



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106831983 B

(45) 授权公告日 2021.11.30

(21) 申请号 201610907892.2
(22) 申请日 2007.07.13
(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106831983 A
(43) 申请公布日 2017.06.13
(30) 优先权数据
06014730.3 2006.07.14 EP
06020765.1 2006.10.02 EP
60/943,289 2007.06.11 US
60/943,499 2007.06.12 US
(62) 分案原申请数据
200780033976.7 2007.07.13
(83) 生物保藏信息
DSM ACC 2750 2005.12.01
(73) 专利权人 AC免疫有限公司
地址 瑞士洛桑
专利权人 基因技术公司
(72) 发明人 A·普法伊费尔 M·皮尔格伦
A·穆斯 R·沃茨
(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247
代理人 柴云峰 黄革生
(51) Int.Cl.
C07K 16/18 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 25/16 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

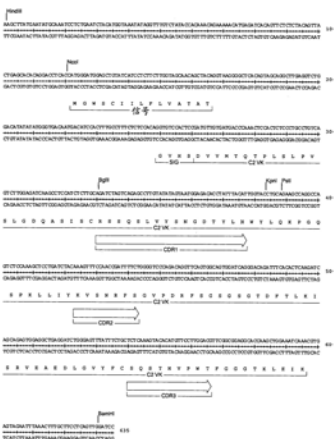
(56) 对比文件
EP 1613347 A2,2006.01.11
WO 2004071408 A2,2004.08.26
Deane,R等.IgG-assisted age-dependent clearance of Alzheimer's amyloid beta peptide by the blood-brain barrier neonatal Fc receptor.《JOURNAL OF NEUROSCIENCE》.2005,第25卷(第50期),
夏骏等.β淀粉样蛋白多肽人源性抗体的筛选与鉴定.《南京医科大学学报(自然科学版)》.2004,(第4期),
徐武华等.阿尔茨海默病患者自身抗β淀粉样蛋白抗体的免疫特性和临床价值.《中华老年医学杂志》.2006,(第2期),

审查员 曲肖男

权利要求书9页 说明书55页
序列表14页 附图21页

(54) 发明名称
针对淀粉状蛋白β的人源化抗体

(57) 摘要
本发明涉及嵌合抗体和人源化抗体,以及涉及在治疗淀粉状变性中应用的用于治疗 and 诊断的方法和组合物,所述淀粉状变性是一组与淀粉状蛋白相关的疾病和异常,诸如阿尔茨海默病。



CN 106831983 B

1. 人源化抗体或人源化抗体的活性片段,其识别并结合至 β -淀粉状蛋白,所述人源化抗体或人源化抗体的活性片段包含 (i) 人类来源的构架区, (ii) 重链可变区,包含代表重链可变区CDR1的SEQ ID NO:1的氨基酸序列;代表重链可变区CDR2的SEQ ID NO:2的氨基酸序列;和代表重链可变区CDR3的SEQ ID NO:3的氨基酸序列, (iii) 轻链可变区,包含代表轻链可变区CDR1的SEQ ID NO:4的氨基酸序列;代表轻链可变区CDR2的SEQ ID NO:5、RVSNRFS或KVSSRFS的氨基酸序列;和代表轻链可变区CDR3的SEQ ID NO:6的氨基酸序列;其中所述人源化抗体包含与SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少95%同一的重链可变区和/或与SEQ ID NO:12的氨基酸序列至少95%同一的轻链可变区,其中重链可变区的构架区中Kabat位置94的氨基酸是Ser。

2. 根据权利要求1的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,其中氨基酸序列SEQ ID NO:5代表轻链可变区CDR2。

3. 根据权利要求1的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,其中氨基酸序列RVSNRFS或者KVSSRFS代表轻链可变区CDR2。

4. 根据权利要求1的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,其包含构架区,其中所述构架区的序列是KABAT亚组V_HIII的人类种系V_H序列。

5. 根据权利要求1的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,其中重链可变区的构架区中Kabat位置47的氨基酸是Leu。

6. 根据权利要求1的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,其中 (a) 轻链可变区的构架区中Kabat位置87的氨基酸是Phe或Tyr;和/或 (b) Kabat位置45的氨基酸是Lys或Gln。

7. 根据权利要求1的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,其中: (a) 重链可变区的构架区的Kabat位置47的氨基酸为Leu;并且 (b) 轻链可变区的构架区的Kabat位置87的氨基酸为Phe或Tyr。

8. 根据权利要求1的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,其中所述抗体包含由SEQ ID NO:14的氨基酸序列组成的轻链恒定区。

9. 根据权利要求1的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,其中所述抗体包含由SEQ ID NO:17的氨基酸序列组成的重链恒定区。

10. 根据权利要求1的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,其中所述抗体包含与SEQ ID NO:13的氨基酸序列至少95%同一的轻链。

11. 根据权利要求1的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,其中所述抗体包含与SEQ ID NO:13的氨基酸序列至少98%同一的轻链。

12. 根据权利要求1的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,其中所述抗体包含与SEQ ID NO:16的氨基酸序列至少95%同一的重链。

13. 根据权利要求1的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,其中所述抗体包含与SEQ ID NO:16的氨基酸序列至少98%同一的重链。

14. 根据权利要求1的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,其中所述抗体包含与SEQ ID NO:16的氨基酸序列至少95%同一的重链,其中所述重链缺少C-末端Lys。

15. 根据权利要求1的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,其中所述抗体包含与SEQ ID NO:16的氨基酸序列至少98%同一的重链,其中所述重链缺少C-末端Lys。

16. 根据权利要求1的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,其中所述抗体包含轻链和

重链,所述轻链与SEQ ID NO:13的氨基酸序列至少95%同一和所述重链与SEQ ID NO:16的或者缺少C-末端Lys的SEQ ID NO:16的氨基酸序列至少95%同一。

17.根据权利要求1的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,其中所述抗体包含轻链和重链,所述轻链与SEQ ID NO:13的氨基酸序列至少98%同一和所述重链与SEQ ID NO:16的或者缺少C-末端Lys的SEQ ID NO:16的氨基酸序列至少98%同一。

18.根据权利要求1的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,所述人源化抗体或人源化抗体的活性片段包含轻链可变区,所述轻链可变区与SEQ ID NO:12的氨基酸序列至少95%同一。

19.根据权利要求1的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,所述人源化抗体或人源化抗体的活性片段包含轻链可变区,所述轻链可变区与SEQ ID NO:12的氨基酸序列至少98%同一。

20.根据权利要求1的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,所述人源化抗体或人源化抗体的活性片段包含重链可变区,所述重链可变区与SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少95%同一。

21.根据权利要求1的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,所述人源化抗体或人源化抗体的活性片段包含重链可变区,所述重链可变区与SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少98%同一。

22.根据权利要求1的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,其中所述抗体包含轻链可变区和重链可变区,所述轻链可变区与SEQ ID NO:12的氨基酸序列至少95%同一和所述重链可变区与SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少95%同一。

23.根据权利要求1的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,其中所述抗体包含轻链可变区和重链可变区,所述轻链可变区与SEQ ID NO:12的氨基酸序列至少98%同一和所述重链可变区与SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少98%同一。

24.根据权利要求1-23任一项的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,所述抗体是IgG1、IgG2、IgG3、或IgG₄同种型,或者是突变的IgG4同种型。

25.根据权利要求1的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,所述抗体显示出聚集抑制特性和解聚特性这两种特性。

26.根据权利要求1的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,所述抗体

a) 在与β-淀粉状蛋白单体肽和/或聚合的可溶性β-淀粉状蛋白肽,和/或包含多个所述β-淀粉状蛋白单体肽的聚合可溶性β-淀粉状蛋白肽共孵育后,抑制了β-淀粉状蛋白单体肽聚集成高分子的聚合原纤维或纤丝,以及

b) 在与由淀粉状蛋白单体肽的聚集形成的预形成的高分子聚合β-淀粉状蛋白原纤维或纤丝共孵育后,能够解聚所述预形成的聚合原纤维或纤丝。

27.根据权利要求26的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,其中所述β-淀粉状蛋白单体肽和/或聚合的可溶性β-淀粉状蛋白肽包含β-淀粉状蛋白单体肽的氨基酸残基1-39、1-40、1-41或1-42。

28.根据权利要求26的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,其中所述β-淀粉状蛋白单体肽和/或聚合的可溶性β-淀粉状蛋白肽包含β-淀粉状蛋白单体肽的氨基酸残基1-42。

29.根据权利要求26的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,其中所述β-淀粉状蛋白

单体肽包含 β -淀粉状蛋白单体肽的肽1-39、1-40、1-41和1-42。

30. 根据权利要求1的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,所述抗体特异结合至哺乳动物脑中聚集的A β 。

31. 根据权利要求1的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,所述抗体降低哺乳动物脑中A β 斑块负荷。

32. 根据权利要求1的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,其中抗体是IgG4同种型。

33. 药物组合物,其包含权利要求1-32中任一项所述的人源化抗体或人源化抗体的活性片段。

34. 根据权利要求33的药物组合物,用于预防、治疗或减轻淀粉状变性的一种或多种影响。

35. 根据权利要求34的药物组合物,其中所述淀粉状变性是阿尔茨海默病。

36. 根据权利要求34的药物组合物,其中所述淀粉状变性是路易体痴呆(Lewy body dementia)、荷兰型遗传性脑出血伴淀粉状变性、进行性核上性麻痹、多发性硬化、关岛帕金森-痴呆综合征、克-雅二氏病(Creutzfeldt Jacob disease)或帕金森氏病。

37. 根据权利要求34的药物组合物,其中所述淀粉状变性是唐氏综合征(Down's syndrome)、HIV-相关痴呆、肌萎缩性侧索硬化症、成年发病型糖尿病、老年性心脏淀粉状变性、内分泌肿瘤或黄斑变性。

38. 用于检测和诊断淀粉状蛋白相关疾病和病症的测试试剂盒,其包含根据权利要求1-32中任一项所述的人源化抗体或人源化抗体的活性片段。

39. 核酸分子,其包含编码根据权利要求1-32任一项的人源化抗体或人源化抗体的活性片段的核苷酸序列。

40. 核酸分子,其包含编码权利要求1-32任一项的人源化抗体或人源化抗体的活性片段的重链可变区和轻链可变区的核苷酸序列。

41. 核酸分子对,其中所述核酸分子对的一个核酸分子编码权利要求1-32任一项的人源化抗体或其活性片段的包含SEQ ID NO:22的核苷酸序列的轻链并且所述核酸分子对的另一个核酸分子编码包含SEQ ID NO:25的核苷酸序列的重链。

42. 包含权利要求39或40的核酸分子或权利要求41的核酸分子对的表达载体。

43. 细胞,其包含权利要求39或40的核酸分子或权利要求41的核酸分子对或权利要求42的表达载体。

44. 组合物,其包含根据权利要求1-32任一项的人源化抗体或人源化抗体的活性片段。

45. 根据权利要求44的组合物,其为包含可药用载体的药物组合物。

46. 混合物,所述混合物包含治疗有效量的根据权利要求1-32任一项的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,以及一种或多种如下物质:生物活性物质、可药用载体、稀释剂、或赋形剂。

47. 根据权利要求46的混合物,其中生物活性物质是在治疗淀粉状变性中使用的化合物。

48. 根据权利要求47的混合物,其包含至少一种以下化合物:抗氧化应激的化合物、抗细胞凋亡的化合物、金属螯合剂、DNA修复抑制剂、3-氨基-1-丙磺酸、1,3-丙二磺酸、 α -分泌

酶活化剂、 β -和 γ -分泌酶抑制剂、 τ 蛋白、神经递质、 β 折叠破坏剂、淀粉状蛋白 β 清除/减少细胞内组分的引诱剂、N端截短淀粉状蛋白 β 的抑制剂、消炎分子、或胆碱酯酶抑制剂；或M1激动剂。

49. 根据权利要求48的混合物，其中所述DNA修复抑制剂是哌仑西平。

50. 根据权利要求48的混合物，其中所述N端截短淀粉状蛋白 β 的抑制剂是焦谷氨酸化淀粉状蛋白 β 3-42。

51. 根据权利要求48的混合物，其中所述胆碱酯酶抑制剂是他克林、卡巴拉汀、多奈哌齐或加兰他敏。

52. 根据权利要求48的混合物，其中所述混合物包含淀粉状蛋白修饰药物或 τ 修饰药物或营养补充剂。

53. 根据权利要求48的混合物，其中所述混合物包含胆碱酯酶抑制剂。

54. 根据权利要求53的混合物，其中所述胆碱酯酶抑制剂是他克林、卡巴拉汀、多奈哌齐、加兰他敏、烟酸或美金刚胺。

55. 根据权利要求46至54任一项的混合物，其包含治疗有效量的生物活性物质。

56. 根据权利要求1-32任一项的人源化抗体或人源化抗体的活性片段，或根据权利要求33-37任一项的药物组合物，和/或根据权利要求44和45任一项的组合物，或根据权利要求46至55任一项的混合物在制备治疗阿尔茨海默氏病(AD)的药物中的用途。

57. 根据权利要求1-32任一项的人源化抗体或人源化抗体的活性片段，或根据权利要求33-37任一项的药物组合物，和/或根据权利要求44和45任一项的组合物，或根据权利要求46至55任一项的混合物在制备治疗与脑中淀粉状蛋白斑的形成相关的疾病或病症的药物中的用途。

58. 根据权利要求57的用途，其中所述与脑中淀粉状蛋白斑的形成相关的疾病或病症是路易体痴呆、荷兰型遗传性脑出血伴淀粉状变性、进行性核上性麻痹、多发性硬化、关岛帕金森-痴呆综合征、克-雅二氏病(Creutzfeldt Jacob disease)或帕金森氏病。

59. 根据权利要求1-32任一项的人源化抗体或人源化抗体的活性片段，或根据权利要求33-37任一项的药物组合物，和/或根据权利要求44和45任一项的组合物，或根据权利要求46至55任一项的混合物在制备治疗唐氏综合征、HIV-相关痴呆、肌萎缩性侧索硬化症、成年发病型糖尿病、老年性心脏淀粉状变性、内分泌肿瘤或黄斑变性的药物中的用途。

60. 根据权利要求57的用途，其中所述与脑中淀粉状蛋白斑的形成相关的疾病或病症以哺乳动物或人认知记忆能力丧失为特征。

61. 根据权利要求60的用途，其中哺乳动物或人的治疗导致认知记忆能力的保持。

62. 根据权利要求60的用途，其中治疗哺乳动物或人导致认知记忆能力的升高。

63. 根据权利要求60的用途，其中治疗哺乳动物或人导致认知记忆能力的完全恢复。

64. 根据权利要求57到63任一项的用途，其中所述人源化抗体或者其活性片段结合脑中聚集的淀粉状蛋白 β 。

65. 制备用于治疗阿尔茨海默氏病(AD)的方法中的根据权利要求33-37任一项的药物组合物，或根据权利要求44-45任一项的组合物，或根据权利要求46至55任一项的混合物的方法，包括以可药用形式配制根据权利要求1-32任一项的人源化抗体或其活性片段。

66. 制备用于治疗与脑中淀粉状蛋白斑的形成相关的疾病或病症的方法中的根据权利要求

要求33-37任一项的药物组合物,或根据权利要求44-45任一项的组合物,或根据权利要求46至55任一项的混合物的方法,包括以可药用形式配制权利要求1-32任一项的人源化抗体或其活性片段。

67.根据权利要求66的方法,其中所述与脑中淀粉状蛋白斑的形成相关的疾病或病症是路易体痴呆、荷兰型遗传性脑出血伴淀粉状变性、进行性核上性麻痹、多发性硬化、关岛帕金森-痴呆综合征、克-雅二氏病(Creutzfeldt Jacob disease)或帕金森氏病,包括以可药用形式配制权利要求1-32任一项的人源化抗体或其活性片段。

68.制备用于治疗唐氏综合征、肌萎缩性侧索硬化症、成年发病型糖尿病、老年性心脏淀粉状变性、内分泌肿瘤或黄斑变性的方法的根据权利要求33-37任一项的药物组合物,或根据权利要求44-45任一项的组合物,或根据权利要求46至55任一项的混合物的方法。

69.用于检测和诊断淀粉状蛋白相关疾病和病症的试剂盒,其包含在一个或多个容器中的根据权利要求1-32任一项的人源化抗体或人源化抗体的活性片段。

70.根据权利要求69的试剂盒,其包含容纳一种或多种根据权利要求1-32任一项的人源化抗体或其活性片段的容器,以及使用抗体的说明书。

71.根据权利要求1-32任一项的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,所述抗体或其活性片段特异结合 β -淀粉状蛋白单体肽,但不显示出显著的与淀粉状蛋白前体蛋白的交叉反应性。

72.根据权利要求71的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,其中所述人源化抗体或人源化抗体的活性片段以具有在 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 至 $1 \times 10^{-12} \text{M}$ 范围内的 K_D 的结合亲和力结合至AB单体,但不显示出显著的与淀粉状蛋白前体蛋白的交叉反应性。

73.根据权利要求71的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,其中所述人源化抗体或人源化抗体的活性片段以具有在 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 至 $1 \times 10^{-11} \text{M}$ 范围内的 K_D 的结合亲和力结合至AB单体,但不显示出显著的与淀粉状蛋白前体蛋白的交叉反应性。

74.根据权利要求71的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,其中所述人源化抗体或人源化抗体的活性片段以具有在 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 至 $1 \times 10^{-10} \text{M}$ 范围内的 K_D 的结合亲和力结合至AB单体,但不显示出显著的与淀粉状蛋白前体蛋白的交叉反应性。

75.根据权利要求71的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,其中所述人源化抗体或人源化抗体的活性片段以具有在 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 至 $5 \times 10^{-8} \text{M}$ 范围内的 K_D 的结合亲和力结合至AB单体,但不显示出显著的与淀粉状蛋白前体蛋白的交叉反应性。

76.根据权利要求1-32任一项的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,所述抗体或其活性片段特异结合A β 纤维、原纤维或纤丝,但不显示出显著的与淀粉状蛋白前体蛋白的交叉反应性。

77.根据权利要求76的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,其中所述人源化抗体或其活性片段以具有在 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 至 $1 \times 10^{-12} \text{M}$ 范围的 K_D 的结合亲和力结合至A β 纤维、原纤维或纤丝,但不显示出任何显著的与淀粉状蛋白前体蛋白的交叉反应性。

78.根据权利要求76的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,其中所述人源化抗体或其活性片段以具有在 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 至 $1 \times 10^{-11} \text{M}$ 范围的 K_D 的结合亲和力结合至A β 纤维、原纤维或纤丝,但不显示出任何显著的与淀粉状蛋白前体蛋白的交叉反应性。

79.根据权利要求76的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,其中所述人源化抗体或

其活性片段以具有在 1×10^{-9} M至 1×10^{-10} M范围的 K_D 的结合亲和力结合至AB纤维、原纤维或纤丝,但不显示出任何显著的与淀粉状蛋白前体蛋白的交叉反应性。

80. 根据权利要求76的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,其中所述人源化抗体或其活性片段以具有在 2×10^{-9} M至 8×10^{-9} M范围的 K_D 的结合亲和力结合至AB纤维、原纤维或纤丝,但不显示出任何显著的与淀粉状蛋白前体蛋白的交叉反应性。

81. 根据权利要求1-32任一项的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,所述抗体或其活性片段特异结合可溶的聚合淀粉状蛋白 β ,但不显示出任何显著的与淀粉状蛋白前体蛋白的交叉反应性。

82. 根据权利要求1-32任一项的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,所述抗体或其活性片段特异结合 β -淀粉状蛋白单体肽和/或AB纤维、原纤维或纤丝和/或可溶的聚合淀粉状蛋白 β ,但不显示出任何显著的与淀粉状蛋白前体蛋白的交叉反应性。

83. 根据权利要求82的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,其中所述抗体或其活性片段以比所述抗体或其活性片段与 β -淀粉状蛋白单体肽的结合亲和力高至少10倍的结合亲和力结合至AB纤维、原纤维或纤丝。

84. 根据权利要求82的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,其中所述抗体或其活性片段以比所述抗体或其活性片段与 β -淀粉状蛋白单体肽的结合亲和力高至少15倍的结合亲和力结合至AB纤维、原纤维或纤丝。

85. 根据权利要求82的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,其中所述抗体或其活性片段以比所述抗体或其活性片段与 β -淀粉状蛋白单体肽的结合亲和力高至少20倍的结合亲和力结合至AB纤维、原纤维或纤丝。

86. 根据权利要求82的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,其中所述抗体或其活性片段以比所述抗体或其活性片段与 β -淀粉状蛋白单体肽的结合亲和力高至少25倍的结合亲和力结合至AB纤维、原纤维或纤丝。

87. 根据权利要求1-32任一项的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,其中所述抗体或其活性片段特异结合至哺乳动物脑中的聚集的AB,但不显示出任何显著的与淀粉状蛋白前体蛋白的交叉反应性。

88. 根据权利要求87的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,其中所述聚集的AB是A β 斑。

89. 根据权利要求87的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,其中所述哺乳动物脑是人脑。

90. 根据权利要求1-32任一项的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,其中所述抗体或其活性片段特异结合至哺乳动物脑中的可溶AB纤维,但不显示出任何显著的与淀粉状蛋白前体蛋白的交叉反应性。

91. 根据权利要求90的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,其中所述可溶AB纤维是 β -淀粉状蛋白单体肽。

92. 根据权利要求90的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,其中所述哺乳动物脑是人脑。

93. 根据权利要求1-32任一项的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,其中所述抗体或其活性片段能够通过诱导构象的转变和结合并稳定组织和/或体液中解聚的和溶解的AB

形式,从而通过使纤维解聚为可溶的聚合和单体形式,使可溶和聚集状态的A β 之间的平衡转向其可溶形式。

94.根据权利要求93的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,其中所述组织是脑组织。

95.根据权利要求93的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,其中所述抗体或其活性片段能够诱导 β 折叠构象向 α 螺旋和/或无规则卷曲构象,这导致了以 β 折叠构象为代价的无规则卷曲构象的增加,以及预形成的高分子聚合淀粉状蛋白原纤维或纤丝的溶解的提高。

96.根据权利要求95的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,其中当与在缓冲液中孵育的分别的预形成的高分子聚合淀粉状蛋白原纤维或纤丝相比较, β 折叠构象减少了至少30%。

97.根据权利要求95的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,其中当与在缓冲液中孵育的分别的预形成的高分子聚合淀粉状蛋白原纤维或纤丝相比较, β 折叠构象减少了至少35%。

98.根据权利要求95的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,其中当与在缓冲液中孵育的分别的预形成的高分子聚合淀粉状蛋白原纤维或纤丝相比较, β 折叠构象减少了至少40%。

99.根据权利要求93的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,其中所述抗体或其活性片段特异结合至聚合的和包括单体形式在内的较少聚集的可溶A β 蛋白种类,由此改变这些A β 蛋白种类的外周的清除和代谢,并且降低它们的毒性作用。

100.根据权利要求1-32任一项的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,其中所述抗体或其活性片段具有比包含含有SEQ ID NO:28的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的轻链可变区的小鼠抗体高至少5倍的对A β 的亲合力。

101.根据权利要求1-32任一项的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,其中所述抗体或其活性片段具有比包含含有SEQ ID NO:28的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的轻链可变区的小鼠供体抗体高至少8倍的对A β 的亲合力。

102.根据权利要求1-32任一项的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,其中所述抗体或其活性片段具有比包含含有SEQ ID NO:28的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的轻链可变区的小鼠供体抗体高至少10倍的对A β 的亲合力。

103.根据权利要求1-32任一项的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,其中所述抗体或其活性片段具有比包含含有SEQ ID NO:28的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的轻链可变区的小鼠供体抗体高至少15倍的对A β 的亲合力。

104.根据权利要求1-32任一项的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,其中所述抗体或其活性片段保护神经元免于A β 诱导的退化。

105.根据权利要求1-32任一项的人源化抗体或人源化抗体的活性片段在制备用于防止暴露于A β 寡聚体后的神经元变性的组合物中的用途。

106.根据权利要求30或31的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,其中所述哺乳动物脑是人脑。

107.产生根据权利要求1-32任一项的人源化抗体或人源化抗体的活性片段的方法,包括产生来自权利要求43的细胞的人源化抗体或人源化抗体的活性片段的步骤。

108.权利要求107的方法,还包括纯化由细胞产生的人源化抗体或人源化抗体的活性

片段的步骤。

109. 产生根据权利要求1-32任一项的人源化抗体或人源化抗体的活性片段的方法,包括表达独立地选自根据权利要求39到40任一项的核酸分子或权利要求41的核酸分子对的一种或多种核酸分子。

110. 根据权利要求1-32任一项的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,或根据权利要求33-37任一项的药物组合物,和/或根据权利要求44和45任一项的组合物,或根据权利要求46至55任一项的混合物用于制备减轻阿尔茨海默氏病(AD)的效果的药物的用途。

111. 根据权利要求1-32任一项的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,或根据权利要求33-37任一项的药物组合物,和/或根据权利要求44和45任一项的组合物,或根据权利要求46至55任一项的混合物用于制备减轻与脑中淀粉状蛋白斑的形成相关的疾病或病症的效果的药物的用途。

112. 根据权利要求111的用途,其中所述与脑中淀粉状蛋白斑的形成相关的疾病或病症是路易体痴呆、荷兰型遗传性脑出血伴淀粉状变性、进行性核上性麻痹、多发性硬化、关岛帕金森-痴呆综合征、克-雅二氏病(Creutzfeldt Jacob disease)或帕金森氏病。

113. 根据权利要求1-32任一项的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,或根据权利要求33-37任一项的药物组合物,和/或根据权利要求44和45任一项的组合物,或根据权利要求46至55任一项的混合物用于制备减轻唐氏综合征、肌萎缩性侧索硬化症、成年发病型糖尿病、老年性心脏淀粉状变性、内分泌肿瘤或黄斑变性的效果的药物的用途。

114. 根据权利要求111的用途,其中所述与脑中淀粉状蛋白斑的形成相关的疾病或病症的特征是哺乳动物或人类中认知记忆能力丧失。

115. 根据权利要求1-32任一项的人源化抗体或人源化抗体的活性片段,或根据权利要求33-37任一项的药物组合物,和/或根据权利要求44和45任一项的组合物,或根据权利要求46至55任一项的混合物用于制备在受试者中保护神经元免受A β 诱导的退化的药物的用途。

116. 根据权利要求115的用途,其中所述受试者患有与哺乳动物脑中淀粉状蛋白斑的形成相关的疾病或病症。

117. 根据权利要求116的用途,其中所述与脑中淀粉状蛋白斑的形成相关的疾病或病症是路易体痴呆、荷兰型遗传性脑出血伴淀粉状变性、进行性核上性麻痹、多发性硬化、关岛帕金森-痴呆综合征、克-雅二氏病(Creutzfeldt Jacob disease)或帕金森氏病。

118. 根据权利要求115的用途,其中所述受试者患有唐氏综合征、肌萎缩性侧索硬化症、成年发病型糖尿病、老年性心脏淀粉状变性、内分泌肿瘤或黄斑变性。

119. 根据权利要求116的用途,其中所述与哺乳动物脑中淀粉状蛋白斑的形成相关的疾病或病症的特征是认知记忆能力丧失。

120. 根据权利要求119的用途,其中所述哺乳动物脑是人脑。

121. 制备用于在受试者中保护神经元免于A β 诱导的退化的方法中的根据权利要求33-37任一项的药物组合物,或根据权利要求44和45任一项的组合物,或根据权利要求46至55任一项的混合物的方法,包括以可药用形式配制权利要求1-32任一项的人源化抗体或其活性片段。

122. 根据权利要求121的方法,其中所述受试者患有与脑中淀粉状蛋白斑的形成相关

的疾病或病症,所述方法包括以可药用形式配制权利要求1-32任一项的人源化抗体或其活性片段。

123.根据权利要求122的方法,其中所述与脑中淀粉状蛋白斑的形成相关的疾病或病症是路易体痴呆、荷兰型遗传性脑出血伴淀粉状变性、进行性核上性麻痹、多发性硬化、关岛帕金森-痴呆综合征、克-雅二氏病(Creutzfeldt Jacob disease)或帕金森氏病,包括以可药用形式配制权利要求1-32任一项的人源化抗体或其活性片段。

124.根据权利要求121的方法,其中所述受试者患有唐氏综合征、肌萎缩性侧索硬化症、成年发病型糖尿病、老年性心脏淀粉状变性、内分泌肿瘤或黄斑变性,所述方法包括以可药用形式配制权利要求1-32任一项的人源化抗体或其活性片段。

125.制备用于减轻阿尔茨海默氏病(AD)的效果的方法的根据权利要求33-37任一项的药物组合物,或根据权利要求44和45任一项的组合物,或根据权利要求46至55任一项的混合物的方法,包括以可药用形式配制权利要求1-32任一项的人源化抗体或其活性片段。

126.制备用于减轻与脑中淀粉状蛋白斑的形成相关的疾病或病症的效果的方法的根据权利要求33-37任一项的药物组合物,或根据权利要求44和45任一项的组合物,或根据权利要求46至55任一项的混合物的方法,包括以可药用形式配制权利要求1-32任一项的人源化抗体或其活性片段。

127.根据权利要求126的方法,其中所述与脑中淀粉状蛋白斑的形成相关的疾病或病症是路易体痴呆、荷兰型遗传性脑出血伴淀粉状变性、进行性核上性麻痹、多发性硬化、关岛帕金森-痴呆综合征、克-雅二氏病(Creutzfeldt Jacob disease)或帕金森氏病,包括以可药用形式配制权利要求1-32任一项的人源化抗体或其活性片段。

128.制备用于减轻唐氏综合征、肌萎缩性侧索硬化症、成年发病型糖尿病、老年性心脏淀粉状变性、内分泌肿瘤或黄斑变性的效果的方法的根据权利要求33-37任一项的药物组合物,或根据权利要求44和45任一项的组合物,或根据权利要求46至55任一项的混合物的方法,包括以可药用形式配制权利要求1-32任一项的人源化抗体或其活性片段。

针对淀粉状蛋白 β 的人源化抗体

[0001] 本申请是申请日为2007年7月13日、发明名称为“针对淀粉状蛋白 β 的人源化抗体”的中国专利申请200780033976.7 (国际申请号PCT/US2007/073504) 的分案申请。

[0002] 本发明涉及用于淀粉状变性的诊断和治疗的方法和组合物,所述淀粉状变性是一组与淀粉状蛋白相关的病症和异常,诸如阿尔茨海默病。

[0003] 淀粉状变性不是单一的疾病实体,而是一群多种以蜡状的、淀粉样蛋白(称之为淀粉状蛋白,它们积累在一个或一个以上的器官或身体系统中)细胞外组织的沉积为特征的进行性疾病过程。随着淀粉状蛋白沉积物聚集,它们开始干扰器官或身体系统的正常功能。至少存在15种不同类型的淀粉状变性。主要形式是没有已知前例的原发性淀粉状变性,一些其它疾病之后的继发性淀粉状变性,和遗传性淀粉状变性。

[0004] 继发性淀粉状变性发生在慢性感染或炎症性疾病,诸如结核病、称为家族性地中海热的细菌感染、骨感染(骨髓炎)、类风湿性关节炎、小肠发炎(肉芽肿性回肠炎)、霍奇金病和麻风病期间。

[0005] 淀粉状蛋白沉积物包括淀粉状蛋白P(五边形)成分P、与正常血清淀粉状蛋白P相关的糖蛋白(SAP)和结缔组织的复合碳水化合物硫酸盐化的糖胺聚糖(GAG)。占淀粉状蛋白物质的90%的淀粉状蛋白原纤维(fibril)包含数种不同类型蛋白中的一种。这些蛋白能够折叠为所谓的“ β -折叠”片状原纤维,这种独特的蛋白构型显示出对刚果红(Congo red)的结合部位,导致了淀粉状蛋白的独特的着色性质。

[0006] 许多老年疾病基于或与淀粉状蛋白样蛋白有关,并且部分地以促进疾病发生和疾病进程的淀粉状蛋白或淀粉状蛋白样物质的细胞外沉积的积累为特征。这些疾病包括但不限于神经疾病,诸如阿尔茨海默病(AD)、路易体痴呆(Lewy body dementia)、唐氏综合征(Down's syndrome)、遗传性脑出血伴淀粉状变性(荷兰型);关岛帕金森-痴呆综合征。其它基于淀粉状蛋白样蛋白或与其相关的疾病是进行性核上性麻痹、多发性硬化、克-雅二氏病(Creutzfeldt Jacob disease)、帕金森氏病、HIV相关痴呆、ALS(肌萎缩性侧索硬化症)、成年发病型糖尿病、老年性心脏淀粉状变性、内分泌肿瘤以及其它疾病,包括黄斑变性。

[0007] 尽管这些疾病的发病机理可能是不同的,但它们的特征性沉积物经常含有许多共同的分子成分。在显著程度上,这些可能归因于促进发炎途径的局部活化从而导致活化的补体组分、急性期反应物、免疫调节剂及其它发炎介质的同时沉积(McGeer等,1994)。

[0008] 阿尔茨海默病(AD)是一种神经疾病,主要认为由淀粉状蛋白斑,即在脑中蛋白质异常沉积的积累所引起的。在感染个体脑中发现的最常见的淀粉状蛋白的类型主要包含A β 原纤维。科学证据表明在斑块中 β -淀粉状蛋白的产生和累积的增加导致神经细胞死亡,这对AD的发展和进程有贡献。在关键脑区域的神经细胞的损失又导致神经递质的减少和记忆的减损。主要造成斑块聚集的蛋白质包括淀粉状蛋白前体蛋白(APP)和两种早老蛋白(早老蛋白I和早老蛋白II)。通过酶 β 和 γ 分泌酶连续裂解淀粉状蛋白前体蛋白(APP)(它们在大多数细胞中组成型表达和分解代谢)导致39至43个氨基酸的A β 肽的释放。APPs的降解可能会增加它们在斑块中聚集的倾向。由于其C末端的两个极疏水的氨基酸残基,A β (1-42)片段尤其具有构建聚集物的高倾向。因此认为A β (1-42)片段主要参与并造成AD中神经炎斑块形

成的起始,并因此具有高病理学潜力。因此需要能预防淀粉状蛋白斑的形成并扩散在AD中现存的淀粉状蛋白斑的药剂。

[0009] AD的症状出现缓慢,第一个症状可能仅仅是轻度健忘。在这一阶段,个体可能忘记新近的事件、活动、熟悉的人或东西的名称以及不能解决简单的数学问题。随着疾病进展,症状能更容易地被注意到并且变得足够严重从而导致患有AD的人们或他们的家人寻求医学帮助。AD的中期症状包括忘记如何做诸如整理清洁的简单任务,以及说话、理解、阅读或书写的问题逐渐显现。后期的AD患者可能变得焦虑或具攻击性,可能从家里走失以及最终需要全面护理。

[0010] 目前,唯一的明确诊断AD的方法是在个体死后的尸体解剖中鉴别脑组织中的斑块和缠结。因此,当人仍活着的时候,医生只能作出“可能”或“很可能”患有AD的诊断。应用目前的方法,内科医生利用数种诊断“很可能”AD的工具可以至多在90%的时间准确地诊断AD。内科医师询问人的一般健康、过去的医疗问题和此人完成日常活动的任何困难的历史。记忆、问题求解、注意力、计算和语言的行为测试提供认知退化的有关信息,医疗检验诸如血、尿或脊髓液的检验和脑部扫描可以提供一些其它信息。

[0011] AD的管理由基于药物的和不基于药物的治疗组成。以改变疾病潜在的过程(延缓或逆转进程)为目的的治疗目前大部分是不成功的。恢复神经细胞的化学信使(神经递质)不足(缺陷)或功能障碍的药物,特别是胆碱酯酶抑制剂(ChEI)(诸如他克林和卡巴拉汀(rivastigmine))已显示出可改善症状。ChEI阻碍神经递质的酶降解,因此增加在脑中可用于传递神经信号的化学信使的量。

[0012] 对于某些在疾病早期和中期阶段的人们,药物他克林(**COGNEX®**, Morris Plains, NJ)、多奈哌齐(**ARICEPT®**, Tokyo, JP)、卡巴拉汀(**EXELON®**, East Hanover, NJ)或加兰他敏(**REMINYL®**, New Brunswick, NJ)可以在有限的时间内帮助防止某些症状变得更严重。另一种药物美金刚(**NAMENDA®**, New York, NY)已被核准治疗中等至严重的AD。也有药物用于对付AD的精神病学表现。有些药物也可以帮助控制AD的行为症状,诸如失眠、兴奋、恍惚、焦虑和抑郁。治疗这些症状通常使得患者更舒服和使对于照顾者来说更容易照顾。不幸的是,尽管显著地治疗进展显示出这一类药剂可靠地比安慰剂好,但是疾病仍继续发展,并且对精神功能的平均作用仅为有限的。很多用于AD药物治疗的药物,例如,诸如ChEI,也具有副作用,包括胃肠功能失调、肝脏毒性和体重减轻。

[0013] 另外一种基于淀粉状蛋白样蛋白的聚集和沉积或与其相关的疾病是黄斑变性。

[0014] 黄斑变性是引起视网膜(在眼睛后部的像纸一样薄的组织,在此感光细胞传送视觉信号至大脑)的中心区域即黄斑区变性的常见的疾病。通过黄斑区处理产生清楚、明晰、“笔直向前”的视觉。损伤黄斑区导致盲点的产生和模糊不清或视物变形。年龄相关性黄斑变性(AMD)在美国是引起视力损伤的主要原因,并且对于65岁以上的人来说,其为高加索人中法定失明的主要原因。大约有180万40岁及以上美国人患有晚期AMD,以及其它730万患有中等AMD的人具有视力丧失的真实危险。政府估计到2020年,将会有290万人患有晚期AMD。AMD患者常常惊讶和沮丧地发现对这种盲症状的原因和治疗了解的是如此之少。

[0015] 存在两种黄斑变性的形式:干性黄斑变性和湿性黄斑变性。有百分之八十五的黄

斑变性患者诊断为干性形式,其中黄斑区的细胞缓慢地开始损坏。尽管一只眼睛可能丧失视力而另外一只眼睛保持未受影响,但两只眼睛通常都受到干性AMD的影响。视网膜下的黄色沉积物,即脉络膜小疣是干性AMD的早期征兆。随着脉络膜小疣的数目和大小的增加,发展成晚期干性AMD或湿性AMD的危险也增加。干性AMD可能在不转变为疾病的湿性形式的情况下进一步发展并且导致视力的丧失;然而,早期的干性AMD也有可能突然变为湿性形式。

