



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201300417 A1

(43)公開日：中華民國 102 (2013) 年 01 月 01 日

(21)申請案號：100140956

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 11 月 09 日

(51)Int. Cl.：

C07K16/40 (2006.01)

C07K16/46 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

G01N33/573 (2006.01)

A61P25/28 (2006.01)

A61P27/06 (2006.01)

(30)優先權：2010/11/10 美國

61/456,642

2010/11/30 美國

61/418,310

2010/12/01 美國

61/418,850

2010/12/22 美國

61/426,425

(71)申請人：建南德克公司 (美國) GENENTECH, INC. (US)

美國

(72)發明人：艾特華 傑斯凡德 ATWAL, JASVINDER (CA)；陳永梅 CHEN, YONGMEI (US)；

邱 希西莉亞 葡 琪 CHIU, CECILIA PUI CHI (CA)；拉薩路斯 羅伯特 A

LAZARUS, ROBERT A. (US)；王維路 WANG, WEIRU (US)；瓦茲 萊恩 J

WATTS, RYAN J. (US)；吳洋 WU, YAN (US)；張映楠 ZHANG, YINGNAN (CN)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：69 項 圖式數：25 共 273 頁

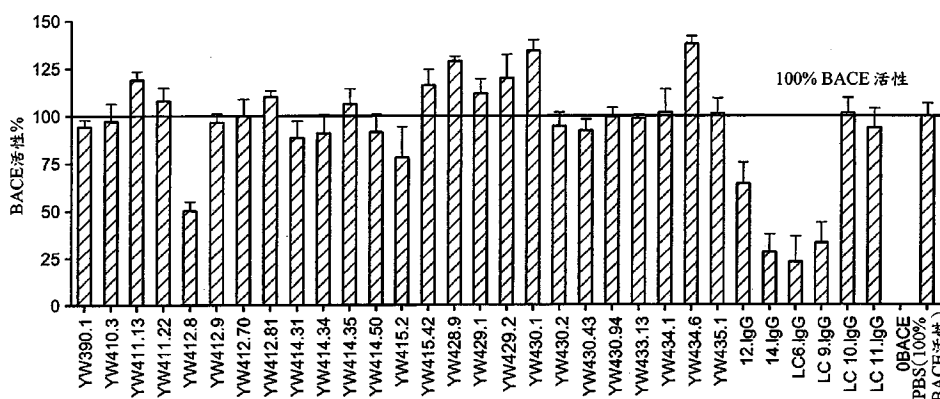
(54)名稱

用於神經疾病免疫療法之方法及組合物

METHODS AND COMPOSITIONS FOR NEURAL DISEASE IMMUNOTHERAPY

(57)摘要

本發明提供針對特定神經蛋白之抗體及其使用方法。





(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201300417 A1

(43)公開日：中華民國 102 (2013) 年 01 月 01 日

(21)申請案號：100140956

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 11 月 09 日

(51)Int. Cl.：

C07K16/40 (2006.01)

C07K16/46 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

G01N33/573 (2006.01)

A61P25/28 (2006.01)

A61P27/06 (2006.01)

(30)優先權：2010/11/10 美國

61/456,642

2010/11/30 美國

61/418,310

2010/12/01 美國

61/418,850

2010/12/22 美國

61/426,425

(71)申請人：建南德克公司 (美國) GENENTECH, INC. (US)

美國

(72)發明人：艾特華 傑斯凡德 ATWAL, JASVINDER (CA)；陳永梅 CHEN, YONGMEI (US)；

邱 希西莉亞 葡 琪 CHIU, CECILIA PUI CHI (CA)；拉薩路斯 羅伯特 A

LAZARUS, ROBERT A. (US)；王維路 WANG, WEIRU (US)；瓦茲 萊恩 J

WATTS, RYAN J. (US)；吳洋 WU, YAN (US)；張映楠 ZHANG, YINGNAN (CN)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：69 項 圖式數：25 共 273 頁

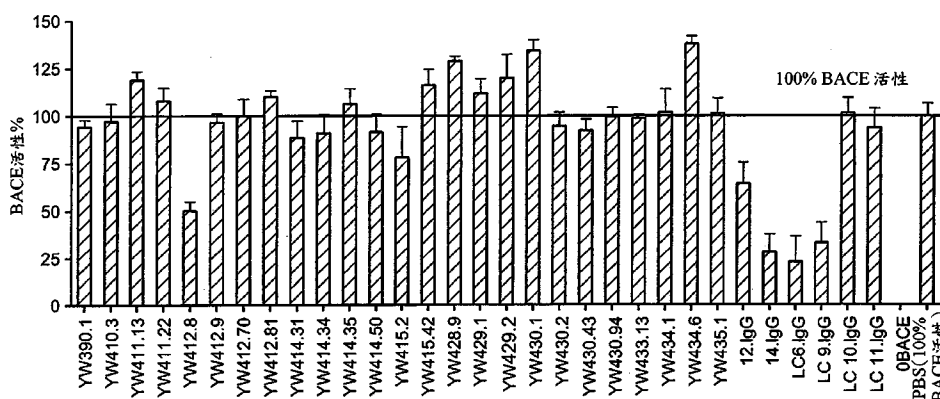
(54)名稱

用於神經疾病免疫療法之方法及組合物

METHODS AND COMPOSITIONS FOR NEURAL DISEASE IMMUNOTHERAPY

(57)摘要

本發明提供針對特定神經蛋白之抗體及其使用方法。



六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明大體上係關於作為例如抑制或降低BACE1活性之BACE1拮抗劑之抗體及包含該等抗體之組合物。其他實施例包括用於治療及診斷各種神經學疾病或病症之方法以及減少患者體內之APP及/或A β 多肽之方法。

相關申請案

本申請案主張2010年11月10日申請之美國臨時申請案第61/456,642號、2010年11月30日申請之美國臨時申請案第61/418,310號、2010年12月1日申請之美國臨時申請案第61/418,850號及2010年12月22日申請之美國臨時申請案第61/426,425號之權利，所有申請案係以全文引用的方式併入本文中。

【先前技術】

澱粉樣變性病並非單一疾病實體，而是以蠟狀澱粉樣蛋白(稱為類澱粉，其在一或多個器官或身體系統中積聚)之細胞外組織沈積物為特徵的進行性疾病過程之不同群組。隨著類澱粉沈積物積聚，其開始干擾器官或身體系統之正常功能。至少有15種不同類型的澱粉樣變性病。主要形式為無已知前因之原發性澱粉樣變性病，某一其他病狀後之繼發性澱粉樣變性病及遺傳性澱粉樣變性病。

許多衰老疾病係基於類澱粉樣蛋白或與其相關，且其特徵部分在於促進疾病發病及進展之類澱粉或類澱粉樣物質細胞外沈積物之積累。此等疾病包括(但不限於)神經病

症，諸如阿茲海默氏病(Alzheimer's Disease; AD)、路易體性癡呆(Lewy body dementia)、唐氏症候群(Down's syndrome)、遺傳性腦出血伴隨澱粉樣變性病(荷蘭(Dutch)型)；關島型帕金森病-癡呆綜合症(Guam Parkinson-Dementia complex)。基於類澱粉樣蛋白或與類澱粉樣蛋白相關之其他疾病為進行性核上麻痺、多發性硬化症、庫賈氏病(Creutzfeldt Jacob disease)、帕金森氏病、與HIV相關之癡呆症、ALS(肌萎縮性側索硬化)、成年發作糖尿病、老年心臟澱粉樣變性病、內分泌腫瘤等，包括黃斑變性。

多肽 β -類澱粉($A\beta$)可能在阿茲海默氏病(AD)發病中起重要作用。Vassar 等人, *J. Neurosci.* 29:12787-12794 (2009)。CNS中 $A\beta$ 多肽積聚造成突觸功能障礙、軸突退化及神經元死亡。AD患者之腦顯示顯著神經病理學病變之特徵性病理學，諸如神經原纖維纏結(NFT)及富類澱粉老年斑。類澱粉斑之主要組分為 $A\beta$ 。此等病變與中樞神經系統(CNS)神經元群體之大量損失相關且其進展伴隨與AD相關之臨床癡呆症。

$A\beta$ 為前驅蛋白 β 類澱粉前驅蛋白(β -APP或APP)之蛋白水解產物。APP為I型跨膜蛋白，其依序被兩種蛋白酶(β -分泌酶及 γ -分泌酶)裂解。 β -分泌酶稱為 β -位類澱粉前驅蛋白裂解酶1(BACE1)，其首先裂解APP以暴露 $A\beta$ 之N末端，從而產生稱為C99之膜結合片段。Vassar等人, *J. Neurosci.*, 29:12787-12794 (2009) 及 UniProtKB/Swiss-Prot Entry P56817 (BACE1_HUMAN)。接著， γ -分泌酶能夠裂解

C99，產生成熟A β 多肽。產生具有長度在38個胺基酸至43個胺基酸範圍內之異源性C末端的A β 。42個胺基酸形式之A β (A β_{42})為A β 之原纖維生成形式，且過度產生於唐氏症候群患者體內，並且已提出其在AD早期發病中起作用。Vassar等人，*J. Neurosci.* 29:12787-12794 (2009)。因此，BACE1已由於假定其抑制作用將抑制APP及A β 產生而成為治療標靶。

實際上，BACE1基因剔除小鼠(BACE1^{-/-})不產生大腦A β ，證實BACE1為腦中負責產生A β 之主要(若非唯一)酶。Roberds等人，*Human Mol. Genetics* 10:1317-1324 (2001)。此外，AD模型中之BACE1基因剔除小鼠不形成類澱粉斑塊；亦可挽救認知缺陷及膽鹼激導性功能障礙。McConlogue等人，*J. Biol. Chem.* 282: 26326-26334 (2007)；Ohno等人，*Neuron* 41: 27-33 (2004)；及Laird等人，*J. Neurosci.* 25:11693-11709 (2005)。此外，BACE1異種接合基因剔除小鼠之斑塊形成減少，表明斑塊減少不必完全抑制BACE1活性。McConlogue等人，*J. Biol. Chem.* 282: 26326-26334 (2007)。

最近已證明APP為死亡受體6(DR6)之配體，死亡受體6引發卡斯蛋白酶(caspase)依賴性神經元細胞體死亡及軸突修剪。Nikolaev等人，*Nature* 457: 981-989 (2009)。此外，BACE1化合物抑制劑削弱軸突及細胞體退化。同前。此等結果指出APP經由DR6結合之模型可能有助於AD。

利用BACE1之有效治療性抑制劑來降低患有神經疾病及

病症(諸如AD)之患者的APP及A β 產量將會有利。本文所提供之本發明係關於該等抑制劑，包括其在各種方法中之用途。

本文所引用之所有參考文獻，包括專利申請案及公開案，均以全文引用的方式併入本文中。

【發明內容】

本發明提供BACE1拮抗劑抗體及其使用方法。特定言之，該等抗體抑制或降低BACE1之活性。

在一實施例中，提供結合至BACE1之分離之抗體，其中該抗體降低或抑制BACE1多肽之活性。詳言之，該抗體結合至BACE1之活性位點或BACE1之外部位點(exosite)。

在另一實施例中，提供結合至BACE1之分離之抗體，其中該抗體降低或抑制BACE1多肽之活性且包含至少一個選自由SEQ ID NO:7至19、22至26、28至30、35至47、56至79及118至122組成之群的高變區(HVR)序列。

在另一實施例中，提供結合至BACE1之分離之抗體，其中該抗體降低或抑制BACE1多肽之活性且包含至少一個選自由HVR-H1、HVR-H2及HVR-H3組成之群的序列，其中HVR-H1包含胺基酸序列GFX₃₀FX₃₁X₃₂X₃₃X₃₄IH(SEQ ID NO:45)，其中X₃₀=N或T；X₃₁=S、L或Y；X₃₂=G或Y；X₃₃=Y或S；且X₃₄=A、G或S；HVR-H2包含胺基酸序列X₃₅X₃₆ISPX₃₇X₃₈GX₃₉TX₄₀YADSVKG(SEQ ID NO:46)，其中X₃₅=A或G；X₃₆=W或S；X₃₇=A或Y；X₃₈=G或S；X₃₉=S或Y；且X₄₀=D或S；且HVR-H3包含胺基酸序列

$X_{41}PX_{42}X_{43}X_{44}X_{45}X_{46}X_{47}MDY$ (SEQ ID NO:47)，其中 $X_{41}=Q$ 或 G ； $X_{42}=T$ 或 F ； $X_{43}=H$ 或 S ； $X_{44}=Y$ 或 P ； $X_{45}=Y$ 或 W ； $X_{46}=Y$ 或 V ，且其中 X_{47} 視情況包括序列 $YAKGYKA$ (SEQ ID NO:48)。或者，該抗體包含 HVR-H1 序列，該序列包含胺基酸序列 $GFTFX_{13}GYX_{14}IH$ (SEQ ID NO:26)，其中 $X_{13}=S$ 或 L 且 $X_{14}=A$ 或 G ；或選自由 SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23 及 SEQ ID NO:28 組成之群的胺基酸序列。

在另一實施例中，提供結合至 BACE1 之分離之抗體，其中該抗體降低或抑制 BACE1 多肽之活性且包含至少一個選自由 HVR-H1、HVR-H2 及 HVR-H3 組成之群的序列，其中 HVR-H1 包含胺基酸序列 $GX_{71}X_{72}X_{73}X_{74}X_{75}X_{76}X_{77}IH$ (SEQ ID NO:120)，其中 $X_{71}=F$ 或 Y ； $X_{72}=F$ 、 N 或 T ； $X_{73}=F$ 或 Y ； $X_{74}=L$ 、 Q 、 I 、 S 或 Y ； $X_{75}=G$ 或 Y ； $X_{76}=Y$ 或 S ；且 $X_{77}=A$ 、 G 或 S ；HVR-H2 包含胺基酸序列 $X_{78}X_{79}ISPX_{80}X_{81}GX_{82}X_{83}X_{84}YADSVKG$ (SEQ ID NO:121)，其中 $X_{78}=A$ 或 G ； $X_{79}=W$ 或 S ； $X_{80}=A$ 、 S 、 Q 或 Y ； $X_{81}=G$ 或 S ； $X_{82}=S$ 、 K 、 L 或 Y ； $X_{83}=T$ 或 Y ；且 $X_{84}=D$ 或 S ；且 HVR-H3 包含胺基酸序列 $X_{85}PX_{86}X_{87}X_{88}X_{89}X_{90}X_{91}MDY$ (SEQ ID NO:122)，其中 $X_{85}=Q$ 或 G ； $X_{86}=T$ 或 F ； $X_{87}=H$ 、 Y 或 S ； $X_{88}=Y$ 或 P ； $X_{89}=Y$ 或 W ； $X_{90}=Y$ 或 V 且其中 X_{91} 視情況包括序列 $YAKGYKA$ (SEQ ID NO:48)。或者，該抗體包含 HVR-H1 序列，該序列包含胺基酸序列 $GX_{53}X_{54}X_{55}X_{56}GYGIH$ (SEQ ID NO:68)，其中 $X_{53}=F$ 或 Y ； $X_{54}=T$ 或 F ； $X_{55}=F$ 或 Y ； $X_{56}=L$ 、 Q 或 I ；或選自由 SEQ ID NO:71 至 73 組成之群的胺基酸序

列。或者，該抗體包含HVR-H2序列，該序列包含胺基酸序列GWISPX₅₇X₅₈GX₅₉X₆₀DYADSVKG(SEQ ID NO:69)，其中X₅₇=A、S或Q；X₅₈=G或S；X₅₉=S、K或L；X₆₀=T或Y；或選自由SEQ ID NO:74至78組成之群的胺基酸序列。或者，該抗體包含HVR-H3序列，該序列包含胺基酸序列GPFX₆₁PWVMDY(SEQ ID NO:70)，其中X₆₁=S或Y；或胺基酸序列SEQ ID NO:79。

在一實施例中，提供結合至BACE1之分離之抗體，其中該抗體降低或抑制BACE1多肽之活性且包含HVR-H1序列，該序列包含選自SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:28及SEQ ID NO:71至73之胺基酸序列。

在一實施例中，提供結合至BACE1之分離之抗體，其中該抗體降低或抑制BACE1多肽之活性且包含HVR-H2序列，該序列包含選自SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:29及SEQ ID NO:74至78之胺基酸序列。

在另一實施例中，提供結合至BACE1之分離之抗體，其中該抗體降低或抑制BACE1多肽之活性且包含HVR-H3序列，該序列包含選自SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:30及SEQ ID NO:79之胺基酸序列。

在一實施例中，提供結合至BACE1之分離之抗體，其中該抗體降低或抑制BACE1多肽之活性且包含HVR-H1、HVR-H2及HVR-H3序列，該等序列對應於關於圖1(B)中之純系YW412.8、YW412.8.31、YW412.8.30、YW412.8.2、YW412.8.29及YW412.8.51所述之序列，或圖2(B)中之純系

Fab12、LC6、LC9及LC10所述之序列，或圖24A至圖24C中之純系所述之序列。

在一實施例中，提供結合至BACE1之分離之抗體，其中該抗體降低或抑制BACE1多肽之活性且包含SEQ ID NO:22或23之HVR-H1序列、SEQ ID NO:24之HVR-H2序列及SEQ ID NO:25之HVR-H3序列。在另一實施例中，提供結合至BACE1之分離之抗體，其中該抗體降低或抑制BACE1多肽之活性且包含SEQ ID NO:23之HVR-H1序列、SEQ ID NO:24之HVR-H2序列及SEQ ID NO:25之HVR-H3序列。在另一實施例中，提供結合至BACE1之分離之抗體，其中該抗體降低或抑制BACE1多肽之活性且包含SEQ ID NO:28之HVR-H1序列、SEQ ID NO:29之HVR-H2序列及SEQ ID NO:30之HVR-H3序列。

在一實施例中，提供結合至BACE1之分離之抗體，其中該抗體降低或抑制BACE1多肽之活性且包含選自SEQ ID NO:71至73之HVR-H1序列、選自SEQ ID NO:74至78之HVR-H2序列及選自SEQ ID NO:79之HVR-H3序列。

在一實施例中，提供結合至BACE1之分離之抗體，其中該抗體降低或抑制BACE1多肽之活性且包含具有選自由SEQ ID NO:20、21、27及80至98組成之群的胺基酸序列的可變重(VH)鏈。在一態樣中，該抗體包含SEQ ID NO:21之VH鏈胺基酸序列。

在另一實施例中，提供結合至BACE1之分離之抗體，其中該抗體降低或抑制BACE1多肽之活性且包含至少一個選

自 HVR-L1、HVR-L2 及 HVR-L3 之群的序列，其中 HVR-L1 包含胺基酸序列 RASQX₁₇VX₁₈X₁₉X₂₀X₂₁A (SEQ ID NO:42)，其中 X₁₇=S、D 或 V；X₁₈=S 或 A；X₁₉=S、T 或 N；X₂₀=A 或 S；X₂₁=V 或 L，HVR-L2 包含胺基酸序列 X₂₂ASX₂₃LYS (SEQ ID NO:43)，其中 X₂₂=S、W、Y 或 L；X₂₃=F、S 或 W，且 HVR-L3 包含胺基酸序列 QQX₂₄X₂₅X₂₆X₂₇X₂₈X₂₉T (SEQ ID NO:44)，其中 X₂₄=S、F、G、D 或 Y；X₂₅=Y、P、S 或 A；X₂₆=Y、T 或 N；X₂₇=T、Y、D 或 S；X₂₈=P 或 L；且 X₂₉=F、P 或 T。

在另一實施例中，提供結合至 BACE1 之分離之抗體，其中該抗體降低或抑制 BACE1 多肽之活性且包含至少一個選自 HVR-L1、HVR-L2 及 HVR-L3 之群的序列，其中 HVR-L1 包含胺基酸序列 RASQX₁₇VX₁₈X₁₉X₂₀X₂₁A (SEQ ID NO:42)，其中 X₁₇=S、D 或 V；X₁₈=S 或 A；X₁₉=S、T 或 N；X₂₀=A 或 S；X₂₁=V 或 L，HVR-L2 包含胺基酸序列 X₆₂ASX₆₃X₆₄YX₆₅ (SEQ ID NO:118)，其中 X₆₂=S、W、Y、F 或 L；X₆₃=F、S、Y 或 W；X₆₄=L 或 R；X₆₅=S、P、R、K 或 W，且 HVR-L3 包含胺基酸序列 QQX₆₆X₆₇X₆₈X₆₉X₇₀X₇₁T (SEQ ID NO:119)，其中 X₆₆=S、F、G、D 或 Y；X₆₇=Y、P、S 或 A；X₆₈=Y、T 或 N；X₆₉=T、Y、D 或 S；X₇₀=P、Q、S、K 或 L；且 X₇₁=F、P 或 T。

在某些實施例中，提供結合至 BACE1 之分離之抗體，其中該抗體降低或抑制 BACE1 多肽之活性且包含 HVR-L1 序列，該序列包含胺基酸序列 RASQX₁VX₂X₃X₄X₅A (SEQ ID

NO:17)，其中 X_1 =D 或 V； X_2 =S 或 A； X_3 =T 或 N； X_4 =S 或 A； X_5 =V 或 L，或選自由 SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8 或 SEQ ID NO:35 組成之群的胺基酸序列。

在一實施例中，提供結合至 BACE1 之分離之抗體，其中該抗體降低或抑制 BACE1 多肽之活性且包含 HVR-L2 序列，該序列包含胺基酸序列 X_6 ASFLYS (SEQ ID NO:18)，其中 X_6 =S 或 L 或 X_{15} AS X_{16} LYS (SEQ ID NO:41)，其中 X_{15} =S、W 或 Y 且 X_{16} =S 或 W，或選自由 SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10 及 SEQ ID NO:36 至 39 組成之群的胺基酸序列。

在一實施例中，提供結合至 BACE1 之分離之抗體，其中該抗體降低或抑制 BACE1 多肽之活性且包含 HVR-L3 序列，該序列包含胺基酸序列 $QQX_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}T$ (SEQ ID NO:19)，其中 X_7 =S、F、G、D 或 Y； X_8 =Y、P、S 或 A； X_9 =T 或 N； X_{10} =T、Y、D 或 S； X_{11} =P 或 L； X_{12} =P 或 T，或選自由 SEQ ID NO:11 至 16 及 SEQ ID NO:40 組成之群的胺基酸序列。

在某些實施例中，提供結合至 BACE1 之分離之抗體，其中該抗體降低或抑制 BACE1 多肽之活性且包含 HVR-L1 序列，該序列包含胺基酸序列 $RASQX_1VX_2X_3X_4X_5A$ (SEQ ID NO:17)，其中 X_1 =D 或 V； X_2 =S 或 A； X_3 =T 或 N； X_4 =S 或 A； X_5 =V 或 L，或選自由 SEQ ID NO:7 組成之群的胺基酸序列。

在一實施例中，提供結合至 BACE1 之分離之抗體，其中該抗體降低或抑制 BACE1 多肽之活性且包含 HVR-L2 序

列，該序列包含胺基酸序列 $X_{48}ASX_{49}X_{50}YX_{51}$ (SEQ ID NO:56)，其中 $X_{48}=S$ 或 F ； $X_{49}=F$ 或 Y ； $X_{50}=L$ 或 R ； $X_{51}=S$ 、 P 、 R 、 K 或 W ，或選自由 SEQ ID NO:58 至 64 組成之群的胺基酸序列。

在一實施例中，提供結合至 BACE1 之分離之抗體，其中該抗體降低或抑制 BACE1 多肽之活性且包含 HVR-L3 序列，該序列包含胺基酸序列 $QQFPTYX_{52}PT$ (SEQ ID NO:57)，其中 $X_{52}=L$ 、 Q 、 S 或 K ，或選自由 SEQ ID NO:65 至 67 組成之群的胺基酸序列。

在一實施例中，提供結合至 BACE1 之分離之抗體，其中該抗體降低或抑制 BACE1 多肽之活性且包含 HVR-L1、HVR-L2 及 HVR-L3 序列，該等序列對應於關於圖 1(A)中之純系 YW412.8、YW412.8.31、YW412.8.30、YW412.8.2、YW412.8.29 及 YW412.8.51 所述之序列，或圖 2(A)中之純系 Fab12、LC6、LC9 及 LC10 所述之序列，或圖 23A 至圖 23C 中之純系所述之序列。

在一實施例中，提供結合至 BACE1 之分離之抗體，其中該抗體降低或抑制 BACE1 多肽之活性且包含 SEQ ID NO:7 或 SEQ ID NO:8 之 HVR-L1 序列；選自由 SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10 或 SEQ ID NO:58 至 64 組成之群的 HVR-L2 序列；及選自由 SEQ ID NO:11 至 16 及 65 至 67 組成之群的 HVR-L3 序列。在另一態樣中，提供結合至 BACE1 之分離之抗體，其中該抗體降低或抑制 BACE1 多肽之活性且包含 SEQ ID NO:7 之 HVR-L1 序列、SEQ ID NO:9 之 HVR-L2 序列

及 SEQ ID NO:12之HVR-L3序列。

在另一實施例中，提供結合至BACE1之分離之抗體，其中該抗體降低或抑制BACE1多肽之活性且包含SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:35之HVR-L1序列。

在另一實施例中，提供結合至BACE1之分離之抗體，其中該抗體降低或抑制BACE1多肽之活性且包含SEQ ID NO:9至10、36至39或58至64之HVR-L2序列。

在另一實施例中，提供結合至BACE1之分離之抗體，其中該抗體降低或抑制BACE1多肽之活性且包含SEQ ID NO:11至16、40或65至67之HVR-L3序列。

在另一實施例中，提供結合至BACE1之分離之抗體，其中該抗體降低或抑制BACE1多肽之活性且包含具有選自由SEQ ID NO:1至6、31至34及99至117組成之群的胺基酸序列的可變輕(VL)鏈序列。在一態樣中，VL鏈胺基酸序列為SEQ ID NO:2。

在另一實施例中，提供結合至BACE1之分離之抗體，其中該抗體降低或抑制BACE1多肽之活性且包含SEQ ID NO:23之HVR-H1序列、SEQ ID NO:24之HVR-H2序列、SEQ ID NO:25之HVR-H3序列、SEQ ID NO:7之HVR-L1、SEQ ID NO:9之HVR-L2及SEQ ID NO:12之HVR-L3。

在一實施例中，提供結合至BACE1之分離之抗體，其中該抗體降低或抑制BACE1多肽之活性且包含包括SEQ ID NO:2之胺基酸序列的VL鏈及包括SEQ ID NO:21之胺基酸序列的VH鏈。

在另一實施例中，提供結合至抗原決定基之分離之抗體，該抗原決定基包含至少一個選自由以下組成之群的BACE1胺基酸殘基：SEQ ID NO:49之314 SER；316 GLU；317 LYS；327 GLN；330 CYS；331 TRP；332 GLN；335 THR；及378 ASP。在某些實施例中，該抗體結合至包含以下胺基酸之BACE1抗原決定基：SEQ ID NO:49之314 SER；316 GLU；317 LYS；327 GLN；330 CYS；331 TRP；332 GLN；335 THR；及378 ASP。

在其他實施例中，該抗體結合至包含BACE1之至少一個胺基酸區的BACE1之抗原決定基，該胺基酸區選自由以下組成之群：SEQ ID NO:49之胺基酸315-318；SEQ ID NO:49之胺基酸331-335；SEQ ID NO:49之胺基酸370-381；及其任何組合。在一實施例中，該抗體結合至包含SEQ ID NO:49之胺基酸315至318、331至335及370至381的BACE1抗原決定基。

在另一實施例中，該抗體結合的BACE1抗原決定基在結合後使BACE1之P6及P7位點之結構產生構型變化。在另一實施例中，該抗體結合的BACE1抗原決定基誘導SEQ ID NO:49之胺基酸218至231採取隨機環形結構。

本發明抗體可呈多種形式。例如，本發明抗體可為人類抗體、人類化抗體或嵌合抗體。在其他態樣中，本發明抗體為全長抗體或其片段(例如包含抗原結合組分之片段)。在本發明之其他態樣中，該抗體為單株抗體。在另一態樣中，本發明抗體可連接或結合至藥劑或部分(例如細胞毒

性劑)以產生免疫結合物。

在一個實施例中，提供一種醫藥調配物，其包含本發明抗體及醫藥學上可接受之載劑。在其他實施例中，提供分離之編碼本發明抗體之核酸以及包含編碼本發明抗體之核酸的載體。在另一態樣中，提供包含編碼本發明抗體之核酸的宿主細胞以及用於產生本發明抗體之方法，該方法包含在適合產生抗體之條件下培養包含編碼本發明抗體之核酸的宿主細胞。

在另一實施例中，提供一種治療患有神經疾病或病症之個體的方法，該方法包含投與該個體有效量之本發明抗體。

在另一實施例中，提供一種減少罹患神經疾病或病症或有感染神經疾病或病症風險之患者之類澱粉斑塊或抑制類澱粉斑塊形成的方法，該方法包含投與該個體有效量之本發明抗體。

在一個實施例中，提供一種減少患者體內A β 蛋白的方法，包含投與該患者有效量之本發明抗體。在一態樣中，該患者罹患神經疾病或病症或有感染神經疾病或病症風險。

在另一實施例中，提供一種抑制患者之軸突退化的方法，該方法包含投與該患者有效量之本發明抗體。

在另一實施例中，提供一種診斷患者之神經疾病或病症的方法，包含使自該患者分離之生物樣品與本發明抗體在適合該抗體與BACE1多肽結合的條件下接觸，及偵測該抗

體與該BACE1多肽之間是否形成複合物。

在一個實施例中，提供一種確定患者是否適於抗-BACE1抗體療法之方法，包含使自該患者分離之生物樣品與本發明抗體在適合該抗體與BACE1多肽結合的條件下接觸，及偵測該抗體與該BACE1多肽之間是否形成複合物，其中該抗體與BACE1之間存在複合物指示患者適於抗-BACE1抗體療法。在一態樣中，該患者罹患神經疾病或病症或有感染神經疾病或病症風險。

在一態樣中，可用於診斷患者神經疾病或病狀、或用於預測患者用BACE1抗體治療之反應或確定患者用BACE1抗體治療之適合性的生物樣品包括(但不限於)體液(諸如血清、血漿、唾液、胃分泌液、黏液、腦脊髓液、淋巴液及其類似物)或獲自生物體之組織或細胞樣品(諸如神經元、腦、心臟或血管組織)。

在本發明方法之一態樣中，該患者為哺乳動物。在另一態樣中，該患者為人類。在另一態樣中，神經疾病或病症係選自由以下組成之群：阿茲海默氏病(AD)、創傷性腦損傷、中風、青光眼、癡呆症、肌肉萎縮症(MD)、多發性硬化症(MS)、肌萎縮性側索硬化症(ALS)、囊腫纖維化、安格曼氏症候群(Angelman's syndrome)、利德爾氏症候群(Liddle syndrome)、柏哲德氏病(Paget's disease)、創傷性腦損傷、路易體病(Lewy body disease)、脊髓灰質炎後症候群、夏伊-德雷格症候群(Shy-Draeger syndrome)、橄欖體腦橋小腦萎縮、帕金森氏病、多系統萎縮症、紋狀體黑

質變性、核上麻痺、牛海綿狀腦病、綿羊癢病、庫賈氏症候群、庫魯症(kuru)、格斯特曼-斯脫司勒-史茵格氏病(Gerstmann-Straussler-Scheinker disease)、慢性消耗性疾病、致死性家族失眠症、延髓性麻痺、運動神經元病、卡納萬病(Canavan disease)、亨廷頓氏病(Huntington's disease)、神經元蠟樣脂褐質沈積症、亞歷山大氏病(Alexander's disease)、妥瑞氏症候群(Tourette's syndrome)、門克氏捲髮症候群(Menkes kinky hair syndrome)、科凱恩症候群(Cockayne syndrome)、哈-斯二氏症候群(Halervorden-Spatz syndrome)、拉福拉病(lafora disease)、雷特氏症候群(Rett syndrome)、肝豆狀核變性、萊施-奈恩症候群(Lesch-Nyhan syndrome)及翁韋里希特-倫德伯格症候群(Unverricht-Lundborg syndrome)、癡呆症(包括(但不限於)皮克氏病(Pick's disease)及脊髓小腦失調)。在一態樣中，神經疾病或病症為阿茲海默氏病。

在一實施例中，提供一種BACE1抗原決定基，其係由抗體或其片段特異性識別且包含BACE1之胺基酸殘基中之至少一者，該等胺基酸殘基對應於選自由以下組成之群的胺基酸：SEQ ID NO:49之314 SER；316 GLU；317 LYS；327 GLN；330 CYS；331 TRY；332 GLN；335 THR；及378 ASP。在一態樣中，BACE1抗原決定基包含對應於SEQ ID NO:49之314 SER、316 GLU、317 LYS、327 GLN、330 CYS、331 TRY、332 GLN、335 THR及378 ASP之胺基酸。

在一實施例中，提供一種BACE1抗原決定基，其係由抗體或其片段特異性識別且包含至少一個選自由以下組成之群的BACE1胺基酸區：SEQ ID NO:49之胺基酸315至318；SEQ ID NO:49之胺基酸331至335；SEQ ID NO:49之胺基酸370至381；及其任何組合。在一態樣中，BACE1抗原決定基包含SEQ ID NO:49之胺基酸315至318、331至335及370至381。

【實施方式】

I. 定義

出於本文之目的，「接受體人類構架」為包含如下文所定義之來源於人類免疫球蛋白構架或人類共同構架之輕鏈可變域(VL)構架或重鏈可變域(VH)構架之胺基酸序列的構架。「來源於」人類免疫球蛋白構架或人類共同構架之接受體人類構架可包含其相同胺基酸序列，或其可含有胺基酸序列變化。在某些實施例中，胺基酸變化數目為10個或10個以下、9個或9個以下、8個或8個以下、7個或7個以下、6個或6個以下、5個或5個以下、4個或4個以下、3個或3個以下、或2個或2個以下。在某些實施例中，VL接受體人類構架序列與VL人類免疫球蛋白構架序列或人類共同構架序列一致。

「親和力」係指分子(例如抗體)之單一結合位點與其結合搭配物(例如抗原)之間非共價相互作用之強度總和。除非另外指示，否則如本文所使用之「結合親和力」係指反映結合對(例如抗體與抗原)成員之間1:1相互作用的固有結

合親和力。分子X對其搭配物Y之親和力一般可由解離常數(Kd)表示。可藉由此項技術中已知的常用方法(包括本文所述之方法)量測親和力。量測結合親和力之具體說明性及例示性實施例描述於下文中。

「親和力成熟」抗體係指在一或多個高變區(HVR)中具有一或多個改變之抗體，與不具有該等改變之親本抗體相比，該等改變改良該抗體對抗原之親和力。

術語「抗- β -分泌酶抗體」、「抗-BACE1抗體」、「結合至 β -分泌酶之抗體」及「結合至BACE1之抗體」係指抗體能夠以足夠親和力結合BACE1以致該抗體在靶向BACE1時適用作診斷劑及/或治療劑。在一個實施例中，如例如放射免疫分析(RIA)所量測，抗-BACE1抗體與無關非-BACE1蛋白之結合程度比抗體與BACE1之結合小約10%。在某些實施例中，結合至BACE1之抗體的解離常數(Kd) $\leq 1 \mu\text{M}$ 、 $\leq 100 \text{ nM}$ 、 $\leq 10 \text{ nM}$ 、 $\leq 1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.01 \text{ nM}$ 或 $\leq 0.001 \text{ nM}$ (例如 10^{-8} M 或 10^{-8} M 以下，例如 10^{-8} M 至 10^{-13} M ，例如 10^{-9} M 至 10^{-13} M)。在某些實施例中，抗-BACE1抗體結合至在不同物種及同功異型物之BACE1中保守之BACE1抗原決定基。

術語「抗體」在本文中以廣義使用且涵蓋各種抗體結構，包括(但不限於)單株抗體、多株抗體、多特異性抗體(例如雙特異性抗體)及抗體片段，只要其展現所要抗原結合活性即可。

「抗體片段」係指除完整抗體以外的分子，其包含完整

抗體中結合完整抗體所結合之抗原之一部分。抗體片段之實例包括(但不限於)Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂；雙功能抗體；線性抗體；單鏈抗體分子(例如 scFv)；及由抗體片段形成之多特異性抗體。

「結合至與參考抗體相同的抗原決定基之抗體」係指在競爭分析中阻礙參考抗體與其抗原結合達50%或50%以上的抗體，反之，參考抗體在競爭分析中阻礙該抗體與其抗原結合達50%或50%以上。本文中提供例示性競爭分析。

術語「嵌合」抗體係指重鏈及/或輕鏈之一部分來源於特定來源或物種，而重鏈及/或輕鏈之其餘部分來源於不同來源或物種的抗體。

抗體「類別」係指抗體重鏈所具有之恆定域或恆定區的類型。存在5個主要抗體類別：IgA、IgD、IgE、IgG及IgM，且此等類別中數個類別可進一步分成亞類(同型)，例如IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁及IgA₂。對應於不同免疫球蛋白類別之重鏈恆定域分別稱為 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及 μ 。

如本文所用之術語「細胞毒性劑」係指抑制或阻止細胞功能及/或造成細胞死亡或破壞的物質。細胞毒性劑包括(但不限於)放射性同位素(例如 At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²、Pb²¹²、及Lu放射性同位素)；化學治療劑或藥物(例如甲胺喋呤(methotrexate)、阿德里黴素(adriamycin)、長春花生物鹼(長春新鹼(vincristine)、長春鹼(vinblastine)、依託泊苷(etoposide))、小紅莓(doxorubicin)、美法倫(melphalan)、絲裂黴素

