



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119371527 A

(43) 申请公布日 2025. 01. 28

(21) 申请号 202411522496.9

(22) 申请日 2020.03.02

(30) 优先权数据

62/813,126 2019.03.03 US

62/813,137 2019.03.03 US

62/838,159 2019.04.24 US

(62) 分案原申请数据

202080018265.8 2020.03.02

(71) 申请人 普罗塞纳生物科学有限公司

地址 爱尔兰都柏林

(72) 发明人 塔洛陈·S·尼扎 罗宾·巴伯尔

菲利普·詹姆斯·多兰三世 刘跃

斯维特拉娜·亚历山大

马克·E·伦茨

(74) 专利代理机构 广州三环专利商标代理有限公司

公司 44202

专利代理师 郝传鑫

(51) Int.Cl.

C07K 16/18 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

G01N 33/60 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 25/16 (2006.01)

C12R 1/91 (2006.01)

权利要求书3页 说明书136页

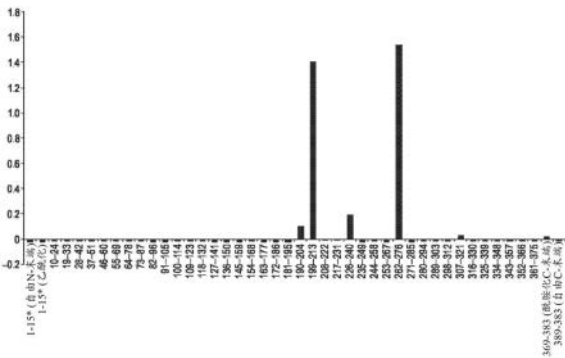
序列表(电子公布) 附图19页

(54) 发明名称

识别tau的抗体

(57) 摘要

本发明提供了特异性结合tau的抗体。所述抗体抑制或延迟与tau相关联的病理和相关联的症状恶化。



1. 一种与人tau特异性结合的分离抗体或其抗原结合抗体片段,其包含:

成熟重链可变区,所述成熟重链可变区包含分别具有SEQ ID NO:8的CDR-H1、具有SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:149的CDR-H2、和具有SEQ ID NO:10的CDR-H3,其中所述重链可变区与SEQ ID NO:18至少90%相同;以及

成熟轻链可变区,所述成熟轻链可变区包含具有SEQ ID NO:12的CDR L1,具有SEQ ID NO:150、151、153、156、158、159、160、163、165、166、167、168、169、170、171、172、173或174的CDR L2,和具有SEQ ID NO:14的CDR L3,其中所述轻链可变区与SEQ ID NO:122至少90%相同。

2. 如权利要求1所述的抗体或抗原结合抗体片段,其中Kabat位置H12、H13、H17、H24、H40、H43、H48、H66、H67、H76、H80、H81和H91中的至少一者能够分别被V、K、T、A、R、Q、I、R、A、D、L、Q和F占据,并且Kabat位置L2、L12、L15、L37、L39、L45、L60和L100中的至少一者能够分别被V、P、L、Q、R、R、D和Q占据。

3. 如权利要求1所述的抗体或抗原结合抗体片段,其中CDR L2包含SEQ ID NO:150、151、163、167、168或169。

4. 如权利要求3所述的抗体或抗原结合抗体片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:18,并且所述轻链可变区包含SEQ ID NO:110、121、122或123。

5. 如权利要求3所述的抗体或抗原结合抗体片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:146,并且所述轻链可变区包含SEQ ID NO:94或122。

6. 如权利要求3所述的抗体或抗原结合抗体片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:18或146,并且所述轻链可变区包含SEQ ID NO:122。

7. 如权利要求1-6中任一项所述的抗体或抗原结合抗体片段,其中所述的抗体或抗原结合抗体片段是嵌合抗体、嵌合抗原结合抗体片段、饰面抗体、饰面抗原结合抗体片段、人源化抗体、或人源化抗原结合抗体片段。

8. 如权利要求1-7中任一项所述的抗体或抗原结合抗体片段,其为抗体。

9. 如权利要求1-7中任一项所述的抗体或抗原结合抗体片段,其为抗原结合抗体片段。

10. 如权利要求9所述的抗体或抗原结合抗体片段,其中所述的抗原结合抗体片段是单链抗体、Fab、或Fab'2片段。

11. 如权利要求9所述的抗体或抗原结合抗体片段,其中所述的抗原结合抗体片段是Fab片段或单链Fv。

12. 如权利要求8所述的抗体或抗原结合抗体片段,其中所述的抗体具有人IgG1同种型。

13. 如权利要求1-7和9-11中任一项所述的抗体或抗原结合抗体片段,其中所述成熟轻链可变区与轻链恒定区融合,并且所述成熟重链可变区与重链恒定区融合。

14. 如权利要求13所述的抗体或抗原结合抗体片段,其中所述重链恒定区是天然人重链恒定区的突变形式,相对于所述天然人重链恒定区,所述天然人重链恒定区的突变形式与Fc γ 受体的结合减少。

15. 如权利要求13或14所述的抗体或抗原结合抗体片段,其中所述重链恒定区属于IgG1同种型。

16. 如权利要求15所述的抗体或抗原结合抗体片段,其中所述重链恒定区具有SEQ ID

NO:176的氨基酸序列。

17. 如权利要求13所述的抗体或抗原结合抗体片段,其中与重链恒定区融合的所述成熟重链可变区具有SEQ ID NO:178的氨基酸序列。

18. 如权利要求17所述的抗体或抗原结合抗体片段,其中所述重链具有SEQ ID NO:180的氨基酸序列。

19. 如权利要求13所述的抗体或抗原结合抗体片段,其中所述轻链恒定区具有SEQ ID NO:177的氨基酸序列。

20. 如权利要求13所述的抗体或抗原结合抗体片段,其中与轻链恒定区融合的所述成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:179的氨基酸序列。

21. 如权利要求20所述的抗体或抗原结合抗体片段,其中所述轻链具有SEQ ID NO:181的氨基酸序列。

22. 如权利要求17所述的抗体或抗原结合抗体片段,其中所述重链具有SEQ ID NO:178的氨基酸序列,并且所述轻链具有SEQ ID NO:179的氨基酸序列。

23. 如权利要求18所述的抗体或抗原结合抗体片段,其中所述重链具有SEQ ID NO:180的氨基酸序列,并且所述轻链具有SEQ ID NO:181的氨基酸序列。

24. 如权利要求13或14所述的抗体或抗原结合抗体片段,其在所述重链恒定区中具有至少一个突变。

25. 如权利要求24所述的抗体或抗原结合抗体片段,其中所述至少一个突变减少所述重链恒定区的补体固定或活化。

26. 如权利要求25所述的抗体或抗原结合抗体片段,其在所述重链恒定区根据EU编号的位置241、264、265、270、296、297、318、320、322、329和331中的一个或多个处具有突变。

27. 如权利要求26所述的抗体或抗原结合抗体片段,其在EU编号的位置318、320和322处具有丙氨酸。

28. 如权利要求8所述的抗体或抗原结合抗体片段,其中所述的抗体具有人IgG2或人IgG4同种型。

29. 如权利要求1-28中任一项所述的抗体或抗原结合抗体片段,其中所述的抗体或抗原结合抗体片段缀合至治疗剂、细胞毒性剂、细胞生长抑制剂、神经营养剂、或神经保护剂。

30. 一种药物组合物,其包含如权利要求1-29中任一项所限定的抗体或抗原结合抗体片段和药学上可接受的载体。

31. 一种核酸,其编码如权利要求8、12和28中任一项所述的抗体的重链和轻链。

32. 一种产生抗体的方法,所述方法包括:

(a) 在细胞培养基中培养用权利要求31所述的核酸转化的细胞,以使所述细胞分泌所述抗体;以及

(b) 从所述细胞培养基中纯化出所述抗体。

33. 一种制备产生抗体的细胞系的方法,所述方法包括:

(a) 将包含权利要求31所述的核酸的载体和选择标志物引入细胞中;

(b) 使所述细胞在用以选择具有增加拷贝数的所述载体的细胞的条件下增殖;

(c) 从所选细胞中分离出单细胞;以及

(d) 将由基于抗体的产量选择的单细胞克隆的细胞建库。

34. 一种产生如权利要求7所述人源化、嵌合或饰面抗体的方法,所述方法包括:

(a) 在细胞培养基中培养用编码所述人源化、嵌合或饰面抗体的重链和轻链的核酸转化的细胞,以使所述细胞分泌所述人源化、嵌合或饰面抗体;以及

(b) 从所述细胞培养基中纯化所述人源化、嵌合或饰面抗体。

35. 一种制备产生如权利要求7所述人源化、嵌合或饰面抗体的细胞系的方法,所述方法包括:

(a) 将编码所述人源化、嵌合或饰面抗体的重链和轻链的载体以及选择标志物引入细胞中;

(b) 使所述细胞在用以选择具有增加拷贝数的所述载体的细胞的条件下增殖;

(c) 从所选细胞中分离单细胞;以及

(d) 将由基于所述人源化、嵌合或饰面抗体的产量选择的单细胞克隆的细胞建库。

36. 权利要求1-29中任一项所述的抗体或抗原结合抗体片段在制造药剂中的应用,所述药剂用于抑制或减少患有tau介导的淀粉样变性或有发展tau介导的淀粉样变性风险的受试者中的tau聚集。

37. 权利要求1-29中任一项所述的抗体或抗原结合抗体片段在制造药剂中的应用,所述药剂用于在受试者中治疗tau相关疾病或实现tau相关疾病的预防。

38. 如权利要求37所述的应用,其中所述tau相关疾病是阿尔茨海默病、唐氏综合征、轻度认知障碍、原发性年龄相关性tau蛋白病、脑炎后帕金森病、创伤后痴呆或拳击员痴呆、皮克氏病、C型尼曼-皮克病、核上性麻痹、额颞痴呆、额颞叶变性、嗜银颗粒病、球状胶质tau蛋白病、关岛肌萎缩性侧索硬化/帕金森痴呆复征、皮质基底节变性(CBD)、路易体痴呆、阿尔茨海默病的路易体变异(LBVAD)、慢性创伤性脑病(CTE)、球状胶质tau蛋白病(GGT)、或进行性核上麻痹(PSP)。

39. 权利要求1-29中任一项所述的抗体或抗原结合抗体片段在制造药剂中的应用,所述药剂用于在受试者中减少tau的异常传播。

40. 权利要求1-29中任一项所述的抗体或抗原结合抗体片段在制造药剂中的应用,所述药剂用于在受试者中诱导tau的吞噬。

41. 权利要求1-29中任一项所述的抗体或抗原结合抗体片段在制造药剂中的应用,所述药剂用于在受试者中抑制tau聚集或沉积。

42. 权利要求1-29中任一项所述的抗体或抗原结合抗体片段在制造药剂中的应用,所述药剂用于在受试者中抑制tau缠结的形成。

43. 权利要求1-29中任一项所述的抗体或抗原结合抗体片段在制造药剂中的应用,所述药剂用于在罹患与tau聚集或沉积相关的疾病或有罹患与tau聚集或沉积相关疾病风险的受试者中检测tau蛋白沉积物。

44. 如权利要求43所述的应用,其中所述与tau聚集或沉积相关的疾病是阿尔茨海默病、唐氏综合征、轻度认知障碍、原发性年龄相关性tau蛋白病、脑炎后帕金森病、创伤后痴呆或拳击员痴呆、皮克氏病、C型尼曼-皮克病、核上性麻痹、额颞痴呆、额颞叶变性、嗜银颗粒病、球状胶质tau蛋白病、关岛肌萎缩性侧索硬化/帕金森痴呆复征、皮质基底节变性(CBD)、路易体痴呆、阿尔茨海默病的路易体变异(LBVAD)、慢性创伤性脑病(CTE)、球状胶质tau蛋白病(GGT)、或进行性核上麻痹(PSP)。

识别tau的抗体

[0001] 分案申请说明

[0002] 本申请是申请日为2020年03月02日,申请号为202080018265.8,发明名称为“识别tau的抗体”的发明专利申请的分案申请。

[0003] 相关申请的交叉引用

[0004] 本申请要求以下专利申请的优先权:2019年3月3日提交的美国临时申请号62/813,126、2019年3月3日提交的美国临时申请号62/813,137,以及2019年4月24日提交的美国临时申请号62/838,159,这些临时申请中的每一者出于所有目的以引用方式全文并入。

[0005] 对序列表的引用

[0006] 该申请包括文件名为50887-0030CN2_SL_ST26.XML的电子序列表,该电子序列表创建于2024年10月08日(实际序列内容创建于2020年02月24日)并且包含200,650个字节,其据此出于所有目的以引用方式全文并入。

背景技术

[0007] Tau是能够以磷酸化形式存在的众所周知的人蛋白(参见,例如,Goedert, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.85:4051-4055 (1988);Goedert,EMBO J.8:393-399 (1989); Lee,Neuron 2:1615-1624 (1989);Goedert,Neuron3:519-526 (1989);Andreadis, Biochemistry 31:10626-10633 (1992)。据报道,Tau在稳定微管方面发挥作用,尤其是在中枢神经系统中。总tau(t-tau,即磷酸化和非磷酸化形式)和磷酸化-tau(p-tau,即磷酸化tau)由脑部响应于神经元损伤和神经变性而释放,并且据报道,相对于普通群体,在阿尔茨海默病患者的CSF中以增大的水平存在(Jack等人,Lancet Neurol 9:119-28 (2010))。

[0008] Tau是神经原纤维缠结的主要成分,其与斑一起是阿尔茨海默病的标志性特征。缠结构成直径测量为10nm的异常原纤维,其成对出现,以螺旋方式缠绕,具有80nm的规则周期性。神经原纤维缠结内的tau被异常磷酸化(过度磷酸化),其中磷酸酯基团附接于分子上的特定位点。在阿尔茨海默病中的内嗅皮质的II层神经元、海马的CA1和钩回下区、扁桃体和新皮质的深层(III层、V层和表层VI)中观察到神经原纤维缠结的严重受累。另外已有报道,过度磷酸化的tau干扰微管组装,这可能促进神经元网络的破坏。

[0009] Tau内含物是几种神经变性疾病的定义神经病理学的一部分,所述疾病包括阿尔茨海默病、额颞叶变性、进行性核上性麻痹以及皮克氏病(Pick's disease)。

发明内容

[0010] 在一个方面,本发明提供了与人tau特异性结合的分离的抗体,其包含成熟重链可变区和成熟轻链可变区,该成熟重链可变区包含具有SEQ ID NO:8的CDR-H1、具有SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:149的CDR-H2,和具有SEQ ID NO:10的CDR-H3,其中该重链可变区与SEQ ID NO:18至少90%相同;该成熟轻链可变区包含具有SEQ ID NO:12的CDR-L1,具有SEQ ID NO:150、151、153、156、158、159、160、163、165、166、167、168、169、170、171、172、173或174的CDR-L2,和具有SEQ ID NO:14的CDR-L3,其中该轻链可变区与SEQ ID NO:122至少90%相

同。

[0011] 在一些抗体中,位置H12、H13、H17、H24、H40、H43、H48、H66、H67、H76、H80、H81和H91中的至少一者能够分别被V、K、T、A、R、Q、I、R、A、D、L、Q和F占据,并且位置L2、L12、L15、L37、L39、L45、L60和L100中的至少一者能够分别被V、P、L、Q、R、R、D和Q占据。

[0012] 在一些抗体中,CDR-L2包含SEQ ID NO:150、151、163、167、168或169。在一些抗体中,该重链可变区包含SEQ ID NO:18,并且该轻链可变区包含SEQ ID NO:110、121、122或123。

[0013] 在一些抗体中,该轻链可变区包含SEQ ID NO:110。在一些抗体中,该轻链可变区包含SEQ ID NO:121。在一些抗体中,该轻链可变区包含SEQ ID NO:122。在一些抗体中,该轻链可变区包含SEQ ID NO:123。

[0014] 在一些抗体中,该重链可变区包含SEQ ID NO:146,并且该轻链可变区包含SEQ ID NO:94或122。在一些抗体中,该轻链可变区包含SEQ ID NO:94。在一些抗体中,该轻链可变区包含SEQ ID NO:122。

[0015] 在一些抗体中,该重链可变区包含SEQ ID NO:18或146,并且该轻链可变区包含SEQ ID NO:122。

[0016] 在另一个方面,本发明提供了与人tau特异性结合的抗体,其包含成熟重链可变区和成熟轻链可变区,该成熟重链可变区包含分别具有SEQ ID NO:8、9和10的CDR H1、CDR H2和CDR H3,不同的是位置H28能够被N或T占据,H54能够被N或D占据,H56能够被D或E占据,位置H58能够被V或I占据,并且位置H60能够被D或E占据,该成熟轻链可变区包含分别具有SEQ ID NO:12、13和14的CDR L1、CDR L2和CDR L3,不同的是位置L24能够被K或R占据,位置L50能够被L、E、D、G或V占据,位置L52能够被S或G占据,并且位置L54能够被L、D、G、N、E、Q、K、R、T、V或S占据,其中以下位置中的至少一者被所指定的氨基酸占据:H1被Q占据,H5被Q占据,H11被L占据,H20被L占据,H23被T占据,H38被K占据,H75被S占据,H56被E占据,H58被I占据,H60被E占据,H82c被V占据,L10被T占据,L17被E占据,L24被R占据,L37被Q占据,L47被G、N、D、E、P、T、S或A占据,L48被G或D占据,L49被E占据,L50被E、D、G或V占据,L52被G占据,L54被D、G、N、E、Q、K、R、T、V或S占据,L83被L占据,L86被H占据,L100被Q占据,L106被L占据。

[0017] 在另一个方面,本发明提供了与人tau结合的分离的单克隆抗体,其包含单克隆抗体3D6的三个轻链CDR和三个重链CDR,其中3D6是小鼠抗体,其特征在于具有包括SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变区和具有包括SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链可变区,不同的是位置H27能够被F或Y占据,位置H28能够被N或T占据,位置H29能够被I或F占据,位置H30能够被K或T占据,位置H51能够被I或V占据,位置H54能够被N或D占据,位置H60能够被D、A或E占据,位置H61能够被P或E占据,位置H102能够被F或Y占据,位置L50能够被L、E、D、G或V占据,位置L52能够被S或G占据,并且位置L54能够被L、D、G、N、E、Q、K、R、T、V或S占据,其中以下位置中的至少一者被所指定的氨基酸占据:L37被Q占据,L47被G、N、D、E、P、T、S或A占据,L48被G或D占据,L49被E占据,L50被E、D、G或V占据,L52被G占据,L54被D、G、N、E、Q、K、R、T、V或S占据,L100被Q占据,H60被E占据,H82c被V占据。

[0018] 在一些抗体中,CDR-H1具有包括SEQ ID NO:86的氨基酸序列。在一些抗体中,CDR-H2具有包括SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:92或SEQ ID NO:149的氨基酸序列。在一些抗体中,CDR-L2具有包括SEQ ID NO:150-175中的任一者的氨基酸序列。在一些抗体

中,CDR-L1具有包括SEQ ID NO:89的氨基酸序列。在一些抗体中,CDR-H1具有包括SEQ ID NO:86的氨基酸序列,并且CDR-H2具有包括SEQ ID NO:87的氨基酸序列。在一些抗体中,CDR-H1具有包括SEQ ID NO:86的氨基酸序列,并且CDR-H2具有包括SEQ ID NO:88的氨基酸序列。在一些抗体中,CDR-H1具有包括SEQ ID NO:86的氨基酸序列,并且CDR-H2具有包括SEQ ID NO:92的氨基酸序列。在一些抗体中,CDR-H1具有包括SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:59或SEQ ID NO:60的氨基酸序列。在一些抗体中,CDR-H2具有包括SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64或SEQ ID NO:149的氨基酸序列。在一些抗体中,CDR-H3具有包括SEQ ID NO:65的氨基酸序列。在一些抗体中,CDR-L2具有包括SEQ ID NO:150-175中的任一者的氨基酸序列。

[0019] 一些抗体是人源化抗体、饰面抗体或嵌合抗体。

[0020] 一些抗体包含人源化成熟重链可变区和人源化成熟轻链可变区,该人源化成熟重链可变区具有与SEQ ID NO:76-80以及SEQ ID NO:90-91中的任一者至少95%相同的氨基酸序列,并且该人源化成熟轻链可变区具有与SEQ ID NO:83-85中的任一者至少90%相同的氨基酸序列。

[0021] 一些抗体包含人源化成熟重链可变区和人源化成熟轻链可变区,该人源化成熟重链可变区具有与SEQ ID NO:18以及SEQ ID NO:146-148中的任一者至少95%相同的氨基酸序列,并且该人源化成熟轻链可变区具有与SEQ ID NO:93-145中的任一者至少90%相同的氨基酸序列。

[0022] 在一些抗体中,VH区中的以下位置中的至少一者被所指定的氨基酸占据:H93被S占据,并且H94被T占据。在一些抗体中,位置H93和H94分别被S和T占据。在一些抗体中,VH区中的位置H91被F占据。

[0023] 在一些抗体中,VH区中的以下位置中的至少一者被所指定的氨基酸占据:H1被E占据,H5被V占据,H11被V占据,H20被I占据,H23被K占据,H38被R占据,H42被G占据,H43被K占据,H66被R占据,H75被T占据,H76被D占据,H81被E占据,H108被L占据,H109被V占据。在一些抗体中,VH区中的位置H1、H5、H11、H20、H23、H38、H42、H43、H66、H75、H76、H81、H108和H109分别被E、V、V、I、K、R、G、K、R、T、D、E、L和V占据。

[0024] 在一些抗体中,VH区中的以下位置中的至少一者被所指定的氨基酸占据:H17被T占据,H80被M占据,H83被R占据。在一些抗体中,VH区中的位置H17、H80和H83分别被T、M和R占据。

[0025] 在一些抗体中,VH区中的位置H58被I占据。

[0026] 在一些抗体中,VH区中的以下位置中的至少一者被所指定的氨基酸占据:H28被T占据,H67被V占据。在一些抗体中,VH区中的位置H28和H67分别被T和V占据。

[0027] 在一些抗体中,VH区中的以下位置中的至少一者被所指定的氨基酸占据:H54被D占据,H56被E占据。在一些抗体中,VH区中的位置H54和H56分别被D和E占据。

[0028] 在一些抗体中,VH区中的以下位置中的至少一者被所指定的氨基酸占据:H1被Q或E占据,H5被Q或V占据,H11被L或V占据,H17被S或T占据,H20被L或I占据,H23被T或K占据,H28被N或T占据,H38被K或R占据,H42被E或G占据,H43被Q或K占据,H54被N或D占据,H56被D或E占据,H58被V或I占据,H60被D或E占据,H66被K或R占据,H67被A或V占据,H75被S或T占据,H76被N或D占据,H80被L或M占据,H81被Q或E占据,H82c被L或V占据,H83被T或R占据,H91

被F或Y占据,H93被S占据,H94被T占据,H108被T或L占据,H109被L或V占据。

[0029] 在一些抗体中,VH区中的以下位置中的至少一者被所指定的氨基酸占据:H10被E或D占据,H12被K或V占据,H13被K或R占据,H17被T、L或S占据,H24被V或A占据,H27被F或Y占据,H28被N或T占据,H29被I或F占据,H30被K或T占据,H38是由Q或R占据,H40被A或R占据,H42被G或E占据,H43被K或Q占据,H48被M或I占据,H51被V或I占据,H54被N或D占据,H60被D、A或E占据,H61被P或E占据,H66被R或K占据,H67被V或A占据,H76被D或N占据,H80被M或L占据,H81被E或Q占据,H82a被S或G占据,H82c被L或V占据,H83被T或R占据,H91被Y或F占据,H93被A或S占据,H102被F或Y占据,H108被T或L占据,H109被L或V占据。

[0030] 在一些抗体中,VH区中的位置H91、H93和H94分别被F、S和T占据。

[0031] 在一些抗体中,VH区中的位置H1、H5、H11、H20、H23、H38、H42、H43、H66、H75、H76、H81、H91、H93、H94、H108和H109分别被E、V、V、I、K、R、G、K、R、T、D、E、F、S、T、L和V占据。在一些抗体中,VH区中的位置H1、H5、H11、H17、H20、H23、H38、H42、H43、H58、H66、H75、H76、H80、H81、H83、H93、H94、H108和H109分别被E、V、V、T、I、K、R、G、K、I、R、T、D、M、E、R、S、T、L和V占据。在一些抗体中,VH区中的位置H1、H5、H11、H17、H20、H23、H28、H38、H42、H43、H58、H66、H67、H75、H76、H80、H81、H83、H93、H94、H108和H109分别被E、V、V、T、I、K、T、R、G、K、I、R、V、T、D、M、E、R、S、T、L和V占据。在一些抗体中,VH区中的位置H1、H5、H11、H17、H20、H23、H28、H38、H42、H43、H54、H56、H58、H66、H67、H75、H76、H80、H81、H83、H93、H94、H108和H109分别被E、V、V、T、I、K、T、R、G、K、D、E、I、R、V、T、D、M、E、R、S、T、L和V占据。

[0032] 在一些抗体中,VH区中的位置H1、H5、H11、H17、H20、H23、H28、H38、H42、H43、H54、H56、H66、H67、H75、H76、H80、H81、H83、H91、H93、H94、H108和H109分别被E、V、V、T、I、K、T、R、G、K、D、E、R、V、T、D、M、E、R、F、S、T、L和V占据。在一些抗体中,VH区中的位置H1、H5、H11、H17、H20、H23、H28、H38、H42、H43、H54、H56、H66、H67、H75、H76、H80、H81、H83、H93、H94、H108和H109分别被E、V、V、T、I、K、T、R、G、K、D、E、R、V、T、D、M、E、R、S、T、L和V占据。

[0033] 在一些抗体中,位置H60被E占据。在一些抗体中,位置H82C被V占据。在一些抗体中,位置H60、H80、H81、H82c和H83分别被E、M、E、V和R占据。

[0034] 在一些抗体中,VL区中的以下位置中的至少一者被所指定的氨基酸占据:L7被S占据,L10被S占据,L15被L占据,L83被V占据,L86被Y占据,并且L106被I占据。在一些抗体中,位置L7、L10、L15、L83、L86和L106分别被S、S、L、V、Y和Y占据。

[0035] 在一些抗体中,VL区中的以下位置中的至少一者被所指定的氨基酸占据:L7为T或S,L10为T或S,L15为I或L,L17为Q或E,L24为K或R,L37为L或Q,L45为K或R,L47为L、G、N、D、E、P、T、S或A,L48为I、G、或D,L49为Y或E,L50为L、E、D、G或V,L52为S或G,L54为L、D、G、N、E、Q、K、R、T、V或S,L83为L或V,L86为H或Y,L100为A或Q,L106为L或I。

[0036] 在一些抗体中,VL区中的以下位置中的至少一者被所指定的氨基酸占据:L2为V或I,L7为S或T,L12为P或S,L15为L或I,L36为L,L37为L或Q,L45为R或K,L47为L、G、N、D、E、P、T、S或A,L48为I、G或D,L49为Y或E,L50为L、E、D、G或V,L52为S或G,L54为L、D、G、N、E、Q、K、R、T、V,L60为D或S,L100为G或Q。

[0037] 在一些抗体中,VL区中的位置L7、L10、L15、L83、L86和L106分别被S、S、L、V、Y和I占据。在一些抗体中,VL区中的位置L7、L10、L15、L17、L24、L37、L45、L83、L86、L100和L106分别被S、S、L、E、R、Q、R、V、Y、Q和I占据。

[0038] 在一些抗体中,位置L54被D占据。在一些抗体中,位置L54被G占据。在一些抗体中,位置L54被N占据。在一些抗体中,位置L54被E占据。在一些抗体中,位置L50被E占据。在一些抗体中,位置L54被Q占据。在一些抗体中,位置L50被D占据。在一些抗体中,位置L54被K占据。在一些抗体中,位置L54被R占据。在一些抗体中,位置L54被T占据。在一些抗体中,位置L50被G占据。在一些抗体中,位置L48被G占据。在一些抗体中,位置L48被D占据。在一些抗体中,位置L47被G占据。在一些抗体中,位置L49被E占据。在一些抗体中,位置L54被V占据。在一些抗体中,位置L54被S占据。

[0039] 在一些抗体中,位置L52被G占据。在一些抗体中,位置L47被N占据。在一些抗体中,位置L47被D占据。在一些抗体中,位置L47被E占据。在一些抗体中,位置L47被P占据。在一些抗体中,位置L47被T占据。在一些抗体中,位置L47被S占据。在一些抗体中,位置L47被A占据。在一些抗体中,位置L50被V占据。

[0040] 在一些抗体中,位置L37、L50和L54分别被Q、G和R占据。在一些抗体中,位置L37、L50和L54分别被Q、G和G占据。在一些抗体中,位置L37、L52和L54分别被Q、G和G占据。在一些抗体中,位置L37、L52和L54分别被Q、G和R占据。在一些抗体中,位置L37、L52和L54分别被Q、G和T占据。在一些抗体中,位置L37、L52和L54分别被Q、G和D占据。在一些抗体中,L37和L54分别被Q和R占据。

[0041] 在一些抗体中,位置L37和L54分别被Q和G占据。在一些抗体中,位置L37和L54分别被Q和D占据。在一些抗体中,位置L37和L50分别被Q和G占据。在一些抗体中,位置L37和L50分别被Q和D占据。在一些抗体中,位置L37和L54分别被Q和T占据。在一些抗体中,位置L37和L52分别被Q和G占据。在一些抗体中,位置L37和L54分别被Q和E占据。在一些抗体中,在一些抗体中,位置L37、L50和L54分别被Q、D和G占据。在一些抗体中,位置L37、L50和L54分别被Q、D和R占据。

[0042] 在一些抗体中,位置L37、L50和L54分别被Q、E和G占据。在一些抗体中,位置L37、L50和L54分别被Q、E和R占据。在一些抗体中,位置L37、L50、L54和L100分别被Q、G、R和Q占据。在一些抗体中,位置L37、L50、L54和L100分别被Q、G、G和Q占据。在一些抗体中,位置L37、L52、L54和L100分别被Q、G、R和Q占据。在一些抗体中,位置L37、L52、L54和L100分别被Q、G、D和Q占据。在一些抗体中,位置L37、L50、L54和L100分别被Q、D、G和Q占据。在一些抗体中,位置L37、L50、L54和L100分别被Q、D、R和Q占据。

[0043] 在一些抗体中,位置L37、L50、L54和L100分别被Q、V、D和Q占据。在一些抗体中,位置L37被Q占据。在一些抗体中,位置L100被Q占据。

[0044] 在一些抗体中,成熟重链可变区具有SEQ ID NO:76至80和SEQ ID NO:90至91中的任一者的氨基酸序列,并且成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:83至85中的任一者的氨基酸序列。在一些抗体中,成熟重链可变区具有SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:146-148中的任一者的氨基酸序列,并且成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:93-145中的任一者的氨基酸序列。

[0045] 在一些抗体中,成熟重链可变区具有SEQ ID NO:76的氨基酸序列,并且成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:83的氨基酸序列。在一些抗体中,成熟重链可变区具有SEQ ID NO:76的氨基酸序列,并且成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:84的氨基酸序列。在一些抗体中,成熟重链可变区具有SEQ ID NO:76的氨基酸序列,并且成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:85的氨基酸序列。

可变区具有SEQ ID NO:94的氨基酸序列。

[0056] 在一些抗体中,成熟重链可变区具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列,并且成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:103的氨基酸序列。

[0057] 例如,抗体可以是嵌合抗体、饰面抗体或人源化抗体。

[0058] 抗体可以是完整的嵌合、饰面或人源化抗体或者结合片段、单链抗体Fab片段、Fab' 2片段,或单链Fv。一些抗体具有人IgG1同种型,而其他抗体可具有人IgG2或IgG4同种型。一些抗体具有与轻链恒定区融合的成熟轻链可变区和与重链恒定区融合的成熟重链可变区。一些抗体的重链恒定区是天然人重链恒定区的突变形式,相对于天然人重链恒定区,天然人重链恒定区的突变形式与Fc γ 受体的结合减少。

[0059] 在一些抗体中,重链恒定区具有SEQ ID NO:176的氨基酸序列。在一些抗体中,与重链恒定区融合的成熟重链可变区具有SEQ ID NO:178的氨基酸序列。一些抗体还包含与成熟重链可变区和/或成熟轻链可变区融合的信号肽。在一些抗体中,重链具有SEQ ID NO:180的氨基酸序列。在一些抗体中,轻链恒定区具有SEQ ID NO:177的氨基酸序列。在一些抗体中,与轻链恒定区融合的成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:179的氨基酸序列。在一些抗体中,轻链具有SEQ ID NO:181的氨基酸序列。在一些抗体中,重链具有SEQ ID NO:178的氨基酸序列,并且轻链具有SEQ ID NO:179的氨基酸序列。在一些抗体中,重链具有SEQ ID NO:180的氨基酸序列,并且轻链具有SEQ ID NO:181的氨基酸序列。

[0060] 一些抗体可在恒定区中具有至少一个突变,诸如减少恒定区的补体固定或活化的突变,例如,在根据EU编号的位置241、264、265、270、296、297、318、320、322、329和331中的一个或多个处的突变。一些抗体在位置318、320和322处具有丙氨酸。一些抗体可以是至少95%w/w纯。抗体可缀合于治疗剂、细胞毒性剂、细胞生长抑制剂、神经营养剂,或神经保护剂。

[0061] 在另一方面,本发明提供了一种药物组合物,其包含本文公开的任何抗体和药学上可接受的载剂。

[0062] 在另一方面,本发明提供了一种编码本文公开的任何抗体的重链和/或轻链的核酸,一种包含所述核酸的重组表达载体以及一种用所述重组表达载体转化的宿主细胞。

[0063] 在一些核酸中,重链由包括SEQ ID NO:182的序列编码,并且轻链由包括SEQ ID NO:183的序列编码。

[0064] 还提供了产生抗体的方法,所述抗体诸如人源化、嵌合或饰面抗体,例如3D6的人源化、嵌合或饰面形式。在此类方法中,对用编码抗体的重链和轻链的核酸转化的细胞进行培养,以使细胞分泌抗体。然后可以从细胞培养基中纯化抗体。

[0065] 产生本文公开的任何抗体的细胞系可以通过以下方式产生:将编码抗体的重链和轻链以及选择性标志物的载体引入细胞中,使细胞在用以选择具有增加拷贝数的载体的细胞的条件下增殖,从所选细胞中分离单细胞;并且将由基于抗体的产量选择的单细胞克隆的细胞建库。

[0066] 在另一个方面,本发明包括包含编码成熟重链可变区和成熟轻链可变区的核酸的载体,所述核酸与一种或多种调节序列可操作地连接,以实现本文所公开的任何抗体在哺乳动物细胞中的表达。在一些载体中,表达的抗体为scFv或Fab片段。在一些载体中,一种或多种调节序列包括启动子、增强子、核糖体结合位点和转录终止信号中的一者或多者。在一

些载体中,该核酸还编码与成熟重链可变区和成熟轻链可变区融合的信号肽。在一些载体中,该核酸经密码子优化以便在宿主细胞中表达。在一些载体中,一种或多种调节序列包括真核启动子。在一些载体中,该核酸还编码选择性基因。

[0067] 在又一个方面,本发明提供了在哺乳动物细胞中表达抗体的方法,包括将本文所公开的核酸结合到转基因动物的基因组中,由此表达所述抗体。

[0068] 在又一个方面,本发明提供了第一载体和第二载体,这些载体分别包含编码成熟重链可变区的核酸和编码成熟轻链可变区的核酸,所述核酸各自与一种或多种调节序列可操作地连接,以实现本文所公开的任何抗体的表达,以及包含所述核酸的宿主细胞。在一些第一载体和第二载体中,所述核酸分别还编码与成熟重链可变区融合的重链恒定区以及与成熟轻链可变区融合的轻链恒定区。在一些第一载体和第二载体中,重链恒定区具有SEQ ID NO:176的序列,该序列具有或不具有C-末端赖氨酸,并且轻链恒定区具有SEQ ID NO:177的序列。

[0069] 在又一个方面,本发明提供了在哺乳动物细胞中表达抗体的方法,包括将本文所公开的任何核酸结合到转基因动物的基因组中,由此表达所述抗体。

[0070] 还提供了产生抗体(诸如人源化抗体、嵌合抗体或饰面抗体)的方法。在此类方法中,培养用编码本文所公开的任何抗体的抗体的重链和轻链的核酸转化的细胞,使得这些细胞分泌所述抗体。然后可以从细胞培养基中纯化抗体。

[0071] 产生本文公开的任何抗体的细胞系可以通过以下方式产生:将编码权利要求1所述抗体的重链和轻链的载体以及选择性标志物引入细胞中,使这些细胞在用于选择具有增加拷贝数的载体的细胞的条件下增殖,从所选细胞中分离单细胞,以及将由基于抗体的产量选择的单细胞克隆的细胞建库。

[0072] 一些细胞可以在选择性条件下增殖,并且筛选天然表达和分泌至少100mg/L/ 10^6 个细胞/24小时的细胞系。可以从所选细胞中分离单细胞。然后可以将由单细胞克隆的细胞建库。可以基于期望特性选择单细胞,诸如抗体的产量。示例性细胞系是表达3D6或3D6的人源化型式的细胞系。

[0073] 本发明还提供了抑制或减少患有tau介导的淀粉样变性或有发展tau介导的淀粉样变性风险的受试者中的tau聚集的方法,包括向受试者施用本文公开的抗体的有效方案,从而抑制或减少受试者中的tau聚集。示例性抗体包括3D6的人源化型式。

[0074] 还提供了在受试者中治疗tau相关疾病或实现其预防的方法,包括施用本文公开的抗体的有效方案并且从而治疗疾病或实现其预防。这种疾病的实例是阿尔茨海默病、唐氏综合征、轻度认知障碍、原发性年龄相关性tau蛋白病、脑炎后帕金森病、创伤后痴呆或拳击员痴呆、皮克氏病、C型尼曼-皮克病、核上性麻痹、额颞叶痴呆、额颞叶变性、嗜银颗粒病、球状胶质tau蛋白病、关岛肌萎缩性侧索硬化/帕金森痴呆复征、皮质基底节变性(CBD)、路易体痴呆、阿尔茨海默病的路易体变异(LBVAD)、慢性创伤性脑病(CTE)、球状胶质tau蛋白病(GGT),或进行性核上性麻痹(PSP)。在一些方法中,tau相关疾病是阿尔茨海默病。在一些方法中,患者是ApoE4载体。

[0075] 还提供了减少tau的异常传播的方法,包括施用本文公开的抗体的有效方案并且从而减少tau的传播。

[0076] 还提供了诱导tau的吞噬的方法,包括施用本文公开的抗体的有效方案并且从而

诱导tau的吞噬。

[0077] 还提供了抑制tau聚集或沉积的方法,包括施用本文公开的抗体的有效方案,从而抑制tau聚集或沉积。

[0078] 还提供了抑制tau缠结形成的方法,包括施用本文公开的抗体的有效方案。

[0079] 本发明还提供了一种在患有与tau聚集或沉积相关联的疾病或有患所述疾病风险的受试者中检测tau蛋白沉积物的方法,包括向受试者施用本文公开的抗体,以及检测受试者中与tau结合的抗体。这种疾病的实例是阿尔茨海默病、唐氏综合征、轻度认知障碍、原发性年龄相关性tau蛋白病、脑炎后帕金森病、创伤后痴呆或拳击员痴呆、皮克氏病、C型尼曼-皮克病、核上性麻痹、额颞叶痴呆、额颞叶变性、嗜银颗粒病、球状胶质tau蛋白病、关岛肌萎缩性侧索硬化/帕金森痴呆复征、皮质基底节变性(CBD)、路易体痴呆、阿尔茨海默病的路易体变异(LBVAD)、慢性创伤性脑病(CTE)、球状胶质tau蛋白病(GGT),或进行性核上性麻痹(PSP)。在一些实施方案中,通过静脉内注射将抗体施用到受试者体内。在一些实施方案中,通过颅内注射或通过钻取穿透受试者的颅骨的孔来将抗体直接施用于受试者的脑部。在一些实施方案中,对抗体进行标记。在一些实施方案中,抗体用荧光标记、顺磁性标记或放射性标记进行标记。在一些实施方案中,使用正电子发射断层摄影术(PET)或单光子发射计算机断层摄影术(SPECT)检测放射性标记。

[0080] 本发明还提供了一种在正接受与tau聚集或沉积相关联的疾病的治疗的受试者中测量治疗的功效的方法,包括在通过向受试者施用本文公开的抗体进行治疗之前测量受试者中tau蛋白沉积物的第一水平,并且检测受试者中与tau结合的抗体的第一量;向受试者施用治疗;在通过向受试者施用抗体进行治疗之后测量受试者中tau蛋白沉积物的第二水平,并且检测受试者中与tau结合的抗体;其中tau蛋白沉积物水平的降低表明对治疗的积极应答。

[0081] 本发明还提供了一种在正接受与tau聚集或沉积相关联的疾病的治疗的受试者中测量治疗的功效的方法,包括在通过向受试者施用本文公开的抗体进行治疗之前测量受试者中tau蛋白沉积物的第一水平,并且检测受试者中与tau结合的抗体的第一量;向受试者施用治疗;在通过向受试者施用抗体进行治疗之后测量受试者中tau蛋白沉积物的第二水平,并且检测受试者中与tau结合的抗体的第二量;其中tau蛋白沉积物的水平没有变化或tau蛋白沉积物的少量增加表明对治疗的积极应答。

[0082] 在另一个方面,本发明提供了产生在式KXXSXXNX(K/H)H(SEQ ID NO:191)或KIGSLDNITH(SEQ ID NO:194)的基序内的表位处与人tau特异性结合的抗体的方法,包括用人tau或其片段使动物免疫以产生抗体,并且筛选所产生的抗体以获得在所述基序内特异性结合的抗体。在另一个方面,本发明提供了产生与由残基KXXSXXNX(K/H)H(SEQ ID NO:191)或KIGSLDNITH(SEQ ID NO:194)组成的肽特异性结合的抗体的方法,包括用人tau或其片段使动物免疫以产生抗体,并且筛选所产生的抗体以获得与所述肽特异性结合的抗体。在另一个方面,本发明提供了产生与包含KXXSXXNX(K/H)H(SEQ ID NO:191)的表位特异性结合的抗体的方法,包括用tau或其片段使动物免疫,并且筛选与所述表位特异性结合的抗体。

[0083] 在一些方法中,用含有383个氨基酸的人tau(4R0N)使动物免疫。在一些方法中,所述人tau含有P301S突变。在一些方法中,所述人tau是N-末端带His标签的重组tau。

[0084] 在一些方法中,所述筛选测定所述抗体与最多15个氨基酸的一种或多种肽之间的特异性结合,所述一种或多种肽分别包含KIGSTENLKH (SEQ ID NO:188)、KCGSKDNIKH (SEQ ID NO:192)、KCGSLGNIHH (SEQ ID NO:193)或由KXXSXXNX (K/H)H (SEQ ID NO:191)表示的任何其他共有基序。在一些方法中,所述一种或多种肽分别包含KIGSTENLKH (SEQ ID NO:188)或KCGSKDNIKH (SEQ ID NO:192)或KCGSLGNIHH (SEQ ID NO:193)。在一些方法中,用与载体连接的最多15个氨基酸的tau片段使动物免疫,所述tau片段包含KXXSXXNX (K/H)H (SEQ ID NO:191)。在一些方法中,肽为KIGSTENLKH (SEQ ID NO:188)或KCGSKDNIKH (SEQ ID NO:192)或KCGSLGNIHH (SEQ ID NO:193)。

附图说明

[0085] 图1描绘了被设计成绘制由鼠3D6单克隆抗体结合的表位的图谱的实验的结果。

[0086] 图2描绘了小鼠3D6抗体 (SEQ ID NO:7) 和3D6抗体的人源化型式 (hu3D6VHvb1、hu3D6VHvb2、hu3D6VHvb3、hu3D6VHvb4、hu3D6VHvb5、hu3D6VHvb6和hu3D6VHvb7) 的重链可变区与人种系重链可变区序列IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:25) 和人受体重链可变区序列2RCS VH hFrwk (SEQ ID NO:75) 的比对。hu3D6VHvb1是SEQ ID NO:76, hu3D6VHvb2是SEQ ID NO:77, hu3D6VHvb3是SEQ ID NO:78, hu3D6VHvb4是SEQ ID NO:79, hu3D6VHvb5是SEQ ID NO:80, hu3D6VHvb6是SEQ ID NO:90, 并且hu3D6VHvb7是SEQ ID NO:91。如由Kabat/Chothia复合物所定义的CDR以粗体显示。

[0087] 图3描绘了小鼠3D6抗体 (SEQ ID NO:11) 和3D6抗体的人源化型式 (hu3D6VLvb1、hu3D6VLvb2和hu3D6VLvb3) 的轻链可变区与人种系轻链可变区序列IGKV2-30*02 (SEQ ID NO:27) 和人受体ARX71335_VL_hFrwk (SEQ ID NO:82) 的比对。hu3D6VLvb1是SEQ ID NO:83, hu3D6VLvb2是SEQ ID NO:84, 并且hu3D6VLvb3是SEQ ID NO:85。如由Kabat所定义的CDR以粗体显示。

[0088] 图4A、图4B和图4C描绘了所选择的小鼠单克隆抗-tau抗体的ELISA筛选测定的结果。

[0089] 图5描绘了所选小鼠单克隆抗-tau抗体与重组人tau的结合动力学。

[0090] 图6描绘了所选小鼠单克隆抗-tau抗体的功能性阻断测定的结果。

[0091] 图7描绘了所选小鼠单克隆抗-tau抗体的解聚测定的结果。

[0092] 图8描绘了示出3D6和5G8免疫捕获来自人阿尔茨海默病组织的tau的实验的结果。

[0093] 图9A和图9B示出了鼠3D6的重链可变区 (SEQ ID NO:7) 和3D6抗体的人源化型式 (hu3D6VHvb1、hu3D6VHvb2、hu3D6VHvb3、hu3D6VHvb4、hu3D6VHvb5、hu3D6VHvb6、hu3D6VHvb7、hu3D6VHvb1bA11、h3D6VHvb8和h3D6VHvb9) 的重链可变区与人种系重链可变区序列IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:25) 和人受体重链可变区序列2RCS VH hFrwk (SEQ ID NO:75) 的比对。hu3D6VHvb1为SEQ ID NO:76, hu3D6VHvb2为SEQ ID NO:77, hu3D6VHvb3为SEQ ID NO:78, hu3D6VHvb4为SEQ ID NO:79, hu3D6VHvb5为SEQ ID NO:80, hu3D6VHvb6为SEQ ID NO:90, hu3D6VHvb7为SEQ ID NO:91, hu3D6VHvb1bA11为SEQ ID NO:18, h3D6VHvb8为SEQ ID NO:146, 并且h3D6VHvb9为SEQ ID NO:148。与鼠3D6的重链可变区 (SEQ ID NO:7) 的残基相同的残基用“.”标记。如由Kabat/Chothia复合物所定义的CDR以粗体显示。

[0094] 图10A、图10B、图10C和图10D示出了3D6抗体的以下人源化型式的轻链可变区的比

对:hu3D6VLv2(SEQ ID NO:21)、hu3D6VLv2 L37Q(SEQ ID NO:143)、hu3D6VLv2 L50G(SEQ ID NO:103)、hu3D6VLv2 S52G(SEQ ID NO:110)、hu3D6VLv2 L54G(SEQ ID NO:94)、hu3D6VLv2 L54D(SEQ ID NO:93)、hu3D6VLv2 L54K(SEQ ID NO:100)、hu3D6VLv2 L54R(SEQ ID NO:101)、hu3D6VLv2 L54T(SEQ ID NO:102)、hu3D6VLv2 L37Q_L50G(SEQ ID NO:128)、hu3D6VLv2 L37Q_L50D(SEQ ID NO:129)、hu3D6VLv2L37Q_S52G(SEQ ID NO:131)、hu3D6VLv2 L37Q_L54G(SEQ ID NO:126)、hu3D6VLv2 L37Q_L54R(SEQ ID NO:125)、hu3D6VLv2 L37Q_L54T(SEQ ID NO:130)、hu3D6VLv2 L37Q_L54D(SEQ ID NO:127)、hu3D6VLv2L37Q_L54E(SEQ ID NO:145)、hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R(SEQ ID NO:119)、hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G(SEQ ID NO:120)、hu3D6VLv2L37Q_L50D_L54R(SEQ ID NO:133)、hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54G(SEQ ID NO:132)、hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54D(SEQ ID NO:124)、hu3D6VLv2L37Q_S52G_L54G(SEQ ID NO:121)、hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54T(SEQ ID NO:123)、hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R(SEQ ID NO:122)、hu3D6VLv2L37Q_L50D_L54G_G100Q(SEQ ID NO:140)、hu3D6VLv2L37Q_L50D_L54R_G100Q(SEQ ID NO:141)、hu3D6VLv2L37Q_L50G_L54G_G100Q(SEQ ID NO:137)、hu3D6VLv2L37Q_L50G_L54R_G100Q(SEQ ID NO:136)、hu3D6VLv2L37Q_L50V_L54D_G100Q(SEQ ID NO:142)、hu3D6VLv2L37Q_S52G_L54D_G100Q(SEQ ID NO:139)和hu3D6VLv2L37Q_S52G_L54R_G100Q(SEQ ID NO:138)。与hu3D6VLv2的轻链可变区(SEQ ID NO:21)的残基相同的残基用“.”标记。如由Kabat所定义的CDR以粗体显示。

[0095] 图11示出了所选择的人源化3D6变体的tau内化测定的结果。

[0096] 图12A和图12B示出了取代作图微阵列实验的结果。图12A示出了取代效应的图,并且图12B示出了tau微管结合重复序列的多个部分的比对,其中突出显示了用于结合3D6的重要残基。aa 255-271为SEQ ID NO:184,aa 286-302为SEQ ID NO:185,aa 317-333为SEQ ID NO:186,并且aa 349-365为SEQ ID NO:187。

[0097] 图13描绘了免疫组织化学实验的结果,示出3D6与正常组织中的tau结合(上图)以及阿尔茨海默病组织中的tau结合(中图和下图)。

[0098] 图14示出了用于评估3D6的结合化学计量的质谱实验的结果。

[0099] 图15示出3D6在阿尔茨海默病的体内疾病模型中使tau接种中断。

[0100] 图16示出3D6人源化变体hu3D6VHv1bA11/hu3D6VLv2和hu3D6VHv1bA11/L2-DIM4阻断了tau与肝素之间的相互作用。

[0101] 图17示出3D6人源化变体hu3D6VHv1bA11/hu3D6VLv2和hu3D6VHv1bA11/L2-DIM4与tau的原纤维形式结合。

[0102] 序列的简要描述

[0103] SEQ ID NO:1列出人tau的同种型的氨基酸序列(Swiss-Prot P10636-8)。

[0104] SEQ ID NO:2列出人tau的同种型的氨基酸序列(Swiss-Prot P10636-7)。

[0105] SEQ ID NO:3列出人tau的同种型的氨基酸序列(Swiss-Prot P10636-6)(4R0N人tau)。

[0106] SEQ ID NO:4列出人tau的同种型的氨基酸序列(Swiss-Prot P10636-5)

[0107] SEQ ID NO:5列出人tau的同种型的氨基酸序列(Swiss-Prot P10636-4)。

[0108] SEQ ID NO:6列出人tau的同种型的氨基酸序列(Swiss-Prot P10636-2)。

- [0109] SEQ ID NO:7列出小鼠3D6抗体的重链可变区的氨基酸序列。
- [0110] SEQ ID NO:8列出小鼠3D6抗体的Kabat/Chothia复合物CDR-H1的氨基酸序列。
- [0111] SEQ ID NO:9列出小鼠3D6抗体的Kabat CDR-H2的氨基酸序列。
- [0112] SEQ ID NO:10列出小鼠3D6抗体的Kabat CDR-H3的氨基酸序列。
- [0113] SEQ ID NO:11列出小鼠3D6抗体和小鼠6A10抗体的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0114] SEQ ID NO:12列出小鼠3D6抗体和小鼠6A10抗体的Kabat CDR-L1的氨基酸序列。
- [0115] SEQ ID NO:13列出小鼠3D6抗体和小鼠6A10抗体的Kabat CDR-L2的氨基酸序列。
- [0116] SEQ ID NO:14列出小鼠3D6抗体和小鼠6A10抗体的Kabat CDR-L3的氨基酸序列。
- [0117] SEQ ID NO:15列出人源化3D6抗体的重链可变区hu3D6VHv1的氨基酸序列。
- [0118] SEQ ID NO:16列出人源化3D6抗体的重链可变区hu3D6VHv2的氨基酸序列。
- [0119] SEQ ID NO:17列出人源化3D6抗体的重链可变区hu3D6VHv1b的氨基酸序列。
- [0120] SEQ ID NO:18列出人源化3D6抗体的重链可变区hu3D6VHv1bA11的氨基酸序列。
- [0121] SEQ ID NO:19列出人源化3D6抗体的重链可变区hu3D6VHv5的氨基酸序列。
- [0122] SEQ ID NO:20列出人源化3D6抗体的轻链可变区hu3D6VLv1的氨基酸序列。
- [0123] SEQ ID NO:21列出人源化3D6抗体的轻链可变区hu3D6VLv2的氨基酸序列。
- [0124] SEQ ID NO:22列出人源化3D6抗体的轻链可变区hu3D6VLv3的氨基酸序列。
- [0125] SEQ ID NO:23列出人源化3D6抗体的轻链可变区hu3D6VLv4的氨基酸序列。
- [0126] SEQ ID NO:24列出重链可变受体Acc.#BAC01986.1的氨基酸序列。
- [0127] SEQ ID NO:25列出重链可变受体Acc.#IMGT#IGHV1-69-2*01的氨基酸序列。
- [0128] SEQ ID NO:26列出重链可变受体Acc.#IMGT#IGKJ1*01的氨基酸序列。
- [0129] SEQ ID NO:27列出轻链可变受体Acc.#IMGT#IGKV2-30*02的氨基酸序列。
- [0130] SEQ ID NO:28列出轻链可变受体Acc.#IMGT#IGKJ2*01的氨基酸序列。
- [0131] SEQ ID NO:29列出轻链可变受体Acc.#AAZ09048.1的氨基酸序列。
- [0132] SEQ ID NO:30列出编码小鼠3D6抗体的重链可变区的核酸序列。
- [0133] SEQ ID NO:31列出编码小鼠3D6抗体的轻链可变区的核酸序列。
- [0134] SEQ ID NO:32列出小鼠3D6抗体的Kabat CDR-H1的氨基酸序列。
- [0135] SEQ ID NO:33列出小鼠3D6抗体的Chothia CDR-H1的氨基酸序列。
- [0136] SEQ ID NO:34列出小鼠3D6抗体的Chothia CDR-H2的氨基酸序列。
- [0137] SEQ ID NO:35列出小鼠3D6抗体的AbM CDR-H2的氨基酸序列。
- [0138] SEQ ID NO:36列出小鼠3D6抗体的Contact CDR-L1的氨基酸序列。
- [0139] SEQ ID NO:37列出小鼠3D6抗体的Contact CDR-L2的氨基酸序列。
- [0140] SEQ ID NO:38列出小鼠3D6抗体的Contact CDR-L3的氨基酸序列。
- [0141] SEQ ID NO:39列出小鼠3D6抗体的Contact CDR-H1的氨基酸序列。
- [0142] SEQ ID NO:40列出小鼠3D6抗体的Contact CDR-H2的氨基酸序列。
- [0143] SEQ ID NO:41列出小鼠3D6抗体的Contact CDR-H3的氨基酸序列。
- [0144] SEQ ID NO:42列出人源化3D6抗体 (如在hu3D6VHv5、hu3D6VHv1bA11B6G2、hu3D6VHv1bA11B6H3、hu3D6VHv1e和hu3D6VHv1f中) 的另选的Kabat-Chothia复合物CDR-H1的氨基酸序列。
- [0145] SEQ ID NO:43列出人源化3D6抗体 (如在hu3D6VHv5和hu3D6VHv1bA11B6H3中) 的另