[0016] 尽管只占到病例的百分之十五,湿性形式导致了失明的百分之九十,并且被认为是晚期的AMD(没有早期或中期阶段的湿性AMD)。湿性AMD总是处于疾病的干性形式之后。当干性形式变得更严重,一些人在黄斑区的后面开始有异常的血管生长。这些血管非常脆弱并且会泄漏液体和血液(因此是“湿性”黄斑变性),这导致了对黄斑区的快速损伤。

[0017] 干性形式的AMD开始会常常引起轻度的视力模糊。特别是视力的中心可能变得模糊不清,并且这一区域随着疾病的发展变得更大。如果只有一只眼睛受到影响,则没有症状可以被注意到。在湿性AMD中,直线可能看起来像波浪状,并且中心视力的丧失可能很快出现。

[0018] 黄斑变性的诊断一般涉及扩张眼检查、视觉敏感度试验,以及用称之为眼底检查的方法查看眼睛的后部以帮助诊断AMD,并且如果有湿性AMD的嫌疑,则也可能进行荧光素血管造影术。如果干性AMD达到晚期阶段,没有预防视力丧失的现行治疗。然而,抗氧化剂和锌的特定高剂量配方可以延缓或预防中期AMD发展至晚期阶段。**Macugen®**(哌加他尼钠注射液)、激光光凝术和光动力学治疗可能可以控制黄斑区中的异常血管生长和流血,这对有些患有湿性AMD的患者有用;然而,视力已经丧失的则不能通过这些技术恢复。如果视力已经丧失,存在可以帮助提高生活质量的低视力辅助器。

[0019] 年龄相关性黄斑变性(AMD)的最早的征兆之一是称之为脉络膜小疣的细胞外沉积物在视网膜色素上皮(RPE)基底层和布鲁赫膜(BM)之间的积累。近来由Anderson等进行的研究已证实脉络膜小疣包含淀粉状蛋白 β (Experimental Eye Research 78(2004)243-256)。

[0020] 进行中的研究继续探索可能促进AMD的环境、遗传和饮食因素。也正在探索新的治疗策略,包括视网膜细胞移植、能够预防或减缓疾病发展的药物、放射疗法、基因疗法、植入到视网膜的可帮助刺激视力的计算机芯片、以及预防黄斑区下新血管生长的药剂。

[0021] 开发新药物时,需要考虑的一个重要因素是对目标患者来说使用的容易性。由于对患者的便利性,经口药物递送(特别是片剂、胶囊剂和软胶剂)占有消费剂型的70%。药物开发者认同患者更喜欢经口递送,而不是接受注射或其它更具侵入性的药物给药方式。导致减少给药次数的间隔(即一天一次或持续释放)的制剂也是优选的。以经口剂型给药抗生素的容易性导致了治疗期间患者顺从性的增加。

[0022] 所需的是预防或处理与淀粉状变性相关的并发症的有效方法和组合物,所述淀粉状变性是一组与淀粉状蛋白斑的形成相关的疾病和病症,包括继发性淀粉状变性和年龄相关性淀粉状变性,包括但不限于神经疾病诸如阿尔茨海默病(AD)、路易体痴呆、唐氏综合征、遗传性脑出血伴淀粉状变性(荷兰型)、关岛帕金森-痴呆综合征;以及其它基于淀粉状蛋白样蛋白或与其相关的疾病,诸如进行性核上性麻痹、多发性硬化、克-雅二氏病、帕金森氏病、HIV-相关痴呆、ALS(肌萎缩性侧索硬化症)、成年发病型糖尿病、老年性心脏淀粉状变性、内分泌肿瘤,以及其它疾病,包括黄斑变性。具体而言,需要的是能消除疾病生理学表

现,诸如消除与淀粉状蛋白或淀粉状蛋白样肽的纤维的聚集相关的斑块形成的药剂。

[0023] 对于人类阿尔茨海默病,据报道与弗氏完全或不完全佐剂混合的由接种 AB_{1-42} 引起的抗淀粉状蛋白抗体能够减少转基因小鼠的淀粉状蛋白的负荷(Schenk等,1999)。将在脂质体中重构的四棕榈酰化 AB_{1-16} 腹膜内接种到NORBA转基因小鼠引起显著的抗淀粉状蛋白抗体滴度,据报道这一抗体也能在体外和体内溶解淀粉状蛋白纤维和斑块(Nicolau等,2002)。

[0024] Bard等(2000)首先提出了溶解已出现的淀粉状蛋白斑和纤维的可能机制,他们得出结论,即抗体调理斑块,斑块随后被小神经胶质细胞的巨噬细胞毁坏。De Mattos等(2001)指出抗 β -淀粉状蛋白的中心结构域的mAb能够结合和完全隔离血浆淀粉状蛋白。他们认为循环系统中这些mAb的存在改变了脑和血浆中的 AB 平衡,有利于外周的清除和分解代谢而不是在脑内沉积。

[0025] 用啮齿类动物抗体的长期的人类治疗可能导致抗球蛋白反应,这能在施与后约8-12天检测到,并在约20-30天达到峰值。如果遭遇了该抗球蛋白反应,必须在不超过约10天之后中断治疗,并且通常无法在之后的时间重新治疗,因为这将导致二次抗球蛋白反应的快速开始。尽管啮齿类动物抗体与人类抗体共享了相当大程度上的序列保守性,但是在啮齿类动物和人类抗体之间存在许多序列差异,足以使啮齿类动物抗体在人类中成为免疫原。

[0026] 可以通过直接在人类中产生抗体或通过创造“人源化”(又称“重构(reshaped)”抗体)来解决这一问题。人源化抗体具有这样的可变区氨基酸序列,所述可变区氨基酸序列含有散布在人类或人类样构架序列中的啮齿类动物衍生的CDR。由于人源化抗体的特异性是由啮齿类动物衍生的CDR提供的,因此,基本上不经改变的应用它们的残基,仅允许不会显著影响抗体对其靶抗原的亲亲和性和特异性的小的修饰。构架残基可以衍生自任何灵长类动物,或尤其是衍生自任何人类可变区,或其组合,并且所得到的设计好的可变区被认为是经重构的。

[0027] 为最大可能地在重构抗体中保留亲和力,适当地选择构架区是重要的。已知构架序列以CDR正确的空间方向容纳CDR,用于与抗原相互作用,并且构架残基有时甚至参与抗原结合。为保留抗体对其抗原的亲亲和性,选择与啮齿类动物构架序列最相似的人类构架序列是有利的。然后仍然可能需要用啮齿类构架中相应的残基替换人类构架序列中的一个或多个氨基酸,以避免亲和性的丧失。通过计算机建模可辅助这一替换。

[0028] 本发明提供包含高特异性和高效抗体、尤其是包括其片段在内的嵌合抗体、更尤其是包括其片段在内的部分或完全的人源化抗体的新的方法和组合物,所述抗体具有特异识别并结合至一系列 β -淀粉状蛋白抗原的特异表位的能力,所述抗原可能以单体、二聚体、三聚体等;以聚合形式;以聚集体、纤维、纤丝的形式;或以斑块的浓缩形式呈递给抗体。通过本发明教导提供的抗体特别对治疗淀粉状变性有用,所述淀粉状变性是一组与淀粉状蛋白斑的形成相关的疾病和病症,包括继发性淀粉状变性和年龄相关性淀粉状变性,包括但不限于神经疾病诸如阿尔茨海默病(AD)、路易体痴呆、唐氏综合征、遗传性脑出血伴淀粉状变性(荷兰型)、关岛帕金森-痴呆综合征;以及其它基于淀粉状蛋白样蛋白或与其相关的疾病,诸如进行性核上性麻痹、多发性硬化、克-雅二氏病、帕金森氏病、HIV-相关痴呆、ALS(肌萎缩性侧索硬化症)、成年发病型糖尿病、老年性心脏淀粉状变性、内分泌肿瘤,以及其

它疾病,包括黄斑变性;这些仅仅是其中的一些例子。

[0029] 发明概述

[0030] 在一个实施方案中,本发明涉及嵌合抗体或嵌合抗体片段、或人源化抗体或人源化抗体片段,其识别并结合至 β -淀粉状蛋白上的至少一个独特的结合部位,特别是至少两个独特的结合部位,以及更特别是至少三个独特的结合部位,其中所述的一个、所述的至少两个和所述的至少三个结合部位的每一个部位均包含主要参与抗体结合的至少一个氨基酸残基或至少两个连续的氨基酸残基。

[0031] 具体而言,根据本发明的嵌合抗体或嵌合抗体片段、或人源化抗体或人源化抗体片段结合 β -淀粉状蛋白上的至少两个、特别是至少三个独特的结合部位,其中三个独特的结合部位中的至少两个包含主要参与抗体结合的至少两个连续的氨基酸残基,并且三个独特的结合部位中的至少一个包含至少一个氨基酸残基。

[0032] 所述的至少两个独特的结合部位在抗原上彼此密切接近地定位,被至少一个不参与抗体结合或与所述的至少两个连续的氨基酸残基相比参与抗体结合程度显著较小的至少一个氨基酸残基隔开和/或侧翼为所述氨基酸,从而形成构象不连续的表位,其中所述独特的结合部位包含至少两个连续的主要参与抗体结合的氨基酸残基。

[0033] 所述的至少三个独特的结合部位在表位上彼此密切接近地定位,被至少一个不参与抗体结合或与主要参与抗体结合的两个氨基酸残基相比参与抗体结合程度显著较小的至少一个氨基酸残基隔开和/或侧翼为所述氨基酸,从而形成构象不连续的表位,其中所述独特的结合部位分别包含主要参与抗体结合的至少两个连续的氨基酸残基和至少一个氨基酸残基。

[0034] 具体而言,提供了嵌合抗体或嵌合抗体片段、或人源化抗体或人源化抗体片段,它们识别并结合至 β -淀粉状蛋白上的至少一个独特的结合部位,特别是至少两个独特的结合部位,更特别的是至少三个独特的结合部位,其中所述的至少一个、或所述的至少两个独特的结合部位每一个包含至少两个连续的主要参与抗体结合的氨基酸残基,其中代表第一结合部位的至少两个连续的氨基酸残基是埋在以下核心序列(SEQ ID NO:9)中的-Phe-Phe-:

[0035] Xaa_3 -Phe-Phe- Xaa_4 - Xaa_5 - Xaa_6 ,其中

[0036] Xaa_3 是选自Ala、Val、Leu、正亮氨酸、Met、Phe和Ile的氨基酸残基;

[0037] Xaa_4 是选自Ala、Val、Leu、Ser和Ile的氨基酸残基;

[0038] Xaa_5 是选自Glu和Asp的氨基酸残基;

[0039] Xaa_6 是选自Glu和Asp的氨基酸残基;并且其中所述的氨基酸残基 Xaa_3 、 Xaa_4 、 Xaa_5 和 Xaa_6 不参与抗体结合或与-Phe-Phe-结合部位相比参与抗体结合程度较小至显著较小。

[0040] 在本发明的另一个实施方案中,提供了嵌合抗体或嵌合抗体片段、或人源化抗体或人源化抗体片段,其中

[0041] Xaa_3 是Val或Leu,但尤其是Val;

[0042] Xaa_4 是Ala或Val,但尤其是Ala;

[0043] Xaa_5 是Glu或Asp,但尤其是Glu;

[0044] Xaa_6 是Glu或Asp,但尤其是Asp。

[0045] 具体而言,提供了嵌合抗体或嵌合抗体片段、或人源化抗体或人源化抗体片段,其

识别并结合至至 β -淀粉状蛋白上的至少一个独特的结合部位,特别是至少两个独特的结合部位,更特别的是至少三个独特的结合部位,其中所述的独特的结合部位分别包含主要参与抗体结合的至少一个和至少两个连续的氨基酸残基,其中代表第一个结合部位的至少两个连续的氨基酸残基是埋在以下核心序列中的-Phe-Phe-,且至少一个氨基酸残基是埋在以下核心序列中的-His-:

[0046] -Xaa₁-His-Xaa₃-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆-Phe-Phe-Xaa₇-Xaa₈-Xaa₉-

[0047] 其中,

[0048] Xaa₁是选自His、Asn、Gln、Lys和Arg的氨基酸残基;

[0049] Xaa₃是选自Asn和Gln的氨基酸残基;

[0050] Xaa₄是选自His、Asn、Gln、Lys和Arg的氨基酸残基;

[0051] Xaa₅是选自Ala、Val、Leu、Ser和Ile的氨基酸残基;

[0052] Xaa₆是选自Ala、Val、Leu、正亮氨酸、Met、Phe和Ile的氨基酸残基;

[0053] Xaa₇是选自Ala、Val、Leu和Ile的氨基酸残基;

[0054] Xaa₈是选自Glu和Asp的氨基酸残基;

[0055] Xaa₉是选自Glu和Asp的氨基酸残基;且其中所述的氨基酸残基Xaa₁、Xaa₃、Xaa₆、Xaa₇、Xaa₈和Xaa₉不参与抗体结合或与-His-和-Phe-Phe-结合部位相比参与抗体结合程度较小至显著较小。

[0056] 在本发明的另一个实施方案中,提供了嵌合抗体或嵌合抗体片段、或人源化抗体或人源化抗体片段,其中

[0057] Xaa₃是Gln或Asn,但尤其是Gln;

[0058] Xaa₄是Lys;

[0059] Xaa₅是Leu;

[0060] Xaa₆是Val或Leu,但尤其是Val;

[0061] Xaa₇是Ala或Val,但尤其是Ala;

[0062] Xaa₈是Glu或Asp,但尤其是Glu;且

[0063] Xaa₉是Asp或Glu,但尤其是Asp。

[0064] 在本发明的另一个实施方案中,提供了嵌合抗体或嵌合抗体片段、或人源化抗体或人源化抗体片段,其识别并结合至至 β -淀粉状蛋白上的至少一个独特的结合部位,特别地至少两个独特的结合部位,更特别地至少三个独特的结合部位,其中所述的至少一个或所述的至少两个独特的结合部位每一个包含至少两个连续的主要参与抗体结合的氨基酸残基,其中代表第二个结合部位的至少两个连续的氨基酸残基是埋在以下核心序列 (SEQ ID NO:10) 中的-Lys-Leu-:

[0065] Xaa₁-Xaa₂-Lys-Leu-Xaa₃,其中

[0066] Xaa₁是选自His、Asn、Gln、Lys和Arg的氨基酸残基;

[0067] Xaa₂是选自Asn和Gln的氨基酸残基;

[0068] Xaa₃是选自Ala、Val、Leu、正亮氨酸、Met、Phe和Ile的氨基酸残基;且其中所述的氨基酸残基Xaa₂、Xaa₃不参与抗体结合或与-Lys-Leu-结合部位相比参与抗体结合程度较小至显著较小。

[0069] 在本发明的另一个实施方案中,提供了嵌合抗体或嵌合抗体片段、或人源化抗体

或人源化抗体片段,其识别并结合至 β -淀粉状蛋白上的至少一个独特的结合部位,特别地至少两个独特的结合部位,更特别地至少三个独特的结合部位,其中所述的独特的结合部位分别包含主要参与抗体结合的至少一个和至少两个连续的氨基酸残基,其中被至少一个不参与抗体结合或与主要参与抗体结合的氨基酸残基相比参与抗体结合程度显著较小的氨基酸残基隔开的至少一个和至少两个连续的氨基酸分别是埋在以下核心序列中的-His-和-Lys-Leu-:

[0070] -His-Xaa₂-Lys-Leu-Xaa₃-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆-Xaa₇-Xaa₈-

[0071] 其中

[0072] Xaa₂是选自Asn和Gln的氨基酸残基;

[0073] Xaa₃是选自Ala、Val、Leu、正亮氨酸、Met、Phe和Ile的氨基酸残基;

[0074] Xaa₄是选自Ala、Val、Leu、正亮氨酸、Met、Phe和Ile的氨基酸残基;

[0075] Xaa₅是选自Ala、Val、Leu、正亮氨酸、Met、Phe和Ile的氨基酸残基;

[0076] Xaa₆是选自Ala、Val、Leu、Ser和Ile的氨基酸残基;

[0077] Xaa₇是选自Glu和Asp的氨基酸残基;

[0078] Xaa₈是选自Glu和Asp的氨基酸残基;

[0079] 并且其中所述的氨基酸残基Xaa₂、Xaa₃、Xaa₆、Xaa₇、Xaa₈分别不参与抗体结合或与-His-和-Lys-Leu-结合部位相比参与抗体结合程度较小至显著较小。

[0080] 在本发明的另一个实施方案中,提供了嵌合抗体或嵌合抗体片段、或人源化抗体或人源化抗体片段,其中

[0081] Xaa₂是Gln或Asn,但尤其是Gln;

[0082] Xaa₃是Val或Leu,但尤其是Val;

[0083] Xaa₄是Phe;

[0084] Xaa₅是Phe;

[0085] Xaa₆是Ala或Val,但尤其是Ala;

[0086] Xaa₇是Glu或Asp,但尤其是Glu;且

[0087] Xaa₈是Asp或Glu,但尤其是Asp。

[0088] 在本发明的另一个实施方案中,提供了嵌合抗体或嵌合抗体片段、或人源化抗体或人源化抗体片段,其识别并结合至 β -淀粉状蛋白上的至少两个独特的结合部位,其中所述的至少两个独特的结合部位每一个包含至少两个连续的主要参与抗体结合的氨基酸残基,其中该至少两个连续的氨基酸被至少一个不参与抗体结合或与所述的连续的氨基酸残基相比参与抗体结合程度显著较小的氨基酸残基隔开,其分别是埋在以下核心序列中的代表第一个和第二个结合部位的-Phe-Phe-和-Lys-Leu-:

[0089] Xaa₁-Xaa₂-Lys-Leu-Xaa₃-Phe-Phe-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆,其中

[0090] Xaa₁是选自His、Asn、Gln、Lys和Arg的氨基酸残基;

[0091] Xaa₂是选自Asn和Gln的氨基酸残基;

[0092] Xaa₃是选自Ala、Val、Leu、正亮氨酸、Met、Phe和Ile的氨基酸残基;

[0093] Xaa₄是选自Ala、Val、Leu、Ser和Ile的氨基酸残基;

[0094] Xaa₅是选自Glu和Asp的氨基酸残基;

[0095] Xaa₆是选自Glu和Asp的氨基酸残基;并且其中所述的氨基酸残基Xaa₂、Xaa₃、Xaa₄、

Xaa₅和Xaa₆分别不参与抗体结合或与-Lys-Leu-和-Phe-Phe-结合部位相比参与抗体结合程度较小至显著较小。

[0096] 在本发明的另一个实施方案中,提供了嵌合抗体或嵌合抗体片段、或人源化抗体或人源化抗体片段,其识别并结合至 β -淀粉状蛋白上的至少一个独特的结合部位,特别地至少两个独特的结合部位,更特别地至少三个独特的结合部位,其中所述的独特的结合部位分别包含主要参与抗体结合的至少一个和至少两个连续的氨基酸残基,其中该至少一个和至少两个连续的氨基酸被至少一个不参与抗体结合或与主要参与抗体结合的氨基酸残基相比参与抗体结合程度显著较小的氨基酸残基隔开,其中所述氨基酸残基分别是埋在以下核心序列中的-His-和-Phe-Phe-和-Lys-Leu-:

[0097] His-Xaa₂-Lys-Leu-Xaa₃-Phe-Phe-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆,其中

[0098] Xaa₂是选自Asn和Gln的氨基酸残基;

[0099] Xaa₃是选自Ala、Val、Leu、正亮氨酸、Met、Phe和Ile的氨基酸残基;

[0100] Xaa₄是选自Ala、Val、Leu、Ser和Ile的氨基酸残基;

[0101] Xaa₅是选自Glu和Asp的氨基酸残基;

[0102] Xaa₆是选自Glu和Asp的氨基酸残基;并且其中所述的氨基酸残基Xaa₂、Xaa₃、Xaa₄、Xaa₅和Xaa₆分别不参与抗体结合或与-His-、-Lys-Leu-和-Phe-Phe-结合部位相比参与抗体结合程度较小至显著较小。

[0103] 在本发明的另一个实施方案中,提供了嵌合抗体或嵌合抗体片段、或人源化抗体或人源化抗体片段,其中

[0104] Xaa₂是Gln或Asn,但尤其是Gln;

[0105] Xaa₃是Val或Leu,但尤其是Val;

[0106] Xaa₄是Ala或Val,但尤其是Ala;

[0107] Xaa₅是Glu或Asp,但尤其是Glu;且

[0108] Xaa₆是Asp或Glu,但尤其是Asp。

[0109] 在本发明的另一个实施方案中,提供了嵌合抗体或嵌合抗体片段、或人源化抗体或人源化抗体片段,其识别并结合至 β -淀粉状蛋白上的至少两个独特的结合部位,其中所述的至少两个独特的结合部位每一个包含至少两个连续的主要参与抗体结合的氨基酸残基,其中该至少两个连续的氨基酸被至少一个不参与抗体结合或与所述的连续的氨基酸残基相比参与抗体结合程度显著较小的氨基酸残基隔开,其分别是埋在以下核心序列中的代表第一个和第二个结合部位的-Phe-Phe-和-Lys-Leu-:

[0110] Xaa₁-Xaa₂-Lys-Leu-Xaa₃-Phe-Phe-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆,其中

[0111] Xaa₁是选自His、Asn、Gln、Lys和Arg的氨基酸残基;

[0112] Xaa₂是选自Asn和Gln的氨基酸残基;

[0113] Xaa₃是选自Val、Ala、Leu、Met、Phe、正亮氨酸和Ile的氨基酸残基;

[0114] Xaa₄是选自Ala、Val、Leu和Ile的氨基酸残基;

[0115] Xaa₅是选自Glu和Asp的氨基酸残基;

[0116] Xaa₆是选自Glu和Asp的氨基酸残基;并且其中所述的氨基酸残基Xaa₂、Xaa₃、Xaa₄、Xaa₅和Xaa₆分别不参与抗体结合或与-Lys-Leu-和-Phe-Phe-结合部位相比参与抗体结合程度较小至显著较小。

[0117] 在本发明的另一个实施方案中,提供了嵌合抗体或嵌合抗体片段、或人源化抗体或人源化抗体片段,其中

[0118] Xaa₁是His或Arg,但尤其是His;

[0119] Xaa₂是Gln或Asn,但尤其是Gln;

[0120] Xaa₃是Val或Leu,但尤其是Val;

[0121] Xaa₄是Ala或Val,但尤其是Ala;

[0122] Xaa₅是Glu或Asp,但尤其是Glu;且

[0123] Xaa₆是Asp或Glu,但尤其是Asp。

[0124] 在本发明的一个实施方案中,提供了嵌合抗体或嵌合抗体片段、或人源化抗体或人源化抗体片段,其识别并结合至β-淀粉状蛋白上的至少两个独特的结合部位,其中所述的至少两个独特的结合部位每一个包含至少两个连续的主要参与抗体结合的氨基酸残基,其分别是-Phe-Phe-Ala-Glu-,特别是-Phe-Phe-Ala-,但尤其是-Phe-Phe-和-Lys-Leu-,并且其中所述的至少两个独特的结合部位分别呈现出SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-和SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列His-Gln-Lys-Leu-Val-。

[0125] 在本发明的一个实施方案中,提供了嵌合抗体或嵌合抗体片段、或人源化抗体或人源化抗体片段,其识别并结合至β-淀粉状蛋白上的至少一个独特的结合部位,特别地至少两个独特的结合部位,更特别地至少三个独特的结合部位,其中所述的至少一个或所述的至少两个独特的结合部位分别包含主要参与抗体结合的至少一个和至少两个连续的氨基酸残基,其分别是-Phe-Phe-和-Lys-Leu-和-His-,其中所述的独特的结合部位分别插入在氨基酸序列-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-,和氨基酸序列-His-Gln-Lys-Leu-Val-中。

[0126] 在本发明另一个实施方案中,嵌合抗体或嵌合抗体片段、或人源化抗体或人源化抗体片段包含识别并结合至β-淀粉状蛋白上的至少两个独特的结合部位的抗原识别和结合部位,其中所述的至少两个独特的结合部位每一个包含分别在SEQ ID NO:7和8中给出的氨基酸序列中的至少两个连续的氨基酸残基,其中所述的连续的氨基酸残基,特别地是-Phe-Phe-和-Lys-Leu-主要参与结合β-淀粉状蛋白。

[0127] 在本发明另一个特别的实施方案中,提供了根据本发明的抗体或其片段,其结合β-淀粉状蛋白上的4个独特的结合部位,其中所述的4个独特的结合部位包括2个每一个包含一个氨基酸残基的结合部位和2个每一个包含两个连续的氨基酸残基的结合部位,所述残基主要参与抗体结合,其中所述的4个独特的结合部位在β-淀粉状蛋白上彼此密切接近地定位,并且所述4个结合部位分别被至少一个不参与抗体结合或参与结合但与4个独特的结合部位的所述一个氨基酸残基和所述两个连续的氨基酸残基相比参与抗体结合程度显著较小的氨基酸残基隔开,因此形成构象不连续的表位。

[0128] 具体而言,第一种两个连续的主要参与抗体结合的氨基酸残基是埋在以下核心序列中的-Lys-Leu-,且第二种至少两个连续的氨基酸残基是埋在以下核心序列中的-Phe-Phe-;第一种单氨基酸残基是埋在以下核心序列中的-His-且第二种单氨基酸残基是埋在以下核心序列中的-Asp-:

[0129] -Xaa₁-His-Xaa₂-Lys-Leu-Xaa₃-Phe-Phe-Xaa₄-Xaa₅-Asp-Xaa₆,其中

[0130] Xaa₁是选自His、Asn、Gln、Lys和Arg的氨基酸残基,但尤其是His;

[0131] Xaa₂是选自Asn和Gln的氨基酸残基,但尤其是Gln;

[0132] Xaa₃是选自Ala、Val、Leu、正亮氨酸、Met、Phe和Ile的氨基酸残基,但尤其是Val。

[0133] Xaa₄是选自Ala、Val、Leu、Ser和Ile的氨基酸残基,但尤其是Ala;

[0134] Xaa₅是选自Glu和Asp的氨基酸残基,但尤其是Glu;

[0135] Xaa₆是选自Ala、Val、Leu、正亮氨酸、Met、Phe和Ile的氨基酸残基,但尤其是Val;并且其中所述的氨基酸残基Xaa₁、Xaa₂、Xaa₃、Xaa₄、Xaa₅和Xaa₆不参与抗体结合或参与结合但与-His-、-Asp-、-Lys-Leu-和-Phe-Phe-结合部位相比参与抗体结合程度显著较小。

[0136] 在一个实施方案中,本发明涉及根据本发明的抗体或其片段,其结合β-淀粉状蛋白上的4个独特的结合部位,其中所述的4个独特的结合部位包括2个每一个包含一个氨基酸残基的结合部位和2个每一个包含两个连续的氨基酸残基的结合部位,其中第一种两个连续的主要参与抗体结合的氨基酸残基是埋在以下核心序列中的-Lys-Leu-,且第二种至少两个连续的氨基酸残基是埋在以下核心序列中的-Phe-Phe-;第一种单氨基酸残基是埋在以下核心序列中的-His-且第二种单氨基酸残基是埋在以下核心序列中的-Asp-:

[0137] -Xaa₁-His-Xaa₂-Lys-Leu-Xaa₃-Phe-Phe-Xaa₄-Xaa₅-Asp-Xaa₆,其中

[0138] Xaa₁是选自His、Asn、Gln、Lys和Arg的氨基酸残基,但尤其是His;

[0139] Xaa₂是选自Asn和Gln的氨基酸残基,但尤其是Gln;

[0140] Xaa₃是选自Ala、Val、Leu、正亮氨酸、Met、Phe和Ile的氨基酸残基,但尤其是Val。

[0141] Xaa₄是选自Ala、Val、Leu、Ser和Ile的氨基酸残基,但尤其是Ala;

[0142] Xaa₅是选自Glu和Asp的氨基酸残基,但尤其是Glu;

[0143] Xaa₆是选自Ala、Val、Leu、正亮氨酸、Met、Phe和Ile的氨基酸残基,但尤其是Val;并且其中所述的氨基酸残基Xaa₁、Xaa₂、Xaa₃、Xaa₄、Xaa₅和Xaa₆不参与抗体结合或参与结合但与-His-、-Asp-、-Lys-Leu-和-Phe-Phe-结合部位相比参与抗体结合程度显著较小。

[0144] 在本发明特定的实施方案中,如上文所定义的识别和结合部位形成了位于β-淀粉状蛋白的12至24位氨基酸残基之间、特别地14至23位氨基酸残基之间、更特别地14至20位氨基酸残基之间区域内的构象上不连续的表位,其中每一包含至少2个氨基酸残基的至少两个独特的识别和结合部位分别位于位置16和17以及位置19和20,并且其中包含至少1个氨基酸残基的至少一个独特的识别和结合部位位于位置14,所述残基主要参与β-淀粉状蛋白的结合且其中所述独特的识别和结合部位至少在一侧的侧翼存在氨基酸残基,特别地是残基21和22,并且被位于位置15和18的一个氨基酸残基隔开,所述氨基酸残基不直接参与抗原的结合,或至少基本上更小的程度。

[0145] 又在本发明的另一个实施方案中,所述的至少三个独特的识别和结合部位在两侧均存在氨基酸残基,特别地是残基12和13、以及残基21和22,并且被位于位置15和18的一个氨基酸残基隔开,所述氨基酸残基不直接参与抗原的结合,或至少基本上更小的程度。

[0146] 在特别的实施方案中,所述的主要参与β-淀粉状蛋白结合的连续氨基酸残基,特别地在位置16和17的-Lys-Leu-和在位置19和20的-Phe-Phe-,被嵌入到以下核心区域内:

[0147]

Val-	His-	His-	Gln-	Lys-	Leu-	Val-	Phe-	Phe-	Ala-	Glu-	Asp
12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23

[0148] 在另一个特别的实施方案中,所述的主要参与β-淀粉状蛋白结合的氨基酸残基,特别地在位置16和17的-Lys-Leu-和在位置19和20的-Phe-Phe-,以及在位置14的-His-被嵌入到以下核心区域内:

[0149]	Val-	His-	His-	Gln-	Lys-	Leu-	Val-	Phe-	Phe-	Ala-	Glu-	Asp-	Val-	Gly-
	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25

[0150] 在本发明的另一个实施方案中,提供了人源化抗体或人源化抗体片段,其分别在轻链可变区和重链可变区中包含插入在一个或多个人类或灵长类动物衍生的构架区中的至少一个非人源CDR,特别地两个非人源CDR,更特别地三个非人源CDR,并且任选地包含衍生自人类或灵长类动物源抗体的恒定区,所述人源化抗体或人源化抗体片段能够在包含以下氨基酸序列 (SEQ ID NO:11) 的表位处特异地识别并结合 β -淀粉状蛋白,特别地 β -淀粉状蛋白单体肽,更特别地 β -淀粉状蛋白聚合肽,甚至更特别地分离的或作为 β -淀粉状蛋白斑一部分的 β -淀粉状蛋白纤维、原纤维或纤丝:

[0151] Xaa₁-Xaa₂-Lys-Leu-Xaa₃-Phe-Phe-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆,

[0152] 其中,

[0153] Xaa₁是选自His、Asn、Gln的氨基酸残基,但尤其是His;

[0154] Xaa₂是选自Asn和Gln的氨基酸残基,但尤其是Gln;

[0155] Xaa₃是选自Val、Leu和Ile的氨基酸残基,但尤其是Val;

[0156] Xaa₄是选自Ala和Val的氨基酸残基,但尤其是Ala;

[0157] Xaa₅是选自Glu和Asp的氨基酸残基,但尤其是Glu;

[0158] Xaa₆是选自Glu和Asp的氨基酸残基,但尤其是Asp。

[0159] 又在本发明的另一个实施方案中,提供了人源化抗体或人源化抗体片段,其分别在轻链可变区和重链可变区中包含插入在一个或多个人类或灵长类动物衍生的构架区中的至少一个非人源CDR,特别地两个非人源CDR,更特别地三个非人源CDR,并且任选地包含衍生自人类或灵长类动物源抗体的恒定区,所述人源化抗体或人源化抗体片段能够在包含以下氨基酸序列的表位处特异地识别并结合 β -淀粉状蛋白,特别地 β -淀粉状蛋白单体肽,更特别地 β -淀粉状蛋白聚合肽,甚至更特别地分离的或作为 β -淀粉状蛋白斑一部分的 β -淀粉状蛋白纤维、原纤维或纤丝:

[0160] His-Xaa₂-Lys-Leu-Xaa₃-Phe-Phe-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆,

[0161] 其中,

[0162] Xaa₂是选自Asn和Gln的氨基酸残基,但尤其是Gln;

[0163] Xaa₃是选自Val、Leu和Ile的氨基酸残基,但尤其是Val;

[0164] Xaa₄是选自Ala和Val的氨基酸残基,但尤其是Ala;

[0165] Xaa₅是选自Glu和Asp的氨基酸残基,但尤其是Glu;

[0166] Xaa₆是选自Glu和Asp的氨基酸残基,但尤其是Glu;并且其中所述的氨基酸残基Xaa₂、Xaa₃、Xaa₄、Xaa₅和Xaa₆不参与抗体结合或与-His-、-Lys-Leu-和-Phe-Phe-结合部位相比参与抗体结合程度显著较小。

[0167] 在本发明特定的实施方案中,从供体抗体、特别地从鼠的供体抗体得到非人源CDR,所述抗体是针对不包含所述的独特的结合部位的抗原片段而产生的。在表位区域的变动可能至少部分地是由超分子抗原构建体的应用引起的,该超分子抗原构建体包含与 β -淀粉状蛋白肽、特别地与 β -淀粉状蛋白肽AB₁₋₁₆氨基酸序列相对应的抗原肽,该抗原肽用亲水部分,例如,诸如聚乙二醇 (PEG) 修饰,其中所述的亲水部分通过至少一个,特别地一个或两个氨基酸,例如,诸如赖氨酸、谷氨酸和半胱氨酸或任何其它能够作为亲水部分偶联到肽片

段的连接装置的合适的氨基酸或氨基酸类似物,而共价地连接到每个抗原肽的末端,如下文中免疫方法中所描述的那样。如本文所描述的那样,当利用PEG作为亲水部分时,游离PEG末端共价地连接到磷脂酰乙醇胺或任何其它适合于作为锚定元件的化合物上,例如,以将抗原性构建体嵌到脂质体的双分子层中。

[0168] 具体而言,从下述鼠供体抗体获得非人源CDR,其中所述抗体展示出根据布达佩斯条约于2005年12月1日以保藏号DSM ACC2750保藏在位于德国布劳恩斯切魏格,38124布劳恩斯切魏格,马斯切尔奥德尔韦格1B的“德意志微生物保藏中心(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH;DSMZ)”中的ACI-01-Ab7C2(在本申请中也称为“mC2”)的特征性特性。

[0169] 在本发明的一个实施方案中,从鼠供体抗体ACI-01-Ab7C2(在本申请中也称为“mC2”)获得非人源CDR,所述抗体根据布达佩斯条约于2005年12月1日以保藏号DSM ACC2750保藏在位于德国布劳恩斯切魏格,38124布劳恩斯切魏格,马斯切尔奥德尔韦格1B的“德意志微生物保藏中心(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH;DSMZ)”中。

[0170] 将脂质A用作免疫方案的一部分也能促进表位区域中的变动。

[0171] 在特定的实施方案中,本发明涉及人源化抗体或人源化抗体片段,包含整合到人类或灵长类动物衍生的构架区中的至少一个具有选自以下序列的氨基酸序列的肽:代表重链可变区(HCVR)CDR2的SEQ ID NO:2和代表重链可变区(HCVR)CDR3的SEQ ID NO:3,以及代表轻链可变区(LCVR)CDR1的SEQ ID NO:4。

[0172] 在另一个实施方案中,本发明涉及人源化抗体或人源化抗体片段,其中所述的人源化抗体包含整合到人类或灵长类动物衍生的重链构架区中的至少一个具有选自以下序列的氨基酸序列的肽:代表重链可变区(HCVR)CDR2的SEQ ID NO:2和代表重链可变区(HCVR)CDR3的SEQ ID NO:3。

[0173] 又在另一个实施方案中,本发明涉及人源化抗体或人源化抗体片段,其中所述的人源化抗体包含整合到人类或灵长类动物衍生的轻链构架区中的具有代表轻链可变区(LCVR)CDR1的SEQ ID NO:4的氨基酸序列的肽。

[0174] 具体而言,本发明涉及轻链可变区(LCVR),其包含整合到人类或灵长类动物衍生的构架区中的至少一个具有代表轻链可变区(LCVR)CDR1的SEQ ID NO:4的氨基酸序列的肽。

[0175] 在另一个特定的实施方案中,本发明涉及重链可变区(HCVR),其包含整合到人类或灵长类动物衍生的构架区中的至少一个具有选自以下序列的氨基酸序列的肽:代表重链可变区(HCVR)CDR2的SEQ ID NO:2和代表重链可变区(HCVR)CDR3的SEQ ID NO:3。

[0176] 本发明还涉及人源化抗体或人源化抗体片段,其包含整合到人类或灵长类动物衍生的构架区中的至少两个肽,所述的肽是不同的且展示出选自以下序列的氨基酸序列:代表重链可变区(HCVR)CDR1的SEQ ID NO:1、代表重链可变区(HCVR)CDR2的SEQ ID NO:2和代表重链可变区(HCVR)CDR3的SEQ ID NO:3,以及代表轻链可变区(LCVR)CDR1的SEQ ID NO:4、代表轻链可变区(LCVR)CDR2的SEQ ID NO:5和代表轻链可变区(LCVR)CDR3的SEQ ID NO:6,其中相同的CDR不能在抗体中出现两次。具体而言,如果存在的至少两个CDR都是轻链可变区(LCVR)的CDR,则至少一个所述CDR必须是由SEQ ID NO:4代表的CDR1。

[0177] 本发明还包括人源化抗体或人源化抗体片段,包含整合到人类或灵长类动物衍生的重链构架区中的至少两个具有选自以下序列的氨基酸序列的肽:代表重链可变区 (HCVR) CDR1的SEQ ID NO:1、代表重链可变区 (HCVR) CDR2的SEQ ID NO:2和代表重链可变区 (HCVR) CDR3的SEQ ID NO:3;但特别地是这样的人源化抗体或人源化抗体片段,其中相同的CDR不能在该抗体中出现两次。