C(mitomycin C)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、道諾黴素(daunorubicin)或其他嵌入劑)；生長抑制劑；酶及其片段，諸如核分解酶；抗生素；毒素，諸如細菌、真菌、植物或動物來源之小分子毒素或酶活性毒素，包括其片段及/或變異體；及下文所揭示之各種抗腫瘤劑或抗癌劑。

「效應功能」係指可歸因於抗體之Fc區的生物活性，其隨抗體同型而變化。抗體效應功能之實例包括：C1q結合及補體依賴性細胞毒性(CDC)；Fc受體結合；抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)；吞噬作用；細胞表面受體(例如B細胞受體)下調；及B細胞活化。

藥劑(例如醫藥調配物)之「有效量」係指在一定劑量下有效達成所要治療性或預防性結果經歷一段必需時間的量。

術語「Fc區」在本文中用於定義含有至少一部分恆定區之免疫球蛋白重鏈之C末端區。該術語包括天然序列Fc區及變異Fc區。在一實施例中，人類IgG重鏈Fc區自Cys226或自Pro230延伸至重鏈羧基末端。然而，Fc區之C末端離胺酸(Lys447)可能存在或不存在。除非本文另外規定，否則Fc區或恆定區中之胺基酸殘基編號係根據EU編號系統，亦稱為EU指數，如Kabat等人，*Sequences of Proteins of Immunological Interest*，5版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991中所述。

「構架」或「FR」係指除高變區(HVR)殘基以外的可變域殘基。可變域FR一般由4個FR結構域組成：FR1、FR2、

FR3及FR4。因此，HVR及FR序列一般按以下順序出現在VH(或VL)中：FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

術語「全長抗體」、「完整抗體」及「整個抗體」在本文中可互換使用且係指具有實質上與天然抗體結構相似之結構或具有含有如本文所定義之Fc區之重鏈的抗體。

術語「宿主細胞」、「宿主細胞株」及「宿主細胞培養物」可互換使用且係指已引入外源核酸之細胞，包括該等細胞之子代。宿主細胞包括「轉型物」及「轉型細胞」，轉型細胞包括原代轉型細胞及來源於其之子代，不考慮繼代數目。子代之核酸內含物與母細胞不完全相同，而是可含有突變。本文包括具有與在原始轉型細胞中所篩選或選擇相同之功能或生物活性的突變型子代。

「人類抗體」為具有對應於由人類或人類細胞所產生之抗體之胺基酸序列或來源於利用人類抗體譜系之非人類來源之胺基酸序列或其他人類抗體編碼序列的抗體。人類抗體之此定義尤其排除包含非人類抗原結合殘基之人類化抗體。

「人類共同構架」為代表所選人類免疫球蛋白VL或VH構架序列中最常出現之胺基酸殘基的構架。一般而言，人類免疫球蛋白VL或VH序列係選自可變域序列子組。一般而言，序列子組為如Kabat等人，*Sequences of Proteins of Immunological Interest*，5版，NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991)第1卷至第3卷中之子組。在一個實施例中，對於VL而言，子組為如Kabat等人之上述文獻中的

子組κI。在一個實施例中，對於VH而言，子組為如Kabat等人之上述文獻中的子組III。

「人類化抗體」係指包含來自非人類HVR之胺基酸殘基及來自人類FR之胺基酸殘基的嵌合抗體。在某些實施例中，人類化抗體將包含實質上所有至少一個且通常兩個可變域，其中所有或實質上所有HVR(例如CDR)對應於非人類抗體之HVR，且所有或實質上所有FR對應於人類抗體之FR。人類化抗體可視情況包含來源於人類抗體之抗體恆定區的至少一部分。抗體(例如非人類抗體)之「人類化形式」係指已進行人類化之抗體。

如本文所使用之術語「高變區」或「HVR」係指抗體可變域中序列高變及/或形成結構確定之環(「高變環」)的各區域。一般而言，天然4鏈抗體包含六個HVR；三個在VH中(H1、H2、H3)，且三個在VL中(L1、L2、L3)。HVR一般包含來自高變環及/或「互補決定區」(CDR)之胺基酸殘基，互補決定區具有最高序列變異性及/或涉及抗原識別。例示性高變環出現在胺基酸殘基26至32(L1)、50至52(L2)、91至96(L3)、26至32(H1)、53至55(H2)及96至101(H3)處。(Chothia及Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)。)例示性CDR(CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2及CDR-H3)出現在L1之胺基酸殘基24至34、L2之胺基酸殘基50至56、L3之胺基酸殘基89至97、H1之胺基酸殘基31至35B、H2之胺基酸殘基50至65及H3之胺基酸殘基95至102處。(Kabat等人, *Sequences of Proteins of*

Immunological Interest , 5 版。Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)。)除 VH 中之 CDR1 以外, CDR 一般包含形成高變環之胺基酸殘基。CDR 亦包含「特異性決定殘基」或「SDR」, 該等殘基為接觸抗原之殘基。SDR 係含於稱為簡化 CDR (abbreviated-CDR) 或 a-CDR 之 CDR 區域內。例示性 a-CDR (a-CDR-L1、a-CDR-L2、a-CDR-L3、a-CDR-H1、a-CDR-H2 及 a-CDR-H3) 出現在 L1 之胺基酸殘基 31 至 34、L2 之胺基酸殘基 50 至 55、L3 之胺基酸殘基 89 至 96、H1 之胺基酸殘基 31 至 35B、H2 之胺基酸殘基 50 至 58 及 H3 之胺基酸殘基 95 至 102 處。(參看 Almagro 及 Fransson, *Front. Biosci.* 13: 1619-1633 (2008)。)除非另外指示, 否則本文中可變域中之 HVR 殘基及其他殘基(例如 FR 殘基)係根據 Kabat 等人之上述文獻進行編號。

「免疫結合物」為與一或多個異源分子(包括(但不限於)細胞毒性劑)結合之抗體。

「個體(individual)」或「個體(subject)」為哺乳動物。哺乳動物包括(但不限於)家養動物(例如母牛、綿羊、貓、狗及馬)、靈長類動物(例如人類及非人類靈長類動物, 諸如猴子)、兔子及齧齒動物(例如小鼠及大鼠)。在某些實施例中, 個體或個體為人類。

「分離之」抗體為已與其自然環境組分分離的抗體。在一些實施例中, 抗體係純化至大於 95% 或 99% 之純度, 如藉由例如電泳(例如 SDS-PAGE、等電聚焦(IEF)、毛細管電

泳)或層析(例如離子交換或逆相HPLC)所測定。關於評估抗體純度之方法綜述，參看例如Flatman等人，*J. Chromatogr. B* 848:79-87 (2007)。

「分離之」核酸係指已與其自然環境組分分離的核酸分子。分離之核酸包括通常含有核酸分子之細胞中所含有的核酸分子，但該核酸分子存在於染色體外或存在於不同於其天然染色體位置的染色體位置。

「編碼抗-BACE1抗體之分離之核酸」係指編碼抗體重鏈及輕鏈(或其片段)的一或多個核酸分子，包括處於單一載體或獨立載體中之該(等)核酸分子，且該(等)核酸分子存在於宿主細胞中之一或多個位置。

如本文所使用之術語「單株抗體」係指獲自實質上均質之抗體群體的抗體，亦即除了可能之變異抗體(例如含有天然存在之突變或在製造單株抗體製劑期間出現，該等變異體一般少量存在)以外，構成該群體之個別抗體相同及/或結合相同抗原決定基。與通常包括針對不同決定子(抗原決定基)之不同抗體的多株抗體製劑相反，單株抗體製劑之各單株抗體係針對抗原上之單一決定子。因此，修飾語「單株」指示抗體在獲自實質上均質之抗體群體時的特徵，且不應視為需要藉由任何特定方法產生抗體。例如，根據本發明使用之單株抗體可藉由多種技術製造，包括(但不限於)融合瘤法、重組DNA法、噬菌體呈現法及利用含有所有或一部分人類免疫球蛋白基因座之轉殖基因動物的方法，該等方法及用於製造單株抗體之其他例示性方法

描述於本文中。

「裸抗體」係指未與異源部分(例如細胞毒性部分)或放射性標記結合之抗體。裸抗體可存在於醫藥調配物中。

「天然抗體」係指具有不同結構之天然存在之免疫球蛋白分子。例如，天然IgG抗體為約150,000道爾頓之雜四聚醣蛋白，由二硫化物鍵結之兩個一致輕鏈及兩個一致重鏈構成。自N末端至C末端，各重鏈具有可變區(VH)，亦稱為可變重域或重鏈可變域，之後為3個恆定域(CH1、CH2及CH3)。類似地，自N末端至C末端，各輕鏈具有可變區(VL)，亦稱為可變輕域或輕鏈可變域，之後為恆定輕(CL)域。抗體輕鏈可基於其恆定域之胺基酸序列而歸為稱為 κ 及 λ 之兩種類型之一。

術語「包裝插頁」用於指通常包括於治療性產品之商業包裝中的說明書，其含有關於與使用該等治療性產品相關之適應症、用法、劑量、投藥、組合療法、禁忌及/或警告的資訊。

相對於參考多肽序列之「胺基酸序列一致性百分比(%)」定義為在比對參考多肽序列與候選序列且必要時引入間隙以達成最大序列一致性百分比之後，且在不將任何保守型取代視為序列一致性之一部分的情況下，候選序列中與參考多肽序列中之胺基酸殘基一致的胺基酸殘基之百分比。可用此項技術內之多種方式，例如使用公開可得之電腦軟體，諸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign(DNASTAR)軟體來比對以便測定胺基酸序列一致性百分

比。熟習此項技術者可確定適用於比對序列之參數，包括在所比較序列之全長內達成最大比對所需之任何演算法。然而，出於本文之目的，使用序列比較電腦程式ALIGN-2來產生胺基酸序列一致性百分比值。ALIGN-2序列比較電腦程式係由Genentech, Inc.創作且原始程式碼已與使用說明書一起在美國版權局(U.S. Copyright Office)(Washington D.C., 20559)存檔，其中其係以美國版權登記號TXU510087登記。ALIGN-2程式可公開獲自Genentech, Inc.(South San Francisco, California)，或可由原始程式碼編譯。ALIGN-2程式應編譯用於UNIX操作系統，包括數位UNIX V4.0D。所有序列比較參數均由ALIGN-2程式設定且不變。

在採用ALIGN-2進行胺基酸序列比較的情況下，如下計算指定胺基酸序列A對於、與、或相對於指定胺基酸序列B之胺基酸序列一致性百分比(或者可稱為指定胺基酸序列A對於、與、或相對於指定胺基酸序列B具有或包含某一百分比之胺基酸序列一致性)：

$$\text{分數 } X/Y \text{ 之 } 100 \text{ 倍}$$

其中X為在A與B之程式比對中由序列比對程式ALIGN-2評為一致匹配的胺基酸殘基數目，且其中Y為B中胺基酸殘基總數。應瞭解，若胺基酸序列A之長度不等於胺基酸序列B之長度，則A與B之胺基酸序列一致性百分比將不等於B與A之胺基酸序列一致性百分比。除非另外明確規定，否則本文中所有胺基酸序列一致性百分比值均使用

ALIGN-2電腦程式如前一段中所述而獲得。

術語「醫藥調配物」係指呈允許其中所含有之活性成分之生物活性有效之形式且不含對該調配物將投與之個體而言毒性不可接受之其他組分的製劑。

「醫藥學上可接受之載劑」係指醫藥調配物中除活性成分以外之成分，其對個體無毒。醫藥學上可接受之載劑包括(但不限於)緩衝劑、賦形劑、穩定劑或防腐劑。

除非另外指示，否則如本文所使用之術語「BACE1」係指來自任何脊椎動物來源之任何天然 β -分泌酶1(亦稱為 β -位點類澱粉前驅蛋白裂解酶1、膜相關天冬胺酸蛋白酶2、memapsin 2、天冬胺醯基蛋白酶2或Asp2)，脊椎動物包括哺乳動物，諸如靈長類動物(例如人類)及齧齒動物(例如小鼠及大鼠)。該術語涵蓋「全長」未經處理BACE1以及由在細胞中處理產生的任何BACE1形式。該術語亦涵蓋天然存在之BACE1變異體，例如剪接變異體或對偶基因變異體。例示性BACE1多肽之胺基酸序列示於下文之SEQ ID NO:49中，且為如Vassar等人，Science 286:735-741 (1999)中所報導之人類BACE1同功異型物A之序列，該文獻係以全文引用的方式併入本文中。

MAQALPWLLWLGAGVLP AHGTQH GIRLPLRSGLG GAPLGLRLPRETDEEPEEPGR
RGSFVEMVDNLRGKSGQGYVEMTVGSPPQTLNILVDTGSSNFAVGAAPHPFLHRY
YQRQLSSTYRDLRKGVYVPYTQGWEGELGTDLVSIHPGNVTVRANIAAITESDKF
FINGSNWEGLGLAYAEIARPDDSLEFFDSL VKQTHVPNLFSLQLCGAGFPLNQSEVL
ASVGGSMIIGGIDHSLYTGSLWYTPIRREWYVEIIVRVEINGQDLKMDCKEYNYDKS
IVDSGTTNLRPLPKKVFEAAVKSIIKAASSTEKFPDGFWLGEQLVCWQAGTTPWNIFPVI
SLYLMGEVTNQSFRTILPQQYLRPVEDVATSQDDCYKFAISQSSTGTVMGAVIMEGF

YVVFDRARKRIGFAVSACHVHDEFRTAAVEGPFVTLDMEDCGYNIPQTDESTLMTIA
YVMAAICALFMLPLCLMVCQWCCLRLRQQHDDFADDISLLK (SEQ ID NO:49)

存在數種其他人類BACE1同功異型物，包括同功異型物B、C及D。參看UniProtKB/Swiss-Prot Entry P56817，其係以全文引用的方式併入本文中。同功異型物B示於SEQ ID NO:50中，且其與同功異型物A(SEQ ID NO:49)之不同之處在於其缺失胺基酸190至214(亦即缺失SEQ ID NO:49之胺基酸190至214)。同功異型物C示於SEQ ID NO:51中，且其與同功異型物A(SEQ ID NO:49)之不同之處在於其缺失胺基酸146至189(亦即缺失SEQ ID NO:49之胺基酸146至189)。同功異型物D示於SEQ ID NO:52中，且其與同功異型物A(SEQ ID NO:49)之不同之處在於其缺失胺基酸146至189及190至214(亦即缺失SEQ ID NO:49之胺基酸146至189及190至214)。

如本文所使用，「處理」(及其語法變化形式)係指試圖改變所治療個體之自然過程且可出於預防目的或在臨床病理學過程中進行的臨床干預。理想治療效果包括(但不限於)防止疾病發生或復發、減輕症狀、減弱疾病之任何直接或間接病理結果、防止轉移、降低疾病進展速率、改善或緩解疾病病況及減輕或改良預後。在一些實施例中，本發明抗體用於延遲疾病發展或減緩疾病進展。

術語「可變區」或「可變域」係指抗體重鏈或輕鏈中參與抗體與抗原結合之結構域。天然抗體之重鏈及輕鏈可變域(分別為VH及VL)一般具有類似結構，其中各結構域包

含四個保守構架區(FR)及三個高變區(HVR)。(參看例如 Kindt 等人, *Kuby Immunology*, 6版, W.H. Freeman and Co., 91頁(2007)。)單一VH或VL域可足以賦予抗原結合特异性。此外,可分別使用來自結合特定抗原之抗體的VH或VL域來分離結合該抗原之抗體以便篩選互補VL或VH域文庫。參看例如 Portolano 等人, *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson 等人, *Nature* 352:624-628 (1991)。

如本文中所用之術語「載體」係指能夠使其所連接之另一核酸繁殖的核酸分子。該術語包括呈自我複製核酸結構形式之載體以及併入引入其之宿主細胞基因體中的載體。某些載體能夠引導與其可操作地連接之核酸之表現。該等載體在本文中稱為「表現載體」。

術語「神經病症」或「神經疾病」係指或描述哺乳動物之中樞及/或周邊神經系統之疾病或病症。神經病症之實例包括(但不限於)以下疾病及病症清單。神經病為以不當或不受控制神經信號傳導或缺乏神經信號傳導為特徵的神經系統疾病或異常,且包括(但不限於)慢性疼痛(包括感受傷害性疼痛(由身體組織損傷所致之疼痛,包括與癌症相關之疼痛))、神經痛(由神經、脊髓或腦中之異常所致的疼痛)及心因性疼痛(完全或主要與心理病症相關)、頭痛、偏頭痛、神經病及往往伴隨該等神經病之症狀及症候群,諸如眩暈或噁心。類澱粉變性病為與CNS中之細胞外蛋白質沈積物相關的疾病及病症群組,包括(但不限於)繼發性澱粉樣變性、年齡相關之澱粉樣變性病、阿茲海默氏病

(AD)、輕度認知障礙(MCI)、路易體性癡呆、唐氏症候群、遺傳性腦出血伴隨澱粉樣變性病(荷蘭型)；關島型帕金森-癡呆綜合症、大腦類澱粉血管病變、亨廷頓氏病、進行性核上麻痺、多發性硬化症；庫賈氏病、帕金森氏病、傳染性海綿狀腦病、與HIV相關之癡呆症、肌萎縮性側索硬化(ALS)、包涵體肌炎(IBM)及與 β -類澱粉沈積相關之眼部疾病(亦即黃斑變性、與脈絡膜小疣(drusen)相關之視神經病及白內障)。CNS癌症之特徵在於一或多個CNS細胞(亦即神經細胞)異常增殖，且包括(但不限於)神經膠質瘤、多形性膠質母細胞瘤、腦膜瘤、星形細胞瘤、聽神經瘤、軟骨瘤、少枝膠質瘤、髓母細胞瘤、神經節神經膠質瘤、神經鞘瘤、神經纖維瘤、神經母細胞瘤，及硬膜外、髓內或硬膜內腫瘤。眼部疾病或病症為眼睛之疾病或病症，出於本文之目的將其視為CNS器官患有BBB。眼部疾病或病症包括(但不限於)鞏膜、角膜、虹膜及睫狀體之病症(亦即鞏膜炎、角膜炎、角膜潰瘍、角膜磨損、雪盲症、電弧眼、希傑森氏表層點狀角膜病(Thygeson's superficial punctate keratopathy)、角膜新血管生成、福斯氏角膜失養症(Fuchs' dystrophy)、圓錐角膜、乾躁性角膜結膜炎、虹膜炎及葡萄膜炎)、晶狀體病症(亦即白內障)、脈絡膜及視網膜病症(亦即視網膜脫落、視網膜分層剝離、高血壓性視網膜病變、糖尿病性視網膜病、視網膜病、早產兒視網膜病、年齡相關之黃斑變性、黃斑變性(濕或乾)、視網膜前膜、色素性視網膜炎及黃斑水腫)、青

光眼、飛蚊症(floaters)、視神經及視路病症(亦即賴博氏遺傳性視神經病變(Leber's hereditary optic neuropathy)及視神經盤脈絡膜小疣)、眼肌/雙眼運動調節/屈光病症(亦即斜視、眼肌癱瘓、進行性外部眼肌麻痺、內斜視、外斜視、遠視、近視、散光、屈光參差、老花眼及眼肌麻痺)、視力障礙及失明(亦即弱視、利伯氏先天性黑蒙(Lever's congenital amaurosis)、盲點、色盲(color blindness)、全色盲(achromatopsia)、夜盲症、失明、河盲症及小眼症/缺損)、紅眼病、阿蓋耳·羅伯遜氏瞳孔(Argyll Robertson pupil)、角膜真菌病、乾眼病及無虹膜症。CNS之病毒或微生物感染包括(但不限於)病毒(亦即流感、HIV、脊髓灰質炎病毒、風疹)感染、細菌(亦即奈瑟菌屬(*Neisseria* sp.)、鏈球菌屬(*Streptococcus* sp.)、假單胞菌屬(*Pseudomonas* sp.)、變形桿菌屬(*Proteus* sp.)、大腸桿菌(*E. coli*)、金黃色葡萄球菌(*S. aureus*)、肺炎球菌屬(*Pneumococcus* sp.)、腦膜炎球菌屬(*Meningococcus* sp.)、嗜血桿菌屬(*Haemophilus* sp.)及結核分枝桿菌(*Mycobacterium tuberculosis*))感染，及其他微生物感染，諸如真菌(亦即酵母、新型隱球菌(*Cryptococcus neoformans*))、寄生蟲(亦即弓蟲(*toxoplasma gondii*))或阿米巴(amoebas)，其導致CNS病理生理學，包括(但不限於)急性或慢性腦膜炎、腦炎、脊髓炎、血管炎及膿腫。CNS炎症為由CNS損傷所致之炎症，其可為物理性損傷(亦即由事故、手術、腦外傷、脊髓損傷、震盪所致)或為由一或

多種其他CNS疾病或病症(亦即膿腫、癌症、病毒或微生物感染)所致或與一或多種其他CNS疾病或病症相關之損傷。如本文所使用之CNS局部缺血係指與腦中之異常血液流動或血管行為或其原因相關之病症群組，且包括(但不限於)局灶性腦缺血、全腦缺血、中風(亦即蛛網膜下出血及腦內出血)及動脈瘤。神經退化性疾病為與CNS中之神經細胞功能損失或死亡相關的疾病及病症群組，且包括(但不限於)腎上腺腦白質營養不良、亞歷山大氏病、阿耳珀氏病(Alper's disease)、肌萎縮性側索硬化症、共濟失調毛細血管擴張、巴滕病(Batten disease)、科凱恩症候群、皮質基底核退化症、由澱粉樣變性病所致或與其相關之退化症、弗里德賴希氏共濟失調(Friedreich's ataxia)、額顳葉退化症、肯尼迪病(Kennedy's disease)、多系統萎縮症、多發性硬化症、原發性側索硬化、進行性核上麻痺、脊髓性肌萎縮、橫貫性脊髓炎、雷弗素姆氏病(Refsum's disease)及脊髓小腦失調。CNS之癲癇發作疾病及病症涉及CNS中之不當及/或異常電傳導，且包括(但不限於)癲癇症(亦即失神性發作、無張力性發作、良性羅蘭癲癇(benign Rolandic epilepsy)、兒童期失神、陣攣性發作、複雜性部分發作、額葉癲癇症、熱性痙攣、嬰兒痙攣、青少年肌陣攣性癲癇、青少年失神癲癇症、林諾克斯-戈斯托特症候群(Lennox-Gastaut syndrome)、蘭達-克萊夫納症候群(Landau-Kleffner Syndrome)、德拉韋氏症候群(Dravet's syndrome)、大田原症候群(Otahara syndrome)、韋氏症候

群(West syndrome)、肌陣攣性發作、粒線體病症、進行性肌陣攣性癲癇症、心因性發作、反射性癲癇、拉斯穆森氏症候群(Rasmussen's Syndrome)、單純性部分發作、繼發性全身性發作、顳葉癲癇、強直(性)陣發性發作、強直性發作、精神運動性發作、邊緣葉癲癇(limbic epilepsy)、部分性癲癇發作、全身性癲癇發作、癲癇持續狀態、腹性癲癇症、運動不能發作、自主神經性發作、大規模雙側肌陣攣、經期癲癇症、跌倒發作(drop seizures)、情感性發作、局灶性發作、癡笑性發作(gelastical seizure)、傑克遜步伐(Jacksonian March)、拉福拉病、運動性發作、多灶性發作、夜間發作、光敏感性發作、假癲癇發作、感覺性癲癇發作、隱微性發作、叢林性發作(sylvan seizure)、戒斷性癲癇發作及視覺反射性癲癇發作)。行為障礙為以患病個體之局部不正常行為為特徵的CNS病症，且包括(但不限於)睡眠障礙(亦即失眠症、類睡症、夜驚、晝夜節律睡眠障礙及發作性睡病)、情感障礙(亦即抑鬱、自殺性抑鬱、焦慮症、慢性情感障礙、恐懼症、恐慌發作、強迫症、注意力不足過動症(ADHD)、注意力缺乏症(ADD)、慢性疲勞症候群、畏曠症、創傷後壓力症、躁鬱症)、飲食障礙(亦即厭食症或貪食症)、精神病、發育行為障礙(亦即自閉症、雷特氏症候群、亞斯伯格氏症候群(Asperger's syndrome))、人格障礙及精神病症(亦即精神分裂症、妄想症及其類似病症)。溶酶體貯積症為在某些情況下與CNS相關或具有CNS特異性症狀的代謝病症；該等病症包括(但不

限於)泰-薩二氏病(Tay-Sachs disease)、高雪氏病(Gaucher's disease)、法布瑞氏病(Fabry disease)、黏多糖病(I型、II型、III型、IV型、V型、VI型及VII型)、肝糖貯積病、GM1神經節苷脂貯積病、異染性腦白質營養不良、法伯氏病(Farber's disease)、卡納萬氏腦白質營養不良及神經元類蠟脂褐質沈積症1型及2型、尼-皮二氏病(Niemann-Pick disease)、龐貝氏病(Pompe disease)及克拉伯氏病(Krabbe's disease)。

II. 組合物及方法

在一態樣中，本發明係部分基於結合BACE1且降低及/或抑制BACE1活性之抗體。在某些實施例中，提供結合至BACE1之活性位點或外部位點的抗體。

A. 例示性抗-BACE1抗體

在一態樣中，本發明提供一種抗-BACE1抗體，其包含至少一、二、三、四、五或六個選自以下之HVR：(a) HVR-H1，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:22、23、26、28、45、68、71、72、73或120；(b) HVR-H2，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:24、29、46、69、74、75、76、77、78或121；(c) HVR-H3，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:25、30、47、70、79或122；(d) HVR-L1，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:7、8、17、35或42；(e) HVR-L2，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:9、10、18、36至39、41、43、56、58、59、60、61、62、63、64或118；及(f) HVR-L3，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:11至16、19、40、44、

57、65、66、67或119。

在一態樣中，本發明提供一種抗體，其包含選自以下之至少一個、至少兩個或所有三個VH HVR序列：(a) HVR-H1，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:22、23、26、28、45、68、71至73或120；(b) HVR-H2，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:24、29、46、69、74至78或121；及(c) HVR-H3，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:25、30、47、70、79或122。

在一個實施例中，該抗體包含包括胺基酸序列SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:28或SEQ ID NO:71或SEQ ID NO:72或SEQ ID NO:73之HVR-H1。在另一實施例中，該抗體包含包括胺基酸序列SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:29或SEQ ID NO:74或SEQ ID NO:75或SEQ ID NO:76或SEQ ID NO:77或SEQ ID NO:78之HVR-H2。在另一實施例中，該抗體包含包括胺基酸序列SEQ ID NO:25或SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:79之HVR-H3。在一個實施例中，該抗體包含包括胺基酸序列SEQ ID NO:28之HVR-H1。在另一實施例中，該抗體包含包括胺基酸序列SEQ ID NO:29之HVR-H2。在另一實施例中，該抗體包含包括胺基酸序列SEQ ID NO:30之HVR-H3。

在另一實施例中，該抗體包含(a)包括胺基酸序列SEQ ID NO:22之HVR-H1；(b)包括胺基酸序列SEQ ID NO:24之HVR-H2；及(c)包括胺基酸序列SEQ ID NO:25之HVR-H3；或該抗體包含(a)包括胺基酸序列SEQ ID NO:23之

HVR-H1；(b)包括胺基酸序列SEQ ID NO:24之HVR-H2；及(c)包括胺基酸序列SEQ ID NO:25之HVR-H3。在另一實施例中，該抗體包含(a)包括胺基酸序列SEQ ID NO:28之HVR-H1；(b)包括胺基酸序列SEQ ID NO:29之HVR-H2；及(c)包括胺基酸序列SEQ ID NO:30之HVR-H3。在另一實施例中，該抗體包含(a)包括胺基酸序列SEQ ID NO:23之HVR-H1；(b)包括胺基酸序列SEQ ID NO:74之HVR-H2；及(c)包括胺基酸序列SEQ ID NO:25之HVR-H3，或該抗體包含(a)包括胺基酸序列SEQ ID NO:23之HVR-H1；(b)包括胺基酸序列SEQ ID NO:75之HVR-H2；及(c)包括胺基酸序列SEQ ID NO:25之HVR-H3，或該抗體包含(a)包括胺基酸序列SEQ ID NO:71之HVR-H1；(b)包括胺基酸序列SEQ ID NO:24之HVR-H2；及(c)包括胺基酸序列SEQ ID NO:25之HVR-H3，或該抗體包含(a)包括胺基酸序列SEQ ID NO:72之HVR-H1；(b)包括胺基酸序列SEQ ID NO:24之HVR-H2；及(c)包括胺基酸序列SEQ ID NO:25之HVR-H3，或該抗體包含(a)包括胺基酸序列SEQ ID NO:23之HVR-H1；(b)包括胺基酸序列SEQ ID NO:76之HVR-H2；及(c)包括胺基酸序列SEQ ID NO:25之HVR-H3，或該抗體包含(a)包括胺基酸序列SEQ ID NO:23之HVR-H1；(b)包括胺基酸序列SEQ ID NO:77之HVR-H2；及(c)包括胺基酸序列SEQ ID NO:79之HVR-H3，或該抗體包含(a)包括胺基酸序列SEQ ID NO:73之HVR-H1；(b)包括胺基酸序列SEQ ID NO:78之HVR-H2；及(c)包括胺基酸序列SEQ ID NO:25之HVR-

H3。

在另一態樣中，本發明提供一種抗體，其包含選自以下之至少一個、至少兩個或所有三個VL HVR序列：(a)包括胺基酸序列SEQ ID NO:7、8、17、35及42之HVR-L1；(b)包括胺基酸序列SEQ ID NO:9、10、18、36至39、41、43、56、58至64或118之HVR-L2；及(c)包括胺基酸序列SEQ ID NO:11至16、19、40、44、57、65至67或119之HVR-L3。

在一個實施例中，該抗體包含包括胺基酸序列SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8之HVR-L1。在另一實施例中，該抗體包含包括胺基酸序列SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:58或SEQ ID NO:59或SEQ ID NO:60或SEQ ID NO:61或SEQ ID NO:62或SEQ ID NO:63或SEQ ID NO:64之HVR-L2。在另一實施例中，該抗體包含包括胺基酸序列SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:65或SEQ ID NO:66或SEQ ID NO:67之HVR-L3。在另一實施例中，該抗體包含包括胺基酸序列SEQ ID NO:35之HVR-L1。在另一實施例中，該抗體包含包括選自由SEQ ID NO:36至39組成之群的胺基酸序列的HVR-L2。在另一實施例中，該抗體包含包括胺基酸序列SEQ ID NO:40之HVR-L3。

在另一實施例中，該抗體包含(a)包括胺基酸序列SEQ ID NO:7之HVR-L1；(b)包括胺基酸序列SEQ ID NO:9之

HVR-L2；及(c)包括胺基酸序列SEQ ID NO:11之HVR-L3，或該抗體包含(a)包括胺基酸序列SEQ ID NO:7之HVR-L1；(b)包括胺基酸序列SEQ ID NO:9之HVR-L2；及(c)包括胺基酸序列SEQ ID NO:12之HVR-L3，或該抗體包含(a)包括胺基酸序列SEQ ID NO:7之HVR-L1；(b)包括胺基酸序列SEQ ID NO:9之HVR-L2；及(c)包括胺基酸序列SEQ ID NO:13之HVR-L3，或該抗體包含(a)包括胺基酸序列SEQ ID NO:7之HVR-L1；(b)包括胺基酸序列SEQ ID NO:9之HVR-L2；及(c)包括胺基酸序列SEQ ID NO:14之HVR-L3，或該抗體包含(a)包括胺基酸序列SEQ ID NO:7之HVR-L1；(b)包括胺基酸序列SEQ ID NO:9之HVR-L2；及(c)包括胺基酸序列SEQ ID NO:16之HVR-L3，或該抗體包含(a)包括胺基酸序列SEQ ID NO:8之HVR-L1；(b)包括胺基酸序列SEQ ID NO:10之HVR-L2；及(c)包括胺基酸序列SEQ ID NO:15之HVR-L3。在另一實施例中，該抗體包含(a)包括胺基酸序列SEQ ID NO:35之HVR-L1；(b)包括胺基酸序列SEQ ID NO:36之HVR-L2；及(c)包括胺基酸序列SEQ ID NO:40之HVR-L3，或該抗體包含(a)包括胺基酸序列SEQ ID NO:35之HVR-L1；(b)包括胺基酸序列SEQ ID NO:37之HVR-L2；及(c)包括胺基酸序列SEQ ID NO:40之HVR-L3，或該抗體包含(a)包括胺基酸序列SEQ ID NO:35之HVR-L1；(b)包括胺基酸序列SEQ ID NO:38之HVR-L2；及(c)包括胺基酸序列SEQ ID NO:40之HVR-L3，或該抗體包含(a)包括胺基酸序列SEQ ID NO:35之HVR-L1；(b)

包括胺基酸序列SEQ ID NO:39之HVR-L2；及(c)包括胺基酸序列SEQ ID NO:40之HVR-L3。

在另一實施例中，該抗體包含(a)包括胺基酸序列SEQ ID NO:7之HVR-L1；(b)包括胺基酸序列SEQ ID NO:58之HVR-L2；及(c)包括胺基酸序列SEQ ID NO:12之HVR-L3，或該抗體包含(a)包括胺基酸序列SEQ ID NO:7之HVR-L1；(b)包括胺基酸序列SEQ ID NO:9之HVR-L2；及(c)包括胺基酸序列SEQ ID NO:65之HVR-L3，或該抗體包含(a)包括胺基酸序列SEQ ID NO:7之HVR-L1；(b)包括胺基酸序列SEQ ID NO:59之HVR-L2；及(c)包括胺基酸序列SEQ ID NO:12之HVR-L3，或該抗體包含(a)包括胺基酸序列SEQ ID NO:7之HVR-L1；(b)包括胺基酸序列SEQ ID NO:9之HVR-L2；及(c)包括胺基酸序列SEQ ID NO:66之HVR-L3，或該抗體包含(a)包括胺基酸序列SEQ ID NO:7之HVR-L1；(b)包括胺基酸序列SEQ ID NO:9之HVR-L2；及(c)包括胺基酸序列SEQ ID NO:67之HVR-L3，或該抗體包含(a)包括胺基酸序列SEQ ID NO:7之HVR-L1；(b)包括胺基酸序列SEQ ID NO:60之HVR-L2；及(c)包括胺基酸序列SEQ ID NO:67之HVR-L3，或該抗體包含(a)包括胺基酸序列SEQ ID NO:7之HVR-L1；(b)包括胺基酸序列SEQ ID NO:61之HVR-L2；及(c)包括胺基酸序列SEQ ID NO:65之HVR-L3，或該抗體包含(a)包括胺基酸序列SEQ ID NO:7之HVR-L1；(b)包括胺基酸序列SEQ ID NO:59之HVR-L2；及(c)包括胺基酸序列SEQ ID NO:66之HVR-L3，或該

抗體包含(a)包括胺基酸序列SEQ ID NO:7之HVR-L1；(b)包括胺基酸序列SEQ ID NO:62之HVR-L2；及(c)包括胺基酸序列SEQ ID NO:67之HVR-L3，或該抗體包含(a)包括胺基酸序列SEQ ID NO:7之HVR-L1；(b)包括胺基酸序列SEQ ID NO:63之HVR-L2；及(c)包括胺基酸序列SEQ ID NO:12之HVR-L3，或該抗體包含(a)包括胺基酸序列SEQ ID NO:7之HVR-L1；(b)包括胺基酸序列SEQ ID NO:64之HVR-L2；及(c)包括胺基酸序列SEQ ID NO:12之HVR-L3。

在另一態樣中，本發明之抗體包含：(a)VH域，其包含選自以下之至少一個、至少兩個或所有三個VH HVR序列：(i)包含選自SEQ ID NO:22、23、26、28、45、68、71至73或120之胺基酸序列的HVR-H1，(ii)包含選自SEQ ID NO:24、29、46、69、74至78或121之胺基酸序列的HVR-H2，及(iii)包含選自SEQ ID NO:25、30、47、70、79或122之胺基酸序列的HVR-H3；及(b)VL域，其包含選自以下之至少一個、至少兩個或所有三個VL HVR序列：(i)包含選自SEQ ID NO:7、8、17、35或42之胺基酸序列的HVR-L1，(ii)包含選自SEQ ID NO:9、10、18、36至39、41、43、56、58至64或118之胺基酸序列的HVR-L2；及(c)包含選自SEQ ID NO:11至16、19、40、44、57、65至67或119之胺基酸序列的HVR-L3。

在另一態樣中，本發明提供一種抗體，其包含(a)包括胺基酸序列SEQ ID NO:23之HVR-H1；(b)包括胺基酸序列SEQ ID NO:24之HVR-H2；(c)包括胺基酸序列SEQ ID

NO:25之HVR-H3；(d)包括胺基酸序列SEQ ID NO:7之HVR-L1；(e)包括胺基酸序列SEQ ID NO:9之HVR-L2；及(f)包含選自SEQ ID NO:12之胺基酸序列的HVR-L3。

