



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109476729 A

(43)申请公布日 2019.03.15

(21)申请号 201780043930.7

(22)申请日 2017.07.18

(30)优先权数据

PCT/CA2016/051303 2016.11.09 CA

62/363,566 2016.07.18 US

62/443,766 2017.01.08 US

62/507,587 2017.05.17 US

62/507,633 2017.05.17 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.01.15

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/CA2017/050866 2017.07.18

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/014126 EN 2018.01.25

(71)申请人 英属哥伦比亚大学

地址 加拿大不列颠哥伦比亚省温哥华

申请人 普罗米斯神经科学公司

(72)发明人 N·R·卡什曼 S·S·普洛特金

J·卡普兰 J·M·西尔弗曼

E·吉布斯

(74)专利代理机构 北京市中伦律师事务所

11410

代理人 杨黎峰 钟锦舜

(51)Int.Cl.

C07K 16/18(2006.01)

A61K 47/68(2006.01)

A61K 49/00(2006.01)

A61K 51/10(2006.01)

C07K 16/46(2006.01)

C12N 15/13(2006.01)

C12N 5/10(2006.01)

C12N 5/16(2006.01)

C12P 21/08(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书5页 说明书46页

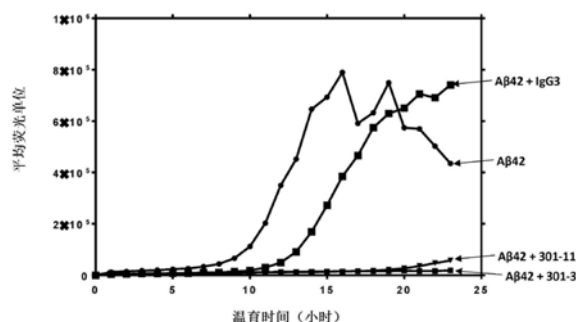
序列表43页 附图1页

(54)发明名称

淀粉样蛋白 β 的抗体

(57)摘要

本公开涉及结合A- β 寡聚体的抗体以及制备和使用所述抗体的方法。



1. 一种分离的抗体,其包含任选地融合的轻链可变区和重链可变区,所述重链可变区包含互补决定区CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述轻链可变区包含互补决定区CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,并且其中所述CDR的氨基酸序列包含以下序列或由其组成:SEQ ID No:1-6;或SEQ ID No:1、2、80和4-6,或SEQ ID No:1、2、80-83。

2. 根据权利要求1所述的抗体,其中,所述CDR的氨基酸序列包括以下序列或由其组成:

CDR-H2 ISDGGSYT (SEQ ID NO:2)

CDR-H3 ARDYYGSSSYTSGFAY (SEQ ID NO:3)

CDR-L1 QSLNLSRTRKNY (SEQ ID NO:4)

CDR-L2 WAS (SEQ ID NO:5)

CDR-L3 KQSYNLYT (SEQ ID NO:6)。

3. 根据权利要求2所述的抗体,其中,所述抗体包含重链可变区,其包含:i) SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列;ii) 与SEQ ID NO:9具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%序列同一性的氨基酸序列,其中所述CDR序列如SEQ ID NO:1、2和3所示,或iii) 保守取代的氨基酸序列i),其中所述CDR序列如SEQ ID NO:1、2和3所示。

4. 根据权利要求2或3所述的抗体,其中,所述抗体包含轻链可变区,其包含:i) SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列,ii) 与SEQ ID NO:11具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%序列同一性的氨基酸序列,其中所述CDR序列如SEQ ID NO:4、5和6中所示,或iii) 保守取代的氨基酸序列i),其中所述CDR序列如SEQ ID NO:4、5和6所示。

5. 根据权利要求2至4中任一项所述的抗体,其中,所述抗体是与包含SEQ ID NO:1-6所示的CDR序列的抗体竞争结合具有SEQ ID NO:12的序列的环肽和/或人A- β 、任选地人A- β 寡聚体、寡聚体的抗体。

6. 根据权利要求1所述的抗体,其中,所述CDR的氨基酸序列包含以下序列或由其组成:

CDR-H1 GFTFSDYY (SEQ ID NO:1)

CDR-H2 ISDGGSYT (SEQ ID NO:2)

CDR-H3 ARDYYGSSNSYTSGFAY (SEQ ID NO:80)

CDR-L1 QSLNLSRTRKNY (SEQ ID NO:4)

CDR-L2 WAS (SEQ ID NO:5)

CDR-L3 KQSYNLYT (SEQ ID NO:6)。

7. 根据权利要求6所述的抗体,其中,所述抗体包含重链可变区,其包含:i) SEQ ID NO:85所示的氨基酸序列;ii) 与SEQ ID NO:85具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%序列同一性的氨基酸序列,其中所述CDR序列如SEQ ID NO:1、2和80所示,或iii) 保守取代的氨基酸序列i),其中所述CDR序列如SEQ ID NO:1、2和80所示。

8. 根据权利要求6或7所述的抗体,其中,所述抗体包含轻链可变区,其包含:i) SEQ ID NO:87所示的氨基酸序列,ii) 与SEQ ID NO:89具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%序列同一性的氨基酸序列,其中所述CDR序列如SEQ ID NO:4、5和6中所示,或iii) 保守取代的氨基酸序列i),其中所述CDR序列如SEQ ID NO:4、5和6所示。

9. 根据权利要求6至8中任一项所述的抗体,其中,所述抗体是与包含SEQ ID NO:1、2、80、4-6所示的CDR序列的抗体竞争结合具有SEQ ID NO:12的序列的环肽和/或人A- β 、任选地人A- β 寡聚体的抗体。

10. 根据权利要求1所述的抗体,其中,所述CDR的氨基酸序列包含以下序列或由其组成:

CDR-H1	GFTFSDYY	(SEQ ID NO:1)
CDR-H2	ISDGGSYT	(SEQ ID NO:2)
CDR-H3	ARDYYGSNSYTSGFAY	(SEQ ID NO:80)
CDR-L1	QSIVHSNGNTY	(SEQ ID NO:81)
CDR-L2	KVS	(SEQ ID NO:82)
CDR-L3	FQGSHVPLT	(SEQ ID NO:83)。

11. 根据权利要求10所述的抗体,其中,所述抗体包含重链可变区,其包含:i) SEQ ID NO:85所示的氨基酸序列;ii) 与SEQ ID NO:85具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%序列同一性的氨基酸序列,其中所述CDR序列如SEQ ID NO:1、2和80所示,或iii) 保守取代的氨基酸序列i),其中所述CDR序列如SEQ ID NO:1、2和80所示。

12. 根据权利要求10或11所述的抗体,其中,所述抗体包含轻链可变区,其包含:i) SEQ ID NO:89所示的氨基酸序列,ii) 与SEQ ID NO:89具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%序列同一性的氨基酸序列,其中所述CDR序列如SEQ ID NO:81、82和83所示,或iii) 保守取代的氨基酸序列i),其中所述CDR序列如SEQ ID NO:81、82和83所示。

13. 根据权利要求10至12中任一项所述的抗体,其中,所述抗体是与包含SEQ ID NO:1、2、80-3所示的CDR序列的抗体竞争结合具有SEQ ID NO:12的序列的环肽和/或人A- β 、任选地人A- β 寡聚体的抗体。

14. 根据权利要求1至13中任一项所述的抗体,其中,所述抗体其中所述抗体选择性结合包含HHQK (SEQ ID NO:7) 的环状化合物而不是相应的线性肽。

15. 根据权利要求1至14中任一项所述的抗体,其中,所述抗体选择性结合A- β 寡聚体而不是A- β 单体和/或A- β 原纤维。

16. 根据权利要求1至15中任一项所述的抗体,其中,所述抗体缺乏或具有可忽略的与A- β 单体和/或A- β 原纤维斑块的原位结合。

17. 根据权利要求1至16中任一项所述的抗体,其中,所述抗体是单克隆抗体。

18. 根据权利要求1至17中任一项所述的抗体,其中,所述抗体是人源化抗体。

19. 根据权利要求1至17中任一项所述的抗体,其中,所述抗体是人抗体。

20. 根据权利要求1至18中任一项所述的抗体,其中,所述抗体是抗体结合片段,其选自Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、dsFv、ds-scFv、二聚体、纳米抗体、微抗体、双抗体和其多聚体。

21. 根据权利要求1所述的抗体,其中,所述同种型是IgG1、IgG2或IgG4。

22. 根据权利要求21所述的抗体,其中,所述同种型是IgG2,任选地IgG2a。

23. 根据权利要求1至22中任一项所述的抗体,其中,所述抗体包含选自表8中所示序列的序列或其部分,其中所述部分包含至少CDR1-3,任选地重链CDR和/或轻链CDR。

24. 根据权利要求23所述的抗体,其中,所述部分是可变结构域核酸序列。

25. 一种人源化抗体,其包含表4A或4B中所示的序列或与其具有至少50%序列同一性的序列,其中CDR氨基酸序列如SEQ ID NO:1-6;SEQ ID No:1、2、80、4-6;SEQ ID No:1、2、80-83或SEQ ID No:74-79所示。

26. 根据权利要求25所述的人源化抗体,其中,所述人源化抗体包含重链可变区,其包

含:i) SEQ ID NO:16、18、20、22、24和26中任一个所示的氨基酸序列;ii) 与SEQ ID NO:16、18、20、22、24和26中任一个具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%序列同一性的氨基酸序列,其中所述CDR序列如SEQ ID NO:1、2和3所示,或iii) 保守取代的氨基酸序列i) 其中所述CDR序列如SEQ ID NO:1、2和3所示。

27. 根据权利要求25或26所述的人源化抗体,其中,所述抗体包含轻链可变区,其包含:i) SEQ ID NO:30、32、34、36、38和40中任一个所示的氨基酸序列,ii) 与SEQ ID NO:30、32、34、36、38和40中任一个具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%序列同一性的氨基酸序列,其中所述CDR序列如SEQ ID NO:4、5和6所示,或iii) 保守取代的氨基酸序列i), 其中所述CDR序列如SEQ ID NO:4、5和6所示。

28. 根据权利要求25至27中任一项所述的人源化抗体,所述重链可变区氨基酸序列由SEQ ID NO:15、17、19、21、23和25中任一个所示的核苷酸序列或其密码子简并或优化形式编码;和/或所述抗体包含由SEQ ID NO:29、31、33、35、37和39中任一个所示的核苷酸序列或其密码子简并或优化形式编码的轻链可变区氨基酸序列。

29. 根据权利要求25所述的人源化抗体,其中,所述抗体包含SEQ ID NO:16和30;SEQ ID NO:18和32;SEQ ID NO:20和34;SEQ ID NO:22和36;SEQ ID NO:24和38;或SEQ ID NO:36和40,或序列与其具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%序列同一性的序列,其中所述CDR维持表2中所示。

30. 根据权利要求25所述的人源化抗体,其中,所述人源化抗体包含重链可变区,其包含:i) SEQ ID NO:44、46、48、50、52和54中任一个所示的氨基酸序列;ii) 与SEQ ID NO:44、46、48、50、52和54中任一个具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%序列同一性的氨基酸序列,其中所述CDR序列是其中下划线显示的序列(SEQ ID NO:74-76也是),或iii) 保守取代的氨基酸序列i), 其中所述CDR序列是其中下划线显示的序列(例如SEQ ID NO:74-76)。

31. 根据权利要求25或30所述的人源化抗体,其中,所述抗体包含轻链可变区,其包含:i) SEQ ID NO:58、60、62、64、66和68中任一个所示的氨基酸序列,ii) 与SEQ ID NO:58、60、62、64、66和68中任一个具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%序列同一性的氨基酸序列,其中所述CDR序列是其中下划线显示的序列(SEQ ID NO:77-79也是),或iii) 保守取代的氨基酸序列i), 其中所述CDR序列是其中下划线显示的序列(SEQ ID NO:77-79也是)。

32. 根据权利要求25、30或31所述的人源化抗体,其中,所述重链可变区氨基酸序列由SEQ ID NO:43、45、47、49、51和53中任一个所示的核苷酸序列或其密码子简并或优化形式编码;和/或所述抗体包含由SEQ ID NO:57、59、61、63、65和67中任一个所示的核苷酸序列或其密码子简并或优化形式编码的轻链可变区氨基酸序列。

33. 根据权利要求25、29、30或31所述的人源化抗体,其中,所述抗体包含SEQ ID NO:44和58;SEQ ID NO:46和60;SEQ ID NO:48和62;SEQ ID NO:50和64;SEQ ID NO:52和66;或SEQ ID NO:54和68,或序列与其具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%序列同一性的序列,其中所述CDR维持其中下划线所示(SEQ ID No:74-79也是)。

34. 根据权利要求25所述的人源化抗体,其中,所述人源化抗体具有如表4A或4B所示的重链可变序列和轻链可变序列。

35. 根据权利要求1至34中任一项所述的人源化抗体,其中,所述抗体是单链抗体。
36. 一种免疫缀合物,其包含根据权利要求1至35中任一项所述的抗体和可检测标记或细胞毒性剂。
37. 根据权利要求36所述的免疫缀合物,其中,所述可检测标记包括发射正电子的放射性核素,其任选地用于受试者成像,例如PET成像。
38. 一种组合物,其包含根据权利要求1至35中任一项所述的抗体,或根据权利要求36或37所述的免疫缀合物,任选地具有稀释剂。
39. 一种核酸分子,其编码根据权利要求1至35中任一项所述的抗体。
40. 一种载体,其包含根据权利要求39所述的核酸。
41. 一种细胞,其表达根据权利要求1至35中任一项所述的抗体,任选地其中所述细胞是包含根据权利要求40所述的载体的杂交瘤。
42. 一种试剂盒,其包含根据权利要求1至35中任一项所述的抗体、根据权利要求39所述的核酸分子、根据权利要求40所述的载体或根据权利要求41所述的细胞。
43. 一种制备根据权利要求1所述的抗体的方法,其包括将具有SEQ ID NO:12的A- β 序列的环肽或包含所述环肽的组合物施用于受试者,例如非人哺乳动物,以及分离抗体和/或表达抗体的细胞,所述抗体具有CDR或与包含选自表2中SEQ ID No的CDR或由其组成的抗体竞争。
44. 一种确定生物样品是否包含A- β 的方法,所述方法包括:
- a. 使所述生物样品与根据权利要求1至35中任一项所述的抗体或根据权利要求36或37所述的免疫缀合物接触;以及
- b. 检测任何抗体复合物的存在。
45. 根据权利要求44所述的方法,其用于确定所述生物样品是否含有A- β 寡聚体,所述方法包括:
- a. 使所述样品与根据权利要求1至35中任一项所述的抗体或根据权利要求36或37所述的免疫缀合物接触,所述抗体或免疫缀合物在允许形成抗体:A- β 寡聚体复合物的条件下对A- β 寡聚体具有特异性和/或选择性;以及
- b. 检测任何复合物的存在;
- 其中可检测的复合物的存在表明所述样品可能含有A- β 寡聚体。
46. 根据权利要求45的方法,其中,测量所述复合物的量。
47. 根据权利要求44至46中任一项所述的方法,其中,所述样品包含脑组织或其提取物、全血、血浆、血清和/或CSF。
48. 根据权利要求44至47中任一项所述的方法,其中,将所述样品与对照、任选地先前样品进行比较。
49. 一种测量受试者中A- β 水平的方法,所述方法包括向有风险或怀疑患有或患有AD的受试者施用根据权利要求36或37所述的包含抗体的免疫缀合物,其中所述抗体与可检测标记缀合;以及检测所述标记,任选地定量检测所述标记。
50. 根据权利要求49所述的方法,其中,所述标记是发射正电子的放射性核素。
51. 一种抑制A- β 寡聚体增殖的方法,所述方法包括使表达A- β 的细胞或组织与有效量的根据权利要求1至37中任一项所述的A- β 寡聚体特异性或选择性抗体或免疫缀合物接触

或将其施用于有需要的受试者,以抑制A- β 聚集和/或寡聚体增殖。

52. 一种治疗AD和/或其它A- β 淀粉样蛋白相关疾病的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用1) 有效量的根据权利要求1至37中任一项所述的抗体或免疫缀合物,或包含所述抗体的药物组合物;向有需要的受试者施用2) 包含编码所述抗体的核酸或包含所述核酸的载体。

53. 根据权利要求52所述的方法,其中,使用本文所述的抗体评估来自待治疗的受试者的生物样品的A- β 的存在或水平。

54. 根据权利要求51至53中任一项所述的方法,其中,将所述抗体、免疫缀合物、组合物或核酸或载体直接施用于脑或CNS的其它部分。

55. 根据权利要求51至54中任一项所述的方法,其中,所述组合物是药物组合物,其包含抗体或免疫缀合物与药学上可接受的稀释剂或载体的混合物。

56. 一种杂交瘤细胞或细胞系,其表达根据权利要求1-16中任一项所述的抗体或表达与包含选自表2中CDR的CDR或由其组成的抗体竞争的抗体。

淀粉样蛋白 β 的抗体

[0001] 同族详述

[0002] 该国际PCT申请要求于2016年7月18日提交的美国临时申请序列号62/363566, 2016年11月9日提交的国际申请PCT/CA2016/051303, 2017年5月17日提交的美国临时序列号62/507587和2017年5月17日提交的美国临时序列号62/507633的优先权, 其各自通过引用整体并入本文。

技术领域

[0003] 公开涉及对淀粉样蛋白 β (A- β 或A β) 寡聚体具有选择性的抗体以及其组合物和用途。

背景技术

[0004] 淀粉样蛋白- β (A- β) 作为36-43个氨基酸的肽存在, 是通过 β 和 γ 分泌酶从淀粉样蛋白前体蛋白 (APP) 释放的产物。在AD患者中, A- β 可存在于可溶性单体、不溶性原纤维和可溶性寡聚体中。在单体形式中, A- β 作为主要是非结构化的多肽链存在。在原纤维形式中, A- β 可聚集成不同的形态, 通常称为品系。这些结构中的一些已经通过固态NMR确定。

[0005] 例如, 几种原纤维品系的结构可在蛋白质数据库 (PDB) 中获得, PDB是原子分辨率三维结构数据的晶体学数据库, 包括3重对称A β 结构 (PDB入口, 2M4J); A β -40单体的双重对称结构 (PDB入口2LMN), 以及A β -42单体的单链平行对位结构 (PDB入口2MXU)。

[0006] Lu等人[8]报道了2M4J的结构, Xiao等人[9]报道了2MXU的结构。Petkova等人[10]报道了2LMN的结构。

[0007] 已显示A- β 寡聚体杀死培养物中的细胞系和神经元并阻断在切片培养物和活动物中促进记忆的关键突触活性, 称为长期增强 (LTP)。

[0008] 迄今尚未确定寡聚体的结构。此外, NMR和其它证据表明, 寡聚体不是存在于单个明确定义的结构中, 而是存在于具有有限规律性的构象-塑性可延展的结构集合中。此外, 有毒寡聚体种类的浓度远低于单体或原纤维的浓度 (估计值各不相同, 但大约低于或多于1000倍), 使得该目标难以实现。

[0009] 已经描述了结合A- β 的抗体。

[0010] 标题为抗淀粉样蛋白抗体在眼部疾病中的用途的W02009048538A2公开了嵌合抗体, 其识别A- β 上的一个或多个结合位点并且可用于治疗眼部疾病。

[0011] 标题为用于治疗与淀粉样蛋白或类淀粉样蛋白相关的疾病的化合物的US9221812B2描述了结合A- β 的药物组合物和不连续抗体, 其包括氨基酸残基12至24之间的表位, 用于治疗淀粉样蛋白相关疾病。

[0012] 标题为抗淀粉样蛋白 β 抗体及其用途的W02003070760A2公开了识别A- β 不连续表位的抗体, 其中第一区域包含氨基酸序列AEFRHDSGY或其片段, 并且其中第二区域包含氨基酸序列VHHQKL VFFAEDVG或其片段。

[0013] 标题为治疗淀粉样变性的化合物的US20110171243A1公开了能够诱导体内形成结

合HQKLVF和/或HQKLVFFAED的抗体的肽模拟表位及其用途。

[0014] W02008088983A1和W02001062801A2公开了结合A- β 氨基酸13-28的聚乙二醇化抗体片段及其在治疗A- β 相关疾病中的用途。Solanezumab和Crenezumab结合A- β 上的氨基酸16-26。Crenezumab与单体、寡聚体和原纤维相互作用。Midregion抗体包括solanezumab(皮摩尔亲和力)和crenezumab(纳摩尔亲和力),似乎优先结合单体A- β [13]。

[0015] 标题为用于治疗与帕金森氏病相关的症状的化合物的W02009149487A2描述了包含对具有特异于A- β 表位例如EVHHQKL, HQKLVF和HQKLVFFAED的抗体具有结合能力的肽的化合物。

[0016] 如Giulian D等人[11]和Winkler等人[12]所述,描述了HHQK (SEQ ID NO:7) 结构域涉及人小胶质细胞中神经毒性的斑块诱导。已经公开了结合HHQK (SEQ ID NO:7) 的非抗体治疗剂用于治疗蛋白质折叠疾病 (US20150105344A1, W02006125324A1)。

[0017] 美国专利5,766,846;5837672和5,593,846 (其通过引用并入本文) 描述了针对A β 肽中心结构域的鼠单克隆抗体的产生。W001/62801描述了在氨基酸13-28之间结合A- β 的抗体。W02004071408公开了人源化抗体。

[0018] 标题为治疗和预防淀粉样变性的W02009086539A2涉及淀粉样变性和淀粉样蛋白轻链淀粉样变性,通过施用包含新表位的肽,例如来自AA的C末端区域的淀粉样蛋白A (AA) 片段,以及对聚集的淀粉样蛋白的新表位特异的抗体,例如,对AA原纤维的C末端区域特异的抗体。

[0019] 标题为抗淀粉样 β 抗体及其用途的W02003070760涉及能够特异性识别R-A4肽的两个区域的抗体分子,其中第一区域包含氨基酸序列AEFRHDSGY或其片段,并且其中第二区域包含氨基酸序列VHHAEDVFFAEDVG或其片段。

[0020] 标题为用于改善认知的人源化淀粉样抗体的W02006066089涉及用于治疗与 β 淀粉样蛋白相关的疾病的改进的药剂和方法,特别是用于鉴定和表征特异性结合A β 肽并且有效减少与淀粉样蛋白形成疾病 (例如AD) 相关的斑块负荷的单克隆抗体12A11。

[0021] 标题为可变区糖基化的针对淀粉样蛋白4的抗体的W02007068429涉及纯化的抗体分子制剂,其特征在于至少一个抗原结合位点包含重链(V_H) 可变区中的糖基化天冬酰胺(Asn)。

[0022] W003/016466涉及经改造以在重链的CDR2内缺乏N-糖基化位点的变体266抗体,其药物组合物,以及用于表达变体抗体的多核苷酸序列、载体和转化细胞。描述了变体以从人生物流体中螯合可溶性A- β 肽并特异性结合淀粉样蛋白 β 肽的位置13-28内包含的表位。

[0023] Yu等人描述了与PADRE或源自毒素的载体蛋白融合的六价可折叠A β 1-15 (6A β 15)。Wang等人2016年报道了这种抗体的外周施用减轻阿尔茨海默病类病理学和老年阿尔茨海默病转基因动物的认知衰退[14], [15]。

[0024] 优选或选择性地单体上或在原纤维上或在单体和原纤维上结合A- β 寡聚体的抗体是期望的。

发明内容

[0025] 一个方面包括分离的抗体,其包含任选地融合的轻链可变区和重链可变区,所述重链可变区包含互补决定区CDR-H1, CDR-H2和CDR-H3,所述轻链可变区包含互补决定区

CDR-L1, CDR-L2和CDR-L3, 并且其中所述CDR的氨基酸序列包含序列SEQ ID No:1-6; 或SEQ ID No:1、2、80和4-6, 或SEQ ID No:1、2、80-83, 或由其组成, 例如表2中所示。

[0026] 在一个实施方式中, 分离的抗体是构象特异性和/或选择性的。

[0027] 在一个实施方式中, 本文所述的抗体, 任选地具有包含SEQ ID No:1-6或SEQ ID No:1、2、80和4-6或SEQ ID No:1、2、80-83, 或由其组成的CDR的抗体, 相比于相应的线性肽选择性结合包含HHQK (SEQ ID NO:7) 的环状化合物, 任选地其中抗体对环状化合物的选择性相比于相应的线性化合物高至少2倍, 3倍, 至少5倍, 至少10倍, 至少20倍, 至少30倍, 至少40倍, 至少50倍, 至少100倍, 至少500倍, 至少1000倍。

[0028] 在另一个实施方式中, 本文所述的抗体, 任选地具有包含SEQ ID No:1-6或SEQ ID No:1、2、80和4-6或SEQ ID No:1、2、80-83, 或由其组成的CDR的抗体, 选择性结合不特异性和/或选择性结合包含序列HHQK (SEQ ID NO:7) 的线性肽, 任选地其中线性肽的序列是用于产生抗体的环状化合物的线性形式。

[0029] 在另一个实施方式中, 具有表2中列出的CDR组的抗体选择性结合A- β 寡聚体而不是A- β 单体和/或A- β 原纤维。

[0030] 在另一个实施方式中, 选择性为对A- β 寡聚体的选择性相比于A- β 单体和/或A- β 原纤维高至少2倍, 至少3倍, 至少5倍, 至少10倍, 至少20倍, 至少30倍, 至少40倍, 至少50倍, 至少100倍, 至少500倍, 至少1000倍。

[0031] 在另一个实施方式中, 抗体缺乏或具有可忽略的与A- β 原纤维斑块的原位结合。

[0032] 在另一个实施方式中, 抗体是单克隆抗体或多克隆抗体。

[0033] 在另一个实施方式中, 具有包含SEQ ID No:1-6或SEQ ID No:1、2、80和4-6或SEQ ID No:1、2、80-83, 或由其组成的CDR的抗体是人源化抗体。在一个实施方式中, 人源化抗体具有重链可变区, 其具有选自表4A中序列的序列和/或轻链可变区, 其具有选自表4A中序列的序列。

[0034] 另一方面, 提供了表达包含表2中所述的CDR的抗体的杂交瘤。

[0035] 另一方面是人源化抗体, 其中人源化抗体具有重链可变区, 其具有选自表4B中序列的序列和/或轻链可变区, 其具有选自表4B中序列的序列。

[0036] 在一个实施方式中, 人源化抗体相对于相同序列的线性肽选择性或特异性结合具有SEQ ID NO:12序列的环肽, 或相对于A- β 单体或A- β 原纤维选择性或特异性结合寡聚A β 。

[0037] 在另一个实施方式中, 抗体是本文所述抗体的抗体结合片段, 其选自Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, dsFv, ds-scFv, 二聚体, 纳米抗体, 微抗体, 双抗体和其多聚体。