[0178] 具体而言,本发明涉及重链可变区 (HCVR),其包含整合到人类或灵长类动物衍生的重链构架区中的至少两个具有选自以下序列的氨基酸序列的肽:代表重链可变区 (HCVR) CDR1的SEQ ID NO:1、代表重链可变区 (HCVR) CDR2的SEQ ID NO:2和代表重链可变区 (HCVR) CDR3的SEQ ID NO:3。

[0179] 在其它实施方案中,本发明涉及人源化抗体或人源化抗体片段,包含整合到人类或灵长类动物衍生的轻链构架区中的至少两个具有选自以下序列的氨基酸序列的肽:代表轻链可变区 (LCVR) CDR1的SEQ ID NO:4、代表轻链可变区 (LCVR) CDR2的SEQ ID NO:5和代表轻链可变区 (LCVR) CDR3的SEQ ID NO:6。

[0180] 具体而言,本发明涉及轻链可变区 (LCVR),其具有整合到人类或灵长类动物衍生的轻链构架区中的至少两个具有选自以下序列的氨基酸序列的肽:代表轻链可变区 (LCVR) CDR1的SEQ ID NO:4、代表轻链可变区 (LCVR) CDR2的SEQ ID NO:5和代表轻链可变区 (LCVR) CDR3的SEQ ID NO:6,其中相同的CDR不能在该抗体中出现两次,具体而言,至少一个所述CDR必须是由SEQ ID NO:4代表的CDR1。

[0181] 本发明还涉及人源化抗体或人源化抗体片段,包含整合到人类或灵长类动物衍生的重链构架区中的具有以下氨基酸序列的肽:代表重链可变区 (HCVR) CDR1的SEQ ID NO:1、代表重链可变区 (HCVR) CDR2的SEQ ID NO:2和代表重链可变区 (HCVR) CDR3的SEQ ID NO:3,特别地以上面所指出的顺序。

[0182] 具体而言,本发明涉及重链可变区 (HCVR),其包含整合到人类或灵长类动物衍生的重链构架区中的具有以下氨基酸序列的肽:代表重链可变区 (HCVR) CDR1的SEQ ID NO:1、代表重链可变区 (HCVR) CDR2的SEQ ID NO:2和代表重链可变区 (HCVR) CDR3的SEQ ID NO:3,特别地以上面所指出的顺序。

[0183] 本发明还包括人源化抗体或人源化抗体片段,其包含整合到人类或灵长类动物衍生的轻链构架区中的具有以下氨基酸序列的肽:代表轻链可变区 (LCVR) CDR1的SEQ ID NO:4、代表轻链可变区 (LCVR) CDR2的SEQ ID NO:5和代表轻链可变区 (LCVR) CDR3的SEQ ID NO:6,特别地以上面所指出的顺序。

[0184] 具体而言,本发明涉及轻链可变区 (LCVR),包含整合到人类或灵长类动物衍生的轻链构架区中的具有以下氨基酸序列的肽:代表轻链可变区 (LCVR) CDR1的SEQ ID NO:4、代表轻链可变区 (LCVR) CDR2的SEQ ID NO:5和代表轻链可变区 (LCVR) CDR3的SEQ ID NO:6,特别地以上面所指出的顺序。

[0185] 本发明还涉及人源化抗体或人源化抗体片段,包含整合到人类或灵长类动物衍生的构架区中的至少三个具有选自以下序列的氨基酸序列的肽:代表重链可变区 (HCVR) CDR1的SEQ ID NO:1、代表重链可变区 (HCVR) CDR2的SEQ ID NO:2和代表重链可变区 (HCVR) CDR3的SEQ ID NO:3,以及代表轻链可变区 (LCVR) CDR1的SEQ ID NO:4、代表轻链可变区 (LCVR) CDR2的SEQ ID NO:5和代表轻链可变区 (LCVR) CDR3的SEQ ID NO:6,但特别地是这样的人源

化抗体或人源化抗体片段,其中相同的CDR不能在该抗体中出现两次。

[0186] 在另一个实施方案中,本发明涉及人源化抗体或人源化抗体片段,所述抗体包含整合到人类或灵长类动物衍生的构架区中的至少四个具有选自以下序列的氨基酸序列的肽:代表重链可变区 (HCVR) CDR1的SEQ ID NO:1、代表重链可变区 (HCVR) CDR2的SEQ ID NO:2和代表重链可变区 (HCVR) CDR3的SEQ ID NO:3,以及代表轻链可变区 (LCVR) CDR1的SEQ ID NO:4、代表轻链可变区 (LCVR) CDR2的SEQ ID NO:5和代表轻链可变区 (LCVR) CDR3的SEQ ID NO:6,但特别地是这样的人源化抗体或人源化抗体片段,其中相同的CDR不能在该抗体中出现两次。

[0187] 在另一个实施方案中,本发明涉及人源化抗体或人源化抗体片段,包含整合到人类或灵长类动物衍生的构架区中的至少五个具有选自以下序列的氨基酸序列的肽:代表重链可变区 (HCVR) CDR1的SEQ ID NO:1、代表重链可变区 (HCVR) CDR2的SEQ ID NO:2和代表重链可变区 (HCVR) CDR3的SEQ ID NO:3,以及代表轻链可变区 (LCVR) CDR1的SEQ ID NO:4、代表轻链可变区 (LCVR) CDR2的SEQ ID NO:5和代表轻链可变区 (LCVR) CDR3的SEQ ID NO:6,但特别地是这样的人源化抗体或人源化抗体片段,其中相同的CDR不能在该抗体中出现两次。

[0188] 在另一个实施方案中,本发明涉及人源化抗体或人源化抗体片段,包含整合到人类或灵长类动物衍生的构架区中的具有以下氨基酸序列的肽:代表重链可变区 (HCVR) CDR1的SEQ ID NO:1、代表重链可变区 (HCVR) CDR2的SEQ ID NO:2和代表重链可变区 (HCVR) CDR3的SEQ ID NO:3,以及代表轻链可变区 (LCVR) CDR1的SEQ ID NO:4、代表轻链可变区 (LCVR) CDR2的SEQ ID NO:5和代表轻链可变区 (LCVR) CDR3的SEQ ID NO:6。

[0189] 在特定的实施方案中,本发明涉及人源化抗体、重链可变区 (HCVR)、或其片段,其中所述的人源化抗体、重链可变区 (HCVR) 或其片段至少包含整合到人类或灵长类动物衍生的重链构架区中的具有代表重链可变区 (HCVR) CDR2的SEQ ID NO:2氨基酸序列的肽。

[0190] 在另一特定的实施方案中,本发明涉及人源化抗体、重链可变区 (HCVR)、或其片段,其中所述的人源化抗体、重链可变区 (HCVR) 或其片段至少包含整合到人类或灵长类动物衍生的重链构架区中的具有代表重链可变区 (HCVR) CDR3的SEQ ID NO:3氨基酸序列的肽。

[0191] 在另一特定的实施方案中,本发明涉及人源化抗体、重链可变区 (HCVR)、或其片段,所述的抗体、重链可变区 (HCVR) 或其片段包含整合到人类或灵长类动物衍生的重链构架区中的至少两个具有以下氨基酸序列的肽:代表重链可变区 (HCVR) CDR1的SEQ ID NO:1和代表重链可变区 (HCVR) CDR2的SEQ ID NO:2。

[0192] 在另一特定的实施方案中,本发明涉及人源化抗体、重链可变区 (HCVR)、或其片段,所述的抗体、重链可变区 (HCVR) 或其片段包含整合到人类或灵长类动物衍生的重链构架区中的至少两个具有以下氨基酸序列的肽:代表重链可变区 (HCVR) CDR1的SEQ ID NO:1和代表重链可变区 (HCVR) CDR3的SEQ ID NO:3。

[0193] 在另一特定的实施方案中,本发明涉及人源化抗体、重链可变区 (HCVR)、或其片段,所述的抗体、重链可变区 (HCVR) 或其片段包含整合到人类或灵长类动物衍生的重链构架区中的至少两个具有以下氨基酸序列的肽:代表重链可变区 (HCVR) CDR2的SEQ ID NO:2和代表重链可变区 (HCVR) CDR3的SEQ ID NO:3。

[0194] 在另一特定的实施方案中,本发明涉及人源化抗体、轻链可变区 (LCVR)、或其片

段,所述的抗体、轻链可变区 (LCVR) 或其片段包含整合到人类或灵长类动物衍生的重链构架区中的至少两个具有以下氨基酸序列的肽:代表轻链可变区 (LCVR) CDR1的SEQ ID NO:4和代表轻链可变区 (LCVR) CDR2的SEQ ID NO:5。

[0195] 在另一特定的实施方案中,本发明涉及人源化抗体、轻链可变区 (LCVR)、或其片段,所述的抗体、轻链可变区 (LCVR) 或其片段包含整合到人类或灵长类动物衍生的重链构架区中的至少两个具有以下氨基酸序列的肽:代表轻链可变区 (LCVR) CDR1的SEQ ID NO:4和代表轻链可变区 (LCVR) CDR3的SEQ ID NO:6。

[0196] 本发明还包含人源化抗体或人源化抗体片段,其中小鼠C2抗体的重链可变区 (HCVR) 和轻链可变区 (LCVR) 的每一个均贡献了至少一个其CDR区给人源化抗体的至少两个CDR区。所得到的人源化抗体或人源化抗体片段因此可以包含:

[0197] -至少和代表CDR1 (LCVR) 的SEQ ID NO:4的氨基酸序列联合的代表CDR1 (HCVR) 的SEQ ID NO:1的氨基酸序列;

[0198] -至少和代表CDR1 (LCVR) 的SEQ ID NO:4的氨基酸序列联合的代表CDR2 (HCVR) 的SEQ ID NO:2的氨基酸序列;

[0199] -至少和代表CDR1 (LCVR) 的SEQ ID NO:4的氨基酸序列联合的代表CDR3 (HCVR) 的SEQ ID NO:3的氨基酸序列;

[0200] -至少和代表CDR2 (LCVR) 的SEQ ID NO:5的氨基酸序列联合的代表CDR1 (HCVR) 的SEQ ID NO:1的氨基酸序列;

[0201] -至少和代表CDR2 (LCVR) 的SEQ ID NO:5的氨基酸序列联合的代表CDR2 (HCVR) 的SEQ ID NO:2的氨基酸序列;

[0202] -至少和代表CDR3 (LCVR) 的SEQ ID NO:6的氨基酸序列联合的代表CDR2 (HCVR) 的SEQ ID NO:2的氨基酸序列;

[0203] -至少和代表CDR3 (LCVR) 的SEQ ID NO:6的氨基酸序列联合的代表CDR1 (HCVR) 的SEQ ID NO:1的氨基酸序列;

[0204] -至少和代表CDR2 (LCVR) 的SEQ ID NO:5的氨基酸序列联合的代表CDR3 (HCVR) 的SEQ ID NO:3的氨基酸序列;

[0205] -至少和代表CDR3 (LCVR) 的SEQ ID NO:6的氨基酸序列联合的代表CDR3 (HCVR) 的SEQ ID NO:3的氨基酸序列。

[0206] 在另一实施方案中,本发明涉及上文描述的嵌合抗体或嵌合抗体片段,或人源化抗体或人源化抗体片段,所述抗体包含人类或灵长类动物来源的轻链和/或重链恒定区。

[0207] 在另一个实施方案中,本发明涉及嵌合抗体或嵌合抗体片段,或人源化抗体或人源化抗体片段,其中通过保守替换改变至少一个,特别地至少一个但不超过5个、更特别地至少一个但不超过4个、甚至更特别地至少一个但不超过3个、但尤其是至少一个但不超过2个如SEQ ID NO:1-6给出的代表轻链和/或重链CDR区的氨基酸,以至于该抗体保留了其完全的功能。

[0208] 具体而言,本发明涉及嵌合抗体或嵌合抗体片段,或人源化抗体或人源化抗体片段,其中在如SEQ ID NO:5给出的轻链可变区 (LCVR) 的CDR2中,在Kabat位置50处的Lys被选自Arg、Gln和Glu的氨基酸残基、特别地被Arg替换。

[0209] 具体而言,本发明涉及轻链可变区 (LCVR),其中在如SEQ ID NO:5给出的CDR2中,

在Kabat位置50处的Lys被选自Arg、Gln和Glu的氨基酸残基、特别地被Arg替换。

[0210] 在另一实施方案中,本发明涉及嵌合抗体或嵌合抗体片段,或人源化抗体或人源化抗体片段,其中在如SEQ ID NO:5给出的轻链可变区(LCVR)的CDR2中,在Kabat位置53处的Ser被选自Asn和Thr的氨基酸残基、特别地被Asn替换。

[0211] 具体而言,本发明涉及轻链可变区(LCVR),其中在如SEQ ID NO:5给出的CDR2中,在Kabat位置53处的Ser被选自Asn和Thr的氨基酸残基、特别地被Asn替换。

[0212] 在本发明的一个实施方案中,提供了嵌合抗体或嵌合抗体片段,或人源化抗体或人源化抗体片段,其中重链可变区(HCVR)具有分别与SEQ ID NO:15和16给出的序列90%、特别地95%、更特别地98%同一的氨基酸序列。

[0213] 在本发明的另一个实施方案中,提供了嵌合抗体或嵌合抗体片段,或人源化抗体或人源化抗体片段,其中轻链可变区(LCVR)具有分别与SEQ ID NO:12和13给出的序列90%、特别地95%、更特别地98%同一的氨基酸序列。

[0214] 在本发明的再另一个实施方案中,提供了人源化抗体或人源化抗体片段,其中重链可变区(HCVR)的至少两个、但尤其是三个CDR区具有与SEQ ID NO:1-3给出的相应的CDR区90%、特别地95%、更特别地98%同一的氨基酸序列。

[0215] 在本发明的其它实施方案中,提供了人源化抗体或人源化抗体片段,其中轻链可变区(LCVR)的至少两个、但尤其是三个CDR区具有与SEQ ID NO:4-6给出的相应的CDR区90%、特别地95%、更特别地98%同一的氨基酸序列。

[0216] 又在另一个实施方案中,本发明涉及上文描述的根据本发明的嵌合抗体或嵌合抗体片段,或人源化抗体或人源化抗体片段,其中重链可变区(HCVR)具有分别与SEQ ID NO:15和16给出的序列90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一的氨基酸序列。

[0217] 又在另一个实施方案中,本发明涉及上文描述的根据本发明的嵌合抗体或嵌合抗体片段,或人源化抗体或人源化抗体片段,其中轻链可变区(LCVR)具有分别与SEQ ID NO:12和13给出的序列90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一的氨基酸序列。

[0218] 又在另一个实施方案中,本发明涉及上文描述的根据本发明的嵌合抗体或嵌合抗体片段,或人源化抗体或人源化抗体片段,其中重链可变区(HCVR)的至少一个、特别地至少两个、但尤其是三个CDR区具有与SEQ ID NO:1-3给出的相应的CDR区90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一的氨基酸序列。

[0219] 又在另一个实施方案中,本发明涉及上文描述的根据本发明的嵌合抗体或嵌合抗体片段,或人源化抗体或人源化抗体片段,其中轻链可变区(LCVR)的至少一个、特别地至少两个、但尤其是三个CDR区具有与SEQ ID NO:4-6给出的相应的CDR区90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一的氨基酸序列。

[0220] 又在另一个实施方案中,本发明涉及上文描述的根据本发明的人源化抗体,其中通过替换为来自鼠抗体ACI-01-Ab7C2的相应区域的氨基酸或与之保守的替换来改变分别获自人类种系(human germline) V_H 和 V_K 序列的受体构架序列的至少一个氨基酸。

[0221] 具体而言,本发明涉及重链可变区和分别包含该重链可变区的人源化抗体,其中在获自人类种系重链可变区KABAT亚组 V_H III的 V_H 序列的受体构架序列中Kabat位置47处的

Trp被选自Leu、正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala和Phe的氨基酸、特别地被选自Leu和Ile的氨基酸、但尤其是被Leu替换,诸如如SEQ ID NO:15所示。

[0222] 本发明还分别涉及重链可变区和包含该重链可变区的人源化抗体,其中在获自人类种系重链可变区KABAT亚组V_HIII的V_H序列的受体构架序列中Kabat位置94处的Arg被选自Ser和Thr的氨基酸、但尤其是被Ser替换,诸如如SEQ ID NO:15所示。

[0223] 又在另一个实施方案中,本发明分别涉及重链可变区和包含该重链可变区的人源化抗体,其中在获自人类种系重链可变区KABAT亚组V_HIII的V_H序列的受体构架序列中Kabat位置47处的Trp被选自Leu、正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala和Phe的氨基酸、特别地被选自Leu和Ile的氨基酸、但尤其是被Ser替换,并且Kabat位置94处的Arg被选自Ser和Thr的氨基酸、但尤其是被Ser替换,诸如如SEQ ID NO:15所示。

[0224] 本发明还分别涉及轻链可变区和包含该轻链可变区的人源化抗体,其中在获自人类种系轻链可变区KABAT亚组V_KII的V_K序列的受体构架序列中Kabat位置45处的Gln被选自Lys、Arg、Gln和Asn的氨基酸、特别地被选自Lys和Arg的氨基酸、但尤其是被Lys替换。

[0225] 本发明还分别涉及轻链可变区和包含该轻链可变区的人源化抗体,其中在获自人类种系轻链可变区KABAT亚组V_KII的V_K序列的受体构架序列中Kabat位置87处的Tyr被选自Phe、Leu、Val、Ile和Ala的氨基酸、特别地被选自Leu和Phe的氨基酸、但尤其是被Phe替换。

[0226] 本发明还分别涉及轻链可变区和包含该轻链可变区的人源化抗体,其中在获自小鼠单克隆抗体、特别地鼠抗体ACI-01-Ab7C2的CDR2区(诸如如SEQ ID NO:12所示)的Kabat位置50处的Lys被选自Arg、Gln、His和Asn的氨基酸、但尤其是被Arg替换。

[0227] 又在另一个实施方案中,本发明分别涉及轻链可变区和包含该轻链可变区的人源化抗体,其中在获自小鼠单克隆抗体、特别地鼠抗体ACI-01-Ab7C2的CDR2区(诸如如SEQ ID NO:12所示)的Kabat位置53处的Asn被选自Ala、Val、Leu、Ser和Ile的氨基酸、但尤其是被Ser替换。

[0228] 又在另一个实施方案中,本发明涉及人源化抗体,其中在获自人类种系重链可变区KABAT亚组V_HIII的V_H序列的受体构架序列中Kabat位置47处的Trp被选自Leu、正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala和Phe的氨基酸、特别地被选自Leu和Ile的氨基酸、但尤其是被Leu替换;并且在获自人类种系重链可变区KABAT亚组V_HIII的V_H序列的受体构架序列中Kabat位置94的Arg被选自Ser和Thr的氨基酸、但尤其是被Ser替换,诸如如SEQ ID NO:15所示;且在获自人类种系轻链可变区KABAT亚组V_KII的V_K序列的受体构架序列中Kabat位置87的Tyr被选自Phe、Leu、Val、Ile和Ala的氨基酸、特别地被选自Leu和Phe的氨基酸、但尤其是被Phe替换。

[0229] 又在另一个实施方案中,本发明分别涉及重链可变区和包含该重链可变区的人源化抗体,其中在获自人类种系重链可变区KABAT亚组V_HIII的V_H序列的受体构架序列(如SEQ ID NO:15所示)中Kabat位置47的Trp被Leu替换。

[0230] 又在另一个实施方案中,本发明分别涉及重链可变区和包含该重链可变区的人源化抗体,其中在获自人类种系重链可变区KABAT亚组V_HIII的V_H序列的受体构架序列中Kabat位置94的Arg被Ser替换,诸如如SEQ ID NO:15所示。

[0231] 又在另一个实施方案中,本发明分别涉及重链可变区和包含该重链可变区的人源化抗体,其中在获自人类种系重链可变区KABAT亚组V_HIII的V_H序列的受体构架序列中Kabat位置47的Trp被Leu或Ile、但尤其是被Leu替换;并且在获自人类种系重链可变区KABAT亚组

V_HIII的V_H序列的受体构架序列中Kabat位置94的Arg被Ser替换,诸如如SEQ ID NO:15所示。

[0232] 又在另一个实施方案中,本发明分别涉及轻链可变区和包含该轻链可变区的人源化抗体,其中在获自人类种系轻链可变区KABAT亚组V_KII的V_K序列的受体构架序列中Kabat位置87的Tyr被Phe替换。

[0233] 又在另一个实施方案中,本发明分别涉及重链可变区和包含该重链可变区的人源化抗体,其中在获自人类种系重链可变区KABAT亚组V_HIII的V_H序列的受体构架序列中Kabat位置47的Trp被选自Leu和Ile的氨基酸、但尤其是被Leu替换;并且在获自人类种系重链可变区KABAT亚组V_HIII的V_H序列的受体构架序列中Kabat位置94的Arg被Ser替换,诸如如SEQ ID NO:15所示;并且在获自人类种系轻链可变区KABAT亚组V_KII的V_K序列的受体构架序列中Kabat位置87的Tyr被Phe替换。

[0234] 在一个实施方案中,本发明分别涉及重链可变区和包含该重链可变区的人源化抗体,其中在获自人类种系重链可变区KABAT亚组V_HIII的V_H序列的受体构架序列中Kabat位置47的Trp被选自Leu、正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala和Phe的氨基酸、特别地被Leu和Ile、但尤其是被Leu替换;并且Kabat位置94的Arg被选自Ser和Thr的氨基酸、但尤其是被Ser替换,诸如如SEQ ID NO:15所示;并且其中在获自小鼠单克隆抗体、特别地鼠抗体ACI-01-Ab7C2的CDR2区Kabat位置50的Lys被选自Arg、Gln、His和Asn的氨基酸、但尤其是被Arg替换。

[0235] 在一个实施方案中,本发明分别涉及重链可变区和包含该重链可变区的人源化抗体,其中在获自人类种系重链可变区KABAT亚组V_HIII的V_H序列的受体构架序列中Kabat位置47的Trp被选自Leu、正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala和Phe的氨基酸、特别地被Leu和Ile、但尤其是被Leu替换;并且Kabat位置94的Arg被选自Ser和Thr的氨基酸、但尤其是被Ser替换,诸如如SEQ ID NO:15所示;并且其中在获自小鼠单克隆抗体、特别地鼠抗体ACI-01-Ab7C2的CDR2区Kabat位置53的Asn被选自Ala、Val、Leu、Ser和Ile的氨基酸、但尤其是被Ser替换。

[0236] 在特定的实施方案中,本发明涉及SEQ ID NO:12的轻链可变区。

[0237] 在本发明的另一特定实施方案中,提供了包含SEQ ID NO:12的轻链可变区的人源化抗体。

[0238] 在特定的实施方案中,本发明涉及SEQ ID NO:13所示的包括信号序列的轻链可变区。

[0239] 在本发明的另一特定实施方案中,提供了包含SEQ ID NO:13所示的包括信号序列的完整的轻链可变区的人源化抗体。

[0240] 在本发明的另一特定实施方案中,提供了包括SEQ ID NO:12的轻链可变区和SEQ ID NO:14的轻链恒定区的人源化抗体。

[0241] 在本发明的另一特定实施方案中,提供了包括SEQ ID NO:13的完整的轻链可变区和SEQ ID NO:14的轻链恒定区的人源化抗体。

[0242] 在特定的实施方案中,本发明涉及SEQ ID NO:15的重链可变区。

[0243] 在本发明的另一特定实施方案中,提供了包含SEQ ID NO:15的重链可变区的人源化抗体。

[0244] 在特定的实施方案中,本发明涉及SEQ ID NO:16所示的包括信号序列的重链可变区。

[0245] 在本发明的另一特定实施方案中,提供了包含SEQ ID NO:16所示的包括信号序列

的完整的重链可变区的人源化抗体。

[0246] 在本发明的另一特定实施方案中,提供了包含SEQ ID NO:15的重链可变区和SEQ ID NO:17的重链恒定区的人源化抗体。

[0247] 在本发明的另一特定实施方案中,提供了包含SEQ ID NO:16的重链可变区和SEQ ID NO:17的重链恒定区的人源化抗体。

[0248] 在一个实施方案中,如本文所描述的根据本发明的人源化抗体与具有至少30个、特别地至少35个、更特别地至少38个、甚至更特别地至少40个氨基酸残基的A β 单体肽和/或包含多个所述A β 单体单位的A β 聚合可溶性淀粉状蛋白肽,但尤其是与A β_{1-42} 单体肽和/或包含多个所述A β_{1-42} 单体单位的A β 聚合可溶性淀粉状蛋白肽共孵育,特别地以高达1:1000、特别地高达1:500,更特别地高达1:300,甚至更特别地高达1:200的抗体对A β_{1-42} 的摩尔浓度比,但尤其是1:10至1:100之间的摩尔浓度比共孵育后,抑制了A β 单体聚集成高分子的聚合原纤维。

[0249] 具体而言,根据本发明的抗体和淀粉状蛋白单体肽和/或聚合可溶性淀粉状蛋白肽的共孵育在28℃至40℃之间,特别地在32℃和38℃之间,更特别地在37℃的温度进行24小时至60小时,特别地30小时至50小时,更特别地48小时,但尤其是24小时。

[0250] 在本发明特定的实施方案中,与淀粉状蛋白单体肽和/或聚合可溶性淀粉状蛋白肽的共孵育在37℃的温度进行24小时。

[0251] 具体而言,包括任何功能等效抗体或其功能部分的根据本发明的抗体,特别是人源化抗体,结合A β_{1-42} 单体肽和/或包含多个所述A β_{1-42} 单体单位的A β 聚合可溶性淀粉状蛋白肽,并且在与A β_{1-42} 单体肽和/或包含多个所述A β_{1-42} 单体单位的A β 聚合可溶性淀粉状蛋白肽共孵育后,抑制了A β 单体和/或聚合体聚集成高分子的聚合原纤维。

[0252] 在一个实施方案中,与在缓冲液中孵育的分别的淀粉状蛋白肽单体(对照)相比较,在高达1:1000的抗体对A β_{1-42} 的摩尔浓度比、特别地1:10至1:100之间的摩尔浓度比、尤其是1:10的摩尔浓度比时,包括任何功能等效抗体或其功能部分的根据本发明的抗体,特别是人源化抗体,至少50%、特别地至少60%、特别地至少65%、更特别地至少75%、甚至特别地至少80%、但尤其是85%-90%抑制A β 单体和/或包含多个所述A β 单体单位的A β 可溶性聚合体聚集成高分子的聚合原纤维。

[0253] 在本发明特定的实施方案中,在1:100的抗体对A β_{1-42} 的摩尔浓度比时,包括任何功能等效抗体或其功能部分的根据本发明的抗体,特别是人源化抗体,至少30%抑制A β 单体和/或包含多个所述A β 单体单位的A β 可溶性聚合体聚集成高分子的聚合原纤维。

[0254] 在本发明另一特定的实施方案中,在1:10的抗体对A β_{1-42} 的摩尔浓度比时,包括任何功能等效抗体或其功能部分的根据本发明的抗体,特别是人源化抗体,至少80%抑制A β 单体和/或包含多个所述A β 单体单位的A β 可溶性聚合体聚集成高分子的聚合原纤维。

[0255] 根据本发明和如本文所描述的抗体与形成淀粉状蛋白的单体和/或聚合肽,但特别是与淀粉状蛋白形式(1-42)的结合导致了对单体和/或聚合的形成淀粉状蛋白的肽聚集成高分子原纤维或纤维的抑制。通过对形成淀粉状蛋白的单体和/或聚合肽聚集的抑制,根据本发明的抗体能够预防或减缓淀粉状蛋白斑,特别是淀粉状蛋白形式(1-42)的形成,众所周知淀粉状蛋白形式(1-42)通过二级构象的改变变得不可溶,并且是患病动物或人类脑中淀粉状蛋白斑的主要部分。

[0256] 根据本发明的抗体的聚集抑制潜力可以通过任何本领域所熟知的合适的方法来测定,特别是通过密度梯度超速离心法,随后通过在预先形成梯度上的SDS-PAGE沉降分析法和/或通过硫代黄素T(thioflavin, Th-T) 荧光测定法来测定。

[0257] 在一个实施方案中,本发明涉及包括任何功能等效抗体或其功能部分的如本文所描述的抗体,特别是人源化抗体,所述抗体在与由具有至少30个、特别地至少35个、更特别地至少38个、甚至更特别地至少40个氨基酸残基的A β 单体肽,但尤其是A β ₁₋₄₂单体肽聚集形成的预形成高分子聚合淀粉状蛋白原纤维或纤丝共孵育,特别地以1:5至1:1000之间、特别地以1:10至1:500之间、更特别地以1:10至1:300之间、甚至更特别地以1:10至1:100之间的摩尔浓度比共孵育后,能够使预形成的聚合的原纤维或纤丝解聚至少20%,特别地至少30%,更特别地至少35%,甚至更特别地至少40%,但尤其是至少50%或更高。

[0258] 在本发明特定的实施方案中,通过密度梯度超速离心法,随之通过在预先形成的梯度上的SDS-PAGE沉降分析法分别测定抗体的聚集抑制和解聚潜力。

[0259] 在本发明另一特定的实施方案中,通过硫代黄素T(Th-T) 荧光测定法来分别测定抗体的聚集抑制和解聚潜力。

[0260] 在另一特定的实施方案中,根据本发明的抗体与淀粉状蛋白预形成的高分子聚合淀粉状蛋白原纤维或纤丝在28℃至40℃之间的温度,特别地在32℃和38℃之间,更特别地在37℃共孵育12小时至36小时,特别地18小时至30小时,更特别地24小时。

[0261] 具体而言,与预形成的高分子聚合淀粉状蛋白原纤维或纤丝在37℃的温度共孵育24小时。

[0262] 在本发明特定的实施方案中,于1:100的抗体对A β 1-42的摩尔浓度比时,包括任何功能等效抗体或其功能部分的根据本发明的抗体,特别是人源化抗体,能够使预形成的聚合原纤维或纤丝解聚至少24%。

[0263] 在本发明另一特定的实施方案中,于1:10的抗体对A β 1-42的摩尔浓度比时,包括任何功能等效抗体或其功能部分的根据本发明的抗体,特别是人源化抗体,能够使预形成的聚合原纤维或纤丝解聚至少32%。

[0264] 通过形成淀粉状蛋白的聚合原纤维或纤丝的解聚,根据本发明的抗体能够预防或减缓淀粉状蛋白斑的形成,这能导致与疾病相关症状的缓解及其进展的延缓或逆转。

[0265] 因此,本发明另一个实施方案提供了如上文所描述的包括任何功能等效抗体或其功能部分的抗体,特别是人源化抗体,所述抗体能够降低患有导致脑中A β 浓度增加的疾病或病症的动物,特别是哺乳动物,但尤其是人类脑中A β 的总量。

[0266] 在另一个实施方案中,本发明涉及根据本发明和如上文所描述的人源化抗体,所述抗体是双功能的,因为它表现出聚集抑制特性以及解聚特性两者,特别是配以高度的构象敏感性。

[0267] 具体而言,本发明涉及根据本发明和如上文所描述的嵌合抗体或嵌合抗体片段,或人源化抗体或人源化抗体片段,所述抗体与淀粉状蛋白单体肽和/或聚合可溶性淀粉状蛋白肽,特别是 β -淀粉状蛋白单体肽,例如,诸如A β 单体肽1-39、1-40、1-41或1-42,和/或包含多个所述A β 单体单位的聚合可溶性 β -淀粉状蛋白肽,但尤其是A β ₁₋₄₂单体和/或包含多个所述A β ₁₋₄₂单体单位的A β 聚合可溶性淀粉状蛋白肽共孵育后,抑制了A β 单体聚集成高分子的聚合原纤维或纤丝,并且此外,在与由淀粉状蛋白单体肽,特别是 β -淀粉状蛋白单体肽,

例如,诸如A β 单体肽1-39、1-40、1-41或1-42,但尤其是A β ₁₋₄₂单体肽的聚集形成的预形成高分子聚合淀粉状蛋白原纤维或纤维共孵育后,能够解聚预形成的聚合原纤维或纤维。

[0268] 另一方面,本发明涉及根据本发明和如上文所描述的嵌合抗体或嵌合抗体片段,或人源化抗体或人源化抗体片段,所述抗体能够引起 β 折叠构象向 α 螺旋和/或无规则卷曲构象,但特别是无规则卷曲构象,甚至更特别的是在分子内给定区域(尤其是在A β 蛋白的Tyr 10和Val 12环境中)的无规则卷曲构象的转变,这导致了以 β 折叠为代价的无规则卷曲构象的增加,以及预形成的高分子聚合淀粉状蛋白原纤维或纤维的溶解的提高。具体而言,当与在缓冲液中孵育的分别的预形成淀粉状蛋白聚合原纤维或纤维(对照)相比较, β 折叠构象减少了至少30%,特别地至少35%,以及更特别地至少40%及更多。

[0269] 通过固态¹³C NMR光谱学,但具体而言,通过测定A β ₁₋₄₂肽中的Tyr10和Val 12 C β 的构象的积分强度来测定抗体在引起二级结构转变中的潜力。

[0270] 在本发明的其它实施方案中,提供了根据本发明和如上文所描述的包含至少一个轻链或其片段、或至少一个重链或其片段的嵌合抗体或嵌合抗体片段,或人源化抗体或人源化抗体片段,其中所述抗体或片段以至少约 1×10^{-7} M至至少约 1×10^{-12} M,特别地至少约 1×10^{-8} M至至少约 1×10^{-11} M,更特别地至少约 1×10^{-9} M至至少约 1×10^{-10} M,甚至更特别地至少约 1×10^{-8} M至至少约 2×10^{-8} M之间范围的 K_D 的高结合亲和力与A β 单体结合,但优选地不显示出任何显著的与淀粉状蛋白前体蛋白(APP)的交叉反应性。

[0271] 在本发明的另一实施方案中,提供了根据本发明和如上文所描述的包含至少一个轻链或其片段、或至少一个重链或其片段的嵌合抗体或嵌合抗体片段,或人源化抗体或人源化抗体片段,其中所述抗体或片段以至少约 1×10^{-7} M至至少约 1×10^{-12} M,特别地至少约 1×10^{-8} M至至少约 1×10^{-11} M,更特别地至少约 1×10^{-9} M至至少约 1×10^{-10} M,甚至更特别地至少约 2×10^{-9} M至至少约 5×10^{-9} M之间范围的 K_D 的高结合亲和力与A β 纤维、原纤维或纤维结合,但优选地不显示出任何显著的与淀粉状蛋白前体蛋白(APP)的交叉反应性。

[0272] 在另一实施方案中,根据本发明和如上文描述的抗体或其片段表现出比与A β 单体的结合亲和力高至少2倍,特别地至少4倍,特别地至少10倍,特别地至少15倍,更特别地高至少20倍,但尤其是至少25倍的与A β 纤维、原纤维或纤维的结合亲和力。

[0273] 在另一实施方案中,提供了如上文所描述的嵌合抗体或嵌合抗体片段,或人源化抗体或人源化抗体片段,所述抗体基本上与哺乳动物、特别是人类脑中的包括A β 斑在內的聚集的A β 结合,但优选地不显示出任何显著的与淀粉状蛋白前体蛋白(APP)的交叉反应性。

[0274] 在本发明的另一方面,提供了如上文所描述的嵌合抗体或嵌合抗体片段,或人源化抗体或人源化抗体片段,所述抗体基本上与哺乳动物、特别是人类脑中的可溶的聚合淀粉状蛋白、特别是包括A β 单体在內的淀粉状蛋白 β (A β)结合,但优选地不显示出任何显著的与淀粉状蛋白前体蛋白(APP)的交叉反应性。

[0275] 还提供了根据本发明和如上文所描述的嵌合抗体或嵌合抗体片段,或人源化抗体或人源化抗体片段,所述抗体显著地减少哺乳动物,特别是人类脑中的A β 斑块负荷。这可以通过以下方法达到:使抗体与斑块结合,或通过诱导构象的转变和结合并稳定组织和/或体液、特别是脑中解聚的和溶解的淀粉状蛋白形式,尤其是淀粉状蛋白 β (A β)形式,从而使纤维解聚为可溶的聚合或单体形式,从而改变淀粉状蛋白、特别是淀粉状蛋白 β (A β)之间的平衡,使不溶和聚集状态转变为其可溶形式。通过根据本发明的抗体的活性,使得外周的

清除和代谢是占优势的,而不是沉积于组织和/或体液、特别是脑中。由此,不使抗体与斑块结合也能得到根据本发明的抗体的有益效果。

[0276] 通过这一稳定活性,根据本发明的抗体能够中和组织和/体液中聚合和较少聚集的可溶淀粉状蛋白、特别是淀粉状蛋白 β (A β) 蛋白的毒性作用。在本发明特定的实施方案中,根据本发明的抗体因此可以不一定需要结合脑中聚集的淀粉状蛋白 β 即能达到其有益效果。

[0277] 在本发明的其它方面,提供了根据本发明和如上文描述的人源化抗体或人源化抗体片段,其包含掺入有至少一个、特别地至少两个以及更特别地三个获自小鼠供体抗体、特别是获自小鼠抗体ACI-01-Ab7C2(在本申请中称为“mC2”,且对于人源化C2抗体,称为“hC2”)的CDR区的至少一个轻链或其片段、或至少一个重链或其片段,其中所述抗体或其片段具有比小鼠供体抗体高至少5倍、特别地至少8倍、更特别地至少10倍、但尤其是至少15倍的对A β 抗原的亲和力,其中所述抗体ACI-01-Ab7C2于2005年12月1日以保藏号DSM ACC2750保藏在位于德国布劳恩斯切魏格,38124布劳恩斯切魏格,马斯切尔奥德尔韦格1B的“德意志微生物保藏中心(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ)”中。

[0278] 在一个实施方案中,本发明的抗体可以是任何同种型和亚型(例如,IgM、IgD、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgE、IgA1和IgA2)的完整抗体(例如,具有两个全长的轻链和两个全长的重链);但尤其是IgG4同种型抗体;备选地,在另一个实施方案中,其可以是完整抗体的抗原结合片段(例如,Fab、F(ab')₂和Fv)。

[0279] 因此,本发明还涉及本文描述的抗体的抗原结合片段。在本发明的一个实施方案中,该片段选自:Fab片段、Fab'片段、F(ab)₂片段以及F_v片段,包括Fab免疫球蛋白表达文库的产物以及任一上述抗体和片段的表位结合片段。