在某些實施例中，該抗體包含至少一個選自HVR-H1、HVR-H2、HVR-H3之序列，其中HVR-H1包含胺基酸序列GFX₃₀FX₃₁X₃₂X₃₃X₃₄IH(SEQ ID NO:45)，其中X₃₀=N或T；X₃₁=S、L或Y；X₃₂=G或Y；X₃₃=Y或S；且X₃₄=A、G或S；其中HVR-H2包含胺基酸序列X₃₅X₃₆ISPX₃₇X₃₈GX₃₉TX₄₀YADSVKG(SEQ ID NO:46)，其中X₃₅=A或G；X₃₆=W或S；X₃₇=A或Y；X₃₈=G或S；X₃₉=S或Y；且X₄₀=D或S；且其中HVR-H3包含序列X₄₁PX₄₂X₄₃X₄₄X₄₅X₄₆X₄₇MDY(SEQ ID NO:47)，其中X₄₁=Q或G；X₄₂=T或F；X₄₃=H或S；X₄₄=Y或P；X₄₅=Y或W；X₄₆=Y或V，且其中X₄₇視情況包括序列YAKGYKA(SEQ ID NO:48)。

在某些實施例中，該抗體包含至少一個選自HVR-H1、HVR-H2及HVR-H3之序列，其中HVR-H1包含胺基酸序列GX₇₁X₇₂X₇₃X₇₄X₇₅X₇₆X₇₇IH(SEQ ID NO:120)，其中X₇₁=F或Y；X₇₂=F、N或T；X₇₃=F或Y；X₇₄=L、Q、I、S或Y；X₇₅=G或Y；X₇₆=Y或S；且X₇₇=A、G或S；HVR-H2包含胺基酸序列X₇₈X₇₉ISPX₈₀X₈₁GX₈₂X₈₃X₈₄YADSVKG(SEQ ID NO:121)，其中X₇₈=A或G；X₇₉=W或S；X₈₀=A、S、Q或Y；X₈₁=G或S；X₈₂=S、K、L或Y；X₈₃=T或Y；且X₈₄=D或S；且HVR-H3包含胺基酸序列X₈₅PX₈₆X₈₇X₈₈X₈₉X₉₀X₉₁MDY(SEQ ID NO:122)，其中X₈₅=Q或G；X₈₆=T或F；X₈₇=H、Y

或 S ; $X_{88}=Y$ 或 P ; $X_{89}=Y$ 或 W ; $X_{90}=Y$ 或 V 且 其中 X_{91} 視 情 況 包 括 序 列 YAKGYKA (SEQ ID NO:48)。

在 某 些 實 施 例 中，該 抗 體 包 含 至 少 一 個 選 自 HVR-L1、HVR-L2、HVR-L3 之 序 列，其 中 HVR-L1 包 含 胺 基 酸 序 列 RASQX₁₇VX₁₈X₁₉X₂₀X₂₁A (SEQ ID NO:42)，其 中 $X_{17}=S$ 、D 或 V ; $X_{18}=S$ 或 A ; $X_{19}=S$ 、T 或 N ; $X_{20}=A$ 或 S ; $X_{21}=V$ 或 L，其 中 HVR-L2 包 含 胺 基 酸 序 列 X₂₂ASX₂₃LYS (SEQ ID NO:43)，其 中 $X_{22}=S$ 、W、Y 或 L ; $X_{23}=F$ 、S 或 W，且 其 中 HVR-L3 包 含 胺 基 酸 序 列 QQX₂₄X₂₅X₂₆X₂₇X₂₈X₂₉T (SEQ ID NO:44)，其 中 $X_{24}=S$ 、F、G、D 或 Y ; $X_{25}=Y$ 、P、S 或 A ; $X_{26}=Y$ 、T 或 N ; $X_{27}=T$ 、Y、D 或 S ; $X_{28}=P$ 或 L ; 且 $X_{29}=F$ 、P 或 T。

在 某 些 實 施 例 中，該 抗 體 包 含 至 少 一 個 選 自 HVR-L1、HVR-L2 及 HVR-L3 之 群 的 序 列，其 中 HVR-L1 包 含 胺 基 酸 序 列 RASQX₁₇VX₁₈X₁₉X₂₀X₂₁A (SEQ ID NO:42)，其 中 $X_{17}=S$ 、D 或 V ; $X_{18}=S$ 或 A ; $X_{19}=S$ 、T 或 N ; $X_{20}=A$ 或 S ; $X_{21}=V$ 或 L，其 中 HVR-L2 包 含 胺 基 酸 序 列 X₆₂ASX₆₃X₆₄YX₆₅ (SEQ ID NO:118)，其 中 $X_{62}=S$ 、W、Y、F 或 L ; $X_{63}=F$ 、S、Y 或 W ; $X_{64}=L$ 或 R ; $X_{65}=S$ 、P、R、K 或 W，且 HVR-L3 包 含 胺 基 酸 序 列 QQX₆₆X₆₇X₆₈X₆₉X₇₀X₇₁T (SEQ ID NO:119)，其 中 $X_{66}=S$ 、F、G、D 或 Y ; $X_{67}=Y$ 、P、S 或 A ; $X_{68}=Y$ 、T 或 N ; $X_{69}=T$ 、Y、D 或 S ; $X_{70}=P$ 、Q、S、K 或 L ; 且 $X_{71}=F$ 、P 或 T。

在 某 些 實 施 例 中，該 抗 體 包 含 至 少 一 個 選 自 HVR-L1、

HVR-L2、HVR-L3之序列，其中HVR-L1包含胺基酸序列RASQX₁VX₂X₃X₄X₅A(SEQ ID NO:17)，其中X₁=D或V；X₂=S或A；X₃=T或N；X₄=S或A；X₅=V或L，其中HVR-L2包含胺基酸序列X₆ASFLYS(SEQ ID NO:18)，其中X₆=S或L，且其中HVR-L3包含胺基酸序列QQX₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂T(SEQ ID NO:19)，其中X₇=S、F、G、D或Y；X₈=Y、P、S或A；X₉=T或N；X₁₀=T、Y、D或S；X₁₁=P或L；X₁₂=P或T。

在某些實施例中，該抗體包含至少一個選自HVR-L1、HVR-L2、HVR-L3之序列，其中HVR-L1包含胺基酸序列RASQX₁VX₂X₃X₄X₅A(SEQ ID NO:17)，其中X₁=D或V；X₂=S或A；X₃=T或N；X₄=S或A；X₅=V或L，其中HVR-L2包含胺基酸序列X₄₈ASX₄₉X₅₀YX₅₁(SEQ ID NO:56)，其中X₄₈=S或F；X₄₉=F或Y；X₅₀=L或R；X₅₁=S、P、R、K或W，其中HVR-L3包含胺基酸序列QQFPTYX₅₂PT(SEQ ID NO:57)，其中X₅₂=L、Q、S或K。

在某些實施例中，該抗體包含至少一個選自HVR-H1、HVR-H2、HVR-H3之序列，其中HVR-H1包含胺基酸序列GFTFX₁₃GYX₁₄IH(SEQ ID NO:26)，其中X₁₃=S或L且X₁₄=A或G，其中HVR-H2包含胺基酸序列GWISPAGGSTDYADSVKG(SEQ ID NO:24)，且其中HVR-H3包含胺基酸序列GPFSPWVMDY(SEQ ID NO:25)。

在某些實施例中，該抗體包含至少一個選自HVR-H1、HVR-H2、HVR-H3之序列，其中HVR-H1包含胺基酸序列

GX₅₃X₅₄X₅₅X₅₆GYGIH(SEQ ID NO:68)，其中X₅₃=F或Y；X₅₄=T或F；X₅₅=F或Y；X₅₆=L、Q或I，其中HVR-H2包含胺基酸序列GWISPX₅₇X₅₈GX₅₉X₆₀DYADSVKG(SEQ ID NO:69)，其中X₅₇=A、S或Q；X₅₈=G或S；X₅₉=S、K或L；X₆₀=T或Y，且其中HVR-H3序列包含胺基酸序列GPFX₆₁PWVMDY(SEQ ID NO:70)，其中X₆₁=S或Y。

在某些實施例中，該抗體包含至少一個選自HVR-L1、HVR-L2、HVR-L3之序列，其中HVR-L1包含胺基酸序列RASQSVSSAVA(SEQ ID NO:35)，其中HVR-L2包含胺基酸序列X₁₅ASX₁₆LYS(SEQ ID NO:41)，其中X₁₅=S、W或Y且X₁₆=S或W，且其中HVR-L3包含胺基酸序列QQYSYSPFT(SEQ ID NO:40)。

在某些實施例中，上文所提供之抗-BACE1抗體之任何一或多個胺基酸在以下HVR位置經取代：

HVR-H1(SEQ ID NO:26)：位置5及8；

HVR-L1(SEQ ID NO:17)：位置5、7、8、9及10；

HVR-L2(SEQ ID NO:18)：位置1或HVR-L2(SEQ ID NO:41)：位置1及4；及

HVR-L3(SEQ ID NO:19)：位置3、4、5、6、7及8。

在某些實施例中，取代為保守取代，如本文所提供。在某些實施例中，可以任何組合進行任何一或多個以下取代：

HVR-H1(SEQ ID NO:26)：位置5處之絲胺酸或白胺酸及位置8處之丙胺酸或甘胺酸；

HVR-L1(SEQ ID NO:17)：位置5處之天冬胺酸或纈胺酸；位置7處之絲胺酸或丙胺酸；位置8處之蘇胺酸或天冬醯胺；位置9處之絲胺酸或丙胺酸；及位置10處之纈胺酸或白胺酸；

HVR-L2(SEQ ID NO:18)：位置1處之絲胺酸或白胺酸或
HVR-L2(SEQ ID NO:41)：位置1處之絲胺酸、酪胺酸或色胺酸或位置4處之酪胺酸、絲胺酸或色胺酸；及

HVR-L3(SEQ ID NO:19)：位置3處之絲胺酸、苯丙胺酸、甘胺酸、天冬胺酸或酪胺酸；位置4處之酪胺酸或脯胺酸，位置5處之絲胺酸、丙胺酸、蘇胺酸或天冬醯胺；位置6處之酪胺酸、蘇胺酸、天冬胺酸或絲胺酸，位置7處之天冬胺酸、絲胺酸、脯胺酸或白胺酸；及位置8處之脯胺酸或蘇胺酸。

在某些實施例中，取代為保守取代，如本文所提供。在某些實施例中，可以任何組合進行任何一或多個以下取代：

HVR-H1(SEQ ID NO:26)：S5L及A8G；

HVR-L1(SEQ ID NO:17)：D5V；S7A；T8N；S9A及V10L；

HVR-L2(SEQ ID NO:18)：S1L，或HVR-L2(SEQ ID NO:41)位置S1W或Y及S4W；及

HVR-L3(SEQ ID NO:19)：位置S3F、G、D或Y1；Y4P、S或A；T5N；T6Y、D或S；P7L及P8T。

在某些實施例中，上文所提供之抗-BACE1抗體之任何

一或多個胺基酸在以下HVR位置經取代：

HVR-H1(SEQ ID NO:120)：位置2、3、5、6、7及8；

HVR-H2(SEQ ID NO:121)：位置1、2、6、7、9、10及11；

HVR-H3(SEQ ID NO:122)：位置1、3、4、5、6、7及8；

HVR-L1(SEQ ID NO:42)：位置5、7、8、9及10；

HVR-L2(SEQ ID NO:118)：位置1、4、5及7；及

HVR-L3(SEQ ID NO:119)：位置3、4、5、6、7及8。

在某些實施例中，取代為保守取代，如本文所提供。

如上文所述之SEQ ID NO:42至47及118至122之共同序列涵蓋以上取代之可能組合。

在任何上述實施例中，抗-BACE1抗體經人類化。在一實施例中，抗-BACE1抗體包含如任一上述實施例中之HVR，且進一步包含接受體人類構架，例如人類免疫球蛋白構架或人類共同構架。在另一實施例中，抗-BACE1抗體包含如任一上述實施例中之HVR，且進一步包含包括SEQ ID NO:1至6、20、21、27、31至34、80至98及99至117之FR1、FR2、FR3或FR4序列的VH或VL。

在另一態樣中，抗-BACE1抗體包含與選自SEQ ID NO:20、21、27及80至98之胺基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的重鏈可變域(VH)序列。在某些實施例中，具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、

96%、97%、98%或99%一致性之VH序列相對於參考序列含有取代(例如保守取代)、插入或缺失，但包含該序列之抗-BACE1抗體保留與BACE1結合及/或抑制或降低BACE1活性的能力。在某些實施例中，SEQ ID NO:20、21、27及80至98中總共1至10個胺基酸已經取代、插入及/或缺失。在某些實施例中，HVR外部區域中(亦即FR中)存在取代、插入或缺失。抗-BACE1抗體視情況包含SEQ ID NO:20、21、27或80至98中之VH序列，包括該序列之轉譯後修飾。在一特定實施例中，VH包含一、二或三個選自以下之HVR：(a)包括胺基酸序列SEQ ID NO:22、23、26、28、45、68、71、72、73或120之HVR-H1，(b)包括胺基酸序列SEQ ID NO:24、29、46、69、74、75、76、77、78或121之HVR-H2，及(c)包括胺基酸序列SEQ ID NO:25、30、47、70、79或122之HVR-H3。

在一態樣中，本發明提供一種抗-BACE1抗體，其包含至少一、二、三、四、五或六個選自以下之HVR：(a)包含圖1(B)、圖2(B)及圖24(A)中之胺基酸序列的HVR-H1；(b)包含圖1(B)、圖2(B)及圖24(B)中之胺基酸序列的HVR-H2；(c)包含圖1(B)、圖2(B)及圖24(C)中之胺基酸序列的HVR-H3；(d)包含圖1(A)、圖2(A)及圖23(A)中之胺基酸序列的HVR-L1；(e)包含圖1(A)、圖2(A)及圖23(B)中之胺基酸序列的HVR-L2；及(f)包含圖1(A)及圖2(A)及圖23(C)中之胺基酸序列的HVR-L3。

在另一態樣中，提供一種抗-BACE1抗體，其中該抗體

包含與選自 SEQ ID NO:1至6、31至34及99至117之胺基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的輕鏈可變域(VL)。在某些實施例中，具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致性之VL序列相對於參考序列含有取代(例如保守取代)、插入或缺失，但包含該序列之抗-BACE1抗體保留與BACE1結合及/或抑制或降低BACE1活性的能力。在某些實施例中，SEQ ID NO:1至6、31至34及99至117中總共1至10個胺基酸已經取代、插入及/或缺失。在某些實施例中，HVR外部區域中(亦即FR中)存在取代、插入或缺失。抗-BACE1抗體視情況包含SEQ ID NO:1至6、31至34或99至117中之VL序列，包括該序列之轉譯後修飾。在一特定實施例中，該VL包含一、二或三個選自以下之HVR：(a)包括胺基酸序列SEQ ID NO:7、8、17、35或42之HVR-L1；(b)包括胺基酸序列SEQ ID NO:9、10、18、36至39、41、43及56、58至64或118之HVR-L2；及(c)包括胺基酸序列SEQ ID NO:11至16、19、40、44、57、65、66、67或119之HVR-L3。

在另一態樣中，提供一種抗-BACE1抗體，其中該抗體包含如上文所提供之任何實施例中之VH及如上文所提供之任何實施例中之VL。在一實施例中，該抗體分別包含SEQ ID NO:21及SEQ ID NO:2中之VH及VL序列，包括該等序列之轉譯後修飾。

在另一態樣中，本發明提供一種抗體，其結合至與本文

所提供之抗-BACE1抗體相同的抗原決定基。例如，在某些實施例中，提供結合至與抗-BACE1抗體相同之抗原決定基的抗體，其包含選自SEQ ID NO:20、21、27及80至98之VH序列及選自SEQ ID NO:1至6、31至34及99至117之VL序列。在某些實施例中，提供結合至與抗-BACE1抗體相同之抗原決定基的抗體，其分別包含SEQ ID NO:21及SEQ ID NO:2中之VH及VL序列。

在某些實施例中，提供結合至BACE1內之抗原決定基的抗體，其包含至少一個、至少兩個、至少三個、至少四個、至少五個、至少六個、至少七個、至少八個、至少九個對應於SEQ ID NO:49之胺基酸314 SER、316 GLU、317 LYS、318 PHE、319 PRO、327 GLN、328 LEU、329 VAL、330 CYS、331 TRP、332 GLN、333 ALA、335 THR、337 PRO、340 ILE、375 THR、378 ASP、380 CYS、426 PHE的胺基酸。

在某些實施例中，提供結合至BACE1內之抗原決定基的抗體，其包含至少一個、至少兩個、至少三個、至少四個、至少五個、至少六個、至少七個、至少八個、至少九個對應於SEQ ID NO:49之胺基酸314 SER、316 GLU、317 LYS、327 GLN、330 CYS、331 TRP、332 GLN、335 THR及378 ASP的胺基酸。在其他實施例中，構形抗原決定基包含對應於SEQ ID NO:49之314 SER、316 GLU、317 LYS、327 GLN、330 CYS、331 TRP、332 GLN、335 THR及378 ASP的胺基酸。應瞭解，BACE1抗原決定基中所鑑

別之胺基酸對應於人類 BACE1 同功異型物 A 之序列。然而，所述 BACE1 構形抗原決定基亦涵蓋 BACE1 之其他變異體及同功異型物中之相應胺基酸，且該抗原決定基可包括除所說明殘基以外的胺基酸。

在某些實施例中，提供結合至 BACE1 內之抗原決定基的抗體，其包含至少一個、至少兩個或至少三個對應於 SEQ ID NO:49 之胺基酸 315 至 318、SEQ ID NO:49 之胺基酸 331 至 335、SEQ ID NO:49 之胺基酸 370 至 381 或其任何組合的 BACE1 胺基酸區。在一實施例中，該抗體結合至包含 SEQ ID NO:49 之胺基酸 315 至 318、331 至 335 及 370 至 381 的 BACE1 抗原決定基。

在另一實施例中，提供結合至 BACE1 內之抗原決定基的抗體，其在結合後在 BACE1 之 P6 及 / 或 P7 位點 (Turner 等人，*Biochemistry* 44:105-112 (2005)) 中相對於未與抗體結合之 BACE1 產生構形變化。在另一實施例中，提供結合至 BACE1 之抗原決定基的抗體，其誘導 BACE1 之 SEQ ID NO:49 之胺基酸 218 至 231 採取隨機環形結構。BACE1 之 SEQ ID NO:49 之胺基酸 218 至 231 以 α -螺旋結構存在於受質結合複合物中。

在另一實施例中，提供結合至如圖 14 及圖 15 中所指示且描述於 BACE1 及抗-BACE1 抗體 YW412.8.31 之晶體結構 (實例 3(B)) 中之 BACE1 內位點的抗體。

在其他實施例中，提供結合至 BACE1 內之外部位點的抗體。在一實施例中，BACE1 內之外部位點為與 Kornacker

等人，*Biochem.* 44:11567-11573 (2005)中所鑑別相同的外部位點。在一實施例中，提供與Kornacker等人，*Biochem.* 44:11567-11573 (2005)中所鑑別之肽(亦即肽1、2、3、1-11、1-10、1-9、1-8、1-7、1-6、2-12、3-12、4-12、5-12、6-12、7-12、8-12、9-12、10-12、4、5、6、5-10、5-9、Y5A、P6A、Y7A、F8A、I9A、P10A及L11A)競爭結合至BACE1的抗體，該文獻係以全文引用的方式併入本文中。

在另一實施例中，提供與本文所述之任何抗-BACE1抗體競爭結合(例如結合至同一抗原決定基)的抗體。

在本發明之另一態樣中，根據任何上述實施例之抗-BACE1抗體為單株抗體，包括嵌合抗體、人類化抗體或人類抗體。在一實施例中，抗-BACE1抗體為抗體片段，例如Fv、Fab、Fab'、scFv、雙功能抗體或F(ab')₂片段。在另一實施例中，該抗體為全長抗體，例如完整IgG1抗體或如本文所定義之其他抗體類別或同型。

在另一態樣中，根據任何上述實施例之抗-BACE1抗體可併有如以下1-7部分中所述之任何特徵(單獨或組合)：

1. 抗體親和力

在某些實施例中，本文所提供之抗體的解離常數(K_d)≤1 μM、≤100 nM、≤10 nM、≤1nM、≤0.1 nM、≤0.01 nM或≤0.001 nM(例如10⁻⁸ M或10⁻⁸ M以下，例如10⁻⁸ M至10⁻¹³ M，例如10⁻⁹ M至10⁻¹³ M)。

在一實施例中，藉由用相關抗體之Fab型式及其抗原按

照以下分析所述進行放射性標記抗原結合分析(RIA)來量測Kd。藉由在未經標記抗原滴定系列存在下使Fab與最小濃度之經(^{125}I)標記抗原平衡，接著用經抗-Fab抗體塗佈之培養盤捕獲結合抗原來量測Fab對抗原之溶液結合親和力(參看例如Chen等人，*J. Mol. Biol.* 293:865-881(1999))。為建立分析條件，用50 mM碳酸鈉(pH 9.6)中之5 $\mu\text{g/ml}$ 捕獲抗-Fab抗體(Cappel Labs)將MICROTITER[®]多孔盤(Thermo Scientific)塗佈隔夜，隨後在室溫(約23°C)下用PBS中之2%(w/v)牛血清白蛋白阻斷2至5小時。在非吸附性培養盤(Nunc #269620)中，將100 pM或26 pM [^{125}I]抗原與相關Fab之連續稀釋液混合(例如與抗VEGF抗體Fab-12之評定相一致，Presta等人，*Cancer Res.* 57:4593-4599 (1997))。接著培育相關Fab隔夜；然而，可繼續培育較長時間(例如約65小時)以確保達到平衡。此後，在室溫下將混合物轉移至捕獲盤中以便培育(例如1小時)。接著移除溶液且用0.1%聚山梨醇酯20(TWEEN-20[®])/PBS將盤洗滌8次。當盤已乾燥時，添加150微升/孔之閃爍劑(MICROSCINT-20TM；Packard)，且在TOPCOUNTTM γ 計數器(Packard)上對盤計數10分鐘。選擇產生小於或等於20%最大結合之各Fab濃度用於競爭性結合分析。

根據另一實施例，使用表面電漿子共振分析，使用BIAcore[®]-2000或BIAcore[®]-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)在25°C下用固定抗原CM5晶片在約10個反應單位(RU)下量測Kd。簡言之，根據供應商說明書，用N-乙基-N'-(3-

二甲基胺基丙基)-碳化二亞胺鹽酸鹽(EDC)及 *N*-羥基丁二醯亞胺(NHS)活化羧甲基化葡聚糖生物感應器晶片(CM5, BIACORE, Inc.)。用 10 mM 乙酸鈉(pH 4.8)將抗原稀釋至 5 $\mu\text{g/ml}$ (約 0.2 μM)，接著以 5 微升/分鐘之流速注射，以獲得約 10 個反應單位(RU)之偶合蛋白。繼注射抗原之後，注射 1 M 乙醇胺以阻斷未反應基團。關於動力學量測，在 25°C 下，以約 25 $\mu\text{l/min}$ 之流速注射含 0.05% 聚山梨醇酯 20 (TWEEN-20TM) 界面活性劑之 PBS(PBST) 中的 Fab 兩倍連續稀釋液(0.78 nM 至 500 nM)。使用簡單的一對一朗繆爾結合模型(one-to-one Langmuir binding model)(BIACORE[®] 評估軟體 3.2 版)，同時擬合締合及解離感測器圖譜來計算締合速率(k_{on})及解離速率(k_{off})。平衡解離常數(K_d)計算為 $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ 比率。參看例如 Chen 等人，*J. Mol. Biol.* 293:865-881 (1999)。若藉由上述表面電漿共振分析測定之締合速率超過 $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ，則可藉由使用螢光淬滅技術來測定締合速率，該技術量測在 25°C 下、在遞增濃度之抗原存在下 PBS(pH 7.2) 中之 20 nM 抗-抗原抗體(Fab 形式)之螢光發射強度的增加或減少(激發=295 nm；發射=340 nm，16 nm 帶通)，如在分光計(諸如配備停流之分光光度計(Aviv Instruments)或具有攪拌比色管之 8000 系列 SLM-AMINCOTM 分光光度計(ThermoSpectronic))中所量測。

2. 抗體片段

在一些實施例中，本文所提供之抗體為抗體片段。抗體片段包括(但不限於)Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv 及

scFv片段及下文所述之其他片段。關於某些抗體片段之綜述，參看Hudson等人，*Nat. Med.* 9:129-134 (2003)。關於scFv片段之綜述，參看例如Pluckthün, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, 113卷，Rosenburg及Moore編；(Springer-Verlag, New York), 269-315頁(1994)；亦參看WO 93/16185及美國專利第5,571,894號及第5,587,458號。關於包含救助受體結合抗原決定基殘基且具有增加之活體內半衰期之Fab及F(ab')₂片段的論述，參看美國專利第5,869,046號。

雙功能抗體為具有兩個抗原結合位點且可為二價或雙特異性之抗體片段。參看例如EP 404,097；WO 1993/01161；Hudson等人，*Nat. Med.* 9:129-134 (2003)；及Hollinger等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993)。三功能抗體及四功能抗體亦描述於Hudson等人，*Nat. Med.* 9:129-134 (2003)中。

單域抗體為包含抗體之所有或一部分重鏈可變域或所有或一部分輕鏈可變域的抗體片段。在某些實施例中，單域抗體為人類單域抗體(Domantis, Inc., Waltham, MA；參看例如美國專利第6,248,516 B1號)。

可藉由各種技術製造抗體片段，包括(但不限於)如本文所述之蛋白水解消化完整抗體以及藉由重組宿主細胞(例如大腸桿菌或噬菌體)產生。

3. 嵌合抗體及人類化抗體

在某些實施例中，本文所提供之抗體為嵌合抗體。某些

嵌合抗體描述於例如美國專利第4,816,567號及Morrison等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)中。在一個實例中，嵌合抗體包含非人類可變區(例如來源於小鼠、大鼠、倉鼠、兔子或非人類靈長類動物(諸如猴子)之可變區)及人類恆定區。在另一實例中，嵌合抗體為「類別切換」抗體，其中類別或亞類已變化而不同於親本抗體之類別或亞類。嵌合抗體包括其抗原結合片段。

在某些實施例中，嵌合抗體為人類化抗體。通常，非人類抗體經人類化以降低對人類之免疫原性，同時保留親本非人類抗體之特異性及親和力。一般而言，人類化抗體包含一或多個可變域，其中HVR，例如CDR，(或其部分)來源於非人類抗體且FR(或其部分)來源於人類抗體序列。人類化抗體視情況亦將包含人類恆定區之至少一部分。在一些實施例中，人類化抗體中之一些FR殘基經來自非人類抗體(例如獲得HVR殘基之抗體)之相應殘基取代，例如用於修復或改良抗體特異性或親和力。

人類化抗體及其製造方法綜述於例如Almagro及Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)中，且進一步描述於例如以下文獻中：Riechmann等人，*Nature* 332:323-329 (1988)；Queen等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989)；美國專利第5,821,337號、第7,527,791號、第6,982,321號及第7,087,409號；Kashmiri等人，*Methods* 36:25-34 (2005)(描述SDR(a-CDR)接枝)；Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991)(描述「表面重整

(resurfacing) 」)；Dall'Acqua 等人，*Methods* 36:43-60 (2005)(描述「FR改組」)；及 Osbourn 等人，*Methods* 36:61-68 (2005)；及 Klimka 等人，*Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000)(描述FR改組之「定向選擇」法)。

可用於人類化之人類架構區包括(但不限於)：使用「最佳擬合」法選擇之架構區(參看例如 Sims 等人，*J. Immunol.* 151:2296 (1993))；來源於輕鏈或重鏈可變區特定子組之人類抗體共同序列的架構區(參看例如 Carter 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992)；及 Presta 等人，*J. Immunol.*, 151:2623 (1993))；人類成熟(體細胞突變)架構區或人類生殖系架構區(參看例如 Almagro 及 Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008))；及由篩選FR文庫獲得之架構區(參看例如 Baca 等人，*J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997)；及 Rosok 等人，*J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996))。

4. 人類抗體

在某些實施例中，本文所提供之抗體為人類抗體。人類抗體可使用此項技術中已知的各種技術製造。人類抗體一般描述於 van Dijk 及 van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 368-74 (2001)及 Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008)中。

可藉由向經改良轉殖基因動物投與免疫原以回應於抗原攻擊而產生完整人類抗體或具有人類可變區之完整抗體來製備人類抗體。該等動物通常含有所有或一部分人類免疫

球蛋白基因座，該等人類免疫球蛋白基因座置換內源性免疫球蛋白基因座或存在於染色體外或隨機整合於動物染色體中。在該等轉殖基因小鼠中，內源性免疫球蛋白基因座一般不活化。關於由轉殖基因動物獲得人類抗體之方法的綜述，參看Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125 (2005)。亦參看例如描述 XENOMOUSE™ 技術之美國專利第 6,075,181 號及第 6,150,584 號；描述 HUMAB® 技術之美國專利第 5,770,429 號；描述 K-M MOUSE® 技術之美國專利第 7,041,87 號；及描述 VELOCIMOUSE® 技術之美國專利申請公開案第 US 2007/0061900 號。來自該等動物所產生之完整抗體的人類可變區可經進一步修飾，例如與不同人類恆定區組合。

人類抗體亦可藉由基於融合瘤之方法製造。已描述用於產生人類單株抗體之人類骨髓瘤及小鼠-人類異源骨髓瘤細胞株。(參看例如 Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984)；Brodeur 等人，*Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, 51-63 頁 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)；及 Boerner 等人，*J. Immunol.*, 147: 86 (1991)。)經由人類 B 細胞融合瘤技術產生之人類抗體亦描述於 Li 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006) 中。其他方法包括例如以下文獻中所述之方法：美國專利第 7,189,826 號(描述由融合瘤細胞株產生單株人類 IgM 抗體)；及 Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26 (4):265-268 (2006)(描述人類-人類融合瘤)。人類融合瘤技術(三瘤體

(Trioma)技術)亦描述於以下文獻中：Vollmers及Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005)；及 Vollmers 及 Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005)。

亦可藉由分離選自來源於人類之噬菌體呈現文庫之Fv純系可變域序列來產生人類抗體。接著可將該等可變域序列與所要人類恆定域組合。下文描述自抗體文庫中選擇人類抗體之技術。

5. 來源於文庫之抗體

可藉由篩選組合文庫中具有所要活性之抗體來分離本發明之抗體。舉例而言，此項技術中已知多種方法可用於產生噬菌體呈現文庫及篩選該等文庫中具有所要結合特徵之抗體。該等方法綜述於例如Hoogenboom等人，*Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien等人編，Human Press, Totowa, NJ, 2001)中，且進一步描述於例如以下文獻中：McCafferty等人，*Nature* 348:552-554；Clackson等人，*Nature* 352: 624-628 (1991)；Marks等人，*J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992)；Marks及Bradbury, *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo編., Human Press, Totowa, NJ, 2003)；Sidhu等人，*J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004)；Lee等人，*J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004)；Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004)；及Lee等人，*J. Immunol. Methods*

284(1-2): 119-132(2004)。

在某些噬菌體呈現方法中，藉由聚合酶鏈式反應(PCR)獨立地選殖VH及VL基因譜系且在噬菌體文庫中隨機重組，接著可如Winter等人，*Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994)中所述篩選抗原結合噬菌體。噬菌體通常將抗體片段呈現為單鏈Fv(scFv)片段或Fab片段。來自免疫來源之文庫不需構築融合瘤即可提供免疫原之高親和力抗體。或者，可選殖天然譜系(例如來自人類)，以便在不進行任何免疫的情況下提供針對多種非自身抗原以及自身抗原的單一抗體來源，如Griffiths等人，*EMBO J*, 12: 725-734 (1993)所述。最後，亦可藉由自幹細胞選殖未重排V基因區段且使用含有隨機序列之PCR引子編碼高度可變CDR3區且實現活體外重排來合成製造天然文庫，如Hoogenboom及Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992)所述。描述人類抗體噬菌體文庫之專利公開案包括例如：美國專利第5,750,373號及美國專利公開案第2005/0079574號、第2005/0119455號、第2005/0266000號、第2007/0117126號、第2007/0160598號、第2007/0237764號、第2007/0292936號及第2009/0002360號。

自人類抗體文庫分離之抗體或抗體片段在本文中被視為人類抗體或人類抗體片段。

6. 多特異性抗體

在某些實施例中，本文所提供之抗體為多特異性抗體，例如雙特異性抗體。多特異性抗體為對至少兩個不同位點

具有結合特異性的單株抗體。在某些實施例中，結合特異性之一係針對BACE1，而另一者係針對任何其他抗原。在某些實施例中，雙特異性抗體可結合至BACE1之兩個不同抗原決定基。雙特異性抗體亦可用於將細胞毒性劑定位於表現BACE1之細胞。雙特異性抗體可製備為全長抗體或抗體片段。

製造多特異性抗體之技術包括(但不限於)重組共表現兩個具有不同特異性之免疫球蛋白重鏈-輕鏈對(參看Milstein及Cuello, *Nature* 305: 537 (1983)、WO 93/08829及Traunecker等人, *EMBO J.* 10: 3655 (1991)); 及「杵入白(knob-in-hole)」工程改造(參看例如美國專利第5,731,168號)。多特異性抗體亦可藉由以下技術製造: 工程改造靜電控制效應以製造抗體Fc異源二聚體分子(WO 2009/089004A1); 交聯兩個或兩個以上抗體或片段(參看例如美國專利第4,676,980號及Brennan等人, *Science*, 229: 81 (1985)); 使用白胺酸拉鏈產生雙特異性抗體(參看例如Kostelny等人, *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992)); 使用「雙功能抗體」技術製造雙特異性抗體片段(參看例如Hollinger等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)); 及使用單鏈Fv(sFv)二聚物(參看例如Gruber等人, *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)); 及製備三特異性抗體, 例如, 如Tutt等人*J. Immunol.* 147: 60 (1991)中所述。

本文亦包括具有3個或3個以上功能性抗原結合位點之工程改造抗體, 包括「章魚狀抗體(Octopus antibody)」(參

看例如 US 2006/0025576A1)。

本文之抗體或片段亦包括包含結合至 BACE1 以及另一不同抗原之抗原結合位點的「雙作用 FAb」或「DAF」(參看例如 US 2008/0069820)。

7. 抗體變異體

在某些實施例中，涵蓋本文所提供之抗體的胺基酸序列變異體。舉例而言，可能需要改良抗體之結合親和力及/或其他生物學特性。抗體之胺基酸序列變異體可藉由在編碼抗體之核苷酸序列中引入適當修飾或藉由肽合成來製備。該等修飾包括例如抗體胺基酸序列內之殘基缺失及/或插入及/或取代。進行缺失、插入及取代之任何組合以獲得最終構築體，其限制條件為該最終構築體具有所要特徵，例如抗原結合。

a) 取代、插入及缺失變異體

在某些實施例中，提供具有一或多個胺基酸取代之抗體變異體。相關取代突變誘發位點包括 HVR 及 FR。保守取代示於表 1 中標題「保守取代」下。更多實質變化提供於表 1 中標題「例示性取代」下，且如下文參考胺基酸側鏈類別進一步描述。可在相關抗體中引入胺基酸取代，且篩選具有所要活性(例如保留/改良抗原結合、降低免疫原性或改良 ADCC 或 CDC)之產物。

表 1

原始殘基	例示性取代	較佳取代
Ala(A)	Val ; Leu ; Ile	Val
Arg(R)	Lys ; Gln ; Asn	Lys
Asn(N)	Gln ; His ; Asp, Lys ; Arg	Gln
Asp(D)	Glu ; Asn	Glu
Cys(C)	Ser ; Ala	Ser
Gln(Q)	Asn ; Glu	Asn
Glu(E)	Asp ; Gln	Asp
Gly(G)	Ala	Ala
His(H)	Asn ; Gln ; Lys ; Arg	Arg
Ile(I)	Leu ; Val ; Met ; Ala ; Phe ; 正白胺酸	Leu
Leu(L)	正白胺酸 ; Ile ; Val ; Met ; Ala ; Phe	Ile
Lys(K)	Arg ; Gln ; Asn	Arg
Met(M)	Leu ; Phe ; Ile	Leu
Phe(F)	Trp ; Leu ; Val ; Ile ; Ala ; Tyr	Tyr
Pro(P)	Ala	Ala
Ser(S)	Thr	Thr
Thr(T)	Val ; Ser	Ser
Trp(W)	Tyr ; Phe	Tyr
Tyr(Y)	Trp ; Phe ; Thr ; Ser	Phe
Val(V)	Ile ; Leu ; Met ; Phe ; Ala ; 正白胺酸	Leu

胺基酸可根據常見側鏈性質分組：

- (1)疏水性：正白胺酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；
- (2)中性親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；
- (3)酸性：Asp、Glu；
- (4)鹼性：His、Lys、Arg；
- (5)影響鏈定向之殘基：Gly、Pro；
- (6)芳族：Trp、Tyr、Phe。

非保守取代將需要將此等類別之一之成員換成另一類別。

一種類型之取代變異體涉及取代親本抗體(例如人化抗體或人類抗體)之一或多個高變區殘基。一般而言，經選擇用於進一步研究之所得變異體的某些生物性質相對於親本抗體將得以改變(例如改良)(例如親和力增加、免疫原性降低)，及/或實質上將保留親本抗體之某些生物特性。例示性取代變異體為親和力成熟抗體，其宜使用例如基於噬菌體呈現之親和力成熟技術產生，諸如本文所述。簡而言之，使一或多個HVR殘基突變，且將變異抗體呈現於噬菌體上，並針對特定生物活性(例如結合親和力)進行篩選。