[0038] 一个方面包括免疫缀合物, 其包含本文所述的抗体和可检测标记或细胞毒性剂。

[0039] 在一个实施方式中, 可检测标记包含发射正电子的放射性核素, 任选地用于受试者成像, 例如PET成像。

[0040] 一个方面包括组合物, 其包含本文所述的抗体, 或本文所述的免疫缀合物, 任选地具有稀释剂。

[0041] 一个方面包括核酸分子, 其编码本文所述的化合物或免疫原的蛋白质部分, 本文所述的抗体或本文所述的蛋白质免疫缀合物。

[0042] 一个方面包括载体, 其包含本文所述的核酸。

[0043] 一个方面包括细胞, 其表达本文所述的抗体, 任选地其中所述细胞是包含本文所

述的载体的杂交瘤。

[0044] 一个方面包括试剂盒,其包含本文所述的抗体,本文所述的免疫缀合物,本文所述的组合物,本文所述的核酸分子,本文所述的载体或本文所述的细胞。

[0045] 一个方面包括确定生物样品是否包含A- β 的方法,所述方法包括:

[0046] a.使生物样品与本文所述的抗体或本文所述的免疫缀合物接触;以及

[0047] b.检测任何抗体复合物的存在。

[0048] 在一个实施方式中,所述生物样品含有A- β 寡聚体,所述方法包括:

[0049] a.使样品与本文所述的抗体或本文所述的免疫缀合物接触,所述抗体或免疫缀合物在允许形成抗体:A- β 寡聚体复合物的条件下对A- β 寡聚体具有特异性和/或选择性;以及

[0050] b.检测任何复合物的存在;

[0051] 其中可检测的复合物的存在表明样品可能含有A- β 寡聚体。

[0052] 在另一个实施方式中,测量复合物的量。

[0053] 在另一个实施方式中,样品包含脑组织或其提取物,全血,血浆,血清和/或CSF。

[0054] 在另一个实施方式中,样品是人样品。

[0055] 在另一个实施方式中,将样品与对照,任选地先前样品进行比较。

[0056] 在另一个实施方式中,通过分析测定法检测A- β 的水平,所述分析测定法包括但不限于SPR,Kinexa,Mesoscale,ELISA,Singulex,Luminex和Simoa。

[0057] 一个方面包括测量受试者中A- β 水平的方法,所述方法包括向有风险或怀疑患有或患有AD的受试者施用包含本文所述抗体的免疫缀合物,其中所述抗体与可检测标记缀合;以及检测标记,任选地定量检测标记。

[0058] 在一个实施方式中,标记是发射正电子的放射性核素。

[0059] 一个方面包括抑制A- β 寡聚体增殖的方法,所述方法包括使表达A- β 的细胞或组织与有效量的本文所述的A- β 寡聚体特异性或选择性抗体或免疫缀合物接触或将其施用于有需要的受试者,以抑制A- β 聚集和/或寡聚体增殖。

[0060] 一个方面包括治疗AD和/或其它A- β 淀粉样蛋白相关疾病的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用1)有效量的本文所述的抗体或免疫缀合物,或包含所述抗体的药物组合物;向有需要的受试者施用2)包含编码1的抗体的核酸或包含所述核酸的载体。

[0061] 在一个实施方式中,使用本文所述的抗体评估来自待治疗的受试者的生物样品的A- β 的存在或水平。

[0062] 在另一个实施方式中,将抗体,免疫缀合物,组合物或核酸或载体直接施用于脑或CNS的其它部分。

[0063] 根据以下详细描述,本公开的其它特征和优点将变得显而易见。然而,应该理解的是,在指示本公开的优选实施方式的同时的详细描述和具体示例仅以说明的方式给出,因为在本公开的精神和范围内的各种改变和修改对于该详细描述的本领域技术人员将变得显而易见。

附图说明

[0064] 现在将结合附图描述本公开的实施方式,其中:

[0065] 图1图表报告了抗体对体外A- β 寡聚体增殖的影响。

具体实施方式

[0066] 本文提供了包含具有如表2中所示序列,和/或具有表3、4A和4B中任一个中提供的可变区序列和/或表8中序列的CDR的抗体,其免疫治疗组合物和使用其的方法。所述抗体可以靶向优先在A- β 的毒性寡聚种类中可获得的表位,包括与阿尔茨海默氏病(AD)相关的寡聚种类。

[0067] 如实施例所示,与相同序列的线性肽相比,使用包含HHQK (SEQ ID NO:7)的环肽产生的抗体优先结合寡聚A β 和/或选择性结合环肽(例如相应的线性序列)。描述实验结果并鉴定表位特异性和构象选择性抗体,其与合成单体相比选择性结合合成寡聚体,相比于对照CSF优先结合来自AD患者的CSF和/或相比于对照可溶性脑提取物优先结合来自AD患者的可溶性脑提取物。AD脑组织的进一步染色鉴定出显示没有或可忽略的斑块结合的抗体,并且体外研究发现抗体抑制A β 寡聚体的增殖和聚集。

[0068] I. 定义

[0069] 如本文所用,术语“A- β ”可以替代地称为“淀粉样蛋白beta”,“淀粉样蛋白 β ”,A-beta,A- β 或“A β ”。淀粉样蛋白 β 是36-43个氨基酸的肽,包括所有种类的所有野生型和突变体形式,特别是人A- β 。A- β 40指40个氨基酸形式;A- β 42指42个氨基酸形式等。人野生型A- β 42的氨基酸序列示于SEQ ID NO:73。

[0070] 如本文所用,术语“A- β 单体”在本文中是指A- β (例如1-40,1-42,1-43)肽的任何单个亚基形式。

[0071] 如本文所用,术语“A- β 寡聚体”在本文中是指多个任何A- β 亚基,其中几个(例如至少两个)A- β 单体以小于约100,或更通常小于约50个单体的构象柔性部分有序的三维小球非共价聚集。例如,寡聚体可含有3或4或5个或更多个单体。如本文所用的术语“A- β 寡聚体”包括合成A- β 寡聚体和/或天然A- β 寡聚体两者。“天然A- β 寡聚体”是指体内形成的A- β 寡聚体,例如在患有AD的受试者的脑和CSF中。

[0072] 如本文所用,术语“A- β 原纤维”是指包含非共价结合的单个A- β 肽的组装体的分子结构,其在电子显微镜下显示纤维结构。原纤维结构通常是“交叉 β ”结构;对于多聚体的大小没有理论上限,并且原纤维可包含上千或数千个单体。原纤维可累积数千个以形成老年斑,这是诊断AD的主要病理形态之一。

[0073] 术语“HHQK”是指氨基酸序列组氨酸,组氨酸,谷氨酰胺,赖氨酸,如SEQ ID NO:7所示。根据上下文,氨基酸序列的参考可以指A- β 或分离的肽中的序列,例如环状化合物的氨基酸序列。

[0074] 术语“氨基酸”包括所有天然存在的氨基酸以及修饰的L-氨基酸。氨基酸的原子可包括不同的同位素。例如,氨基酸可以包含取代氢的氘,取代氮-14的氮-15和取代碳-12的碳-13和其它类似变化。

[0075] 如本文所用的术语“抗体”旨在包括单克隆抗体,多克隆抗体,单链、饰面、人源化和其它嵌合抗体及其结合片段,包括例如单链Fab片段,Fab'2片段或单链Fv片段。抗体可以来自重组来源和/或在动物如兔,美洲驼,鲨鱼等中产生。还包括可以在转基因动物中或使用生物化学技术产生的人抗体,或者可以从诸如噬菌体文库的文库中分离。人源化或其它嵌合抗体可包括来自一种或多于一种同种型或类别或种类的序列。

[0076] 短语“分离的抗体”是指从产生抗体的来源,例如动物,杂交瘤或其它细胞系(例如

产生抗体的重组昆虫,酵母或细菌细胞)中已除去的体内或体外产生的抗体。分离的抗体任选地“纯化”,这意味着至少:80%,85%,90%,95%,98%或99%纯度。

[0077] 本文所用的术语“结合片段”是抗体或抗体链的一部分或部分,其包含比完整或完全抗体或抗体链更少的氨基酸残基,并且结合抗原或与完整抗体竞争。示例性结合片段包括但不限于Fab,Fab',F(ab')₂,scFv,dsFv,ds-scFv,二聚体,纳米抗体,微抗体,双抗体及其多聚体。片段可以通过化学或酶处理完整或完全抗体或抗体链获得。片段也可以通过重组方法获得。例如,通过用胃蛋白酶处理抗体可以产生F(ab')₂片段。可以处理所得的F(ab')₂片段以还原二硫键以产生Fab'片段。木瓜蛋白酶消化可导致Fab片段的形成。Fab,Fab'和F(ab')₂,scFv,dsFv,ds-scFv,二聚体,微抗体,双抗体,双特异性抗体片段和其它片段也可以通过重组表达技术构建。

[0078] 本领域公认的术语“IMGT编号”或“ImMunoGeneTics数据库编号”是指编码氨基酸残基的系统,所述残基比抗体的重和轻链可变区或其抗原结合部分中的其它氨基酸残基更可变(即高变)。

[0079] 如本文所用,术语“构象表位”是指表位,其中表位氨基酸序列具有特定的三维结构,其中三维结构的至少一个方面不存在或不太可能存在于另一种形式,例如相应的线性肽或AB单体,并且被同源抗体特异性和/或选择性识别。特异性结合构象特异性表位的抗体识别该构象特异性表位的一个或多个氨基酸的空间排列。例如,HHQK (SEQ ID NO:7) 构象表位是指HHQK (SEQ ID NO:7) 的表位,其被抗体选择性识别,例如与使用线性HHQK (SEQ ID NO:7) 产生的抗体相比,选择性增加至少2倍,3倍,5倍,10倍,50倍,100倍,250倍,500倍或1000倍或更高。当抗体被称为选择性结合诸如构象表位的表位例如HHQK (SEQ ID NO:7) 时,意思是抗体优先结合含有特定残基或其部分的一种或多种特定构象,比在另一种构象中结合所述残基具有更大的亲和力。例如,当抗体被称为相对于相应的线性肽选择性结合包含HHQK或相关表位的环肽时,抗体与环肽结合的亲和力比其结合线性肽高至少2倍。类似地,当抗体被称为选择性结合寡聚AB时,抗体与寡聚种类结合的亲和力比结合AB单体和/或斑块原纤维高至少2倍。

[0080] 本文关于抗体使用的术语“没有或可忽略的斑块结合”或“缺乏或具有可忽略的斑块结合”意指抗体在免疫组织化学上不显示典型的斑块形态学染色(例如原位,任选地与用AB抗体6E10看到的斑块染色相比),并且染色水平与用IgG阴性(例如不相关)同种型对照看到的水平相当或不超过2倍。

[0081] 术语“分离的肽”是指例如已通过重组或合成技术产生,并且从产生肽的来源(例如重组细胞或残余肽合成反应物)中除去的肽。任选地“纯化”分离的肽,这意味着至少:80%,85%,90%,95%,98%或99%纯度和任选的药物级纯度。

[0082] 如本文所用的术语“可检测标记”是指可以附加或引入本文所述的肽或化合物中的诸如肽序列(例如myc标签,HA标签,V5标签或NE标签)、荧光蛋白的部分,其能够直接或间接产生可检测的信号。例如,标签可以是不透射线的,发射正电子的放射性核素(例如用于PET成像),或放射性同位素,例如³H,¹³N,¹⁴C,¹⁸F,³²P,³⁵S,¹²³I,¹²⁵I,¹³¹I;荧光(荧光团)或化学发光(发色团)化合物,如异硫氰酸荧光素,罗丹明或荧光素;酶,如碱性磷酸酶,β-半乳糖苷酶或辣根过氧化物酶;成像剂;或金属离子。可检测标记也可以间接检测,例如使用二抗。

[0083] 如本文所用的术语“表位”是指被抗体特异性识别的抗原中的抗体结合位点,通常

是多肽片段。如本文所用,“表位”还可以指使用所描述的集体坐标方法在A-β上鉴定的氨基酸序列或其部分。例如,针对对应于包含鉴定的靶区域HHQK SEQ ID NO:7)的环状化合物的分离的肽产生的抗体识别所述表位序列的部分或全部。当可以被抗原结合时,表位在本说明书的上下文中是“可接近的”。

[0084] 如本文所用的术语“更大的亲和力”是指抗体结合的相对程度,其中相比于靶标Z,抗体X与靶标Y更强地结合(K_{on})和/或具有更小的解离常数(K_{off}),并且在这种情况下,抗体X对靶标Y的亲和力比对Z大。同样,术语“更小的亲和力”在本文中是指抗体结合程度,其中抗体X与靶标Y的结合强度较低和/或具有较大的解离常数。在此背景下,抗体X对靶Y的亲和力小于对Z的亲和力。抗体与其靶抗原之间结合的亲和力可表示为 K_A 等于 $1/K_D$,其中 K_D 等于 k_{on}/k_{off} 。 k_{on} 和 k_{off} 值可以使用表面等离子共振技术测量,例如使用分子亲和筛选系统(MASS-1)(Sierra Sensors GmbH,Hamburg,Germany)。对环状化合物中存在的构象具有选择性的抗体,任选的环肽,与线性形式的相应序列(例如非环化序列)相比,对环状化合物(例如环肽)具有更大的亲和力。

[0085] 关于环状化合物的术语“相应的线性化合物”是指化合物,任选地肽,其包含与环状化合物相同的序列或化学部分或由其组成,但是呈线性(即非环化)形式,例如具有在线性肽溶液中存在的性质。例如,相应的线性化合物可以是未环化的合成肽。

[0086] 如本文所用,关于抗体的“特异性结合”是指抗体识别表位序列并以最小亲和力结合其靶抗原。例如,多价抗体以至少 $1e-6$,至少 $1e-7$,至少 $1e-8$,至少 $1e-9$ 或至少 $1e-10$ 的 K_D 结合其靶标。大于至少 $1e-8$ 的亲和力可能是优选的。例如, K_D 可以在纳摩尔范围或皮摩尔范围内。抗原结合片段(例如包含一个可变结构域的Fab片段)可以比其与非片段化抗体的多价相互作用的亲和力低10倍或100倍结合其靶标。

[0087] 如本文所用,术语“选择性结合”是关于选择性结合A-β形式(例如原纤维,单体或寡聚体)的抗体或环状化合物意指抗体以至少2倍,至少3倍,或至少5倍,至少10倍,至少100倍,至少250倍,至少500倍或至少1000倍或更大的亲和力结合该形式。因此,与另一种形式和/或线性肽相比,对特定构象(例如寡聚体)更具选择性的抗体优先结合特定形式的A-β,具有至少2倍等更大的亲和力。

[0088] 本文使用的术语“动物”或“受试者”包括动物界的所有成员,包括哺乳动物,任选地包括或排除人。

[0089] 本文所用的“保守氨基酸取代”是其中一个氨基酸残基被另一个氨基酸残基取代而不消除蛋白质所需特性的氨基酸取代。合适的保守氨基酸取代可以通过将具有相似疏水性,极性和R-链长度的氨基酸彼此取代来进行。保守氨基酸取代的示例包括:

[0090]	保守取代	
	<u>氨基酸的类型</u>	<u>可取代的氨基酸</u>
	亲水性	Ala, Pro, Gly, Glu, Asp, Gln, Asn, Ser, Thr
	巯基	Cys
	脂肪族	Val, Ile, Leu, Met
	碱性	Lys, Arg, His
	芳香族	Phe, Tyr, Trp

[0091] 如本文所用的术语“序列同一性”是指两个多肽序列或两个核酸序列之间的序列同一性的百分比。为了确定两个氨基酸序列或两个核酸序列的百分比同一性，将序列进行比对以用于最佳比较目的（例如可以在第一氨基酸或核酸序列的序列中引入空位以与第二氨基酸或核酸序列最佳比对）。然后比较相应氨基酸位置或核苷酸位置的氨基酸残基或核苷酸。当第一序列中的位置被与第二序列中的相应位置相同的氨基酸残基或核苷酸占据时，则该分子在该位置是相同的。两个序列之间的百分比同一性是序列共有的相同位置数的函数（即%同一性=相同重叠位置的数量/位置总数×100%）。在一个实施方式中，两个序列长度相同。也可以使用数学算法来确定两个序列之间的百分比同一性。用于比较两个序列的数学算法的优选的非限制性实例是Karlin和Altschul, 1990, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.87:2264-2268的算法，在Karlin和Altschul, 1993, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.90:5873-5877中改进。这种算法被并入Altschul等人, 1990, J.Mol.Biol.215:403的NBLAST和XBLAST程序中。可以用NBLAST核苷酸程序参数集进行BLAST核苷酸搜索，例如得分=100，字长=12，以获得与本申请的核酸分子同源的核苷酸序列。可以用XBLAST程序参数集进行BLAST蛋白质搜索，例如得分=50，字长=3，以获得与本文所述蛋白质分子同源的氨基酸序列。为了获得用于比较目的的空位比对，可以如Altschul等人, 1997, Nucleic Acids Res.25:3389-3402中所述使用空位BLAST。或者，PSI-BLAST可用于执行迭代搜索，其检测分子之间的远距离关系(Id.)。当使用BLAST，空位BLAST和PSI-Blast程序时，可以使用各个程序（例如XBLAST和NBLAST）的默认参数（参见例如NCBI网站）。用于比较序列的数学算法的另一个优选的非限制性实例是Myers和Miller, 1988, CABIOS 4:11-17的算法。这种算法包含在ALIGN程序（版本2.0）中，该程序是GCG序列比对软件包的一部分。当利用ALIGN程序比较氨基酸序列时，可以使用PAM120重量残基表，空位长度罚分为12，空位罚分为4。两个序列之间的同一性百分比可以使用与上述类似的技术在允许或不允许空位的情况下确定。在计算百分比同一性时，通常仅计算完全匹配。

[0092] 对于抗体，当通过IMGT或其它（例如Kabat编号惯例）最大比对抗体序列时，可以确定百分比序列同一性。比对后，如果将受试者抗体区域（例如重链或轻链的整个成熟可变区）与参考抗体的相同区域进行比较，则受试者和参照抗体区域之间的序列同一性百分比

是在受试者和参考抗体区域中由相同氨基酸占据的位置除以两个区域的比对位置的总数(未计数空位),乘以100以转换成百分比。

[0093] 如本文所用的术语“核酸序列”是指由天然存在的碱基,糖和糖间(骨架)键组成的核苷或核苷酸单体的序列。该术语还包括含有非天然存在的单体或其部分的修饰或取代的序列。本申请的核酸序列可以是脱氧核糖核酸序列(DNA)或核糖核酸序列(RNA),并且可以包括天然存在的碱基,包括腺嘌呤,鸟嘌呤,胞嘧啶,胸苷和尿嘧啶。序列还可含有修饰碱基。这种修饰碱基的实例包括氮杂和去氮腺嘌呤,鸟嘌呤,胞嘧啶,胸苷和尿嘧啶;以及黄嘌呤和次黄嘌呤。核酸可以是双链的或单链的,并且代表有义链或反义链。此外,术语“核酸”包括互补核酸序列以及密码子优化的或同义密码子等同物。如本文所用的术语“分离的核酸序列”是指当通过重组DNA技术产生时基本上不含细胞材料或培养基的核酸,或化学合成时的化学前体或其它化学品。分离的核酸也基本上不含天然侧接核酸的序列(即位于核酸的5'和3'末端的序列),核酸来源于此。

[0094] “可操作地连接”意指核酸以允许核酸表达的方式与调节序列连接。合适的调节序列可以来源于多种来源,包括细菌,真菌,病毒,哺乳动物或昆虫基因。适当调节序列的选择取决于所选择的宿主细胞,并且可以由本领域普通技术人员容易地完成。此类调节序列的实例包括:转录启动子和增强子或RNA聚合酶结合序列,核糖体结合序列,包括翻译起始信号。另外,取决于所选择的宿主细胞和所用的载体,可以将其它序列(例如复制起点,其它DNA限制性位点,增强子和赋予转录诱导能力的序列)整合到表达载体中。

[0095] 如本文所用的术语“载体”包括核酸分子的任何中间载体,其使得所述核酸分子例如被引入原核和/或真核细胞和/或整合到基因组中,并且包括质粒,噬菌粒,噬菌体或病毒载体如基于逆转录病毒的载体和Adeno相关的病毒载体等。本文所用的术语“质粒”通常是指染色体外遗传物质的构建体,通常是环状DNA双链体,其可独立于染色体DNA复制。

[0096] “至少中等严格的杂交条件”是指选择促进溶液中两个互补核酸分子之间选择性杂交的条件。可以对核酸序列分子的全部或部分进行杂交。杂交部分的长度通常为至少15(例如20,25,30,40或50)个核苷酸。本领域技术人员将认识到核酸双链体或杂合体的稳定性由 T_m 确定,其在含钠缓冲液中是钠离子浓度和温度的函数($T_m = 81.5^{\circ}\text{C} - 16.6 (\text{Log}_{10} [\text{Na}^+]) + 0.41 (\% (\text{G}+\text{C}) - 600/1)$ 或类似的方程式)。因此,确定混合稳定性的洗涤条件中的参数是钠离子浓度和温度。为了鉴定与已知核酸分子相似但不相同的分子,可以假设1%的错配导致 T_m 降低约 1°C ,例如,如果寻求具有>95%同一性的核酸分子,则最终洗涤温度将降低约 5°C 。基于这些考虑,本领域技术人员将能够容易地选择合适的杂交条件。在优选的实施方式中,选择严格的杂交条件。举例来说,可以采用以下条件来实现严格杂交:基于上式,在 $T_m - 5^{\circ}\text{C}$ 下在5x氯化钠/柠檬酸钠(SSC)/5x Denhardt溶液/1.0%SDS下杂交,然后在 60°C 下经0.2x SSC/0.1%SDS洗涤。中等严格的杂交条件包括在 42°C 下在3x SSC中的洗涤步骤。然而,应该理解,使用替代的缓冲剂,盐和温度可以实现等效的严格性。关于杂交条件的其它指导可参见:Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley&Sons, N.Y., 2002, 和参见:Sambrook等人, Molecular Cloning: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001。

[0097] 如本文所用并且如本领域所熟知的,术语“治疗”是指获得有益或所需结果(包括临床结果)的方法。有益或期望的临床结果可包括但不限于减轻或改善一种或多种症状或

病症,减轻疾病程度,稳定(即不恶化)疾病状态,预防疾病传播,延迟或减缓疾病进展,改善或缓解疾病状态,减少和缓解疾病复发(无论是部分还是全部),无论是可检测的还是不可检测的。如果不接受治疗,“治疗”还意味着与预期存活相比延长存活。如本文所用的“治疗”还包括预防性治疗。例如,可以治疗具有早期AD的受试者以预防进展,可以用本文所述的化合物,抗体,免疫原,核酸或组合物治疗以预防进展。

[0098] 如本文所用的术语“施用”是指向细胞或受试者施用治疗有效剂量的本公开化合物或组合物。

[0099] 如本文所用,短语“有效量”是指在达到所需结果所需的剂量和时间段内有效的量。当施用于受试者时的有效量可以根据诸如疾病状态,年龄,性别,受试者体重等因素而变化。可以调整剂量方案以提供最佳治疗反应。

[0100] 术语“药学上可接受的”是指载体,稀释剂或赋形剂与制剂的其它组分相容并且对其接受者基本上无害。

[0101] “包含”或“包括”一个或多个所述元素的组合物或方法可包括未具体列举的其它元素。例如,“包含”或“包括”抗体的组合物可以单独含有抗体或与其它成分组合。

[0102] 在理解本公开的范围时,如本文所使用的术语“由……组成”及其衍生词旨在是封闭式术语,其指定所述特征,元素,组件,组,整数和/或步骤的存在,并且还排除存在其它未说明的特征,元素,组件,组,整数和/或步骤。

[0103] 本文中通过端点列举的数值范围包括该范围内包含的所有数字和分数(例如1至5包括1,1.5,2,2.75,3,3.90,4和5)。还应理解,推测其所有数字和分数均由术语“约”修饰。此外,应理解,除非内容另有明确说明,否则“一个”,“一种”和“该”包括复数指示物。术语“约”是指正在参考的数字的 $\pm 0.1\%$ 至 50% , $5-50\%$ 或 $10-40\%$,优选 $10-20\%$,更优选 10% 或 15% 。

[0104] 此外,特定部分中描述的定义和实施方式旨在适用于本文所述的其它实施方式,如本领域技术人员所理解的,它们是适合的。例如,在以下段落中,更详细地定义了本发明的不同方面。除非明确地相反指出,否则如此定义的每个方面可以与任何其它方面组合。特别地,任何被指示为优选或有利的特征可以与被指示为优选或有利的任何其它特征组合。

[0105] 除非上下文另有明确规定,否则冠词“一个”,“一种”和“该”的单数形式包括复数形式。例如,术语“一种化合物”或“至少一种化合物”可包括多种化合物,包括其混合物。

[0106] II. 抗体和核酸

[0107] 本文公开了特定抗体及其用途。

[0108] 如实施例中所证明的,对使用环(CGHHQKG) (SEQ ID NO:12)产生的抗体进行测序,相对于相应的线性肽选择性结合环状化合物,选择性结合A- β 寡聚体而不是单体,和/或在AD组织中缺乏明显的斑块染色。此外,所述抗体能够抑制A- β 聚集的体外增殖。

[0109] 因此,一个方面包括抗体,其包含任选地融合的轻链可变区和重链可变区,所述重链可变区包含互补决定区CDR-H1,CDR-H2和CDR-H3,所述轻链可变区包含互补决定区CDR-L1,CDR-L2和CDR-L3,并且其中所述CDR的氨基酸序列包含以下序列:

[0110] CDR-H1 GFTFSDYY (SEQ ID NO:1)

[0111] CDR-H2 ISDGGSYT (SEQ ID NO:2)

[0112] CDR-H3 ARDYYGSSSYTSGFAY (SEQ ID NO:3)

[0113] CDR-L1 QSLNLSRTRKNY (SEQ ID NO:4)

[0114] CDR-L2 WAS (SEQ ID NO:5)

[0115] CDR-L3 KQSYNLYT (SEQ ID NO:6)

[0116] 在一个实施方式中,所述抗体包含重链可变区,其包含:i) SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列;ii)与SEQ ID NO:9具有至少50%,至少60%,至少70%,至少80%或至少90%序列同一性的氨基酸序列,其中CDR序列如SEQ ID NO:1,2和3所示,或iii)保守取代的氨基酸序列i),其中CDR序列如SEQ ID NO:1,2和3所示。

[0117] 在另一个实施方式中,所述抗体包含轻链可变区,其包含:i) SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列,ii)与SEQ ID NO:11具有至少50%,至少60%,至少70%,至少80%或至少90%序列同一性的氨基酸序列,其中CDR序列如SEQ ID NO:4,5和6中所示,或iii)保守取代的氨基酸序列i),其中CDR序列如SEQ ID NO:4,5和6所示。

[0118] 在另一个实施方式中,重链可变区氨基酸序列由SEQ ID NO:8所示的核苷酸序列或其密码子简并或优化形式编码;和/或抗体包含由SEQ ID NO:10所示的核苷酸序列或其密码子简并或优化形式编码的轻链可变区氨基酸序列。

[0119] 在另一个实施方式中,重链可变区包含SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列或由其组成和/或轻链可变区包含SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列或由其组成。

[0120] 在另一个实施方式中,抗体是与包含SEQ ID NO:1-6所示的CDR序列的抗体竞争结合具有SEQ ID NO:12的序列的环肽和/或人A- β 寡聚体的抗体。