[0280] 在另一个实施方案中,将本发明的抗体或抗原结合片段与聚乙二醇缀合。在另一个实施方案中,对本发明抗体的恒定区进行修饰以相对于未修饰的抗体减少至少一种恒定区介导的生物效应子功能。在另一个实施方案中,本发明的抗体或抗原结合片段包含具有经改变的效应子功能的Fc区。

[0281] 本发明还涉及包含编码根据本发明和如上文描述的嵌合抗体或嵌合抗体片段、或人源化抗体或人源化抗体片段的核苷酸序列的核苷酸分子。

[0282] 具体而言,本发明涉及包含编码如分别在SEQ ID NO:2和3中给出的一段连续氨基酸分子(其代表重链可变区(HCVR)的互补决定区(CDR)2和3)的核苷酸序列、或其互补序列的核苷酸分子。

[0283] 更具体地,本发明涉及包含编码如SEQ ID NO:4给出的代表轻链可变区(LCVR)的互补决定区(CDR)1的一段连续氨基酸分子的核苷酸序列、或其互补序列的核苷酸分子。

[0284] 在本发明的另一个实施方案中,提供了包含如SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19给出的核苷酸序列、或其互补序列的核苷酸分子,其中所述核苷酸分子分别编码重链可变区(HCVR)的CDR2和CDR3的氨基酸序列。

[0285] 在本发明的另一个实施方案中,提供了包含如SEQ ID NO:20给出的核苷酸序列、或其互补序列的核苷酸分子,其中所述核苷酸分子为编码轻链可变区(LCVR)CDR1的核苷酸序列。

[0286] 在本发明的另一个实施方案中,提供了包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列、或其互补序列的核苷酸分子,其中所述核苷酸分子编码轻链可变区。

[0287] 在本发明的另一个实施方案中,提供了包含SEQ ID NO:22的核苷酸序列、或其互补序列的核苷酸分子,其中所述核苷酸分子编码包括了信号序列的完整的轻链可变区。

[0288] 在本发明的另一个实施方案中,提供了包含SEQ ID NO:22的编码轻链可变区的核苷酸序列和SEQ ID NO:23的编码轻链恒定区的核苷酸序列的核苷酸分子。本发明还包含所述核苷酸分子的互补链。

[0289] 在本发明的另一个实施方案中,提供了包含SEQ ID NO:24的编码重链可变区的核苷酸序列的核苷酸分子。本发明还包含所述核苷酸分子的互补链。

[0290] 在本发明的另一个实施方案中,提供了包含SEQ ID NO:25的编码包括了信号序列的完整的重链可变区的核苷酸序列的核苷酸分子。本发明还包含所述核苷酸分子的互补链。

[0291] 在本发明的另一个实施方案中,提供了包含SEQ ID NO:25的编码重链可变区的核苷酸序列和SEQ ID NO:26的编码重链恒定区的核苷酸序列的核苷酸分子。本发明还包含所述核苷酸分子的互补链。

[0292] 本发明还包括分离的或作为较大核苷酸分子的一部分的下述核苷酸序列,其中所述核苷酸序列杂交至上述本发明的编码抗体的核苷酸序列之一、特别地杂交至其互补链。

[0293] 具体而言,本发明涉及在常规杂交条件下,特别地在严格杂交条件下杂交至在SEQ ID NO:18-26和29-32给出的任一核苷酸序列的核苷酸序列,特别地杂交至其互补链的核苷酸序列。

[0294] 在本发明的另一个实施方案中,提供了包含根据本发明和如上文提及的核酸分子的表达载体。

[0295] 在本发明的另一个实施方案中,提供了包含表达载体的细胞,其中所述表达载体包含根据本发明和如上文提及的核酸分子。

[0296] 在另一个实施方案中,本发明涉及包含治疗有效量的根据本发明的抗体,但特别是包括任何功能等效抗体或任何衍生物或其功能部分在内的根据本发明和如上文描述的嵌合抗体或嵌合抗体片段、或人源化抗体或人源化抗体片段的组合物;具体而言是这样的组合物,即其为任选地还包含可药用载体的药物组合物。

[0297] 在本发明的另一实施方案中,所述组合物包含治疗有效量的抗体。

[0298] 本发明还包含混合物,所述混合物包含治疗有效量的抗体,特别是根据本发明的单克隆抗体,但特别是包括任何功能等效抗体或任何衍生物或其功能部分在内的根据本发明和如上文描述的嵌合抗体或嵌合抗体片段、或人源化抗体或人源化抗体片段,以及任选地其它生物活性物质和/或可药用载体和/或稀释剂和/或赋形剂。

[0299] 具体而言,本发明涉及混合物,其中其它生物活性物质是在治疗淀粉状变性中使用的化合物,所述淀粉状变性是一组与淀粉状蛋白或淀粉状蛋白样蛋白,诸如参与阿尔茨海默病的A β 蛋白相关的疾病和病症。

[0300] 在本发明的另一个实施方案中,其它生物活性物质或化合物还可以是可用于治疗由淀粉状蛋白 β 引起的淀粉状变性或可以用于治疗其它神经病症的治疗剂。

[0301] 其它生物活性物质或化合物可以通过与根据本发明的抗体相同或相似的机理,或

通过不相关的作用机理,或通过多种相关和/或不相关的作用机理发挥它的生物学效果。

[0302] 一般地,其它的生物活性化合物可以包括中子透射增强剂、精神病治疗药物、乙酰胆碱酯酶抑制剂、钙通道阻断剂、生物胺、苯并二氮~~革~~类镇静剂、乙酰胆碱合成、贮藏或释放增强剂、乙酰胆碱突触后受体激动剂、单胺氧化酶-A或-B抑制剂、N-甲基-D-天冬氨酸谷氨酸受体拮抗剂、非甾体类抗炎药物、抗氧化剂和5-羟色胺能受体拮抗剂。

[0303] 更具体地,本发明涉及混合物,其包含根据本发明的抗体、任选的可药用载体和/或稀释剂和/或赋形剂、以及至少一种选自以下的化合物:有效抗氧化应激的化合物、抗细胞凋亡的化合物、金属螯合剂、DNA修复抑制剂诸如哌仑西平和代谢物、3-氨基-1-丙磺酸(3APS)、1,3-丙二磺酸(1,3PDS)、 α -分泌酶活化剂、 β -和 γ -分泌酶抑制剂、 τ 蛋白、神经递质、 β 折叠破坏剂、淀粉状蛋白 β 清除/减少细胞内组分的引诱剂、包括焦谷氨酸化淀粉状蛋白 β 3-42在内的N端截短淀粉状蛋白 β 的抑制剂、消炎分子、或胆碱酯酶抑制剂(ChEI)(诸如他克林、卡巴拉汀、多奈哌齐、和/或加兰他敏)、M1激动剂和其它药物,包括任何淀粉状蛋白或 τ 修饰药物和营养补充剂、以及营养补充剂。

[0304] 本发明还涉及混合物,其中该化合物是胆碱酯酶抑制剂(ChEI),特别是这样的混合物,其中该化合物选自他克林、卡巴拉汀、多奈哌齐、加兰他敏、烟酸和美金刚胺(memantine)。

[0305] 在另外的实施方案中,根据本发明的混合物可以包含烟酸或美金刚胺、根据本发明的抗体、以及任选的可药用载体和/或稀释剂和/或赋形剂。

[0306] 在本发明的另一个实施方案中,提供了混合物,其包含用于治疗包括幻觉、妄想症、思维障碍(表现为显著的无条理、思维不中肯、言不及义)以及古怪或紊乱的行为和快感缺乏、情感单调、冷淡、和不合群的阳性和阴性精神病症状的“非典型的抗精神病药物”,例如,诸如氯氮平、齐拉西酮、利哌利酮、阿立哌唑或奥氮平,以及抗体,特别是根据本发明的单克隆抗体,但特别是根据本发明和如本文描述的嵌合抗体或嵌合抗体片段或人源化抗体或人源化抗体片段,以及任选的可药用载体和/或稀释剂和/或赋形剂。

[0307] 在本发明的特别的实施方案中,根据本发明和如上文描述的组合物和混合物包含分别是治疗有效量的抗体和生物活性物质。

[0308] 适合与根据本发明的抗体联合用于混合物中的其它化合物描述于W02004/058258(特别参见16和17页),包括治疗性药物靶标(36-39页)、链烷磺酸和烷醇硫酸(39-51页)、胆碱酯酶抑制剂(51-56页)、NMDA受体拮抗剂(56-58页)、雌激素(58-59页)、非甾体抗炎药(60-61页)、抗氧化剂(61-62页)、过氧化物酶体增殖物活化的受体(PPAR)激动剂(63-67页)、降胆固醇剂(68-75页)、淀粉状蛋白抑制剂(75-77页);淀粉状蛋白形成抑制剂(77-78页)、金属螯合剂(78-79页)、精神抑制剂和抗抑郁剂(80-82页)、营养补充物(83-89页)、增加脑中生物活性物质可利用性的化合物(参见89-93页)和前体药物(93和94页),该文献在此处引入作为参考。

[0309] 在另一个实施方案中,本发明涉及混合物,其包含治疗有效量的抗体,特别是根据本发明的单克隆抗体,但特别是根据本发明和如上文描述的嵌合抗体或嵌合抗体片段或人源化抗体或人源化抗体片段和/或生物活性物质。

[0310] 本发明还涉及抗体,特别是根据本发明的单克隆抗体,但特别是根据本发明和如上文描述的嵌合抗体或嵌合抗体片段或人源化抗体或人源化抗体片段,和/或其功能部分,

和/或包含所述抗体的药物组合物或混合物在制备治疗或减轻淀粉状变性的效应的药物中的用途,所述淀粉状变性是一组与淀粉状蛋白斑的形成相关的疾病和病症,包括继发性淀粉状变性和年龄相关性淀粉状变性,诸如以下疾病,包括但不限于神经疾病诸如阿尔茨海默病(AD)、路易体痴呆、唐氏综合征、遗传性脑出血伴淀粉状变性(荷兰型)、关岛帕金森-痴呆综合征;以及其它基于淀粉状蛋白样蛋白或与其相关的疾病,诸如进行性核上性麻痹、多发性硬化、克-雅二氏病、帕金森氏病、HIV-相关痴呆、ALS(肌萎缩性侧索硬化症)、成年发病型糖尿病、老年性心脏淀粉状变性、内分泌肿瘤,以及其它疾病,包括黄斑变性。

[0311] 本发明还包括制备用于预防、治疗或减轻淀粉状变性的效应的方法中的抗体,特别是根据本发明的单克隆抗体,但特别是根据本发明和如上文描述的嵌合抗体或嵌合抗体片段或人源化抗体或人源化抗体片段,和/或其功能部分,和/或包含特别是治疗有效量的所述抗体和/或其功能部分的药物组合物或混合物的方法,所述方法包括以可药用形式配制抗体,特别是根据本发明的单克隆抗体,但特别是根据本发明的嵌合抗体或嵌合抗体片段或人源化抗体或人源化抗体片段,其中所述淀粉状变性是一组与淀粉状蛋白斑的形成相关的疾病和病症,包括继发性淀粉状变性和年龄相关性淀粉状变性,诸如以下疾病,包括但不限于神经疾病诸如阿尔茨海默病(AD)、路易体痴呆、唐氏综合征、遗传性脑出血伴淀粉状变性(荷兰型)、关岛帕金森-痴呆综合征;以及其它基于淀粉状蛋白样蛋白或与其相关的疾病,诸如进行性核上性麻痹、多发性硬化、克-雅二氏病、帕金森氏病、HIV-相关痴呆、ALS(肌萎缩性侧索硬化症)、成年发病型糖尿病、老年性心脏淀粉状变性、内分泌肿瘤,以及其它疾病,包括黄斑变性。

[0312] 本发明还包括预防、治疗或减轻淀粉状变性的效应的方法,所述淀粉状变性是一组与淀粉状蛋白斑的形成相关的疾病和病症,包括继发性淀粉状变性和年龄相关性淀粉状变性,诸如以下疾病,包括但不限于神经疾病诸如阿尔茨海默病(AD)、路易体痴呆、唐氏综合征、遗传性脑出血伴淀粉状变性(荷兰型)、关岛帕金森-痴呆综合征;以及其它基于淀粉状蛋白样蛋白或与其相关的疾病,诸如进行性核上性麻痹、多发性硬化、克-雅二氏病、帕金森氏病、HIV-相关痴呆、ALS(肌萎缩性侧索硬化症)、成年发病型糖尿病、老年性心脏淀粉状变性、内分泌肿瘤,以及其它疾病,包括黄斑变性,所述方法通过施与抗体和/或其功能部分,但特别是人源化抗体和/或其功能部分,或包含此类抗体和/或其功能部分的组合物或混合物给受到此类病症影响的动物或人类,包括施与治疗有效量的抗体。

[0313] 提供治疗淀粉状变性的方法也是本发明的一个目的,所述淀粉状变性是一组与淀粉状蛋白斑的形成相关的疾病和病症,包括继发性淀粉状变性和年龄相关性淀粉状变性,包括但不限于神经疾病诸如阿尔茨海默病(AD),特别是以认知记忆能力丧失为特征的疾病或病症,所述方法通过给动物、特别是哺乳动物或人类施与根据本发明和如本文描述的抗体,特别是药物组合物。

[0314] 在本发明特定的实施方案中,提供了通过给动物、特别是哺乳动物或人类施与根据本发明和如上文描述的抗体、特别是药物组合物来保持或增加认知记忆能力,但特别是恢复患有记忆障碍的动物、特别是哺乳动物或人类的认知记忆能力的方法。

[0315] 本发明的另一个目的是,提供应用了根据本发明和如上文所描述的抗体的治疗组合物和制备此类组合物的方法,以及用于治疗淀粉状变性的方法,所述淀粉状变性是一组与淀粉状蛋白斑的形成相关的疾病和病症,包括继发性淀粉状变性和年龄相关性淀粉状变

性,包括但不限于神经疾病诸如阿尔茨海默病(AD),特别是以认知记忆能力丧失为特征的疾病或病症。

[0316] 具体而言,本发明涉及导致患有以认知记忆能力丧失为特征的淀粉状蛋白相关病症的动物、特别是哺乳动物或人类保持认知记忆能力的治疗。

[0317] 本发明还涉及在患者中诊断淀粉状蛋白相关疾病或病症的方法,包括检测抗体或其活性片段对样本中或原位的淀粉状蛋白表位的免疫特异性结合,所述方法包括以下步骤:

[0318] (a) 使怀疑含有淀粉状蛋白的样本或特定身体部分或身体区域与抗体,特别是根据本发明的单克隆抗体,但特别是根据本发明和如上文描述的嵌合抗体或嵌合抗体片段或人源化抗体或人源化抗体片段,和/或其功能部分接触,所述抗体结合淀粉状蛋白的表位;

[0319] (b) 允许抗体和/或其功能部分结合至淀粉状蛋白以形成免疫复合物;

[0320] (c) 检测免疫复合物的形成;以及

[0321] (d) 将免疫复合物的存在或不存在与样本或特定身体部分或区域中淀粉状蛋白的存在或不存在相关联。

[0322] 还包括确定组织和/或体液中产生淀粉状蛋白的斑块负荷的程度的方法,包括:

[0323] (a) 获得代表所研究的组织和/或体液的样本;

[0324] (b) 用抗体,特别是根据本发明的单克隆抗体,但特别是根据本发明和如上文描述的嵌合抗体或嵌合抗体片段或人源化抗体或人源化抗体片段,和/或其功能部分测试所述样本中淀粉状蛋白的存在;

[0325] (c) 确定结合到蛋白的抗体的量;以及

[0326] (d) 计算组织和/或体液中的斑块负荷。

[0327] 具体而言,本发明涉及确定组织和/或体液中产生淀粉状蛋白的斑块负荷的程度的方法,其中确定在步骤c)中的免疫复合物的形成,从而使免疫复合物的存在或不存在与淀粉状蛋白的存在或不存在相关联。

[0328] 在本发明的另一实施方案中,提供了用于检测和诊断淀粉状蛋白相关疾病和病症的测试试剂盒,其包括抗体,特别是根据本发明的单克隆抗体,但特别是根据本发明和如上文描述的嵌合抗体或嵌合抗体片段或人源化抗体或人源化抗体片段,和/或其功能部分。

[0329] 具体而言,本发明涉及用于检测和诊断淀粉状蛋白相关疾病和病症的测试试剂盒,其包含容纳一种或多种根据本发明的抗体,和/或其功能部分的容器,以及使用抗体用于结合淀粉状蛋白以形成免疫复合物,以及检测免疫复合物的形成,从而使免疫复合物的存在或不存在与淀粉状蛋白存在或不存在相关联的说明书。

[0330] 另一方面,本发明提供了包含如SEQ ID NO:27所示可变区的抗体,或其变体。在一个实施方案中,细胞系表达该抗体。

[0331] 另一方面,本发明提供了包含如SEQ ID NO:29所示可变区的抗体基因,或其变体。在一个实施方案中,细胞系表达该抗体。

[0332] 另一方面,本发明提供了用于解聚预形成的 β 淀粉状蛋白纤维的方法,包括使hC2抗体与预形成的 β 淀粉状蛋白纤维接触。

[0333] 另一方面,本发明提供了根据前述权利要求任一项的人源化抗体其片段,其中所述抗体或其片段使神经元免受A β 诱导的变性。

[0334] 另一方面,本发明提供了预防A β 诱导的神经元变性的方法,包括用有效量的根据本发明的人源化抗体或人源化抗体片段处理神经元。

[0335] 另一方面,本发明提供了根据本说明书的人源化抗体或人源化抗体片段在制备用于预防神经元在暴露于A β 寡聚体后的变性的药物中的用途。

[0336] 在阅读了以下所公开的实施方案的详细说明和所附权利要求后,本发明的这些和其它目的、特征和优点将变得显而易见。

[0337] 附图和序列简述

[0338] 图1(实施例2):嵌合抗体的小鼠轻链可变区表达盒

[0339] 图2(实施例2):嵌合抗体的小鼠重链可变区表达盒

[0340] 图3(实施例5.2):小鼠重链可变区与最接近的鼠种系序列的比较

[0341] 图4(实施例8):纯化的人源化C2抗体的活性

[0342] 图5(实施例9):与通过瞬时转染产生的嵌合抗体C2ChVHAF/ChVK以及纯化的抗体相比较,通过瞬时表达与C2嵌合重链连接的C2修饰的CDRL2构建体产生的抗体的结合活性。

[0343] 图6(实施例11):嵌合抗体AF和人源化抗体H4K1的免疫组织化学结合测试法的结果

[0344] 图7(实施例12):mC2对淀粉状蛋白纤维的功能性

[0345] 图8(实施例12):在ELISA中人源化C2的结合亲和力

[0346] 图9(实施例14):mC2对不同类淀粉状蛋白的构象特异性结合。在该图说明中的沉淀制备物指A β ₁₋₄₂纤维,上清制备物指淀粉状蛋白单体。

[0347] 图10:与鼠序列和人类受体序列DPK15和J κ 1相比较的人源化C2VK序列

[0348] 图11:与鼠序列和人类受体序列DP54和J μ 6相比较的人源化C2 VH序列

[0349] 图12:C2人源化抗体C2HuVK1的轻链可变区的完整DNA和蛋白序列

[0350] 图13:人源化C2抗体的轻链恒定区(人类C κ)的完整DNA和蛋白序列

[0351] 图14:人源化C2抗体的重链恒定区(人类IgG4ser228-pro)的完整DNA和蛋白序列

[0352] 图15A-C(实施例15):表位作图实验的结果

[0353] 图16(实施例13):聚集测试法实验的结果

[0354] 图17(实施例13):解聚测试法实验的结果

[0355] 图18(实施例16):用人源化抗体C2的神经保护实验的结果

[0356] SEQ ID NO:1 C2 HuVH AF 4人源化重链可变区(CDR1)的氨基酸序列

[0357] SEQ ID NO:2 C2 HuVH AF 4人源化重链可变区(CDR2)的氨基酸序列

[0358] SEQ ID NO:3 C2 HuVH AF 4人源化重链可变区(CDR3)的氨基酸序列

[0359] SEQ ID NO:4 C2 HuVK 1人源化轻链可变区(CDR1)的氨基酸序列

[0360] SEQ ID NO:5 C2 HuVK 1人源化轻链可变区(CDR2)的氨基酸序列

[0361] SEQ ID NO:6 C2 HuVK 1人源化轻链可变区(CDR3)的氨基酸序列

[0362] SEQ ID NO:7 A β 表位区2的氨基酸序列

[0363] SEQ ID NO:8 A β 表位区1的氨基酸序列

[0364] SEQ ID NO:9 A β 表位区2修饰的氨基酸序列

[0365] SEQ ID NO:10 A β 表位区1修饰的氨基酸序列

[0366] SEQ ID NO:11 表位区修饰的完全的氨基酸序列

- [0367] SEQ ID NO:12 C2 HuVK 1人源化轻链可变区的氨基酸序列
- [0368] SEQ ID NO:13 C2人源化轻链的氨基酸序列
- [0369] SEQ ID NO:14 人源化C2轻链恒定区的氨基酸序列
- [0370] SEQ ID NO:15 C2 HuVH AF 4人源化重链可变区的氨基酸序列
- [0371] SEQ ID NO:16 C2人源化重链的氨基酸序列
- [0372] SEQ ID NO:17 Ig γ -4链C区修饰的氨基酸序列
- [0373] SEQ ID NO:18 C2 HuVH AF 4人源化重链可变区CDR2的核苷酸序列
- [0374] SEQ ID NO:19 C2 HuVH AF 4人源化重链可变区CDR3的核苷酸序列
- [0375] SEQ ID NO:20 C2 HuVK 1人源化轻链可变区CDR1的核苷酸序列
- [0376] SEQ ID NO:21 C2 HuVK 1人源化轻链可变区的核苷酸序列
- [0377] SEQ ID NO:22 C2人源化轻链的核苷酸序列
- [0378] SEQ ID NO:23 C2人源化轻链恒定区的核苷酸序列
- [0379] SEQ ID NO:24 C2 HuVH AF 4人源化重链可变区的核苷酸序列
- [0380] SEQ ID NO:25 C2人源化重链的核苷酸序列
- [0381] SEQ ID NO:26 C2人源化重链恒定区的核苷酸序列
- [0382] SEQ ID NO:27 小鼠C2轻链可变区的氨基酸序列
- [0383] SEQ ID NO:28 小鼠C2重链可变区的氨基酸序列
- [0384] SEQ ID NO:29 小鼠C2轻链可变区的核苷酸序列
- [0385] SEQ ID NO:30 小鼠C2轻链的核苷酸序列
- [0386] SEQ ID NO:31 小鼠C2重链可变区的核苷酸序列
- [0387] SEQ ID NO:32 小鼠C2重链的核苷酸序列
- [0388] 定义
- [0389] 文中使用的术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”可以互换,并定义为由通过肽键连接的氨基酸组成的生物分子。
- [0390] 除非上下文不合适,否则文中使用的术语“一”、“该”定义为“一个或多个”并且包括复数。
- [0391] 句子“由淀粉状蛋白或淀粉状蛋白样蛋白引起的或与其相关的疾病和病症”包括但不限于由单体、原纤维或聚合状态的淀粉状蛋白样蛋白,或该三者任意组合的存在或活性引起的疾病和病症。此类疾病和病症包括但不限于淀粉状变性、内分泌肿瘤和黄斑变性。
- [0392] 术语“淀粉状变性”是指一组与淀粉状蛋白斑的形成相关的疾病和病症,包括但不限于继发性淀粉状变性和年龄相关性淀粉状变性,诸如以下疾病,包括但不限于神经疾病诸如阿尔茨海默病(AD)、包括以认知记忆能力丧失为特征的疾病或病症,例如,诸如轻度认知损害(MCI)、路易体痴呆、唐氏综合征、遗传性脑出血伴淀粉状变性(荷兰型)、关岛帕金森-痴呆综合征;以及其它基于淀粉状蛋白样蛋白或与其相关的疾病,诸如进行性核上性麻痹、多发性硬化、克-雅二氏病、帕金森氏病、HIV-相关痴呆、ALS(肌萎缩性侧索硬化症)、包涵体肌炎(IBM)、成年发病型糖尿病、老年性心脏淀粉状变性,以及各种眼睛疾病,包括黄斑变性、脉络膜小疣相关视神经病、和由于 β 淀粉状蛋白沉积的白内障。
- [0393] 文中使用的术语“检测”定义为用已知的技术(诸如免疫化学或组织学方法)检测

生物分子,以及指在研究中定性或定量检测生物分子的存在或浓度。

[0394] “聚合的可溶淀粉状蛋白”是指多重聚集的淀粉状蛋白肽、或淀粉状蛋白样肽、或修饰的或截短的淀粉状蛋白肽或淀粉状蛋白肽其它衍生物的单体,其形成在哺乳动物或人类身体中、更特别地在脑中可溶的低聚或多聚结构,但特别是指多重聚集的淀粉状蛋白 β (A β) 或修饰的或截短的淀粉状蛋白 β (A β) 肽或其衍生物的单体,其在哺乳动物或人类身体中,更特别地在脑中是可溶的。

[0395] “淀粉状蛋白 β 、A β 或 β -淀粉状蛋白”是本领域认可的术语,并且指淀粉状蛋白 β 蛋白和肽、淀粉状蛋白 β 前体蛋白 (APP), 以及其修饰物、片段或任何功能等效物。具体而言,文中所使用的淀粉状蛋白 β 是指通过APP的蛋白酶剪切产生的任何片段,但尤其是那些参与淀粉状变性病理学或与之相关的片段,包括但不限于A β_{1-38} 、A β_{1-39} 、A β_{1-40} 、A β_{1-41} 、A β_{1-42} 和A β_{1-43} 。

[0396] 上面所提到的淀粉状蛋白 β 肽的结构和序列是本领域技术人员公知的,并且生产所述肽或从脑和其它组织中提取它们的方法描述于,例如Glennner和Wong, Biochem Biophys Res Comm 129, 885-890 (1984)。此外,淀粉状蛋白 β 肽也以多种形式商业可获得。

[0397] “分离的”意思是指生物分子没有至少一些与之天然存在的组分。

[0398] 文中应用的术语“抗体”是本领域认可的术语,其指结合到已知抗原的分子或分子的活性片段,特别是免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫学活性部分,即含有特异结合抗原的结合部位的分子。免疫球蛋白是包含一个或多个基本上由免疫球蛋白 κ 和 λ 、 α 、 γ 、 δ 、 ϵ 和 μ 恒定区基因、以及大量免疫球蛋白可变区基因编码的多肽的蛋白。轻链可分为 κ 或 λ 。重链可分为 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ ,其依次分别定义免疫球蛋白类型IgG、IgM、IgA、IgD和IgE。还已知了重链的亚类。例如,人类中的IgG重链可以是IgG1、IgG2、IgG3和IgG4亚类中的任一个。根据本发明的免疫球蛋白可以是任何的类 (IgG、IgM、IgD、IgE、IgA和IgY) 或亚类 (IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2) 的免疫球蛋白分子。

[0399] 文中使用的关于抗体的“特异性结合”是指该抗体以比其与结构上不同的抗原更高的亲和力与它的靶抗原结合。

[0400] 已知典型的免疫球蛋白结构单位包含四聚体。每一个四聚体包括两个相同的多肽链对,每一对具有一个“轻”链 (约25kD) 和一个“重”链 (约50-70kD)。每一个链的N端定义了约100至110个或更多个主要负责抗原识别的氨基酸的可变区。术语可变轻链 (V_L) 和可变重链 (V_H) 分别指这些轻链和重链。

[0401] 抗体可以作为全长完整的抗体或作为许多已很好的描述了的通过用各种肽酶或化学制品消化产生的片段存在。因此,例如,胃蛋白酶在铰链区的二硫键下面消化抗体产生F(ab')₂,其为Fab的二聚体,所述Fab本身是通过二硫键与 V_H -CH₁结合的轻链。F(ab')₂可以在中性条件下被还原以破坏铰链区中的二硫键,因此将F(ab')₂二聚体转化为Fab'单体。Fab'单体基本上是具有铰链区一部分的Fab片段 (其它抗体片段的更详细的描述请参见:基础免疫学 (Fundamental Immunology), W.E. Paul编辑, Raven Press, N.Y. (1993))。尽管各种抗体片段是根据完整抗体的消化来定义的,但本领域技术人员能够理解,可以通过化学或通过利用重组DNA方法从头合成任意的各种抗体片段。因此,文中使用的术语抗体还包括通过修饰完整抗体或从头合成产生的抗体片段,或通过应用重组DNA方法得到抗体或片段。

[0402] “抗体”在本发明的范围内意图包括单克隆抗体、多克隆抗体、嵌合抗体、单链抗

体、双特异性抗体、猿源化(simianized)抗体、人抗体和人源化抗体,以及其活性片段。结合已知抗原的分子的活性片段的实例包括分开的轻链和重链、Fab、Fab/c、Fv、Fab'和F(ab')₂片段,包括Fab免疫球蛋白表达文库的产物和上面提到的任何抗体和片段的表位结合片段。

[0403] 这些活性片段可以通过多种技术从本发明的抗体中衍生。例如,可以用酶,诸如胃蛋白酶切割单克隆抗体,然后经过HPLC凝胶过滤。然后可以通过膜过滤法等收集和浓缩合适的含有Fab片段的级分。抗原活性片段分离的其它常规用技术的描述可参见,例如Khaw, B.A.等, *J.Nucl.Med.* 23:1011-1019 (1982); Rousseaux等, *Methods Enzymology*, 121:663-69, Academic Press, 1986。

[0404] 重组制备的抗体可以是常规的全长抗体、来自蛋白水解消化的已知活性抗体片段、独特的活性抗体片段诸如Fv或单链Fv(scFv)、结构域缺失抗体等。Fv抗体约50Kd大小且包含轻链和重链可变区。单链Fv("scFv")多肽是共价连接的VH::VL异二聚体,其可以表达自包括编码VH和VL的序列的核酸,所述序列是直接连接的,或通过编码肽的接头连接。参见Huston等(1988) *Proc.Nat.Acad.Sci.USA*, 85:5879-5883。许多结构用于将来自抗体V区域的天然聚集的但化学上分离的轻和重多肽链转化为scFv分子,所述scFv分子将折叠为基本上与抗原结合部位的结构类似的三维结构。例如,参见美国专利5,091,513、5,132,405和4,956,778号。

[0405] 结合部位是指抗体分子的参与抗原结合的部分。抗原结合部位由重("H")和轻("L")链的N端可变("V")区的氨基酸残基形成。抗体可变区包含三个称为"高变区"或"互补决定区"(CDR)的高度相异的片段,其插入到称为"构架区"(FR)的更保守的侧翼片段之间。在抗体分子中,轻链的三个高变区(LCDR1、LCDR2、和LCDR3)和重链的三个高变区(HCDR1、HCDR2和HCDR3)在三维空间中相对于彼此布置以形成抗原结合表面或口袋。因此,抗原结合部位表示构成抗体CDR的氨基酸以及构成结合部位口袋的任何构架残基。

[0406] 可以应用本领域公知的方法确定在特定抗体中构成结合部位的氨基酸残基的特性。例如,可以如最初由Kabat等定义的高变区那样鉴定抗体CDR。(参见"免疫学感兴趣的蛋白质序列"("Sequences of Proteins of Immunological Interest"), E.Kabat等,美国健康和人类服务部(U.S.Department of Health and Human Services); Johnson, G和Wu, TT (2001), Kabat数据库及其应用:未来指引(Kabat Database and its applications: future directions), *Nucleic Acids Research*, 29:205-206; <http://immuno.bme.nwa.edu>)。也可以如最初由Chothia和其它人描述的结构上的环结构那样鉴定CDR的位置(参见Chothia和Lesk, *J.Mol.Biol.* 196,901 (1987)、Chothia等, *Nature* 342,877 (1989) 和Tramontano等, *J.Mol.Biol.* 215,175 (1990))。其它方法包括"AbM定义"或Macallum等的CDR的"接触定义"("抗原-抗体相互作用:接触分析和结合部位拓扑图"("Antibody-antigen interactions:contact analysis and binding site topography"), *J Mol Biol.* 1996年10月11日; 262(5):732-45), 所述"AbM定义"是Kabat和Chothia之间的折衷方案,并且是应用Oxford分子AbM抗体模建软件(现为Accelrys)衍生的。以下图表基于各种已知的定义鉴定CDR。

	环	Kabat	AbM	Chothia	接触
	----	-----	-----	-----	-----
	L1	L24 -- L34	L24 -- L34	L24 -- L34	L30 -- L36
	L2	L50 -- L56	L50 -- L56	L50 -- L56	L46 -- L55
	L3	L89 -- L97	L89 -- L97	L89 -- L97	L89 -- L96
[0407]	H1	H31 -- H35B	H26 -- H35B	H26 -- H32..34	H30 -- H35B
	Kabat 编号方式				
	H1	H31 -- H35	H26 -- H35	H26 -- H32	H30 -- H35
	Chothia 编号方式				
	H2	H50 -- H65	H50 -- H58	H52 -- H56	H47 -- H58
	H3	H95 -- H102	H95 -- H102	H95 -- H102	H93 -- H101

[0408] 人们可以通过仅从序列而鉴定抗体中的CDR的总体指导如下：

[0409] LCDR1：

[0410] 开始-约第24个残基。

[0411] 前面的残基总是Cys。

[0412] 后面的残基总是Trp。一般地，TRP之后是TYR-GLN，但也可能是LEU-GLN、PHE-GLN或TYR-LEU。

[0413] 长度是10至17个残基。

[0414] LCDR2：

[0415] 开始-在L1终点之后的第16个残基。

[0416] 前面的序列一般是ILE-TYR，但也可以是VAL-TYR、ILE-LYS或ILE-PHE。

[0417] 长度一般为7个残基。

[0418] LCDR3：

[0419] 开始-一般是L2终点之后的第33个残基。

[0420] 前面的残基是Cys。

[0421] 后面的序列是PHE-GLY-X-GLY。

[0422] 长度是7至11个残基。

[0423] HCDR1：

[0424] 开始-在约第26个残基(CYS后4个残基)[Chothia/AbM定义]，Kabat定义在5个残基以后开始。

[0425] 前面的序列是CYS-X-X-X。

[0426] 后面的残基是TRP，其后一般是VAL，但也可以是ILE或ALA。

[0427] 在AbM定义下的长度是10至12个残基，而Chothia定义则不包括最后的4个残基。

[0428] HCDR2

[0429] 开始-在CDR-H1的Kabat/AbM定义的终点后第15个残基。

[0430] 前面的序列一般是LEU-GLU-TRP-ILE-GLY (SEQ ID NO.1)，但许多变形也是可能的。

[0431] 后面的序列是:LYS/ARG-LEU/ILE/VAL/PHE/THR/ALA-THR/SER/ILE/ALA。

[0432] 在Kabat定义下的长度是16至19个残基(AbM定义为先7个残基终止)。

[0433] HCDR3:

[0434] 开始:在CDR-H2终点之后第33个残基(CYS后两个残基)。

[0435] 前面的序列是CYS-X-X(一般为CYS-ALA-ARG)。

[0436] 后面的序列是TRP-GLY-X-GLY。

[0437] 长度是3至25个残基。

[0438] 可以应用本领域公知的方法,诸如分子模建和X光晶体照相术确定特定抗体中的在CDR之外,但仍然通过具有作为结合部位衬里部分的侧链而构成结合部位一部分(即,其可被用于通过结合部位连接)的氨基酸残基的特性。例如参见Riechmann等,(1988) Nature, 332:323-327。

[0439] 嵌合抗体是这样的抗体,即其中该抗体的一个或多个区域来自一个动物物种,且该抗体的一个或多个区域来自不同的动物物种。优选的嵌合抗体是包括来自灵长类动物免疫球蛋白的区域的嵌合抗体。用于人类临床应用的嵌合抗体通常被理解为具有来自非人类动物(例如啮齿类动物)的可变区,且具有来自人类的恒定区。相反,人源化抗体利用来自非人类抗体的CDR,其中所述非人类抗体具有多数或全部来自人类免疫球蛋白的构架区,以及全部来自人类免疫球蛋白的恒定区。人类嵌合抗体通常被理解为具有来自啮齿类动物的可变区。典型的人类嵌合抗体具有人类重链恒定区和人类轻链恒定区,且具有来自啮齿类动物抗体的重链和轻链两者的可变区。嵌合抗体可以包括某些对人类恒定区的天然氨基酸序列和天然的啮齿类动物可变区序列的改变。可以通过本领域公知的方法制备嵌合和人源化抗体,所述方法包括CDR嫁接方法(例如参见,美国专利5,843,708、6,180,370、5,693,762、5,585,089、5,530,101号)、链改组策略(例如参见,美国专利5,565,332号;Rader等, Proc.Natl.Acad.Sci.USA (1998) 95:8910-8915)和分子模建策略(美国专利5,639,641号)等。

[0440] 在双链抗体的情况下,文中使用的“人源化抗体”是其中至少一条链被人源化的抗体。人源化抗体链具有这样的可变区,即其中一个或多个构架区是人类的。单链的人源化抗体是其中所述链具有这样的可变区的抗体,即在所述的可变区中一个或多个构架区是人类的。人源化抗体链或其片段的可变区的非人类的部分衍生自非人类来源,特别是非人类抗体,一般为啮齿类动物来源的抗体。非人类的对人源化抗体的贡献一般是以至少一个散布在源自一个(或多个)人类免疫球蛋白的构架区中的CDR区的形式提供的。此外,可以改变构架区支持残基以保留结合亲和力。

[0441] 人源化抗体还可以包含恒定区(例如,在轻链的情况下,至少一个恒定区或其部分,以及在重链的情况下,优选三个恒定区)。如果存在的话,人源化抗体的恒定区一般是人类的。

[0442] 获得“人源化抗体”的方法对于本领域技术人员是公知的(例如参见,Queen等, Proc.Natl Acad Sci USA,86:10029-10032 (1989)、Hodgson等,Bio/Technology,9:421 (1991))。

[0443] “人源化抗体”也可以通过新颖的基因工程方法得到,其能在大型动物,诸如兔子和小鼠中产生亲和力成熟的人样多克隆抗体。例如参见,美国专利6,632,976号。