可改變(例如取代)HVR以例如改良抗體親和力。可在HVR「熱點」及/或SDR(a-CDR)中進行該等改變，熱點亦即由在體細胞成熟過程中以高頻率發生突變的密碼子所編碼之殘基(參看例如 Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008))，測試所得變異VH或VL之結合親和力。藉由構築二次文庫及自二次文庫中再選擇之親和力成熟已描述於例如 Hoogenboom等人，*Methods in Molecular Biology* 178:1-37中(O'Brien等人編，Human Press, Totowa, NJ, (2001)。)在親和力成熟之一些實施例中，藉由多種方法(例如易出錯PCR、鏈改組或寡核苷酸定向突變誘發)中之任一者在選擇以供成熟之可變基因中引入多樣性。接著建立二次文庫。接著篩選該文庫以鑑別具有所要親和力的任何抗體變異體。用於引入多樣性之另一方法涉及HVR定

向法，其中將若干個HVR殘基(例如一次4至6個殘基)隨機化。例如，可使用丙胺酸掃描突變誘發或建模來特異性鑑別涉及抗原結合之HVR殘基。詳言之，通常靶向CDR-H3及CDR-L3。

在某些實施例中，取代、插入或缺失可在一或多個HVR內發生，只要該等變化不實質上降低抗體結合抗原之能力即可。例如，可在HVR中進行不實質上降低結合親和力之保守改變(例如，如本文所提供之保守取代)。該等改變可在HVR「熱點」或SDR外。在上文所提供之變異VH及VL序列之某些實施例中，各HVR未經改變，或不含超過一、二或三個胺基酸取代。

一種適用於鑑別可作為突變誘發之標靶的抗體殘基或區域之方法稱作「丙胺酸掃描突變誘發」，如Cunningham及Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085所述。在此方法中，鑑別殘基或標靶殘基群組(例如帶電殘基，諸如Arg、Asp、His、Lys及Glu)且用中性或帶負電胺基酸(例如丙胺酸或聚丙胺酸)置換來確定抗體與抗原之相互作用是否受影響。可在該等胺基酸位置引入其他取代來證明初始取代之功能敏感性。或者或此外，分析抗原-抗體複合物之晶體結構以鑑別抗體與抗原之接觸點。該等接觸殘基及相鄰殘基可作為取代候選者加以靶向或消除。可篩選變異體以確定其是否含有所要特性。

胺基酸序列插入物包括長度在一個殘基至含有一百個或更多殘基之多肽範圍內之胺基及/或羧基末端融合體，以

及具有單個或多個胺基酸殘基之序列內插入物。末端插入物之實例包括具有N末端甲硫胺醯基殘基之抗體。抗體分子之其他插入變異體包括抗體之N末端或C末端與酶(例如，對於ADEPT而言)或可增加抗體之血清半衰期之多肽的融合物。

b) 糖基化變異體

在某些實施例中，本文所提供之抗體經改變以增加或降低抗體糖基化程度。向抗體添加糖基化位點或缺失糖基化位點宜藉由改變胺基酸序列以產生或移除一或多個糖基化位點來實現。

在抗體包含Fc區的情況下，可改變與其連接之碳水化合物。哺乳動物細胞所產生之天然抗體通常包含一般由N鍵連接至Fc區CH2域之Asn297的分支雙觸角寡糖。參看例如Wright等人，*TIBTECH* 15:26-32 (1997)。寡糖可包括各種碳水化合物，例如甘露糖、N-乙醯基葡糖胺(GlcNAc)、半乳糖及唾液酸，以及海藻糖，其連接至雙觸角寡糖結構「主幹」中之GlcNAc。在一些實施例中，可對本發明抗體中之寡糖進行修飾以便形成具有在一定程度上得以改良之特性的抗體變異體。

在一實施例中，提供具有缺乏連接(直接或間接)至Fc區之海藻糖之碳水化合物結構的抗體變異體。例如，該抗體中海藻糖之量可為1%至80%、1%至65%、5%至65%或20%至40%。海藻糖之量係藉由相對於連接至Asn 297之所有糖結構(例如複合甘露糖結構、混合甘露糖結構及高甘露糖

結構)之總和計算糖鏈內 Asn297處海藻糖之平均量來確定，如藉由MALDI-TOF質譜所量測，例如，如WO 2008/077546中所述。Asn297係指位於Fc區之約297位(Fc區殘基之Eu編號)處之天冬醯胺殘基；然而，Asn297亦可因抗體中之微小序列變異而位於297位上游或下游約 ± 3 個胺基酸處，亦即在294位至300位。該等海藻糖基化變異體可具有改良之ADCC功能。參看例如美國專利公開案第US 2003/0157108號(Presta, L.)；第US 2004/0093621號(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd)。關於「脫海藻糖基化」或「海藻糖缺失」抗體變異體之公開案的實例包括：US 2003/0157108；WO 2000/61739；WO 2001/29246；US 2003/0115614；US 2002/0164328；US 2004/0093621；US 2004/0132140；US 2004/0110704；US 2004/0110282；US 2004/0109865；WO 2003/085119；WO 2003/084570；WO 2005/035586；WO 2005/035778；WO 2005/053742；WO 2002/031140；Okazaki等人，*J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004)；Yamane-Ohnuki等人，*Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004)。能夠產生脫海藻糖基化抗體之細胞株的實例包括缺乏蛋白質海藻糖基化之Lec13 CHO細胞(Ripka等人，*Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986)；美國專利申請案第US 2003/0157108 A1號(Presta, L)；及WO 2004/056312 A1(Adams等人)，尤其實例11)及基因剔除細胞株，諸如 α -1,6-海藻糖基轉移酶基因、*FUT8*、基因剔除CHO細胞(參看例如Yamane-Ohnuki等人，*Biotech. Bioeng.*

87: 614 (2004); Kanda, Y.等人, *Biotechnol. Bioeng.*, 94 (4): 680-688 (2006); 及 WO 2003/085107)。

進一步提供具有平分型寡糖之抗體變異體，例如，其中連接至抗體Fc區之雙觸角寡糖係由GlcNAc平分。該等抗體變異體可具有降低之海藻糖基化及/或改良之ADCC功能。該等抗體變異體之實例描述於例如 WO 2003/011878 (Jean-Mairet等人)、美國專利第6,602,684號(Umana等人)及US 2005/0123546(Umana等人)中。亦提供在連接至Fc區之寡糖中具有至少一個半乳糖殘基之抗體變異體。該等抗體變異體可具有改良之CDC功能。該等抗體變異體描述於例如 WO 1997/30087(Patel等人)、WO 1998/58964(Raju, S.)及WO 1999/22764(Raju, S.)中。

c) Fc區變異體

在某些實施例中，可在本文所提供之抗體的Fc區中引入一或多個胺基酸修飾，從而產生Fc區變異體。Fc區變異體可包含在一或多個胺基酸位置包含胺基酸修飾(例如取代)的人類Fc區序列(例如人類IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc區)。

在某些實施例中，本發明涵蓋具有一些而不是所有效應功能的抗體變異體，由此使該抗體變異體成為許多應用之理想候選物，在該等應用中，活體內抗體半衰期非常重要，而某些效應功能(諸如補體及ADCC)則為非必需或有害的。可進行活體外及/或活體內細胞毒性分析以確認CDC及/或ADCC活性之降低/衰竭。舉例而言，可進行Fc受

體(FcR)結合分析，以確保抗體缺乏FcγR結合能力(從而可能缺乏ADCC活性)，但保留FcRn結合能力。介導ADCC之初級細胞、NK細胞僅表現FcγRIII，而單核細胞表現FcγRI、FcγRII及FcγRIII。FcR在造血細胞上之表現彙總於Ravetch及Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991)第464頁之表3中。用於評定相關分子之ADCC活性的活體外分析之非限制性實例描述於以下文獻中：美國專利第5,500,362號(參看例如Hellstrom, I.等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986))及Hellstrom, I等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985)；美國專利第5,821,337號(參看Bruggemann, M.等人，*J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987))。或者，可使用非放射性分析法(參看例如流動式細胞測量術之ACTI™非放射性細胞毒性分析(CellTechnology, Inc. Mountain View, CA)；及CytoTox 96®非放射性細胞毒性分析(Promega, Madison, WI))。適用於該等分析之效應細胞包括周邊血液單核細胞(PBMC)及天然殺手(NK)細胞。或者或另外，例如可在動物模型(諸如Clynes等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998)中所揭示之動物模型)中於活體內評定相關分子之ADCC活性。亦可進行C1q結合分析以確認抗體無法與C1q結合且因此缺乏CDC活性。參看例如WO 2006/029879及WO 2005/100402中之C1q及C3c結合ELISA。為評定補體活化，可進行CDC分析(參看例如Gazzano-Santoro等人，*J. Immunol. Methods* 202:163 (1996)；Cragg, M.S.等人，

Blood 101:1045-1052 (2003) ; 及 Cragg, M.S. 及 M.J. Glennie, *Blood* 103:2738-2743 (2004))。亦可使用此項技術中已知的方法進行FcRn結合及活體內清除/半衰期測定(參看例如 Petkova, S.B. 等人, *Intl. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006))。

具有降低之效應功能的抗體包括Fc區殘基238、265、269、270、297、327及329中之一或多者經取代之抗體(美國專利第6,737,056號)。該等Fc突變體包括胺基酸位置265、269、270、297及327中兩者或兩者以上經取代之Fc突變體, 包括殘基265及297被丙胺酸取代之所謂「DANA」Fc突變體(美國專利第7,332,581號)。

描述與FcR之結合得以改良或削弱的某些抗體變異體。(參看例如美國專利第6,737,056號; WO 2004/056312; 及 Shields等人, *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001)。)

在某些實施例中, 抗體變異體包含具有一或多個改良ADCC之胺基酸取代, 例如Fc區位置298、333及/或334(殘基之Eu編號)處之取代的Fc區。

在一些實施例中, 在Fc區中進行導致C1q結合及/或互補依賴性細胞毒性(CDC)改變(亦即改良或削弱)之改變, 例如, 如美國專利第6,194,551號、WO 99/51642及 Idusogie 等人, *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000)中所述。

半衰期增加且與新生兒Fc受體(FcRn)之結合得以改良之抗體描述於US 2005/0014934A1 (Hinton等人)中, 新生兒Fc受體負責將母體IgG轉移至胎兒(Guyer等人, *J.*

Immunol. 117:587 (1976)及Kim等人, *J. Immunol.* 24:249 (1994))。此等抗體包含具有一或多個改良Fc區與FcRn之結合之取代的Fc區。該等Fc變異體包括在以下Fc區殘基中之一或多者處具有取代的變異體：238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424或434，例如取代Fc區殘基434(美國專利第7,371,826號)。

關於Fc區變異體之其他實例，亦參看Duncan & Winter, *Nature* 322:738-40 (1988)；美國專利第5,648,260號；美國專利第5,624,821號；及WO94/29351。

d) 半胱胺酸工程改造抗體變異體

在某些實施例中，可能需要產生半胱胺酸工程改造抗體，例如"thioMAb"，其中一或多個抗體殘基經半胱胺酸殘基取代。在特定實施例中，經取代之殘基存在於抗體之可達位點處。藉由用半胱胺酸取代該等殘基，從而使反應性硫醇基定位於抗體之可達位點且可用於結合抗體與其他部分，諸如藥物部分或連接子-藥物部分以產生免疫結合物，如本文中另外描述。在某些實施例中，以下殘基中之任何一或多者可經半胱胺酸取代：輕鏈之V205(Kabat編號)；重鏈之A118(EU編號)；及重鏈Fc區之S400(EU編號)。例如，可如美國專利第7,521,541號中所述產生半胱胺酸工程改造抗體。

e) 抗體衍生物

在某些實施例中，本文所提供之抗體可經進一步修飾以

含有此項技術中已知且易於獲得之其他非蛋白部分。適用於抗體衍生化之部分包括(但不限於)水溶性聚合物。水溶性聚合物之非限制性實例包括(但不限於)聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇共聚物、羧甲基纖維素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯啉酮、聚-1,3-二氧戊環、聚-1,3,6-三噁烷、乙烯/順丁烯二酸酐共聚物、聚胺基酸(均聚物或隨機共聚物)及葡聚糖或聚(N-乙烯吡咯啉酮)聚乙二醇、丙二醇均聚物、聚氧化丙烯/氧化乙烯共聚物、聚氧乙烯多元醇(例如甘油)、聚乙烯醇及其混合物。聚乙二醇丙醛可因其於水中之穩定性而具有製造優勢。聚合物可具有任何分子量，且可具支鏈或不具支鏈。連接至抗體之聚合物數目可變化，且若連接一種以上聚合物，則該等聚合物可為相同或不同分子。一般而言，用於衍生化之聚合物的數目及/或類型可基於包括(但不限於)待改良抗體之特定特性或功能，抗體衍生物是否將用於指定病狀之療法等考慮來確定。

在另一實施例中，提供抗體與可藉由曝露於輻射來選擇性加熱之非蛋白部分的結合物。在一實施例中，非蛋白部分為奈米碳管(Kam等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 11600-11605 (2005))。此輻射可具有任一波長，且包括(但不限於)不損傷普通細胞但可將非蛋白部分加熱至可殺死抗體-非蛋白部分近側細胞之溫度的波長。

B. 重組法及組合物

舉例而言，可使用如美國專利第4,816,567號中所述之重

組法及組合物來產生抗體。在一實施例中，提供編碼本文所述之抗-BACE1抗體的分離之核酸。該核酸可編碼包含抗體之VL的胺基酸序列及/或包含抗體之VH的胺基酸序列(例如抗體之輕鏈及/或重鏈)。在另一實施例中，提供包含該核酸之一或多種載體(例如表現載體)。在另一實施例中，提供包含該核酸之宿主細胞。在一個此種實施例中，宿主細胞包含(例如經轉型而具有)：(1)包含編碼包含抗體VL之胺基酸序列及包含抗體VH之胺基酸序列之核酸的載體，或(2)包含編碼包含抗體VL之胺基酸序列之核酸的第一載體及包含編碼包含抗體VH之胺基酸序列之核酸的第二載體。在一實施例中，宿主細胞為真核細胞，例如中國倉鼠卵巢(CHO)細胞或淋巴細胞(例如Y0、NS0、Sp20細胞)。在一實施例中，提供製造抗-BACE1抗體之方法，其中該方法包含在適合表現該抗體之條件下培養如上文所提供之包含編碼該抗體之核酸的宿主細胞及視情況自該宿主細胞(或宿主細胞培養基)回收該抗體。

為重組產生抗-BACE1抗體，例如分離如上文所述之編碼抗體之核酸，並插入一或多種載體中以供在宿主細胞中進一步選殖及/或表現。可使用習知程序(例如藉由使用能夠特異性結合至編碼抗體重鏈及輕鏈之基因的寡核苷酸探針)容易地分離該核酸並測序。

適用於選殖或表現抗體編碼載體之宿主細胞包括本文所述之原核細胞及真核細胞。例如，可在細菌中產生抗體，尤其是當不需要糖基化作用及Fc效應功能時。關於在細菌

中表現抗體片段及多肽，參看例如美國專利第5,648,237號、第5,789,199號及第5,840,523號。(亦參看描述在大腸桿菌中表現抗體片段之 Charlton, *Methods in Molecular Biology*, 248卷(B.K.C. Lo編, Humana Press, Totowa, NJ, 2003), 245-254頁。)表現後，可自可溶性部分中之細菌細胞糊狀物中分離抗體且可進一步純化。

除原核生物以外，真核微生物(諸如絲狀真菌或酵母)亦適合選殖或表現用於抗體編碼載體之宿主，包括糖基化路徑已經人類化之真菌及酵母菌株，以便產生具有部分或完全人類糖基化模式之抗體。參看 Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004)，及Li等人，*Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006)。

適合表現糖基化抗體之宿主細胞亦來源於多細胞生物體(無脊椎動物及脊椎動物)。無脊椎動物細胞之實例包括植物及昆蟲細胞。已鑑別許多可與昆蟲細胞聯合使用之桿狀病毒菌株，尤其是用於轉染草地黏蟲細胞。

亦可利用植物細胞培養物作為宿主。參看例如美國專利第5,959,177號、第6,040,498號、第6,420,548號、第7,125,978號及第6,417,429號(描述在轉殖基因植物中產生抗體的 PLANTIBODIES™ 技術)。

脊椎動物細胞亦可用作宿主。例如，可使用適合於懸浮液中生長之哺乳動物細胞株。適用哺乳動物宿主細胞株之其他實例為由SV40轉型之猴腎CV1細胞株(COS-7)；人胚腎細胞株(293或293細胞，例如，如Graham等人，*J. Gen*

Virol. 36:59 (1977)中所述)；幼倉鼠腎細胞(BHK)；小鼠賽托利細胞(TM4細胞，例如，如 Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)中所述)；猴腎細胞(CV1)；非洲綠猴腎細胞(VERO-76)；人類宮頸癌細胞(HELA)；犬科動物腎細胞(MDCK)；布法羅(buffalo)大鼠肝細胞(BRL 3A)；人類肺細胞(W138)；人類肝細胞(Hep G2)；小鼠乳腺腫瘤(MMT 060562)；TRI細胞，例如，如 Mather等人，*Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)中所述；MRC 5細胞；及FS4細胞。其他適用哺乳動物宿主細胞株包括中國倉鼠卵巢(CHO)細胞，包括DHFR⁻ CHO細胞(Urlaub等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980))；及骨髓瘤細胞株，諸如Y0、NS0及Sp2/0。關於適於產生抗體之某些哺乳動物宿主細胞株的評述，參看例如Yazaki及Wu, *Methods in Molecular Biology*，248卷(B.K.C. Lo編，Humana Press, Totowa, NJ, 2003)，255-268頁(2003)。

C. 分析

可藉由此項技術中已知的各種分析來鑑別、篩選或表徵本文所提供之抗-BACE1抗體的物理/化學特性及/或生物活性。

1. 結合分析法及其他分析法

在一態樣中，例如藉由已知方法(諸如ELISA、西方墨點法(Western blot)等)測試本發明抗體之抗原結合活性。

在另一態樣中，可使用競爭分析來鑑別與本文所述之任何抗體或Fab(例如YW412.8、YW412.8.31、YW412.8.30、

YW412.8.2、YW412.8.29、YW412.8.51、Fab12、LC6、LC9、LC10)競爭結合至BACE1的抗體。在某些實施例中，該競爭抗體結合至與本文所述之任何抗體或Fab(例如YW412.8、YW412.8.31、YW412.8.30、YW412.8.2、YW412.8.29、YW412.8.51、Fab12、LC6、LC9、LC10)所結合者相同的抗原決定基(例如線性或構形抗原決定基)。定位抗體所結合之抗原決定基的詳細例示性方法提供於Morris (1996) 「Epitope Mapping Protocols」, *Methods in Molecular Biology*, 66卷(Humana Press, Totowa, NJ)中。

在一例示性競爭分析中，在包含可結合至BACE1之第一標記抗體(例如YW412.8、YW412.8.31、YW412.8.30、YW412.8.2、YW412.8.29、YW412.8.51、Fab12、LC6、LC9、LC10)及第二未標記抗體(將測試其與該第一抗體競爭結合至BACE1之能力)的溶液中培育經固定之BACE1。第二抗體可存在於融合瘤上清液中。作為對照，在包含第一標記抗體而不含第二未標記抗體之溶液中培育經固定之BACE1。在允許第一抗體與BACE1結合之條件下培育後，移除過量未結合抗體，且量測與經固定之BACE1締合之標記的量。若測試樣品中與經固定之BACE1締合之標記的量相對於對照樣品實質上減少，則指示第二抗體與第一抗體競爭結合至BACE1。參看Harlow及Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* 第14章 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)。

2. 活性分析法

在一態樣中，提供鑑別其具有生物活性之抗-BACE1抗體之分析。生物活性可包括例如抑制或降低BACE1天冬胺醯基蛋白酶活性；或抑制或減少BACE1之APP裂解；或抑制或降低A β 產量。亦提供在活體內及/或活體外具有該生物活性之抗體。

在某些實施例中，測試本發明抗體之該生物活性。例如，可使用合成受質肽如實例1及實例2(B)中所述用均質時差式螢光HTRF分析或微流毛細管電泳(MCE)分析測試BACE1蛋白酶活性

簡而言之，可使用均質時差式螢光(HTRF)分析，借助於類澱粉前驅蛋白BACE1裂解位點肽來量測BACE1天冬胺醯基蛋白酶活性。例如，在384孔培養盤(Proxiplate™, Perkin-Elmer)中，將Bi27肽(生物素-KTEEISEVNLD AEFRHDSGYEVHHQKL(SEQ ID NO:53), American Peptide Company))與BACE1組合，在BACE反應緩衝液(50 mM乙酸鈉 pH 4.4及0.1% CHAPS)中與抗-BACE抗體一起預培育。在環境溫度下培育蛋白水解反應混合物75分鐘，且藉由添加於偵測緩衝液(200 mM Tris pH 8.0、20 mM EDTA、0.1% BSA及0.8 M KF)中含有2 nM抗生蛋白鏈菌素D2及150 nM經銷穴狀化合物標記之抗類澱粉 β 抗體的5 μ L HTRF偵測混合物將其淬滅。在環境溫度下培育最終反應混合物60分鐘，且使用EnVision Multilabel Plate Reader™(Perkin-Elmer)以320 nm之激發波長以及615 nm及665 nm之發射波長量測TR-FRET信號。

用藉由向酶及4×化合物中添加受質(其中含有人類BACE1(細胞外域)、類澱粉前驅蛋白 β 分泌酶活性位點肽(FAM-KTEEISEVNLDAEFRWKK-CONH₂(SEQ ID NO:55))、50 mM NaOAc pH 4.4及0.1% CHAPS)起始之標準酶反應進行MCE分析反應。在環境溫度下培育60分鐘後，使用12吸管微流體晶片(Caliper Life Sciences)分離各反應之產物及受質，在LC3000®(Caliper Life Sciences)上進行分析。藉由使用製造商之優化軟體選擇電壓及壓力來優化產物與受質之分離。根據電泳圖譜使用HTS Well Analyzer軟體(Caliper Life Sciences)計算受質轉化率。

此外，可在表現BACE1受質(諸如APP)之細胞株或表現BACE1受質(諸如人類APP)之轉殖基因小鼠中如實例2(C)及實例4中所述活體內測試BACE1蛋白酶活性。

此外，可在動物模型中用抗-BACE1抗體測試BACE1蛋白酶活性。例如，各種神經疾病及病症之動物模型及研究與此等模型相關之病理過程的相關技術在此項技術中可容易地獲得。各種神經病症之動物模型包括非重組及重組(轉殖基因)動物。非重組動物模型包括例如齧齒動物，例如鼠類模型。可藉由使用例如皮下注射、尾靜脈注射、脾臟植入、腹膜內植入及腎包膜下植入之標準技術將細胞引入同基因型小鼠中來產生該等模型。活體內模型包括中風/腦缺血模型、活體內神經退化性疾病模型，諸如小鼠帕金森氏病模型；小鼠阿茲海默氏病模型；小鼠肌萎縮性側索硬化症模型；小鼠脊髓性肌萎縮模型；小鼠/大鼠局

灶性缺血腦模型及全腦缺血模型，例如頸總動脈閉塞或大腦中動脈閉塞模型；或離體全胚胎培養物。作為一非限制性實例，存在許多此項技術中已知的小鼠阿茲海默氏病模型（參看例如 Rakover 等人，*Neurodegener. Dis.* (2007); 4(5): 392-402；Mouri 等人，*FASEB J.* (2007) 7月; 21 (9): 2135-48；Minkeviciene 等人，*J. Pharmacol. Exp. Ther.* (2004) 11月；311 (2): 677-82；及 Yuede 等人，*Behav Pharmacol.* (2007) 9月；18 (5-6): 347-63)。可用已知活體外或活體內分析格式如此項技術中已知且如文獻中所述進行各種分析。各種該等動物模型亦可獲自商業供應商，諸如 Jackson Laboratory。其他動物模型分析描述於實例 4 及實例 5 中。

D. 免疫結合物

本發明亦提供免疫結合物，其包含與一或多種細胞毒性劑（諸如化學治療劑或藥物、生長抑制劑、毒素（例如蛋白質毒素、細菌、真菌、植物或動物來源之酶活性毒素、或其片段）或放射性同位素）結合的本文之抗-BACE1 抗體。

在一實施例中，免疫結合物為抗體-藥物結合物(ADC)，其中抗體結合至一或多種藥物，包括（但不限於）類美登素(maytansinoid)(參看美國專利第 5,208,020 號、第 5,416,064 號及歐洲專利 EP 0 425 235 B1)；阿瑞他汀(auristatin)，諸如單甲基阿瑞他汀藥物部分 DE 及 DF(MMAE 及 MMAF)(參看美國專利第 5,635,483 號及第 5,780,588 號及第 7,498,298 號)；海兔毒素；卡奇黴素(calicheamicin)或其衍生物(參看

美國專利第 5,712,374 號、第 5,714,586 號、第 5,739,116 號、第 5,767,285 號、第 5,770,701 號、第 5,770,710 號、第 5,773,001 號及第 5,877,296 號；Hinman 等人，*Cancer Res.* 53:3336-3342 (1993)；及 Lode 等人，*Cancer Res.* 58:2925-2928 (1998))；蒽環黴素，諸如道諾黴素(daunomycin)或小紅莓(參看 Kratz 等人，*Current Med. Chem.* 13:477-523 (2006)；Jeffrey 等人，*Bioorganic & Med. Chem. Letters* 16:358-362 (2006)；Torgov 等人，*Bioconj. Chem.* 16:717-721 (2005)；Nagy 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:829-834 (2000)；Dubowchik 等人，*Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12:1529-1532 (2002)；King 等人，*J. Med. Chem.* 45:4336-4343 (2002)；及美國專利第 6,630,579 號)；甲胺喋呤(methotrexate)；長春地辛(vindesine)；紫杉烷(taxane)，諸如歐洲紫杉醇(docetaxel)、太平洋紫杉醇(paclitaxel)、拉羅他賽(larotaxel)、替司他賽(tesetaxel)及歐塔他賽(ortataxel)；新月毒素(trichothecene)；及 CC1065。

在另一實施例中，免疫結合物包含與酶活性毒素或其片段結合之如本文所述之抗體，包括(但不限於)白喉 A 鏈、白喉毒素之未結合活性片段、外毒素 A 鏈(得自綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒素 A 鏈、相思豆毒素 A 鏈、莫迪素 A 鏈、 α -帚麴菌素、油桐(*Aleurites fordii*)蛋白、康乃馨(dianthin)蛋白、美洲商陸(*Phytolaca americana*)蛋白(PAPI、PAPII 及 PAP-S)、苦瓜(*Momordica charantia*)抑制劑、麻瘋樹毒素(curcin)、巴豆毒素

(crotonin)、肥皂草(saponaire officinalis)抑制劑、天堂果毒素(gelonin)、有絲分裂素、侷限麴菌素(restrictocin)、酚黴素(phenomycin)、伊諾黴素(enomycin)及黴菌毒素(tricothecenes)。

在另一實施例中，免疫結合物包含與放射性原子結合以形成放射結合物的如本文所述之抗體。可使用多種放射性同位素產生放射結合物。實例包括 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 及 Lu 之放射性同位素。當使用放射結合物進行偵測時，其可包含用於閃爍攝影研究之放射性原子，例如 tc99m 或 I123 ；或用於核磁共振(NMR)成像(亦稱為磁共振成像，mri)之自旋標記，諸如再次碘-123、碘-131、銩-111、氟-19、碳-13、氮-15、氧-17、鋁、錳或鐵。

抗體與細胞毒性劑之結合物可使用多種雙功能蛋白偶合劑製得，該等蛋白偶合劑諸如 3-(2-吡啶基二硫基)丙酸 N-丁二醯亞胺酯(SPDP)、4-(N-馬來醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸丁二醯亞胺酯(SMCC)、亞胺基硫雜環戊烷(IT)、醯亞胺酯之雙功能衍生物(諸如二亞胺代己二酸二甲酯鹽酸鹽)、活性酯(諸如辛二酸二丁二醯亞胺酯)、醛類(諸如戊二醛)、雙-疊氮基化合物(諸如雙-(對疊氮基苯甲醯基)己二胺)、雙-重氮鹽衍生物(諸如雙-(對重氮苯甲醯基)-乙二胺)、二異氰酸酯(諸如甲苯 2,6-二異氰酸酯)及雙活性氟化合物(諸如 1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。舉例而言，蓖麻毒素免疫毒素可如 Vitetta 等人，*Science*, 238:1098 (1987) 中所

述來製備。碳14標記之1-異硫氰基苯甲基-3-甲基二伸乙三胺五乙酸(MX-DTPA)為一種用於使放射性核苷酸與抗體結合之例示性螯合劑。參看WO94/11026。連接子可為有助於在細胞中釋放細胞毒性藥物之「可裂解連接子」。舉例而言，可使用酸不穩定連接子、肽酶敏感性連接子、光不穩定連接子、二甲基連接子或含二硫鍵之連接子(Chari等人，*Cancer Res.* 52:127-131 (1992)；美國專利第5,208,020號)。

本文之免疫結合物或ADC明確地涵蓋但不限於用交聯試劑製備之該等結合物，該等交聯試劑包括(但不限於)BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、磺基-EMCS、磺基-GMBS、磺基-KMUS、磺基-MBS、磺基-SIAB、磺基-SMCC及磺基-SMPB及SVSB((4-乙烯基磺)苯甲酸丁二醯亞胺酯)且可購自市面(例如購自Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A)。

E. 用於診斷及偵測之方法與組合物

在某些實施例中，本文所提供之任何抗-BACE1抗體均適用於偵測生物樣品中存在之BACE1。如本文所用之術語「偵測」涵蓋定量或定性偵測。在某些實施例中，生物樣品包含細胞或組織，諸如血清、血漿、唾液、胃分泌液、黏液、腦脊髓液、淋巴液、神經元組織、腦組織、心臟組織或血管組織。

在一實施例中，提供用於診斷或偵測方法之抗-BACE1

抗體。在另一態樣中，提供偵測生物樣品中存在之BACE1的方法。在某些實施例中，該方法包含使該生物樣品與如本文所述之抗-BACE1抗體在允許該抗-BACE1抗體與BACE1結合的條件下接觸，及偵測該抗-BACE1抗體與BACE1之間是否形成複合物。該方法可為活體外或活體內方法。在一實施例中，使用抗-BACE1抗體選擇適合抗-BACE1抗體療法之個體，例如在BACE1為用於選擇患者之生物標記的情況下。

可使用本發明抗體診斷之例示性病變包括神經退化性疾病(包括(但不限於)路易體病、脊髓灰質炎後症候群、夏伊-德雷格症候群、橄欖體腦橋小腦萎縮、帕金森氏病、多系統萎縮症、紋狀體黑質變性、澱蛋白病變(包括(但不限於)阿茲海默氏病及核上麻痺)、朊病毒疾病(包括(但不限於)牛海綿狀腦病、綿羊癢病、庫賈氏症候群、庫魯症、格斯特曼-斯脫司勒-史茵格氏病、慢性消耗性疾病及致死性家族失眠症)、中風、肌肉萎縮症、多發性硬化症、肌萎縮性側索硬化症(ALS)、安格曼氏症候群、利德爾氏症候群、柏哲德氏症候群、創傷性腦損傷、延髓性麻痺、運動神經元病及神經系統混合型退化病症(包括(但不限於)卡納萬病、亨廷頓氏病、神經元蠟樣脂褐質沈積症、亞歷山大氏病、妥瑞氏症候群、門克氏捲髮症候群、科凱恩症候群、哈-斯二氏症候群、拉福拉病、雷特氏症候群、肝豆狀核變性、萊施-奈恩症候群及翁韋里希特-倫德伯格症候群)、癡呆症(包括(但不限於)皮克氏病及脊髓

小腦失調)。

在某些實施例中，提供經標記抗-BACE1抗體。標記包括(但不限於)可直接偵測之標記或部分(諸如螢光標記、發色標記、電子緻密標記、化學發光標記及放射性標記)，以及例如經由酶反應或分子間相互作用間接偵測之部分(諸如酶或配體)。例示性標記包括(但不限於)放射性同位素 ^{32}P 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 及 ^{131}I ；螢光團，諸如稀土螯合物或螢光素(fluorescein)及其衍生物；若丹明(rhodamine)及其衍生物；丹蘊基(dansyl)；傘酮(umbelliferone)；螢光素酶，例如螢火蟲螢光素酶及細菌螢光素酶(美國專利第4,737,456號)；螢光素(luciferin)；2,3-二氫酞嗪二酮；辣根過氧化酶(HRP)；鹼性磷酸酶； β -半乳糖苷酶；葡糖澱粉酶；溶菌酶；醣氧化酶，例如葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶及葡萄糖-6-磷酸脫氫酶；雜環氧化酶，諸如尿酸酶及黃嘌呤氧化酶，以及採用過氧化氫來氧化染料前驅物之酶(諸如HRP、乳過氧化酶或微過氧化酶)；生物素/抗生物素蛋白；自旋標記；噬菌體標記；穩定自由基；及其類似物。

F. 醫藥調配物

如本文所述之抗-BACE1抗體之醫藥調配物係藉由混合具有所要純度之該抗體與一或多種視情況選用之醫藥學上可接受之載劑(*Remington's Pharmaceutical Sciences*第16版，Osol, A.編(1980))而製備成凍乾調配物或水溶液形式。醫藥學上可接受之載劑一般在所採用劑量及濃度下對

接受者無毒，且包括(但不限於)：緩衝劑，諸如磷酸鹽、檸檬酸鹽及其他有機酸；抗氧化劑，包括抗壞血酸及甲硫胺酸；防腐劑(諸如十八烷基二甲基苯甲基氯化銨；氯化六羥季銨；氯化苯甲烴銨；苜索氯銨；苯酚、丁醇或苯甲醇；對羥基苯甲酸烷基酯，諸如對羥苯甲酸甲酯或對羥苯甲酸丙酯；兒茶酚；間苯二酚；環己醇；3-戊醇；及間甲酚)；低分子量(少於約10個殘基)多肽；蛋白質，諸如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水性聚合物，諸如聚乙烯吡咯酮；胺基酸，諸如甘胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺、組胺酸、精胺酸或離胺酸；單醣、二醣及其他碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合劑，諸如EDTA；糖，諸如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇；成鹽相對離子，諸如鈉；金屬錯合物(例如鋅-蛋白質錯合物)；及/或非離子型界面活性劑，諸如聚乙二醇(PEG)。本文中之例示性醫藥學上可接受之載劑進一步包括間質性藥物分散劑，諸如可溶性中性活性玻尿酸酶醣蛋白(sHASEGP)，例如人類可溶 PH-20 玻尿酸酶醣蛋白，諸如 rHuPH20 (HYLENEX[®]，Baxter International, Inc.)。某些例示性 sHASEGP 及使用方法(包括 rHuPH20)描述於美國專利公開案第 2005/0260186 號及第 2006/0104968 號中。在一態樣中，sHASEGP 與一或多種其他葡萄糖胺聚糖酶(諸如硫酸軟骨素酶)組合。

例示性凍乾抗體調配物描述於美國專利第 6,267,958 號中。水性抗體調配物包括美國專利第 6,171,586 號及 WO

2006/044908中所述者，後者調配物包括組胺酸-乙酸鹽緩衝劑。

本文中之調配物亦可含有一種以上所治療之特定適應症所必需之活性成分，較佳為具有不會對彼此產生不利影響之互補活性的活性成分。該等活性成分適當地以對預定目的有效之量存在於組合中。

亦可例如藉由凝聚技術或藉由界面聚合將活性成分截留於所製備之微膠囊中，例如羥甲基纖維素或明膠微膠囊及聚-(甲基丙烯酸甲酯)微膠囊分別截留於膠狀藥物遞送系統(例如微脂粒、白蛋白微球體、微乳液、奈米粒子及奈米膠囊)或巨乳液中。該等技術揭示於 *Remington's Pharmaceutical Sciences* 第16版，Osol, A.編(1980)中。

可製備持續釋放製劑。持續釋放製劑之適合實例包括含有抗體之固體疏水性聚合物的半透性基質，該等基質呈成形物品(例如薄膜或微膠囊)形式。

用於活體內投藥之調配物一般為滅菌的。可藉由例如經由滅菌過濾膜過濾容易地實現滅菌。

G. 治療方法與組合物

本文所提供之任何抗-BACE1抗體均可用於治療方法。

在一個態樣中，提供用作藥物之抗-BACE1抗體。在另一態樣中，提供用於治療神經疾病或病症(例如AD)之抗-BACE1抗體。在某些實施例中，提供用於治療方法之抗-BACE1抗體。在某些實施例中，本發明提供用於治療患有神經疾病或病症之個體之方法的抗-BACE1抗體，該方法

包含投與該個體有效量之抗-BACE1抗體。在一個此種實施例中，該方法進一步包含投與該個體有效量之至少一種其他治療劑。在其他實施例中，本發明提供用於減少或抑制有罹患神經疾病或病症(例如AD)風險或罹患神經疾病或病症之患者中的類澱粉斑塊形成的抗BACE1抗體。在某些實施例中，本發明提供用於減少或抑制個體中之A β 產生之方法的抗-BACE1抗體，該方法包含投與該個體有效量之抗-BACE1抗體。根據任何上述實施例之「個體」較佳為人類。在某些態樣中，用於本發明方法之抗-BACE抗體降低或抑制BACE1活性。例如，抗-BACE1抗體降低或抑制BACE1裂解APP之能力。