选的Kabat CDR-H2的氨基酸序列。

[0146] SEQ ID NO:44列出小鼠3D6和所选择的人源化3D6抗体的重链可变区(VHv1、VHv2、VHv1b、VHv1bA11和VHv5)中的共有氨基酸序列(在PCT/IB2017/052544的图2中标记为“Majority”。

[0147] SEQ ID NO:45列出小鼠3D6和所选择的人源化3D6抗体的轻链可变区之间的共有氨基酸序列(在PCT/IB2017/052544的图3中标记为“Majority”)。

[0148] SEQ ID NO:46列出人源化3D6抗体的重链可变区hu3D6VHv1bA11B6G2的氨基酸序列。

[0149] SEQ ID NO:47列出人源化3D6抗体的重链可变区hu3D6VHv1bA11B6H3的氨基酸序列。

[0150] SEQ ID NO:48列出人源化3D6抗体的重链可变区hu3D6VHv1c的氨基酸序列。

[0151] SEQ ID NO:49列出人源化3D6抗体的重链可变区hu3D6VHv1d的氨基酸序列。

[0152] SEQ ID NO:50列出人源化3D6抗体的重链可变区hu3D6VHv1e的氨基酸序列。

[0153] SEQ ID NO:51列出人源化3D6抗体的重链可变区hu3D6VHv1f的氨基酸序列。

[0154] SEQ ID NO:52列出人源化3D6抗体的重链可变区hu3D6VHv3的氨基酸序列。

[0155] SEQ ID NO:53列出人源化3D6抗体的重链可变区hu3D6VHv3b的氨基酸序列。

[0156] SEQ ID NO:54列出人源化3D6抗体的重链可变区hu3D6VHv3c的氨基酸序列。

[0157] SEQ ID NO:55列出人源化3D6抗体的重链可变区hu3D6VHv4的氨基酸序列。

[0158] SEQ ID NO:56列出人源化3D6抗体的重链可变区hu3D6VHv4b的氨基酸序列。

[0159] SEQ ID NO:57列出人源化3D6抗体的重链可变区hu3D6VHv4c的氨基酸序列。

[0160] SEQ ID NO:58列出人源化3D6抗体(如在hu3D6VH1c中)的另选的Kabat-Chothia复合物CDR-H1的氨基酸序列。

[0161] SEQ ID NO:59列出人源化3D6抗体(如在hu3D6VHv1d、hu3D6VHv3c和hu3D6VHv4c中)的另选的Kabat-Chothia复合物CDR-H1的氨基酸序列。

[0162] SEQ ID NO:60列出人源化3D6抗体(如在hu3D6VHv3b和hu3D6VHv4b中)的另选的Kabat-Chothia复合物CDR-H1的氨基酸序列。

[0163] SEQ ID NO:61列出人源化3D6抗体(如在hu3D6VHv1bA11B6G2中)的另选的Kabat CDR-H2的氨基酸序列。

[0164] SEQ ID NO:62列出人源化3D6抗体(如在hu3D6VHv1c、hu3D6VHv3b和hu3D6VHv4b中)的另选的Kabat CDR-H2的氨基酸序列。

[0165] SEQ ID NO:63列出人源化3D6抗体(如在hu3D6VHv1d、hu3D6VHv1f、hu3D6VHv3c和hu3D6VHv4c中)的另选的Kabat CDR-H2的氨基酸序列。

[0166] SEQ ID NO:64列出人源化3D6抗体(如在hu3D6VHv1e中)的另选的Kabat CDR-H2的氨基酸序列。

[0167] SEQ ID NO:65列出人源化3D6抗体(如在hu3D6VHv1f中)的另选的Kabat CDR-H3的氨基酸序列。

[0168] SEQ ID NO:66列出小鼠6A10抗体的重链可变区的氨基酸序列。

[0169] SEQ ID NO:67列出小鼠6A10抗体的Kabat/Chothia复合物CDR-H1的氨基酸序列。

[0170] SEQ ID NO:68列出小鼠6A10抗体的Kabat CDR-H2的氨基酸序列。

- [0171] SEQ ID NO:69列出小鼠6A10抗体的Kabat CDR-H3的氨基酸序列。
- [0172] SEQ ID NO:70列出用作重链人源化的结构模板的小鼠抗体的VH区 (pdb代码1CR9) 的氨基酸序列。
- [0173] SEQ ID NO:71列出所选择的人源化3D6抗体的重链可变区 (VHv1、VHv1b、VHv1bA11、VHv1bA11B6G2、VHv1bA11B6H3、VHv1c、VHv1d、VHv1e、VHv1f、VHv2、VHv3、VHv3b、VHv3c、VHv4、VHv4b、VHv4c和VHv5) 中的共有氨基酸序列 (在PCT/IB2017/052544的图4A和图4B中标记为“Majority”)。
- [0174] SEQ ID NO:72列出嵌合3D6抗体的重链的氨基酸序列。
- [0175] SEQ ID NO:73列出嵌合3D6抗体的轻链的氨基酸序列。
- [0176] SEQ ID NO:74列出重链可变结构模型Acc.#5MYX-VH_mSt的氨基酸序列。
- [0177] SEQ ID NO:75列出重链可变受体Acc.#2RCS-VH_huFrwk的氨基酸序列。
- [0178] SEQ ID NO:76列出人源化3D6抗体hu3D6VHvb1的重链可变区的氨基酸序列。
- [0179] SEQ ID NO:77列出人源化3D6抗体hu3D6VHvb2的重链可变区的氨基酸序列。
- [0180] SEQ ID NO:78列出人源化3D6抗体hu3D6VHvb3的重链可变区的氨基酸序列。
- [0181] SEQ ID NO:79列出人源化3D6抗体hu3D6VHvb4的重链可变区的氨基酸序列。
- [0182] SEQ ID NO:80列出人源化3D6抗体hu3D6VHvb5的重链可变区的氨基酸序列。
- [0183] SEQ ID NO:81列出轻链可变结构模型Acc.#5MYX-VL_mSt的氨基酸序列。
- [0184] SEQ ID NO:82列出轻链可变受体Acc.#ARX71335-VL_huFrwk的氨基酸序列。
- [0185] SEQ ID NO:83列出人源化3D6抗体hu3D6VLvb1的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0186] SEQ ID NO:84列出人源化3D6抗体hu3D6VLvb2的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0187] SEQ ID NO:85列出人源化3D6抗体hu3D6VLvb3的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0188] SEQ ID NO:86列出人源化3D6抗体 (如在hu3D6VHvb4和hu3D6VHvb5中) 的另选的Kabat-Chothia复合物CDR-H1的氨基酸序列。
- [0189] SEQ ID NO:87列出人源化3D6抗体 (如在hu3D6VHvb3和hu3D6VHvb4中) 的另选的Kabat CDR-H2的氨基酸序列。
- [0190] SEQ ID NO:88列出人源化3D6抗体 (如在hu3D6VHvb5中) 的另选的Kabat CDR-H2的氨基酸序列。
- [0191] SEQ ID NO:89列出人源化3D6抗体 (如在hu3D6VLvb3中) 的另选的Kabat CDR-L1的氨基酸序列。
- [0192] SEQ ID NO:90列出人源化3D6抗体hu3D6VHvb6的重链可变区的氨基酸序列。
- [0193] SEQ ID NO:91列出人源化3D6抗体hu3D6VHvb7的重链可变区的氨基酸序列。
- [0194] SEQ ID NO:92列出人源化3D6抗体 (如在hu3D6VHvb6和hu3D6VHvb7中) 的另选的Kabat CDR-H2的氨基酸序列。
- [0195] SEQ ID NO:93列出hu3D6VLv2变体L54D的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0196] SEQ ID NO:94列出hu3D6VLv2变体L54G的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0197] SEQ ID NO:95列出hu3D6VLv2变体L45N的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0198] SEQ ID NO:96列出hu3D6VLv2变体L54E的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0199] SEQ ID NO:97列出hu3D6VLv2变体L50E的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0200] SEQ ID NO:98列出hu3D6VLv2变体L54Q的轻链可变区的氨基酸序列。

- [0201] SEQ ID NO:99列出hu3D6VLv2变体L50D的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0202] SEQ ID NO:100列出hu3D6VLv2变体L54K的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0203] SEQ ID NO:101列出hu3D6VLv2变体L54R的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0204] SEQ ID NO:102列出hu3D6VLv2变体L54T的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0205] SEQ ID NO:103列出hu3D6VLv2变体L50G的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0206] SEQ ID NO:104列出hu3D6VLv2变体I48G的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0207] SEQ ID NO:105列出hu3D6VLv2变体I48D的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0208] SEQ ID NO:106列出hu3D6VLv2变体L47G的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0209] SEQ ID NO:107列出hu3D6VLv2变体Y49E的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0210] SEQ ID NO:108列出hu3D6VLv2变体L54V的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0211] SEQ ID NO:109列出hu3D6VLv2变体L54S的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0212] SEQ ID NO:110列出hu3D6VLv2变体S52G的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0213] SEQ ID NO:111列出hu3D6VLv2变体L47N的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0214] SEQ ID NO:112列出hu3D6VLv2变体L47D的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0215] SEQ ID NO:113列出hu3D6VLv2变体L47E的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0216] SEQ ID NO:114列出hu3D6VLv2变体L47P的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0217] SEQ ID NO:115列出hu3D6VLv2变体L47T的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0218] SEQ ID NO:116列出hu3D6VLv2变体L47S的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0219] SEQ ID NO:117列出hu3D6VLv2变体L47A的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0220] SEQ ID NO:118列出hu3D6VLv2变体L50V的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0221] SEQ ID NO:119列出hu3D6VLv2变体L37Q_L50G_L54R的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0222] SEQ ID NO:120列出hu3D6VLv2变体L37Q_L50G_L54G的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0223] SEQ ID NO:121列出hu3D6VLv2变体L37Q_S52G_L54G的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0224] SEQ ID NO:122列出hu3D6VLv2变体L37Q_S52G_L54R的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0225] SEQ ID NO:123列出hu3D6VLv2变体L37Q_S52G_L54T的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0226] SEQ ID NO:124列出hu3D6VLv2变体L37Q_S52G_L54D的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0227] SEQ ID NO:125列出hu3D6VLv2变体L37Q_L54R的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0228] SEQ ID NO:126列出hu3D6VLv2变体L37Q_L54G的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0229] SEQ ID NO:127列出hu3D6VLv2变体L37Q_L54D的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0230] SEQ ID NO:128列出hu3D6VLv2变体L37Q_L50G的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0231] SEQ ID NO:129列出hu3D6VLv2变体L37Q_L50D的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0232] SEQ ID NO:130列出hu3D6VLv2变体L37Q_L54T的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0233] SEQ ID NO:131列出hu3D6VLv2变体L37Q_S52G的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0234] SEQ ID NO:132列出hu3D6VLv2变体L37Q_L50D_L54G的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0235] SEQ ID NO:133列出hu3D6VLv2变体L37Q_L50D_L54R的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0236] SEQ ID NO:134列出hu3D6VLv2变体L37Q_L50E_L54G的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0237] SEQ ID NO:135列出hu3D6VLv2变体L37Q_L50E_L54R的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0238] SEQ ID NO:136列出hu3D6VLv2变体L37Q_L50G_L54R_G100Q的轻链可变区的氨基酸序列。

- [0239] SEQ ID NO:137列出hu3D6VLv2变体L37Q_L50G_L54G_G100Q的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0240] SEQ ID NO:138列出hu3D6VLv2变体L37Q_S52G_L54R_G100Q的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0241] SEQ ID NO:139列出hu3D6VLv2变体L37Q_S52G_L54D_G100Q的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0242] SEQ ID NO:140列出Hu3D6VLv2变体L37Q_L50D_L54G_G100Q的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0243] SEQ ID NO:141列出Hu3D6VLv2变体L37Q_L50D_L54R_G100Q的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0244] SEQ ID NO:142列出Hu3D6VLv2变体L37Q_L50V_L54D_G100Q的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0245] SEQ ID NO:143列出Hu3D6VLv2变体L37Q的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0246] SEQ ID NO:144列出Hu3D6VLv2变体G100Q的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0247] SEQ ID NO:145列出Hu3D6VLv2变体L37Q_L54E的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0248] SEQ ID NO:146列出hu3D6VHv1bA11变体D60E (也称为h3D6VHvb8) 的重链可变区的氨基酸序列。
- [0249] SEQ ID NO:147列出hu3D6VHv1bA11变体L82cV的重链可变区的氨基酸序列。
- [0250] SEQ ID NO:148列出hu3D6VHv1bA11变体D60E_L80M_Q81E_L82cV_T83R (也称为h3D6VHvb9) 的重链可变区的氨基酸序列。
- [0251] SEQ ID NO:149列出人源化3D6抗体 (如在h3D6VHvb8和h3D6VHvb9中) 的另选的Kabat CDR-H2的氨基酸序列。
- [0252] SEQ ID NO:150列出人源化3D6抗体 (如在hu3D6VLv2 L54D和hu3D6VLv2 L37Q_L54D中) 的另选的Kabat CDR-L2的氨基酸序列。
- [0253] SEQ ID NO:151列出人源化3D6抗体 (如在hu3D6VLv2 L54G和hu3D6VLv2 L37Q_L54G中) 的另选的Kabat CDR-L2的氨基酸序列。
- [0254] SEQ ID NO:152列出人源化3D6抗体 (如在hu3D6VLv2 L54N中) 的另选的Kabat CDR-L2的氨基酸序列。
- [0255] SEQ ID NO:153列出人源化3D6抗体 (如在hu3D6VLv2 L54E和hu3D6VLv2 L37Q_L54E中) 的另选的Kabat CDR-L2的氨基酸序列。
- [0256] SEQ ID NO:154列出人源化3D6抗体 (如在hu3D6VLv2 L50E中) 的另选的Kabat CDR-L2的氨基酸序列。
- [0257] SEQ ID NO:155列出人源化3D6抗体 (如在hu3D6VLv2 L54Q中) 的另选的Kabat CDR-L2的氨基酸序列。
- [0258] SEQ ID NO:156列出人源化3D6抗体 (如在hu3D6VLv2 L50D和hu3D6VLv2 L37Q_L50D中) 的另选的Kabat CDR-L2的氨基酸序列。
- [0259] SEQ ID NO:157列出人源化3D6抗体 (如在hu3D6VLv2 L54K中) 的另选的Kabat CDR-L2的氨基酸序列。
- [0260] SEQ ID NO:158列出人源化3D6抗体 (如在hu3D6VLv2 L54R和hu3D6VLv2 L37Q_

L54R中)的另选的Kabat CDR-L2的氨基酸序列。

[0261] SEQ ID NO:159列出人源化3D6抗体(如在hu3D6VLv2 L54T和hu3D6VLv2 L37Q_L54T中)的另选的Kabat CDR-L2的氨基酸序列。

[0262] SEQ ID NO:160列出人源化3D6抗体(如在hu3D6VLv2 L50G和hu3D6VLv2 L37Q_L50G中)的另选的Kabat CDR-L2的氨基酸序列。

[0263] SEQ ID NO:161列出人源化3D6抗体(如在hu3D6VLv2 L54V中)的另选的Kabat CDR-L2的氨基酸序列。

[0264] SEQ ID NO:162列出人源化3D6抗体(如在hu3D6VLv2 L54S中)的另选的Kabat CDR-L2的氨基酸序列。

[0265] SEQ ID NO:163列出人源化3D6抗体(如在hu3D6VLv2 S52G和hu3D6VLv2 L37Q_S52G中)的另选的Kabat CDR-L2的氨基酸序列。

[0266] SEQ ID NO:164列出人源化3D6抗体(如在hu3D6VLv2 L50V中)的另选的Kabat CDR-L2的氨基酸序列。

[0267] SEQ ID NO:165列出人源化3D6抗体(如在hu3D6VLv2

[0268] L37Q_L50G_L54R和hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R_G100Q中)的另选的Kabat CDR-L2的氨基酸序列。

[0269] SEQ ID NO:166列出人源化3D6抗体(如在hu3D6VLv2

[0270] L37Q_L50G_L54G和hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G_G100Q中)的另选的Kabat CDR-L2的氨基酸序列。

[0271] SEQ ID NO:167列出人源化3D6抗体(如在hu3D6VLv2

[0272] L37Q_S52G_L54G中)的另选的Kabat CDR-L2的氨基酸序列。

[0273] SEQ ID NO:168列出人源化3D6抗体(如在hu3D6VLv2

[0274] L37Q_S52G_L54R和hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R_G100Q中)的另选的Kabat CDR-L2的氨基酸序列。

[0275] SEQ ID NO:169列出人源化3D6抗体(如在hu3D6VLv2

[0276] L37Q_S52G_L54T中)的另选的Kabat CDR-L2的氨基酸序列。

[0277] SEQ ID NO:170列出人源化3D6抗体(如在hu3D6VLv2

[0278] L37Q_S52G_L54D和hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54D_G100Q中)的另选的Kabat CDR-L2的氨基酸序列。

[0279] SEQ ID NO:171列出人源化3D6抗体(如在hu3D6VLv2

[0280] L37Q_L50D_L54G和hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54G_G100Q中)的另选的Kabat CDR-L2的氨基酸序列。

[0281] SEQ ID NO:172列出人源化3D6抗体(如在hu3D6VLv2

[0282] L37Q_L50D_L54R和hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R_G100Q中)的另选的Kabat CDR-L2的氨基酸序列。

[0283] SEQ ID NO:173列出人源化3D6抗体(如在hu3D6VLv2

[0284] L37Q_L50E_L54G中)的另选的Kabat CDR-L2的氨基酸序列。

[0285] SEQ ID NO:174列出人源化3D6抗体(如在hu3D6VLv2

[0286] L37Q_L50E_L54R中)的另选的Kabat CDR-L2的氨基酸序列。

- [0287] SEQ ID NO:175列出人源化3D6抗体(如在hu3D6VLv2 L37Q_L50V_L54D_G100Q中)的另选的Kabat CDR-L2的氨基酸序列。
- [0288] L37Q_L50V_L54D_G100Q中)的另选的Kabat CDR-L2的氨基酸序列。
- [0289] SEQ ID NO:176列出重链恒定区(IgG1:同种异型G1m17,1)的氨基酸序列。
- [0290] SEQ ID NO:177列出轻链恒定区(κ)的氨基酸序列。
- [0291] SEQ ID NO:178列出3D6人源化变体(hu3D6VHv1bA11 IgG1 G1m17同种异型)的成熟重链的氨基酸序列。
- [0292] SEQ ID NO:179列出3D6人源化变体(hu3D6VLv2变体L37Q_S52G_L54R,L2-DIM4 κ)的成熟轻链的氨基酸序列。
- [0293] SEQ ID NO:180列出在N-末端处具有牛 α -乳清蛋白信号肽的3D6人源化变体(hu3D6VHv1bA11 IgG1 G1m17同种异型)的重链的氨基酸序列。
- [0294] SEQ ID NO:181列出在N-末端处具有牛 α -乳清蛋白信号肽的3D6人源化变体(hu3D6VLv2变体L37Q_S52G_L54R,L2-DIM4 κ)的轻链的氨基酸序列。
- [0295] SEQ ID NO:182列出编码在N-末端处具有牛 α -乳清蛋白信号肽的3D6人源化变体(hu3D6VHv1bA11 IgG1 G1m17同种异型)的重链的核苷酸序列。
- [0296] SEQ ID NO:183列出编码在N-末端处具有牛 α -乳清蛋白信号肽的3D6人源化变体(hu3D6VLv2变体L37Q_S52G_L54R,L2-DIM4 κ)的轻链的核苷酸序列。
- [0297] SEQ ID NO:184列出tau微管结合重复序列1的区域(SEQ ID NO:1的氨基酸残基255-271)的氨基酸序列。
- [0298] SEQ ID NO:185列出tau微管结合重复序列2的区域(SEQ ID NO:1的氨基酸残基286-302)的氨基酸序列。
- [0299] SEQ ID NO:186列出tau微管结合重复序列3的区域(SEQ ID NO:1的氨基酸残基317-333)的氨基酸序列。
- [0300] SEQ ID NO:187列出tau微管结合重复序列4的区域(SEQ ID NO:1的氨基酸残基349-365)的氨基酸序列。
- [0301] SEQ ID NO:188列出由3D6结合的MBTR 1中的tau的核心基序的氨基酸序列。
- [0302] SEQ ID NO:189列出由3D6结合的MBTR 1中的tau的tau序列N-末端至核心基序的氨基酸序列。
- [0303] SEQ ID NO:190列出由3D6结合的MBTR 1中的tau的tau序列C-末端至核心基序的氨基酸序列。
- [0304] SEQ ID NO:191列出3D6表位的氨基酸序列。
- [0305] SEQ ID NO:192列出由3D6结合的MBTR 2中的tau的核心基序的氨基酸序列。
- [0306] SEQ ID NO:193列出由3D6结合的MBTR 3中的tau的核心基序的氨基酸序列。
- [0307] SEQ ID NO:194列出由4D6结合的MBTR 3中的tau的核心基序的氨基酸序列。
- [0308] 定义
- [0309] 单克隆抗体或其他生物学实体通常以分离形式提供。这意味着抗体或其他生物学实体通常至少50%w/w不含由其生产或纯化产生的干扰性蛋白质和其他污染物,但不排除单克隆抗体与过量的药学上可接受的载剂或旨在便于其使用的其他媒介物组合的可能性。有时单克隆抗体至少60%、70%、80%、90%、95%或99%w/w不含由其生产或纯化产生的干扰性蛋白质和污染物。通常,分离的单克隆抗体或其他生物学实体是其纯化后剩余的主要

大分子物类。

[0310] 抗体与其靶抗原的特异性结合意指至少 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 或 10^{12}M^{-1} 的亲合力和/或亲合力。特异性结合的量级可检测地更高,并且可区别于对至少一种不相关的靶标发生的非特异性结合。特异性结合可以是特定官能团之间形成键或特定空间配合(例如,锁钥型)的结果,而非特异性结合通常是范德华力的结果。然而,特异性结合不一定意味着抗体仅仅结合一个靶标。

[0311] 基本抗体结构单元是亚基的四聚体。每个四聚体包括两对相同的多肽链,每对具有一条“轻”链(约25kDa)和一条“重”链(约50-70kDa)。每条链的氨基末端部分包括主要负责抗原识别的约100至110或更多个氨基酸的可变区。此可变区最初被表达为与可切割的信号肽连接。没有信号肽的可变区有时被称为成熟可变区。因此,例如,轻链成熟可变区意指没有轻链信号肽的轻链可变区。每条链的羧基末端部分限定主要负责效应子功能的恒定区。

[0312] 轻链分为 κ 或 λ 。重链分为 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ ,并将抗体的同种型分别定义为IgG、IgM、IgA、IgD和IgE。在轻链和重链内,可变区和恒定区通过约12或更多个氨基酸的“J”区连接,其中重链还包括约10或更多个氨基酸的“D”区。大致参见Fundamental Immunology, Paul, W. 编辑,第2版, Raven Press, N.Y., 1989, 第7章(整体以引用方式并入以用于所有目的)。

[0313] 免疫球蛋白轻链或重链可变区(在本文中也分别称为“轻链可变结构域”(“VL结构域”)或“重链可变结构域”(“VH结构域”))由被三个“互补决定区”或“CDR”间隔开的“框架”区组成。框架区用于对齐CDR,以用于与抗原的表位特异性结合。CDR包括主要负责抗原结合的抗体的氨基酸残基。从氨基末端到羧基末端,VL和VH结构域均包含以下框架(FR)和CDR区:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。VL结构域的CDR 1、2和3在本文也分别称为CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3;VH结构域的CDR 1、2和3在本文也分别称为CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3。当本申请公开了具有R作为C末端残基的VL序列时,R可以替代地被认为是轻链恒定区的N末端残基。因此,该申请还应理解为公开了不具有C末端R的VL序列。

[0314] 每个VL和VH结构域的氨基酸的分配与CDR的任何常规定义一致。常规定义包括Kabat定义(Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987和1991)、Chothia定义(Chothia&Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917, 1987; Chothia等人, Nature 342:878-883, 1989); Chothia Kabat CDR的复合物,其中CDR-H1是Chothia和Kabat CDR的复合物;Oxford Molecular的抗体建模软件使用的AbM定义;以及Martin等人的Contact定义(bioinfo.org.uk/abs)(参见表1)。Kabat提供了广泛使用的编号惯例(Kabat编号),其中不同重链之间或不同轻链之间的对应残基被指定相同的编号。当通过CDR的某一定义(例如,Kabat)说抗体包含CDR时,该定义指明抗体中存在的CDR残基(即Kabat CDR)的最小数目。这不排除同时存在属于另一常规CDR定义但在指定定义之外的其他残基。例如,除其他可能性之外,包含由Kabat定义的CDR的抗体包括其中CDR含有Kabat CDR残基且不含有其他CDR残基的抗体,以及其中CDR H1是复合物Chothia-Kabat CDR H1并且其他CDR含有Kabat CDR残基且不含有基于其他定义的另外的CDR残基的抗体。

[0315] 表1使用Kabat编号的CDR的常规定义

[0316]	环	Kabat 的复合物	Chothia	Chothia 和 Kabat 的复合物	AbM	Contact
	L1	L24--L34	L24--L34	L24--L34	L24--L34	L30--L36
	L2	L50--L56	L50--L56	L50--L56	L50--L56	L46--L55
	L3	L89--L97	L89--L97	L89--L97	L89--L97	L89--L96
	H1	H31--H35B	H26--H32..H34*	H26--H35B*	H26--H35B	H30--H35B
	H2	H50--H65	H52--H56	H50--H65	H50--H58	H47--H58
	H3	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H93--H101

[0317] *根据Chothia的CDR-H1可以在H32、H33或H34处结束(取决于环的长度)。这是因为Kabat编号方案在35A和35B处布置额外残基的插入,而Chothia编号将它们布置在31A和31B处。如果既不存在H35A也不存在H35B(Kabat编号),那么Chothia CDR-H1环在H32处结束。如果仅存在H35A,那么它在H33处结束。如果H35A和H35B都存在,那么它在H34处结束。

[0318] 术语“抗体”包括完整抗体及其结合片段。通常,片段与衍生它们的完整抗体竞争与靶标的特异性结合,包括单独的重链、轻链Fab、Fab'、F(ab')₂、F(ab)c、Dab、纳米抗体和Fv。片段可以通过重组DNA技术产生,或通过完整免疫球蛋白的酶促或化学分离产生。术语“抗体”还包括双特异性抗体和/或人源化抗体。双特异性或双功能抗体是具有两个不同的重/轻链对和两个不同结合位点的人工杂交抗体(参见例如,Songsivilai和Lachmann, Clin. Exp. Immunol., 79:315-321 (1990); Kostelny等人, J. Immunol., 148:1547-53 (1992))。在一些双特异性抗体中,两个不同的重链/轻链对包括人源化3D6重链/轻链对和对于tau上不同于3D6所结合的表位具有特异性的重链/轻链对。

[0319] 在一些双特异性抗体中,一个重链/轻链对是如下文进一步公开的人源化3D6抗体,并且另一个重链/轻链对来自与在血脑屏障上表达的受体结合的抗体,所述受体诸如胰岛素受体、胰岛素样生长因子(IGF)受体、瘦素受体或脂蛋白受体,或者转铁蛋白受体(Friden等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4771-4775, 1991; Friden等人, Science 259:373-377, 1993)。这种双特异性抗体可以通过受体介导的胞转穿过血脑屏障转移。可通过工程化双特异性抗体以减小其与血脑屏障受体的亲和力来进一步增强双特异性抗体的脑部摄取。对受体的亲和力降低导致在脑部中更广泛的分布(参见例如, Atwal等人, Sci. Trans. Med. 3, 84ra43, 2011; Yu等人, Sci. Trans. Med. 3, 84ra44, 2011)。

[0320] 示例性双特异性抗体还可以是:(1)双可变结构域抗体(DVD-Ig),其中每条轻链和重链通过短肽键含有两个串联的可变结构域(Wu等人, Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-IgTM) Molecule, 在: Antibody Engineering, Springer Berlin Heidelberg (2010)中); (2) Tandab, 其为两个单链双抗体的融合体,从而得到四价双特异性抗体,其对于每种靶抗原具有两个结合位点; (3) 柔性体(flexibody), 其为scFv与双抗体的组合,从而得到多价分子; (4) 所谓的“对接并锁定(dock

and lock)”分子,其基于蛋白激酶A中的“二聚化和对接结构域”,当应用于Fab时,可以得到由连接于不同的Fab片段的两个相同的Fab片段组成的三价双特异性结合蛋白;或(5)所谓的Scorpion分子,其包含例如融合至人Fc区的两个末端的两个scFv。可用于制备双特异性抗体的平台的实例包括BiTE (Micromet)、DART (MacroGenics)、Fcab和Mab2 (F-star)、Fc工程化IgG1 (Xencor)或DuoBody (基于Fab臂交换,Genmab)。

[0321] 术语“表位”是指抗原上与抗体结合的位点。表位可由连续氨基酸或通过一个或多个蛋白质的三级折叠而并置的非连续氨基酸形成。由连续氨基酸(也称为线性表位)形成的表位通常在暴露于变性溶剂时保留,而通过三级折叠形成的表位(也称为构象表位)通常在用变性溶剂处理时丢失。表位通常包括处于独特空间构象的至少3个、且更通常至少5或8-10个氨基酸。确定表位的空间构象的方法包括,例如,x射线晶体学和2维核磁共振。参见例如,Epitope Mapping Protocols,在Methods in Molecular Biology中,第66卷,Glenn E.Morris编辑(1996)。

[0322] 识别相同或重叠表位的抗体可以在显示出一种抗体与另一种抗体竞争结合靶抗原的能力的简单的免疫测定中鉴定。抗体的表位还可以通过与其抗原结合以鉴定接触残基的抗体的X射线晶体学来定义。另选地,如果抗原中减少或消除一种抗体的结合的所有氨基酸突变减少或消除另一种抗体的结合,那么两种抗体具有相同的表位。如果减少或消除一种抗体的结合的一些氨基酸突变减少或消除另一种抗体的结合,那么两种抗体具有重叠表位。

[0323] 抗体之间的竞争通过测定来确定,在所述测定中,待测抗体抑制参考抗体与共同抗原的特异性结合(参见例如,Junghans等人,Cancer Res.50:1495,1990)。如果过量的测试抗体(例如,至少2x、5x、10x、20x或100x)抑制至少50%的参考抗体的结合(如在竞争性结合测定中所测量的),那么测试抗体与参考抗体竞争。一些测试抗体抑制至少75%、90%或99%的参考抗体的结合。通过竞争测定鉴定的抗体(竞争性抗体)包括与参考抗体结合相同表位的抗体和结合至与参考抗体结合的表位充分接近以产生位阻的相邻表位的抗体。

[0324] 术语“药学上可接受的”是指载剂、稀释剂、赋形剂或辅助剂与制剂的其他成分相容并且对其接受者基本上无害。

[0325] 术语“患者”包括接受预防性或治疗性治疗的人和其他哺乳动物受试者。

[0326] 如果受试者具有至少一个已知的风险因素(例如,遗传、生化、家族史和情境暴露),从而将具有所述风险因素的个体置于与没有该风险因素的个体相比在统计学上显著更大的发展该疾病的风险中,那么个体患病风险增加。

[0327] 术语“生物样品”是指生物来源(例如人或哺乳动物受试者)内或可从其获得的生物材料的样品。此类样品可以是器官、细胞器、组织、组织切片、体液、外周血、血浆、血清、细胞、分子诸如蛋白质和肽和由其衍生的任何部分或组合。术语生物样品还可包括通过处理样品衍生的任何材料。衍生材料可包括细胞或其后代。生物样品的处理可包括过滤、蒸馏、提取、浓缩、固定、干扰组分的失活等中的一个或多个。

[0328] 术语“对样品”是指未被已知或怀疑包括tau相关疾病影响区域的生物样品,或至少未被已知或怀疑包括给定类型的患病区域的生物样品。对样品可以从未患有tau相关疾病的个体获得。另选地,对样品可以从患有tau相关疾病的患者获得。此类样品可以与被认为包含tau相关疾病的生物样品同时获得或在不同场合获得。生物样品和对样品

都可以从相同的组织获得。优选地,对照样品基本上或完全由正常的健康区域组成,并且可用于与被认为包含tau相关疾病影响区域的生物样品的比较。优选地,对照样品中的组织与生物样品中的组织是相同类型。优选地,被认为在生物样品中的tau相关疾病影响细胞来自与对照样品中的细胞类型相同的细胞类型(例如,神经元或神经胶质)。

[0329] 术语“疾病”是指损害生理功能的任何异常病状。该术语广泛用于涵盖生理功能受损的任何病症、病痛、异常、病理、不适、病状或综合征,而不论病因的性质如何。

[0330] 术语“症状”是指受试者感知的疾病的主观证据,诸如步态改变。“体征”是指医生观察到的疾病的客观证据。

[0331] 术语“对治疗的积极应答”是指相对于未接受治疗的对照群体中的平均应答,个体患者中更有利的应答或患者群体中的平均应答。

[0332] 为了将氨基酸取代分为保守或非保守取代,将氨基酸分组如下:第I组(疏水性侧链):met、ala、val、leu、ile;第II组(中性亲水性侧链):cys、ser、thr;第III组(酸性侧链):asp、glu;第IV组(碱性侧链):asn、gln、his、lys、arg;第V组(影响链取向的残基):gly、pro;以及第VI组(芳香族侧链):trp、tyr、phe。保守取代包括相同类别的氨基酸之间的取代。非保守取代包括将这些类别中的一个的成员交换为另一个类别的成员。

[0333] 用通过Kabat编号惯例最大限度地对齐的抗体序列确定序列同一性百分比。比对应后,如果将受试者抗体区域(例如,重链或轻链的整个成熟可变区)与参考抗体的相同区域进行比较,受试者抗体区域与参考抗体区域之间的序列同一性百分比是在受试者抗体区域和参考抗体区域中相同氨基酸占据的位置的数目除以两个区域的对齐位置的总数,其中空位不计数,乘以100以转换为百分比。

[0334] “包含”或“包括”一种或多种所列举的元素的组合物或方法可包括未具体列举的其他元素。例如,“包含”或“包括”抗体的组合物可含有单独或与其他成分组合的抗体。当本公开涉及包括指定要素的特征时,本公开应当替代性地被理解为涉及基本上由指定要素组成或由指定要素组成的特征。

[0335] 值的范围的指定包括该范围内或限定该范围的所有整数,以及通过该范围内的整数限定的所有子范围。

[0336] 除非从上下文中另外显而易见,否则术语“约”包括非实质性变型,诸如在指定值的测量误差(例如,SEM)的标准容限之内的值。

[0337] 统计显著性意指 $p \leq 0.05$ 。

[0338] 除非上下文另外明确规定,否则冠词“一个”、“一种”和“该”的单数形式包括多个指代物。例如,术语“化合物”或“至少一种化合物”可包括多种化合物,包括其混合物。

具体实施方式

[0339] I. 概要

[0340] 本发明提供了与tau结合的抗体。一些抗体与人tau的微管结合区(MTBR)内的一个或多个表位特异性结合,所述微管结合区由SEQ ID NO:1的大约244至372位残基限定。由于MTBR区域包含序列重复,所以单一抗体可以在该区域内的多个重复位点处结合。一些抗体与KXXSXXNX(K/H)H(SEQ ID NO:191)的表位特异性结合。一些抗体在SEQ ID NO:3的残基199-213和/或262-276(分别对应于SEQ ID NO:1的残基257-271或320-334)内结合。一些抗

体在SEQ ID NO:1的残基259-268和/或290-299和/或321-330和/或353-362内结合。在一些抗体中,与MTBR 4区域在残基353-362处的结合弱于与MTBR 1、MTBR 2和MTBR 3的结合。一些抗体与tau结合,而不管是否为磷酸化状态。本发明的一些抗体用于抑制或延迟与tau相关联的病理和相关联的症状恶化。尽管本发明的实践不要求理解机制,但是由于抗体诱导tau的吞噬、抑制tau的分子间或分子内聚集或与其他分子的结合,通过稳定非毒性构象、通过抑制致病性tau形式的细胞间或细胞内传播、通过阻断tau磷酸化、通过阻止tau与细胞结合,或通过诱导tau的蛋白质水解切割等机制可发生毒性的降低。本发明的抗体或诱导此类抗体的剂可用于治疗阿尔茨海默病和与tau相关联的其他疾病或实现其预防的方法中。

[0341] II. 靶分子

[0342] 除非从上下文中另外显而易见,否则对tau的提及意指tau的天然人形式,包括所有同种型,而不管是否存在翻译后修饰(例如,磷酸化、糖化或乙酰化)。在人脑中存在六种主要的tau同种型(剪接变体)。这些变体中最长的具有441个氨基酸,其中起始met残基被切割。根据441同种型对残基编号。因此,例如,对位置404处的磷酸化的提及意指441同种型的位置404,或当与441同种型最大限度地对齐时任何其他同种型的对应位置。同种型的氨基酸序列和Swiss-Prot编号如下文所指示。

P10636-8 (SEQ ID NO:1)

```

10      20      30      40      50      60
MAEPRQEFV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG
70      80      90      100     110     120
SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGQAA AQPHTIPEG TTAEEAGIGD TPSLEDEAAG
130     140     150     160     170     180
HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK IATPRGAAPP GQKGQANATR IPAKTPPAPK
190     200     210     220     230     240
TPPSSGEPFK SGDRSGYSSP GSPGTPGSR SRTPSLPTPT REPKKVAVVR TPPKSPSSAK
250     260     270     280     290     300
SRLQTAPVPM PDLKNVKSII GSTENLKHQP GGGKVQIINK KLDLSNVQSK CGSKDNIKHV
310     320     330     340     350     360
PGGGSVQIVY KPVDSLKVTS KCGSLGNIHH KPGGGQVEVK SEKLDFKDRV QSKIGSLDNI
370     380     390     400     410     420
THVPGGGNKK IETHKLTFR NAKAKTDHGA EIVYKSPVVS GDTSPRHLSN VSSTGSIDMV
430     440
DSPQLATLAD EVSASLAKQG L

```

P10636-7 (SEQ ID NO:2)

```

10      20      30      40      50      60
MAEPRQEFV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG
70      80      90      100     110     120
SETSDAKSTP TAAEEAGIG DTPSLEDEAA GHVTQARMVS KSKDGTGSDD KKAKGADGKT
130     140     150     160     170     180
KIATPRGAAP PGQKGQANAT RIPAKTPPAP KTPPSSGEFP KSGDRSGYSS PGSPGTPGSR
190     200     210     220     230     240
SRTPSLPTPT TREPKKAVV RTPPKSPSSA KSRLQTAPVP MPDLKNVSK IGSTENLKHQ
250     260     270     280     290     300
PGGGKVQIIN KKLDSNVQS KCGSKDNIKH VPGGGSVQIV YKPVDSLKVTS SKCGSLGNIH
310     320     330     340     350     360
HKPGGGQVEV KSEKLDFKDR VQSKIGSLDN ITHVPGGGNK KIETHKLTFR ENAKAKTDHG
370     380     390     400     410
AEIVYKSPVV SGDTSPRHLS NVSSTGSIDM VDSPQLATLA DEVSASLAKQ GL

```

[0343]

P10636-6 (4RON 人 tau) (SEQ ID NO:3)

```

10      20      30      40      50      60
MAEPRQEFV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKAEAGI GDTPSLEDEA
70      80      90      100     110     120
AGHVTQARMV SKSKDGTGSD DKKAKGADGK TKIATPRGAA PPGQKGQANA TRIPAKTPPA
130     140     150     160     170     180
PKTPPSSGEF PKSGDRSGYS SPGSPGTPGS RSRTPSLPTP PTREPKKVAV VRTPPKSPSS
190     200     210     220     230     240
AKSRLQTAPV PMPDLKNVKS KIGSTENLKH QPGGGKVQII NKKLDLSNVQ SKCGSKDNIK
250     260     270     280     290     300
HVPGGGSVQI VYKPVDSLKV TSKCGSLGNI HHKPGGGQVE VKSEKLDFKD RVQSKIGSLD
310     320     330     340     350     360
NITHVPGGGN KKIETHKLTFR RENAKAKTDH GAEIVYKSPV VSGDTSPRHL SNVSSTGSID
370     380
MVDSPQLATL ADEVASLAK QGL

```

P10636-5 (SEQ ID NO:4)

10	20	30	40	50	60
MAEPRQEFV	MEDHAGTYGL	GDRKDQGGYT	MHQDQEGDTD	AGLKESPLQT	PTEDGSEEPG
70	80	90	100	110	120
SETSDAKSTP	TAEDVTAPLV	DEGAPGKQAA	AQPHTEIPEG	TTAEEAGIGD	TPSLEDEAAG
130	140	150	160	170	180
HVTQARMVSK	SKDGTGSDDK	KAKGADGKTK	IATPRGAAPP	GQKGQANATR	IPAKTPPAK
190	200	210	220	230	240
TPPSSGEPK	SGDRSGYSSP	GSPGTPGSR	RTPSLPTPPT	REPKKVAVVR	TPPKSPSSAK
250	260	270	280	290	300
SRLQTAPVPM	PDLKNVSKI	GSTENLKHQP	GGGKVQIVYK	PVDLSKVTSK	CGSLGNIHHK
310	320	330	340	350	360
PGGGQVEVKS	EKLDFKDRVQ	SKIGSLDNIT	HVPGGGNKKI	ETHKLTFREN	AKAKTDHGAE
370	380	390	400	410	
IVYKSPVVS	DTSRHLNSV	SSTGSIDMVD	SPQLATLADE	VSASLAKQGL	

P10636-4 (SEQ ID NO:5)

10	20	30	40	50	60
MAEPRQEFV	MEDHAGTYGL	GDRKDQGGYT	MHQDQEGDTD	AGLKESPLQT	PTEDGSEEPG
70	80	90	100	110	120
SETSDAKSTP	TAEAEAGIG	DTPSLEDEAA	GHVTQARMVS	KSKDGTGSDD	KKAKGADGKT
130	140	150	160	170	180
KIATPRGAAP	PGQKGQANAT	RIPAKTPPAP	KTPPSSGEP	KSGDRSGYSS	PGSPGTPGSR
190	200	210	220	230	240
SRTPSLPTP	TREPKKVAV	RTPPKSPSSA	KSRLQTAPVP	MPDLKNVSK	IGSTENLKHQ
250	260	270	280	290	300
PGGGKVQIVY	KPVDLSKVTS	KCGSLGNIHH	KPGGGQVEVK	SEKLDFKDRV	QSKIGSLDNI
310	320	330	340	350	360
THVPGGGNKK	IETHKLTFRE	NAKAKTDHGA	EIVYKSPVVS	GDTSPRHLN	VSSTGSIDMV
370	380				
DSPQLATLAD	EVSASLAKQG	L			

[0344]

P10636-2 (SEQ ID NO:6)

10	20	30	40	50	60
MAEPRQEFV	MEDHAGTYGL	GDRKDQGGYT	MHQDQEGDTD	AGLKAEEAGI	GDTPSLEDEA
70	80	90	100	110	120
AGHVTQARMV	SKSKDGTGSD	DKKAKGADGK	TKIATPRGAA	PPGQKGQANA	TRIPAKTPPA
130	140	150	160	170	180
PKTPPSSGEP	PKSGDRSGYS	SPGSPGTPGS	RSRTPSLPTP	PTREPKKVAV	VRTPPKSPSS
190	200	210	220	230	240
AKSRLQTAPV	PMPDLKNVKS	KIGSTENLKH	QPGGGKVQIV	YKFPVDLSKVT	SKCGSLGNIH
250	260	270	280	290	300
HKPGGGQVEV	KSEKLDFKDR	VQSKIGSLDN	ITHVPGGGNK	KIETHKLTFR	ENAKAKTDHG
310	320	330	340	350	
AEIVYKSPVW	SGDTSRHLN	NVSSTGSIDM	VDSPQLATLA	DEVASLAKQ	GL

[0345] 对tau的提及包括已知的自然变型,其中约30种列于Swiss-Prot数据库及其排列中,以及与tau病理相关联的突变,所述病理诸如痴呆、皮克氏病、核上性麻痹等(参见,例如,Swiss-Prot数据库和Poorkaj等人,Ann Neurol.43:815-825(1998))。通过441同种型编号的tau突变的一些实例为氨基酸残基257处的赖氨酸至苏氨酸突变(K257T),氨基酸位置260处的异亮氨酸至缬氨酸突变(I260V);氨基酸位置272处的甘氨酸至缬氨酸突变(G272V);氨基酸位置279处的天冬酰胺至赖氨酸突变(N279K);氨基酸位置296处的天冬酰胺至组氨酸突变(N296H);氨基酸位置301处的脯氨酸至丝氨酸突变(P301S);氨基酸301处的脯氨酸至亮氨酸突变(P301L);氨基酸位置303处的甘氨酸至缬氨酸突变(G303V);位置305处的丝氨酸至天冬酰胺突变(S305N);氨基酸位置335处的甘氨酸至丝氨酸突变(G335S);位置337处的缬氨酸至甲硫氨酸突变(V337M);位置342处的谷氨酸至缬氨酸突变(E342V);氨基酸位置369处的赖氨酸至异亮氨酸突变(K369I);氨基酸位置389处的甘氨酸

至精氨酸突变 (G389R) ; 以及氨基酸位置 406 处的精氨酸至色氨酸突变 (R406W) 。

[0346] Tau可以在一个或多个氨基酸残基处被磷酸化,所述氨基酸残基包括氨基酸位置 18、29、97、310 和 394 处的酪氨酸,氨基酸位置 184、185、198、199、202、208、214、235、237、238、262、293、324、356、396、400、404、409、412、413 和 422 处的丝氨酸; 以及氨基酸位置 175、181、205、212、217、231 和 403 处的苏氨酸。除非从上下文另外显而易见,否则对 tau 或其片段的提及包括天然人氨基酸序列,包括其同种型、突变体和等位基因变体。

[0347] III. 抗体

[0348] A. 结合特异性和功能特性

[0349] 本发明提供了与 tau 结合的抗体。一些抗体与 KXXSXXNX (K/H) H (SEQ ID NO: 191) 内的表位特异性结合。一些抗体与包含含有 441 个氨基酸的 tau 蛋白 (SEQ ID NO: 1) 的氨基酸残基 259-268、基本上由这些氨基酸残基组成或由这些氨基酸残基组成的肽结合。一些抗体与包含含有 441 个氨基酸的 tau 蛋白 (SEQ ID NO: 1) 的氨基酸残基 290-299、基本上由这些氨基酸残基组成或由这些氨基酸残基组成的肽结合。一些抗体与包含含有 441 个氨基酸的 tau 蛋白 (SEQ ID NO: 1) 的氨基酸残基 321-330、基本上由这些氨基酸残基组成或由这些氨基酸残基组成的肽结合。一些抗体与包含含有 441 个氨基酸的 tau 蛋白 (SEQ ID NO: 1) 的氨基酸残基 353-362、基本上由这些氨基酸残基组成或由这些氨基酸残基组成的肽结合。一些抗体与这些肽中的两种、三种或全部四种结合。一些抗体与含有 383 个氨基酸的 4RON 人 tau 蛋白 (SEQ ID NO: 3) 的残基 199-213 (对应于 SEQ ID NO: 1 的残基 257-271) 内的表位特异性结合。一些抗体与含有 383 个氨基酸的 4RON 人 tau 蛋白 (SEQ ID NO: 3) 的残基 262-276 (对应于 SEQ ID NO: 1 的残基 320-334) 内的表位特异性结合。本发明的一些抗体与由含有 441 个氨基酸的 tau 蛋白 (SEQ ID NO: 1) 的残基 257-271 组成的肽特异性结合。本发明的一些抗体与由含有 441 个氨基酸的 tau 蛋白 (SEQ ID NO: 1) 的残基 320-334 组成的肽特异性结合。本发明的一些抗体与由含有 441 个氨基酸的 tau 蛋白 SEQ ID NO: 1 的残基 259-268 (即 KIGSTENLKH (SEQ ID NO: 188)) 组成的肽特异性结合。本发明的一些抗体与由含有 441 个氨基酸的 tau 蛋白 SEQ ID NO: 1 的残基 290-299 (即 KCGSKDNIKH (SEQ ID NO: 192)) 组成的肽特异性结合。本发明的一些抗体与由含有 441 个氨基酸的 tau 蛋白 SEQ ID NO: 1 的残基 321-330 (即 KCGSLGNIHH (SEQ ID NO: 193)) 组成的肽特异性结合。本发明的一些抗体与由含有 441 个氨基酸的 tau 蛋白 SEQ ID NO: 1 的残基 353-362 (即 KIGSLDNITH (SEQ ID NO: 194)) 组成的肽特异性结合。本发明的一些抗体与由共有基序 KXXSXXNX (K/H) H (SEQ ID NO: 191) 组成的肽特异性结合。一些抗体与包含含有 441 个氨基酸的 tau 蛋白 SEQ ID NO: 1 的残基 259、262、265、267、268, 残基 290、293、296、298、299, 残基 321、324、327、329、330 或残基 353、356、359、362 的表位结合。一些抗体与 tau 结合, 而不管是否为磷酸化状态。一些抗体与不包括经受磷酸化的残基的表位结合。这些抗体可以通过用从天然来源纯化或重组表达的 tau 多肽免疫来获得。可以筛选结合处于非磷酸化形式以及其中易于磷酸化的一个或多个残基被磷酸化的形式的 tau 的抗体。与非磷酸化的 tau 相比, 此类抗体优选以不可区分的亲和力或至少在 1.5 倍、2 倍或 3 倍的系数内结合磷酸化 tau (即, 是泛特异性的)。3D6 是泛特异性单克隆抗体的实例。本发明还提供了与任何前述抗体结合相同表位例如 3D6 的表位的抗体。还包括了与任何前述抗体竞争结合 tau 的抗体, 例如与 3D6 竞争。

[0350] 上面提到的抗体可以从头产生, 方式为: 用包括 SEQ ID NO: 3 的残基 199-213 或

262-276(分别对应于SEQ ID NO:1的残基257-271或320-334)、基本上由这些残基组成或由这些残基组成的肽进行免疫;或用包括SEQ ID NO:1的残基259-268、290-299、321-330或353-362,基本上由这些残基组成或由这些残基组成的肽进行免疫;或用包含此类残基的全长tau多肽或其片段进行免疫,并且筛选与包括此类残基的肽的特异性结合。此类肽优选地附接到有助于引发对所述肽的抗体应答的异源缀合物分子。附接可以是直接的,或者经由间隔肽或氨基酸进行。使用半胱氨酸作为间隔氨基酸,因为其游离SH基团有利于载体分子的附接。还可以使用在甘氨酸与肽之间具有或不具有半胱氨酸残基的聚甘氨酸接头(例如,2至6个甘氨酸)。该载体分子用于提供T细胞表位,其有助于引发针对所述肽的抗体应答。通常使用几种载体,具体为匙孔血蓝蛋白(KLH)、卵清蛋白和牛血清白蛋白(BSA)。肽间隔物可以作为固相肽合成的一部分添加到肽免疫原中。载体通常通过化学交联添加。可以使用的化学交联剂的一些实例包括交联-N-马来酰亚胺基-6-氨基己酰基酯或间马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羧基琥珀酰亚胺酯(MBS)(参见例如,Harlow,E.等人,Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.1988;Sinigaglia等人,Nature,336:778-780(1988);Chicz等人,J.Exp.Med.,178:27-47(1993);Hammer等人,Cell 74:197-203(1993);Falk K.等人,Immunogenetics,39:230-242(1994);WO 98/23635;以及Southwood等人,J.Immunology,160:3363-3373(1998))。如果存在,载体和间隔物可以附接到免疫原的任一端。

[0351] 具有任选间隔物和载体的肽可以用于使实验室动物或B细胞免疫,如下文更详细描述。可以测试杂交瘤上清液与一种或多种肽和/或tau的磷酸化形式和非磷酸化形式(诸如具有处于磷酸化形式的位置404的tau的全长同种型)结合的能力,所述肽包括SEQ ID NO:3的残基199-213或262-276(分别对应于SEQ ID NO:1的残基257-271或320-334)、基本上由这些残基组成或由这些残基组成,或者包括SEQ ID NO:1的残基259-268、290-299、321-330或353-362,基本上由这些残基组成或由这些残基组成。可以将所述肽附接到载体或其他标签以有利于筛选测定。在这种情况下,载体或标签优先不同于用于免疫的间隔物和载体分子的组合,以消除对间隔物或载体而不是tau肽具有特异性的抗体。可以使用任何tau同种型。

[0352] 本发明提供了与tau内的表位结合的单克隆抗体。被命名为3D6的抗体是一种这样的示例性小鼠抗体。除非从上下文中另外显而易见,否则对3D6的提及应理解为是指该抗体的小鼠、嵌合、饰面和人源化形式中的任一种。抗体已经以[保藏号]被保藏。该抗体与KXXSXXNX(K/H)H(SEQ ID NO:191)的表位特异性结合。该抗体在含有383个氨基酸的4R0N人tau蛋白(SEQ ID NO:3)的氨基酸残基199-213和/或262-276(分别对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基257-271和/或320-334)内特异性结合。该抗体在SEQ ID NO:1的氨基酸残基259-268或290-299或321-330或353-362,以及它们中的任意2者、3者或所有4者的组合内特异性结合。该抗体通过其结合磷酸化和非磷酸化tau、tau的非病理和病理形式和构象和tau的错误折叠/聚集形式的能力进一步表征。被命名为6A10的抗体是一种这样的示例性小鼠抗体。除非从上下文中另外显而易见,否则对6A10的提及应理解为是指该抗体的小鼠、嵌合、饰面和人源化形式中的任一种。6A10的重链的Kabat/Chothia复合物CDR分别被命名为SEQ ID NO:67、68和69,并且6A10的轻链的Kabat CDR分别被命名为SEQ ID NO:12、13和14。小鼠6A10分别与小鼠3D6的VH链和VL链有82.1%的VH序列同一性和100%的VL序列同一性。