[0444] 本文使用的术语恒定区 (CR) 是指免疫球蛋白的恒定区基因。恒定区基因编码抗体分子的赋予效应子功能的部分。对于嵌合的人类抗体和人源化抗体,一般地,非人类(例如,鼠)的恒定区被人类恒定区替换。作为对象的嵌合的或人源化抗体的恒定区通常源自人类免疫球蛋白。重链恒定区可以选自以下5种同种型中的任一种: α 、 δ 、 ϵ 、 γ 或 μ 。此外,不同亚类(诸如重链的IgG亚类)的重链负责不同的效应子功能,并且因此通过选择期望的重链恒定区,可以制得具有期望效应子功能的抗体。在本发明范围内可以使用的恒定区是 $\gamma 1$ (IgG1)、特别是 $\gamma 1$ (IgG1) 同种型的Fc区域; $\gamma 3$ (IgG3) 和尤其是 $\gamma 4$ (IgG4)。轻链恒定区可以是 κ 或 λ 型,优选 κ 型。在一个实施方案中,轻链恒定区是人类 κ 恒定链(Heiter等(1980) Cell 22:197-207),且重恒定链是人类IgG4恒定链。

[0445] 术语“单克隆抗体”也是本领域公认的,并且是指其为产生单克隆抗体的细胞的产物的抗体。单克隆抗体一般通过将正常短命的产生抗体的B细胞和快速生长的细胞诸如癌细胞(有时称为“永生”细胞)融合产生。所产生的杂交细胞或杂交瘤快速增殖,产生生产抗体的克隆。

[0446] 对于本发明的目的,应理解“单克隆抗体”也包含由还没有达到完全单克隆性的母克隆生产的抗体。

[0447] “功能等效抗体”在本发明的范围内是指与上面提到的和在此描述的抗体实质上共有至少一种主要的功能特性的抗体,所述功能特性包括:特异结合 β -淀粉状蛋白,特别是 AB_{1-42} 蛋白,以及更特别的 AB_{1-42} 蛋白的16-21表位区域、体外的免疫反应性、抑制 AB_{1-42} 单体聚集成高分子的聚合原纤维和/或解聚预形成的 AB_{1-42} 聚合原纤维、和/或 β 折叠的破坏特性、和当预防性地或治疗性地施与时减轻淀粉状变性的效应,其中所述淀粉状变性是一组与淀粉状蛋白斑的形成相关的疾病和病症,包括继发性淀粉状变性和年龄相关性淀粉状变性,包括但不限于神经疾病诸如阿尔茨海默病(AD)、路易体痴呆、唐氏综合征、遗传性脑出血伴淀粉状变性(荷兰型)、关岛帕金森-痴呆综合征;以及其它基于淀粉状蛋白样蛋白或与其相关的疾病,诸如进行性核上性麻痹、多发性硬化、克-雅二氏病、帕金森氏病、HIV-相关痴呆、ALS(肌萎缩性侧索硬化症)、成年发病型糖尿病、老年性心脏淀粉状变性、内分泌肿瘤,以及其它疾病,包括黄斑变性。抗体可以是任何类的,诸如IgG、IgM或IgA等,或任何亚类的,诸如IgG1、IgG2a等以及其它在上文提到或本领域公知的其它亚类,但特别是IgG4类。此外,抗体可以通过任何方法生产,诸如噬菌体展示,或在任何生物或细胞系生产,包括细菌、昆虫、哺乳动物或其它生产具有期望特性的抗体(诸如人源化抗体)的细胞类型或细胞系。抗体也可以通过组合来自不同物种的Fab部分和Fc区形成。

[0448] 所使用的术语“杂交”指常规的杂交条件,优选地指在使用5xSSPE、1% SDS、1x登哈特(Denhardt's)溶液作为溶液和/或杂交温度在35℃至70℃之间、优选65℃的杂交条件。杂交后,洗涤优选地在35℃和70℃之间、优选65℃的温度,首先用2xSSC、1% SDS和随后用0.2xSSC进行(关于SSPE、SSC和登哈特溶液的定义参见上述引文中的Sambrook等)。例如描述于上面Sambrook等中的严格杂交条件是特别优选的。如果如上面指出的那样在65℃进行杂交和洗涤,则例如给出了特别优选的严格杂交条件。非严格杂交条件,例如在45℃进行杂交和洗涤是较不优选的,以及在35℃甚至更不优选。

[0449] 两个序列之间的“同源性”通过序列同一性确定。如果两条待相互比较的序列在长度上有区别,序列同一性优选的指与较长序列核苷酸残基相同的较短序列的核苷酸残基百

分数。序列同一性可以通过使用诸如Bestfit程序(Wisconsin序列分析包,版本8,Unix, Genetics Computer Group,University Research Park,575Science Drive Madison,WI 53711)的计算机程序照惯例测定。Bestfit利用Smith和Waterman,Advances in Applied Mathematics 2(1981),482-489的局部同源算法,目的是找出两个序列之间具有最高序列同一性的部分。当使用Bestfit或其它的序列比对程序以确定特定的序列是否与本发明的参考序列具有例如95%的序列同一性时,优选的如此设置参数以使得序列同一性百分比是对于参考序列的全长计算并且允许高达参考序列中核苷酸总数的5%的同源性缺口。当使用Bestfit时,所谓的任意的参数优选地设在它们的预定(“缺省”)值。出现在给定序列和以上所描述的本发明的序列之间的比较中的偏差可能由例如添加、缺失、替换、插入或重组所导致。这类序列比较也可以优选的用程序“fasta20u66”(2.0u66版本,1998年9月,William R.Pearson和the University of Virginia;也参见W.R.Pearson(1990),Methods in Enzymology 183,63-98,所附的实例和<http://workbench.sdsc.edu/>)。为此目的,可以使用“缺省”参数设置。

[0450] 根据本发明的抗体可以是免疫球蛋白或抗体,其被理解为具有它的每一结合位点相同(如果是多价的话),或备选地,可以是“双特异性抗体”或“双功能抗体”。

[0451] “双特异性抗体”或“双功能抗体”是具有两个不同的重/轻链对和两个不同的结合部位的人工杂化抗体。可以通过多种方法,包括杂交瘤融合或Fab'片段的连接制备双特异抗体。例如参见,Songsivilai和Lachmann,Clin.Exp.Immunol.79:315-321(1990); Kostelny等,J.Immunol.148,1547-1553(1992)。

[0452] 术语“片段”是指包含比完整或完全抗体或抗体链更少的氨基酸残基的抗体或抗体链的部分或一段。可以通过化学或酶处理完整或完全的抗体或抗体链获得片段。还可以通过重组方式获得片段。示范性片段包括Fab、Fab'、F(ab')₂、Fab₂和/或Fv片段。术语“抗原结合片段”是指结合抗原或与完整抗体(即与它们所源自的完整抗体)竞争抗原结合(即,特异性结合)的免疫球蛋白或抗体的多肽片段。

[0453] 通过重组DNA技术,或通过酶或化学切割完整的免疫球蛋白制备结合片段。结合片段包括Fab、Fab'、F(ab')₂、Fab₂、Fv、单链和单链抗体。

[0454] “片段”还指包含另一多肽氨基酸序列的至少5个连续的氨基酸残基、至少10个连续的氨基酸残基、至少15个连续的氨基酸残基、至少20个连续的氨基酸残基、至少25个连续的氨基酸残基、至少40个连续的氨基酸残基、至少50个连续的氨基酸残基、至少60个连续的氨基酸残基、至少70个连续的氨基酸残基、至少80个连续的氨基酸残基、至少90个连续的氨基酸残基、至少100个连续的氨基酸残基、至少125个连续的氨基酸残基、至少150个连续的氨基酸残基、至少175个连续的氨基酸残基、至少200个连续的氨基酸残基、至少250个连续的氨基酸残基的氨基酸序列的肽或多肽。在特别的实施方案中,多肽片段保留了该多肽的至少一种功能。

[0455] 术语“抗原”是指能结合抗体的实体或其片段。免疫原是指能在生物体、特别是动物、更特别的是包括人类在内的哺乳动物中引发免疫反应的抗原。术语抗原包括称为抗原决定簇或表位的区域,所述区域是指抗原的一部分(其为接触的,或其在支持位于负责抗原性的抗原或抗原决定簇中的接触中起着重要作用)。

[0456] 如在本文中使用的术语“可溶的”指在水性溶液中部分或完全溶解。

[0457] 也在本文中使用的术语“免疫原性的”指引起针对免疫原抗原的抗体、T细胞和其它反应性免疫细胞的产生的物质。

[0458] 当个体产生足够的抗所施与的本发明的免疫原性组合物的抗体、T细胞和其它反应性免疫细胞的时候,发生免疫反应以缓解或减轻所要治疗的病症。

[0459] 文中使用的术语免疫原性是指当施与接受者时,抗原引起免疫反应(体液或细胞免疫反应)的能力的计量。本发明涉及减少作为对象的人类嵌合或人源化抗体免疫原性的方法。

[0460] 减少免疫原性的人源化抗体是指展示出相对于亲本抗体(例如,鼠抗体)的减少了免疫原性的人源化抗体。

[0461] 基本上保留了亲本抗体的结合特性的人源化抗体是指保留了特异结合被用以产生此种人源化抗体的亲本抗体识别的抗原的能力的抗体。优选地,人源化抗体展示出和亲本抗体相同或基本相同的抗原结合亲和力和亲合力。理想地,该抗体的亲和力不少于亲本抗体亲和力的10%,更优选不少于亲本抗体的30%,以及更优选地,亲和力不少于亲本抗体的50%。用于分析抗原结合亲和力的方法是本领域公知的,且包括半数最大结合测试法、竞争测试法和斯卡查德分析。在本申请中描述了合适的抗原结合测试法。

[0462] “回复突变(back mutation)”是引入编码人源化抗体的核苷酸序列中的突变,该突变产生与母本抗体(例如,供体抗体,例如鼠抗体)中的氨基酸对应的氨基酸。在本发明抗体的人源化过程中,可以保留来自亲本抗体中某些构架残基,以基本上保留亲本抗体的结合特性,而同时最小化所得抗体的潜在的免疫原性。在本发明的一个实施方案中,亲本抗体是小鼠抗体。例如,回复突变使人类构架残基改变为亲本鼠残基。可以回复突变的构架残基的实例包括但不限于:规范残基(canonical residues)、界面填充残基、与结合部位接近的稀有亲本残基、在“游标区(Vernier Zone)”(其形成CDR位于其上的平台)(Foote和Winter, 1992, J. Mol. Biol. 224, 487-499)中的残基、以及接近于CDR H3的那些残基。

[0463] 如本文所使用的“保守改变”是指与天然蛋白相比,分别是基本上在构象上或抗原上是中性的、在突变体多肽的三级结构中产生最小的变化的、或在突变多肽的抗原决定簇中产生最小的变化的改变。当提及本发明的抗体和抗体片段时,保守改变的意思是不会使该抗体不能结合主题受体的氨基酸替换。本领域普通技术人员将能够预测可以制造哪些氨基酸替换,同时维持构象上和抗原上中性的高度可能性。例如在Berzofsky, (1985) Science 229:932-940和Bowie等(1990) Science 247:1306-1310中提供了此类指导。应当考虑的影响维持构象上和抗原上中性的可能性的因素包括,但不限于:(a) 疏水氨基酸的替换较不可能影响抗原性,因为疏水残基更可能位于蛋白的内部;(b) 物理化学类似的氨基酸的替换较不可能影响构象,因为替换的氨基酸残基结构上模拟天然氨基酸;(c) 进化上保守的序列的改变可能不利地影响构象,因为此类保守表明该氨基酸序列可能具有功能重要性。本领域普通技术人员将能够应用公知的测试法评估蛋白质构象的改变,所述测试法包括但不限于微量补体结合法(Wasserman等(1961) J. Immunol. 87:290-295; Levine等(1967) Meth. Enzymol. 11:928-936)和通过应用构象依赖性的单克隆抗体的结合研究(Lewis等(1983) Biochem. 22:948-954)。

[0464] 此外,术语“治疗有效量”指抗体的量,当其施与给人类或动物时,在所述人类或动物中足以产生治疗效果。本领域技术人员按照常规方法能很容易的确定治疗有效量。

[0465] 本文所使用的术语“治疗”、“预防”是指因施与预防剂或治疗剂所致的受试者疾病的一种或多种症状的复发或开始的预防。

[0466] 人源化抗体的构建

[0467] 通过参考以下包含于此的具体实施方案的详细描述,能更容易理解本发明。尽管本发明根据其特定的实施方案的特定细节进行描述,但并不意欲把这些细节当作是对本发明范围的限制。

[0468] 本发明提供了包含高特异性和高效抗体的新的方法和组合物,所述抗体具有特异性地识别并结合至来自 β 淀粉状蛋白抗原范围内的特异表位的能力。通过本发明的教导得到的抗体尤其可用于治疗淀粉状变性,这是一组与淀粉状蛋白斑的形成相关的疾病和病症,包括继发性淀粉状变性和年龄相关性淀粉状变性,诸如以下疾病,包括但不限于神经疾病诸如阿尔茨海默病(AD)、路易体痴呆、唐氏综合征、遗传性脑出血伴淀粉状变性(荷兰型)、关岛帕金森-痴呆综合征;以及其它基于淀粉状蛋白样蛋白或与其相关的疾病,诸如进行性核上性麻痹、多发性硬化、克-雅二氏病、遗传性脑出血伴淀粉状变性荷兰型、帕金森氏病、HIV-相关痴呆、ALS(肌萎缩性侧索硬化症)、成年发病型糖尿病、老年性心脏淀粉状变性、内分泌肿瘤,以及其它疾病,包括黄斑变性,这些仅仅是列举。

[0469] 可在本发明的范围内产生出根据本发明的完全的人源化或重构的可变区,通过首先设计含有埋入到人类衍生的构架序列中的非人类、特别是啮齿类动物衍生的CDR,但尤其是衍生自鼠抗体ACI-01-Ab7C2(在申请中称为“mC2”,并根据布达佩斯条约于2005年12月1日以保藏号DSM ACC2750保藏在位于德国布劳恩斯切魏格,38124布劳恩斯切魏格,马斯切尔奥德尔韦格1B的“德意志微生物保藏中心(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH;DSMZ)”)的CDR的可变区氨基酸序列。可以从根据本发明的抗体获得的非人类、特别是啮齿类动物衍生的CDR提供了期望的特异性。因此,这些残基基本上未改变地包括在重构的可变区的设计中。因此,应当将任何修饰限制为最小,且严密地监视在抗体特异性和亲和力方面的改变。另一方面,理论上构架残基可以衍生自任何的人类可变区。

[0470] 为了产生显示出可接受的或甚至提高了的亲和力的重构抗体,应当选择同样地适用于产生重构的可变区和适用于保留抗体亲和力的人类构架序列。

[0471] 为达到这一目的,开发了最佳适合策略(best-fit strategy)。因为已知构架序列支撑CDR以它们正确的空间方向用于与抗原相互作用,并且构架残基有时甚至能够参与抗原结合,这一策略以最小化可能负面影响抗体三维结构的改变为目的,通过从与非人类、特别是啮齿类动物衍生的可变区最同源或类似的人类可变区衍生用于抗体重构的人类构架序列。这还将最大化亲和力将保留在重构抗体中的可能性。

[0472] 在其最简单的水平,“最佳适合”策略包括将供体啮齿类动物V区域与所有已知的人类V区氨基酸序列相比较,并然后选择最同源的以向人源化过程提供受体构架区。事实上,有若干个其它需要考虑的因素,并且它们可能影响受体构架区的最终选择。在任何实验工作之前,在这一考虑中可以应用分子建模预测,以试图最大化所得到的重构抗体的亲和力。实际上,模型的目的是预测最同源的人类构架的哪些关键残基(如果有的话)需要如在啮齿类动物中那样保留,以在重构抗体中获得最佳亲和力。

[0473] 在本发明的一个实施方案中,CDR可从小鼠单克隆抗体,特别是从在共同未决申请

EP 05 02 7092.5 (2005年12月12提交) 中描述的小鼠单克隆抗体ACI-01-Ab7C2得到,所述申请的公开在此引入作为参考。

[0474] 产生小鼠单克隆抗体ACI-01-Ab7C2 (在本申请中称为“mC2”,且对于人源化C2抗体,称为hC2) 的杂交瘤细胞FP-12H3-C2于2005年12月1日在共同未决申请EP05027092.5号中根据布达佩斯条约以保藏号DSM ACC2750保藏在位于德国布劳恩斯切魏格,38124布劳恩斯切魏格,马斯切尔奥德尔韦格1B的“德意志微生物保藏中心 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH;DSMZ)”中。

[0475] 可以通过抗超分子抗原构建体来产生小鼠抗体,所述超分子抗原构建体包含对应于 β -淀粉状蛋白肽,特别是 β -淀粉状蛋白肽 AB_{1-15} 、 AB_{1-16} 和 $AB_{1-16(\Delta 14)}$ 氨基酸序列的抗原肽,所述抗原肽用疏水部分(例如,诸如棕榈酸)或亲水部分(例如,诸如聚乙二醇(PEG))或两者的组合进行修饰,其中所述疏水和亲水部分分别通过至少一个,特别是一个或两个氨基酸,例如,诸如赖氨酸、谷氨酸和半胱氨酸或任何其它的能够用作将亲水和疏水部分偶联到肽片段的连接结构的合适的氨基酸或氨基酸类似物而共价地连接到抗原性肽的每一个末端。当使用PEG作为亲水部分时,游离的PEG末端共价地连接到磷脂酰乙醇胺或任何其它适合于作为锚定元件的化合物上,例如,以将抗原构建体埋在脂质体的双分子层中。

[0476] 具体而言,可以通过抗超分子抗原构建体来产生小鼠抗体,所述超分子抗原构建体包含对应于 β -淀粉状蛋白肽 AB_{1-16} 的氨基酸序列的抗原肽,所述抗原肽用亲水部分(例如,诸如聚乙二醇(PEG))进行修饰,其中亲水部分通过至少一个,特别是一个或两个氨基酸,例如,诸如赖氨酸、谷氨酸和半胱氨酸或任何其它的能够用作将亲水和疏水部分偶联到肽片段的连接结构的合适的氨基酸或氨基酸类似物而共价地连接到抗原性肽的每一个末端。当使用PEG作为亲水部分时,游离的PEG末端共价地连接到磷脂酰乙醇胺或任何其它适合于作为锚定元件的化合物上,例如,以将抗原构建体埋在脂质体的双分子层中。

[0477] 在本发明的一个实施方案中,提供了嵌合抗体或嵌合抗体片段、或人源化抗体或人源化抗体片段,它们在可变区中包含嵌入在一个或多个人类或灵长类动物来源的构架区中并与衍生自人类或灵长类动物来源抗体的恒定区组合的至少一个非人类来源的CDR,所述嵌合抗体或嵌合抗体片段、或人源化抗体或人源化抗体片段能够特异性地识别并结合 β 淀粉状蛋白单体肽。

[0478] CDR含有最可能结合抗原的残基,并必须保留在重构抗体中。通过根据Kabat等,免疫学感兴趣的蛋白质序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest),第5版,美国健康和人类服务部(U.S.Department of Health and Human Services),美国政府印刷局(The United States Government Printing Office),1991的序列定义CDR。当关键残基在很大程度上决定CDR环的结构构象时,CDR落入标准类型(Chothia等,1989Nature, 342,877-883)。这些残基几乎总是保留在重构抗体中。

[0479] 在制备根据本发明的人源化抗体的方法中,将C2重链和轻链可变区(V_H 和 V_K)的氨基酸序列与NCBI及Kabat数据库中的啮齿类动物抗体 V_H 和 V_K 序列相比较。

[0480] 与C2 V_K 最匹配的小鼠种系基因是bb1,基因座MMU231201, (Schable等,1999)。比较显示两个氨基酸与这一种系序列不同,两个均位于CDRL1内。可以发现具有类似但不同的序列的成熟鼠抗体。若干个具有同一的CDRL2和同一的CDRL3,但C2的CDRL1似乎是独特的。与人类种系 V_K 序列的比较显示来自亚组 V_{KI} 的基因对于C2 V_K 是最匹配的(Cox等,

1994)。因此可将C2 V_K归于KABAT亚组MuV_KII序列。

[0481] 可以选择DPK15和人类J区域HuJ_K1以向人源化V_K提供受体构架序列。

[0482] 已经定义了可在可变轻链和重链之间的界面处的残基(Chothia等,1985 J.Mol.Biol,186,651-663)。这些通常保留在重构抗体中。在V_KII亚组中,小鼠C2 V_K位置87的Phe很少在界面上,而在该界面上Tyr更常见,表明这一构架残基可能对于抗体活性很重要。Tyr 87存在于人类种系和人源化C2VK中。

[0483] 因此,可以如此的设计人源化V_K序列,以使得C2HuVK1由具有来自DPK15和人类J_K1的构架的小鼠C2 V_K CDR组成。在本发明特定的实施方案中,可以在人类构架区位置45和/或87替换鼠残基。在可从小鼠单克隆抗体,特别是鼠抗体ACI-01-Ab7C2得到的CDR2区域中,可以在Kabat位置50和/或53进行氨基酸替换。残基45可能参与支持CDR的构象。残基87位于V_H和V_K结构域的界面上。因此,这些残基对于维持抗体结合可能是很关键的。

[0484] 与C2 V_H AF最匹配的小鼠种系基因是VH7183,基因座AF 120466(Langdon等,2000)。与人类种系V_H序列的比较显示来自亚组V_HIII的基因与C2 V_H最匹配。可将C2 V_H AF归于KABAT亚组MuV_HIIID。可选择序列DP54和人类J区域HuJ_H6以向人源化V_H提供受体构架序列。

[0485] 比较显示在C2 VH序列和人类受体种系序列DP54及J_H6之间有九个氨基酸不同,其大多位于CDRH2内。发现了具有同一或相似(一个残基不同)的CDRH1或具有相似的CDRH2(一个残基不同)的成熟鼠抗体,但是没有一个抗体具有与C2 V_H AF同一的全部三个CDR。C2抗体的CDRH3极其短,仅仅由三个残基组成。然而,在数据库中发现了具有这一长度的CDRH3的其它抗体。C2 V_H的残基47是Leu,而不是较常见的Trp,且残基94是Ser而不是通常的Arg,表明这些构架残基可能对于抗体活性是很重要的。

[0486] 可以设计多种人源化V_H序列。C2HuVH1由具有来自DP54的构架的C2 V_H AF CDR和HuJ_H6组成。在本发明特定的实施方案中,可以在人类构架区位置47或94或两者替换鼠残基。构架2中的残基47与CDR及V_K结构域两者接触。残基94可能参与支持CDR的构象。因此这些残基对于维持抗体结合可能是很关键的。

[0487] 可以设计不同的HCVR和LCVR区域,其包含可从供体抗体,例如鼠抗体得到的、埋入到天然或经修饰的人类或灵长类动物来源的构架区中的非人类CDR。修饰可以特别地涉及构架区中的一个或个氨基酸的交换,所述交换是通过在分别的亚组中的这一位置更普遍发现的非人类残基,特别是鼠残基,或通过具有与在分别的亚组中的这一位置更普遍发现的残基类似的性质的残基进行的。

[0488] 构架区的修饰,构架序列支撑CDR以它们正确的空间方向用于与抗原相互作用,并且构架残基有时甚至可以参与抗原结合。在本发明的一个实施方案中,进行测量以进一步改造所选择的人类构架序列以使得它们与啮齿类动物构架序列最类似,以最大化亲和力将保留在重构抗体中的可能性。

[0489] 因此,可以替换人类构架区中的鼠残基。具体而言,可以在人类重链可变区(HCVR)构架区位置47或94或两者,以及人类轻链可变区(LCVR)构架区位置45和/或87替换鼠残基。在可从小鼠单克隆抗体,特别是鼠抗体ACI-01-Ab7C2得到的CDR2区域中,可在Kabat位置50和/或53进行氨基酸替换。

[0490] 可以通过在分别的亚组中的这一位置较普遍地发现的鼠残基交换在人类构架区

中上面所示位置中发现的残基。具体而言,在如SEQ ID NO:15所示的人类或灵长类动物来源的重链可变区的构架区中Kabat位置47的Trp可被Leu或被下述氨基酸残基替换,其中所述氨基酸残基具有类似的性质并且该氨基酸的替换导致这样的改变,即所述改变基本上在构象上或抗原性上中性的、产生在突变多肽的三级结构中的最小的变化、或产生在抗原决定簇中最小的变化。具体而言,在如SEQ ID NO:15所示的人类或灵长类动物来源的重链可变区的构架区中Kabat位置47的Trp还可被选自正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala和Phe的氨基酸替换,特别地被Ile替换。可以考虑构象上和抗原性上中性的备选保守替换。

[0491] 在如SEQ ID NO:15所示的人类或灵长类动物来源的重链可变区的构架区中Kabat位置94的Arg可被Ser或被下述氨基酸残基替换,其中所述氨基酸残基具有类似的性质并且该氨基酸的替换导致这样的改变,即所述改变基本上在构象上或抗原性上中性的、产生在突变多肽的三级结构中的最小的变化、或产生在抗原决定簇中最小的变化。具体而言,在如SEQ ID NO:15所示的人类或灵长类动物来源的重链可变区的构架区中Kabat位置94的Arg可备选地被Thr替换。

[0492] 在本发明的另一个实施方案中,在人源化抗体中可以替换两个残基。

[0493] 在如SEQ ID NO:12所示的人类或灵长类动物来源的轻链可变区的构架区中Kabat位置45的Gln可被Lys或被下述氨基酸残基替换,其中所述氨基酸残基具有类似的性质并且该氨基酸的替换导致这样的改变,即所述改变基本上在构象上或抗原性上中性的、产生在突变多肽的三级结构中的最小的变化、或产生在抗原决定簇中最小的变化。具体而言,在如SEQ ID NO:12所示的人类或灵长类动物来源的轻链可变区的构架区中Kabat位置45的Gln可被选自Arg、Gln和Asn的氨基酸替换,特别地被Arg替换。

[0494] 在如SEQ ID NO:12所示的人类或灵长类动物来源的轻链可变区的构架区中Kabat位置50的Leu可被Lys或被下述氨基酸残基替换,其中所述氨基酸残基具有类似的性质并且该氨基酸的替换导致这样的改变,即所述改变基本上在构象上或抗原性上中性的、产生在突变多肽的三级结构中的最小的变化、或产生在抗原决定簇中最小的变化。具体而言,在如SEQ ID NO:12所示的人类或灵长类动物来源的轻链可变区的构架区中Kabat位置50的Leu可被选自Arg、Gln和Asn的氨基酸替换,特别地被Arg替换。

[0495] 在如SEQ ID NO:12所示的人类或灵长类动物来源的轻链可变区的构架区中Kabat位置53的Asn可被His和Gln,或被下述氨基酸残基替换,其中所述氨基酸残基具有类似的性质并且该氨基酸的替换导致这样的改变,即所述改变基本上在构象上或抗原性上中性的、产生在突变多肽的三级结构中的最小的变化、或产生在抗原决定簇中最小的变化。具体而言,在如SEQ ID NO:12所示的人类或灵长类动物来源的轻链可变区的构架区中Kabat位置53的Asn可被选自Gln、His、Lys和Arg的氨基酸替换。

[0496] 在如SEQ ID NO:12所示的人类或灵长类动物来源的轻链可变区的构架区中Kabat位置87的Thr可被Phe或被下述氨基酸残基替换,其中所述氨基酸残基具有类似的性质并且该氨基酸的替换导致这样的改变,即所述改变基本上在构象上或抗原性上中性的、产生在突变多肽的三级结构中的最小的变化、或产生在抗原决定簇中最小的变化。具体而言,在如SEQ ID NO:12所示的人类或灵长类动物来源的轻链可变区的构架区中Kabat位置87的Tyr可被选自Leu、Val、Ile和Ala的氨基酸替换,特别地被Leu替换。

[0497] 然后可将这样得到的可变区与衍生自人类或灵长类动物来源抗体的恒定区,特别

地分别与人类IgG4或 κ 恒定区组合,其中所述可变区包含埋入在一个或多个人类或灵长类动物衍生的构架区中的至少一个非人类来源的CDR。可以例如通过将铰链区中位置228的丝氨酸改变为脯氨酸(HuIgG4 Ser-Pro)来修饰IgG4恒定区。这一突变稳定了链间的二硫键,并且阻止了可能在天然人类IgG4制品中发生的半分子的形成。可以通过缺失如SEQ ID NO: 16所示的位置439上的末端Lys进一步修饰IgG4恒定区。

[0498] 可以通过本领域已知的方法,例如诸如重叠PCR重组,来构建经修饰的可变区。可将嵌合抗体的表达盒C2 ChV_H AF和C2 ChV_K用于将构架区诱变为所需序列的模板。合成包含待改变区域的诱变引物对的组。可将所产生的人源化V_H和V_K表达盒克隆到本领域已知的合适的克隆载体中,例如诸如pUC19。在确定了全部DNA序列对于每一个V_H和V_K都是正确的之后,可将经修饰的重链和轻链V区域基因作为表达盒从克隆载体中切除。然后可将它们转移到合适的表达载体中,所述表达载体诸如分别包括人类IgG4Ser-Pro或 κ 恒定区的pSVgpt和pSVhyg。

[0499] 表达载体

[0500] 表达载体pSVgpt基于pSV₂gpt (Mulligan和Berg,1980),且包括用于在细菌细胞中选择的氨苄青霉素抗性基因、用于在哺乳动物细胞中选择的gpt基因、鼠重链免疫球蛋白增强子区域、编码恒定区基因的基因组序列和SV40多聚A序列。将用于表达的重链可变区作为HindIII至BamHI片段插入。

[0501] 表达载体pSVhyg包括用于在细菌细胞中选择的氨苄青霉素抗性基因、用于在哺乳动物细胞中选择的hyg基因、鼠重链免疫球蛋白增强子区域、编码 κ 恒定区基因且包括 κ 增强子的基因组序列和SV40多聚A序列。将用于表达的轻链可变区作为HindIII至BamHI片段插入。

[0502] 然后确定DNA序列对于表达载体中的人源化V_H和V_K是正确的。

[0503] 对于抗体生产,可将人源化重链和轻链表达载体导入本领域公知的合适的生产细胞系中,例如诸如NS0细胞。可以通过共转染完成表达载体的导入,其中所述共转染是通过电穿孔或任何其它本领域中可利用的合适的转化技术完成的。然后可选择并放大产生抗体的细胞系,以及纯化人源化抗体。然后可通过标准技术诸如SDS-PAGE分析纯化的抗体。

[0504] 具有提高的亲和力、特异性和稳定性的抗体

[0505] 可以轻微地修饰小鼠C2抗体的CDRL2序列(“KVSNRFS”),而不会不利地影响抗体活性。可以通过将位置50的K改变为R以及将位置53的N改变为S进行保守突变。该两个备选的CDRL2序列因此分别是“RVSNRFS”和“KVSSRFS”。没有其它改变掺入到鼠V_K序列中,分别作为C2 VK-R和C2 VK-S。

[0506] 可以通过改变其糖基化特性或模式修饰上文描述的根据本发明的抗体或其片段的亲和力、特异性和稳定性,以产生提高了的治疗价值。

[0507] 为达到该在糖基化模式中的改变,可以改造宿主细胞,使得它们能够表达修饰糖蛋白的糖基转移酶活性的优选的范围,其升高复合物N连接的寡糖携带的二分GlcNAc。此外,可以得到糖蛋白的经修饰的糖形式,例如具有增强的Fc介导的细胞毒性的抗体,所述抗体包括完整抗体分子、抗体片段、或包括与免疫球蛋白的Fc区域等价区域的融合蛋白。

[0508] 获得具有经修饰的糖基化模式的抗体的方法是本领域普通技术人员公知的,并且例如描述于EP 1071700、US2005272128、Ferrara等(2006) J Biol Chem 281(8),5032-

5036)、Ferrara等(2006)Biotechnology and Bioengineering 93(5),851-861。

[0509] 药物制备物和施与

[0510] 根据本发明的抗体,但特别是根据本发明的单克隆抗体可以用公知的技术制备为生理学上可接受的制剂,并且其可以包含可药用载体、稀释剂和/或赋形剂。例如,根据本发明和在上文中描述的包括任何功能等效抗体或其功能部分的抗体、特别是包括任何功能等效抗体或其功能部分的单克隆抗与可药用载体、稀释剂和/或赋形剂结合形成药物组合物。适宜的药学载体、稀释剂和/或赋形剂是本领域公知的并且包含例如磷酸缓冲盐溶液、水、乳液(诸如油/水乳液)、多种湿润剂、无菌溶液等。

[0511] 根据本发明的药物组合物的配制可以根据本领域技术人员公知的标准方法完成。

[0512] 本发明的组合物可以以固体、液体或气溶胶的形式以合适的、药学有效剂量施与受试者。固体组合物的实例包括片剂、乳膏以及可植入的剂量单位。片剂可以经口施与。治疗乳膏可以局部施与。可植入的剂量单位可以局部地例如在肿瘤部位施与;或可以经植入用于全身地释放治疗组合物,例如经皮下植入。液体组合物的实例包括适合肌内、皮下、静脉内、动脉内注射的制剂,以及用于局部或眼内施与的制剂。气溶胶制剂的实例包含用于施与至肺的吸入制剂。

[0513] 组合物可以通过标准的施与途径施与。一般来说,组合物可以通过局部、经口、直肠、鼻、真皮内、腹膜内或非肠胃的(例如静脉内、皮下、肌肉内)途径施与。此外,还可将组合物掺入到持续释放基质中,诸如生物可降解的聚合物,将聚合物植入期望递送位置例如肿瘤部位附近。方法包括单剂量的施与、以预定的时间间隔重复剂量施与、以及持续施与预定的一段时间。

[0514] 本文使用的持续释放基质是由通常可被酶或酸/碱水解或通过溶解而可降解的聚合物这样的物质制造的基质。一旦植入到体内,基质受到酶和体液的影响。期望的持续释放基质选择为生物相容性物质,诸如脂质体、聚丙交酯(聚丙交酯酸)、聚乙交酯(乙醇酸的聚合物)、聚丙交酯共乙交酯(乳酸和乙醇酸的共聚物)、聚酞类、聚原酸酯、多肽、透明质酸、胶原、硫酸软骨素、羧酸、脂肪酸、磷脂、多糖、核酸、聚氨基酸、诸如苯丙氨酸、酪氨酸、异亮氨酸的氨基酸、多核苷酸、聚乙烯基丙烯、聚乙烯吡咯烷酮和聚硅氧烷。优选的生物可降解基质是聚丙交酯、聚乙交酯或聚丙交酯共乙交酯(乳酸和乙醇酸的共聚物)之一的基质。

[0515] 本领域技术人员公知组合物的剂量取决于多种因素,例如,诸如待治疗的状况、所使用的特定组合物、以及其它临床因素(诸如患者的体重、尺寸、性别和一般健康状况)、身体表面面积、待施与的特定的化合物或组合物、同时施与的其它药物以及施与途径。

[0516] 组合物可以和其它包含生物活性物质或化合物的组合物联合施与,特别是选自下列的化合物的至少一种、以及本发明的抗体、以及任选的可药用载体和/或稀释剂和/或赋形剂:抗氧化应激的化合物、抗细胞凋亡的化合物、金属螯合剂、DNA修复抑制剂诸如哌仑西平和代谢物、3-氨基-1-丙磺酸(3APS)、1,3-丙二磺酸(1,3PDS)、 α -分泌酶活化剂、 β -和 γ -分泌酶抑制剂、 τ 蛋白、神经递质、 β 折叠破坏剂、淀粉样蛋白 β 清除/减少细胞内组分的引诱剂、包括焦谷氨酸化淀粉样蛋白 β 3-42在内的N端截短淀粉样蛋白 β 的抑制剂、消炎分子、“非典型的抗精神病药物”(例如,诸如氯氮平、齐拉西酮、利哌利酮、阿立哌唑或奥氮平)、或胆碱酯酶抑制剂(ChEI)(诸如他克林、卡巴拉汀、多奈哌齐、和/或加兰他敏)、M1激动剂和其它药物,包括任何淀粉样蛋白或 τ 修饰药物、以及营养补充剂,诸如维生素B12、半胱氨酸、乙酰

胆碱前体、卵磷脂、胆碱、银杏、乙酰基-L-肉毒碱、艾地苯醌、丙戊茶碱或黄嘌呤衍生物；以及疾病治疗方法。

[0517] 蛋白质药理学活性物质可以以每剂1ng至10mg之间的量存在。一般地，施与方案可以是0.1μg至10mg之间范围的根据本发明的抗体、特别是1.0μg至1.0mg的范围、更特别的1.0μg至100μg之间的范围，所有落入这些范围的单个数值也是本发明的一部分。如果通过连续输注进行施与，更适当的剂量可以是每小时每千克体重0.01μg至10mg单位之间的范围，所有落入这些范围的单个数值也是本发明的一部分。

[0518] 施与通常是经肠胃的，例如静脉内施与。非肠胃施与的制品包括无菌水性或非水性溶液、悬浮液和乳液。非水性溶剂包括但不限于丙二醇、聚乙二醇、植物油（诸如橄榄油）、以及可注射的有机酯（诸如油酸乙酯）。水性溶液可以选自水、醇/水溶液、乳液或包括盐和缓冲介质的悬浮液。非肠胃的载体包括氯化钠溶液、林格氏右旋糖、右旋糖和氯化钠、乳酸林格氏液或不挥发油。静脉内载体包括流体和营养补充物、电解质补充物（诸如基于林格氏右旋糖的那些）以及其它物质。也可以存在防腐剂，例如，诸如抗菌剂、抗氧化剂、螯合剂、惰性气体等。

[0519] 药物组合物可以进一步包含蛋白质载体，例如，诸如血清白蛋白或免疫球蛋白，特别是人类来源的。其它生物活性物质也可以存在于发明的药物组合物中，取决于它的用途。

[0520] 当结合靶标位于脑中时，本发明的某些实施方式提供抗体或其活性片段穿过血脑屏障。某些神经变性疾病与血脑屏障渗透性的升高相关，由此抗体或其活性片段能很容易地被导入脑中。当血脑屏障仍保持完整无缺时，存在若干种本领域已知的用于将分子转运穿过它的方法，包括但不限于：物理方法、基于脂质地方法、以及基于受体和通道的方法。