在另一態樣中，本發明提供抗-BACE1抗體用於製造或製備藥物之用途。在一個實施例中，該藥物係用於治療神經疾病或病症。在另一實施例中，該藥物係用於治療神經疾病或病症之方法，該方法包含投與患有神經疾病或病症之個體有效量之藥物。在一個此種實施例中，該方法進一步包含投與該個體有效量之至少一種其他治療劑，例如，如下文所述。在另一實施例中，該藥物係用於抑制BACE1活性。在另一實施例中，該藥物係用於抑制個體中之A β 產生或斑塊形成之方法，該方法包含投與該個體可有效抑制A β 產生或斑塊形成之量的藥物。根據任何上述實施例之「個體」可為人類。

在另一態樣中，本發明提供治療阿茲海默氏病之方法。在一實施例中，該方法包含投與患有AD之個體有效量之

抗-BACE1抗體。在一個此種實施例中，該方法進一步包含投與該個別有效量之至少一種其他治療劑。根據任何上述實施例之「個體」可為人類。

在另一態樣中，本發明提供包含本文所提供之任何抗BACE1抗體之醫藥調配物，其係用於例如任何上述治療方法。在一個實施例中，醫藥調配物包含本文所提供之任何抗-BACE1抗體及醫藥學上可接受之載劑。在另一實施例中，醫藥調配物包含本文所提供之任何抗BACE1抗體及至少一種其他治療劑，例如，如下文所述。

本發明抗體可單獨或與其他藥劑組合用於療法中。舉例而言，本發明抗體可與至少一種其他治療劑共同投藥。

上述該等組合療法涵蓋組合投藥(其中兩種或兩種以上治療劑包括在同一或獨立調配物中)，及獨立投藥，在此情況下可在投與其他治療劑及/或佐劑之前、同時及/或之後投與本發明抗體。本發明抗體亦可與放射療法組合使用。

本發明抗體(及任何其他治療劑)可藉由任何適合方式投與，包括非經腸、肺內及鼻內，及需要用於局部治療時之病灶內投藥。非經腸輸注包括肌肉內、靜脈內、動脈內、腹膜內或皮下投藥。部分視投藥為短期或是長期而定，可藉由任何適合途徑(例如藉由注射，諸如靜脈內或皮下注射)給藥。本文涵蓋各種給藥時程，包括(但不限於)單次投藥或隨不同時間點多次投藥、推注投藥及脈衝輸注。

本發明之某些實施例提供穿過血腦屏障之抗體或其片

段。某些神經退化性疾病與血腦屏障滲透性增加相關，從而抗體或其活性片段可容易地引入腦中。當血腦障壁保持完整時，存在幾種此項技術中已知的輸送分子穿越血腦障壁之方法，包括(但不限於)物理方法、基於脂質之方法以及基於受體及通道之方法。

輸送抗體或其片段穿越血腦屏障之物理方法包括(但不限於)完全繞過血腦屏障或在血腦屏障中形成開口。繞過方法包括(但不限於)直接注入腦中(參看例如 Papanastassiou 等人，*Gene Therapy* 9: 398-406 (2002))及在腦中植入遞送裝置(參看例如 Gill 等人，*Nature Med.* 9: 589-595 (2003)；及 Gliadel Wafers™, Guildford Pharmaceutical)。在屏障中形成開口之方法包括(但不限於)超音波法(參看例如美國專利公開案第 2002/0038086 號)、滲透壓法(例如，藉由投與高張性甘露糖醇(Neuwelt, E. A., **Implication of the Blood-Brain Barrier and its Manipulation**，第 1 及 2 卷，Plenum Press, N.Y. (1989))、藉由例如緩激肽或滲透劑 A-7 之滲透法(參看例如美國專利第 5,112,596 號、第 5,268,164 號、第 5,506,206 號及第 5,686,416 號)，以及用含有編碼抗體或其片段之基因的載體轉染跨立於血腦障壁的神經元(參看例如美國專利公開案第 2003/0083299 號)。

基於脂質之輸送抗體或其片段跨越血腦屏障之方法包括(但不限於)將抗體或其片段囊封於與結合至血腦屏障之血管內皮上之受體的抗體結合片段偶合之微脂粒中(參看例

如美國專利申請公開案第20020025313號)及將抗體或其活性片段塗佈於低密度脂蛋白粒子(參看例如美國專利申請公開案第20040204354號)或載脂蛋白E(參看例如美國專利申請公開案第20040131692號)中。

以與良好醫療實務一致之方式調配、給藥及投與本發明抗體。在此情況下考慮之因素包括所治療之特定病症、所治療之特定哺乳動物、個別患者之臨床病狀、病症之病因、藥劑遞送位點、投藥方法、投藥時程及醫學從業者已知的其他因素。抗體無需但可視情況與一或多種當前用於預防或治療所述病症之藥劑一起調配。該等其他藥劑之有效量視調配物中所存在之抗體量、病症或治療類型及上文所論述之其他因素而定。此等藥劑通常以與本文所述相同之劑量且利用如本文所述之投藥途徑使用，或以本文所述劑量之約1%至99%使用，或以任意劑量且憑經驗/臨床上確定為適當的任何途徑使用。

為預防或治療疾病，本發明抗體之適當劑量(當單獨或與一或多種其他額外治療劑組合使用時)將視待治療之疾病類型、抗體類型、疾病嚴重度及病程、投與抗體是用於預防目的或是治療目的、先前療法、患者臨床病史及對抗體之反應以及主治醫師之判斷而定。抗體適合一次性或經一系列治療投與至患者。視疾病類型及嚴重程度而定，投與患者之抗體初始候選劑量可為約1 $\mu\text{g/kg}$ 至15 mg/kg (例如，0.1 mg/kg 至10 mg/kg)，無論是藉由例如一或多次分開投藥，或是藉由連續輸注投藥。一種典型日劑量可在約

1 $\mu\text{g/kg}$ 至100 mg/kg 或100 mg/kg 以上範圍內，視上文所提及之因素而定。對於經數天或更長時間之重複投藥，視病狀而定，治療一般將持續至對疾病症狀產生所要抑制為止。一個例示性抗體劑量將在約0.05 mg/kg 至約10 mg/kg 範圍內。因此，可將約0.5 mg/kg 、2.0 mg/kg 、4.0 mg/kg 或10 mg/kg 之一或多個劑量(或其任何組合)投與患者。該等劑量可間歇地投與，例如，每週或每三週(例如，以使患者接受約二至約二十或例如約六次劑量之抗體)。最初可投與較高負載劑量，接著可投與一或多個較低劑量。然而，可使用其他給藥方案。此療法之進程容易由習知技術及分析加以監測。

應理解，任何上述調配物或治療方法均可使用本發明之免疫結合物替代抗-BACE1抗體或除抗-BACE1抗體外亦使用本發明之免疫結合物來進行。

H. 製品

在本發明之另一態樣中，提供一種含有可用於治療、預防及/或診斷上述病症之物質的製品。該製品包含容器及於該容器上或伴隨該容器之標籤或包裝插頁。適合容器包括例如瓶子、小瓶、注射器、IV溶液袋等。該容器可由諸如玻璃或塑膠之各種材料形成。容器容納組合物自身或與有效用於治療、預防及/或診斷病狀之另一組合物組合之組合物，且可具有滅菌存取口(例如容器可為具有可由皮下注射針刺穿之塞子的靜脈內溶液袋或小瓶)。組合物中之至少一種活性劑為本發明抗體。標籤或包裝插頁指示組

合物用於治療所選病狀。此外，該製品可包含(a)含有組合物之第一容器，其中該組合物包含本發明抗體；及(b)含有組合物之第二容器，其中該組合物包含另一細胞毒性劑或其他治療劑。本發明實施例中之製品可進一步包含包裝插頁，該包裝插頁指示組合物可用於治療特定病狀。或者或另外，該製品可進一步包含第二(或第三)容器，其包含醫藥學上可接受之緩衝液，諸如注射用抑菌水(BWFI)、磷酸鹽緩衝生理鹽水、林格氏溶液(Ringer's solution)及葡萄糖溶液。其可進一步包括根據商業及使用者觀點所需之其他物質，包括其他緩衝劑、稀釋劑、過濾器、針及注射器。

應理解，任何上述製品均可包括本發明之免疫結合物替代抗-BACE1抗體或除抗-BACE1抗體外亦包括本發明之免疫結合物。

III. 實例

以下為本發明方法及組合物之實例。應理解，鑒於上文提供之一般描述，可實施各種其他實施例。

實例1：產生及表徵抗-BACE1抗體

藉由淘選針對人類BACE1細胞外域SEQ ID NO:49之胺基酸1至457的兩種不同類型之噬菌體呈現抗體文庫(一種具有天然多樣性(VH及VH/VL)，另一種在人工侷限於特定胺基酸組之某些CDR區中具有多樣性(YSGX))來產生特異性結合至BACE1之抗體。

A. 用於鑑別抗BACE-1抗體之天然多樣性文庫淘選及篩選

選擇噬菌體呈現之抗-BACE1純系

使用經生物素標記之人類BACE-1(SEQ ID NO:49之1至457)作為抗原用於文庫淘選。針對預捕獲於交替中性鏈親和素/抗生蛋白鏈菌素培養盤上之經生物素標記之BACE-1對天然多樣性噬菌體文庫進行5輪淘選。對於第一輪淘選，首先用10 µg/mL中性鏈親和素(Fisher Scientific, #21125)塗佈NUNC 96孔Maxisorp免疫培養盤，且用噬菌體阻斷緩衝液PBST(磷酸鹽緩衝生理鹽水(PBS)及1%(w/v)牛血清白蛋白(BSA)及0.05% (v/v) Tween 20)阻斷隔夜。首先，將10 µg/mL經生物素標記之BACE-1捕獲於免疫培養盤上持續30分鐘。隨後將預先用噬菌體阻斷緩衝液PBST阻斷之抗體噬菌體文庫VH(參看例如Lee等人, *J. Immunol. Meth.* 284:119-132 (2004))及VH/VL(參看Liang等人, *J. Mol. Biol.* 366: 815-829 (2007))添加至培養盤且在室溫下培育隔夜。第二天，用PBT(含0.05% Tween 20之PBS)洗滌培養盤10×，且用1 mL 50 mM HCl及500 mM NaCl溶離已結合之噬菌體30分鐘並用600 µL 1 M Tris鹼(pH 8.0)中和。在大腸桿菌XL-1 Blue細胞中擴增所回收之噬菌體。在隨後之各輪選擇中，首先用含50 µl Dynabeads® MyOne™ 抗生蛋白鏈菌素 T1(Invitrogen, #65601)之PBST/BSA預先吸收所繁殖之噬菌體文庫，並在室溫下培育30分鐘。藉由移除Dynabeads®自噬菌體儲備物中減去與中性鏈親和素結合之噬菌體粒子。接著將未結合噬菌體添加至呈現於抗生蛋白鏈菌素培養盤上之BACE-1抗原中，

並將培育時間減至2至3小時。逐漸增加培養盤洗滌之嚴格度。

5輪淘選後，觀測到顯著富集。由V_H及V_H/V_L文庫淘選挑選出96種純系以確定其是否特異性結合至人類BACE-1。此等純系之可變區經PCR測序以鑑別獨特序列純系。選擇以高於背景至少5×結合人類BACE-1的42種獨特噬菌體抗體，且重組成全長IgG以供在活體外細胞分析中加以評估。

相關純系係藉由將個別純系之V_L及V_H區分別選殖至LPG3及LPG4載體中且短暫表現於哺乳動物CHO細胞中並使用蛋白質A管柱層析法加以純化而重組為IgG。

選擇抗-BACE1抑制純系

BACE1為在其接近細胞表面之跨膜域附近之點處正常裂解類澱粉前驅蛋白的天冬胺醯基蛋白酶。因此，使用均質時差式螢光(HTRF)分析活體外評定上文所鑑別之抗體調變某些BACE1受質上之BACE1蛋白水解活性之能力。

如下進行HTRF分析。例如，在384孔培養盤(Proxiplate™, Perkin-Elmer)中，將2 μL 375 nM Bi27(生物素-KTEEISEVNLDAEFRHDSGYEVHHQKL(SEQ ID NO:53), American Peptide Company；其為帶有用於增加對BACE1裂解之敏感性之取代的類澱粉前驅蛋白質BACE1裂解位點肽)與3 μL 125 nM BACE1組合，在BACE反應緩衝液(50 mM乙酸鈉pH 4.4及0.1% CHAPS)中與抗-BACE抗體一起預培育。在環境溫度下將蛋白水解反應混合物培育75分鐘，

且藉由添加於偵測緩衝液(200 mM Tris pH 8.0、20 mM EDTA、0.1% BSA及0.8 M KF)中含有2 nM抗生蛋白鏈菌素D2及150 nM經銷穴狀化合物標記之6E10抗-類澱粉 β 抗體(Covance, Emoryville, CA)的5 μ L HTRF偵測混合物將其淬滅。在環境溫度下培育最終反應混合物60分鐘，且使用EnVision Multilabel Plate Reader™ (Perkin-Elmer)以320 nm之激發波長以及615 nm及665 nm之發射波長量測TR-FRET信號。使用缺乏BACE1酶(0 BACE)之反應及含有缺乏抗-BACE1抗體之反應(PBS(100% BACE1活性))作為對照。

在自天然多樣性文庫鑑別出之42種測試抗體中，選擇最佳BACE1抑制劑YW412.8用於親和力成熟。參看圖4。

抗-BACE1抑制純系之親和力成熟

如下構築文庫以使YW412.8抗體親和力成熟。噬菌粒pW0703(來源於噬菌粒pV0350-2b(Lee等人, *J. Mol. Biol.* 340, 1073-1093 (2004))，在所有CDR-L3位置含有終止密碼子(TAA)且在M13噬菌體之表面上呈現單價Fab)充當來自天然多樣性文庫之相關純系之接枝重鏈可變域(VH)的文庫模板以供親和力成熟。使用硬隨機化及軟隨機化策略進行親和力成熟。對於硬隨機化，使用經設計以模擬天然人類抗體之胺基酸將一種具有所選擇之3個輕鏈CDR之位置的輕鏈文庫隨機化，且所設計之DNA簡併如Lee等人(*J. Mol. Biol.* 340, 1073-1093 (2004))中所述。對於軟隨機化，靶向CDR-L3之位置91至94及96、CDR-H1之位置28至

31及34至35、CDR-H2之位置50、52及53至58、CDR-H3之位置95至99及100A之殘基；且選擇CDR環之兩種不同組合L3/H1/H2及L3/H3進行隨機化。為達成在所選位置引入約50%突變率之軟隨機化條件，用偏好野生型核苷酸之鹼基的70-10-10-10混合物合成突變DNA(Gallop等人，*J. Med. Chem.* 37:1233-1251 (1994))。

如下選擇親和力改良之Fab。對親和力改良噬菌體文庫進行第一輪培養盤淘選，接著進行4輪或5輪溶液淘選。對於第一輪培養盤淘選，在室溫下於1% BSA及0.05% Tween 20中輸入約2 OD/ml之噬菌體針對由經中性鏈親和素塗佈之培養盤(NUNC Maxisorp培養盤)捕獲之10 µg/ml經生物素標記標靶(BACE1)將文庫淘選2小時。在第一輪培養盤淘選後，進行溶液淘選以增加選擇嚴格度。對於溶液淘選，在室溫下，在含有1% Superblock(Pierce Biotechnology)及0.05% Tween 20之100 µl緩衝液中，將由第一輪培養盤淘選繁殖之1 OD/ml噬菌體與100 nM經生物素標記之標靶蛋白質(濃度係以親本純系噬菌體IC₅₀值計)一起培育30分鐘。用1% Superblock將混合物再稀釋10×，且在室溫下隨輕微震盪以100微升/孔塗覆於經中性鏈親和素塗佈之各孔(5 µg/ml)持續15分鐘以使經生物素標記之標靶結合噬菌體。用PBS及0.05% Tween 20洗滌各孔10次。為測定背景結合，在中性鏈親和素塗佈之培養盤上捕獲含有噬菌體及未經生物素標記之標靶的對照孔。用0.1 N HCl溶離所結合之噬菌體20分鐘，藉由1/10體積之1 M Tris pH 11中和，測

定效價並繁殖以供下一輪。接下來，在增加選擇嚴格度的同時再進行2輪溶液淘選。第一輪為藉由將經生物素標記之標靶蛋白質濃度自100 nM降至5 nM進行之締合速率選擇。第二輪為藉由在室溫下添加過量未經生物素標記之標靶蛋白質(100倍以上)以競爭解離(competite off)較弱結合者而進行之解離速率選擇。此外，降低噬菌體輸入(0.1至0.5 OD/ml)以降低背景噬菌體結合。

由第四輪篩選挑選出群落，且使其在37°C下於含50 µg/ml卡本西林(carbenicillin)及1E10/ml KO7噬菌體之150微升/孔2YT培養基中在96孔培養盤(Falcon)中生長隔夜。自同一培養盤挑選經XL-1感染之親本噬菌體群落作為對照。用於PBS中之100微升/孔中性鏈親和素(2 µg/ml)塗佈96孔Nunc Maxisorp培養盤，在4°C下隔夜或在室溫下持續2小時。用65 µl 1% BSA阻斷培養盤30分鐘，且添加40 µl 1% Tween 20後再持續30分鐘，接著添加經生物素標記之標靶蛋白質(2 µg/ml)並在室溫下培育15分鐘。

將噬菌體上清液1:10稀釋於含或不含10 nM標靶蛋白質之ELISA(酶聯免疫吸附分析)緩衝液(含0.5% BSA、0.05% Tween 20之PBS)中，總體積為100 µl，且在室溫下於F培養盤(NUNC)中培育至少1小時以供用於單點競爭分析。將75 µl含或不含標靶蛋白質之混合物並排轉移至經中性鏈親和素塗佈之培養盤所捕獲之標靶蛋白質。將培養盤輕輕震盪15分鐘以便將未結合之噬菌體捕獲於中性鏈親和素所捕獲之標靶蛋白質。用PBS-0.05%吐溫20洗滌培養盤至少五

次。藉由添加含辣根過氧化酶(HRP)結合抗M13抗體之ELISA緩衝液(1:5000)且在室溫下培育30分鐘定量結合。用PBS-0.05% Tween 20洗滌培養盤至少5次。接著，以每孔100 μ L向孔中添加1:1比率之3,3',5,5'-四甲基聯苯胺(TMB)過氧化酶受質及過氧化酶溶液B(H₂O₂)(Kirkegaard-Perry Laboratories(Gaithersburg, MD))，且在室溫下培育5分鐘。藉由向各孔中添加100 μ l 1 M磷酸(H₃PO₄)並在室溫下培育5分鐘終止反應。在450 nm下使用標準ELISA培養盤讀取器測定各孔中之黃色OD(光密度)。利用以下等式計算OD降低率(%)。

$$\text{OD}_{450\text{nm}} \text{降低}(\%) = [(\text{含競爭劑之孔的OD}_{450\text{nm}}) / (\text{不含競爭劑之孔的OD}_{450\text{nm}})] * 100。$$

與親本噬菌體之孔的OD_{450nm}降低率(%) (100%)相比，挑選對人類與鼠類標靶之OD_{450nm}降低率(%)低於50%的純系用於序列分析。藉由與親本純系相比較來選擇獨特純系製備噬菌體以測定針對標靶之結合親和力(噬菌體IC₅₀)。將親和力改良程度最大之純系重組成人類IgG1以產生抗體，且藉由表面電漿子共振使用BIAcore及其他活體外或活體內分析法進行其他結合動力學分析。

選自天然多樣性噬菌體文庫之YW412.8之輕鏈及重鏈HVR區序列示於圖1(A)及圖1(B)中。此外，亦對獲自YW412.8抗體之親和力成熟的5種抗體進行測序，且輕鏈及重鏈HVR序列亦示於圖1(A)及圖1(B)中。呈現此等抗體之變異性的輕鏈HVR區之共同胺基酸序列為：HVR-L1：

Arg Ala Ser Gln X₁ Val X₂ X₃ X₄ X₅ Ala (SEQ ID NO:17), 其中X₁係選自天冬胺酸及纈胺酸, X₂係選自絲胺酸及丙胺酸, X₃係選自蘇胺酸及天冬醯胺, X₄係選自丙胺酸及絲胺酸, 且X₅係選自纈胺酸及白胺酸; HVR-L2: X₆ Ala Ser Phe Leu Tyr Ser (SEQ ID NO:18), 其中X₆係選自絲胺酸及白胺酸; 及HVR-L3: Gln Gln X₇ X₈ X₉ X₁₀ X₁₁ X₁₂ Thr (SEQ ID NO:19), 其中X₇係選自絲胺酸、苯丙胺酸、甘胺酸、天冬胺酸及酪胺酸, X₈係選自酪胺酸、脯胺酸、絲胺酸及丙胺酸, X₉係選自蘇胺酸及天冬醯胺, X₁₀係選自蘇胺酸、酪胺酸、天冬胺酸及絲胺酸, X₁₁係選自脯胺酸及白胺酸, 且X₁₂係選自脯胺酸及蘇胺酸。在此等抗體中僅重鏈高變區H1呈現變異性, 且該區之共同序列為: HVR-H1: Gly Phe Thr Phe X₁₃ Gly Tyr X₁₄ Ile His(SEQ ID NO:26), 其中X₁₃係選自絲胺酸及白胺酸, 且X₁₄係選自丙胺酸及甘胺酸。

B. 用於鑑別抗BACE-1抗體之合成多樣性文庫淘選及篩選

已構築在互補決定區(CDR)具有有限化學多樣性之極簡合成抗體文庫, 且其顯示可有效獲得針對多種蛋白質之高親和力抗體結合劑, 如先前於Fellouse, F.A.等人, *J. Mol. Biol.* 373: 924-940 (2007)中所述。使用表示為YSGX文庫之合成多樣性文庫藉由溶液淘選搜尋針對BACE1之抑制抗體。如下文所述進行5輪結合淘選。

如先前所述, 使用用於Fab噬菌體呈現之噬菌粒

(pF1359)構築表示為 YSGX 文庫之初始淘選文庫 (Fellouse, F.A. 等人, *J. Mol. Biol.* 373: 924-940 (2007) 中之文庫 D)。文庫之多樣性為約 2×10^{10} 。

關於親和力成熟，針對來源於初始淘選之所選純系，在固定 CDRH 的情況下使所有 3 個 CDRL 隨機化。使用 3 種類型寡核苷酸進行隨機化。類型 I 使用僅編碼 Tyr 及 Ser 之簡併密碼子 TMC。類型 II 使用以等莫耳比含有 Tyr、Ser、Gly 及 Trp 之密碼子的慣用三聚體胺基磷酸酯混合物。類型 III 使用以如下莫耳比編碼 10 個胺基酸殘基之三聚體胺基磷酸酯混合物：Tyr(30%)、Ser(15%)、Gly(15%)、Trp(10%) 及各 5% 之 Phe、Leu、His、Asp、Pro、Ala。在用於 CDR-L3 之寡核苷酸中引入突變以便原始模板上之 *KpnI* 位點在突變誘發後靜默。CDR-L1 之長度偏差為 3 至 10 個胺基酸，CDR-L2 之長度偏差為 7 個胺基酸，且 CDR-L3 之長度偏差為 2 至 10 個胺基酸。將寡核苷酸適當地彙集在一起以製造最終寡核苷酸組，亦即混合一種類型內之所有不同長度之 L1、L2 及 L3 寡核苷酸，接著將所有 3 種類型一起分別混合成 CDR-L1、CDR-L2 及 CDR-L3 之寡核苷酸組。使用 Kunkel 突變誘發來置換所有 CDR-LC 位置。Kunkel 突變誘發 (Kunkel, T.A. 等人, *Methods Enzymol.* 154: 367-382 (1987)) 後，純化 DNA 且在 37°C 下用 *KpnI* 處理 3 小時以消化模板 DNA。接著，對經純化 DNA 進行電穿孔以供文庫構築。

選擇噬菌體呈現之抗-BACE1 純系

使用經生物素標記之人類 BACE-1 (SEQ ID NO:49 之 1 至

457)作為抗原用於文庫分選。關於第一輪淘選，在4℃下將20 µg經生物素標記之BACE1與1 ml文庫一起以 1×10^{13} pfu/ml之濃度培育1.5小時。用200 µl先前已經阻斷緩衝液(PBS, 0.5%(w/v)牛血清白蛋白)阻斷之Dynabeads® MyOne 抗生蛋白鏈菌素捕獲結合至標靶之噬菌體，持續15分鐘。用0.1 M HCl溶離所結合噬菌體且立即用1 M Tris鹼中和。按照如先前所述之標準方案擴增溶離之噬菌體(Sidhu, S.S. 等人, *Methods Enzymol.* 328: 333-363 (2000))。與第一輪相同進行第二輪，使用10 µg經生物素標記之BACE1與400 µl經擴增噬菌體一起培育。對於所有隨後各輪，將2 µg經生物素標記之BACE1與400 µl經擴增噬菌體一起培育。使用先前已經中性鏈親和素或抗生蛋白鏈菌素(在各輪之間交替)塗佈且用阻斷緩衝液阻斷之Maxisorp Immunoplates (NUNC)捕獲結合至經生物素標記BACE1之噬菌體，持續15分鐘。

5輪選擇後，由以96孔格式生長之個別純系產生噬菌體，且將培養物上清液在磷酸鹽緩衝生理鹽水(PBS)、0.5% (w/v)牛血清白蛋白(BSA)(Sigma-Aldrich, St Louis, MO)、0.1% (v/v) Tween 20(Sigma-Aldrich)(PBT緩衝液)中稀釋三倍以供用於噬菌體斑點ELISA。將經稀釋之噬菌體上清液與固定於經中性鏈親和素塗佈之384孔Maxisorp免疫培養盤(NUNC)上的經生物素標記BACE1一起培育1小時。用PBS、0.05% (v/v) Tween 20(PBT緩衝液)洗滌培養盤6次，且與辣根過氧化酶/抗M13抗體結合物(於PBT緩衝液

中之1:5000稀釋液)(GE Healthcare)一起培育30分鐘。用PT緩衝液洗滌培養盤6次且用PBS洗滌2次，用3,3',5,5'-四甲基聯苯胺/ H_2O_2 過氧化酶受質(Kirkegaard-Perry Laboratories)顯影15分鐘，用1.0 M H_3PO_4 淬滅且用分光光度法讀取450 nm下之吸光度。

選擇抗-BACE1抑制純系

淘選YSGX文庫，從而鑑別出結合BACE1的18個獨特純系。參看圖3。如下純化對應於此等純系之Fab蛋白。在編碼Fab之噬菌粒上之重鏈與基因3之間引入終止密碼子。將所得噬菌粒轉型至大腸桿菌株34B8中。在37°C下，在30 ml補充有50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 卡本西林之LB培養基中使單一群落生長隔夜。將隔夜培養物(5 ml)接種至補充有卡本西林(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)之500 ml完全C.R.A.P.培養基中，且在30°C下生長24小時。使用蛋白A瓊脂糖珠粒藉由標準方法純化Fab蛋白。

使用如上文所述之HTRF酶活性分析篩選對BACE1具有抑制活性的經純化Fab。Fab 2、Fab 5、Fab 8、Fab 12、Fab 14及Fab 19鑑別為BACE1抑制劑，且Fab 23鑑別為活化劑。參看圖5。

進一步表徵Fab 2、Fab 5、Fab 8、Fab 12、Fab 14及Fab 19以測定其結合抗原決定基。在如下文所述之噬菌體競爭ELISA中，將所有6種抗體之經純化Fab之組用於與結合至培養盤捕獲之BACE1的個別Fab呈現噬菌體競爭。

挑選所選純系之單一群落(XL1藍色細胞)且在37°C下在補充有50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 卡本西林、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 四環素及M13KO7之1

ml 2YT培養液中生長2小時。向培養物中添加康黴素(Kanamycin)(25 µg/ml)，繼續生長6小時。將培養物轉移至補充有50 µg/ml卡本西林及25 µg/ml康黴素之30 ml 2YT培養液中並在37°C下生長隔夜。如先前所述收集並純化噬菌體(Sidhu, S.S. 等人, *Methods Enzymol.* 328: 333-363 (2000))。在PBT緩衝液中連續稀釋經純化Fab呈現噬菌體且測試與固定於培養盤上之BACE1的結合。選擇提供80%飽和信號之固定噬菌體濃度以供用於隨後之競爭ELISA。藉由培育經固定之亞飽和Fab呈現噬菌體與BACE1之連續稀釋液1小時，接著轉移至BACE1固定培養盤持續15分鐘以捕獲未結合噬菌體來進行競爭。接著洗滌培養盤8次，且藉由抗-M13-HRP偵測所結合噬菌體。

使經純化Fab 5與噬菌體呈現Fab 8及Fab 12競爭結合BACE1，而不是Fab 2、Fab 14及Fab 19。與此數據一致，使經純化Fab 8與噬菌體呈現Fab 5及Fab 12競爭。總之，此等數據指示Fab 5、Fab 8及Fab 12結合至BACE1上之相同或重疊抗原決定基。基於此等經純化Fab中任一者均可與Fab 14及Fab 19呈現噬菌體競爭的事實，Fab 14及Fab 19亦與彼此競爭。由此表明此兩個抗體結合至相同或重疊抗原決定基，該抗原決定基不同於Fab 5、Fab 8及Fab 12之抗原決定基。在噬菌體ELISA分析中，無法藉由任何經純化Fab蛋白(包括Fab 2自身)競爭解離Fab 2呈現噬菌體，表明Fab 2與BACE1之結合不具特異性。因此，排除Fab 2作為親和力成熟候選者。

抗-BACE1抑制純系之親和力成熟

為改良由初始淘選製程所獲得之親本抑制抗體的結合親和力，設計隨機化Fab 5、Fab 8、Fab 12、Fab 14及Fab 19之所有3個CDR-LC的新噬菌體文庫。基於不同抗原決定基將此5種抗體分成兩個子組：Fab 5、Fab 8及Fab 12為第1組，且Fab 14及Fab 19為第2組。純化個別純系之單股DNA(ssDNA)作為模板以供用於文庫構築。將第1組之ssDNA模板彙集在一起供用於親和力成熟文庫1(設計為LC-lib1)，且彙集第2組供用於文庫2(LC-lib2)。基於天然胺基酸之功能能力將化學多樣性限制在隨機化CDR內以供分子識別。參看 Birtalan, S. 等人, *Mol Biosyst.* 6:1186-1194 (2010)。將極簡多樣性(Tyr及Ser二元密碼子)、半極簡多樣性(Tyr、Ser、Gly及Trp三元密碼子)及涉及10種胺基酸之其他多樣性混合以達成高親和力。使用同一組寡核苷酸池構築兩個親和力成熟文庫LC-lib1及LC-lib2以便如上文所述同時隨機化所有3個CDR-LC。關於親和力成熟，針對來源於初始淘選之所選純系，在CDR-HC(互補決定區-重鏈)固定的情況下隨機化所有3個CDR-LC(互補決定區-輕鏈)。

類似於上文所述，篩選最初獲得之抗體之親和力成熟文庫。用經生物素標記之BACE1在溶液中淘選文庫3輪，由此使結合增濃100倍以上。對於第1輪，將2 μ g生物素-BACE1與噬菌體呈現Fab文庫一起培育。對於第2輪及第3輪，分別將20 nM及5 nM經生物素標記之BACE1與經擴增噬菌體一起培育。在一點競爭ELISA中篩選得自兩個文庫

中之每一者的純系(96)，其中如下文所述使用 20 nM BACE1在溶液中與噬菌體粒子競爭結合至培養盤固定之 BACE1。

藉由使用預先在4℃下塗佈 2 $\mu\text{g/ml}$ 中性鏈親和素隔夜且用阻斷緩衝液阻斷之384孔Maxisorp免疫培養盤捕獲 2 $\mu\text{g/ml}$ 經生物素標記之BACE1持續15分鐘來製備經BACE1固定之培養盤。將來自以96孔格式生長之個別純系的培養物上清液在PBT緩衝液中稀釋20倍，且在室溫下，在存在或不存在 20 nM BACE1的情況下培育1小時。將混合物轉移至具有固定BACE1之培養盤並培育15分鐘。用PT緩衝液洗滌培養盤6次，且如上文所述藉由抗-M13-HRP偵測所結合噬菌體。來自溶液中不存在BACE1及存在BACE1之孔的ELISA信號之比率指示純系之親和力，其中比率愈高指示親和力愈高。

LC_lib1中5個純系的來自不存在BACE1之孔的ELISA信號與來自存在BACE1之孔的ELISA信號之比率 >4 ，且LC_lib2中1個純系的比率 >3 。2個純系(表示為LC4及LC11)來源於Fab5；3個純系(LC6、LC9及LC10)來自Fab 12，且LC40來自Fab14(圖6)。

為估計此6個純系之親和力，如上文所述進行噬菌體競爭ELISA，且測定 IC_{50} 值(圖7)。藉由使用Kaleidagraph(Synergy Software)將數據擬合由Marquardt開發之四參數邏輯等式(Marquardt, D. W. *SIAM J. Appl. Math.* 11: 431-441 (1963))來確定 IC_{50} 值，且示於以下表2中。

表 2

Fab ID	IC ₅₀ nM	親和力改良倍數
Fab5*	20.7±9.5	1
LC4	0.46±0.07	45
LC11	0.88±0.14	24
Fab12*	45.3±31	1
LC9	0.12±0.02	378
LC10	0.12±0.01	378
LC6	0.12±0.02	156
Fab14*	14.3±2.5	1
LC40	4.7±0.7	3

*親本

實際上所有LC純系與其各別親本相比均展示改良之親和力。值得注意地，在CDR-L2中引入兩個Trp殘基使Fab 12衍生物之親和力與親本相比改良超過100倍。

純化6個純系之Fab蛋白，並如上文所述進行HTRF酶活性分析。使用BACE1之肽抑制劑OM99-2(CalBiochem®，目錄號496000)作為對照。對於以Fab 5作為親本之抗體，Fab LC4展示顯著改良之抑制，而LC11損失抑制活性。來自Fab14之衍生物LC 40亦損失其抑制活性。Fab 12之親和力改良衍生物Fab LC 6、LC 9及LC10一般展示其抑制活性改良約20倍(圖8)。基於此分析，Fab LC 6為最佳抑制劑，且展示幾乎100%抑制酶活性，而其他Fab為部分抑制劑，抑制程度為約60%至70%(圖8)。各種測試Fab之IC₅₀值如以下表3中所示。此分析中OM99-2之IC₅₀為11 nM。

表 3

Fab ID	IC50(nM)
Fab5*	130
LC4	480
LC11	未測出
Fab12*	未測出
LC9	140
LC10	180
LC6	160
Fab14*	740
LC40	未測出
*親本	

Fab12之輕鏈及重鏈HVR區之序列示於圖2(A)及圖2(B)中。由Fab 12之親和力成熟所產生之3種抗體的輕鏈及重鏈HVR序列亦示於圖2(A)及圖2(B)中。此等抗體中僅輕鏈HVR-L2呈現變異性：HVR-L2：X₁₅ Ala Ser X₁₆ Leu Tyr Ser(SEQ ID NO:41)，其中X₁₅係選自絲胺酸、色胺酸及酪胺酸，且X₁₆係選自絲胺酸及色胺酸。4種抗體中之3個重鏈HVR區中的每一者均一致。

如下將Fab選殖為IgG抗體供用於其他應用。將所選Fab之輕鏈及重鏈可變域選殖至具有人類輕鏈或重鏈(人類IgG1)恆定域之基於pRK5之質體中以供於293T細胞或中國倉鼠卵巢(CHO)細胞中短暫表現IgG。使用蛋白A瓊脂糖珠粒藉由標準方法純化IgG蛋白。

實例2：進一步表徵抗-BACE1抗體

如上文所述，根據功能及BACE1上結合之抗原決定基鑑別抗體。使用下文所述之分析法進一步表徵親本抗體及親

和力成熟抗體。

A. 結合動力學

評定YW412.8.31之結合動力學。簡而言之，藉由表面電漿共振 (SPR) 使用 BIAcore™-3000 儀器來量測抗-BACE1 IgG之結合親和力。藉由塗佈於CM5生物感測器晶片上直至達到約100個反應單位 (RU) 之小鼠抗人類Fc抗體 (GE Healthcare，目錄號BR-1008-39) 來捕獲YW412.8.31抗-BACE1人類IgG。關於動力學量測，在25℃下以30 $\mu\text{l}/\text{min}$ 之流速將人類BACE1 ECD或鼠類BACE1 ECD(胺基酸1至457)之兩倍連續稀釋液(0.98 nM至125 nM)注入PBT緩衝液(含0.05% Tween 20之PBS)中。使用簡單一對一朗繆耳結合模型(BIAcore™評價軟體3.2版)計算締合速率(k_{on})及解離速率(k_{off})。平衡解離常數(K_D)計算為比率 $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ 。在pH 7.0下之YW412.8.31結合結果示於表4中。

表4：如由BIAcore™量測之抗-BACE1抗體之結合動力學值

抗體	BACE1類型	$K_{\text{ON}}(\text{M}^{-1}\text{S}^{-1})$	$K_{\text{OFF}}(\text{S}^{-1})$	$K_D(\text{M})$
YW412.8.31	人類	1.1×10^5	3.1×10^{-4}	2.9×10^{-9}
		1.05×10^5	1.39×10^{-4}	1.32×10^{-9}
YW412.8.31	小鼠	1.4×10^5	2.9×10^{-4}	2.1×10^{-9}
		1.01×10^5	1.41×10^{-4}	1.4×10^{-9}
YW412.8.31	天竺鼠	1.0×10^5	2.7×10^{-4}	2.6×10^{-9}