[0121] 在另一个实施方式中,抗体是与包含SEQ ID NO:9的重链可变链序列和/或SEQ ID NO:11的轻链可变区序列的抗体一起结合具有SEQ ID NO:12的序列的环肽和/或人A- β 寡聚体的抗体。

[0122] 另一方面包括分离的构象特异性和/或选择性抗体,其包含任选地融合的轻链可变区和重链可变区,所述重链可变区包含互补决定区CDR-H1,CDR-H2和CDR-H3,所述轻链可变区包含互补决定区CDR-L1,CDR-L2和CDR-L3,并且其中所述CDR的氨基酸序列包含以下序列:

[0123] CDR-H1 GFTFSDYY (SEQ ID NO:1)

[0124] CDR-H2 ISDGGSYT (SEQ ID NO:2)

[0125] CDR-H3 ARDYYSNSYTS GFAY (SEQ ID NO:80)

[0126] CDR-L1 QSLNLSRTRKNY (SEQ ID NO:4)

[0127] CDR-L2 WAS (SEQ ID NO:5)

[0128] CDR-L3 KQSYNLYT (SEQ ID NO:6)。

[0129] 在一个实施方式中,所述抗体包含重链可变区,其包含:i) SEQ ID NO:85所示的氨基酸序列;ii)与SEQ ID NO:85具有至少50%,至少60%,至少70%,至少80%或至少90%序列同一性的氨基酸序列,其中CDR序列如SEQ ID NO:1,2和80所示,或iii)保守取代的氨基酸序列i),其中CDR序列如SEQ ID NO:1,2和80所示。

[0130] 在另一个实施方式中,所述抗体包含轻链可变区,其包含:i) SEQ ID NO:87所示的氨基酸序列,ii)与SEQ ID NO:89具有至少50%,至少60%,至少70%,至少80%或至少90%序列同一性的氨基酸序列,其中CDR序列如SEQ ID NO:4,5和6中所示,或iii)保守取代的氨基酸序列i),其中CDR序列如SEQ ID NO:4,5和6所示。

[0131] 在另一个实施方式中,重链可变区氨基酸序列由SEQ ID NO:84所示的核苷酸序列或其密码子简并或优化形式编码;和/或抗体包含由SEQ ID NO:86所示的核苷酸序列或其密码子简并或优化形式编码的轻链可变区氨基酸序列。

[0132] 在另一个实施方式中,重链可变区包含SEQ ID NO:85所示的氨基酸序列或由其组成和/或轻链可变区包含SEQ ID NO:87所示的氨基酸序列或由其所示的氨基酸序列组成。

[0133] 在另一个实施方式中,抗体是与包含SEQ ID NO:1,2,80,4-6所示的CDR序列的抗体竞争结合具有SEQ ID NO:12的序列的环肽和/或人A- β 寡聚体的抗体。

[0134] 在另一个实施方式中,抗体是与包含SEQ ID NO:85的重链可变链和/或SEQ ID NO:87的轻链可变区序列的抗体一起结合具有SEQ ID NO:12的序列的环肽和/或人A- β 寡聚体的抗体。

[0135] 另一方面包括分离的构象特异性和/或选择性抗体,其包含任选地融合的轻链可变区和重链可变区,所述重链可变区包含互补决定区CDR-H1,CDR-H2和CDR-H3,轻链可变区包含互补决定区CDR-L1,CDR-L2和CDR-L3,并且其中所述CDR的氨基酸序列包含以下序列:

[0136] CDR-H1 GFTFSDYY (SEQ ID NO:1)

[0137] CDR-H2 ISDGGSYT (SEQ ID NO:2)

[0138] CDR-H3 ARDYYSNSYTSGFAY (SEQ ID NO:80)

[0139] CDR-L1 QSIVHSNGNTY (SEQ ID NO:81)

[0140] CDR-L2 KVS (SEQ ID NO:82)

[0141] CDR-L3 FQGSHVPLT (SEQ ID NO:83)。

[0142] 在一个实施方式中,所述抗体包含重链可变区,其包含:i) SEQ ID NO:85所示的氨基酸序列;ii)与SEQ ID NO:85具有至少50%,至少60%,至少70%,至少80%或至少90%序列同一性的氨基酸序列,其中CDR序列如SEQ ID NO:1,2和80所示,或iii)保守取代的氨基酸序列i),其中CDR序列如SEQ ID NO:1,2和80所示。

[0143] 在另一个实施方式中,所述抗体包含轻链可变区,其包含:i) SEQ ID NO:89所示的氨基酸序列,ii)与SEQ ID NO:89具有至少50%,至少60%,至少70%,至少80%或至少90%序列同一性的氨基酸序列,其中CDR序列如SEQ ID NO:81,82和83所示,或iii)保守取代的氨基酸序列i),其中CDR序列如SEQ ID NO:81,82和83所示。

[0144] 在另一个实施方式中,重链可变区氨基酸序列由SEQ ID NO:84所示的核苷酸序列或其密码子简并或优化形式编码;和/或抗体包含由SEQ ID NO:88所示的核苷酸序列或其密码子简并或优化形式编码的轻链可变区氨基酸序列。

[0145] 在另一个实施方式中,重链可变区包含SEQ ID NO:85所示的氨基酸序列或由其组成和/或轻链可变区包含SEQ ID NO:89所示的氨基酸序列或由其组成。

[0146] 在另一个实施方式中,抗体是与包含SEQ ID NO:1,2,80-3所示的CDR序列的抗体竞争结合具有SEQ ID NO:12的序列的环肽和/或人A- β 寡聚体的抗体。

[0147] 在另一个实施方式中,抗体是与包含SEQ ID NO:85的重链可变链序列和/或SEQ ID NO:89的轻链可变区序列的抗体一起结合具有SEQ ID NO:12的序列的环肽和/或人A- β 寡聚体的抗体。

[0148] 在一个实施方式中,所述抗体缺乏结合包含序列HHQK (SEQ ID NO:7)的线性肽,任选地其中线性肽的序列是用于任选地在实施例描述的条件下产生抗体的环状序列的线

性形式。

[0149] 在一个实施方式中,抗体特异性结合体内存在的A- β 上的表位,该表位包含HHQK (SEQ ID NO:7)或其部分或由其组成。

[0150] 在一个实施方式中,抗体不特异性结合和/或不选择性于由HHQK (SEQ ID NO:7)组成的线性肽。如本文所述,可以使用ELISA或表面等离子体共振测量来测量选择性结合。

[0151] 在一个实施方式中,相对于任选地在线性CGHHQKG (SEQ ID NO:12)的背景下包含HHQK (SEQ ID NO:7)的线性肽,抗体选择性结合任选地在环(CGHHQKG) (SEQ ID NO:12)的背景下包含HHQK (SEQ ID NO:7)或其部分的环状化合物。例如,在一个实施方式中,抗体选择性地结合环状构象的HHQK (SEQ ID NO:7)并且与线性化合物(如相应的线性化合物)的HHQK (SEQ ID NO:7)相比,对环状构象的HHQK (SEQ ID NO:7)具有至少2倍,至少5倍,至少10倍,至少20倍,至少30倍,至少30倍,至少30倍,至少40倍,至少50倍,至少100倍,至少500倍,至少1000倍的更高选择性,例如通过ELISA或表面等离子体共振测量,任选使用本文所述的方法。

[0152] 在一个实施方式中,抗体相对于线性肽选择性结合包含表位序列的环状化合物或相对于单体选择性结合A- β 种类如A- β 寡聚体。在一个实施方式中,选择性为与选自A- β 单体和/或A- β 原纤维和/或线性HHQK (SEQ ID NO:7),任选地线性CGHHQKG (SEQ ID NO:12)的A- β 种类相比,对环状化合物和/或A- β 寡聚体的选择性高至少2倍,至少3倍,至少5倍,至少10倍,至少20倍,至少30倍,至少40倍,至少50倍,至少100,至少500倍,至少1000倍。

[0153] 在一个实施方式中,抗体是单克隆抗体。单克隆的生产描述于实施例中。

[0154] 为了产生单克隆抗体,可以从用本文所述免疫原免疫的受试者中收获抗体产生细胞(淋巴细胞),并通过标准体细胞融合方法与骨髓瘤细胞融合,从而使这些细胞永生化和产生杂交瘤细胞。这些技术是本领域熟知的(例如最初由Kohler和Milstein开发的杂交瘤技术(Nature 256:495-497 (1975))以及其它技术,例如人B细胞杂交瘤技术(Kozbor等人, Immunol.Today 4:72 (1983)),产生人单克隆抗体的EBV杂交瘤技术(Cole等人,Methods Enzymol,121:140-67 (1986)),以及组合抗体文库的筛选(Huse Science 246:1275 (1989))。可以免疫化学筛选杂交瘤细胞以产生与所需表位特异性反应的抗体,并且可以分离单克隆抗体。

[0155] 还可以通过筛选编码免疫球蛋白基因或其部分的表达文库来产生对特定抗原或分子具有反应性的特异性抗体或抗体片段,所述免疫球蛋白基因或其部分在具有细胞表面组分的细菌中表达。例如,可以使用噬菌体表达文库在细菌中表达完整的Fab片段,VH区和FV区(参见例如Ward等人,Nature 41:544-546 (1989);Huse等人,Science 246:1275-1281 (1989);和McCafferty等人,Nature 348:552-554 (1990))。

[0156] 在一个实施方式中,抗体是人源化抗体。如实施例中所证明的,描述了特定的人源化抗体。

[0157] 来自非人种类的抗体的人源化已在文献中充分描述。参见例如EP-B1 0239400和Carter&Merchant 1997 (Curr Opin Biotechnol 8,449-454,1997,其全部内容通过引用并入本文)。人源化抗体也易于商业获得(例如Scotgen Limited,2Holly Road,Twickenham,Middlesex,Great Britain.)。

[0158] 通过CDR移植容易地产生人源化形式的啮齿动物抗体(Riechmann等人,Nature,

332:323-327,1988)。在该方法中,包含啮齿动物单克隆抗体的抗原结合位点的六个CDR环与相应的人框架区连接。CDR移植通常产生具有降低亲和力的抗体,因为框架区的氨基酸可能影响抗原识别(Foote&Winter.J Mol Biol,224:487-499,1992)。为了保持抗体的亲和力,通常需要通过定点诱变或其它重组技术替换某些框架残基,并且可以通过抗原结合位点的计算机模拟来辅助(Co等人,J Immunol,152:2968-2976,1994)。

[0159] 任选地通过表面重修获得人源化形式的抗体(Pedersen等人,J Mol Biol,235:959-973,1994)。在该方法中,仅啮齿动物抗体的表面残基是人源化的。

[0160] 在一个实施方式中,人源化抗体包含CDR,如表2中所示。

[0161] 表4A和4B中提供了特定的人源化序列。

[0162] 一个方面包括人源化抗体,其包含表4A或4B中所示的序列或与表4A或4B中所示的序列具有至少50%序列同一性的序列,其中CDR氨基酸序列如其中所示。

[0163] 在一个实施方式中,人源化抗体包含重链可变区,其包含:i) SEQ ID NO:16,18,20,22,24和26中任一个所示的氨基酸序列;ii) 与SEQ ID NO:16,18,20,22,24和26中任一个具有至少50%,至少60%,至少70%,至少80%或至少90%序列同一性的氨基酸序列,其中CDR序列如SEQ ID NO:1,2和3所示,或iii) 保守取代的氨基酸序列i) 其中CDR序列如SEQ ID NO:1,2和3所示。

[0164] 在另一个实施方式中,抗体包含轻链可变区,其包含:i) SEQ ID NO:30,32,34,36,38和40中任一个所示的氨基酸序列,ii) 与SEQ ID NO:30,32,34,36,38和40中任一个具有至少50%,至少60%,至少70%,至少80%或至少90%序列同一性的氨基酸序列,其中CDR序列如SEQ ID NO:4,5和6所示,或iii) 保守取代的氨基酸序列i),其中CDR序列如SEQ ID NO:4,5和6所示。

[0165] 在另一个实施方式中,重链可变区氨基酸序列由SEQ ID NO:15,17,19,21,23和25中任一个所示的核苷酸序列或其密码子简并或优化形式编码;和/或抗体包含由SEQ ID NO:29,31,33,35,37和39中任一个所示的核苷酸序列或其密码子简并或优化形式编码的轻链可变区氨基酸序列。

[0166] 在另一个实施方式中,重链可变区包含SEQ ID NO:16,18,20,22,24和26中任一个所示的氨基酸序列或由其组成和/或轻链可变区包含SEQ ID NO:30,32,34,36,38和40中任一个所示的氨基酸序列或由其组成。

[0167] 在另一个实施方式中,抗体是与包含如表4A中所示的重链序列,任选地包含表4A中所示的轻链序列的抗体竞争结合具有SEQ ID NO:12的序列的环肽和/或人A- β 任选地人A- β 寡聚体的抗体。

[0168] 在另一个实施方式中,抗体是与包含SEQ ID NO:16,18,20,22,24和26中任一个的重链可变链序列和/或SEQ ID NO:30,32,34,36,38和40中任一个SEQ ID所示的轻链可变区序列的抗体竞争结合具有SEQ ID NO:12的序列的环肽和/或人A- β 任选地人A- β 寡聚体的抗体。

[0169] 在一个实施方式中,抗体包含SEQ ID NO:16和30;SEQ ID NO:18和32;SEQ ID NO:20和34;SEQ ID NO:22和36;SEQ ID NO:24和38;或SEQ ID NO:36和40,或序列与其具有至少50%,至少60%,至少70%,至少80%或至少90%序列同一性的序列,其中CDR维持表2中所示。

[0170] 在另一个实施方式中,人源化抗体包含表4B中所示的序列。

[0171] 在一个实施方式中,人源化抗体包含重链可变区,其包含:i) SEQ ID NO:44,46,48,50,52和54中任一个所示的氨基酸序列;ii) 与SEQ ID NO:44,46,48,50,52和54中任一个具有至少50%,至少60%,至少70%,至少80%或至少90%序列同一性的氨基酸序列,其中CDR序列是其中下划线显示的序列(SEQ ID NO:74-76也是),或iii) 保守取代的氨基酸序列i),其中CDR序列是其中下划线显示的序列(例如SEQ ID NO:74-76)。

[0172] 在另一个实施方式中,抗体包含轻链可变区,其包含:i) SEQ ID NO:58,60,62,64,66和68中任一个所示的氨基酸序列,ii) 与SEQ ID NO:58,60,62,64,66和68中任一个具有至少50%,至少60%,至少70%,至少80%或至少90%序列同一性的氨基酸序列,其中CDR序列是其中下划线显示的序列(SEQ ID NO:77-79也是),或iii) 保守取代的氨基酸序列i),其中CDR序列是其中下划线显示的序列(SEQ ID NO:77-79也是)。

[0173] 在另一个实施方式中,重链可变区氨基酸序列由SEQ ID NO:43,45,47,49,51和53中任一个所示的核苷酸序列或其密码子简并或优化形式编码;和/或抗体包含由SEQ ID NO:57,59,61,63,65和67中任一个所示的核苷酸序列或其密码子简并或优化形式编码的轻链可变区氨基酸序列。

[0174] 在另一个实施方式中,重链可变区包含SEQ ID NO:44,46,48,50,52和54中任一个所示的氨基酸序列或由其组成和/或轻链可变区包含SEQ ID NO:58,60,62,64,66和68中任一个所示的氨基酸序列或由其组成。

[0175] 在另一个实施方式中,抗体是与包含表4B中所示的重链序列的抗体(任选地其中该抗体还包含表4B中所示的轻链序列)竞争结合具有SEQ ID NO:12的序列的环肽和/或人A- β 寡聚体的抗体。

[0176] 在另一个实施方式中,抗体是与包含SEQ ID NO:44,46,48,50,52和54中任一个的重链可变链序列和/或SEQ ID NO:58,60,62,64,66和68中任一个的轻链可变区序列的抗体竞争结合具有SEQ ID NO:12的序列的环肽和/或人A- β 寡聚体的抗体。

[0177] 在一个实施方式中,抗体包含SEQ ID NO:44和58;SEQ ID NO:46和60;SEQ ID NO:48和62;SEQ ID NO:50和64;SEQ ID NO:52和66;或SEQ ID NO:54和68,或序列与其具有至少50%,至少60%,至少70%,至少80%或至少90%序列同一性的序列,其中CDR维持其中下划线所示(SEQ ID No:74-79也是)。

[0178] 在一个实施方式中,本文描述的抗体包含恒定区,其具有:i) SEQ ID NO:70和/或72所示的氨基酸序列;ii) 与SEQ ID NO:70和/或72中任一个具有至少50%,至少60%,至少70%,至少80%或至少90%序列同一性的氨基酸序列;或iii) 保守取代的氨基酸序列i)。

[0179] 在另一个实施方式中,重链恒定区氨基酸序列由SEQ ID NO:69所示的核苷酸序列;或其密码子简并或优化形式编码;和/或抗体包含由SEQ ID NO:71所示的核苷酸序列,或其密码子简并或优化形式编码的轻链恒定区氨基酸序列。

[0180] 可以通过噬菌体展示策略鉴定对特定抗原特异的人抗体(Jespersen等人,Bio/Technology,12:899-903,1994)。在一种方法中,克隆针对特定抗原的啮齿动物抗体的重链并与人轻链的全集配对,以在丝状噬菌体上显示为Fab片段。通过与抗原结合来选择噬菌体。随后将选定的人轻链与人重链库配对以在噬菌体上展示,并通过与抗原结合再次选择噬菌体。结果是对特定抗原特异的人抗体Fab片段。在另一种方法中,产生噬菌体文库,其中

成员在其外表面上展示不同的人抗体片段 (Fab或Fv) (Dower等人, W091/17271和McCafferty等人, W092/01047)。通过对特定抗原的亲亲和富集来选择展示具有所需特异性的抗体的噬菌体。可以将从任一方法鉴定的人Fab或Fv片段重新克隆用于在哺乳动物细胞中表达为人抗体。

[0181] 任选地从转基因动物获得人抗体 (美国专利号6,150,584;6,114,598;和5,770,429)。在该方法中,缺失嵌合或种系突变小鼠中的重链连接区 (JH) 基因。随后将人种系免疫球蛋白基因阵列转移至此类突变小鼠。然后,所得到的转基因小鼠能够在抗原攻击后产生完整的人抗体库。

[0182] 人源化抗体通常作为抗原结合片段产生,例如Fab,Fab',F(ab')₂,Fd,Fv和单结构域抗体片段,或作为单链抗体产生,其中重链和轻链通过间隔子连接。而且,人或人源化抗体可以以单体或聚合物形式存在。人源化抗体任选地包含一条非人链和一条人源化链 (即一条人源化重链或轻链)。

[0183] 包括人源化或人抗体的抗体选自任何类别的免疫球蛋白,包括:IgM,IgG,IgD,IgA或IgE;和任何同种型,包括:IgG1,IgG2,IgG3和IgG4。人源化抗体或人抗体可包括来自一种或多种同种型或类别的序列。

[0184] 将具有SEQ ID No:74-79中所示的CDR的抗体进行密码子优化,并制成IgG1或IgG2a同种型。序列如表8所示。

[0185] 在一个实施方式中,抗体具有表8中提供的序列或其部分,该部分包含至少CDR,任选地重链CDR和/或轻链CDR。在一个实施方式中,该部分是选自表8中序列的序列可变链部分。

[0186] 表8中所示的恒定区 (例如通过与本文提供的其它序列比较可确定,例如SEQ ID NO:42和56,也可以与具有SEQ ID NO:1-6或1,2,80,4-6或1,2,80-83的CDR的抗体的可变序列组合。

[0187] 另外,通过筛选抗体噬菌体展示文库,可以容易地分离对本文所述表位特异的抗体。例如,任选地通过使用本发明的疾病特异性表位筛选抗体噬菌体文库,以鉴定对疾病特异性表位特异的抗体片段。鉴定的抗体片段任选地用于产生多种可用于本发明不同实施方式的重组抗体。抗体噬菌体展示文库可商购获得,例如,通过Xoma (Berkeley,California)。用于筛选抗体噬菌体文库的方法是本领域熟知的。

[0188] 在一个实施方式中,抗体是单克隆抗体。在一个实施方式中,抗体是嵌合抗体,例如人源化抗体,其包含表2中所示的CDR序列。

[0189] 在另一个实施方式中还提供了抗体,其任选地在单链抗体的背景下包含表2中所示的CDR和轻链可变区和重链可变区。

[0190] 本文的抗体可以是单链抗体。所描述的人源化抗体在一个实施方式中也是单链抗体。

[0191] 如所提及的还包括与包含表2中所述的CDR序列,或包含如表3,4A,4B和8中任一个提供的序列的抗体竞争结合具有SEQ ID NO:12的序列的环肽和/或人A- β 寡聚体的抗体。

[0192] 抗体之间的竞争可以例如使用其中测试待测抗体抑制参照抗体与共同抗原的特异性结合的能力的测定来确定。如果过量的测试抗体 (例如至少2倍,5倍,10倍或20倍) 在竞争性结合测定中测量为抑制参照抗体的结合至少50%,至少75%,至少80%,至少90%或至

少95%，则测试抗体与参照抗体竞争。

[0193] 在一个实施方式中，抗体是分离的。在一个实施方式中，抗体是外源抗体。

[0194] 在一个实施方式中，抗体不结合单体A- β ，例如在实施例中描述的条件。在一个实施方式中，抗体不在老年斑中结合A- β ，例如在AD脑组织中原位结合，例如在实施例中描述的条件。

[0195] 在另一个实施方式中，与天然或合成寡聚体A- β 相比，抗体不选择性结合单体A- β 。

[0196] 在一个实施方式中，A- β 寡聚体包含A- β 1-42亚基。

[0197] 在一个实施方式中，抗体缺乏A- β 原纤维斑块（也称为老年斑）染色，例如通过免疫组织化学测量。可以通过与阳性对照例如A- β 特异性抗体6E10和4G8 (Biolegend, San Diego, CA) 或2C8 (Enzo Life Sciences Inc., Farmingdale, NY) 和同种型对照进行比较来评估斑块染色的缺失。如果抗体不显示典型的噬斑形态染色并且染色水平与IgG阴性同种型对照所见水平相当或不超过2倍，则本文所述的抗体缺乏或具有可忽略的A- β 原纤维斑块染色。该量表可以例如将同种型对照的染色水平设定为1，并将6E10设定为10。如果这种量表上的染色水平为2或更低，则抗体缺乏A- β 原纤维斑块染色。在一个实施方式中，抗体显示出最小的A- β 原纤维斑块染色，例如在上述量表上，评分水平低于或小于3。

[0198] 另一方面是与治疗性可检测标记或细胞毒性剂缀合的抗体。在一个实施方式中，可检测标记是发射正电子的放射性核素。发射正电子的放射性核素可用于例如PET成像。

[0199] 另一方面涉及抗体复合物，其包含本文所述的抗体和/或其结合片段和寡聚A- β 。

[0200] 另一方面是编码本文所述抗体或其部分的分离的核酸。

[0201] 还提供了编码重链或轻链或其部分的核酸，例如编码包含本文所述的CDR-H1，CDR-H2和/或CDR-H3区的重链或编码包含本文所述的CDR-L1，CDR-L2和/或CDR-L3区的轻链，本文所述的可变链及其密码子优化和密码子简并形式。

[0202] 本公开还提供了编码本文公开的抗体和/或其结合片段的核酸序列的变体。例如，变体包括在至少中等严格的杂交条件下与编码本文公开的抗体和/或其结合片段的核酸序列杂交的核苷酸序列或密码子简并或优化的序列。在另一个实施方式中，变体核酸序列与编码表2, 3, 4A, 4B和8中所示任何氨基酸序列的核酸序列具有至少50%，至少60%，至少70%，最优选至少80%，甚至更优选至少90%，甚至最优选至少95%序列同一性。

[0203] 另一方面是编码本文所述抗体的分离的核酸，例如表2, 3, 4A, 4B和8中任一个所示的核酸。

[0204] 另一方面是包含本文公开的核酸的表达盒或载体。在一个实施方式中，载体是分离的载体。

[0205] 载体可以是任何载体，包括适于产生抗体和/或其结合片段或表达本文所述肽序列的载体。

[0206] 可以以已知方式将核酸分子掺入合适的表达载体中，该载体确保蛋白质的表达。可能的表达载体包括但不限于粘粒，质粒或修饰的病毒（例如复制缺陷型逆转录病毒，腺病毒和腺相关病毒）。载体应与所用的宿主细胞相容。表达载体“适于转化宿主细胞”，这意味着表达载体含有编码对应于本文所述表位或抗体的肽的核酸分子。

[0207] 在一个实施方式中，载体适于通过基因疗法表达例如单链抗体。载体可以适应神经组织中的特异性表达，例如使用神经特异性启动子等。在一个实施方式中，载体包含IRES

并允许表达轻链可变区和重链可变区。此类载体可用于体内递送抗体。

[0208] 合适的调节序列可以来源于多种来源,包括细菌,真菌,病毒,哺乳动物或昆虫基因。

[0209] 此类调节序列的实例包括:转录启动子和增强子或RNA聚合酶结合序列,核糖体结合序列,包括翻译起始信号。另外,取决于所选择的宿主细胞和所用的载体,可以将其它序列,例如复制起点,额外的DNA限制性位点,增强子和赋予转录诱导能力的序列掺入表达载体中。

[0210] 在一个实施方式中,调节序列指导或增加神经组织和/或细胞中的表达。

[0211] 在一个实施方式中,载体是病毒载体。

[0212] 重组表达载体还可含有标记基因,其有助于选择用表达本文所述抗体或表位肽的载体转化、感染或转染的宿主细胞。

[0213] 重组表达载体还可含有编码融合部分(即“融合蛋白”)的表达盒,其提供增加的重组肽表达或稳定性;增加的重组肽溶解度;通过充当亲和纯化中的配体,包括例如本文所述的标签和标记,有助于纯化靶重组肽。此外,可以将蛋白水解切割位点添加到靶重组蛋白中,以允许在纯化融合蛋白后从重组蛋白中分离重组蛋白。典型的融合表达载体包括pGEX (Amrad Corp.,Melbourne,Australia)、pMAL (New England Biolabs,Beverly,MA)和pRIT5 (Pharmacia,Piscataway,NJ),其分别将谷胱甘肽S-转移酶(GST)、麦芽糖E结合蛋白或蛋白A融合至重组蛋白。

[0214] 用于在体外和体内将基因转移到例如神经元和神经组织中的系统包括基于病毒的载体,最值得注意的是单纯疱疹病毒,腺病毒,腺相关病毒(AAV)和包括慢病毒的逆转录病毒。用于基因递送的替代方法包括使用裸露的质粒DNA以及脂质体-DNA复合物。另一种方法是使用AAV质粒,其中DNA是聚阳离子浓缩的并且脂质被包埋并通过脑内基因递送引入脑中(Leone等人,美国申请号2002076394)。