[0521] 转运抗体或其活性片段穿过血脑屏障的物理方法包括但不限于：完全地规避血脑屏障，或通过血脑屏障产生开口。规避方法包括但不限于：直接注射至脑中（例如参见，Papanastassiou等，Gene Therapy 9:398-406 (2002)）和在脑中植入传送装置（例如参见，Gill等，Nature Med. 9:589-595 (2003)、和Gliadel WafersTM, Guildford Pharmaceutical）。在屏障中产生开口的方法包括但不限于：超声（例如参见美国专利公开2002/0038086号）、渗透压力（例如通过施与高渗甘露糖醇（Neuwelt, E.A., 血脑屏障的应用及其操作（Implication of the Blood-Brain Barrier and its Manipulation）, 卷1和2, Plenum Press, N.Y. (1989)））、例如通过缓激肽或透化剂A-7（例如美国专利5,112,596、5,268,164、5,506,206和5,686,416号）的透化作用、以及用含有编码抗体或抗原结合片段的基因的载体转染跨越血脑屏障的神经元（例如参见美国专利公开2003/0083299号）。

[0522] 转运抗体或其活性片段穿过血脑屏障的基于脂质体的方法包括但不限于：将抗体或其活性片段封进与抗体结合片段偶联的脂质体内部，所述抗体结合片段结合血脑屏障的血管内皮上的受体（例如参见美国专利申请公开20020025313号）、以及将抗体或其活性片段包被在低密度脂蛋白颗粒中（例如参见美国专利申请公开20040204354号）或载脂蛋白E中（例如参见美国专利申请公开20040131692号）。

[0523] 转运抗体或其活性片段穿过血脑屏障的基于受体和通道的方法包括但不限于：应用糖皮质激素阻滞物增加血脑屏障的渗透性（例如参见美国专利申请公开2002/0065259、2003/0162695和2005/0124533号）；活化钾通道（例如参见美国专利申请公开2005/0089473

号)、抑制ABC药物转运装置(例如参见美国专利申请公开2003/0073713号);用转铁蛋白包被抗体并调制活化一个或多个转铁蛋白受体(例如参见美国专利申请公开2003/0129186号)、以及阳离子化抗体(例如参见美国专利5,004,697号)。

[0524] 检测/诊断

[0525] 在本发明另外的实施方案中,提供了可用于检测和诊断淀粉状蛋白相关疾病或病症的方法和试剂盒。这些方法包括通常用于检测或定量生物样本中或原位条件下的物质的公知的免疫学方法。

[0526] 淀粉状蛋白相关疾病或病症的诊断可以通过检测单克隆抗体或其活性片段与样本或原位淀粉状蛋白表位的免疫特异结合来完成,其包括使怀疑含有淀粉状蛋白的样本或特定身体部分或身体区域与结合淀粉状蛋白表位的抗体接触,允许抗体结合至淀粉状蛋白以形成免疫复合物,检测免疫复合物的形成,并将免疫复合物的存在或不存在与样本或特定身体部分或区域中淀粉状蛋白的存在或不存在相关联。

[0527] 可以用于诊断淀粉状蛋白相关疾病或病症的生物样本是例如体液,诸如血清、血浆、唾液、胃分泌液、黏液、脑脊髓液、淋巴液等;或从生物体获得的组织或细胞样本,诸如神经、脑、心脏或血管组织。为检测在样本中淀粉状蛋白的存在或不存在,可以使用任何本领域普通技术人员公知的免疫测定法(参见Harlow和Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1988 555-612)),例如,利用应用了用于检测的第二试剂的间接检测方法的分析、ELISA和免疫沉淀法和凝集测试法。例如Maertens和Stuyver的W096/13590, Zrein等(1998)和W096/29605给出了这些测试法的详细描述。

[0528] 对于原位诊断,可以利用领域公知的方法将抗体或其任何活性和功能部分施与待诊断的生物,例如静脉内、鼻内、腹膜内、大脑内、动脉内注射,从而根据本发明的抗体与淀粉状蛋白抗原上的表位区域之间可能发生特异性结合。可以通过连接至抗体或其功能片段的标记物检测抗体/抗原复合物。

[0529] 用于诊断应用的免疫测定法通常依赖于标记的抗原、抗体或用于检测的第二试剂。蛋白或试剂可以用本领域技术人员公知的化合物标记,包括酶、放射性同位素、以及荧光、发光以及显色物质,包括有色粒子,诸如胶体金和乳胶微球。在这些方法中,放射性标记几乎可以应用于所有类型的测试并且具有最多的变化。在必须避免放射性或需要快速结果时,缀合酶的标记特别有用。尽管荧光染料在使用中需要昂贵的设备,但荧光染料提供了非常敏感的检测方法。用于这些检测的抗体包括单克隆抗体、多克隆抗体和经亲和纯化的多克隆抗体。

[0530] 备选地,可以通过与经标记的对免疫球蛋白具有亲和力的物质(诸如蛋白A或蛋白G或第二抗体)的反应来间接地标记抗体。抗体可以与第二物质缀合,并且用标记的对缀合到抗体的第二物质有亲和力的第三物质检测。例如,抗体可以缀合生物素,以及用标记的亲和素或链亲和素检测抗体-生物素缀合物。类似的,抗体可以缀合半抗原,以及用标记的抗半抗原抗体检测抗体-半抗原缀合物。

[0531] 本领域技术人员公知这些和其它可用于本发明的适合标记物。可以应用本领域普通技术人员普遍公知的标准技术完成这些标记物与抗体或其片段的结合。Kennedy, J.H., 等, 1976 (*Clin. Chim. Acta* 70:1-31), 和Schurs, A.H.W.M. 等, 1977 (*Clin. Chim. Acta* 81:1-

40) 描述了典型的技术。在后者提到的偶联技术是戊二醛法、高碘酸盐法、双马来酰亚胺法以及其它方法,所有的这些都在此引入作为参考。

[0532] 当前的免疫测定法利用双抗体方法以检测分析物的存在,其中,抗体通过与已用可检测的标记物标记的第二抗体反应被间接标记。第二抗体优选的是与单克隆抗体来源动物的抗体结合的抗体。换句话说,如果单克隆抗体是小鼠抗体,则标记的第二抗体是抗小鼠抗体。对于下面描述的测试中使用的单克隆抗体,这种标记物优选地是抗体包被的珠,特别是磁珠。对于将在此描述的免疫测定中应用的多克隆抗体,优选的标记物是可检测的分子,诸如放射性的、荧光的、或电化学发光物质。

[0533] 也可以在本发明的范围内应用备选的双抗体系统,由于它们适合于快速测定分析物的存在,经常被称为快速格式系统(fast format systems)。该系统需要抗体与分析物之间的高亲和力。根据本发明的一个实施方案,用一对各自对淀粉状蛋白特异的抗体测定淀粉状蛋白的存在。所述的抗原对中的一个在此被称为“检测抗体”,以及所述的抗原对中的另一个在此被称为“俘获抗体”。本发明的单克隆抗体可以用做俘获或检测抗体。本发明的单克隆抗体也可作为俘获和检测抗体一起用于单个分析。本发明的一个实施方案因此应用双抗体夹心法以在生物流体样本中检测淀粉状蛋白。在这一方法中,分析物(淀粉状蛋白)被夹在检测抗体和俘获抗体之间,俘获抗体不可逆的固定在固体支持物上。检测抗体包含可检测的标记物,以鉴定抗体-分析物夹心的存在并且因此鉴定分析物的存在。

[0534] 示例性固相物质包括但不限于在放射免疫测定和酶免疫测定领域中公知的微量滴定板、聚苯乙烯试管、磁性、塑料或玻璃小珠和玻片。用于将抗体偶联到固相的方法也是本领域技术人员公知的。最近,多种多孔材料诸如尼龙、硝化纤维素、醋酸纤维素、玻璃纤维和其它的多孔聚合物也已被用做固体支持物。

[0535] 本发明也涉及检测生物样本中淀粉状蛋白的诊断试剂盒,其包含上面定义的组合物。此外,本发明涉及后面的诊断试剂盒,除了如上面定义的组合物外,其还包括上面所定义的检测试剂。术语“诊断试剂盒”一般涉及本领域公知的任何诊断试剂盒。更具体地说,后一术语指如在Zrein等(1998)描述的诊断试剂盒。

[0536] 本发明的另一个目的是提供用于检测和诊断淀粉状蛋白相关疾病和病症的包含根据本发明的抗体的新免疫探针和测试试剂盒。对于免疫探针,抗体直接或间接的与合适的报告分子(例如,酶或放射性核素)相连接。测试试剂盒包含容纳一种或多种根据本发明的抗体的容器,以及使用抗体用于结合淀粉状蛋白以形成免疫复合物及检测免疫复合物的形成从而使免疫复合物的存在或不存在与淀粉状蛋白存在或不存在相关联的说明书。

实施例

[0537] 材料

[0538] 小鼠单克隆抗体ACI-01-Ab7C2(在本申请中称为“mC2”,以及对于人源化C2抗体称为hC2)的开发和制备描述于2005年12月12日提交的共同未决申请EP 05 02 7092.5,其全文在此引入作为参考。

[0539] 产生小鼠单克隆抗体ACI-01-Ab7C2(在本申请中称为“mC2”,以及对于人源化C2抗体,称为hC2)的杂交瘤细胞FP-12H3-C2于2005年12月1日在共同未决申请EP05027092.5号中根据布达佩斯条约以保藏号DSM ACC2750保藏在位于德国布劳恩斯切魏格,38124布劳恩

斯切魏格, 马斯切尔奥德尔韦格1B的“德意志微生物保藏中心 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ)”中。

[0540] 将杂交瘤细胞培养于补充有10%胎牛血清和抗生素(青霉素/链霉素)的Dulbecco改良的Eagle培养基(DMEM)中。检查了所产生的抗体的同位型, 并且发现是小鼠IgG2b/ κ , 和期望的一样。

[0541] 测试法

[0542] 与淀粉状蛋白 β 结合的ELISA提供了C2抗体效力的可靠测量。阳性对照抗体, 鼠FP-12H3-C2 (Genovac批号: AK379/01), 以及标准Chemicon抗体1560 (批号: 0508008791)。

[0543] 人类恒定区的选择

[0544] 对于临床抗体候选者来说, 免疫系统的募集是不期望的, 对于重链, 所选择的人类恒定区是人类IgG4, 对其进行修饰以将较链区中位置228的丝氨酸改变为脯氨酸(HuIgG4Ser-Pro)。这一突变稳定了链间的二硫键, 并且阻止了可能在天然人类IgG4制品中发生的半分子的形成。从生产细胞系表达的抗体还将具有移除的末端赖氨酸。人类恒定区HuIgG4Ser-Pro和人类 κ 的序列分别在SEQ ID NO:17和14中给出。

[0545] 实施例1抗体可变区的克隆和测序

[0546] 应用Qiagen Rneasy微型试剂盒(目录号: 74104)从 3×10^6 个杂交瘤细胞(一个T175培养瓶)中制备总RNA。将RNA洗脱在50 μ L水中, 并在1.2%琼脂糖凝胶上检查。保留来自细胞的条件培养基, 并在抗体活性测试法中将样本用于测试。

[0547] 用小鼠IgG和 κ 恒定区引物应用逆转录酶制备 V_H 和 V_K cDNA。应用大量信号序列引物通过PCR扩增第一链cDNA。将扩增的DNA凝胶纯化并克隆至载体pGem®T Easy (Promega)中。通过PCR针对期望大小的插入片段对得到的 V_H 和 V_K 克隆进行筛选, 并通过自动DNA测序确定所选择的克隆的序列。参照其它抗体序列(Kabat EA等, 1991)确定互补决定区(CDR)在序列中的位置。在本申请中贯穿使用对于抗体可变区的Kabat编号规则; 因此残基编号可能与严格的线性编号不同。

[0548] mC2 V_K 的DNA序列及推出的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:29和27所示。四个克隆给出这一同一的生产序列。在许多克隆中也发现了由杂交瘤融合配偶体产生的非生产性异常 V_K 序列。

[0549] 对于mC2 V_H , 分离了两个不同的生产性序列。在总共29个克隆中发现了mC2 V_H AF序列(参见SEQ ID NO:30), 在个别克隆中有14个单碱基对改变。在总共8个克隆中发现了mC2 V_H B序列。它们中的五个代表多数序列, 而其它3个克隆是在其上的变体。有可能这些类似 V_H B序列是作为PCR扩增的人工产物产生的。从C2杂交瘤细胞中也得到了非生产性异常 V_H , 并将其归因于有缺陷的V-D-J结合。

[0550] 为确定哪一个是正确的活性mC2 V_H , 用该两个不同的 V_H 序列AF和B与mC2 V_K 组合, 制备了两个嵌合抗体, 以测试正确的抗体活性。

[0551] 实施例2嵌合抗体基因的构建

[0552] 以其最常见形式的人类嵌合抗体由与鼠(或其它非人类)可变区连接的人类恒定区组成。嵌合抗体提供了非常有用的工具, 首先用于确认已鉴定的正确的可变区, 其次在具有相同的效应子功能并利用相同的第二检测试剂作为人源化或工程抗体的抗原结合测试法中用作对照抗体, 以及还可用于研究关于抗体特定靶标的人类恒定区的药物代谢动力学

和其它特性。

[0553] 构建了两个嵌合重链表达载体,其由与表达载体pSVgpt中的HuIgG4 (Ser-Pro) 恒定区连接的mC2 V_H AF或mC2 V_H B可变区组成。该载体基于pSV₂gpt (Mulligan和Berg, 1980), 且包括用于在细菌细胞中选择的氨苄青霉素抗性基因、用于在哺乳动物细胞中选择的gpt基因、鼠重链免疫球蛋白增强子区域、编码恒定区基因的基因组序列和SV40多聚A序列。将用于表达的重链可变区作为HindIII至BamHI片段插入。

[0554] 构建了嵌合轻链载体,其由与表达载体pSVhyg中的人类C_κ恒定区的C2 VK组成。pSVhyg (Hieter PA等, 1980) 包括用于在细菌细胞中选择的氨苄青霉素抗性基因、用于在哺乳动物细胞中选择的hyg基因、鼠重链免疫球蛋白增强子区域、编码κ恒定区基因且包括κ增强子的基因组序列和SV40多聚A序列。将用于表达的轻链可变区作为HindIII至BamHI片段插入。

[0555] 应用载体VH-PCR1和VK-PCR1作为模板 (Riechmann等, 1988), 通过添加包括前导信号肽、前导内含子和鼠免疫球蛋白启动子的5' 侧翼序列, 以及包括剪接部位和内含子序列的3' 侧翼序列, 构建鼠C2 VH和VK序列的表达盒。确定嵌合表达载体中VH和VK的DNA序列是正确的。表达盒中VH和VK基因的DNA和氨基酸序列如图1和2所示。

[0556] 实施例3嵌合抗体的表达

[0557] 3.1在稳定细胞系中的表达

[0558] 用于抗体表达的宿主细胞系是NS0, 其为不产生免疫球蛋白的小鼠骨髓瘤, 获自欧洲动物细胞培养物保藏中心 (European Collection of Animal Cell Cultures), Porton UK (ECACC号85110503)。通过电穿孔将重链和轻链表达载体共转染入NS0细胞。在补充有10%胎牛血清 (FBS)、0.8μg/ml霉酚酸和250μg/ml黄嘌呤的Dulbecco改良的Eagle培养基 (DMEM) 中选择表达gpt基因的克隆。通过用于人类IgG的ELISA筛选产生人类抗体的转染的细胞克隆。放大分泌抗体的细胞系, 以及选择产量最高的细胞并冷冻于液氮中。在如上面那样的但仅含有5%FBS的培养基中放大对于每一抗体的最佳生产细胞系。应用**Prosep®-A** (Bioprocessing有限公司) 纯化嵌合抗体。通过对人类IgGκ抗体的ELISA确定浓度。还通过SDS-PAGE分析抗体。

[0559] 3.2嵌合抗体的瞬时表达

[0560] 为加速不同嵌合抗体的测试, 应用瞬时表达以快速生产小量的含有重组抗体的细胞上清液用于测试。将mC2 V_H和V_K表达盒转移至基于pcDNA3.1 (Invitrogen) 的载体上用于瞬时表达。重链载体包括人类IgG恒定区。轻链载体包括人类κ恒定区。根据生产商提供的方案利用Lipofectamine 2000试剂 (Invitrogen目录号: 11668) 将mC2 V_H AF和mC2 V_H B两者与mC2 V_K转染至人类胚肾 (HEK 298) 细胞中。在转染3天后, 从细胞中收获条件培养基。通过用于人类IgGκ抗体的ELISA确定所产生的抗体量。

[0561] 实施例4: 嵌合C2抗体的活性

[0562] 4.1通过瞬时转染产生的嵌合C2抗体的活性

[0563] 在结合淀粉状蛋白β的ELISA中测试两个不同嵌合抗体的来自瞬时转染的条件培养基样本。结果清楚地表明C2 V_H AF是正确的序列。C2 V_H AF/C2 V_K嵌合抗体在测试中很好地结合, 而C2 V_H B/C2 V_K完全没有显示出任何结合。Chemicon 1560鼠对照抗体显示出良好的结合, 但通过经纯化的鼠C2抗体提供的结合很低。应当注意, 对于具有小鼠恒定区的鼠抗

体和具有人类恒定区的嵌合抗体的比较,应用了不同的二抗,因此该结果不是可以直接比较的。后面发现来自C2杂交瘤细胞的条件培养基在测试法中给出了良好的结果。

[0564] 4.2纯化的嵌合C2抗体的活性

[0565] 如所描述的那样从稳定的NS0细胞中纯化两种不同的C2嵌合抗体,并应用淀粉状蛋白 β ELISA进行测试。得到的结果与用瞬时表达的抗体得到的结果一致。C2 ChVH AF/ChVK抗体在ELISA中结合良好,而C2ChVH B/ChVK抗体完全不结合。

[0566] 实施例5:人源化C2抗体基因的设计

[0567] 将mC2 V_H和V_K氨基酸序列与NCBI及Kabat数据库中的啮齿类动物抗体V_H和V_K序列相比较。

[0568] 5.1轻链可变区

[0569] 与mC2 V_K最匹配的小鼠种系基因是bb1,基因座MMU231201 (Schable等,1999)。仅仅两个氨基酸与该种系序列不同,两个均位于CDRL1内。发现了具有类似但不同一的序列的成熟鼠抗体。若干个具有同一的CDRL2和同一的CDRL3,但mC2的CDRL1似乎是独特的。可将mC2 V_K归于KABAT亚组MuV_KII。mC2 V_K的位置87是F而不是在该亚组中更常见的Y,表明这一构架残基对于抗体活性可能是很重要的。与人类种系V_K序列的比较显示来自亚组V_KII的基因对于C2 V_K是最匹配的(Cox等,1994)。选择序列DPK15和人类J区域HuJ_K1以向人源化V_K提供受体构架序列。

[0570] 设计了四个人源化V_K序列。C2HuVK1由与来自DPK 15和人类J_K1的构架区一起的mC2 V_K CDR组成。在第2、3和4种形式中,在构架中在位置45或87上或两者替换了鼠残基。残基45可能参与支持CDR的构象。残基87位于V_H和V_K结构域的界面上。因此,这些残基可能对于维持抗体结合是很关键的。位置和在轻链构架区中进行的改变如表6所示。人源化序列与mC2 V_K序列以及与DPK15和人类J_K1的比较。

[0571] 5.2重链可变区

[0572] 与mC2 V_H AF最密切匹配的小鼠种系基因是VH7183,基因座AF120466 (Langdon等,2000)。该比较如图3所示。九个氨基酸与这一种系序列不同,大多数位于CDR2内。发现了具有同一或类似(一个残基不同)的CDR1或具有类似CDR2(一个残基不同)的成熟鼠抗体,但是没有抗体具有三个与mC2 V_H AF同一的CDR。mC2抗体的CDR3极其短,仅由三个残基组成。然而,在数据库中发现了具有这一长度的CDR3的其它抗体。可将mC2 V_H AF归于KABAT亚组MuV_HIIID。mC2 V_H的残基47是L而不是较常见的W,以及残基94是S而不是通常的R,表明这些构架残基对于抗体活性可能是很重要的。与人类种系V_H序列的比较显示来自亚组V_HIII的基因与mC2 V_H最匹配。选择了序列DP54和人类J区域HuJ_H6以向人源化V_H提供受体构架序列。

[0573] 设计了四个人源化V_H序列。C2HuVH1由与来自DP54和HuJ_H6的构架一起的mC2 V_H AF CDR组成。在第2、3和4种形式中,在构架中在位置47或94处或两者替换了鼠残基。构架2中的残基47与CDR及V_K结构域两者接触。残基94可能参与支持CDR的构象。因此,这些残基可能对于维持抗体结合是关键的。

[0574] 位置和在重链构架区中进行的改变如表7所示。

[0575] 实施例6:人源化抗体基因的构建

[0576] 通过重叠PCR重组方法构建修饰的可变区。将嵌合抗体C2 ChV_H AF和C2 ChV_K的表达盒用作用于将构架区诱变为所需序列的模板。合成包含待改变区域的诱变引物对的组。

将所产生的人源化 V_H 和 V_K 表达盒克隆到pUC19中,并确定全部DNA序列对于每一个 V_H 和 V_K 都是正确的。将经修饰的重链和轻链V区域基因作为HindIII至BamHI的表达盒从pUC19中切除。然后将它们转移到分别包括人类IgG4 Ser-Pro或 κ 恒定区的pSVgpt和pSVhyg中,作为嵌合抗体载体。确定表达载体中的人源化 V_H 和 V_K 的DNA序列是正确的。

[0577] 实施例7人源化抗体的表达

[0578] 7.1在稳定细胞系中的表达

[0579] 至于嵌合抗体的表达,将人源化重链和轻链表达载体通过电穿孔共转染至NS0细胞中。选择并放大产生抗体的细胞系,并且纯化人源化抗体,确切地作为嵌合抗体。通过SDS-PAGE分析纯化的抗体。

[0580] 7.2人源化抗体的瞬时表达

[0581] 为加速不同人源化 V_H 和 V_K 构建体的测试,还将C2人源化 V_H 和 V_K 表达盒转染至7.2节描述的用于瞬时表达的载体中。将所述四个人源化C2 V_K 构建体与嵌合C2 V_H 构建体共转染至HEK293细胞。类似地,将四个人源化C2 V_H 构建体与嵌合C2 V_K 构建体共转染至HEK293细胞。转染三天后,从细胞中收获条件培养基。通过用于人类IgG κ 抗体的ELISA确定产生的抗体量。

[0582] 实施例8:人源化C2抗体的活性

[0583] 8.1通过瞬时转染产生的人源化C2抗体的活性

[0584] 在淀粉状蛋白BELISA中测试来自瞬时转染的条件培养基样本。所得到的结果清楚地表明当与嵌合C2 κ 链组合时,人源化VH构建体C2 HuVH AF的第2和4种形式是有功能的,并且在测试法中与嵌合C2抗体是相当的。相反,含有与嵌合C2 κ 链组合的C2 HuVH AF的第1和3种形式的抗体在测试法中完全没有显示出结合。这表明在位置94的鼠残基的替换对于抗体活性是必需的。在ELISA中含有与四个人源化C2 κ 链组合的嵌合C2重链的抗体全部都显示出良好的结合,其与嵌合抗体是相当的。

[0585] 8.2纯化的人源化C2抗体的活性

[0586] 如所描述的那样从稳定的NS0细胞系统纯化包括两个人源化重链和四个人源化轻链的所有组合的八个不同的人源化C2抗体,并使用淀粉状蛋白BELISA测试(图4)。

[0587] 所得到的结果清楚地表明在测试法中C2 HuVH4抗体比C2 HuVH2抗体表现更好。在C2 HuVH2抗体中,C2 HuVH2/HuVK3显示出最佳的结合活性,但与嵌合对照抗体C2 ChVHAF/ChVK相比,其约降低了两倍。与对照相比,C2 HuVH2/HuVK2活性降低了四至五倍。包含与四个不同的人源化轻链一起的C2HuVH4的抗体的活性是类似的。观察到最高活性的是C2HuVH4/HuVK1,且四个抗体在测试法中都与对照嵌合抗体相接近。

[0588] 实施例9对CDRL2的修饰

[0589] 9.1设计具有修饰的CDRL2的轻链

[0590] 如上面提到的那样,许多抗体与C2抗体共有相同的CDRL2序列(“KVSNRFS”)。决定测试是否可以轻微地修饰CDRL2而不会不利地影响抗体活性。选择了两个保守替换:位置50的K替换为R,以及位置53的N替换为S。因此,该两个备选的CDRL2序列是“RVSNRFS”和“KVSSRFS”。将它们掺入没有其它改变的鼠 V_K 序列中,分别作为mC2VK-R和mC2 VK-S。

[0591] 9.2修饰的CDRL2抗体的瞬时表达

[0592] 将具有在11.2.1节中描述的经修饰的CDRL2的两个C2轻链构建体克隆至轻链载

体,用于瞬时表达。每一个都与嵌合C2 V_H载体共转染至HEK293细胞中。转染三天后从细胞收获条件培养基。通过用于人类IgG κ 抗体的ELISA确定所产生的抗体量。

[0593] 9.3具有经修饰的CDRL2的C2抗体的活性

[0594] 在淀粉状蛋白 β ELISA中测试来自具有和mC2 V_H组合的经修饰的CDRL2的mC2 V_KS瞬时转染的条件培养基样本(图5)。VK-R和VK-S抗体两者都与嵌合C2抗体相当,表明在测试法中,所选择的对CDRL2的各修饰不会显著地影响抗体的活性。

[0595] 实施例10亲和力和测定

[0596] 为评估小鼠(ACI-01-Ab-7-C2)嵌合(AF)和人源化抗体(H4K1、H4K4)的结合特异性和亲和力,应用淀粉状蛋白 β 1-42单体和纤维作为固定在CM5芯片上的抗原进行BIACORE.RTM.分析。BIACORE.RTM.技术利用在抗体结合至固定在层上的抗原后表面层上的折射率改变。通过从表面折射的激光的表面胞质共振(surface plasmon resonance;SPR)检测结合。信号动力学结合速率(on rate)和解离速率(off rate)的分析允许区分非特异和特异相互作用。使用的抗体浓度在0.05 μ M至1.0 μ M的范围。

[0597] 表1:小鼠(ACI-01-Ab-7-C2)嵌合(AF)和人源化抗体(H4K1、H4K4)对淀粉状蛋白 β 1-42单体和纤维的结合特异性和亲和力

		单体			纤维		
		k _a (1/Ms)	k _d (1/s)	KD (M)	k _a (1/Ms)	k _d (1/s)	KD (M)
[0598]	小鼠 ACI-01-Ab-7-C2	1.8E+04	2.7E-03	1.5E-07	2.4E+04	9.9E-04	4.1E-08
	嵌合 AF	4.7E+04	9.5E-04	2E-08	5.1E+04	3.3E-04	6.5E-09
	人源化 H4K1	5.0E+04	9.5E-04	1.9E-08	4.9E+04	2.3E-04	4.7E-09
	人源化 H4K4	2.5E+04	4.4E-04	1.8E-08	1.3E+05	3.0E-04	2.3E-09

[0599] 实施例11免疫组织化学结合测试法

[0600] 11.1人类脑切片

[0601] 在伦理学批准后从波恩的Universitätsklinik获得来自健康的、非痴呆的前AD(pre-AD)及AD患者的脑。将脑在甲醛中固定,并使海马区脱水,包埋于石蜡中,并用切片机切成5 μ m切片。将石蜡切片于RT下保藏,直到使用。对于新鲜材料,用低温恒温器切成5 μ m低温切片,并将切片保藏在-80℃,直到使用。

[0602] 11.2免疫组织化学

[0603] 通过将玻片浸泡于二甲苯中,随后浸泡于100%乙醇、90%乙醇和70%乙醇中而使石蜡切片脱石蜡和再水化。通过在水中的10%H₂O₂、10%甲醇中孵育30分钟降低背景。通过将玻片在100%甲酸中孵育3分钟得到抗原恢复。在Tris缓冲盐水(TBS,pH 7.5)中洗涤3次后,通过将玻片在TBS中的10%BSA、0.25%Triton X-100中孵育2小时封闭非特异标记。在洗涤(在TBS中3次)后,通过添加未标记的抗-人类IgG(Biomed)并将玻片在潮湿室中在RT下孵育过夜而进行内源抗体的封闭。在另外的3次洗涤后,将人类抗淀粉状蛋白一级抗体加到玻片上,并在RT下孵育另一24小时。洗涤后,往玻片加入碱性磷酸酶标记的二级抗人类IgG(Sigma)并在RT下孵育2小时。洗涤后,用液体永久红(Dakocytomation)显影玻片,用水洗涤,并风干,随后用永久封片介质(corbitbalsam)封片。

[0604] 将冷冻切片在-80℃在甲醇中固定30分钟,并通过添加H₂O₂到冷甲醇中至10%的终浓度并在RT下孵育30分钟而降低背景。在Tris缓冲盐水(TBS,pH7.5)中洗涤3次后,通过如上面那样在TBS中的10%BSA、0.25%Triton X-100中孵育2小时封闭非特异标记,并且进行如上面那样的染色步骤。

[0605] 用Leica DMLB显微镜检查切片,并用Leica DC500相机和Leica FireCam1.2.0软件拍照。

[0606] 人类抗体A和C均标记了来自AD疾病患者的脑的斑块(图6)。弥散和核心斑均被标记。此外,非痴呆的前AD患者中的弥散斑块也能够被A和C抗体检测到。用两个抗体都标记了脑淀粉状蛋白血管疾病(CAA)中的淀粉状蛋白,并且还检测到了可能与细胞内淀粉状蛋白相对应的神经元的一些染色。在来自健康患者的对照脑中并没有看到标记。可以在用甲酸预处理的石蜡切片上检测到斑块,但在没有甲酸预处理的石蜡切片上以及在甲醇中固定的冷冻切片上没有斑块被标记。人类抗体B没有在石蜡切片上检测到斑块,并且小鼠抗体没有染色人类脑的石蜡或冷冻切片。

[0607] 缩写

[0608] A=结合的嵌合抗体AF(IgG4)(mC2Ch VHAF)

[0609] B=非结合的嵌合抗体B(IgG4)(mC2VHB)

[0610] C=结合的人源化抗体H4K1(IgG4)(HuVH4/HuVK1)

[0611] 小鼠=ACI-01-Ab-C2小鼠抗体(IgG2b)

[0612] 实施例12:mC2对淀粉状蛋白纤维的功能性

[0613] 12.1在结合mC2抗体后,AB1-42纤维的构象改变和解聚的引发

[0614] 为评估抗体能够解聚预形成 β 淀粉状蛋白(AB₁₋₄₂)纤维的机制,进行了测量解聚的硫代黄素T(Th-T)荧光测试法和分析二级构象的U-¹³C酪氨酸10和缬氨酸12标记的AB1-42肽的固态核磁共振(NMR)的并行比较(图7A)。mC2抗体溶解了35.4%的预形成AB1-42纤维并同时诱导二级构象从 β 折叠向无规则卷曲的转变。就无规则卷曲而言, β 折叠构象总量的减少约为35%,并因此与用荧光Th-T测试法测量的减少总量接近一致(图7B)。这些数据表明mC2抗体的结合引发二级结构的转变,其可能引起 β 折叠的平行分子间排列的不稳定,导致延伸的纤维断裂成较小的片段。

[0615] 12.2mC2抗体的构象依赖性结合亲和力

[0616] 由于在科学文献中公知抗体-抗原结合能量的一部分可以用于抗原构象的能量依赖性改变(Blond和Goldberg,1987),因此进行C2抗体结合到整个AB₁₋₄₂蛋白与结合到9个氨基酸长的包含抗体的表位的较小肽的结合亲和力的比较实验(图8)。为进行此比较,通过ELISA使用生物素化的覆盖C2表位的全部氨基酸序列的肽(Mimotopes生产,购自ANAWA Trading SA)和生物素化的完整AB1-42肽(Bachem)分析了人源化抗体C2的亲和力。根据制造商(Mimotopes)的说明书进行分析。如在图8和表2中说明的那样,抗体与包含其特异表位(AB₁₋₄₂序列的氨基酸13-21)的肽的结合亲和力比与整个AB1-42蛋白的结合亲和力高36.0%。因此提示结合亲和力能量之差被用于淀粉状蛋白二级构象的能量消耗性转变,以在对于抗体相互作用而言更可接受的布局呈现抗原。这解释了为什么抗体对天然抗原(整个淀粉状蛋白肽)的亲和力比对分离的亚单位的亲和力低。

[0617] 表2

[0618]		O.D	
		淀粉状蛋白 β 13-21	淀粉状蛋白 β 1-42
	hC2	1.225	0.9005
	对照 IgG	0.171	0.196

[0619] 实施例13:抗淀粉状蛋白hC2对淀粉状蛋白 β 1-42肽聚集的影响

[0620] 为评估人源化抗人类淀粉状蛋白 β 单克隆抗体hC2介导对淀粉状蛋白 β (A β) 的抗聚集和解聚效果的能力,进行了硫代黄素T分光荧光测试法。

[0621] 13.1聚集抑制测试法

[0622] 将A β 1-42冻干粉末在六氟异丙醇 (HFIP) 中重构至1mM。在室温下超声处理肽溶液15分钟,搅拌过夜,将等分试样装入未硅化的微型离心管中。然后在氩气流下蒸发HFIP。将得到的肽薄片真空干燥10分钟并储藏于-80℃,直到使用。

[0623] 为测试抗体介导的对A β 1-42聚集的抑制,将hC2抗体预稀释于PBS中,并在未硅化的孵育管中制得含有如下成分的测试溶液:3.3或0.33 μ M预稀释的抗体、10 μ M硫代黄素T、33 μ M A β 1-42、和8.2%DMSO。因此,抗体对A β 1-42的最终摩尔比是1:10和1:100。还制备了合适的对照溶液。然后将溶液在37℃孵育24小时,并在Perkin-Elmer FluoroCount分光荧光计上在黑色384孔板 (Perkin-Elmer) 中以六个重复读出分光荧光 (相对荧光单位;RFU)。然后测量分光荧光并如下计算%解聚。

[0624] 13.2解聚测试法

[0625] 为测试抗体介导的预聚集的A β 1-42的解聚,将如上面描述的那样制备的低分子量A β 1-42配制为在27%DMSO和1 x PBS中的110 μ M溶液。然后使该溶液在37℃聚集24小时,随后加入以下物质:3.3或0.33 μ M预稀释的抗体、和10 μ M硫代黄素T。这导致了抗体对A β 1-42的1:10和1:100的摩尔比。然后将该溶液在37℃再温育24小时。然后测量分光荧光并如下计算%解聚。

[0626] 13.3计算

[0627] 根据如下等式将聚集抑制或解聚分别表达为平均%抑制或解聚 $\pm$ 平均值的标准误差 (SEM) :

[0628] %抑制 = $\{[(\text{阳性对照的RFU}-\text{阴性对照的RFU}) - (\text{有A}\beta\text{1-42的样本的RFU}-\text{没有A}\beta\text{1-42的样本的RFU})] / (\text{阳性对照的RFU}-\text{阴性对照的RFU})\} \times 100\%$

[0629] 13.4结果

[0630] 13.4.1 A β 1-42聚集的抑制

[0631] 应用hC2抗体的A β 1-42聚集的抑制如表3和图16所示。当抗体对A β 1-42的摩尔比是1:100时,抑制平均为30% (2次独立实验),而当摩尔比是1:10时,抑制是80% (2次独立实验,参见表3)。

[0632] 表3:抗体对A β 1-42的摩尔比是1:100和1:10时,hC2介导的A β 1-42聚集的抑制

[0633]	抗体	摩尔比 (抗体比 A β 1-42)	
		1:100	1:10
	hC2	30.0 $\pm$ 4.1%	80.4 $\pm$ 6.9%

[0634] 13.4.2预聚集的A β 1-42的解聚

[0635] 应用hC2抗体对预聚集的A β 1-42的解聚如表4和图17所示。当抗体对A β 1-42的摩尔比是1:100时,解聚平均为24%,而当摩尔比是1:10时,解聚是32%(3次独立实验,参见表4)。

[0636] 表4:抗体对A β 1-42的摩尔比是1:100和1:10时,hC2介导的预聚集A β 1-42的解聚。

[0637]	抗体	摩尔比 (抗体比 A β 1-42)	
		1:100	1:10
	hC2	23.9 $\pm$ 4.4%	31.9 $\pm$ 3.5%

[0638] 应用硫代黄素T测试法,可以证明抗A β 人源化抗体hC2的双功能特性,即抑制A β 1-42聚集为致病的初原纤维构象 (protofibrillar conformation),并且此外还解聚预形成的A β 1-42初原纤维 (protofibrils)。当抗体对A β 1-42的摩尔比是1:10时,hC2使A β 1-42聚集抑制了80%。在1:10的摩尔比下,显示hC2解聚预聚集的A β 1-42初原纤维的能力为32%。

[0639] 实施例14:mC2与不同类的淀粉状蛋白的构象特异性结合

[0640] 为了评估mC2对不同阶段聚合的淀粉状蛋白,即对单体、聚合的可溶淀粉状蛋白以及原纤维淀粉状蛋白的特异性,进行了包被有这些不同阶段聚合的 β 淀粉状蛋白的ELISA (图9)。根据修改的 (Klein,2002) 公开的方法制备单体,根据 (Barghorn等,2005) 制备可溶的聚合淀粉状蛋白 β ,且通过将淀粉状蛋白 (Bachem,瑞士) 以在Tris/HCl (pH 7.4) 中1 μ g/ μ l的终浓度在37 $^{\circ}$ C孵育5天,随后离心 (10,000rpm,5分钟) 来制备纤维。然后将淀粉状蛋白聚合物以55 μ g/ml的终浓度包被在ELISA板上,并通过使用碱性磷酸盐标记的抗小鼠IgG单克隆抗体 (Jackson) 进行结合亲和力ELISA。如表5显示的那样,mC2抗体与可溶的聚合淀粉状蛋白 β 的结合亲和力比与纤维的结合亲和力更高,并且与单体的结合亲和力最低。这些数据表明,抗体的结合受到淀粉状蛋白表位和不同淀粉状蛋白聚集物的构象的影响。

[0641] 表5 mC2对淀粉状蛋白单体、寡聚体和纤维的构象特异性结合

[0642]	mC2	O.D		
	Ab 浓度(μ g/ml)	寡聚体	纤维	单体
	0.625	2.806	1.620	1.155
	0.312	1.724	0.989	0.649
	0.156	1.036	0.631	0.397
	0.078	0.652	0.499	0.333