[0353] 本发明的一些抗体与被命名为3D6的抗体结合相同或重叠的表位。该抗体的重链成熟可变区和轻链成熟可变区的序列分别被命名为SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:11。具有这种结合特异性的其他抗体可以通过以下方式产生：用tau或其部分来对小鼠进行免疫，所述tau或其部分包括期望表位（例如，SEQ ID NO:3的199-213和/或262-276，分别对应于SEQ ID NO:1的残基257-271和/或320-334；或例如SEQ ID NO:1的259-268或290-299或321-330或353-362，它们中的2者、3者或所有4者的组合）、基本上由期望表位组成或由期望表位组成，并且筛选所得的抗体以获得任选地与具有小鼠3D6 (IgG1 κ) 的可变区的抗体竞争结合tau的抗体。包括期望表位的tau片段可以与有助于引发对所述片段的抗体应答的载体连接并且/或者与有助于引发这种应答的佐剂组合。可以针对与指定残基的突变体相比与tau或其片段的差异结合来筛选此类抗体。针对此类突变体的筛选更精确地限定了结合特异性，以允许鉴定其结合受到特定残基的诱变的抑制并且可能共享其他所例示抗体的功能特性的抗体。突变可以是在整个靶标中或在靶标的已知其中存在表位的整个区段中用丙氨酸（或丝氨酸，如果丙氨酸已经存在的话）进行系统性替换取代，一次一个残基，或间隔开更宽的间距。如果同一组突变显著降低两种抗体的结合，那么这两种抗体结合相同的表位。

[0354] 具有所选择鼠抗体（例如，3D6）的结合特异性的抗体也可以使用噬菌体展示方法的变型来产生。参见Winter, WO 92/20791。该方法尤其适用于产生人抗体。在该方法中，使用所选择鼠抗体的重链可变区或轻链可变区作为起始材料。例如，如果选择轻链可变区作为起始材料，则构建噬菌体文库，其中成员展示相同的轻链可变区（即，鼠起始材料）和不同的重链可变区。重链可变区可以例如由重排的人重链可变区的文库获得。选择对tau或其片段（例如，至少 10^8 ，优选地至少 $10^9 M^{-1}$ ）表现出强特异性结合的噬菌体。然后，来自该噬菌体的重链可变区用作构建另一噬菌体文库的起始材料。在该文库中，每个噬菌体展示相同的重链可变区（即，从第一个展示文库中识别的区域）和不同的轻链可变区。轻链可变区可以例如由重排的人可变轻链区的文库获得。再一次，选择对于tau或其片段表现出强特异性结合的噬菌体。所得的抗体通常具有与鼠起始材料相同或相似的表位特异性。

[0355] 3D6的重链的Kabat/Chothia复合物CDR分别被命名为SEQ ID NO:8、9和10，并且3D6的轻链的Kabat CDR分别被命名为SEQ ID NO:12、13和14。

[0356] 表2指出如由Kabat、Chothia、Chothia和Kabat的复合物（在本文也称为“Kabat/Chothia复合物”）、AbM和Contact所定义的3D6 CDR。

[0357] 表2：如由Kabat、Chothia、Chothia和Kabat的复合物、AbM和Contact所定义的3D6 CDR

[0358]

环	Kabat 的复合物	Chothia	Chothia 和 Kabat 的复合物	AbM	Contact
L1	L24--L34 SEQ ID NO:12	L24--L34 SEQ ID NO:12	L24--L34 SEQ ID NO:12	L24--L34 SEQ ID NO:12	L30--L36 SEQ ID NO:36
L2	L50--L56 SEQ ID NO:13	L50--L56 SEQ ID NO:13	L50--L56 SEQ ID NO:13	L50--L56 SEQ ID NO:13	L46--L55 SEQ ID NO:37
L3	L89--L97 SEQ ID NO:14	L89--L97 SEQ ID NO:14	L89--L97 SEQ ID NO:14	L89--L97 SEQ ID NO:14	L89--L96 SEQ ID NO:38

[0359] 表2: 如由Kabat、Chothia、Chothia和Kabat的复合物、AbM和Contact所定义的3D6 CDR

[0360]

环	Kabat 的复合物	Chothia	Chothia 和 Kabat 的复合物	AbM	Contact
H1	H31--H35B SEQ ID NO:32	H26--H32 SEQ ID NO:33	H26--H35B SEQ ID NO:8	H26--H35B SEQ ID NO:8	H30--H35B SEQ ID NO:39
H2	H50--H65 SEQ ID NO:9	H52--H56 SEQ ID NO:34	H50--H65 SEQ ID NO:9	H50--H58 SEQ ID NO:35	H47--H58 SEQ ID NO:40
H3	H95--H102 SEQ ID NO:10	H95--H102 SEQ ID NO:10	H95--H102 SEQ ID NO:10	H95--H102 SEQ ID NO:10	H93--H101 SEQ ID NO:41

[0361] 其他抗体可以通过编码示例性抗体 (诸如3D6) 的重链和轻链的cDNA的诱变获得。在成熟重链可变区和/或成熟轻链可变区的氨基酸序列中与3D6至少70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同并且维持其功能特性,以及/或者与相应抗体的差别在于少量功能上不重要的氨基酸取代 (例如,保守取代)、缺失或插入的单克隆抗体也包括在本发明中。还包括具有至少一个或所有六个CDR的单克隆抗体,所述CDR如由任何常规定义所定义,但优选Kabat,其与3D6的对应CDR具有90%、95%、99%或100%的同一性。

[0362] 本发明还提供了具有完全或基本上来自3D6的一些或全部 (例如,3、4、5和6个) CDR的抗体。此类抗体可包括重链可变区,其具有完全或基本上来自3D6的重链可变区的至少两个且通常全部三个CDR,和/或轻链可变区,其具有完全或基本上来自3D6的轻链可变区的至少两个且通常全部三个CDR。抗体可包括重链和轻链。当CDR包含不超过4、3、2或1个取代、插入或缺失时,所述CDR基本上来自对应的3D6 CDR,不同的是CDR-H2 (当由Kabat定义时) 可具有不超过6、5、4、3、2或1个取代、插入,或缺失。此类抗体可在成熟重链和/或轻链可变区的氨基酸序列中与3D6具有至少70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性且维持其功能特性,和/或与3D6的差别在于少量功能上不重要的氨基酸取代 (例如,保守取代)、缺失或插入。

[0363] 通过此类测定鉴定的一些抗体可以结合tau的单体、错误折叠、聚集、磷酸化或非磷酸化形式或其他形式。同样,一些抗体对tau的非病理和病理形式和构象具有免疫反应性。

[0364] B. 非人抗体

[0365] 针对tau或其片段(例如,SEQ ID NO:3的氨基酸残基199-213或262-276,分别对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基257-271或320-334;或者SEQ ID NO:1的氨基酸残基259-268或290-299或321-330或353-362)的其他非人抗体(例如,鼠、豚鼠、灵长类动物、兔或大鼠)的产生可以通过例如用tau或其片段使动物免疫来实现。参见Harlow&Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (CSHP NY, 1988) (以引用方式并入以用于所有目的)。这种免疫原可以从天然来源、通过肽合成或通过重组表达获得。任选地,免疫原可以与载体蛋白融合或以其他方式复合施用。任选地,免疫原可以与佐剂一起施用。可以如下所述使用几种类型的佐剂。对于实验室动物的免疫,优选完全弗氏佐剂,然后是不完全佐剂。兔或豚鼠通常用于制备多克隆抗体。小鼠通常用于制备单克隆抗体。针对与tau或tau内表位(例如,包含SEQ ID NO:3的氨基酸残基199-213或262-276中的一个或多个残基的表位,这些残基分别对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基257-271或320-334;或包含SEQ ID NO:1的氨基酸残基259-268或290-299或321-330或353-362中的一个或多个残基的表位)的特异性结合对抗体进行筛选。这种筛选可以通过以下方式实现:确定抗体与tau变体的集合的结合,所述tau变体诸如含有SEQ ID NO:3的氨基酸残基199-213或262-276(分别对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基257-271或320-334)的tau变体,或者含有SEQ ID NO:1的氨基酸残基259-268或290-299或321-330或353-362,或这些残基内的突变的tau变体;以及确定哪些tau变体与抗体结合。可以例如通过蛋白质印迹(Western blot)、FACS或ELISA来评估结合。

[0366] C. 人源化抗体

[0367] 人源化抗体是遗传工程化的抗体,其中将来自非人“供体”抗体的CDR接枝到人“受体”抗体序列中(参见,例如,Queen, US 5,530,101和5,585,089; Winter, US 5,225,539; Carter, US 6,407,213; Adair, US 5,859,205; 以及 Foote, US 6,881,557)。受体抗体序列可以是,例如,成熟人抗体序列、此类序列的复合物、人抗体序列的共有序列,或种系区序列。因此,人源化抗体是具有完全或基本上来自供体抗体的至少三个、四个、五个或全部CDR,以及完全或基本上来自人抗体序列的可变区框架序列和恒定区(如果存在的话)的抗体。类似地,人源化重链具有完全或基本上来自供体抗体重链的至少一个、两个且通常全部三个CDR,以及基本上来自人重链可变区框架和恒定区序列的重链可变区框架序列和重链恒定区(如果存在的话)。类似地,人源化轻链具有完全或基本上来自供体抗体轻链的至少一个、两个且通常全部三个CDR,以及基本上来自人轻链可变区框架和恒定区序列的轻链可变区框架序列和轻链恒定区(如果存在的话)。除纳米抗体和dAb之外,人源化抗体包括人源化重链和人源化轻链。当相应CDR之间至少85%、90%、95%或100%的对应残基(如由任何常规定义所定义,但优选地由Kabat定义)相同时,人源化抗体中的CDR基本上来自非人抗体中的对应CDR。当至少85%、90%、95%或100%的由Kabat定义的对应该残基相同时,抗体链的可变区框架序列或抗体链的恒定区分别基本上来自人可变区框架序列或人恒定区。为了根据2014年世界卫生组织(WHO)国际非专有名称(INN)对人源化抗体的定义被归为人源化的,抗体必须与人种系抗体序列(即,在体细胞高频突变(somatic hypermutation)之前)具有至

少85%的同一性。混合抗体是一条抗体链(例如,重链)满足阈值但另一条链(例如,轻链)不满足阈值的抗体。如果任一条链都不满足阈值,那么抗体被归为嵌合体,即使两条链的可变框架区是基本上人的,具有一些鼠回复突变。参见Jones等人(2016)The INNs and outs of antibody nonproprietary names,mAbs 8:1,1-9,DOI:10.1080/19420862.2015.1114320。还参见“WHO-INN:International nonproprietary names (INN) for biological and biotechnological substances (areview)” (Internet)2014。可从:<http://www.who.int/medicines/services/inn/BioRev2014.pdf>获得,其以引用方式并入本文。为避免疑义,如本文所用的术语“人源化”不旨在限制人源化抗体的2014WHO INN定义。本文提供的一些人源化抗体与人种系序列具有至少85%的序列同一性,并且本文提供的一些人源化抗体与人种系序列具有小于85%的序列同一性。本文提供的人源化抗体的一些重链与人种系序列具有约60%至100%的序列同一性,例如,在约60%至69%、70%至79%、80%至84%,或85%至89%的范围内。一些重链不满足2014WHO INN定义,并且与人种系序列具有,例如,约64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%,或82%、83%,或84%的序列同一性,而其他重链满足2014WHO INN定义并且与人种系序列具有约85%、86%、87%、88%、89%或更高的序列同一性。本文提供的人源化抗体的一些轻链与人种系序列具有约60%至100%的序列同一性,例如,在约80%至84%,或85%至89%的范围内。一些轻链不满足2014WHO INN定义,并且与人种系序列具有,例如,约81%、82%、83%,或84%的序列同一性,而其他轻链满足2014WHO INN定义并且与人种系序列具有约85%、86%、87%、88%、89%或更高的序列同一性。根据2014WHO INN定义为“嵌合”的本文提供的一些人源化抗体具有与人种系序列具有小于85%同一性的重链,所述重链和与人种系序列具有小于85%同一性的轻链配对。根据2014WHO INN定义为“混合”的本文提供的一些人源化抗体,例如,具有与人种系序列具有至少85%序列同一性的重链,所述重链和与人种系序列具有小于85%序列同一性的轻链配对,或反之亦然。本文提供的一些人源化抗体满足“人源化”的2014WHO INN定义并且具有与人种系序列具有至少85%序列同一性的重链,所述重链和与人种系序列具有至少85%序列同一性的轻链配对。本发明的另外的人源化抗体符合2014WHO INN对“混合”的定义。

[0368] 尽管人源化抗体通常掺入来自小鼠抗体的全部六个CDR(由任何常规定义所定义,但优选由Kabat定义),但它们也可以用少于来自小鼠抗体的全部CDR(例如,至少3个、4个或5个CDR)制备(例如,Pascalis等人,J.Immunol.169:3076,2002;Vajdos等人,J.of Mol.Biol.,320:415-428,2002;Iwahashi等人,Mol.Immunol.36:1079-1091,1999;Tamura等人,J.Immunol.,164:1432-1441,2000)。

[0369] 在一些抗体中,仅需要部分CDR,即结合所需的CDR残基的子集,称为SDR,保持结合在人源化抗体中。可以基于先前的研究(例如,通常不需要CDR H2中的残基H60-H65)从位于Chothia高变环外的Kabat CDR区域(Chothia,J.Mol.Biol.196:901,1987)中,通过分子建模和/或经验性地,或如Gonzales等人,Mol.Immunol.41:863,2004中所述鉴定不接触抗原且不在SDR中的CDR残基。在此类人源化抗体中,在一个或多个供体CDR残基不存在或省略了整个供体CDR的位置处,占据该位置的氨基酸可以是占据受体抗体序列中的对应位置(通过Kabat编号)的氨基酸。CDR中将包括的受体对供体氨基酸的此类取代的数量反映了竞争考虑的平衡。此类取代可能有利于减少人源化抗体中小鼠氨基酸的数量,并且因此降低潜在

的免疫原性和/或满足“人源化”的WHO INN定义。然而,取代还可引起亲和力的改变,并且优选避免亲和力的显著降低。CDR内用于取代的位置和用于取代的氨基酸也可经验性地选择。

[0370] 人受体抗体序列可任选地选自许多已知的人抗体序列,以在人受体序列可变区框架与供体抗体链的对应的可变区框架之间提供高度的序列同一性(例如,65%至85%的同一性)。

[0371] 一些人源化抗体和嵌合抗体具有相同(在实验误差范围内)或改进的功能特性,例如对人tau的结合亲和力、抑制tau内化到神经元中,如实施例所述,作为它们所源自的鼠抗体。例如,一些人源化抗体和嵌合抗体具有在它们所源自的鼠抗体的3倍、2倍或1倍内的结合亲和力,或者在实验误差内无法区分的亲和力。一些人源化抗体和嵌合抗体抑制tau内化到神经元中,如实施例所述,其抑制水平在它们所源自的鼠抗体的3倍、2倍或1倍内,或者在实验误差范围内以与它们所源自的小鼠抗体相同的水平抑制。与先前描述的3D6抗体的人源化形式(参见WO 2017/191560)相比,一些人源化抗体表现出降低的免疫原性、增加的亲和力、增加的热稳定性和/或改进的表达hu3D6VHv1bA11/L2-DIM4展示出相比于亲本hu3D6VHv1bA11/hu3D6VLv2改进的亲和力,如通过结合率(on-rate)、解离率(off-rate)和Kd数所证实的。hu3D6VHv1bA11/L2-DIM4展示出比亲本hu3D6VHv1bA11/hu3D6VLv2高的热稳定性和滴度。

[0372] 重链受体序列的一个实例是人源化48G7 Fab的人成熟重链可变区,PDB登录码为2RCS-VH_huFrwk(SEQ ID NO:75)。3D6和48G7 Fab的可变结构域还在CDR-H1、H2环上共用相同的长度。重链受体序列的一个实例是人成熟重链可变区IMGT#IGHV1-69-2*01(SEQ ID NO:25)。IMGT#IGHV1-69-2*01(SEQ ID NO:25)共享小鼠3D6重链CDR-H1和H2的规范形式。IMGT#IGHV1-69-2*01(SEQ ID NO:25)属于人重链子组1。轻链的受体序列的一个实例是具有人抗体PDB登录码ARX71335 VL(SEQ ID NO:82)的人成熟轻链可变区。3D6和ARX71335抗体的可变轻结构域还在CDR-L1、L2和L3环上共用相同的长度。轻链受体序列的一个实例是具有IMGT#IGKV2-30*02(SEQ ID NO:27)的人成熟轻链可变区。IMGT#IGKV2-30*02(SEQ ID NO:27)具有与小鼠3D6相同的CDR-L1、CDR-L2和L3的规范类别。IMGT#IGKV2-30*02(SEQ ID NO:27)属于人κ子组2。

[0373] 如果选择多于一种人受体抗体序列,那么可以使用那些受体的复合物或杂交体,并且在人源化轻链和重链可变区中的不同位置使用的氨基酸可以取自所用的任何人受体抗体序列。例如,使用IMGT#IGHV1-69-2*01(SEQ ID NO:25)和PDB登录码#2RCS-VH_huFrwk(SEQ ID NO:75)的人成熟重链可变区作为用于3D6成熟重链可变区的人源化的受体序列。这两个受体不同的位置的实例是位置H17(T或S)。3D6重链可变区的人源化型式可以在该位置处包括任一种氨基酸。例如,使用人成熟轻链可变区IMGT#IGKV2-30*02(SEQ ID NO:27)和PDB码#ARX71335-VL_huFrwk(SEQ ID NO:82)作为用于3D6成熟轻链可变区的人源化的受体序列。这两个受体不同的位置的实例是位置L100(Q或A)。3D6轻链可变区的人源化型式可以在该位置处包括任一种氨基酸。

[0374] 可以基于它们对CDR构象和/或与抗原的结合的可能影响来选择来自人可变区框架残基的某些氨基酸用于取代。对此类可能影响的研究通过建模、检查特定位置处的氨基酸的特征,或经验观察特定氨基酸的取代或诱变的作用来实现。

[0375] 例如,当鼠可变区框架残基与选定的人可变区框架残基之间的氨基酸不同时,当

合理地预期氨基酸有以下特征时人框架氨基酸可以被来自小鼠抗体的等效框架氨基酸取代:

[0376] (1) 直接非共价结合抗原;

[0377] (2) 与CDR区相邻或在由Chothia而不是Kabat所限定的CDR内;

[0378] (3) 以其他方式与CDR区相互作用(例如,在CDR区的约6 Å内), (例如,通过对同源的已知免疫球蛋白链的解析结构上的轻链或重链进行建模来鉴定);或

[0379] (4) 是参与VL-VH界面的残基。

[0380] 在一个实施方案中,使用两阶段PCR方案生成人源化序列,其允许使用QuikChange定点诱变引入多个突变、缺失和插入[Wang,W.和Malcolm,B.A. (1999) BioTechniques 26: 680-682)]。

[0381] 来自Queen,US 5,530,101定义的类别(1)至(3)的框架残基有时另选地被称为规范残基和微调残基(vernier residue)。有助于限定CDR环的构象的框架残基有时被称为规范残基(Chothia&Lesk,J.Mol.Biol.196:901-917(1987);Thornton&Martin,J.Mol.Biol.263:800-815(1996))。支持抗原结合环构象并在精细调节抗体与抗原的配合中发挥作用的框架残基有时被称为微调残基(Foote&Winter,J.Mol.Biol 224:487-499(1992))。

[0382] 作为取代候选的其他框架残基是产生潜在糖基化位点的残基。其他取代候选是受体人框架氨基酸,其在该位置对于人免疫球蛋白不常见。这些氨基酸可以被来自小鼠供体抗体的等同位置或来自更典型的人免疫球蛋白的等同位置的氨基酸取代。

[0383] 作为取代候选的其他框架残基是N末端谷氨酰胺残基(Q),其可以替换为谷氨酸(E)以最小化焦谷氨酸转化的可能性[Y.Diana Liu等人,2011,J.Biol.Chem.,286:11211-11217]。谷氨酸(E)至焦谷氨酸(pE)的转化比从谷氨酰胺(Q)更慢地发生。由于在谷氨酰胺至pE转化中失去伯胺,因此抗体变得具有更大酸性。不完全转化产生抗体的异质性,这使用基于电荷的分析方法可以观察为多个峰。异质性差异可能表明缺乏过程控制。

[0384] 示例性的人源化抗体是小鼠3D6的人源化形式,命名为Hu3D6。

[0385] 小鼠抗体3D6包括成熟重链可变区和成熟轻链可变区,其分别具有包括SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:11的氨基酸序列。本发明提供了鼠3D6抗体的人源化形式,其包括10个所例示的人源化重链成熟可变区(hu3D6VHvb1(SEQ ID NO:76)、hu3D6VHvb2(SEQ ID NO:77)、hu3D6VHvb3(SEQ ID NO:78)、hu3D6VHvb4(SEQ ID NO:79)、hu3D6VHvb5(SEQ ID NO:80)、hu3D6VHvb6(SEQ ID NO:90)、hu3D6VHvb7(SEQ ID NO:91)、hu3D6VHv1bA11 D60E(h3D6VHvb8,SEQ ID NO:146)、hu3D6VHv1bA11 L82cV(SEQ ID NO:147)和hu3D6VHv1bA11D60E_L80M_Q81E_L82cV_T83R(h3D6VHvb9,SEQ ID NO:148)),以及56个所例示的人源化轻链成熟可变区(hu3D6VLvb1(SEQ ID NO:83)、hu3D6VLvb2(SEQ ID NO:84)、hu3D6VLvb3(SEQ ID NO:85)、hu3D6VLv2L54D(SEQ ID NO:93)、hu3D6VLv2 L54G(SEQ ID NO:94)、hu3D6VLv2L54N(SEQ ID NO:95)、hu3D6VLv2 L54E(SEQ ID NO:96)、hu3D6VLv2L50E(SEQ ID NO:97)、hu3D6VLv2 L54Q(SEQ ID NO:98)、hu3D6VLv2L50D(SEQ ID NO:99)、hu3D6VLv2 L54K(SEQ ID NO:100)、hu3D6VLv2L54R(SEQ ID NO:101)、hu3D6VLv2 L54T(SEQ ID NO:102)、hu3D6VLv2L50G(SEQ ID NO:103)、hu3D6VLv2 I48G(SEQ ID NO:104)、hu3D6VLv2I48D(SEQ ID NO:105)、hu3D6VLv2 L47G(SEQ ID NO:106)、hu3D6VLv2Y49E(SEQ

ID NO:107)、hu3D6VLv2 L54V (SEQ ID NO:108)、hu3D6VLv2L54S (SEQ ID NO:109)、hu3D6VLv2 S52G (SEQ ID NO:110)、hu3D6VLv2L47N (SEQ ID NO:111)、hu3D6VLv2 L47D (SEQ ID NO:112)、hu3D6VLv2 L47E (SEQ ID NO:113)、hu3D6VLv2 L47P (SEQ ID NO:114)、hu3D6VLv2 L47T (SEQ ID NO:115)、hu3D6VLv2 L47S (SEQ ID NO:116)、hu3D6VLv2 L47A (SEQ ID NO:117)、hu3D6VLv2 L50V (SEQ ID NO:118)、hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R (SEQ ID NO:119)、hu3D6VLv2L37Q_L50G_L54G (SEQ ID NO:120)、hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54G (SEQ ID NO:121)、hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R (SEQ ID NO:122)、hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54T (SEQ ID NO:123)、hu3D6VLv2L37Q_S52G_L54D (SEQ ID NO:124)、hu3D6VLv2 L37Q_L54R (SEQ ID NO:125)、hu3D6VLv2 L37Q_L54G (SEQ ID NO:126)、hu3D6VLv2L37Q_L54D (SEQ ID NO:127)、hu3D6VLv2 L37Q_L50G (SEQ ID NO:128)、hu3D6VLv2 L37Q_L50D (SEQ ID NO:129)、hu3D6VLv2L37Q_L54T (SEQ ID NO:130)、hu3D6VLv2 L37Q_S52G (SEQ ID NO:131)、hu3D6VLv2 L37Q_L54E (SEQ ID NO:145)、hu3D6VLv2L37Q_L50D_L54G (SEQ ID NO:132)、hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R (SEQ ID NO:133)、hu3D6VLv2 L37Q_L50E_L54G (SEQ ID NO:134)、hu3D6VLv2 L37Q_L50E_L54R (SEQ ID NO:135)、hu3D6VLv2L37Q_L50G_L54R_G100Q (SEQ ID NO:136)、hu3D6VLv2L37Q_L50G_L54G_G100Q (SEQ ID NO:137)、hu3D6VLv2L37Q_S52G_L54R_G100Q (SEQ ID NO:138)、hu3D6VLv2L37Q_S52G_L54D_G100Q (SEQ ID NO:139)、hu3D6VLv2L37Q_L50D_L54G_G100Q (SEQ ID NO:140)、hu3D6VLv2L37Q_L50D_L54R_G100Q (SEQ ID NO:141)、hu3D6VLv2L37Q_L50V_L54D_G100Q (SEQ ID NO:142)、hu3D6VLv2 L37Q (SEQ ID NO:143)和hu3D6VLv2 G100Q (SEQ ID NO:144))。

[0386] 图2和图3分别示出鼠3D6和各种人源化抗体的重链可变区和轻链可变区的比对。图9A和图9B示出鼠3D6的重链可变区与各种人源化抗体的重链可变区的比对。图10A、图10B、图10C和图10D示出hu3D6VLv2的轻链可变区与各种人源化抗体的轻链可变区的比对。

[0387] 出于诸如可能影响CDR构象和/或与抗原的结合、介导重链与轻链之间的相互作用、与恒定区的相互作用、是期望或不期望的翻译后修饰的位点、是其在人可变区序列中的位置的不常见残基且因此潜在地具有免疫原性、获得聚集潜力以及其他原因之类的原因，以下35个可变区框架位置被认为是用于56个所例示的人成熟轻链可变区和10个所例示的人成熟重链可变区中的取代的候选位置，如实例中进一步指定的：L7 (T7S)、L10 (T10S)、L15 (I15L)、L17 (Q17E)、L37 (L37Q)、L45 (K45R)、L47 (L47G、L47N、L47D、L47E、L47P、L47T、L47S或L47A)、L48 (I48G或I48D)、L49 (Y49E)、L83 (L83V)、L86 (H86Y)、L100 (A100Q)、L106 (L106I)、H1 (Q1E)、H5 (Q5V)、H11 (L11V)、H17 (S17T)、H20 (L20I)、H23 (T23K)、H38 (K38R)、H42 (E42G)、H43 (Q43K)、H66 (K66R)、H67 (A67V)、H75 (S75T)、H76 (N76D)、H80 (L80M)、H81 (Q81E)、H82c (L82cV)、H83 (T83R)、H91 (Y91F)、H93 (A93S)、H94 (S94T)、H108 (T108L)和H109 (L109V)。以下9个可变区CDR位置被认为是用于56个所例示的人成熟轻链可变区和10个所例示的人成熟重链可变区中的取代的候选位置，如实例中进一步指定的：L24 (K24R)、L50 (L50E、L50D、L50G或L50V)、L52 (S52G)、L54 (L54D、L54G、L54N、L54E、L54Q、L54K、L54R、L54T、L54V或L54S)、H28 (N28T)、H54 (N54D)、H56 (D56E)、H58 (V58I)和H60 (D60E)。在一些人源化3D6抗体中，Kabat CDR-H2具有包括SEQ ID NO:87的氨基酸序列。在一些人源化3D6抗体中，Kabat CDR-H2具有包括SEQ ID NO:149的氨基酸序列。在一些人源化3D6抗体中，Kabat-Chothia复合物CDR-H1具有包括SEQ ID NO:86的氨基酸序列，并且Kabat CDR-H2具有包括SEQ ID NO:

87的氨基酸序列。在一些人源化3D6抗体中,Kabat-Chothia复合物CDR-H1具有包括SEQ ID NO:86的氨基酸序列,并且Kabat CDR-H2具有包括SEQ ID NO:88的氨基酸序列。在一些人源化3D6抗体中,Kabat-Chothia复合物CDR-H1具有包括SEQ ID NO:86的氨基酸序列,并且Kabat CDR-H2具有包括SEQ ID NO:92的氨基酸序列。在一些人源化3D6抗体中,Kabat CDR-L1具有包括SEQ ID NO:89的氨基酸序列。在一些人源化3D6抗体中,Kabat CDR-L2包含选自由SEQ ID NO:150至SEQ ID NO:175组成的组的氨基酸序列。

[0388] 此处,与其他地方一样,首先提到的残基是通过将Kabat CDR或复合物Chothia-Kabat CDR (在CDR-H1的情况下)接枝到人受体框架中而形成的人源化抗体的残基,并且第二提到的残基是考虑替换这一残基的残基。因此,在可变区框架内,首先提到的残基是人,并且在CDR内,首先提到的残基是小鼠。

[0389] 所例示的抗体包括所例示的成熟重链可变区和成熟轻链可变区的任何排列或组合,VHvb1/VLvb1、VHvb1/VLvb2、VHvb1/VLvb3、VHvb2/VLvb1、VHvb2/VLvb2、VHvb2/VLvb3、VHvb3/VLvb1、VHvb3/VLvb2、VHvb3/VLvb3、VHvb4/VLvb1、VHvb4/VLvb2、VHvb4/VLvb3、VHvb5/VLvb1、VHvb5/VLvb2、VHvb5/VLvb3、VHvb6/VLvb1、VHvb6/VLvb2、VHvb6/VLvb3、VHvb7/VLvb1、VHvb7/VLvb2、VHvb7/VLvb3。所例示的抗体包括所例示的成熟重链可变区hu3D6VHvb1 (SEQ ID NO:76)、hu3D6VHvb2 (SEQ ID NO:77)、hu3D6VHvb3 (SEQ ID NO:78)、hu3D6VHvb4 (SEQ ID NO:79)、hu3D6Hvb5 (SEQ ID NO:80)、hu3D6VHvb6 (SEQ ID NO:90)、hu3D6VHvb7 (SEQ ID NO:91)、hu3D6VHvb7 (SEQ ID NO:91)、hu3D6VHv1bA11 D60E (h3D6VHvb8, SEQ ID NO:146)、hu3D6VHv1bA11L82cV (SEQ ID NO:147) 和 hu3D6VHv1bA11D60E_L80M_Q81E_L82cV_T83R (h3D6VHvb9, SEQ ID NO:148) 与人源化3D6VL轻链可变区hu3D6VLvb1 (SEQ ID NO:83)、hu3D6VLvb2 (SEQ ID NO:84)、hu3D6VLvb3 (SEQ ID NO:85)、hu3D6VLv2 L54D (SEQ ID NO:93)、hu3D6VLv2 L54G (SEQ ID NO:94)、hu3D6VLv2 L54N (SEQ ID NO:95)、hu3D6VLv2 L54E (SEQ ID NO:96)、hu3D6VLv2 L50E (SEQ ID NO:97)、hu3D6VLv2 L54Q (SEQ ID NO:98)、hu3D6VLv2 L50D (SEQ ID NO:99)、hu3D6VLv2 L54K (SEQ ID NO:100)、hu3D6VLv2 L54R (SEQ ID NO:101)、hu3D6VLv2 L54T (SEQ ID NO:102)、hu3D6VLv2 L50G (SEQ ID NO:103)、hu3D6VLv2 I48G (SEQ ID NO:104)、hu3D6VLv2 I48D (SEQ ID NO:105)、hu3D6VLv2 L47G (SEQ ID NO:106)、hu3D6VLv2 Y49E (SEQ ID NO:107)、hu3D6VLv2 L54V (SEQ ID NO:108)、hu3D6VLv2 L54S (SEQ ID NO:109)、hu3D6VLv2 S52G (SEQ ID NO:110)、hu3D6VLv2 L47N (SEQ ID NO:111)、hu3D6VLv2 L47D (SEQ ID NO:112)、hu3D6VLv2 L47E (SEQ ID NO:113)、hu3D6VLv2 L47P (SEQ ID NO:114)、hu3D6VLv2 L47T (SEQ ID NO:115)、hu3D6VLv2 L47S (SEQ ID NO:116)、hu3D6VLv2 L47A (SEQ ID NO:117)、hu3D6VLv2 L50V (SEQ ID NO:118)、hu3D6VLv2L37Q_L50G_L54R (SEQ ID NO:119)、hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G (SEQ ID NO:120)、hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54G (SEQ ID NO:121)、hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R (SEQ ID NO:122)、hu3D6VLv2L37Q_S52G_L54T (SEQ ID NO:123)、hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54D (SEQ ID NO:124)、hu3D6VLv2 L37Q_L54R (SEQ ID NO:125)、hu3D6VLv2L37Q_L54G (SEQ ID NO:126)、hu3D6VLv2 L37Q_L54D (SEQ ID NO:127)、hu3D6VLv2 L37Q_L50G (SEQ ID NO:128)、hu3D6VLv2L37Q_L50D (SEQ ID NO:129)、hu3D6VLv2 L37Q_L54T (SEQ ID NO:130)、hu3D6VLv2 L37Q_S52G (SEQ ID NO:131)、hu3D6VLv2L37Q_L54E (SEQ ID NO:145)、hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54G (SEQ ID NO:132)、

hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R(SEQ ID NO:133)、hu3D6VLv2L37Q_L50E_L54G(SEQ ID NO:134)、hu3D6VLv2 L37Q_L50E_L54R(SEQ ID NO:135)、hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R_G100Q(SEQ ID NO:136)、hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G_G100Q(SEQ ID NO:137)、hu3D6VLv2L37Q_S52G_L54R_G100Q(SEQ ID NO:138)、hu3D6VLv2L37Q_S52G_L54D_G100Q(SEQ ID NO:139)、hu3D6VLv2L37Q_L50D_L54G_G100Q(SEQ ID NO:140)、hu3D6VLv2L37Q_L50D_L54R_G100Q(SEQ ID NO:141)、hu3D6VLv2L37Q_L50V_L54D_G100Q(SEQ ID NO:142)、hu3D6VLv2 L37Q(SEQ ID NO:143)和hu3D6VLv2 G100Q(SEQ ID NO:144)中的任一者的任何排列或组合。

[0390] 所例示的抗体包括所例示的成熟重链可变区hu3D6VHvb1(SEQ ID NO:76)、hu3D6VHvb2(SEQ ID NO:77)、hu3D6VHvb3(SEQ ID NO:78)、hu3D6VHvb4(SEQ ID NO:79)、hu3D6Hvb5(SEQ ID NO:80)、hu3D6VHvb6(SEQ ID NO:90)、hu3D6VHvb7(SEQ ID NO:91)、hu3D6VHvb7(SEQ ID NO:91)、hu3D6VHv1bA11 D60E(h3D6VHvb8,SEQ ID NO:146)、hu3D6VHv1bA11 L82cV(SEQ ID NO:147)和hu3D6VHv1bA11D60E_L80M_Q81E_L82cV_T83R(h3D6VHvb9,SEQ ID NO:148)与人源化3D6VL轻链可变区hu3D6VLv1(SEQ ID NO:20)、hu3D6VLv2(SEQ ID NO:21)、hu3D6VLv3(SEQ ID NO:22)和hu3D6VLv4(SEQ ID NO:22)中的任一者的任何排列或组合。所例示的抗体包括所例示的成熟轻链可变区hu3D6VLvb1(SEQ ID NO:83)、hu3D6VLvb2(SEQ ID NO:84)、hu3D6VLvb3(SEQ ID NO:85)、hu3D6VLv2 L54D(SEQ ID NO:93)、hu3D6VLv2 L54G(SEQ ID NO:94)、hu3D6VLv2 L54N(SEQ ID NO:95)、hu3D6VLv2 L54E(SEQ ID NO:96)、hu3D6VLv2 L50E(SEQ ID NO:97)、hu3D6VLv2 L54Q(SEQ ID NO:98)、hu3D6VLv2 L50D(SEQ ID NO:99)、hu3D6VLv2 L54K(SEQ ID NO:100)、hu3D6VLv2 L54R(SEQ ID NO:101)、hu3D6VLv2 L54T(SEQ ID NO:102)、hu3D6VLv2 L50G(SEQ ID NO:103)、hu3D6VLv2 I48G(SEQ ID NO:104)、hu3D6VLv2 I48D(SEQ ID NO:105)、hu3D6VLv2 L47G(SEQ ID NO:106)、hu3D6VLv2 Y49E(SEQ ID NO:107)、hu3D6VLv2 L54V(SEQ ID NO:108)、hu3D6VLv2 L54S(SEQ ID NO:109)、hu3D6VLv2 S52G(SEQ ID NO:110)、hu3D6VLv2 L47N(SEQ ID NO:111)、hu3D6VLv2 L47D(SEQ ID NO:112)、hu3D6VLv2 L47E(SEQ ID NO:113)、hu3D6VLv2 L47P(SEQ ID NO:114)、hu3D6VLv2 L47T(SEQ ID NO:115)、hu3D6VLv2 L47S(SEQ ID NO:116)、hu3D6VLv2 L47A(SEQ ID NO:117)、hu3D6VLv2 L50V(SEQ ID NO:118)、hu3D6VLv2L37Q_L50G_L54R(SEQ ID NO:119)、hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G(SEQ ID NO:120)、hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54G(SEQ ID NO:121)、hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R(SEQ ID NO:122)、hu3D6VLv2L37Q_S52G_L54T(SEQ ID NO:123)、hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54D(SEQ ID NO:124)、hu3D6VLv2 L37Q_L54R(SEQ ID NO:125)、hu3D6VLv2L37Q_L54G(SEQ ID NO:126)、hu3D6VLv2 L37Q_L54D(SEQ ID NO:127)、hu3D6VLv2 L37Q_L50G(SEQ ID NO:128)、hu3D6VLv2L37Q_L50D(SEQ ID NO:129)、hu3D6VLv2 L37Q_L54T(SEQ ID NO:130)、hu3D6VLv2 L37Q_S52G(SEQ ID NO:131)、hu3D6VLv2L37Q_L54E(SEQ ID NO:145)、hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54G(SEQ ID NO:132)、hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R(SEQ ID NO:133)、hu3D6VLv2L37Q_L50E_L54G(SEQ ID NO:134)、hu3D6VLv2 L37Q_L50E_L54R(SEQ ID NO:135)、hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R_G100Q(SEQ ID NO:136)、hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G_G100Q(SEQ ID NO:137)、hu3D6VLv2L37Q_S52G_L54R_G100Q(SEQ ID NO:138)、hu3D6VLv2L37Q_S52G_L54D_G100Q(SEQ ID NO:139)、hu3D6VLv2L37Q_L50D_L54G_G100Q(SEQ ID NO:140)、hu3D6VLv2L37Q_L50D_L54R_G100Q

(SEQ ID NO:141)、hu3D6VLv2L37Q_L50V_L54D_G100Q (SEQ ID NO:142)、hu3D6VLv2 L37Q (SEQ ID NO:143)和hu3D6VLv2 G100Q (SEQ ID NO:144)与下列人源化3D6重链可变区中的任一者的任何排列或组合:hu3D6VHv1 (SEQ ID NO:15)、hu3D6VHv2 (SEQ ID NO:16)、hu3D6VHv1b (SEQ ID NO:17)、hu3D6VHv1bA11 (SEQ ID NO:18)、hu3D6VHv5 (SEQ ID NO:19)、hu3D6VHv1bA11B6G2 (SEQ ID NO:46)、hu3D6VHv1bA11B6H3 (SEQ ID NO:47)、hu3D6VHv1c (SEQ ID NO:48)、hu3D6VHv1d (SEQ ID NO:49)、hu3D6VHv1e (SEQ ID NO:50)、hu3D6VHv1f (SEQ ID NO:51)、hu3D6VHv3 (SEQ ID NO:52)、hu3D6VHv3b (SEQ ID NO:53)、hu3D6VHv3c (SEQ ID NO:54)、hu3D6VHv4 (SEQ ID NO:55)、hu3D6VHv4b (SEQ ID NO:56)、和hu3D6VHv4c (SEQ ID NO:57)。

[0391] 本发明提供了一种抗体,其中人源化重链可变区hu3D6VHv1bA11 (也称为h3D6Hu5) (SEQ ID NO:18)与人源化轻链可变区hu3D6VLv2L37Q_S52G_L54R (L2-DIM4, SEQ ID NO:122)结合。本发明提供了一种抗体,其中人源化重链可变区hu3D6VHv1bA11 (也称为h3D6Hu5) (SEQ ID NO:18)与人源化轻链可变区hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54T (L2-DIM5, SEQ ID NO:123)结合。本发明提供了一种抗体,其中人源化重链可变区h3D6VHvb8 (SEQ ID NO:146)与人源化轻链可变区hu3D6VLv2L37Q_S52G_L54R (L2-DIM4, SEQ ID NO:122)结合。本发明提供了一种抗体,其中人源化重链可变区hu3D6VHv1bA11 (也称为h3D6Hu5) (SEQ ID NO:18)与人源化轻链可变区hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54G (L2-DIM3, SEQ ID NO:121)结合。本发明提供了一种抗体,其中人源化重链可变区hu3D6VHv1bA11 (也称为h3D6Hu5) (SEQ ID NO:18)与人源化轻链可变区hu3D6VLv2 S52G (L2-DIM9, SEQ ID NO:110)结合。本发明提供了一种抗体,其中人源化重链可变区h3D6VHvb8 (SEQ ID NO:146)与人源化轻链可变区hu3D6VLv2 L54G (L2-DIM7, SEQ ID NO:94)结合。本发明提供了一种抗体,其中人源化重链可变区hu3D6VHv1bA11 (也称为h3D6Hu5) (SEQ ID NO:18)与人源化轻链可变区hu3D6VLv2 L50G (L2-DIM22, SEQ ID NO:103)结合。

[0392] 本发明提供了一种抗体,其中所例示的人源化重链可变区中的任一个与人重链恒定区结合。示例性人重链恒定区作为SEQ ID NO:176 (IgG1:同种异型G1m17,1)提供。例如,SEQ ID NO:178列出3D6人源化变体 (hu3D6VHv1bA11 IgG1 G1m17同种异型)的成熟重链的氨基酸序列。例如,SEQ ID NO:180列出在N-末端处具有牛 α -乳清蛋白信号肽的3D6人源化变体 (hu3D6VHv1bA11 IgG1 G1m17同种异型)的重链的氨基酸序列。本发明提供了一种抗体,其中所例示的人源化轻链可变区中的任一个与轻链恒定区结合。示例性轻链恒定区作为SEQ ID NO:177 (κ)提供。例如,SEQ ID NO:179列出3D6人源化变体的成熟轻链 (hu3D6VLv2变体L37Q_S52G_L54R, L2-DIM4 κ)的氨基酸序列。例如,SEQ ID NO:181列出在N-末端处具有牛 α -乳清蛋白信号肽的3D6人源化变体 (hu3D6VLv2变体L37Q_S52G_L54R, L2-DIM4 κ)的轻链的氨基酸序列。

[0393] 本发明提供了3D6人源化抗体的变体,其中人源化成熟重链可变区与hu3D6VHvb1 (SEQ ID NO:76)、hu3D6VHvb2 (SEQ ID NO:77)、hu3D6VHvb3 (SEQ ID NO:78)、hu3D6VHvb4 (SEQ ID NO:79)、hu3D6VHvb5 (SEQ ID NO:80)、hu3D6VHvb6 (SEQ ID NO:90)、hu3D6VHvb7 (SEQ ID NO:91)、hu3D6VHvb7 (SEQ ID NO:91)、hu3D6VHv1bA11 D60E (h3D6VHvb8, SEQ ID NO:146)、hu3D6VHv1bA11L82cV (SEQ ID NO:147)或hu3D6VHv1bA11D60E_L80M_Q81E_L82cV_T83R (h3D6VHvb9, SEQ ID NO:148)示出至少90%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性,

并且人源化成熟轻链可变区与hu3D6VLvb1 (SEQ ID NO:83)、hu3D6VLvb2 (SEQ ID NO:84)、hu3D6VLvb3 (SEQ ID NO:85)、hu3D6VLv2 L54D (SEQ ID NO:93)、hu3D6VLv2 L54G (SEQ ID NO:94)、hu3D6VLv2 L54N (SEQ ID NO:95)、hu3D6VLv2 L54E (SEQ ID NO:96)、hu3D6VLv2 L50E (SEQ ID NO:97)、hu3D6VLv2 L54Q (SEQ ID NO:98)、hu3D6VLv2 L50D (SEQ ID NO:99)、hu3D6VLv2 L54K (SEQ ID NO:100)、hu3D6VLv2 L54R (SEQ ID NO:101)、hu3D6VLv2 L54T (SEQ ID NO:102)、hu3D6VLv2 L50G (SEQ ID NO:103)、hu3D6VLv2 I48G (SEQ ID NO:104)、hu3D6VLv2 I48D (SEQ ID NO:105)、hu3D6VLv2 L47G (SEQ ID NO:106)、hu3D6VLv2 Y49E (SEQ ID NO:107)、hu3D6VLv2 L54V (SEQ ID NO:108)、hu3D6VLv2 L54S (SEQ ID NO:109)、hu3D6VLv2 S52G (SEQ ID NO:110)、hu3D6VLv2 L47N (SEQ ID NO:111)、hu3D6VLv2 L47D (SEQ ID NO:112)、hu3D6VLv2 L47E (SEQ ID NO:113)、hu3D6VLv2 L47P (SEQ ID NO:114)、hu3D6VLv2 L47T (SEQ ID NO:115)、hu3D6VLv2 L47S (SEQ ID NO:116)、hu3D6VLv2 L47A (SEQ ID NO:117)、hu3D6VLv2 L50V (SEQ ID NO:118)、hu3D6VLv2L37Q_L50G_L54R (SEQ ID NO:119)、hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G (SEQ ID NO:120)、hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54G (SEQ ID NO:121)、hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R (SEQ ID NO:122)、hu3D6VLv2L37Q_S52G_L54T (SEQ ID NO:123)、hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54D (SEQ ID NO:124)、hu3D6VLv2 L37Q_L54R (SEQ ID NO:125)、hu3D6VLv2L37Q_L54G (SEQ ID NO:126)、hu3D6VLv2 L37Q_L54D (SEQ ID NO:127)、hu3D6VLv2 L37Q_L50G (SEQ ID NO:128)、hu3D6VLv2L37Q_L50D (SEQ ID NO:129)、hu3D6VLv2 L37Q_L54T (SEQ ID NO:130)、hu3D6VLv2 L37Q_S52G (SEQ ID NO:131)、hu3D6VLv2L37Q_L54E (SEQ ID NO:145)、hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54G (SEQ ID NO:132)、hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R (SEQ ID NO:133)、hu3D6VLv2L37Q_L50E_L54G (SEQ ID NO:134)、hu3D6VLv2 L37Q_L50E_L54R (SEQ ID NO:135)、hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R_G100Q (SEQ ID NO:136)、hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G_G100Q (SEQ ID NO:137)、hu3D6VLv2L37Q_S52G_L54R_G100Q (SEQ ID NO:138)、hu3D6VLv2L37Q_S52G_L54D_G100Q (SEQ ID NO:139)、hu3D6VLv2L37Q_L50D_L54G_G100Q (SEQ ID NO:140)、hu3D6VLv2L37Q_L50D_L54R_G100Q (SEQ ID NO:141)、hu3D6VLv2L37Q_L50V_L54D_G100Q (SEQ ID NO:142)、hu3D6VLv2 L37Q (SEQ ID NO:143)或hu3D6VLv2 G100Q (SEQ ID NO:144) 示出至少90%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。在一些此类抗体中,保留了SEQ ID NO:76-80、SEQ ID NO:90-91、SEQ ID NO:146-148、SEQ ID NO:83-85和SEQ ID NO:93-145中的至少1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、41个、42个、43个或全部44个回复突变或其他突变。

[0394] 在一些人源化3D6抗体中,VH区中的以下位置中的至少一者被所指定的氨基酸占据:H93被S占据,并且H94被T占据。在一些人源化3D6抗体中,位置H93和H94分别被S和T占据。

[0395] 在一些人源化3D6抗体中,VH区中的位置H91被F占据。

[0396] 在一些人源化3D6抗体中,VH区中的以下位置中的至少一者被所指定的氨基酸占据:H1被E占据,H5被V占据,H11被V占据,H20被I占据,H23被K占据,H38被R占据,H42被G占据,H43被K占据,H66被R占据,H75被T占据,H76被D占据,H81被E占据,H108被L占据,H109被V占据。在一些人源化3D6抗体中,VH区中的位置H1、H5、H11、H20、H23、H38、H42、H43、H66、H75、

H76、H81、H108和H109分别被E、V、V、I、K、R、G、K、R、T、D、E、L和V占据。

[0397] 在一些人源化3D6抗体中,VH区中的以下位置中的至少一者被所指定的氨基酸占据:H17被T占据,H80被M占据,H83被R占据。在一些人源化3D6抗体中,VH区中的位置H17、H80和H83分别被T、M和R占据。

[0398] 在一些人源化3D6抗体中,VH区中的位置H58被I占据。

[0399] 在一些人源化3D6抗体中,VH区中的以下位置中的至少一者被所指定的氨基酸占据:H28被T占据,H67被V占据。在一些人源化3D6抗体中,VH区中的位置H28和H67分别被T和V占据。

[0400] 在一些人源化3D6抗体中,VH区中的以下位置中的至少一者被所指定的氨基酸占据:H54被D占据,H56被E占据。在一些人源化3D6抗体中,VH区中的位置H54和H56分别被D和E占据。

[0401] 在一些人源化3D6抗体中,VH区中的以下位置中的至少一个位置被所指定的氨基酸占据:H1被Q或E占据,H5被Q或V占据,H11被L或V占据,H17被S或T占据,H20被L或I占据,H23被T或K占据,H28被N或T占据,H38被K或R占据,H42被E或G占据,H43被Q或K占据,H54被N或D占据,H56被D或E占据,H58被V或I占据,H66被K或R占据,H67被A或V占据,H75被S或T占据,H76被N或D占据,H80被L或M占据,H81被Q或E占据,H83被T或R占据,H91被F或Y占据,H93被S占据,H94被T占据,H108被T或L占据,H109被L或V占据。

[0402] 在一些人源化3D6抗体中,VH区中的位置H91、H93和H94分别被F、S和T占据,如在huVHvb1中。在一些人源化3D6抗体中,VH区中的位置H1、H5、H11、H20、H23、H38、H42、H43、H66、H75、H76、H81、H91、H93、H94、H108和H109分别被E、V、V、I、K、R、G、K、R、T、D、E、F、S、T、L和V占据,如在huVHvb2中。在一些人源化3D6抗体中,VH区中的位置H1、H5、H11、H17、H20、H23、H38、H42、H43、H58、H66、H75、H76、H80、H81、H83、H93、H94、H108和H109分别被E、V、V、T、I、K、R、G、K、I、R、T、D、M、E、R、S、T、L和V占据,如在huVHvb3中。在一些人源化3D6抗体中,VH区中的位置H1、H5、H11、H17、H20、H23、H28、H38、H42、H43、H58、H66、H67、H75、H76、H80、H81、H83、H93、H94、H108和H109分别被E、V、V、T、I、K、T、R、G、K、I、R、V、T、D、M、E、R、S、T、L和V占据,如在huVHvb4中。在一些人源化3D6抗体中,VH区中的位置H1、H5、H11、H17、H20、H23、H28、H38、H42、H43、H54、H56、H58、H66、H67、H75、H76、H80、H81、H83、H93、H94、H108和H109分别被E、V、V、T、I、K、T、R、G、K、D、E、I、R、V、T、D、M、E、R、S、T、L和V占据,如在huVHvb5中。在一些人源化3D6抗体中,VH区中的位置H1、H5、H11、H17、H20、H23、H28、H38、H42、H43、H54、H56、H66、H67、H75、H76、H80、H81、H83、H91、H93、H94、H108和H109分别被E、V、V、T、I、K、T、R、G、K、D、E、R、V、T、D、M、E、R、F、S、T、L和V占据,如在huVHvb6中。在一些人源化3D6抗体中,VH区中的位置H1、H5、H11、H17、H20、H23、H28、H38、H42、H43、H54、H56、H66、H67、H75、H76、H80、H81、H83、H93、H94、H108和H109分别被E、V、V、T、I、K、T、R、G、K、D、E、R、V、T、D、M、E、R、S、T、L和V占据,如在huVHvb7中。

[0403] 在一些人源化3D6抗体中,位置H60被E占据,如在hu3D6VHv1bA11D60E(h3D6VHvb8)中。在一些人源化3D6抗体中,位置H82C被V占据,如在hu3D6VHv1bA11 L82cV中。在一些人源化3D6抗体中,位置H60、H80、H81、H82c和H83被E、M、E、V和R占据,如在hu3D6VHv1bA11D60E_L80M_Q81E_L82cV_T83R(h3D6VHvb9)中。

[0404] 可以对上文所参考的抗体中的任一种抗体的重链可变区进行修饰,以进一步降低

免疫原性。例如,在一些人源化抗体中,位置H80被M占据并且/或者位置H82c被V占据。

[0405] 在一些人源化3D6抗体中,VL区中的以下位置中的至少一者被所指定的氨基酸占据:L7被S占据,L10被S占据,L15被L占据,L83被V占据,L86被Y占据,并且L106被I占据。在一些人源化3D6抗体中,位置L7、L10、L15、L83、L86和L106分别被S、S、L、V、Y和Y占据。

[0406] 在一些人源化3D6抗体中,VL区中的以下位置中的至少一个位置被所指定的氨基酸占据:L7为T或S,L10为T或S,L15为I或L,L17为Q或E,L24为K或R,L37为L或Q,L45为K或R,L83为L或V,L86为H或Y,L100为A或Q,L106为L或I。

[0407] 在一些人源化3D6抗体中,VL区中的位置L7、L10、L15、L83、L86和L106分别被S、S、L、V、Y和I占据,如在huVLvb2中。在一些人源化3D6抗体中,VL区中的位置L7、L10、L15、L17、L24、L37、L45、L83、L86、L100和L106分别被S、S、L、E、R、Q、R、V、Y、Q和I占据,如在huVLvb3中。

[0408] 可以对上文所参考的抗体中的任一种抗体的轻链可变区进行修饰,以进一步降低免疫原性。例如,在一些人源化抗体中,位置L47被G、N、D、E、P、T、S或A占据;位置L48被G或D占据;位置L49被E占据;位置L50被E、D、G或V占据;位置L52被G占据;并且/或者位置L54被D、G、N、E、Q、K、R、T、V或S占据。可以对上文所参考的抗体中的任一种抗体的重链可变区进行修饰,以进一步降低免疫原性。例如,在一些人源化抗体中,位置H80被M占据并且/或者位置H82c被V占据。