[0215] 因此,在另一方面,本文所述的化合物,免疫原,核酸,载体和抗体可以配制成囊泡,例如脂质体,纳米颗粒和病毒蛋白质颗粒,例如用于递送本文所述的抗体,化合物,免疫原和核酸。特别是合成聚合物囊泡,包括聚合物囊泡,可用于施用抗体。

[0216] 另一方面还提供了细胞,任选地分离和/或重组细胞,其表达本文所述的抗体或包含本文公开的载体。

[0217] 可以使用适于产生多肽,例如适合于产生抗体和/或其结合片段的任何细胞产生重组细胞。例如,为了将核酸(例如载体)引入细胞,可以转染、转化或感染细胞,这取决于所用的载体。

[0218] 合适的宿主细胞包括多种原核和真核宿主细胞。例如,本文描述的蛋白质可以在细菌细胞中表达,例如大肠杆菌,昆虫细胞(使用杆状病毒),酵母细胞或哺乳动物细胞。

[0219] 在一个实施方式中,细胞是选自酵母,植物,蠕虫,昆虫,禽类,鱼类,爬行动物和哺乳动物细胞的真核细胞。

[0220] 在另一个实施方式中,哺乳动物细胞是骨髓瘤细胞,脾细胞或杂交瘤细胞。

[0221] 在一个实施方式中,细胞是神经细胞。

[0222] 适于表达抗体或肽的酵母和真菌宿主细胞包括但不限于酿酒酵母,粟酒裂殖酵母,毕赤酵母属或克鲁维酵母属以及曲霉属的各种种类。用于在酵母酿酒酵母中表达的载

体的实例包括pYepSec1,pMFa,pJRY88和pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA)。用于转化酵母和真菌的方案是本领域普通技术人员所熟知的。

[0223] 可能合适的哺乳动物细胞包括: COS (例如ATCC No. CRL 1650或1651), BHK (例如ATCC No. CRL 6281), CHO (ATCC No. CCL 61), HeLa (例如ATCC No. CCL 2), 293 (ATCC No. 1573) 和NS-1细胞。用于在哺乳动物细胞中指导表达的合适表达载体通常包括启动子 (例如来源于病毒材料, 例如多瘤病毒, 腺病毒2, 巨细胞病毒和猿猴病毒40), 以及其它转录和翻译控制序列。哺乳动物表达载体的实例包括pCDM8和pMT2PC。

[0224] 在一个实施方式中, 细胞是融合细胞, 例如杂交瘤细胞, 杂交瘤细胞产生对本文所述的表位或表位序列具有特异性和/或选择性的抗体, 包括例如选择性结合A- β 寡聚体的抗体。A- β 单体相对于线性化合物选择性结合环状化合物中存在的表位序列, 或者缺乏或具有可忽略的斑块结合。

[0225] 另一方面是产生包含本文所述CDR组的抗体的杂交瘤细胞系。

[0226] III. 组合物

[0227] 另一方面是包含本文所述的核酸, 载体或抗体的组合物。

[0228] 在一个实施方式中, 组合物包含稀释剂。

[0229] 合适的核酸稀释剂包括但不限于水, 盐溶液和乙醇。

[0230] 用于多肽的合适稀释剂, 包括抗体或其片段和/或细胞, 包括但不限于盐水溶液, pH缓冲溶液和甘油溶液或适于冷冻多肽和/或细胞的其它溶液。

[0231] 在一个实施方式中, 所述组合物是药物组合物, 其包含本文公开的任何抗体, 核酸或载体, 并且任选地包含药学上可接受的载体。

[0232] 本文所述的组合物可通过本身已知的制备药学上可接受的组合物的方法制备, 所述组合物可施用于受试者, 任选地作为疫苗, 使得有效量的活性物质以与药学上可接受的载体的混合物组合。

[0233] 药物组合物包括但不限于冻干粉末或水性或非水性无菌可注射溶液或悬浮液, 其可进一步含有抗氧化剂, 缓冲剂, 抑菌剂和溶质, 使组合物与预期接受者的组织或血液基本相容。可存在于此类组合物中的其它组分包括水, 表面活性剂 (如吐温), 醇类, 多元醇, 甘油和植物油。临时注射溶液和悬浮液可由无菌粉末, 颗粒, 片剂或浓缩溶液或悬浮液制备。该组合物可以例如但不以限制方式提供作为冻干粉末, 其在施用于患者之前用无菌水或盐水重构。

[0234] 药物组合物可包含药学上可接受的载体。合适的药学上可接受的载体包括基本上化学惰性和无毒的组合物, 其不会干扰药物组合物的生物活性的有效性。合适的药物载体的实例包括但不限于水, 盐水溶液, 甘油溶液, 乙醇, N-(1 (2,3-二油氧基) 丙基) N,N,N-三甲基氯化铵 (DOTMA), 二油基磷脂酰基-乙醇胺 (DOPE) 和脂质体。此类组合物应含有治疗有效量的化合物, 以及适量的载体, 以提供直接施用于患者的形式。

[0235] 组合物可以是药学上可接受的盐的形式, 其包括但不限于与游离氨基形成的那些, 例如来源于盐酸, 磷酸, 乙酸, 草酸, 酒石酸等, 以及和游离羧基形成的那些, 例如来源于钠, 钾, 铵, 钙, 氢氧化铁, 异丙胺, 三乙胺, 2-乙基氨基乙醇,

[0236] 在一个实施方式中, 组合物包含本文描述的抗体。在另一个实施方式中, 组合物包含本文所述的抗体和稀释剂。在一个实施方式中, 该组合物是无菌组合物。

[0237] 另一方面包括抗体复合物,其包含本文所述的抗体和A- β ,任选地A- β 寡聚体。复合物可以在溶液中或包含在组织中,任选地在体外。

[0238] IV. 试剂盒

[0239] 另一方面涉及试剂盒,其包含i) 抗体和/或其结合片段,ii) 所述抗体的核酸或其部分,iii) 包含本文所述的抗体,核酸或细胞的组合物或iv) 本文所述的重组细胞,这些包含在小瓶,例如无菌小瓶或其它外壳中,以及任选的参考试剂和/或其使用说明书。

[0240] 在一个实施方式中,试剂盒还包含收集瓶,标准缓冲液和检测试剂中的一种或多种。

[0241] 在另一个实施方式中,试剂盒用于诊断或监测阿尔茨海默氏病或涉及寡聚A β 的病症。

[0242] V. 方法

[0243] 包括制备本文所述抗体的方法。

[0244] 具体而言,提供了使用本文所述的抗体使抗体成为本文所述的抗体对HHQK (SEQ ID NO:7) 的构象表位具有选择性的方法,所述方法包括向受试者,任选地非人受试者施用包含本文所述表位序列的环状化合物,和产生包含本文所述CDR的细胞或抗体的分离抗体。

[0245] 在一个实施方式中,该方法用于使用例如本文所述的方法制备单克隆抗体。

[0246] 在另一个实施方式中,提供了制备嵌合抗体或其结合片段的方法,该方法包括使用重组技术将编码本文所述抗体可变区(重链和/或轻链)的核酸亚克隆到包含编码人抗体恒定结构域(例如IgG1,2,3或4)的核酸的载体,任选地具有或不具有Fc部分以产生嵌合抗体载体;并在细胞中表达嵌合抗体载体;并分离抗体。在一个实施方式中,嵌合体是小鼠人嵌合体。

[0247] 在一个实施方式中,该方法用于使用例如本文所述的方法制备人源化抗体。在一个实施方式中,该方法包括制备嵌合中间体。嵌合中间体的可变区例如被诱变以在CDR区外引入一个或多个氨基酸变化。在另一个实施方式中,将本文所述的一种或多种CDR编码序列插入人抗体支架中。

[0248] 如本文和实施例中所述选择使用环状化合物产生的抗体。在一个实施方式中,该方法包括任选地使用本文所述的方法分离抗体,所述抗体特异性或选择性结合环肽而非线性肽,对表位序列特异,特异性结合寡聚体和/或缺乏或可忽略地结合原位斑块和/或相应的线性肽。

[0249] 另一方面提供了检测生物样品是否包含A- β 的方法,该方法包括使生物样品与本文所述的抗体接触和/或检测任何抗体复合物的存在。在一个实施方式中,该方法用于检测生物样品是否包含寡聚A- β 。

[0250] 在一个实施方式中,该方法包括:

[0251] a. 使生物样品与本文所述的抗体接触,所述抗体在允许产生抗体:A- β 寡聚体复合物的条件下对本文的A- β 寡聚体具有特异性和/或选择性;以及

[0252] b. 检测任何复合物的存在;

[0253] 其中可检测的复合物的存在表明样品可能含有A- β 寡聚体。

[0254] 在一个实施方式中,将形成复合物的水平与测试抗体(例如合适的Ig对照或无关抗体)进行比较。

[0255] 在一个实施方式中,定量检测并测量产生的复合物量。测量可以例如相对于标准进行。

[0256] 在一个实施方式中,将测量的量与对照进行比较。

[0257] 在另一个实施方式中,该方法包括:

[0258] (a) 在允许产生抗体-抗原复合物的条件下,使所述受试者的测试样品与本文所述的抗体接触;

[0259] (b) 测量测试样品中抗体-抗原复合物的量;以及

[0260] (c) 将测试样品中抗体-抗原复合物的量与对照进行比较;

[0261] 其中,与对照相比,检测测试样品中的抗体-抗原复合物表明样品包含A- β 。

[0262] 对照可以是样品对照(例如来自没有AD的受试者,或来自具有特定形式的AD,轻度,中度或晚期的受试者),或者是来自相同受试者的先前样品,用于监测A- β 寡聚体水平在受试者中的变化。或者,对照可以是源自具有或不具有AD的多个患者的值。

[0263] 在一个实施方式中,抗体是具有本文所述CDR序列的抗体。在一个实施方式中,抗体是人源化抗体。在一个实施方式中,抗体是嵌合抗体。

[0264] 在一个实施方式中,样品是生物样品。在一个实施方式中,样品包含脑组织或其提取物和/或CSF。在一个实施方式中,样品包含全血,血浆或血清。在一个实施方式中,样品获自人受试者。在一个实施方式中,受试者怀疑或有风险或患有AD。

[0265] 许多方法可用于检测A- β :抗体复合物,从而使用本文所述的抗体确定样品中存在的A- β 寡聚体,包括免疫测定,例如流式细胞术,Western印迹,ELISA,SPR和免疫沉淀,然后进行SDS-PAGE免疫细胞化学。

[0266] 如实施例中所述,表面等离子体共振技术可用于评估构象特异性结合。如果标记抗体或使用对复合抗体特异的可检测标记的二抗,则可以检测标记。常用的试剂包括荧光发射和HRP标记的抗体。在定量方法中,可以通过与标准品或对照比较来测量产生的信号量。测量也可以是相对的。

[0267] 另一方面包括测量受试者或组织中A- β 的水平或成像的方法,任选地其中待测量或成像的A- β 是寡聚A- β 。在一个实施方式中,该方法包括向有风险或怀疑患有或患有AD的受试者施用与可检测标记缀合的本文所述的抗体;并检测标记,任选地定量检测标记。实施方式中的标记是发射正电子的放射性核素,其可以例如用于PET成像。

[0268] 所述方法还可以与AD或认知障碍的其它测试组合。例如,可以测量CSF中的突触蛋白水平,例如SNAP-25或突触小泡糖蛋白2a(SVG2a)(*Sci Transl Med.*2016年7月20日;8(348):348ra96.doi:10.1126/scitranslmed.aaf6667)。例如,氟代脱氧葡萄糖PET(FDG-PET)用作突触代谢的间接量度。

[0269] 使用本文描述的抗体检测A- β 水平可以单独使用或与其它方法组合使用以监测对治疗的响应。

[0270] 本文证明,包含本文所述CDR组的针对环(CGHHQKG)(SEQ ID NO:12)产生的抗体可以特异性和/或选择性结合A- β 寡聚体。低聚A- β 种类被认为是AD中的有毒增殖种类。进一步如图1所示和实施例中所述,这些抗体对寡聚体,抑制的A- β 聚集和A- β 寡聚体增殖具有特异性。因此,还提供了抑制A- β 寡聚体增殖的方法,该方法包括使表达A- β 的细胞或组织与有效量的本文所述的A- β 寡聚体特异性或选择性抗体接触或将其施用于有需要的受试者,以抑

制A- β 聚集和/或寡聚体增殖。在体外,可以如实施例中所所述监测测定。

[0271] 抗体还可用于治疗AD和/或其它A- β 淀粉样蛋白相关疾病。例如,路易体痴呆和包涵体肌炎(肌肉疾病)的变体表现出与AD相似的斑块,并且A- β 也可以形成涉及脑淀粉样血管病的聚集体。如上所述,包含CDR组的抗体以及在本文所述的人源化抗体序列中时结合寡聚A- β ,其被认为是AD中A- β 的产毒种类并且在体外抑制产毒A- β 寡聚体的形成。

[0272] 因此,另一方面是治疗AD和/或其它A- β 淀粉样蛋白相关疾病的方法,该方法包括向有需要的受试者施用有效量的本文所述的抗体,其包含本文所述的CDR组,任选地表4A或4B中描述的人源化抗体,或选择性地将包含所述抗体的药物组合物用于有需要受试者。在其它实施方式中,编码本文所述抗体的核酸也可以施用于受试者,任选地使用适于在受试者中递送核酸的载体。

[0273] 在一个实施方式中,使用本文描述的抗体评估来自待治疗的受试者的生物样品的A- β 的存在或水平。在一个实施方式中,用抗体处理具有可检测的A- β 水平的受试者(例如体外测量的或通过成像测量的A- β 抗体复合物)。

[0274] 抗体、肽和核酸可以例如包含在如本文所述的药物组合物中,并且例如配制成囊泡以改善递送。

[0275] 可以组合施用靶向HHQK(SEQ ID NO:7)的一种或多种抗体。此外,本文公开的抗体可以与一种或多种其它治疗方法一起施用,例如 β -分泌酶抑制剂或胆碱酯酶抑制剂。

[0276] 还提供了组合物,抗体,分离的肽和核酸用于治疗AD或A- β 淀粉样蛋白相关疾病的用途。

[0277] 本文所述的组合物,抗体,分离的肽和核酸,载体等可以例如通过肠胃外,静脉内,皮下,肌肉内,颅内,心室内,鞘内,眶内,眼内,脊柱内,脑池内,腹膜内,鼻内,气雾剂或口服施用来施用。

[0278] 在某些实施方式中,全身施用药物组合物。

[0279] 在其它实施方式中,将药物组合物直接施用于脑或CNS的其它部分。例如,这种方法包括使用可植入导管和泵,其用于将预定剂量通过导管排出到输注部位。本领域技术人员将进一步认识到,可以通过外科技术植入导管,该外科技术允许导管的可视化,以便将导管定位在脑中所需的施用或输注部位附近。Elsberry等人,美国专利5,814,014“通过脑输注治疗神经退行性疾病的技术”描述了这些技术,该专利通过引用并入本文。还考虑了如美国专利申请20060129126(Kaplitt和During“用于将材料注入患者脑部的输注装置和方法”)中描述的那些方法。用于向大脑和CNS的其它部分递送药物的装置是可商购的(例如,**SynchroMed[®]** EL输液系统;Medtronic,Minneapolis,Minnesota)。

[0280] 在另一个实施方式中,使用诸如修饰待施用的化合物以允许受体介导的跨血脑屏障转运的方法将药物组合物施用于脑。

[0281] 其它实施方式考虑将本文所述的组合物,抗体,分离的肽和核酸与已知促进跨血脑屏障转运的生物活性分子共同施用。

[0282] 在某些实施方式中还考虑了用于在血脑屏障上施用本文所述的组合物,抗体,分离的肽和核酸的方法,例如那些旨在瞬时增加血脑屏障的渗透性的方法,如美国专利7012061“增加血脑屏障渗透性的方法”中所述,其通过引用并入本文。

[0283] 以上公开内容一般性地描述了本申请。通过参考以下特定实施例可以获得更完整

的理解。这些实施例仅用于说明的目的，并不意图限制本申请的范围。可以考虑形式的变化和等同替代，因为情况可能暗示或提供权宜之计。尽管本文已采用特定术语，但这些术语旨在描述性意义而非出于限制的目的。

[0284] 以下非限制性实施例是对本发明的说明：

[0285] 实施例

[0286] 实施例1

[0287] 抗体产生

[0288] 方法和材料

[0289] 免疫原

[0290] Cyclo (CGHHQKG) (SEQ ID NO:12) 肽在CPC Scientific, Sunnyvale, CA, USA产生(环状和线性均是)，并使用三氟乙酸盐反离子方案与KLH(用于免疫)和BSA(用于筛选)缀合。还制备了相同序列的线性肽CGHHQKG (SEQ ID NO:12)。将肽脱盐并通过MS和HPLC检查，并认为95%纯度。将环肽运送到IPA用于在小鼠中生产单克隆抗体。

[0291] 抗体

[0292] 产生杂交瘤和单克隆抗体为与Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) 连接的环(CGHHQKG) (SEQ ID NO:12)。

[0293] 免疫50天龄雌性BALB/c小鼠(Charles River Laboratories, Quebec)。在19天的时间内给予一系列含有抗原但没有佐剂的皮下水性注射剂。每次注射0.5μg/mL环肽-KLH无菌盐水溶液，每只小鼠以100μg每小鼠接种免疫。在第19天对所有4只小鼠实施安乐死，并收获淋巴细胞用于产生杂交瘤细胞系。

[0294] 融合/杂交瘤发展

[0295] 分离淋巴细胞并在聚乙二醇(PEG1500)存在下与鼠SP2/0骨髓瘤细胞融合。使用HAT选择培养融合细胞。该方法使用基于半固体甲基纤维素的HAT选择性培养基将杂交瘤选择和克隆组合成一个步骤。单细胞衍生的杂交瘤在半固体培养基上生长形成单克隆菌落。融合事件后10天，将得到的杂交瘤克隆转移到96孔组织培养板中，并在含有HT的培养基中生长，直至达到对数中期生长(5天)。

[0296] 杂交瘤分析

[0297] 通过间接ELISA对筛选抗原(环肽-BSA)测试来自杂交瘤的组织培养物上清液，并使用山羊抗IgG/IgM(H&L)-HRP二级探针检测IgG和IgM抗体，并用TMB底物显色。在该测定中，克隆>0.2OD进行下一轮测试。在筛选抗原上重新测试阳性培养物以确认分泌，并在无关抗原(人转铁蛋白)上重新测试，以消除非特异性mAb并排除假阳性。通过抗体捕获ELISA对选择的克隆进行同种型分析，以确定它们是IgG或IgM同种型。还通过间接ELISA对其它环肽-BSA缀合物以及线性肽-BSA缀合物测试所选克隆以评估交叉反应性和接头反应性。还通过SPR分析筛选抗体。

[0298] ELISA抗体筛选

[0299] ELISA板用以下包被：1) 0.1μg/孔环肽-缀合-BSA以100uL/孔在碳酸盐包被缓冲液(pH9.6) 0/N中，4℃；2) 0.1μg/孔线性-肽-缀合-BSA以100uL/孔在碳酸盐包被缓冲液(pH9.6) 0/N中，4℃；或3) 0.1μg/孔阴性-肽以100uL/孔在碳酸盐包被缓冲液(pH9.6) 0/N中，4℃。一抗：100uL/孔的杂交瘤上清液在37℃振荡温育1小时。二抗1:10000山羊抗小鼠IgG/

IgM (H+L) -HRP在PBS-Tween中以100uL/孔在37℃振荡1小时。用PBS-Tween进行所有洗涤步骤30分钟。以50uL/孔加入底物TMB,在黑暗中显色并用等体积1M HCl终止。

[0300] SPR结合测定

[0301] SPR分析抗体与环肽,A-β单体和寡聚体的结合

[0302] A-β单体和寡聚体制备:将重组A-β40和42肽 (California Peptide, Salt Lake City UT, USA) 溶解在冰冷的六氟异丙醇 (HFIP) 中。通过蒸发过夜除去HFIP并在SpeedVac离心机中干燥。为制备单体,将肽膜在DMSO中重构至5mM,在dH₂O中进一步稀释至100μM并立即使用。通过在不含酚红的F12培养基 (Life Technologies Inc., Burlington ON, Canada) 中稀释5mM DMSO肽溶液至终浓度100μM来制备寡聚体,并在4℃下温育24小时至7天。

[0303] 环肽,A-β单体和寡聚体结合的SPR分析:所有SPR测量使用分子生物传感器进行,其采用高强度的分子亲和筛选系统 (MASS-1) (Sierra Sensors GmbH, Hamburg, Germany)。激光和高速光学扫描实时监测结合相互作用。使用SPR直接结合测定进行组织培养上清液的初步筛选,其中BSA缀合的肽,A-β42单体和A-β42寡聚体共价固定在高胺容量 (HAC) 传感器芯片 (Sierra Sensors GmbH, Hamburg, Germany) 的各个流动池上,并且抗体在表面上流动。将每个样品在固定的肽和BSA参考表面上一式两份稀释并注射,然后仅注射用于解离阶段的运行缓冲液。在每个分析周期之后,传感器芯片表面被再生。通过从BSA参考表面和空白运行缓冲液注射中减去结合,以及在解离阶段收集的结合响应报告点,对传感图进行双重参考。

[0304] 使用SPR间接 (捕获) 结合测定法在二级筛选中分析蛋白G纯化的mAb,由此将抗体固定在蛋白A衍生的传感器芯片 (XanTec Bioanalytics GmbH, Duesseldorf, Germany) 并且A-β40单体上,A-β42寡聚体,合并的可溶性脑提取物流过表面。通过在HAC传感器芯片的各个流动池上共价固定A-β42单体和A-β42寡聚体并在表面上流动纯化的mAb,以在SPR直接结合测定中验证抗体的特异性。

[0305] 抗体测序

[0306] 对重链和轻链的CDR和可变区进行测序。使用标准RT-PCR从杂交瘤细胞产生的cDNA扩增由杂交瘤表达的免疫球蛋白基因转录物,并使用标准染料-终止子毛细管测序方法测序。

[0307] 人源化抗体

[0308] 制备人源化Fab抗体 (Abzena) 并测序。

[0309] 结果

[0310] ELISA测试发现杂交瘤克隆相对于线性肽优先结合环肽。选择针对环 (CGHHQKG) 产生的克隆301-3,301-11和301-17用于进一步分析。

[0311] 显示了301-3,301-11和301-17的同种型是IgG3亚型。

[0312] 在一种或多种测定中测试抗体结合如上所述制备的环肽,线性肽,A-β1-42单体和A-β1-42寡聚体的能力。

[0313] ELISA和SPR测定证实,克隆相对于线性肽优先结合环肽 (并且与不相关的环肽不交叉反应) 和/或相对于单体优先结合Aβ寡聚体。使用SPR与杂交瘤培养上清液的结合分析的结果显示在表1A中。

[0314] 固定化从杂交瘤上清液中纯化的抗体,并测定它们通过SPR结合Aβ寡聚体的能力。

结果如表1B所示。

[0315] 表1A

[0316]

	环肽 (RU)	线性肽 (RU)	Ab42单体 (RU)	Ab42寡聚体 (RU)
301-11	488	210.5	21.6	75.3
301-3	468.9	60.6	-1.8	56.8

[0317] 表1B

[0318]

	Ab42单体 (RU)	Ab42寡聚体 (RU)
301-3	-23.8	15.5
301-11	-14.1	-2.8
301-17	-27.1	147.8

[0319] 抗体序列

[0320] 对克隆301-3, 301-11和301-17抗体进行测序。表2中提供了301-3和301-11的CDR序列。301-17的CDR在SEQ ID No 74-79中提供。表3中提供了抗体重链和轻链可变部分的共有DNA序列和多肽序列。

[0321] 如表2中所示, 301-3和301-11的重链CDR对于CDR1和2是相同的, 并且CDR3在一个位置变化。

[0322] 对两条轻链进行测序。一条轻链与301-11的轻链几乎相同。

[0323] 制备人源化抗体用于301-17并测序 (Abzena Cambridge UK)。人源化抗体序列在表4A (301-11) 和4B (301-17) 中提供。每个抗体序列的CDR序列用粗体和下划线表示。

[0324] 表2

[0325]

抗体	链	CDR	序列	SEQ ID NO.
301-11	重	CDR-H1	GFTFSDYY	1
301-11		CDR-H2	ISDGGSYT	2
301-11		CDR-H3	ARDYYGSSSYTSGFAY	3
301-11	轻	CDR-L1	QSLNLSRTRKNY	4
301-11		CDR-L2	WAS	5
301-11		CDR-L3	KQSYNLYT	6
301-03-1	重	CDR-H1	GFTFSDYY	1
301-03-1		CDR-H2	ISDGGSYT	2
301-03-1		CDR-H3	ARDYYGSNSYTSFGFAY	80
301-03-1	轻	CDR-L1	QSLNLSRTRKNY	4
301-03-1		CDR-L2	WAS	5
301-03-1		CDR-L3	KQSYNLYT	6
301-03-2	重	CDR-H1	GFTFSDYY	1
301-03-2		CDR-H2	ISDGGSYT	2

301-03-2		CDR-H3	ARDYYGSNSYTSGFAY	80
301-03-2	轻	CDR-L1	QSIVHSNGNTY	81
301-03-2		CDR-L2	KVS	82
301-03-2		CDR-L3	FQGSHVPLT	83

[0326] 表3

[0327] 共有DNA序列和可变区的翻译蛋白质序列。根据IMTG/LIGM-DB,互补决定区(CDR)加下划线。

[0328]

抗体和同种型	共有 cDNA 序列	多肽序列
301-11 IgG3 SEQ ID NO: 8, 9	ATGAACTTTGGGCTCAGCTTGATTTTCCTTGTCCTTGTTTTAAA AGGTGTCCAGTGTGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGG CTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCC TCT <u>GGATTCACTTTCAGTGA</u> CTATTACATGTATTGGGTTC GCCAGACTCCGAAAAGAGGCTGGAGTGGGTCGCAACC <u>ATT</u> <u>AGTGATGGTGGTAGTTACACC</u> TCCTATCCAGACAGTGTG	MNFGLSLIFLVLVL KGVQCEVQLVESG GGLVKPGGSLKLSC AAS <u>GFTFSDYY</u> MY WVRQTPEKRLEWV AT <u>ISDGGSY</u> TSYP

[0329]

	AAGGGACGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACAAC CTGTACCTGCAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACAGCC ATGTATTACTGT <u>GCAAGAGATTACTACGGTAGTAG</u> <u>CTACACCTCGGGCTTTGCTTACT</u> TGGGGCCAAGGGACTCT GGTCACTGTCTCTGCA	DSVKGRFTISRDNA KNNLYLQMSSLRSE DTAMY <u>YCAR</u> <u>DY</u> <u>Y</u> <u>GSSSYTSGFAY</u> <u>W</u> GQGTLVTVSA
301-11 K SEQ ID NO: 10,11	ATGGATTACAGGCCAGGTTCTTATATTGCTGCTGCTATGGG TATCTGGTACCTGTGGGGACATTGTGATGTCACAGTCTCCATC CTCCCTGGCTGTGTCAACAGGAGAGAAGGTCACTATGAGCTG CAAATCCAGT <u>CAGAGTCTGCTCAACAGTAGAACCCGAA</u> <u>AGAACTACT</u> TTGGCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCT CCTAAACTGCTGATCTAC <u>TGGGCATCC</u> ACTAGGGAATCTGG GGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTC ACTCTACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTT ATTACTGC <u>AAGCAATCTTATAATCTGTACACG</u> TTCCGGAG GGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA	MDSQAQVLILLLLW VSGTCGDIVMSQSP SSLAVSTGEKVMS CKSS <u>QSL</u> <u>NSRTR</u> <u>KNY</u> LAWYQQKPG QSPKLLI <u>Y</u> <u>WAS</u> TRE SGVPDRFTGSGSGT DFTLTISSVQAEDLA VYY <u>C</u> <u>KOSYNLYT</u> FGGGTKLEIK
301-03 IgG3 SEQ ID NO: 84, 85	ATGAACTTCGGGCTCAGCTTGATTTTCCTTGTCTTGTTTTAAA AGGTGTCCAGTGTGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGG CTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCC TCT <u>GGATTCACTTT</u> <u>CAGTGACTATTAC</u> ATGTATTGGGTTC GCCAGACTCCGGAAAAGAGGCTGGAGTGGGTCGCAACC <u>ATT</u> <u>AGTGATGGTGGTAGTTACACC</u> TCTATCCAGACAGTGTG AAGGGGCGATTACCATCTCCAGAGACAGTGCCAAGAACAAC CTGTACCTGCAAATGAGCAGTCTGAAGTCTGAGGACACAGCC ATGTATTACTGT <u>GCAAGAGATTACTACGGTAGTAATAG</u> <u>TTACACCTCGGGCTTTGCTTACT</u> TGGGGCCAAGGGACTCT GGTCACTGTCTCTGCA	MNFGLSLIFLVVL KGVQCEVQLVESG GGLVKPGGSLKLS AAS <u>GFTFSDYY</u> MY WVRQTPEKRLEWV AT <u>ISDGGSYT</u> SY DSVKGRFTISRDSA KNNLYLQMSSLKSE DTAMY <u>YCAR</u> <u>DY</u> <u>Y</u> <u>GSSSYTSGFAY</u> <u>W</u> GQGTLVTVSA
301-03 κ1 SEQ ID NO: 86, 87	ATGGATTACAGGCCAGGTTCTTATATTGCTGCTGCTATGGG TATCTGGTACCTGTGGGGACATTGTGATGTCACAGTCTCCATC CTCCCTGGCTGTGTGTCAGCAGGAGAGAAGGTCACTATGAGCTG CAAATCCAGT <u>CAGAGTCTGCTCAATAGTAGAACCCGAA</u> <u>AGAACTACT</u> TTGGCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCT CCTAAACTGCTGATCTAC <u>TGGGCATCC</u> ACTAGGGAATCTGG GGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTC ACTCTACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTT ATTACTGC <u>AAGCAATCTTATAATCTGTACACG</u> TTCCGGAG GGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA	MDSQAQVLILLLLW VSGTCGDIVMSQSP SSLAVSAGEKVMS CKSS <u>QSL</u> <u>NSRTR</u> <u>KNY</u> LAWYQQKPG QSPKLLI <u>Y</u> <u>WAS</u> TRE SGVPDRFTGSGSGT DFTLTISSVQAEDLA VYY <u>C</u> <u>KOSYNLYT</u> FGGGTKLEIK
301-03 κ2 SEQ ID NO:	ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGTGATGTTCTGGATTC CTGCTTCCAGCAGTGTGTTTTGATGACCCAACTCCACTCTC CCTGCCTGTGAGTCTTGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCA	MKLPVRLVLVLMFWI PASSDVLMTQTPL SLPVSLGDQASISCR

[0330]

88, 89	<p>TCTAGT<u>CAGAGCATTGTACATAGTAATGGAAACACCTA</u> <u>TT</u>TAGAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCT CCTGATCTAC<u>AAAGTTTCC</u>AACCGATTCTTCTGGGGTCCCAGA CAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAA GATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGC <u>TTTCAAGGTTACATGTTCTCTCACG</u>TTCGGTGCTGGG ACCAAGCTGGAGCTGAAA</p>	<p>SS<u>OSIVHSNGNTY</u> LEWYLQKPGQSPKL LIY<u>KVS</u>NRFSGVDP RFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDLGVYFC<u>F</u> <u>QGS</u>HVPLTFGAGT KLELK</p>
--------	---	---

[0331] 表4A

[0332]

人源化抗体 301-11	cDNA 序列	多肽序列
VH0 SEQ ID NO: 13, 14	<p>CAGGTCCAAGTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTTGTGAAGCCT GGGGCTTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCT<u>GGATTCACT</u> <u>TTCAGTGACTATTAC</u>ATAAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGA CAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGAT<u>ATTAGTGATGGTGGTAG</u> <u>TTACACCT</u>TACAATGCTAAGTTCAAGAGCAAGGCCACACTGAC TCTGGACACATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGC CTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGT<u>GCAAGAGATT</u> <u>ACTACGGTAGTAGTAGCTACACCTCGGGCTTTGCTTACT</u>GG GGCGCAGGCACCACGGTCACCGTCTCCTCA</p>	<p>QVQLQQPGAELVKPG ASVKMSCKAS<u>GFTEF</u> <u>DYY</u>INWVKQRPQGQ LEWIGD<u>ISDGGSYTY</u> NAKFKSKATLTLDTS SSTAYMQLSSLTSEDS AVYYC<u>ARDYYGSSS</u> <u>YTSGFAY</u>WGAGTTV TVSS</p>
VH1 SEQ ID NO: 15, 16	<p>CAGGTCCAAGTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGCTTAAGAAGCCT GGGGCTTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCT<u>GGATTCACT</u> <u>TTCAGTGACTATTAC</u>ATAAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGA CAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGAT<u>ATTAGTGATGGTGGTAG</u> <u>TTACACCT</u>TACAATGCTAAGTTCAAGAGCAGAGCCACACTGAC TCTGGACACATCCATAAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGC CTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGT<u>GCAAGAGATT</u> <u>ACTACGGTAGTAGTAGCTACACCTCGGGCTTTGCTTACT</u>GG GGCCAAGGCACCACGGTCACCGTCTCCTCA</p>	<p>QVQLVQSGAELKKPG ASVKMSCKAS<u>GFTEF</u> <u>DYY</u>INWVKQRPQGQ LEWIGD<u>ISDGGSYTY</u> NAKFKSRATLTLDTSI STAYMQLSSLTSEDS AVYYC<u>ARDYYGSSS</u> <u>YTSGFAY</u>WGQGTIV TVSS</p>
VH2 SEQ ID NO: 17, 18	<p>CAGGTCCAAGTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCT GGGGCTTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCT<u>GGATTCACT</u> <u>TTCAGTGACTATTAC</u>ATAAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGA CAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGAT<u>ATTAGTGATGGTGGTAG</u> <u>TTACACCT</u>TACAATGCTAAGTTCAAGAGCAGAGCCACACTGAC TCTGGACACATCCATAAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAG CCTGAGATCTGAGGACACGGCGGTCTATTACTGT<u>GCAAGAGA</u> <u>TTACTACGGTAGTAGTAGCTACACCTCGGGCTTTGCTTACT</u>T GGGGCCAAGGCACCACGGTCACCGTCTCCTCA</p>	<p>QVQLVQSGAEVKKP GASVKMSCKAS<u>GFTEF</u> <u>SDYY</u>INWVKQRPQGQ GLEWIGD<u>ISDGGSYT</u> YNAKFKSRATLTLDTS SISTAYMELSSLRSED TAVYYC<u>ARDYYGSSS</u> <u>YTSGFAY</u>WGQGTIV TVSS</p>
VH3	CAGGTCCAAGTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCT	QVQLVQSGAEVKKP

[0333]

SEQ ID NO: 19, 20	GGGGCTTCAGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTTCT <u>GGATTCACT</u> <u>TTCAGTGACTATTAC</u> ATAAACTGGGTGCGACAGAGGCCTGGA CAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGAT <u>ATTAGTGATGGTGGTAG</u> <u>TTACACCT</u> TACAATGCTAAGTTCAAGAGCAGAGCCACACTGAC TCTGGACACATCCATAAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAG CCTGAGATCTGAGGACACGGCGGTCTATTACTGT <u>GCAAGAGA</u> <u>TTACTACGGTAGTAGTAGCTACACCTCGGGCTTTGCTTACT</u> GGGGCCAAGGCACCACGGTCACCGTCTCCTCA	GASVKVSKKAS <u>GFTF</u> <u>SDYY</u> INWVRQRPQG LEWIGD <u>ISDGGSYTY</u> NAKFKSRATLTLDTSI STAYMELSSLRSED AVYYC <u>ARDYYGSSS</u> <u>YTSGFAY</u> WGQGTTV TVSS
VH4 SEQ ID NO: 21, 22	CAGGTCCAAGTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCT GGGGCTTCAGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTTCT <u>GGATTCACT</u> <u>TTCAGTGACTATTAC</u> ATAAACTGGGTGCGACAGAGGCCTGGA CAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGAT <u>ATTAGTGATGGTGGTAG</u> <u>TTACACCT</u> TACAATGCTAAGTTCAAGAGCAGAGTCACACTGAC TCTGGACACATCCATAAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAG CCTGAGATCTGAGGACACGGCGGTCTATTACTGT <u>GCAAGAGA</u> <u>TTACTACGGTAGTAGTAGCTACACCTCGGGCTTTGCTTACT</u> GGGGCCAAGGCACCACGGTCACCGTCTCCTCA	QVQLVQSGAEVKKP GASVKVSKKAS <u>GFTF</u> <u>SDYY</u> INWVRQRPQG LEWIGD <u>ISDGGSYTY</u> NAKFKSRVTLTLDTSI STAYMELSSLRSED AVYYC <u>ARDYYGSSS</u> <u>YTSGFAY</u> WGQGTTV TVSS
VH5 SEQ ID NO: 23, 24	CAGGTCCAAGTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCT GGGGCTTCAGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTTCT <u>GGATTCACT</u> <u>TTCAGTGACTATTAC</u> ATAAACTGGGTGCGACAGAGGCCTGGA CAAGGCCTTGAGTGGATGGGAGAT <u>ATTAGTGATGGTGGTAG</u> <u>TTACACCT</u> TACAATGCTAAGTTCAAGAGCAGAGTCACACTGAC TAGGGACACATCCATAAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAG CCTGAGATCTGAGGACACGGCGGTCTATTACTGT <u>GCAAGAGA</u> <u>TTACTACGGTAGTAGTAGCTACACCTCGGGCTTTGCTTACT</u> GGGGCCAAGGCACCACGGTCACCGTCTCCTCA	QVQLVQSGAEVKKP GASVKVSKKAS <u>GFTF</u> <u>SDYY</u> INWVRQRPQG LEWMGD <u>ISDGGSYT</u> YNAKFKSRVTLTRDT SISTAYMELSSLRSED TAVYYC <u>ARDYYGSSS</u> <u>YTSGFAY</u> WGQGTTV TVSS
VH6 SEQ ID NO: 25, 26	CAGGTCCAAGTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCT GGGGCTTCAGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTTCT <u>GGATTCACT</u> <u>TTCAGTGACTATTAC</u> ATAAACTGGGTGCGACAGAGGCCTGGA CAAGGCCTTGAGTGGATGGGAGAT <u>ATTAGTGATGGTGGTAG</u> <u>TTACACCT</u> TACAATGCTAAGTTCCAGGCAGAGTCACAATGAC TAGGGACACATCCATAAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAG CCTGAGATCTGAGGACACGGCGGTCTATTACTGT <u>GCAAGAGA</u> <u>TTACTACGGTAGTAGTAGCTACACCTCGGGCTTTGCTTACT</u> GGGGCCAAGGCACCACGGTCACCGTCTCCTCA	QVQLVQSGAEVKKP GASVKVSKKAS <u>GFTF</u> <u>SDYY</u> INWVRQRPQG LEWMGD <u>ISDGGSYT</u> YNAKFQGRVTMTRD TSISTAYMELSSLRSE DTAVYYC <u>ARDYYGS</u> <u>SSYTSGFAY</u> WGQGT TVSS
VK0 SEQ ID NO: 27, 28	GATGTTTTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCT TGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGACAGATCTAGT <u>CAGAGTCT</u> <u>GCTCAACAGTAGAACCCGAAAGAACTACT</u> TTAGAATGGTACC TGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACT <u>TGGG</u>	DVLMQTPLSLPVSL GDQASISCRSS <u>QSLLN</u> <u>SRTRKNY</u> LEWYLQK PGQSPKLLIY <u>WASNR</u>

[0334]

	<u>CATCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCA GTGGCA</u> GTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGG AGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCA <u>AAGCAATCTTATA</u> <u>ATCTGTACACGTTTGGCAGCGGGACCAAGCTGGAGATCAAA</u>	FSGVPDRFSGSGSGTD FTLKISRVEAEDLGVY YCKQSYNLYTFGSGT KLEIK
VK1 SEQ ID NO: 29, 30	GATGTTTTGATGACCCAATCTCCACTCTCCCTGCCTGTCACCCCT TGGACAGCCGGCCTCCATCTCTTGACAGATCTAGT <u>CAGAGTCT</u> <u>GCTCAACAGTAGAACCCGAAAGAACTACT</u> TTAGAATGGTTTC AGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAGGCGCCTGATCTACT <u>TGGG</u> <u>CATCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCA GTGGCA</u> GTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGG AGGCTGAGGATGTTGGAGTTTATTACTGCA <u>AAGCAATCTTATA</u> <u>ATCTGTACACGTTTGGCCAAGGGACCAAGCTGGAGATCAAA</u>	DVLMTQSPLSLPVTL GQPASISCRSS <u>QSLLN</u> <u>SRTRKNY</u> LEWFQQK PGQSPRRLIY <u>WASNR</u> FSGVPDRFSGSGSGTD FTLKISRVEAEDVGV YYCKQSYNLYTFGQ GTKLEIK
VK2 SEQ ID NO: 31, 32	GATGTTGTGATGACCCAATCTCCACTCTCCCTGCCTGTCACCCCT TGGACAGCCGGCCTCCATCTCTTGACAGATCTAGT <u>CAGAGTCT</u> <u>GCTCAACAGTAGAACCCGAAAGAACTACT</u> TTAGAATGGTTTC AGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAGGCGCCTGATCTACT <u>TGGG</u> <u>CATCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCA GTGGCA</u> GTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGG AGGCTGAGGATGTTGGAGTTTATTACTGCA <u>AAGCAATCTTATA</u> <u>ATCTGTACACGTTTGGCCAAGGGACCAAGCTGGAGATCAAA</u>	DVVMTQSPLSLPVTL GQPASISCRSS <u>QSLLN</u> <u>SRTRKNY</u> LEWFQQK PGQSPRRLIY <u>WASNR</u> FSGVPDRFSGSGSGTD FTLKISRVEAEDVGV YYCKQSYNLYTFGQ GTKLEIK
VK3 SEQ ID NO: 33, 34	GATGTTGTGATGACCCAATCTCCACTCTCCCTGCCTGTCACCCCT TGGACAGCCGGCCTCCATCTCTTGACAGATCTAGT <u>CAGAGTCT</u> <u>GCTCAACAGTAGAACCCGAAAGAACTACT</u> TTAGAATGGTTTC AGCAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAGGCGCCTGATCTACT <u>TGGG</u> <u>CATCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCA GTGGCA</u> GTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGG AGGCTGAGGATGTTGGAGTTTATTACTGCA <u>AAGCAATCTTATA</u> <u>ATCTGTACACGTTTGGCCAAGGGACCAAGCTGGAGATCAAA</u>	DVVMTQSPLSLPVTL GQPASISCRSS <u>QSLLN</u> <u>SRTRKNY</u> LEWFQQR PGQSPRRLIY <u>WASNR</u> FSGVPDRFSGSGSGTD FTLKISRVEAEDVGV YYCKQSYNLYTFGQ GTKLEIK
VK4 SEQ ID NO: 35, 36	GATGTTCTGATGACCCAATCTCCACTCTCCCTGCCTGTCACCCCT TGGACAGCCGGCCTCCATCTCTTGACAGATCTAGT <u>CAGAGTCT</u> <u>GCTCAACAGTAGAACCCGAAAGAACTACT</u> TTAGAATGGTACC TGCAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAGCTGCTGATCTACT <u>TGGG</u> <u>CATCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCA GTGGCA</u> GTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGG AGGCTGAGGATGTTGGAGTTTATTACTGCA <u>AAGCAATCTTATA</u> <u>ATCTGTACACGTTTGGCCAAGGGACCAAGCTGGAGATCAAA</u>	DVLMTQSPLSLPVTL GQPASISCRSS <u>QSLLN</u> <u>SRTRKNY</u> LEWYLQR PGQSPKLLIY <u>WASNR</u> FSGVPDRFSGSGSGTD FTLKISRVEAEDVGV YYCKQSYNLYTFGQ GTKLEIK
VK5 SEQ ID NO: 37, 38	GATGTTCTGATGACCCAATCTCCACTCTCCCTGCCTGTCACCCCT TGGACAGCCGGCCTCCATCTCTTGACAGATCTAGT <u>CAGAGTCT</u> <u>GCTCAACAGTAGAACCCGAAAGAACTACT</u> TTAGAATGGTACC	DVLMTQSPLSLPVTL GQPASISCRSS <u>QSLLN</u> <u>SRTRKNY</u> LEWYQQR

[0335]

	AGCAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAGGCTGCTGATCTACT <u>TGGG</u> <u>CATCCA</u> ACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCA GTGGCA GTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGG AGGCTGAGGATGTTGGAGTTTATTACTGCA <u>AAGCAATCTTATA</u> <u>ATCTGTACACG</u> TTTGGCCAAGGGACCAAGCTGGAGATCAAA	PGQSPRLLIY <u>WASNR</u> FSGVPDRFSGSGSGTD FTLKISRVEAEDVGV YYC <u>KQSYNLYTFGQ</u> GTKLEIK
VK6 SEQ ID NO: 39, 40	GATGTTGTGATGACCCAATCTCCACTCTCCCTGCCTGTCACCCT TGGACAGCCGGCCTCCATCTCTTG CAGATCTAGT <u>CAGAGTCT</u> <u>GCTCAACAGTAGA</u> ACCCGAAAGAACTACTTAGAATGGTACC AGCAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAGGCTGCTGATCTACT <u>TGGG</u> <u>CATCCA</u> ACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCA GTGGCA GTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGG AGGCTGAGGATGTTGGAGTTTATTACTGCA <u>AAGCAATCTTATA</u> <u>ATCTGTACACG</u> TTTGGCCAAGGGACCAAGCTGGAGATCAAA	DVVMTQSPLSLPVTL GQPASISCRSS <u>QSLLN</u> <u>SRTRKN</u> YLEWYQQR PGQSPRLLIY <u>WASNR</u> FSGVPDRFSGSGSGTD FTLKISRVEAEDVGV YYC <u>KQSYNLYTFGQ</u> GTKLEIK

[0336] 表4B

[0337]

人源化抗体	cDNA 序列	多肽序列
301-17 VH0 SEQ ID NO: 41, 42 (小鼠)	CAGGTCCAACCTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTTGTGAAGCCT GGGGCTTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCT <u>GGCTACAGC</u> <u>TTCACCAGCTACTGG</u> ATAAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGG ACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGAT <u>GTGCATCCTGGTAGAG</u> <u>GCGTGTCCACA</u> TACAATGCTAAGTTCAAGAGCAAGGCCACAC TGACTCTGGACACATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAG CAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGT <u>AGCAGA</u> <u>TCCCATGGTAACACCTACTGGTTTTTTGACGTC</u> TGGGGCGC AGGCACCACGGTCACCGTCTCCTCA	QVQLQQPGAELVKPG ASVKMSCKAS <u>GYSET</u> <u>SYW</u> INWVKQRPQG LEWIGD <u>VHPGRGVS</u> <u>T</u> YNAKFKSKATLTLD TSSSTAYMQLSSLTSE DSAVYYC <u>SRSHGNT</u> <u>YWFFDY</u> WVAGTTVT VSS
VH1 SEQ ID NO: 43, 44	CAGGTCCAACCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGCTTAAGAAGCCT GGGGCTTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCT <u>GGCTACAGC</u> <u>TTCACCAGCTACTGG</u> ATAAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGG ACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGAT <u>GTGCATCCTGGTAGAG</u> <u>GCGTGTCCACA</u> TACAATGCTAAGTTCAAGAGCAGAGCCACAC TGACTCTGGACACATCCATAAGCACAGCCTACATGCAGCTCAG CAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGT <u>AGCAGA</u> <u>TCCCATGGTAACACCTACTGGTTTTTTGACGTC</u> TGGGGCCA AGGCACCACGGTCACCGTCTCCTCA	QVQLVQSGAELKKPG ASVKMSCKAS <u>GYSET</u> <u>SYW</u> INWVKQRPQG LEWIGD <u>VHPGRGVS</u> <u>T</u> YNAKFKSRATLTLD TSISTAYMQLSSLTSE DSAVYYC <u>SRSHGNT</u> <u>YWFFDY</u> WVGQTTVT VSS
VH2 SEQ ID NO: 45, 46	CAGGTCCAACCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCT GGGGCTTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCT <u>GGCTACAGC</u> <u>TTCACCAGCTACTGG</u> ATAAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGG ACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGAT <u>GTGCATCCTGGTAGAG</u>	QVQLVQSGAEVKKP GASVKMSCKAS <u>GYSE</u> <u>TSYW</u> INWVKQRPQG GLEWIGD <u>VHPGRGV</u>

[0338]

	<u>GCGTGTCCACA</u> TACAATGCTAAGTTCAAGAGCAGAGCCACAC TGACTCTGGACACATCCATAAGCACAGCCTACATGGAGCTCAG CAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCGGTCTATTACTGT <u>AGCAG</u> <u>ATCCCATGGTAACACCTACTGGTTTTTTTGACGTC</u> TGGGGCC AAGGCACCACGGTCACCGTCTCCTCA	<u>STYNAKFKSRATLTL</u> DTSISTAYMELSSLRS EDTAVYYC <u>SRSHGN</u> <u>TYWFFDV</u> WGQGTTV TVSS
VH3 SEQ ID NO: 47, 48	CAGGTCCAAGTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCT GGGGCTTCAGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTTCT <u>GGCTACAGC</u> <u>TTCACCAGCTACTGG</u> ATAAACTGGGTGCGACAGAGGCCTGG ACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGAT <u>GTGCATCCTGGTAGAG</u> <u>GCGTGTCCACA</u> TACAATGCTAAGTTCAAGAGCAGAGCCACAC TGACTCTGGACACATCCATAAGCACAGCCTACATGGAGCTCAG CAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCGGTCTATTACTGT <u>AGCAG</u> <u>ATCCCATGGTAACACCTACTGGTTTTTTTGACGTC</u> TGGGGCC AAGGCACCACGGTCACCGTCTCCTCA	QVQLVQSGAEVKKP GASVKVSCKAS <u>GYSE</u> <u>TSYW</u> INWVRQRPQG GLEWIGD <u>VHPGRGV</u> <u>STYNAKFKSRATLTL</u> DTSISTAYMELSSLRS EDTAVYYC <u>SRSHGN</u> <u>TYWFFDV</u> WGQGTTV TVSS
VH4 SEQ ID NO: 49, 50	CAGGTCCAAGTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCT GGGGCTTCAGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTTCT <u>GGCTACAGC</u> <u>TTCACCAGCTACTGG</u> ATAAACTGGGTGCGACAGAGGCCTGG ACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGAT <u>GTGCATCCTGGTAGAG</u> <u>GCGTGTCCACA</u> TACAATGCTAAGTTCAAGAGCAGAGTCACAC TGACTCTGGACACATCCATAAGCACAGCCTACATGGAGCTCAG CAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCGGTCTATTACTGT <u>AGCAG</u> <u>ATCCCATGGTAACACCTACTGGTTTTTTTGACGTC</u> TGGGGCC AAGGCACCACGGTCACCGTCTCCTCA	QVQLVQSGAEVKKP GASVKVSCKAS <u>GYSE</u> <u>TSYW</u> INWVRQRPQG GLEWIGD <u>VHPGRGV</u> <u>STYNAKFKSRVTLTL</u> DTSISTAYMELSSLRS EDTAVYYC <u>SRSHGN</u> <u>TYWFFDV</u> WGQGTTV TVSS
VH5 SEQ ID NO: 51, 52	CAGGTCCAAGTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCT GGGGCTTCAGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTTCT <u>GGCTACAGC</u> <u>TTCACCAGCTACTGG</u> ATAAACTGGGTGCGACAGAGGCCTGG ACAAGGCCTTGAGTGGATTGGGAGAT <u>GTGCATCCTGGTAGAG</u> <u>GCGTGTCCACA</u> TACAATGCTAAGTTCAAGAGCAGAGTCACAC TGACTAGGGACACATCCATAAGCACAGCCTACATGGAGCTCA GCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCGGTCTATTACTGT <u>AGCA</u> <u>GATCCCATGGTAACACCTACTGGTTTTTTTGACGTC</u> TGGGGC CAAGGCACCACGGTCACCGTCTCCTCA	QVQLVQSGAEVKKP GASVKVSCKAS <u>GYSE</u> <u>TSYW</u> INWVRQRPQG GLEWMGD <u>VHPGRG</u> <u>VSTYNAKFKSRVTLT</u> RDTSISTAYMELSSLR SEDVAVYYC <u>SRSHGN</u> <u>TYWFFDV</u> WGQGTTV TVSS
VH6 SEQ ID NO: 53, 54	CAGGTCCAAGTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCT GGGGCTTCAGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTTCT <u>GGCTACAGC</u> <u>TTCACCAGCTACTGG</u> ATAAACTGGGTGCGACAGAGGCCTGG ACAAGGCCTTGAGTGGATTGGGAGAT <u>GTGCATCCTGGTAGAG</u> <u>GCGTGTCCACA</u> TACAATGCTAAGTTCCAGGGCAGAGTCACAA TGACTAGGGACACATCCATAAGCACAGCCTACATGGAGCTCA GCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCGGTCTATTACTGT <u>AGCA</u>	QVQLVQSGAEVKKP GASVKVSCKAS <u>GYSE</u> <u>TSYW</u> INWVRQRPQG GLEWMGD <u>VHPGRG</u> <u>VSTYNAKFQGRVTM</u> TRDTSISTAYMELSSL RSEDVAVYYC <u>SRSHG</u>

[0339]