證明在pH 7.0及pH 5.0下YW412.8.31與BACE1結合。此發現非常重要，因為BACE1在酸性pH值下假定在內吞性小泡及/或反式高爾基網中活性最佳。

B. 活體外抑制分析

此外，使用兩種活性分析法在活體外評定抗體調變BACE1對某些BACE受質之蛋白質分解活性的能力：用BACE1之人類重組細胞外域進行之HTRF分析法及微流體毛細管電泳(MCE)分析法。

在如實例1所述之HTRF分析中測試親和力成熟YW412.8.31抗-BACE1抗體。使用BACE1之合成肽抑制劑OM99-2(CalBiochem®，目錄號496000)、BACE1之小分子抑制劑(β -分泌酶抑制劑IV，CalBiochem®，目錄號5657688)及不結合至BACE1之IgG抗體作為對照。參看圖9(A圖)(長肽)。此外，與HTRF反應一致，亦進行使用短FRET肽(Rh-EVNLD AEFK-淬滅劑(SEQ ID NO:54)，Invitrogen)之反應。如上量測對照反應所產生之螢光產物，但在545 nm之激發波長及585 nm之發射波長下進行。使用GraphPad Prism 5™(LaJolla，CA)分析所獲得之數據。參看圖9(A圖)(短肽)。

在384孔微量培養盤中進行MCE分析反應，每孔中之最終體積為20 μ L。以向5 μ L 4 $\times$ 酶及5 mL 4 $\times$ 化合物中添加10 μ L 2X受質起始標準酶反應，其中含有12 nM人類BACE1細胞外域、1 mM類澱粉前驅蛋白 β 分泌酶活性位點肽(FAM-KTEEISEVNLD AEFRWKK-CONH₂(SEQ ID NO:55))、50 mM NaOAc pH 4.4及0.1% CHAPS。將相同反應條件用於人類BACE2酶(5 nM)之細胞外域及組織蛋白酶D(6 nM，Calbiochem®)之細胞外域。在環境溫度下培育60分鐘後，使用12吸管微流體晶片(Caliper Life Sciences)分離各反應

之產物及受質，在LC3000®(Caliper Life Sciences)上加以分析。藉由使用製造商之優化軟體選擇電壓及壓力來優化產物與受質之分離。獨立緩衝液含有100 mM HEPES pH 7.2、0.015% Brij-35、0.1%塗佈試劑#3、10 mM EDTA及5% DMSO。分離條件使用-500 V之下游電壓、-2250 V之上游電壓及-1.2 psi之篩選壓力。在488 nm波長下激發產物及受質螢光，且在530 nm波長下進行偵測。根據電泳圖譜使用HTS Well Analyzer軟體(Caliper Life Sciences)計算受質轉化率。

使用YW412.8.31抗體進行之HTRF及MCE分析之結果示於圖9中。在長肽分析中，此抗體之 IC_{50} 觀測值為1.7 nM，最大抑制達到77%。此外，YW412.8.31抗體在短肽分析中之 IC_{50} 為17 nM。此外，在微流體毛細管電泳分析中，YW412.8.31抗-BACE1抗體抑制BACE1活性， IC_{50} 為80 pM，而不抑制人類BACE2或組織蛋白酶D(其為溶酶體天冬胺醯基蛋白酶)。YW412.8.31抗體之SPR分析亦證實，該抗體不結合BACE2(其為與BACE1最高度相關之蛋白酶)。此等數據一起指示YW412.8.31抗體為有效而具選擇性之BACE1拮抗劑。進一步表徵此抗體以更透徹地瞭解其功能。

C. 基於細胞之抑制分析

為確定抗-BACE1抗體對APP處理之所觀測活體外抑制作用是否亦存在於細胞情形下，進行活體內研究。如下評定抗體在穩定表現野生型人類類澱粉前驅蛋白之293-HEK細

胞中抑制 $A\beta_{1-40}$ 產生的能力。以 3×10^4 個細胞/孔之密度將 293-APP^{WT} 細胞接種於 96 孔培養盤中隔夜。在 37°C 下將含有抗-BACE1 抗體或對照 IgG1 抗體之 50 μ l 新鮮培養基 (DMEM +10% FBS) 與細胞一起培育 24 小時。亦使用三環小分子 BACE1 抑制劑 (BACE1 SMI) 作為對照 (化合物 8e; Charrier, N. 等人, *J. Med. Chem.* 51:3313-3317 (2008))。收集細胞培養基並使用 $A\beta_{1-40}$ HTRF® 分析法 (CisBio) 根據製造商說明書分析 $A\beta_{1-40}$ 之存在。針對如使用 CellTiter-Glo 發光細胞生存力分析法 (Promega) 所測定之細胞生存力校正 $A\beta_{1-40}$ 值。實驗進行至少 3 次, 且各實驗中之各點二重複。使用四參數非線性回歸曲線擬合程式 (Kaleidagraph, Synergy Software) 將數據繪成曲線。

亦在自小鼠分離之背根神經節、皮層神經元及海馬體神經元中進行類似研究。簡而言之, 由 E13.5 背根神經節 (DRG)、E16.5 皮層神經元及 E16.5 海馬體神經元製備解離神經元培養物。使神經元在活體外生長 5 天。將含有 YW412.8.31 抗-BACE 抗體或對照 IgG1 之新鮮培養基與神經元一起培育 24 小時。收集培養基並使用 MSD® 齧齒動物/人類 (4G8) $A\beta_{40}$ 超敏感套組根據製造商說明書分析 $A\beta_{40}$ 之存在。針對如使用 CellTiter-Glo 發光細胞生存力分析法 (Promega) 所測定之細胞生存力校正 $A\beta_{40}$ 值。實驗進行至少 3 次, 且各點二重複。使用四參數非線性回歸曲線擬合程式 (Kaleidagraph, Synergy Software) 將數據繪成曲線。

在表現 APP 之 293 細胞中, 與非 BACE1 IgG 抗體抑制劑

(Xolair®)相比，所有測試之抗-BACE1抗體(LC6、LC9、YW412.8、YW412.8.30、YW412.8.31及YW412.8.51)均抑制 $A\beta_{1-40}$ 產生。參看圖10。

如圖11中所示，YW412.8.31抗BACE1抗體在表現APP之293細胞中抑制 $A\beta_{1-40}$ 產生，其程度類似於BACE1 SMI對照， IC_{50} 為17 nM且最大降低為約90%。在DRG神經元中獲得類似結果，在最高濃度之YW412.8.31下 $A\beta_{40}$ 產量減少約50%，且 IC_{50} 為8.4 nM。YW412.8.31抗-BACE1抗體亦抑制皮層及海馬體神經元中之 $A\beta_{40}$ 產生， IC_{50} 為2.3至2.6 nM。此等研究結果指示抗-BACE1抗體對細胞之功能類似於先前在活體外所觀測。此外，YW412.8.31抗體看似在CNS神經元中展示最佳效能。

D. 抗-BACE1抗體之細胞內定位

已知BACE1表現於細胞內，尤其表現於高基體上。為確定YW412.8.31在細胞內環境中是否與BACE1相互作用，進行內在化研究。一組神經元培養物係由E13.5背根神經節(DRG)外植體製備，第二組神經元培養物係由得自BACE1+/+或BACE1-/-小鼠之E16.5解離皮層神經元製備且分別在37°C下培養24小時或72小時。將含有0.5 μ M YW412.8.31抗-BACE1抗體之培養基添加至培養物中後持續30分鐘至2小時之時期，且在4°C或37°C下培育。處理後用PBS充分洗滌除去未結合抗體。在室溫下用4%三聚甲醛固定培養物20分鐘，且亦用0.1% Triton X-100滲透所選樣品。使用二次Alexa 568結合抗-人類IgG1抗體(Molecular

Probes)根據製造商說明書偵測結合抗體。

在高溫樣品中，發現大部分抗體信號內在化。如圖12(B)可見，當細胞被滲透以便使用二次抗體偵測YW412.8.31抗-BACE1抗體時可在37°C下於細胞內偵測DRG軸突中之BACE1。反之，當在4°C下冷培育DRG以防止內在化時，或當細胞未被滲透以允許細胞內偵測YW412.8.31時，在細胞表面偵測到極少BACE1。使抗體在神經元中內在化視BACE1結合而定，因為其僅在得自BACE1+/+動物之皮層神經元中可偵測，而在得自BACE1-/-動物之神經元中不可偵測(比較圖12(C)之中圖與右圖)。

此外，在YW412.8.31抗-BACE1抗體或對照IgG存在下將小鼠皮層神經元培養10分鐘或3小時，此後藉由免疫染色偵測抗體。神經元培養物係由E15.5解離皮層神經元製備，且培養14 DIV。將含有1 μ M YW412.8.31之培養基添加至培養物中後持續10分鐘至3小時，且在37°C下培育。處理後用HBSS充分洗滌除去未結合抗體。在室溫下用2%三聚甲醛固定培養物10分鐘，接著用0.1% Triton X-100滲透或不進行滲透。使用Alexa 568結合抗-人類IgG1二次抗體(Molecular Probes)偵測結合抗體。分析未滲透細胞中之YW412.8.31定位以查看細胞表面上之結合程度，以及分析滲透細胞中之YW412.8.31定位以查看抗體內在化程度。大部分所偵測到之抗體信號位於細胞內，在細胞表面上觀察到少許抗體染色(圖12(A))。YW412.8.31處理僅10分鐘後，內在化即非常明顯，表明該抗體極易被早期核內體攝

取。大部分YW412.8.31信號為點狀，指示其可能含於小泡內。

為更好地鑑別YW412.8.31所定位之亞細胞區室，用不同泡狀區室之標記共同染色：早期核內體(轉鐵蛋白受體，TfR)、反式高爾基網(TGN)(VAMP4)及溶酶體(LAMP1)。細胞用抗-TfR(Novus，目錄號NB100-64979)、抗-VAMP4(Novus，目錄號NB300-533)或抗-LAMP1(BD Pharmingen，目錄號553792)共同染色。YW412.8.31免疫反應性與早期核內體及TGN而不是溶酶體之標記共定位(圖12(A))。此模式與抗體定位於BACE1具有活性之區室一致。

實例3：抗-BACE1抗體結合位點表徵

進行其他研究以鑑別某些抗-BACE1抗體與人類BACE1之結合位點。在一組實驗中，在存在或不存在已知活性位點或外部位點BACE1結合肽的情況下評定抗體與BACE1(hBACE1)之結合以確定何種抗體顯示競爭性結合。在第二組實驗中，使抗-BACE1 Fab與人類BACE1細胞外域共同結晶以確定三維結合位點。

A. 競爭性結合

作為測定本發明抗-BACE1抗體之BACE1上結合位點的間接方法，進行競爭性ELISA。簡而言之，在4°C下將抗體YW412.8 IgG(1 µg/ml)塗佈於NUNC 96孔Maxisorp免疫培養盤上隔夜且在室溫下用阻斷緩衝液PBST(PBS及1% BSA及0.05% Tween 20)阻斷1小時。將抗-BACE1抗體YW412.8或hBACE1結合肽之連續稀釋液與預定量之經生物素標記

hBACE1一起培育，且在室溫下培育60分鐘。接著將連續稀釋液添加至經YW412.8塗佈之培養盤中且在室溫下培育30分鐘。隨後，用洗滌緩衝液(PBS，含0.05% T-20)洗滌培養盤且在室溫下藉由添加經辣根過氧化酶(HRP)標記之抗生蛋白鏈菌素顯影30分鐘。接著洗滌培養盤並用四甲基聯苯胺(TMB)受質顯影。在630 nm波長下使用標準技術量測結合至所捕獲之經生物素標記hBACE1的HRP結合抗生蛋白鏈菌素。

為確定用於上述競爭ELISA分析之經生物素標記標靶蛋白質之最佳濃度，如上文所述塗佈並阻斷NUNC 96孔Maxisorp免疫培養盤。在室溫下將經生物素標記標靶之連續稀釋液與經抗體塗佈培養盤一起培育30分鐘。接著用PBST洗滌培養盤，接著在室溫下與辣根過氧化酶結合抗生蛋白鏈菌素一起培育30分鐘。如上文所述偵測結合信號。使用四參數非線性回歸曲線擬合程式(Kaleidagraph，Synergy Software)將數據繪成曲線。根據曲線擬合確定經生物素標記之hBACE1的亞飽和濃度並應用於上文之競爭ELISA。

正如所料，YW412.8與自身競爭結合至hBACE1(圖13)。在YW412.8與活性位點抑制肽OM99-2(CalBiochem®，目錄號496000)之間未觀察到競爭。在LC6及YW412.8抗-BACE1抗體與已知外部位點結合肽BMS1(肽1，Kornacker等人，*Biochemistry* 44:11567-11572 (2005))之間觀察到競爭。綜上所述，此等結果表明YW412.8結合不同於APP裂

解之BACE1活性位點的BACE1外部位點。圖13中之曲線形狀表明YW412.8、LC6及BMS1在BACE1上可能具有重疊結合位點。

B. 晶體結構

為更透徹地瞭解YW412.8抗體與BACE1之相互作用，使YW412.8.31 Fab與人類重組BACE1細胞外域之細胞外域共同結晶。

蛋白質表現及純化

如下進行蛋白質表現及純化：藉由Blue Heron合成具有C末端His6標籤(SEQ ID NO:210)之BACE1(SEQ ID NO:49之胺基酸57至453)DNA，選殖於pET29a(+)載體(Novagen)中，且轉型於BL21(DE3)細胞(Invitrogen)中。在37°C下，在1 mM異丙基 β -D-1-硫代半乳糖苷(IPTG)誘導下表現4小時。用微流化床溶解細胞，且分離包涵體(含有BACE1)並用TE(10 mM Tris pH 8.0及1 mM乙二胺四乙酸(EDTA))緩衝液洗滌兩次。在室溫下使用7.5 M尿素、100 mM AMP SO pH 10.8及100 mM β -巰基乙醇(BME)溶解蛋白質2小時，接著在12,000 rpm下離心30分鐘。接著用7.5 M尿素、100 mM AMP SO pH 10.8稀釋上清液直至達到約1.5至2.0之OD₂₈₀。藉由首先在冷水中1:20稀釋溶解之BACE1，接著在4°C下輕輕攪拌樣品3週以便發生再摺疊來進行蛋白質再摺疊。純化經再摺疊之BACE1包括3個管柱層析步驟。首先，將BACE1裝載於經20 mM Tris pH 8.0及0.4 M尿素預平衡之50 ml Q瓊脂糖快速流(GE Healthcare)管柱

上，且用 0 至 0.5 M NaCl 之鹽梯度溶離。彙集峰值溶離份，用 20 mM Tris pH 8.0 緩衝液稀釋 5 倍，且裝載於 Source™15Q 管柱 (GE Healthcare) 上。使用 0 至 0.3 M NaCl 梯度溶離 BACE1。彙集含有 BACE1 蛋白之溶離份，濃縮並在 Superdex™ S75 管柱 (GE Healthcare) 上於 25 mM Hepes pH 7.5、150 mM NaCl 中進一步純化。

使 YW412.8.31 Fab 表現於大腸桿菌中，且在 PBS、25 mM EDTA 及 1 mM PMSF 中將細胞糊狀物解凍。將混合物均質化，通過微流化床兩次，且在 12,000 rpm 下離心 60 分鐘。接著以 5 ml/min 將上清液裝載於蛋白 G 管柱上。用 PBS 將管柱洗滌至基線且用 0.58% 乙酸溶離蛋白質。彙集含有 YW412.8.31 Fab 之溶離份並裝載於經 20 mM MES (pH 5.5) 平衡之 SP-瓊脂糖管柱上，且用 0 至 0.25 M NaCl 鹽梯度溶離 Fab。在 Superdex™ S75 管柱上於 25 mM Hepes pH 7.5 及 150 mM NaCl 中進一步純化 Fab。

結晶

將經純化之 BACE1 蛋白 (SEQ ID NO:49 之胺基酸 57 至 453) 與經純化之 YW412.8.31 Fab 以 1:1.5 莫耳比 (Fab 過量) 混合。在冰上培育複合物 1 小時且在 S200 26/60 凝膠過濾管柱 (GE Healthcare) 上純化以將其與過量 Fab 分離。接著將複合物濃縮至 15 mg/ml。藉由沈滴式氣相擴散法用與含有 20% PEG 4000、0.1M Tris pH 8.5 及 0.2 M 乙酸钠之 1 μ l 孔溶液混合的 1 μ l BACE1/Fab 複合物溶液進行結晶。接著在 19°C 下培育結晶滴。4 天後出現晶體且繼續再生長 2 天。接

著收集晶體，且於含有母液及20%甘油之低溫保護溶液中急驟冷凍。

數據收集及結構測定

使用單色X射線束(12658.4 eV)在斯坦福同步輻射設施(Stanford Synchrotron Radiation Facility; SSRL)光束線7-1下收集繞射數據。X射線偵測裝置為距晶體430 mm處放置之ADSC量子-315 CCD偵測器。對單一晶體應用旋轉法以收集完整數據集，其中每框架擺動為 0.5° 且總楔形大小(wedge size)為 180° 。接著使用程式HKL2000®(HLK Research, Inc.)對數據求指數、積分並換算。

使用分子置換(MR)法用程式Phaser(Read, R.J., *Acta Cryst.* D57:1373-1382 (2000))求解結構。Matthews係數計算結果指示各不對稱單元係由一個BACE1/Fab複合物及48%溶劑構成。因此，MR計算係針對搜尋一組3個次單位(包括Fab之N及C結構域以及BACE1細胞外域)。獨立地搜尋N末端及C末端Fab域以允許可撓性肘角。Fab次單位之搜尋模型來源於HGFA/Fab複合物之晶體結構(PDB程式碼：2R0L，Wu, Y.等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:19784-19789 (2007))。BACE1之搜尋模型來自公開之BACE1結構PDB程式碼：1FKN(Hong, L.等人，*Science* 290:150-153 (2000))。在BACE1/Fab界面發生顯著構形變化。用程式COOT(結晶目標定向工具套組；Crystallographic Object-Orientation Toolkit)(Emsley & Cowtan, *Acta. Cryst.* D60:2126-2132 (2004))進行手工重建。用程式REFMAC5

(Murshudov, G.N. 等人, *Acta Cryst.* D53:240-255 (1997))及 PHENIX(Python-based Hierarchical Environment for Integrated Xtallography)(Adams, P.D. 等人, *Acta. Cryst.* D66:213-221 (2010))使用最大似然目標函數(maximum likelihood target function)反覆進行結構精化,直至獲得之最終R因子為0.221及R_{游離}為0.274。結構精化統計值示於表5中。

表5-結晶學數據統計值

數據收集	
空白組	P2 ₁
單位晶胞	a=46.1 Å, b=75.5 Å, c=112.0 Å a=90° b=99.8° g=90°
解析度	30-2.8Å
反射總數	64939
完整性	97.9%(84.4%) ²
豐度	3.5(2.5)
I/σ	10.8(2.0)
Rsym ¹	0.112(0.366)
精化	
解析度範圍	30-2.8Å
R晶體 ³ /R游離 ⁴	0.221/0.274
游離R測試設定大小	5%觀測反射
非氫原子	6324
水分子	94
平均B, 總計	37.3
蛋白質	37.6
水	29.7
均方根偏差鍵長	0.003 Å
均方根偏差角度	0.705°

¹ $R_{\text{sym}} = \Sigma |I_{hi} - I_h| / \Sigma I_{hi}$ ，其中 I_{hi} 為反射 h 之第 i 對稱相關觀測值之換算強度，且 I_h 為平均值。

² 括弧中之值具有最高解析度殼層 (highest resolution shell)，其為 (1.97-1.90 Å)。

³ $R_{\text{晶體}} = \Sigma_h |F_{oh} - F_{ch}| / \Sigma_h F_{oh}$ ，其中 F_{oh} 及 F_{ch} 為反射 h 之觀測結構因子及計算結構因子幅度。

⁴ $R_{\text{游離}}$ 之值係針對精化中未包括之 5% 隨機選擇反射而計算。

使晶體繞射且在 2.8 Å 解析度下精化結構。複合物中之 BACE1 的整體結構在很大程度上類似於其游離形式 (Hong 等人, *Science* 290:150-153 (2000))，其可在殘基中 96% (373/385) Ca 原子位置與 0.63 Å RMSD 對準。YW412.8.31 Fab 覆蓋 BACE1 分子表面上約 840 Å² 之表面積且不在活性位點附近結合。抗原決定基包含由 Hong 等人 (*Science* 290:150-153 (2000)) 命名為環 C (全長 BACE1 之胺基酸 315 至 318)、環 D (全長 BACE1 之胺基酸 331 至 335) 及環 F (全長 BACE1 之胺基酸 370 至 381) 之結構元件，該等結構元件緊密位於三維空間中。此外，YW412.8.31 結合位點處及 YW412.8.31 結合位點附近之部分 BACE1 採用構形變化，且得到 0.71 之形狀互補評分，與強結合一致。據認為，抗體誘導之構形變化有助於異位抑制分泌酶活性。

Fab 結合至類澱粉前驅蛋白之 BACE1 活性位點遠端的外部位點，與先前鑑別為一組 BACE1 結合肽之結合位點的外部位點部分重疊 (Kornacker 等人, *Biochemistry* 44:11567-

11572 (2005))(圖 14)。重鏈及輕鏈均涉及相互作用(圖 15)。與游離形式不同，若 BACE1 抗原決定基區更具活力(如高溫因子所指示)，則抗體結合結構以獨特構形穩定，由此損壞分泌酶之 P6 及 P7 位點(Turner 等人，*Biochemistry* 44:105-112 (2005))。與該等位點相鄰，在受質結合複合物中採用 α -螺旋結構之胺基酸 218 至 231(SEQ ID NO:49(殘基 157 至 170；Lin 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:1456-1460 (2000)(胺基酸編號以 BACE1 之成熟蛋白酶結構域起始)之 AGFPLNQSEVLASV(SEQ ID NO:126))在抗體複合物中變成隨機環，此可能因防止 APP 以勝任催化方式到達 BACE1 催化口中而對 APP 蛋白水解裂解造成不利影響。結構抗原決定基包括含有一或多個位於距晶體結構中 YW412.8.31 Fab 之任何部分之距離在 4 埃以內之原子的 BACE1 胺基酸殘基。在以下表 6 中，Fab 輕鏈殘基屬於鏈 L，且 Fab 重鏈殘基屬於鏈 H。BACE1 胺基酸之殘基編號係基於 BACE1 之全長序列(SEQ ID NO:49)。Fab 胺基酸之殘基編號係基於 Kabat 編號方案(Kabat 等人，*Sequences of Proteins of Immunological Interest*，5 版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991)。

表 6：位於 YW412.8.31-BACE1 結合界面之殘基

BACE1殘基	Fab殘基
314 SER	H 26 GLY
316 GLU	H 27 PHE
317 LYS	H 28 THR
318 PHE	H 30 LEU
319 PRO	H 31 GLY
327 GLN	H 32 TYR
328 LEU	H 53 ALA
329 VAL	H 58 ASP
330 CYS	H 94 ARG
331 TRP	H 96 PRO
332 GLN	H 97 PHE
333 ALA	H 98 SER
335 THR	H 99 PRO
337 PRO	H 100 TRP
340 ILE	
375 THR	L 49 TYR
378 ASP	L 53 PHE
380 CYS	L 55 TYR
426 PHE	L 56 SER
	L 94 TYR

詳細的原子相互作用係呈極性相互作用之凡得瓦爾力接觸形式。極性相互作用包括氫鍵結及鹽橋。以下表7包括 BACE1與 YW412.8.31 Fab之間的成對極性相互作用清單。Fab輕鏈殘基屬於鏈L，且Fab重鏈殘基屬於鏈H。BACE1胺基酸之殘基編號係基於BACE1之全長序列(SEQ ID NO:49)。Fab胺基酸之殘基編號係基於Kabat編號方案。

表 7： BACE1與 YW412.8.31 Fab之間的成對極性相互作用

BACE1殘基---Fab殘基
314 SER---H 98 SER
317 LYS---H 58 ASP
327 GLN---H 53 ALA
330 CYS---H 31 GLY
331 TRP---H 98 SER
331 TRP---H 32 TYR
332 GLN---H 32 TYR
378 ASP---H 32 TYR
316 GLU---L 94 TYR
332 GLN---L 55 TYR
335 THR---L 49 TYR

如下文所示，YW412.8.31抗體BACE1抗原決定基之胺基酸組成較差保留於BACE2及組織蛋白酶D中之相應區域中。YW412.8.31抗體抗原決定基之此胺基酸差異與觀察到該抗體對BACE1具有高選擇性相一致。編號係基於BACE1之全長序列(SEQ ID NO:49)。BACE2及組織蛋白酶D之序列基於其各別晶體結構與BACE1對準。將YW412.8.31 BACE1抗原決定基中之殘基加方框。

	312	322	332	372	
BACE1	... AS	ETKEPPD	ETLGEELVCH	QNGAEINL	... D
BACE2	... AS	LIPEESD	ETTSQIACH	INSEFNSY	... M
CatD	... -	VPL	EQ EFM	-H	PC

實例 4：活體內表徵-小鼠

評定活體內 YW412.8.31 作用。為確定 BACE1 特異性抑制劑可達到之最大 Aβ₁₋₄₀ 減少，相較於 BACE1+/+ 對照研究 BACE1 對 BACE1-/- 小鼠之血漿及前腦中 Aβ₁₋₄₀ 產量的貢

獻。在 BACE1^{-/-}小鼠中，血漿 A β ₁₋₄₀ 信號減少 45%，且腦 A β ₁₋₄₀ 信號減少 80%(圖 16，圖 A)。此等結果暗示 BACE1 實際上為前腦中之主要 β -分泌酶，但在周邊，BACE1 僅佔 A β ₁₋₄₀ 產量之一部分，其餘來自另一 β -分泌酶。

藉由瞭解到 BACE1 對 A β 產量之貢獻，評定抗-BACE1 抗體 YW412.8.31 調變 hAPP 轉殖基因小鼠及野生型小鼠中之類澱粉生成處理 (amyloidogenic processing) 的能力。

hAPP 轉殖基因小鼠

簡而言之，用 30 mg/kg 或 100 mg/kg YW412.8.31 抗體或媒劑藉由每四天進行腹膜內注射總計三次劑量 (亦即第 1 天、第 5 天及第 9 天) 來處理 5 個月大的人類 APP 表現小鼠。最後一次劑量後兩小時對動物施以安樂死。收集血清、血漿及腦並加以處理。使用類澱粉 β (A β) ELISA 測試套組根據製造商說明書 (The Genetics Company) 分析血漿、皮層及海馬體之可溶性 A β ₁₋₄₀ 及 A β ₁₋₄₂ 含量。對血清及腦組織勻漿進行藥物動力學分析。

結果顯示，血漿 A β ₁₋₄₀ 及 A β ₁₋₄₂ 含量在 30 mg/kg 及 100 mg/kg YW412.8.31 抗體劑量下降低至對照含量之約 30%(圖 17(A) 之上圖及圖 18 之圖 A)。然而，與在下文所述之野生型小鼠中所觀察到的相反，腦中 A β ₁₋₄₀ 及 A β ₁₋₄₂ 含量在 100 mg/kg 劑量之 YW412.8.31 抗體下僅減少 15% 至 22%(圖 17(A) 之下圖及圖 18 之圖 A)。經處理動物之腦中的 YW412.8.31 抗體濃度以劑量依賴性方式增加，其中以 30 mg/kg 處理之動物腦中觀測到的抗體濃度為 4.8 ± 3.6 nM，而以 100 mg/kg 處

理之動物腦中觀測到的抗體濃度為 14.0 ± 9.3 nM，證明經腹膜內投與之抗體劑量愈高，實際上轉換為腦中觀測到之抗體劑量愈高。個體藥物動力學相對於藥效學讀出值之曲線圖表明抗體在此模型中存在PK/PD關係(圖17(B))。

亦進行類似實驗，其中YW412.8.31抗-BACE1抗體係藉由連續ICV輸注全身性遞送或直接遞送至hAPP轉殖基因小鼠腦中。對於ICV遞送，經由單側植入之Alzet滲透小型泵(2001型)連續遞送抗體7天。YW412.8.31抗體之遞送量為0.041毫克/天(低劑量)或0.41毫克/天(高劑量)；每天向對照組遞送0.33毫克對照IgG。安樂死時，收集血漿、皮層及海馬體並藉由ELISA(The Genetics Company)按照製造商說明書分析可溶性 $A\beta_{1-40}$ 及 $A\beta_{1-42}$ 含量。

以下表8展示藉由全身性遞送投與30 mg/kg或100 mg/kg或者藉由ICV遞送每天投與0.041 mg及0.41 mg之小鼠腦中的YW412.8.31抗體濃度。

表 8

	劑量	腦中之抗體濃度 (μ G/G)	腦中之抗體濃度 (NM)
全身性遞送	30 mg/kg	0.7	4.8
	100 mg/kg	2.1	14
ICV遞送	低(0.041 mg/天)	13-25	87-167
	高(0.41 mg/天)	110-305	733-2003

然而，儘管輸注後腦中之抗體含量較高，但 $A\beta$ 減少適度(15%至23%)且類似於全身性遞送時所觀察到之減少(圖18之圖B)。此觀察表明高劑量全身性注射或許能夠降低

hAPP轉殖基因小鼠之 $A\beta$ 含量，然而減少為適度的。據信，在hAPP轉殖基因小鼠中之降低效力為動物模型之結果，因為腦中之濃度(等於全身性遞送後血清中之濃度)較高不進一步降低 $A\beta$ 產量。此外，hAPP轉殖基因小鼠腦中之減少與在野生型小鼠中所觀察及以下所述相比為適度的。因此，轉殖基因hAPP小鼠對於研究抗BACE1之活體內作用可能不理想。根據疾病觀點，野生型小鼠亦為更適當之抗體效力模型，因為阿茲海默氏病患者群體中絕大多數攜帶野生型APP等位基因。

野生型小鼠

亦在野生型小鼠中評定抗-BACE1抗體YW412.8.31調變類澱粉生成處理之能力。簡而言之，如上文所述進行實驗。藉由靜脈內(IV)注射向野生型小鼠全身遞送單劑量之對照IgG抗體或YW412.8.31抗-BACE1抗體(50 mg/kg)。24小時或48小時後，收集血漿及腦樣品並分析 $A\beta_{1-40}$ 含量。血漿及腦中之總小鼠 $A\beta_{1-40}$ 濃度係使用夾層ELISA按照與下文關於量測總抗-BACE1抗體濃度所述相似之程序來測定。簡而言之，將對 $A\beta_{1-40}$ 之C末端具有特異性之兔多株抗體(Millipore, Bedford, MA)塗佈於培養盤上，且使用經生物素標記之抗-小鼠 $A\beta$ 單株抗體M3.2(Covance, Dedham, MA)進行偵測。該分析之血漿定量下限值為1.96 pg/ml，且腦中之定量下限值為39.1 pg/g。如圖16之圖B中所示，血漿 $A\beta_{1-40}$ 減少35%，且皮層 $A\beta_{1-40}$ 減少20%。

用野生型C57Bl/6J小鼠進行其他試驗，其中全身投與

100 mg/kg YW412.8.31或對照IgG。在單次腹膜內(IP)注射後4小時測定經處理動物之血漿及前腦中的 $A\beta_{1-40}$ 含量。藉由心臟穿刺自動物收集血液以分離血漿。PBS灌注後，收集腦，且在PK緩衝液(1% NP-40/PBS，含Roche完全蛋白酶抑制劑)中製備來自一個半腦之前腦，而將來自另一半腦之前腦在5M GuHCL、50 mM Tris pH 8.0中均質化，並在酪蛋白阻斷緩衝液(0.25%酪蛋白/0.05%疊氮化鈉、20 μ g/ml抑肽酶/5 mM EDTA pH 8.0/10 μ g/ml抗纖維蛋白酶/PBS)中進一步稀釋以供 $A\beta_{1-40}$ 分析。

如圖22之圖A中所示，100 mg/kg劑量能夠將血漿 $A\beta_{1-40}$ 對照含量降低約50%，且與先前所述之BACE1基因剔除含量相似。然而，在投藥後4小時未偵測到前腦 $A\beta_{1-40}$ 之變化。此早期時間點可能距YW412.8.31投藥過早而無法看出在腦中之作用。可能需要在投藥後較長時期觀察腦中之 $A\beta$ 減少，尤其是因為如上文所述在野生型小鼠中以較低劑量(50 mg/kg)於24小時才觀測到 $A\beta$ 減少。血清中之YW412.8.31濃度極高，截至投藥後4小時為 1040 ± 140 μ g/mL(6.9 ± 0.9 μ M)。腦中之YW412.8.31濃度低得多，為 0.7 ± 0.4 μ g/g(4.7 ± 2.7 nM)，佔血清濃度之約0.07%，非常接近所預測之抗體向CNS中之0.1%穩態滲透(Reiber及Felgenhauer, *Clin. Chim. Acta.* 163:319-328(1987))。重要的是，腦中所達到之抗體濃度 4.7 ± 2.7 nM接近先前所觀測到之細胞 IC_{50} (圖11)。因此，抗-BACE1抗體在活體內高度有效，如血漿 $A\beta_{1-40}$ 降至BACE1基因剔除小鼠中所見之含

量所顯示。然而，單次全身性劑量截至投與小鼠後4小時未引起腦減少，主要可能因為時間點過早以致未觀測到任何作用。

進行其他實驗以確定藉由重複給藥升高腦抗體含量之作用。每4天以30 mg/kg或100 mg/kg IP投與YW412.8.31抗體或對照IgG，總計3次劑量。在此研究中，最後一次劑量後4小時量測經處理動物之血漿及前腦中的 $A\beta_{1-40}$ 含量。同樣，在以30 mg/kg及100 mg/kg多次給藥後觀察到血漿 $A\beta_{1-40}$ 含量減少約50%(圖22之圖B)。值得注意的是，在高劑量抗-BACE1下，觀察到前腦 $A\beta_{1-40}$ 減少42%，但在低劑量下未觀察到減少。每4天分別以30 mg/kg及100 mg/kg投藥後，血清中之YW412.8.31抗體濃度為 480 ± 210 $\mu\text{g/mL}$ 及 1500 ± 440 $\mu\text{g/mL}$ ，且腦中之濃度為 0.9 ± 0.6 $\mu\text{g/g}$ (5.9 ± 4.3 nM)及 3.0 ± 1.6 $\mu\text{g/g}$ (20 ± 10 nM)。因此，如所預測，腦中之抗體含量較高使 $A\beta$ 含量穩定減少。值得注意的是，與100 mg/kg劑量相比，在30 mg/kg劑量下周邊 $A\beta$ 含量無差異，表明在30 mg/kg下達成最大周邊抑制，且因此，簡單地降低周邊 $A\beta$ 含量不足以降低腦含量。

此外，在野生型小鼠及BACE1基因剔除小鼠中投與YW412.8.31抗-BACE1抗體後獲得PK數據。參看圖19。經由IV注射向BALB/C小鼠遞送單劑量之抗BACE1(1 mg/kg或10 mg/kg)。分析出截至給藥後21天的血清PK。

如下量測小鼠血清及腦樣品中之總抗-BACE1抗體濃度。使用酶聯免疫吸附分析(ELISA)量測小鼠血清及腦樣

品中之抗體濃度。在4℃下用Fc片段特異性多株抗體驢抗人類IgG之F(ab')₂片段(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)塗佈NUNC 384孔Maxisorp免疫培養盤(Neptune, NJ)隔夜。第二天在室溫下用含有0.5%牛血清白蛋白(BSA)之磷酸鹽緩衝生理鹽水(PBS)阻斷培養盤1小時。使用各抗體(對照IgG及抗-BACE1)作為定量各別抗體濃度之標準物。使用微量培養盤洗滌機(Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT)用含有0.05% Tween 20之PBS洗滌培養盤後,在室溫下將稀釋於含有0.5% BSA、0.35 M NaCl、0.25% CHAPS、5 mM EDTA、0.05% Tween 20及15 ppm Proclin之PBS中的標準物及樣品在培養盤上隨輕微攪動培育2小時。用辣根過氧化酶結合F(ab')₂山羊抗人類IgG(Fc特異性多株抗體)(Jackson ImmunoResearch)偵測所結合抗體。最後,使用受質3,3',5,5'-四甲基聯苯胺(TMB)(KPL, Inc., Gaithersburg, MD)使培養盤顯影。在450 nm波長下以630 nm為參考在Multiskan Ascent讀數器(Thermo Scientific, Hudson, NH)上量測吸光度。根據標準曲線使用四參數非線性回歸程式確定濃度。該分析之血清定量下限(LLOQ)值為3.12 ng/ml且腦中之定量下限值為15.6 ng/g。

按照與上文所述類似之程序,使用BACE1 ECD作為塗料及Fc特異性抗體抗人類IgG(Jackson ImmunoResearch)用於偵測來偵測小鼠中之游離YW412.8.31抗體濃度。游離抗-BACE1小鼠ELISA之血清LLOQ值為0.626 ng/ml,且腦

中之LLOQ值為3.13 ng/g。

使用兩種獨立的PK分析：一種分析偵測血清中之所有YW412.8.31(總mAb)，而一種分析僅偵測血清中之未結合YW412.8.31(游離mAb)。所觀測到之PK動力學為非線性的，且樣品(其中YW412.8.31濃度 $<10\text{ }\mu\text{g/mL}$)之總mAb值相對於游離mAb值之差值表明標靶介導之清除。參看圖19之圖A。此外，總mAb與未結合mAb之差值指示血清中有些YW412.8.31可能結合至可溶性BACE1。BACE1+/+、BACE1+/-及BACE1-/-小鼠中之單劑量PK分析證實初步研究中所觀測到之非線性，且指示增強清除實際上為標靶介導。BACE1-/-小鼠展示線性PK。參看圖19(圖B)。