[0643] 实施例15:AC免疫的单克隆抗体hC2的表位作图

[0644] 通过ELISA使用三种不同的肽文库进行人源化单克隆抗体hC2的表位作图。一个文库包含总共33个生物素化的覆盖A β 1-42的完整氨基酸(aa)序列 (由Mimotopes制造,购自ANAWA Trading SA) 的肽,第二个文库包含生物素化的使用来自第一肽文库的肽12 (A β 的第12-20位氨基酸) 并用丙氨酸替代序列中每一个aa的肽 (参见下表8),以及第三个文库包含生物素化的肽13、14或15 (A β 的第13-21、14-22或15-23位氨基酸) 并在每种情况下将最后的氨基酸替代为丙氨酸或将已经是丙氨酸的第21位氨基酸替代为甘氨酸 (参见下表9)。应用

生物素化的完整A β 1-42肽作为阳性对照 (Bachem)。根据制造商 (Mimotopes) 的说明进行表位作图。简单的说, 将经链亲和素包被的板 (NUNC) 在4℃用PBS中的0.1%BSA封闭过夜。用PBS-0.05%吐温20洗涤后, 用来自文库的不同肽在室温下包被板1小时, 肽在PBS中0.1%BSA、0.1%叠氮化钠中稀释至10 μ M终浓度。洗涤后, 将培养板与hC2抗体或非A β 结合的嵌合IgG4抗体在室温下孵育1小时, 抗体在PBS中2%BSA、0.1%叠氮化钠中稀释至200ng/ml。再次洗涤板, 并用碱性磷酸酶偶联的山羊抗人IgG在室温下孵育1小时。在最终洗涤后, 将板与磷酸酶底物 (pNPP) 孵育并用ELISA板读取器在405nm读数。

[0645] 显示人源化单克隆抗体hC2特异结合第一个肽文库的肽12、13、14、15和16。这些肽分别包含A β 1-42的12-20、13-21、14-22、15-23和16-24, 这提示表位位于A β 的区域12-24。用丙氨酸替代的第二个文库用于测定结合A β 12-20 (VHHQKLVFF) 的关键氨基酸。当氨基酸16、17、19或20被丙氨酸替代后, hC2抗体的结合完全丧失, 表明这些氨基酸对于抗体与A β 的结合是绝对关键的。当第15和18位氨基酸被替代时, hC2抗体的结合部分丧失。

[0646] 当第14位氨基酸被替代为丙氨酸时, 结合也几乎完全丧失, 表明第14位氨基酸对结合也是非常重要的。

[0647] 最后, 使用第三个文库以测定第21、21或23位氨基酸对表位的结合是否是关键的。当第23位氨基酸被丙氨酸替代时, 抗体与第15-23位氨基酸的结合降低了, 表明第23位氨基酸对结合也是重要的。当第21位氨基酸被甘氨酸替代时, 结合部分丧失, 以及当第22位氨基酸被丙氨酸替代时, 结合轻微丧失。

[0648] 实施例16: 通过hC2抗体的神经保护

[0649] 在体外测试法中评估了抗体hC2保护神经元免于A β 寡聚体诱导的变性的能力。分离了胚胎第16.5-17.5天小鼠皮质神经元, 使之分开, 并在体外培养于N3-F12培养基中。总共培养细胞九天, 在第3天以及在加入A β 寡聚体、或A β 寡聚体及抗A β 抗体hC2的那一天供给养分。在第5天 (“4天A β ”) 或第6天 (“3天A β ”), 仅用2 μ M A β 寡聚体、或用2 μ M A β 寡聚体和50 μ g/mL抗A β 抗体hC2的联合处理某些孔的细胞。

[0650] 通过将A β 1-42 (rPeptide) 溶解于HFIP中制备A β 寡聚体, 然后将A β 肽从那里分装为1mg/ml的10 μ l等分试样, 并且然后在通风橱中蒸发30分钟, 并将肽薄膜储藏于-80℃, 直到使用。使用时, 将肽薄膜溶解于10 μ l DMSO中, 然后溶解于78.6 μ l HAMS F12, 然后将A β 肽溶液在4℃孵育24-48小时 (25 μ M的A β 终浓度)。

[0651] 对于对照细胞, 在第5天仅加入和A β -DMSO相同体积的DMSO-F12, 并将细胞再培养4天, 不做任何其它处理。第9天, 固定来自所有培养条件的神经元, 并用Tu j1 (抗 β -微管蛋白抗体) 染色, 随后用FITC标记的二抗染色, 以显现微管, 并且因此一般地显现神经元进程。结果如图18所示。

[0652] 培养9天后, 未处理的小鼠胚胎皮质神经元显示出正常的形态 (图18, 最左图)。用A β 寡聚体处理细胞3天诱导轴突变性并导致轴突总数量的减少 (图18, 较低中图), 并且这一影响在4天的处理后甚至更显著 (图18, 较高中图)。相反, 用A β 寡聚体和抗A β 抗体hC2联合处理的细胞看起来和对照细胞类似 (图18, 上和下右图)。这些结果表明抗A β 抗体hC2能够保护胚胎小鼠皮质神经元免于A β 寡聚体诱导的变性。

[0653] 表6: 位置和在人源化C2轻链构架区中进行的改变

[0654]

轻链位置	45	87	50	53
------	----	----	----	----

小鼠C2V _K	K	F	K	N
人源化C2HuV _K 1	Q	Y	K	N
人源化C2HuV _K 2	Q	F	K	N
人源化C2HuV _K 3	K	Y	K	N
人源化C2HuV _K 4	K	F	K	N
人类种系dpk15	Q	Y	L	N
小鼠C2V _K -R			R	
小鼠C2V _K -S				S

[0655] 表7:位置和在入源化C2重链构架区中进行的改变

重链位置	47	94
小鼠 C2VHAF	L	S
人源化 C2HuVHAF1	W	R
人源化 C2HuVHAF2	W	S
人源化 C2HuVHAF3	L	R

[0657]

人源化 C2HuVHAF4	L	S
人类种系 DP-54	W	R

[0658] 用轻链人源化C2HuV_K1、C2HuV_K2、C2HuV_K3、C2HuV_K4以及重链C2HuVHAF4和C2HuVHAF2构建了总共8种不同的抗体。

[0659] 表8:第二个文库所用肽的概述

[0660] 用斜体和下划线标记了对于结合重要的氨基酸,并且用斜体和粗体标记了对结合绝对关键的氨基酸。

p12-20	V	H	H	Q	K	L	V	F	F
A12	A	H	H	Q	K	L	V	F	F
A13	V	A	H	Q	K	L	V	F	F
A14	V	H	A	Q	K	L	V	F	F
A15	V	H	H	A	K	L	V	F	F
A16	V	H	H	Q	A	L	V	F	F
A17	V	H	H	Q	K	A	V	F	F
A18	V	H	H	Q	K	L	A	F	F
A19	V	H	H	Q	K	L	V	A	F
A20	V	H	H	Q	K	L	V	F	A
氨基酸编号	12	13	14	15	16	17	18	19	20

[0662] 表9:第三个文库所用肽的概述

[0663] 用斜体和下划线标记了对于结合重要的氨基酸,并且用斜体和粗体标记了对结合绝对关键的氨基酸。

[0664]	p13-21		H	H	Q	K	L	V	F	F	A		
	p13-21	G21	H	H	Q	K	L	V	F	F	G		
	p14-22			H	Q	K	L	V	F	F	A	E	
	p14-22	A22		H	Q	K	L	V	F	F	A	A	
	p15-23				Q	K	L	V	F	F	A	E	D
	p15-23	A23			Q	K	L	V	F	F	A	E	A
	氨基酸编号		13	14	<u>15</u>	16	17	<u>18</u>	19	20	21	22	<u>23</u>

[0665] 参考文献:

[0666] Barghorn S,Nimmrich V,Striebinger A,Krantz C,Keller P,Janson B,Bahr M,Schmidt M,Bitner RS,Harlan J,Barlow E,Ebert U,Hillen H(2005)球形淀粉状蛋白 β 肽寡聚体-在阿尔茨海默病中的同质且稳定的神经病理蛋白,J Neurochem 95:834-847.

[0667] Blond和Goldberg,1987,PNAS,1987年3月1日,卷84|5期|1147-1151

[0668] Cox JPL,Tomlinson IM和Winter G.Eur.J.Immunol.1994;24:827-836.人类种系V κ 片段的目录揭示它们使用中的强偏差。

[0669] Hieter PA,Max EE,Seidman JG,Maizel JV Jr,Leder P.克隆的人类和小鼠 κ 免疫球蛋白恒定和J区基因在功能片段中保留同源性,Cell.1980年11月;22(1Pt1):197-207.

[0670] Kabat EA,Wu TT,Perry HM,Gottesman KS,Foeller C.免疫学感兴趣的蛋白质序列,美国健康和人类服务部,1991。

[0671] Klein WL(2002)在阿尔茨海默病中的A β 毒性:球形可溶的多聚淀粉状蛋白 β (ADDLs)作为新疫苗和药物靶标.Neurochem Int 41(5):345-352.

[0672] Langdon SD,Inaioki M,Kelsoe G.和Tedder TF.Immunogenetics 2000;51:241-245.C57BL/6小鼠中的V(H)7183基因家族成员的种系序列显示在近期进化期间特定序列的自然选择。

[0673] Mulligan RC和Berg P.Science 1980;209:1422-1427.细菌基因在哺乳动物细胞中的表达

[0674] Riechmann L,Clark M,Waldmann H,Winter G,Nature 1988;332:323-327.重构人类抗体用于治疗。

[0675] Schable KP,Thiebe R,Bensch A,Brensing-Kueppers J,Heim V,Kirschbaum T,Lamm R,Ohnrich M,Pourrajabi S,Roschenthaler F,Schwendinger J,Wichelhaus D,Zocher I和Zachau HG.Eur.J.Immunol.1999;29:2082-2086.小鼠基因组中的免疫球蛋白V κ 基因、假基因、残余基因和孤儿基因的特征。

[0676] Tomlinson IM,Walter G,Marks JD,Llewelyn MB和Winter G.,J.Mol.Biol.1992;227:776-798.人类种系V μ 序列库揭示约50组具有不同高变环的V μ 片段。

序列表

<110> AC免疫有限公司

<120> 针对淀粉状蛋白 β 的人源化抗体

<130> M1967 EP S3

<160> 32

<170> PatentIn版本3.3

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<220>

<223> C2 HuVH AF 4 人源化重链可变区 (CDR1)

<400> 1

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser
1 5 10

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<223> C2 HuVH AF 4 人源化重链可变区 (CDR2)

<400> 2

Ser Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

[0001]

Gly

<210> 3

<211> 3

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<223> C2 HuVH AF 4 人源化重链可变区 (CDR3)

<400> 3

Gly Asp Tyr
1

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<223> C2 HuVK 1 人源化轻链可变区 (CDR1)

<400> 4

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

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>
 <223> C2 HuVK 1 人源化轻链可变区 (CDR2)
 <400> 5

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<220>
 <223> C2 HuVK 1 人源化轻链可变区 (CDR3)
 <400> 6

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr
 1 5

<210> 7
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人 (Homo sapiens)

<220>
 <223> A β 表位, 区域2
 <400> 7

Val Phe Phe Ala Glu Asp
 1 5

[0002]

<210> 8
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人

<220>
 <223> A β 表位, 区域1
 <400> 8

His Gln Lys Leu Val
 1 5

<210> 9
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa可以是Ala, Val, Leu, 正亮氨酸, Met, Phe, 或Ile

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa可以是Ala, Val, Leu, Ser 或Ile

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa可以是Glu 或Asp

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)

<223> Xaa可以是Glu 或Asp

<400> 9

Xaa Phe Phe Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 10

<211> 5

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Xaa可以是His, Asn, Gln Lys, 或Arg

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa可以是Asn 或Gln

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> Xaa可以是Ala, Val, Leu, 正亮氨酸, Met, Phe, 或Ile

<400> 10

Xaa Xaa Lys Leu Xaa
1 5

[0003]

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Xaa可以是His, Asn, Gln Lys, 或Arg

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa可以是Asn 或Gln

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> Xaa可以是Ala, Val, Leu, 正亮氨酸, Met, Phe, 或Ile

<220>

<221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> Xaa可以是Ala, Val, Leu, Ser 或Ile

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> Xaa可以是Glu 或Asp

<220>

<221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> Xaa可以是Glu 或Asp

<400> 11

Xaa Xaa Lys Leu Xaa Phe Phe Xaa Xaa Xaa
1 5 10

<210> 12
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工的人源化C2 HuVK 1可变轻链

<400> 12

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser
20 25 30

Asn Gly Asp Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
85 90 95

[0004]

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 13
<211> 219
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工的人源化C2轻链

<400> 13

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser
20 25 30

Asn Gly Asp Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 14
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

[0005]

<220>
<223> 人工的人源化C2轻链恒定区
<400> 14

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 15
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工的人源化C2 HuVH AF 4可变重链
<400> 15
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val
35 40 45
Ala Ser Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 16
<211> 439
<212> PRT
<213> 人工序列

[0006]

<220>
<223> 人工的人源化C2重链
<400> 16
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val
35 40 45
Ala Ser Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
100 105 110
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
115 120 125
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

130	135	140
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser 145 150 155 160		
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser 165 170 175		
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr 180 185 190		
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys 195 200 205		
Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro 210 215 220		
Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys 225 230 235 240		
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val 245 250 255		
Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp 260 265 270		
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe 275 280 285		
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp 290 295 300		
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu 305 310 315 320		
Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg 325 330 335		
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys 340 345 350		
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp 355 360 365		
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys 370 375 380		
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser 385 390 395 400		
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser 405 410 415		
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser 420 425 430		
Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		

[0007]

435

<210> 17
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> 人

<220>
 <223> Ig Y-4链C区域 - 经修饰的

<400> 17

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

[0008]

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300

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

Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 325

<210> 18
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> 小家鼠

<220>
 <223> C2 HuVH AF 4 人源化重链可变区(CDR2)

<400> 18
 agcatcaata gtaatgtgg tagcacctat tatccagaca gtgtgaaggg c 51

<210> 19
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> 小家鼠

[0009]

<220>
 <223> C2 HuVH AF 4 人源化重链可变区(CDR3)

<400> 19
 ggtgactac 9

<210> 20
 <211> 49
 <212> DNA
 <213> 小家鼠

<220>
 <223> C2 HuVK 1 人源化轻链可变区(CDR1)

<400> 20
 agatctagtc agagccttgt atatagtaat ggagacacct atttacatt 49

<210> 21
 <211> 635
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工的人源化C2 Hu VK 1可变轻链

<400> 21
 gatattgtga tgacceaatc tccactctcc ctgcctgtca ctcttggtga gctgcctcc 60
 atctcttgca gatctagtca gagccttgta tatagtaatg gagacaccta ttacattgg 120
 tacctgcaga agccaggcca gtctccacag ctctgatct acaaagtctt caaccgattt 180
 tctgggggcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
 agcagagtgg aggctgagga tgtgggagtt tattactgct ctcaaagtac acatgttcct 300

tggacgttcg gccaaaggcac caaggtggaa atcaaa 336

<210> 22
<211> 657
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工的人源化C2轻链

<400> 22
gatattgtga tgaccaaatc tccactctcc ctgcctgtca ctccctggtga gcctgcctcc 60
atctcttgca gatctagtca gagccttgta tatagtaatg gagacaccta ttacattgg 120
tacctgcaga agccaggcca gtctccacag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180
tcctgggtcc cagacagggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
agcagagtgg aggetgagga tgtgggagtt tattactgct ctcaaagtac acatgttcct 300
tggacgttcg gccaaaggcac caaggtggaa atcaaaagga ctgtggctgc accatctgtc 360
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgctg 420
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtggga aggtggataa cgccctccaa 480
tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540
agcagcaccg tgacgttagg caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgctgcgaa 600
gtcaccatc agggccttag ctgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt 657

[0010]

<210> 23
<211> 321
<212> DNA
<213> 人

<220>
<223> 人工的人源化C2轻链恒定区

<400> 23
aggactgtgg ctgcaccatc tgtcttcac ttcccggcat ctgatgagca gttgaaatct 60
ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat aactcttctc ccagagaggc caaagtacag 120
tggaaggtgg ataagccctt ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180
agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240
aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag 300
agcttcaaca ggggagagtg t 321

<210> 24
<211> 798
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工的人源化C2 HuVH AF可变重链

<400> 24
gaggtgcagc tggtcgagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc cctgagactc 60
tctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatggca tgtcttgggt tcgccaggct 120
ccaggcaagg gtctcgaatt ggtcgcaagc atcaatagta atggtggtag cacctattat 180
ccagacagtg tgaaggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa ctccctgtac 240

	ctgcaaatga acagtctgag agctgaggac accgccgtgt attactgtgc aagtgggtgac	300
	tactggggcc aaggcaccac tgtcacagtc tcctca	336
	<210> 25	
	<211> 1317	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工的人源化C2重链	
	<400> 25	
	gaggtgcagc tggtcgagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc cctgagactc	60
	tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatggca tgtcttgggt tcgccaggct	120
	ccaggcaagg gtctcgaatt ggtcgcaagc atcaatagta atgggtgtag cacctattat	180
	ccagacagtg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa ctccctgtac	240
	ctgcaaatga acagtctgag agctgaggac accgccgtgt attactgtgc aagtgggtgac	300
	tactggggcc aaggcaccac tgtcacagtc tcctcagctt ccaccaaggg cccatccgtc	360
	ttccccctgg cgcctgtctc cagatcgacc tccgagagca cagccgccct gggtgcctg	420
	gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc	480
	ggcgtgcaca ccttcccggc tgcctacag tcctcaggac tctactcct cagcagcgtg	540
	gtgaccgtgc cctccagcag ctgggcacg aagacctaca cctgcaacgt agatcacaag	600
	cccagcaaca ccaagggtga caagagagtt gagtccaaat atgggtcccc gtgtcccca	660
[0011]	tgcccagcac ctgagttcct ggggggacca tcagtcttcc tgttcccccc aaaacccaag	720
	gacactctca tgatctcccc gacctctgag gtcacgtgcg tgggtgtgga cgtgagccag	780
	gaagaccccg aggtccagtt caactggtag gtggatggcg tggaggtgca taatgccaag	840
	acaaagcccg gggaggagca gttcaacagc acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc	900
	ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag tacaagtga aggtctcca caaaggcctc	960
	ccgtctctca tcgagaaaac catctccaaa gccaaagggc agccccgaga gccacagggtg	1020
	tacacctgc cccatccca ggaggagatg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg	1080
	gtcaaagget tctaccccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag	1140
	aacaactaca agaccacgcc tccgctctc gattccgacg gctccttctt cctctacagc	1200
	aggctaaccg tggacaagag caggtggcag gagggaatg tcttctcatg ctccgtgatg	1260
	catgaggctc tgcacaacca ctacacacag aagagcctct ccctgtctct gggtaaa	1317
	<210> 26	
	<211> 981	
	<212> DNA	
	<213> 人	
	<220>	
	<223> 人工的人源化C2重链恒定区	
	<400> 26	
	gtttccacca agggcccatc cgtcttcccc ctggcgccct gtctcagatc gacctccgag	60
	agcacagccg ccctgggctg cctggtaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg	120
	tggaaactcag gcgcctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggtgtctct acagtctca	180
	ggactctact cctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc	240

tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtc 300
 aaatatggtc ccccggtgcc cccatgccca gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc 360
 ttctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg 420
 tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat 480
 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac 540
 cgtgtggtca ggcctctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 600
 tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtcc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 660
 gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccaggagga gatgaccaag 720
 aaccaggta cgcctgacct cctgggtcaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag 780
 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctcccgt cctcgattcc 840
 gacggctcct tcttctctca cagcaggcta accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg 900
 aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagaga 960
 ctctccctgt ctctgggtaa a 981

<210> 27
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 27

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser
 20 25 30

Asn Gly Asp Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
 85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 28
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 28

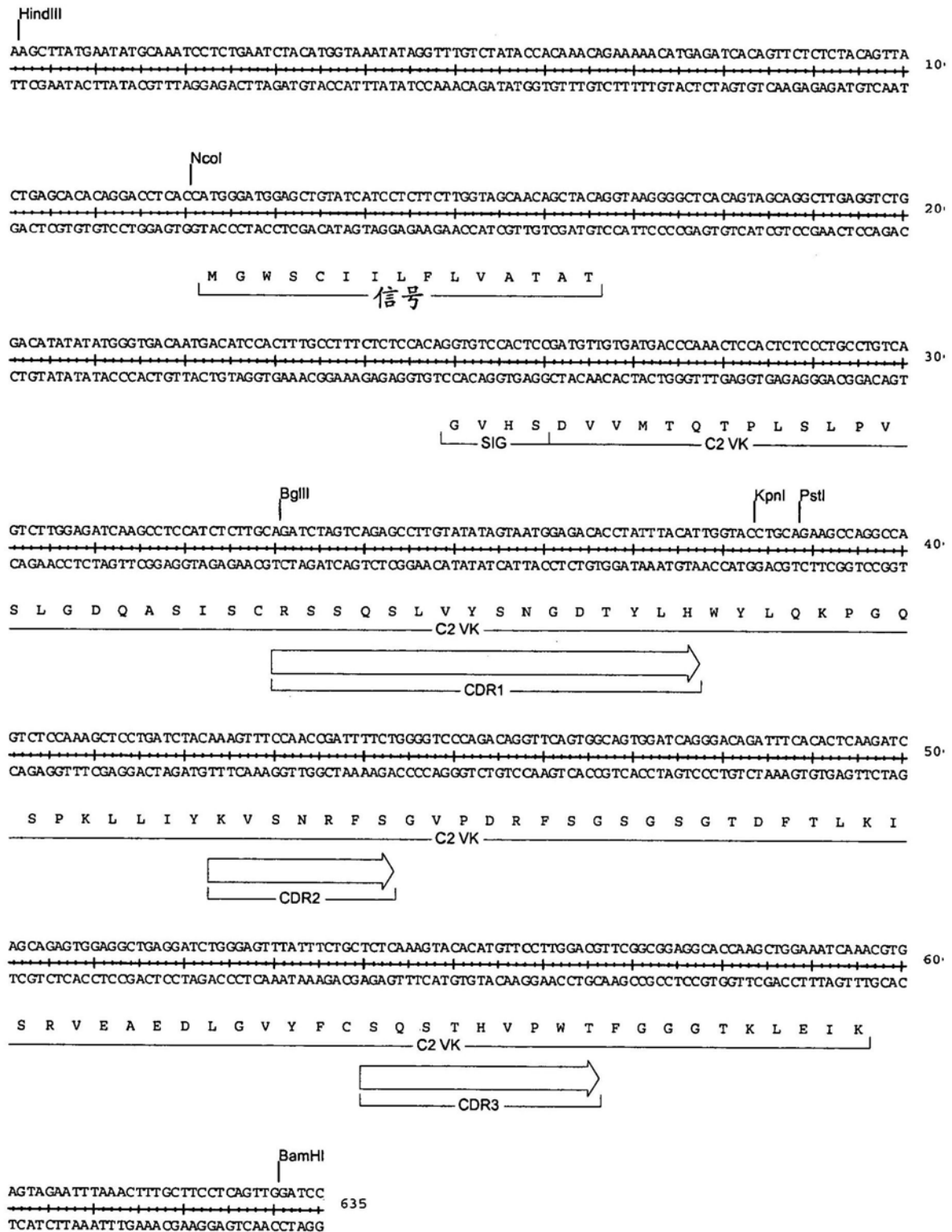
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

[0012]

	20	25	30
	Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Leu Val 35 40 45		
	Ala Ser Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val 50 55 60		
	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr 65 70 75 80		
	Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys 85 90 95		
	Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ser Thr Leu Thr Val Ser Ser 100 105 110		
	<210> 29 <211> 336 <212> DNA <213> 小家鼠		
[0013]	<400> 29		
	gatgttgta tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc	60	
	atctcttgca gatctagtca gacgcttgta tatagtaatg gagacaccta ttacattgg	120	
	tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtctt caaccgattt	180	
	tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc	240	
	agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaagtac acatgttcct	300	
	tggacgttcg gtggaggcac caagctagaa atcaaa	336	
	<210> 30 <211> 417 <212> DNA <213> 小家鼠		
	<400> 30		
	atgaagtgc ctgttagget gttggtgctg atgttctgga ttctgcttc cagcagtgat	60	
	gttgtgatga cccaaactcc actctccctg cctgtcagtc ttggagatca agcctccatc	120	
	tcttgcagat ctagtccagag ccttgtatat agtaatggag acacctattt acattggtac	180	
	ctgcagaagc caggccagtc tccaaagctc ctgatctaca aagtttccaa ccgattttct	240	
	gggggtcccag acaggttcag tggcagtgga tcaggacag atttcacact caagatcagc	300	
	agagtggagg ctgaggatct gggagtttat ttctgctctc aaagtacaca tgttccttgg	360	
	acgttcggtg gaggcaccaa gctagaaatc aaacgggctg atgctgcacc aactgta	417	
	<210> 31 <211> 336 <212> DNA <213> 小家鼠		
	<400> 31		
	gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc cctgaaactc	60	
	tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatggca tgtcttgggt tcgccagact	120	
	ccagacaaga ggctggaatt ggtcgcaagc atcaatagta atgggtgtag cacctattat	180	
	ccagacagtg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac	240	

	ctgcaaatga gcagictgaa gictgaggac acagccatgt attactgtgc aagtgggtgac	300
	tactggggcc aaggctccac tctcacagtc tectca	336
	<210> 32	
	<211> 408	
	<212> DNA	
	<213> 小家鼠	
[0014]	<400> 32	
	atgrasttsg ggytcagmtt grttttcctt gcccttattt taaaagggtgt ccaatgtgag	60
	gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gagggtcctt gaaactctcc	120
	tgtgcagcct ctggattcac ttccagtagc tatggcatgt ctggggttcg ccagactcca	180
	gacaagaggc tggaatttgt cgcaagcatc aatagtaatg gtggtagcac ctattatcca	240
	gacagtgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg	300
	caaatgagca gtctgaagtc tgaggacaca gccatgtatt actgtgcaag tgggtgactac	360
	tggggccaag gctccactct cacagtctcc tcagccaaaa caacaccc	408





		10		20																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
--	--	----	--	----	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

图3

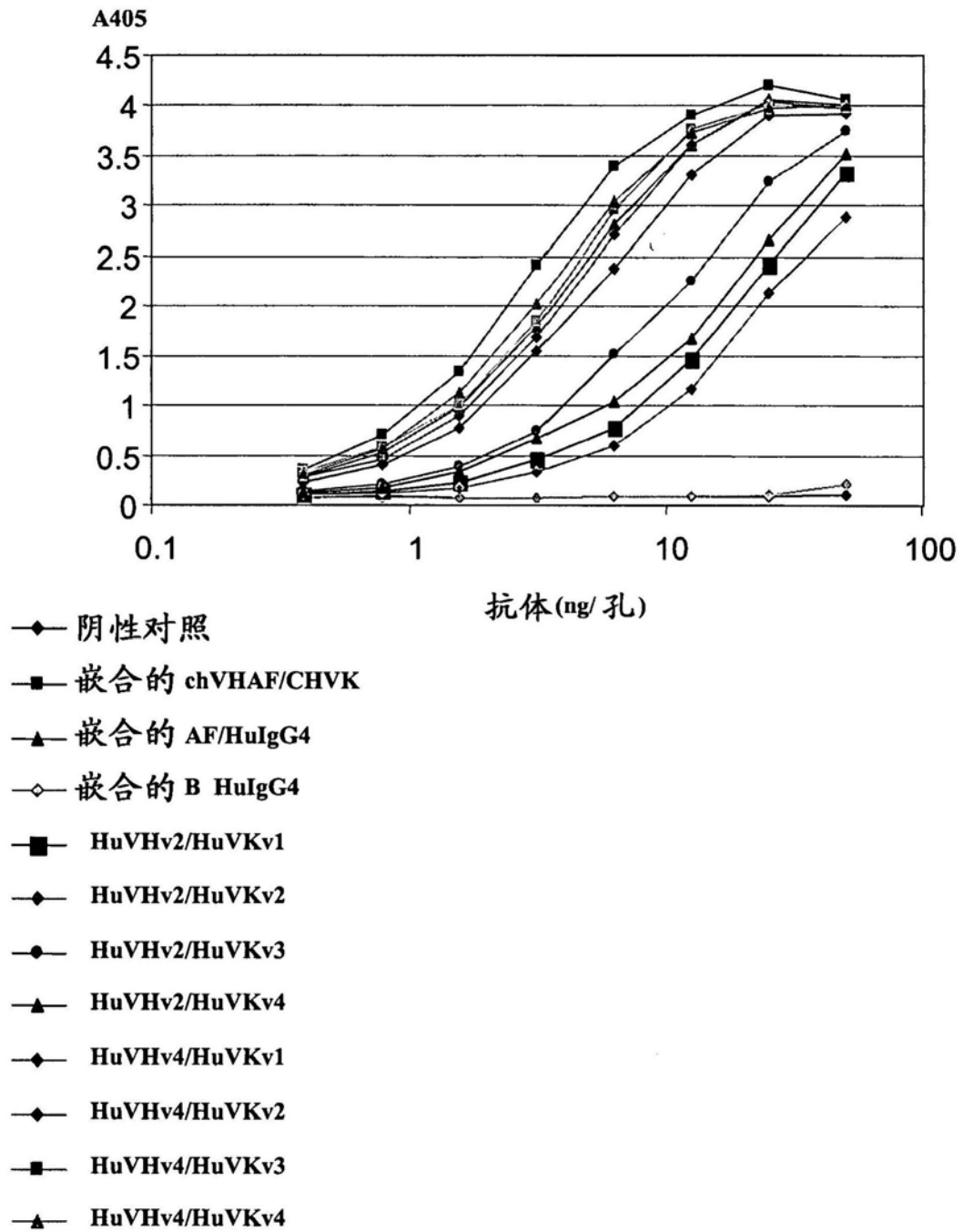


图4

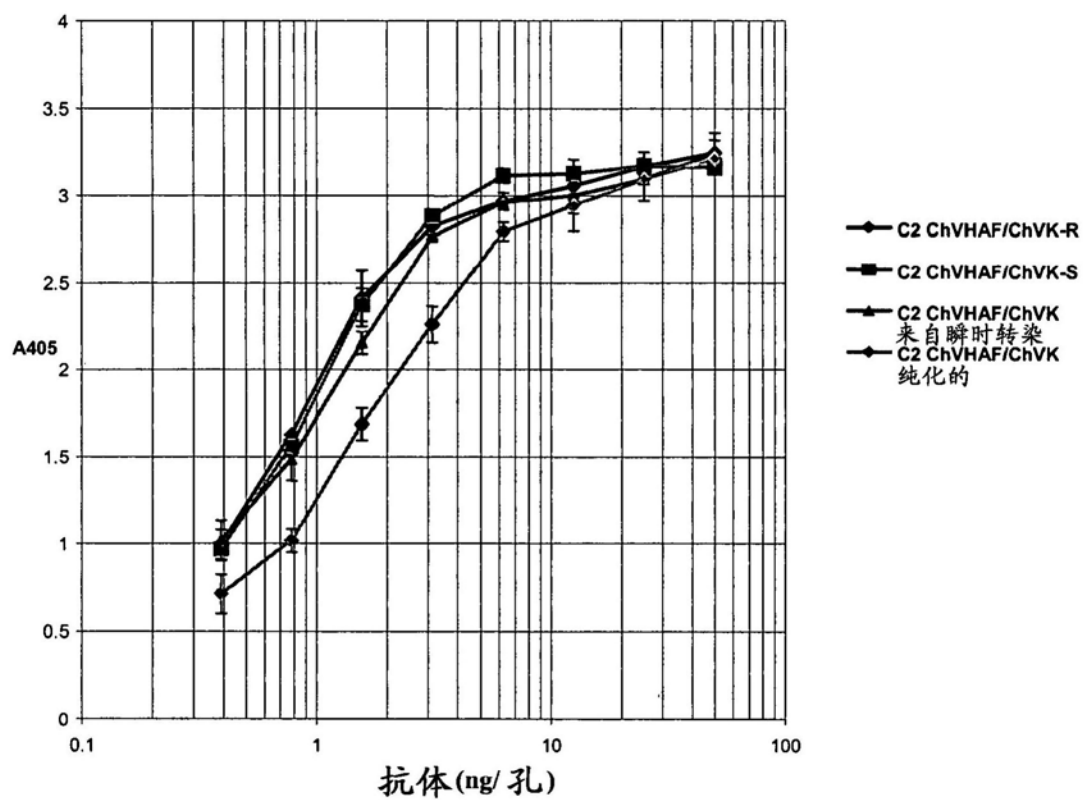


图5

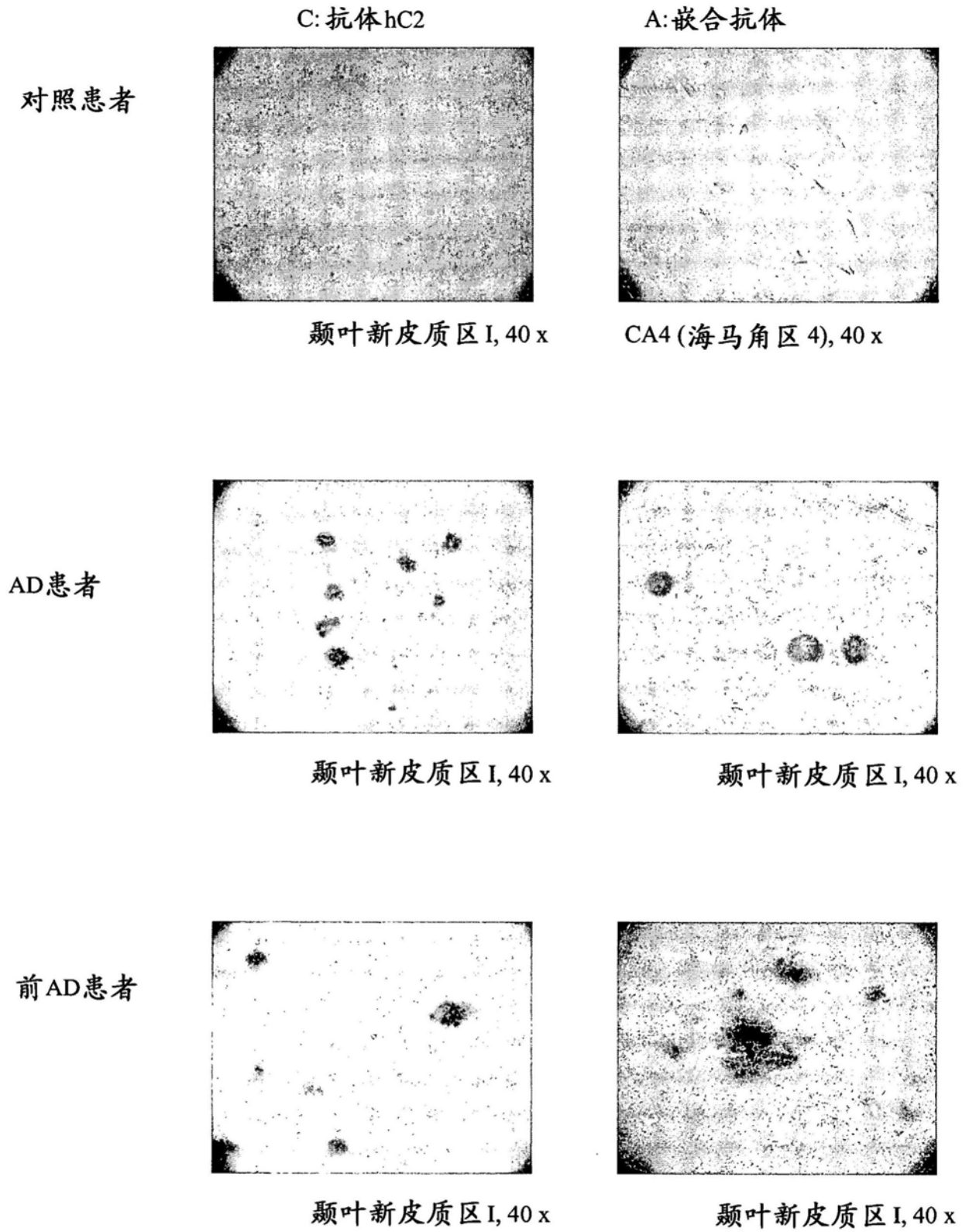
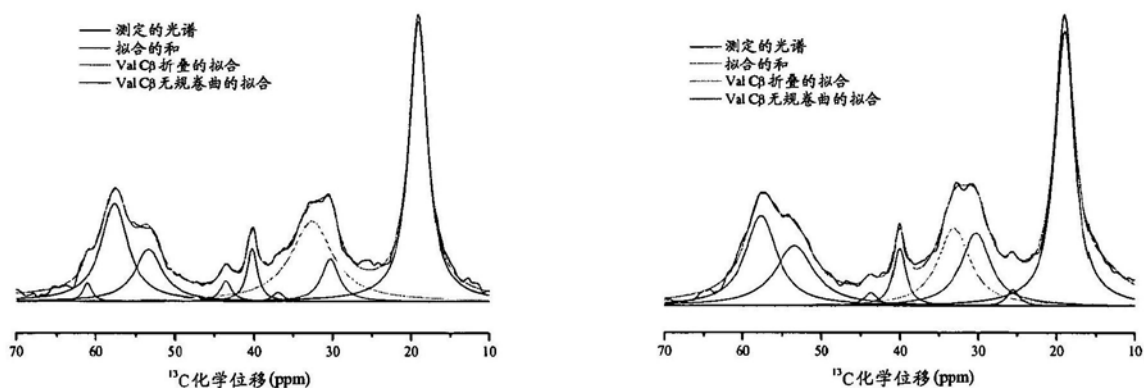


图6

A)



B)

	PBS			小鼠 C2		
	δ ISO (ppm)	FWHH (Hz)	% 积分强度	δ ISO (ppm)	FWHH (Hz)	% 积分强度
Val C β 折叠	32.60	479	81.7	33.09	366	53.5
Val C β 无规卷曲	30.27	200	18.3	30.27	340	46.5

A) 比较与 PBS (左图; 用作对照) 或者 ACI-7-C2 (右图) 孵育 24 小时然后冷冻干燥的 U- ^{13}C Tyr10 和 Val12 标记的淀粉状蛋白 β 1-42 纤维的 ^{13}C CPMAS 光谱并拟合。对 Val12 C β 的两个构象的拟合显示为绿色 (折叠) 和蓝色 (无规卷曲)。在 33 ppm 处的峰对应于纤维的 β 折叠构象, 而在 30 ppm 处的峰是无规卷曲构象的结果。