	<u>GATCCCATGGTAACACCTACTGGTTTTTTGACGTC</u> TGGGGC CAAGGCACCACGGTCACCGTCTCCTCA	<u>NTYWFFDV</u> WGQGT VTVSS
VK0 SEQ ID NO: 55, 56 (小鼠)	GATGTTTTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCT TGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGT <u>CAGAGCATT</u> <u>GTACATAGTAATGGAAACACCTAT</u> TTAGAATGGTACCTGCA GAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTAC <u>AAAGTTTC</u> <u>CAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTT</u> CAGTGGCAGTGGA TCAGGGACAGATTTACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCT GAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCT <u>TTTCAAGGTTACATGTT</u> <u>CCTTCACT</u> TTTGGCAGCGGGACCAAGCTGGAGATCAAA	DVLMQTPLSLPVS GDQASISCRSS <u>OSIVH</u> <u>SNGNTY</u> LEWYLQKP GQSPKLLIY <u>KVS</u> NRFS GVPDRFSGSGSGTDF TLKISRVEAEDLGVY YC <u>FOGSHVPET</u> FGSG TKLEIK
VK1 SEQ ID NO: 57, 58	GATGTTTTGATGACCCAATCTCCACTCTCCCTGCCTGTCACCC TGGACAGCCGGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGT <u>CAGAGCATT</u> <u>GTACATAGTAATGGAAACACCTAT</u> TTAGAATGGTTTCAGCAG AAACCAGGCCAGTCTCCAAGGCGCCTGATCTAC <u>AAAGTTTCC</u> AACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGAT CAGGGACAGATTTACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTG AGGATGTTGGAGTTTATTACTGCT <u>TTTCAAGGTTACATGTT</u> <u>CTTTCAC</u> TTTGGCCAAGGGACCAAGCTGGAGATCAAA	DVLMQSPSLPVT GQPASISCRSS <u>OSIVH</u> <u>SNGNTY</u> LEWFQKQP GQSPRRLIY <u>KVS</u> NRFS GVPDRFSGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVY YC <u>FOGSHVPET</u> FGQG TKLEIK
VK2 SEQ ID NO: 59, 60	GATGTTGTGATGACCCAATCTCCACTCTCCCTGCCTGTCACCC TGGACAGCCGGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGT <u>CAGAGCATT</u> <u>GTACATAGTAATGGAAACACCTAT</u> TTAGAATGGTTTCAGCAG AAACCAGGCCAGTCTCCAAGGCGCCTGATCTAC <u>AAAGTTTCC</u> AACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGAT CAGGGACAGATTTACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTG AGGATGTTGGAGTTTATTACTGCT <u>TTTCAAGGTTACATGTT</u> <u>CTTTCAC</u> TTTGGCCAAGGGACCAAGCTGGAGATCAAA	DVVMQSPSLPVT GQPASISCRSS <u>OSIVH</u> <u>SNGNTY</u> LEWFQKQP GQSPRRLIY <u>KVS</u> NRFS GVPDRFSGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVY YC <u>FOGSHVPET</u> FGQG TKLEIK
VK3 SEQ ID NO: 61, 62	GATGTTGTGATGACCCAATCTCCACTCTCCCTGCCTGTCACCC TGGACAGCCGGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGT <u>CAGAGCATT</u> <u>GTACATAGTAATGGAAACACCTAT</u> TTAGAATGGTTTCAGCAG AGGCCAGGCCAGTCTCCAAGGCGCCTGATCTAC <u>AAAGTTTCC</u> AACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGAT CAGGGACAGATTTACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTG AGGATGTTGGAGTTTATTACTGCT <u>TTTCAAGGTTACATGTT</u> <u>CTTTCAC</u> TTTGGCCAAGGGACCAAGCTGGAGATCAAA	DVVMQSPSLPVT GQPASISCRSS <u>OSIVH</u> <u>SNGNTY</u> LEWFQQR GQSPRRLIY <u>KVS</u> NRFS GVPDRFSGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVY YC <u>FOGSHVPET</u> FGQG TKLEIK
VK4 SEQ ID NO: 63, 64	GATGTTCTGATGACCCAATCTCCACTCTCCCTGCCTGTCACCC TGGACAGCCGGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGT <u>CAGAGCATT</u> <u>GTACATAGTAATGGAAACACCTAT</u> TTAGAATGGTACCTGCA GAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTGCTGATCTAC <u>AAAGTTTC</u> <u>CAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTT</u> CAGTGGCAGTGGA	DVLMQSPSLPVT GQPASISCRSS <u>OSIVH</u> <u>SNGNTY</u> LEWYLQRP GQSPKLLIY <u>KVS</u> NRFS GVPDRFSGSGSGTDF

[0340]

	TCAGGGACAGATTTACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCT GAGGATGTTGGAGTTTATTACTGC <u>TTTCAAGGTTACATGTT</u> <u>CCTTTCACT</u> TTTGGCCAAGGGACCAAGCTGGAGATCAAA	TLKISRVEAEDVGVY YC <u>FOGSHVPET</u> FGQG TKLEIK
VK5 SEQ ID NO: 65, 66	GATGTTCTGATGACCCAATCTCCACTCTCCCTGCCTGTCACCCT TGGACAGCCGGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGT <u>CAGAGCATT</u> <u>GTACATAGTAATGGAAACACCTAT</u> TTAGAATGGTACCAGCA GAGGCCAGGCCAGTCTCCAAGGCTGCTGATCTAC <u>AAAGTTTC</u> <u>CAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTT</u> CAGTGGCAGTGGA TCAGGGACAGATTTACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCT GAGGATGTTGGAGTTTATTACTGC <u>TTTCAAGGTTACATGTT</u> <u>CCTTTCACT</u> TTTGGCCAAGGGACCAAGCTGGAGATCAAA	DVLMTQSPLSLPVTL GQPASISCRSS <u>QSIVH</u> <u>SNGNTY</u> LEWYQQR GQSPRLLIY <u>KVS</u> NRFS GVPDRFSGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVY YC <u>FOGSHVPET</u> FGQG TKLEIK
VK6 SEQ ID NO: 67, 68	GATGTTGTGATGACCCAATCTCCACTCTCCCTGCCTGTCACCCT TGGACAGCCGGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGT <u>CAGAGCATT</u> <u>GTACATAGTAATGGAAACACCTAT</u> TTAGAATGGTACCAGCA GAGGCCAGGCCAGTCTCCAAGGCTGCTGATCTAC <u>AAAGTTTC</u> <u>CAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTT</u> CAGTGGCAGTGGA TCAGGGACAGATTTACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCT GAGGATGTTGGAGTTTATTACTGC <u>TTTCAAGGTTACATGTT</u> <u>CCTTTCACT</u> TTTGGCCAAGGGACCAAGCTGGAGATCAAA	DVVMTQSPLSLPVTL GQPASISCRSS <u>QSIVH</u> <u>SNGNTY</u> LEWYQQR GQSPRLLIY <u>KVS</u> NRFS GVPDRFSGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVY YC <u>FOGSHVPET</u> FGQG TKLEIK

[0341] *VH0和VK0是提供用于比较的小鼠序列

[0342] 表5

[0343]

恒定区	cDNA 序列	多肽序列
IgG4 重链 SEQ ID NO: 69, 70	GCTTCCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGA GCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTT CCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCGGC GTGCACACCTTCCCGGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCA GCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACAC CTGCAATGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTT GAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCACCATGCCAGCACCTGAGTTCC TGGGGGGACCATCAGTCTTCTGTTCCTTCCCCCAAACCAAGGACACTCT CATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGC CAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGG TGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTA CCGTGTGGTCAGCGTCTTCCAGTCTGCACCAAGGACTGGCTGAACGGC AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCTCCATCG AGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTA CACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTG ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGG	ASTKGPSVFPLAPCSRS TSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVKDRVESKY GPPCPPCPAPEFLGGPS VFLFPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSDQEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKV NKGLPSSIEKTIKAKG QPREPQVYTLPPSQEEM TKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYK

[0344]

	AGAGCAATGGGCAGCCGAGAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCT GGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAG AGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGTCTCCGTGATGCATGAGG CTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAA ATGA	TTPVLDSGDSFFLYSR LTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSL SLGK
K SEQ ID NO: 71, 72	CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCTATCTTCCCGCCATCTGATGAGC AGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTA TCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCG GGTAAGTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCT ACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACA CAAAGTCTACGCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTC ACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG	RTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCCLNNFYF REAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDYSL SSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSPVTKSF NRGEC

[0345] 实施例2

[0346] 免疫组化

[0347] 在冷冻的人脑切片上进行免疫组织化学,没有固定或抗原修复。在加湿室中,通过与无血清蛋白质封闭试剂(Dako Canada Inc.,Mississauga,ON,Canada)温育1小时来阻断非特异性染色。以下一抗用于免疫染色:小鼠单克隆同种型对照IgG1,IgG2a和IgG2b,和抗淀粉样蛋白6E10,均购自Biolegend,和纯化抗体301-11和301-17。所有抗体均以1 μ g/mL使用。将切片在室温下温育1小时,并在TBS-T中洗涤3 \times 5分钟。将与辣根过氧化物酶(1:1000)缀合的抗小鼠IgG应用于切片并温育45分钟,然后在TBS-T中洗涤3 \times 5分钟。施加DAB色原试

剂 (Vector Laboratories, Burlington ON, Canada), 当达到所需的背景染色目标水平时, 用蒸馏水冲洗切片。切片用Mayer的苏木精复染, 脱水并盖上盖玻片。在光学显微镜 (Zeiss Axiovert 200M, Carl Zeiss Canada, Toronto ON, Canada) 下检查载玻片, 并使用Leica DC300数码相机和软件 (Leica Microsystems Canada Inc., Richmond Hill, ON) 以20和40×放大率捕获代表性图像。使用“色阶自动校正”在Adobe Photoshop中优化图像。

[0348] **脑提取物:** 经UBC临床研究伦理委员会 (C04-0595) 批准, 从马里兰大学脑和组织库获得人脑组织。可能AD的临床诊断基于NINCDS-ADRDA标准[5]。

[0349] **均质化:** 称重人脑组织样品, 随后浸入来自Roche Diagnostics (Laval QC, Canada) 的一定体积的新鲜冰冷TBS和无EDTA蛋白酶抑制剂混合物中, 使得脑组织的最终浓度为20% (W/v)。使用机械探针均化器在该缓冲液中匀浆组织 (3×30秒脉冲, 其间30秒暂停, 均在冰上进行)。然后将TBS匀浆的样品进行超速离心 (70000×g, 90分钟)。收集上清液, 等分并储存在-80℃。使用BCA蛋白质测定法 (Pierce Biotechnology Inc, Rockford IL, USA) 测定TBS匀浆的蛋白质浓度。

[0350] 使用抗体6E10确认脑提取物中的阳性结合。

[0351] **SPR分析:** 合并并分析来自AD患者的4个脑提取物和来自年龄匹配的对照的4个脑提取物。在TBS中均质化的脑样品包括额叶皮层布罗德曼区9。所有实验均使用分子亲和筛选系统 (MASS-1) (Sierra Sensors GmbH, Hamburg, Germany) 进行, 并使用采用高强度激光和高速光学扫描的分析生物传感器以实时监测结合相互作用, 如实施例6所述。在蛋白A衍生的传感器芯片的分开的流动池上捕获针对本文所述的环肽产生的纯化抗体, 并将稀释的样品注射到表面上180秒, 然后在缓冲液和表面再生中进行120分钟的解离。通过减去小鼠对照IgG参考表面结合和测定缓冲液以双重参考结合反应, 并比较不同组的样品。

[0352] **结果**

[0353] **脑提取物, CSF和免疫组化**

[0354] 测试抗体在可溶性脑提取物, CSF和空肠健康对照和AD脑的组织样品中结合A-β的能力, 结果显示在表6中。表6中阳性的强度由数字加号显示。

[0355] 与对照患者相比, 抗体301-11和301-17中的每一种显示与来自AD患者的脑匀浆和CSF的阳性结合。

[0356] 如表6中所示, 纯化的抗体在可溶性脑提取物和CSF中显示出AD比非AD的更优结合, 并且通过IHC不明显地与斑块原纤维结合。

[0357] **表6: 结合特征的概述**

[0358]	抗体	寡聚体/单体	脑提取物 AD/非 AD	IHC - 斑块染色 (冰冻部分脑 1630)	CSF
	301-3	++	++	-	+
[0359]	301-11	++	+++	-	++
	301-17	++	++	-	+

[0360] *评分与相同样品类别中未显示的其它克隆相关。

[0361] 实施例3

[0362] 与A- β 合成低聚物结合。

[0363] 为了进一步证实和验证A- β 42寡聚体结合,将纯化的抗体共价固定在传感器芯片上,然后注射到商业制备的稳定A- β 42寡聚体表面上(1 μ M) (SynAging SAS,Vandoeuvre-lès-Nancy,France)。

[0364] 抗体301-3,301-11和307-17结合稳定的A- β 42寡聚体(1 μ M),结合反应单位(BRU)分别平均为14.5(301-3),19.3(301-11)和30(301-17)。相比之下,阴性对照IgG1没有有意义地结合寡聚体(BRU 2.5的平均结合),而pan-A β 阳性对照抗体6E10结合的平均BRU为90。

[0365] 实施例4

[0366] 福尔马林固定组织的免疫组化研究

[0367] 使用抗体301-11,301-17评估人AD脑组织切片。该患者之前已经通过三联方法对阿尔茨海默病进行了表征和诊断:(i) Bielschowsky银法显示老年斑和神经原纤维缠结,(ii) 刚果红用于证明淀粉样蛋白和(iii) tau免疫组织化学证明缠结并确认老年斑是“神经病”。该组织用于测试所选单克隆抗体克隆的噬菌斑反应性。将脑组织在10%缓冲的福尔马林中固定数天,并在Sakura VIP组织处理器中进行石蜡处理。用含有和不含微波抗原修复(AR)的1 μ g/ml抗体探测组织切片。包括泛淀粉样蛋白 β 反应性抗体6E10以及选择的抗体克隆作为阳性对照。将抗体在抗体稀释剂(Ventana)中稀释,用OptiView DAB(Ventana)显色。染色在Ventana Benchmark XT IHC染色机上进行。用Olympus BX45显微镜获得图像。由具有神经病理学专业知识的病理学家盲性分析图像。

[0368] 如下表7中所示,使用固定组织,测试的抗体对老年斑淀粉样蛋白的特异性染色是阴性的。用作阳性对照的6E10抗体显示出强烈的斑块染色。

[0369] 表7

[0370]		抗体	老年斑淀粉样蛋白的染色
		301-11	阴性
		301-17	阴性
	阳性对照	6E10	强烈阳性

[0371] 实施例5

[0372] 重组IgG1和IgG2a抗体

[0373] 通过将杂交瘤衍生的301-17的CDR移植到鼠IgG1或IgG2a骨架(WuXi,Biologics)上来制备重组IgG1和IgG2a 301-17构建体。序列在表8中提供。

[0374] 表8-301-17同种型的重链和轻链序列

[0375]

抗体和同种型	cDNA 序列	多肽序列
301-17 IgG1 SEQ ID NO: 90, 91	CAGGTGCAGCTGCAGCAGCCTGGCGCTGAGCTGGTGAAGCCT GGAGCCTCCGTGAAGATGTCCTGCAAGGCCTCCGGCTACTCCT TCACCAGCTACTGGATCAACTGGGTGAAGCAGAGGCCCGGAC AGGGCCTGGAGTGGATTGGAGACGTGCACCCTGGCCGGGGAG TGTCACCTACAACGCCAAGTTCAAGTCCAAGGCCACCCTGAC CCTGGACACCTCCAGCTCCACCGCCTACATGCAGCTGTCCTCC CTGACCTCCGAGGACTCCGCCGTGTAATACTGCAGCAGGTCCC ACGGCAACACCTACTGGTTTTTCGACGTGTGGGGCGCCGGAAC CACAGTGACCGTGTCTCCGCCAAAACGACACCCCATCTGTCT TATCCACTGGCCCCCTGGATCTGCTGCCCAAATACTCCATGG TGACCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGT GACAGTGACCTGGAACCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCAC ACCTTCCCAGCTGTCTGGAGTCTGACCTCTACACTCTGAGCA GCTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCCCTCGGCCAGCGAGACCGT CACCTGCAACGTTGCCACCCGCCAGCAGCACCAAGGTGGA CAAGAAAATTGTGCCAGGGATTGTGGTTGTAAGCCTTGCATA TGTACAGTCCCAGAAGTATCATCTGTCTTCATCTTCCCCCAA AGCCCAAGGATGTGCTCACCATTACTCTGACTCCTAAGGTCAC GTGTGTTGTGGTAGACATCAGCAAGGATGATCCCGAGGTCCA GTTCAGCTGGTTTGTAGATGATGTGGAGGTGCACACAGCTCAG ACGCAACCCCGGAGGAGCAGTTCAACAGCACTTTCCGCTCA GTCAGTGAACCTCCCATCATGCACCAGGACTGGCTCAATGGCA AGGAGTTCAAATGCAGGGTCAACAGTGCAGCTTTCCCTGCCCC	QVQLQQPGAELVKP GASVKMSCKASGY SFTSYWINWVKQRP GQGLEWIGDVHPGR GVSTYNAKFKSKAT LTLDTSSSTAYMQL SSLTSEDSAVYYCS RSHGNTYWFFDVW GAGTTVTVSSAKTT PPSVYPLAPGSAAQ TNSMVTGLCLVKG YFPEPVTVTWNSGS LSSGVHTFPAVLES DLYTLSSSVTPSSP RPSETVTCNVAHPA SSTKVDDKIVPRDC GCKPCICTVPEVSSV FIFPPKPKDVLITLT PKVTCVVVDISKDD PEVQFSWFVDDVEV HTAQTQPREEQFNS TFRSVSELPIMHQD WLNGKEFKCRVNS

[0376]

	CATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGCAGACCGAAGGC TCCACAGGTGTACACCATTCACCTCCCAAGGAGCAGATGGCC AAGGATAAAGTCAGTCTGACCTGCATGATAACAGACTTCTTCC CTGAAGACATTACTGTGGAGTGGCAGTGGAATGGGCAGCCAG CGGAGAACTACAAGAACA CTGAGCCCATCATGAACACGAATG GCTCTTACTTCGTCTACAGCAAGCTCAATGTGCAGAAGAGCAA CTGGGAGGCAGGAAATACTTTACCTGCTCTGTGTTACATGAG GGCCTGCACAACCACCATACTGAGAAGAGCCTCTCCCACTCTC CTGGTAAATGATGA	AAFPAPIEKTISKTK GRPKAPQVYTIPPPK EQMAKDKVSLTCMI TDFFPEDITVEWQW NGQPAENYKNTQPI MNTNGSYFVYSKL NVQKSNWEAGNTF TCSVLHEGLHNHHT EKSLSHSPGK
301-17 IgG2a SEQ ID NO: 92, 93	CAGGTGCAGCTGCAGCAGCCTGGCGCTGAGCTGGTGAAGCCT GGAGCCTCCGTGAAGATGTCCTGCAAGGCCTCCGGCTACTCCT TCACCAGCTACTGGATCAACTGGGTGAAGCAGAGGCCCGGAC AGGGCCTGGAGTGGATTGGAGACGTGCACCCTGGCCGGGGAG TGTCACCTACAACGCCAAGTTCAAGTCCAAGGCCACCCTGAC CCTGGACACCTCCAGCTCCACCGCCTACATGCAGCTGTCCTCC CTGACCTCCGAGGACTCCGCCGTGTACTACTGCAGCAGGTCCC ACGGCAACACCTACTGGTTTTTCGACGTGTGGGGCGCCGGAAC CACAGTGACCGTGTCTCCGCCAAAACAACAGCCCCATCGGTC TATCCACTGGCCCCTGTGTGTGGAGATACA ACTGGCTCCTCGG TGACTCTAGGATGCCTGGTCAAGGGTTATTTCCCTGAGCCAGT GACCTTGACCTGGA ACTCTGGATCCCTGTCCAGTGGTGTGCAC ACCTTCCCAGCTGTCCTGCAGTCTGACCTCTACACCCTCAGCA GCTCAGTGACTGTAACCTCGAGCACCTGGCCCAGCCAGTCCAT CACCTGCAATGTGGCCCACCCGGCAAGCAGCACCAAGGTGGA CAAGAAAATTGAGCCCAGAGGGCCCACAATCAAGCCCTGTCC TCCATGCAAATGCCCAGCACCTAACCTCTTGGGTGGACCATCC GTCTTCATCTTCCCTCCAAAGATCAAGGATGTACTCATGATCT CCCTGAGCCCCATAGTCACATGTGTGGTGGTGGATGTGAGCGA GGATGACCCAGATGTCCAGATCAGCTGGTTTGTGAACAACGT GGAAGTACACACAGCTCAGACACAAACCCATAGAGAGGATTA CAACAGTACTCTCCGGGTGGTCAAGTGCCTCCCATCCAGCAC CAGGACTGGATGAGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAGGTCAAC AACAAAGACCTCCCAGCGCCCATCGAGAGAACCATCTCAAAA CCCAAAGGGTCAGTAAGAGCTCCACAGGTATATGTCTTGCCTC CACCAGAAGAAGAGATGACTAAGAAACAGGTCACTCTGACCT GCATGGTCACAGACTTCATGCCTGAAGACATTTACGTGGAGTG GACCAACAACGGGAAAACAGAGCTAAACTACAAGA AACTG AACCAGTCCTGGACTCTGATGGTTCTTACTTCATGTACAGCAA GCTGAGAGTGGAAGAAGAACTGGGTGGAAAGAAATAGCT	QVQLQQPGAELVKP GASVKMSCKASGY SFTSYWINWVKQRP GQGLEWIGDVHPGR GVSTYNAKFKSKAT LTLDTSSTAYMQL SSLTSEDSAVYYCS RSHGNTYWFFDVW GAGTTVTVSSAKTT APSVYPLAPVCGDT TGSSVTLGCLVKGY FPEPVTLTWNSGSL SGVHTFPAVLQSDL YTLSSSVTVTSSTWP SQSITCNVAHPASST KVDKKIEPRGPTIKP CPPCKCPAPNLLGG PSVFIFPPKIKDVLMI SLSPIVTCVVVDVSE DDPDVQISWVFNNV EVHTAQTQTHREDY NSTLRVVSALPIQH QDWMSGKEFKCKV NNKDLPAPIERTISK PKGSVRAPQVYVLP PPEEEMTKKQVTLT CMVTD FMPEDIYVE WTNNGKTELNYKN TEPVLSDGSYFMY SKLRVEKKNWVER

[0377]

	ACTCCTGTTTCAGTGGTCCACGAGGGTCTGCACAATCACCACAC GACTAAGAGCTTCTCCCGGACTCCGGGTAAATGATGA	NSYSCSVVHEGLHN HHTTKSFSRTPGK
301-17 κ SEQ ID NO: 94, 95	GATGTGCTGATGACCCAGACCCCTCTGTCCCTGCCTGTGTCCC TGGGCGATCAGGCCAGCATCTCCTGCAGGTCCTCCCAGTCCAT CGTGCACTCCAACGGAACACCTACCTGGAGTGGTACCTGCA GAAGCCCGGCCAGTCCCCAAGCTGCTGATCTACAAGGTGTCC AACCGGTTCTCCGGCGTGCCGATAGGTTCTCCGGATCCGGCT CCGGCACCAGACTTTACCCTGAAGATCTCCAGGTGGAGGCCG AGGACCTGGGCGTGTACTACTGCTTTTCAGGGCTCCACGTGCC CTTCACCTTCGGCTCCGGCACCAAGCTGGAGATCAAGCGGGCT GATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGC AGTTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAA CTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGAAGATTGATGGC AGTGAACGACAAAATGGCGTCCTGAACAGTTGGACTGATCAG GACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTCACG TTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGT GAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCT TCAACAGGAATGAGTGTGATGA	DVLMQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSI VHSNGNTYLEWYL QKPGQSPKLLIYKV SNRFSQVPDRFSGS GSGTDFTLKISRVEA EDLGVYYCFQGS HV PFTFGSGTKLEIKRA DAAPTVSIFPPSSEQ LTSGGASVVCFLNN FYPKDINVKWKIDG SERQNGVLNSWTD QDSKDSTYSMSSTL TLTKDEYERHNSYT CEATHKTSTSPIVKS FNRNEC

[0378] 测试301-17IgG1和IgG2a抗体,并与亲本杂交瘤纯化的IgG3抗体进行比较,以获得如下所述的结合特征。

[0379] 301-17 IgG2a ProteOn生物传感器 (BioRad) 与Ab0的结合:用Proteon GLM Sensor芯片上的抗小鼠IgG或胺偶联捕获重组301-17IgG2a和杂交瘤纯化的301-17IgG3,并测试Ab0结合 (SynAging Ab0)。使用Ab0 3倍稀释:1μM,0.33μM,0.11μM,37nM,12.3nM。测定缓冲液是PBS-E+吐温20+2mg/ml BSA。

[0380] 结果:

[0381] 近似动力学值为:

[0382] 杂交瘤:KD=26.9nM

[0383] IgG2a-301-17抗体:KD=16.2-19.5nM

[0384] 用对照小鼠IgG未检测到结合。

[0385] 301-17 IgG2a ProteOn生物传感器 (BioRad) 与环肽表位的结合:重组301-17 IgG2a与Proteon GLH生物传感器芯片胺偶联,并测试与偶联于BSA的SEQ ID NO:2的环肽的结合。使用9nM至111pM的Cyclo-BSA 3倍稀释液。测定缓冲液是PBS-E+0.05%Tween+10mg/ml BSA。发现抗体301-17IgG2a结合与BSA缀合的环肽 (SEQ ID NO:12),KD约为17pM (平均3次测试)。对于测试的其它商业Aβ抗体 (pan-Aβ6E10, Biolegend) 和兔抗Aβ抗体 (D54D2, Cell Signaling; ab201060, (abcam; NBP1-78007, Novus)) 未检测到或检测到可忽略的结合。

[0386] 301-17 IgG1 MAAS-2与Ab0的结合:将重组301-17 IgG1和杂交瘤纯化的301-17 IgG3固定在MAAS-2传感器芯片上,并以1μM测试其与Ab0 (SynAging) 的结合。在测试条件下,重组IgG1 301-17抗体在2次测试中产生比杂交瘤纯化抗体更大的信号 (分别为40-55BRU与

15-25BRU)。用对照小鼠IgG检测到很少或没有结合。

[0387] 301-17 IgG1 MAAS-2与环肽表位的结合:将重组301-17 IgG1固定在MAAS-2传感器芯片上,并测试在pH 6.5,7.5或8.0下与偶联于BSA的SEQ ID NO:2的环肽的结合。在所有3种pH条件下,对于301-17IgG1观察到等效的高水平结合(~400BRU)。在对照小鼠IgG或pan-A β 6E10抗体(Biolegend)的任何pH条件下检测到很少或没有结合。

[0388] 实施例6

[0389] 寡聚体增殖的抑制

[0390] 通过使用硫磺素T(ThT)结合测定检查它们对淀粉样蛋白 β (A β)聚集的影响,以体外测试抗体的生物学功能。A β 聚集由预先形成的小A β 寡聚体的细胞核诱导并增殖,从单体A β 到可溶性寡聚体到不溶性原纤维的完整过程伴随着 β 片形成的同时增加。这可以通过ThT(苯并噻唑盐)监测,当与 β 片富集结构结合并且导致荧光增加时,其激发和发射最大值分别从385nm变化到450nm和445nm变化到482nm。简而言之,将A β 1-42(Bachem Americas Inc., Torrance, CA)溶解,超声处理,在Tris-EDTA缓冲液(pH7.4)中稀释,并加入黑色96孔微量滴定板(Greiner Bio-One, Monroe, NC),其中加入了等体积的环肽产生的抗体或不相关的小鼠IgG抗体同种型对照,导致A β 1-42肽与抗体的摩尔比为1:5。加入ThT并将板在室温下温育24小时,使用Wallac Victor3v 1420 Multilabel Counter(PerkinElmer, Waltham, MA)每小时记录ThT荧光测量(在440nm处激发,在486nm处发射)。从所有孔中减去来自背景缓冲液的荧光读数,并从相应的孔中进一步减去仅来自抗体孔的读数。