[0409] 在一些人源化3D6抗体中,位置L54被D占据,如在hu3D6VLv2L54D中。在一些人源化3D6抗体中,位置L54被G占据,如在hu3D6VLv2 L54G中。在一些人源化3D6抗体中,位置L54被N占据,如在hu3D6VLv2 L54N中。在一些人源化3D6抗体中,位置L54被E占据,如在hu3D6VLv2 L54E中。在一些人源化3D6抗体中,位置L50被E占据,如在hu3D6VLv2 L50E中。在一些人源化3D6抗体中,位置L54被Q占据,如在hu3D6VLv2 L54Q中。在一些人源化3D6抗体中,位置L50被D占据,如在hu3D6VLv2 L50D中。在一些人源化3D6抗体中,位置L54被K占据,如在hu3D6VLv2 L54K中。在一些人源化3D6抗体中,位置L54被R占据,如在hu3D6VLv2 L54R中。在一些人源化3D6抗体中,位置L54被T占据,如在hu3D6VLv2 L54T中。在一些人源化3D6抗体中,位置L50被G占据,如在hu3D6VLv2 L50G中。在一些人源化3D6抗体中,位置L48被G占据,如在hu3D6VLv2 I48G中。在一些人源化3D6抗体中,位置L48被D占据,如在hu3D6VLv2 I48D中。在一些人源化3D6抗体中,位置L47被G占据,如在hu3D6VLv2 L47G中。在一些人源化3D6抗体中,位置L49被E占据,如在hu3D6VLv2 Y49E中。在一些人源化3D6抗体中,位置L54被V占据,如在hu3D6VLv2 L54V中。在一些人源化3D6抗体中,位置L54被S占据,如在hu3D6VLv2 L54S中。在一些人源化3D6抗体中,位置L52被G占据,如在hu3D6VLv2 S52G中。在一些人源化3D6抗体中,位置L47被N占据,如在hu3D6VLv2 L47N中。在一些人源化3D6抗体中,位置L47被D占据,如在hu3D6VLv2 L47D中。在一些人源化3D6抗体中,位置L47被E占据,如在hu3D6VLv2 L47E中。在一些人源化3D6抗体中,位置L47被P占据,如在hu3D6VLv2 L47P中。在一些人源化3D6抗体中,位置L47被T占据,如在hu3D6VLv2 L47T中。在一些人源化3D6抗体中,位置L47被S占据,如在hu3D6VLv2 L47S中。在一些人源化3D6抗体中,位置L47被A占据,如在hu3D6VLv2L47A中。在一些人源化3D6抗体中,位置L50被V占据,如在hu3D6VLv2 L50V中。

[0410] 在一些人源化3D6抗体中,位置L37、L50和L54分别被Q、G和R占据,如在hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R中。在一些人源化3D6抗体中,位置L37、L50和L54分别被Q、G和G占据,如在hu3D6VLv2L37Q_L50G_L54G中。在一些人源化3D6抗体中,位置L37、L52和L54分别被Q、G和G

占据,如在hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54G中。在一些人源化3D6抗体中,位置L37、L52和L54分别被Q、G和R占据,如在hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R中。在一些人源化3D6抗体中,位置L37、L52和L54分别被Q、G和T占据,如在hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54T中。在一些人源化3D6抗体中,位置L37、L52和L54分别被Q、G和D占据,如在hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54D中。

[0411] 在一些人源化3D6抗体中,位置L37和L54分别被Q和R占据,如在hu3D6VLv2 L37Q_L54R中。在一些人源化3D6抗体中,位置L37和L54分别被Q和G占据,如在hu3D6VLv2 L37Q_L54G中。在一些人源化3D6抗体中,位置L37和L54分别被Q和D占据,如在hu3D6VLv2 L37Q_L54D中。在一些人源化3D6抗体中,位置L37和L50分别被Q和G占据,如在hu3D6VLv2 L37Q_L50G中。在一些人源化3D6抗体中,位置L37和L50分别被Q和D占据,如在hu3D6VLv2 L37Q_L50D中。在一些人源化3D6抗体中,位置L37和L54分别被Q和T占据,如在hu3D6VLv2 L37Q_L54T中。在一些人源化3D6抗体中,位置L37和L52分别被Q和G占据,如在hu3D6VLv2 L37Q_S52G中。在一些人源化3D6抗体中,位置L37和L54分别被Q和E占据,如在hu3D6VLv2 L37Q_L54E中。

[0412] 在一些人源化3D6抗体中,位置L37、L50和L54分别被Q、D和G占据,如在hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54G中。在一些人源化3D6抗体中,位置L37、L50和L54分别被Q、D和R占据,如在hu3D6VLv2L37Q_L50D_L54R中。在一些人源化3D6抗体中,位置L37、L50和L54分别被Q、E和G占据,如在hu3D6VLv2 L37Q_L50E_L54G中。在一些人源化3D6抗体中,位置L37、L50和L54分别被Q、E和R占据,如在hu3D6VLv2 L37Q_L50E_L54R中。

[0413] 在一些人源化3D6抗体中,位置L37、L50、L54和L100分别被Q、G、R和Q占据,如在hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R_G100Q中。在一些人源化3D6抗体中,位置L37、L50、L54和L100分别被Q、G、G和Q占据,如在hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G_G100Q中。在一些人源化3D6抗体中,位置L37、L52、L54和L100分别被Q、G、R和Q占据,如在hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R_G100Q中。在一些人源化3D6抗体中,位置L37、L52、L54和L100分别被Q、G、D和Q占据,如在hu3D6VLv2L37Q_S52G_L54D_G100Q中。在一些人源化3D6抗体中,位置L37、L50、L54和L100分别被Q、D、G和Q占据,如在hu3D6VLv2L37Q_L50D_L54G_G100Q中。在一些人源化3D6抗体中,位置L37、L50、L54和L100分别被Q、D、R和Q占据,如在hu3D6VLv2L37Q_L50D_L54R_G100Q中。在一些人源化3D6抗体中,位置L37、L50、L54和L100分别被Q、V、D和Q占据,如在hu3D6VLv2L37Q_L50V_L54D_G100Q中。

[0414] 在一些人源化3D6抗体中,位置L37被Q占据,如在hu3D6VLv2L37Q中。在一些人源化3D6抗体中,位置L100被Q占据,如在hu3D6VLv2 G100Q中。

[0415] 一些人源化3D6抗体包含成熟重链可变区和成熟轻链可变区,该成熟重链可变区包含分别具有SEQ ID NO:8、9和10的CDR H1、CDR H2和CDR H3,不同的是位置H28能够被N或T占据,H54能够被N或D占据,H56能够被D或E占据,位置H58能够被V或I占据,并且位置H60能够被D或E占据,该成熟轻链可变区包含分别具有SEQ ID NO:12、13和14的CDR L1、CDR L2和CDR L3,不同的是位置L24能够被K或R占据,位置L50能够被L、E、D、G或V占据,位置L52能够被S或G占据,并且位置L54能够被L、D、G、N、E、Q、K、R、T、V或S占据,其中以下位置中的至少一者被所指定的氨基酸占据:H1被Q占据,H5被Q占据,H11被L占据,H20被L占据,H23被T占据,H38被K占据,H75被S占据,H56被E占据,H58被I占据,H60被E占据,H82c被V占据,L10被T占据,L17被E占据,L24被R占据,L37被Q占据,L47被G、N、D、E、P、T、S或A占据,L48被G或D占据,

L49被E占据,L50被E、D、G或V占据,L52被G占据,L54被D、G、N、E、Q、K、R、T、V或S占据,L83被L占据,L86被H占据,L100被Q占据,L106被L占据。

[0416] 一些人源化3D6抗体包含单克隆抗体3D6的三个轻链CDR和三个重链CDR,其中3D6是小鼠抗体,其特征在于具有包括SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变区和具有包括SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链可变区,不同的是位置H27能够被F或Y占据,位置H28能够被N或T占据,位置H29能够被I或F占据,位置H30能够被K或T占据,位置H51能够被I或V占据,位置H54能够被N或D占据,位置H60能够被D、A或E占据,位置H61能够被P或E占据,位置H102能够被F或Y占据,位置L50能够被L、E、D、G或V占据,位置L52能够被S或G占据,并且位置L54能够被L、D、G、N、E、Q、K、R、T、V或S占据,其中以下位置中的至少一者被所指定的氨基酸占据:L37被Q占据,L47被G、N、D、E、P、T、S或A占据,L48被G或D占据,L49被E占据,L50被E、D、G或V占据,L52被G占据,L54被D、G、N、E、Q、K、R、T、V或S占据,L100被Q占据,H60被E占据,H82c被V占据。

[0417] 在一些人源化3D6抗体中,可变重链与人序列具有 $\geq 85\%$ 的同一性。在一些人源化3D6抗体中,可变轻链与人序列具有 $\geq 85\%$ 的同一性。在一些人源化3D6抗体中,可变重链和可变轻链中的每一者与人种系序列具有 $\geq 85\%$ 的同一性。在一些人源化3D6抗体中,三个重链CDR如由Kabat/Chothia复合物(SEQ ID NO:8、9和10)所定义,并且三个轻链CDR如由Kabat/Chothia复合物(SEQ ID NO:12、13和14)所定义;前提条件是位置H28被N或T占据,位置H54被N或D占据,位置H56被D或E占据,位置H58被V或I占据,位置H60被D或E占据,位置L24被K或R占据,位置L50被L、E、D、G或V占据,位置L52被S或G占据,并且位置L54被L、D、G、N、E、Q、K、R、T、V或S占据。在一些人源化3D6抗体中,Kabat/Chothia复合物CDR-H1具有包括SEQ ID NO:86的氨基酸序列。在一些人源化3D6抗体中,Kabat CDR-H2具有包括SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:92或SEQ ID NO:149的氨基酸序列。在一些人源化3D6抗体中,Kabat CDR-L1具有包括SEQ ID NO:89的氨基酸序列。在一些人源化3D6抗体中,Kabat CDR-L2包含选自SEQ ID NO:150至SEQ ID NO:175组成的组的氨基酸序列。

[0418] 此类人源化抗体的CDR区域可以与3D6的CDR区域相同或基本上相同,CDR区域可以由任何常规定义(例如,Chothia,或者Chothia和Kabat的复合物)来定义,但优选地如由Kabat来定义。

[0419] 除非另行指出,否则可变区框架位置符合Kabat编号。其他此类变体通常与所例示的Hu3D6重链和轻链的序列相差少量的(例如,通常不超过1、2、3、5、10,或15个)替换、缺失或插入。此类差异通常在框架中,但也可以存在于CDR中。

[0420] 人源化3D6变体的另外变异的可能性是可变区框架中的另外的回复突变。人源化mAb中不与CDR接触的许多框架残基可以适应来自供体小鼠mAb或其他小鼠或人抗体的对应位置的氨基酸的取代,并且甚至许多潜在的CDR接触残基也允许取代。甚至CDR内的氨基酸也可以被改变,例如,使用在用于提供可变区框架的人受体序列的对应位置处发现的残基。另外,可以使用另选的人受体序列,例如,用于重链和/或轻链。如果使用不同的受体序列,那么可以不进行上文推荐的一种或多种回复突变,因为在没有回复突变的情况下对应的供体和受体残基已经相同。

[0421] 优选地,人源化3D6变体中的替换或回复突变(无论是否保守)对人源化mAb的结合亲和力或效力,即其结合tau的能力没有实质影响。

[0422] 人源化3D6抗体通过它们结合磷酸化和未磷酸化tau两者以及tau的错误折叠/聚集形式的能力进一步表征。

[0423] D. 嵌合抗体和饰面抗体

[0424] 本发明还提供了非人抗体,具体为实例的3D6抗体的嵌合形式和饰面形式。

[0425] 嵌合抗体是其中非人抗体(例如,小鼠)的轻链和重链的成熟可变区与人轻链恒定区和人重链恒定区组合的抗体。此类抗体基本上或完全保留小鼠抗体的结合特异性,并且是约三分之二的人序列。在一个实施方案中,嵌合3D6抗体具有SEQ ID NO:72的重链氨基酸序列和SEQ ID NO:73的轻链氨基酸序列。

[0426] 饰面抗体是一种类型的人源化抗体,其保留非人抗体的一些且通常所有CDR和一些非人可变区框架残基,但将可以有助于B细胞表位或T细胞表位的其他可变区框架残基,例如暴露残基(Padlan, Mol. Immunol. 28:489, 1991)替换为来自人抗体序列的对应位置的残基。结果是其中CDR完全或基本上来自非人抗体,并且非人抗体的可变区框架通过取代而变得更像人的抗体。3D6抗体的饰面形式包括在本发明中。

[0427] E. 人抗体

[0428] 针对tau或其片段(例如,SEQ ID NO:3的氨基酸残基199-213和/或262-276,分别对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基257-271和/或320-334,或者SEQ ID NO:1的氨基酸残基259-268或290-299或321-330或353-362或者它们中的2者、3者或全部4者的任何组合)的人抗体通过下文所述的多种技术提供。通过竞争性结合实验,通过Winter的噬菌体展示方法(上文)或以其他方式选择一些人抗体,以具有与特定小鼠抗体(诸如实施例所述的小鼠单克隆抗体中的一种)相同的表位特异性。还可以通过仅使用tau的片段,诸如仅含有SEQ ID NO:3的氨基酸残基199-213或262-276(分别对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基257-271或320-334)或仅含有SEQ ID NO:1的氨基酸残基259-268或290-299或321-330或353-362的tau片段作为靶抗原,以及/或者通过针对tau变体(诸如在SEQ ID NO:3的氨基酸残基199-213或262-276(分别对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基257-271或320-334)内或在SEQ ID NO:1的氨基酸残基259-268或290-299或321-330或353-362内含有各种突变的tau变体)的集合筛选抗体,来针对特定表位特异性对人抗体进行筛选。

[0429] 用于产生人抗体的方法包括:Oestberg等人,Hybridoma 2:361-367(1983); Oestberg,美国专利号4,634,664;以及Engleman等人,美国专利号4,634,666的三体杂交瘤法;使用包括人免疫球蛋白基因的转基因小鼠(参见例如,Lonberg等人,W093/12227(1993);US 5,877,397;US 5,874,299;US 5,814,318;US 5,789,650;US 5,770,429;US 5,661,016;US 5,633,425;US 5,625,126;US 5,569,825;US 5,545,806;Neuberger, Nat. Biotechnol. 14:826(1996);以及Kucherlapati, W0 91/10741(1991));噬菌体展示方法(参见例如Dower等人,W0 91/17271;McCafferty等人,W0 92/01047;US 5,877,218;US 5,871,907;US 5,858,657;US 5,837,242;US 5,733,743;以及US 5,565,332);以及W0 2008/081008中描述的方法(例如,将从人体分离的记忆B细胞永生,例如用EBV,针对期望特性进行筛选,并且克隆和表达重组形式)。

[0430] F. 恒定区的选择

[0431] 嵌合、饰面或人源化抗体的重链和轻链可变区可以与恒定区的至少一部分连接。恒定区的选择部分取决于是否需要抗体依赖性细胞介导的细胞毒性、抗体依赖性细胞

吞噬和/或补体依赖性细胞毒性。例如,人同种型IgG1和IgG3具有补体依赖性细胞毒性,而人同种型IgG2和IgG4则没有。人IgG1和IgG3还诱导比人IgG2和IgG4更强的细胞介导的效应子功能。轻链恒定区可以是 λ 或 κ 。恒定区的编号惯例包括EU编号(Edelman,G.M.等人,Proc.Natl.Acad.USA,63,78-85(1969))、Kabat编号(Kabat,Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institutes of Health,Bethesda,MD,1991)、IMGT唯一编号(Lefranc M.-P.等人,IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor constant domains and Ig superfamily C-like domains,Dev.Comp.Immunol.,29,185-203(2005))和IMGT外显子编号(Lefranc,同上)。

[0432] 轻链和/或重链的氨基或羧基末端的一个或几个氨基酸,诸如重链的C末端赖氨酸,可在一部分或全分子中缺失或衍生。可在恒定区中进行取代以减少或增加效应子功能,诸如补体介导的细胞毒性或ADCC(参见例如Winter等人,美国专利号5,624,821;Tso等人,美国专利号5,834,597;以及Lazar等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 103:4005,2006),或延长在人体中的半衰期(参见,例如,Hinton等人,J.Biol.Chem.279:6213,2004)。示例性取代包括位置250处的Gln和/或位置428处的Leu(EU编号在该段中用于恒定区)以用于增加抗体的半衰期。位置234、235、236和/或237中的任一个或所有位置处的取代降低了对Fc γ 受体,尤其是Fc γ RI受体的亲和力(参见,例如,US 6,624,821)。人IgG1的位置234、235和237处的丙氨酸取代可用于减小效应子功能。一些抗体具有在人IgG1的位置234、235和237处的丙氨酸取代,以用于减小效应子功能。任选地,人IgG2中的位置234、236和/或237被丙氨酸取代,并且位置235被谷氨酰胺取代(参见,例如,US 5,624,821)。在一些抗体中,使用人IgG1的位置241、264、265、270、296、297、322、329和331(EU编号)中的一个或多个位置处的突变。在一些抗体中,使用人IgG1的位置318、320和322(EU编号)中的一个或多个位置处的突变。在一些抗体中,位置234和/或235被丙氨酸取代和/或位置329被甘氨酸取代。在一些抗体中,位置234和235被丙氨酸取代。在一些抗体中,同种型是人IgG2或IgG4。

[0433] 抗体可以被表达为含有两条轻链和两条重链的四聚体、单独的重链、轻链、Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv,或其中重链和轻链成熟可变结构域通过间隔物连接的单链抗体。

[0434] 人恒定区显示出不同个体之间的同种异型变异和同族同种异型变异,即在一个或多个多态性位置,恒定区在不同个体中可以不同。同族同种异型与同种异型的区别在于,识别同族同种异型的血清结合至一个或多个其他同种型的非多态性区域。因此,例如,另一个重链恒定区属于具有或不具有C-末端赖氨酸的IgG1 G1m3。对人恒定区的提及包括具有任何天然同种异型或占据天然同种异型中的位置的残基的任何排列的恒定区。示例性重链恒定区是SEQ ID NO:176,其具有或不具有C-末端赖氨酸,并且示例性轻链恒定区是SEQ ID NO:177。

[0435] G. 重组抗体的表达

[0436] 已知许多方法用于使用抗体表达细胞系(例如,杂交瘤)产生嵌合和人源化的抗体。例如,可以使用众所周知的方法对抗体的免疫球蛋白可变区进行克隆和测序。在一种方法中,使用由杂交瘤细胞制备的mRNA通过RT-PCR克隆重链可变VH区。将通用引物作为5'引物和g2b恒定区特异性3'引物用于包括翻译起始密码子的VH区前导肽。示例性引物描述于Schenk等人的美国专利公布US2005/0009150中(下文称为“Schenk”)。可以比较来自多个独立衍生克隆的序列,以确保在扩增过程中不引入任何变化。还可以通过对通过5'RACE RT-

PCR方法和3'g2b特异性引物获得的VH片段进行测序来确定或确认VH区的序列。

[0437] 可以以类似的方式克隆轻链可变VL区。在一种方法中,使用被设计成与包括翻译起始密码子的VL区杂交的5'引物和对于与V-J接合区下游的Ck区具有特异性的3'引物来设计用于VL区的扩增的共有引物组。在第二种方法中,采用5'RACE RT-PCR方法克隆VL编码cDNA。示例性引物描述于Schenk,同上中。然后将克隆的序列与编码人(或其他非人物种)恒定区的序列组合。

[0438] 在一种方法中,将重链可变区和轻链可变区重新工程化为编码相应VDJ或VJ接合处下游的剪接供体序列,并且将它们克隆到哺乳动物表达载体(诸如用于重链的pCMV-h 1和用于轻链的pCMV-Mc1)中。这些载体将人1和Ck恒定区编码为插入的可变区盒下游的外显子片段。在序列验证后,可以将重链和轻链表达载体共转染到CHO细胞中以产生嵌合抗体。转染后48小时收集条件培养基,并通过蛋白质印迹分析评估抗体产量或通过ELISA评估抗原结合。如上所述将嵌合抗体人源化。

[0439] 嵌合、饰面、人源化和人抗体通常通过重组表达产生。重组多核苷酸构建体通常包括可操作地连接于抗体链的编码序列的表达控制序列,包括天然相关联的或异源的表达控制元件,诸如启动子。表达控制序列可以是能够转化或转染真核或原核宿主细胞的载体中的启动子系统。一旦已经将载体掺入适当的宿主中,即将宿主维持在适于核苷酸序列的高水平表达和交叉反应性抗体的收集和纯化的条件下。

[0440] 这些表达载体通常可作为附加体或作为宿主染色体DNA的整合部分在宿主生物中复制。通常,表达载体含有选择标志物,例如,氨苄青霉素抗性或潮霉素抗性,以允许检测用期望的DNA序列转化的那些细胞。

[0441] 大肠杆菌(E.coli)是可用于表达抗体,尤其是抗体片段的一种原核宿主。诸如酵母的微生物也可用于表达。酵母属(Saccharomyces)是根据需要带有具有表达控制序列、复制起点、终止序列等等的合适载体的酵母宿主。典型的启动子包括3-磷酸甘油酸激酶和其他糖酵解酶。诱导型酵母启动子包括来自醇脱氢酶、异细胞色素C和负责麦芽糖和半乳糖利用的酶的启动子等。

[0442] 哺乳动物细胞可用于表达编码免疫球蛋白或其片段的核苷酸区段。参见Winnacker,From Genes to Clones,(VCH Publishers,NY,1987)。已经开发出许多能够分泌完整的异源蛋白质的合适的宿主细胞系,并且包括CHO细胞系、各种COS细胞系、HeLa细胞、HEK293细胞、L细胞,以及非抗体产生性骨髓瘤,包括Sp2/0和NS0。细胞可以是非人的。这些细胞的表达载体可包括表达控制序列,诸如复制起点、启动子、增强子(Queen等人,Immunol.Rev.89:49(1986))和必要的加工信息位点诸如核糖体结合位点、RNA剪接位点、多腺苷酸化位点和转录终止子序列。表达控制序列可包括衍生自内源基因、巨细胞病毒、SV40、腺病毒、牛乳头瘤病毒等的启动子。参见Co等人,J.Immunol.148:1149(1992)。

[0443] 另选地,可以将抗体编码序列掺入转基因中以用于引入转基因动物的基因组中并随后在转基因动物的乳汁中表达(参见例如,美国专利号5,741,957;美国专利No.号5,304,489;以及美国专利号5,849,992)。合适的转基因包括与来自乳腺特异性基因(诸如酪蛋白或 β 乳球蛋白)的启动子和增强子可操作地连接的轻链和/或重链的编码序列。

[0444] 含有感兴趣的DNA区段的载体可以通过取决于细胞宿主类型的方法转移到宿主细胞中。例如,对于原核细胞,通常利用氯化钙转染,而对于其他细胞宿主,可使用磷酸钙处

理、电穿孔、脂质转染、基因枪法或基于病毒的转染。用于转化哺乳动物细胞的其他方法包括使用聚凝胺、原生质体融合、脂质体、电穿孔以及显微注射。为了产生转基因动物,可以将转基因显微注射到受精卵母细胞中或可以将其掺入胚胎干细胞或诱导多能干细胞(iPSC)的基因组中,并且将此类细胞的细胞核转移到去核卵母细胞中。

[0445] 已经将编码抗体重链和轻链的一种或多种载体引入细胞培养物中,可以在无血清培养基中针对生长率和产品质量对细胞库进行筛选。最佳产量的细胞库随后可进行基于FACS的单细胞克隆以产生单克隆系。可以使用每个细胞每天50pg或100pg以上的比生产率,其对应于大于7.5g/L培养物的产物滴度。由单细胞克隆产生的抗体还可以进行浊度、过滤特性、PAGE、IEF、UV扫描、HP-SEC、碳水化合物-寡糖映射、质谱和结合测定(诸如ELISA或Biacore)的测试。选定的克隆可随后存储在多个小瓶中并且冷冻储存,以备后用。

[0446] 一旦被表达,抗体可根据本领域的标准程序进行纯化,包括蛋白A捕获、HPLC纯化、柱色谱法、凝胶电泳等(通常参见Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, NY, 1982))。

[0447] 可以使用商业生产抗体的方法,包括密码子优化、启动子的选择、转录元件的选择、终止子的选择、无血清单细胞克隆、细胞建库、使用用于拷贝数扩增的选择标志物、CHO终止子,或改善蛋白质滴度(参见例如US 5,786,464;US 6,114,148;US 6,063,598;US 7,569,339;W02004/050884;W02008/012142;W02008/012142;W02005/019442;W02008/107388;W02009/027471;以及US 5,888,809)。

[0448] IV. 活性免疫原

[0449] 用于主动免疫的作用剂用于在患者中诱导和与结合以上被动免疫所描述的相同类型的抗体。用于主动免疫的作用剂可以是用于在实验室动物中生成单克隆抗体的相同类型的免疫原,例如,来自tau的对应于SEQ ID NO:3的残基199-213或262-276(分别对应于SEQ ID NO:1的残基257-271或320-334)的区域的3至15个或3至12个或5至12个或5至8个连续氨基酸的肽,诸如包括SEQ ID NO:3的残基199-213或262-276(分别对应于SEQ ID NO:1的残基257-271或320-334)的肽,或来自tau的对应于SEQ ID NO:1的残基259-268或290-299或321-330或353-362的区域的3至15个或3至12个或5至12个或5至8个连续氨基酸的肽,诸如包括SEQ ID NO:1的残基259-268或290-299或321-330或353-362的肽。为了诱导与3D6结合相同或重叠表位的抗体,可以对这些抗体的表位特异性作图(例如,通过测试与跨越tau的一系列重叠肽的结合)。然后可以使用由该表位组成或者包括该表位或与该表位重叠的tau的片段作为免疫原。此类片段通常以非磷酸化的形式使用。

[0450] 如果使用的话,异源载体和佐剂可以与用于生成单克隆抗体的相同,但是也可以针对在人中使用的更好的药物适用性进行选择。合适的载体包括血清白蛋白、匙孔血蓝蛋白、免疫球蛋白分子、甲状腺球蛋白、卵清蛋白、破伤风类毒素,或者来自其他致病细菌诸如白喉(例如,CRM197)、大肠杆菌、霍乱或幽门螺杆菌(*H. pylori*)的类毒素,或者减毒的毒素衍生物。T细胞表位也是合适的载体分子。一些缀合物可以通过将本发明的作用剂连接到免疫刺激性聚合物分子(例如,三棕榈酰基-S-甘油半胱氨酸(Pam₃Cys)、甘露聚糖(甘露糖聚合物)或葡聚糖(β 1 $\rightarrow$ 2聚合物))、细胞因子(例如,IL-1、IL-1 α 肽和 β 肽、IL-2、 γ -INF、IL-10、GM-CSF)和趋化因子(例如,MIP1- α 和 β ,以及RANTES)来形成。免疫原可以与具有或不具有间隔氨基酸(例如,gly-gly)的载体连接。另外的载体包括病毒样颗粒。病毒样颗粒

(VLP),也称为假型病毒或病毒衍生颗粒,代表由能够在体内自组装成具有限定的球形对称性的VLP的病毒衣壳和/或包膜蛋白质的多个拷贝组成的亚单位结构。(Powilleit等人,(2007)PLoS ONE 2(5):e415。)替代性地,肽免疫原可以连接于至少一个人工T细胞表位,所述表位能够结合大部分的MHC II类分子,诸如pan DR表位(“PADRE”)。PADRE描述于US 5,736,142、WO 95/07707和Alexander J等人,Immunity,1:751-761(1994)中。活性免疫原能够以多聚体形式存在,其中免疫原和/或其载体的多个拷贝作为单个共价分子存在。

[0451] 片段通常与药学上可接受的佐剂一起施用。相对于单独使用肽的情况,佐剂增加诱导抗体的滴度和/或诱导抗体的结合亲和力。多种佐剂可以与tau的免疫原性片段组合使用以引发免疫应答。优选的佐剂增强对免疫原的固有应答,而不导致影响应答的定性形式的免疫原构象变化。优选的佐剂包括铝盐,诸如氢氧化铝和磷酸铝、3De-O-酰化的单磷酸基脂质A(MPL™)(参见GB 2220211(RIBI ImmunoChem Research Inc.,Hamilton,Montana,现为Corixa的一部分)。Stimulon™ QS-21是从在南美洲发现的皂皮树(Quillaja Saponaria Molina)的树皮中分离的三萜糖苷或皂草苷(参见Kensil等人,载于Vaccine Design:The Subunit and Adjuvant Approach(Powell&Newman编辑,Plenum Press,NY,1995中);US 5,057,540),(Aquila BioPharmaceuticals,Framingham,MA;现为Antigenics Inc.,New York,NY)。其他佐剂是水包油乳剂(诸如角鲨烯或花生油),任选地组合免疫刺激剂,诸如单磷酸基脂质A(参见Stoute等人,N.Engl.J.Med.336,86-91(1997))、普朗尼克(pluronic)聚合物,以及杀死的分枝杆菌。Ribi佐剂是水包油型乳剂。Ribi含有用含吐温80的盐水乳化的可代谢油(角鲨烯)。Ribi还含有充当免疫刺激剂的精制的分枝杆菌产品和细菌单磷酸基脂质A。另一种佐剂为CpG(WO 98/40100)。佐剂可以作为治疗组合物的组分与活性剂一起施用,或者可以在施用治疗剂之前、同时或之后单独施用。

[0452] 还可以使用诱导针对tau的抗体的tau的天然片段的类似物。例如,一种或多种或所有的L-氨基酸可以被此类肽中的D-氨基酸取代。氨基酸的顺序也可以逆转(逆向肽(retro peptide))。任选地,肽包括相反顺序的所有D-氨基酸(逆反肽(retro-inverso peptide))。肽和其他化合物不一定与tau肽具有显著的氨基酸序列相似性,但仍然充当tau肽的模拟物并且诱导相似的免疫应答。还可以使用针对如上所述的tau的单克隆抗体的抗独特型抗体。此类抗Id抗体模拟抗原并且产生针对所述抗原的免疫应答(参见Essential Immunology,Roit编辑,Blackwell Scientific Publications,Palo Alto,CA第6版,第181页)。

[0453] 肽(和任选地与肽融合的载体)还能够以编码所述肽的核酸的形式施用并且在患者体内原位表达。编码免疫原的核酸区段通常连接到调控元件,诸如启动子和增强子,这些调控元件允许DNA区段在患者的预期靶细胞中表达。为了在血细胞中表达,如免疫应答的诱导所希望的,来自轻链免疫球蛋白基因或重链免疫球蛋白基因的启动子元件和增强子元件或者CMV主要立即早期启动子和增强子适于指导表达。通常将连接的调控元件和编码序列克隆到载体中。抗体也可以以编码抗体重链和/或轻链的核酸的形式施用。如果重链和轻链均存在,那么链优选作为单链抗体连接。用于被动施用的抗体也可以例如通过亲和色谱从用肽免疫原处理的患者的血清中制备。

[0454] DNA可以以裸露的形式(即,没有胶体或包封材料)递送。另选地,可以使用许多病毒载体系统,包括逆转录病毒系统(参见,例如,Lawrie and Tumin,Cur.Opin.Genet.Develop.3,102-109(1993));腺病毒载体{参见,例如,Bett等人,

J.Virol.67,591-1(1993)),包括逆转录病毒衍生载体,诸如MMLV、HIV-1和ALV;腺相关病毒载体{参见,例如,Zhou等人,J.Exp.Med.179,1867(1994)},慢病毒载体诸如基于HIV或FIV gag序列的那些,来自痘科的病毒载体(包括牛痘病毒和禽痘病毒),来自 α 病毒属的病毒载体诸如衍生自新培斯病毒(Sindbis Virus)和塞姆利基森林病毒(Semliki Forest Virus)的那些(参见,例如,Dubensky等人,J.Virol.70,508-519(1996)),委内瑞拉马脑炎病毒(参见US 5,643,576)和弹状病毒诸如水疱性口炎病毒(参见WO 96/34625)以及乳头瘤病毒(Ohe等人,Human Gene Therapy6,325-333(1995);Woo等人,WO 94/12629以及Xiao& Brandsma,Nucleic Acids.Res.24,2630-2622(1996))。

[0455] 编码免疫原或编码抗体的重链和/或轻链的DNA,或者含有该DNA的载体能够被包装到脂质体中。合适的脂质和相关类似物由US 5,208,036、US 5,264,618、US 5,279,833和US 5,283,185描述。编码免疫原或编码抗体的重链和/或轻链的载体和DNA还能够被吸附至颗粒载剂或与其相缔合,所述颗粒载剂的实例包括聚甲基丙烯酸甲酯聚合物和聚乳酸以及聚(丙交酯-共-乙交酯),(参见,例如,McGee等人,J.Micro Encap.1996)。

[0456] 编码抗体的重链和/或轻链的载体或来自这些载体的区段可以被结合在离体细胞中,例如结合到从个体患者移植的细胞(例如,淋巴细胞、骨髓抽取液、组织活检物)或万能供血者造血干细胞中,然后通常在选择已结合了转基因的细胞之后,将这些细胞再植入患者中。(参见,例如,WO 2017/091512)。示例性的衍生自患者的细胞包括衍生自患者的诱导多能干细胞(IPSC)或其他类型的干细胞(胚胎干细胞、造血干细胞、神经干细胞或间充质干细胞)。

[0457] 编码所述抗体的重链和/或轻链的载体或来自该载体的区段能够被引入到离体细胞中的任何感兴趣区域(诸如白蛋白基因或其他安全港基因)中。结合了载体的细胞可以在进行了或未进行在先分化的情况下植入。可以将细胞植入到特定组织(诸如分泌组织或病理位置)中,或者全身性地植入(诸如通过输注到血液中)。例如,可以将细胞植入到患者的分泌组织(诸如肝脏)中,该分泌组织任选地在先分化为存在于该组织中的细胞,诸如在肝脏的情况下为肝细胞。该抗体在肝脏中表达导致抗体分泌到血液中。

[0458] H. 抗体筛选测定

[0459] 可以如上所述针对预期结合特异性对抗体进行初始筛选。同样可以针对诱导具有这种结合特异性的抗体的能力对活性免疫原进行筛选。在这种情况下,使用活性免疫原对实验室动物进行免疫,并针对适当的结合特异性对所得血清进行测试。

[0460] 然后可以在细胞和动物模型中测试具有期望的结合特异性的抗体。用于这种筛选的细胞优先为神经元细胞。已经报道了tau病理的细胞模型,其中用任选地具有与tau病理相关联的突变的tau的四重复结构域转染神经母细胞瘤细胞(例如, δ K280,参见Khlistunova,Current Alzheimer Research4,544-546(2007))。在另一模型中,通过添加强力霉素在神经母细胞瘤N2a细胞系中诱导tau。细胞模型使得能够研究在可溶或聚集状态中tau对细胞的毒性、开启tau基因表达后tau聚集体的出现、再次关闭基因表达后tau聚集体的溶解和抗体在抑制tau聚集体的形成或使其解聚方面的功效。

[0461] 还可以在与tau相关联的疾病的转基因动物模型中筛选抗体或活性免疫原。此类转基因动物可包括tau转基因(例如,人同种型中的任一种)和任选的尤其人APP转基因,诸如磷酸化tau、ApoE、早老素或 α 突触核蛋白的激酶。此类转基因动物被设置用于发展与tau

相关联的疾病的至少一种体征或症状。

[0462] 示例性的转基因动物是K3系小鼠 (Itner等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105 (41):15997-6002 (2008))。这些小鼠具有人tau转基因, 所述人tau转基因具有K 369I突变 (该突变与皮克氏病相关联) 和Thy 1.2启动子。该模型显示出快速的神经变性、运动缺陷以及传入纤维和小脑粒细胞的变性的过程。另一种示例性动物是JNPL3系小鼠。这些小鼠具有人tau转基因, 所述人tau转基因具有P301L突变 (该突变与额颞叶痴呆相关联) 和Thy1.2启动子 (Taconic, Germantown, N.Y., Lewis等人, Nat Genet. 25:402-405 (2000))。这些小鼠具有更渐进的神经变性过程。小鼠在几个脑区域和脊髓中发展神经原纤维缠结, 其据此整体以引用方式并入)。这是研究缠结发展的后果以及可抑制这些聚集体产生的筛选疗法的优秀模型。这些动物的另一个优点是病理的相对早发。在纯合系中, 至少早在3个月就可以观察到与tau病理相关联的行为异常, 但动物至少在8月龄之前都保持相对健康。换句话说, 在8个月时, 动物走动、给自己喂食, 并且可以充分良好地执行行为任务以允许监测治疗效果。使用-AI wI K LH-PHF-1对这些小鼠进行6至13个月的主动免疫产生了约1,000的滴度, 并且相对于未处理的对照小鼠显示出较少的神经元纤维缠结、较少的pSer422和减少的体重减轻。

[0463] 抗体或活性剂的活性可以通过各种标准来评估, 包括总tau或磷酸化tau的量减少、其他病理特征 (诸如A β 的淀粉样蛋白沉积物) 减少, 以及抑制或延迟行为缺陷。还可以针对血清中抗体的诱导对活性免疫原进行测试。可以针对抗体穿过血脑屏障进入转基因动物的脑中对被动免疫原和主动免疫原这两者进行测试。还可以在天然地或通过诱导发展以tau为特征的疾病的症状的非人灵长类动物中测试抗体或诱导抗体的片段。对抗体或活性剂的测试通常与对照结合执行, 其中进行平行实验, 不同的是不存在抗体或活性剂 (例如, 由媒介物替换)。然后可以相对于对照评估可归因于待测的抗体或活性剂的疾病体征或症状的减少、延迟或抑制。

[0464] V. 适合治疗的患者

[0465] 已经在几种疾病中发现了神经元纤维缠结的存在, 这些疾病包括阿尔茨海默病、唐氏综合征、轻度认知障碍、原发性年龄相关性tau蛋白病、脑炎后帕金森病、创伤后痴呆或拳击员痴呆、皮克氏病、C型尼曼-皮克病、核上性麻痹、额颞叶痴呆、额颞叶变性、嗜银颗粒病、球状胶质tau蛋白病、关岛肌萎缩性侧索硬化/帕金森痴呆复征、皮质基底节变性 (CBD)、路易体痴呆、阿尔茨海默病的路易体变异 (LBVAD)、慢性创伤性脑病 (CTE)、球状胶质tau蛋白病 (GGT), 以及进行性核上性麻痹 (PSP)。本发明的方案也可用于治疗或预防这些疾病中的任一种。由于神经疾病和病状与tau之间的广泛关联, 本发明的方案可用于治疗或预防与没有神经疾病的个体中的平均值相比显示出升高水平的tau或磷酸化tau (例如, 在CSF中) 的任何受试者。本发明的方案还可用于治疗或预防在与神经疾病相关联的tau中具有突变的个体的神经疾病。本发明的方法特别适用于治疗或预防阿尔茨海默病, 尤其是在患者中。

[0466] 适合治疗的患者包括有患病风险但未显示出症状的个体, 以及目前显示出症状的患者。有患病风险的患者包括具有已知的疾病遗传风险的那些。此类个体包括具有经历过该疾病的亲属的那些个体, 以及通过遗传或生化标志物分析确定其风险的那些个体。风险的遗传标志物包括tau中的突变, 诸如上面讨论的那些, 以及与神经疾病相关联的其他基因中的突变。例如, 杂合和甚至尤其纯合形式中的ApoE4等位基因与阿尔茨海默病的风险相关

联。阿尔茨海默病风险的其他标志物包括APP基因中的突变,具体是位置717以及位置670和671处的突变(分别称为Hardy和Swedish突变)、早老素基因PS1和PS2中的突变、AD的家族史、高胆固醇血症或动脉粥样硬化。目前患有阿尔茨海默病的个体可以通过PET成像、由特征性的痴呆以及如上所述的风险因素的存在来识别。此外,许多诊断测试可用于鉴定患有AD的个体。这些包括CSF tau或磷酸化-tau以及A β 42水平的测量。升高的tau或磷酸化-tau和降低的A β 42水平意味着AD的存在。一些突变与帕金森病相关联。Ala30Pro或Ala53或与帕金森病相关联的其他基因诸如富含亮氨酸重复片段的激酶PARK8中的突变。根据DSM IV TR的标准,个体也可以被诊断患有上文提及的任何神经疾病。

[0467] 在无症状患者中,治疗可以在任何年龄开始(例如,10岁、20岁、30岁)。然而,通常,在患者达到40、50、60或70岁之前不必开始治疗。通常需要在一段时间内进行多剂量的治疗。可以通过测定随时间推移的抗体水平对治疗进行监测。如果应答下降,表明需要加强剂量。在潜在的唐氏综合征患者的情况下,可以通过向母亲施用治疗剂在出生前开始治疗或在出生后不久开始治疗。

[0468] I. 核酸

[0469] 本发明还提供了编码上述任何重链和轻链的核酸(例如,SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:76-80、SEQ ID NO:90-91、SEQ ID NO:146-148、SEQ ID NO:83-85、SEQ ID NO:93-145和SEQ ID NO:178-181)。编码本发明的重链的示例性核酸是SEQ ID NO:182,并且编码本发明的轻链的示例性核酸是SEQ ID NO:183。任选地,此类核酸进一步编码信号肽,并且可以被表达为具有连接到可变区的信号肽。核酸的编码序列可以与调控序列可操作地连接以确保编码序列的表达,诸如启动子、增强子、核糖体结合位点、转录终止信号等。调节序列可以包括启动子,例如,原核启动子或真核启动子。编码重链或轻链的核酸可以经密码子优化以便在宿主细胞中表达。编码重链和轻链的核酸可以编码选择性基因。编码重链和轻链的核酸可以以分离形式存在或可以克隆到一种或多种载体中。核酸可以通过例如固态合成或重叠寡核苷酸的PCR合成。编码重链和轻链的核酸可以作为一个连续核酸接合在例如表达载体内,或可以是分开的,例如,各自克隆到其自身的表达载体中。

[0470] J. 缀合抗体

[0471] 与抗原诸如tau特异性结合的缀合抗体,可用于检测tau的存在;监测和评价治疗剂用于治疗被诊断为患有以下疾病的患者的功效:阿尔茨海默病、唐氏综合征、轻度认知障碍、原发性年龄相关性tau蛋白病、脑炎后帕金森病、创伤后痴呆或拳击员痴呆、皮克氏病、C型尼曼-皮克病、核上性麻痹、额颞叶痴呆、额颞叶变性、嗜银颗粒病、球状胶质tau蛋白病、关岛肌萎缩性侧索硬化/帕金森痴呆复征、皮质基底节变性(CBD)、路易体痴呆、阿尔茨海默病的路易体变异(LBVAD)、慢性创伤性脑病(CTE)、球状胶质tau蛋白病(GGT),或进行性核上性麻痹(PSP);抑制或减少tau的聚集;抑制或减少tau原纤维形成;减少或清除tau沉积物;稳定tau的无毒构象;或在患者中治疗以下疾病或实现以下疾病的预防:阿尔茨海默病、唐氏综合征、轻度认知障碍、原发性年龄相关性tau蛋白病、脑炎后帕金森病、创伤后痴呆或拳击员痴呆、皮克氏病、C型尼曼-皮克病、核上性麻痹、额颞叶痴呆、额颞叶变性、嗜银颗粒病、球状胶质tau蛋白病、关岛肌萎缩性侧索硬化/帕金森痴呆复征、皮质基底节变性(CBD)、路易体痴呆、阿尔茨海默病的路易体变异(LBVAD)、慢性创伤性脑病(CTE)、球状胶质tau蛋白病(GGT),或进行性核上性麻痹(PSP)。例如,此类抗体可以与其他治疗性部分、其他蛋白质、

其他抗体和/或可检测标记缀合。参见WO 03/057838;US 8,455,622。此类治疗性部分可以是可用于在患者中治疗、抗击、缓解、预防或改善不想要的病状或疾病的任何药剂,所述病状或疾病诸如阿尔茨海默病、唐氏综合征、轻度认知障碍、原发性年龄相关性tau蛋白病、脑炎后帕金森病、创伤后痴呆或拳击员痴呆、皮克氏病、C型尼曼-皮克病、核上性麻痹、额颞叶痴呆、额颞叶变性、嗜银颗粒病、球状胶质tau蛋白病、关岛肌萎缩性侧索硬化/帕金森痴呆复征、皮质基底节变性(CBD)、路易体痴呆、阿尔茨海默病的路易体变异(LBVAD)、慢性创伤性脑病(CTE)、球状胶质tau蛋白病(GGT),或进行性核上性麻痹(PSP)。

[0472] 缀合的治疗性部分可包括细胞毒性剂、细胞生长抑制剂、神经营养剂、神经保护剂、放射治疗剂、免疫调节剂,或促进或增强抗体活性的任何生物活性剂。细胞毒性剂可以是对细胞有毒性的任何剂。细胞生长抑制剂可以是抑制细胞增殖的任何剂。神经营养剂可以是促进神经元维持、生长或分化的任何剂,包括化学剂或蛋白质剂。神经保护剂可以是保护神经元免于急性侵害或退化过程的剂,包括化学剂或蛋白质剂。免疫调节剂可以是刺激或抑制免疫应答的发展或维持的任何剂。放射治疗剂可以是发射辐射的任何分子或化合物。如果此类治疗性部分偶联于tau特异性抗体,诸如本文所述的抗体,那么偶联的治疗性部分将相对于正常细胞对tau相关疾病影响细胞具有特异性亲和力。因此,缀合抗体的施用直接靶向癌细胞,而对周围的正常健康组织具有最小的伤害。这对于毒性太大而不能单独施用的治疗性部分可以是特别有用的。此外,可以使用较少量的治疗性部分。

[0473] 一些此类抗体可以被修饰以充当免疫毒素。参见例如美国专利号5,194,594。例如,通过使用用于抗体的双功能试剂S-乙酰基巯基琥珀酸酐和用于蓖麻毒素的3-(2-吡啶基二硫代)丙酸琥珀酰亚胺酯,可以将来源于植物的细胞毒素蓖麻毒素偶联于抗体。参见Pietersz等人,Cancer Res.48(16):4469-4476(1998)。偶联导致蓖麻毒素的B链结合活性丧失,同时既不损害蓖麻毒素的A链的毒性潜力,也不损害抗体的活性。类似地,核糖体组装的抑制剂皂草素可通过化学插入的巯基(sulfhydryl)基团之间的二硫键偶联于抗体。参见Polito等人,Leukemia 18:1215-1222(2004)。

[0474] 一些此类抗体可连接于放射性同位素。放射性同位素的实例包括,例如,钇⁹⁰(⁹⁰Y)、铟¹¹¹(¹¹¹In)、¹³¹I、^{99m}Tc、放射性银-111、放射性银-199和铋²¹³。放射性同位素与抗体的连接可以用常规的双功能螯合物进行。对于放射性银-111和放射性银-199连接,可以使用巯基接头。参见Hazra等人,Cell Biophys.24-25:1-7(1994)。银放射性同位素的连接可涉及用抗坏血酸还原免疫球蛋白。对于诸如¹¹¹In和⁹⁰Y的放射性同位素,可以使用替伊莫单抗并且将使其与此类同位素反应以分别形成¹¹¹In-替伊莫单抗和⁹⁰Y-替伊莫单抗。参见Witzig,Cancer Chemother.Pharmacol.,48增刊1:S91-S95(2001)。

[0475] 一些此类抗体可以连接于其他治疗性部分。此类治疗性部分可以具有例如细胞毒性、细胞生长抑制性、神经营养性或神经保护性。例如,抗体可以与毒性化学治疗药物诸如美登素(maytansine)、格尔德霉素(geldanamycin)、微管蛋白抑制剂诸如微管蛋白结合剂(例如,奥瑞斯他汀(auristatin)),或小沟结合剂诸如卡里奇霉素(calicheamicin)缀合。其他代表性的治疗性部分包括已知可用于治疗、管理或改善以下疾病的药剂:阿尔茨海默病、唐氏综合征、轻度认知障碍、原发性年龄相关性tau蛋白病、脑炎后帕金森病、创伤后痴呆或拳击员痴呆、皮克氏病、C型尼曼-皮克病、核上性麻痹、额颞叶痴呆、额颞叶变性、嗜银颗粒病、球状胶质tau蛋白病、关岛肌萎缩性侧索硬化/帕金森痴呆复征、皮质基底节变性

(CBD)、路易体痴呆、阿尔茨海默病的路易体变异(LBVAD)、慢性创伤性脑病(CTE)、球状胶质tau蛋白病(GGT),或进行性核上性麻痹(PSP)。

[0476] 抗体还可与其他蛋白质偶联。例如,抗体可与Fynomer偶联。Fynomer是衍生自人Fyn SH3结构域的小结合蛋白(例如,7kDa)。它们可以是稳定且可溶的,并且它们可缺乏半胱氨酸残基和二硫键。可将Fynomer工程化以与抗体相同的亲和力和特异性结合至靶分子。它们适用于基于抗体产生多特异性融合蛋白。例如,Fynomer可以融合至抗体的N末端和/或C末端,以产生具有不同架构的双特异性和三特异性FynomAb。可以使用Fynomer文库,通过筛选技术,使用FACS、Biacore以及允许有效选择具有最佳特性的Fynomer的基于细胞的测定选择Fynomer。Fynomer的实例公开于Grabulovski等人,J.Biol.Chem.282:3196-3204(2007);Bertschinger等人,Protein Eng.Des.Sel.20:57-68(2007);Schlatter等人,MAbs.4:497-508(2011);Banner等人,Acta.Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.69(Pt6):1124-1137(2013);以及Brack等人,Mol.Cancer Ther.13:2030-2039(2014)。

[0477] 本文公开的抗体还可以与一种或多种其他抗体偶联或缀合(例如,以形成抗体异源缀合物(antibody heteroconjugate))。此类其他抗体可以结合tau内的不同表位或可以结合不同的靶抗原。

[0478] 抗体还可与可检测的标记偶联。此类抗体可以用于例如诊断阿尔茨海默病、唐氏综合征、轻度认知障碍、原发性年龄相关性tau蛋白病、脑炎后帕金森病、创伤后痴呆或拳击员痴呆、皮克氏病、C型尼曼-皮克病、核上性麻痹、额颞叶痴呆、额颞叶变性、嗜银颗粒病、球状胶质tau蛋白病、关岛肌萎缩性侧索硬化/帕金森痴呆复征、皮质基底节变性(CBD)、路易体痴呆、阿尔茨海默病的路易体变异(LBVAD)、慢性创伤性脑病(CTE)、球状胶质tau蛋白病(GGT),或进行性核上性麻痹(PSP),以及/或者用于评估治疗的功效。此类抗体尤其可用于在患有或易患上以下疾病的受试者中:阿尔茨海默病、唐氏综合征、轻度认知障碍、原发性年龄相关性tau蛋白病、脑炎后帕金森病、创伤后痴呆或拳击员痴呆、皮克氏病、C型尼曼-皮克病、核上性麻痹、额颞叶痴呆、额颞叶变性、嗜银颗粒病、球状胶质tau蛋白病、关岛肌萎缩性侧索硬化/帕金森痴呆复征、皮质基底节变性(CBD)、路易体痴呆、阿尔茨海默病的路易体变异(LBVAD)、慢性创伤性脑病(CTE)、球状胶质tau蛋白病(GGT),或进行性核上性麻痹(PSP),或者在从此类患者获得的适当生物样品中执行此类测定。可以与抗体偶联或连接的代表性可检测标记包括各种酶,诸如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶,或乙酰胆碱酯酶;辅基,诸如链霉抗生物素蛋白/生物素和抗生物素蛋白/生物素;荧光材料,诸如伞形酮、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,诸如鲁米诺;生物发光材料,诸如萤光素酶、萤光素和水母发光蛋白;放射性材料,诸如放射性银-111、放射性银-199、铽²¹³、碘(¹³¹I、¹²⁵I、¹²³I、¹²¹I)、碳(¹⁴C)、硫(³⁵S)、氚(³H)、铟(¹¹⁵In、¹¹³In、¹¹²In、¹¹¹In)、锝(⁹⁹Tc)、钛(²⁰¹Ti)、镓(⁶⁸Ga、⁶⁷Ga)、钯(¹⁰³Pd)、钼(⁹⁹Mo)、氙(¹³³Xe)、氟(¹⁸F)、¹⁵³Sm、¹⁷⁷Lu、¹⁵⁹Gd、¹⁴⁹Pm、¹⁴⁰La、¹⁷⁵Yb、¹⁶⁶Ho、⁹⁰Y、⁴⁷Sc、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、¹⁴²Pr、¹⁰⁵Rh、⁹⁷Ru、⁶⁸Ge、⁵⁷Co、⁶⁵Zn、⁸⁵Sr、³²P、¹⁵³Gd、¹⁶⁹Yb、⁵¹Cr、⁵⁴Mn、⁷⁵Se、¹¹³Sn以及¹¹⁷Ti;正电子发射金属,使用各种正电子发射断层摄影术;非放射性顺磁性金属离子;以及放射性标记的或缀合于特定放射性同位素的分子。

[0479] 放射性同位素与抗体的连接可以用常规的双功能螯合物进行。对于放射性银-111和放射性银-199连接,可以使用硫基接头。参见Hazra等人,Cell Biophys.24-25:1-7

(1994)。银放射性同位素的连接可涉及用抗坏血酸还原免疫球蛋白。对于诸如 ^{111}In 和 ^{90}Y 的放射性同位素,可以使用替伊莫单抗并且将使其与此类同位素反应以分别形成 ^{111}In -替伊莫单抗和 ^{90}Y -替伊莫单抗。参见Witzig, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 48增刊1:S91-S95 (2001)。

[0480] 治疗性部分、其他蛋白质、其他抗体和/或可检测标记可以直接或通过中间体(例如,接头)间接与本发明的抗体偶联或缀合。参见例如Arnon等人,“Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy”,在*Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld等人(编辑),第243-56页(Alan R. Liss Inc. 1985)中; Hellstrom等人,“Antibodies For Drug Delivery”,在*Controlled Drug Delivery* (第2版), Robinson等人(编辑),第623-53页(Marcel Dekker Inc. 1987)中; Thorpe, “Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review”,在*Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera等人(编辑),第475-506页(1985)中; “Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy”,在*Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin等人(编辑),第303-16页(Academic Press 1985)中; 以及Thorpe等人, *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982)。合适的接头包括,例如,可切割和不可切割的接头。可采用在酸性或还原条件下,在暴露于特定蛋白酶时,或在其他限定条件下释放所偶联的治疗性部分、蛋白质、抗体和/或可检测标记的不同接头。

