



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I781507 B

(45)公告日：中華民國 111 (2022) 年 10 月 21 日

(21)申請案號：110100084

(22)申請日：中華民國 105 (2016) 年 01 月 27 日

(51)Int. Cl. : C07K16/18 (2006.01)

G01N33/68 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P25/00 (2006.01)

(30)優先權：2015/01/28 美國

62/109,001

2015/12/11 美國

62/266,557

(71)申請人：愛爾蘭商普羅余納生物科技有限公司 (愛爾蘭) PROTHENA BIOSCIENCES LIMITED (IE)

愛爾蘭

大學健康網絡 (加拿大) UNIVERSITY HEALTH NETWORK (CA)

加拿大

(72)發明人：尼加爾 塔羅辰 S. NIJJAR, TARLOCHAN S. (US) ; 查克拉波提 阿維吉特 CHAKRABARTTY, AVIJIT (CA) ; 檜垣 傑佛瑞 N. HIGAKI, JEFFREY N. (US)

(74)代理人：惲軼群；劉法正

(56)參考文獻：

US 2014056904A1

審查人員：張維纓

申請專利範圍項數：14 項 圖式數：7 共 119 頁

(54)名稱

抗甲狀腺素運送蛋白抗體

(57)摘要

本發明提供特異性結合至甲狀腺素運送蛋白(TTR)之抗體。該等抗體可用於治療或實現預防與 TTR 累積或 TTR 沉積物之累積相關聯的疾病或病症(例如，TTR 類澱粉變性)。該等抗體亦可用於診斷 TTR 類澱粉變性及抑制或減少 TTR 之聚集以及其他應用。

The invention provides antibodies that specifically bind to transthyretin (TTR). The antibodies can be used for treating or effecting prophylaxis of diseases or disorders associated with TTR accumulation or accumulation of TTR deposits (e.g., TTR amyloidosis). The antibodies can also be used for diagnosing TTR amyloidosis and inhibiting or reducing aggregation of TTR, among other applications.

I781507

公告本

發明摘要

※ 申請案號：110100084

※ 申請日：105.01.27

C07K 16/18 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

※IPC 分類：A61K 39/395 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

抗甲狀腺素運送蛋白抗體

ANTI-TRANSTHYRETIN ANTIBODIES

【中文】

本發明提供特異性結合至甲狀腺素運送蛋白(TTR)之抗體。該等抗體可用於治療或實現預防與 TTR 累積或 TTR 沉積物之累積相關聯的疾病或病症(例如，TTR 類澱粉變性)。該等抗體亦可用於診斷 TTR 類澱粉變性及抑制或減少 TTR 之聚集以及其他應用。

【英文】

The invention provides antibodies that specifically bind to transthyretin (TTR). The antibodies can be used for treating or effecting prophylaxis of diseases or disorders associated with TTR accumulation or accumulation of TTR deposits (e.g., TTR amyloidosis). The antibodies can also be used for diagnosing TTR amyloidosis and inhibiting or reducing aggregation of TTR, among other applications.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ ）圖。(無)

【本代表圖之符號簡單說明】：

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

(無)

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

抗甲狀腺素運送蛋白抗體

ANTI-TRANSTHYRETIN ANTIBODIES

【技術領域】

相關申請案之交互參照

【0001】 本申請案係關於 2015 年 1 月 28 日申請之美國臨時申請案第 62/109,001 號及 2015 年 12 月 11 日申請之美國臨時申請案第 62/266,557 號，該等案中每一者以全文引用之方式併入。

對序列表之引用

【0002】 本申請案包括檔案形式的電子序列表，該檔案名稱為 472678_SEQLIST.txt，建立於 2015 年 12 月 11 日且含有 70,699 個位元組，該序列表以全文引用之方式併入本文用於所有目的。

【0003】 本發明係有關於抗甲狀腺素運送蛋白抗體。

【先前技術】

【0004】 據認為，數種疾病係由疾病特異性蛋白質之異常折疊及聚集所引起。此等蛋白質可累積成稱為類澱粉蛋白之病理學診斷累積物，其藉由某些組織學染色物顯現。據認為，類澱粉蛋白引出炎性反應且對所涉及組織具有多種負面結果。此外，異常折疊蛋白質之較小聚集物可存在且發揮細胞毒性效應。

【0005】 甲狀腺素運送蛋白(TTR)為已知錯誤折疊且聚集(例如，經歷類澱粉蛋白生成(amyloidogenesis))的許多蛋白質中的一種。甲狀腺素運送蛋白相關的類澱粉變性(amyloidosis)涵蓋兩種形式的疾病：由突變或變異 TTR 之錯誤折疊所產生的家族性疾病，及由野生型 TTR 之錯誤聚集所引起的散發性、非遺傳性疾病。TTR 類澱粉蛋白生成之過程可引起神經系統及/或心臟以及其他組織中之病理學。

【發明內容】

【0006】 在一個態樣中，本發明提供特異性結合甲狀腺素運送蛋白之抗體，其包含實質上來自抗體 6C1 之三個重鏈 CDR 及三個輕鏈 CDR。一些此類抗體包含抗體 6C1 之三個 Kabat 重鏈 CDR (分別為 SEQ ID NO:10-12) 及三個輕 CDR (分別為 SEQ ID NO:18-20)。在一些抗體中，重鏈 CDR-H1 為複合 Kabat-Chothia CDR-H1 (SEQ ID NO:63)。一些此類抗體為單株抗體。一些此類抗體為嵌合抗體、人類化抗體、鑲飾(veneered)抗體或人類抗體。一些此類抗體具有人類 IgG1 同型。一些此類抗體具有人類 IgG2 或 IgG4 同型。

【0007】 一些此類抗體為特異性結合至甲狀腺素運送蛋白之人類化或嵌合 6C1 抗體，其中 6C1 為特徵為 SEQ ID NO:1 之成熟重鏈可變區及 SEQ ID NO:13 之成熟輕鏈可變區的小鼠抗體。

【0008】 在一些抗體中，人類化成熟重鏈可變區包含 6C1 之三個重鏈 CDR，且人類化成熟輕鏈可變區包含 6C1 之三個輕鏈 CDR。在一些抗體中，人類化成熟重鏈可變區包含 6C1 之三個 Kabat 重鏈 CDR (SEQ ID NO:10-12)，且人類化成熟輕鏈可變區包含 6C1 之三個 Kabat 輕鏈 CDR (SEQ ID NO:18-20)。

【0009】 在一些抗體中，人類化成熟重鏈可變區具有與 SEQ ID NO:9 至少 90%一致的胺基酸序列，且人類化成熟輕鏈可變區具有與 SEQ ID NO:17 至少 90%一致的胺基酸序列。在一些此類抗體中，位置 H77 由 T 佔據。在一些此類抗體中，位置 H49 由 A 佔據。在一些此類抗體中，位置 H76 及 H82(a)由 S 佔據。在一些此類抗體中，位置 H49 由 A 佔據。在一些此類抗體中，位置 H19、H44、H83 及 H89 分別由 K、R、K 及 M 佔據。在一些此類抗體中，位置 H49 由 A 佔據。在一些此類抗體中，位置 L45 由 K 佔據。在一些此類抗體中，位置 L2 由 V 佔據。

【0010】 一些抗體包含具有與 SEQ ID NO:9 至少 95%一致的胺基酸序列之成熟重鏈可變區，及具有與 SEQ ID NO:17 至少 95%一致的胺基酸序列之成熟輕鏈可變區。一些抗體包含具有與 SEQ ID NO:9 至少 98%一致的胺基酸序列之成熟重鏈可變區，及具有與 SEQ ID NO:17 至少 98%一致的胺基酸序列之成熟輕鏈可變區。

【0011】 在一些此類抗體中，成熟重鏈可變區具有 SEQ ID NO:4 之胺基酸序列。在一些此類抗體中，成熟重鏈可變區具有 SEQ ID NO:5 之胺基酸序列。在一些此類抗體中，成熟重鏈可變區具有 SEQ ID NO:6 之胺基酸序列。在一些此類抗體中，成熟重鏈可變區具有 SEQ ID NO:7 之胺基酸序列。在一些此類抗體中，成熟重鏈可變區具有 SEQ ID NO:8 之胺基酸序列。在一些此類抗體中，成熟重鏈可變區具有 SEQ ID NO:9 之胺基酸序列。

【0012】 在一些此類抗體中，成熟輕鏈可變區具有 SEQ ID NO:16 之胺基酸序列。在一些此類抗體中，成熟輕鏈可變區具有 SEQ ID NO:17 之胺基酸序列。

【0013】 在一些此類抗體中，成熟重鏈可變區具有 SEQ ID NO:4 之胺基酸序列，且成熟輕鏈可變區具有 SEQ ID NO:16 之胺基酸序列。在一些此類抗體中，成熟重鏈可變區具有 SEQ ID NO:4 之胺基酸序列，且成熟輕鏈可變區具有 SEQ ID NO:17 之胺基酸序列。

【0014】 在一些此類抗體中，成熟重鏈可變區具有 SEQ ID NO:5 之胺基酸序列，且成熟輕鏈可變區具有 SEQ ID NO:16 之胺基酸序列。在一些此類抗體中，成熟重鏈可變區具有 SEQ ID NO:5 之胺基酸序列，且成熟輕鏈可變區具有 SEQ ID NO:17 之胺基酸序列。

【0015】 在一些此類抗體中，成熟重鏈可變區具有 SEQ ID NO:6 之胺基酸序列，且成熟輕鏈可變區具有 SEQ ID NO:16 之胺基酸序列。在一些此類抗體中，成熟重鏈可變區具有 SEQ ID NO:6 之胺基酸序列，且成熟輕鏈可變區具有 SEQ ID NO:17 之胺基酸序列。

【0016】 在一些此類抗體中，成熟重鏈可變區具有 SEQ ID NO:7 之胺基酸序列，且成熟輕鏈可變區具有 SEQ ID NO:16 之胺基酸序列。在一些此類抗體中，成熟重鏈可變區具有 SEQ ID NO:7 之胺基酸序列，且成熟輕鏈可變區具有 SEQ ID NO:17 之胺基酸序列。

【0017】 在一些此類抗體中，成熟重鏈可變區具有 SEQ ID NO:8 之胺基酸序列，且成熟輕鏈可變區具有 SEQ ID NO:16 之胺基酸序列。在一些此類抗體中，成熟重鏈可變區具有 SEQ ID NO:8 之胺基酸序列，且成熟輕鏈可變區具有 SEQ ID NO:17 之胺基酸序列。

【0018】 在一些此類抗體中，成熟重鏈可變區具有 SEQ ID NO:9 之胺基酸序列，且成熟輕鏈可變區具有 SEQ ID NO:16 之胺基酸序列。在一些此類抗體中，成熟重鏈可變區具有 SEQ ID NO:9 之胺基酸序列，且成熟輕鏈可變區具有 SEQ ID NO:17 之胺基酸序列。

【0019】 在一些抗體中，抗體為完整抗體。在一些抗體中，抗體為結合片段。在一些此類抗體中，結合片段為單鏈抗體、Fab 或 Fab'2 片段。

【0020】 在一些抗體中，成熟輕鏈可變區融合至輕鏈恆定區，且成熟重鏈可變區融合至重鏈恆定區。在一些此類抗體中，重鏈恆定區為天然人類重鏈恆定區之突變體形式，其相對於天然人類重鏈恆定區與 Fc γ 受體的結合減小。在一些此類抗體中，重鏈恆定區為 IgG1 同型。在一些此類抗體中，成熟重鏈可變區融合至具有 SEQ ID NO:26 之序列的重鏈恆定區，及/或成熟輕鏈可變區融合至具有 SEQ ID NO:28 之序列的輕鏈恆定區。

【0021】 在一些抗體中，分別來自 SEQ ID NO:1 及 13 之成熟重鏈可變區及成熟輕鏈可變區之 CDR 中的任何差異駐存於位置 H60-H65 中。

【0022】 在另一態樣中，本發明提供一種醫藥組成物，其包含任何上文所提及之抗體及醫藥學上可接受之載劑。

【0023】 在另一態樣中，本發明提供一種核酸，其編碼任何上文所提及之抗體之重鏈及/或輕鏈。在另一態樣中，本發明提供一種重組表現載體，其包含此類核酸。在另一態樣中，本發明提供一種寄主細胞，其用此類重組表現載體轉型。

【0024】 在另一態樣中，本發明提供一種人類化抗體之方法，該方法包含：

- (a) 選擇受體抗體；
- (b) 鑑別小鼠抗體中待保留之胺基酸殘基；
- (c) 合成編碼包含小鼠抗體重鏈之 CDR 的人類化重鏈的核酸，及編碼包含小鼠抗體輕鏈之 CDR 的人類化輕鏈的核酸；以及
- (d) 於寄主細胞中表現核酸以產生人類化抗體；

其中小鼠抗體包含具有 SEQ ID NO:1 之胺基酸序列的重鏈可變區及具有 SEQ ID NO:13 之胺基酸序列的輕鏈可變區。

【0025】 在另一態樣中，本發明提供一種產生人類化、嵌合或鑲飾抗體之方法，該方法包含：

(a) 培養用編碼抗體之重鏈及輕鏈的核酸轉型的細胞，以使得該等細胞分泌抗體；以及

(b) 純化來自細胞培養基之抗體；

其中抗體為 6C1 之人類化、嵌合或鑲飾形式。

【0026】 在另一態樣中，本發明提供一種產生細胞系之方法，該細胞系產生人類化、嵌合或鑲飾抗體，該方法包含：

(a) 將編碼抗體之重鏈及輕鏈之載體及可選擇標記物引入至細胞中；

(b) 在條件下繁殖細胞以選擇載體之複本數目增大的細胞；

(c) 自所選細胞分離單一細胞；以及

(d) 將自基於抗體之產率選擇的單一細胞選殖之細胞存入庫；

其中抗體為 6C1 之人類化、嵌合或鑲飾形式。

【0027】 一些此類方法進一步包含在選擇性條件下繁殖細胞及篩選天然表現且分泌至少 100 mg/L/10⁶ 個細胞/24 小時的細胞系。

【0028】 在另一態樣中，本發明提供一種抑制或減少患有甲狀腺素運送蛋白介導之類澱粉變性或冒有其患病風險的受試者中甲狀腺素運送蛋白之聚集的方法，其包含向受試者投與任何上文所提及抗體之有效方案，從而抑制或減少受試者中甲狀腺素運送蛋白之聚集。

【0029】 在另一態樣中，本發明提供一種抑制或減少患有甲狀腺素運送蛋白介導之類澱粉變性或冒有其患病風險的受試者中甲狀腺素運送蛋白原纖成型的方法，其包含向受試者投與任何上文所提及抗體之有效方案，從而抑制或減少受試者中甲狀腺素運送蛋白累積。

【0030】 在另一態樣中，本發明提供一種減少患有甲狀腺素運送蛋白介導之類澱粉變性或冒有其患病風險的受試者中甲狀腺素運送蛋白沉積物的方法，其包含向受試者投與任何上文所提及抗體之有效方案，從而減少受試者中甲狀腺素運送蛋白沉積物。

【0031】 在另一態樣中，本發明提供一種清除患有甲狀腺素運送蛋白介導之類澱粉變性或冒有其患病風險的受試者中經聚集甲狀腺素運送蛋白

的方法，其包含向受試者投與任何上文所提及抗體之有效方案，從而相對於未接受抗體的患有甲狀腺素運送蛋白介導之類澱粉變性或冒有其患病風險的受試者清除受試者中經聚集甲狀腺素運送蛋白。

【0032】 在另一態樣中，本發明提供一種穩定患有甲狀腺素運送蛋白介導之類澱粉變性或冒有其患病風險的受試者中甲狀腺素運送蛋白之非毒性構形的方法，其包含向受試者投與任何上文所提及抗體之有效方案，從而穩定受試者中甲狀腺素運送蛋白之非毒性構形。

【0033】 在另一態樣中，本發明提供一種治療或實現預防受試者中甲狀腺素運送蛋白介導之類澱粉變性的方法，其包含向受試者投與任何上文所提及抗體之有效方案。

【0034】 在另一態樣中，本發明提供一種延緩受試者中甲狀腺素運送蛋白介導之類澱粉變性發作的方法，其包含向受試者投與任何上文所提及抗體之有效方案。

【0035】 在另一態樣中，本發明提供一種診斷受試者中甲狀腺素運送蛋白介導之類澱粉變性的方法，其包含將受試者之生物樣本與有效量任何上文所提及抗體接觸。一些此類方法進一步包含偵測抗體對甲狀腺素運送蛋白之結合，其中經結合抗體之存在指示受試者患有甲狀腺素運送蛋白介導之類澱粉變性。一些此類方法進一步包含將抗體對生物樣本之結合與抗體對對照樣本之結合進行比較，由此抗體對生物樣本之結合相對於對照樣本增大指示受試者患有甲狀腺素運送蛋白介導之類澱粉變性。

【0036】 在一些此類方法中，生物樣本及對照樣本包含相同組織起源之細胞。在一些此類方法中，生物樣本及/或對照樣本為血液、血清、血漿或實體組織。在一些此類方法中，實體組織來自心臟、周邊神經系統、自主神經系統、腎、眼睛或胃腸道。

【0037】 在一些方法中，甲狀腺素運送蛋白介導之類澱粉變性為家族性甲狀腺素運送蛋白類澱粉變性或散發性甲狀腺素運送蛋白類澱粉變性。在一些此類方法中，家族性甲狀腺素運送蛋白類澱粉變性為家族性類澱粉蛋白心肌病變(FAC)、家族性類澱粉蛋白多發性神經病變(FAP)或中樞神經系統選擇性類澱粉變性(CNSA)。在一些此類方法中，散發性甲狀腺素運送

蛋白類澱粉變性為老年全身性類澱粉變性(SSA)或老年心臟類澱粉變性(SCA)。

【0038】 在一些方法中，甲狀腺素運送蛋白介導之類澱粉變性與受試者之心臟、周邊神經系統、自主神經系統、腎、眼睛或胃腸道中類澱粉蛋白累積相關聯。

【0039】 在另一態樣中，本發明提供一種偵測受試者中甲狀腺素運送蛋白沉積物存在或不存在的方法，其包含將來自受試者的疑似包含類澱粉蛋白累積物之生物樣本與有效量任何上文所提及抗體接觸。一些此類方法進一步包含偵測抗體對甲狀腺素運送蛋白之結合，其中經結合抗體之偵測指示甲狀腺素運送蛋白沉積物之存在。一些此類方法進一步包含將抗體對生物樣本之結合與抗體對對照樣本之結合進行比較，由此抗體對生物樣本之結合相對於對照樣本增大指示受試者患有甲狀腺素運送蛋白介導之類澱粉變性。在一些此類方法中，生物樣本及對照樣本包含相同組織起源之細胞。在一些此類方法中，生物樣本及/或對照樣本為血液、血清、血漿或實體組織。在一些此類方法中，實體組織來自心臟、周邊神經系統、自主神經系統、腎、眼睛或胃腸道。

【0040】 在另一態樣中，本發明提供一種測定受試者中甲狀腺素運送蛋白沉積之水準的方法，其包含投與任何上文所提及抗體及偵測受試者中經結合抗體之存在。在一些此類方法中，經結合抗體之存在藉由正電子發射斷層攝影術(PET)來測定。

【圖式簡單說明】

【0041】 圖 1 描繪小鼠 6C1 抗體、小鼠模型抗體、人類受體抗體及 6C1 抗體之人類化版本之重鏈可變區的比對。將如 Kabat 所定義的 CDR 封閉於框中，只不過第一封閉框為 Chothia CDR-H1 及 Kabat CDR-H1 之複合物，其中 Kabat CDR-H1 加有底線及加粗。

【0042】 圖 2 描繪小鼠 6C1 抗體、小鼠模型抗體、人類受體抗體及 6C1 抗體之人類化版本之輕鏈可變區的比對。將如 Kabat 所定義的 CDR 封閉於框中。

【0043】 圖 3A 及 3B：圖 3A 描繪鼠類 5A1、6C1、9D5 及 14G8 抗體對 ph4 處理的 TTR 之結合曲線。圖 3B 描繪鼠類 5A1、6C1、9D5 及 14G8 抗體對 ph4 處理的或原態 TTR 之結合曲線。

【0044】 圖 4A、4B 及 4C：圖 4A 描繪 TTR-Y78F 纖維形成受 mis-TTR 抗體的抑制。圖 4B 描繪 TTR-V122I 纖維形成受 14G8 的抑制。圖 4C 描繪 TTR-V122I 纖維形成受對照抗體的抑制。

【0045】 圖 5A 及 5B：圖 5A 描繪使用 9D5 mis-TTR 抗體進行的對來自確認 V30M ATTR 的患者之血漿樣本(樣本#21、#22、#23、#24、#25 及#27)及來自正常受試者之樣本(樣本#11、#12、#15、#18、#19、#20)的西方墨點法分析之密度測定法分析。圖 5B 描繪使用 5A1 mis-TTR 抗體進行的對相同樣本的西方墨點法分析之密度測定法分析。

【0046】 圖 6 描繪使用 6C1 抗體對來自確認 V30M ATTR 的患者之血漿樣本(樣本#21、#22、#23、#24、#25、#27)及來自正常受試者之樣本(樣本#11、#12、#15、#18、#19、#20)之 MesoScale Discovery (MSD)板分析。

【0047】 圖 7A 及 7B：圖 7A 描繪抗體 14G8 對 THP-1 細胞攝取 F87M/L110M TTR 的作用。圖 7B 描繪 mis-TTR 抗體中每一者對 THP-1 細胞攝取 V30M TTR 的作用。

【實施方式】

序列簡述

【0048】 SEQ ID NO:1 闡明小鼠 6C1 抗體之重鏈可變區之胺基酸序列。

【0049】 SEQ ID NO:2 闡明小鼠重鏈可變區結構模板之胺基酸序列。

【0050】 SEQ ID NO:3 闡明重鏈可變受體登錄號 ADX65650 之胺基酸序列。

【0051】 SEQ ID NO:4 闡明人類化 6C1 抗體版本 1 之重鏈可變區 (Hu6C1VHv1)之胺基酸序列。

【0052】 SEQ ID NO:5 闡明人類化 6C1 抗體版本 1b 之重鏈可變區 (Hu6C1VHv1b)之胺基酸序列。

【0053】 SEQ ID NO:6 闡明人類化 6C1 抗體版本 2 之重鏈可變區 (Hu6C1VHv2)之胺基酸序列。

【0054】 SEQ ID NO:7 闡明人類化 6C1 抗體版本 2b 之重鏈可變區 (Hu6C1VHv2b)之胺基酸序列。

【0055】 SEQ ID NO:8 闡明人類化 6C1 抗體版本 3 之重鏈可變區 (Hu6C1VHv3)之胺基酸序列。

【0056】 SEQ ID NO:9 闡明人類化 6C1 抗體版本 3b 之重鏈可變區 (Hu6C1VHv3b)之胺基酸序列。

【0057】 SEQ ID NO:10 闡明小鼠 6C1 抗體之 Kabat CDR-H1 之胺基酸序列。

【0058】 SEQ ID NO:11 闡明小鼠 6C1 抗體之 Kabat CDR-H2 之胺基酸序列。

【0059】 SEQ ID NO:12 闡明小鼠 6C1 抗體之 Kabat CDR-H3 之胺基酸序列。

【0060】 SEQ ID NO:13 闡明小鼠 6C1 抗體之輕鏈可變區之胺基酸序列。

【0061】 SEQ ID NO:14 闡明小鼠輕鏈可變區結構模板之胺基酸序列。

【0062】 SEQ ID NO:15 闡明輕鏈可變受體登錄號 ABI74084 之胺基酸序列。

【0063】 SEQ ID NO:16 闡明人類化 6C1 抗體版本 1 之輕鏈可變區 (Hu6C1VLv1)之胺基酸序列。

【0064】 SEQ ID NO:17 闡明人類化 6C1 抗體版本 2 之輕鏈可變區 (Hu6C1VLv2)之胺基酸序列。

【0065】 SEQ ID NO:18 闡明小鼠 6C1 抗體之 Kabat CDR-L1 之胺基酸序列。

【0066】 SEQ ID NO:19 闡明小鼠 6C1 抗體之 Kabat CDR-L2 之胺基酸序列。

【0067】 SEQ ID NO:20 闡明小鼠 6C1 抗體之 Kabat CDR-L3 之胺基酸序列。

【0068】 SEQ ID NO:21 闡明編碼小鼠 6C1 抗體的具有訊號肽之重鏈可變區之核酸序列。

【0069】 SEQ ID NO:22 闡明小鼠 6C1 抗體的具有訊號肽之重鏈可變區之胺基酸序列。

【0070】 SEQ ID NO:23 闡明編碼小鼠 6C1 抗體的具有訊號肽之輕鏈可變區之核酸序列。

【0071】 SEQ ID NO:24 闡明小鼠 6C1 抗體的具有訊號肽之輕鏈可變區之胺基酸序列。

【0072】 SEQ ID NO:25 闡明示範性 IgG1 重鏈恆定區之胺基酸序列。

【0073】 SEQ ID NO:26 闡明示範性 IgG1 G1m3 重鏈恆定區之胺基酸序列。

【0074】 SEQ ID NO:27 闡明示範性 IgG1 G1m3 重鏈恆定區之胺基酸序列。

【0075】 SEQ ID NO:28 闡明具有 N 端精胺酸的示範性輕鏈恆定區之胺基酸序列。

【0076】 SEQ ID NO:29 闡明不具有 N 端精胺酸的示範性輕鏈恆定區之胺基酸序列。

【0077】 SEQ ID NO:30 闡明人類化 6C1 抗體版本 1 之重鏈區之胺基酸序列。

【0078】 SEQ ID NO:31 闡明人類化 6C1 抗體版本 1b 之重鏈區之胺基酸序列。

【0079】 SEQ ID NO:32 闡明人類化 6C1 抗體版本 2 之重鏈區之胺基酸序列。

【0080】 SEQ ID NO:33 闡明人類化 6C1 抗體版本 2b 之重鏈區之胺基酸序列。

【0081】 SEQ ID NO:34 闡明人類化 6C1 抗體版本 3 之重鏈區之胺基酸序列。

【0082】 SEQ ID NO:35 闡明人類化 6C1 抗體版本 3b 之重鏈區之胺基酸序列。

【0083】 SEQ ID NO:36 闡明人類化 6C1 抗體版本 1 之輕鏈區之胺基酸序列。

【0084】 SEQ ID NO:37 闡明人類化 6C1 抗體版本 2 之輕鏈區之胺基酸序列。

【0085】 SEQ ID NO:38 闡明登錄號 P02766.1 (UniProt)中所闡明之人類甲狀腺素運送蛋白之胺基酸序列。

【0086】 SEQ ID NO:39 闡明登錄號 AAB35639.1 (GenBank)中所闡明之人類甲狀腺素運送蛋白之胺基酸序列。

【0087】 SEQ ID NO:40 闡明登錄號 AAB35640.1 (GenBank)中所闡明之人類甲狀腺素運送蛋白之胺基酸序列。

【0088】 SEQ ID NO:41 闡明登錄號 ABI63351.1 (GenBank)中所闡明之人類甲狀腺素運送蛋白之胺基酸序列。

【0089】 SEQ ID NO:42 闡明人類甲狀腺素運送蛋白之殘基 89-97 之胺基酸序列。

【0090】 SEQ ID NO:43 闡明潛在甲狀腺素運送蛋白免疫原之胺基酸序列。

【0091】 SEQ ID NO:44 闡明潛在甲狀腺素運送蛋白免疫原之胺基酸序列。

【0092】 SEQ ID NO:45 闡明潛在甲狀腺素運送蛋白免疫原之胺基酸序列。

【0093】 SEQ ID NO:46 闡編碼示範性 IgG1 G1m3 重鏈恆定區之核酸序列。

【0094】 SEQ ID NO:47 闡明編碼具有 N 端精胺酸的示範性輕鏈恆定區之核酸序列。

【0095】 SEQ ID NO:48 闡明編碼不具有 N 端精胺酸的示範性輕鏈恆定區之核酸序列。

【0096】 SEQ ID NO:49 闡明重鏈恆定區訊號肽之胺基酸序列。

- 【0097】 SEQ ID NO:50 闡明編碼重鏈恆定區訊號肽之核酸序列。
- 【0098】 SEQ ID NO:51 闡明輕鏈恆定區訊號肽之胺基酸序列。
- 【0099】 SEQ ID NO:52 闡明編碼輕鏈恆定區訊號肽之核酸序列。
- 【0100】 SEQ ID NO:53 闡明編碼小鼠 6C1 可變輕鏈區之核酸序列。
- 【0101】 SEQ ID NO:54 闡明編碼小鼠 6C1 可變重鏈區之核酸序列。
- 【0102】 SEQ ID NO:55 闡明編碼人類化 6C1 抗體版本 1 之重鏈可變區(Hu6C1VHv1)之核酸序列。
- 【0103】 SEQ ID NO:56 闡明編碼人類化 6C1 抗體版本 1b 之重鏈可變區(Hu6C1VHv1b)之核酸序列。
- 【0104】 SEQ ID NO:57 闡明編碼人類化 6C1 抗體版本 2 之重鏈可變區(Hu6C1VHv2)之核酸序列。
- 【0105】 SEQ ID NO:58 闡明編碼人類化 6C1 抗體版本 2b 之重鏈可變區(Hu6C1VHv2b)之核酸序列。
- 【0106】 SEQ ID NO:59 闡明編碼人類化 6C1 抗體版本 3 之重鏈可變區(Hu6C1VHv3)之核酸序列。
- 【0107】 SEQ ID NO:60 闡明編碼人類化 6C1 抗體版本 3b 之重鏈可變區(Hu6C1VHv3b)之核酸序列。
- 【0108】 SEQ ID NO:61 闡明編碼人類化 6C1 抗體版本 1 之輕鏈可變區(Hu6C1VLv1)之核酸序列。
- 【0109】 SEQ ID NO:62 闡明編碼人類化 6C1 抗體版本 2 之輕鏈可變區(Hu6C1VLv2)之核酸序列。
- 【0110】 SEQ ID NO:63 闡明小鼠 6C1 抗體之複合 CDR-H1 (殘基 26-35)之胺基酸序列。