實例5：活體內表徵-猴子

藉由IV遞送向食蟹獼猴投與對照IgG或YW412.8.31抗-BACE1抗體(30 mg/kg)。在給藥前多達7天對血漿及CSF取樣以設置各個別動物之平均基線 $A\beta_{1-40}$ 含量，接著在給藥後之不同時間取樣。使用猴吸附型山羊抗人類IgG多株抗體(Bethyl, Montgomery, TX)作為塗料及偵測來量測猴子血清及CSF樣品中之總抗-BACE1或對照抗體濃度(圖20)。使用BACE1 ECD作為塗料及猴吸附型山羊抗人類IgG抗體(Bethyl)用於偵測來測定猴子中之游離抗-BACE1抗體濃度。總抗-BACE1及游離抗-BACE1猴子分析之血清或CSF之LLOQ值為6.25 ng/ml。向猴子投與IgG1之PK如所預期且展示預測暴露。

亦測定所測試食蟹獼猴之血漿及CSF中的 $A\beta_{1-40}$ 含量。

簡而言之，使用MSD MA6000 Human (6E10) A β 套組(目錄號K111BVE-2，Meso Scale Diagnostics)根據製造商說明書測定血漿中之總獼猴A β_{1-40} 濃度。將對A β_{1-40} 之C末端具有特異性的捕獲抗體預先塗佈於培養盤上，且使用磺基標籤抗-A β 單株抗體6E10進行偵測。該分析之血漿定量下限值為49.4 pg/ml。使用夾層ELISA測定CSF中之總獼猴A β_{1-40} 濃度。將對A β_{1-40} 之C末端具有特異性之兔多株抗體(目錄號AB5737，Millipore，Bedford，MA)塗佈於培養盤上，且使用經生物素標記之抗-A β 單株抗體6E10(目錄號SIG-39340，Covance，Dedham，MA)進行偵測。該分析之CSF定量下限值為15.6 pg/ml。

如圖21(圖A)中所示，在所有個體中，血漿A β_{1-40} 含量比基線降低約50%。A β 之50%最大血漿減少持續整個7天觀察期。YW412.8.31抗-BACE1抗體之血清濃度-時間概況看似與對照IgG抗體所觀測到者相似，表明動力學與在線性範圍內投與典型IgG1之動力學相似(圖20之圖A)。在投藥後15分鐘第一次收集樣品時觀察到峰值血清抗體濃度為約800 $\mu\text{g/mL}$ ，且截至給藥後7天降至232 $\mu\text{g/mL}$ 。值得注意的是，在給藥後量測之所有時間點，YW412.8.31之血清濃度均超過細胞IC₅₀(約2.5 nM，參看圖11)。

如圖21(圖B)中所示，CSF A β_{1-40} 含量雖然可變，但顯示在給藥後1天及3天時減少多達50%，接著在給藥後7天時，呈現返回基線A β 之趨勢。基線血漿及CSF含量之變化性示於圖21(圖C及圖D)中。基線血漿含量在各動物之間十

分均勻，而CSF A β ₁₋₄₀含量高度可變。因此，對於各個猴子，所有A β ₁₋₄₀量測值均相對於基線校正。

此等數據顯示猴子中單劑量YW412.8.31顯著降低血漿及CSF之A β 含量。在CSF中，在此時期中觀察到0.2 $\mu\text{g/ml}$ 至0.3 $\mu\text{g/ml}$ 之YW412.8.31濃度，其轉換為約2 nM(圖20之圖B)。根據此數據，推斷YW412.8.31之腦濃度在類似範圍內。藉由比較PK與PD數據，此等結果顯示血漿中之藥物暴露足以在7天窗口期間最大程度地抑制A β 產生，而CSF中之藥物濃度接近細胞IC₅₀且在測試劑量(30 mg/kg)下短暫降低腦中之A β 含量。總之，此等數據提供在非人類靈長類動物中全身投與抗-BACE1可降低腦中之BACE1活性的強有力證據，如藉由CSF A β 量測所確定。

實例6：YW412.8.31抗體之親和力成熟

在先前所述之晶體結構所提供之結構數據的指導下使YW412.8.31抗體親和力成熟。使與BACE1接觸之抗體殘基突變以增強YW412.8.31抗體之親和力。由此策略產生之親和力成熟純系命名為YW412.8.31xS。亦經由如先前所述之軟隨機化靶向所有CDR來產生YW412.8.31親和力成熟純系，且其命名為YW412.8.31x。結合BACE1之純系的重鏈可變序列及輕鏈可變序列描述於圖23(A)至圖23(C)及圖24(A)至圖24(C)中。

在如先前於實例2C中所述之基於細胞之HTRF分析中測試結合BACE1之純系的BACE1蛋白酶抑制。分析結果描繪於圖25A及圖25B中。圖25B展示經所指示濃度各種親和力

成熟抗-BACE1抗體處理24小時之原代皮層神經元的A β ₁₋₄₀產量(pg/ml)之結果。若干測試抗體抑制BACE1之程度與用YW412.8.31時所觀察到者相似。

雖然上文已藉助於說明及實例略為詳細地描述本發明以便清楚理解，但該等描述及實例不應解釋為限制本發明之範疇。本文所引用之所有專利及科學文獻的揭示內容係以全文引用的方式明確併入本文中。

【圖式簡單說明】

圖1A至圖1B描繪獲自天然多樣性噬菌體呈現文庫之天然分類的純系YW412.8及YW412.8之親和力成熟形式的輕鏈及重鏈胺基酸序列(如實例1(A)中所述)。圖1A描繪輕鏈序列比對。圖1B描繪重鏈序列比對。在圖1A與圖1B兩者中，各純系之HVR序列由方框內區域指示，其中第一個方框指示HVR-L1(SEQ ID NO:7及8，圖1A)或HVR-H1(SEQ ID NO:22及23，圖1B)，第二個方框指示HVR-L2(SEQ ID NO:9及10，圖1A)或HVR-H2(SEQ ID NO:24，圖1B)，且第三個方框指示HVR-L3(SEQ ID NO:11至16，圖1A)或HVR-H3(SEQ ID NO:25，圖1B)。

圖2A至圖2B描繪獲自合成多樣性噬菌體呈現文庫之天然分類的純系Fab 12及Fab 12之親和力成熟形式的輕鏈及重鏈胺基酸序列(如實例1(B)中所述)。圖2A描繪輕鏈序列比對。圖2B描繪重鏈序列比對。在圖2A與圖2B兩者中，各純系之HVR序列由方框內區域指示，其中第一個方框指示HVR-L1(SEQ ID NO:35，圖2A)或HVR-H1(SEQ ID

NO:28，圖 2B)，第二個方框指示HVR-L2(SEQ ID NO:36至39，圖 2A)或HVR-H2(SEQ ID NO:29，圖 2B)，且第三個方框指示HVR-L3(SEQ ID NO:40，圖 2A)或HVR-H3(SEQ ID NO:30，圖 2B)。

圖 3A及圖 3B描繪自合成多樣性噬菌體呈現文庫分離之輕鏈及重鏈Fab的HVR或CDR序列(如實例 1(B)中所述)。編號係根據Kabat等人之命名法。圖 3A揭示「CDRL1」序列為SEQ ID NO:133，「CDRL2」序列為SEQ ID NO:134，「CDRL3」序列為SEQ ID NO 135至144、141及145至152，且「CDRH1」序列為SEQ ID NO 153至159、158、160至161、159、158、162、161及163至167，所有序列分別按照出現的順序。圖 3B揭示「CDRH2」序列為SEQ ID NO 168至177、174、171、178至182、177及183，且「CDRH3」序列為SEQ ID NO 184至202，所有序列分別按照出現的順序。

圖 4提供展示自天然多樣性噬菌體呈現文庫及合成多樣性噬菌體呈現文庫鑑別之各種純系對BACE1之抑制作用的圖表。在均質時差式螢光(HTRF)分析中測試該等純系之BACE1抑制作用，如實例 1(A)所述。所有YW系列抗體均以500 nM之濃度使用，除了YW 434.6抗體，其係以320 nM之濃度進行測試。抗體12.IgG、14.IgG、LC6.IgG、LC9.IgG、LC10.IgG及LC11.IgG均以1 μ M之濃度進行測試。

圖 5為展示HTRF分析中BACE1在自合成多樣性噬菌體呈

現文庫鑑別之抗-BACE1 Fab存在下之活性(如實例1(B)中所述)的圖表。各線對應於存在BACE1及受質(PBS對照)時之100%活性(0%抑制)及不存在BACE1時之100%抑制。

圖6描繪親和力成熟抗-BACE1 Fab之CDR或HVR序列(如實例1(B)所述)。編號係根據Kabat等人之命名法。競爭ELISA比率為在如實例1(B)中所述之一點競爭ELISA分析(one-point competition ELISA assay)中在溶液中不存在或存在作為競爭劑之20 nM BACE1的情況下的ELISA信號之比率。圖6揭示「CDRL1」序列為SEQ ID NO 133、133、133、133、133及203，「CDRL2」序列為SEQ ID NO 134、134及204至207，「CDRL3」序列為SEQ ID NO 208至209、145、145及145至146，「CDRH1」序列為SEQ ID NO 157、157、158、158、158及162，「CDRH2」序列為SEQ ID NO 172、172、171、171、171及178，且「CDRH3」序列為SEQ ID NO 188、188、195、195及195至196，所有序列分別按照出現的順序。

圖7A至圖7C含有展示得自親和力成熟抗-BACE純系之競爭性ELISA分析之數據(如實例1(B)所述)的圖表。使Fab呈現噬菌體與固定於培養盤上之BACE1之結合與溶液中之BACE1之連續稀釋液競爭。圖7A、圖7B及圖7C描繪親本抗體及相應親和力成熟抗體之競爭曲線。

圖8A至圖8C描繪展示抗-BACE1 Fab在HTRF酶分析中之BACE1抑制作用(如實例1(B)所述)的圖表。在HTRF酶分析中量測個別抗-BACE1純系之經純化Fab之抑制活性。

OM99-2(CalBiochem®, 目錄號 496000)為 BACE1 之合成肽抑制劑且用作陽性對照。圖 8A、圖 8B 及圖 8C 為親本及相應親和力成熟衍生物之抑制曲線。此分析中 OM99-2 之 IC_{50} 為 11 nM。

圖 9A 提供展示使用在 HTRF 分析中具有較強 BACE1 敏感度之長肽受質(左圖)或在 FRET 分析中具有較強 BACE1 敏感度之短肽受質(右圖)時，親和力成熟 YW412.8.31 抗-BACE1 抗體對人類重組 BACE1 之活體外酶活性之影響(如實例 2(B)中所述)的圖表。使用 BACE1 合成肽抑制劑 OM99-2(CalBiochem®, 目錄號 496000)、BACE1 小分子抑制劑(BACE1 SMI) β -分泌酶抑制劑 IV(CalBiochem®, 目錄號 565788)及不結合 BACE1 之 IgG 抗體作為對照。圖 9B-1 及圖 9B-2 亦提供展示人類重組 BACE1 細胞外域、人類重組 BACE2 細胞外域或組織蛋白酶 D 細胞外域對在 YW412.8.31 或對照 IgG 抗體存在下具有較強 BACE1 敏感度之短肽受質之活體外酶活性(如實例 2(B)中所述)的圖表。

圖 10 描繪用各種抗-BACE1 抗體(LC6、LC9、YW412.8、YW412.8.30、YW412.8.31 及 YW412.8.51)對 293-HEK 細胞中之重組類澱粉前驅蛋白(APP)進行處理(如實例 2(C)中所述)的實驗結果。使用不結合 BACE1 之 IgG 抗體(Xolair®)作為對照。

圖 11A 至圖 11D 提供說明 YW412.8.31 抗-BACE1 抗體對重組或內源性類澱粉前驅蛋白(APP)進行處理之作用(如實例 2(C)中所述)的圖表。圖 11A 展示使用穩定表現野生型人類

APP之293-HEK細胞的實驗結果。BACE1 SMI為小分子BACE1抑制劑，其係用作對照(化合物8e；Charrier等人，*J. Med. Chem.* 51:3313-3317 (2008))。圖11B展示使用自野生型CD1小鼠培養之E13.5背根神經節神經元之實驗結果。其他實驗係使用得自野生型CD1小鼠之E16.5皮層神經元培養物(圖11C)及E16.5培養海馬神經元(圖11D)進行。

圖12A至圖12C提供YW412.8.31抗-BACE1抗體被攝入原代小鼠神經元中(如實例2(D)中所述)之影像。圖12A展示YW412.8.31抗-BACE1抗體內化至神經元中之細胞內小泡中。在37°C下培育胚胎皮層神經元，持續所指示之時間。用 α -人類Alexa 568偵測表面(未滲透)或內部(滲透)細胞區室上之結合YW412.8.31。大部分信號被內化。藉由用所指示之血管區室標記進行共染色將內化之YW412.8.31定位於亞細胞區室：早期核內體(TfR)；反式高爾基網(trans-golgi network；VAMP4)及溶酶體(LAMP1)。比例尺(scale bar)=65 μ m(頂部)及20 μ m(底部)。圖12B展示在如圖中所指示之兩個不同溫度及三個不同時間點將抗-BACE1抗體攝入E13.5背根神經節(DRG)神經元中。細胞滲透以允許標記細胞內BACE1抗體。在未滲透細胞中，僅標記外部結合之YW412.8.31抗-BACE1抗體。圖12(C)展示來自BACE1表現小鼠或BACE1基因剔除小鼠之YW412.8.31抗-BACE1抗體攝入E16.5皮層神經元中。

圖13提供實例3(A)之ELISA結果的圖示，其比較YW412.8抗-BACE1抗體與自身、另一抗-BACE1抗體

(LC6)、活性位點 BACE1 結合肽 (OM99-2(CalBiochem®, 目錄號 496000)) 及外部位點 BACE1 結合肽 (BMS1) (Kornacker 等人, *Biochemistry* 44:11567-11572 (2005) 中之肽 1) 之競爭性結合。

圖 14 展示與人類 BACE1 細胞外域共結晶之 Fab YW412.8.31 之 2.8 Å 結構的不同視圖，如實例 3(B) 中所述。該 Fab 結合至分泌酶活性位點遠端的 BACE1 外部位點，該分泌酶活性位點與已知可與具有 BACE1 抑制性質之某些肽相互作用之另一外部位點部分重疊。

圖 15 提供 Fab YW412.8.31 與人類 BACE1 細胞外域相互作用之特寫圖。用表面表示法展示 BACE1，且 Fab 展示為條帶。打點表面指示 BACE1 抗原決定基。

圖 16A 及圖 16B 展示研究 BACE1 對野生型小鼠中之 $A\beta_{1-40}$ 含量之貢獻之實驗結果。研究 BACE1^{+/+} 相對於 BACE1^{-/-} 小鼠中之 $A\beta_{1-40}$ 含量。如實例 4 中所述向小鼠投與單劑量之對照 IgG 抗體或抗-BACE YW412.8.31 抗體。圖 16A 展示研究 BACE1 對小鼠中之 $A\beta_{1-40}$ 產量之貢獻之遺傳研究結果。在 BACE1 基因剔除小鼠 (BACE1^{-/-}) 中所觀測到之 $A\beta_{1-40}$ 含量提供特定 BACE1 抑制劑對野生型小鼠 $A\beta_{1-40}$ 產量之改變程度的對照。圖 16B 展示投與對照 IgG 或抗-BACE1 YW412.8.31 (50 mg/kg) 在給藥後 24 小時或 48 小時對血漿及 CNS (皮層) 中之 $A\beta_{1-40}$ 產量的作用。藉由 IV 注射向 C57B1/6 小鼠遞送單劑量之對照 IgG 或抗-BACE1 抗體 (50 mg/kg)。24 小時或 48 小時後，收集血漿及腦樣品以分析 $A\beta_{1-40}$ 。血

漿 $A\beta_{1-40}$ 減少 35%(24 小時)且皮層 $A\beta_{1-40}$ 減少約 20%。用於繪製曲線之值為平均值($\pm$ SEM), * $p < 0.01$; ** $p < 0.001$ 。

圖 17A 至圖 17B 提供實例 4 中所述之活體內 YW412.8.31 抗-BACE1 抗體實驗結果。圖 17A 展示在經兩個不同濃度之 YW412.8.31 抗-BACE1 抗體處理(與媒劑對照處理相比)之小鼠血漿及海馬體中所觀測到之 $A\beta_{1-40}$ 含量的曲線圖。圖 17B 為個體藥物動力學相對於藥效學讀出值之曲線圖, 指示此小鼠模型中對於 YW412.8.31 抗-BACE1 抗體存在 PK/PD 關係。

圖 18A 及圖 18B 展示用 YW412.8.31 抗-BACE1 抗體對 hAPP 轉殖基因小鼠進行全身性給藥(圖 A, 對如圖 17A 中所述之相同實驗再次作圖以供比較)或藉由連續 ICV 輸注給藥(圖 B)之實驗的比較。在圖 18A 中, 動物由 IP 注射(3 次劑量, 各自相隔 4 天(Q4D))接受媒劑或抗-BACE1 抗體(30 mg/kg 或 100 mg/kg)。最後一次給藥後 2 小時, 收集血漿及腦樣品以分析 $A\beta_{1-40}$ 及 $A\beta_{1-42}$ 。在 30 mg/kg 及 100 mg/kg 抗-BACE1 抗體下, 血漿 $A\beta_{1-40}$ 及 $A\beta_{1-42}$ 降至約 30% 對照含量。在高劑量抗-BACE1(100 mg/kg)下, 海馬體 $A\beta_{1-40}$ 及 $A\beta_{1-42}$ 降低(13% 至 22%), 且皮層 $A\beta_{1-40}$ 及 $A\beta_{1-42}$ 展示降低趨勢(12% 至 18%)。在圖 18B 中, 藉由單側 ICV 輸注遞送對照 IgG 或抗-BACE1 抗體, 持續 7 天。在兩個劑量下, 皮層(15% 至 23%)及海馬體(15% 至 20%)中均可見 $A\beta_{1-40}$ 及 $A\beta_{1-42}$ 一致降低。圖 C 展示全身性遞送相對於 ICV 遞送之後腦中抗-BACE1 抗體含量。用於繪製曲線之值為平均值($\pm$ SEM)* $p < 0.05$;

**p<0.001。

圖 19A 及圖 19B 展示經由 IV 注射遞送至 BALB/C 小鼠之單劑量 YW412.8.31 抗-BACE1 (1 mg/kg 或 10 mg/kg) 之 PK 分析 (圖 19A)。分析出截至給藥後 21 天的血清 PK。使用兩種獨立的 PK 分析：一種分析偵測血清中之所有抗-BACE1 (總 mAb)，而一種分析僅偵測血清中之未結合抗-BACE1 (游離 mAb)。BACE1+/+、BACE1+/- 及 BACE1-/- 小鼠中之單劑量 PK 分析證實初步研究中所觀測到之非線性，且指示增強清除實際上為標靶介導 (圖 19B)。

圖 20A 及圖 20B 展示藉由 IV 遞送投與對照 IgG 或 YW412.8.31 抗-BACE1 抗體 (30 mg/kg) 之食蟹獼猴的 PK 分析。如實例 5 中所述，使用猴吸附型山羊抗人類 IgG 多株抗體 (Bethyl, Montgomery, TX) 量測猴血清 (圖 20A) 及 CSF 樣品 (圖 20B) 中之總抗-BACE1 或對照抗體濃度。

圖 21A 至圖 21D 為如實例 5 中所述之實驗的結果，其中藉由 IV 遞送向食蟹獼猴投與對照 IgG 或抗-BACE1 抗體 YW412.8.31。紋線展示個別動物之數據，而實線展示組平均值。在給藥前 7 天、2 天及剛剛給藥前對血漿及 CSF 取樣以設置各個猴子之 $A\beta_{1-40}$ 基線含量平均值。在不同時間量測血漿 $A\beta_{1-40}$ (圖 21A) 及 CSF $A\beta_{1-40}$ (圖 21B)。亦展示不同動物之基線血漿 $A\beta_{1-40}$ (圖 21C) 及 CSF $A\beta_{1-40}$ (圖 21D) 變化。

圖 22A 及圖 22B 描繪野生型小鼠中全身性投與 YW412.8.31 後之 $A\beta$ 產量。圖 22A 為展示藉由 IP 注射向 C57Bl/6J 小鼠投與單劑量之對照 IgG 或 YW412.8.31 (100

mg/kg)後之 $A\beta_{1-40}$ 產量的圖表。4小時後，收集血漿及腦樣品以分析 $A\beta_{1-40}$ 。在此範例中血漿 $A\beta_{1-40}$ 降低48%，但前腦 $A\beta_{1-40}$ 不降低。圖22B為展示藉由3次IP注射(各自相隔4天)投與對照IgG或YW412.8.31(30 mg/kg或100 mg/kg)後之 $A\beta_{1-40}$ 產量的圖表。最後一次給藥後4小時，收集血漿及腦樣品以分析 $A\beta_{1-40}$ 。血漿 $A\beta_{1-40}$ 降低50%至53%，而前腦 $A\beta_{1-40}$ 在以30 mg/kg給藥時不降低，但當以100 mg/kg給藥時降低42%。用於繪製曲線之值為平均值($\pm$ SEM)* $p < 0.0001$ 。

圖23A至圖23C描繪純系YW412.8.31及YW412.8.31之親和力成熟形式的輕鏈胺基酸序列。圖23A至圖23C描繪完全輕鏈序列比對。各純系之HVR序列由方框內區域指示，其中第一個方框指示HVR-L1(SEQ ID NO:7，圖23A)，第二個方框指示HVR-L2(SEQ ID NO:9及58至64，圖23B)，且第三個方框指示HVR-L3(SEQ ID NO:12及66至67，圖23C)。

圖24A至圖24C描繪純系YW412.8.31及YW412.8.31之親和力成熟形式的重鏈胺基酸序列。圖24A至圖24C描繪完全重鏈序列比對。各純系之HVR序列由方框內區域指示，其中第一個方框指示HVR-H1(SEQ ID NO:24及71至73，圖24A)，第二個方框指示HVR-H2(SEQ ID NO:24及74至78，圖24B)，且第三個方框指示HVR-H3(SEQ ID NO:25及79，圖24C)。

圖25A及圖25B描繪展示HTRF分析中YW412.8.31及親和

力成熟純系對BACE1之抑制作用(如實例6中所述)的圖表。測試純系 YW412.8.31.3S 、 YW412.8.31.9S 、 YW412.8.31.25S 、 YW412.8.31.58S 、 YW412.8.31.53 、 YW412.8.31.69 、 YW412.8.31.77 、 YW412.8.31.81S 及 YW412.8.31.89S抑制BACE1之蛋白酶活性的能力。

序列表

<110> 美商建南德克公司
<120> 用於神經疾病免疫療法之方法及組合物
<130> P4453R1
<140> 100140956
<141> 2011-11-09
<150> 61/456,642
<151> 2010-11-10
<150> 61/418,310
<151> 2010-11-30
<150> 61/418,850
<151> 2010-12-01
<150> 61/426,425
<151> 2010-12-22
<160> 210
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成多肽”

<400> 1
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 2
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成多肽”

<400> 2

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Leu Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 3

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /注意= “人工序列之描述：合成多肽”

<400> 3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Asn Asp Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 4

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成多肽”

<400> 4
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Thr Asp Pro Thr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 5
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成多肽”

<400> 5
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Val Val Ala Asn Ser
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Leu Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Ala Thr Ser Pro Pro
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 6
 <211> 108
 <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /注意= “人工序列之描述：合成多肽”

<400> 6

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ala Thr Asp Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 7

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 7

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 8

Arg Ala Ser Gln Val Val Ala Asn Ser Leu Ala
1 5 10

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 9
Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
1 5

<210> 10
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 10
Leu Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
1 5

<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 11
Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
1 5

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 12
Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Leu Pro Thr
1 5

<210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 13
Gln Gln Gly Tyr Asn Asp Pro Pro Thr
1 5

<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 14
Gln Gln Ser Ser Thr Asp Pro Thr Thr
1 5

<210> 15
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 15
Gln Gln Asp Ala Thr Ser Pro Pro Thr
1 5

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 16
Gln Gln Tyr Ala Thr Asp Pro Pro Thr
1 5

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

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成共同序列”

<220>
<221> VARIANT
<222> (5)..(5)
<223> /置換= “Val”

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> /注意= “序列中所提供之殘基相對於該位置之註解不具有優先性”

<220>
<221> VARIANT
<222> (7)..(7)
<223> /置換= “Ala”

<220>
<221> VARIANT
<222> (8)..(8)
<223> /置換= “Asn”

<220>
<221> VARIANT
<222> (9)..(9)
<223> /置換= “Ala”

<220>
<221> VARIANT

<222> (10)..(10)
 <223> /置換= "Leu"
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(10)
 <223> /注意= "序列中所提供之殘相對於該等位置之註解中之位置不具有優先性"

<400> 17
 Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ser Val Ala
 1 5 10

<210> 18
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= "人工序列之描述：合成共同序列"

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (1)..(1)
 <223> /置換= "Leu"

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> /注意= "序列中所提供之殘基相對於該位置之註解不具有優先性"

<400> 18
 Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
 1 5

<210> 19
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= "人工序列之描述：合成共同序列"

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (3)..(3)
 <223> /置換= "Phe" 或 "Gly" 或 "Asp" 或 "Tyr"

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (4)..(4)
 <223> /置換= "Pro" 或 "Ser" 或 "Ala"

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (5)..(5)
 <223> /置換= "Asn"

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (6)..(6)
 <223> /置換= "Tyr" 或 "Asp" 或 "Ser"

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (7)..(7)

<223> /置換= "Leu"

<220>

<221> VARIANT

<222> (8)..(8)

<223> /置換= "Thr"

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(8)

<223> /注意= "序列中所提供之殘相對於該等位置之註解中之位置不具有優先性"

<400> 19

Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
1 5

<210> 20

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /注意= "人工序列之描述：合成多肽"

<400> 20

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 Gly Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala 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 Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 21

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /注意= "人工序列之描述：合成多肽"

<400> 21

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 Leu Gly Tyr
20 25 30
Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala 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 Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 22
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 22
Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Ala Ile His
1 5 10

<210> 23
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 23
Gly Phe Thr Phe Leu Gly Tyr Gly Ile His
1 5 10

<210> 24
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 24
Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 25
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 25
 Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 26
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成共同序列”

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (5)..(5)
 <223> /置換= “Leu”

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> /注意= “序列中所提供之殘基相對於該位置之註解不具有優先性”

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (8)..(8)
 <223> /置換= “Gly”

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> /注意= “序列中所提供之殘基相對於該位置之註解不具有優先性”

<400> 26
 Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Ala Ile His
 1 5 10

<210> 27
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成多肽”

<400> 27
 Glu Ile Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 1 5 10 15

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Phe
 20 25 30

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

Ser

<210> 28
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 28
Gly Phe Asn Phe Tyr Tyr Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 29
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 29
Ala Ser Ile Ser Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 30
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 30
Gln Pro Thr His Tyr Tyr Tyr Tyr Ala Lys Gly Tyr Lys Ala Met Asp
1 5 10 15

Tyr

<210> 31
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成多肽”

<400> 31
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ala
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Ser Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Tyr Ser Pro Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 32
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成多肽”

<400> 32
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ala
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Ser Trp Ala Ser Trp Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Tyr Ser Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 33
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成多肽”

<400> 33
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Trp Tyr Ala Ser Trp Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Tyr Ser Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 34
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成多肽”

<400> 34
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Trp Trp Ala Ser Ser Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Tyr Ser Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 35
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 35
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ala Val Ala
1 5 10

<210> 36
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 36
Ser Ala Ser Ser Leu Tyr Ser
1 5

<210> 37
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 37
Trp Ala Ser Trp Leu Tyr Ser
1 5

<210> 38
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 38
Tyr Ala Ser Trp Leu Tyr Ser
1 5

<210> 39
<211> 7
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 39

Trp Ala Ser Ser Leu Tyr Ser
1 5

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 40

Gln Gln Tyr Ser Tyr Ser Pro Phe Thr
1 5

<210> 41

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /注意= “人工序列之描述：合成共同序列”

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)..(1)

<223> /置換= “Trp” 或 “Tyr”

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> /注意= “序列中所提供之殘基相對於該位置之註解不具有優先性”

<220>

<221> VARIANT

<222> (4)..(4)

<223> /置換= “Trp”

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> /注意= “序列中所提供之殘基相對於該位置之註解不具有優先性”

<400> 41

Ser Ala Ser Ser Leu Tyr Ser
1 5

<210> 42

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /注意= “人工序列之描述：合成共同序列”

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (5)..(5)
 <223> /置換= “Asp” 或 “Val”

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> /注意= “序列中所提供之殘基相對於該位置之註解不具有優先性”

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (7)..(7)
 <223> /置換= “Ala”

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (8)..(8)
 <223> /置換= “Thr” 或 “Asn”

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (9)..(9)
 <223> /置換= “Ser”

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (10)..(10)
 <223> /置換= “Leu”

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(10)
 <223> /注意= “序列中所提供之殘相對於該等位置之註解中之位置不具有優先性”

<400> 42
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ala Val Ala
 1 5 10

<210> 43
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成共同序列”

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (1)..(1)
 <223> /置換= “Trp” 或 “Tyr” 或 “Leu”

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> /注意= “序列中所提供之殘基相對於該位置之註解不具有優先性”

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (4)..(4)
 <223> /置換= “Ser” 或 “Trp”

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> /注意= “序列中所提供之殘基相對於該位置之註解不具有優先性”

<400> 43
 Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
 1 5

<210> 44
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成共同序列”

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (3)..(3)
 <223> /置換= “Phe” 或 “Gly” 或 “Asp” 或 “Tyr”

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (4)..(4)
 <223> /置換= “Pro” 或 “Ser” 或 “Ala”

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (5)..(5)
 <223> /置換= “Thr” 或 “Asn”

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (6)..(6)
 <223> /置換= “Tyr” 或 “Asp” 或 “Ser”

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (7)..(7)
 <223> /置換= “Leu”

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (8)..(8)
 <223> /置換= “Pro” 或 “Thr”

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(8)
 <223> /注意= “序列中所提供之殘相對於該等位置之註解中之位置不具有優先性”

<400> 44
 Gln Gln Ser Tyr Tyr Thr Pro Phe Thr
 1 5

<210> 45
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成共同序列”

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (3)..(3)
 <223> /置換= “Thr”

<220>

<221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> /注意= “序列中所提供之殘基相對於該位置之註解不具有優先性”

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (5)..(5)
 <223> /置換= “Leu” 或 “Tyr”

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (6)..(6)
 <223> /置換= “Tyr”

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (7)..(7)
 <223> /置換= “Ser”

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (8)..(8)
 <223> /置換= “Gly” 或 “Ser”

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(8)
 <223> /注意= “序列中所提供之殘相對於該等位置之註解中之位置不具有優先性”

<400> 45
 Gly Phe Asn Phe Ser Gly Tyr Ala Ile His
 1 5 10

<210> 46
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成共同序列”

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (1)..(1)
 <223> /置換= “Gly”

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (2)..(2)
 <223> /置換= “Ser”

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> /注意= “序列中所提供之殘相對於該等位置之註解中之位置不具有優先性”

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (6)..(6)
 <223> /置換= “Tyr”

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (7)..(7)
 <223> /置換= “Ser”

<220>
 <221> misc_feature

<222> (6)..(7)
 <223> /注意=“序列中所提供之殘相對於該等位置之註解中之位置不具有優先性”

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (9)..(9)
 <223> /置換=“Tyr”

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> /注意=“序列中所提供之殘基相對於該位置之註解不具有優先性”

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (11)..(11)
 <223> /置換=“Ser”

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> /注意=“序列中所提供之殘基相對於該位置之註解不具有優先性”

<400> 46
 Ala Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15

Lys Gly

<210> 47
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意=“人工序列之描述：合成共同序列”

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (1)..(1)
 <223> /置換=“Gly”

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> /注意=“序列中所提供之殘基相對於該位置之註解不具有優先性”

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (3)..(3)
 <223> /置換=“Phe”

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (4)..(4)
 <223> /置換=“Ser”

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (5)..(5)
 <223> /置換=“Pro”

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

<223> /置換= "Trp"

<220>

<221> VARIANT

<222> (7)..(7)

<223> /置換= "Val"

<220>

<221> VARIANT

<222> (8)..(14)

<223> /置換= " "

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(14)

<223> /注意= "序列中所提供之殘相對於該等位置之註解中之位置不具有優先性"

<220>

<221> misc_feature

<222> (8)..(14)

<223> /注意= "當存在時，此區域以整體存在"

<400> 47

Gln Pro Thr His Tyr Tyr Tyr Tyr Ala Lys Gly Tyr Lys Ala Met Asp
1 5 10 15

Tyr

<210> 48

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /注意= "人工序列之描述：合成肽"

<400> 48

Tyr Ala Lys Gly Tyr Lys Ala
1 5

<210> 49

<211> 501

<212> PRT

<213> 智人

<400> 49

Met Ala Gln Ala Leu Pro Trp Leu Leu Leu Trp Met Gly Ala Gly Val
1 5 10 15

Leu Pro Ala His Gly Thr Gln His Gly Ile Arg Leu Pro Leu Arg Ser
20 25 30

Gly Leu Gly Gly Ala Pro Leu Gly Leu Arg Leu Pro Arg Glu Thr Asp
35 40 45

Glu Glu Pro Glu Glu Pro Gly Arg Arg Gly Ser Phe Val Glu Met Val
50 55 60

Asp Asn Leu Arg Gly Lys Ser Gly Gln Gly Tyr Tyr Val Glu Met Thr
65 70 75 80

Val Gly Ser Pro Pro Gln Thr Leu Asn Ile Leu Val Asp Thr Gly Ser
85 90 95

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

385 390 395 400
 Gly Phe Tyr Val Val Phe Asp Arg Ala Arg Lys Arg Ile Gly Phe Ala
 405 410 415
 Val Ser Ala Cys His Val His Asp Glu Phe Arg Thr Ala Ala Val Glu
 420 425 430
 Gly Pro Phe Val Thr Leu Asp Met Glu Asp Cys Gly Tyr Asn Ile Pro
 435 440 445
 Gln Thr Asp Glu Ser Thr Leu Met Thr Ile Ala Tyr Val Met Ala Ala
 450 455 460
 Ile Cys Ala Leu Phe Met Leu Pro Leu Cys Leu Met Val Cys Gln Trp
 465 470 475 480
 Cys Cys Leu Arg Cys Leu Arg Gln Gln His Asp Asp Phe Ala Asp Asp
 485 490 495
 Ile Ser Leu Leu Lys
 500
 <210> 50
 <211> 476
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 50
 Met Ala Gln Ala Leu Pro Trp Leu Leu Leu Trp Met Gly Ala Gly Val
 1 5 10 15
 Leu Pro Ala His Gly Thr Gln His Gly Ile Arg Leu Pro Leu Arg Ser
 20 25 30
 Gly Leu Gly Gly Ala Pro Leu Gly Leu Arg Leu Pro Arg Glu Thr Asp
 35 40 45
 Glu Glu Pro Glu Glu Pro Gly Arg Arg Gly Ser Phe Val Glu Met Val
 50 55 60
 Asp Asn Leu Arg Gly Lys Ser Gly Gln Gly Tyr Tyr Val Glu Met Thr
 65 70 75 80
 Val Gly Ser Pro Pro Gln Thr Leu Asn Ile Leu Val Asp Thr Gly Ser
 85 90 95
 Ser Asn Phe Ala Val Gly Ala Ala Pro His Pro Phe Leu His Arg Tyr
 100 105 110
 Tyr Gln Arg Gln Leu Ser Ser Thr Tyr Arg Asp Leu Arg Lys Gly Val
 115 120 125
 Tyr Val Pro Tyr Thr Gln Gly Lys Trp Glu Gly Glu Leu Gly Thr Asp
 130 135 140
 Leu Val Ser Ile Pro His Gly Pro Asn Val Thr Val Arg Ala Asn Ile
 145 150 155 160