[0481] VI. 药物组合物和使用方法

[0482] 在预防性应用中,抗体或用于诱导抗体的作用剂或者所述抗体或作用剂的药物组合物以能有效地降低疾病(例如,阿尔茨海默病)的风险、减轻疾病的严重性,或者延迟疾病的至少一个体征或症状的发作的方案(剂量、频率和施用途径)施用于易患该疾病或者说处于该疾病的风险下的患者。具体地讲,该方案优选地有效抑制或延迟脑中的tau或磷酸化-tau和由其形成的成对丝,和/或抑制或延迟其毒性作用和/或抑制/或延迟行为缺陷的发展。在治疗性应用中,抗体或诱导抗体的作用剂以能有效地改善或至少抑制疾病(例如,阿尔茨海默病)的至少一个体征或症状的进一步恶化的方案(剂量、频率和施用途径)施用于疑似患有或已经患有该疾病的患者。具体地,该方案优选地有效减少或至少抑制与毒性和/或行为缺陷相关联的tau、磷酸化tau或由其形成的成对丝的水平地进一步增加。

[0483] 如果个体治疗的患者达到的结果比不通过本发明的方法治疗的对比患者的对照群体中的平均结果更有利,或如果经治疗患者的结果相对于对照临床试验(例如,II期、II/III期或III期试验)中的对照患者被证明更有利,在 $p < 0.05$ 或 0.01 或甚至 0.001 的水平,那么方案被认为是治疗或预防有效的。

[0484] 有效剂量随许多不同的因素而变化,所述因素诸如施用方式、靶位点、患者的生理状态、患者是否为ApoE载体、患者是人还是动物、施用的其他药物和治疗是预防性的还是治疗性的。

[0485] 抗体的示例性剂量范围为约 0.01 至 60mg/kg ,或约 0.1 至 3mg/kg 或 0.15 - 2mg/kg 或 0.15 - 1.5mg/kg 患者体重。抗体可以每天、隔日、每周、每两周、每月、每季度或根据通过实证分析决定的任何其他时间表施用此类剂量。示例性的治疗需要长期施用多种剂量,例如至少六个月。另外的示例性治疗方案需要每两周施用一次,或一月施用一次或每3至6个月施

用一次。

[0486] 对于人施用,用于主动施用的作用剂的量在每个患者0.1 μ g至500 μ g且更通常地在每次注射1 μ g至100 μ g或1 μ g至10 μ g的范围内变化。注射的时间安排可以显著变化,从一天一次,到一年一次,再到十年一次。典型的方案由免疫,然后以诸如6周间隔或两个月的时间间隔进行加强注射组成。另一种方案由免疫,然后在1个月、2个月和12个月后进行加强注射组成。另一种方案需要两月一次终身注射。替代性地,加强注射可以不规律地进行,如通过监测免疫应答所指示的。

[0487] 抗体或用于诱导抗体的作用剂优选地经由外部途径(即,施用的或诱导的抗体穿过血脑屏障到达脑中的预期部位的途径)施用。施用途径包括局部、静脉内、口服、皮下、动脉内、颅内、鞘内、腹膜内、鼻内、眼内,或肌内。抗体施用的优选途径是静脉内和皮下。主动免疫的优选途径是皮下和肌内。这种类型的注射最通常在手臂或腿部肌肉中进行。在一些方法中,将剂直接注射到积聚沉积物的特定组织中,例如颅内注射。

[0488] 用于肠胃外施用的药物组合物优选是无菌且基本上等渗并在GMP条件下制造的。药物组合物能够以单位剂型(即,用于单次施用的剂量)提供。可以使用一种或多种生理上可接受的载剂、稀释剂、赋形剂或助剂配制药物组合物。配方取决于所选择的施用途径。对于注射,抗体可在水溶液,优选在生理相容的缓冲液诸如汉克氏溶液(Hank's solution)、林格氏溶液(Ringer's solution)或生理盐水或乙酸盐缓冲液中(以减少注射部位的不适)中配制。溶液可含有配制剂,诸如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。另选地,抗体可以是冻干形式,以在使用前用合适的媒介物(例如,无菌的无热原水)复原。

[0489] 本发明的方案可以与有效治疗或预防正在治疗的疾病的另一种剂组合施用。例如,就阿尔茨海默病而言,本发明的方案可以与针对A β 的免疫疗法(WO/2000/072880)、胆碱酯酶抑制剂或美金刚组合,或者就帕金森病而言,本发明的方案可以与针对 α 突触核蛋白的免疫疗法WO/2008/103472、左旋多巴、多巴胺激动剂、COMT抑制剂、MAO-B抑制剂、金刚烷胺或抗胆碱能剂组合。

[0490] 抗体以有效方案施用,所述有效方案意指延迟发作、降低严重性、抑制进一步恶化和/或改善正在治疗的病症的至少一种体征或症状的剂量、施用途径和施用频率。如果患者已经患有病症,那么可以将该方案称为治疗有效方案。如果患者相对于普通群体患有该病症的风险高但尚未出现症状,那么将该方案称为预防有效方案。在一些情况下,相对于历史对照或同一患者的过去经历,可以在个体患者中观察到治疗或预防功效。在其他情况下,相对于未治疗患者的对照群体,可以在经治疗患者的群体的临床前或临床试验中证明治疗或预防功效。

[0491] 抗体的示例性剂量为0.1-60mg/kg(例如,0.5、3、10、30,或60mg/kg),或0.5-5mg/kg体重(例如,0.5、1、2、3、4或5mg/kg)或作为固定剂量的10-4000mg或10-1500mg。剂量取决于患者的状况和对先前治疗的应答(如果有的话)、治疗是预防性的还是治疗性的和该病症是急性的还是慢性的和其他因素。

[0492] 施用可以是肠胃外、静脉内、口服、皮下、动脉内、颅内、鞘内、腹膜内、局部、鼻内或肌内。可以通过静脉内或皮下施用将一些抗体施用到体循环中。静脉内施用可以,例如,通过在诸如30-90min的时间内输注。

[0493] 施用频率取决于循环中抗体的半衰期、患者的状况和施用途径以及其他因素。频

率可以是响应于患者状况的改变或正在治疗的病症的进展每天、每周、每月、每季度或不定期地。静脉内施用的示例性频率是在连续治疗过程内的每周与每季度之间,但也可以更频繁或更不频繁地给药。对于皮下施用,示例性给药频率是每天至每月,但也可以更频繁或更不频繁地给药。

[0494] 施用的剂量数取决于该病症是急性的还是慢性的以及该病症对治疗的应答。对于急性病症或慢性病症的急性加重,1与10剂量之间通常是足够的。有时单次推注剂量,任选地以分开形式,足以用于急性病症或慢性病症的急性加重。治疗可以重复用于急性病症或急性加重的复发。对于慢性病症,可以定期,例如,每周、每两周、每月、每季度、每六个月施用抗体至少1年、5年或10年,或患者终生。

[0495] A. 诊断和监测方法

[0496] 体内成像、诊断方法和优化免疫疗法

[0497] 本发明提供了在患者体内对tau蛋白沉积物(例如,神经原纤维缠结和tau内含物)成像的方法。所述方法通过向患者施用试剂诸如结合tau的抗体(例如,小鼠的、人源化的、嵌合或饰面的3D6抗体),然后在试剂结合之后对其进行检测来开展。结合至SEQ ID NO:3的氨基酸残基199-213或262-276(分别对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基257-271或320-334)内或SEQ ID NO:1的氨基酸残基259-268或290-299或321-330或353-362内的tau表位的抗体是优选的。在一些方法中,所述抗体结合至SEQ ID NO:3的氨基酸残基199-213(对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基257-271)内或SEQ ID NO:3的氨基酸残基262-276(对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基320-334)内的表位。在一些方法中,所述抗体结合至SEQ ID NO:1的氨基酸残基259-268内、SEQ ID NO:1的氨基酸残基290-299内、SEQ ID NO:1的氨基酸残基321-330内或SEQ ID NO:1的氨基酸残基353-362内的表位。通过使用缺乏全长恒定区的抗体片段,诸如Fab,可以避免或减少对所施用抗体的清除应答。在一些方法中,相同的抗体可以用作治疗和诊断试剂两者。

[0498] 诊断试剂可以通过静脉内注射施用到患者体内,或通过颅内注射或通过颅骨上钻孔直接施用到脑部中。试剂的剂量应在与用于治疗方法相同的范围内。通常,对试剂进行标记,但在一些方法中,对tau具有亲和力的主要试剂未标记并且第二标记剂用于结合主要试剂。标记的选择取决于检测手段。例如,荧光标记适用于光学检测。顺磁性标记的使用适用于无需外科手术干预的断层摄影检测。还可以使用正电子发射断层摄影术(PET)或单光子发射计算机断层摄影术(SPECT)检测放射性标记。

[0499] tau蛋白沉积物的体内成像方法可用于诊断tau蛋白病(诸如阿尔茨海默病、额颞叶变性、进行性核上性麻痹和皮克氏病)或确认其诊断或对这种疾病的易感性。例如,该方法可用于表现出痴呆症状的患者。如果患者具有异常的神经原纤维缠结,那么患者可能患有阿尔茨海默病。另选地,如果患者具有异常的tau内含物,那么取决于内含物的位置,患者可能患有额颞叶变性。该方法还可用于无症状患者。异常tau蛋白沉积物的存在表明对未来症状性疾病的易感性。该方法还可用于在先前已被诊断患有tau相关疾病的患者中监测疾病进展和/或对治疗的应答。

[0500] 可以通过将标记基因座的数量、大小和/或强度与对应的基线值相比较来进行诊断。基线值可代表未患病个体的群体的平均水平。基线值还可代表在同一患者中确定的先前水平。例如,可以在开始tau免疫疗法治疗之前在患者中确定基线值,然后将测量值与基

线值进行比较。相对于基线的值的减小传达了对治疗的积极应答的信号。

[0501] 在一些患者中,可以通过进行PET扫描来辅助tau蛋白病的诊断。可以使用例如常规的PET成像器和辅助设备来进行PET扫描。扫描通常包括通常已知与tau蛋白沉积物相关联的一个或多个脑部区域以及其中通常存在很少(如果有的话)沉积物以用作对照的一个或多个区域。

[0502] 在PET扫描中检测到的信号可以表示为多维图像。多维图像可以是表示穿过脑部的横截面的二维、表示三维脑部的三维,或表示三维脑部随时间的变化的四维。可以使用具有不同颜色的色标,从而指示不同的标记量并且推测性地指示所检测到tau蛋白沉积物。扫描结果还可以利用与检测到的标记量以及因此tau蛋白沉积物的量相关的数字以数字方式呈现。存在于已知与特定tau蛋白病(例如,阿尔茨海默病)的沉积物相关联的脑部区域中的标记可与存在于已知与沉积物无关的区域中的标记进行比较,以提供指示前一个区域内的沉积物程度的比率。对于相同的放射性标记的配体,此类比例提供了不同患者之间的tau蛋白沉积物及其变化的可比较的度量。

[0503] 在一些方法中,PET扫描与MRI或CAT扫描同时或在同一次患者就诊时进行。MRI或CAT扫描提供比PET扫描更多的脑部解剖细节。然而,来自PET扫描的图像可以叠加在MRI或CAT扫描图像上,从而更精确地指示相对于脑部的解剖结构PET配体的位置并由此推出tau沉积物的位置。一些机器可以执行PET扫描和MRI或CAT扫描,而无需患者在扫描之间改变位置,从而有利于图像的叠加。

[0504] 合适的PET配体包括本发明的放射性标记的抗体(例如,小鼠、人源化、嵌合或饰面的3D6抗体)。所使用的放射性同位素可以是,例如, C^{11} 、 N^{13} 、 O^{15} 、 F^{18} ,或 I^{123} 。施用PET配体与进行扫描之间的间隔可取决于PET配体,且具体地是其在脑部的摄取和清除速率,以及其放射性标记的半衰期。

[0505] PET扫描还可以作为预防措施在无症状患者中或在有轻度认知障碍症状但尚未被诊断患有tau蛋白病但发展tau蛋白病的风险高的患者中进行。对于无症状患者,扫描尤其适用于由于家族史、遗传或生化风险因素或中老年而被认为患tau蛋白病的风险高的个体。例如在45与75岁之间的患者年龄就可以开始预防性扫描。在一些患者中,在50岁时进行第一次扫描。

[0506] 预防性扫描可以以例如介于六个月与十年,优选地介于1至5年的间隔进行。在一些患者中,一年一次进行预防性扫描。如果作为预防措施进行的PET扫描指示异常高的tau蛋白沉积物水平,那么可以开始免疫疗法并且随后进行PET扫描,就像在被诊断患有tau蛋白病的患者中那样。如果作为预防措施进行的PET扫描指示tau蛋白沉积物的水平在正常水平内,那么可以像之前一样以介于六个月与10年之间、且优选地1至5年的间隔,或响应于tau蛋白病或轻度认知障碍的体征或症状的出现而进行另外的PET扫描。如果且当检测到高于正常水平的tau蛋白沉积物时,通过将预防性扫描与tau定向免疫疗法的施用组合,可以将tau蛋白沉积物的水平降低至或接近正常水平,或至少抑制进一步增加,并且与没有接受预防性扫描和tau定向免疫疗法相比,患者可以保持更长时间不患tau蛋白病(例如,至少5年、10年、15年或20年,或患者的余生)。

[0507] tau蛋白沉积物的正常水平可以通过未被诊断患有特定tau蛋白病(例如,阿尔茨海默氏病)且不被认为处于发展这种疾病的高风险的普通群体中的个体的代表性样本(例

如,50岁以下无疾病个体的代表性样本)的脑部神经原纤维缠结或tau内含物的量来确定。另选地,如果已知其中发展了tau蛋白沉积物的脑部区域中的根据本方法的PET信号不同于(在测量的准确度内)来自其中已知此类沉积物通常不发展的脑部区域中的信号,那么可以在个体患者中识别正常水平。通过与正常水平(例如,外部平均值和标准偏差的方差)进行比较,或者仅仅由与不被已知与沉积物相关联的区域相比与tau蛋白沉积物相关联的脑部区域中超出实验误差的升高的信号,可以识别个体中的升高水平。为了比较个体和群体中tau蛋白沉积物的水平,tau蛋白沉积物应优选在脑部的一个或多个相同区域中确定,这些区域包括已知形成与特定的tau蛋白病(例如,阿尔兹海默病)相关联的tau蛋白沉积物的至少一个区域。具有升高水平的tau蛋白沉积物的患者是开始免疫疗法的候选者。

[0508] 在开始免疫疗法后,可首先将tau蛋白沉积物水平的降低视为治疗具有期望效果的指示。观察到的降低可以是,例如,在基线值的1-100%、1-50%、或1-25%的范围内。此类效果可以在已知沉积物在其中形成的脑部的一个或多个区域中测量,或可以由此类区域的平均值测量。治疗的总效果可以通过将相对于基线的减少百分比与平均未治疗患者中可能存在的tau蛋白沉积物的增加相加来近似计算。

[0509] tau蛋白沉积物在大约恒定水平的维持或甚至tau蛋白沉积物的少量增加也可以指示对治疗的应答,尽管是非最佳应答。可以将此类应答与未接受治疗的具有特定tau蛋白病(例如,阿尔茨海默病)的患者中的tau蛋白沉积物水平的时间过程进行比较,以确定免疫疗法是否具有抑制tau蛋白沉积物进一步增加的作用。

[0510] tau蛋白沉积物的变化的监测允许响应于治疗调整免疫疗法或其他治疗方案。PET监测提供了对治疗的应答的性质和程度的指示。然后,可以确定是否调整治疗,并且如果需要,可以响应于PET监测来调整治疗。因此,PET监测允许在其他生物标志物、MRI或认知测量已经可检测地响应之前调整tau定向免疫疗法或其他治疗方案。显著变化意指治疗后的参数值相对于基线的比较提供了治疗已经或尚未产生有益效果的一些证据。在一些情况下,患者自身中参数值的变化提供了治疗已经或尚未产生有益效果的证据。在其他情况下,将患者中的值的变化(如果有的话)与未进行免疫疗法的患者的代表性对照群体中的值的变化(如果有的话)进行比较。特定患者的应答与对照患者的正常应答的差异(例如,平均值加标准偏差的方差)也可以提供免疫疗法方案在患者中实现或未实现有益效果的证据。

[0511] 在一些患者中,监测指示了tau蛋白沉积物的可检测下降,但是tau蛋白沉积物的水平仍保持高于正常水平。在此类患者中,如果没有不可接受的副作用,那么治疗方案可以按原样继续,或甚至增加施用频率和/或剂量(如果尚未达到最大推荐剂量的话)。

[0512] 如果监测指示患者中tau蛋白沉积物的水平已经降低至tau蛋白沉积物的正常或接近正常水平,那么免疫治疗方案可以从诱导的方案(即,降低tau蛋白沉积物的水平)调整为维持的方案(即,将tau蛋白沉积物维持在大致恒定的水平)。这种方案可通过减少施用免疫疗法的剂量和/或频率实现。

[0513] 在其他患者中,监测可指示免疫疗法具有一些有益效果但是非最佳效果。最佳效果可以定义为在开始疗法后在给定时间点进行免疫疗法的tau蛋白病患者的代表性样本所经历的tau蛋白沉积物的变化的上半部分或四分点之内的tau蛋白沉积物水平的百分比减少(在整个脑部或已知tau蛋白沉积物在其中形成的其代表性区域中测量或计算)。经历较小降低的患者,或其tau蛋白沉积物保持恒定或甚至增加但程度小于在不存在免疫疗法的

情况下所预期的程度(例如,如从不施用免疫疗法的患者的对照组所推断的那样)的患者可被归类为经历积极但非最佳的应答。此类患者可以任选地进行方案调整,其中增加了剂的剂量和或施用频率。

[0514] 在一些患者中,tau蛋白沉积物可以与不接受免疫疗法的患者中的tau沉积物类似或更大的方式增加。如果此类增加持续一段时间,诸如18个月或2年,甚至在剂的频率或剂量的任何增加之后,那么可以根据需要停止免疫疗法,以有利于其他治疗。

[0515] 诊断、监测和调整tau蛋白病的治疗的以上描述主要集中在使用PET扫描。然而,可以使用用于可视化和/或测量适于本发明的tau抗体(例如,小鼠、人源化、嵌合或饰面的3D6抗体)的使用的tau蛋白沉积物的任何其他技术代替PET扫描来执行此类方法。

[0516] 还提供了在患有或易患与tau相关联的疾病的患者中检测针对tau的免疫应答的方法。所述方法可用于监测使用本文提供的剂的治疗性和预防性治疗的过程。被动免疫后的抗体谱通常显示出抗体浓度的立即峰值,然后是指数衰减。在没有再次给药的情况下,衰变取决于所施用的抗体的半衰期在数天至数月的时间段内接近治疗前水平。例如,一些人抗体的半衰期约为约20天。

[0517] 在一些方法中,在施用之前进行受试者中针对tau的抗体的基线测量,之后不久进行第二次测量以确定峰值抗体水平,并且间隔地进行一次或多次进一步测量以监测抗体水平的衰减。当抗体水平已经下降至基线或低于基线的峰值(peak less baseline)的预定百分比(例如,50%,25%或10%)时,施用另一剂量抗体的施用。在一些方法中,将低于背景的峰值或随后测定的水平与先前测定的参考水平进行比较以在其他受试者中构建有益的预防性或治疗性治疗方案。如果测量的抗体水平显著小于参考水平(例如,小于由治疗受益的受试者群体中的参考值的平均值减一个,或优选地,两个标准偏差),指示施用附加剂量的抗体。

[0518] 还提供了检测受试者中的tau的方法,例如,通过测量来自受试者的样品中的tau或通过受试者中的tau的体内成像。此类方法可用于诊断或确认与tau相关联的疾病的诊断或其易感性。所述方法还可用于无症状受试者。tau的存在指示对未来症状性疾病的易感性。这些方法还可用于监测先前已经被诊断为患有以下疾病的受试者中的疾病进展和/或对治疗的应答:阿尔茨海默病、唐氏综合征、轻度认知障碍、原发性年龄相关性tau蛋白病、脑炎后帕金森病、创伤后痴呆或拳击员痴呆、皮克氏病、C型尼曼-皮克病、核上性麻痹、额颞叶痴呆、额颞叶变性、嗜银颗粒病、球状胶质tau蛋白病、关岛肌萎缩性侧索硬化/帕金森痴呆复征、皮质基底节变性(CBD)、路易体痴呆、阿尔茨海默病的路易体变异(LBVAD)、慢性创伤性脑病(CTE)、球状胶质tau蛋白病(GGT),或进行性核上性麻痹(PSP)。

[0519] 可以使从患有以下疾病、疑似患有以下疾病或有患上以下疾病的风险的受试者获得的生物样本与本文所公开的抗体接触,以评估tau的存在:阿尔茨海默病、唐氏综合征、轻度认知障碍、原发性年龄相关性tau蛋白病、脑炎后帕金森病、创伤后痴呆或拳击员痴呆、皮克氏病、C型尼曼-皮克病、核上性麻痹、额颞叶痴呆、额颞叶变性、嗜银颗粒病、球状胶质tau蛋白病、关岛肌萎缩性侧索硬化/帕金森痴呆复征、皮质基底节变性(CBD)、路易体痴呆、阿尔茨海默病的路易体变异(LBVAD)、慢性创伤性脑病(CTE)、球状胶质tau蛋白病(GGT),或进行性核上性麻痹(PSP)。例如,可以将此类受试者中的tau水平与健康受试者中存在的那些水平进行比较。另选地,可以将接受对该疾病的治疗的此类受试者中的tau水平与没有针对

以下疾病进行过治疗的受试者的那些tau水平进行比较:阿尔茨海默病、唐氏综合征、轻度认知障碍、原发性年龄相关性tau蛋白病、脑炎后帕金森病、创伤后痴呆或拳击员痴呆、皮克氏病、C型尼曼-皮克病、核上性麻痹、额颞叶痴呆、额颞叶变性、嗜银颗粒病、球状胶质tau蛋白病、关岛肌萎缩性侧索硬化/帕金森痴呆复征、皮质基底节变性(CBD)、路易体痴呆、阿尔茨海默病的路易体变异(LBVAD)、慢性创伤性脑病(CTE)、球状胶质tau蛋白病(GGT),或进行性核上性麻痹(PSP)。一些此类测试涉及从此类受试者中获得的组织活检。ELISA测定也可以是有用的方法,例如,用于评估流体样品中的tau。

[0520] VII. 药盒

[0521] 本发明还提供了包括本文公开的抗体和相关材料诸如使用说明书(例如,包装插页)的药盒(例如,容器)。使用说明书可包含例如施用抗体和任选的一种或多种另外剂的说明书。抗体的容器可以是单位剂量、散装(例如,多剂量包装)或亚单位剂量。

[0522] 包装插页是指通常治疗产品的商业包装中通常包括的说明书,其包含关于适应症、用法、剂量、施用、禁忌症和/或关于此类治疗产品的使用的警告的信息。

[0523] 药盒还可包括第二容器,其包括药学上可接受的缓冲液,诸如抑菌性注射用水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液和右旋糖溶液。它还可以包括从商业和用户角度所需的材料,包括其他缓冲剂、稀释剂、过滤器、针头和注射器。

[0524] VIII. 其他应用

[0525] 抗体可用于在临床诊断或治疗或研究的情况下检测tau或其片段。例如,抗体可用于检测生物样品中tau的存在,作为生物样品包括tau沉积物的指示。可以将抗体与生物样品的结合和抗体与对照样品的结合进行比较。对照样品和生物样品可包括相同组织来源的细胞。对照样品和生物样品可以从相同的个体或不同的个体并且可以在相同的场合或在不同的场合获得。如果需要,在多个场合评价多个生物样品和多个对照样品,以对抗与样品之间的差异无关的随机变化。然后可以在一个或多个生物样品和一个或多个对照样品之间进行直接比较,以确定相对于抗体与一个或多个对照样品的结合而言,抗体与一个或多个生物样品的结合(即,tau的存在)增加、减少还是相同。相对于一个或多个对照样品,抗体与一个或多个生物样品的结合的增加表明一个或多个生物样品中存在tau。在一些情况下,增加的抗体结合在统计学上是显著的。任选地,抗体与生物样品的结合是抗体与对照样品的结合的至少1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍,或100倍。

[0526] 此外,这些抗体可以用于检测生物样本中tau的存在,以监测和评价用于治疗被诊断为患有以下疾病的患者的治疗剂的功效:阿尔茨海默病、唐氏综合征、轻度认知障碍、原发性年龄相关性tau蛋白病、脑炎后帕金森病、创伤后痴呆或拳击员痴呆、皮克氏病、C型尼曼-皮克病、核上性麻痹、额颞叶痴呆、额颞叶变性、嗜银颗粒病、球状胶质tau蛋白病、关岛肌萎缩性侧索硬化/帕金森痴呆复征、皮质基底节变性(CBD)、路易体痴呆、阿尔茨海默病的路易体变异(LBVAD)、慢性创伤性脑病(CTE)、球状胶质tau蛋白病(GGT),或进行性核上性麻痹(PSP)。对来自被诊断为患有阿尔茨海默病、唐氏综合征、轻度认知障碍、原发性年龄相关性tau蛋白病、脑炎后帕金森病、创伤后痴呆或拳击员痴呆、皮克氏病、C型尼曼-皮克病、核上性麻痹、额颞叶痴呆、额颞叶变性、嗜银颗粒病、球状胶质tau蛋白病、关岛肌萎缩性侧索硬化/帕金森痴呆复征、皮质基底节变性(CBD)、路易体痴呆、阿尔茨海默病的路易体变异(LBVAD)、慢性创伤性脑病(CTE)、球状胶质tau蛋白病(GGT),或进行性核上性麻痹(PSP)的

患者的生物样本进行评价,以建立在用治疗剂开始疗法之前抗体与该样本的结合的基线(即,样本中存在tau的基线)。在一些情况下,在多个场合评价来自患者的多个生物样品,以建立基线和与治疗无关的随机变化的量度。然后以一个方案施用治疗剂。该方案可包括在一段时间内多次施用剂。任选地,在多个场合在来自患者的多个生物样品中评价抗体的结合(即,tau的存在),以建立随机变化的量度并显示出响应于免疫疗法的趋势。然后比较抗体与生物样品的结合的各种评估。如果仅进行两次评估,那么可以在这两次评估之间进行直接比较,以确定抗体结合(即,tau的存在)在两次评估之间是否增加、减少或保持相同。如果进行了多于两次的测量,那么可以将测量分析为在用治疗剂治疗之前开始且在整个疗程中前进的时间过程。在抗体与生物样本的结合(即,tau的存在)已减少的患者中,可以推断出治疗剂能有效地治疗患者中的以下疾病:阿尔茨海默病、唐氏综合征、轻度认知障碍、原发性年龄相关性tau蛋白病、脑炎后帕金森病、创伤后痴呆或拳击员痴呆、皮克氏病、C型尼曼-皮克病、核上性麻痹、额颞叶痴呆、额颞叶变性、嗜银颗粒病、球状胶质tau蛋白病、关岛肌萎缩性侧索硬化/帕金森痴呆复征、皮质基底节变性(CBD)、路易体痴呆、阿尔茨海默病的路易体变异(LBVAD)、慢性创伤性脑病(CTE)、球状胶质tau蛋白病(GGT),或进行性核上性麻痹(PSP)。抗体结合的减少可以是在统计学上显著的。任选地,结合减少至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%,或100%。抗体结合的评估可以与评估以下疾病的其他体征和症状结合进行:阿尔茨海默病、唐氏综合征、轻度认知障碍、原发性年龄相关性tau蛋白病、脑炎后帕金森病、创伤后痴呆或拳击员痴呆、皮克氏病、C型尼曼-皮克病、核上性麻痹、额颞叶痴呆、额颞叶变性、嗜银颗粒病、球状胶质tau蛋白病、关岛肌萎缩性侧索硬化/帕金森痴呆复征、皮质基底节变性(CBD)、路易体痴呆、阿尔茨海默病的路易体变异(LBVAD)、慢性创伤性脑病(CTE)、球状胶质tau蛋白病(GGT),或进行性核上性麻痹(PSP)。

[0527] 抗体还可以用作检测tau或其片段的实验室研究的研究试剂。在此类用途中,抗体可以用荧光分子、自旋标记分子、酶,或放射性同位素标记,并且可以以具有用以执行检测测定的所有必需试剂的试剂盒的形式提供。抗体还可用于例如通过亲和色谱纯化tau,或tau的结合配偶体。

[0528] 上文或下文引用的所有专利文件、网站、其他出版物、登录号等出于所有目的整体以引用方式并入,其程度如同每一个单独的项被特定且单独地指明以引用方式如此并入一样。如果一个序列的不同版本在不同的时间与一个登录号相关联,那么在本申请的有效申请日期与登录号相关联的版本是有意义的。有效申请日期意指早于实际申请日期或涉及到登录号的优先权申请的申请日期(如果适用的话)。同样,如果出版物、网站等的不同版本在不同的时间公布,那么在本申请的有效申请日期最近出版的版本是有意义的,除非另外指明。除非另外具体指明,否则本发明的任何特征、步骤、要素、实施方式或方面可以与任何其他组合使用。虽然出于清楚和理解的目的,已经通过说明和举例的方式对本发明进行了相当详细的描述,但很显然,可在所附权利要求的范围内实践某些变化和修改。

[0529] 实施例

[0530] 实施例1.tau单克隆抗体的鉴定

[0531] 如下产生针对tau的单克隆抗体。用含有P301S突变的重组的带有N末端His标签的383a.a.人tau(4R0N)[免疫原A]或含有P301S突变、缺乏N末端His标签的重组的383a.a.人

tau (4R0N) [免疫原B] 执行免疫。将免疫原在RIBI佐剂中乳化。

[0532] 在第0天,用25 μ g免疫原A对五周龄的雌性Balb/c小鼠进行腹膜内免疫,并且在第7、14、21、27、34、48、55和62天各用10 μ g免疫原A进行腹膜内免疫。在第76天和第90天用10 μ g免疫原B对小鼠进行免疫。在第43天和第98天,将小鼠取血并针对免疫原A进行滴定;在第101天,将具有最高滴度的动物用50 μ g免疫原B的末尾免疫 (terminal immunization) 加强,所述免疫原B^{1/2}腹膜内和^{1/2}静脉内递送。经由ELISA针对两种免疫原对融合的杂交瘤进行筛选,并且将具有最高信号的阳性杂交瘤进行表位作图 (参见实施例2)。3D6与对应于SEQ ID NO:3的氨基酸残基199-213和对应于SEQ ID NO:3的氨基酸残基262-276 (根据tau的最长CNS同种型的编号,这对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基257-271和SEQ ID NO:1的氨基酸残基320-334) 的肽反应。

[0533] 实施例2. 抗体3D6的表位作图

[0534] 跨越整个383aa 4R0N人tau蛋白的一系列重叠生物素化肽用于对鼠3D6抗体进行作图。另外的肽用于对蛋白质的C末端和N末端的潜在的翻译后修饰进行建模。

[0535] 生物素化肽结合至链霉抗生物素蛋白包被的ELISA平板的单独的孔。将平板封闭并用鼠3D6处理,然后与辣根过氧化物酶缀合的抗小鼠抗体一起孵育。彻底洗涤后,将OPD施加到平板上并使其显影。读取平板在450nm处的吸光度。利用不含一抗的孔的吸光度值进行背景减除,并且将阳性结合的阈值设定为0.2吸光度单位。

[0536] 对于跨越 (SEQ ID NO:3的) 氨基酸残基199-213和 (SEQ ID NO:3的) 氨基酸残基262-276的肽检测到阳性结合。使用全长4R2N人tau蛋白 (441个氨基酸) 的编号,这些肽对应于 (SEQ ID NO:1的) 氨基酸残基257-271和 (SEQ ID NO:1的) 氨基酸残基320-334。(图1)

[0537] 实施例3. 人源化3D6抗体的设计

[0538] 人源化的起点或供体抗体是小鼠抗体3D6。成熟m3D6的重链可变氨基酸序列作为SEQ ID NO:7提供。成熟m3D6的轻链可变氨基酸序列作为SEQ ID NO:11提供。重链Kabat/Chothia复合物CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列分别作为SEQ ID NO:8-10提供。轻链Kabat CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列分别作为SEQ ID NO:12-14提供。始终使用Kabat编号。

[0539] 3D6的可变 κ (Vk) 属于小鼠Kabat第2亚组,其对应于人Kabat第2亚组,并且可变重链 (Vh) 属于小鼠Kabat第2c亚组,其对应于人Kabat第1亚组 [Kabat E.A.等人, (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版NIH出版号91-3242]。在Vk中,16残基Chothia CDR-L1属于规范类别4,7残基Chothia CDR-L2属于类别1,9残基Chothia CDR-L3属于类别1 [Martin A.C和Thornton J.M. (1996) J.Mol.Biol.263:800-15. [Martin&Thornton,1996]。10残基Chothia CDR-H1属于类别1,17残基Chothia CDR-H2属于类别2 [Martin&Thornton,1996]]。CDR-H3没有归于规范类别中。对PDB数据库中的蛋白质序列进行了搜索 [Deshpande N等人, (2005) Nucleic Acids Res.33:D233-7.], 以寻找将提供3D6的粗略结构模型的结构。为了建立3D6的Fv模型,使用了鼠抗焦谷氨酸-A β 抗体Fab c#24 (pdb代码5MYX) 的结构 [Piechotta,A.等人,2017,J Biol Chem.292:12713-12724], 分辨率为1.4Å。它保留了与3D6相同的环规范结构。

[0540] 3D6 VH的框架与由Wedemayer,G.J.等人 (1997;Science 276:1665-1669) 设计的人源化48G7 Fab PDB:2RCS的相应区域具有高度的序列相似性。3D6和48G7 fab的可变结构域还在CDR-H1、H2环上共用相同的长度。类似地,3D6 VL的框架与由Dafferner,A.J.等人

(2017;.直接投稿)克隆的人抗体ARX71335 VL的相应区域具有高度的序列相似性。3D6和ARX71335抗体的可变轻结构域还在CDR-L1、L2和L3环上共用相同的长度。因此,选择48G7 VH(2RCS-VH)和ARX71335 VL的框架区域作为3D6的CDR的受体序列。构建了接枝到VH和VL的相应人框架上的3D6CDR的模型,并且用作进一步回复突变的指导。

[0541] 使用IMGT Domain GapAlign工具将由抗体人源化过程产生的重链和轻链变体序列与人种系序列进一步比对,以评估重链和轻链的人源性(humanness),如WHO INN委员会准则所概述的。(WHO-INN:International nonproprietary names (INN) for biological and biotechnological substances (综述) (Internet)2014.获自:<http://www.who.int/medicines/services/inn/BioRev2014.pdf>) 在可能的情况下,改变残基以与对应的人种系序列对齐,以增强人源性并且降低潜在的免疫原性。对于人源化的VLvb2变体和VLvb3变体,引入突变以使序列更类似于人种系基因IGKV2-30*02 (SEQ ID NO:27) 对于人源化VHvb2、VHvb3、VHvb4、VHvb5、VHvb6和VHvb6变体,引入突变以使序列更类似于人种系基因IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:25)

[0542] 设计了hu3D6-VH和hu3D6-VL的型式,以便能够评估各种框架残基对抗原结合、热稳定性和免疫原性的贡献,以及用于优化糖基化、聚集、N末端异质性、热稳定性、表面暴露的带电斑块、表面暴露的电荷贴片、脱氨基作用和蛋白酶敏感性。考虑突变的位置包括以下位置:

[0543] -限定规范的CDR构象(汇总于Martin,A.C.R.(2010) Protein sequence and structure analysis of antibody variable domains.载于:Kontermann R和Dübel S(编辑).Antibody Engineering.Heidelberg,Germany:Springer International Publishing AG.),

[0544] -在微调区内(Foote J和Winter G.(1992) Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops.J Mol Biol.224(2):487-99.),

[0545] -定位于VH/VL结构域界面(汇总于Léger OJP和Saldanha J.(2000) Preparation of recombinant antibodies from immune rodent spleens and the design of their humanisation by CDR grafting.载于:Shepherd P和Dean C(编辑),Monoclonal Antibodies:a Practical Approach.Oxford,UK:Oxford University Press.),

[0546] -易于翻译后修饰,诸如糖基化或焦谷氨酸化,

[0547] -根据接枝到VH框架和VL框架上的3D6 CDR模型,被预测会与CDR冲突的残基占据,或者

[0548] -被测序的人抗体中罕见的残基占据,其中亲本小鼠3D6残基或一些其他残基在人抗体组库内更加普遍。

[0549] 示出了鼠3D6抗体和各种人源化抗体的轻链可变区(表4和图3)与重链可变区(表3和图2)的比对。

[0550] 构建了含有不同的取代排列的7种人源化重链可变区变体和3种人源化轻链可变区变体:hu3D6VHvb1、hu3D6VHvb2、hu3D6VHvb3、hu3D6VHvb4、hu3D6VHvb5、hu3D6VHvb6或hu3D6VHvb7(分别为SEQ ID NO:76-80和90-91);以及hu3D6VLvb1、hu3D6VLvb2或hu3D6VLvb3(分别为SEQ ID NO:83-85)(表3和表4)。具有基于所选人框架的回复突变和其

他突变的示例性人源化Vk和Vh设计分别在表3和表4中示出。表3和表4中的粗体区域表示由Kabat/Chothia复合物定义的CDR。SEQ ID NO:76至80和SEQ ID NO:90至91含有如表5中所示的回复突变和其他突变。hu3D6VHvb1、hu3D6VHvb2、hu3D6VHvb3、hu3D6VHvb4、hu3D6VHvb5、hu3D6VHvb6和hu3D6VHvb7中的位置处的氨基酸在表6中列出。hu3D6VLvb1、hu3D6VLvb2和hu3D6VLvb3中的位置处的氨基酸在表7中列出。

[0551] 表3

[0552]

Kabat 残基编号	线性残基编号	FR 或 CDR	小鼠 3D6 VH (SEQ ID NO:7)	IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:25)	2RCS-VH_huFrwk (SEQ ID NO:75)	Hu3D6 VHvb1 (SEQ ID NO:76)	Hu3D6 VHvb2 (SEQ ID NO:77)	Hu3D6 VHvb3 (SEQ ID NO:78)	Hu3D6 VHvb4 (SEQ ID NO:79)	Hu3D6 VHvb5 (SEQ ID NO:80)	Hu3D6 VHvb6 (SEQ ID NO:90)	Hu3D6 VHvb7 (SEQ ID NO:91)
1	1	Fr1	E	E	Q	Q	E	E	E	E	E	E
2	2	Fr1	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
3	3	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
4	4	Fr1	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
5	5	Fr1	Q	V	Q	Q	V	V	V	V	V	V
6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
7	7	Fr1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
8	8	Fr1	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
9	9	Fr1	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
10	10	Fr1	D	E	E	E	E	E	E	E	E	E
11	11	Fr1	L	V	L	L	V	V	V	V	V	V
12	12	Fr1	V	K	V	V	V	V	V	V	V	V
13	13	Fr1	R	K	K	K	K	K	K	K	K	K
14	14	Fr1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
15	15	Fr1	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
16	16	Fr1	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
17	17	Fr1	L	T	S	S	S	T	T	T	T	T
18	18	Fr1	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
19	19	Fr1	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
20	20	Fr1	L	I	L	L	I	I	I	I	I	I
21	21	Fr1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
22	22	Fr1	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
23	23	Fr1	K	K	T	T	K	K	K	K	K	K
24	24	Fr1	A	V	A	A	A	A	A	A	A	A

[0553]

Kabat 残基编号	线性残基编号	FR 或 CDR	小鼠 3D6 VH (SEQ ID NO:7)	IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:25)	2RCS-VH_huFrwk (SEQ ID NO:75)	Hu3D6 VHvb1 (SEQ ID NO:76)	Hu3D6 VHvb2 (SEQ ID NO:77)	Hu3D6 VHvb3 (SEQ ID NO:78)	Hu3D6 VHvb4 (SEQ ID NO:79)	Hu3D6 VHvb5 (SEQ ID NO:80)	Hu3D6 VHvb6 (SEQ ID NO:90)	Hu3D6 VHvb7 (SEQ ID NO:91)
25	25	Fr1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
26	26	CDR-H1	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
27	27	CDR-H1	F	Y	F	F	F	F	F	F	F	F
28	28	CDR-H1	N	T	N	N	N	N	T	T	T	T
29	29	CDR-H1	I	F	I	I	I	I	I	I	I	I
30	30	CDR-H1	K	T	K	K	K	K	K	K	K	K
31	31	CDR-H1	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
32	32	CDR-H1	Y	Y	T	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
33	33	CDR-H1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
34	34	CDR-H1	L	M	M	L	L	L	L	L	L	L
35	35	CDR-H1	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
35A		CDR-H1	-		-	-	-	-	-	-	-	-
35B		CDR-H1	-		-	-	-	-	-	-	-	-
36	36	Fr2	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
37	37	Fr2	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
38	38	Fr2	R	Q	K	K	R	R	R	R	R	R
39	39	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
40	40	Fr2	R	A	R	R	R	R	R	R	R	R
41	41	Fr2	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
42	42	Fr2	E	G	E	E	G	G	G	G	G	G
43	43	Fr2	Q	K	Q	Q	K	K	K	K	K	K
44	44	Fr2	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
45	45	Fr2	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
46	46	Fr2	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
47	47	Fr2	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
48	48	Fr2	I	M	I	I	I	I	I	I	I	I

[0554]

Kabat 残基编号	线性残基编号	FR 或 CDR	小鼠 3D6 VH (SEQ ID NO:7)	IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:25)	2RCS-VH_huFrwk (SEQ ID NO:75)	Hu3D6 VHvb1 (SEQ ID NO:76)	Hu3D6 VHvb2 (SEQ ID NO:77)	Hu3D6 VHvb3 (SEQ ID NO:78)	Hu3D6 VHvb4 (SEQ ID NO:79)	Hu3D6 VHvb5 (SEQ ID NO:80)	Hu3D6 VHvb6 (SEQ ID NO:90)	Hu3D6 VHvb7 (SEQ ID NO:91)
49	49	Fr2	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
50	50	CDR-H2	W	L	R	W	W	W	W	W	W	W
51	51	CDR-H2	I	V	I	I	I	I	I	I	I	I
52	52	CDR-H2	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
52A	53	CDR-H2	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
52B		CDR-H2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
52C		CDR-H2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
53	54	CDR-H2	E	E	A	E	E	E	E	E	E	E
54	55	CDR-H2	N	D	N	N	N	N	N	D	D	D
55	56	CDR-H2	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
56	57	CDR-H2	D	E	N	D	D	D	D	E	E	E
57	58	CDR-H2	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
58	59	CDR-H2	V	I	K	V	V	I	I	I	V	V
59	60	CDR-H2	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
60	61	CDR-H2	D	A	D	D	D	D	D	D	D	D
61	62	CDR-H2	P	E	P	P	P	P	P	P	P	P
62	63	CDR-H2	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
63	64	CDR-H2	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
64	65	CDR-H2	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
65	66	CDR-H2	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
66	67	Fr3	K	R	K	K	R	R	R	R	R	R
67	68	Fr3	A	V	A	A	A	A	V	V	V	V
68	69	Fr3	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
69	70	Fr3	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
70	71	Fr3	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
71	72	Fr3	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

[0555]

Kabat 残基编号	线性残基编号	FR 或 CDR	小鼠 3D6 VH (SEQ ID NO:7)	IMGT#IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:25)	2RCS-VH_huFrwk (SEQ ID NO:75)	Hu3D6 VHvb1 (SEQ ID NO:76)	Hu3D6 VHvb2 (SEQ ID NO:77)	Hu3D6 VHvb3 (SEQ ID NO:78)	Hu3D6 VHvb4 (SEQ ID NO:79)	Hu3D6 VHvb5 (SEQ ID NO:80)	Hu3D6 VHvb6 (SEQ ID NO:90)	Hu3D6 VHvb7 (SEQ ID NO:91)
72	73	Fr3	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
73	74	Fr3	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
74	75	Fr3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
75	76	Fr3	S	T	S	S	T	T	T	T	T	T
76	77	Fr3	N	D	N	N	D	D	D	D	D	D
77	78	Fr3	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
78	79	Fr3	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
79	80	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
80	81	Fr3	L	M	L	L	L	M	M	M	M	M
81	82	Fr3	Q	E	Q	Q	E	E	E	E	E	E
82	83	Fr3	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
82A	84	Fr3	G	S	S	S	S	S	S	S	S	S
82B	85	Fr3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
82C	86	Fr3	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
83	87	Fr3	T	R	T	T	T	R	R	R	R	R
84	88	Fr3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
85	89	Fr3	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
86	90	Fr3	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
87	91	Fr3	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
88	92	Fr3	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
89	93	Fr3	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
90	94	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
91	95	Fr3	F	Y	Y	F	F	Y	Y	Y	F	Y
92	96	Fr3	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
93	97	Fr3	S	A	A	S	S	S	S	S	S	S
94	98	Fr3	T	T	S	T	T	T	T	T	T	T

[0556]

Kabat 残基编号	线性残基编号	FR 或 CDR	小鼠 3D6 VH (SEQ ID NO:7)	IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:25)	2RCS-VH_huFrwk (SEQ ID NO:75)	Hu3D6 VHvb1 (SEQ ID NO:76)	Hu3D6 VHvb2 (SEQ ID NO:77)	Hu3D6 VHvb3 (SEQ ID NO:78)	Hu3D6 VHvb4 (SEQ ID NO:79)	Hu3D6 VHvb5 (SEQ ID NO:80)	Hu3D6 VHvb6 (SEQ ID NO:90)	Hu3D6 VHvb7 (SEQ ID NO:91)
95	99	CDR-H3	L		Y	L	L	L	L	L	L	L
96		CDR-H3	-		Y	-	-	-	-	-	-	-
97		CDR-H3	-		G	-	-	-	-	-	-	-
98		CDR-H3	-		-	-	-	-	-	-	-	-
99		CDR-H3	-		-	-	-	-	-	-	-	-
100		CDR-H3	-		-	-	-	-	-	-	-	-
100 A		CDR-H3	-		-	-	-	-	-	-	-	-
100 B		CDR-H3	-		-	-	-	-	-	-	-	-
100 C		CDR-H3	-		-	-	-	-	-	-	-	-
100 D		CDR-H3	-		-	-	-	-	-	-	-	-
100 E		CDR-H3	-		-	-	-	-	-	-	-	-
100F		CDR-H3	-		-	-	-	-	-	-	-	-
100 G		CDR-H3	-		-	-	-	-	-	-	-	-
100 H		CDR-H3	-			-	-	-	-	-	-	-
100I		CDR-H3	-			-	-	-	-	-	-	-
100J		CDR-H3	-			-	-	-	-	-	-	-
100 K		CDR-H3	-			-	-	-	-	-	-	-
101	100	CDR-H3	D	Q	I	D	D	D	D	D	D	D
102	101	CDR-H3	F	H	Y	F	F	F	F	F	F	F
103	102	Fr4	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
104	103	Fr4	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G

[0557]

Kabat 残基编号	线性残基编号	FR 或 CDR	小鼠 3D6 VH (SEQ ID NO:7)	IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:25)	2RCS-VH_huFrwk (SEQ ID NO:75)	Hu3D6 VHvb1 (SEQ ID NO:76)	Hu3D6 VHvb2 (SEQ ID NO:77)	Hu3D6 VHvb3 (SEQ ID NO:78)	Hu3D6 VHvb4 (SEQ ID NO:79)	Hu3D6 VHvb5 (SEQ ID NO:80)	Hu3D6 VHvb6 (SEQ ID NO:90)	Hu3D6 VHvb7 (SEQ ID NO:91)
105	104	Fr4	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
106	105	Fr4	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
107	106	Fr4	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
108	107	Fr4	T	L	T	T	L	L	L	L	L	L
109	108	Fr4	L	V	L	L	V	V	V	V	V	V
110	109	Fr4	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
111	110	Fr4	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
112	111	Fr4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
113	112	Fr4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

[0558] 表4

[0559]

Kabat 残基编号	线性残基编号	FR 或 CDR	小鼠 VL 3D6 (SEQ ID NO:11)	ARX71335-VL_huFrw _k (SEQ ID NO:82)	IMGT#IGKV2-30*02 (SEQ ID NO:27)	Hu3D6VLvb1 (SEQ ID NO:83)	Hu3D6VLvb2 (SEQ ID NO:84)	Hu3D6VLvb3 (SEQ ID NO:85)
1	1	Fr1	D	D	D	D	D	D
2	2	Fr1	V	V	V	V	V	V
3	3	Fr1	V	V	V	V	V	V
4	4	Fr1	M	M	M	M	M	M
5	5	Fr1	T	T	T	T	T	T
6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q	Q
7	7	Fr1	T	T	S	T	S	S
8	8	Fr1	P	P	P	P	P	P
9	9	Fr1	L	L	L	L	L	L
10	10	Fr1	T	T	S	T	S	S
11	11	Fr1	L	L	L	L	L	L
12	12	Fr1	S	S	P	S	S	S
13	13	Fr1	V	V	V	V	V	V
14	14	Fr1	T	T	T	T	T	T
15	15	Fr1	I	I	L	I	L	L
16	16	Fr1	G	G	G	G	G	G
17	17	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q	E
18	18	Fr1	P	P	P	P	P	P
19	19	Fr1	A	A	A	A	A	A
20	20	Fr1	S	S	S	S	S	S
21	21	Fr1	I	I	I	I	I	I
22	22	Fr1	S	S	S	S	S	S
23	23	Fr1	C	C	C	C	C	C
24	24	CDR-L1	K	K	R	K	K	R
25	25	CDR-L1	S	S	S	S	S	S

[0560]

Kabat 残基编号	线性残基编号	FR 或 CDR	小鼠 VL3D6 (SEQ ID NO:11)	ARX71335-VL_huFrw _k (SEQ ID NO:82)	IMGT#IGKV2-30*02 (SEQ ID NO:27)	Hu3D6VLvb1 (SEQ ID NO:83)	Hu3D6VLvb2 (SEQ ID NO:84)	Hu3D6VLvb3 (SEQ ID NO:85)
26	26	CDR-L1	S	S	S	S	S	S
27	27	CDR-L1	Q	Q	Q	Q	Q	Q
27A	28	CDR-L1	S	S	S	S	S	S
27B	29	CDR-L1	L	L	L	L	L	L
27C	30	CDR-L1	L	L	V	L	L	L
27D	31	CDR-L1	D	Y	H	D	D	D
27E	32	CDR-L1	S	S	S	S	S	S
27F		CDR-L1	-					
28	33	CDR-L1	D	N	D	D	D	D
29	34	CDR-L1	G	G	G	G	G	G
30	35	CDR-L1	K	K	N	K	K	K
31	36	CDR-L1	T	T	T	T	T	T
32	37	CDR-L1	Y	Y	Y	Y	Y	Y
33	38	CDR-L1	L	L	L	L	L	L
34	39	CDR-L1	N	N	N	N	N	N
35	40	Fr2	W	W	W	W	W	W
36	41	Fr2	L	L	F	L	L	L
37	42	Fr2	L	L	Q	L	L	Q
38	43	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q	Q
39	44	Fr2	R	R	R	R	R	R
40	45	Fr2	P	P	P	P	P	P
41	46	Fr2	G	G	G	G	G	G
42	47	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q	Q
43	48	Fr2	S	S	S	S	S	S
44	49	Fr2	P	P	P	P	P	P
45	50	Fr2	K	K	R	K	K	R
46	51	Fr2	R	R	R	R	R	R

[0561]

Kabat 残基编号	线性残基编号	FR 或 CDR	小鼠 VL3D6 (SEQ ID NO:11)	ARX71335-VL_huFrw _k (SEQ ID NO:82)	IMGT#IGKV2-30*02 (SEQ ID NO:27)	Hu3D6VLvb1 (SEQ ID NO:83)	Hu3D6VLvb2 (SEQ ID NO:84)	Hu3D6VLvb3 (SEQ ID NO:85)
47	52	Fr2	L	L	L	L	L	L
48	53	Fr2	I	I	I	I	I	I
49	54	Fr2	Y	Y	Y	Y	Y	Y
50	55	CDR-L2	L	L	K	L	L	L
51	56	CDR-L2	V	V	V	V	V	V
52	57	CDR-L2	S	S	S	S	S	S
53	58	CDR-L2	K	K	N	K	K	K
54	59	CDR-L2	L	L	R	L	L	L
55	60	CDR-L2	D	D	D	D	D	D
56	61	CDR-L2	S	S	S	S	S	S
57	62	Fr3	G	G	G	G	G	G
58	63	Fr3	V	V	V	V	V	V
59	64	Fr3	P	P	P	P	P	P
60	65	Fr3	D	D	D	D	D	D
61	66	Fr3	R	R	R	R	R	R
62	67	Fr3	F	F	F	F	F	F
63	68	Fr3	T	S	S	S	S	S
64	69	Fr3	G	G	G	G	G	G
65	70	Fr3	S	S	S	S	S	S
66	71	Fr3	G	G	G	G	G	G
67	72	Fr3	S	S	S	S	S	S
68	73	Fr3	G	G	G	G	G	G
69	74	Fr3	T	T	T	T	T	T
70	75	Fr3	D	D	D	D	D	D
71	76	Fr3	F	F	F	F	F	F
72	77	Fr3	T	T	T	T	T	T
73	78	Fr3	L	L	L	L	L	L

[0562]

Kabat 残基编号	线性残基编号	FR 或 CDR	小鼠 VL3D6 (SEQ ID NO:11)	ARX71335-VL_huFrw _k (SEQ ID NO:82)	IMGT#IGKV2-30*02 (SEQ ID NO:27)	Hu3D6VLvb1 (SEQ ID NO:83)	Hu3D6VLvb2 (SEQ ID NO:84)	Hu3D6VLvb3 (SEQ ID NO:85)
74	79	Fr3	K	K	K	K	K	K
75	80	Fr3	I	I	I	I	I	I
76	81	Fr3	S	S	S	S	S	S
77	82	Fr3	R	R	R	R	R	R
78	83	Fr3	V	V	V	V	V	V
79	84	Fr3	E	E	E	E	E	E
80	85	Fr3	A	A	A	A	A	A
81	86	Fr3	E	E	E	E	E	E
82	87	Fr3	D	D	D	D	D	D
83	88	Fr3	L	L	V	L	V	V
84	89	Fr3	G	G	G	G	G	G
85	90	Fr3	V	V	V	V	V	V
86	91	Fr3	Y	H	Y	H	Y	Y
87	92	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y
88	93	Fr3	C	C	C	C	C	C
89	94	CDR-L3	W	E	M	W	W	W
90	95	CDR-L3	Q	Q	Q	Q	Q	Q
91	96	CDR-L3	G	G	G	G	G	G
92	97	CDR-L3	T	T	T	T	T	T
93	98	CDR-L3	H	H	H	H	H	H
94	99	CDR-L3	F	F	W	F	F	F
95	100	CDR-L3	P	P	P	P	P	P
95A		CDR-L3	-	-	-	-	-	-
95B		CDR-L3	-	-	-	-	-	-
95C		CDR-L3	-	-	-	-	-	-
95D		CDR-L3	-	-	-	-	-	-
95E		CDR-L3	-	-	-	-	-	-