定義

【0111】 單株抗體或其他生物實體通常以分離形式提供。此意謂抗體或其他生物實體通常為干擾蛋白質及由其產生或純化所引起的其他污染物之至少 50% w/w 純，但不排除單株抗體與過量醫藥學上可接受之載劑或旨在有助於其使用的其他媒劑組合的可能性。有時單株抗體為干擾蛋白質及來自產生或純化的污染物之至少 60%、70%、80%、90%、95%或 99% w/w

純。分離單株抗體或其他生物實體常常為在其純化之後剩餘的主要巨分子物質。

【0112】 抗體對其靶標抗原之特異性結合意謂至少 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 或 10^{10} M^{-1} 之親和力。特異性結合之量級可偵測為較高的且其可與對至少一種不相關靶標發生的非特異性結合區分。特異性結合可為在具體官能基或具體空間配合(例如，鎖-匙型)之間鍵的形成之結果，然而非特異性結合通常為凡得瓦力之結果。然而特異性結合不必暗示抗體結合一個且僅一個靶標。

【0113】 基本抗體結構單元為次單元之四聚物。各四聚物包括兩對一致的多肽鏈，每一對具有一個「輕」鏈(約 25 kDa)及一個「重」鏈(約 50-70 kDa)。各鏈之胺基端部分包括具有約 100 個至 110 個或 110 個以上胺基酸之主要負責抗原識別的可變區。此可變區最初經表現連接至可裂解訊號肽。不具有訊號肽的可變區有時稱為成熟可變區。因此，例如，輕鏈成熟可變區意謂不具有輕鏈訊號肽的輕鏈可變區。各鏈之羧基端部分界定主要負責效應功能之恆定區。

【0114】 輕鏈分類為 κ 或 λ 。重鏈分類為 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ ，且將抗體之同型分別定義為 IgG、IgM、IgA、IgD 及 IgE。在輕鏈及重鏈內，可變區與恆定區係由具有約 12 個或 12 個以上胺基酸的「J」區接合，其中重鏈亦包括具有約 10 個或 10 個以上胺基酸的「D」區。一般而言參見，*Fundamental Immunology*, Paul, W.編，第 2 版，Raven Press, N.Y., 1989, 第 7 章(其以全文引用之方式併入以用於所有目的)。

【0115】 免疫球蛋白輕鏈或重鏈可變區(本文亦分別稱為「輕鏈可變域」(「VL 域」)或「重鏈可變域」(「VH 域」))由藉由三個「互補決定區」或「CDR」中斷的「架構」區組成。架構區用以比對用於特異性結合至抗原之抗原定位的 CDR。CDR 包括抗體主要負責抗原結合的胺基酸殘基。自胺基端至羧基端，VL 域及 VH 域均包含以下架構(FR)及 CDR 區：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 及 FR4。VL 域之 CDR1、2 及 3 在本文亦分別稱為 CDR-L1、CDR-L2 及 CDR-L3；VH 域之 CDR1、2 及 3 在本文亦分別稱為 CDR-H1、CDR-H2 及 CDR-H3。

【0116】 各 VL 域及 VH 域之胺基酸之指定係根據 CDR 之任何習知定義。習知定義包括：Kabat 定義(Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (美國國家衛生研究院, Bethesda, MD, 1987 及 1991)；Chothia 定義(Chothia 及 Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917, 1987；Chothia 等人, *Nature* 342:878-883, 1989)；Chothia Kabat CDR 的複合定義，其中 CDR-H1 為 Chothia CDR 及 Kabat CDR 之複合物；AbM 定義，其由 Oxford Molecular 之抗體模型化軟體使用；以及 Martin 等人之接頭定義(bioinfo.org.uk/abs) (參見表 1)。Kabat 提供一種廣泛使用的編號慣例(Kabat 編號)，其中將不同重鏈之間或不同輕鏈之間的對應殘基指定相同編號。當藉由 CDR 之某一定義(例如，Kabat)將抗體表述為包含 CDR 時，該定義指定抗體中存在的 CDR 殘基(亦即，Kabat CDR)之最小數目。不排除亦存在屬於另一習知 CDR 定義但不屬於該規定定義之其他殘基。舉例而言，包含由 Kabat 定義的 CDR 之抗體在其他可能性中包括 CDR 含有 Kabat CDR 殘基且無其他 CDR 殘基之抗體，而 CDR H1 為複合 Chothia-Kabat CDR H1 且其他 CDR 含有 Kabat CDR 殘基且無基於其他定義的另外 CDR 殘基的抗體。

表 1

使用 Kabat 編號的 CDR 之習知定義

環	Kabat	Chothia	Chothia 及 Kabat 之複合物	AbM	接頭
L1	L24--L34	L24--L34	L24--L34	L24--L34	L30--L36
L2	L50--L56	L50--L56	L50--L56	L50--L56	L46--L55
L3	L89--L97	L89--L97	L89--L97	L89--L97	L89--L96
H1	H31--H35B	H26--H32..H34*	H26--H35B*	H26--H35B	H30--H35B
H2	H50--H65	H52--H56	H50--H65	H50--H58	H47--H58
H3	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H93--H101

* Chothia 之 CDR-H1 可結束於 H32、H33 或 H34 (視環之長度而定)。此可因為 Kabat 編號方案於 35A 及 35B 處放置額外殘基之插入，然而 Chothia 編號將其放置於 31A 及 31B 處。若 H35A 或 H35B (Kabat 編號)均不存在，

則 Chothia CDR-H1 結束於 H32 處。若僅 H35A 存在，則其結束於 H33 處。若 H35A 及 H35B 均存在，則其結束於 H34 處。

【0117】 術語「抗體」包括完整抗體及其結合片段。通常，片段與其來源的完整抗體競爭特異性結合至包括單獨重鏈、輕鏈 Fab、Fab'、F(ab')₂、F(ab)c、Dab、奈米抗體及 Fv 之靶標。片段可藉由重組 DNA 技術，或藉由完整免疫球蛋白之酶促或化學分離來製造。術語「抗體」亦包括雙特異性抗體及/或人類化抗體。雙特異性或雙功能性抗體為具有兩個不同重/輕鏈對及兩個不同結合位點之人工雜交抗體(參見例如，Songsivilai 及 Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.*, 79:315-321 (1990)；Kostelny 等人, *J. Immunol.*, 148:1547-53 (1992))。在一些雙特異性抗體中，兩個不同重/輕鏈對包括一對人類化 6C1 重鏈/輕鏈及一對特異於不同於 6C1 所結合的甲狀腺素運送蛋白上之抗原決定位的重鏈/輕鏈。

【0118】 在一些雙特異性抗體中，一對重鏈/輕鏈為如以下所進一步揭露之人類化 6C1 抗體，且另一對重鏈/輕鏈來自於結合至血腦阻障上所表現的受體的抗體，該受體諸如胰島素受體、類胰島素生長因子(IGF)受體、瘦素受體或脂蛋白受體，或運鐵蛋白受體(Friden 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4771-4775, 1991；Friden 等人, *Science* 259:373-377, 1993)。此類雙特異性抗體可藉由受體介導的胞吞轉送來轉移跨過血腦阻障。雙特異性抗體之腦攝取可進一步藉由將雙特異性抗體工程改造以減小其對血腦阻障受體之親和力來增強。受體之親和力減小導致腦中之分佈更寬(參見例如，Atwal 等人, *Sci. Trans. Med.* 3, 84ra43, 2011；Yu 等人, *Sci. Trans. Med.* 3, 84ra44, 2011)。

【0119】 示範性雙特異性分子亦可為：(1) 雙重可變域抗體(DVD-Ig)，其中各輕鏈及重鏈含有經由短肽鍵聯串連的兩個可變域(Wu 等人, *Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-Ig™) Molecule*, In: *Antibody Engineering*, Springer Berlin Heidelberg (2010)中)；(2) Tandab，其為兩個單鏈雙功能抗體之融合，得到具有針對靶標抗原中每一者的兩個結合位點的四價雙特異性抗體；(3) 撓性抗體(flexibody)，其為 scFv 與雙功能抗體之組合，得到多價分子；(4)

所謂的「對接及鎖定(dock and lock)」分子，基於蛋白質激酶 A 之「二聚及對接域」，當施加至 Fab 時，其可得到由連接至不同 Fab 片段之兩個一致 Fab 片段組成的三價雙特異性結合蛋白質；或(5)所謂的蠍(Scorpion)分子，其包含例如融合至人類 Fc 區之兩個末端的兩個 scFv。可用於製備雙特異性抗體之平台的實例包括 BiTE (Micromet)、DART (MacroGenics)、Fcab 及 Mab2 (F-star)、Fc 工程改造 IgG1 (Xencor)或 DuoBody (基於 Fab 臂交換, Genmab)。

【0120】術語「抗原決定位」係指抗體結合的抗原上之位點。抗原決定位可由鄰接胺基酸或藉由一或多種蛋白質之三級折疊並列的非鄰接胺基酸形成。由鄰接胺基酸形成之抗原決定位(亦稱為線性抗原決定位)通常在暴露於變性溶劑時保留，然而由三級折疊形成之抗原決定位(亦稱為構形抗原決定位)通常在用變性溶劑處理時喪失。抗原決定位通常包括呈獨特空間構形之至少 3 個，且更通常至少 5 個或 8-10 個胺基酸。測定抗原決定位之空間構形的方法包括例如 x 射線結晶學及二維核磁共振。參見例如，Epitope Mapping Protocols, Methods in Molecular Biology, 第 66 卷, Glenn E. Morris, 編 (1996)。抗原決定位可為線性，諸如 SEQ ID NO:38 之例如 2-5、3-5、3-9 或 5-9 個鄰接胺基酸之抗原決定位。抗原決定位亦可為構形抗原決定位，包括例如 SEQ ID NO:38 之殘基 89-97 內胺基酸之兩個或多個非鄰接段。舉例而言，若稱抗體結合至甲狀腺素運送蛋白(TTR)之胺基酸 89-97 內之抗原決定位，則意謂該抗原決定位在所述胺基酸範圍內，包括定義範圍之外極限的彼等者。不必意謂範圍內之每一胺基酸皆構成抗原決定位之部分。因此，例如，TTR 之胺基酸 89-97 內之抗原決定位可除了 SEQ ID NO:42 之其他線性段之外由胺基酸 89-97、89-96、90-96、91-96、92-96、93-96、94-96、89-96、89-95、89-94、89-93、89-92 或 89-93 組成，或就構形抗原決定位而言，由 SEQ ID NO:42 之胺基酸之非鄰接段組成。

【0121】鑑別相同或重疊抗原決定位的抗體可以簡單的免疫分析鑑別，該免疫分析展示一種抗體與另一抗體競爭結合至靶標抗原的能力。抗體之抗原決定位亦可藉由結合至其抗原的抗體之 X 射線結晶學來定義以鑑別接觸殘基。或者，若抗原中減少或消除一種抗體之結合的所有胺基酸突變減少或消除另一抗體之結合，則兩種抗體具有相同抗原決定位。若減少

或消除一種抗體之結合的一些胺基酸突變減少或消除另一抗體之結合，則兩種抗體具有重疊抗原決定位。

【0122】 藉由其中受測試抗體抑制參考抗體對共同抗原的特異性結合之分析來測定抗體之間的競爭(參見例如，Junghans 等人, *Cancer Res.* 50:1495, 1990)。若如競爭性結合分析中所量測，過量測試抗體(例如，至少 2x、5x、10x、20x 或 100x)抑制參考抗體之結合至少 50%，則測試抗體與參考抗體競爭。一些測試抗體抑制參考抗體之結合至少 75%、90%或 99%。藉由競爭分析(競爭抗體)所鑑別之抗體包括結合至與參考抗體相同抗原決定位之抗體，及就發生位阻而言結合至足夠接近於參考抗體所結合的抗原決定位的相鄰抗原決定位之抗體。

【0123】 相對於結構甲狀腺素運送蛋白(TTR)之術語「原態」係指 TTR 以其正確起作用的狀態之正常折疊結構(亦即，TTR 四聚物)。由於 TTR 之原態折疊形式為四聚物，所以 TTR 之非原態形式包括例如錯誤折疊的 TTR 四聚物、TTR 單體、TTR 之聚集形式及 TTR 之原纖維形式。TTR 之非原態形式可包括包含野生型 TTR 胺基酸序列或突變的分子。

【0124】 相對於 TTR 之術語「錯誤折疊」係指 TTR 多肽單體或多聚物之二級及三級結構，且指示多肽呈現對於以其正確起作用的狀態之蛋白質而言不正常的構形。儘管 TTR 錯誤折疊可由蛋白質的突變(例如，缺失、取代或增加)引起，但是野生型 TTR 蛋白質亦可在疾病中錯誤折疊，進而暴露特異性抗原決定位。

【0125】 術語「醫藥學上可接受」係指載劑、稀釋劑、賦形劑或輔助劑可與調配物之其他成分相容且對其接受者實質上無害。

【0126】 術語「患者」包括接受預防或治療性治療之人類及其他哺乳動物受試者。

【0127】 若受試者具有至少一種已知的風險因素(例如，遺傳、生物化學、家族病史及情境暴露)，則個體處於增加的疾病風險下，該風險因素將具有該風險因素之個體相比於不具有該風險因素之個體置於統計學上顯著更大的發展疾病之風險。

【0128】 術語「生物樣本」係指在例如人類或哺乳動物受試者之生物來源內或可自其獲得的生物材料之樣本。此類樣本可為器官、胞器、組織、組織切片、體液、周邊血液、血漿、血清、細胞、諸如蛋白質及肽之分子及自其來源的任何部分或組合。術語生物樣本亦可涵蓋藉由處理該樣本所來源的任何材料。來源材料可包括細胞或其子代。生物樣本之處理可涉及過濾、蒸餾、萃取、濃縮、固定、干擾組分之去活化及其類似操作中之一或多者。

【0129】 術語「對照樣本」係指已知不包括或疑似包括甲狀腺素運送蛋白(TTR)之單體、錯誤折疊、聚集或原纖維形式，諸如以 TTR 類澱粉蛋白沉積物形式的生物樣本。對照樣本可獲自未患有 TTR 類澱粉變性或 TTR 類澱粉變性之特定所選類型的個體。或者，對照樣本可獲自罹患 TTR 類澱粉變性或 TTR 類澱粉變性之特定所選類型的患者。此類樣本可與認為包含 TTR 類澱粉變性之生物樣本同時或在不同時刻獲得。生物樣本及對照樣本可均獲自相同組織(例如，含有 TTR 類澱粉蛋白沉積物及周圍正常組織兩者之組織切片)。較佳地，對照樣本基本上或全部由不含 TTR 類澱粉蛋白沉積物的組織組成，且可用於與認為包含 TTR 類澱粉蛋白沉積物的生物樣本進行比較。較佳地，對照樣本中之組織與生物樣本中之組織(例如，心臟之心肌細胞)為相同類型。

【0130】 術語「疾病」係指損害生理功能之任何異常病狀。該術語廣泛用於涵蓋生理功能受損的任何病症、疾患、異常、病理學、病態(sickness)、病狀或症候群，不管病因學之本質。

【0131】 術語「症狀」係指如受試者所感知的疾病之主觀跡象，諸如步態改變。「徵象」係指如醫師所觀察的疾病之客觀跡象。

【0132】 出於將胺基酸取代分類為保守或非保守的目的，將胺基酸如下分組：第 I 組(疏水性側鏈)：met、ala、val、leu、ile；第 II 組(中性親水性側鏈)：cys、ser、thr；第 III 組(酸性側鏈)：asp、glu；第 IV 組(鹼性側鏈)：asn、gln、his、lys、arg；第 V 組(影響鏈定向之殘基)：gly、pro；以及 VI 組(芳族側鏈)：trp、tyr、phe。保守取代涉及相同類的胺基酸之間的取代。非保守取代構成將該些類別中一者之成員交換為另一者之成員。

【0133】 序列一致性百分比由藉由 Kabat 編號慣例最大程度比對的抗體序列測定。在比對之後，若將受試者抗體區(例如，重鏈或輕鏈之全部成熟可變區)與參考抗體之相同區進行比較，則在受試者抗體區與參考抗體區之間的序列百分比一致性為受試者及參考抗體區兩者中相同胺基酸所佔據的位置數目除以兩個區之所比對位置的總數目(不計入間隙)乘以 100 以轉換成百分比。

【0134】 「包含」或「包括」一或多種所述要素之組成物或方法可包括未特定描述的其他要素。舉例而言，「包含」或「包括」抗體之組成物可含有單獨的或與其他成分組合的抗體。

【0135】 值之範圍的指定包括該範圍內或定義該範圍的所有整數，及由該範圍內的整數所定義的所有子範圍。

【0136】 除非上下文中另外明顯指出，否則術語「約」涵蓋所述值之量測誤差之標準限度內(例如，SEM)之值。

【0137】 統計顯著性意謂 $p \leq 0.05$ 。

【0138】 除非上下文另外清楚指定，否則冠詞「一個」、「一種」及「該」之單數形式包括複數參考。舉例而言，術語「化合物」或「至少一種化合物」可包括複數種化合物，包括其混合物。

詳細描述

I. 概要

【0139】 本發明提供特異性結合至甲狀腺素運送蛋白(TTR)之殘基 89-97 的抗體。抗體具有結合至 TTR 之單體、錯誤折疊、聚集或原纖維形式的能力。抗體可用於治療或實現預防與 TTR 累積或 TTR 沉積物之累積相關聯的疾病或病症(例如，TTR 類澱粉變性)。抗體亦可用於診斷 TTR 類澱粉變性及抑制或減少 TTR 之聚集以及其他應用。

II. 靶標分子

【0140】 甲狀腺素運送蛋白(TTR)為主要由肝合成的 127 個胺基酸、55 kDa 之血清及腦脊髓液運送蛋白。其亦稱為前白蛋白、甲狀腺素結合前白蛋白、ATTR 及 TBPA。在其原態狀態中，TTR 以四聚物的形式存在。在同型合子中，四聚物包含一致的 127 個胺基酸富含 β -褶板之次單元。在異

型合子中，TTR 四聚物由變體及/或野生型次單元構成，通常以統計方式組合。

【0141】 血液中 TTR 之確立功能為運送全視黃醇結合蛋白。儘管 TTR 為齧齒動物之血液中甲狀腺素(T₄)之主要載體，但是利用正交於用於全視黃醇結合蛋白的結合位點之結合位點，T₄ 結合位點在人類中未獲有效佔據。

【0142】 TTR 為至少三十種不同人類蛋白質中之一種，該等人類蛋白質據認為細是胞外錯誤折疊及/或錯誤組裝(類澱粉蛋白生成)成一系列聚集物結構以引起稱為類澱粉蛋白疾病的變性疾病。TTR 經歷構形改變從而變得類澱粉蛋白生成。部分折疊暴露延伸構形中大的不帶電疏水性殘基之伸長段(stretch)，該等伸長段有效地錯誤組裝成大的非結構化球形聚集物，該等聚集物最終經歷構形轉換成交叉 β -褶板類澱粉蛋白結構。

【0143】 除非上下文中另外明顯指出，否則對甲狀腺素運送蛋白(TTR)或其片段或域之參考包括天然人類胺基酸序列，包括其同功型、突變體及對偶變體。示範性 TTR 多肽序列藉由以下指定：登錄號 P02766.1 (UniProt) (SEQ ID NO:38)、AAB35639.1 (GenBank) (SEQ ID NO:39)、AAB35640.1 (GenBank) (SEQ ID NO:40)及 ABI63351.1 (GenBank) (SEQ ID NO:41)。根據 Swiss Prot P02766.1 將殘基編號，其中成熟蛋白質(亦即，不包括 20 個胺基酸訊號序列)之第一胺基酸指定為殘基 1。在任一其他 TTR 蛋白質中，根據關於最大比對的 P02766.1 中之對應殘基將殘基編號。

III. 甲狀腺素運送蛋白類澱粉變性

【0144】 甲狀腺素運送蛋白(TTR)類澱粉變性為一種全身性病症，其特徵為病原性錯誤折疊 TTR 及由 TTR 構成的類澱粉蛋白原纖維之細胞外沉積。TTR 類澱粉變性一般而言由以下造成：原態 TTR 四聚物形式之去穩定化(歸因於環境或遺傳條件)，引起 TTR 解離、錯誤折疊及聚集成累積於各種器官及組織中的類澱粉蛋白原纖維，從而造成進行性功能不良。參見例如，Almeida 及 Saraiva, *FEBS Letters* 586:2891-2896 (2012)；Ando 等人, *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8:31 (2013)。

【0145】 在引起有絲分裂後組織變性的類澱粉蛋白生成之過程的情況下，在人類中，野生型 TTR 四聚物及包含突變體及野生型次單元之混合四聚物兩者可解離、錯誤折疊且聚集。因此，TTR 類澱粉變性涵蓋由起因於 TTR 之突變或起因於非突變、錯誤折疊的 TTR 的病原性錯誤折疊 TTR 所造成的疾病。

【0146】 舉例而言，老年全身性類澱粉變性(SSA)及老年心臟類澱粉變性(SCA)為與年齡相關的類型的類澱粉變性，其起因於心臟之心肌細胞外或內的野生型 TTR 類澱粉蛋白之沉積。TTR 類澱粉變性亦為遺傳性(家族性)類澱粉變性之最常見形式，其由將 TTR 蛋白去穩定化的突變造成。與 TTR 基因中之點突變相關聯的 TTR 類澱粉變性包括家族性類澱粉蛋白多發性神經病變(FAP)、家族性類澱粉蛋白心肌病變(FAC)及罕見的中樞神經系統選擇性類澱粉變性(CNSA)。患有遺傳性(家族性)TTR 類澱粉變性的患者幾乎始終為異型合子，其意謂 TTR 四聚物由突變體及/或野生型 TTR 次單元構成，一般而言為統計學分佈。TTR 類澱粉變性之遺傳性(家族性)版本一般而言為體染色體顯性，且其發作通常早於散發性疾病(SSA 及 SCA)。

【0147】 在編碼 TTR 的基因中存在超過 100 種牽涉體染色體顯性病變 FAP 及 FAC 之突變。參見例如，US 2014/0056904；Saraiva, *Hum. Mutat.* 17(6):493-503 (2001)；Damas 及 Saraiva, *J. Struct. Biol.* 130:290-299；Dwulet 及 Benson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 114:657-662 (1983)。此等類澱粉蛋白造成的突變分佈遍及 TTR 之整個分子。一般而言，TTR 四聚物結構之突變體次單元去穩定化越多，類澱粉蛋白疾病發作越早。TTR 變體之病原潛能一般而言藉由其不穩定性及其細胞分泌效率來測定。由一些 TTR 變體造成的最初病理學源自其心臟組織之選擇性破壞，然而其他 TTR 變體之病理學源自危及周邊及自主神經系統。由 TTR 類澱粉蛋白生成所造成的組織損傷似乎主要源於小的擴散性 TTR 聚集物之毒性，儘管細胞外類澱粉蛋白之累積可導致且幾乎必然在 TTR 類澱粉變性晚期折損器官結構。

【0148】 TTR 類澱粉變性以許多不同形式存在，其中跨個體及地理位置具有相當大的表現型變化。舉例而言，TTR 類澱粉變性可表現為進行

性、軸突感覺自主及運動神經病變。TTR 類澱粉變性亦可表現為浸潤性心肌病變。

【0149】 疾病相關症狀發作之年齡在二十與九十歲之間，其中不同人群變化較大。TTR 類澱粉變性之多系統牽連為其診斷之線索。舉例而言，當存在以下一種或數種時，考慮為 TTR 類澱粉變性診斷：(1)神經病性疾病之家族病史，特定言之與心臟衰竭相關聯者；(2)未知病因學之神經病性疼痛或進行性感覺障礙；(3)無明顯原因之腕隧道症候群，尤其是雙側性的情況且需要手術鬆弛(release)；(4)未知病因學之胃腸道運動性障礙或自主神經功能不良(例如，勃起功能不良、起立性低血壓、神經性膀胱功能障礙(gladder))；(5)特徵為不存在高血壓之心室壁增厚的心臟病；(6)未知起因的房室傳導阻滯增強，具體而言當伴隨有心臟增厚時；以及(6)棉絨型之玻璃體內容物。參見 Ando 等人, *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8:31 (2013)。其他症狀可包括例如多發性神經病變、感覺喪失、疼痛、下肢無力、流汗異常、腹瀉、便秘、體重下降及尿失禁/滯留。

【0150】 TTR 類澱粉變性之診斷通常依賴於靶標器官生檢，接著用類澱粉蛋白特異性染料剛果紅將切除組織進行組織染色。若觀察到對類澱粉蛋白為陽性測試，則隨後進行 TTR 之免疫組織化學染色以確保造成類澱粉蛋白形成的前驅蛋白確實為 TTR。就家族性形式的疾病而言，在可進行診斷之前，就需要證明編碼 TTR 的基因中之突變。此可例如經由等電聚焦電泳、聚合酶鏈式反應或雷射切除/液相層析-串聯質譜來實現。參見例如，US 2014/0056904；Ruberg 及 Berk, *Circulation* 126:1286-1300 (2012)；Ando 等人, *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8:31 (2013)。

IV. 抗體

A. 結合特異性及功能性質

【0151】 本發明提供結合至甲狀腺素運送蛋白(TTR)，更特定言之，結合至 TTR 之胺基酸殘基 89-97 (SEQ ID NO:42)內之抗原決定位的單株抗體。此類抗原決定位埋在原態 TTR 四聚物中且暴露於 TTR 之單體、錯誤折疊、聚集或原纖維形式中。

【0152】 指定為 6C1 的抗體為此類示範性小鼠抗體。此抗體在 TTR 之胺基酸殘基 89-97 (SEQ ID NO:42)內特異性結合。此抗體進一步特徵為其結合至 TTR 之單體、錯誤折疊、聚集或原纖維形式，但不結合至 TTR 之原態四聚物形式的的能力。此外，此抗體特徵為其對 TTR 介導之類澱粉變性心臟組織具有免疫反應性，但對健康心臟組織無免疫反應性。結合至特異性蛋白質或其片段的能力可使用實例中所提供的示範性分析形式來證明。

【0153】 一些抗體結合至與指定 6C1 的抗體相同或重疊抗原決定位。6C1 之重鏈及輕鏈成熟可變區之序列分別指定為 SEQ ID NO:1 及 13。具有此類結合特異性之其他抗體可藉由以下產生：用 TTR 或其包括所要抗原決定位之部分(例如，SEQ ID NO:42)使小鼠免疫，且篩選結合至單體 TTR 或包含 SEQ ID NO:42 的肽的所得抗體，該等抗體視情況與具有小鼠 6C1 (IgG1, κ)之可變區的抗體競爭。TTR 中包括所要抗原決定位之片段可連接至幫助引出對該片段之抗體反應的載體及/或可與幫助引出此類反應的佐劑組合。可針對相較於特定殘基之突變體對 TTR 之野生型、單體版本或其片段(例如，SEQ ID NO:38)的不同結合篩選此類抗體。對此類突變體的篩選更精確地定義結合特異性，允許鑑別結合受具體殘基之突變誘發抑制且可能分享其他例證抗體之功能特性的抗體。突變可為遍及靶標或遍及其已知駐存有抗原決定位之切片，用丙胺酸(或絲胺酸，若已經存在丙胺酸)，一次或更廣泛地隔開間隔，全身置換取代一種殘基。若相同組突變顯著降低兩種抗體之結合，則兩種抗體結合相同抗原決定位。

【0154】 具有所選擇的鼠類抗體(例如，6C1)之結合特異性的抗體亦可使用噬菌體顯示方法之變體產生。參見 Winter, WO 92/20791。此方法具體而言適用於產生人類抗體。在此方法中，所選擇的鼠類抗體之重鏈或輕鏈可變區用作起始材料。若例如選擇輕鏈可變區作為起始材料，則構建成員顯示相同輕鏈可變區(亦即，鼠類起始材料)及不同重鏈可變區的噬菌體文庫。重鏈可變區可例如獲自重排人類重鏈可變區之文庫。選擇展示對單體 TTR 或其片段(例如，胺基酸殘基 89-97)強特異性結合(例如，至少 10^8 及較佳至少 10^9 M^{-1})的噬菌體。此噬菌體之重鏈可變區隨後充當構建另一噬菌體文庫之起始材料。在此文庫中，各噬菌體顯示相同重鏈可變區(亦即，自第

一顯示文庫鑑別的區)及不同輕鏈可變區。輕鏈可變區可例如獲自重排人類輕鏈可變區之文庫。此外，選擇展示對單體 TTR 或其片段(例如，胺基酸殘基 89-97)強特異性結合的噬菌體。所得抗體通常具有與鼠類起始材料相同或類似的抗原決定位特異性。

【0155】 其他抗體可藉由突變誘發編碼諸如 6C1 之示範性抗體之重鏈及輕鏈的 cDNA 來獲得。本發明亦包括與成熟重鏈及/或輕鏈可變區之胺基酸序列中之 6C1 至少 70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%一致且維持其功能性質的，及/或與各別抗體不同之處在於少量功能上無關的胺基酸取代(例如，保守取代)、缺失或插入的單株抗體。亦包括具有如藉由習知定義所定義的六種 CDR 中之一種或全部，但較佳為 Kabat 之單株抗體，其與 6C1 之對應 CDR 90%、95%、99%或 100%一致。