[0391] 通过ThT荧光监测的A β 42聚集显示出S形形状,其特征是具有最小荧光的初始滞后期,具有荧光快速增加的指数期以及最终A β 分子种类处于平衡且在此期间荧光没有增加的平稳期。A β 42与不相关的小鼠抗体的共温育对聚集过程没有任何显著影响。相反,A β 42与测试抗体的共温育完全抑制了聚集过程的所有阶段。用抗体301-11获得的结果显示在图1中。

[0392] 用301-17以及301-3获得几乎相同的结果。

[0393] 由于ThT聚集测定模拟来自在AD发病机理中起关键作用的单体,寡聚体,原纤维和纤维的A β 增殖和聚集的体内生物物理/生物化学阶段,因此抗体显示出完全消除该过程的潜力。使用小鼠IgG对照抗体进行的同种型对照显示无抑制。

[0394] 实施例7

[0395] 毒性抑制试验

[0396] 可以在大鼠初级皮质神经元测定中测试抗体对A- β 42寡聚体的毒性的抑制。

[0397] 将抗体和对照IgG各自调节至例如2mg/mL的浓度。测试各种摩尔比的A- β 寡聚体和抗体以及载体对照,单独的A- β 寡聚体和阳性对照例如神经保护肽humanin HNG。

[0398] 表9中示出了示例性设置。

[0399] 在室温下预温育10分钟后,用培养基将体积调节至840微升。将溶液在37°C下温育5分钟。然后将溶液直接加入原代皮质神经元中,并将细胞培养24小时。可以使用MTT测定来确定细胞活力。

[0400] 表9

[0401]

A β O/MAB 摩尔比	A β O (μ L)	A β O (μ M)	AB (μ M)	AB (μ L)	培养基(μ L)	终体积(μ L)
5/1	1.68	4.2	0.84	12.73	185.6	200
1/1	1.68	4.2	4.20	63.64	134.7	200
1/2	1.68	4.2	8.4	127.27	71.1	200

[0402]

A β O 工作溶液 2.2mg/mL - 500 μ M

[0403]

CTRL 载体: 1.68 μ L 的寡聚体缓冲液+ 127.3 μ L PBS + 711 μ L 培养基CTRL A β O: 1.68 μ L 的 A β O + 127.3 μ L PBS + 711 μ L 培养基CTRL HNG: 1.68 μ L 的 A β O + 8.4 μ L HNG (100nM 最终) + 127.3 μ L PBS + 702.6 μ L 培养基

[0404] 在不存在A- β 寡聚体的情况下,单独的301-17抗体对神经元细胞活力没有影响。当在A- β 寡聚体存在下温育时,抗体在所测试的所有摩尔比下抑制A- β 寡聚体诱导的神经元死亡

[0405] 实施例8

[0406] 体内毒性抑制试验

[0407] 可以在小鼠行为测定中体内测试抗体对A- β 42寡聚体的毒性的抑制。

[0408] 新型物体识别 (NOR)

[0409] 新物体识别 (NOR) 模型利用啮齿动物的正常行为来研究新物体的时间比已知物体长得多。该测试评估物品的识别记忆,其人体等效物是视觉成对比较 (VPC)。物体的识别是由啮齿动物,灵长类动物和人类的外周皮层介导的。AD病理学首先发生在海马体前的外周和内嗅皮层。VPC任务检测轻度认知障碍 (MCI) 中的记忆缺陷,并且通过该任务预测从MCI到AD的转换 (16)。

[0410] 结果:

[0411] 通过 (SynAging SAS, Vandoeuvre-lès-Nancy, France) 进行测定。在第0天,在载体 (PBS) 或抗体301-17的存在下,每组12只C57BL6J小鼠 (11-12周龄) 用载体 (用于A β 寡聚化的缓冲液) 或A β O (50皮摩尔) 进行ICV注射。通过在+7和+8天进行的新物体识别 (NOR) 测试确定所有小鼠的表现。

[0412] 对操作者盲性进行的研究涉及总共48只小鼠,分成4个实验组,每个实验组12只小鼠。所有动物在不存在或存在抗体的情况下接受单次 (和单侧) ICV注射载体OR A β ,总体积为5 μ L。实验组定义如下:

[0413] • A组 (载体CTRL): ICV注射载体 (n=12)

[0414] • B组 (A β O CTRL): ICV注射A β O (n=12)[0415] • C组 (抗体CTRL): ICV注射A β O+抗体 (n=12)[0416] • D组 (治疗): ICV注射A β O+抗体 (n=12)[0417] 在ICV注射之前,将4 μ L抗体1 (即112皮摩尔) 在室温下与1 μ L载体 (即用于A β 寡聚化

的缓冲液)或对应于抗体/A β 0摩尔比为2.24的1 μ L A β 0 (50皮摩尔)一起温育30分钟。

[0418] 在第0天,小鼠在载体或抗体的存在下接受单次5 μ L ICV注射载体或A β 。

[0419] 在+7和+8天在一个试验中对所有48只小鼠进行NOR试验。在认知测试前一天(即在+7天),小鼠在10分钟试验期间习惯,在此期间将它们置于空旷的场地中。在认知测试的那天(即+8天),将动物置于相同的场地中并且允许自由探索两个相同的物体以进行五分钟的试验(获得试验)。然后将动物放回其笼子中,进行五分钟的审判时间。在保留试验期间,允许动物探索两个不同的物体:相同的熟悉物体和一个新物体。在此期间,实验者对治疗盲性,记录了鼠标主动探索每个物体的时间。所有试验均录像(Smart v3.0软件,Bioseb)。然后生成鉴别指数(DI): $DI = (\text{探索新物体的时间} - \text{探索熟悉物体的时间}) / \text{总探索时间}$ 。如果总探索时间 ≤ 5 秒,则将动物排除在鉴别指数和统计分析的计算之外。

[0420] 来自载体对照组的小鼠(A组)表现出正常行为,平均鉴别指数为 0.443 ± 0.053 。这些结果与SynAging中类似对照组的先前观察结果一致。正如预期的那样,与载体对照小鼠相比,单次ICV注射A β 0(B组)导致认知表现的显著损害($p < 0.0001$);平均鉴别指数为 -0.062 ± 0.048 。A β 注射的小鼠不能鉴别新物体和熟悉物体。

[0421] 发现在载体存在下给予抗体的小鼠(C组)表现出正常的认知表现,平均鉴别指数为 0.439 ± 0.049 。这些小鼠与载体对照小鼠没有显著差异($p = 0.9163$),并且与注射A β 0的小鼠显著不同($p < 0.0001$)。

[0422] 当与A β 0共注射时,抗体在NOR测试中完全阻止A β 0诱导的认知缺陷。实际上,来自D组的小鼠表现出 0.481 ± 0.055 的平均鉴别指数,与对照小鼠没有差异($p = 0.6126$),但与注射A β 0的小鼠不同($p = 0.0002$)。总之,数据表明抗体301-17提供了针对A β 0诱导的认知缺陷的保护。

[0423] 突触标记

[0424] 除了行为测定之外,可以收集脑组织并分析突触标记(PSD95,SNAP25,突触素)和炎症标记(IL-1- β 和TNF- α)的水平。在ICV注射寡聚体后约14天处死小鼠并用盐水灌注。收集海马体,快速冷冻并储存在 -80°C 直至分析。通过BCA测定均质样品的蛋白质浓度。使用ELISA试剂盒(Cloude-Clone Corp,USA)测定突触标记的浓度。通常,在注射A- β 寡聚体的小鼠中突触标记减少25-30%,并通过人阳性对照恢复至90-100%。在注射A- β 寡聚体的小鼠中,IL-1- β 炎症标记的浓度增加约3倍,并且这种增加在很大程度上被人胰岛素阻止。

[0425] 从经历行为测试的小鼠收集脑。

[0426] 解剖海马体(记忆形成的相关结构)并在含有抗蛋白酶混合物的RIPA缓冲液中匀浆。通过在液氮和 37°C 水浴中进行的3次冷冻融化循环裂解组织。离心后回收上清液。

[0427] 可以分析裂解物的TNF- α 水平(随炎症增加)和突触标记PSD-95和SNAP-25的水平(其在存在突触损伤时下降)。

[0428] 抗体在行为测定中显示出完全保护。预计大脑也将显示SNAP25和PSD-95水平的改善以及脑中TNF- α 水平的降低。

[0429] 实施例9

[0430] 体内繁殖抑制测定

[0431] 可以在阿尔茨海默氏病(AD)的各种啮齿动物模型中研究A- β 毒性寡聚体的体内增殖和相关病理学。例如,转基因人APP(例如APP23小鼠)或人APP和PSEN1(APPPS1小鼠)的小

鼠表达升高水平的A- β 并且随着年龄伴随炎症和神经元损伤表现出逐渐的淀粉样蛋白沉积。含有寡聚体的脑提取物的脑内接种可以显著加速这一过程(13,14)。这些模型提供了研究通过脑内或全身施用的测试抗体抑制A- β 寡聚体增殖的系统。

[0432] 表10A- β 序列和化合物

[0433] 1)

[0434] HHQK (SEQ ID NO:7)

[0435] CGHHQKG,环(CGHHQKG) (SEQ ID NO:12)

[0436] 表11

[0437] 人A- β 1-42

[0438] DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA (SEQ ID NO:73)

[0439] 虽然已经参考目前被认为是优选实施例的内容描述了本申请,但应理解,本申请不限于所公开的实施例。相反,本申请旨在涵盖包含在所附权利要求的精神和范围内的各种修改和等同布置。

[0440] 所有出版物、专利和专利申请通过引用整体并入本文,其程度如同每个单独的出版物、专利或专利申请被具体和单独地指出通过引用整体并入。具体地,与本文提供的每个登录号相关的序列包括例如表或其它地方提供的登录号和/或生物标记序列(例如蛋白质和/或核酸),其通过引用整体并入本文。

[0441] 权利要求的范围不应受优选实施方式和示例的限制,而应给出与整个描述一致的最广泛解释。

[0442] 本说明书中引用的参考文献引用

[0443] [1]Gabriela A.N.Crespi,Stefan J.Hermans,Michael W.Parker和Luke A.Miles.Molecular basis for mid-region amyloid- β capture by leading Alzheimer's disease immunotherapies SCIENTIFIC REPORTS|5:9649,2015|DOI:10.1038/srep09649.

[0444] [2]Vincent J.Hilser和Ernesto Freire.Structure-based calculation of the equilibrium folding pathway of proteins.correlation with hydrogen exchange protection factors.J.Mol.Biol.,262:756-772,1996.The COREX approach.

[0445] [3]Samuel I.A.Cohen等人,Proliferation of amyloid- β 42 aggregates occurs through a secondary nucleation mechanism.Proc.Natl.l Acad.Sci.USA,110(24):9758-9763,2013.

[0446] [4]Pietro Sormanni,Francesco A.Aprile和Michele Vendruscolo.The camsol method of rational design of protein mutants with enhanced solubility.J of Mol Biol,427(2):478-490,2015.

[0447] [5]Deborah Blacker,MD,ScD;Marilyn S.Albert,PhD;Susan S.Bassett,PhD;Rodney C.P.Go,PhD;Lindy E.Harrell,MD,PhD;Marshai F.Folstein,MD Reliability and Validity of NINCDS-ADRDA Criteria for Alzheimer's Disease The National Institute of Mental Health Genetics Initiative.Arch Neurol.1994;51(12):1198-1204.doi:10.1001/archneur.1994.00540240042014.

[0448] [6]Hamley,I.W.PEG-Peptide Conjugates 2014;15,1543-1559;dx.doi.org/

10.1021/bm500246w

[0449] [7]Roberts,MJ等人,Chemistry for peptide and protein PEGylation 64: 116-127.

[0450] [8]J.X.Lu,W.Qiang,W.M.Yau,C.D.Schwieters,S.C.Meredith,R.Tycko, MOLECULAR STRUCTURE OF BETA-AMYLOID FIBRILS IN AD BRAIN TISSUE.CELL Vol.154p.1257 (2013)

[0451] [9]Y.Xiao,B.MA,D.McElheny,S.Parthasarathy,F.Long,M.Hoshi,R.Nussinov, Y.Ishii,A BETA(1-42) FIBRIL STRUCTURE ILLUMINATES SELF-RECOGNITION AND REPLICATION OF AMYLOID IN ALZHEIMER'S DISEASE.NAT.STRUCT.MOL.BIOL.Vol.22p.499 (2015) .

[0452] [10]A.Petkova,W.Yau,R.Tycko EXPERIMENTAL CONSTRAINTS ON QUATERNARY STRUCTURE IN ALZHEIMER'S BETA-AMYLOID FIBRILS BIOCHEMISTRY V.45 498 2006.

[0453] [11]Giulian D,Haverkamp LJ,Yu J,Karshin W,Tom D,Li J,Kazanskaia A, Kirkpatrick J,Rohrer AE.The HHQK domain of β -amyloid provides a structural basis for the immunopathology of Alzheimer's disease,J.BiolChem.1998,273(45) , 29719-26.

[0454] [12]Winkler K,Scharnagl H,Tisljar U,Hoschützky H,Friedrich I,Hoffmann MM,Hüttinger M,Wieland H,März W.Competition of A β amyloid peptide and apolipoprotein E for receptor-mediated endocytosis.J.Lipid Res.1999,40(3) , 447-55.

[0455] [13]SCIENTIFIC REPORTS|5:9649|DOI:10.1038/srep09649|.

[0456] [14]Yu YZ,Wang WB,Chao A,Chang Q,Liu S,Zhao M等人,Strikingly reduced amyloid burden and improved behavioral performance in Alzheimer's disease mice immunized with recombinant chimeric vaccines by hexavalent foldable Ab 1-15 fused to toxin-derived carrier proteins.J Alzheimer's Dis 2014;41:243-60.

[0457] [15]Wang,HC;Yu,YZ;Liu,S;Zhao,M和Q Xu,Peripherally administered sera antibodies recognizing amyloid-oligomers mitigate Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline in aged 3 \times Tg-AD mice,Vaccine 2016.

[0458] [16]Zola SM,Manzanares CM,Clopton P,Lah JJ,Levey AI.A behavioral task predicts conversion to mild cognitive impairment and Alzheimer's disease.Am J Alzheimer's Dis&other dementia.2013,28(2) ,1790184.

序列表

<110> 英属哥伦比亚大学

<120> 用于A β 的抗体

<130> 7685-P50442PC01

<150> 62/363566

<151> 2016-07-18

<150> PCT/CA2016/051303

<151> 2016-11-09

<150> 62/507587

<151> 2017-05-17

<150> 62/507633

<151> 2017-05-17

<160> 95

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 1

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr

1 5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 2

Ile Ser Asp Gly Gly Ser Tyr Thr

1 5

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 3

Ala Arg Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Thr Ser Gly Phe Ala Tyr

1 5 10 15

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 4

Gln Ser Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr

1 5 10

<210> 5

<211> 3

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 5

Trp Ala Ser

1

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 6

Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Tyr Thr

1 5

<210> 7

<211> 4

<212> PRT

<213> 智人

<400> 7

His His Gln Lys

1

<210> 8

<211> 426

<212> DNA

<213> 小家鼠

<400> 8

atgaactttg ggctcagctt gattttcett gtccttgttt taaaagggtg ccagtgtgaa 60

gtgcagctgg tggagtctgg gggaggetta gtgaagcctg gagggtcctt gaaactctcc 120

tgtgcagcct ctggattcac tttcagtac tattacatgt attgggttcg ccagactccg 180

gaaaagaggc tggagtgggt cgcaaccatt agtgatggtg gtagttacac ctctatcca 240

gacagtgtga agggacgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacaa cctgtacctg 300

caaatgagca gtctgaggtc tgaggacaca gccatgtatt actgtgcaag agattactac 360

ggtagtagta gctacacctc gggctttgct tactggggcc aagggactct ggtcactgtc 420

tctgca 426

<210> 9

<211> 142

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 9

```

Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Val Leu Val Leu Lys Gly
1           5           10           15
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
           20           25           30
Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
           35           40           45
Ser Asp Tyr Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu
           50           55           60
Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Asp Gly Gly Ser Tyr Thr Ser Tyr Pro
65           70           75           80
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
           85           90           95
Asn Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met
           100          105          110
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Thr Ser Gly
           115          120          125
Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
           130          135          140

```

<210> 10

<211> 396

<212> DNA

<213> 小家鼠

<400> 10

```

atggattcac aggccaggt tcttatattg ctgctgctat gggtatctgg tacctgtggg 60
gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt caacaggaga gaaggtcact 120
atgagctgca aatccagtc gagtctgctc aacagtagaa cccgaaagaa ctacttggct 180
tggtaccagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tctactgggc atccactagg 240
gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 300
atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gcaagcaatc ttataatctg 360
tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa 396

```

<210> 11

<211> 132

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 11

Met Asp Ser Gln Ala Gln Val Leu Ile Leu Leu Leu Leu Trp Val Ser
 1 5 10 15
 Gly Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala
 20 25 30
 Val Ser Thr Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
 35 40 45
 Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
 50 55 60
 Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
 65 70 75 80
 Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 85 90 95
 Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr
 100 105 110
 Tyr Cys Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 115 120 125
 Leu Glu Ile Lys
 130

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工构建体

<400> 12

Cys Gly His His Gln Lys Gly

1 5

<210> 13

<211> 366

<212> DNA

<213> 小家鼠

<400> 13

cagggtccaac tgcagcagcc tggggctgag cttgtgaagc ctggggcttc agtgaagatg 60
 tcctgcaagg cttctggatt cactttcagt gactattaca taaactgggt gaagcagagg 120
 cctggacaag gccttgagtg gattggagat attagtgatg gtggtagtta cacctacaat 180
 gctaagtcca agagcaaggc cacactgact ctggacacat cctccagcac agcctacatg 240
 cagctcagca gcctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag agattactac 300
 ggtagtagta gctacacctc gggctttgct tactggggcg caggcaccac ggtcaccgtc 360
 tcctca 366

<220>

<223> 合成构建体

<400> 16

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

<210> 17

<211> 366

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 17

caggtccaac tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggccttc agtgaagatg 60
 tcctgcaagg cttctggatt cactttcagt gactattaca taaactgggt gaagcagagg 120
 cctggacaag gccttgagtg gattggagat attagtgatg gtggtagtta cacctacaat 180
 gctaagttca agagcagagc cacaactgact ctggacacat ccataagcac agcctacatg 240
 gagctcagca gcctgagatc tgaggacacg gcggtctatt actgtgcaag agattactac 300
 ggtagtagta gctacacctc gggctttgct tactggggcc aaggcaccac ggtcaccgtc 360
 tcctca 366

<210> 18

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 18

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

<210> 19

<211> 366

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 19

caggccaac tgggtcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcttc agtgaaggtg 60
 tcctgcaagg cttctggatt cactttcagt gactattaca taaactgggt gcgacagagg 120
 cctggacaag gccttgagtg gattggagat attagtgatg gtggtagtta cacctacaat 180
 gctaagttca agagcagagc cacactgact ctggacacat ccataagcac agcctacatg 240
 gagctcagca gcctgagatc tgaggacacg gcggtctatt actgtgcaag agattactac 300
 ggtagtagta gctacacctc gggctttgct tactggggcc aaggcaccac ggtcaccgtc 360
 tcctca 366

<210> 20

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 20

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

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

<210> 21

<211> 366

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 21

cagggtccaac tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggccttc agtgaaggtg 60
tcctgcaagg cttctggatt cactttcagt gactattaca taaactgggt gcgacagagg 120
cctggacaag gccttgagtg gattggagat attagtgatg gtggtagtta cacctacaat 180
gctaagttca agagcagagt cacactgact ctggacacat ccataagcac agcctacatg 240
gagctcagca gcctgagatc tgaggacacg gcggtctatt actgtgcaag agattactac 300
ggtagtagta gctacacctc gggctttgct tactggggcc aaggcaccac ggtcaccgtc 360
tcctca 366

<210> 22

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 22

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala			
1	5	10	15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr			

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

<210> 23

<211> 366

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 23

cagggtccaac tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggccttc agtgaaggtg 60
tcctgcaagg cttctggatt cactttcagt gactattaca taaactgggt gcgacagagg 120
cctggacaag gccttgagtg gatgggagat attagtgatg gtggtagtta cacctacaat 180
gctaagttca agagcagagt cacactgact agggacacat ccataagcac agcctacatg 240
gagctcagca gcctgagatc tgaggacacg gcggtctatt actgtgcaag agattactac 300
ggtagtagta gctacacctc gggctttgct tactggggcc aaggcaccac ggtcaccgtc 360
tcctca 366

<210> 24

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 24

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30
Tyr Ile Asn Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35	40	45
Gly Asp Ile Ser Asp Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Asn Ala Lys Phe Lys		
50	55	60
Ser Arg Val Thr Leu Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met		
65	70	75
Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala		
85	90	95
Arg Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Thr Ser Gly Phe Ala Tyr Trp		
100	105	110
Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser		
115	120	

<210> 25

<211> 366

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 25

cagggtccaac tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggccttc agtgaaggtg 60
 tcctgcaagg cttctggatt cactttcagt gactattaca taaactgggt gcgacagagg 120
 cctggacaag gccttgagtg gatgggagat attagtgatg gtggtagtta cacctacaat 180
 gctaagttcc agggcagagt cacaatgact aggacacat ccataagcac agcctacatg 240
 gagctcagca gcctgagatc tgaggacacg gcggtctatt actgtgcaag agattactac 300
 ggtagtagta gctacacctc gggctttgct tactggggcc aaggcaccac ggtcaccgtc 360
 tcctca 366

<210> 26

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 26

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30
Tyr Ile Asn Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Asp Ile Ser Asp Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Asn Ala Lys Phe Gln

50	55	60
Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met		
65	70	75
Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala		
85	90	95
Arg Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Thr Ser Gly Phe Ala Tyr Trp		
100	105	110
Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser		
115	120	
<210> 27		
<211> 336		
<212> DNA		
<213> 小家鼠		
<400> 27		
gatgttttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60		
atctcttgca gatctagtca gagtctgtc aacagtagaa cccgaaagaa ctacttagaa 120		
tggtacctgc agaaaccagg ccagtctcca aagctcctga tctactgggc atccaaccga 180		
ttttctgggg tcccagacag gttcagtggc agtggatcag ggacagattt cacactcaag 240		
atcagcagag tggaggctga ggatctggga gtttattact gcaagcaatc ttataatctg 300		
tacacgtttg gcagcgggac caagctggag atcaaa 336		
<210> 28		
<211> 112		
<212> PRT		
<213> 小家鼠		
<400> 28		
Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly		
1	5	10
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser		
20	25	30
Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln		
35	40	45
Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val		
50	55	60
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys		
65	70	75
Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Lys Gln		
85	90	95
Ser Tyr Asn Leu Tyr Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
100	105	110

<210> 29

<211> 336

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 29

```
gatgttttga tgacccaatc tccactctcc ctgcctgtca cccttggaca gccggcctcc 60
atctcttgca gatctagtca gagtctgctc aacagtagaa cccgaaagaa ctacttagaa 120
tggtttcagc agaaaccagg ccagtctcca aggcgctga tctactgggc atccaaccga 180
ttttctgggg tcccagacag gttcagtggc agtggatcag ggacagattt cacactcaag 240
atcagcagag tggaggetga ggatgttga gtttattact gcaagcaatc ttataatctg 300
tacacgtttg gccaaaggac caagctggag atcaaa 336
```

<210> 30

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 30

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

<210> 31

<211> 336

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 31

```
gatgttgtga tgaccaatc tccactctcc ctgcctgtca cccttggaca gccggcctcc 60
atctctttgca gatctagtca gagtctgctc aacagtagaa cccgaaagaa ctacttagaa 120
tggtttcagc agaaaccagg ccagtctcca aggcgctga tctactgggc atccaaccga 180
ttttctgggg tcccagacag gttcagtggc agtggatcag ggacagattt cacactcaag 240
atcagcagag tggaggctga ggatgttga gtttattact gcaagcaatc ttataatctg 300
tacacgtttg gccaaaggac caagctggag atcaaa 336
```

<210> 32

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 32

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

<210> 33

<211> 336

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 33

```
gatgttgtga tgaccaatc tccactctcc ctgcctgtca cccttggaca gccggcctcc 60
atctctttgca gatctagtca gagtctgctc aacagtagaa cccgaaagaa ctacttagaa 120
tggtttcagc agaggccagg ccagtctcca aggcgctga tctactgggc atccaaccga 180
```

ttttctgggg tcccagacag gttcagtggc agtggatcag ggacagattt cacactcaag 240
atcagcagag tggaggctga ggatgttgga gtttattact gcaagcaatc ttataatctg 300
tacacgtttg gccaaaggac caagctggag atcaaa 336

<210> 34

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 34

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

<210> 35

<211> 336

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 35

gatgttctga tgacccaatc tccactetec ctgectgtca cccttggaca gccggcctcc 60
atctcttgca gatctagtca gagtctgctc aacagtagaa cccgaaagaa ctacttagaa 120
tggtacctgc agaggccagg ccagtetcca aagctgctga tctactgggc atccaaccga 180
ttttctgggg tcccagacag gttcagtggc agtggatcag ggacagattt cacactcaag 240
atcagcagag tggaggctga ggatgttgga gtttattact gcaagcaatc ttataatctg 300
tacacgtttg gccaaaggac caagctggag atcaaa 336

<210> 36

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 36

```

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

```

<210> 37

<211> 336

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 37

```

gatgttctga tgacccaatc tccactctcc ctgcctgtca cccttggaca gccggcctcc 60
atctcttgca gatctagtca gagtctgctc aacagtagaa cccgaaagaa ctacttagaa 120
tggtaccagc agaggccagg ccagtctcca aggetgctga tctactgggc atccaaccga 180
ttttctgggg tcccagacag gttcagtggc agtggatcag ggacagattt cacactcaag 240
atcagcagag tggaggctga ggatgttgga gtttattact gcaagcaatc ttataatctg 300
tacacgtttg gccaaaggac caagctggag atcaaa 336

```

<210> 38

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 38

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

<210> 39

<211> 336

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 39

gatgttgtga tgaccaatc tccactctcc ctgcctgtca cccttggaca gccggcctcc 60
 atctcttgca gatctagtca gagtctgctc aacagtagaa cccgaaagaa ctacttagaa 120
 tgggtaccagc agaggccagg ccagtctcca aggctgctga tctactgggc atccaaccga 180
 ttttctgggg tcccagacag gttcagtggc agtggatcag ggacagattt cacactcaag 240
 atcagcagag tggaggctga ggatgttgga gtttattact gcaagcaatc ttataatctg 300
 tacacgtttg gccaaggac caagctggag atcaaa 336