[0563]

Kabat 残基编号	线性残基编号	FR 或 CDR	小鼠 VL 3D6 (SEQ ID NO:11)	ARX71335-VL_huFrwk (SEQ ID NO:82)	IMGT#IGKV2-30*02 (SEQ ID NO:27)	Hu3D6VLvb1 (SEQ ID NO:83)	Hu3D6VLvb2 (SEQ ID NO:84)	Hu3D6VLvb3 (SEQ ID NO:85)
95F		CDR-L3	-	-	-	-	-	-
96	101	CDR-L3	Y	L	Y	Y	Y	Y
97	102	CDR-L3	T	T	T	T	T	T
98	103	Fr4	F	F	F	F	F	F
99	104	Fr4	G	G	G	G	G	G
100	105	Fr4	G	A	Q	A	A	Q
101	106	Fr4	G	G	G	G	G	G
102	107	Fr4	T	T	T	T	T	T
103	108	Fr4	K	K	K	K	K	K
104	109	Fr4	L	L	L	L	L	L
105	110	Fr4	E	E	E	E	E	E
106	111	Fr4	I	L	I	L	I	I
106 A	112	Fr4	K	K	K	K	K	K

[0564] 表5: 人源化3D6的V_H、V_L回复突变和其他突变

[0565]

V _H 或 V _L 变体	V _H 或 V _L 外显子受体序列	受体框架(或 CDR)残基的变化(基于 Kabat/Chothia 复合物 CDR)
Hu3D6VHvb1 (SEQ ID NO:76)	PDB ID 2RCS-VH_huFrwk (SEQ ID NO:75) IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25)	H91、H93、H94

[0566]

Hu3D6VHvb2 (SEQ ID NO:77)	PDB ID 2RCS-VH_huFrwk (SEQ ID NO:75) IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ (ID NO: 25)	H1、H5、H11、H20、 H23、H38、H42、H43、 H66、H67、H75、H76、 H81、H91、H93、H94
Hu3D6VHvb3 (SEQ ID NO:78)	PDB ID 2RCS-VH_huFrwk (SEQ ID NO:75) IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ (ID NO: 25)	H1、H5、H11、H17、 H20、H23、H38、H42、 H43、H58、H66、H67、 H75、H76、H80、H81、 H83、H93、H94、H108、 H109
Hu3D6VHvb4 (SEQ ID NO:79)	PDB ID 2RCS-VH_huFrwk (SEQ ID NO:75) IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ (ID NO: 25)	H1、H5、H11、H17、 H20、H23、H28、H38、 H42、H43、H58、H66、 H67、H75、H76、H80、 H81、H83、H93、H94、 H108、H109
Hu3D6VHvb5 (SEQ ID NO:80)	PDB ID 2RCS-VH_huFrwk (SEQ ID NO:75) IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ (ID NO: 25)	H1、H5、H11、H17、 H20、H23、H28、H38、 H42、H43、H54、H56、 H58、H66、H67、H75、 H76、H80、H81、H83、 H93、H94、H108、H109
Hu3D6 VHvb6 (SEQ ID NO:90)	PDB ID 2RCS-VH_huFrwk (SEQ ID NO:75) IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ (ID NO: 25)	H1、H5、H11、H17、 H20、H23、H28、H38、 H42、H43、H54、H56、 H66、H67、H75、H76、 H80、H81、H83、H91、 H93、H94、H108、H109
Hu3D6 VHvb7 (SEQ ID NO:91)	PDB ID 2RCS-VH_huFrwk (SEQ ID NO:75) IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ (ID NO: 25)	H1、H5、H11、H17、 H20、H23、H28、H38、 H42、H43、H54、H56、 H66、H67、H75、H76、 H80、H81、H83、H93、 H94、H108、H109

[0567]

Hu3D6VLvb1 (SEQ ID NO:83)	PDB ID ARX71335-VL_huFrwk (SEQ ID NO:82); IMGT#IGKV2-30*02 (SEQ (ID NO: 27)	
Hu3D6VLvb2 (SEQ ID NO:84)	PDB ID ARX71335-VL_huFrwk (SEQ ID NO:82); IMGT#IGKV2-30*02 (SEQ (ID NO: 27)	L7、L10、L15、L83、 L86、L106
Hu3D6VLvb3 (SEQ ID NO:85)	PDB ID ARX71335-VL_huFrwk (SEQ ID NO:82); IMGT#IGKV2-30*02 (SEQ (ID NO: 27)	L7、L10、L15、L17、 L24、L37、L45、L83、 L86、L100、L106

[0568] 表6:人源化3D6抗体的重链中的回复突变和其他突变的框架(或CDR)残基(基于Kabat/Chothia复合物CDR)的Kabat编号

[0569]

残基	2RCS-VH_huFrwk (SEQ ID NO:75)	(重链)IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:25)	小鼠 3D6 (SEQ ID NO:7)	Hu3D6 VHvb1 (SEQ ID NO:76)	Hu3D6 VHvb2 (SEQ ID NO:77)	Hu3D6 VHvb3 (SEQ ID NO:78)	Hu3D6 VHvb4 (SEQ ID NO:79)	Hu3D6 VHvb5 (SEQ ID NO:80)	Hu3D6 VHvb6 (SEQ ID NO:90)	Hu3D6 VHvb7 (SEQ ID NO:91)
H1	Q	E	E	Q	E	E	E	E	E	E
H5	Q	V	Q	Q	V	V	V	V	V	V
H11	L	V	L	L	V	V	V	V	V	V
H17	S	T	L	S	S	T	T	T	T	T
H20	L	I	L	L	I	I	I	I	I	I
H23	T	K	K	T	K	K	K	K	K	K
H28	N	T	N	N	N	N	T	T	T	T
H38	K	Q	R	K	R	R	R	R	R	R
H42	E	G	E	E	G	G	G	G	G	G
H43	Q	K	Q	Q	K	K	K	K	K	K
H54	N	D	N	N	N	N	N	D	D	D
H56	N	E	D	D	D	D	D	E	E	E
H58	K	I	V	V	V	I	I	I	V	V
H66	K	R	K	K	R	R	R	R	R	R
H67	A	V	A	A	A	A	V	V	V	V

[0570]

残基	2RCS-VH_huFrwk (SEQ ID NO:75)	(重链)IMGT#IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:25)	小鼠 3D6 (SEQ ID NO:7)	Hu3D6 VHvb1 (SEQ ID NO:76)	Hu3D6 VHvb2 (SEQ ID NO:77)	Hu3D6 VHvb3 (SEQ ID NO:78)	Hu3D6 VHvb4 (SEQ ID NO:79)	Hu3D6 VHvb5 (SEQ ID NO:80)	Hu3D6 VHvb6 (SEQ ID NO:90)	Hu3D6 VHvb7 (SEQ ID NO:91)
H75	S	T	S	S	T	T	T	T	T	T
H76	N	D	N	N	D	D	D	D	D	D
H80	L	M	L	L	L	M	M	M	M	M
H81	Q	E	Q	Q	E	E	E	E	E	E
H83	T	R	T	T	T	R	R	R	R	R
H91	Y	Y	F	F	F	Y	Y	Y	F	Y
H93	A	A	S	S	S	S	S	S	S	S
H94	S	T	T	T	T	T	T	T	T	T
H108	T	L	T	T	L	L	L	L	L	L
H109	L	V	L	L	V	V	V	V	V	V

[0571] 表7:人源化3D6抗体的轻链中的回复突变和其他突变的框架残基(基于Kabat/Chothia复合物CDR)的Kabat编号

[0572]

残基	<u>ARX71335-VL_huFrwk (SEQ ID NO:82)</u>	<u>(轻链) IMGT#IGKV2-30*02 (SEQ ID NO:27)</u>	<u>小鼠 3D6 (SEQ ID NO:11)</u>	<u>Hu3D6VLvb1 (SEQ ID NO:83)</u>	<u>Hu3D6VLvb2 (SEQ ID NO:84)</u>	<u>Hu3D6VLvb3 (SEQ ID NO:85)</u>
<u>L7</u>	<u>T</u>	<u>S</u>	<u>T</u>	<u>T</u>	<u>S</u>	<u>S</u>
<u>L10</u>	<u>T</u>	<u>S</u>	<u>T</u>	<u>T</u>	<u>S</u>	<u>S</u>
<u>L15</u>	<u>I</u>	<u>L</u>	<u>I</u>	<u>I</u>	<u>L</u>	<u>L</u>
<u>L17</u>	<u>Q</u>	<u>Q</u>	<u>Q</u>	<u>Q</u>	<u>Q</u>	<u>E</u>
<u>L24</u>	<u>K</u>	<u>R</u>	<u>K</u>	<u>K</u>	<u>K</u>	<u>R</u>
<u>L37</u>	<u>L</u>	<u>Q</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>Q</u>
<u>L45</u>	<u>K</u>	<u>R</u>	<u>K</u>	<u>K</u>	<u>K</u>	<u>R</u>

[0573]

<u>残基</u>	<u>ARX71335-VL huFrwk (SEQ ID NO:82)</u>	<u>(轻链) IMGT#IGKV2-30*02 (SEQ ID NO:27)</u>	<u>小鼠 3D6 (SEQ ID NO:11)</u>	<u>Hu3D6VLvb1 (SEQ ID NO:83)</u>	<u>Hu3D6VLvb2 (SEQ ID NO:84)</u>	<u>Hu3D6VLvb3 (SEQ ID NO:85)</u>
<u>L83</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	<u>V</u>
<u>L86</u>	<u>H</u>	<u>Y</u>	<u>Y</u>	<u>H</u>	<u>Y</u>	<u>Y</u>
<u>L100</u>	<u>A</u>	<u>Q</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>Q</u>
<u>L106</u>	<u>L</u>	<u>I</u>	<u>I</u>	<u>L</u>	<u>I</u>	<u>I</u>

[0574] 在小鼠与人受体序列之间规范、微调或界面残基不同的位置是取代候选。规范/CDR相互作用残基的实例包括表3中的Kabat残基H54和H94。微调残基的实例包括表3中的Kabat残基H28、H67、H93和H94。界面/堆积 (VH+VL) 残基的实例包括表3中的Kabat残基H91和H93。

[0575] 选择重链可变区中表3所示位置作为取代候选的理由如下。

[0576] 重链可变区

[0577] hu3D6VHvb1

[0578] -由接枝到48G7-VH (RCS-VH) 的框架上的3D6-VH的CDR-H1、H2和H3环组成,在位置H91 (Y91F)、H93 (A93S) 和H94 (S94T) 处具有回复突变。

[0579] hu3D6VHvb2

[0580] -在下述位置处恢复所有框架取代:这些位置是用于限定Chothia规范类别的关键位置,是微调区的一部分,或者定位于VH/VL结构域界面或有助于结构稳定性。3D6-VH_vb2结合了回复突变或取代Q1E、Q5V、L11V、L20I、T23K、K38R、E42G、Q43K、K66R、S75T、N76D、Q81E、Y91F、A93S、S94T T108L和L109V,以便能够评估这些位置对抗原结合亲和力和免疫原性的贡献。

[0581] hu3D6VHvb3、hu3D6VHvb4、hu3D6VHvb5、hu3D6VHvb6和hu3D6VHvb7

[0582] 由另外的取代组成,并且增加抗体稳定性以及/或者用于优化糖基化、聚集、N末端异质性、热稳定性、表面暴露的带电斑块、表面暴露的电荷贴片、脱氨基作用和蛋白酶敏感性。

[0583] Q1E:是稳定性增强突变,用于降低形成焦谷氨酸的可能性 (Liu,出处同上)

[0584] Q5V:是基于频率的种系对齐突变。Val在人序列中在该位置处最常见。Val在人种系基因IMGT#IGHV1-69-2*01 (SEQ (ID NO:25) 中处于该位置处。

[0585] L11V:是种系对齐突变。Val在人种系基因IMGT#IGHV1-69-2*01 (SEQ (ID NO:25) 中处于该位置处。

[0586] S17T:是种系对齐突变。Thr在人种系基因IMGT#IGHV1-69-2*01 (SEQ (ID NO:25) 中处于该位置处。

[0587] L20I:是种系对齐突变。Ile在人种系基因IMGT#IGHV1-69-2*01 (SEQ (ID NO:25) 中处于该位置处。

[0588] T23K:是基于频率的种系对齐突变。Lys较频繁地处于该位置处。Lys在人种系基因IMGT#IGHV1-69-2*01 (SEQ (ID NO:25) 中处于该位置处。

[0589] N28T:这是CDR-H1的针对Thr的残基取代。

[0590] K38R:是基于频率的回复突变。Arg最频繁地处于该位置处。预测该位置处的Arg除了与重链中的Asp86和Tyr 90各形成一个H键外,还与Glu 46形成两个H键;因此,Arg取代可以增强该位置处的Lys上的稳定性。

[0591] E42G:是基于频率的种系对齐突变。Gly在人种系基因IMGT#IGHV1-69-2*01 (SEQ (ID NO:25) 中处于该位置处。Gly最频繁地处于该位置处。预测Gly取代不会影响稳定性。

[0592] Q43K:除了主链与Gln 39和Arg 40形成H键之外,预测该位置处的Lys侧链还与G42形成H键,由此Lys取代可以增强该位置处的Q上的稳定性。

[0593] N54D和D56E是CDR残基的取代,根据同源模型预测其为非抗原接触位置。预测N54D取代和D56E取代会稳定抗体结构。

[0594] V58I:是CDR-H2残基的取代物。种系基因IMGT#IGHV1-69-2*01 (SEQ (ID NO:25) 在该位置处具有Ile。预测该残基不接触抗原。

[0595] K66R:预测该位置处的Arg除了与Asp 86形成H键和盐桥外,还与Ser 82a和Thr 83形成H键。

[0596] A67V:是微调区残基的取代物。种系基因IMGT#IGHV1-69-2*01 (SEQ (ID NO:25) 在该位置处具有Val。

[0597] S75T:预测该位置处的Ser与Asp 72和Tyr 76形成H键。预测该位置处的Thr也可以发生这些接触,但是表面暴露的残基Thr可以增强抗体稳定性。

[0598] N76D:Asp是种系对齐突变。Asp在人种系基因IMGT#IGHV1-69-2*01 (SEQ (ID NO:25) 中处于该位置处。

[0599] L80M:Met是种系对齐突变。Met在人种系基因IMGT#IGHV1-69-2*01 (SEQ (ID NO:25) 中处于该位置处。

[0600] Q81E:预测Glu会与K19形成H键加盐桥,因此该位置处的Glu可增强抗体稳定性。

[0601] T83R用于增强热稳定性并且用于增加人源性。Arg是种系对齐突变。Arg在人种系基因IMGT#IGHV1-69-2*01 (SEQ (ID NO:25) 中处于该位置处。Arg最频繁地处于该位置处。

[0602] F91Y:是界面残基的突变,并且是基于频率的回复突变。Tyr通常处于该位置处,并且可以增强抗体稳定性。

[0603] A93S:是微调区残基和界面区残基的回复突变。

[0604] S94T:是Chothia定义的规范结构残基和微调残基的回复突变。

[0605] T108L:Leu是种系对齐突变。Leu在人种系基因IMGT#IGHV1-69-2*01 (SEQ (ID NO:25) 中处于该位置处。预测该位置处的Leu使抗体的免疫原性降低,并且对抗体的稳定性没有影响。

[0606] L109V:是基于频率的突变。Val最频繁地处于该位置处。

- [0607] 选择轻链可变区中表4所示位置作为取代候选的理由如下。
- [0608] κ轻链可变区
- [0609] hu3D6VLvb1
- [0610] -由接枝到ARX71335 VL框架上的3D6-VL的CDR-L1、L2和L3环组成。
- [0611] hu3D6VLvb2和hu3D6VLvb3
- [0612] -在下述位置处恢复所有框架取代:这些位置是用于限定Chothia规范类别的关键位置,是微调区的一部分,或者定位于VH/VL结构域界面。Hu3D6-VLvb2和Hu3D6-VLvb3还包括有助于结构稳定性的取代hu3D6-VL_vb2结合了回复突变T7S、I15L、L83V、H86Y和L106I,以便能够评估这些位置对抗原结合亲和力和免疫原性的贡献。
- [0613] Hu3D6-VL_vb3针对vb2提及的所有取代,连同Q17E、K24R、L37Q、K45R和L106I处的附加变化
- [0614] T7S:是种系对齐突变。Ser在人种系基因IGKV2-30*02 (SEQ (ID NO:27) 中处于该位置处。
- [0615] T10S:是基于频率的种系对齐突变。Ser频繁地处于该位置处。Ser在人种系基因IGKV2-30*02 (SEQ (ID NO:27) 中处于该位置处。
- [0616] I15L:是种系对齐突变。Leu在人种系基因IGKV2-30*02 (SEQ (ID NO:27) 中处于该位置处。
- [0617] Q17E:预测该位置处的Glu与T14形成H键并且与Lys 107、两个轻链残基形成盐桥,并且用于提高抗体稳定性。
- [0618] K24R:是CDR残基的突变。预测Lys和Arg都与轻链中的Asp 70形成H键和盐桥。预测Arg在该构象中更加适合。Arg也是种系对齐突变。Arg在人种系基因IGKV2-30*02 (SEQ (ID NO:27) 中处于该位置处。
- [0619] L37Q:预测这是深埋的残基,预测Leu不与周围的残基相互作用,然而,预测Gln与轻链中的Q38和Asp 82形成H键。Gln也是种系对齐突变。Gln在人种系基因IGKV2-30*02 (SEQ (ID NO:27) 中处于该位置处。
- [0620] K45R:但是,预测Lys与S56和Gly 57形成H键;预测Arg与相邻残基的相互作用范围大得多,因为预测它与D55形成盐桥、与Arg46形成H键,并且与S56形成双H键。Arg也是种系对齐突变。Arg在人种系基因IGKV2-30*02 (SEQ (ID NO:27) 中处于该位置处。
- [0621] L83V:这是预测表面暴露的残基的基于频率的突变。Val也是种系对齐突变。Val在人种系基因IGKV2-30*02 (SEQ (ID NO:27) 中处于该位置处。
- [0622] H86Y:鼠3D6 VL在该位置处具有Tyr。Tyr也是最频繁地处于该位置处的残基。
- [0623] A100Q:ALA在该位置处很少见。预测Ala是表面暴露的残基,并且预测其不与周围的残基相互作用。Gln最频繁地处于该位置处,并且也是种系对齐突变。Gln在人种系基因IGKV2-30*02 (SEQ (ID NO:27) 中处于该位置处。预测Gln与Ser 7形成H键,从而稳定链内部。
- [0624] L106I:是基于频率的种系对齐突变。Ile最频繁地处于该位置处。Ile在人种系基因IGKV2-30*02 (SEQ (ID NO:27) 中处于该位置处。
- [0625] 基于这些人框架的设计是:
- [0626] 重链可变区
- [0627] >hu3D6VHvb1 (SEQ ID NO:76)

- [0628] QVQLQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDYLLHWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDT
VYDPKFQKGKATITADTSSNTAYLQSLTSEDNAVYFCSTLDFWGQGTTLTVSS
- [0629] >hu3D6VHvb2 (SEQ ID NO:77)
- [0630] EVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGFNIKDYLLHWVRQRPKGLEWIGWIDPENGDT
VYDPKFQGRATITADTSTDYALELSSLTSEDNAVYFCSTLDFWGQGTTLTVSS
- [0631] >hu3D6VHvb3 (SEQ ID NO:78)
- [0632] EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFNIKDYLLHWVRQRPKGLEWIGWIDPENGDTI
YDPKFQGRATITADTSTDYAMELSSLRSEDNAVYYCSTLDFWGQGTTLTVSS
- [0633] hu3D6VHvb4 (SEQ ID NO:79)
- [0634] EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFTIKDYLLHWVRQRPKGLEWIGWIDPENGDTI
YDPKFQGRVTITADTSTDYAMELSSLRSEDNAVYYCSTLDFWGQGTTLTVSS
- [0635] >hu3D6VHvb5 (SEQ ID NO:80)
- [0636] EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFTIKDYLLHWVRQRPKGLEWIGWIDPEDGETI
YDPKFQGRVTITADTSTDYAMELSSLRSEDNAVYYCSTLDFWGQGTTLTVSS
- [0637] >hu3D6VHvb6 (SEQ ID NO:90)
- [0638] EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFTIKDYLLHWVRQRPKGLEWIGWIDPEDGET
VYDPKFQGRVTITADTSTDYAMELSSLRSEDNAVYFCSTLDFWGQGTTLTVSS
- [0639] >hu3D6VHvb7 (SEQ ID NO:91)
- [0640] EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFTIKDYLLHWVRQRPKGLEWIGWIDPEDGET
VYDPKFQGRVTITADTSTDYAMELSSLRSEDNAVYYCSTLDFWGQGTTLTVSS
- [0641] κ轻链可变区
- [0642] hu3D6VLvb1 (SEQ ID NO:83)
- [0643] DVVMTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLDSGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLVSKLD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVHYCWQGTHFPYTFGAGTKLELK
- [0644] >hu3D6VLvb2 (SEQ ID NO:84)
- [0645] DVVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSSQSLLDSGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLVSKLD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGAGTKLEIK
- [0646] >hu3D6VLvb3 (SEQ ID NO:85)
- [0647] DVVMTQSPLSLSVTLGEPASISCRSSQSLLDSGKTYLNWLQRPQGSPRRLIYLVSKLD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGQGTLEIK
- [0648] 使用两阶段PCR方案生成人源化序列,其允许使用QuikChange定点诱变引入多个突变、缺失和插入[Wang,W.和Malcolm,B.A.(1999)BioTechniques 26:680-682)。
- [0649] 实施例4.小鼠单克隆抗体在ELISA测定中结合tau
- [0650] 方法:间接ELISA:96孔聚苯乙烯平板用悬浮于1xPBS中的捕获抗体抗-6xHis(图4A)或多克隆抗-tau(Dako#A0024,图4B)包被,在室温下持续2hr或在4℃下持续16hr。移除包被,将平板用在1xPBS中的1%BSA封闭1hr,然后与人重组tau一起孵育,其中在该蛋白质的N末端具有(图4A)或不具有(图4B)聚组氨酸标签。洗涤后,将平板与指示抗体一起孵育、洗涤、并与HRP缀合的山羊抗小鼠二抗一起孵育。用TMB使平板显色,并且用读板机测量 A_{450} 。

[0651] 夹心ELISA:96孔聚苯乙烯平板用在1xPBS中的抗小鼠抗体包被,在室温下持续2hr或在4℃下持续16hr。移除包被,并且将平板用在1xPBS中的1%BSA封闭1hr。接着将平板与稀释于在1xPBS中的0.1% BSA中的相同浓度的指示抗体一起孵育。依次用人tau、多克隆兔抗-tau (Dako#A0024) 和HRP-缀合的山羊抗兔抗体(均稀释于在PBS中的0.1% BSA中)对平板进行处理,其中每个步骤之间存在洗涤。添加链霉抗生物素蛋白-HRP,用TMB使平板显色,并且用读板机测量 A_{450} 。参见图4C。

[0652] 结果:通过多种不同的ELISA形式测定一组杂交瘤产生的抗体与tau的结合。使用间接形式,使用通过其N末端融合的聚组氨酸标签固定的tau蛋白确认tau的检测(图4A)。还确认了与天然的不带标签蛋白的结合(图4B)。为了评估各种抗体的溶液亲和力,使用了夹心ELISA形式,其中使用所测试的杂交瘤抗体作为捕获试剂(图4C)。

[0653] 实施例5.小鼠单克隆抗体与tau的亲和力

[0654] 方法:使用Biacore T200进行SPR分析以确定鼠抗体与重组人tau的结合动力学。为了制备传感器表面,通过胺偶联将抗小鼠抗体(GE Life Sciences)固定在传感器芯片CM5上,并且以一定的水平捕获抗体以确保50RU的最大结合。在运行缓冲液(HBS+0.05%P-20,1mg/mL BSA)中,使在10-0.14nM范围内的各种浓度的重组tau以50 μ L/min的流速经过捕获配体,持续180sec缔合和900sec解离。数据双重参考不含抗体配体的不相关传感器和0nM分析物浓度,以考虑到配体与捕获部分的解离。然后使用全局1:1拟合对数据进行分析。

[0655] 结果:基于它们在一连串ELISA测定中的表现选择多种鼠抗体,并通过SPR评估它们的结合亲和力。以平行组测试抗体,并比较它们的结合缔合和解离速率,以选择重组人tau的最高结合物。在抗体克隆3D6中观察到最高的结合亲和力。结合亲和力在图5中示出。

[0656] 实施例6.小鼠单克隆抗体阻止人tau与永生化神经元细胞表面的结合

[0657] 方法:用抗-Tau单克隆抗体抑制Tau与B103神经母细胞瘤细胞的结合

[0658] 1.将B103细胞以 5×10^5 个细胞/mL重悬于PBS中。在MSD High Bind平板中每孔50 μ L细胞悬浮液涂板。这得到25K细胞/孔。盖上平板并且使细胞在37℃、5% CO₂下附着2hr。

[0659] 2.细胞附着后,通过翻转平板并轻轻敲打来从孔中移除PBS,以移除过量的缓冲液。向每个孔中添加50 μ L的在PBS中的3% MSD Blocker A或其他合适的封闭缓冲液,并且伴随振荡将平板在室温下孵育1hr。

[0660] 3.在平板封闭步骤期间,如下共同孵育Tau和抗-Tau抗体:

[0661] a.以2mg/mL的抗-Tau抗体开始,并且在PBS中1:2连续稀释,以得到7份另外的稀释液。

[0662] b.将Tau在PBS中稀释至20nM。每个孔中的Tau浓度将保持恒定。

[0663] c.将Tau和抗-Tau抗体1:1混合,以得到10nM的最终Tau浓度和1mg/mL的抗-Tau起始浓度。

[0664] d.伴随振荡(600rpm)将混合物在室温下孵育大约1h。

[0665] 4.在平板封闭(步骤2)之后,通过将平板倒置并且轻轻敲打来从孔中移除封闭缓冲液,并且使用多通道移液管用PBS将平板洗涤2次。确保过量的缓冲液被完全移除。将接种细胞冷却至4℃,然后添加Tau:抗-Tau复合物。

[0666] 5.将50 μ L冷却复合物(步骤3)添加到接种细胞中并在冰上孵育30分钟。

[0667] 6.如先前所述用冰冷的PBS将平板洗涤2次。

[0668] 7. 每个孔中添加50 μ L的16B5.SULFO-TAG,以用于检测细胞表面结合的Tau。在冰上孵育30分钟。

[0669] 8. 再次如先前所述用冰冷的PBS将平板洗涤2次。

[0670] 9. 每个孔中添加150 μ L不含表面活性剂的1X读数缓冲液T(1XRead Buffer T Without Surfactant)(稀释于H₂O中)并且立即在MSD SECTOR™600仪器上读数。添加读取缓冲液时避免引入气泡。

[0671] 10. 报告MSD信号与抗-Tau的浓度之间的关系。

[0672] 所测试的抗体为抗-tau抗体3D6、16G7、3H9、4C5和5G8,以及同种型对照。

[0673] 结果:

[0674] 随着测试抗体的逐渐增加而发生的SulfoTag抗-tau信号的逐渐减少表明tau与神经元细胞表面的结合的功能性阻断。在同种型对照、16G7或3H9中未观察到阻断。在4C5、5G8和3D6中观察到逐渐增加的量的功能性阻断活性。3D6展示出所测试抗体的最深阻断活性。参见图6。

[0675] 实施例7.解聚活性

[0676] 方法:重组tau的聚集—将具有N末端6xHis标签的经纯化的重组tau与等摩尔量的低分子量肝素在1xPBS(pH 7.4)中配混,并在章动器(nutator)上于37℃孵育96hr。通过与硫代黄素T的结合确认样品的聚集。

[0677] 与抗体一起孵育—将抗体与聚集的重组tau以指示的摩尔比一起孵育,在没有旋转或章动的情况下在37℃下孵育96hr。在实验结束时,通过将样品与25mM硫代黄素T一起孵育并测量发射的荧光(450/482ex/em)来测量聚集。将信号背景减除至缓冲样品。

[0678] 结果:如图7所示,3D6优先分解完整的tau原纤维。将不同摩尔比的3D6(三角形)、同种型对照(圆圈)和16G7(正方形)与含淀粉样蛋白的tau原纤维一起孵育96小时。在这一时间段结束时,通过与硫代黄素T的结合评估聚集程度。与同种型对照抗体以及16G7(结合至tau的不同区域的抗-tau抗体)相比,3D6优先降低样品中存在的硫代黄素T信号。

[0679] 实施例8.3D6和5G8免疫捕获来自人疾病组织的tau。

[0680] 方法:将高盐可溶性蛋白质级分制备成1mg/ml。对于每次免疫沉淀,使用200 μ g的样品。将10 μ g的指示抗体(同种型对照、3D6或抗-tau抗体5G8)添加到高盐样品制备物中,并孵育2hr。然后将蛋白G磁珠添加到混合物中,并且再孵育一小时以捕获抗体/抗原复合物。用1xPBS彻底洗涤样品,并将珠子在还原/变性样品缓冲液中煮沸以释放捕获的蛋白质。通过SDS-PAGE分离所得的样品,并使用多克隆抗-tau抗体(Dako, #A0024)进行蛋白质印迹。

[0681] 结果:如图8所示,3D6和5G8免疫沉淀来自阿尔茨海默病组织的tau。用指示抗体使高盐可溶性级分免疫沉淀,并使用针对tau分子的单独区域的多克隆抗-tau抗体从3D6和tau抗体A的结合位点检测。3D6从该级分强健地捕获tau。输入(高盐溶性样品)在右侧示出。

[0682] 实施例9.3D6的免疫组织化学免疫反应性

[0683] 从没有神经变性疾病或患有阿尔茨海默病的患者中获得额颞叶皮质,其在死后评估时进行确认。在轻度丙酮固定的10 μ m载玻片安装的冷冻切片上进行免疫组织化学。使用Leica消耗品,使用Leica BOND Rx自动染色机进行所有染色步骤。将3D6的鼠或人形式与组织切片一起孵育,然后添加缀合于HRP聚合物的物种适当的二抗。当在人组织上使用人源化抗体时,为了防止内源免疫球蛋白的非特异性结合,在体外用生物素缀合的抗人单价Fab片

段非共价标记抗体,然后在组织上孵育。使用抗生物素蛋白-生物素扩增系统(Vector Laboratories,Burlingame,CA)进一步扩增用一抗-生物素Fab片段复合物标记的组织。用DAB色原使染色可视化,产生褐色沉积物。阴性对照由用IgG同种型对照抗体在相邻切片上执行整个免疫组织化学程序组成。

[0684] 所测试的抗体是鼠CD6、嵌合3D6(其含有来自具有人恒定区、重链SEQ ID NO:72和轻链SEQ ID NO:73的鼠抗体的VH和VL)和人源化变体hu3D6VHv5/hu3D6VLv2。

[0685] 对用3D6的鼠、嵌合和人源化形式进行的染色进行定性比较并评估染色的强力和强度,以及免疫反应性的定位。对于3D6的嵌合和人源化形式,染色强度是相似的,并且与抗体的鼠形式相比表现出相似的定位模式。在神经原纤维缠结、原纤维、神经纤维网线和变性轴突中检测到tau。还检测到明显的神经元体细胞(soma)染色。

[0686] 实施例10.人源化变体对tau的亲合力

[0687] 方法;间接ELISA将96孔聚苯乙烯平板用悬浮于1xPBS中的人重组tau包被,在室温处持续2h或在4℃处持续16h。移除包被,并且将平板用在1xPBS中的1% BSA封闭1h。将在1xPBS中的0.1%BSA中的1μg/mL的人源化变体抗体添加至平板,持续1小时,然后洗涤,并且添加HRP缀合的山羊抗人抗体。用TMB使平板显色,并且用读板机测量A₄₅₀。

[0688] 夹心ELISA 96孔聚苯乙烯平板用在1xPBS中的抗人抗体包被,在室温处持续2小时或在4℃处持续16小时。移除包被,并且将平板用在1xPBS中的1% BSA封闭1小时。将稀释在1xPBS中的0.1%BSA中的各种浓度的人源化变体抗体添加至平板,持续1小时,然后洗涤,并且添加稀释在1xPBS中的0.1% BSA中的生物素化的重组人tau。洗涤后,添加链霉抗生物素蛋白-HRP,用TMB使平板显色,并且用读板机测量A₄₅₀。

[0689] 使用Biacore T200进行SPR分析,以确定h3D6-VHv5-L2与重组人tau的结合动力学。为了制备传感器表面,经由胺偶联将抗人抗体(GE Life Sciences)固定在传感器芯片CM5上,并且以一定的水平捕获人源化变体抗体以确保50RU的最大结合。在运行缓冲液(HBS +0.05% P-20,1mg/mL BSA)中,使在10nM至0.14nM范围内的各种浓度的重组tau以50μL/min的流速经过捕获配体,持续180s缔合和900s解离。数据双重参考不含抗体配体的不相关传感器和0nM分析物浓度,以考虑到配体与捕获部分的解离。然后使用全局1:1拟合对数据进行分析。

[0690] 实施例11hu3D6VLv2轻链可变区的免疫原性

[0691] 使用iedb.org去免疫化工具(Dhanda等人,Immunology.2018年1月;153(1):118-132)分析了hu3D6VLv2轻链可变区(SEQ ID NO:21)的氨基酸序列。表9示出了可以被选择用于将hu3D6VLv2去免疫化的肽,即,表明可以对其进行进一步取代以降低潜在免疫原性的区域。

[0692] 表9.鉴定用于去免疫化的潜在肽的免疫原性分析结果

	起始位置(线性)	停止位置(线性)	中值百分位数排名	肽
[0693]	1	15	14.845	DVVMTQSPLSLPVTL
	51	65	15.745	RLIYLVSKLDSGVPD
	46	60	18.58	GQSPRRLIYLVSKLD

[0694] 基于表9中所示的分析结果,设计了hu3D6VLv2轻链可变区的变体,其靶向表10中

加粗的氨基酸残基。每个变体都结合了以下氨基酸取代中的一种,如表11中所示。

[0695] 表10.hu3D6VLv2中的被靶向用于取代的氨基酸残基。

[0696]	hu3D6VLv2 轻链可变区的靶向残基	初始 SEQ ID NO
	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLL DSDGKTYLNWLLQRPGQSPRRLIYLVSKLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCWQGTHFPYTFGGGTKLEIK	21

[0697] 表11.hu3D6VLv2中的被设计成降低免疫原性的氨基酸取代

[0698]	线性 编号	Kabat 编号	变体名称	所得的轻链可变区的 SEQ ID NO
	L59D	L54D	hu3D6VLv2 L54D (也称为 L2-DIM21)	SEQ ID NO:93
	L59G	L54G	hu3D6VLv2 L54G (也称为 L2-DIM7)	SEQ ID NO:94
	L59N	L54N	hu3D6VLv2 L54N	SEQ ID NO:95
	L59E	L54E	hu3D6VLv2 L54E	SEQ ID NO:96
	L55E	L50E	hu3D6VLv2 L50E	SEQ ID NO:97
	L59Q	L54Q	hu3D6VLv2 L54Q	SEQ ID NO:98
	L55D	L50D	hu3D6VLv2 L50D	SEQ ID NO:99
	L59K	L54K	hu3D6VLv2 L54K	SEQ ID NO:100
	L59R	L54R	hu3D6VLv2 L54R	SEQ ID NO:101
	L59T	L54T	hu3D6VLv2 L54T	SEQ ID NO:102

[0699]

L55G	L50G	hu3D6VLv2 L50G (也称为 L2-DIM22)	SEQ ID NO:103
I53G	I48G	hu3D6VLv2 I48G	SEQ ID NO:104
I53D	I48D	hu3D6VLv2 I48D	SEQ ID NO:105
L52G	L47G	hu3D6VLv2 L47G	SEQ ID NO:106
Y54E	Y49E	hu3D6VLv2 Y49E	SEQ ID NO:107
L59V	L54V	hu3D6VLv2 L54V	SEQ ID NO:108
L59S	L54S	hu3D6VLv2 L54S	SEQ ID NO:109
S57G	S52G	hu3D6VLv2 S52G (也称为 L2-DIM9)	SEQ ID NO:110
L52N	L47N	hu3D6VLv2 L47N	SEQ ID NO:111
L52D	L47D	hu3D6VLv2 L47D	SEQ ID NO:112
L52E	L47E	hu3D6VLv2 L47E	SEQ ID NO:113
L52P	L47P	hu3D6VLv2 L47P	SEQ ID NO:114
L52T	L47T	hu3D6VLv2 L47T	SEQ ID NO:115
L52S	L47S	hu3D6VLv2 L47S	SEQ ID NO:116
L52A	L47A	hu3D6VLv2 L47A	SEQ ID NO:117
L55V	L50V	hu3D6VLv2 L50V	SEQ ID NO:118

[0700] 设计了hu3D6VLv2轻链可变区的另外的变体,如表12中所示,其在表10中突出显示的氨基酸残基中的一者或两者处结合了取代。表12中的一些变体还结合了取代L37Q(SEQ ID NO:119-135和145),或者取代L37Q和取代G100Q(SEQ ID NO:136-142)两者。

[0701] 选择轻链可变区中如表12和表13中所指示的位置L37Q和G100Q作为取代候选物的基本原理如下。

[0702] L37Q是用于增加序列的人源性的突变。Gln是种系对齐突变。Gln在人种系基因IGKV2-30*02(SEQ ID NO:27)中处于该位置处。

[0703] G100Q是用于增加序列的人源性的突变。Gln是种系对齐突变。Gln在人种系基因IGKV2-30*02(SEQ ID NO:27)中处于该位置处。

[0704] 表12:hu3D6VLv2中的被设计成降低免疫原性的氨基酸取代

[0705]

hu3D6VLv2 的另外的变体中的被设计成降低免疫原性的取代(所指示突变的 Kabat 编号)	变体名称	所得轻链可变区的 SEQ ID NO:
L37Q_L50G_L54R	hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R (也称为 L2-DIM1)	SEQ ID NO:119
L37Q_L50G_L54G	hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G (也称为 L2-DIM2)	SEQ ID NO:120
L37Q_S52G_L54G	hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54G (也称为 L2-DIM3)	SEQ ID NO:121
L37Q_S52G_L54R	hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R (也称为 L2-DIM4)	SEQ ID NO:122
L37Q_S52G_L54T	hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54T (也称为 L2-DIM5)	SEQ ID NO:123
L37Q_S52G_L54D	hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54D (也称为 L2-DIM6)	SEQ ID NO:124
L37Q_L54R	hu3D6VLv2 L37Q_L54R	SEQ ID NO:125
L37Q_L54G	hu3D6VLv2 L37Q_L54G	SEQ ID NO:126
L37Q_L54D	hu3D6VLv2 L37Q_L54D (也称为 L2-DIM12)	SEQ ID NO:127
L37Q_L50G	hu3D6VLv2 L37Q_L50G (也称为 L2-DIM13)	SEQ ID NO:128
L37Q_L50D	hu3D6VLv2 L37Q_L50D (也称为 L2-DIM14)	SEQ ID NO:129
L37Q_L54T	hu3D6VLv2 L37Q_L54T	SEQ ID NO:130
L37Q_S52G	hu3D6VLv2 L37Q_S52G	SEQ ID NO:131
L37Q_L54E	hu3D6VLv2 L37Q_L54E	SEQ ID NO:145
L37Q_L50D_L54G	hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54G (也称为 L2-DIM17)	SEQ ID NO:132

[0706]

hu3D6VLv2 的另外的变体中的被设计成降低免疫原性的取代(所指示突变的 Kabat 编号)	变体名称	所得轻链可变区的 SEQ ID NO:
L37Q_L50D_L54R	hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R (也称为 L2-DIM18)	SEQ ID NO:133
L37Q_L50E_L54G	hu3D6VLv2 L37Q_L50E_L54G (也称为 L2-DIM19)	SEQ ID NO:134
L37Q_L50E_L54R	hu3D6VLv2 L37Q_L50E_L54R (也称为 L2-DIM20)	SEQ ID NO:135
L37Q_L50G_L54R_G100Q	hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R_G100Q	SEQ ID NO:136
L37Q_L50G_L54G_G100Q	hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G_G100Q	SEQ ID NO:137
L37Q_S52G_L54R_G100Q	hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R_G100Q	SEQ ID NO:138
L37Q_S52G_L54D_G100Q	hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54D_G100Q	SEQ ID NO:139
L37Q_L50D_L54G_G100Q	hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54G_G100Q	SEQ ID NO:140
L37Q_L50D_L54R_G100Q	hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R_G100Q	SEQ ID NO:141
L37Q_L50V_L54D_G100Q	hu3D6VLv2 L37Q_L50V_L54D_G100Q	SEQ ID NO:142

[0707] 设计了hu3D6VLv2轻链可变区的另外的变体以结合L37Q(SEQ ID NO:143)或结合G100Q(SEQ ID NO:144),如表13中所示。

[0708] 表13:hu3D6VLv2中的另外的氨基酸取代

[0709]

hu3D6VLv2 的另外的变体中的取代(所指示突变的 Kabat 编号)	变体名称	所得轻链可变区的 SEQ ID NO:
L37Q	hu3D6VLv2 L37Q (也称为 L2-DIM8)	SEQ ID NO:143
G100Q	hu3D6VLv2 G100Q	SEQ ID NO:144

[0710] 图10A、图10B、图10C和图10D示出了3D6抗体的以下人源化型式的轻链可变区的比对:hu3D6VLv2(SEQ ID NO:21)、hu3D6VLv2 L37Q(SEQ ID NO:143)、hu3D6VLv2 L50G(SEQ ID NO:103)、hu3D6VLv2 S52G(SEQ ID NO:110)、hu3D6VLv2 L54G(SEQ ID NO:94)、hu3D6VLv2 L54D(SEQ ID NO:93)、hu3D6VLv2L54K(SEQ ID NO:100)、hu3D6VLv2 L54R(SEQ

ID NO:101)、hu3D6VLv2 L54T(SEQ ID NO:102)、hu3D6VLv2 L37Q_L50G(SEQ ID NO:128)、hu3D6VLv2 L37Q_L50D(SEQ ID NO:129)、hu3D6VLv2L37Q_S52G(SEQ ID NO:131)、hu3D6VLv2 L37Q_L54G(SEQ ID NO:126)、hu3D6VLv2 L37Q_L54R(SEQ ID NO:125)、hu3D6VLv2L37Q_L54T(SEQ ID NO:130)、hu3D6VLv2 L37Q_L54D(SEQ ID NO:127)、hu3D6VLv2 L37Q_L54E(SEQ ID NO:145)、hu3D6VLv2L37Q_L50G_L54R(SEQ ID NO:119)、hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G(SEQ ID NO:120)、hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R(SEQ ID NO:133)、hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54G(SEQ ID NO:132)、hu3D6VLv2L37Q_S52G_L54D(SEQ ID NO:124)、hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54G(SEQ ID NO:121)、hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54T(SEQ ID NO:123)、hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R(SEQ ID NO:122)、hu3D6VLv2L37Q_L50D_L54G_G100Q(SEQ ID NO:140)、hu3D6VLv2L37Q_L50D_L54R_G100Q(SEQ ID NO:141)、hu3D6VLv2L37Q_L50G_L54R_G100Q(SEQ ID NO:136)、hu3D6VLv2L37Q_L50G_L54G_G100Q(SEQ ID NO:137)、hu3D6VLv2L37Q_L50V_L54D_G100Q(SEQ ID NO:142)、hu3D6VLv2L37Q_S52G_L54D_G100Q(SEQ ID NO:139)和hu3D6VLv2L37Q_S52G_L54R_G100Q(SEQ ID NO:138)。

[0711] 实施例12hu3D6VHv1bA11(重链可变区)的免疫原性

[0712] 设计了hu3D6VHv1bA11(也称为h3D6Hu5)(SEQ ID NO:18)的另外的重链可变区变体,如表14中所示。

[0713] 图9A和图9B示出了鼠3D6的重链可变区(SEQ ID NO:7)和3D6抗体的人源化型式(hu3D6VHvb1、hu3D6VHvb2、hu3D6VHvb3、hu3D6VHvb4、hu3D6VHvb5、hu3D6VHvb6、hu3D6VHvb7、hu3D6VHv1bA11、h3D6VHvb8和h3D6VHvb9)的重链可变区与人种系重链可变区序列IGHV1-69-2*01(SEQ ID NO:25)和人受体重链可变区序列2RCS VH hFrwk(SEQ ID NO:75)的比对。hu3D6VHvb1为SEQ ID NO:76,hu3D6VHvb2为SEQ ID NO:77,hu3D6VHvb3为SEQ ID NO:78,hu3D6VHvb4为SEQ ID NO:79,hu3D6VHvb5为SEQ ID NO:80,hu3D6VHvb6为SEQ ID NO:90,hu3D6VHvb7为SEQ ID NO:91,hu3D6VHv1bA11为SEQ ID NO:18,h3D6VHvb8为SEQ ID NO:146,并且h3D6VHvb9为SEQ ID NO:148。

[0714] 表14:hu3D6VHv1bA11(也称为h3D6Hu5)中的另外的氨基酸取代

hu3D6VHv1bA11 的另外的变体中的取代(所指示突变的 Kabat 编号)	变体名称	所得重链可变区的 SEQ ID NO
D60E	hu3D6VHv1bA11 D60E (也称为 h3D6VHvb8)	SEQ ID NO:146
L82cV	hu3D6VHv1bA11 L82cV	SEQ ID NO:147
D60E_L80M_Q81E_L82cV_T83R	hu3D6VHv1bA11 D60E_L80M_Q81E_L82cV_T83R (也称为 h3D6VHvb9)	SEQ ID NO:148

[0716] 选择重链可变区中表14所示位置作为取代候选的理由如下。

[0717] D60E:用于减少潜在的蛋白质水解。已知Asp-Pro基序是潜在的蛋白质水解切割位点。在hu3D6VHv1bA11(h3D6Hu5)VH中的Kabat位置60-61处存在Asp-Pro基序。基于同源性模

型,认为位置60处的Glu取代是构象保守的。因此,进行D60E取代以减少潜在的蛋白质水解。

[0718] Q81E用于增强热稳定性并且用于增加人源性。预测Glu会与K19形成H键加盐桥,因此该位置处的Glu可增强抗体稳定性。Glu是种系对齐突变。Glu在人种系基因IMGT#IGHV1-69-2*01 (SEQ (ID NO:25) 中处于该位置处。

[0719] L82cV用于降低免疫原性。使用IEDB (免疫表位数据库) 免疫原性分析工具对人源化hu3D6VHv1bA11 (h3D6Hu5) 免疫原性进行的计算机分析预测了包括L82c的潜在免疫原性肽。L82cV取代被设计成降低免疫原性。该位置处的缬氨酸取代保持环构象。

[0720] L80M用于降低免疫原性;并且用于增加人源性。Met是种系对齐突变。Met在人种系基因IMGT#IGHV1-69-2*01 (SEQ (ID NO:25) 中处于该位置处。

[0721] T83R用于增强热稳定性并且用于增加人源性。Arg是种系对齐突变。Arg在人种系基因IMGT#IGHV1-69-2*01 (SEQ (ID NO:25) 中处于该位置处。Arg最频繁地处于该位置处。

[0722] 实施例13人源化3D6变体的分析

[0723] 分析了具有预测的去免疫化取代的人源化3D6变体的几个特征,包括靶标结合亲和力、基于细胞的测定法中的活性、热稳定性、表达特征和取代数目。在所有情况下,都将结果与亲本序列hu3D6VHv1bA11/hu3D6VLv2进行了比较,以确定是否记录了任何活性或稳定性的损失。

[0724] 使用Biacore T200进行靶标结合分析,以比较人源化3D6变体与重组人4R0N tau的结合亲和力。经由胺偶联将抗人Fc抗体固定在传感器芯片CM3上,并且将人源化3D6变体捕获至相等水平。在运行缓冲液(HBS+0.05% P-20,1mg/mL BSA)中,使各种浓度的重组4R0N人tau(在0.02nM至12.5nM范围内)以50 μ L/min的速度经过捕获配体,持续180秒缔合/420秒解离(作为单个循环)。针对不含抗体的不相关传感器和0nM分析物浓度两者,将数据减去空白值。使用Biacore评价软件,使用全局1:1拟合进行分析。

[0725] 亲和力测定揭示了保留亲本hu3D6VHv1bA11/hu3D6VLv2的亲合力的许多去免疫化变体,这是通过将每个抗体的 K_D 与亲本hu3D6VHv1bA11/hu3D6VLv2的 K_D 进行比较来确定的。被确定具有在hu3D6VHv1bA11/hu3D6VLv2 (表15) 的4倍之内的相当的 K_D 的抗体包括hu3D6VHv1bA11/L2-DIM4、hu3D6VHv1bA11/L2-DIM9、hu3D6VHv1bA11/L2-DIM5、hu3D6VHv1bA11/L2-DIM3、h3D6VHvb8/L2-DIM4、hu3D6VHv1bA11/L2-DIM7、h3D6VHvb8/L2-DIM7、h3D6VHvb8/L2-DIM8、hu3D6VHv1bA11/L2-DIM12、hu3D6VHv1bA11/L2-DIM21和hu3D6VHv1bA11/L2-DIM22。hu3D6VHv1bA11/L2-DIM4展示出相比亲本hu3D6VHv1bA11/hu3D6VLv2改善的亲和力,如通过结合率、解离率和 K_d 数所证实的。

[0726] 表15. 3D6人源化变体的亲和力

3D6 人源化变体		K_a (1/M s)	K_d (1/s)	K_D (M)
[0727]	hu3D6VHv1bA11/ hu3D6VLv2	4.17E+06	7.40E-04	1.81E-10
	hu3D6VHv1bA11/L2-DIM4	5.65E+06	5.35E-04	9.48E-11
	hu3D6VHv1bA11/L2-DIM9	4.63E+06	7.40E-04	1.60E-10
	hu3D6VHv1bA11/L2-DIM5	4.02E+06	7.35E-04	1.83E-10
	hu3D6VHv1bA11/L2-DIM3	3.93E+06	7.81E-04	1.99E-10
	h3D6VHvb8/L2-DIM4	4.51E+06	1.02E-03	2.26E-10
	h3D6VHvb8/L2-DIM7	4.31E+06	1.19E-03	2.75E-10
	hu3D6VHv1bA11/L2-DIM7	3.46E+06	9.71E-04	2.81E-10
	h3D6VHvb8/L2-DIM8	3.28E+06	1.40E-03	4.27E-10
	hu3D6VHv1bA11/L2-DIM12	2.74E+06	1.33E-03	4.85E-10
	hu3D6VHv1bA11/L2-DIM21	2.15E+06	1.49E-03	6.96E-10
	hu3D6VHv1bA11/L2-DIM22	3.54E+06	2.51E-03	7.08E-10
	hu3D6VHv1bA11/L2-DIM1	3.02E+06	2.60E-03	8.59E-10
	hu3D6VHv1bA11/L2-DIM13	3.15E+06	2.85E-03	9.04E-10
	hu3D6VHv1bA11/L2-DIM-17	5.24E+10	5.42E+01	1.03E-09
	h3D6VHvb8/L2-DIM1	6.19E+06	6.41E-03	1.04E-09
	h3D6VHvb8/L2-DIM2	1.03E+10	1.46E+01	1.42E-09
	hu3D6VHv1bA11/L2-DIM6	3.08E+06	4.61E-03	1.49E-09
[0728]	h3D6VHvb8/L2-DIM6	3.79E+09	5.67E+00	1.50E-09
	hu3D6VHv1bA11/L2-DIM14	7.69E+10	1.18E+02	1.53E-09
	hu3D6VHv1bA11/L2-DIM2	5.73E+06	9.33E-03	1.63E-09
	hu3D6VHv1bA11/L2-DIM19	3.28E+09	5.88E+00	1.79E-09
	hu3D6VHv1bA11/L2-DIM-18	1.51E+06	3.78E-03	2.51E-09
	hu3D6VHv1bA11/L2-DIM20	2.60E+05	9.35E-03	3.60E-08

[0729] 此外,作为次要特征,分析了所有去免疫化变体的热稳定性和滴度。基于亲和力测量,比较与hu3D6VHv1bA11/hu3D6VLv2相当的抗体的热稳定性水平和滴度水平,并且表16中的抗体基于与hu3D6VHv1bA11/hu3D6VLv2的 T_m 的差异按顺序列出。

[0730] 使用差示扫描量热法(DSC)测定热稳定性值。使用VP-Capillary DSC系统(Malvern)进行所有的DSC扫描。所有样品均在1xPBS中制备成0.5mg/mL,并且以1xPBS为基准。将大约0.5mL蛋白质溶液和缓冲液引入到样品池和参比池中。在恒定压力下,以60°C/h的扫描速率,从25°C到110°C进行量热扫描。使用Origin软件进行分析。所报告的值是记录Fab峰的最大热容量的温度。

[0731] 滴度以如下方式测定。在293个悬浮细胞中表达后,使用蛋白A层析利用标准方法纯化抗体。纯化后,将抗体交换到1xPBS中,并且通过280nm处的吸光度测定蛋白质浓度。通过将经纯化蛋白质的最终产量除以表达培养物的起始体积来计算滴度,并且以毫克/升为单位报告。hu3D6VHv1bA11/L2-DIM4展示出比亲本hu3D6VHv1bA11/hu3D6VLv2高的热稳定性和滴度。热稳定性水平和瞬时表达水平(滴度)都是药物开发的重要考虑因素。

[0732] 表16. 3D6人源化变体的热稳定性和滴度

[0733]	3D6 人源化变体	T_m (°C)—与 hu3D6VHv1bA11/ hu3D6VLv2 的差异	滴度 (mg/L)
	hu3D6VHv1bA11/ hu3D6VLv2	0.00	456.00
	hu3D6VHv1bA11/L2-DIM4	0.08	467.00
[0734]	h3D6VHvb8/L2-DIM8	-0.38	301.00
	h3D6VHvb8/L2-DIM4	-0.78	445.00
	hu3D6VHv1bA11/L2-DIM22	-1.23	570.00
	hu3D6VHv1bA11/L2-DIM9	-2.19	290.00
	hu3D6VHv1bA11/L2-DIM5	-3.34	383.00
	hu3D6VHv1bA11/L2-DIM7	-4.24	231.00
	h3D6VHvb8/L2-DIM7	-4.83	271.00
	hu3D6VHv1bA11/L2-DIM3	-5.01	283.00
	hu3D6VHv1bA11/L2-DIM21	-5.17	81.00
	hu3D6VHv1bA11/L2-DIM12	-5.47	94.00