【0156】 本發明亦包括具有完全或實質上來自 6C1 的一些或所有(例如，3、4、5 及 6 個) CDR 之抗體。此類抗體可包括具有完全或實質上來自 6C1 之重鏈可變區之至少兩種，且通常所有三種 CDR 之重鏈可變區，及/或具有完全或實質上來自 6C1 之輕鏈可變區之至少兩種，且通常所有三種 CDR 之輕鏈可變區。抗體可包括重鏈及輕鏈兩者。當含有不超過 4、3、2 或 1 個取代、插入或缺失時，CDR 實質上來自對應的 6C1 CDR，只不過 CDR-H2 (當由 Kabat 定義時)可具有不超過 6、5、4、3、2 或 1 個取代、插入或缺失。此類抗體可與成熟重鏈及/或輕鏈可變區之胺基酸序列中之 6C1 至少 70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%一致且維持其功能特性，及/或與 6C1 的不同之處在於少量功能上無關的胺基酸取代(例如，保守取代)、缺失或插入。

【0157】 藉由此類分析所鑑別的一些抗體可結合至 TTR 之單體、錯誤折疊、聚集或原纖維形式，但不結合至 TTR 之原態四聚物形式，如實例中或另外所述。同樣，一些抗體對 TTR 介導之類澱粉變性組織具有免疫反應性，但對健康組織不具有免疫反應性。

【0158】 一些抗體可抑制或減少 TTR 之聚集，抑制或減少 TTR 原纖成形，減少或清除 TTR 沉積物或聚集 TTR，或穩定動物模型或臨床試驗中 TTR 之非毒性構形。一些抗體可治療 TTR 類澱粉變性、實現其預防或延緩

其發作，如動物模型或臨床試驗中所示。用於測試對 TTR 類澱粉變性的活性的示範性動物模型包括以下所述者：Kohno 等人, *Am. J. Path.* 150(4):1497-1508 (1997)；Teng 等人, *Laboratory Investigations* 81:385-396 (2001)；Wakasugi 等人, *Proc. Japan Acad.* 63B:344-347 (1987)；Shimada 等人, *Mol. Biol. Med.* 6:333-343 (1989)；Nagata 等人, *J. Biochem.* 117:169-175 (1995)；Sousa 等人, *Am. J. Path.* 161:1935-1948 (2002)；以及 Santos 等人, *Neurobiology of Aging* 31:280-289 (2010)。

B. 非人類抗體

【0159】 針對單體 TTR 或其片段(例如，胺基酸殘基 89-97)之其他非人類抗體(例如，鼠類、天竺鼠、靈長類、兔或大鼠)的產生可藉由例如用 TTR 或其片段使動物免疫來實現。參見 Harlow 及 Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (CSHP NY, 1988) (以引用之方式併入以用於所有目的)。此類免疫原可來自天然來源，藉由肽合成，或藉由重組表現獲得。視情況，可投與免疫原以與載體蛋白融合或以其他方式複合。視情況，可與佐劑一起投與免疫原。可如以下所述使用數種類型佐劑。完全弗氏佐劑接著不完全佐劑較佳用於實驗動物之免疫。兔或天竺鼠通常用於製作多株抗體。小鼠通常用於製作單株抗體。針對單體 TTR 或 TTR 內之抗原決定位(例如，包含胺基酸殘基 89-97 中一或多者的抗原決定位)的特異性結合篩選抗體。此類篩選可藉由以下實現：測定抗體對一系列單體 TTR 變體之結合，該等 TTR 變體諸如含有胺基酸殘基 89-97 或在此等殘基內的突變的 TTR 變體，且測定哪些 TTR 變體結合至抗體。可例如藉由西方墨點法、FACS 或 ELISA 來估計結合。

C. 人類化抗體

【0160】 人類化抗體為將非人類「供體」之 CDR 植入至人類「受體」抗體序列中的基因工程改造抗體(參見例如，Queen, US 5,530,101 及 5,585,089；Winter, US 5,225,539；Carter, US 6,407,213；Adair, US 5,859,205；以及 Foote, US 6,881,557)。受體抗體序列可為例如成熟人類抗體序列、此類序列之複合物、人類抗體序列之共通序列或生殖細胞系區序列。因此，人類化抗體為具有全部或實質上來自供體抗體之至少三種、四種、五種或所

有 CDR 及全部或實質上來自人類抗體序列之可變區架構序列及恆定區(若存在)的抗體。類似地，人類化重鏈具有全部或實質上來自供體抗體重鏈的至少一種、兩種及通常所有三種 CDR，及實質上來自人類重鏈可變區架構及恆定區序列的重鏈可變區架構序列及重鏈恆定區(若存在)。類似地，人類化重鏈具有全部或實質上來自供體抗體重鏈的至少一種、兩種及通常所有三種 CDR，及實質上來自人類重鏈可變區架構及恆定區序列的重鏈可變區架構序列及重鏈恆定區(若存在)。不同於奈米抗體及 dAb，人類化抗體包含人類化重鏈及人類化輕鏈。人類化抗體中之 CDR 實質上來自非人類抗體中之 CDR，當至少 85%、90%、95%或 100%對應殘基(如藉由任何習知定義所定義，但較佳不由 Kabat 定義)在各自 CDR 之間一致時。抗體鏈之可變區架構序列或抗體鏈之恆定區實質上分別來自人類可變區架構序列或人類恆定區，當至少 85%、90%、95%或 100%任何習知定義所定義但較佳不由 Kabat 定義的對應殘基為一致時。

【0161】 儘管人類化抗體經常併入小鼠抗體之所有六種 CDR (較佳如 Kabat 所定義)，但其亦可應少於小鼠抗體之所有 CDR (例如，至少 3、4 或 5 中 CDR)製作(例如，Pascalis 等人, *J. Immunol.* 169:3076, 2002；Vajdos 等人, *J. of Mol. Biol.*, 320: 415-428, 2002；Iwahashi 等人, *Mol. Immunol.* 36:1079-1091, 1999；Tamura 等人, *J. Immunol.*, 164:1432-1441, 2000)。

【0162】 在一些抗體中，僅部分 CDR，亦即結合所需的 CDR 殘基之子集，稱作 SDR，需要保留在人類化抗體中之結合。未接觸抗原且不在 SDR 中的 CDR 殘基可基於先前研究(例如常常不需要 CDR H2 中之殘基 H60-H65)，自位於 Chothia 高度變異環外側之 Kabat CDR 之區(Chothia, *J. Mol. Biol.* 196:901, 1987)，藉由分子模型化及/或憑經驗，或如 Gonzales 等人, *Mol. Immunol.* 41: 863, 2004 中所述來鑑別。在不存在一或多種供體 CDR 殘基或省略全部供體 CDR 的位置處之此類人類化抗體中，佔據該位置的胺基酸可為佔據受體抗體序列中對應位置(藉由 Kabat 編號)的胺基酸。CDR 中之供體胺基酸將包括的受體之此類取代的數目反映競爭考慮的平衡。此類取代在減少人類化抗體中小鼠胺基酸之數目及因此減少潛在免疫原性方面為

潛在地有利的。然而，取代亦可造成親和力之改變，且親和力之顯著降低較佳得以避免。亦可憑經驗選擇待取代的 CDR 及胺基酸內取代的位置。

【0163】 人類受體抗體序列可視情況選自許多已知人類抗體序列以提供在人類受體序列可變區架構與供體抗體鏈之對應可變區架構之間的高序列一致性(例如，65-85%一致性)。

【0164】 重鏈之受體序列之實例為具有 NCBI 登記代碼 ADX65650 (SEQ ID NO:3)的人類成熟重鏈可變區。此受體序列包括具有與小鼠 6C1 重鏈相同典範形式的兩種 CDR。輕鏈之受體序列之實例為具有 NCBI 登錄代碼 ABI74084 (SEQ ID NO:15)的人類成熟輕鏈可變區。此受體序列包括具有與小鼠 6C1 輕鏈相同典範形式的兩種 CDR。

【0165】 人類可變區架構殘基之某些胺基酸可選擇用於取代，基於其可能影響 CDR 構形及/或結合至抗原。對此類可能影響之研究系藉由模型化，檢查具體位置處胺基酸之特徵，或憑經驗觀察具體胺基酸之取代或突變誘發之效果。

【0166】 舉例而言，當胺基酸在鼠類可變區架構殘基與所選擇的人類可變區架構殘基之間有差異時，人類架構胺基酸可由小鼠抗體之等效架構胺基酸取代，當可合理地預期胺基酸以下時：

- (1) 直接非共價地接合抗原；
- (2) 相鄰於 CDR 區或在 CDR 內，如 Chothia 而非 Kabat 所定義；
- (3) 以其他方式與 CDR 區相互作用(例如，在約 6 Å CDR 區內)，(例如，藉由在同源已知免疫球蛋白鏈之解決結構上模型化輕鏈或重鏈)；或
- (4) 為參與 VL-VH 界面之殘基。

【0167】 如 Queen, US 5,530,101 所定義之類別(1)至(3)之架構殘基有時可替代地稱為典範及游標(vernier)殘基。幫助定義 CDR 環之構形的架構殘基有時稱為典範殘基(Chothia 及 Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)；Thornton 及 Martin, *J. Mol. Biol.* 263:800-815 (1996))。支援抗原結合環構形且在微調抗體對抗原之配合方面起作用的架構殘基有時稱為游標殘基(Foote 及 Winter, *J. Mol. Biol.* 224:487-499 (1992))。

【0168】 作為取代之候選者的其他架構殘基為產生潛在醣化位點的殘基。取代之其他候選者還為就該位置處的人類免疫球蛋白而言不尋常的受體人類架構胺基酸。此等胺基酸可經來自小鼠供體抗體之等效位置或更典型人類免疫球蛋白之等效位置之胺基酸取代。

【0169】 示範性人類化抗體為小鼠 6C1 抗體之人類化形式，指定為 Hu6C1。小鼠抗體包含分別具有包含 SEQ ID NO:1 及 SEQ ID NO:13 之胺基酸序列的成熟重鏈及輕鏈可變區。本發明提供六種例證人類化成熟重鏈可變區：Hu6C1VHv1 (SEQ ID NO:4)、Hu6C1VHv1b (SEQ ID NO:5)、Hu6C1VHv2 (SEQ ID NO:6)、Hu6C1VHv2b (SEQ ID NO:7)、Hu6C1VHv3 (SEQ ID NO:8)及 Hu6C1VHv3b (SEQ ID NO:9)。本發明進一步提供兩種例證人類成熟輕鏈可變區：Hu6C1VLv1 (SEQ ID NO:16)及 Hu6C1VLv2 (SEQ ID NO:17)。圖 1 及 2 展示 6C1、小鼠模型抗體、人類受體抗體及 6C1 之人類化抗體版本之分別重鏈可變區及輕鏈可變區之比對。

【0170】 出於諸多原因，諸如對 CDR 構形及/或結合至抗原的影響、介導重鏈與輕鏈之間的相互作用、與恆定區相互作用、作為轉譯後修飾所要或非所要的位點、作為人類可變區序列中其位置之不常見殘基且因此潛在地免疫原性、產生聚集潛能及其他原因，以下十種可變區構架位置考慮為六種例證人類成熟輕鏈可變區及兩種例證人類成熟重鏈可變區之候選者，如實例中進一步指定：L2、L45、H19、H44、H49、H76、H77、H82(a)、H83 及 H89。

【0171】 此處，如在其他情況下，第一提及的殘基為藉由植入 Kabat CDR 所形成的人類化抗體之殘基或就 CDR-H1 進入人類受體架構而言的複合 Chothia Kabat CDR，且第二提及的殘基為考慮用於置換此類殘基的殘基。因此，在可變區架構內，第一提及的殘基為人類，且在 CDR 內，第一提及的殘基為小鼠。

【0172】 例證抗體包括例證成熟重鏈及輕鏈可變區之排列或組合(例如，Hu6C1VHv1/VLv1 或 H1L1、Hu6C1VHv1b/VLv1 或 H1bL1、Hu6C1VHv1/VLv2 或 H1L2、Hu6C1VHv1b/VLv2 或 H1bL2、Hu6C1VHv2/VLv1 或 H2L1、Hu6C1VHv2b/VLv1 或 H2bL1、Hu6C1VHv2/VLv2 或 H2L2、Hu6C

1VHv2b/VLv2 或 H2bL2、Hu6C1VHv3/VLv1 或 H3L1、Hu6C1VHv3b/VLv1 或 H3bL1、Hu6C1VHv3/VLv2 或 H3L2 及 Hu6C1VHv3b/VLv2 或 H3bL2)。

【0173】 本發明提供人類化抗體之變體，其中人類化成熟重鏈可變區展示與 SEQ ID NO:4-9 至少 90%、95%、96%、97%、98%或 99%一致性，且人類化成熟輕鏈可變區展示與 SEQ ID NO:16 或 17 至少 90%、95%、96%、97%、98%或 99%一致性。在一些此類抗體中，保留 SEQ ID NO:4-9、16 及 17 中回復突變或其他突變中之至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或所有 10 種。

【0174】 在一些抗體中，V_H 區中位置 H19、H44、H49、H76、H77、H82(a)、H83 及 H89 中之至少一者分別由 K、R、A、S、T、S、K 及 V 佔據。在一些抗體中，V_H 區中位置 H77 由 T 佔據，如在 Hu6C1VHv1。在一些抗體中，V_H 區中位置 H49 及 H77 分別由 A 及 T 佔據，如在 Hu6C1VHv1b。在一些抗體中，V_H 區中位置 H76、H77 及 H82(a)分別由 S、T 及 S 佔據，如在 Hu6C1VHv2。在一些抗體中，V_H 區中位置 H49、H76、H77 及 H82(a)分別由 A、S、T 及 S 佔據，如在 Hu6C1VHv2b。在一些抗體中，V_H 區中位置 H19、H44、H77、H83 及 H89 分別由 K、R、T、K 及 M 佔據，如在 Hu6C1VHv3。在一些抗體中，V_H 區中位置 H19、H44、H49、H77、H83 及 H89 分別由 K、R、A、T、K 及 M 佔據，如在 Hu6C1VHv3b。在一些抗體中，V_L 區中位置 L45 由 K 佔據。在一些抗體中，V_L 區中位置 L2 由 I 佔據。在一些抗體中，V_L 區中位置 L2 及 L45 中之一者或兩者分別由 V 及 K 佔據，如在 Hu6C1VLv1。在一些抗體中，V_L 區中位置 L2 及 L45 中之一者或兩者分別由 I 及 K 佔據，如在 Hu6C1VLv2。此類人類化抗體之 CDR 區可與 6C1 小鼠供體抗體之 CDR 區一致或實質上一致。該等 CDR 區可藉由任何習知定義(例如，Chothia，或 Chothia 及 Kabat 之複合物)所定義，但較佳如 Kabat 所定義。

【0175】 除非另外說明，否則可變區架構位置係根據 Kabat 編號。其他此類變體通常與例證 Hu6C1 變體之序列相差少量(例如，通常不超過 1、2、3、5、10 或 15 個)置換、缺失或插入。此類差異通常在架構中，但可發生於 CDR 中。

【0176】 人類化 6C1 變體中另外變化之可能性為可變區架構中另外的回復突變。不接觸人類化 mAb 中 CDR 的許多架構殘基可適應供體小鼠 mAb 或其他小鼠或人類抗體之對應位置之胺基酸的取代，且甚至許多潛在的 CDR 接觸殘基亦適合於取代。甚至 CDR 內之胺基酸可例如經用於提供可變區架構的人類受體序列之對應位置處所見的殘基改變。此外，交替的人類受體序列可用於例如重鏈及/或輕鏈。若使用不同受體序列，則可不進行上文所推薦之回復突變中之一或多者，因為對應供體及受體殘基在無回復突變之情況下已經相同。

【0177】 較佳地，Hu6C1 變體(不管是否為保守)中之置換或回復突變對人類化 mAb 之結合親和力或潛能無實質作用，亦即，其結合至單體 TTR 之能力(例如，在本發明變體人類化 6C1 抗體之實例中所述的一些或所有分析中之潛能與鼠類 6C1 之潛能實質上相同(亦即，在實驗誤差內))。

D. 嵌合及鑲飾抗體

【0178】 本發明進一步提供非人類抗體、尤其實例之 6C1 抗體之嵌合及鑲飾形式。

【0179】 嵌合抗體為非人類抗體(例如，小鼠)之輕鏈及重鏈之成熟可變區與人類輕鏈及重鏈恆定區組合的抗體。此類抗體實質上或全部保留小鼠抗體之結合特異性，且為約 2/3 人類序列。

【0180】 鑲飾抗體為人類化抗體之一種類型，其保留一些且通常所有 CDR 及非人類抗體之一些非人類可變區架構殘基，但用人類抗體序列之對應位置之殘基置換可造成 B 細胞或 T 細胞抗原決定位的其他可變區架構殘基，例如暴露殘基(Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489, 1991)。結果為一抗體，其中 CDR 全部或實質上來自非人類抗體且非人類抗體之可變區架構藉由取代被製成更類似於人類的。本發明中包括 6C1 抗體之鑲飾形式。

E. 人類抗體

【0181】 藉由以下所述的各種技術提供針對單體 TTR 或其片段(例如，TTR 之胺基酸殘基 89-97 (SEQ ID NO:42))之人類抗體。一些人類抗體藉由競爭性結合實驗，藉由 Winter 之噬菌體顯示方法(上文)，或以其他方式來選擇以具有與具體小鼠抗體相同的抗原決定位特異性，諸如實例中所

述的小鼠單株抗體中之一種。藉由僅使用 TTR 之片段，諸如僅含有 TTR 之胺基酸殘基 89-97 之 TTR 變體作為靶標抗原，及/或藉由篩選抗針對一系列 TTR 變體的抗體來篩選人類抗體之具體抗原決定位特異性，該等變體含有 TTR 之胺基酸殘基 89-97 內各種突變的 TTR 變體。

【0182】 用於產生人類抗體之方法包括 Oestberg 等人, *Hybridoma* 2:361-367 (1983); Oestberg, 美國專利第 4,634,664 號；以及 Engleman 等人, 美國專利 4,634,666 之三源雜交瘤(trioma)方法，其使用包括人類免疫球蛋白基因之基因轉殖小鼠(參見例如，Lonberg 等人, WO93/12227 (1993)；US 5,877,397；US 5,874,299；US 5,814,318；US 5,789,650；US 5,770,429；US 5,661,016；US 5,633,425；US 5,625,126；US 5,569,825；US 5,545,806；Neuberger, *Nat. Biotechnol.* 14:826 (1996)；以及 Kucherlapati, WO 91/10741 (1991))及噬菌體顯示方法(參見例如，Dower 等人, WO 91/17271；McCafferty 等人, WO 92/01047；US 5,877,218；US 5,871,907；US 5,858,657；US 5,837,242；US 5,733,743；以及 US 5,565,332)。

F. 恆定區之選擇

【0183】 嵌合、鑲飾或人類化抗體之重鏈及輕鏈可變區可連接至人類恆定區之至少一部分。恆定區之選擇部分取決於是否需要抗體依賴性細胞介導之細胞毒性、抗體依賴性細胞吞噬及/或補體依賴性細胞毒性。舉例而言，人類同型 IgG1 及 IgG3 具有補體依賴性細胞毒性且人類同型 IgG2 及 IgG4 不具有補體依賴性細胞毒性。人類 IgG1 及 IgG3 亦包括強於人類 IgG2 及 IgG4 之細胞介導之效應子功能。輕鏈恆定區可為 λ 或 κ 。

【0184】 輕鏈或重鏈之胺基端或羧基端之一種或數種胺基酸，諸如重鏈之 C 端離胺酸，可在一部分或所有分子中缺少或經衍生。取代可在恆定區中進行以減少或增加諸如補體介導之細胞毒性或 ADCC 的效應子功能(參見例如，Winter 等人, 美國專利第 5,624,821 號；Tso 等人, 美國專利第 5,834,597 號；以及 Lazar 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:4005, 2006)，或延長在人類中的半衰期(參見例如，Hinton 等人, *J. Biol. Chem.* 279:6213, 2004)。示範性取代包括位置 250 處之 Gln 及/或位置 428 處之 Leu (就恆定區而言，EU 編號用於此段中)用於增加抗體之半衰期。位置 234、235、236

及/或 237 中之任一者或所有的取代減少對於 Fcγ 受體，具體而言 FcγRI 受體的親和力(參見例如，US 6,624,821)。人類 IgG1 之位置 234、235 及 237 處之丙胺酸取代可用於減少效應子功能。一些抗體具有人類 IgG1 之位置 234、235 及 237 處之丙胺酸取代用於減少效應子功能。視情況，人類 IgG2 中之位置 234、236 及/237 經丙胺酸取代，且位置 235 經麩醯胺取代(參見例如，US 5,624,821)。在一些抗體中，使用藉由人類 IgG1 之 EU 編號之位置 241、264、265、270、296、297、322、329 及 331 中之一或多者處之突變。在一些抗體中，使用藉由人類 IgG1 之 EU 編號之位置 318、320 及 322 中之一或多者處之突變。在一些抗體中，位置 234 及/或 235 經丙胺酸取代，及/或位置 329 經甘胺酸取代。在一些抗體中，位置 234 及 235 經丙胺酸取代，諸如在 SEQ ID NO:27 中。在一些抗體中，同型為人類 IgG2 或 IgG4。

【0185】 示範性人類輕鏈 κ 恆定區具有 SEQ ID NO:28 之胺基酸序列。SEQ ID NO:28 之 N 端精胺酸可省略，在此狀況下，輕鏈 κ 恆定區具有 SEQ ID NO:29 之胺基酸序列。示範性人類 IgG1 重鏈恆定區具有 SEQ ID NO:25 之胺基酸序列(具有或不具有 C 端離胺酸)。抗體可表現為含有兩個輕鏈及兩個重鏈的四聚物，單獨重鏈、輕鏈，Fab、Fab'、F(ab')₂ 及 Fv，或重鏈及輕鏈成熟可變域經由間隔連接的單鏈抗體。

【0186】 人類恆定區展示不同個體之間的同種異型變化及同種同型(isoallotypic)變化，亦即，不同個體中之恆定區可在一或多個多型位置處有所不同。同種同型與同種異型之不同之處在於識別同種同型之血清結合至一或多種其他同型之非多型區。因此，例如，另一重鏈恆定區為 IgG1 G1m3 同種異型且具有 SEQ ID NO:26 之胺基酸序列。IgG1 G1m3 同種異型之另一重鏈恆定區具有 SEQ ID NO:27 之胺基酸序列(具有或不具有 C 端離胺酸)。對人類恆定區的參考包括具有任何天然同種異型或佔據天然同種異型中位置的殘基之任何排列的恆定區。

G 重組抗體之表現

【0187】 已知許多用於使用抗體表現細胞系(例如，融合瘤)產生嵌合及人類化抗體的方法。舉例而言，可使用熟知的方法將抗體之免疫球蛋白可變區選殖且定序。在一種方法中，重鏈可變 VH 區藉由 RT-PCR 使用製備

自融合瘤細胞的 mRNA 選殖。共通引子用於 VH 區前導肽，其涵蓋轉譯起始密碼子作為 5'引子及 g2b 恆定區特異性 3'引子。示範性引子描述於 Schenk 等人(在下文中「Schenk」)之美國專利公開案 US 2005/0009150 中。可比較多種獨立衍生植株之序列以確保在擴增期間未引入變化。VH 區之序列亦可藉由定序由 5' RACE RT-PCR 方法論獲得之 VH 片段及 3' g2b 特異性引子來測定或證實。

【0188】 可以同功方式選殖輕鏈可變 VL 區。在一種方法中，設計共通引子組用於 VL 區之擴增，其使用經設計以雜交至涵蓋轉譯起始密碼子的 VL 區的 5'引子及對 V-J 接合區之下游 Ck 區具有特異性的 3'引子。在第二種方法中，採用 5'RACE RT-PCR 方法論以選殖編碼 cDNA 的 VL。示範性引子描述於 Schenk 中，見前文。隨後將選殖序列與編碼人類(或其他非人類物種)恆定區的序列組合。編碼恆定區的示範性序列包括 SEQ ID NO:46，其編碼人類 IgG1 恆定區，及 SEQ ID NO:47 及 48，其編碼人類 κ 輕鏈恆定區。

【0189】 在一種方法中，重鏈及輕鏈可變區經再工程改造以編碼各自 VDJ 或 VJ 連結下游的剪接供體序列，且選殖至哺乳動物表現載體中，諸如重鏈之 pCMV-h γ 1 及輕鏈之 pCMV-M κ 1。此等載體編碼人類 γ 1 及 Ck 恆定區作為插入可變區匣之下游外顯子片段。在序列驗證之後，重鏈及輕鏈表現載體可共轉染至 CHO 細胞中以產生嵌合抗體。轉染後 48 小時收集條件培養基，且藉由西方墨點法分析來分析其抗體產生或藉由 ELISA 來分析其抗原結合。如上文所述將嵌合抗體人類化。

【0190】 通常藉由重組表現產生嵌合、鑲飾、人類化及人類抗體。重組多核苷酸結構通常包括可操作地連接至抗體鏈之編碼序列的表現控制序列，其包括原態締合或異源性表現控制元件，諸如啟動子。表現控制序列可為載體中能夠轉型或轉染真核或原核寄主細胞的啟動子系統。一旦載體併入至適當寄主中，就將寄主維持在適於核苷酸序列之高水準表現及交叉反應性抗體之收集及純化的條件下。

【0191】 此等表現載體通常可在寄主有機體中作為游離基因體或寄主染色體 DNA 之整體部分複製。通常，表現載體含有選擇標誌物，例如，

安比西林抗性或濕黴素抗性，以允許彼等經所要 DNA 序列轉型的細胞之偵測。

【0192】 大腸桿菌為一種可用於表現抗體、尤其抗體片段之原核寄主。諸如酵母之微生物亦可用於表現。酵母菌為一種具有合適載體的酵母寄主，其具有表現控制序列、複製起點、終止序列及如所要的類似者。典型啟動子包括 3-磷酸甘油酸激酶及其他解糖酶。可誘導酵母啟動子尤其包括來自乙醇脫氫酶、異細胞色素 C 及負責麥芽糖及半乳糖利用之酶的啟動子。

【0193】 哺乳動物細胞可用於表現編碼免疫球蛋白或其片段的核苷酸段。參見 Winnacker, *From Genes to Clones*, (VCH Publishers, NY, 1987)。許多能夠分泌完整異源性蛋白質的合適的寄主細胞系已得以發展，且包括 CHO 細胞系、各種 COS 細胞系、HeLa 細胞、HEK293 細胞、L 細胞及包括 Sp2/0 及 NS0 的非抗體產生骨髓瘤。細胞可為非人類。此等細胞之表現載體可包括表現控制序列，諸如複製起點、啟動子、增強子(Queen 等人, *Immunol. Rev.* 89:49 (1986))及必要的處理資訊位點，諸如核糖體結合位點、RNA 剪接位點、多腺苷酸化位點及轉錄終止子序列。表現控制序列可包括來源於內源性基因、細胞巨大病毒、SV40、腺病毒、牛乳突瘤病毒及其類似者的啟動子。參見 Co 等人, *J. Immunol.* 148:1149 (1992)。

【0194】 或者，可將抗體編碼序列併入轉殖基因中以供引入基因轉殖動物之基因組中且隨後於基因轉殖動物之乳汁中表現(參見例如，美國專利第 5,741,957 號；美國專利第 5,304,489 號；以及美國專利第 5,849,992 號)。合適的轉殖基因包括與諸如酪蛋白或 β 乳球蛋白的乳腺特異性基因之啟動子及增強子可操作地連接的輕鏈及/或重鏈的編碼序列。

【0195】 含有受關注 DNA 段之載體可藉由取決於細胞寄主類型的方法轉移至寄主細胞中。舉例而言，氯化鈣轉染通常用於原核細胞，然而，磷酸鈣處理、電穿孔、脂質轉染、基因槍(biolistic)或基於病毒的轉染可用於其他細胞寄主。用於轉型哺乳動物細胞之其他方法包括使用凝聚胺(polybrene)、原生質融合、脂質體、電穿孔及顯微注射。就產生基因轉殖動

物而言，轉殖基因可顯微注射至受精卵母細胞中，或可併入至胚胎幹細胞之基因體中，且此類細胞之核轉移至除核卵母細胞中。

【0196】 將編碼抗體重鏈及輕鏈的載體引入至細胞培養物中，可篩選細胞池之物血清培養基中之生長生產率及產物品質。可隨後將產生最多的細胞池經歷基於 FACS 的單細胞選殖以產生單株株系。可使用高於 50 pg 或 100 pg 每細胞每天的比生產率，其對應於大於 7.5 g/L 培養物的產物效價。可測試由單細胞殖株產生的抗體之混濁度、過濾性質、PAGE、IEF、UV 掃描、HP-SEC、醣-寡醣映射、質譜及結合分析，諸如 ELISA 或 Biacore。可隨後將所選擇的殖株保存入庫於多個小瓶中，且冷凍保存用於後續使用。

【0197】 一旦表現，就可根據此項技術之標準程序純化抗體，其包括蛋白質 A 捕獲、HPLC 純化、柱層析、凝膠電泳及其類似程序(一般而言參見，Scopes, *Protein Purification* (Springer-Verlag, NY, 1982))。

【0198】 可採用用於抗體之商業生產之方法，包括密碼子最佳化、啟動子之選擇、轉錄元件之選擇、終止子之選擇、無血清單細胞選殖、細胞保存入庫、針對複本數之擴增的選擇標誌物之使用、CHO 終止子或蛋白質效價之改良(參見例如，US 5,786,464；US 6,114,148；US 6,063,598；US 7,569,339；W02004/050884；W02008/012142；W02008/012142；W02005/019442；W02008/107388；W02009/027471；以及 US 5,888,809)。