B) 比较 Val 12 C β 的两个构象的拟合参数。这两个构象的拟合的化学位移非常相似, 但积分强度非常不同, 这反映了原始的 β 构象减少约 35% ($1 - (53.5/81.7)$)。这与我们通过荧光测定法获得的值非常紧密地吻合。

图7

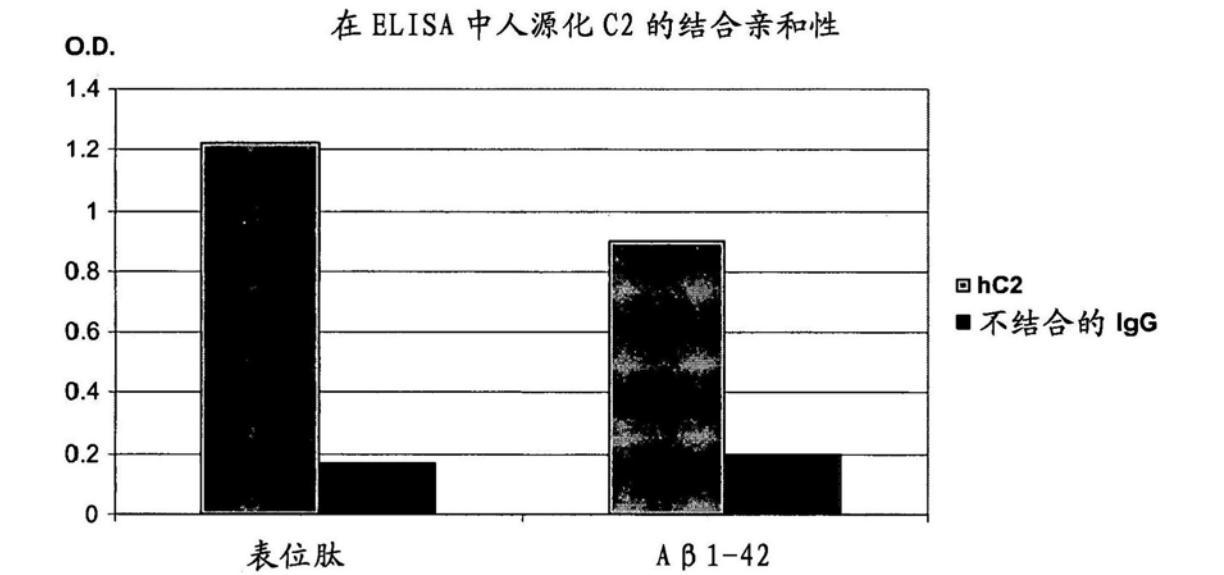


图8

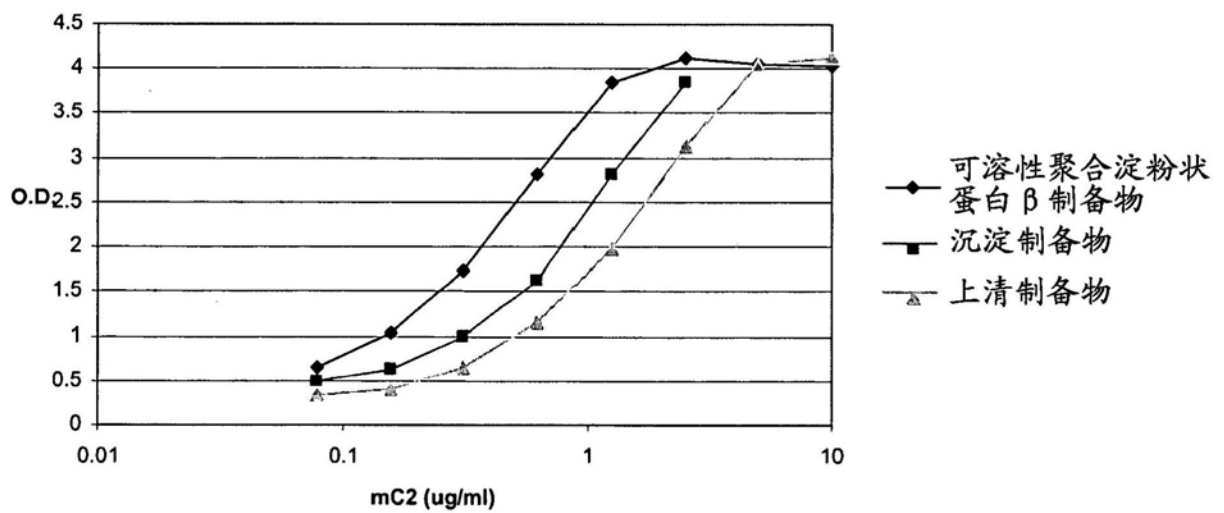


图9

图10

		10		20		30																								
C2VHAF	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	K	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S
C2HuVHAF1	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S
C2HuVHAF2	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S
C2HuVHAF3	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S
C2HuVHAF4	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S
DP-54	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S
HUJH6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

		40		50		60																								
C2VHAF	S	Y	G	M	S	W	V	R	Q	T	P	D	K	R	L	E	L	V	A	S	I	N	S	N	G	G	S	T	Y	Y
C2HuVHAF1	S	Y	G	M	S	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	A	S	I	N	S	N	G	G	S	T	Y	Y
C2HuVHAF2	S	Y	G	M	S	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	A	S	I	N	S	N	G	G	S	T	Y	Y
C2HuVHAF3	S	Y	G	M	S	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	L	V	A	S	I	N	S	N	G	G	S	T	Y	Y
C2HuVHAF4	S	Y	G	M	S	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	L	V	A	S	I	N	S	N	G	G	S	T	Y	Y
DP-54	S	Y	W	M	S	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	A	N	I	K	Q	D	G	S	E	K	Y	Y
HUJH6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Y	Y

		70		80		90																								
C2VHAF	P	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	A	K	N	T	L	Y	L	Q	M	S	S	L	K	S	E	D
C2HuVHAF1	P	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	A	K	N	S	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D
C2HuVHAF2	P	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	A	K	N	S	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D
C2HuVHAF3	P	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	A	K	N	S	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D
C2HuVHAF4	P	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	A	K	N	S	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D
DP-54	V	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	A	K	N	S	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D
HUJH6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

		100		110																		
C2VHAF	T	A	M	Y	Y	C	A	S	G	D	Y	W	G	Q	G	S	T	L	T	V	S	S
C2HuVHAF1	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	D	Y	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S
C2HuVHAF2	T	A	V	Y	Y	C	A	S	G	D	Y	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S
C2HuVHAF3	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	D	Y	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S
C2HuVHAF4	T	A	V	Y	Y	C	A	S	G	D	Y	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S
DP-54	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	D	Y	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S
HUJH6	-	-	-	Y	Y	Y	G	M	-	D	V	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S

图11

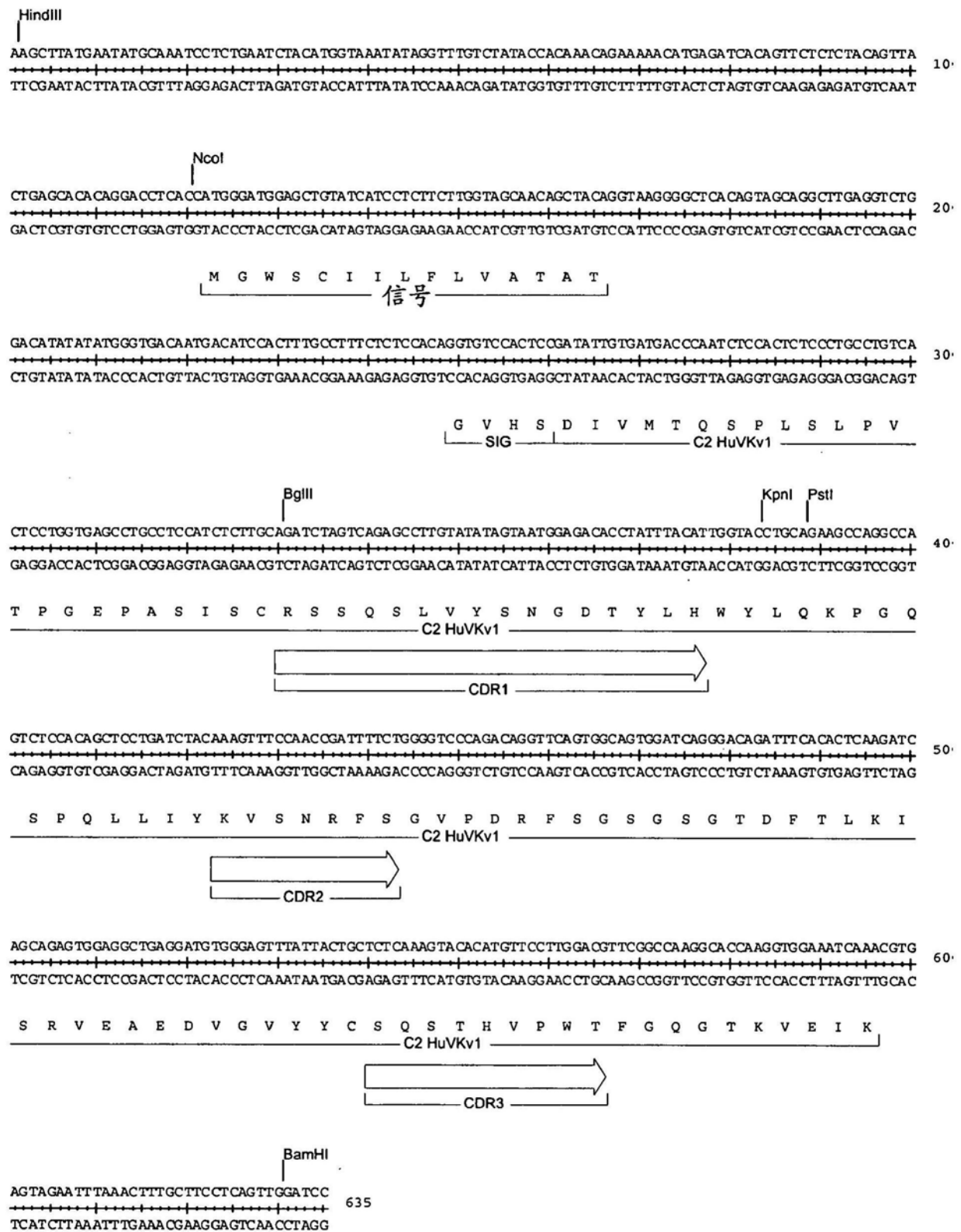


图12

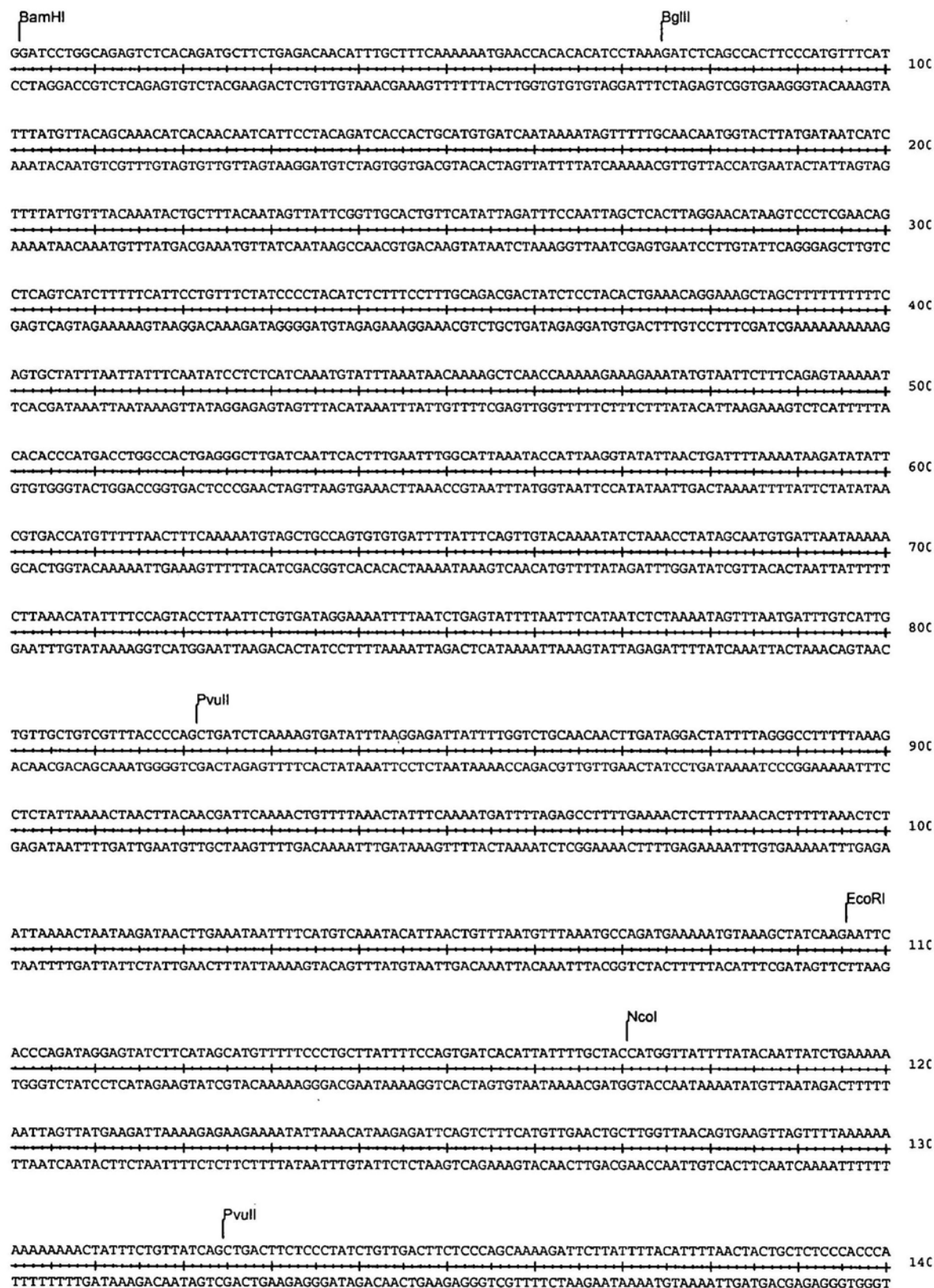
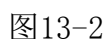


图13-1



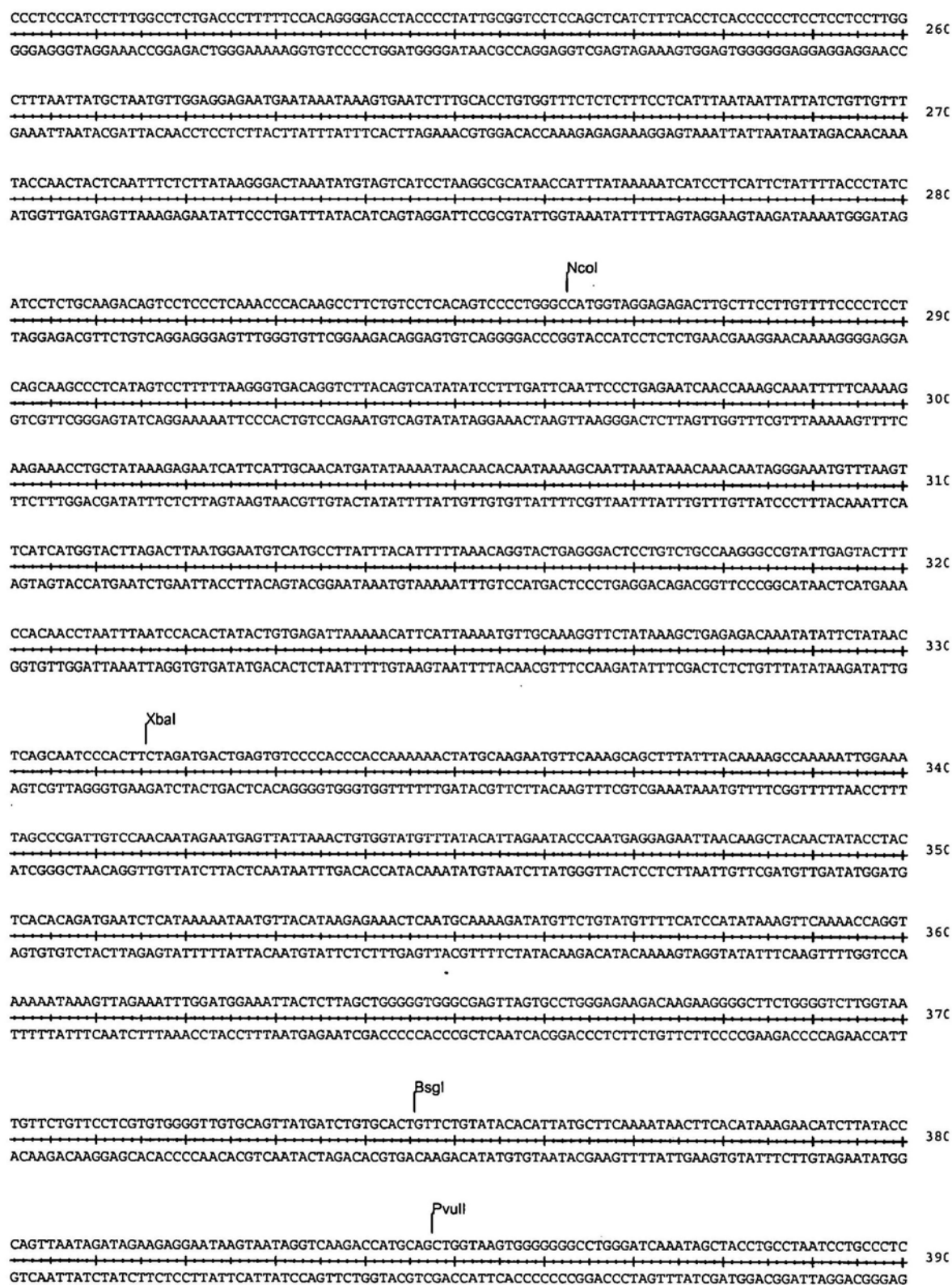


图13-3

TTGAGCCCTGAATGAGTCTGCCTTCCAGGGCTCAAGGTGCTCAACAAAACAACAGGCCTGCTATTTTCTGGCATCTGTGCCCTGTTTGGCTAGCTAGGA 40C
AACTCGGGACTTACTCAGACGGAAGGTCCCGAGTTCACAGAGTTGTTTGTGTCCGGACGATAAAAGGACCGTAGACACGGGACAAACCGATCGATCCT

GCACACATACATAGAAATTAATGAAACAGACCTTCAGCAAGGGGACAGAGGACAGAATTAACCTTGCCCAGACACTGGAAACCCATGTATGAACACTCA 41C
CGTGTGTATGTATCTTAATTTACTTGTCTGGAAGTCGTCCCTGTCTCCTGTCTTAATTGGAACGGGTCTGTGACCTTGGGTACATACTTGTGAGT

CATGTTTGGGAAGGGGAAGGGCACATGTAAATGAGGACTCTTCTCATTCTATGGGGCACTCTGGCCCTGCCCTCTCAGCTACTCATCCATCCAACAC 42C
GTACAAACCTTCCCCCTTCCCGTGTACATTTACTCCTGAGAAGGAGTAAGATACCCCGTGAGACGGGACGGGAGAGTCGATGAGTAGGTAGGTTGTG

XmnI
ACCTTCTAAGTACCTCTCTCTGCCTACACTCTGAAGGGTTTCAAGAGTAACTAACACAGCATCCCTTCCCTCAAATGACTGACCATCCCTTGTCTCTGC 43C
TGGAAGATTCTGAGAGAGACGGATGTGAGACTTCCCAAGTCCTCATTGATTGTGTCGTAGGGAAGGGAGTTTACTGACTGGTAGGGAACAGGACG

TTTGTTTTCTTCCAGTCAGTACTGGGAAAGTGGGGAAGGACAGTCATGGAAAACTACATAAGGAAGCACCTTGCCCTTCTGCCTCTTGAGAAATGTTG 44C
AAACAAAAGAAAGGTGAGTCATGACCTTTCACCCCTTCTGTGAGTACCTTTTGTATGATTCTTCTGTGGAACGGGAAGACGAGAACTCTTACAAC

ATGAGTATCAAATCTTCAAACCTTGGAGGTTTGTAGGGGTGAGACTCAGTAATGTCCCTTCCAATGACATGAACTTGCTCACTCATCCCTGGGGGCC 45C
TACTCATAGTTTAGAAAGTTGAAACCTCAAACCTCATCCCACTCTGAGTCATTACAGGAAGGTTACTGTACTTGAACGAGTGAGTAGGACCCCCCG

EcoRI
AAATTGAACAATCAAGGCAGGCATAATCCAGTTATGAATTCAAACCTTCTTCTCAGAAGATAACACTCTGAAGGAAACCCACCCATAACCTAAGCAAG 46C
TTAACTTGTTAGTTTCCGTCCGTATTAGGTCAATACTTAAGTTTGAAGAAGAGTCTTCTATTGTGAGACTTCCCTTGGGTGGGTATTGGATTGTTTC

PstI
TGAAGACAGGTGCTGCAGGTGGAATTGTGCTCTCAAAAAGGTATGCTCAACTCCTTGCTCTTGGTACTCATAATGGGTACATAAATGTGACTTTATT 47C
ACTTCTGTCCACGACGTCCACCTTAACACAGGAAGTTTTCATACGAGTTGAGGAACGGAACCATGAGTATTACCCAGTGTATTACACTGAAATAA

TGGAATAGGGTCTTGCAGAGTAATCAAGTCAAATTAGGTCATACTGAAATGTTTGTGAGGATGCGGTGAAATGGATCATTATATATTGCTGGTG 48C
ACCTTTATCCAGAAACGTCTCCATTAGTTTCAATCCAGTATGACTTTACAACACTCCTACGCCACTTTACCTAGTAAGTATATAACGACCAC

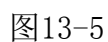
XbaI
GGAATATAAAGGGTATAGCTACTCTAGAAAAAGTTGTGAGTTTCTGAAAACTAAACAAAAGACACCTACCATATGACCCAGGAATTGTACTTCTTG 49C
CCTTATATTTCCCATATCGATGAGATCTTTATCAACAGTCAAAGAACTTTTGTATTGTTTCTGTGGATGGTATACTGGGTCTTAACATGAGGAAC

GGAATTTACCCCAAGGAATAAACTTATGTCCACACAGAACCATACATGATTGTTTACAGCAGCTTTATTTGTTGTAGCCAAAGCTAGAAAGAGCCA 50C
CCTTAAATGGGGTCTTTATTTTGAATACAGGTGTGCTTGGGTATGTAACAAGTGTGTCGAAATAACAACATCGGTTTCGATCTTCTCGGT

ACCCATCCCTCAATAGGCAACTAGCCTAACAAATTTGAATATATCCATGCCATAGAATGCTATGAGGCAATAAAAGGAACGAAGTGTGATACAGAGAA 51C
TGGGTAGGGAGTTATCCGTGATCGGATGTTTAAACATTATATAGGTACGGTATCTTACGATACTCCGTTATTTTCTTGCTTCAAACTATGTCTCTT

CTGGAGTGATTCTGAAGGACTTCTACTGAGTGAAAAAGCCAACTCTGAAAGGGTCACATACCATGTGATTCTTTTATGTAACATTGTTGAAGTGACAA 52C
GACCTCACTAAGACTTCTGAAAGATGACTCACTTTTTTGGTTAGACTTTCAGTGTATGGTACACTAAGGAAATACATTGTAACAACCTCACTGTT

图13-4



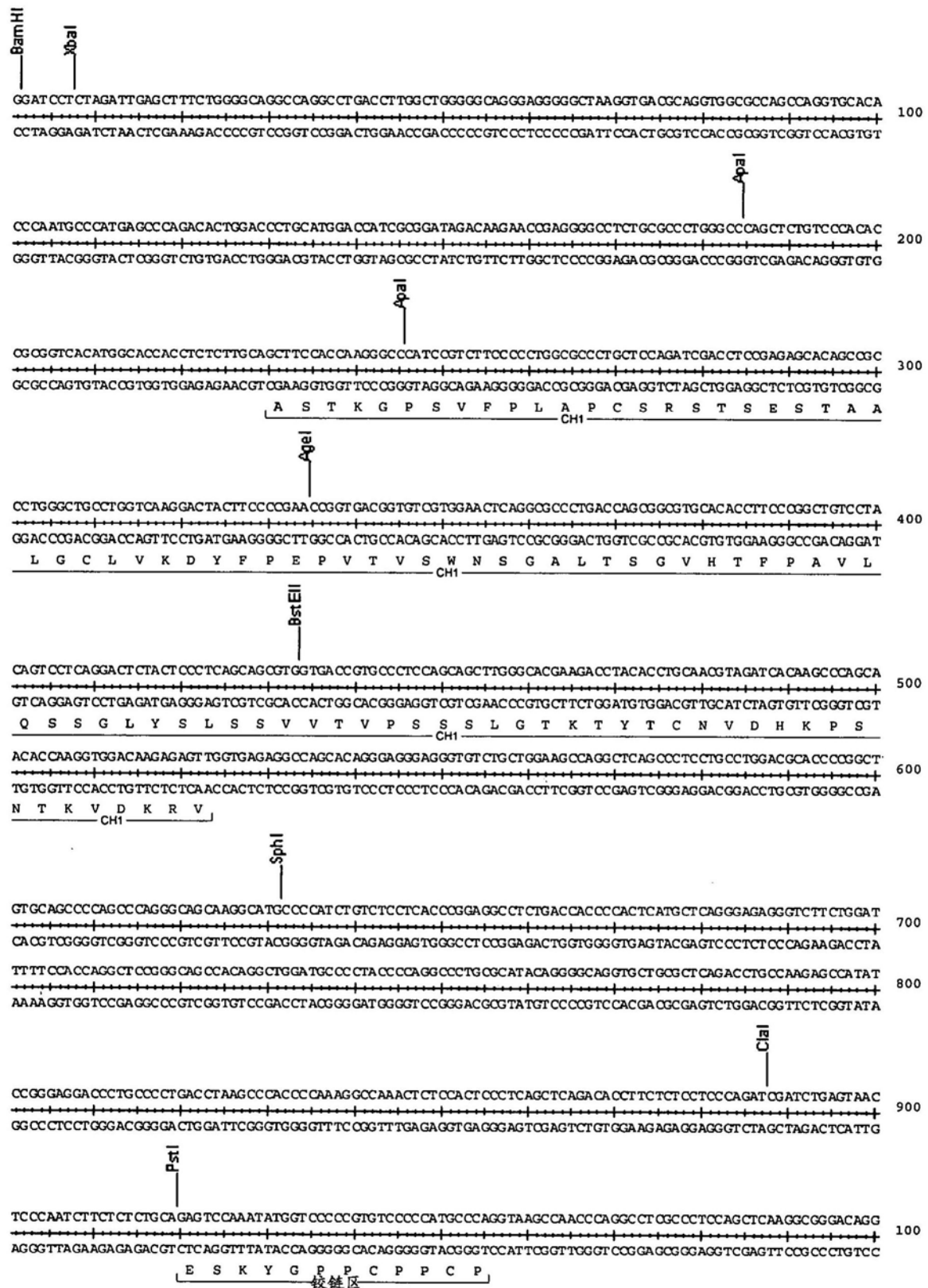
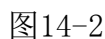


图14-1



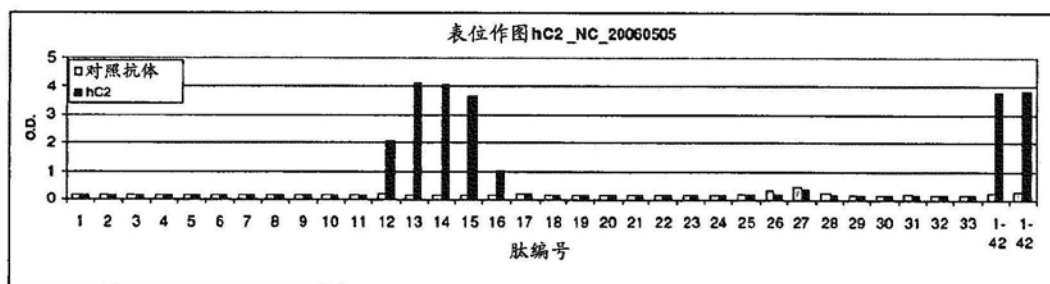


图 A hC2 结合至 A β 1-42 肽文库的肽 12、13、14、15 和 16。
hC2 与 A β 1-42 的重叠肽的结合通过 ELISA 分析。与全长的 A β 1-42 的结合和不结合的嵌合抗体（对照抗体）的结合分别用作阳性对照和阴性对照。肽编号对应于在 A β 1-42 序列中肽起始的氨基酸。

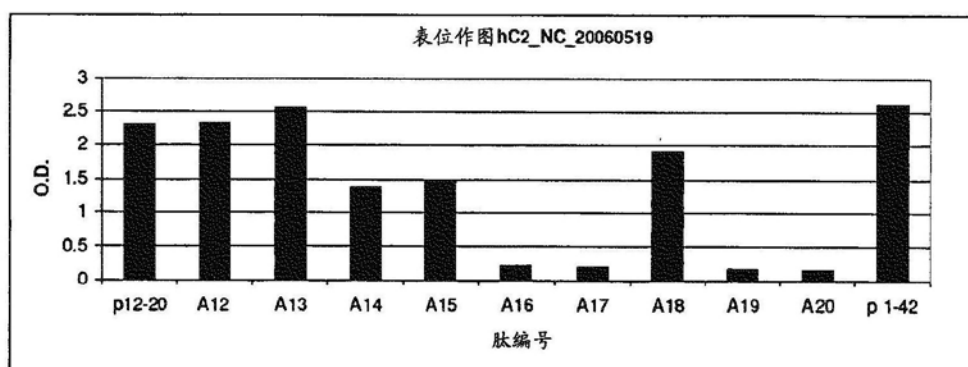


图 B hC2 结合至 A β 12-20 完全取决于第 16、17、19 和 20 位氨基酸，并部分取决于第 14、15 和 18 位氨基酸。
hC2 与 A β 12-20 的结合和与丙氨酸替代的 A β 12-20 的结合通过 ELISA 分析。与全长的 A β 1-42 的结合用作阳性对照。编号对应于被丙氨酸替代的氨基酸。结果表示为 OD。

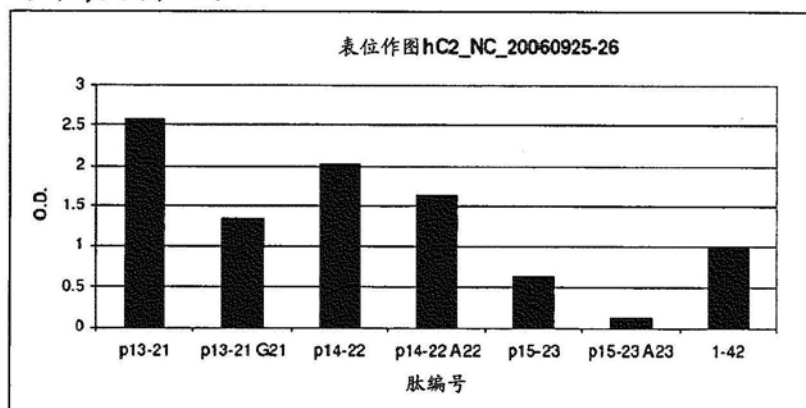


图 C hC2 结合至 A β 13-21 取决于第 23 位氨基酸，并部分取决于第 21 位氨基酸，并轻微取决于第 22 位氨基酸。
hC2 与 A β 13-21、14-22、或 15-23 的结合和与 13-21G21、14-22A22、或 15-23A23 的结合通过 ELISA 分析。与全长的 A β 1-42 的结合用作阳性对照。结果表示为 OD。

图15

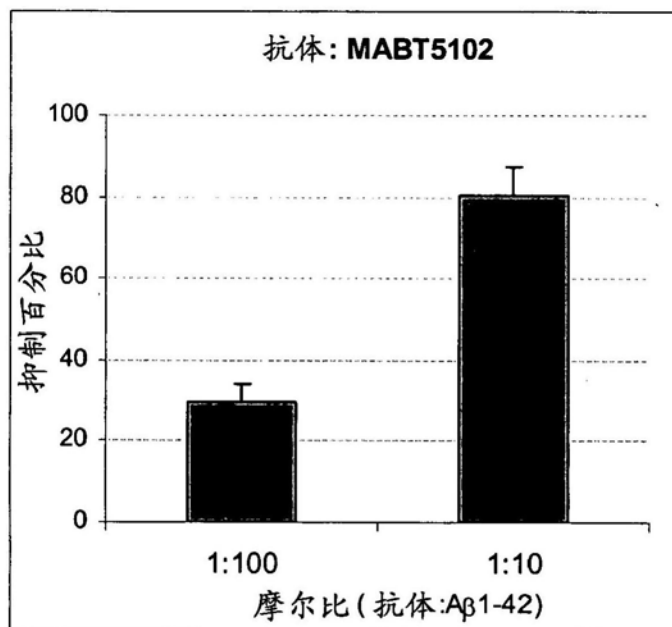


图16

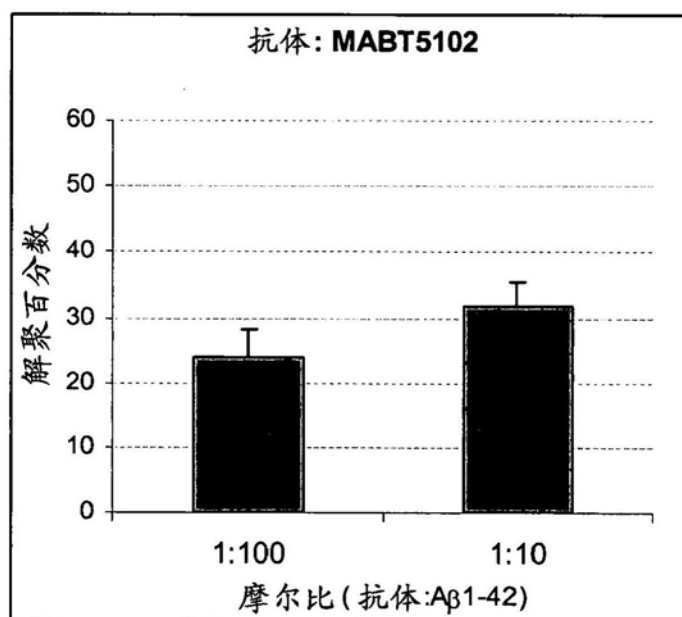


图17

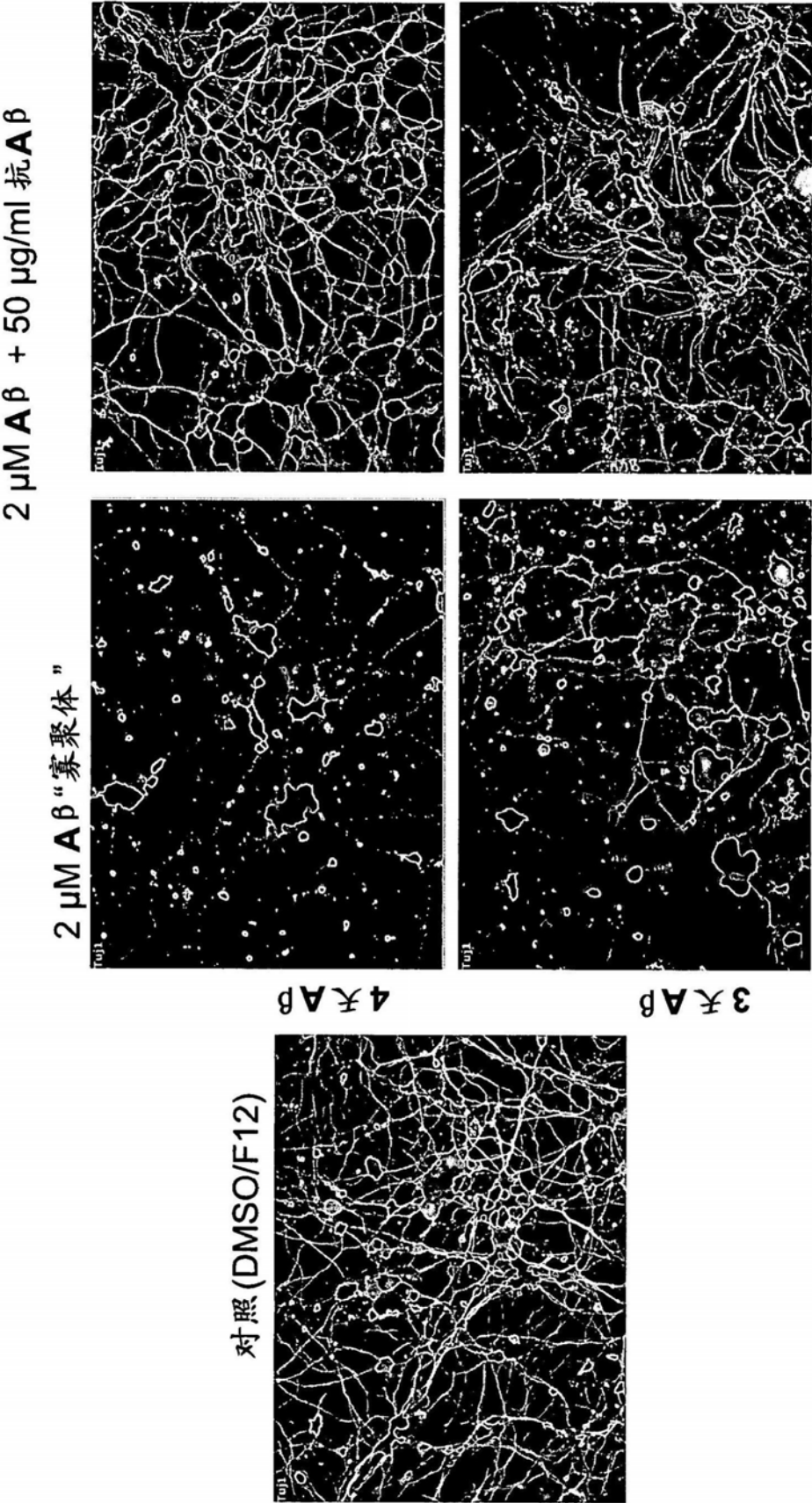


图18