[0735] 基于对上面列出的发现的分析,选择了表16中七种抗体的中和活性,用于在基于细胞的tau内化模型中进一步分析:重链和轻链中相对于亲本hu3D6VHv1bA11/hu3D6VLv2的取代被记录下来。

[0736] 执行采用荧光激活细胞分选 (FACS) 的内化测定法来评价各种抗体阻断tau的神经元内化的能力。阻断内化的抗体可能会阻断tau的传递。

[0737] 通过在37°C下将重组全长tau与等摩尔量的低分子量肝素一起孵育3天,产生可溶性tau聚集体。在孵育后,通过以10,000xg离心15分钟,将不溶性tau和可溶性tau分离。然后通过制备型尺寸排阻色谱法分离上清液,收集聚集体峰(大于100kDa)并且浓缩。为了测量内化,用pHrodo Red琥珀酰亚胺酯标记可溶性聚集体部分,当其被内化到内容酶体途径中时发出荧光。

[0738] 将pHrodo标记的4R0N人tau P301L可溶性低聚物(最终浓度1.5μg/ml)与抗-tau抗体(剂量滴定:起始浓度80μg/ml,之后进行4倍连续稀释)在细胞培养基中在室温处预孵育30分钟。然后将tau/抗体混合物以500,000个细胞/mL的终浓度添加到B103神经母细胞瘤细胞系中,并且在组织培养孵育器(5% CO₂)中在37°C处孵育3小时至4小时。然后用培养基将细胞洗涤3次,之后进行10分钟的培养基孵育,并且用FACS缓冲液(1% FBS的PBS溶液)洗涤2次。将细胞重悬于100μl FACS缓冲液中,并且通过FACS LSR II测量Texas红色平均荧光强度。来自pHrodo的Texas红色荧光被内化时与内容酶体隔室相关联的低pH激活。因为FACS检测细胞,并且pHrodo仅在内化时发荧光,所以将仅检测被细胞内化的tau。平均荧光强度越低,内化tau的量越少,这表明所测试的抗体的阻断活性越高。

[0739] 除了hu3D6VHv1bA11/L2-DIM22之外,全部所测试的变体在相等浓度的tau内化模型中均显示出高度的抑制活性(图11和表17)。

[0740] 表17. 在基于细胞的Tau内化测定中所测试的人源化3D6变体

[0741]	3D6 人源化变体	相对于亲本 hu3D6VHv 1bA11 的重 链取代	相 对 于 亲 本 hu3D6VLv2 的轻链取代	抑制基于细胞的内 化(以 133 nM 的抗 体浓度, 最大荧光 信号抑制%±标准 偏差)
	hu3D6VHv1bA1 1/ hu3D6VLv2			87.2 ± 1.6
	hu3D6VHv1bA1 1/ L2-DIM4		L37Q_S52G_L 54R	92.2 ± 2.4
	hu3D6VHv1bA1 1/L2-DIM5		L37Q_S52G_L 54T	92.7 ± 3.6
	h3D6VHvb8/L2- DIM4	D60E	L37Q_S52G_L 54R	89.4 ± 2.6
	hu3D6VHv1bA1 1/L2-DIM3		L37Q_S52G_L 54G	87.4 ± 3.6
	hu3D6VHv1bA1 1/L2-DIM9		S52G	96 ± 3.5
	h3D6VHvb8/L2- DIM7	D60E	L54G	93.2 ± 1.3
	hu3D6VHv1bA1 1/L2-DIM22		L50G	8.7 ± 8.6

[0742] 实施例14 3D6表位作图的细化

[0743] 初始肽作图表明,3D6的表位处于微管结合重复区(MTBR,图1)中。另外,肽作图表明,3D6与MTBR内的多个位点结合,表明存在重复且不连续的表位。

[0744] 由于用于表位研究的初始肽图利用了不含完整微管结合重复序列的重叠肽重叠,因此对用单独的完整微管重复序列进行了另外的肽作图。将对应于MTBR重复序列1-4的氨基酸的生物素化肽添加到链霉抗生物素蛋白包被的ELISA板中,洗涤,并且在1% BSA/PBS中封闭。然后将不同量的3D6(在50ug/ml至10ng/ml范围内)在平板上孵育。洗涤后,将山羊抗小鼠HRP添加到ELISA板中,洗涤,并且使用OPD显色。在490nm处检测吸光度,并且使用4参数对数曲线拟合结合曲线以确定EC50值(表18)。3D6相对等效地与MTBR 1至MTBR 3结合,EC50值分别为72.5ng/ml、35.5ng/ml和25.1ng/ml。然而,与MTBR 4的结合大约为1/170至1/60,表观EC50为4309ng/ml。来自MTBR 1、2、3和4的MTBR 4中的重复表位的序列变化可以解释与MTBR 4的结合较弱的原因。

[0745] 表18

	微管重复序列数	氨基酸(使用全长 tau 同种型 tau 同种型 SEQ ID NO:1 的编号)	EC50 (ng/ml 抗体)
[0746]	1	244-274	72.5
	2	275-305	35.5
	3	306-336	25.1
	4	337-368	4309

[0747] 为了更详细地阐明负责3D6结合的特定氨基酸,使用肽NVKSKIGSTENLKHQPG (SEQ ID NO:184) 经由微阵列进行取代作图,所述肽是使用全长tau同种型的编号的残基255-271的序列。该测定将所述肽序列中的每个氨基酸与所有20个氨基酸交换,以高度准确地确定3D6的核心表位。用所有肽一式三份地打印微阵列,连同HA对照肽一起以确保测定性能。为了进行该测定,将阵列与封闭缓冲液中的3D6 (10ug/ml) 一起孵育,用PBS-T洗涤,之后与缀合至DyLight-680的山羊抗小鼠二抗一起孵育。此外,将微阵列与直接缀合至DyLight-800的抗HA抗体12CA5一起孵育。使用LiCor扫描仪扫描微阵列,并且将三个平行样的强度平均。

[0748] 通过测定天然残基突变时损失的3D6结合与所有其他19个氨基酸的总和的比率来计算每个残基的取代效应。结果在图12A中绘出。结合损失大于50% (虚线) 表示用于3D6结合的重要残基。探针肽 (441aa同种型的残基255-271) 与3D6的结合揭示了具有保守核心基序KIGSTENLKH (SEQ ID NO:188) 的表位取代模式,其由可变的N-末端延伸NVKS (SEQ ID NO:189) 和C-末端延伸QPG (SEQ ID NO:190) 框住,这两者对于结合都不重要。在该核心表位内,不允许取代的残基是Lys⁵、Asn¹¹和His¹⁴;此外,位置13表明对除Lys和His之外的残基的取代耐受性降低。除了这些重要的残基之外,Ser⁸只允许有限的取代。这导致KXXSXXNX (K/H) H (SEQ ID NO:191) 的不连续表位,如图12B中所示。tau微管结合重复序列的相关区段以对齐方式呈现,其中突出显示了重要的3D6结合残基。当与tau中的微管重复序列相比时,重要的残基存在于所有重复序列中,核心表位中的倒数第二个位置 (K/H,由[^]表示) 除外。在该位置,重复序列4包含苏氨酸,这可能是造成3D6 ELISA结合较低的原因。核心表位在KIGSTENLKH (SEQ ID NO:188,SEQ ID NO:1的残基259-268,在MBTR重复序列1中)、KCGSKDNIKH (SEQ ID NO:192,SEQ ID NO:1的残基290-299,在MBTR重复序列2中)、KCGSLGNIHH (SEQ ID NO:193,SEQ ID NO:1的残基321-330,在MBTR重复序列3中) 处限定,且在KIGSLDNITH (SEQ ID NO:194,SEQ ID NO:1的残基353-362,在MBTR重复序列4中) 处的结合较少。

[0749] 实施例15小鼠3D6与来自阿尔茨海默病患者的患者样品结合,免疫组织化学实验

[0750] 将新鲜冷冻人脑样品 (约0.5g) 的尸体解剖块包埋在OCT中,并且使用低温恒温器切割以产生10μm切片。在叠氮化钠存在下,将切片置于葡萄糖氧化酶和βD-葡萄糖的溶液中,以阻断内源性过氧化物酶。一旦制备好组织切片,就按照制造商的说明,使用抗小鼠聚合物和基于DAB的检测试剂盒 (Leica BOND精制检测试剂盒) 将其用指定浓度的3D6染色。结果在图13中示出。

[0751] 在AD组织中,3D6结合tau的标志性病理特征,包括神经原纤维缠结以及营养不良

性神经突。此外,3D6与可溶性细胞内tau结合;正常健康对照组织中存在的染色表明了这一点。

[0752] 实施例16小鼠3D6与可溶性tau聚集体结合,交联高质量MALDI质谱实验

[0753] 为了确定3D6是结合单个tau亚单位还是多个tau亚单位,利用交联高质量MALDI质谱来评估结合化学计量。交联允许直接分析非共价相互作用。通过将含有非共价相互作用的蛋白质样品与交联混合物混合(Bich,C等人,Anal.Chem.,2010,82(1),第172至179页),有可能以高灵敏度特异性地检测非共价复合物。在该测定中,测试了3D6与可溶性tau聚集体的相互作用。通过在37℃下将重组全长tau与等摩尔量的低分子量肝素一起孵育3天,产生可溶性tau聚集体。在孵育后,通过以10,000xg离心15分钟,将不溶性tau和可溶性tau分离。然后通过制备型尺寸排阻色谱法分离上清液,收集聚集体峰(大于100kDa)并且浓缩。

[0754] 将3D6与各种比例的可溶性tau聚集体混合,并且通过高质量MALDI质谱进行检测。此外,还对各个组分进行了对照实验,以便正确标记检测到的峰。用标准氮激光器,用HM4相互作用模块(Cova1X)以线性正模式进行分析,聚焦于0kDa至1500kDa的质量范围。

[0755] 结果在图14中示出。在对照(未交联)结果中,tau和3D6两者分别作为40.93kDa和146.938kDa的个体被检测到。然而,当交联时,3D6的抗体峰消失,而出现了两个新的峰,代表3D6与一种抗原和两种抗原相互作用(分别在194.788和228.963处。如在叠加插图中检测到的,交联样品中明显不存在146.938kDa处的3D6峰。这些数据表明3D6与tau的可溶性聚集体非常强地结合,并且通过每个抗体结合一个或两个复合物来实现这种结合。

[0756] 实施例17小鼠3D6在阿尔茨海默病病理学的体内疾病模型中使tau接种中断

[0757] 在AD病变增殖的体内疾病模型中研究了3D6中断tau接种的能力。使用来自末期hTauP301L小鼠或野生型对照的脑干匀浆产生病理种子。为了诱导病变,在自然病变进展开始之前,将种子单侧注射到3.5月龄小鼠的海马体中。为了测试抗体影响tau接种的能力,在注射前预孵育抗体。1个月后,通过AT8免疫反应性评估小鼠同侧的接种量;确定海马体内每个切片的神经元数量。

[0758] 结果在图15中示出。与同种型对照相比,用3D6预孵育tau种子能够显著减少1个月后的在鼠中检测到的接种量,这表明注射部位近侧的tau内化中断,并且表明3D6能够损害tau的摄取和增殖。

[0759] 实施例18小鼠3D6和人源化变体在体外中断tau与肝素的相互作用

[0760] 几项研究表明,tau内化到细胞中是由tau与表面相关的硫酸肝素蛋白聚糖(HSPG)的初始相互作用介导的,并且这种相互作用是导致tau摄取、接种和增殖的必要初始步骤(Holmes等人,PNAS,110(33),2013;Katsinelos等人,Cell Rep,23,2018)。因此,治疗性抗tau抗体的有利特性将是能够阻断tau与将存在于细胞表面上的肝素之间的相互作用。

[0761] 为了测试鼠3D6和人源化3D6变体中断tau与肝素相互作用的能力,首先在室温下用PBS中的2% BSA将包被低分子量肝素的ELISA板封闭2小时。用TBST洗涤平板。封闭后,在室温下将板与生物素化的重组tau连同指定浓度的未标记抗体在1% BSA/PBS中孵育1小时。再次洗涤板,然后与链霉抗生物素蛋白-HRP一起在0.1% BSA/PBS中孵育45分钟。然后洗涤板并用OPD显色,然后在490nm处测量吸光度。使用4参数对数拟合分析抑制曲线。

[0762] 结果在图16和表19中示出。在该测定中测试的3D6的鼠形式以及两种人源化形式均表现出能够阻断tau/肝素相互作用,这表明3D6表位对于这种相互作用很重要,并且抗体

能够抑制该相互作用。这表明能够中断tau摄取到细胞中。尽管所有测试的抗体都显示抑制活性,但变体hu3D6VHv1bA11/L2-DIM4保留的活性更接近抗体的鼠形式($IC_{50}=422.7\text{pM}$,与鼠的 409.2pM 相比)。相比之下,与hu3D6VHv1bA11/L2-DIM4相比,hu3D6VHv1bA11/hu3D6VLv2表现出较低的抑制活性($IC_{50}=564.6\text{pM}$),指明hu3D6VHv1bA11/L2-DIM4以较高的程度保留鼠抗体特性,并且表明由于轻链CDR中的氨基酸变体,hu3D6VHv1bA11/L2-DIM4的抑制活性提高。

[0763] 表19

[0764]	抗体	IC50 (pM)
	鼠 3D6	409.2
	hu3D6VHv1bA11/ hu3D6VLv2	564.6
	hu3D6VHv1bA11/L2-DIM4	422.7

[0765] 实施例19 3D6人源化变体与tau的原纤维形式结合

[0766] 重组tau原纤维是通过与等摩尔量的低分子量肝素和4-重复序列tau(“原纤维tau”)一起孵育或者接种3-重复序列tau和4-重复序列tau(“混合原纤维”)后的生长来产生的。将Tau在 37°C 下孵育3至5天。为了分离原纤维,将制备的样品以 $100,000\times g$ 超速离心30分钟。使用前,先将沉淀再悬浮于其原始体积中,然后在 -80°C 下储存。

[0767] 用预先形成的原纤维包被ELISA板(在 50mM 碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液($\text{pH } 9.6$)中,在 4°C 下过夜),洗涤,并且用 1% BSA的PBS溶液封闭。封闭后,在室温下将板与指定浓度的生物素化一抗在 0.1% BSA/PBS中孵育1小时。洗涤板,然后与链霉抗生物素蛋白-HRP一起在 0.1% BSA/PBS中孵育45分钟。然后洗涤板并用OPD显色,然后在 490nm 处测量吸光度。使用4参数对数拟合分析结合曲线。

[0768] 结果在图17和表20中示出。在该测定中测试的两种人源化形式的3D6均显示与原纤维形式的tau的强结合,无论原纤维是仅包含4R tau,还是同时包含3R tau和4R tau。与hu3D6VHv1bA11/hu3D6VLv2($EC_{50}=236.7\text{pM}$)相比,变体hu3D6VHv1bA11/L2-DIM4表现出对结合两种物质的偏好($EC_{50}=191.8\text{pM}$),指明由于轻链CDR中的氨基酸变体,hu3D6VHv1bA11/L2-DIM4的结合能力提高。

[0769] 表20

[0770]	抗体	与 4R tau 原纤维的结合: EC_{50} (pM)
	hu3D6VHv1bA11/L2-DIM4	191.8
	hu3D6VHv1bA11/ hu3D6VLv2	236.7

[0771] 实施例20示例性CDR

[0772] 本发明的抗体的示例性CDR示于表21中。

[0773] 表21: 示例性CDR

[0774]

CDR 和定义	CDR 氨基酸序列	SEQ ID NO:	其中存在 CDR 的示例性 VH 或 VL
Kabat/Chothia HCDR1	GFNIKDYLLH	8	小鼠 3D6 VH
Kabat HCDR2	WIDPENGDTVYDPK FQG	9	小鼠 3D6 VH
Kabat HCDR3:	LDF	10	小鼠 3D6 VH
Kabat LCDR1	KSSQSLLDSDGKTY LN	12	小鼠 3D6 VL
Kabat LCDR2	LVS KLDS	13	小鼠 3D6 VL
Kabat LCDR3:	WQGTHFPYT	14	小鼠 3D6 VL
CDR-H1 Kabat	DYYLH	32	小鼠 3D6 VH
CDR-H1 Chothia	GFNIKDY	33	小鼠 3D6 VH
CDR-H2 Chothia	DPENG D	34	小鼠 3D6 VH
CDR-H2 AbM	WIDPENGDTV	35	小鼠 3D6 VH
CDR-L1 Contact	KTYLNWL	36	小鼠 3D6 VL
CDR-L2 Contact	RLIYLVSKLD	37	小鼠 3D6 VL
CDR-L3 Contact	WQGTHFPY	38	小鼠 3D6 VL
CDR-H1 Contact	KDYYLH	39	小鼠 3D6 VH
CDR-H2 Contact	WIGWIDPENGDTV	40	小鼠 3D6 VH
CDR-H3 Contact	STLD	41	小鼠 3D6 VH
Kabat-Chothia CDR-H1	GFTIKDYLLH	42	hu3D6VHv5 、 hu3D6VHv1bA11B6G 2 、 hu3D6VHv1bA11B6H 3 、 hu3D6VHv1e 和 hu3D6VHv1f
Kabat CDR-H2	WIDPEDGDTVYAPK FQG	43	hu3D6VHv5 和 hu3D6VHv1bA11B6H 3

[0775]

CDR 和定义	CDR 氨基酸序列	SEQ ID NO:	其中存在 CDR 的示例性 VH 或 VL
Kabat-Chothia CDR-H1	GFNFKDYLLH	58	hu3D6VH1c
Kabat-Chothia CDR-H1	GYTFTDYLLH	59	hu3D6VHv1d hu3D6VHv3c hu3D6VHv4c
Kabat-Chothia CDR-H1	GYNFKDYLLH	60	hu3D6VHv3b hu3D6VHv4b
Kabat CDR-H2	WVDPEDGDTVYAP KFQG	61	hu3D6VHv1bA11B6G 2
Kabat CDR-H2	WIDPENGDTVYDEK FQG	62	hu3D6VHv1c hu3D6VHv3b hu3D6VHv4b
Kabat CDR-H2	WVDPEDGDTVYAE KFQG	63	hu3D6VHv1d hu3D6VHv1f hu3D6VHv3c hu3D6VHv4c
Kabat CDR-H2	WIDPENGDTVYAEK FQG	64	hu3D6VHv1e
Kabat CDR-H3	LDY	65	hu3D6VHv1f
Kabat/Chothia 复合物 CDR-H1	GLNIKDYIIH	67	小鼠 6A10 VH
Kabat CDR-H2	WIDPENDDTEYAPK FQG	68	小鼠 6A10 VH
Kabat CDR-H3	LDY	69	小鼠 6A10 VH
Kabat-Chothia 复合物 CDR-H1	GFTIKDYLLH	86	hu3D6VHvb4 hu3D6VHvb5
Kabat CDR-H2	WIDPENGDTIYDPKF QG	87	hu3D6VHvb3 hu3D6VHvb4
Kabat CDR-H2	WIDPEDGETIYDPKF QG	88	hu3D6VHvb5
Kabat CDR-L1	RSSQSLLDSDGKTY LN	89	hu3D6VLvb3
Kabat CDR-H2	WIDPEDGETVYDPK FQG	92	hu3D6VHvb6 hu3D6VHvb7
Kabat CDR-H2	WIDPENGDTVYEPK FQG	149	h3D6VHvb8 h3D6VHvb9
Kabat CDR-L2	LVSKEDES	150	hu3D6VLv2 L54D hu3D6VLv2 L37Q L54D

[0776]

CDR 和定义	CDR 氨基酸序列	SEQ ID NO:	其中存在 CDR 的示例性 VH 或 VL
Kabat CDR-L2	LVSKGDS	151	hu3D6VLv2 L54G 和 hu3D6VLv2 L37Q_L54G
Kabat CDR-L2	LVSKNDS	152	hu3D6VLv2 L54N
Kabat CDR-L2	LVSKEDS	153	hu3D6VLv2 L54E 和 hu3D6VLv2 L37Q_L54E
Kabat CDR-L2	EVSKLDS	154	hu3D6VLv2 L50E
Kabat CDR-L2	LVSKQDS	155	hu3D6VLv2 L54Q
Kabat CDR-L2	DVSKLDS	156	hu3D6VLv2 L50D 和 hu3D6VLv2 L37Q_L50D
Kabat CDR-L2	LVSKKDS	157	hu3D6VLv2 L54K
Kabat CDR-L2	LVSKRDS	158	hu3D6VLv2 L54R 和 hu3D6VLv2 L37Q_L54R
Kabat CDR-L2	LVSKTDS	159	hu3D6VLv2 L54T 和 hu3D6VLv2 L37Q_L54T
Kabat CDR-L2	GVSKLDS	160	hu3D6VLv2 L50G 和 hu3D6VLv2 L37Q_L50G
Kabat CDR-L2	LVSKVDS	161	hu3D6VLv2 L54V
Kabat CDR-L2	LVSKSDS	162	hu3D6VLv2 L54S
Kabat CDR-L2	LVGKLDS	163	hu3D6VLv2 S52G 和 hu3D6VLv2 L37Q_S52G
Kabat CDR-L2	VVSKLDS	164	hu3D6VLv2 L50V
Kabat CDR-L2	GVSKRDS	165	hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R 和 hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R_G 100Q
Kabat CDR-L2	GVSKGDS	166	hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G 和 hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G_G 100Q

[0777]

CDR 和定义	CDR 氨基酸序列	SEQ ID NO:	其中存在 CDR 的示例性 VH 或 VL
Kabat CDR-L2	LVGKGDS	167	hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54G
Kabat CDR-L2	LVGKRDS	168	hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R 和 hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R_G100Q
Kabat CDR-L2	LVGKTDS	169	hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54T
Kabat CDR-L2	LVGKDDS	170	hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54D 和 hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54D_G100Q
Kabat CDR-L2	DVSKGDS	171	在 hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54G 和 hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54G_G100Q 中
Kabat CDR-L2	DVSKRDS	172	hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R 和 hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R_G100Q
Kabat CDR-L2	EVSKGDS	173	hu3D6VLv2 L37Q_L50E_L54G
Kabat CDR-L2	EVSKRDS	174	hu3D6VLv2 L37Q_L50E_L54R
Kabat CDR-L2	VVSKDDS	175	hu3D6VLv2 L37Q_L50V_L54D_G100Q

序列表

P10636-8 (SEQ ID NO:1)

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPLQTP TEDGSE
EPGSETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAQPHTEIPEGTTAEEAGIGDTPSLEDE
AAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANATRIPAK
TPPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREP KKVAVVRTPPKSP
SSAKSRLQTAPVMPDLKNVSKSIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKD
NIKHVPGGGSVQIVYKPV DLSKVT SKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKI
GSLDNITHVPGGGNKKIETHKLT FRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGDTS PRHLSNV SST
GSIDMV DSPQLATLADEV SASLAKQGL

P10636-7 (SEQ ID NO:2)

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPLQTP TEDGSE
EPGSETSDAKSTPTAEAEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKG
ADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPG
TPGSRSRTPSLPTPPTREP KKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVMPDLKNVSKSIGSTEN
LKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPV DLSKVT SKCGS
LNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLT FRENAK
AKTDHGAEIVYKSPVVSGDTS PRHLSNV SSTGSIDMV DSPQLATLADEV SASLAKQGL

[0778]

P10636-6 (4RON 人 tau) (SEQ ID NO:3)

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKAEAGIGDTPSLE
DEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANATRIP
AKTPPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREP KKVAVVRTPPK
SPSSAKSRLQTAPVMPDLKNVSKSIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGS
KDNIKHVPGGGSVQIVYKPV DLSKVT SKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQ
SKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLT FRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGDTS PRHLSNV
SSTGSIDMV DSPQLATLADEV SASLAKQGL

P10636-5 (SEQ ID NO:4)

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPLQTP TEDGSE
EPGSETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAQPHTEIPEGTTAEEAGIGDTPSLEDE
AAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANATRIPAK
TPPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREP KKVAVVRTPPKSP

SSAKSRLQTAPVMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIVYKPVDSLKVTSKCGSLG
NIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAK
TDHGAEIVYKSPVVSAGDTSPRHLSNVSSSTGSIDMVDSPQLATLADEVASLAKQGL
P10636-4 (SEQ ID NO:5)

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKESPLQTPTEDGSE
EPGSETSDAKSTPTAEAEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKG
ADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANATRIPAKTPAPKTPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPG
TPGSRSRTPSLPTPTREPCKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVMPDLKNVSKIGSTEN
LKHQPGGGKVQIVYKPVDSLKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKI
GSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSAGDTSPRHLSNVSSST
GSIDMVDSPQLATLADEVASLAKQGL
P10636-2 (SEQ ID NO:6)

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKAEEAGIGDTPSLE
DEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANATRIP
AKTPAPKTPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPTREPCKVAVVRTPPK
SPSSAKSRLQTAPVMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIVYKPVDSLKVTSKCGS
LGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAK
AKTDHGAEIVYKSPVVSAGDTSPRHLSNVSSSTGSIDMVDSPQLATLADEVASLAKQGL

[0779]

SEQ ID NO:7; 鼠 3D6 VH 氨基酸序列:

EVQLQQSGADLVRPGALVKLSCKASGFNIKDYLLHWVRQRP
EQGLEWIGWIDPENGDTVYDPKFQGKATITADTSSNTAYLQLGSLT
SEDTAVYFCSTLDFWGQGTTTLTVSS

SEQ ID NO:8; Kabat/Chothia HCDR1:

GFNIKDYLLH

SEQ ID NO:9; Kabat HCDR2:

WIDPENGDTVYDPKFQG

SEQ ID NO:10; Kabat HCDR3:

LDF

SEQ ID NO:11; 鼠 3D6 VL 氨基酸序列:

DVVMQTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQ
RPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLG
VYYCWQGTHFPYTFGGGGTKLEIK

SEQ ID NO:12; 鼠 Kabat LCDR1:

KSSQSLLDSDGKTYLN

SEQ ID NO:13; 鼠 Kabat LCDR2:

LVSKLDS

SEQ ID NO:14; 鼠 Kabat LCDR3:

WQGTHFPYT

[0780]

SEQ ID NO:15; hu3D6VHv1:

EVQLVQSGAEVVRPGALVKVSCCKASGFNIKDYLLHWVRQAP
EQGLEWIGWIDPENGDTVYDPKFQGKATITADTSTNTAYLQLSSLT
SEDTAVYFCSTLDFWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:16; hu3D6VHv2:

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGFNIDYLLHWVRQAP
EQGLEWMGWIDPENGDTVYDPKFQGRVTITADTSTNTAYMELSSL
TSEDTAVYYCSTLDFWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:17; hu3D6VHv1b:

EVQLVQSGAEVVRPGALVKISCKASGFNIKDYLLHWVRQRP
EQGLEWIGWIDPENGDTVYDPKFQGKATITADTSTNTAYLQLGSLT
SEDTAVYFCSTLDFWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:18; hu3D6VHv1bA11:

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFNIKDYHLHWVRQRP
GQGLEWIGWIDPENGDTVYDPKFQGRATITADTSTDYALQLGSL
TSEDYAVYFCSTLDFWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:19; hu3D6VHv5:

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFNIKDYHLHWVRQRP
GQGLEWIGWIDPEDGDTVYAPKFQGRATITADTSTDYALQLGSLT
SEDYAVYFCSTLDFWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:20; hu3D6VLv1:

DVVMYQSPLSLSVTLGQPAISCKSSQSLLDSYGKTYLNWLL
QRPYQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV
GVYYCWQGTHFPYTFGGGTKLEIK

[0781]

SEQ ID NO:21; hu3D6VLv2:

DVVMYQSPLSLPVTGQPAISCKSSQSLLDSYGKTYLNWLL
QRPYQSPRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV
GVYYCWQGTHFPYTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO:22; hu3D6VLv3:

DVVMYQSPLSLPVTGQPAISCKSSQSLLDSYGKTYLNWLL
QRPYQSPRLIYLVSKLDSGVPSRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG
VYYCWQGTHFPYTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO:23; hu3D6VLv4:

DIVMTQTPLSLSVTIGQPAISCKSSQSLLDSYGKTYLNWLLQ
KPYQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG

VYYCWQGTHFPYTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO:24; 重链可变受体 Acc.# BAC01986.1

QVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFGSYAISWVRQAP
GQGLEWMGRIIPILGIATYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMDLSSLRS
EDTAVYYCARGKGEFEGMDVWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:25; 重链可变受体 Acc.# IMGT#IGHV1-69-2*01

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYMHVQQA
PGKGLEWMGLVDPEDGETIYAEKFQGRVTITADTSTDYMEELSS
LRSEDTAVYYCAT

SEQ ID NO:26; 重链可变受体 Acc.# IMGT#IGKJ1*01

QHWGQGTLVTVSS

[0782]

SEQ ID NO:27; 轻链可变受体 Acc. # IMGT#IGKV2-30*02 Acc.
IMGT#IGKV2-30*02

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLNWFQ
QRPQGSPRRLIYKVSNRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV
GVYYCMQGTHWP

SEQ ID NO:28; 轻链可变受体 Acc. # IMGT#IGKJ2*01

YTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:29; 轻链可变受体 Acc. # AAZ09048.1

DVVMTQSPLSLTVTLGQPASISCRSSQSLVYSDGNTYLNWFQ
QRPQGSPRRLIYRVSHWDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV
GVYYCMQGTYWPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:30; 鼠 3D6 VH 核酸序列:

GAGG TTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGACCTTGTGAGGC
CAGGGGCCTTAGTCAAGTTGTCCTGCAAAGCTTCTGGCTTCAA
CATTAAAGACTACTATTTGCACTGGGTGAGGCAGAGGCCTGAA
CAGGGCCTGGAGTGGATTGGATGGATTGATCCTGAGAATGGTGA
TACTGTATATGACCCGAAGTTCCAGGGCAAGGCCACTATAACAG
CAGACACATCCTCCAATACAGCCTACCTGCAGCTCGGCAGCCTG
ACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTTCTGTTCTACCCTTGACTTC
TGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

SEQ ID NO:31; 鼠 3D6 VL 核酸序列:

[0783]

GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCACTTTGTCGGTTAC
CATTGGACAACCAGCCTCCATCTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGC
CTCTTAGATAGTGATGGAAAGACATATTTGAATTGGTTGTTACAG
AGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCGCCTAATCTATCTGGTGTCTAA
ACTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTCCTGAGTGGCAGTGGATCA
GGGACAGATTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGG
ATTTGGGAGTTTATTATTGCTGGCAAGGTACACATTTTCCGTACA
CGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGT

SEQ ID NO:32; 鼠 CDR-H1 Kabat

DYYLH

SEQ ID NO:33; 鼠 CDR-H1 Chothia

GFNIKDY

SEQ ID NO:34; 鼠 CDR-H2 Chothia

DPENGD

SEQ ID NO:35; 鼠 CDR-H2 AbM

WIDPENGDTV

SEQ ID NO:36; 鼠 CDR-L1 Contact

KTYLNWL

SEQ ID NO:37; 鼠 CDR-L2 Contact

RLIYLVSKLD

SEQ ID NO:38; 鼠 CDR-L3 Contact

WQGTHFPY

SEQ ID NO:39; 鼠 CDR-H1 Contact

[0784] KDYYLH

SEQ ID NO:40; 鼠 CDR-H2 Contact

WIGWIDPENGDTV

SEQ ID NO:41; 鼠 CDR-H3 Contact

STLD

SEQ ID NO:42; 另选的 Kabat-Chothia CDR-H1

GFTIKDYYLH

SEQ ID NO:43; 另选的 Kabat CDR-H2

WIDPEDGDTVYAPKFQG

SEQ ID NO:44; 来自 PCT/IB2017/052544 的图 2 的共有 VH 氨基

酸序列

EVQLVQSGAEVVXPGALVKISCKASGFNIKDYHLHWVRQRP
EQGLEWIGWIDPENGDTVYDPKFQGXATITADTSTNTAYLQLGSL
TSEDTAVYFCSTLDFWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:45; PCT/IB2017/052544 的图 3 的共有 VL 氨基酸序
列

DVVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSSQSLLDSGKTYLNWLL
QRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDV
GVYYCWQGTHFPYTFGGGTKLEIKR

SEQ ID NO:46; hu3D6VHv1bA11B6G2:

[0785] EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFTIKDYHLHWVRQRP
GKGLEWIGWIDPEDGDTVYAPKFQGRATITADTSTDYAYLELGS
TSEDTAVYFCSTLDFWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:47; hu3D6VHv1bA11B6H3:

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFTIKDYHLHWVRQRP
GKGLEWIGWIDPEDGDTVYAPKFQGRATITADTSTDYAYLELGS
TSEDTAVYFCSTLDFWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:48; hu3D6VHv1c:

EVQLVQSGAEVKRPGALVKISCKASGFNFKDYHLHWVRQRP
EQGLEWMGWIDPENGDTVYDEKFQGRVTITADTSTNTAYLQLGSL
TSEDTAVYFCSTLDFWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:49; hu3D6VHv1d:

EVQLVQSGAEVKRPGALVKISCKASGYTFTDYHLHWVRQRP

EQGLEWMGWVDPEDGDTVYAEKFQGRVTITADTSTNTAYLQLGS
LTSED TAVYFCSTLDFWGQGTLTVSS

SEQ ID NO:50; hu3D6VHv1e:

EVQLVQSGADVvkPGALVKISCKASGFTIKDYYLHWVRQRPE
QGLEWIGWIDPENGDTVYAEKFQGRVTITADTSTNTAYLeLGSLTS
EDTAVYFCSTLDFWGQGTTTLTVSS

SEQ ID NO:51; hu3D6VHv1f:

EVQLVQSGADVVKPGALVKISCKASGFTIKDYYLHWVRQRP
GQGLEWIGWVDPEDGDTVYAEKFQGRVTITADTSTD TAYMELGSL
TSED TAVYFCSTLDYWGQGTTTLTVSS

SEQ ID NO:52; hu3D6VHv3:

[0786]

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNIKDYYLHWVRQAP
GKGLEWMGWIDPENGDTVYDPKFQGRVTITADTSTD TAYMELSS
LRSED TAVYYCSTLDFWGQGTLTVSS

SEQ ID NO:53; hu3D6VHv3b:

EVQLVQSGAEVKKPGALVKISCKVSGYNFKDYYLHWVRQAP
GKGLEWMGWIDPENGDTVYDEKFQGRVTITADTSTNTAYMELGS
LRSED TAVYYCSTLDFWGQGTLTVSS

SEQ ID NO:54; hu3D6VHv3c:

EVQLVQSGAEVKKPGALVKISCKVSGYTFTDYYLHWVRQAP
GKGLEWMGWVDPEDGDTVYAEKFQGRVTITADTSTNTAYMELGS
LRSED TAVYYCSTLDFWGQGTLTVSS

SEQ ID NO:55; hu3D6VHv4:

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKVSGFNIKDYLLHWVRQRP
GKGLEWIGWIDPENGDTVYDPKFQ GKATITADTSTNTAYLELGS LT
SEDTAVYYCSTLDFWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:56; hu3D6VHv4b:

EVQLVQSGAEVVKPGALVKISCKVSGYNFKDYLLHWVRQRP
GKGLEWMGWIDPENGDTVYDEKFQGRVTITADTSTDYAYLELGS L
TSEDTAVYYCSTLDFWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:57; hu3D6VHv4c:

EVQLVQSGAEVVKPGALVKISCKVSGYTFTDYLLHWVRQRP
GKGLEWMGWVDPEDGDTVYAEKFQGRVTITADTSTDYAYLELGS
LTSEDTAVYYCSTLDFWGQGTLVTVSS

[0787] SEQ ID NO:58; 另选的 Kabat-Chothia CDR-H1 (如在 hu3D6VH1c 中)。

GFNFKDYLLH

SEQ ID NO:59; 另选的 Kabat-Chothia CDR-H1, (如在 hu3D6VHv1d、hu3D6VHv3c 和 hu3D6VHv4c 中)。

GYTFTDYLLH

SEQ ID NO:60; 另选的 Kabat-Chothia CDR-H1 (如在 hu3D6VHv3b 和 hu3D6VHv4b 中)

GYNFKDYLLH

SEQ ID NO:61; 另选的 Kabat CDR-H2 (如在 hu3D6VHv1bA11B6G2 中)。

WVDPEDGDTVYAPKFQG

SEQ ID NO:62, 另选的 Kabat CDR-H2 (如在 hu3D6VHv1c、hu3D6VHv3b 和 hu3D6VHv4b 中)。

WIDPENGDTVYDEKFQG

SEQ ID NO:63; 另选的 Kabat CDR-H2, 如在 hu3D6VHv1d、hu3D6VHv1f、hu3D6VHv3c 和 hu3D6VHv4c 中)。

WVDPEDGDTVYAEKFQG

SEQ ID NO:64; 另选的 Kabat CDR-H2 (如在 hu3D6VHv1e 中)。

WIDPENGDTVYAEKFQG

SEQ ID NO:65; 另选的 Kabat CDR-H3 (如在 hu3D6VHv1f 中)

LDY

[0788]

SEQ ID NO:66; 小鼠 6A10 抗体的重链可变区。

EVQLQQSGAELVRSGASVKLSCTASGLNIKDYYIHWVKQRPE
QGLEWIGWIDPENDDTEYAPKFQGRATLTDTSSNTAYLQLSSLTS
EDTAVYYCTPLDYWGQGTSTVTVSS

SEQ ID NO:67; 小鼠 6A10 抗体的 Kabat/Chothia 复合物
CDR-H1。

GLNIKDYYIH

SEQ ID NO:68; 小鼠 6A10 抗体的 Kabat CDR-H2。

WIDPENDDTEYAPKFQG

SEQ ID NO:69; 小鼠 6A10 抗体的 Kabat CDR-H3

LDY

SEQ ID NO:70; Mus VH 结构模板(PDB#1CR9_H)

KVKLQQSGAELVRSGASVKLSCTASGFNIKDYIYWVKQRPE
QGLEWIGWIDPENGNSYAPRFQGKATMTADTSLNTAYLQLSSLTS
EDTAVYYCNADLHDYWGQGTTTLTVSS

SEQ ID NO:71; 来自 PCT/IB2017/052544 的图 4A 和图 4B 的共
有 VH 氨基酸序列

EVQLVQSGAEVVKPGALVKISCKASGFNIKDYILHWVRQRP
GQGLEWIGWIDPENGDVYDPKFQGRVTITADTSTNTAYLELGSL
TSEDVAVYFCSTLDFWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO:72; 嵌合 3D6 抗体的重链

[0789]

EVQLQQSGADLVRPGALVKLSCKASGFNIKDYILHWVRQRP
EQGLEWIGWIDPENGDVYDPKFQGKATITADTSSNTAYLQLGSL
TSEDVAVYFCSTLDFWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG
GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:73; 嵌合 3D6 抗体的轻链

DVVMQTPTLTLSTIGQPASISCKSSQSLLDSGKTYLNWLL
QRPQGSPKRLIYLVSKLDGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDL
GVYYCWQGTHFPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST
YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:74; 重链可变结构模型 Acc.# 5MYX-VH_mSt 的氨基酸序列

EVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYIFNNYWINWVKQRPG
QGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLT
SEDSAVYFCAREGYIVYWGGQGLVTVSA

SEQ ID NO:75; 重链可变受体 Acc.# 2RCS-VH_huFrwk 的氨基酸序列

QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDTYMHVVKQRP
EQGLEWIGRIDPANGNTKYDPKFQGKATITADTSSNTAYLQLSSL
TSEDVAVYYCASYYGIIYWGQGTTTLTVSS

SEQ ID NO:76; 人源化 3D6 抗体 hu3D6VHvb1 的重链可变区的氨基酸序列

[0790]

QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDYHLHWVKQRP
EQGLEWIGWIDPENGDTVYDPKFQGKATITADTSSNTAYLQLSSL
TSEDVAVYFCSTLDFWGQGTTTLTVSS

SEQ ID NO:77; 人源化 3D6 抗体 hu3D6VHvb2 的重链可变区的氨基酸序列

EVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGFNIKDYHLHWVRQRP
GKGLEWIGWIDPENGDTVYDPKFQGRATITADTSTDYALELSSL
TSEDVAVYFCSTLDFWGQGLVTVSS

SEQ ID NO:78; 人源化 3D6 抗体 hu3D6VHvb3 的重链可变区的氨基酸序列

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFNIKDYHLHWVRQRP
GKGLEWIGWIDPENGDTIYDPKFQGRATITADTSTDYAMELSSL

RSEDTAVYYCSTLDFWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:79; 人源化 3D6 抗体 hu3D6VHvb4 的重链可变区的氨基酸序列

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFTIKDYLLHWVRQRP
GKGLEWIGWIDPENGDTIYDPKFQGRVTITADTSTDYAYMELSSL
RSEDTAVYYCSTLDFWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:80; 人源化 3D6 抗体 hu3D6VHvb5 的重链可变区的氨基酸序列

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFTIKDYLLHWVRQRP
GKGLEWIGWIDPEDGETIYDPKFQGRVTITADTSTDYAYMELSSL
RSEDTAVYYCSTLDFWGQGTLVTVSS

[0791] SEQ ID NO:81; 轻链可变结构模型 Acc.# 5MYX-VL_mSt 的氨基酸序列

DVVLTTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLNWLLQ
RPGQSPKRLIYVVS KLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLG
VYYCVQGTHFPFTFGSGTKLEIK

SEQ ID NO:82; 轻链可变受体 Acc.# ARX71335-VL_huFrwk 的氨基酸序列

DVVMTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLNWLL
QRPQGSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDL
GVHYCEQGTHFPLTFGAGTKLELK

SEQ ID NO:83; 人源化 3D6 抗体 hu3D6VLvb1 的轻链可变区的氨基酸序列

DVVMTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLDSGKTYLNWLL

QRPQGSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDL
GVHYCWQGTHFPYTFGAGTKLELK

SEQ ID NO:84; 人源化 3D6 抗体 hu3D6VLvb2 的轻链可变区的
氨基酸序列

DVVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLL
QRPQGSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV
GVYYCWQGTHFPYTFGAGTKLEIK

SEQ ID NO:85; 人源化 3D6 抗体 hu3D6VLvb3 的轻链可变区的
氨基酸序列

DVVMTQSPLSLSVTLGEPASISCRSSQSLLDSDGKTYLNWLQ
QRPQGSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV
GVYYCWQGTHFPYTFGQGTKLEIK

[0792]

SEQ ID NO:86; 人源化 3D6 抗体(如在 hu3D6VHvb4 和
hu3D6VHvb5 中)的另选的 Kabat-Chothia 复合物 CDR-H1 的氨基酸序
列

GFTIKDYLLH

SEQ ID NO:87; 人源化 3D6 抗体(如在 hu3D6VHvb3 和
hu3D6VHvb4 中)的另选的 Kabat CDR-H2 的氨基酸序列

WIDPENGDTIYDPKFQG

SEQ ID NO:88; 人源化 3D6 抗体(如在 hu3D6VHvb5 中)的另选
的 Kabat CDR-H2 的氨基酸序列

WIDPEDGETIYDPKFQG

SEQ ID NO:89; 人源化 3D6 抗体(如在 hu3D6VLvb3 中)的另选的

Kabat CDR-L1 的氨基酸序列

RSSQSLLDSDGKTYLN

SEQ ID NO:90; 人源化 3D6 抗体 hu3D6VHvb6 的重链可变区的氨基酸序列

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFTIKDYYLHWVRQRP
GKGLEWIGWIDPEDGETVYDPKFQGRVTITADTSTDYAYMELSSL
RSEDYAVYFCSTLDFWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:91; 人源化 3D6 抗体 hu3D6VHvb7 的重链可变区的氨基酸序列

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFTIKDYYLHWVRQRP
GKGLEWIGWIDPEDGETVYDPKFQGRVTITADTSTDYAYMELSSL
RSEDYAVYYCSTLDFWGQGTLVTVSS

[0793]

SEQ ID NO:92; 人源化 3D6 抗体(如在 hu3D6VHvb6 和 hu3D6VHvb7 中)的另选的 Kabat CDR-H2 的氨基酸序列

WIDPEDGETVYDPKFQG

SEQ ID NO:93; hu3D6VLv2 变体 L54D (也称为 L2-DIM21)的轻链可变区

DVVMYTSPLSLPVTLGQPAISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLL
QRPQGSPRRLIYLVSKDDSGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDV
GVYYCWQGTHFPYTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO:94; hu3D6VLv2 变体 L54G (也称为 L2-DIM7)的轻链可变区

DVVMYTSPLSLPVTLGQPAISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLL

QRPGQSPRRLIYLVSKGDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV
GVYYCWQGTHFPYTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO:95; hu3D6VLv2 变体 L45N 的轻链可变区

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLL
QRPGQSPRRLIYLVSKND SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV
GVYYCWQGTHFPYTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO:96; hu3D6VLv2 变体 L54E 的轻链可变区

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLL
QRPGQSPRRLIYLVSKEDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV
GVYYCWQGTHFPYTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO:97; hu3D6VLv2 变体 L50E 的轻链可变区

[0794]

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLL
QRPGQSPRRLIYEVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV
GVYYCWQGTHFPYTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO:98; hu3D6VLv2 变体 L54Q 的轻链可变区

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLL
QRPGQSPRRLIYLVSKQDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV
GVYYCWQGTHFPYTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO:99; hu3D6VLv2 变体 L50D 的轻链可变区

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLL
QRPGQSPRRLIYDVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV
GVYYCWQGTHFPYTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO:100; hu3D6VLv2 变体 L54K 的轻链可变区

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLL
QRPQGQSPRRLIYLVSKKDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV
GVYYCWQGTHFPYTFGGGGTKLEIK

SEQ ID NO:101; hu3D6VLv2 变体 L54R 的轻链可变区

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLL
QRPQGQSPRRLIYLVSKRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV
GVYYCWQGTHFPYTFGGGGTKLEIK

SEQ ID NO:102; hu3D6VLv2 变体 L54T 的轻链可变区

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLL
QRPQGQSPRRLIYLVSKTDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV
GVYYCWQGTHFPYTFGGGGTKLEIK

[0795] SEQ ID NO:103; hu3D6VLv2 变体 L50G (也称为 L2-DIM22)的
轻链可变区

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLL
QRPQGQSPRRLIYGVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV
GVYYCWQGTHFPYTFGGGGTKLEIK

SEQ ID NO:104; hu3D6VLv2 变体 I48G 的轻链可变区

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLL
QRPQGQSPRRLGYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV
GVYYCWQGTHFPYTFGGGGTKLEIK

SEQ ID NO:105; hu3D6VLv2 变体 I48D 的轻链可变区

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLL
QRPQGQSPRRLDYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV
GVYYCWQGTHFPYTFGGGGTKLEIK

SEQ ID NO:106; hu3D6VLv2 变体 L47G 的轻链可变区

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLL
QRPGQSPRRGIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV
GVYYCWQGTHFPYTFGGGGTKLEIK

SEQ ID NO:107; hu3D6VLv2 变体 Y49E 的轻链可变区

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLL
QRPGQSPRRLIELVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV
GVYYCWQGTHFPYTFGGGGTKLEIK

SEQ ID NO:108; hu3D6VLv2 变体 L54V 的轻链可变区

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLL
QRPGQSPRRLIYLVSKVDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV
GVYYCWQGTHFPYTFGGGGTKLEIK

[0796]

SEQ ID NO:109; hu3D6VLv2 变体 L54S 的轻链可变区

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLL
QRPGQSPRRLIYLVSKSDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV
GVYYCWQGTHFPYTFGGGGTKLEIK

SEQ ID NO:110; hu3D6VLv2 变体 S52G (也称为 L2-DIM9)的轻链可变区

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLL
QRPGQSPRRLIYLVGKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV
GVYYCWQGTHFPYTFGGGGTKLEIK

SEQ ID NO:111; hu3D6VLv2 变体 L47N 的轻链可变区

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLL

QRPQGSPRRNIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV
GVYYCWQGTHFPYTFGGGGTKLEIK

SEQ ID NO:112; hu3D6VLv2 变体 L47D 的轻链可变区

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSGKTYLNWLL
QRPQGSPRRDIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV
GVYYCWQGTHFPYTFGGGGTKLEIK

SEQ ID NO:113; hu3D6VLv2 变体 L47E 的轻链可变区

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSGKTYLNWLL
QRPQGSPRREIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV
GVYYCWQGTHFPYTFGGGGTKLEIK

SEQ ID NO:114; hu3D6VLv2 变体 L47P 的轻链可变区

[0797]

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSGKTYLNWLL
QRPQGSPRRPIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV
GVYYCWQGTHFPYTFGGGGTKLEIK

SEQ ID NO:115; hu3D6VLv2 变体 L47T 的轻链可变区

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSGKTYLNWLL
QRPQGSPRRTIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV
GVYYCWQGTHFPYTFGGGGTKLEIK

SEQ ID NO:116; hu3D6VLv2 变体 L47S 的轻链可变区

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSGKTYLNWLL
QRPQGSPRRSIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV
GVYYCWQGTHFPYTFGGGGTKLEIK

SEQ ID NO:117; hu3D6VLv2 变体 L47A 的轻链可变区

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLL
QRPQGSPRRAIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV
GVYYCWQGTHFPYTFGGGGTKLEIK

SEQ ID NO:118, hu3D6VLv2 变体 L50V 的轻链可变区

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLL
QRPQGSPRRLIYVVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV
GVYYCWQGTHFPYTFGGGGTKLEIK

SEQ ID NO:119; hu3D6VLv2 变体 L37Q_L50G_L54R (也称为
L2-DIM1)的轻链可变区

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLQ
QRPQGSPRRLIYGVSKGDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV
GVYYCWQGTHFPYTFGGGGTKLEIK

[0798]

SEQ ID NO:120; hu3D6VLv2 变体 L37Q_L50G_L54G (也称为
L2-DIM2)的轻链可变区

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLQ
QRPQGSPRRLIYEVS KGDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV
GVYYCWQGTHFPYTFGGGGTKLEIK

SEQ ID NO:121; hu3D6VLv2 变体 L37Q_S52G_L54G (也称为
L2-DIM3)的轻链可变区

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLQ
QRPQGSPRRLIYLVGKGDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV
GVYYCWQGTHFPYTFGGGGTKLEIK

SEQ ID NO:122; hu3D6VLv2 变体 L37Q_S52G_L54R (也称为
L2-DIM4)的轻链可变区

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLQ
QRPQGSPRRLIYLVGKRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV
GVYYCWQGTHFPYTFGGGGTKLEIK

SEQ ID NO:123; hu3D6VLv2 变体 L37Q_S52G_L54T (也称为
L2-DIM5)的轻链可变区

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLQ
QRPQGSPRRLIYLVGKTDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV
GVYYCWQGTHFPYTFGGGGTKLEIK

SEQ ID NO:124; hu3D6VLv2 变体 L37Q_S52G_L54D (也称为
L2-DIM6)的轻链可变区

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLQ
QRPQGSPRRLIYLVGKDDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV
GVYYCWQGTHFPYTFGGGGTKLEIK

[0799]

SEQ ID NO:125; hu3D6VLv2 变体 L37Q_L54R 的轻链可变区

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLQ
QRPQGSPRRLIYLVSKGDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV
GVYYCWQGTHFPYTFGGGGTKLEIK

SEQ ID NO:126; hu3D6VLv2 变体 L37Q_L54G 的轻链可变区

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLQ
QRPQGSPRRLIYLVSKGDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV
GVYYCWQGTHFPYTFGGGGTKLEIK

SEQ ID NO:127; hu3D6VLv2 变体 L37Q_L54D (也称为
L2-DIM12)的轻链可变区

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLQ

QRPQGQSPRRLIYLVSKDDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV
GVYYCWQGTHFPYTFGGGGTKLEIK

SEQ ID NO:128; hu3D6VLv2 变体 L37Q_L50G (也称为
L2-DIM13)的轻链可变区

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLQ
QRPQGQSPRRLIYGVSKLDSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV
GVYYCWQGTHFPYTFGGGGTKLEIK

SEQ ID NO:129; hu3D6VLv2 变体 L37Q_L50D (也称为
L2-DIM14)的轻链可变区

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLQ
QRPQGQSPRRLIYDVSKLDSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV
GVYYCWQGTHFPYTFGGGGTKLEIK

[0800]

SEQ ID NO:130; hu3D6VLv2 变体 L37Q_L54T 的轻链可变区

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLQ
QRPQGQSPRRLIYDVSKLDSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV
GVYYCWQGTHFPYTFGGGGTKLEIK

SEQ ID NO:131; hu3D6VLv2 变体 L37Q_S52G 的轻链可变区

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLQ
QRPQGQSPRRLIYLVGKLDSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV
GVYYCWQGTHFPYTFGGGGTKLEIK

SEQ ID NO:132; hu3D6VLv2 变体 L37Q_L50D_L54G (也称为
L2-DIM17)的轻链可变区

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLQ
QRPQGQSPRRLIYDVSKGDSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV

GVYYCWQGTHFPYTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO:133; hu3D6VLv2 变体 L37Q_L50D_L54R (也称为 L2-DIM18)的轻链可变区

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLQ
QRPGQSPRRLIYDVSKRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV
GVYYCWQGTHFPYTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO:134; hu3D6VLv2 变体 L37Q_L50E_L54G (也称为 L2-DIM19)的轻链可变区

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLQ
QRPGQSPRRLIYEVSKGDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV
GVYYCWQGTHFPYTFGGGTKLEIK

[0801] SEQ ID NO:135; hu3D6VLv2 变体 L37Q_L50E_L54R (也称为 L2-DIM20)的轻链可变区

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLQ
QRPGQSPRRLIYEVSKRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV
GVYYCWQGTHFPYTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO:136; hu3D6VLv2 变体 L37Q_L50G_L54R_G100Q 的轻链可变区

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLQ
QRPGQSPRRLIYGVSKRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV
GVYYCWQGTHFPYTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:137; hu3D6VLv2 变体 L37Q_L50G_L54G_G100Q 的轻链可变区

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLQ

QRPQGSPRRLIYGVSKGDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV
GVYYCWQGTHFPYTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:138; hu3D6VLv2 变体 L37Q_S52G_L54R_G100Q 的
轻链可变区

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLQ
QRPQGSPRRLIYLVGKRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV
GVYYCWQGTHFPYTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:139; hu3D6VLv2 变体 L37Q_S52G_L54D_G100Q 的
轻链可变区

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLQ
QRPQGSPRRLIYLVGKDDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV
GVYYCWQGTHFPYTFGQGTKLEIK

[0802]

SEQ ID NO:140; hu3D6VLv2 变体 L37Q_L50D_L54G_G100Q 的
轻链可变区

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLQ
QRPQGSPRRLIYDVSKGDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV
GVYYCWQGTHFPYTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:141; hu3D6VLv2 变体 L37Q_L50D_L54R_G100Q 的
轻链可变区