<210> 40

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 40

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30
 Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln

35	40	45
Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val		
50	55	60
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys		
65	70	75
Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Lys Gln		
85	90	95
Ser Tyr Asn Leu Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
100	105	110

<210> 41

<211> 360

<212> DNA

<213> 小家鼠

<400> 41

```

caggccaac tgcagcagcc tggggctgag cttgtgaagc ctggggcttc agtgaagatg 60
tcctgcaagg cttctggcta cagcttcacc agctactgga taaactgggt gaagcagagg 120
cctggacaag gccttgagtg gattggagat gtgcatcctg gtagaggcgt gtccacatac 180
aatgctaagt tcaagagcaa ggccacactg actctggaca catcctccag cacagcctac 240
atgcagctca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtag cagatcccat 300
ggtaacacct actggttttt tgacgtctgg ggcgcaggca ccacggtcac cgtctctctca 360

```

<210> 42

<211> 120

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 42

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 43

<211> 360

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 43

cagggtccaac tgggtgcagtc tggggctgag cttaagaagc ctggggccttc agtgaagatg 60
tcctgcaagg cttctggcta cagcttcacc agctactgga taaactgggt gaagcagagg 120
cctggacaag gccttgagtg gattggagat gtgcatectg gtagaggcgt gtccacatac 180
aatgctaagt tcaagagcag agccacactg actctggaca catccataag cacagcctac 240
atgcagctca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtag cagatcccat 300
ggtaacacct actggttttt tgacgtctgg ggccaaggca ccacggtcac cgtctcctca 360

<210> 44

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 44

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

<210> 45

<211> 360

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 45

```
cagggtccaac tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggccttc agtgaagatg 60
tcctgcaagg cttctggcta cagcttcacc agctactgga taaactgggt gaagcagagg 120
cctggacaag gccttgagtg gattggagat gtgcatcctg gtagaggcgt gtccacatac 180
aatgctaagt tcaagagcag agccacactg actctggaca catccataag cacagcctac 240
atggagctca gcagcctgag atctgaggac acggcggctt attactgtag cagatcccat 300
ggtaacacct actggttttt tgacgtctgg ggccaaggca ccacggtcac cgtctcctca 360
```

<210> 46

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 46

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

<210> 47

<211> 360

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 47

cagggtccaac tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggccttc agtgaaggtg 60
tcctgcaagg cttctggcta cagcttcacc agctactgga taaactgggt gcgacagagg 120
cctggacaag gccttgagtg gattggagat gtgcattctg gtagaggcgt gtccacatac 180
aatgctaagt tcaagagcag agccacactg actctggaca catccataag cacagcctac 240
atggagctca gcagcctgag atctgaggac acggcggctt attactgtag cagatcccat 300
ggtaacacct actggttttt tgacgtctgg ggccaaggca ccacggtcac cgtctcctca 360

<210> 48

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 48

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

<210> 49

<211> 360

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 49

cagggtccaac tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcttc agtgaaggtg 60
 tcctgcaagg cttctggcta cagcttcacc agctactgga taaactgggt gcgacagagg 120
 cctggacaag gccttgagtg gattggagat gtgcatcctg gtagaggcgt gtccacatac 180
 aatgctaagt tcaagagcag agtcacactg actctggaca catccataag cacagcctac 240
 atggagctca gcagcctgag atctgaggac acggcgggtct attactgtag cagatcccat 300
 ggtaacacct actggttttt tgacgtctgg ggccaaggca ccacggtcac cgtctcctca 360

<210> 50

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 50

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

<210> 51

<211> 360

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 51

cagggtccaac tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcttc agtgaaggtg 60
 tcctgcaagg cttctggcta cagcttcacc agctactgga taaactgggt gcgacagagg 120
 cctggacaag gccttgagtg gatgggagat gtgcatcctg gtagaggcgt gtccacatac 180

aatgctaagt tcaagagcag agtcacactg actagggaca catccataag cacagcctac 240
 atggagctca gcagcctgag atctgaggac acggcggctct attactgtag cagatcccat 300
 ggtaacacct actgggttttt tgacgtctgg ggccaaggca ccacggtcac cgtctcctca 360

<210> 52

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 52

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

<210> 53

<211> 360

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 53

caggccaac tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcttc agtgaaggtg 60
 tcctgcaagg cttctggcta cagcttcacc agctactgga taaactgggt gcgacagagg 120
 cctggacaag gccttgagtg gatgggagat gtgcatcctg gtagaggcgt gtccacatac 180
 aatgctaagt tccagggcag agtcacaatg actagggaca catccataag cacagcctac 240
 atggagctca gcagcctgag atctgaggac acggcggctct attactgtag cagatcccat 300
 ggtaacacct actgggttttt tgacgtctgg ggccaaggca ccacggtcac cgtctcctca 360

<210> 54

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 54

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

<210> 55

<211> 336

<212> DNA

<213> 小家鼠

<400> 55

gatgtttttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60
 atctctttgca gatctagtca gagcattgta catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg 120
 tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctctgatctt acaaagtttc caaccgattt 180
 tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
 agcagagtgg aggctgagga tctggggagt tattactgct ttcaaggttc acatgttcct 300
 ttcaacttttg gcagcgggac caagctggag atcaaa 336

<210> 56

<211> 112

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 56

Asp Val Leu 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 Ile Val His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu 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 Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95
 Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 57

<211> 336

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 57

gatgtttttga tgaccaaatc tccactctcc ctgcctgtca cccttggaca gccggcctcc 60
 atctcttgca gatctagtca gagcattgta catagtaatg gaaacaccta ttagaatgg 120
 tttcagcaga aaccaggcca gtctccaagg cgctgatct acaaagtffc caaccgattt 180
 tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
 agcagagtgg aggctgagga tgttggagtt tattactgct ttcaaggttc acatgttcct 300
 ttcacttttg gccaaaggac caagctggag atcaaa 336

<210> 58

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 58

Asp Val Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95
 Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 61

<211> 336

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 61

gatgttgtga tgacccaatc tccactctcc ctgcctgtca cccttggaca gccggcctcc 60
 atctcttgca gatctagtca gagcattgta catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg 120
 tttcagcaga ggccaggcca gtctccaagg cgcctgatct acaaagtttc caaccgattt 180
 tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
 agcagagtgg aggctgagga tgttggagtt tattactgct ttcaaggttc acatgttcct 300
 ttcacttttg gccaaaggac caagctggag atcaaa 336

<210> 62

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 62

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

<210> 63

<211> 336

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 63

```
gatgttctga tgacccaatc tccactctcc ctgcctgtca cccttggaca gccggcctcc 60
atctcttgca gatctagtca gagcattgta catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg 120
tacctgcaga ggccaggcca gtctccaaag ctgctgatct acaaagtttc caaccgattt 180
tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
agcagagtgg aggctgagga tgttggagtt tattactgct ttcaaggttc acatgttctt 300
ttcacttttg gccaaaggac caagctggag atcaaa 336
```

<210> 64

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 64

```
Asp Val Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1           5           10           15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
          20           25           30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Arg 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 Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
          85           90           95
Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
          100          105          110
```

<210> 65

<211> 336

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 65

gatgttctga tgaccaatc tccactctcc ctgcctgtca cccttggaca gccggcctcc 60
atctcttgca gatctagtca gagcattgta catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg 120
taccagcaga ggccaggcca gtctccaagg ctgctgatct acaaagtttc caaccgattt 180
tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
agcagagtgg aggctgagga tgttggagtt tattactgct ttcaaggttc acatgttcct 300
ttcacttttg gccaaaggac caagctggag atcaaa 336

<210> 66

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 66

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

<210> 67

<211> 336

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 67

gatgttgtga tgaccaatc tccactctcc ctgcctgtca cccttggaca gccggcctcc 60
atctcttgca gatctagtca gagcattgta catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg 120
taccagcaga ggccaggcca gtctccaagg ctgctgatct acaaagtttc caaccgattt 180
tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240

agcagagtgg aggcctgagga tgttgaggtt tattactgct ttcaaggttc acatgttcct 300
ttcacttttg gccaaaggac caagctggag atcaaa 336

<210> 68

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 68

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

<210> 69

<211> 984

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 69

gcttccacca agggcccatc cgtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag 60
agcacagccg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 120
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgctg cacacettcc cggctgtcct acagtccctca 180
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc 240
tacacctgca atgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtcc 300
aaatatggtc ccccatgccc accatgccc gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc 360
ttcctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg 420
tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat 480
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac 540

cgtgtggtca gcgctcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 600
 tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtcc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 660
 gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccaggagga gatgaccaag 720
 aaccagggtca gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag 780
 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccggt gctggactcc 840
 gacggctcct tcttcctcta cagcaggcta accgtggaca agagcagggtg gcaggagggg 900
 aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc 960
 ctctccctgt ctctgggtaa atga 984

<210> 70

<211> 327

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 70

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	
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 Lys
 325

<210> 71

<211> 324

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 71

cgaactgtgg ctgcaccatc tgtcttcac ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct 60
 ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag 120
 tggaagggtg ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180
 agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240
 aaacacaaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag 300
 agcttcaaca ggggagagtg ttag 324

<210> 72

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 72

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> 73

<211> 42

<212> PRT

<213> 智人

<400> 73

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys			
1	5	10	15
Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile			
	20	25	30
Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala			
	35	40	

<210> 74

<211> 8

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 74

Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp	
1	5

<210> 75

<211> 9

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 75

Val His Pro Gly Arg Gly Val Ser Thr	
1	5

<210> 76

<211> 13

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 76

Ser Arg Ser His Gly Asn Thr Tyr Trp Phe Phe Asp Val

1 5 10

<210> 77

<211> 11

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 77

Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr

1 5 10

<210> 78

<211> 3

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 78

Lys Val Ser

1

<210> 79

<211> 9

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 79

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Phe Thr

1 5

<210> 80

<211> 16

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 80

Ala Arg Asp Tyr Tyr Gly Ser Asn Ser Tyr Thr Ser Gly Phe Ala Tyr

1 5 10 15

<210> 81

<211> 11

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 81

Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr

1 5 10

<210> 82

<211> 3

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 82

Lys Val Ser

1

<210> 83

<211> 9

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 83

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Leu Thr

1 5

<210> 84

<211> 426

<212> DNA

<213> 小家鼠

<400> 84

atgaacttcg ggctcagctt gattttcctt gtccttggtt taaaagggtg ccagtgtgaa 60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgaagcctg gagggtcctt gaaactctcc 120
tgtgcagcct ctggattcac tttcagtgac tattacatgt attgggttcg ccagactccg 180
gaaaagaggc tggagtgggt cgcaaccatt agtgatgggt gtagttacac ctcctatcca 240
gacagtgtga aggggcgatt caccatctcc agagacagtg ccaagaacaa cctgtacctg 300
caaatgagca gtctgaagtc tgaggacaca gccatgtatt actgtgcaag agattactac 360
ggtagtaata gttacacctc gggctttgct tactggggcc aagggactct ggtcactgtc 420
tctgca 426

<210> 85

<211> 142

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 85

Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Val Leu Val Leu Lys Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys

20 25 30

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

35	40	45
Ser Asp Tyr Tyr Met Tyr Trp	Val Arg Gln Thr Pro	Glu Lys Arg Leu
50	55	60
Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser	Asp Gly Gly Ser Tyr Thr	Ser Tyr Pro
65	70	75
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe	Thr Ile Ser Arg Asp Ser	Ala Lys Asn
85	90	95
Asn Leu Tyr Leu Gln Met Ser	Ser Leu Lys Ser Glu Asp	Thr Ala Met
100	105	110
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Tyr	Tyr Gly Ser Asn Ser Tyr	Thr Ser Gly
115	120	125
Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly	Thr Leu Val Thr Val	Ser Ala
130	135	140

<210> 86

<211> 396

<212> DNA

<213> 小家鼠

<400> 86

```

atggattcac aggccaggt tcttatattg ctgctgctat gggtatctgg tacctgtggg 60
gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggtcact 120
atgagctgca aatccagtc gagtctgctc aatagtagaa cccgaaagaa ctacttggct 180
tggtaccagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tctactgggc atccactagg 240
gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 300
atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gcaagcaatc ttataatctg 360
tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa 396

```

<210> 87

<211> 132

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 87

Met Asp Ser Gln Ala Gln Val	Leu Ile Leu Leu Leu Trp	Val Ser
1	5	10
Gly Thr Cys Gly Asp Ile Val	Met Ser Gln Ser Pro Ser	Ser Leu Ala
20	25	30
Val Ser Ala Gly Glu Lys Val	Thr Met Ser Cys Lys Ser	Ser Gln Ser
35	40	45
Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg	Lys Asn Tyr Leu Ala Trp	Tyr Gln Gln
50	55	60
Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys	Leu Leu Ile Tyr Trp	Ala Ser Thr Arg

65	70	75	80
Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp			
	85	90	95
Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr			
	100	105	110
Tyr Cys Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys			
	115	120	125
Leu Glu Ile Lys			

130

<210> 88

<211> 393

<212> DNA

<213> 小家鼠

<400> 88

```

atgaagttgc ctgttaggct gttggtgctg atgttctgga ttcttgcttc cagcagtgat 60
gttttgatga cccaaactcc actctccctg cctgtcagtc ttggagatca agcctccatc 120
tcttgcatat ctagtcagag cattgtacat agtaatggaa acacctatctt agaatggtac 180
ctgcagaaac caggccagtc tccaaagctc ctgatctaca aagtttccaa ccgattttct 240
ggggtcccag acaggttcag tggcagtggg tcagggacag atttcacact caagatcagc 300
agagtggagg ctgaggatct gggagtttat ttctgctttc aaggttcaca tgttcctctc 360
acgttcggtg ctgggaccaa gctggagctg aaa 393

```

<210> 89

<211> 131

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 89

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

100	105	110
Phe Gln Gly Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu		
115	120	125
Glu Leu Lys		
130		
<210> 90		
<211> 1338		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成构建体		
<400> 90		
caggtgcagc tgcagcagcc tggcgtgag ctggtgaagc ctggagcctc cgtgaagatg 60		
tcttgcaagg cctccggcta ctcttcacc agctactgga tcaactgggt gaagcagagg 120		
cccggacagg gcctggagtg gattggagac gtgcaccctg gccggggagt gtccacctac 180		
aacgccaagt tcaagtccaa ggccaccctg accctggaca cctccagctc caccgcctac 240		
atgcagctgt cctccctgac ctccgaggac tccgccgtgt actactgcag caggtccac 300		
ggcaacacct actggttttt cgacgtgtgg ggcgccgaa ccacagtgc cgtgtcctcc 360		
gcaaaaacga caccctcatc tgtctatcca ctggccctg gatctgtgc caaaactaac 420		
tccatggtga ccctgggatg cctggtcaag ggctatttcc ctgagccagt gacagtgacc 480		
tggaactctg gatccctgtc cagcgggtgt cacaccttcc cagctgtcct ggagtctgac 540		
ctctacactc tgagcagctc agtgactgtc ccctccagcc ctcgccccag cgagaccgtc 600		
acctgcaacg ttgcccaccc ggccagcagc accaagggtg acaagaaaat tgtgcccagg 660		
gattgtgggt gtaagccttg catatgtaca gtcccagaag tatcatctgt cttcatcttc 720		
ccccaaaagc ccaaggatgt gctcaccatt actctgactc ctaaggtcac gtgtgtttgtg 780		
gtagacatca gcaaggatga tcccagggtc cagttcagct ggttttaga tgatgtggag 840		
gtgcacacag ctgagacgca accccgggag gagcagttca acagcacttt ccgctcagtc 900		
agtgaacttc ccatcatgca ccaggactgg ctcaatggca aggagttcaa atgcagggtc 960		
aacagtgcag ctttccctgc ccccatcgag aaaaccatct ccaaaaccaa aggagaccg 1020		
aaggctccac aggtgtacac cattccacct cccaaggagc agatggccaa ggataaagtc 1080		
agtctgacct gcatgataac agactttctt cctgaagaca ttactgtgga gtggcagtg 1140		
aatgggcagc cagcggagaa ctacaagaac actcagccca tcatgaacac gaatggctct 1200		
tacttcgtct acagcaagct caatgtgcag aagagcaact gggaggcagg aaatactttc 1260		
acctgctctg tgttacatga gggcctgcac aaccaccata ctgagaagag cctctccac 1320		
tctcctggta aatgatga 1338		
<210> 91		
<211> 444		
<212> PRT		
<213> 人工序列		

<220>

<223> 合成构建体

<400> 91

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

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro		
290	295	300
Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val		
305	310	315 320
Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr		
	325	330 335
Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys		
	340	345 350
Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp		
	355	360 365
Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro		
	370	375 380
Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asn Thr Asn Gly Ser		
385	390	395 400
Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala		
	405	410 415
Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His		
	420	425 430
His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys		
	435	440

<210> 92

<211> 1356

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 92

```

caggtgcagc tgcagcagcc tggcgctgag ctggtgaagc ctggagcctc cgtgaagatg 60
tcctgcaagg cctccggcta ctccttcacc agctactgga tcaactgggt gaagcagagg 120
cccggacagg gcctggagtg gattggagac gtgcaccctg gccggggagt gtccacctac 180
aacgccaagt tcaagtccaa ggccaccctg acctggaca cctccagctc caccgcctac 240
atgcagctgt cctccctgac ctccgaggac tccgccgtgt actactgcag caggtccac 300
ggcaacacct actggttttt cgacgtgtgg ggcgccggaa ccacagtgc cgtgtcctcc 360
gcaaaaacaa cagccccatc ggtctatcca ctggcccctg tgtgtggaga tacaactggc 420
tcctcggatga ctctaggatg cctggtcaag ggttatttcc ctgagccagt gaccttgacc 480
tggaactctg gatccctgtc cagtgggtgtg cacaccttcc cagctgtcct gcagtctgac 540
ctctacaccc tcagcagctc agtgactgta acctcgagca cctggcccag ccagtccatc 600
acctgcaatg tggcccaccc ggcaagcagc accaaggtgg acaagaaaat tgagcccaga 660
gggcccacaa tcaagccctg tcctccatgc aaatgccag cacctaacct cttgggtgga 720

```

ccatccgtct tcattctccc tccaaagatc aaggatgtac tcatgatctc cctgagcccc 780
 atagtacat gtgtggtggt ggatgtgagc gaggatgacc cagatgtcca gatcagctgg 840
 tttgtgaaca acgtggaagt acacacagct cagacacaaa cccatagaga ggattacaac 900
 agtactctcc ggggtggtcag tgccctcccc atccagcacc aggactggat gagtggcaag 960
 gaggttcaaat gcaaggtcaa caacaaagac ctcccagcgc ccatcgagag aaccatctca 1020
 aaacccaaaag ggtcagtaag agtccacag gtatatgtct tgcctccacc agaagaagag 1080
 atgactaaga aacaggtcac tctgacctgc atggtcacag acttcatgcc tgaagacatt 1140
 tacgtggagt ggaccaacaa cgggaaaaca gagctaaact acaagaacac tgaaccagtc 1200
 ctggactctg atggttctta cttcatgtac agcaagctga gagtggaaaa gaagaactgg 1260
 gtggaaaagaa atagctactc ctgttcagtg gtccacgagg gtctgcacaa tcaccacagc 1320
 actaagagct tctcccggac tccgggtaaa tgatga 1356

<210> 93

<211> 450

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 93

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Pro	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Ser	Tyr
				20				25					30		
Trp	Ile	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
				35			40					45			
Gly	Asp	Val	His	Pro	Gly	Arg	Gly	Val	Ser	Thr	Tyr	Asn	Ala	Lys	Phe
				50			55				60				
Lys	Ser	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Leu	Asp	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr
65				70				75						80	
Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85				90					95		
Ser	Arg	Ser	His	Gly	Asn	Thr	Tyr	Trp	Phe	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Ala
				100				105					110		
Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Lys	Thr	Thr	Ala	Pro	Ser	Val
				115				120				125			
Tyr	Pro	Leu	Ala	Pro	Val	Cys	Gly	Asp	Thr	Thr	Gly	Ser	Ser	Val	Thr
				130				135				140			
Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Leu	Thr
145				150						155				160	
Trp	Asn	Ser	Gly	Ser	Leu	Ser	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val

				165			170				175				
Leu	Gln	Ser	Asp	Leu	Tyr	Thr	Leu	Ser	Ser	Ser	Val	Thr	Val	Thr	Ser
				180			185				190				
Ser	Thr	Trp	Pro	Ser	Gln	Ser	Ile	Thr	Cys	Asn	Val	Ala	His	Pro	Ala
				195			200				205				
Ser	Ser	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Ile	Glu	Pro	Arg	Gly	Pro	Thr	Ile
				210			215				220				
Lys	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Lys	Cys	Pro	Ala	Pro	Asn	Leu	Leu	Gly	Gly
225				230			235				240				
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Lys	Ile	Lys	Asp	Val	Leu	Met	Ile
				245			250				255				
Ser	Leu	Ser	Pro	Ile	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Glu	Asp
				260			265				270				
Asp	Pro	Asp	Val	Gln	Ile	Ser	Trp	Phe	Val	Asn	Asn	Val	Glu	Val	His
				275			280				285				
Thr	Ala	Gln	Thr	Gln	Thr	His	Arg	Glu	Asp	Tyr	Asn	Ser	Thr	Leu	Arg
				290			295				300				
Val	Val	Ser	Ala	Leu	Pro	Ile	Gln	His	Gln	Asp	Trp	Met	Ser	Gly	Lys
305				310			315				320				
Glu	Phe	Lys	Cys	Lys	Val	Asn	Asn	Lys	Asp	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu
				325			330				335				
Arg	Thr	Ile	Ser	Lys	Pro	Lys	Gly	Ser	Val	Arg	Ala	Pro	Gln	Val	Tyr
				340			345				350				
Val	Leu	Pro	Pro	Pro	Glu	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Lys	Gln	Val	Thr	Leu
				355			360				365				
Thr	Cys	Met	Val	Thr	Asp	Phe	Met	Pro	Glu	Asp	Ile	Tyr	Val	Glu	Trp
				370			375				380				
Thr	Asn	Asn	Gly	Lys	Thr	Glu	Leu	Asn	Tyr	Lys	Asn	Thr	Glu	Pro	Val
385				390			395				400				
Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Tyr	Phe	Met	Tyr	Ser	Lys	Leu	Arg	Val	Glu
				405			410				415				
Lys	Lys	Asn	Trp	Val	Glu	Arg	Asn	Ser	Tyr	Ser	Cys	Ser	Val	Val	His
				420			425				430				
Glu	Gly	Leu	His	Asn	His	His	Thr	Thr	Lys	Ser	Phe	Ser	Arg	Thr	Pro
				435			440				445				
Gly		Lys													
450															
<210>		94													
<211>		720													

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 94

```

atgaaactgc ccgtgaggct gctggtgctc atgttctgga tccctgcctc cagctccgat 60
gtgctgatga cccagacccc tctgtccctg cctgtgtccc tgggcgatca ggccagcatc 120
tcctgcaggt cctcccagtc catcgtgcac tccaacggca acacctacct ggagtggtag 180
ctgcagaagc ccggccagtc ccccaagctg ctgacttaca aggtgtccaa ccggttctcc 240
ggcgtgcccc ataggttctc cggatccggc tccggcaccg actttaccct gaagatctcc 300
agggtggagg ccgaggacct gggcgtgtac tactgttttc agggctccca cgtgcccttc 360
accttcggct ccggcaccaa gctggagatc aagcgggctg atgctgcacc aactgtatcc 420
atcttcccac catccagtga gcagttaaca tctggaggtg cctcagtcgt gtgtttcttg 480
aacaacttct accccaaaga catcaatgtc aagtgaaga ttgatggcag tgaacgacaa 540
aatggcgctc tgaacagttg gactgatcag gacagcaaag acagcaccta cagcatgagc 600
agcaccctca cgttgaccaa ggacgagtat gaacgacata acagctatac ctgtgaggcc 660
actcacaaga catcaacttc acccattgtc aagagcttca acaggaatga gtgttgatga 720

```

<210> 95

<211> 219

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 95

```

Asp Val Leu 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 Ile Val His Ser
           20           25           30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu 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 Tyr Cys Phe Gln Gly
           85           90           95
Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
           100          105          110
Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu

```

115	120	125
Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe		
130	135	140
Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg		
145	150	155
Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser		
165	170	175
Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu		
180	185	190
Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser		
195	200	205
Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys		
210	215	

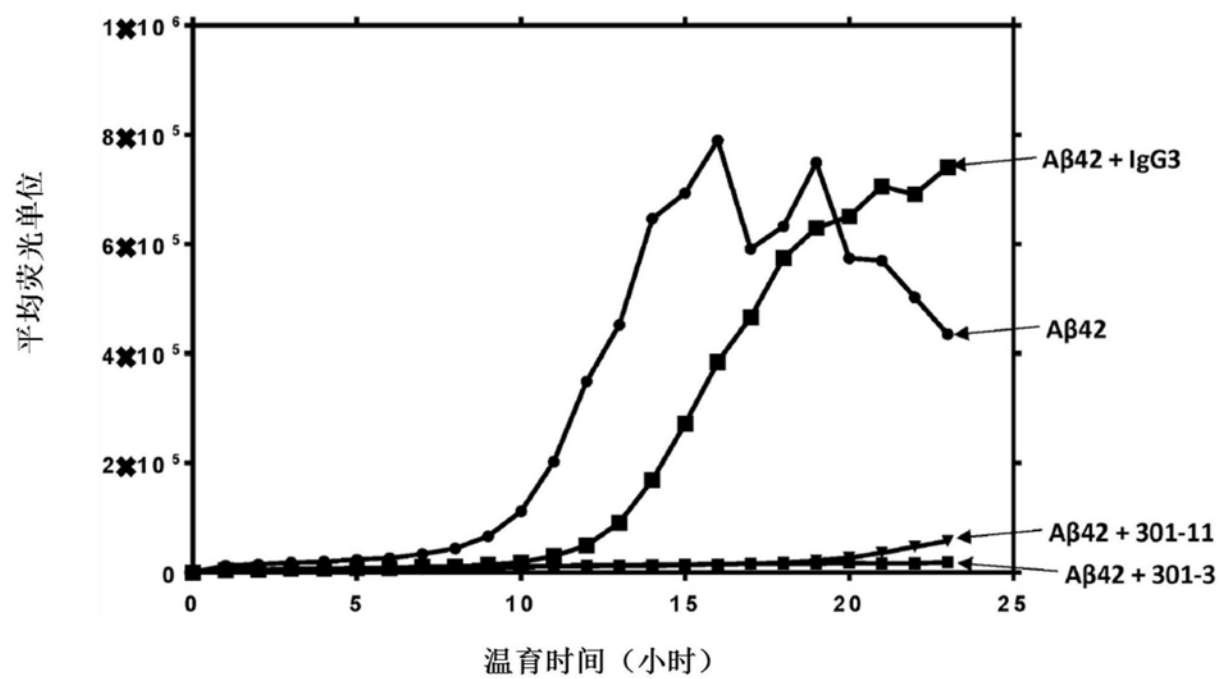


图1