H. 抗體篩選分析

【0199】 可將抗體經受數種篩選，其包括結合分析、功能篩選、與 TTR 沉積物相關聯的疾病之動物模型的篩選及臨床試驗。結合分析測試對單體 TTR 或其片段的特異性結合，及視情況，親和力及抗原決定位特異性。舉例而言，結合分析可篩選結合至 TTR 之胺基酸殘基 89-97 (SEQ ID NO:42) 之抗體，其為埋在原態 TTR 四聚物中且暴露於 TTR 之單體、錯誤折疊、聚集或原纖維形式中的抗原決定位。亦可針對結合 TTR 之前原纖維、非原態構形及 TTR 類澱粉蛋白原纖維，但不結合原態 TTR 構形的能力篩選抗體。舉例而言，抗體可針對結合至藉由原態四聚物 TTR 之解離或解聚所產生的 TTR 之單體形式的能力進行篩選，且可針對原態四聚物 TTR 進行反向篩選，如實例中或另外所述。同樣，抗體亦可針對其 TTR 介導之類澱粉變性

組織具有免疫反應性，但對健康組織不具有免疫反應性進行篩選。此類篩選有時以與諸如具有 6C1 或 IgG1 κ 同型之可變區的抗體的示範性抗體競爭的形式進行。視情況，抗體或 TTR 靶標在此類分析中經固定。

【0200】 可在包括天然表現 TTR 或經編碼 TTR 或其片段之 DNA 轉染的細胞的細胞模型中進行功能分析。合適的細胞包括來源於心臟組織或受 TTR 類澱粉蛋白生成影響的其他組織的細胞。可針對 TTR 之單體、錯誤折疊、聚集或原纖維形式之水準減少(例如，藉由細胞萃取物或上清液之西方墨點法或免疫沉澱)或由於 TTR 之單體、錯誤折疊、聚集或原纖維形式而細胞毒性減小來對細胞進行篩選。舉例而言，可針對抑制或減少 TTR 之聚集、抑制或減少 TTR 原纖成形、減少 TTR 沉積物、清除聚集 TTR 或穩定 TTR 之非毒性構形的能力來對抗體進行測試。

【0201】 可於溶液中進行其他功能分析，諸如測試當溶液中單體 TTR 或錯誤折疊 TTR 中間物於抗體接觸時，抗體是否能夠干擾或減少 TTR 原纖成形。原纖成形之程度可藉由渾濁度量測，例如，在 400 nm 下在裝備有四聚物控制單元的 UV-可見光譜儀上探測。硫代黃素-T 亦可用於估計類澱粉蛋白原纖成形之程度。舉例而言，可將五倍莫爾過量的硫代黃素-T 添加至 TTR 樣本，且在進行量測之前放置在室溫下 30 分鐘。可使用光譜螢光計監測硫代黃素-T 螢光。參見 US 2014/0056904。

【0202】 動物模型篩選測試抗體治療上或預防上治療模擬與 TTR 或 TTR 沉積物之累積相關聯的人類疾病的動物模型中之徵象或症狀。此類疾病包括以下 TTR 類澱粉變性之類型，諸如老年全身性類澱粉變性(SSA)、老年心臟類澱粉變性(SCA)、家族性類澱粉蛋白多發性神經病變(FAP)、家族性類澱粉蛋白心肌病變(FAC)及中樞神經系統選擇性類澱粉變性(CNSA)。可監測的合適徵象或症狀包括諸如胃腸道或心臟的各種組織中類澱粉蛋白沉積物之存在及程度。類澱粉蛋白沉積物之減少程度可藉由與適當對照進行比較來測定，諸如接受對照抗體(例如，同型匹配對照抗體)治療、安慰劑治療或未治療的對照動物中 TTR 類澱粉蛋白沉積物之水準。測試針對 TTR 類澱粉變性之活性的示範性動物模型為攜帶內源性小鼠 *Ttr* 基因座之無效突變及包含與家族性類澱粉蛋白多發性神經病變相關聯的 V30M 突變的人類

突變體 *TTR* 基因的小鼠模型。參見例如，Kohn 等人, *Am. J. Path.* 150(4):1497-1508 (1997); Cardoso 及 Saraiva, *FASEB J* 20(2):234-239 (2006)。類似模型亦存在，包括 *TTR* 類澱粉變性之家族性版本的其他模型及 *TTR* 類澱粉變性之散發性版本的模型。參見例如，Teng 等人, *Lab. Invest.* 81(3): 385-396 (2001); Ito 及 Maeda, *Mouse Models of Transthyretin Amyloidosis*, 於 *Recent Advances in Transthyretin Evolution, Structure, and Biological Functions* 中, 第 261-280 頁 (2009) (Springer Berlin Heidelberg)。基因轉殖動物可包括人類 *TTR* 轉殖基因，諸如具有與 *TTR* 類澱粉變性相關聯的突變的 *TTR* 轉殖基因或野生型 *TTR* 轉殖基因。為了促進動物模型中之測試，可使用具有適用於動物模型的恆定區的嵌合抗體(例如，小鼠-大鼠嵌合體可用於測試大鼠中之抗體)。可推斷，抗體之人類化版本將為有效的，若對應小鼠抗體或嵌合抗體在適當動物模型中有效，且人類化抗體具有類似的結合親和力(例如，在實驗誤差內，諸如 1.5、2 或 3 之因子)。

【0203】 臨床實驗測試患有與 *TTR* 類澱粉變性相關聯的疾病的人類中之安全性及效力。

I. 核酸

【0204】 本發明進一步提供編碼上文所述之任何重鏈及輕鏈之核酸(例如，SEQ ID NO:4-9、16 及 17)。視情況，此類核酸進一步編碼訊號肽且可與連接至恆定區之訊號肽一起表現(例如，具有 SEQ ID NO:49 (重鏈)及 51 (輕鏈)之胺基酸序列的訊號肽，其可分別由 SEQ ID NO:50 (重鏈)及 52 (輕鏈)編碼)。核酸之編碼序列可操作地與調節序列一起連接以確保編碼序列之表現，諸如啟動子、增強子、核糖體結合位點、轉錄終止訊號及其類似物。編碼重鏈及輕鏈之核酸可以分離形式存在，或可選殖至一或多種載體中。核酸可藉由例如重疊寡核苷酸之固態合成或 PCR 來合成。編碼重鏈及輕鏈的核酸可接合成鄰近核酸，例如，在表現載體內，或可為單獨的，例如，各自選殖至其自有表現載體中。

J. 結合抗體

【0205】 特異性結合至以 *TTR* 之病原形式但不以 *TTR* 之原態四聚物形式暴露的抗原之結合抗體，諸如 *TTR* 之胺基酸殘基 89-97 (SEQ ID

NO:42)，可用於偵測 TTR 之單體、錯誤折疊、聚集或原纖維形式之存在；監測且評估用於治療診斷有 TTR 類澱粉變性之患者的治療劑之效力；抑制或減少 TTR 之聚集；抑制或減少 TTR 原纖成形；減少或清除 TTR 沉積物；穩定 TTR 之非毒性構形；或治療或實現預防患者中 TTR 類澱粉變性。舉例而言，此類抗體可與其他治療部分、其他蛋白質、其他抗體及/或可偵測標記結合。參見 WO 03/057838；US 8,455,622。

【0206】 結合治療部分可為可由於治療、減弱、改善、預防或改良患者中諸如 TTR 類澱粉變性的非所要病狀或疾病的任何試劑。治療部分可包括例如免疫調節劑或促進或增強抗體活性之任何生物活性試劑。免疫調節劑可為刺激或抑制免疫反應之發展或維持的任何試劑。若此類治療部分偶合至對 TTR 之單體、錯誤折疊、聚集或原纖維形式具有特異性之抗體，諸如本文所述之抗體，則偶合的治療部分對 TTR 之非原態病原形式的特異性親和力超過 TTR 之原態四聚物形式。因此，結合抗體之投與直接靶向包含 TTR 之病原形式的組織，而對周圍正常健康組織之損傷最小。此可具體而言用於毒性太大以致於無法本身投與之治療部分。此外，可使用較少量之治療部分。

【0207】 合適的治療部分之實例包括減少 TTR 之水準、穩定 TTR 之原態四聚物結構、抑制 TTR 之聚集、干擾 TTR 原纖維或類澱粉蛋白形成或抵消細胞毒性的藥物。參見例如，Almeida 及 Saraiva, *FEBS Letters* 586:2891-2896 (2012)；Saraiva, *FEBS Letters* 498:201-203 (2001)；Ando 等人, *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8:31 (2013)；Ruberg 及 Berk, *Circulation* 126:1286-1300 (2012)；以及 Johnson 等人, *J. Mol. Biol.* 421(2-3):185-203 (2012)。舉例而言，抗體可結合至他發米帝司(tafamidis)、二氟尼柳(diflunisal)、ALN-TTR01、ALNTTR02、ISIS-TTRRx、去氧經四環素(doxy)、牛磺熊去氧膽酸(TUDCA)、Doxy-TUDCA、表沒食子兒茶素沒食子酸酯(EGCG)、薑黃素或白藜蘆醇(3,5,4'-三羟基芪)。其他代表性治療部分包括已知可用於治療、管理或改善 TTR 類澱粉變性或 TTR 類澱粉變性之症狀的其他試劑。參見例如，Ando 等人, *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8:31

(2013)，其針對 TTR 類澱粉變性之常見臨床症狀及用於治療該等症狀之典型試劑。

【0208】 抗體亦可與其他蛋白質偶合。舉例而言，抗體可與 Fynomer 偶合。Fynomer 為來源於人類 Fyn SH3 域之小結合蛋白(例如，7 kDa)。其可為穩定的且可溶的，且其可缺乏半胱氨酸殘基及雙硫鍵。Fynomer 可經工程改造以結合至具有與抗體相同親和力及特異性的靶標分子。其可適於產生基於抗體之多特異性融合蛋白。舉例而言，Fynomer 可融合至抗體之 N 端及/或 C 端以產生具有不同架構的雙特異性及三特異性 FynomAb。Fynomer 可使用 Fynomer 文庫，經由使用 FACS、Biacore 及基於細胞的分析的篩選技術來進行選擇，從而允許有效選擇具有最佳特性的 Fynomer。Fynomer 之實例揭示於以下中：Grabulovski 等人, *J. Biol. Chem.* 282:3196-3204 (2007)；Bertschinger 等人, *Protein Eng. Des. Sel.* 20:57-68 (2007)；Schlatter 等人, *MAbs.* 4:497-508 (2011)；Banner 等人, *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 69(Pt6):1124-1137 (2013)；以及 Brack 等人, *Mol. Cancer Ther.* 13:2030-2039 (2014)。

【0209】 本文所揭示之抗體亦可偶合或結合至一或多種其他抗體(例如，以形成抗體異結合物)。此類其他抗體可結合至 TTR 或其部分內不同抗原決定位或可結合至不同靶標抗原。

【0210】 抗體亦可與可偵測標記偶合。此類抗體可用於例如診斷 TTR 類澱粉變性，用於檢測 TTR 類澱粉變性之進展，及/或用於估計治療之效力。此類抗體具體而言可用於在患有或易患 TTR 澱粉樣變性的受試者中，或在獲自此類受試者之適當生物樣本中進行此類測定。可偶合或連接至人類化 6C1 抗體之代表性可偵測標記包括各種酶，諸如山葵過氧化酶、鹼性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙醯膽鹼脂酶；輔基，諸如鏈黴親和素/生物素及抗生物素蛋白/生物素；螢光材料，諸如繖形酮、螢光素、螢光異硫氰酸鹽、玫瑰紅、二氯三嗪胺螢光素、丹磺醯氯或藻紅素；發光材料，諸如流明諾；生物發光材料，諸如螢光素酶、冷光素(luciferin)及水母素(aequorin)；放射性材料，諸如釷⁹⁰ (90Y)、放射銀-111、放射銀-199、鉍²¹³、碘(¹³¹I、¹²⁵I、¹²³I、¹²¹I)、碳(¹⁴C)、硫(³⁵S)、氚(³H)、銦(¹¹⁵In、¹¹³In、¹¹²In、¹¹¹In)、鎝(⁹⁹Tc)、

鈦(^{201}Ti)、鎳(^{68}Ga 、 ^{67}Ga)、鈀(^{103}Pd)、鉬(^{99}Mo)、氙(^{133}Xe)、氟(^{18}F)、 ^{153}Sm 、 ^{177}Lu 、 ^{159}Gd 、 ^{149}Pm 、 ^{140}La 、 ^{175}Yb 、 ^{166}Ho 、 ^{90}Y 、 ^{47}Sc 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{142}Pr 、 ^{105}Rh 、 ^{97}Ru 、 ^{68}Ge 、 ^{57}Co 、 ^{65}Zn 、 ^{85}Sr 、 ^{32}P 、 ^{153}Gd 、 ^{169}Yb 、 ^{51}Cr 、 ^{54}Mn 、 ^{75}Se 、 ^{113}Sn 及 ^{117}In ；正子發射材料，其使用各種正子發射斷層攝影術；非放射性順磁金屬離子；以及放射性標記或結合至特異性放射性同位素的分子。

【0211】 放射性同位素向抗體之鍵聯可用習知雙官能螯合物進行。就放射銀-111 及放射銀-199 鍵聯而言，可使用基於硫的連接子。參見 Hazra 等人, *Cell Biophys.* 24-25:1-7 (1994)。銀放射同位素之鍵聯可涉及用抗壞血酸減少免疫球蛋白。就諸如 ^{111}In 及 ^{90}Y 之放射同位素而言，可使用替伊莫單抗(ibrutinomab tiuxetan)且將於此類同位素反應以分別形成 ^{111}In -替伊莫單抗及 ^{90}Y -替伊莫單抗。參見 Witzig, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 48 增刊 1:S91-S95 (2001)。

【0212】 治療部分、其他蛋白質、其他抗體及/或可偵測標記可使用此項領域中已知的技術直接或經由中間物(例如，連接子)間接偶合或結合至鼠類、嵌合、鑲飾或人類化 6C1 抗體。參見例如，Arnon 等人，「Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy」, *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy* 中, Reisfeld 等人(編), 第 243-56 頁 (Alan R. Liss, 公司 1985); Hellstrom 等人，「Antibodies For Drug Delivery」, *Controlled Drug Delivery* 中 (第 2 版), Robinson 等人(編), 第 623-53 頁 (Marcel Dekker, 公司 1987)；Thorpe, 「Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review」, *Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications* 中, Pinchera 等人(編), 第 475-506 頁 (1985)；「Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy」, *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin 等人(編), 第 303-16 頁 (Academic Press 1985)；以及 Thorpe 等人, *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982)。合適的連接子包括例如可裂及非可裂連接子。可採用以下不同連接子，其在酸性或還原性條件下，在暴露於特異性蛋白酶，或在其他所限定的條件下釋放偶合的治療部分、蛋白質、抗體及/或可偵測標記。

V. 治療應用

【0213】 以上抗體可用於治療或實現預防患者之疾病，該患者患有至少部分由甲狀腺素運送蛋白(TTR)且尤其由 TTR 之單體、錯誤折疊、聚集或原纖維形式介導的疾病或出於該疾病風險中。儘管機制之理解並非實踐所需，咸信任何或所有以下機制可有助於使用上文抗體治療 TTR 類澱粉變性：TTR 聚集及原纖成形之抗體介導抑制、TTR 之非毒性構形(例如，四聚物形式)之抗體介導穩定或聚集 TTR、寡聚 TTR 或單體 TTR 之抗體介導清除。抗體-藥物結合物可具有藉由結合部分所決定的另外作用機制。

【0214】 以有效方案投與抗體，其意謂劑量、投與途徑及投與頻率延緩發作、降低嚴重性、抑制進一步惡化，及/或改善所治療病症之至少一種徵象或症狀。若患者已罹患病症，則該方案可稱為治療有效性方案。若患者處於相對於一般人群高的病症風險，但仍未經歷症狀，則該方案可稱為預防有效性方案。在一些情況下，治療或預防效力可於個別患者中相對於病史對照或相同患者之過去經驗進行觀察。在其他情況下，治療或預防效力可於臨床前或臨床試驗中於治療人群相對於未治療對照人群進行證明。

【0215】 除了其他因素，投與頻率取決於循環中抗體之半衰期、患者之病狀及投與途徑。頻率可為每天、每週、每月、每季度或無規間隔，其根據患者病狀之變化或治療之病症之進展。靜脈內投與之示範性頻率在治療的連續療程內介於每週與每季度之間，儘管更大或更小頻率給藥亦為可能的。就皮下投與而言，示範性給藥頻率為每天至每月，儘管大或更小頻率給藥亦為可能的。

【0216】 所投與劑量之數目取決於病症為急性還是慢性及病症對治療之反應。就急性病症或慢性病症之急性加重而言，在 1 個與 10 個劑量之間常常為足夠的。有時單一彈丸式劑量(bolus dose)，視情況以分開形式，足夠用於急性病症或慢性病症之急性加重。就急性病症或急性加重復發而言，可重複治療。就慢性病症而言，可在規律間隔下投與抗體，例如，每週、每兩週、每月、每季度、每六個月持續至少 1、5 或 10 年或患者之生命期。

VI. 醫藥組成物及使用方法

【0217】 本文提供診斷、監測、治療或實現預防至少部分由甲狀腺素運送蛋白(TTR)、及尤其藉由 TTR 之單體、錯誤折疊、聚集或原纖維形式(例如，TTR 類澱粉變性)介導之疾病或病狀的數種方法。此類疾病之實例包括家族性 TTR 類澱粉變性，諸如家族性類澱粉蛋白心肌病變(FAC)、家族性類澱粉蛋白多發性神經病變(FAP)或中樞神經系統選擇性類澱粉變性(CNSA)，及散發性 TTR 類澱粉變性，諸如老年全身性類澱粉變性(SSA)或老年心臟類澱粉變性(SCA)。上文所述之抗體可併入之醫藥組成物中用於此類方法中。一般而言，抗體或含有抗體之醫藥組成物投與至有需要的受試者。接受治療的患者包括處於 TTR 類澱粉變性風險但不展示症狀的個體，以及當前展示症狀的患者。一些患者可在 TTR 類澱粉變性之前驅階段期間治療。

【0218】 醫藥組成物可預防性地投與至具有已知 TTR 類澱粉變性之遺傳風險的個體。此類個體包括親屬已經歷此類疾病之個體，及風險藉由遺傳或生物化學標誌物(例如，TTR 中與 TTR 類澱粉變性相關聯的突變)之分析，包括使用本文所提供的診斷方法測定的個體。舉例而言，編碼 TTR 之基因中存在超過 100 種牽涉 TTR 類澱粉變性之突變。參見例如，US 2014/0056904；Saraiva, *Hum. Mutat.* 17(6):493-503 (2001)；Damas 及 Saraiva, *J. Struct. Biol.* 130:290-299；Dwulet 及 Benson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 114:657-662 (1983)。

【0219】 罹患 TTR 澱粉樣變性之個體可有時根據 TTR 澱粉樣變性之臨床表現加以識別，該等臨床表現包括以下中一或多者：(1)神經病性疾病之家族病史，特定言之與心臟衰竭相關聯者；(2)未知病因學之神經病性疼痛或進行性感覺障礙；(3)無明顯原因之腕隧道症候群，尤其是雙側性的情況且需要手術鬆弛；(4)未知病因學之胃腸道運動性障礙或自主神經功能不良(例如，勃起功能不良、起立性低血壓、神經性膀胱功能障礙(gladder))；(5)特徵為不存在高血壓之心室壁增厚的心臟病；(6)未知起因的房室傳導阻滯增強，具體而言當伴隨有心臟增厚時；以及(6)棉絨型之玻璃體內容物。參見 Ando 等人, *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8:31 (2013)。然而，TTR 類澱粉變性之決定性診斷通常依賴於靶標器官生檢，接著用類澱粉蛋白特

異性染料剛果紅將切除組織進行組織染色。若觀察到對類澱粉蛋白為陽性測試，則隨後進行 TTR 之免疫組織化學染色以確保造成類澱粉蛋白形成的前驅蛋白確實為 TTR。就家族性形式的疾病而言，在可進行決定性診斷之前，就需要證明編碼 TTR 的基因中之突變。

【0220】 受試者之鑑別可發生於臨床環境中，或在其他情況下，諸如在受試者家中，例如經由受試者自己使用自測套組。舉例而言，受試者可基於以下各種症狀鑑別，諸如：周邊神經病變(感覺及運動)、自主神經病變、胃腸道損傷、心肌病變、腎病變或眼沉積。參見 Ando 等人, *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8:31 (2013)。受試者亦可藉由受試者之血漿樣本中 TTR 之非原態形式之水準相較於對照樣本增加來鑑別，如實例中所揭示。

【0221】 根據 TTR 類澱粉變性之家族病史、遺傳測試或醫學篩選，治療可在任何年齡(例如，20、30、40、50、60 或 70 歲)開始。治療通常需要在一段時間內多個劑量，且可藉由分析治療劑(例如，包含胺基酸殘基 89-97 的 TTR 之截斷形式)隨時間的抗原或活化 T 細胞或 B 細胞反應來監測。若反應下降，則指示為加強劑量。

【0222】 在預防性應用中，將抗體或包含該抗體之醫藥組成物，以有效減少風險、減輕嚴重程度或延緩疾病之至少一種徵象或症狀發作之方案(劑量、頻率及投與途徑)，投與至易患疾病(例如，TTR 類澱粉變性)，或另外處於疾病風險的受試者。在治療性應用中，將抗體或誘導抗體的免疫原，以有效改善或至少部分抑制疾病之至少一種徵象或症狀之進一步惡化之方案(劑量、頻率及投與途徑)，投與至易患或已罹患疾病(例如，TTR 類澱粉變性)的患者。

【0223】 若個別經治療受試者達成比未藉由本文所揭示之方法治療的可比較受試者之對照群體中的平均結果更有利的結果，或若在 $p < 0.05$ 或 0.01 或甚至 0.001 水準下，在受控臨床試驗(例如，II 期、II/III 期或 III 期試驗)或動物模型中證明方案在受治療受試者中相對對照受試者之更有利結果，則認為方案為治療或預防有效。

【0224】 抗體之有效方案可用於例如：抑制或減少患有與 TTR 累積相關聯的病狀或冒其風險的受試者中 TTR 之聚集；抑制或減少患有與 TTR

累積相關聯的病狀或冒其風險的受試者中 TTR 原纖成形；減少或清除患有與 TTR 累積相關聯的病狀或冒其風險的受試者中 TTR 沉積物或聚集 TTR；穩定患有與 TTR 累積相關聯的病狀或冒其風險的受試者中 TTR 之非毒性構形；抑制患有與 TTR 累積相關聯的病狀或冒其風險的受試者中 TTR 聚集体、原纖維或沉積物之毒性作用；診斷疑似包含類澱粉蛋白累積之組織中 TTR 類澱粉蛋白累積物之存在或不存在；在投與抗體之後藉由偵測受試者中結合抗體之存在測定受試者中 TTR 沉積物之水準；偵測受試者中 TTR 之單體、錯誤折疊、聚集或原纖維形式之存在；監測且評估用於治療診斷有 TTR 類澱粉變性的患者的治療藥劑之效力；誘導受試者中包含抗體對 TTR 之免疫反應；延緩受試者中與 TTR 類澱粉蛋白相關聯的病狀之發作；或治療或實現預防患者中之 TTR 類澱粉變性。

【0225】 有效劑量取決於許多不同因素而變化，諸如投與手段、靶標位點、受試者之生理學狀態、受試者為人類還是動物、所投與之其他藥物，及治療為預防性還是治療性。

【0226】 抗體之示範性劑量範圍可為約 0.1-20 或 0.5-5 mg/kg 體重(例如，0.5、1、2、3、4 或 5 mg/kg)或 10-1500 mg 作為固定劑量。劑量取決於患者之病狀及治療前反應(若存在)、治療為預防性還是治療性及病症為急性還是慢性，以及其他因素。

【0227】 可以此類劑量每天、隔天、每週、每兩週、每月、每季度，或根據藉由憑經驗分析所判定的其他時程投與抗體。示範性治療需要以多劑量形式經延長的時間(例如至少六個月)進行投與。其他示範性治療方案需要每兩週投與一次或一月投與一次或每 3 至 6 個月投與一次。

【0228】 可經由外周途徑投與抗體。投與途徑包括局部、靜脈內、經口、皮下、動脈內、顱內、鞘內、腹膜內、鼻內或肌肉內。抗體之投與途徑可為靜脈內或皮下。靜脈內投與可例如藉由輸注經諸如 30-90 分鐘之時間段。注射類型最通常在手臂或腿部肌肉內進行。在一些方法中，將試劑直接注射至沉積物已聚集的具體組織中，例如顱內注射。

【0229】 用於腸胃外投與之醫藥組成物可為無菌的且實質上等張的(250-350 mOsm/kg 水)且在 GMP 條件下製造。醫藥組成物可以單位劑量形

式(例如，單一投與的劑量)提供。醫藥組成物可使用一或多種生理上可接受之載劑、稀釋劑、賦形劑或佐劑調配。調配物取決於所選擇的投與途徑。就注射而言，抗體可於水溶液中調配，例如於生理上相容的緩衝液中，諸如漢克氏(Hank's)溶液、林格氏溶液或生理鹽水或乙酸鹽緩衝液(以減少注射位點處的不適)。溶液可含有諸如懸浮劑、穩定劑及/或分散劑的調配試劑。在使用前，替代抗體可呈凍乾形式用於與合適媒劑，例如無菌無熱原水組合。

【0230】 方案可與有效治療或預防治療疾病之另一試劑組合投與。此類試劑可包括抑制 TTR 之表現的 siRNA 或作為四聚物形式 TTR 之穩定劑的 Vyndaqel。

【0231】 治療之後，可評估受試者病狀以測定此類治療之進程或效力。此類方法較佳測試 TTR 類澱粉蛋白水準或 TTR 之非原態形式之水準的變化。舉例而言，可評估 TTR 類澱粉蛋白水準以測定相對於治療之前在可比較環境下受試者 TTR 類澱粉蛋白水準的改良。受試者 TTR 類澱粉蛋白水準亦可在可比較環境下與對照人群進行比較。對照群體可為類似患病的未治療受試者或正常未治療受試者(及其他對照受試者)。相對於類似患病、未治療受試者或接近或達到為治療正常受試者之水準的水準之改良指示對治療的陽性反應。

【0232】 TTR 類澱粉蛋白水準可藉由許多方法，包括成像技術來量測。合適的成像技術之實例包括用以下進行的 PET 掃描：放射標記 TTR 或其片段、TTR 抗體或其片段、基於剛果紅的類澱粉蛋白成像試劑(諸如 PIB (US 2011/0008255)，類澱粉蛋白成像肽 p31(基於剛果紅染色組織染色，類澱粉蛋白成像肽 p31 之生物分佈與類澱粉蛋白定量相關, Wall 等人, 摘要編號 1573, 2011 ISNM 年會))及其他 PET 標記。TTR 之非原態形式之水準可例如藉由用本文所揭示之抗體對受試者之血漿樣本或活檢樣本進行 SDS-PAGE/西方墨點法或 Meso Scale Discovery 板分析且如實例中所述與對照樣本進行比較來量測。

A. 診斷及監測方法

【0233】 本文亦提供偵測患者中針對 TTR 的免疫反應之方法，該患者罹患或易患與 TTR 沉積或 TTR 之病原形式(例如，TTR 之單體、錯誤折疊、聚集或原纖維形式)相關聯的疾病。該等方法可用於監測用本文所提供的試劑的治療性或預防性治療之療程。被動免疫之後的抗體曲線通常展示抗體濃度之當前峰，接著指數衰減。在無另一劑量的情況下，衰減在數天至數月的時間段內接近治療前水準，其取決於所投與抗體之半衰期。舉例而言，一些人類抗體之半衰期為大約 20 天。

【0234】 在一些方法中，受試者中抗體對 TTR 之基線量測可在投與之前進行，第二次量測在投與之後不久進行以測定峰抗體水準，且一或多次另外量測間隔地進行以監測抗體水準之衰減。當抗體之水準下降至基線或低於基線的預定百分比峰(例如，50%、25%或 10%)時，投與另一劑量抗體之投與。在一些方法中，將低於背景的峰或後續量測的水準與先前測定的參考水準進行比較以構成其他受試者中有益的預防性或治療性治療方案。若所量測的抗體水準顯著小於參考水準(例如，在受益於治療的受試者之群體中小於平均值減一倍或較佳兩倍參考值之標準偏差)，則指示投與額外劑量的抗體。

【0235】 亦提供例如藉由量測受試者之樣本中 TTR 類澱粉蛋白或 TTR 之病原形式(例如，TTR 之單體、錯誤折疊、聚集或原纖維形式)或藉由受試者中 TTR 之體內成像，偵測受試者中 TTR 之單體、錯誤折疊、聚集或原纖維形式之方法。此類方法可用於診斷與 TTR 之病原形式(例如，TTR 類澱粉變性)相關聯的疾病或疾病易感性或確認其診斷。該等方法亦可用於無症狀受試者。TTR 之單體、錯誤折疊、聚集或原纖維形式之存在指示對未來無症狀疾病的易感性。該等方法亦可用於監測先前診斷有 TTR 類澱粉變性的受試者中疾病進展及/或治療反應。

【0236】 獲自患有 TTR 類澱粉變性、疑似患有 TTR 類澱粉變性或冒 TTR 類澱粉變性風險的受試者之生物樣本可與本文所揭示之抗體接觸以估計 TTR 之單體、錯誤折疊、聚集或原纖維形式之存在。舉例而言，此類受試者中 TTR 之單體、錯誤折疊、聚集或原纖維形式之水準可相較於健康受試者中存在的水準。或者，接受疾病治療的此類受試者中 TTR 類澱粉蛋白