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLQ
QRPQGSPRRLIYDVSKRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV
GVYYCWQGTHFPYTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:142; hu3D6VLv2 变体 L37Q_L50V_L54D_G100Q 的
轻链可变区

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLQ
QRPQGQSPRRLIYVVSKDDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV
GVYYCWQGTHFPYTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:143; hu3D6VLv2 变体 L37Q (也称为 L2-DIM8)的轻链可变区

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLQ
QRPQGQSPRRLIYLVSKLDSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV
GVYYCWQGTHFPYTFGGGGTKLEIK

SEQ ID NO:144 hu3D6VLv2 变体 G100Q 的轻链可变区

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLL
QRPQGQSPRRLIYLVSKLDSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV
GVYYCWQGTHFPYTFGQGTKLEIK

[0803]

SEQ ID NO:145 hu3D6VLv2 变体 L37Q_L54E 的轻链可变区

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLQ
QRPQGQSPRRLIYLVSKEDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV
GVYYCWQGTHFPYTFGGGGTKLEIK

SEQ ID NO:146 ; hu3D6VHv1bA11 变体 D60E (也称为 h3D6VHvb8)的重链可变区

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFNIKDYYLHWVRQRP
GQGLEWIGWIDPENGD TVYEPKFQGRATITADTSTD TAYLQLGSLT
SED TAVYFCSTLDFWGQGT LVT VSS

SEQ ID NO:147 hu3D6VHv1bA11 变体 L82cV 的重链可变区

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFNIKDYYLHWVRQRP
GQGLEWIGWIDPENGD TVYDPKFQGRATITADTSTD TAYLQLGSV

TS EDTAVYFCSTLDFWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:148 ; hu3D6VHv1bA11 变体 D60E_L80M_Q81E_L82cV_T83R (也称为 h3D6VHvb9)的重链可变区

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFNIKDY LHWVRQRP
GQGLEWIGWIDPENGDTVYEPKFQGRATITADTSTD TAYMELGSV
RSED TAVYFCSTLDFWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:149; 人源化 3D6 抗体(如在 h3D6VHvb8 和 h3D6VHvb9 中)的另选的 Kabat CDR-H2 的氨基酸序列

WIDPEN GDTVYEPKFQG

SEQ ID NO:150; 人源化 3D6 抗体(如在 hu3D6VLv2 L54D 和 hu3D6VLv2 L37Q_L54D 中)的另选的 Kabat CDR-L2 的氨基酸序列:

[0804]

LVSKDDS

SEQ ID NO:151; 人源化 3D6 抗体(如在 hu3D6VLv2 L54G 和 hu3D6VLv2 L37Q_L54G 中)的另选的 Kabat CDR-L2 的氨基酸序列:

LVSKGDS

SEQ ID NO:152; 人源化 3D6 抗体(如在 hu3D6VLv2 L54N 中)的另选的 Kabat CDR-L2 的氨基酸序列:

LVSKNDS

SEQ ID NO:153; 人源化 3D6 抗体(如在 hu3D6VLv2 L54E 和 hu3D6VLv2 L37Q_L54E 中)的另选的 Kabat CDR-L2 的氨基酸序列:

LVSKEDS

SEQ ID NO:154; 人源化 3D6 抗体(如在 hu3D6VLv2 L50E 中)的

另选的 Kabat CDR-L2 的氨基酸序列:

EVSKLDS

SEQ ID NO:155; 人源化 3D6 抗体(如在 hu3D6VLv2 L54Q 中)的另选的 Kabat CDR-L2 的氨基酸序列:

LVSQKDS

SEQ ID NO:156; 人源化 3D6 抗体(如在 hu3D6VLv2 L50D 和 hu3D6VLv2 L37Q_L50D 中)的另选的 Kabat CDR-L2 的氨基酸序列:

DVSKLDS

SEQ ID NO:157; 人源化 3D6 抗体(如在 hu3D6VLv2 L54K 中)的另选的 Kabat CDR-L2 的氨基酸序列:

[0805]

LVSQKDS

SEQ ID NO:158; 人源化 3D6 抗体(如在 hu3D6VLv2 L54R 和 hu3D6VLv2 L37Q_L54R 中)的另选的 Kabat CDR-L2 的氨基酸序列:

LVSQRDS

SEQ ID NO:159; 人源化 3D6 抗体(如在 hu3D6VLv2 L54T 和 hu3D6VLv2 L37Q_L54T 中)的另选的 Kabat CDR-L2 的氨基酸序列:

LVSQTDS

SEQ ID NO:160; 人源化 3D6 抗体(如在 hu3D6VLv2 L50G 和 hu3D6VLv2 L37Q_L50G 中)的另选的 Kabat CDR-L2 的氨基酸序列:

GVSKLDS

SEQ ID NO:161; 人源化 3D6 抗体(如在 hu3D6VLv2 L54V 中)的

另选的 Kabat CDR-L2 的氨基酸序列:

LVSKVDS

SEQ ID NO:162; 人源化 3D6 抗体(如在 hu3D6VLv2 L54S 中)的另选的 Kabat CDR-L2 的氨基酸序列:

LVSKSDS

SEQ ID NO:163; 人源化 3D6 抗体(如在 hu3D6VLv2 S52G 和 hu3D6VLv2 L37Q_S52G 中)的另选的 Kabat CDR-L2 的氨基酸序列:

LVGKLDS

SEQ ID NO:164; 人源化 3D6 抗体(如在 hu3D6VLv2 L50V 中)的另选的 Kabat CDR-L2 的氨基酸序列:

[0806]

VVSKLDS

SEQ ID NO:165; 人源化 3D6 抗体(如在 hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R 和 hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R_G100Q 中)的另选的 Kabat CDR-L2 的氨基酸序列:

GVSKRDS

SEQ ID NO:166; 人源化 3D6 抗体(如在 hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G 和 hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G_G100Q 中)的另选的 Kabat CDR-L2 的氨基酸序列:

GVSKGDS

SEQ ID NO:167; 人源化 3D6 抗体(如在 hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54G 中)的另选的 Kabat CDR-L2 的氨基酸序列:

LVGKGDS

SEQ ID NO:168; 人源化 3D6 抗体(如在 hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R 和 hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R_G100Q 中)的另选的 Kabat CDR-L2 的氨基酸序列:

LVGKRDS

SEQ ID NO:169; 人源化 3D6 抗体(如在 hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54T 中)的另选的 Kabat CDR-L2 的氨基酸序列:

LVGKTDS

SEQ ID NO:170; 人源化 3D6 抗体(如在 hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54D 和 hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54D_G100Q 中)的另选的 Kabat CDR-L2 的氨基酸序列:

LVGKDDS

[0807] SEQ ID NO:171; 人源化 3D6 抗体(如在 hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54G 和 hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54G_G100Q 中)的另选的 Kabat CDR-L2 的氨基酸序列:

DVSKGDS

SEQ ID NO:172; 人源化 3D6 抗体(如在 hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R 和 hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R_G100Q 中)的另选的 Kabat CDR-L2 的氨基酸序列:

DVSKRDS

SEQ ID NO:173; 人源化 3D6 抗体(如在 hu3D6VLv2 L37Q_L50E_L54G 中)的另选的 Kabat CDR-L2 的氨基酸序列:

EVSKGDS

SEQ ID NO:174; 人源化 3D6 抗体(如在 hu3D6VLv2

L37Q_L50E_L54R 中)的另选的 Kabat CDR-L2 的氨基酸序列:

EVSKRDS

SEQ ID NO:175; 人源化 3D6 抗体(如在 hu3D6VLv2 L37Q_L50V_L54D_G100Q 中)的另选的 Kabat CDR-L2 的氨基酸序列:

VVSKDDS

SEQ ID NO:176; 重链恒定区(IgG1: 同种异型 G1m17,1)的氨基酸序列:

[0808]

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSV MHEA
LHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:177; 轻链恒定区(κ)的氨基酸序列:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK
VDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEEKHKVYAC
EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:178; 3D6 人源化变体(hu3D6VHv1bA11 IgG1 G1m17 同种异型)的成熟重链的氨基酸序列

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISKASGFNIKDY LHWVRQRP
GQGLEWIGWIDPENGD TVYDPKFQGRATITADTSTD TAYLQLGSL

TSEDTAVYFCSTLDFWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG
GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS
SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:179 ; 3D6 人源化变体 (hu3D6VLv2 变体
L37Q_S52G_L54R, L2-DIM4 κ) 的成熟轻链的氨基酸序列

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLQ
QRPQGSPRRLIYLVGKRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV
GVYYCWQGTHFPYTFGGGTLKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT
[0809] ASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:180; 在 N-末端处具有牛 α -乳清蛋白信号肽的 3D6
人源化变体(hu3D6VHv1bA11 IgG1 G1m17 同种异型)的重链的氨基
酸序列

MMSFVSLLLVGILFHATQAEVQLVQSGAEVVKPGATVKISCK
ASGFNIKDYLLHWVRQRPQGQLEWIGWIDPENGDTVYDPKFQGR
ATITADTSTDYALQLGSLTSEDTAVYFCSTLDFWGQGTLVTVSSA
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSVSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN

NYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:181; 在 N-末端处具有牛 α -乳清蛋白信号肽的 3D6 人源化变体(hu3D6VLv2 变体 L37Q_S52G_L54R, L2-DIM4 κ)的轻链的氨基酸序列。

MMSFVSLLLVGILFHATQADVVM TQSPLSLPVT LGQPASISCK
SSQSLLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVGKRDSGVPDRFSG
SGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGG TKLEIKRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKSFNRGEC

[0810] SEQ ID NO:182; 编码在 N-末端处具有牛 α -乳清蛋白信号肽的 3D6 人源化变体(hu3D6VHv1bA11 IgG1 G1m17 同种异型)的重链的核苷酸序列

ATGATGTCCTTTGTCTCTCTGCTCCTGGTTGGCATCCTATTC
CATGCCACCCAGGCCGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCAG
AGGTTGTGAAGCCAGGGGCCACAGTCAAGATCTCCTGTAAGGC
TTCTGGCTTCAACATTAAAGACTACTATCTGCACTGGGTGCGGC
AGAGGCCTGGACAGGGCCTGGAGTGGATTGGATGGATTGATCC
TGAGAATGGTGATACTGTGTATGACCCGAAGTTCCAGGGCAGG
GCCACTATAACAGCAGACACATCCACCGACACAGCCTACCTGC
AGCTCGGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTTCTGT
TCTACCCTGGACTTCTGGGGCCAAGGCACCCTTGTCACAGTCTC
CTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCT
CTAGCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCT
GGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAAC
TCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCC

[0811]

TACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTG
CCCTCCAGCAGCTTGGGACCCAGACCTACATCTGCAACGTGA
ATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTTGAGC
CCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCCAGC
ACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAA
AACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAC
ATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAG
TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGA
CAAAGCCGAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGG
TCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAA
GGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCC
ATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAA
CCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCA
AGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCC
CAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGA
GAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGC
TCCTTCTTCCTCTATTCCAAACTCACCGTGGACAAGAGCAGGTG
GCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTC
TGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGG
GAAATGATGAGATCTCGAG

SEQ ID NO:183; 编码在 N-末端处具有牛 α -乳清蛋白信号肽的
3D6 人源化变体(hu3D6VLv2 变体 L37Q_S52G_L54R, L2-DIM4 κ)的
轻链的核苷酸序列

ATGATGTCCTTTGTCTCTCTGCTCCTGGTTGGCATCCTATTC
CATGCCACCCAGGCCGATGTTGTGATGACCCAGTCTCCACTCTC
TTTGCCCGTTACCCTTGGACAACCTGCCTCCATCTCTTGCAAGT
CAAGTCAGAGCCTCTTAGATAGTGATGGAAAGACATATTTGAAT
TGGTTGCAACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCACGGCGCCTAATCT
ATCTGGTGGGCAAACGGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTTCAG

TGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACACTGAAAATCAGCAGA
GTGGAGGCTGAGGATGTGGGAGTTTATTATTGCTGGCAAGGCAC
ACATTTTCCGTACACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATA
AAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATC
TGATGAGCAGCTTAAGTCCGGAAGTCTAGCGTTGTGTGCCTGC
TGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGT
GGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACA
GAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACC
CTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTAC
GCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAA
AGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAGTGAGATCTCGAG

SEQ ID NO:184; tau 微管结合重复序列 1 的区域(SEQ ID NO:1
的氨基酸残基 255-271)的氨基酸序列

[0812] NVKSKIGSTENLKHQPG

SEQ ID NO:185; tau 微管结合重复序列 2 的区域(SEQ ID NO:1
的氨基酸残基 286-302)的氨基酸序列

NVQSKCGSKDNIKHVPG

SEQ ID NO:186; tau 微管结合重复序列 3 的区域(SEQ ID NO:1
的氨基酸残基 317-333)的氨基酸序列

KVTSKCGSLGNIHHKPG

SEQ ID NO:187; tau 微管结合重复序列 4 的区域(SEQ ID NO:1
的氨基酸残基 349-365)的氨基酸序列

RVQSKIGSLDNITHVPG

SEQ ID NO:188; 由 3D6 结合的 tau 的核心基序的氨基酸序列

KIGSTENLKH

SEQ ID NO:189; 由 3D6 结合的 tau 的 tau 序列 N-末端至核心基序的氨基酸序列

NVKS

SEQ ID NO:190; 由 3D6 结合的 tau 的 tau 序列 C-末端至核心基序的氨基酸序列

QPG

SEQ ID NO:191; 3D6 的表位的氨基酸序列

[0813]

KXXSXXNX(K/H)H

SEQ ID NO:192; 由 3D6 结合的 tau 的核心基序的氨基酸序列

KCGSKDNIKH

SEQ ID NO:193; 由 3D6 结合的 tau 的核心基序的氨基酸序列

KCGSLGNIHH

SEQ ID NO:194; 由 3D6 结合的 tau 的核心基序的氨基酸序列

KIGSLDNITH

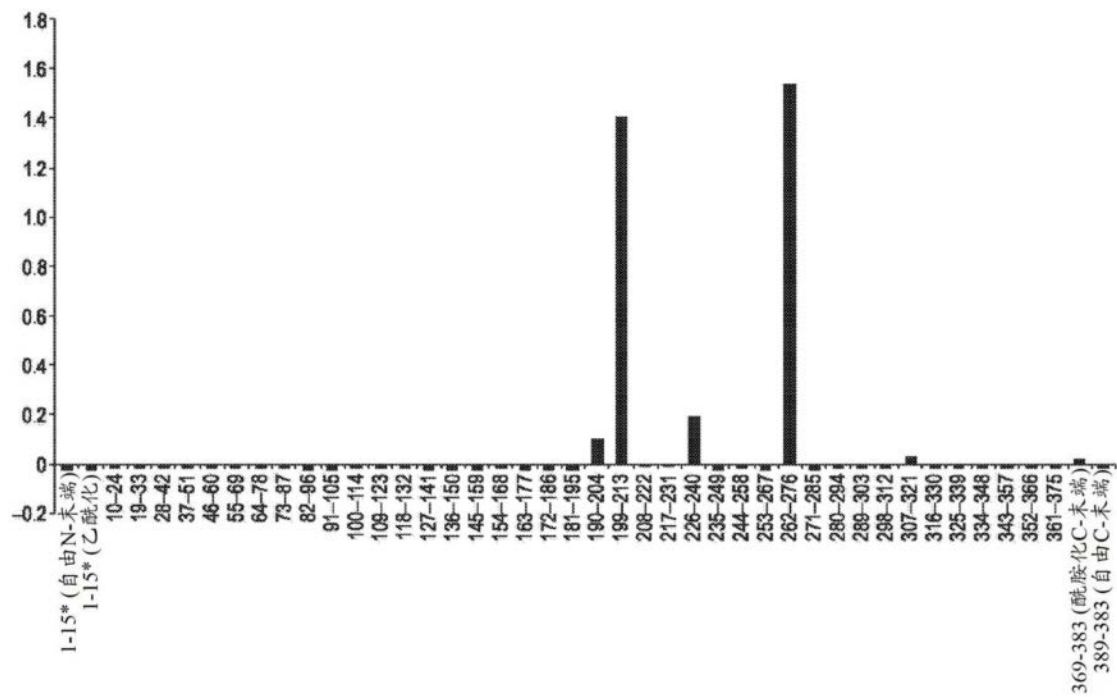


图1

小鼠3D6VH	E V Q L Q Q S G A D L V R P G A L V K K L S C K A S G F N I K D Y Y L H H W V R Q R	40
IGHV1-69-2*01	E V Q L V Q S G A E L V K K P G A I V K I S C K V S G Y T F D Y Y M H W V Q Q A	40
2RCS VH hFrwk	Q V Q L Q Q S G A E L V K K P G A S V K L S C T A S G F N I K D Y Y L H H W V K Q R	40
hu3D6 VHvb1	Q V Q L Q Q S G A E L V K K P G A S V K L S C T A S G F N I K D Y Y L H H W V K Q R	40
hu3D6 VHvb2	E V Q L V Q S G A E V V K P G A S V K I S C K A S G F N I K D Y Y L H H W V R Q R	40
hu3D6 VHvb3	E V Q L V Q S G A E V V K P G A T V K I S C K A S G F N I K D Y Y L H H W V R Q R	40
hu3D6 VHvb4	E V Q L V Q S G A E V V K P G A T V K I S C K A S G F N I K D Y Y L H H W V R Q R	40
hu3D6 VHvb5	E V Q L V Q S G A E V V K P G A T V K I S C K A S G F N I K D Y Y L H H W V R Q R	40
hu3D6 VHvb6	E V Q L V Q S G A E V V K P G A T V K I S C K A S G F N I K D Y Y L H H W V R Q R	40
hu3D6 VHvb7	E V Q L V Q S G A E V V K P G A T V K I S C K A S G F N I K D Y Y L H H W V R Q R	40
小鼠3D6VH	P E Q G L E W I G W I D P E N G D T V Y D P K F Q G K A T I T A D T S S N T A Y	80
IGHV1-69-2*01	P G K G L E W M G L V D P E D G E T I Y A E K F Q G R V T I T A D T S T D T A Y	80
2RCS VH hFrwk	P E Q G L E W I G R I D P A N G D T K Y D P K F Q G K A T I T A D T S S N T A Y	80
hu3D6 VHvb1	P E Q G L E W I G W I D P E N G D T V Y D P K F Q G K A T I T A D T S S N T A Y	80
hu3D6 VHvb2	P G K G L E W I G W I D P E N G D T V Y D P K F Q G R A T I T A D T S T D T A Y	80
hu3D6 VHvb3	P G K G L E W I G W I D P E N G D T I Y D P K F Q G R A T I T A D T S T D T A Y	80
hu3D6 VHvb4	P G K G L E W I G W I D P E N G D T I Y D P K F Q G R V T I T A D T S T D T A Y	80
hu3D6 VHvb5	P G K G L E W I G W I D P E D G E T I Y D P K F Q G R V T I T A D T S T D T A Y	80
hu3D6 VHvb6	P G K G L E W I G W I D P E D G E T V Y D P K F Q G R V T I T A D T S T D T A Y	80
hu3D6 VHvb7	P G K G L E W I G W I D P E D G E T V Y D P K F Q G R V T I T A D T S T D T A Y	80
小鼠3D6VH	L Q L G S L T S E D T A V Y F C S T L D - - F W G Q G T T L T V S S	112
IGHV1-69-2*01	M E L S S L R S E D T A V Y Y C A T - Q - - H W G Q G T L T V S S	111
2RCS VH hFrwk	L Q L S S L T S E D T A V Y Y C A S Y Y G I Y W G Q G T T L T V S S	114
hu3D6 VHvb1	L Q L S S L T S E D T A V Y F C S T L D - - F W G Q G T T L T V S S	112
hu3D6 VHvb2	L E L S S L T S E D T A V Y F C S T L D - - F W G Q G T L T V T V S S	112
hu3D6 VHvb3	M E L S S L R S E D T A V Y Y C S T L D - - F W G Q G T L T V T V S S	112
hu3D6 VHvb4	M E L S S L R S E D T A V Y Y C S T L D - - F W G Q G T L T V T V S S	112
hu3D6 VHvb5	M E L S S L R S E D T A V Y Y C S T L D - - F W G Q G T L T V T V S S	112
hu3D6 VHvb6	M E L S S L R S E D T A V Y F C S T L D - - F W G Q G T L T V T V S S	112
hu3D6 VHvb7	M E L S S L R S E D T A V Y Y C S T L D - - F W G Q G T L T V T V S S	112

图2

小鼠3D6VL	10	20	30	40	40
ARX71335_VL_hFrwk	D V V M T Q T P L T L S V T I G Q P A S I S C K S S Q S L L D S D G K T Y L N W				40
IGKV2-30*02	D V V M T Q T P L T L S V T I G Q P A S I S C K S S Q S L L Y S N G K T Y L N W				40
hu3D6VLvb1	D V V M T Q S P L S L P V T L G Q P A S I S C R S S Q S L V H S D G N T Y L N W				40
hu3D6VLvb2	D V V M T Q T P L T L S V T I G Q P A S I S C K S S Q S L L D S D G K T Y L N W				40
hu3D6VLvb3	D V V M T Q S P L S L S V T L G Q P A S I S C K S S Q S L L D S D G K T Y L N W				40
	50	60	70	80	
小鼠3D6VL	90	100	110		80
ARX71335_VL_hFrwk	L L Q R P G Q S P K R L I Y L V S K L D S G V P D R R F T G S G S G T D F T L K I				80
IGKV2-30*02	L L Q R P G Q S P K R L I Y L V S K L D S G V P D R R F T G S G S G T D F T L K I				80
hu3D6VLvb1	F Q Q R P G Q S P K R L I Y K V S N R D S G V P D R R F T G S G S G T D F T L K I				80
hu3D6VLvb2	L L Q R P G Q S P K R L I Y L V S K L D S G V P D R R F T G S G S G T D F T L K I				80
hu3D6VLvb3	L L Q R P G Q S P K R L I Y L V S K L D S G V P D R R F T G S G S G T D F T L K I				80
	90	100	110		80
小鼠3D6VL	S R V E A E D L G V Y Y C W Q G T H F P Y T F G G G T K L E I K				112
ARX71335_VL_hFrwk	S R V E A E D L G V H Y C E Q G T H F P Y T F G G G T K L E I K				112
IGKV2-30*02	S R V E A E D V G V Y Y C M Q G T H F P Y T F G G G T K L E I K				112
hu3D6VLvb1	S R V E A E D L G V H Y C W Q G T H F P Y T F G G G T K L E I K				112
hu3D6VLvb2	S R V E A E D V G V Y Y C W Q G T H F P Y T F G G G T K L E I K				112
hu3D6VLvb3	S R V E A E D V G V Y Y C W Q G T H F P Y T F G G G T K L E I K				112

图3

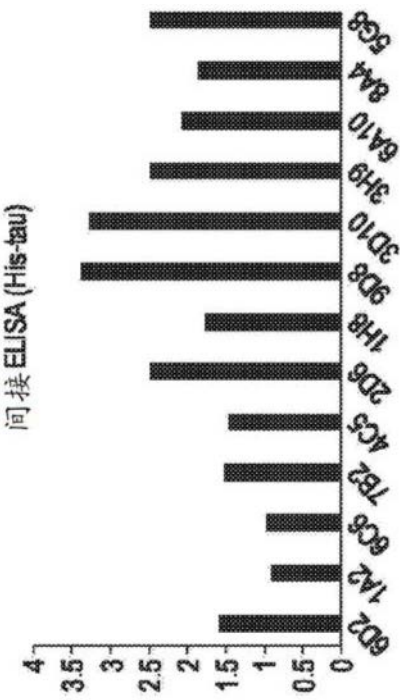


图4A

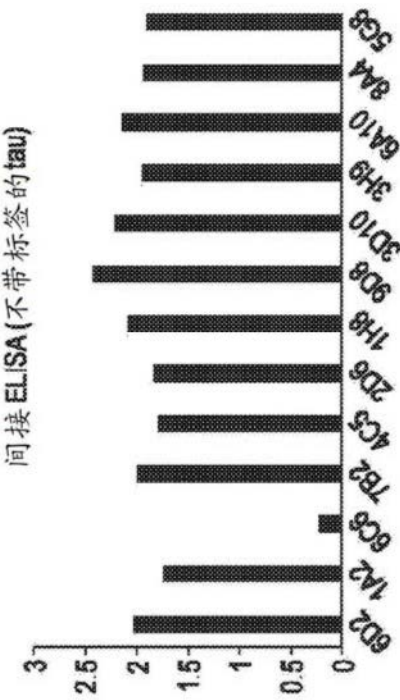


图4B

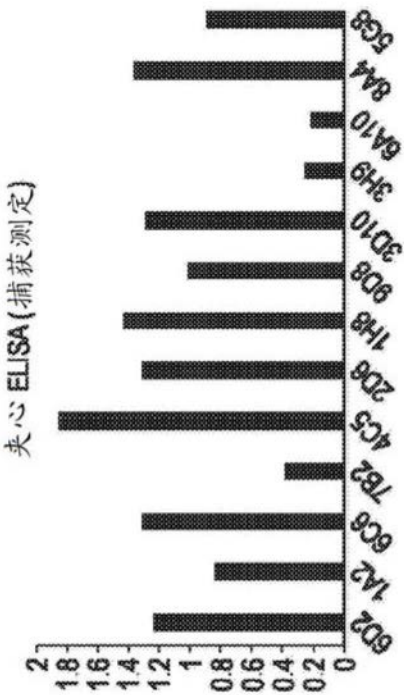


图4C

名称	$k_a(M^{-1}s^{-1})$	$k_d(s^{-1})$	$k_D(nM)$
3D6	2.58×10^6	1.19×10^{-3}	0.46
1H8	5.07×10^5	5.61×10^{-3}	11.1
3H9	4.71×10^5	1.41×10^{-3}	3.0
5G8	3.75×10^5	2.54×10^{-3}	6.78
6D2	3.83×10^5	3.18×10^{-3}	8.29
7G6	5.76×10^5	3.32×10^{-3}	5.77
8A4	5.99×10^5	2.27×10^{-3}	3.8

图5

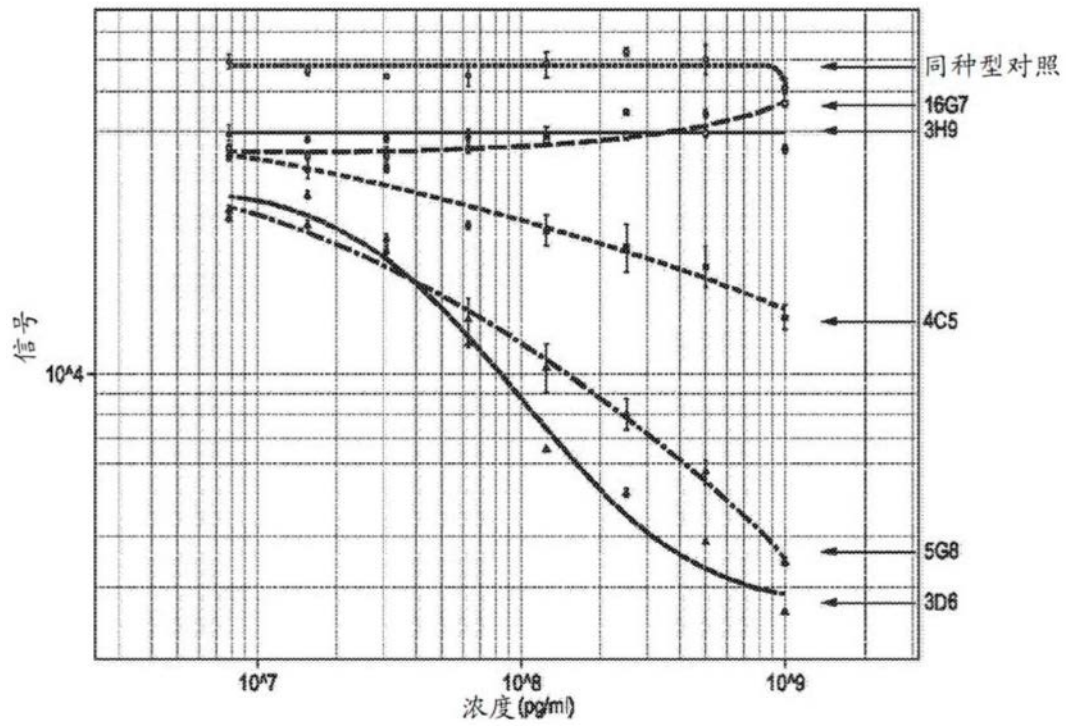


图6

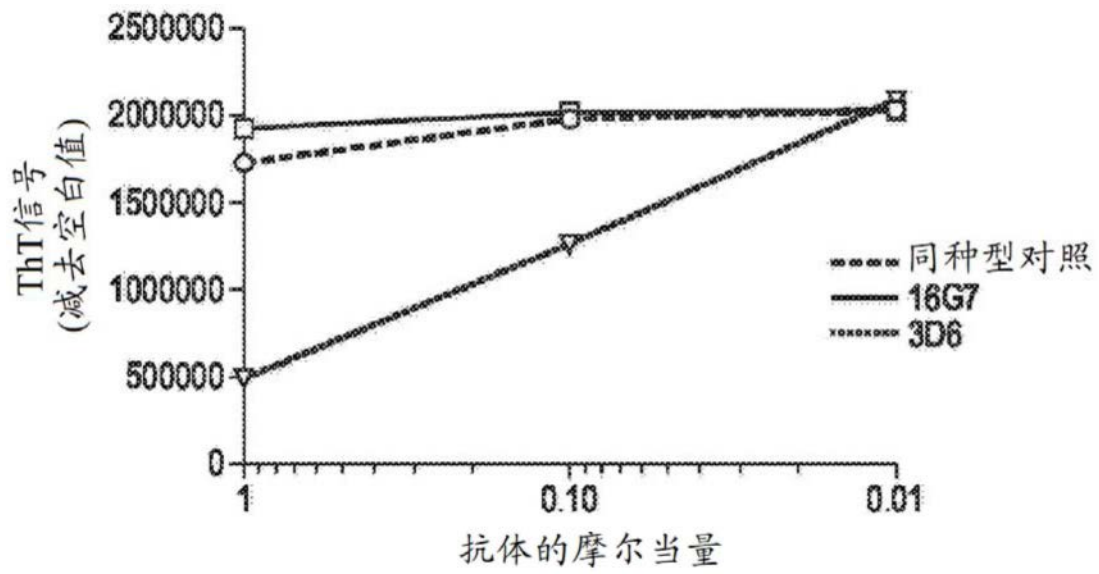


图7

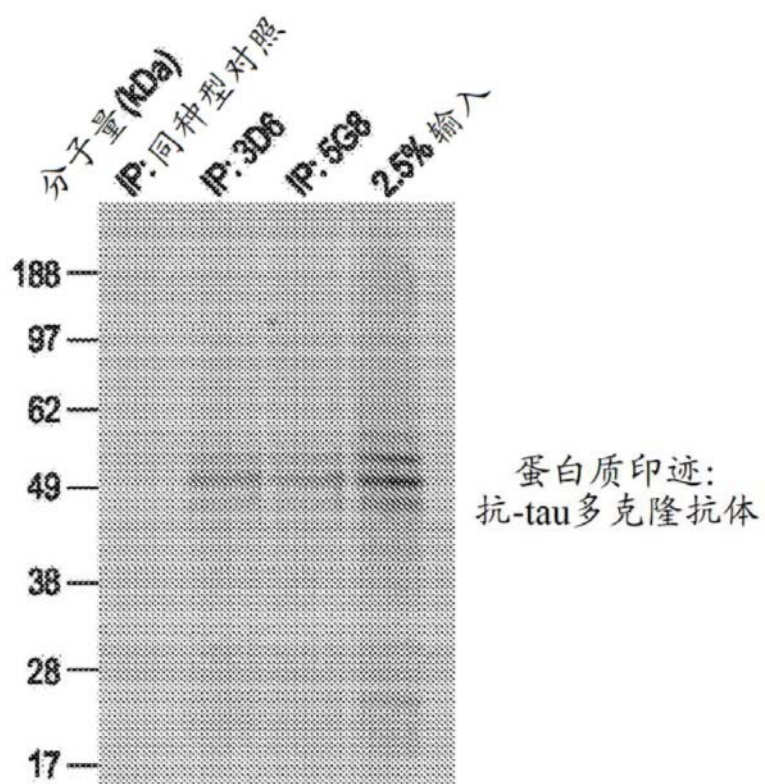


图8

	10	20	30	40
鼠3D6VH	EVQLQQSGADLVRRPGALVKLSCKASG	FN	IKDY	YLHWRQR
IGHV1-69-2*01	..V..EVKK..T..I..V..YTFT..M..Q.A			
2RCS VH hFrwk	Q...E..K..S..T..T..T..M..K..			
hu3D6 VHvb1	Q...E..K..S..T..T..T..M..K..			
hu3D6 VHvb2	..V..EV..K..S..I..T..T..T..T..			
hu3D6 VHvb3	..V..EV..K..T..I..T..T..T..T..			
hu3D6 VHvb4	..V..EV..K..T..I..T..T..T..T..			
hu3D6 VHvb5	..V..EV..K..T..I..T..T..T..T..			
hu3D6 VHvb6	..V..EV..K..T..I..T..T..T..T..			
hu3D6 VHvb7	..V..EV..K..T..I..T..T..T..T..			
hu3D6VHv1bA11	..V..EV..K..T..I..T..T..T..T..			
h3D6 VHvb8	..V..EV..K..T..I..T..T..T..T..			
h3D6 VHvb9	..V..EV..K..T..I..T..T..T..T..			

	50	60	70	80
鼠3D6VH	PEQGLEWIGWIDPENGD	TVYD	PKFQG	KATITADTSSNTAY
IGHV1-69-2*01	GK...M.LV..D.E.I.AE..RV..TD..			
2RCS VH hFrwk	..R..A..N.K..T..T..T..T..T..			
hu3D6 VHvb1	..R..A..N.K..T..T..T..T..T..			
hu3D6 VHvb2	..R..A..N.K..T..T..T..T..T..			
hu3D6 VHvb3	..R..A..N.K..T..T..T..T..T..			
hu3D6 VHvb4	..R..A..N.K..T..T..T..T..T..			
hu3D6 VHvb5	..R..A..N.K..T..T..T..T..T..			
hu3D6 VHvb6	..R..A..N.K..T..T..T..T..T..			
hu3D6 VHvb7	..R..A..N.K..T..T..T..T..T..			
hu3D6VHv1bA11	..R..A..N.K..T..T..T..T..T..			
h3D6 VHvb8	..R..A..N.K..T..T..T..T..T..			
h3D6 VHvb9	..R..A..N.K..T..T..T..T..T..			

图9A

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

图9B

	40	50	60
	D S D G K T Y L N W L L Q R P G Q S P R R L I Y L V S K L D		
hu3D6VLv2	.	.	.
hu3D6VLv2 L37Q	.	.	.
hu3D6VLv2 L50G	.	.	.
hu3D6VLv2 S52G	.	.	.
hu3D6VLv2 L54G	.	.	.
hu3D6VLv2 L54D	.	.	.
hu3D6VLv2 L54K	.	.	.
hu3D6VLv2 L54R	.	.	.
hu3D6VLv2 L54T	.	.	.
hu3D6VLv2 L37Q_L50G	.	.	.
hu3D6VLv2 L37Q_L50D	.	.	.
hu3D6VLv2 L37Q_S52G	.	.	.
hu3D6VLv2 L37Q_L54G	.	.	.
hu3D6VLv2 L37Q_L54R	.	.	.
hu3D6VLv2 L37Q_L54T	.	.	.
hu3D6VLv2 L37Q_L54D	.	.	.
hu3D6VLv2 L37Q_L54E	.	.	.
hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R	.	.	.
hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G	.	.	.
hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R	.	.	.
hu3D6VLv2 L37Q_L50E_L54R	.	.	.
hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54G	.	.	.
hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54D	.	.	.
hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54G	.	.	.
hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54T	.	.	.
hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R	.	.	.
hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54G_G100Q	.	.	.
hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R_G100Q	.	.	.
hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G_G100Q	.	.	.
hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R_G100Q	.	.	.
hu3D6VLv2 L37Q_L50V_L54D_G100Q	.	.	.
hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54D_G100Q	.	.	.
hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R_G100Q	.	.	.

图10B

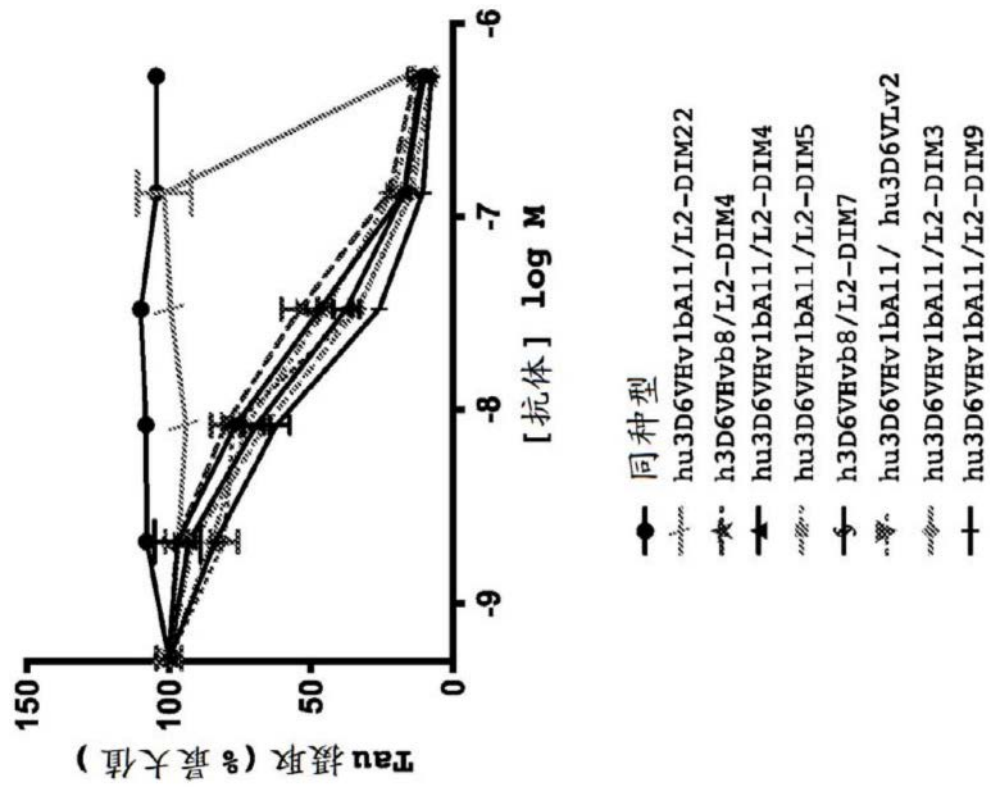


图11

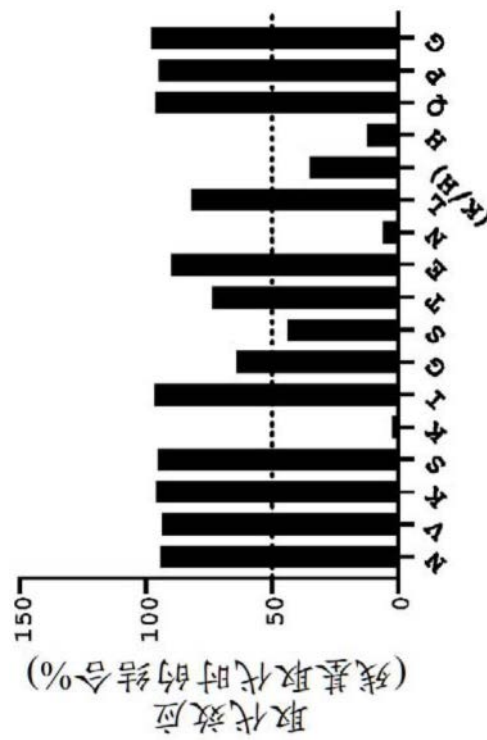


图12A

微管结合重复序列1	{aa 255-271}	N	V	K	S	K	I	G	S	T	E	N	L	Λ	K	H	Q	P	G
微管结合重复序列2	{aa 286-302}	N	V	Q	S	K	C	G	S	K	D	N	I		K	H	V	P	G
微管结合重复序列3	{aa 317-333}	K	V	T	S	K	C	G	S	L	G	N	I		H	H	K	P	G
微管结合重复序列4	{aa 349-365}	R	V	Q	S	K	I	G	S	L	D	N	I		T	H	V	P	G

重要的3D6结合残基

Λ 在重复序列4中不保守的重要残基

图12B

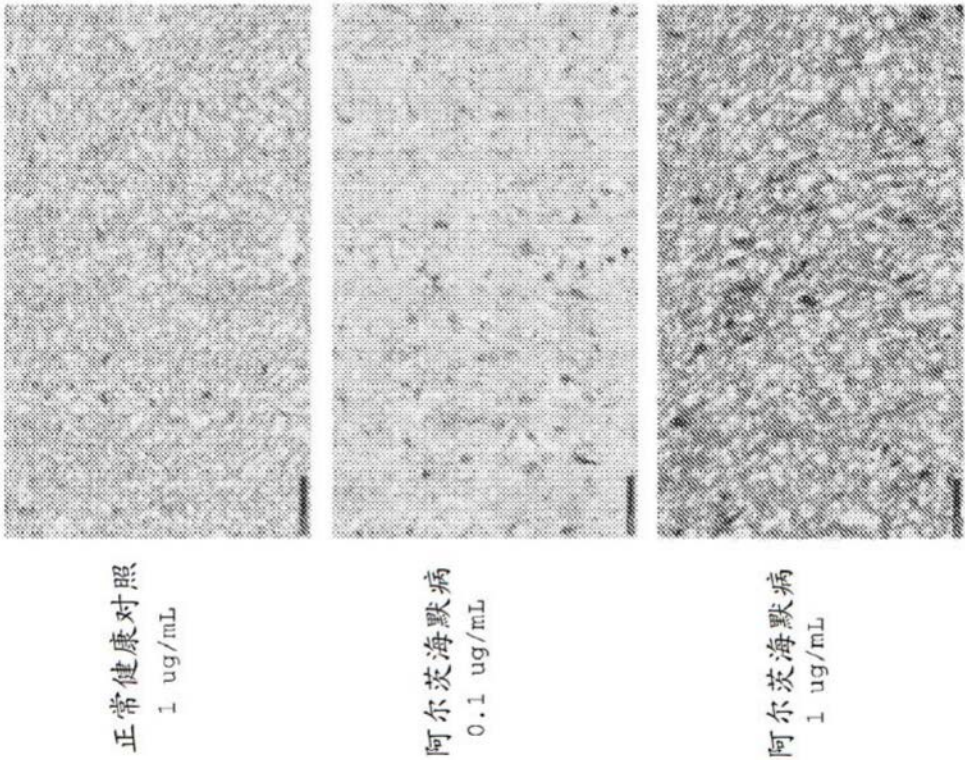


图13

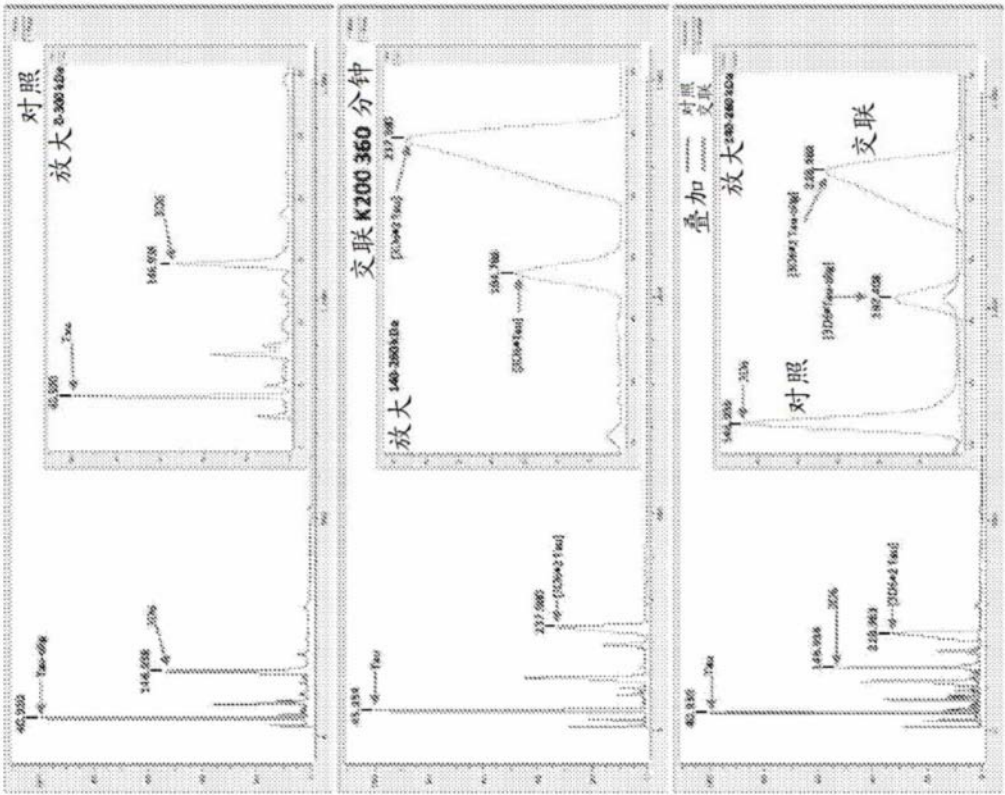


图14

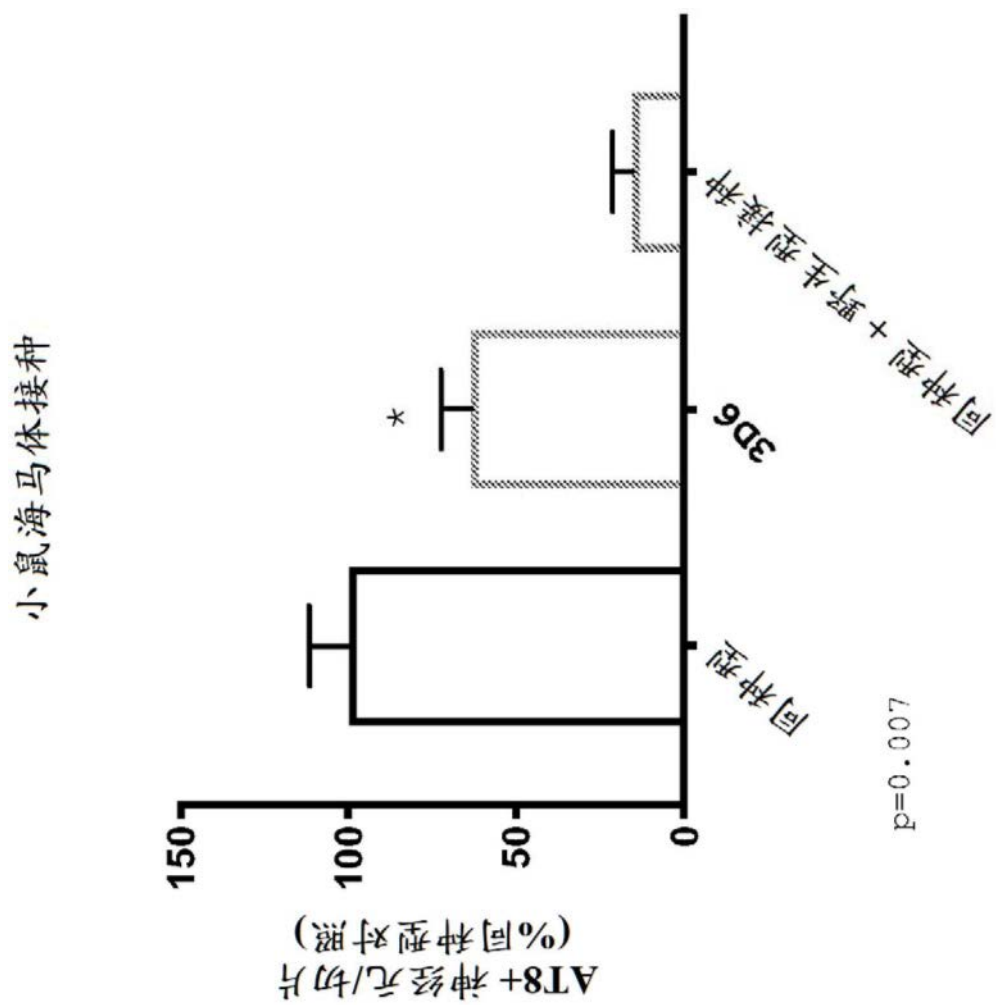


图15

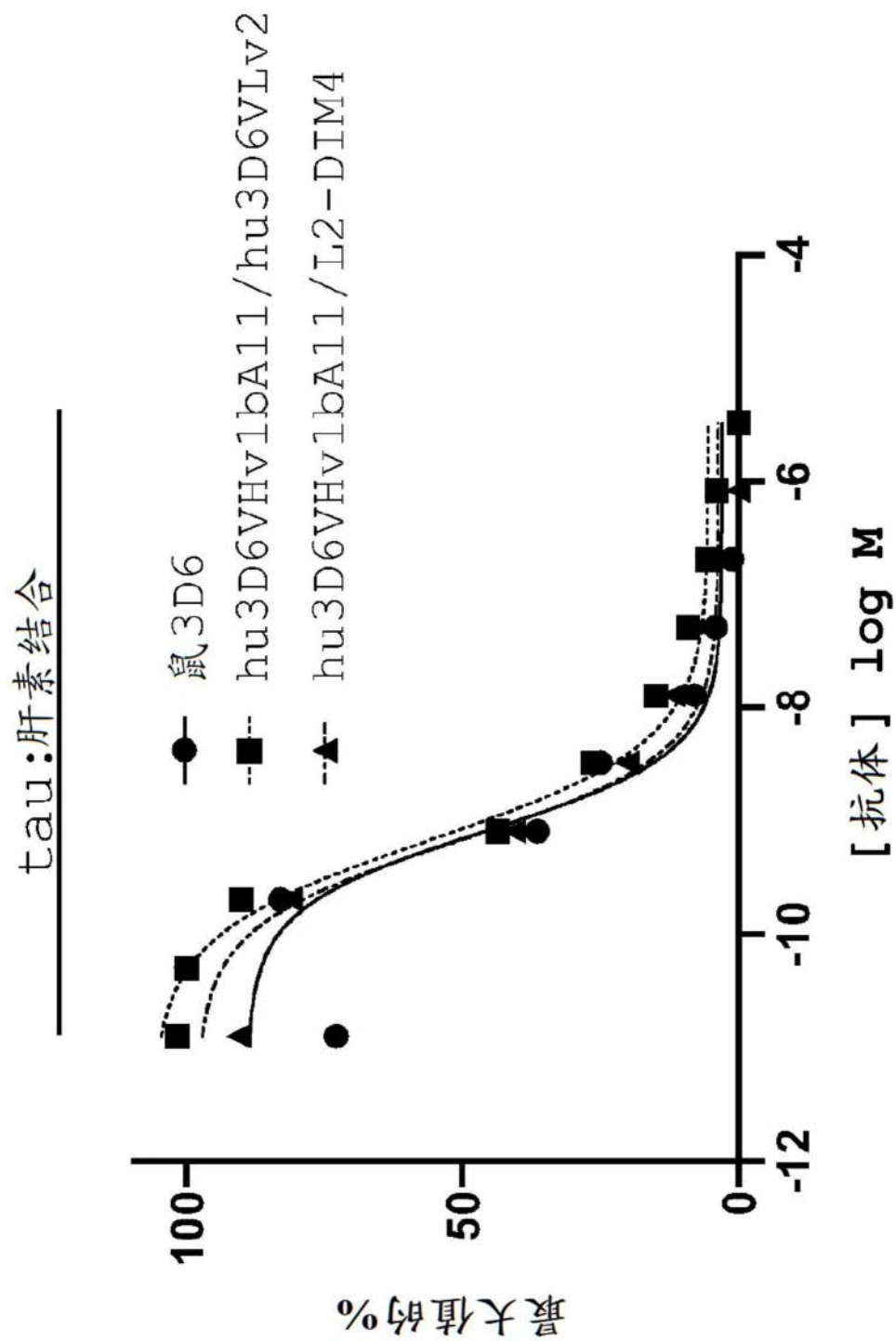


图16

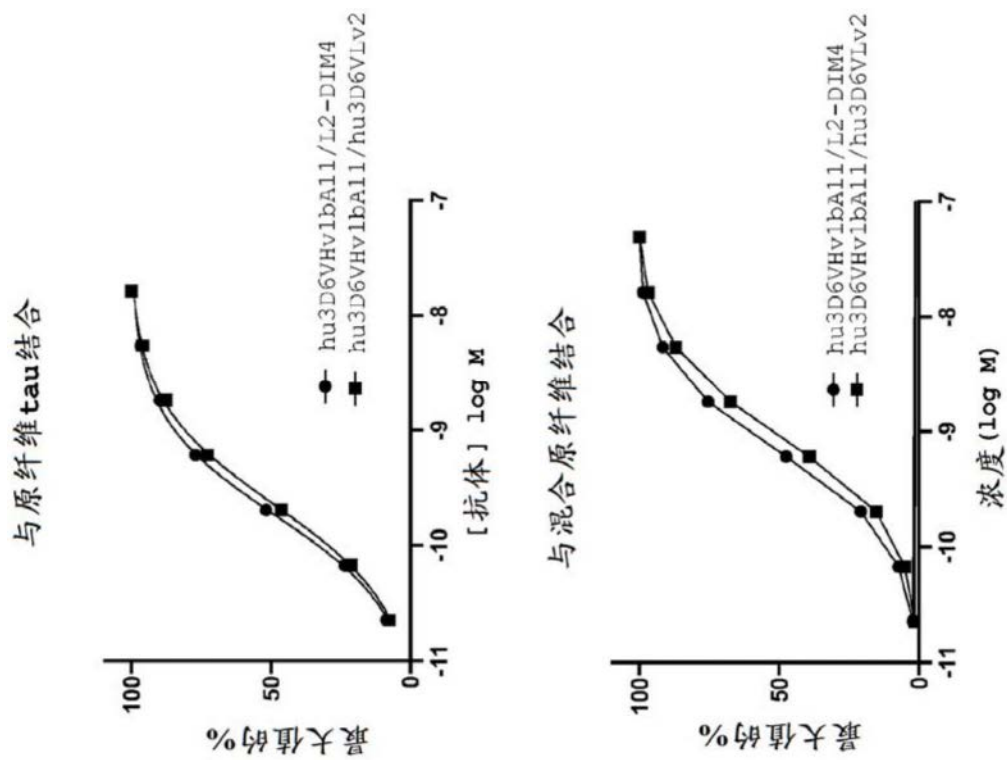


图17