或 TTR 之病原形式(例如，TTR 之單體、錯誤折疊、聚集或原纖維形式)之水準可與未治療 TTR 類澱粉變性的受試者中之水準進行比較。一些此類測試涉及獲自此類受試者之組織的生檢。ELISA 分析亦可為例如用於估計流體樣本中 TTR 之單體、錯誤折疊、聚集或原纖維形式之水準的可用方法。一些此類 ELISA 分析涉及相對於 TTR 之正常四聚物形式較佳結合 TTR 之單體、錯誤折疊、聚集或原纖維形式的抗 TTR 抗體。

【0237】 體內成像方法可藉由投與諸如結合受試者中 TTR 之單體、錯誤折疊、聚集或原纖維形式的抗體的試劑，且隨後在其結合之後偵測試劑來工作。此類抗體通常結合至 TTR 之殘基 89-97 內的抗原決定位。若需要，則清除反應可藉由使用缺乏諸如 Fab 之全長恆定區的抗體片段來避免。在一些方法中，相同抗體可充當治療及診斷試劑兩者。

【0238】 診斷試劑可藉由靜脈內注射至受試者體內，或經由認為合理的其他途徑來投與。試劑之劑量應在與治療方法相同的範圍內。通常，試劑經標記，儘管在一些方法中，具有 TTR 之單體、錯誤折疊、聚集或原纖維形式之親和力的一級試劑未經標記，且二級標記試劑用於結合該一級試劑。標記之選擇取決於偵測手段。舉例而言，螢光標記適用於光偵測。順磁標記之使用適用於斷層攝影偵測而無手術介入。放射性標記亦可使用 PET 或 SPECT 偵測。

【0239】 診斷係藉由將標記基因座之數目、大小及/或強度與對於基線值比較來進行。基線值可代表未患病個體之群體中之平均水準。基線值亦可代表相同受試者中所測定的先前水準。舉例而言，基線值可在治療之前於受試者中測定，且之後將量測值與基線值進行比較。值相對於基線的減小一般而言標誌治療之陽性反應。

IX. 套組

【0240】 本發明進一步提供包含本文所揭示之人類化 6C1 抗體及諸如使用說明書(例如，包裝插頁)之相關材料的套組(例如，容器)。使用說明書可含有例如投與抗體及視情況一或多種另外試劑的說明書。抗體之容器可為單位劑量、大包裝(例如，多劑量包裝)或亞單位劑量。

【0241】 包裝插頁係指習慣上包括於治療產品之商業包裝中之說明書，其含有關於涉及此等治療產品之使用之適應症、用法、劑量、投與、禁忌及/或警告之資訊。

【0242】 套組亦可包括第二容器，其包含醫藥學上可接受之緩衝劑，諸如注射用抑菌水(BWFI)、磷酸鹽緩衝液、林格氏溶液及右旋糖溶液。其可亦包括自商業及使用者觀點看來合乎需要之其他材料，包括其他緩衝劑、稀釋劑、過濾器、針及注射器。

X. 其他應用

【0243】 在臨床診斷或治療之情景中或在研究中，抗體可用於偵測甲狀腺素運送蛋白(TTR)之單體、錯誤折疊、聚集或原纖維形式，或其片段。舉例而言，抗體可用於偵測生物樣本中 TTR 之單體、錯誤折疊、聚集或原纖維形式之存在作為生物樣本包含 TTR 類澱粉蛋白沉積物之指示。抗體對生物樣本之結合可與抗體對對照樣本之結合比較。對照樣本及生物樣本可包含相同組織起源之細胞。對照樣本及生物樣本可獲自相同個體或不同個體且在相同情況下或在不同情況下。若需要，則在多種情況下評估多種生物樣本及多種對照樣本以避免與樣本之間差異無關的隨機變化。隨後可在生物樣本與對照樣本之間進行直接比較以測定生物樣本之抗體結合(亦即，TTR 之單體、錯誤折疊、聚集或原纖維形式之存在)相對於對照樣本之抗體結合增大、減小還是相同。抗體對生物樣本之結合相對於對照樣本增大指示生物樣本中 TTR 之單體、錯誤折疊、聚集或原纖維形式之存在。在一些情況下，抗體結合增大為統計學顯著的。視情況，結合至生物樣本的抗體為至少 1.5 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、10 倍、20 倍或 100 倍高於對照樣本之抗體結合。

【0244】 此外，抗體可用於偵測生物樣本中 TTR 之單體、錯誤折疊、聚集或原纖維形式之存在以監測及評估用於治療診斷患有 TTR 類澱粉變性之患者的治療劑的效力。評估診斷有 TTR 類澱粉變性的患者之生物樣本以在用治療劑開始治療之前確立抗體對樣本之結合基線(亦即，樣本中 TTR 之單體、錯誤折疊、聚集或原纖維形式之存在的基線)。在一些情況下，在多個情況下評估患者之多種生物樣本以確立與治療無關的隨機變異的基線及

量度。隨後以一方案投與治療劑。方案可包括在一段時間內試劑的多次投與。視情況，在多種情況下於患者之多種生物樣本中評估抗體之結合(亦即，TTR 之單體、錯誤折疊、聚集或原纖維形式之存在)以確立隨機變異之量度且展示對免疫療法的反應的傾向。隨後比較抗體結合至生物樣本的各種估計值。若僅進行兩次估計，則可在兩次估計之間進行直接比較以測定兩次估計之間的抗體結合(亦即，TTR 之單體、錯誤折疊、聚集或原纖維形式之存在)增加、減少還是保持相同。若進行超過兩次量測，則可以在用治療劑治療之前開始及進行經過療法療程的時程的形式分析量測。在抗體結合至生物樣本降低的患者(亦即，TTR 之單體、錯誤折疊、聚集或原纖維形式之存在)中，可推斷治療劑在治療患者中之 TTR 類澱粉變性方面為有效的。抗體結合之降低可為統計學顯著的。視情況，結合降低至少 1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 或 100%。抗體結合之估計可結合估計 TTR 類澱粉變性之其他徵象及症狀進行。

【0245】 抗體亦可用作偵測 TTR 之單體、錯誤折疊、聚集或原纖維形式，或其片段的實驗室研究之研究劑。在此類用途中，可將抗體用螢光分子、自旋標記分子、酶或放射性同位素標記，且可以具有進行偵測分析的所有必需試劑的套組形式提供。抗體亦可用於例如藉由親和力層析來純化 TTR 之單體、錯誤折疊、聚集或原纖維形式，或 TTR 之單體、錯誤折疊、聚集或原纖維形式之結合配偶體。

【0246】 抗體亦可用於抑制或減少 TTR 之聚集、抑制或減少 TTR 原纖維成形、減少或清除 TTR 沉積物或 TTR 聚集物或穩定生物樣本中 TTR 之非毒性構形。生物樣本可包含例如血液、血清、血漿或組織(例如，心臟、周邊神經系統、自主神經系統、腎、眼睛或胃腸道之組織)。在一些情況下，TTR 聚集、TTR 原纖維成形或 TTR 沉積物抑制或減少至少 10%、20%、25%、30%、40%、50% 或 75% (例如，10%-75% 或 30%-70%)。本文其他處描述偵測原纖維成形之分析。亦參見 US 2014/0056904。

【0247】 將所有專利文件、網站、其他出版物、登錄號及上文所下文所述的類似者以全文引用之方式併入以用於所有目的，其程度就如同各單

獨項目皆特別地且單獨地指示以引用方式併入一樣。若序列之不同版本在不同時間與登錄號相關聯，則意謂在該申請案之有效申請日期下與登錄號相關聯的版本。有效申請日期意謂實際申請日期或指代登錄號(若適用)的優先權申請案之申請日期中之較早者。同樣，除非另外指示，否則若出版物、網址或其類似者之不同版本在不同時間公開，則意謂在申請案之有效申請日期最早公開的版本。除非另外特定指示，否則本發明之任何特徵、步驟、元件、實施例或態樣可與任何其他者組合使用。儘管已出於清楚及理解之目的藉由說明及實例詳細描述本發明，但是明顯的是，可在隨附申請專利範圍之範疇內進行某些改變及修改。

實例

實例 1. mis-TTR 單株抗體之鑑別

【0248】 如材料及方法(a-d)中所述產生、篩選、表現且純化針對 TTR 之單體、錯誤折疊、原纖維或聚集形式(mis-TTR)的構形特異性單株抗體。為了產生 mis-TTR 單株抗體，檢查人類四聚物 TTR 之晶體結構以找出埋在四聚物中，但在將四聚物解離成其單體次單元之後暴露的蛋白質之區。所鑑別之區為殘基 89-97 (EHAEEVFTA) (SEQ ID NO:42)，其定位於 TTR 之 F 鏈內且在四聚蛋白質之二聚物界面處螯合。蛋白質資料庫之 BLAST 搜索未顯示擁有此序列之任何其他人類蛋白質。

【0249】 合成包含此序列(ggEHAEEVFTAggk)(SEQ ID NO:43)的肽。大寫字母代表 TTR 之殘基 89-97。小寫字母代表另外的連接子殘基，添加該等連接子殘基以提高抗原肽之溶解度且將 9 個胺基酸片段建立為內部序列。此肽連接至聚離胺酸樹突狀核，產生包含多個支鏈連接至 TTR 89-97 肽的離胺酸殘基之核的多抗原肽免疫原(TTR-MAP)。產生表 2 中所列舉的針對 TTR-MAP 之抗體。

【0250】 除此多抗原肽之外，藉由將類似的 TTR 89-97 肽 (Ac-cggEHAEEVFTA-醯胺(SEQ ID NO:44)及 Ac-EHAEEVFTAcgg-醯胺) (SEQ ID NO:45)經由 N 端及 C 端半胱胺酸殘基共價連接至鑰孔血藍蛋白 (TTR89-97-N-KLH 及 TTR89-97-C-KLH)產生含有相同 TTR 片段的兩種其他免疫原。

【0251】 在抗體產生、篩選、表現及純化之後，藉由對於重組人類 TTR F87M/L110M 進行表面電漿子共振(SPR)測定先導 mis-TTR 抗體之詳細結合動力學參數(締合速率(k_a)、解離速率(k_d)及結合親和力常數(K_D))，如表 2 中所示。根據 GE Healthcare 抗小鼠套組中所提供的說明書，將抗小鼠 IgG (GE Healthcare)經由胺偶合固定於感測器晶片 C5 (缺乏聚葡萄糖鏈)上，且捕獲 mis-TTR mAb 至一水準以確保分析物之最大結合為 30-50 RU。將各種濃度的分析物(重組人類 TTR F87M/L110M)以 30 μ l/min 於 3 倍稀釋液中的電泳緩衝液(HBS + 0.05% P-20, 1 mg/mL BSA)中經過所捕獲的配體。就各濃度而言，反應進行使得在締合期間較高分析物濃度達到平衡，以及在解離期間至少 10%的訊號衰減的時間段。至少一個濃度(不為最高或最低)進行兩次。基於初步實驗選擇分析物之濃度範圍以使跨度為至少高於 K_D 10 倍至低於 K_D 10 倍。

【0252】 先導 mis-TTR mAb 之 SPR 分析結果展示於以下表 2 中。

表 2

結合至人類 TTR (F87M/L110M)之先導 mis-TTR 抗體之 SPR 分析

mAb	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	R _{最大}
9D5	2.715E +4	4.930E-4	1.816E-8	31.55
14G8	2.880E+4	5.358E-4	1.861E-8	27.13
5A1	6.107E+4	4.693E-4	7.684E-9	30.98
6C1	4.607E+4	4.151E-4	9.010E-9	26.32

實例 2. mis-TTR 抗體對 TTR 抗原的結合

【0253】 藉由 ELISA 在 0.31 至 2.5 μ g/ml 範圍的濃度下使用 pH 4.0 處理的 TTR (pH4-TTR)及原態 TTR 作為披覆抗原分析四種先導 mis-TTR mAb (9D5、14G8、6C1 及 5A1)。TTR 抗原製備及 ELISA 協定描述於材料及方法中其他處(e-g)。

【0254】 所得抗原曲線以及表列 K_d 及 $B_{最大}$ 值展示於以下圖 3 及表 3 中。圖 3 中之結果以任意單位(a.u.)表示於 y 軸上。所有 mAb 展示對 pH4-TTR 的顯著結合，其中 K_d 值在 16 nM (6C1)至 282 nM (9D5)範圍內。結合至 pH4-TTR 的 $B_{最大}$ 值在下限 0.65 a.u. (14G8)至上限 2.02 (9D5)範圍內。與對

pH4-TTR 的結合相反，沒有抗體展示對原態 TTR 的顯著結合，從而指示所產生的所有 TTR 抗體皆對 TTR 之非原態形式具有特異性。

表 3

結合至 pH4-TTR 的先導 mis-TTR 抗體之 ELISA 分析

mAb	K_d (nM)	B_{最大}(a.u.)
9D5	282	2.02
14G8	108	0.65
6C1	16	1.07
5A1	23	1.61

實例 3. 藉由 SDS-PAGE 及原態-PAGE 分析 mis-TTR 抗體

【0255】 藉由 SDS-PAGE/西方墨點分析 9D5 及 14G8 以證明對於 TTR 之單體/變性形式相對原態非變性 TTR 之結合特異性。SDS-PAGE、原態-PAGE 及西方墨點法協定描述於方法及材料中其他處(h-j)。

【0256】 將非變性 TTR 或 pH4-TTR 與熱變性 TTR 及熱變性 pH4-TTR 並排在 SDS-PAGE 凝膠上進行電泳。在電泳之後，將凝膠於硝化纖維素上進行西方墨點且用 TTR mAb 9D5 及 14G8 染色。兩種抗體僅識別當在 pH4 下處理時或當 TTR 或 pH4-TTR 在 SDS-PAGE 之前首先熱變性的 TTR。此等 9D5 及 14G8 因此展示對於藉由 TTR 之變性或藉由在 pH4 下處理 TTR 所產生的 TTR 構形的特異性。

【0257】 亦藉由 SDS-PAGE/西方墨點分析 6C1 及 5A1 連同全部 TTR mAb (7G7, 8C3)及可商購獲得的 Sigma 多株抗體。各墨點含有染色分子量標誌物、非變性 TTR 及 pH4-TTR。

【0258】 染色 SDS-PAGE 凝膠展示非變性 TTR 樣本中存在的主要物質為約 38 kDa 二聚物。相反，pH4-TTR 樣本中存在的主要組分以約 35 kDa 二聚物形式進行，其中少量二聚物為約 15 kDa 單體之二聚物。此二聚物以略小於非變性 TTR 樣本中存在的二聚物之蛋白質形式進行，指示兩種 TTR 二聚物物質之間的構形差異。

【0259】 使用四種 mis-TTR 抗體的 TTR 及 pH4-TTR 之西方墨點法展示此等 mAb 不識別非變性 TTR，但結合至 pH4-TTR 樣本中存在的變性單

體及二聚物。因此，當藉由 SDS-PAGE/西方墨點分析時，四種 mis-TTR mAb (9D5、14G8、6C1 及 5A1) 展示對 TTR 之非原態構形的類似特異性。

【0260】 與四種 mis-TTR mAb 相反，作為兩種 TTR 對照 mAb，經由具有完整 TTR 的小鼠之免疫所產生之 7G7 及 8C3 識別 TTR 及 pH4-TTR 樣本中存在的所有 TTR 物質，包括四聚物 TTR 物質。因此，不同於 mis-TTR mAb，此等對照 mAb 結合 TTR 但不具有構形特異性。Sigma 多株抗體之行爲類似於 7G7 及 8C3 對照 mAb。

【0261】 亦在原態凝膠上對 TTR 及 pH4-TTR 進行實驗以看是否四種 mis-TTR mAb 能夠展示在非變性凝膠條件下的構形特異性。在染色原態 PAGE 凝膠上，TTR 以具有少量四聚物的約 35 kDa 原態二聚物形式進行。相反，pH4-TTR 主要以具有少量約 35 kDa 二聚物之高分子量塗片(smear)形式進行。非特異性 Sigma 多株抗體識別 TTR 及 pH4-TTR 樣本中存在的所有 TTR 物質。相反，9D5 僅識別 pH4-TTR 樣本中存在的高分子量 TTR 物質。如 SDS-PAGE/西方墨點研究中所觀察，9D5 不識別原態 TTR 物質中之任一者。

【0262】 隨後藉由原態-PAGE/西方墨點法分析所有四種 mis-TTR mAb。如所預期且類似於 9D5，其他 mis-TTR mAb，14G8、6C1 及 5A1，特異性結合至 pH4-TTR 樣本中存在的 TTR 之高分子量非原態形式。此等抗體中沒有抗體識別約 35 kDa 原態 TTR 二聚物。此等結果指示，四種 mis-TTR mAb 之行爲類似且僅識別構形不同於原態 TTR 的非原態 TTR 物質。

實例 4. mis-TTR 抗體對 TTR 纖維形成的抑制

【0263】 TTR-Y78F 為一種含有在蛋白質序列之位置 78 處使 TTR 四聚物去穩定化的點突變的 TTR 變體。隨著時間的推移且在略微酸性條件下，TTR 變體解離成其單體次單元，其隨後可繼續聚集且形成能夠結合至硫代黃素-T 的纖維。纖維形成之程度可因此藉由量測 480 nm 下之硫代黃素-T 螢光來監測。引入對解離 TTR 單體或聚集物具有特異性的 mis-TTR 抗體可防止 TTR 纖維之組裝導致硫代黃素-T 螢光相對於無抗體對照反應物減小。用於檢查 TTR 纖維形成的抑制的協定描述於材料及方法中其他處(k)。

【0264】 所有四種 mis-TTR 抗體相對於同型對照強烈抑制硫代黃素-T 反應性 TTR-Y78F 纖維之形成(結果展示於圖 4 中且以任意單位(a.u.)呈現於 y 軸上)。mis-TTR 抗體 5A1 幾乎完全抑制纖維形成。此等結果與 mis-TTR 抗體結合 TTR 之單體及/或聚集形式，從而防止 TTR 纖維形成之想法一致。

【0265】 表 4 總結針對 4 種 mis-TTR 抗體(9D5、14G8、6C1 及 5A1)組所獲得的特徵化資料，其展示對 TTR 之非原態形式之良好的構形選擇性。此等抗體對 pH4-TTR 的親和力(K_D)在 14.5 nM (6C1)至 257 nM (9D5)範圍內，且 $B_{最大}$ 值在 0.65 a.u. (14G8)至 2.02 (9D5)範圍內。此等抗體中沒有抗體識別原態 TTR，但關於結合至 SDS-PAGE/西方墨點法的 pH4-TTR 及原態-PAGE/西方墨點法的高分子量 TTR 聚集物。在使用 Thio-T 的纖維形成分析中，根據讀出，此等抗體亦抑制 TTR 纖維之形成。

表 4
mis-TTR-Y78F mAb 特徵化匯總表

殖株編號	夾心 ELISA (pH4-TTR)		西方墨點法			%抑制原 纖維 (Thio-T)
	K _D (nM)	B 最大 (OD ₄₅₀ a.u.)	SDS-PAGE		原態 (HMW-TTR)	
			(TTR)	(pH4-TTR)		
9D5	257	2.02	-	+++	+++	83
14G8	98.7	0.65	-	+++	++	65
6C1	14.6	1.07	-	+++	+++	72
5A1	21.3	1.61	-	+++	+++	100

【0266】 TTR-V122I 為一種含有在位置 122 處使四聚物去穩定化的單點突變之 TTR 變體。原纖成形與 ThT 螢光增大相關聯。增大 14G8 mAb 濃度造成 ThT 螢光中單體減少，指示 TTR 纖維化之次化學計量抑制($IC_{50}=0.028\pm0.009$ mg/mL ; n=3 ; 圖 4B 及表 4a)。同型對照 mAb 不造成 TTR 纖維化之抑制(圖 4C)，因此證明 14G8 介導之抑制的特異性。

【0267】 對 5A1 及 6C1 所測定的可比較次化學計量 IC_{50} 值(表 4a)表明對於此等 mis-TTR mAb 中每一者的原纖維抑制之相似機制。相反，9D5

非預期地無法抑制 TTR-V122I 原纖成形，儘管其展示對於非原態 TTR 類似的特異性及親和力。仍需研究是否 9D5 對所使用的分析條件更敏感。

表 4a

mis-TTR-V122I mAb 特徵化匯總表

抗體	IC ₅₀ ± SD (mg/mL)
9D5	無抑制
14G8	0.028 ± 0.009
6C1	0.048 ± 0.059
5A1	0.015 ± 0.02
EG 27/1	無抑制

實例 5. 使用 mis-TTR mAb 免疫組織化學(IHC)特徵化 ATTR 組織

【0268】 於來自經確認 TTR 心臟類澱粉變性患者之新鮮冷凍且石蠟處理的組織上對針對甲狀腺素運送蛋白之 TTR 89-97 片段所產生的先導 mis-TTR mAb 進行免疫組織化學測試。用於獲得且製備心臟組織樣本的協定、免疫組織化學(IHC)及影像分析皆提供於材料及方法中其他處(1-o)。用於 IHC 的抗體描述於表 5 中。

表 5

用於免疫組織化學特徵化的抗體

抗體	抗體類型	供應商	染色心臟組織	濃度
14G8	mis-TTR	Prothena Biosciences	是	0.5 µg/mL
9D5	mis-TTR	Prothena Biosciences	是	0.5 µg/mL
6C1	mis-TTR	Prothena Biosciences	是	0.5 µg/mL
5A1	mis-TTR	Prothena Biosciences	是	0.5 µg/mL
7G7	TTR	Prothena Biosciences	是	0.5 µg/mL
6F10	同型對照	Prothena Biosciences	否	0.5 µg/mL
前白蛋白 (A0002)	TTR	Dako North America	是	1:2,000 及 1:20,000
κ 輕鏈 (A0191)	LC-κ	Dako North America	否	1:8,000
λ 輕鏈 (A0193)	LC-λ	Dako North America	否	1:8,000

類澱粉蛋白 A (M0759)	AA	Dako North America	否	1:8,000
--------------------	----	--------------------	---	---------

【0269】 心臟組織樣本獲自確診 ATTR 突變之患者。免疫組織化學檢查之案例之人口統計如下且總結於表 6 中：FAC = 家族性類澱粉蛋白心肌病變；FAP = 家族性類澱粉蛋白多發性神經病變；1° AL = 輕鏈類澱粉變性；ATTR = 甲狀腺素運送蛋白介導之類澱粉變性；Unk = 未知

表 6

用 mis-TTR 抗體之心臟組織樣本之免疫組織化學染色

案例	診斷	TTR 突變	型式	用 TTR 抗體染色？
患者 1	FAC	Ileu122	冷凍	是
患者 2	FAP	野生型	冷凍	是
患者 3	FAP	84Ser	冷凍	是
患者 4	FAP	84Ser	冷凍	是
患者 5	1° AL	--	冷凍	否
患者 6	1° AL	--	冷凍	否
患者 7	ATTR	10Arg	冷凍	是
患者 8	ATTR	V122I	冷凍	是
患者 H1	ATTR	Val122Ile	FFPE	是
患者 H2	ATTR	Thr60Ala	FFPE	是
患者 H3	ATTR	Thr49Ala	FFPE	是
患者 H4	ATTR	Ile84Ser	FFPE	是
患者 H5	Unk.	老年心臟	FFPE	是
患者 H6	ATTR	Ile84Ser	FFPE	是

【0270】 於來自經確認 TTR 心臟類澱粉變性患者之新鮮冷凍且石蠟處理的組織上對針對甲狀腺素運送蛋白之 89-97 片段所產生的小鼠單株抗體(mis-TTR mAb)進行免疫組織化學測試。各 mis-TTR 抗體在 ATTR 心臟組織上展示免疫反應性。遍及心肌及脈管系統之沉積物中觀察到深色染色。當將免疫反應性與用剛果紅染色硫代黃素-T 相比較時，組織中免疫反應性之大多數展示與剛果紅雙折射及硫代黃素 T 陽性染色高度一致。此證實此組織中所沉積的 TTR 類澱粉蛋白之 β 褶板本質。此等 mis-TTR 抗體亦偵測前類澱粉蛋白 TTR，其定位於心肌中 TTR 免疫陽性但剛果紅或硫代黃素 T 陰性的區域。IgG 同型對照抗體及一級抗體省略切片均對於跨所測試的所有

組織的染色為陰性。對其他類澱粉蛋白產生蛋白(λ 及 κ 輕鏈或類澱粉蛋白 A)具有反應性的抗體對此分析中所使用的 ATTR 心臟組織不具有反應性，指示沉積物特定言之本質上為 TTR。

【0271】 將 mis-TTR 抗體之染色圖案與用良好特徵化的市售 TTR 參考抗體(前白蛋白，A0002；Dako；Carpinteria, CA)所獲得的染色圖案進行比較。DAKO 參考抗體染色與 mis-TTR 抗體相同區域中的患病心肌，但產生更分散的顏色圖案。DAKO 參考抗體染色脈管系統上存在的剛果親和性(congophilic) TTR 類澱粉蛋白沉積物並不像 mis-TTR 抗體一樣強。

【0272】 mis-TTR 抗體不染色正常非病組織。此外，如所預期，用同型對照抗體染色，6F10 亦為陰性。

【0273】 為判定 mis-TTR 抗體之反應性對 TTR 沉積物是否具有特異性，檢查此等抗體對來源於診斷有原發性 AL 類澱粉變性的患者之心臟組織的交叉反應性。如所預期，未觀測到 AL 類澱粉蛋白組織之染色，證實 TTR 抗體對 ATTR 患病組織特異性地反應。

【0274】 確診老年全身性類澱粉變性的患者或證實由 TTR 基因中點突變所造成的 FAC 或 FAP 的患者之心臟組織亦在 14G8、9D5、6C1 及 5A1 之情況下為陽性染色。此等結果指示，mis-TTR 抗體具有識別心臟組織中 TTR 沉積物的能力，與 ATTR 基因型無關。

【0275】 亦對於由 14G8、9D5、6C1 及 5A1 染色檢查已知表現 TTR 的其他非心臟組織，且相較於使用 DAKO 參考抗體所獲得的染色。如所預期，使用 Dako 參考抗體，肝、胰及脈絡叢皆對於 TTR 為陽性染色。相反，mis-TTR 抗體僅染色定位於蘭氏小島(Langerhans)及脈絡叢中的胰 α 細胞，表明定位於此等器官之 TTR 中之一些構形上不同於肝中所表現的 TTR。肝中缺乏 mis-TTR mAb 免疫反應性表明，其中所表現之大量 TTR 主要為四聚原態 TTR 且不具有所敘述的 mis-TTR 表型。

實例 6. 藉由 SDS-PAGE/西方墨點法及藉由 Meso Scale Discovery (MSD) 板分析進行的 ATTR 相對正常人類血漿之分析

【0276】 經確認 V30M ATTR 之患者之六種血漿樣本(樣本#21、#22、#23、#24、#25、#27)及正常受試者之 6 種樣本(樣本#11、#12、#15、#18、

#19、#20) 獲自 M. Saraiva (Porto University, Portugal)。樣本#C6 為獲自市售來源(BioreclamationIVT)之正常人類血清樣本。藉由 SDS-PAGE 及西方墨點法，或藉由 MesoScale Discovery (MSD)板分析來分析樣本。用於此等分析之協定描述於材料中其他處(p-r)。產生使用 6C1 的 MSD 板分析的標準曲線。

【0277】 在使用 9D5 或 5A1 mis-TTR mAb 的所得西方墨點法中，正常與 TTR-V30M 患病血漿樣本之間的差異明顯。所有血漿含有約 14 kDa TTR 帶，其與 pH4-TTR 參考樣本中存在的非原態 TTR 單體共遷移。一般而言，來源於 TTR-V30M 患者的血漿樣本(#21、22、23、24、25 及 27)具有更多此 mis-TTR 物質。此外，來源於 V30M 患者的血漿樣本亦含有約 30 kDa 帶，其與參考樣本中存在的非原態 TTR 二聚物共遷移。除樣本#12 及 #18 之外，血漿樣本亦來源於擁有較少此二聚物物質之正常個體。

【0278】 掃描所得西方墨點，且將各樣本之組合 9D5 或 5A1 反應性 TTR 二聚物及單體帶之強度作圖(結果展示於圖 5A (9D5)及 5B (5A1)中且以任意單位(a.u.)呈現於 y 軸上)。除血漿樣本#15 及#18 之外，來源於正常個體之血漿樣本(11、12、19 及 20)含有少於來源於 V30M 患者之樣本(21-25 及 27)的 9D5 反應性二聚物及單體。

【0279】 藉由 9D5 及 5A1 西方墨點法分析的 12 種血清樣本亦藉由 MSD 板分析，使用 6C1 作為 mis-TTR 捕獲抗體且 Dako-SulfoTag 抗體作為偵測抗體來分析。此等 MSD 分析之結果展示於圖 6 中且以任意單位(a.u.)表示於 y 軸上。樣本 11、12、15、18、19 及 20 代表正常血漿。樣本 21-25 及 27 代表 V30M 患病血漿。

【0280】 除血漿樣本#15 及#18 之外，來源於正常個體之血漿樣本中存在的 6C1 反應性 TTR 之量低於 TTR-V30M 患病個體之血漿中所觀測之量。藉由 MSD 分析所量測的 6C1 反應性水準與上文藉由 SDS-PAGE/西方墨點法所觀測的 9D5 反應性二聚物及單體之量相關性良好。

【0281】 為測定血漿樣本中存在的反應性 TTR 物質之濃度，使用 6C1 作為捕獲抗體且 8C3-SulfoTag 作為偵測抗體再分析相同樣本。將 MSD 訊號使用上文所產生的 TTR F87M/L110M 標準曲線轉換成 ng/ml 反應性 TTR 物質濃度。基於此分析，對照樣本中存在的 6C1 反應性 TTR 之平均濃度為 271

+/- 185 ng/ml。相反，V30M 患病血漿樣本中存在的反應性 TTR 之平均濃度較高，為 331 +/- 95 ng/ml。總而言之，此等 MSD 結果表明，mis-TTR 抗體能夠在 ATTR 疾病相較於正常血漿之間進行區分。此保證進一步發展 mis-TTR 抗體用於 ATTR 疾病之診斷分析中。

實例 7. 人類化 6C1 抗體之設計

【0282】 用於人類化之起始點或供體抗體為小鼠抗體 6C1。成熟 m6C1 之重鏈可變胺基酸序列提供為 SEQ ID NO:1。成熟 m6C1 之輕鏈可變胺基酸序列提供為 SEQ ID NO:13。重鏈 CDR1、CDR2 及 CDR3 胺基酸序列分別提供為 SEQ ID NO:10-12。輕鏈 CDR1、CDR2 及 CDR3 胺基酸序列分別提供為 SEQ ID NO:18-20。Kabat 編號遍及此實例使用。

【0283】 m6C1 之可變 κ (Vk)屬於小鼠 Kabat 子群 2，其對應於人類 Kabat 子群 2。m6C1 之可變重(Vh)屬於小鼠 Kabat 子群 3d，其對應於 Kabat 子群 3。參見 Kabat 等人 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版. NIH 出版號 91-3242, 1991。16 個殘基 CDR-L1 屬於典範類 4，7 個殘基 CDR-L2 屬於典範類 1，且 9 個殘基 CDR-L3 屬於 Vk 之典範類 1。參見 Martin 及 Thornton, J. Mol. Biol. 263:800-15, 1996。10 個殘基 CDR-H1 (Chothia 及 Kabat CDR-H1 之複合物，如表 7 所示之殘基 26-35)屬於典範類 1，且 17 個殘基 CDR-H2 屬於典範類 1。參見 Martin 及 Thornton, J Mol. Biol. 263:800-15, 1996。CDR-H3 不具有典範類。

【0284】 在 Vk 與 Vh 域之間的界面處的殘基為常見殘基。

【0285】 對 PDB 資料庫中之蛋白質進行搜索(Deshpande 等人, Nucleic Acids Res. 33: D233-7, 2005)以找出可提供 6C1 之粗糙結構模型的結構。抗體 fab (pdb 代碼 3EYS)之晶體結構(Gardberg 等人, Biochemistry (2009) 第 48(23)卷, 第 5210-5217 頁)用於 Vk 結構，因為其具有良好的解析度 (1.95Å)、類似於 6C1 Vk 的整體序列且保留與 6C1 相同環的典範結構。二聚體抗體(pdb 代碼 2OTU) (Li 等人, Submission to GenBank (2007))用於 Vh 結構，因為其具有良好的類似性及解析度(1.68 Å)且其含有的 CDR-H1 及 CDR-H2 的典範結構與 6C1 VH 的典範結構相同。BioLuminate 軟體(得到 Schrodinger 公司許可)用於建模 6C1 之粗糙結構。

【0286】 搜索 NCBI 之非冗餘蛋白質序列資料庫允許選擇合適移植鼠類 CDR 的人類架構。就 Vh 而言，選擇人類 Ig 重鏈 ADX65650 (GI: 323432015) (SEQ ID NO:3) (Scheel 等人, Submission to GenBank (2010))。其分享 6C1 之典範形式。就 Vk 而言，選擇 NCBI 登錄代碼 ABI74084(GI: 114385652)的人類 κ 輕鏈(SEQ ID NO:15) (Shriner 等人 Submission to GenBank (2006))。其 CDR-L1 及 L2 之典範類與親代 Vk 之典範類相同。

【0287】 構建六種人類化重鏈可變區變體及兩種人類化輕鏈可變區變體，其含有取代之不同排列(Hu6C1VHv1、Hu6C1VHv1b、Hu6C1VHv2、Hu6C1VHv2b、Hu6C1VHv3 及 Hu6C1VHv3b (分別為 SEQ ID NO:4-9)及 Hu6C1VLv1-2 (分別為 SEQ ID NO:16 及 17)) (表 7 及 8)。示範性人類化 Vh 及 Vk 設計分別展示於表 7 及 8 中，其中回復突變及其他突變係基於所選擇的人類架構。表 7 及 8 中之第一欄中灰色陰影區域指示 CDR 由 Chothia 定義，且表 7 及 8 中剩餘欄中灰色陰影區域指示 CDR 由 Kabat 定義。SEQ ID NO:4-9、16 及 17 含有如表 9 中所展示的回復突變及其他突變。Hu6C1VHv1、Hu6C1VHv1b、Hu6C1VHv2、Hu6C1VHv2b、Hu6C1VHv3 及 Hu6C1VHv3b，及 Hu6C1VLv1-2 中位置 L2、L45、H19、H44、H49、H76、H77、H82(a)、H83 及 H89 處的胺基酸列舉於表 10 中。

表 7
人類化 6C1 Vh 區

Chothia 殘基#	Kabat 殘基#	線性殘基#	FR 或 CDR	鼠類 6C1 VH (SEQ ID NO:1)	Hu VH 受體 Fr Acc# ADX65650 (SEQ ID NO:3)	6C1 VHv1 (SEQ ID NO:4)	6C1 VHv1b (SEQ ID NO:5)	6C1 VHv2 (SEQ ID NO:6)	6C1 VHv2b (SEQ ID NO:7)	6C1 VHv3 (SEQ ID NO:8)	6C1 VHv3b (SEQ ID NO:9)
1	1	1	Fr1	E	E	E	E	E	E	E	E
2	2	2	Fr1	V	V	V	V	V	V	V	V
3	3	3	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
4	4	4	Fr1	L	L	L	L	L	L	L	L
5	5	5	Fr1	V	V	V	V	V	V	V	V
6	6	6	Fr1	E	E	E	E	E	E	E	E
7	7	7	Fr1	S	S	S	S	S	S	S	S
8	8	8	Fr1	G	G	G	G	G	G	G	G
9	9	9	Fr1	G	G	G	G	G	G	G	G
10	10	10	Fr1	G	G	G	G	G	G	G	G
11	11	11	Fr1	L	L	L	L	L	L	L	L

表 7
人類化 6C1 Vh 區

12	12	12	Fr1	V	V	V	V	V	V	V	V
13	13	13	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
14	14	14	Fr1	P	P	P	P	P	P	P	P
15	15	15	Fr1	G	G	G	G	G	G	G	G
16	16	16	Fr1	G	G	G	G	G	G	G	G
17	17	17	Fr1	S	S	S	S	S	S	S	S
18	18	18	Fr1	L	L	L	L	L	L	L	L
19	19	19	Fr1	K	R	R	R	R	R	K	K
20	20	20	Fr1	L	L	L	L	L	L	L	L
21	21	21	Fr1	S	S	S	S	S	S	S	S
22	22	22	Fr1	C	C	C	C	C	C	C	C
23	23	23	Fr1	A	A	A	A	A	A	A	A
24	24	24	Fr1	A	A	A	A	A	A	A	A
25	25	25	Fr1	S	S	S	S	S	S	S	S
26	26	26	CDR-H1	G	G	G	G	G	G	G	G
27	27	27	CDR-H1	F	F	F	F	F	F	F	F
28	28	28	CDR-H1	T	T	T	T	T	T	T	T
29	29	29	CDR-H1	F	F	F	F	F	F	F	F
30	30	30	CDR-H1	S	S	S	S	S	S	S	S
31	31	31	CDR-H1	N	S	N	N	N	N	N	N
32	32	32	CDR-H1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
33	33	33	CDR-H1	Y	E	Y	Y	Y	Y	Y	Y
34	34	34	CDR-H1	M	M	M	M	M	M	M	M
35	35	35	CDR-H1	S	N	S	S	S	S	S	S
36	36	36	Fr2	W	W	W	W	W	W	W	W
37	37	37	Fr2	V	V	V	V	V	V	V	V
38	38	38	Fr2	R	R	R	R	R	R	R	R
39	39	39	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
40	40	40	Fr2	T	A	A	A	A	A	A	A
41	41	41	Fr2	P	P	P	P	P	P	P	P
42	42	42	Fr2	E	G	G	G	G	G	G	G
43	43	43	Fr2	K	K	K	K	K	K	K	K
44	44	44	Fr2	R	G	G	G	G	G	R	R
45	45	45	Fr2	L	L	L	L	L	L	L	L
46	46	46	Fr2	E	E	E	E	E	E	E	E
47	47	47	Fr2	W	W	W	W	W	W	W	W
48	48	48	Fr2	V	V	V	V	V	V	V	V
49	49	49	Fr2	A	S	S	A	S	A	S	A
50	50	50	CDR-H2	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
51	51	51	CDR-H2	I	I	I	I	I	I	I	I
52	52	52	CDR-H2	S	S	S	S	S	S	S	S
52A	52A	53	CDR-H2	I	S	I	I	I	I	I	I
53	53	54	CDR-H2	D	S	D	D	D	D	D	D
54	54	55	CDR-H2	G	G	G	G	G	G	G	G
55	55	56	CDR-H2	N	S	N	N	N	N	N	N
56	56	57	CDR-H2	N	T	N	N	N	N	N	N
57	57	58	CDR-H2	I	I	I	I	I	I	I	I
58	58	59	CDR-H2	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y

表 7
人類化 6C1 Vh 區

59	59	60	CDR-H2	H	Y	H	H	H	H	H	H
60	60	61	CDR-H2	P	A	P	P	P	P	P	P
61	61	62	CDR-H2	D	D	D	D	D	D	D	D
62	62	63	CDR-H2	S	S	S	S	S	S	S	S
63	63	64	CDR-H2	V	V	V	V	V	V	V	V
64	64	65	CDR-H2	K	K	K	K	K	K	K	K
65	65	66	CDR-H2	G	G	G	G	G	G	G	G
66	66	67	Fr3	R	R	R	R	R	R	R	R
67	67	68	Fr3	F	F	F	F	F	F	F	F
68	68	69	Fr3	T	T	T	T	T	T	T	T
69	69	70	Fr3	I	I	I	I	I	I	I	I
70	70	71	Fr3	S	S	S	S	S	S	S	S
71	71	72	Fr3	R	R	R	R	R	R	R	R
72	72	73	Fr3	D	D	D	D	D	D	D	D
73	73	74	Fr3	N	N	N	N	N	N	N	N
74	74	75	Fr3	A	A	A	A	A	A	A	A
75	75	76	Fr3	K	K	K	K	K	K	K	K
76	76	77	Fr3	N	N	N	N	S	S	N	N
77	77	78	Fr3	T	S	T	T	T	T	T	T
78	78	79	Fr3	L	L	L	L	L	L	L	L
79	79	80	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
80	80	81	Fr3	L	L	L	L	L	L	L	L
81	81	82	Fr3	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
82	82	83	Fr3	M	M	M	M	M	M	M	M
82A	82A	84	Fr3	S	N	N	N	S	S	N	N
82B	82B	85	Fr3	S	S	S	S	S	S	S	S
82C	82C	86	Fr3	L	L	L	L	L	L	L	L
83	83	87	Fr3	K	R	R	R	R	R	K	K
84	84	88	Fr3	S	A	A	A	A	A	A	A
85	85	89	Fr3	E	E	E	E	E	E	E	E
86	86	90	Fr3	D	D	D	D	D	D	D	D
87	87	91	Fr3	T	T	T	T	T	T	T	T
88	88	92	Fr3	A	A	A	A	A	A	A	A
89	89	93	Fr3	M	V	V	V	V	V	M	M
90	90	94	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
91	91	95	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
92	92	96	Fr3	C	C	C	C	C	C	C	C
93	93	97	Fr3	A	A	A	A	A	A	A	A
94	94	98	Fr3	R	R	R	R	R	R	R	R
95	95	99	CDR-H3	D	D	D	D	D	D	D	D
96	96	100	CDR-H3	S	L	S	S	S	S	S	S
97	97	101	CDR-H3	D	S	D	D	D	D	D	D
98	98	102	CDR-H3	Y	G	Y	Y	Y	Y	Y	Y
99	99	103	CDR-H3	G	S	G	G	G	G	G	G
100	100	104	CDR-H3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
100G	100G	105	CDR-H3	F	Y	F	F	F	F	F	F
101	101	106	CDR-H3	D	G	D	D	D	D	D	D
102	102	107	CDR-H3	V	Y	V	V	V	V	V	V

表 7
人類化 6C1 Vh 區

103	103	108	Fr4	W	W	W	W	W	W	W	W
104	104	109	Fr4	G	G	G	G	G	G	G	G
105	105	110	Fr4	T	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
106	106	111	Fr4	G	G	G	G	G	G	G	G
107	107	112	Fr4	T	T	T	T	T	T	T	T
108	108	113	Fr4	T	L	L	L	L	L	L	L
109	109	114	Fr4	V	V	V	V	V	V	V	V
110	110	115	Fr4	T	T	T	T	T	T	T	T
111	111	116	Fr4	V	V	V	V	V	V	V	V
112	112	117	Fr4	S	S	S	S	S	S	S	S
113	113	118	Fr4	S	S	S	S	S	S	S	S

表 8
人類化 6C1 Vk 區

Chothia 殘基#	Kaba 殘基#	線性殘基#	FR 或 CDR	鼠類 6C1 VL (SEQ ID NO:13)	Hu VL 受體 Fr Acc#ABI74084 (SEQ ID NO:15)	6C1 VLv1 (SEQ ID NO:16)	6C1 VLv2 (SEQ ID NO:17)
1	1	1	Fr1	D	D	D	D
2	2	2	Fr1	V	I	V	I
3	3	3	Fr1	L	V	V	V
4	4	4	Fr1	M	M	M	M
5	5	5	Fr1	T	T	T	T
6	6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q
7	7	7	Fr1	T	T	T	T
8	8	8	Fr1	P	P	P	P
9	9	9	Fr1	L	L	L	L
10	10	10	Fr1	S	S	S	S
11	11	11	Fr1	L	L	L	L
12	12	12	Fr1	P	P	P	P
13	13	13	Fr1	V	V	V	V
14	14	14	Fr1	S	T	T	T
15	15	15	Fr1	L	P	P	P
16	16	16	Fr1	G	G	G	G
17	17	17	Fr1	D	E	E	E
18	18	18	Fr1	Q	P	P	P
19	19	19	Fr1	A	A	A	A
20	20	20	Fr1	S	S	S	S
21	21	21	Fr1	I	I	I	I
22	22	22	Fr1	S	S	S	S
23	23	23	Fr1	C	C	C	C
24	24	24	CDR-L1	R	R	R	R
25	25	25	CDR-L1	S	S	S	S
26	26	26	CDR-L1	S	S	S	S
27	27	27	CDR-L1	Q	Q	Q	Q

表 8

人類化 6C1 V_h 區

27A	27A	28	CDR-L1	S	S	S	S
27B	27B	29	CDR-L1	I	L	I	I
27C	27C	30	CDR-L1	V	L	V	V
27D	27D	31	CDR-L1	H	H	H	H
27E	27E	32	CDR-L1	S	S	S	S
28	28	33	CDR-L1	N	N	N	N
29	29	34	CDR-L1	G	G	G	G
30	30	35	CDR-L1	N	Y	N	N
31	31	36	CDR-L1	T	N	T	T
32	32	37	CDR-L1	Y	Y	Y	Y
33	33	38	CDR-L1	L	L	L	L
34	34	39	CDR-L1	E	D	E	E
35	35	40	Fr2	W	W	W	W
36	36	41	Fr2	Y	Y	Y	Y
37	37	42	Fr2	L	L	L	L
38	38	43	Fr2	Q	Q	Q	Q
39	39	44	Fr2	K	K	K	K
40	40	45	Fr2	R	P	P	P
41	41	46	Fr2	G	G	G	G
42	42	47	Fr2	Q	Q	Q	Q
43	43	48	Fr2	S	S	S	S
44	44	49	Fr2	P	P	P	P
45	45	50	Fr2	K	Q	K	K
46	46	51	Fr2	L	L	L	L
47	47	52	Fr2	L	L	L	L
48	48	53	Fr2	I	I	I	I
49	49	54	Fr2	Y	Y	Y	Y
50	50	55	CDR-L2	K	L	K	K
51	51	56	CDR-L2	V	G	V	V
52	52	57	CDR-L2	S	S	S	S
53	53	58	CDR-L2	K	N	K	K
54	54	59	CDR-L2	R	R	R	R
55	55	60	CDR-L2	F	A	F	F
56	56	61	CDR-L2	S	S	S	S
57	57	62	Fr3	G	G	G	G
58	58	63	Fr3	V	V	V	V
59	59	64	Fr3	P	P	P	P
60	60	65	Fr3	D	D	D	D
61	61	66	Fr3	R	R	R	R
62	62	67	Fr3	F	F	F	F
63	63	68	Fr3	S	S	S	S
64	64	69	Fr3	G	G	G	G
65	65	70	Fr3	S	S	S	S
66	66	71	Fr3	G	G	G	G
67	67	72	Fr3	S	S	S	S
68	68	73	Fr3	G	G	G	G
69	69	74	Fr3	T	T	T	T
70	70	75	Fr3	D	D	D	D

表 8
人類化 6C1 V_k 區

71	71	76	Fr3	F	F	F	F
72	72	77	Fr3	I	T	T	T
73	73	78	Fr3	L	L	L	L
74	74	79	Fr3	K	K	K	K
75	75	80	Fr3	I	I	I	I
76	76	81	Fr3	S	S	S	S
77	77	82	Fr3	R	R	R	R
78	78	83	Fr3	V	V	V	V
79	79	84	Fr3	E	E	E	E
80	80	85	Fr3	A	A	A	A
81	81	86	Fr3	E	E	E	E
82	82	87	Fr3	D	D	D	D
83	83	88	Fr3	L	V	V	V
84	84	89	Fr3	G	G	G	G
85	85	90	Fr3	V	V	V	V
86	86	91	Fr3	Y	Y	Y	Y
87	87	92	Fr3	Y	Y	Y	Y
88	88	93	Fr3	C	C	C	C
89	89	94	CDR-L3	F	M	F	F
90	90	95	CDR-L3	Q	Q	Q	Q
91	91	96	CDR-L3	G	G	G	G
92	92	97	CDR-L3	S	L	S	S
93	93	98	CDR-L3	H	Q	H	H
94	94	99	CDR-L3	V	T	V	V
95	95	100	CDR-L3	P	P	P	P
96	96	101	CDR-L3	L	L	L	L
97	97	102	CDR-L3	T	T	T	T
98	98	103	Fr4	F	F	F	F
99	99	104	Fr4	G	G	G	G
100	100	105	Fr4	G	G	G	G
101	101	106	Fr4	G	G	G	G
102	102	107	Fr4	T	T	T	T
103	103	108	Fr4	K	K	K	K
104	104	109	Fr4	L	V	V	V
105	105	110	Fr4	E	E	E	E
106	106	111	Fr4	L	I	I	I
107	107	112	Fr4	K	K	K	K

表 9
V_H、V_L回復突變及其他突變

V _H 或 V _L 變體	V _H 或 V _L 外顯子受體序列	供體架構殘基
Hu6C1VHv1 (SEQ ID NO:4)	NCBI 登錄代碼 ADX65650 (SEQ ID NO:3)	H77
Hu6C1VHv1b (SEQ ID NO:5)	NCBI 登錄代碼 ADX65650 (SEQ ID NO:3)	H49, H77
Hu6C1VHv2 (SEQ ID NO:6)	NCBI 登錄代碼 ADX65650 (SEQ ID NO:3)	H76, H77, H82(a)
Hu6C1VHv2b (SEQ ID NO:7)	NCBI 登錄代碼 ADX65650 (SEQ ID NO:3)	H49, H76, H77, H82(a)
Hu6C1VHv3 (SEQ ID NO:8)	NCBI 登錄代碼 ADX65650 (SEQ ID NO:3)	H19, H44, H77, H83, H89
Hu6C1VHv3b (SEQ ID NO:9)	NCBI 登錄代碼 ADX65650 (SEQ ID NO:3)	H19, H44, H49, H77, H83, H89
Hu6C1VLv1 (SEQ ID NO:16)	NCBI 登錄代碼 ABI74084 (SEQ ID NO:15)	L2, L45
Hu6C1VLv2 (SEQ ID NO:17)	NCBI 登錄代碼 ABI74084 (SEQ ID NO:15)	L45

表 10
人類化 6C1 抗體中回復突變及其他突變之構架殘基之 Kabat 編號

殘基	ADX65650 重鏈	ABI74084 輕鏈	小鼠 6C1	Hu6C1 VHv1	Hu6C1 VHv1b	Hu6C1 VHv2	Hu6C1 VHv2b	Hu6C1 VHv3	Hu6C1 VHv3b	Hu6C1 VLv1	Hu6C1 VLv2
L2	-	I	V	-	-	-	-	-	-	V	I
L45	-	Q	K	-	-	-	-	-	-	K	K
H19	R	-	K	R	R	R	R	K	K	-	-
H44	G	-	R	G	G	G	G	R	R	-	-
H49	S	-	A	S	A	S	A	S	A	-	-
H76	N	-	N	N	N	S	S	N	N	-	-
H77	S	-	T	T	T	T	T	T	T	-	-
H82(a)	N	-	S	N	N	S	S	N	N	-	-
H83	R	-	K	R	R	R	R	K	K	-	-
H89	V	-	M	V	V	V	V	M	M	-	-

【0288】 鼠類 6C1 Vh 序列(SEQ ID NO:1)與小鼠模型序列(2OTU_B.pro; SEQ ID NO:2)、人類受體序列(ADX65650; SEQ ID NO:3)及 Hu6C1VHv1、Hu6C1VHv1b、Hu6C1VHv2、Hu6C1VHv2b、Hu6C1VHv3 及 Hu6C1VHv3b 序列(分別為 SEQ ID NO:4 及 9)之比對展示於圖 1 中。如 Kabat 所定義的 CDR 區帶有陰影。在小鼠與人類受體序列之間典範、游標或界面殘基不同的位置為取代的候選者。游標/CDR 基礎殘基之實例包括表 7 中之 Kabat 殘基 2、49、69、71、75、78 及 94。典範/CDR 相互作用殘基之實例包括表 7 中之 Kabat 殘基 24、48 及 73。界面/堆積(VH+VL)殘基之實例包括表 7 中之 Kabat 殘基 37、39、45、47、91、93 及 103。

【0289】 鼠類 6C1 Vk 序列(SEQ ID NO:13)與小鼠模型序列(3EYS_L_St.pro; SEQ ID NO:14)、人類受體序列(ABI74084; SEQ ID NO:15)及 Hu6C1VLv1 及 Hu6C1VLv2 序列(分別為 SEQ ID NO:16 及 17)之比對展示於圖 2 中。如 Kabat 所定義的 CDR 區帶有陰影。在小鼠與人類受體序列之間典範、游標或界面殘基不同的位置為取代的候選。游標/CDR 基礎殘基之實例包括表 8 中之 Kabat 殘基 4、35、46、49、66、68 及 69。典範/CDR 相互作用殘基之實例包括表 8 中之 Kabat 殘基 2、48、64 及 71。界面/堆積(VH+VL)殘基之實例包括表 8 中之 Kabat 殘基 36、38、44、87 及 98。

【0290】 選擇輕鏈可變區中表 9 及 10 中所指示的位置作為取代之候選者的基本原理為如下。

【0291】 I2V：此為典範 CDR 相互反應殘基。Ile 之較大側鏈可潛在地與 CDR L1 及 L2 堆積相互作用。此殘基回復突變至 Hu6C1VH1 中之 Val。

【0292】 Q45K：Lys 在此位置處比人類序列中之 Gln 更頻繁；因此為基於頻率的回復突變。

【0293】 選擇重鏈可變區中表 9 及 10 中所指示的位置作為取代之候選者的基本原理為如下。

【0294】 R19K：Lys 與接合殘基形成 H 鍵，而 Arg 不會。

【0295】 G44R：Arg 與輕鏈中界面殘基 Phe98 形成 H 鍵，而 Gly 不會。

【0296】 S49A：Ser 可潛在地與 CDR-H2 中之 Hys 形成 H 鍵。

【0297】 N76S：此殘基處存在高脫醯胺暴露。Ser 為此位置處人類生殖系中第二最頻繁。

【0298】 S77T：此位置處的絲胺酸在人類生殖系重鏈構架中極罕見，然而，蘇胺酸在位置 77 處最頻繁。進行此回復突變以減輕任何免疫原性潛能。

【0299】 N82(a)S：此殘基處存在高脫醯胺暴露。Ser 為此位置處人類生殖系中第二最頻繁。

【0300】 R83K：此位置處之 Lys 與接合殘基形成多種相互作用，似乎對環產生穩定化作用，然而 Arg 不會。

【0301】 V89M：Met 與干擾殘基殘基 Tyr91 形成 H 鍵且似乎穩定該界面，然而 Val 不與 Tyr91 相互作用。

【0302】 兩種人類化輕鏈可變區變體及兩種人類化重鏈可變區變體如下：

【0303】 Hu6C1VL 版本 1 (以小寫形式的 I2V 及 Q45K 回復突變)：
DvVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQ
SPkLLIYKVSKRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGS
HVPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:16)

【0304】 Hu6C1VL 版本 2 (以小寫形式的 Q45K 回復突變)：
DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQ
SPkLLIYKVSKRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGS
HVPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:17)

【0305】 Hu6C1VH 版本 1 (以小寫形式的 S77T 回復突變)：
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWVRQAPGKGL
EWVSYISIDGNNIYHPDSVKGRFTISRDNANKtLYLQMNSLRAEDTAVYY
CARDSDYGYFDVWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:4)

【0306】 Hu6C1VH 版本 1b (以小寫形式的 S49A 及 S77T 回復突變)：
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWVRQAPGKGL
EWWaYISIDGNNIYHPDSVKGRFTISRDNANKtLYLQMNSLRAEDTAVYY
CARDSDYGYFDVWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:5)

【0307】 Hu6C1VH 版本 2 (以小寫形式的 N76S、S77T 及 N82(a)S 回復突變)：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWVRQAPGKGL
EWVSYISIDGNNIYHPDSVKGRFTISRDNAKstLYLQM_sSLRAEDTAVYYC
ARDSDYGYFDVWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:6)

【0308】 Hu6C1VH 版本 2b (以小寫形式的 S49A、N76S、S77T 及 N82(a)S 回復突變)：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWVRQAPGKGL
EWWaYISIDGNNIYHPDSVKGRFTISRDNAKstLYLQM_sSLRAEDTAVYYC
ARDSDYGYFDVWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:7)

【0309】 Hu6C1VH 版本 3 (以小寫形式的 R19K、G44R、S77T、R83K 及 V89M 回復突變)：

EVQLVESGGGLVQPGGSLkLSCAASGFTFSNYYMSWVRQAPGKrLE
WVSYISIDGNNIYHPDSVKGRFTISRDNAKNtLYLQMNSLkAEDTAmYYC
ARDSDYGYFDVWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:8)

【0310】 Hu6C1VH 版本 3b (以小寫形式的 R19K、G44R、S49A、S77T、R83K 及 V89M 回復突變)：

EVQLVESGGGLVQPGGSLkLSCAASGFTFSNYYMSWVRQAPGKrLE
WVaYISIDGNNIYHPDSVKGRFTISRDNAKNtLYLQMNSLkAEDTAmYYC
ARDSDYGYFDVWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:9)

實例 8. 人類化 6C1 抗體之結合動力學分析

【0311】 藉由 Biacore 特徵化包含選自版本 3b 的重鏈及選自版本 2 的輕鏈的人類化 6C1 抗體之結合動力學且展示如下。

mAb	$k_a(1/Ms)$	$k_d(1/s)$	$K_D(M)$	R _{最大}
Hu-6C1-H3bL2	3.724E+5	5.449E-4	1.463E-9	38.80

實例 9. 材料及方法

a. 抗體產生協定

【0312】 將小鼠每週於 RIBI 佐劑中或每月於 TiterMax 佐劑中以抗原肽 TTR-MAP、TTR89-97-N-KLH 或 TTR89-97-C-KLH 免疫。在融合之前三至四天，將所選擇的小鼠於鹽水溶液中以免疫原給予最終 IV 強化。將脾勻漿化以製備脾細胞且使用標準電融合協定用 SP2/0 骨髓瘤細胞融合。將選擇培養基中融合細胞平板接種於 96 孔板中且在 7-10 天之後進行篩選。

b. 抗體篩選協定

【0313】 融合瘤選擇係基於以下 ELISA 篩選：將 96 孔 ELISA 板塗佈雞抗 His、1 $\mu\text{g/mL}$ PBS 且孵育 1 小時。將板用 200 μL /孔 1% BSA/PBS 溶液阻斷 15 分鐘，隨後添加 50 μL /孔 0.5 $\mu\text{g/mL}$ pH4-TTR 且孵育 1 小時。pH4-TTR 為已經歷低 pH (50 mM 乙酸鈉, pH 4.0) 之 TTR 以解離/聚集 TTR，暴露 TTR89-97 抗原決定位。將板用 TBS-T 清洗兩次。以 50 μL /孔添加融合板之上清液且孵育 1 小時。將板用 TBS-T 清洗兩次。以 50 μL /孔添加偵測抗體，1:5,000 稀釋於 0.5% BSA/PBS/TBS-T 中的山羊抗小鼠(IgG1、2a、2b、3 特異性)-HRP，且孵育 1 小時。最終，將板用 TBS-T 清洗五次，且以 100 μL /孔添加 TMB 基質。15 分鐘之後，以 50 μL /孔用 2N 硫酸使基質發展停止。在 450 nm 下讀取板。選擇具有 O.D. > 1.0 的孔，且將細胞轉移至 24 孔板。生長 3 天之後，將殖株用上文分析進行反向篩選以證實結合，且以原態 TTR 取代 pH4-TTR 最陰性反向篩選，允許選擇產生對 TTR 之非原態形式具有特異性的 TTR mAb 的殖株。

c. 抗體表現協定

【0314】 將攜帶人類化單株抗體序列的 CMV 驅動輕鏈及重鏈質體轉染至 CHO-S1 細胞(Life Technology)中。應用雙重選擇以製造所選擇的池。分析條件培養基之效價、結合且藉由 SDS-PAGE/西方墨點法分析。使用

Clonepix 系統(Molecular Devices)，所選擇的池用於殖株產生。基於抗體效價將殖株分級。將所選擇的殖株擴展且保存入庫。

【0315】 將產率最高的殖株於搖瓶中擴展且將培養物用於孵育 10–25 L Wave 袋培養物。將補充有 Glutamax 的 FreeStyle-CHO、CD OptiCHO 及 FreeStyle F17 表現培養基之混合物(培養基及 Glutamax 來自 Life Technology)用於搖瓶且用於 Wave 袋培養物。使用 Wave Bioreactor (GE Healthcare)，在 37°C、7% CO₂ 下，在持續攪拌下製作分批培養物。週期性地將樣本抽出以監測細胞數目、活力及抗體產生。若需要，用 Cell Boost (HyClone)進行補充。當細胞活力開始降低低於 90% (5-7 天)時收集分批培養物。

d. 抗體純化協定

【0316】 在首先使懸浮液中的細胞經由重力在 4°C 下沉降至 Wave 袋底部之後，收集細胞培養物。將收集的培養基經由深度過濾器(Millistak Pod COHC, Millipore)澄清，藉由切向流動過濾(Pelicon 2PLC 30K, Millipore)濃縮 10 倍，且經由 0.2 μ m 過濾器(Opticap XL, Millipore)無菌過濾。隨後使用 FPLC (Akta Avant, GE Lifesciences)，將濃縮的條件培養基裝載至於 pH 7.4 的 1xPBS 中預平衡的蛋白質 G 瓊脂糖凝膠快速流動柱(GE Lifesciences)上。將未結合蛋白質用 5-10 倍柱體積 pH 7.4 的 1xPBS 洗出柱，直至 OD₂₈₀ 達到基線。將結合抗體用 2 倍柱體積 IgG 溶離緩衝液(Thermo Scientific)自柱溶離。將溶離餾出物收集且用 pH 9.0 的 2M Tris (60 μ L 每 1 ml 溶離液)進行 pH 中和。

【0317】 將含抗體之餾出物合併且在 4°C 下用 pH 7.4 的 1xPBS 透析隔夜。隨後將透析樣本藉由通過 0.2 μ m PES 過濾器的超濾殺菌且在 4°C 下儲存。藉由二喹啉甲酸(BCA)使用牛 γ -球蛋白作為蛋白質標準(Thermo Scientific)測定最終蛋白質濃度。

e. 重組 TTR 表現及純化協定

【0318】 將大腸桿菌(*E. coli*) (BL21-A1)細胞用含有 TTR 插入物 Met-hTTR-(His)₆ 或含有 F87M/L110M 雙突變的 TTR 變體的 pET21a(+)質體轉型。使細胞生長於含有 100 µg/ml 安比西林的 2YT 培養液中。在 20℃ 下，在 1 mM IPTG 及 0.05%阿拉伯糖存在下誘導 TTR 之表現隔夜。

【0319】 藉由以 4000 x g 離心 10 分鐘收集細胞，且在 -80℃ 下儲存直至使用。藉由經由 LV-1 高剪切處理器(Microfluidics 公司)處理，將 10-15 g 細胞沉澱物解凍且溶解於 50 ml 緩衝液 A (含有 500 mM NaCl、20 mM 咪唑的 1xPBS)中。將溶解細胞以 12,000 x g 離心 15 分鐘，過濾通過 0.2 µm PES 過濾器，之後於 His-Trap HP 柱(GE Lifesciences)上純化。裝載之後，將柱用 10 c.v.緩衝液 A 清洗且用緩衝液 B (具有 500 mM NaCl、500 mM 咪唑的 1xPBS)溶離。將對應於 TTR 之峰餾出物收集，用 1xPBS 透析且在 -80℃ 下儲存直至使用。

f. TTR 抗原製備

【0320】 藉由將重組 TTR-6His 之濃縮儲備液稀釋至於 1x PBS 中 2.5 µg/ml 的最終濃度來製備原態 TTR 抗原。藉由在室溫下，在 0.2 mg/ml 的濃度下於 50 mM pH 3.95 的乙酸钠中孵育重組 TTR 歷時 72 小時來產生 pH4 處理 TTR。在此等條件下，TTR 解離成 TTR 單體及結構不同於原態 TTR 的聚集形式的混合物。隨後將 pH4-TTR 稀釋至於 1xPBS 中 2.5 µg/ml 之最終濃度，之後立即用於分析。將 96 孔板(Costar #3690)在室溫以於 1xPBS 中的 1.0 µg/ml 雞抗 his 多株抗體(Abcam #Ab9107)下在 50 µl 每孔之情況下塗佈持續 1 小時。將塗層溶液捨棄且將板以溶解於 1xPBS 中含 1x BSA 的阻斷緩衝液(G-Biosciences #786-193)在 250 µl/孔體積之情況下阻斷 1 小時。

g. ELISA 協定

【0321】 將塗佈且阻斷的 96 孔板在室溫下以 2.5 µg/ml TTR 抗原(原態 TTR 或 pH4-TTR)在 50 µl 每孔之情況下處理 1 小時。隨後將板以清洗緩衝液(含有 0.05% Tween-20 的 1x Tris 緩衝鹽水)在 250 µl 每孔之情況下清洗

兩次。隨後將清洗的板以在 0.31 至 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 範圍內的濃度下的適當抗 TTR 單株抗體在 50 μl 每孔之情況下處理 1 小時。

【0322】 將處理的板在 250 μl 每孔之情況下用清洗緩衝液清洗 3 次。清洗之後，將板以包含過氧化物結合的山羊抗小鼠 (Jackson ImmunoResearch #115-035-164) 於 1xPBS 中的 1:5,000 稀釋液的偵測抗體在 50 μl 每孔之情況下處理 1 小時。隨後將板清洗 3 次，之後添加 100 μl 每孔 TMB 基質 (Rockland)。使 HRP 反應在室溫下進行 15 分鐘，之後用 50 μl 每孔體積 1N H_2SO_4 淬滅。在 450 nm 之波長下量測光譜吸收率。

h. SDS-PAGE

【0323】 如下於 SDS-聚丙烯醯胺凝膠上進行電泳。將 0.1-1 μg 於 1xLDS 樣本緩衝液 (Life Technologies) 中的 TTR 或 pH 4.0-TTR 裝載至 10% NuPAGE bis-tris 凝膠上且在恆定 90 V 下於 MES 緩衝液中經歷電泳 105 分鐘。電泳之後，將凝膠於 Instant Blue (Expedeon) 中染色或轉移至硝化纖維素過濾膜用於西方墨點法分析。

i. 原態-PAGE

【0324】 如下於原態 Tris-甘胺酸凝膠上進行電泳。將 0.1-1 μg 於 1xTris-甘胺酸樣本緩衝液 (Life Technologies) 中的 TTR 或 pH 4.0-TTR 裝載至 10-20% Tris-甘胺酸凝膠上且在恆定 120 V 下於 1x 原態 Tris-甘胺酸運行緩衝液中經歷電泳 105 分鐘。電泳之後，將凝膠於 Instant Blue (Expedeon) 中染色或轉移至硝化纖維素過濾膜用於西方墨點法分析。

j. 西方墨點法

【0325】 將 SDS-PAGE 凝膠或原態-PAGE 凝膠點墨至硝化纖維素過濾紙 (iBlot, P7 Program) 上且用阻斷溶液 (Licor) 阻斷 30 分鐘。隨後將過濾器在室溫下孵育於 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 於阻斷緩衝液中的一級抗體中 1 小時 (或在 4°C 下隔夜)，接著用 1xTBS 清洗三次，每次 10 分鐘。將過濾器放置於 1:20,000 二次稀釋於阻斷緩衝液中的 IRDye 800CW 結合山羊抗小鼠中。在室溫下將

過濾器於二級抗體溶液中孵育 1 小時之後，將過濾器清洗且成像於 Odyssey CLx 紅外成像器(Licor)上。

k. TTR 纖維形成分析協定

【0326】 將 pH 4.8 的 3.6 μ M (0.2 mg/ml) TTR-Y78F 於 50 mM 乙酸钠中之溶液在 37°C 下，在 1.4 μ M (0.2mg/ml) mis-TTR 抗體或同型對照存在下孵育 72 小時。孵育之後，將 5X 過量硫代黃素-T 添加至混合物中且使得結合 30 分鐘。以 480 nm 之發射波長量測螢光量測值，其中激發波長設置在 440 nm。0%抑制設置為在同型對照抗體存在下之螢光強度(83 a.u.)，且 100%抑制點設置為在 TTR-Y78F 蛋白質不存在下之螢光(38 a.u.)。

l. 心臟組織樣本

【0327】 確診 ATTR 突變的新鮮冷凍且石蠟處理的心臟組織塊獲自印地安那大學之 Merrill Benson 博士。樣本包括八種新鮮冷凍的樣本及六種 FFPE 樣本，且各樣本診斷有 ATTR 或一些其他心臟類澱粉變性。組織之診斷在 Prothena 經由用 κ 及 λ 輕鏈及類澱粉蛋白 A 之抗體 IHC 染色，之後用 TTR 抗體特徵化來進一步證實。

m. 免疫組織化學

【0328】 對多聚甲醛輕微固定之 10 μ m 玻片安裝低溫切片(cryosection)及對 5 μ m 石蠟切片進行免疫組織化學。免疫過氧化酶法為主要偵測系統，其使用結合聚合物精煉偵測套組(DS980, Leica Biosystems)在 Leica Bond Rx (Leica Biosystems, Buffalo Grove, IL)上進行。將一級抗體孵育一小時(根據表 2 中之濃度)，接著用抗小鼠及抗兔聚合物 HRP 連接子抗體結合物孵育。染色用 DAB 色素原顯現，其產生棕色沉積物。將玻片用蘇木精複染，於上升系列醇中脫水，於二甲苯中澄清，且用 CytoSeal 60 (Richard Allen Scientific; Kalamazoo, MI)蓋上蓋玻片。陰性對照由對具有非免疫 IgG 同型對照或一級抗體之省略的相鄰切片進行整個免疫組織化學程序組成。

n. 類澱粉蛋白之證明：剛果紅及硫代黃素 T 染色

【0329】 使用 American MasterTech (Lodi, California)之套組進行剛果紅染色以證明組織中之 TTR 類澱粉蛋白。根據製造商之程序進行染色。將玻片染色於剛果紅溶液中 1 小時，接著於 1%氫氧化鈉中分化大致 15 秒。隨後將玻片於流水中沖洗，經由遞增濃度的醇系列脫水，且經由三次改變二甲苯來澄清，且用 CytoSeal 60 蓋上蓋玻片。

【0330】 採用修改的硫代黃素 T 染色協定(Schmidt 等人 1995)以測定組織中 TTR 類澱粉蛋白之存在。簡言之，將玻片用 Mayers 蘇木精複染色，於流水中沖洗且用 0.015%硫代黃素 T (T3516-25G; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)於 50%乙醇中之過濾溶液染色十分鐘。隨後將玻片於流水中沖洗且於 1% (v/v)乙酸中分化 10 分鐘，且於水中沖洗三次。使玻片空氣乾燥，之後用 ProLong Gold (Life Technologies)蓋上蓋玻片。

o. 影像分析

【0331】 將玻片用 Olympus BX61 顯微鏡、Hamamatsu Nanozoomer 2.0HT 數位玻片掃描儀或 Leica SPE 光譜共焦系統成像。將影像收集且以 TIFF 檔案形式儲存。

p. 藉由 SDS-PAGE/西方墨點法分析人類血漿樣本

【0332】 經確認 V30M ATTR 之患者之六種血漿樣本(樣本#21、#22、#23、#24、#25、#27)及正常受試者之 6 種樣本(樣本#11、#12、#15、#18、#19、#20)獲自 M. Saraiva (Porto University, Portugal)。樣本#C6 為獲自市售來源(BioreclamationIVT)的正常人類血清樣本。將此等血漿樣本如下藉由 SDS-PAGE 分離且用 9D5 進行西方墨點法。將 1.4 μ l 體積血漿 1:8 稀釋成不存在還原劑(Life Technologies)的 1xLDS 樣本緩衝液。使樣本如先前所述經歷 SDS-PAGE 分離且用 0.5 μ g/ml 9D5 進行西方墨點法。

q. 藉由 MesoScale Discovery (MSD) 板分析來分析人類血漿樣本

【0333】 將 96 孔 MSD 板塗佈有於 PBS 中 4 μ g/mL 之濃度的單株抗體 6C1 且在室溫下在搖動情況下孵育 2 小時，或在 4°C 下孵育隔夜。將板

用 1xTBST 清洗三次，之後在搖動情況下用 3% MSD 阻斷劑 A 溶液以 150 μ L 每孔阻斷 1 小時。將 1:10 稀釋於樣本緩衝液中的人類血漿樣本以 30 μ L 每孔體積添加至阻斷 MSD 板 1 小時，該樣本緩衝液包含 0.6% 無球蛋白牛血清白蛋白、1.5 mM 磷酸二氫鈉、8 mM 磷酸氫二鈉、145 mM 氯化鈉、0.05% Triton X-405 及 0.05% 硫柳汞。將板用 1xTBST 清洗 3 次。在室溫下，在搖動之情況下，添加 50 μ L 每孔體積的 1 μ g/ml 於樣本緩衝液中的磺基標記偵測抗體(Dako 多株抗體之 8C3 總 TTR 抗體)持續 1 小時。將板用 1xTBST 清洗三次，接著添加 150 μ L 每孔 1X 讀取緩衝液 T 溶液(Meso Scale Discovery)。隨後將板於 MSD Sector 成像器中讀取。

r. MSD 標準曲線之產生

【0334】 為定量人類血漿樣本中存在的非原態 6C1 反應性 TTR 蛋白質之量，使用重組 TTR-F87M/L110M 作為 6C1 反應性 TTR 標準產生 MSD 標準曲線。此 TTR 變體含有防止四聚物形成的兩種胺基酸取代基且保持蛋白質呈單體狀態(Jiang 等人 (2001) Biochemistry 40, 11442-11452)。同樣地，此 TTR 變體由所有 mis-TTR mAb 識別且因此非常適用於 MSD 分析中之參考標準。

【0335】 為產生標準曲線，將 96 孔 MSD 板塗佈有於 PBS 中 4 μ g/mL 之濃度的 mis-TTR 抗體 6C1 且在室溫下在搖動情況下孵育 2 小時，或在 4 $^{\circ}$ C 下孵育隔夜。將板用 1xTBST 清洗三次，之後在搖動情況下用 3% MSD 阻斷劑 A 溶液以 150 μ L 每孔阻斷 1 小時。隨後將阻斷的板在 50 μ L 每孔之情況下以 1:5 連續稀釋的 25 μ g/mL TTR-F87M/L110M 處理 1 小時，其中最後一種稀釋液為空白緩衝液。將板用 1xTBST 清洗 3 次，之後在室溫下，在搖動之情況下添加 50 μ L 每孔體積的 1 μ g/ml SulfoTag 偵測抗體(8C3-SulfoTag 或 Dako pAb-SulfoTag)持續 1 小時。將 8C3 mAb 及 Dako 抗體兩者偶合至 SulfoTag 且可在偵測抗體處使用，因為其結合至全部 TTR 且不具構形特異性。

【0336】 用偵測抗體處理之後，將板用 150 μ l 每孔體積 1xTBST 清洗三次，接著添加 150 μ l 每孔 1x 讀取緩衝液 T (MSD)。將板於 MSD Sector 成像器中讀取且產生所得 TTR F87M/L110M 校準曲線。

實例 10. 基因轉殖小鼠模型中 mis-TTR 抗體之評估

【0337】 於人類化基因轉殖小鼠模型 V30M hTTR 中進行體內研究 (Inoue 等人, (2008) Specific pathogen free conditions prevent transthyretin amyloidosis in mouse models. Transgenic Research 17:817-826)以估計聚集 hTTR 之結合劑移除中抗 TTR 抗體之效力。

【0338】 使用標準程序繁殖基因轉殖小鼠且藉由 ELISA 估計其循環 hTTR 水準。將血清水準為 200-400 μ g/ml hTTR 的小鼠用於隨後效力研究。第一組研究檢查基因轉殖小鼠中 hTTR 之天然沉積。hTTR 沉積物之偵測開始於 12 月齡且其後每 3-6 個月重複。一旦於基因轉殖小鼠中發現可接受水準的聚集物，就開始效力研究。將動物分成三個治療群(n=10/群)且用 IP 劑量之媒劑、對照抗體(同型對照，10 mpk)或抗 hTTR 抗體(10 mpk)每週治療持續四週。最後一次治療之後一週將小鼠安樂死，收集組織且處理，且隨後染色以估計剩餘 TTR 沉積物之數目及大小。採用定量方法及統計學以測定在群之間所見的清除度。

【0339】 在替代方法中，體外製備 hTTR 聚集物且隨後將其注射至基因轉殖小鼠之腎中以接種新聚集物之沉積。申請人已判定，注射此等製劑可以可預料方式加快新聚集物之沉積。基於此等發現，使動物鎮靜，左腎暴露且將預聚集 hTTR 材料注射至腎之皮質中。在合適的恢復期之後，將小鼠分成三個治療群(n=10/群)且用 IP 劑量之媒劑、對照抗體(同型對照，10 mpk)或抗 hTTR 抗體(10 mpk)每週治療持續四至八週。最後一次治療之後一週將小鼠安樂死，收集腎且處理，且隨後染色以估計 TTR 沉積物之數目及大小。採用定量方法及統計學以測定在群之間所見的改變度。

實例 11. Matrigel 植入物模型中 mis-TTR 抗體之評估

【0340】 申請人已判定，預聚集 hTTR 可懸浮於 Matrigel (BD Bioscience, Cat #354263)中，允許固化且隨後皮下放置於小鼠中。植入後四週，Matrigel 植入物維持其結構且聚集 hTTR 仍存在於植入物內。此外，植入物由小鼠良好地耐受，且抗 hTTR 抗體能夠穿透且結合至懸浮於 Matrigel 中的聚集物。基於此等發現，進行抗體效力研究。使動物鎮靜且將含有預聚集 hTTR 的植入物懸浮於皮下放置於小鼠中之 Matrigel 中。在合適的恢復期之後，將小鼠分成三個治療群(n=10/群)且用 IP 劑量之媒劑、對照抗體(同型對照，10 mpk)或抗 hTTR 抗體(10 mpk)每週治療持續二至四週。在最後一次治療之後，將小鼠安樂死，將含有植入物的皮膚收集且處理，且隨後使用組織學及/或生物化學方法估計 TTR 沉積物之量。採用定量分析及統計學以測定在群之間所見的清除度。

【符號說明】

(無)

【序列表】

<110>愛爾蘭商普羅余納生物科技有限公司 (PROTHENA BIOSCIENCES LIMITED)
大學健康網絡 (UNIVERSITY HEALTH NETWORK)

<120> 抗甲狀腺素運送蛋白抗體

<140> TW 110100084

<141> 2016-01-27

<150> US 62/109001

<151> 2015-01-28

<150> US 62/266557

<151> 2015-12-11

<160> 63

<170> FastSEQ 4.0 版 (Windows 系統)

<210> 1

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 1

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

<210> 2

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 2

```

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

```

<210> 3

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 3

```

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

```

<210> 4

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 4

[illegible]

<210> 5

<211> 118

<212> PRT

〈213〉 人工序列

$\langle 220 \rangle$

〈223〉 合成

<400> 5

[illegible]

<210> 6

<211> 118

<212> PRT

〈213〉 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 6
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30
Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Tyr Ile Ser Ile Asp Gly Asn Asn Ile Tyr His Pro Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Ser Asp Tyr Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 7
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 7
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30
Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Tyr Ile Ser Ile Asp Gly Asn Asn Ile Tyr His Pro Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Ser Asp Tyr Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 8
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 8

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

<210> 9

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 9

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

<210> 10

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 10
Asn Tyr Tyr Met Ser
1 5

<210> 11
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 11
Tyr Ile Ser Ile Asp Gly Asn Asn Ile Tyr His Pro Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 12
Asp Ser Asp Tyr Gly Tyr Phe Asp Val
1 5

<210> 13
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 13
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 Arg Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Lys Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ile 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 Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

<210> 14
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 14
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 Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

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

<220>
<223> 合成

<400> 15
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30
Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
85 90 95

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

<210> 16
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 16
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser 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 Lys 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 Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 17
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 17
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser 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 Lys 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 Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 18
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 18
Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
1 5 10 15

<210> 19
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 19
Lys Val Ser Lys Arg Phe Ser
1 5

<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 20
Phe Gln Gly Ser His Val Pro Leu Thr
1 5

<210> 21
<211> 411
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 21
atgaactttg ggttcagctt gattttcett gtccttgitt taaaagggtg gaagtgtgaa 60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggetta gtgcagcctg gagggtcctt gaaactctcc 120
tgtgcagcct ctggattcac ttttagtaac tattacatgt ctggggttcg ccagactcca 180
gagaagaggc tggagtgggt cgcatacatt agtattgatg gtaataatat ctaccatcca 240

gacagtgtga agggctcgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg 300
caaatgagca gtctgaagtc tgaggacaca gccatgtatt actgtgcaag agacagtgac 360
tacggctact tcgatgtctg gggcacaggg accacgggtca ccgtctcctc a 411

<210> 22
<211> 137
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 22
Met Asn Phe Gly Phe Ser Leu Ile Phe Leu Val Leu Val Leu Lys Gly
1 5 10 15
Val Lys Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30
Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45
Ser Asn Tyr Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu
50 55 60
Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ile Asp Gly Asn Asn Ile Tyr His Pro
65 70 75 80
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
85 90 95
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met
100 105 110
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Asp Tyr Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly
115 120 125
Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 23
<211> 393
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 23
atgaagttgc ctgttagget gttggtgctg atgttctgga ttcttgcctc cagcagtgat 60
gttttgatga cccaaactcc actctccctg cctgtcagtc ttggagatca agcctccatc 120
tcttgcagat ctagtccagag cattgtacat agtaatggaa acacctatctt agaatgggtac 180
ctgcagaaac gaggccagtc tccaaagctc ctgatctaca aagtittccaa acgattttct 240
ggggtcccag acaggttcag tggcagtgga tcaggacag atttcatact caagatcagc 300
agagtggagg ctgaggatct gggagtttat tactgctttc aaggttcaca tgttccgctc 360
acgttcgggtg gtgggaccaa gctggagctg aaa 393

<210> 24
<211> 131
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 24

```

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 Arg
50          55          60
Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Lys Arg Phe Ser
65          70          75          80
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ile
85          90          95
Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys
100          105          110
Phe Gln Gly Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
115          120          125
Glu Leu Lys
130

```

<210> 25

<211> 330

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 25

```

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

```


Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
145					150					155					160
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Val	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
				165					170					175	
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
			180					185					190		
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
		195					200				205				
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
	210					215					220				
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu
225					230					235					240
Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
			245						250					255	
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
		260						265					270		
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
		275					280					285			
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
	290					295					300				
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
305					310					315					320
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
			325						330						

<210> 26

<211> 330

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 26

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

```

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145          150          155          160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
          165          170          175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
          180          185          190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
          195          200          205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
          210          215          220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225          230          235          240
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
          245          250          255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
          260          265          270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
          275          280          285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
          290          295          300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305          310          315          320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
          325          330

```

<210> 27
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成

<400> 27

```

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

```

Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
145					150					155					160
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
			165						170					175	
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
			180					185					190		
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
		195					200					205			
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
	210					215					220				
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu
225					230					235				240	
Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
			245						250					255	
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
			260					265					270		
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
		275					280					285			
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
	290					295					300				
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
305					310					315					320
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
			325						330						

<210> 28
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成

<400> 28

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> 29
 <211> 106

6

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

<210> 31
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成

<400> 31
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Tyr Ile Ser Ile Asp Gly Asn Asn Ile Tyr His Pro Asp Ser Val
 50 55 60

Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	65	70	75	80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Arg	Asp	Ser	Asp	Tyr	Gly	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	100	105	110	
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	115	120	125	
Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	130	135	140	
Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	145	150	155	160
Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	165	170	175	
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	180	185	190	
Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	195	200	205	
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	210	215	220	
His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	225	230	235	240
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	245	250	255	
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	260	265	270	
Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	275	280	285	
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	290	295	300	
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	305	310	315	320
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	325	330	335	
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	340	345	350	
Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	355	360	365	
Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	370	375	380	
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	385	390	395	400
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	405	410	415	
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	420	425	430	
Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	435	440	445	

<210> 32

<211> 448

<212> PRT

Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp
385					390					395					400
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser
				405					410					415	
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala
			420					425					430		
Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys
		435					440					445			

<210> 33
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成

<400> 33

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

290		295		300
Ser Val Leu Thr Val	Leu His Gln Asp Trp	Leu Asn Gly Lys Glu Tyr		
305	310	315		320
Lys Cys Lys Val Ser	Asn Lys Ala Leu Pro	Ala Pro Ile Glu Lys Thr		
	325	330		335
Ile Ser Lys Ala Lys	Gly Gln Pro Arg Glu	Pro Gln Val Tyr Thr Leu		
	340	345		350
Pro Pro Ser Arg Glu	Glu Met Thr Lys Asn	Gln Val Ser Leu Thr Cys		
	355	360		365
Leu Val Lys Gly Phe	Tyr Pro Ser Asp Ile	Ala Val Glu Trp Glu Ser		
	370	375		380
Asn Gly Gln Pro Glu	Asn Asn Tyr Lys Thr	Thr Pro Pro Val Leu Asp		
385	390	395		400
Ser Asp Gly Ser Phe	Phe Leu Tyr Ser Lys	Leu Thr Val Asp Lys Ser		
	405	410		415
Arg Trp Gln Gln Gly	Asn Val Phe Ser Cys	Ser Val Met His Glu Ala		
	420	425		430
Leu His Asn His Tyr	Thr Gln Lys Ser Leu	Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
	435	440		445

<210> 34
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成

<400> 34

Glu Val Gln Leu Val	Glu Ser Gly Gly Gly	Leu Val Gln Pro Gly Gly
1	5	10
Ser Leu Lys Leu Ser	Cys Ala Ala Ser Gly	Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
	20	25
Tyr Met Ser Trp Val	Arg Gln Ala Pro Gly	Lys Arg Leu Glu Trp Val
	35	40
Ser Tyr Ile Ser Ile	Asp Gly Asn Asn Ile	Tyr His Pro Asp Ser Val
50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr	Ile Ser Arg Asp Asn	Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser	Leu Lys Ala Glu Asp	Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
	85	90
Ala Arg Asp Ser Asp	Tyr Gly Tyr Phe Asp	Val Trp Gly Gln Gly Thr
	100	105
Leu Val Thr Val Ser	Ser Ala Ser Thr Lys	Gly Pro Ser Val Phe Pro
	115	120
Leu Ala Pro Ser Ser	Lys Ser Thr Ser Gly	Gly Thr Ala Ala Leu Gly
	130	135
Cys Leu Val Lys Asp	Tyr Phe Pro Glu Pro	Val Thr Val Ser Trp Asn
145	150	155
Ser Gly Ala Leu Thr	Ser Gly Val His Thr	Phe Pro Ala Val Leu Gln
	165	170
Ser Ser Gly Leu Tyr	Ser Leu Ser Ser Val	Val Thr Val Pro Ser Ser
	180	185
Ser Leu Gly Thr Gln	Thr Tyr Ile Cys Asn	Val Asn His Lys Pro Ser
	195	200
Asn Thr Lys Val Asp	Lys Arg Val Glu Pro	Lys Ser Cys Asp Lys Thr
		205

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

<210> 35
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成

<400> 35
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Tyr Ile Ser Ile Asp Gly Asn Asn Ile Tyr His Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Ser Asp Tyr Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro
	115						120					125			
Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly
	130					135					140				
Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn
145					150					155					160
Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln
			165					170						175	
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser
		180					185						190		
Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser
	195						200					205			
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr
	210					215					220				
His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	
225					230					235				240	
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg
			245						250					255	
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro
		260					265						270		
Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala
	275						280				285				
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val
	290					295					300				
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr
305					310					315					320
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr
			325						330					335	
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu
		340					345						350		
Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys
		355					360					365			
Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser
	370					375					380				
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp
385					390					395					400
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser
			405						410					415	
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala
		420					425						430		
Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys
	435						440					445			

<210> 36
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成

<400> 36

```

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1          5          10          15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser 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 Lys 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 Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100          105          110
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
          115          120          125
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
          130          135          140
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145          150          155          160
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
          165          170          175
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
          180          185          190
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
          195          200          205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
          210          215

```

<210> 37
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成

```

<400> 37
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1          5          10          15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser 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 Lys 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 Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100          105          110
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

```

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

<210> 38
 <211> 147
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 38
Met Ala Ser His Arg Leu Leu Leu Leu Cys Leu Ala Gly Leu Val Phe
1 5 10 15
Val Ser Glu Ala Gly Pro Thr Gly Thr Gly Glu Ser Lys Cys Pro Leu
20 25 30
Met Val Lys Val Leu Asp Ala Val Arg Gly Ser Pro Ala Ile Asn Val
35 40 45
Ala Val His Val Phe Arg Lys Ala Ala Asp Asp Thr Trp Glu Pro Phe
50 55 60
Ala Ser Gly Lys Thr Ser Glu Ser Gly Glu Leu His Gly Leu Thr Thr
65 70 75 80
Glu Glu Glu Phe Val Glu Gly Ile Tyr Lys Val Glu Ile Asp Thr Lys
85 90 95
Ser Tyr Trp Lys Ala Leu Gly Ile Ser Pro Phe His Glu His Ala Glu
100 105 110
Val Val Phe Thr Ala Asn Asp Ser Gly Pro Arg Arg Tyr Thr Ile Ala
115 120 125
Ala Leu Leu Ser Pro Tyr Ser Tyr Ser Thr Thr Ala Val Val Thr Asn
130 135 140
Pro Lys Glu
145

<210> 39
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 39
Gly Pro Thr Gly Thr Gly Glu Ser Lys Cys Pro Leu Met Val Lys Val
1 5 10 15
Leu Asp Ala Val Arg Gly Ser Pro Ala Ile Asn Val Ala Val His Val
20 25 30
Phe Arg Lys Ala Ala Asp Asp Thr Trp Glu Pro Phe Ala Ser Gly Lys

35 40 45
Thr Ser Glu Ser Gly Glu Leu His Gly Leu Thr Thr Glu Glu Gln Phe
50 55 60
Val Glu Gly Ile Tyr Lys Val Glu Ile Asp Thr Lys Ser Tyr Trp Lys
65 70 75 80
Ala Leu Gly Ile Ser Pro Phe His Glu His Ala Glu Val Val Phe Thr
85 90 95
Ala Asn Asp Ser Gly Pro Arg Arg Tyr Thr Ile Ala Ala Leu Leu Ser
100 105 110
Pro Tyr Ser Tyr Ser Thr Thr Ala Val Val Thr Asn Pro Lys Glu
115 120 125

<210> 40
<211> 127
<212> PRT
<213> 智人

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

<210> 41
<211> 138
<212> PRT
<213> 智人

<400> 41
Met Ala Ser His Arg Leu Leu Leu Leu Cys Leu Ala Gly Leu Val Phe
1 5 10 15
Val Ser Glu Ala Gly Pro Thr Gly Thr Gly Glu Ser Lys Cys Pro Leu
20 25 30
Met Val Lys Val Leu Asp Ala Val Arg Gly Ser Pro Ala Ile Asn Val
35 40 45
Ala Val His Val Phe Arg Lys Ala Ala Asp Asp Thr Trp Glu Pro Phe
50 55 60
Ala Ser Gly Lys Thr Ser Glu Ser Gly Glu Leu His Gly Leu Thr Thr
65 70 75 80
Glu Glu Glu Phe Val Glu Gly Ile Tyr Lys Val Glu Ile Asp Thr Lys

				85					90					95	
Ser	Tyr	Trp	Lys	Ala	Leu	Gly	Ile	Ser	Pro	Phe	His	Glu	His	Ala	Glu
			100					105					110		
Val	Val	Phe	Thr	Ala	Asn	Asp	Ser	Gly	Pro	Arg	Arg	Tyr	Ser	Tyr	Ser
		115					120					125			
Thr	Thr	Ala	Val	Val	Thr	Asn	Pro	Lys	Glu						
	130					135									

<210> 42
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 42
Glu His Ala Glu Val Val Phe Thr Ala
1 5

<210> 43
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 43
Gly Gly Glu His Ala Glu Val Val Phe Thr Ala Gly Gly Lys Gly
1 5 10 15

<210> 44
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 44
Cys Gly Gly Glu His Ala Glu Val Val Phe Thr Ala
1 5 10

<210> 45
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 45
Glu His Ala Glu Val Val Phe Thr Ala Cys Gly Gly
1 5 10

<210> 46
<211> 990
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 46
gcctccacca aggggtccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60
ggcacagcgg ccttgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacgggtgtcg 120
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggtgttctt acagtctctca 180
ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 240
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc 300
aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga 360
ccgtcagttt tctcttccc cccaaaacc aaggacacc tcatgatctc ccggaccct 420
gaggtccatc gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 540
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtctgcacc aggaactggc gaatggcaag 600
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 660
aaagccaaag ggcagcccc agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggaggag 720
atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccggt 840
ctggactccg acggtctctt ctctctctat agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 900
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 960
cagaagagcc tctccctgtc cccgggtaaa 990

<210> 47
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 47
cgaactgtgg ctgcaccatc tgtcttctac ttcccggcat ctgatgagca gttgaaatct 60
ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag 120
tggaagggtg ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180
agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240
aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaa 300
agcttcaaca ggggagagtg t 321

<210> 48
<211> 318
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 48

actgtggctg caccatctgt cttcatcttc ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga 60
actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac ttctatcca gagaggccaa agtacagtgg 120
aagggtggata acgccctcca atcgggtaac tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc 180
aaggacagca cctacagcct cagcagcacc ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa 240
cacaaagtct acgctgcga agtcacccat cagggcctga gctcgcccggt cacaaagagc 300
ttcaacaggg gagagtgt 318

<210> 49

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 49

Met Asn Phe Gly Phe Ser Leu Ile Phe Leu Val Leu Val Leu Lys Gly
1 5 10 15
Val Lys Cys

<210> 50

<211> 57

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 50

atgaactttg gggttcagctt gatttttcctt gtccttggtt taaaaggtgt gaagtgt 57

<210> 51

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 51

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
1 5 10 15
Ser Ser Ser

<210> 52
 <211> 57
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成

<400> 52
 atgaagttagc ctgttaggct gttggtgctg atgttctgga ttcctgcttc cagcagt 57

<210> 53
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成

<400> 53
 gatgttttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60
 atctcttgca gatctagtca gagcattgta catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg 120
 tacctgcaga aacgaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtctt caaacgattt 180
 tctgggggcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcat actcaagatc 240
 agcagagtgg agcctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaagggtc acatgttccg 300
 ctcacgttcg gtggtgggac caagctggag ctgaaa 336

<210> 54
 <211> 354
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成

<400> 54
 gaagtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc cctgaaactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacttttagt aactattaca tgtcttgggt tcgccagact 120
 ccagagaaga ggcctggagt ggctgcatac attagtattg atggtaataa tatctaccat 180
 ccagacagtg tgaagggctg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240
 ctgcaaatga gcagtctgaa gtctgaggac acagccatgt attactgtgc aagagacagt 300
 gactacggct acttcgatgt ctggggcaca gggaccacgg tcaccgtctc ctca 354

<210> 55
 <211> 354
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成

<400> 55

gaggtgcagc tggtaggagtc cggcgggcggc ctggtgcagc cggcgggctc cctgcgcctg 60
tcttgccgcg cctccggctt cactttctcc aactactaca tgtcctgggt gcgccaggcc 120
cccggcaagg gcctggagtg ggtgtcctac atctccatcg acggcaacaa catctaccac 180
cccgactccg tgaagggccg cttcaccatc tcccgcgaca acgccaagaa caccctgtac 240
ctgcagatga actccctgcg cgcgaggac accgccgtgt actactgcgc ccgcgactcc 300
gactacggct acttcgacgt gtggggccaa ggcaccctgg tgaccgtgtc ctca 354

<210> 56
<211> 354
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 56
gaggtgcagc tggtaggagtc cggcgggcggc ctggtgcagc cggcgggctc cctgcgcctg 60
tcttgccgcg cctccggctt cactttctcc aactactaca tgtcctgggt gcgccaggcc 120
cccggcaagg gcctggagtg ggtgtcctac atctccatcg acggcaacaa catctaccac 180
cccgactccg tgaagggccg cttcaccatc tcccgcgaca acgccaagaa caccctgtac 240
ctgcagatga actccctgcg cgcgaggac accgccgtgt actactgcgc ccgcgactcc 300
gactacggct acttcgacgt gtggggccaa ggcaccctgg tgaccgtgtc ctca 354

<210> 57
<211> 354
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 57
gaggtgcagc tggtaggagtc cggcgggcggc ctggtgcagc cggcgggctc cctgcgcctg 60
tcttgccgcg cctccggctt cactttctcc aactactaca tgtcctgggt gcgccaggcc 120
cccggcaagg gcctggagtg ggtgtcctac atctccatcg acggcaacaa catctaccac 180
cccgactccg tgaagggccg cttcaccatc tcccgcgaca acgccaagtc caccctgtac 240
ctgcagatgt cctccctgcg cgcgaggac accgccgtgt actactgcgc ccgcgactcc 300
gactacggct acttcgacgt gtggggccaa ggcaccctgg tgaccgtgtc ctca 354

<210> 58
<211> 354
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 58
gaggtgcagc tggtaggagtc cggcgggcggc ctggtgcagc cggcgggctc cctgcgcctg 60
tcttgccgcg cctccggctt cactttctcc aactactaca tgtcctgggt gcgccaggcc 120
cccggcaagg gcctggagtg ggtgtcctac atctccatcg acggcaacaa catctaccac 180
cccgactccg tgaagggccg cttcaccatc tcccgcgaca acgccaagtc caccctgtac 240
ctgcagatgt cctccctgcg cgcgaggac accgccgtgt actactgcgc ccgcgactcc 300

gactacggct acttcgacgt gtggggccaa ggcaccctgg tgaccgtgtc ctca 354

<210> 59
<211> 354
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 59
gaggtgcagc tgggtggagtc cggcggcggc ctggtgcagc cggcgggctc cctgaagctg 60
tcctgcgcgc cctccggctt cacccttctc aactactaca tgtcctgggt gcgccaagcc 120
cccggcaagc gcctggagtg ggtgtcttac atctccatcg acggcaacaa catctaccac 180
cccgactccg tgaagggcgc cttcaccatc tcccgcgaca acgccaagaa caccctgtac 240
ctgcagatga actccctgaa ggccgaggac accgccatgt actactgcgc ccgcgactcc 300
gactacggct acttcgacgt gtggggccaa ggcaccctgg tgaccgtgtc ctca 354

<210> 60
<211> 354
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 60
gaggtgcagc tgggtggagtc cggcggcggc ctggtgcagc cggcgggctc cctgaagctg 60
tcctgcgcgc cctccggctt cacccttctc aactactaca tgtcctgggt gcgccaagcc 120
cccggcaagc gcctggagtg ggtggcctac atctccatcg acggcaacaa catctaccac 180
cccgactccg tgaagggcgc cttcaccatc tcccgcgaca acgccaagaa caccctgtac 240
ctgcagatga actccctgaa ggccgaggac accgccatgt actactgcgc ccgcgactcc 300
gactacggct acttcgacgt gtggggccaa ggcaccctgg tgaccgtgtc ctca 354

<210> 61
<211> 336
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 61
gacgtggtga tgaccagac cccctgttcc ctgcccgtga ccccggcga gcccgctcc 60
atctctgcc gctctccca gtccatcgtg cactccaacg gcaacaccta cctggagtgg 120
tacctgcaga agcccgcca gtccccaag ctgctgatct acaaggtgtc caagcgcttc 180
tccggcgtgc ccgaccgtt ctcggctcc ggctccggca ccgacttcac cctgaagatc 240
tcccgcgtgg aggccgagga cgtggcgtg tactactgt tccagggtc ccacgtgcc 300
ctgaccttcg gcggcggcac caagtgag atcaaa 336

<210> 62
<211> 336
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 62

gacatcgtga tgaccagac cccctgtcc ctgcccgtga ccccggega gccgcctcc 60
atctctgcc gctctccca gtccatcgtg cactccaacg gcaacaccta cctggagtgg 120
tacctgcaga agcccggeca gtccccaag ctgctgactt acaagggtgc caagcgcttc 180
tccggcgtgc ccgaccgctt ctccggctcc ggctccggca ccgacttcac cctgaagatc 240
tcccgctgg aggcgagga cgtgggcgtg tactactgct tccagggtc ccacgtgccc 300
ctgaccttcg gcggcggcac caaggtggag atcaaa 336

<210> 63

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 63

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

申請專利範圍

1. 一種特異性結合至甲狀腺素運送蛋白的抗體，其包含一重鏈及一輕鏈，其中該重鏈包含 SEQ ID NO: 4 至 9 中任一者之成熟重鏈可變區，其與 SEQ ID NO: 25、26 或 27 之一重鏈恆定區融合，該重鏈恆定區具有或不具有 C 端離胺酸，以及其中該輕鏈包含 SEQ ID NO: 16 或 17 之成熟輕鏈可變區，其融合至 SEQ ID NO: 28 之輕鏈恆定區。
2. 如請求項 1 之抗體，其包含 SEQ ID NO: 9 之一成熟重鏈可變區以及 SEQ ID NO: 17 之一成熟輕鏈可變區。
3. 如請求項 1 之抗體，其中該重鏈包含 SEQ ID NO: 30-35 中任一者之胺基酸序列，其具有或不具有 C 端離胺酸，且該輕鏈包含 SEQ ID NO: 36 或 37 之胺基酸序列。
4. 如請求項 3 之抗體，其中該重鏈包含 SEQ ID NO: 35 之胺基酸序列，其具有或不具有 C 端離胺酸，且該輕鏈包含 SEQ ID NO: 37 之胺基酸序列。
5. 如請求項 1 之抗體，其中該重鏈恆定區具有 SEQ ID NO: 26 之序列，其具有或不具有 C 端離胺酸，及/或該輕鏈恆定區具有 SEQ ID NO: 28 之序列。
6. 一種醫藥組成物，其包含如請求項 1 至 5 中任一項之抗體及一醫藥學上可接受的載體。
7. 一種核酸，其編碼如請求項 1 所述之抗體的重鏈及輕鏈，其中該編碼該成熟重鏈可變區的核酸包含 SEQ ID NO: 55-60 中任一者，該編碼該重鏈恆定區之核酸包含 SEQ ID NO: 46，該編碼該成熟輕鏈可變區的核酸包含 SEQ ID NO: 61 或 62，以及該編碼該輕鏈恆定區之核酸包含 SEQ ID NO: 47。
8. 如請求項 7 之核酸，其中該編碼該成熟重鏈可變區的核酸包含 SEQ ID NO: 60，該編碼該重鏈恆定區之核酸包含 SEQ ID NO: 46，該編碼該成熟輕鏈可變區的核酸包含 SEQ ID NO: 62，以及該編碼該輕鏈恆定區之核酸包含 SEQ ID NO: 47。
9. 一種重組表現載體，其包含如請求項 8 之核酸。
10. 一種寄主細胞，其由如請求項 9 之重組表現載體轉型。
11. 一種如請求項 1 之抗體於製備藥劑之用途，該藥劑是用於抑制或減少甲

狀腺素運送蛋白之聚集、抑制或減少甲狀腺素運送蛋白原纖成形、減少甲狀腺素運送蛋白沉積物、清除經聚集之甲狀腺素運送蛋白、使甲狀腺素運送蛋白之一非毒性構形穩定、治療或實現預防甲狀腺素運送蛋白介導之類澱粉變性或延緩甲狀腺素運送蛋白介導之類澱粉變性發作。

12. 一種體外診斷一受試者中一甲狀腺素運送蛋白介導之類澱粉變性的方法，其包含將來自該受試者之一生物樣本與一有效量的如請求項 1 之抗體接觸。
13. 如請求項 12 之方法，其中該生物樣本為血液、血清、血漿或實體組織。
14. 如請求項 13 之方法，其中該實體組織來自心臟、周邊神經系統、自主神經系統、腎、眼睛或胃腸道。

m6C1VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS	GFTFSNYYMS	WVRQT	40
20TU B.pro	QVQLOESGGGLVQPGGSLKLSCAAS	GFTFRDYIMY	WVRQT	40
ADX65650	EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLSCAAS	GFTFSSEYEMN	WVRQA	40
Hu6C1VHv1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLSCAAS	GFTFSNYYMS	WVRQA	40
Hu6C1VHv1b	EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLSCAAS	GFTFSNYYMS	WVRQA	40
Hu6C1VHv2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLSCAAS	GFTFSNYYMS	WVRQA	40
Hu6C1VHv2b	EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLSCAAS	GFTFSNYYMS	WVRQA	40
Hu6C1VHv3	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS	GFTFSNYYMS	WVRQA	40
Hu6C1VHv3b	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS	GFTFSNYYMS	WVRQA	40
m6C1VH	PEKRLEWVA	YISIDGNNIYHPDSVKGRFTISRDN	AKNTLY	80
20TU B.pro	PEKRLEWVA	FISNGGGSTYYPDTVKGRFTISRDN	AKNTLY	80
ADX65650	PGKGLEWVS	YISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDN	AKNSLY	80
6C1VHv1	PGKGLEWVS	YISIDGNNIYHPDSVKGRFTISRDN	AKNTLY	80
Hu6C1VHv1b	PGKGLEWVA	YISIDGNNIYHPDSVKGRFTISRDN	AKNTLY	80
Hu6C1VHv2	PGKGLEWVS	YISIDGNNIYHPDSVKGRFTISRDN	AKSTLY	80
Hu6C1VHv2b	PGKGLEWVA	YISIDGNNIYHPDSVKGRFTISRDN	AKSTLY	80
Hu6C1VHv3	PGKRLEWVS	YISIDGNNIYHPDSVKGRFTISRDN	AKNTLY	80
Hu6C1VHv3b	PGKRLEWVA	YISIDGNNIYHPDSVKGRFTISRDN	AKNTLY	80
m6C1VH	LQMS	SLKSEDTAMYYCARDSDYGYFDVWG	TGTTVSS	118
20TU B.pro	LQMS	RLKSEDTAMYYCARGYVWFAYWG	QGTTVSS	118
ADX65650	LQMS	SLRAEDTAVYYCARDLSGSYYGYWG	QGLTVSS	118
Hu6C1VHv1	LQMS	SLRAEDTAVYYCARDSDYGYFDVWG	QGLTVSS	118
Hu6C1VHv1b	LQMS	SLRAEDTAVYYCARDSDYGYFDVWG	QGLTVSS	118
Hu6C1VHv2	LQMS	SLRAEDTAVYYCARDSDYGYFDVWG	QGLTVSS	118
Hu6C1VHv2b	LQMS	SLRAEDTAVYYCARDSDYGYFDVWG	QGLTVSS	118
Hu6C1VHv3	LQMS	SLKAEDTAMYYCARDSDYGYFDVWG	QGLTVSS	118
Hu6C1VHv3b	LQMS	SLKAEDTAMYYCARDSDYGYFDVWG	QGLTVSS	118

圖 1

m6C1VL	DV	L	M	T	Q	T	P	L	S	L	P	V	S	L	G	D	Q	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	S	I	V	H	S	N	G	N	T	Y	L	E	W	40
3EYS_L_St.pro	DV	L	M	T	Q	T	P	L	S	L	P	V	S	L	G	D	Q	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	S	I	V	H	S	N	G	N	T	Y	L	E	W	40
ABI74084	DI	V	M	T	Q	T	P	L	S	L	P	V	T	P	G	E	P	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	S	L	L	H	S	N	G	Y	N	Y	L	D	W	40
Hu6C1VLv1	DV	V	M	T	Q	T	P	L	S	L	P	V	T	P	G	E	P	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	S	I	V	H	S	N	G	N	T	Y	L	E	W	40
Hu6C1VLv2	DI	V	M	T	Q	T	P	L	S	L	P	V	T	P	G	E	P	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	S	I	V	H	S	N	G	N	T	Y	L	E	W	40
m6C1VL	Y	L	Q	K	R	G	Q	S	P	K	L	I	Y	K	V	S	K	R	F	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	80		
3EYS_L_St.pro	Y	L	Q	K	P	G	Q	S	P	K	L	I	Y	K	V	S	N	R	F	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	80		
ABI74084	Y	L	Q	K	P	G	Q	S	P	Q	L	L	I	Y	L	G	S	N	R	A	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	80	
Hu6C1VLv1	Y	L	Q	K	P	G	Q	S	P	K	L	I	Y	K	V	S	K	R	F	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	80		
Hu6C1VLv2	Y	L	Q	K	P	G	Q	S	P	K	L	I	Y	K	V	S	K	R	F	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	80		
m6C1VL	S	R	V	E	A	E	D	L	G	V	Y	Y	C	F	Q	S	H	V	P	L	T	F	G	G	T	K	L	E	L	K	112	(SEQ ID NO:13)								
3EYS_L_St.pro	S	R	V	E	A	E	D	L	G	V	Y	Y	C	F	Q	S	H	V	P	L	T	F	G	A	G	T	K	L	E	L	K	112	(SEQ ID NO:14)							
ABI74084	S	R	V	E	A	E	D	V	G	V	Y	Y	C	M	Q	G	L	Q	T	P	L	T	F	G	G	T	K	V	E	I	K	112	(SEQ ID NO:15)							
Hu6C1VLv1	S	R	V	E	A	E	D	V	G	V	Y	Y	C	F	Q	S	H	V	P	L	T	F	G	G	T	K	V	E	I	K	112	(SEQ ID NO:16)								
Hu6C1VLv2	S	R	V	E	A	E	D	V	G	V	Y	Y	C	F	Q	S	H	V	P	L	T	F	G	G	T	K	V	E	I	K	112	(SEQ ID NO:17)								

圖 2

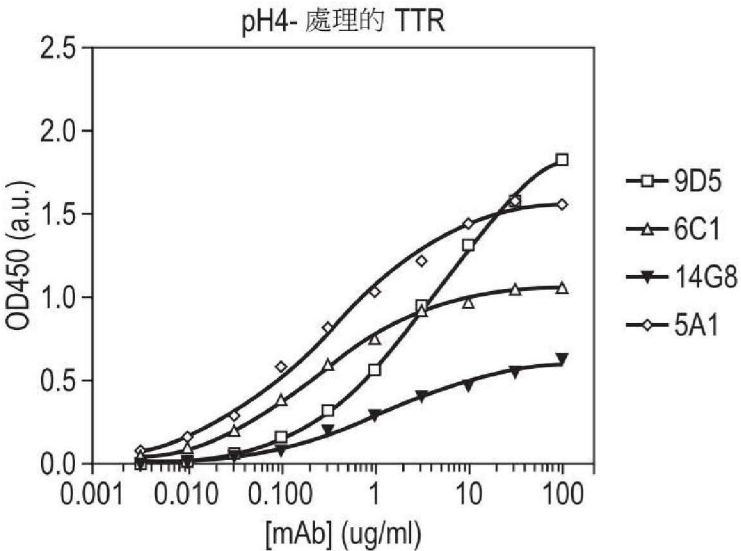


圖 3A

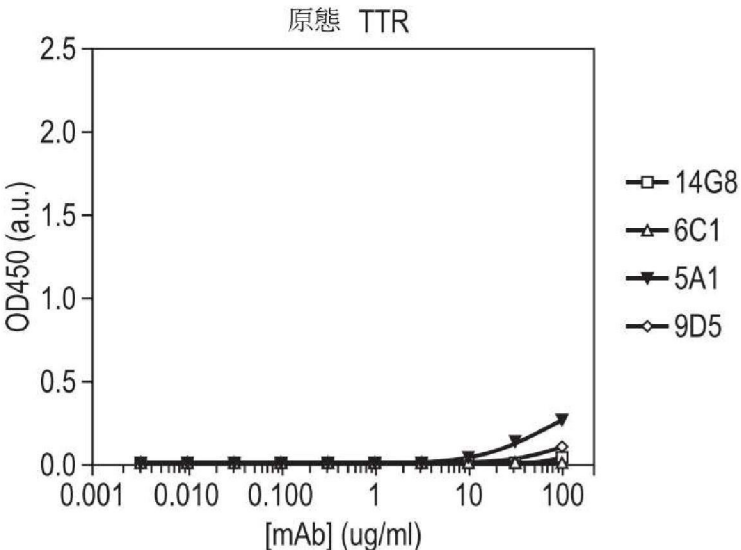


圖 3B

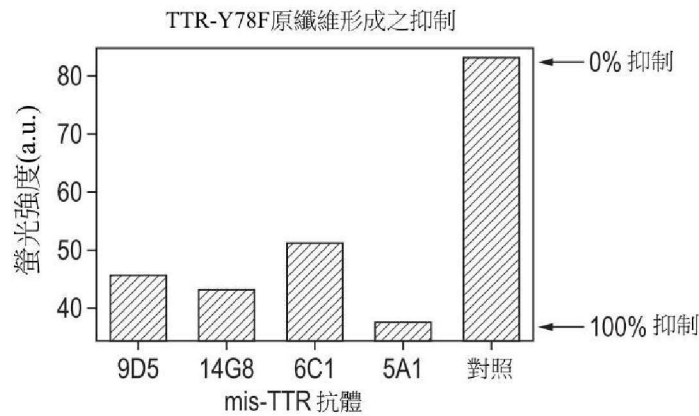


圖 4A

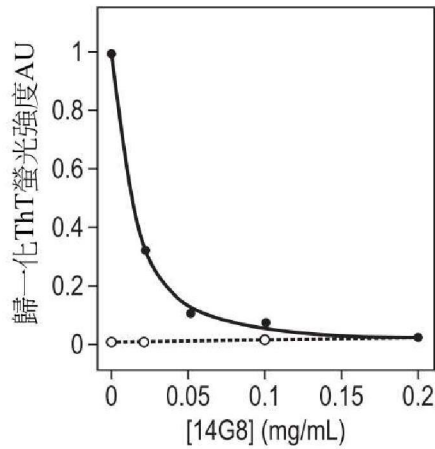


圖 4B

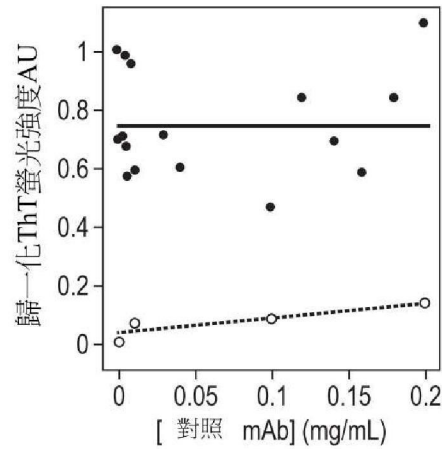


圖 4C

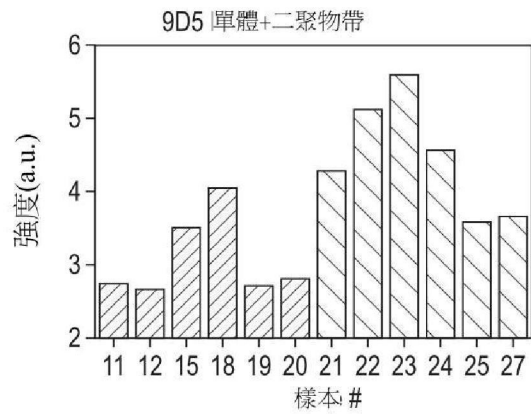


圖 5A

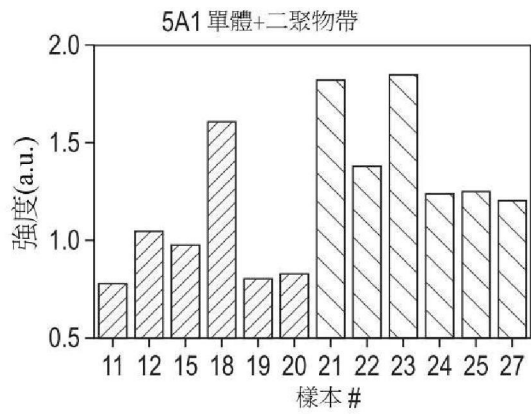


圖 5B

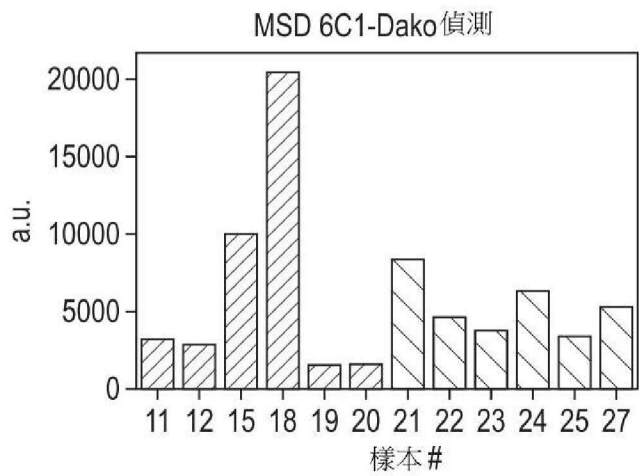


圖 6

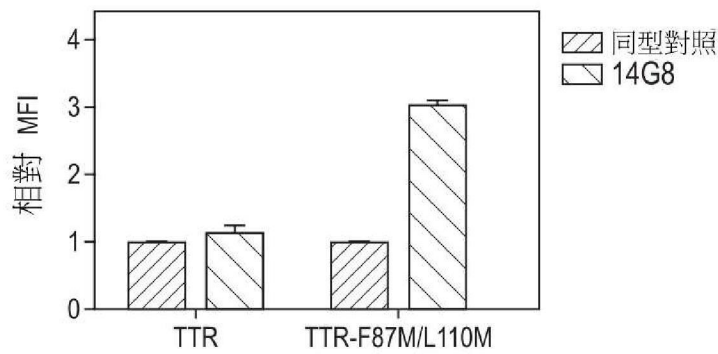


圖 7A

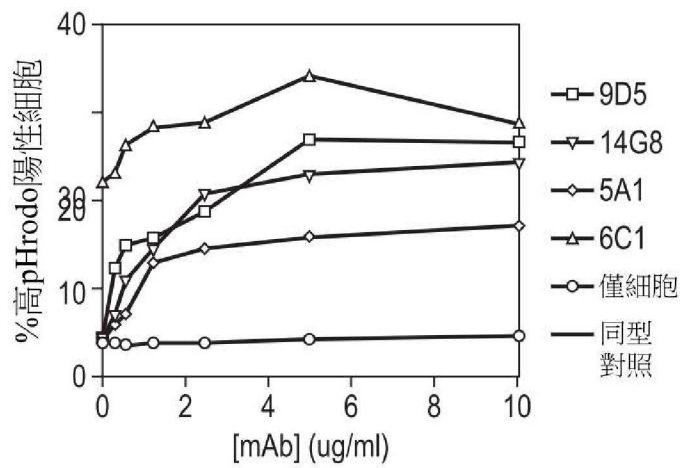


圖 7B