Ala Ala Ile Thr Glu Ser Asp Lys Phe Phe Ile Asn Gly Ser Asn Trp
165 170 175

Glu Gly Ile Leu Gly Leu Ala Tyr Ala Glu Ile Ala Arg Leu Cys Gly
180 185 190

Ala Gly Phe Pro Leu Asn Gln Ser Glu Val Leu Ala Ser Val Gly Gly
195 200 205

Ser Met Ile Ile Gly Gly Ile Asp His Ser Leu Tyr Thr Gly Ser Leu
210 215 220

Trp Tyr Thr Pro Ile Arg Arg Glu Trp Tyr Tyr Glu Val Ile Ile Val
225 230 235 240

Arg Val Glu Ile Asn Gly Gln Asp Leu Lys Met Asp Cys Lys Glu Tyr
245 250 255

Asn Tyr Asp Lys Ser Ile Val Asp Ser Gly Thr Thr Asn Leu Arg Leu
260 265 270

Pro Lys Lys Val Phe Glu Ala Ala Val Lys Ser Ile Lys Ala Ala Ser
275 280 285

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

Cys Trp Gln Ala Gly Thr Thr Pro Trp Asn Ile Phe Pro Val Ile Ser
305 310 315 320

Leu Tyr Leu Met Gly Glu Val Thr Asn Gln Ser Phe Arg Ile Thr Ile
325 330 335

Leu Pro Gln Gln Tyr Leu Arg Pro Val Glu Asp Val Ala Thr Ser Gln
340 345 350

Asp Asp Cys Tyr Lys Phe Ala Ile Ser Gln Ser Ser Thr Gly Thr Val
355 360 365

Met Gly Ala Val Ile Met Glu Gly Phe Tyr Val Val Phe Asp Arg Ala
370 375 380

Arg Lys Arg Ile Gly Phe Ala Val Ser Ala Cys His Val His Asp Glu
385 390 395 400

Phe Arg Thr Ala Ala Val Glu Gly Pro Phe Val Thr Leu Asp Met Glu
405 410 415

Asp Cys Gly Tyr Asn Ile Pro Gln Thr Asp Glu Ser Thr Leu Met Thr
420 425 430

Ile Ala Tyr Val Met Ala Ala Ile Cys Ala Leu Phe Met Leu Pro Leu
435 440 445

Cys Leu Met Val Cys Gln Trp Cys Cys Leu Arg Cys Leu Arg Gln Gln

450

455

460

His Asp Asp Phe Ala Asp Asp Ile Ser Leu Leu Lys
465 470 475

<210> 51
<211> 457
<212> PRT
<213> 智人

<400> 51
Met Ala Gln Ala Leu Pro Trp Leu Leu Leu Trp Met Gly Ala Gly Val
1 5 10 15

Leu Pro Ala His Gly Thr Gln His Gly Ile Arg Leu Pro Leu Arg Ser
20 25 30

Gly Leu Gly Gly Ala Pro Leu Gly Leu Arg Leu Pro Arg Glu Thr Asp
35 40 45

Glu Glu Pro Glu Glu Pro Gly Arg Arg Gly Ser Phe Val Glu Met Val
50 55 60

Asp Asn Leu Arg Gly Lys Ser Gly Gln Gly Tyr Tyr Val Glu Met Thr
65 70 75 80

Val Gly Ser Pro Pro Gln Thr Leu Asn Ile Leu Val Asp Thr Gly Ser
85 90 95

Ser Asn Phe Ala Val Gly Ala Ala Pro His Pro Phe Leu His Arg Tyr
100 105 110

Tyr Gln Arg Gln Leu Ser Ser Thr Tyr Arg Asp Leu Arg Lys Gly Val
115 120 125

Tyr Val Pro Tyr Thr Gln Gly Lys Trp Glu Gly Glu Leu Gly Thr Asp
130 135 140

Leu Pro Asp Asp Ser Leu Glu Pro Phe Phe Asp Ser Leu Val Lys Gln
145 150 155 160

Thr His Val Pro Asn Leu Phe Ser Leu Gln Leu Cys Gly Ala Gly Phe
165 170 175

Pro Leu Asn Gln Ser Glu Val Leu Ala Ser Val Gly Gly Ser Met Ile
180 185 190

Ile Gly Gly Ile Asp His Ser Leu Tyr Thr Gly Ser Leu Trp Tyr Thr
195 200 205

Pro Ile Arg Arg Glu Trp Tyr Tyr Glu Val Ile Ile Val Arg Val Glu
210 215 220

Ile Asn Gly Gln Asp Leu Lys Met Asp Cys Lys Glu Tyr Asn Tyr Asp
225 230 235 240

Lys Ser Ile Val Asp Ser Gly Thr Thr Asn Leu Arg Leu Pro Lys Lys
245 250 255

Val Phe Glu Ala Ala Val Lys Ser Ile Lys Ala Ala Ser Ser Thr Glu
260 265 270

Lys Phe Pro Asp Gly Phe Trp Leu Gly Glu Gln Leu Val Cys Trp Gln
275 280 285

Ala Gly Thr Thr Pro Trp Asn Ile Phe Pro Val Ile Ser Leu Tyr Leu
290 295 300

Met Gly Glu Val Thr Asn Gln Ser Phe Arg Ile Thr Ile Leu Pro Gln
305 310 315 320

Gln Tyr Leu Arg Pro Val Glu Asp Val Ala Thr Ser Gln Asp Asp Cys
325 330 335

Tyr Lys Phe Ala Ile Ser Gln Ser Ser Thr Gly Thr Val Met Gly Ala
340 345 350

Val Ile Met Glu Gly Phe Tyr Val Val Phe Asp Arg Ala Arg Lys Arg
355 360 365

Ile Gly Phe Ala Val Ser Ala Cys His Val His Asp Glu Phe Arg Thr
370 375 380

Ala Ala Val Glu Gly Pro Phe Val Thr Leu Asp Met Glu Asp Cys Gly
385 390 395 400

Tyr Asn Ile Pro Gln Thr Asp Glu Ser Thr Leu Met Thr Ile Ala Tyr
405 410 415

Val Met Ala Ala Ile Cys Ala Leu Phe Met Leu Pro Leu Cys Leu Met
420 425 430

Val Cys Gln Trp Cys Cys Leu Arg Cys Leu Arg Gln Gln His Asp Asp
435 440 445

Phe Ala Asp Asp Ile Ser Leu Leu Lys
450 455

<210> 52
<211> 432
<212> PRT
<213> 智人

<400> 52
Met Ala Gln Ala Leu Pro Trp Leu Leu Leu Trp Met Gly Ala Gly Val
1 5 10 15

Leu Pro Ala His Gly Thr Gln His Gly Ile Arg Leu Pro Leu Arg Ser
20 25 30

Gly Leu Gly Gly Ala Pro Leu Gly Leu Arg Leu Pro Arg Glu Thr Asp
35 40 45

Glu Glu Pro Glu Glu Pro Gly Arg Arg Gly Ser Phe Val Glu Met Val
50 55 60

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

Leu Asp Met Glu Asp Cys Gly Tyr Asn Ile Pro Gln Thr Asp Glu Ser
370 375 380

Thr Leu Met Thr Ile Ala Tyr Val Met Ala Ala Ile Cys Ala Leu Phe
385 390 395 400

Met Leu Pro Leu Cys Leu Met Val Cys Gln Trp Cys Cys Leu Arg Cys
405 410 415

Leu Arg Gln Gln His Asp Asp Phe Ala Asp Asp Ile Ser Leu Leu Lys
420 425 430

<210> 53
<211> 27
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<220>
<221> source
<223> /注意= “N末端生物素”

<400> 53
Lys Thr Glu Glu Ile Ser Glu Val Asn Leu Asp Ala Glu Phe Arg His
1 5 10 15

Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu
20 25

<210> 54
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<220>
<221> source
<223> /注意= “N末端Rh”

<220>
<221> source
<223> /注意= “C末端淬灭剂”

<400> 54
Glu Val Asn Leu Asp Ala Glu Phe Lys
1 5

<210> 55
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “N末端FAM”

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “C末端CONH₂”

<400> 55
 Lys Thr Glu Glu Ile Ser Glu Val Asn Leu Asp Ala Glu Phe Arg Trp
 1 5 10 15

Lys Lys

<210> 56
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成共同序列”

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (1)..(1)
 <223> /置換= “Phe”

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> /注意= “序列中所提供之殘基相對於該位置之註解不具有優先性”

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (4)..(4)
 <223> /置換= “Tyr”

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (5)..(5)
 <223> /置換= “Arg”

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(5)
 <223> /注意= “序列中所提供之殘相對於該等位置之註解中之位置不具有優先性”

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (7)..(7)
 <223> /置換= “Pro” 或 “Arg” 或 “Lys” 或 “Trp”

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> /注意= “序列中所提供之殘基相對於該位置之註解不具有優先性”

<400> 56
 Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
 1 5

<210> 57
 <211> 9

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成共同序列”

<220>
<221> VARIANT
<222> (7)..(7)
<223> /置換= “Gln” 或 “Ser” 或 “Lys”

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> /注意= “序列中所提供之殘基相對於該位置之註解不具有優先性”

<400> 57
Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Leu Pro Thr
1 5

<210> 58
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 58
Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Ser
1 5

<210> 59
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 59
Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Pro
1 5

<210> 60
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 60
Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Arg
1 5

<210> 61
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 61
 Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Lys
 1 5

<210> 62
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 62
 Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Trp
 1 5

<210> 63
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 63
 Phe Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
 1 5

<210> 64
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 64
 Phe Ala Ser Phe Arg Tyr Ser
 1 5

<210> 65
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 65
 Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Gln Pro Thr
 1 5

<210> 66
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 66
 Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Ser Pro Thr
 1 5

<210> 67
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 67
 Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Lys Pro Thr
 1 5

<210> 68
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成共同序列”

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (2)..(2)
 <223> /置換= “Tyr”

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (3)..(3)
 <223> /置換= “Phe”

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (4)..(4)
 <223> /置換= “Tyr”

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (5)..(5)
 <223> /置換= “Gln” 或 “Ile”

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(5)
 <223> /注意= “序列中所提供之殘相對於該等位置之註解中之位置不具有優先性”

<400> 68
 Gly Phe Thr Phe Leu Gly Tyr Gly Ile His
 1 5 10

<210> 69
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成共同序列”

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (6)..(6)
 <223> /置換= “Ser” 或 “Gln”

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (7)..(7)
 <223> /置換= “Ser”

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(7)
 <223> /注意= “序列中所提供之殘相對於該等位置之註解中之位置不具有優先性”

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (9)..(9)
 <223> /置換= “Lys” 或 “Leu”

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (10)..(10)
 <223> /置換= “Tyr”

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(10)
 <223> /注意= “序列中所提供之殘相對於該等位置之註解中之位置不具有優先性”

<400> 69
 Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15

Lys Gly

<210> 70
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成共同序列”

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (4)..(4)
 <223> /置換= “Tyr”

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> /注意= “序列中所提供之殘基相對於該位置之註解不具有優先性”

<400> 70
 Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 71
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 71
Gly Phe Phe Phe Gln Gly Tyr Gly Ile His
1 5 10

<210> 72
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 72
Gly Phe Phe Phe Leu Gly Tyr Gly Ile His
1 5 10

<210> 73
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 73
Gly Tyr Thr Tyr Ile Gly Tyr Gly Ile His
1 5 10

<210> 74
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 74
Gly Trp Ile Ser Pro Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 75
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 75
Gly Trp Ile Ser Pro Gln Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 76
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 76
Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Lys Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 77
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 77
Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Leu Tyr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 78
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 78
Gly Trp Ile Ser Pro Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 79
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 79
Gly Pro Phe Tyr Pro Trp Val Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 80
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成多肽”

<400> 80
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 Leu Gly Tyr
20 25 30
Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Gly Trp Ile Ser Pro Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala 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 Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 81
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成多肽”

<400> 81
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 Leu Gly Tyr
20 25 30
Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Gly Trp Ile Ser Pro Gln Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala 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 Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 82
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成多肽”

<400> 82
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 Leu Gly Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala 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 Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 83
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成多肽”

<400> 83
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 Phe Phe Gln Gly Tyr
20 25 30

Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

45

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

223> /注意= “人工序列之描述：合成多肽”

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<223> /注意=“人工序列之描述：合成多肽”

<400> 85
 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 Phe Phe Leu Gly Tyr
 20 25 30

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

Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala 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 Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 86
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成多肽”

<400> 86
 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 Leu Gly Tyr
 20 25 30

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

Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala 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 Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 87
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成多肽”

<400> 87
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 Leu Gly Tyr
20 25 30
Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala 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 Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 88
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成多肽”

<400> 88
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 Leu Gly Tyr
20 25 30
Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala 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 Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 89
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成多肽”

<400> 89
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 Leu Gly Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala 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 Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 90
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成多肽”

<400> 90
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 Phe Phe Leu Gly Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala 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 Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 91
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成多肽”

<400> 91
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 Phe Phe Leu Gly Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala 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 Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 92
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成多肽”

<400> 92

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 Leu Gly Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Lys Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala 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 Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 93

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /注意= “人工序列之描述：合成多肽”

<400> 93

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 Leu Gly Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala 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 Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 94
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成多肽”

<400> 94
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 Leu Gly Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala 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 Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 95
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成多肽”

<400> 95
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 Leu Gly Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Leu Tyr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala 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 Gly Pro Phe Tyr Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 96
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成多肽”

<400> 96
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 Tyr Thr Tyr Ile Gly Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Ser Pro Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala 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 Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 97
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成多肽”

<400> 97
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 Leu Gly Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala 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 Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 98
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成多肽”

<400> 98
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 Leu Gly Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala 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 Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 99
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source

<223> /注意= “人工序列之描述：合成多肽”

<400> 99

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Leu Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 100

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /注意= “人工序列之描述：合成多肽”

<400> 100

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Leu Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 101

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /注意= “人工序列之描述：合成多肽”

<400> 101

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Leu Pro
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 102

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /注意= “人工序列之描述：合成多肽”

<400> 102

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Leu Pro
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 103

<211> 108
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成多肽”

<400> 103
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Gln Pro
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 104
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成多肽”

<400> 104
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Leu Pro
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 105
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成多肽”

<400> 105
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Leu Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 106
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成多肽”

<400> 106
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Ser Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 107
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成多肽”

<400> 107
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Lys Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 108
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成多肽”

<400> 108
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Arg Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Lys Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 109
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成多肽”

<400> 109
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Gln Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 110
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成多肽”

<400> 110
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Leu Pro
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 111
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成多肽”

<400> 111
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Ser Pro
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 112
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成多肽”

<400> 112
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Ser Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 113

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /注意= “人工序列之描述：合成多肽”

<400> 113

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Trp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Lys Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 114

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /注意= “人工序列之描述：合成多肽”

<400> 114

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Leu Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 115

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /注意= “人工序列之描述：合成多肽”

<400> 115

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Leu Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 116

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /注意= “人工序列之描述：合成多肽”

<400> 116

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Phe Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Leu Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 117
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成多肽”

<400> 117
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Phe Ala Ser Phe Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Leu Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

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

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成共同序列”

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)..(1)
<223> /置换= “Trp” 或 “Tyr” 或 “Leu”

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> /注意= “序列中所提供之殘基相對於該位置之註解不具有優先性”

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (4)..(4)
 <223> /置換= “Ser” 或 “Tyr” 或 “Trp”

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (5)..(5)
 <223> /置換= “Arg”

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(5)
 <223> /注意= “序列中所提供之殘基相對於該位置之註解不具有優先性”

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (7)..(7)
 <223> /置換= “Pro” 或 “Arg” 或 “Lys” 或 “Trp”

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> /注意= “序列中所提供之殘基相對於該位置之註解不具有優先性”

<400> 118
 Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
 1 5

<210> 119
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成共同序列”

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (3)..(3)
 <223> /置換= “Phe” 或 “Gly” 或 “Asp” 或 “Tyr”

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (4)..(4)
 <223> /置換= “Pro” 或 “Ser” 或 “Ala”

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (5)..(5)
 <223> /置換= “Thr” 或 “Asn”

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (6)..(6)
 <223> /置換= “Tyr” 或 “Asp” 或 “Ser”

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (7)..(7)
 <223> /置換= “Gln” 或 “Ser” 或 “Lys” 或 “Leu”

<220>

<221> VARIANT
<222> (8)..(8)
<223> /置換= “Pro” 或 “Thr”

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(8)
<223> /注意= “序列中所提供之殘相對於該等位置之註解中之位置不具有優先性”

<400> 119
Gln Gln Ser Tyr Tyr Thr Pro Phe Thr
1 5

<210> 120
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成共同序列”

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)..(2)
<223> /置換= “Tyr”

<220>
<221> VARIANT
<222> (3)..(3)
<223> /置換= “Asn” 或 “Thr”

<220>
<221> VARIANT
<222> (4)..(4)
<223> /置換= “Tyr”

<220>
<221> VARIANT
<222> (5)..(5)
<223> /置換= “Gln” 或 “Ile” 或 “Ser” 或 “Tyr”

<220>
<221> VARIANT
<222> (6)..(6)
<223> /置換= “Tyr”

<220>
<221> VARIANT
<222> (7)..(7)
<223> /置換= “Ser”

<220>
<221> VARIANT
<222> (8)..(8)
<223> /置換= “Gly” 或 “Ser”

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(8)
<223> /注意= “序列中所提供之殘相對於該等位置之註解中之位置不具有優先性”

<400> 120
Gly Phe Phe Phe Leu Gly Tyr Ala Ile His
1 5 10

<210> 121
<211> 18
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /注意= “人工序列之描述：合成共同序列”

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)..(1)

<223> /置換= “Gly”

<220>

<221> VARIANT

<222> (2)..(2)

<223> /置換= “Ser”

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> /注意= “序列中所提供之殘相對於該等位置之註解中之位置不具有優先性”

<220>

<221> VARIANT

<222> (6)..(6)

<223> /置換= “Ser” 或 “Gln” 或 “Tyr”

<220>

<221> VARIANT

<222> (7)..(7)

<223> /置換= “Ser”

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(7)

<223> /注意= “序列中所提供之殘相對於該等位置之註解中之位置不具有優先性”

<220>

<221> VARIANT

<222> (9)..(9)

<223> /置換= “Lys” 或 “Leu” 或 “Tyr”

<220>

<221> VARIANT

<222> (10)..(10)

<223> /置換= “Tyr”

<220>

<221> VARIANT

<222> (11)..(11)

<223> /置換= “Ser”

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)..(11)

<223> /注意= “序列中所提供之殘相對於該等位置之註解中之位置不具有優先性”

<400> 121

Ala	Trp	Ile	Ser	Pro	Ala	Gly	Gly	Ser	Thr	Asp	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
1				5				10						15	

Lys Gly

<10> 122

<11> 17

<12> PRT

<13> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成共同序列”

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)..(1)
<223> /置換= “Gly”

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> /注意= “序列中所提供之殘相對於該等位置之註解中之位置不具有優先性”

<220>
<221> VARIANT
<222> (3)..(3)
<223> /置換= “Phe”

<220>
<221> VARIANT
<222> (4)..(4)
<223> /置換= “Tyr” 或 “Ser”

<220>
<221> VARIANT
<222> (5)..(5)
<223> /置換= “Pro”

<220>
<221> VARIANT
<222> (6)..(6)
<223> /置換= “Trp”

<220>
<221> VARIANT
<222> (7)..(7)
<223> /置換= “Val”

<220>
<221> VARIANT
<222> (8)..(14)
<223> /置換= “ ”

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(14)
<223> /注意= “序列中所提供之殘相對於該等位置之註解中之位置不具有優先性”

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(14)
<223> /注意= “當存在時，此區域以整體存在”

<400> 122
Gln Pro Thr His Tyr Tyr Tyr Tyr Ala Lys Gly Tyr Lys Ala Met Asp
1 5 10 15

Tyr

<210> 123
<211> 30
<212> PRT
<213> 智人

<400> 123
Ala Ser Ser Thr Glu Lys Phe Pro Asp Gly Phe Trp Leu Gly Glu Gln
1 5 10 15

Leu Val Cys Trp Gln Ala Gly Thr Thr Pro Trp Asn Ile Phe
20 25 30

<210> 124
<211> 30
<212> PRT
<213> 智人

<400> 124
Ala Ser Leu Ile Pro Glu Phe Ser Asp Gly Phe Trp Thr Gly Ser Gln
1 5 10 15

Leu Ala Cys Trp Thr Asn Ser Glu Thr Pro Trp Ser Tyr Phe
20 25 30

<210> 125
<211> 18
<212> PRT
<213> 智人

<400> 125
Val Pro Leu Thr Gln Gly Glu Tyr Met Ile Pro Cys Glu Lys Val Ser
1 5 10 15

Thr Leu

<210> 126
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 126
Ala Gly Phe Pro Leu Asn Gln Ser Glu Val Leu Ala Ser Val
1 5 10

<210> 127
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 127
Glu Lys Phe Pro
1

<210> 128
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 128
Gln Leu Val Cys Trp Gln Ala
1 5

<210> 129

<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 129
Pro Phe Ser Pro Trp
1 5

<210> 130
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 130
Asp Val Ala Thr Ser Gln Asp Asp Cys Tyr
1 5 10

<210> 131
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 131
Met Gly Ala Gly Leu Asn Tyr Glu Cys Tyr
1 5 10

<210> 132
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 132
Ser Gln Ala Gly Lys Thr Leu Cys Leu
1 5

<210> 133
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 133
Ser Val Ser Ser Ala Val
1 5

<210> 134
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 134
Tyr Ser Ala Ser Ser
1 5

<210> 135

<211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 135
 Tyr Ser Ser Ser Tyr Ser Pro Val
 1 5

<210> 136
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 136
 Ser Tyr Ser Tyr Tyr Tyr Pro Leu
 1 5

<210> 137
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 137
 Ser Tyr Ser Tyr Ser Leu Ile
 1 5

<210> 138
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 138
 Ser Ser Ser Ser Leu Phe
 1 5

<210> 139
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 139
 Tyr Tyr Tyr Ser Leu Phe
 1 5

<210> 140

<211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 140
 Ser Tyr Tyr Ser Tyr Ser Leu Val
 1 5

<210> 141
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 141
 Ser Tyr Ser Tyr Ser Ser Pro Ile
 1 5

<210> 142
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 142
 Ser Ser Ser Ser Tyr Ser Pro Leu
 1 5

<210> 143
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 143
 Ser Tyr Tyr Ser Ser Ser Leu Ile
 1 5

<210> 144
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 144
 Tyr Tyr Ser Ser Ser Leu Val
 1 5

<210> 145

<211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 145
 Tyr Ser Tyr Ser Pro Phe
 1 5

<210> 146
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 146
 Tyr Ser Tyr Ser Tyr Ser Pro Ile
 1 5

<210> 147
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 147
 Tyr Ser Tyr Tyr Ser Leu Phe
 1 5

<210> 148
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 148
 Ser Ser Tyr Ser Ser Leu Val
 1 5

<210> 149
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 149
 Ser Tyr Tyr Tyr Ser Pro Phe
 1 5

<210> 150

<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 150
Ser Tyr Ser Tyr Pro Val
1 5

<210> 151
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 151
Ser Ser Ser Ser Tyr Tyr Leu Leu
1 5

<210> 152
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 152
Ser Tyr Tyr Tyr Pro Leu
1 5

<210> 153
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 153
Phe Tyr Ser Ser Tyr Ile
1 5

<210> 154
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 154
Ile Tyr Tyr Ser Ser Met
1 5

<210> 155

<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 155
Phe Tyr Tyr Tyr Ser Met
1 5

<210> 156
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 156
Ile Tyr Ser Tyr Ser Met
1 5

<210> 157
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 157
Leu Ser Tyr Ser Tyr Ile
1 5

<210> 158
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 158
Phe Tyr Tyr Ser Ser Ile
1 5

<210> 159
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 159
Phe Ser Ser Tyr Tyr Ile
1 5

<210> 160

<211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 160
 Val Ser Tyr Tyr Tyr Ile
 1 5

<210> 161
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 161
 Val Ser Ser Ser Tyr Met
 1 5

<210> 162
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 162
 Val Ser Ser Ser Ser Met
 1 5

<210> 163
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 163
 Phe Tyr Tyr Ser Tyr Met
 1 5

<210> 164
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 164
 Phe Tyr Ser Tyr Ser Met
 1 5

<210> 165

<211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 165
 Leu Tyr Tyr Ser Ser Ile
 1 5

<210> 166
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 166
 Val Ser Ser Ser Tyr Ile
 1 5

<210> 167
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 167
 Val Tyr Tyr Ser Tyr Met
 1 5

<210> 168
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 168
 Ser Ile Ser Pro Tyr Ser Ser Ser Thr Tyr
 1 5 10

<210> 169
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 169
 Tyr Ile Ser Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr
 1 5 10

<210> 170

<211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 170
 Tyr Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr
 1 5 10

<210> 171
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 171
 Ser Ile Ser Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Ser
 1 5 10

<210> 172
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 172
 Ser Ile Tyr Ser Ser Tyr Gly Ser Thr Tyr
 1 5 10

<210> 173
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 173
 Tyr Ile Ser Pro Tyr Ser Gly Ser Thr Ser
 1 5 10

<210> 174
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 174
 Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser
 1 5 10

<210> 175

<211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 175
 Ser Ile Ser Pro Ser Ser Gly Ser Thr Ser
 1 5 10

<210> 176
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 176
 Ser Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr
 1 5 10

<210> 177
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 177
 Ser Ile Tyr Pro Tyr Tyr Ser Ser Thr Tyr
 1 5 10

<210> 178
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 178
 Ser Ile Tyr Pro Tyr Ser Ser Ser Thr Ser
 1 5 10

<210> 179
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 179
 Tyr Ile Ser Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Tyr
 1 5 10

<210> 180

<211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 180
 Ser Ile Tyr Ser Ser Gly Tyr Thr Ser
 1 5 10

<210> 181
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 181
 Ser Ile Tyr Pro Tyr Ser Ser Tyr Thr Tyr
 1 5 10

<210> 182
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 182
 Tyr Ile Tyr Pro Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser
 1 5 10

<210> 183
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 183
 Ser Ile Tyr Pro Tyr Ser Ser Ser Thr Tyr
 1 5 10

<210> 184
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 184
 Arg Ser Ser Ser Tyr Lys Ile Ser Gly Tyr Glu Leu Met Tyr Tyr Glu
 1 5 10 15

Tyr Ala Met Asp

<210> 185
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 185
 Arg Asp Gly Met Tyr Tyr Arg Gly Phe Asp
 1 5 10

<210> 186
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 186
 Arg Asn Ser Tyr Gly Tyr Arg Ala Leu Asp
 1 5 10

<210> 187
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 187
 Arg Ala Tyr Ser Met Tyr Pro Trp Asn Val Gly Phe Asp
 1 5 10

<210> 188
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 188
 Arg Ser Tyr His His Ser Asp Lys Tyr Tyr Tyr Ala Trp Ser Tyr Ala
 1 5 10 15

Leu Asp

<210> 189
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 189
 Arg Gly Gly Tyr Trp Tyr Tyr Phe Tyr Asp Gly Gly Ile Asp
 1 5 10

<210> 190
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 190
 Arg Lys Ser Asn Arg Tyr Ser Arg Val Tyr Phe Gly Met Asp
 1 5 10

<210> 191
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 191
 Arg Ile Gly Ser Tyr Phe Tyr Tyr Tyr Gly Tyr Asn Val His Tyr Asn
 1 5 10 15

Gly Met Asp

<210> 192
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 192
 Arg Tyr Gly Tyr Ser Gly Lys Gly Phe Asp
 1 5 10

<210> 193
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 193
 Arg Pro Asn Arg Tyr Gly Leu Val Gly Ser Gly Leu Asp
 1 5 10

<210> 194
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 194
Arg Lys Ser Asn Arg Tyr Ser Arg Val Ser Phe Gly Met Asp
1 5 10

<210> 195
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 195
Arg Gln Pro Thr His Tyr Tyr Tyr Tyr Ala Lys Gly Tyr Lys Ala Met
1 5 10 15

Asp

<210> 196
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 196
Arg Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Gly Ile Asp
1 5 10

<210> 197
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 197
Arg Tyr Ser Tyr Tyr Trp Leu Ala Leu Asp
1 5 10

<210> 198
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 198
Arg Tyr Ser Asp Tyr Tyr Tyr Phe Phe Pro Ser Tyr Val Tyr Gly Gly
1 5 10 15

Ala Met Asp

<210> 199
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 199
Arg Glu Ser Phe Tyr Tyr Thr Asn Tyr Ala Phe Asp
1 5 10

<210> 200
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 200
Arg Tyr Phe Trp Ser Tyr Asn Ser Phe Ala Gln Ser Phe Trp Ala Met
1 5 10 15

Asp

<210> 201
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 201
Arg Ser Gln Thr Thr Asp Tyr Leu Gly Phe Tyr Ile Ser Tyr Thr Gly
1 5 10 15

Ala Leu Asp

<210> 202
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 202
Arg Tyr Gly Phe Tyr Tyr Ser Tyr Glu Tyr Ala Phe Asp
1 5 10

<210> 203
<211> 7
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 203

Tyr Ser Tyr Ser Tyr Ser Val
1 5

<210> 204

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 204

Ser Trp Ala Ser Trp
1 5

<210> 205

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 205

Trp Tyr Ala Ser Trp
1 5

<210> 206

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 206

Trp Trp Ala Ser Ser
1 5

<210> 207

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 207

Ser Tyr Ala Ser Tyr
1 5

<210> 208

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 208

Tyr Ser Tyr Ser Leu Leu
1 5

<210> 209

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 209

Tyr Tyr Pro Leu
1

<210> 210

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /注意= “人工序列之描述：合成6×His標籤”

<400> 210

His His His His His His
1 5

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：100/40956

※ 申請日：100.11.9

※IPC 分類：
C07K 16/40 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
G01N 33/573 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 27/06 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

用於神經疾病免疫療法之方法及組合物

METHODS AND COMPOSITIONS FOR NEURAL DISEASE
IMMUNOTHERAPY

二、中文發明摘要：

本發明提供針對特定神經蛋白之抗體及其使用方法。

三、英文發明摘要：

The invention provides antibodies to specific neural proteins and methods of using the same.

七、申請專利範圍：

1. 一種分離之抗體或其片段，其結合至BACE1，其中該抗體降低或抑制BACE1多肽之活性。
2. 如請求項1之抗體，其中該抗體結合至BACE1之活性位點。
3. 如請求項1之抗體，其中該抗體結合至BACE1之外部位點(exosite)。
4. 如請求項1之抗體，其包含至少一個高變區(HVR)序列，選自由SEQ ID NO:7至19、22至26、28至30、35至47、56至79、及118至122組成之群。
5. 如請求項1之抗體，其包含至少一個選自由HVR-H1、HVR-H2及HVR-H3組成之群的序列，其中HVR-H1包含胺基酸序列GFX₃₀FX₃₁X₃₂X₃₃X₃₄IH (SEQ ID NO:45)，其中X₃₀=N或T；X₃₁=S、L或Y；X₃₂=G或Y；X₃₃=Y或S；X₃₄=A、G或S；HVR-H2包含胺基酸序列X₃₅X₃₆ISPX₃₇X₃₈GX₃₉TX₄₀YADSVKGG(SEQ ID NO:46)，其中X₃₅=A或G；X₃₆=W或S；X₃₇=A或Y；X₃₈=G或S；X₃₉=S或Y；X₄₀=D或S；及HVR-H3包含胺基酸序列X₄₁PX₄₂X₄₃X₄₄X₄₅X₄₆X₄₇MDY(SEQ ID NO:47)，其中X₄₁=Q或G；X₄₂=T或F；X₄₃=H或S；X₄₄=Y或P；X₄₅=Y或W；X₄₆=Y或V，且其中X₄₇視情況包括序列YAKGYKA(SEQ ID NO:48)。
6. 如請求項1之抗體，其包含至少一個選自由HVR-H1、HVR-H2及HVR-H3組成之群的序列，其中HVR-H1包含

胺基酸序列 $GX_{71}X_{72}X_{73}X_{74}X_{75}X_{76}X_{77}IH$ (SEQ ID NO:120)，其中 $X_{71}=F$ 或 Y ； $X_{72}=F$ 、 N 或 T ； $X_{73}=F$ 或 Y ； $X_{74}=L$ 、 Q 、 I 、 S 或 Y ； $X_{75}=G$ 或 Y ； $X_{76}=Y$ 或 S ； $X_{77}=A$ 、 G 或 S ；HVR-H2 包含胺基酸序列 $X_{78}X_{79}ISPX_{80}X_{81}GX_{82}X_{83}X_{84}YADSVK$ G(SEQ ID NO:121)，其中 $X_{78}=A$ 或 G ； $X_{79}=W$ 或 S ； $X_{80}=A$ 、 S 、 Q 或 Y ； $X_{81}=G$ 或 S ； $X_{82}=S$ 、 K 、 L 或 Y ； $X_{83}=T$ 或 Y ； $X_{84}=D$ 或 S ；及 HVR-H3 包含胺基酸序列 $X_{85}PX_{86}X_{87}X_{88}X_{89}X_{90}X_{91}MDY$ (SEQ ID NO:122)，其中 $X_{85}=Q$ 或 G ； $X_{86}=T$ 或 F ； $X_{87}=H$ 、 Y 或 S ； $X_{88}=Y$ 或 P ； $X_{89}=Y$ 或 W ； $X_{90}=Y$ 或 V ，且其中 X_{91} 視情況包括序列 $YAKGYKA$ (SEQ ID NO:48)。

7. 如請求項 1 之抗體，其包含至少一個選自由 HVR-H1、HVR-H2 及 HVR-H3 組成之群的序列，其中 HVR-H1 包含胺基酸序列 $GX_{53}X_{54}X_{55}X_{56}GYGIH$ (SEQ ID NO:68)，其中 $X_{53}=F$ 或 Y ； $X_{54}=T$ 或 F ； $X_{55}=F$ 或 Y ； $X_{56}=L$ 、 Q 或 I ；HVR-H2 包含胺基酸序列 $GWISPX_{57}X_{58}GX_{59}X_{60}DYADSVKG$ (SEQ ID NO:69)，其中 $X_{57}=A$ 、 S 或 Q ； $X_{58}=G$ 或 S ； $X_{59}=S$ 、 K 或 L ； $X_{60}=T$ 或 Y ，其中 HVR-H3 序列包含胺基酸序列 $GPFX_{61}PWVMDY$ (SEQ ID NO:70)，其中 $X_{61}=S$ 或 Y ，或胺基酸序列 SEQ ID NO:79。
8. 如請求項 5 之抗體，其包含 HVR-H1 序列，該序列包含胺基酸序列 $GFTFX_{13}GYX_{14}IH$ (SEQ ID NO:26)，其中 $X_{13}=S$ 或 L 且 $X_{14}=A$ 或 G 。
9. 如請求項 6 之抗體，其包含 HVR-H1 序列，該序列包含選

自由 SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:28及 SEQ ID NO:71至73組成之群的胺基酸序列。

10. 如請求項6之抗體，其包含HVR-H2序列，該序列包含選自 SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:29及 SEQ ID NO:74至78之胺基酸序列。
11. 如請求項6之抗體，其包含HVR-H3序列，該序列包含選自 SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:30及 SEQ ID NO:79之胺基酸序列。
12. 如請求項6之抗體，其包含對應於圖1(B)中之純系 YW 412.8、YW412.8.31、YW412.8.30、YW412.8.2、YW 412.8.29及 YW412.8.51或圖24(A)至(C)中之純系所述者之HVR-H1、HVR-H2及HVR-H3序列。
13. 如請求項6之抗體，其包含對應於圖2(B)中之純系 Fab 12、LC6、LC9及LC10所述者之HVR-H1、HVR-H2及HVR-H3序列。
14. 如請求項6之抗體，其包含SEQ ID NO:22或23之HVR-H1序列、SEQ ID NO:24之HVR-H2序列及SEQ ID NO:25之HVR-H3序列。
15. 如請求項14之抗體，其中該HVR-H1序列為SEQ ID NO:23。
16. 如請求項6之抗體，其包含SEQ ID NO:28之HVR-H1序列、SEQ ID NO:29之HVR-H2序列及SEQ ID NO:30之HVR-H3序列。
17. 如請求項6之抗體，其包含VH鏈，該鏈具有選自由SEQ

ID NO:20、21、27及80至98組成之群的胺基酸序列。

18. 如請求項16之抗體，其中該VH鏈之胺基酸序列為SEQ ID NO:21。

19. 如請求項1之抗體，其包含至少一個選自HVR-L1、HVR-L2及HVR-L3之群的序列，其中HVR-L1包含胺基酸序列RASQX₁₇VX₁₈X₁₉X₂₀X₂₁A(SEQ ID NO:42)，其中X₁₇=S、D或V；X₁₈=S或A；X₁₉=S、T或N；X₂₀=A或S；X₂₁=V或L，HVR-L2包含胺基酸序列X₂₂ASX₂₃LYS(SEQ ID NO:43)，其中X₂₂=S、W、Y或L；X₂₃=F、S或W，及HVR-L3包含胺基酸序列QQX₂₄X₂₅X₂₆X₂₇X₂₈X₂₉T(SEQ ID NO:44)，其中X₂₄=S、F、G、D或Y；X₂₅=Y、P、S或A；X₂₆=Y、T或N；X₂₇=T、Y、D或S；X₂₈=P或L；且X₂₉=F、P或T。

20. 如請求項1之抗體，其包含至少一個選自HVR-L1、HVR-L2及HVR-L3之群的序列，其中HVR-L1包含胺基酸序列RASQX₁₇VX₁₈X₁₉X₂₀X₂₁A(SEQ ID NO:42)，其中X₁₇=S、D或V；X₁₈=S或A；X₁₉=S、T或N；X₂₀=A或S；X₂₁=V或L，HVR-L2包含胺基酸序列X₆₂ASX₆₃X₆₄YX₆₅(SEQ ID NO:118)，其中X₆₂=S、W、Y、F或L；X₆₃=F、S、Y或W；X₆₄=L或R；X₆₅=S、P、R、K或W，及HVR-L3包含胺基酸序列QQX₆₆X₆₇X₆₈X₆₉X₇₀X₇₁T(SEQ ID NO:119)，其中X₆₆=S、F、G、D或Y；X₆₇=Y、P、S或A；X₆₈=Y、T或N；X₆₉=T、Y、D或S；X₇₀=P、Q、S、K或L；且X₇₁=F、P或T。

21. 如請求項1之抗體，其包含至少一個選自由HVR-L1、HVR-L2及HVR-L3組成之群的序列，其中HVR-L1包含胺基酸序列RASQX₁VX₂X₃X₄X₅A(SEQ ID NO:17)，其中X₁=D或V；X₂=S或A；X₃=T或N；X₄=S或A；X₅=V或L，HVR-L2包含胺基酸序列X₄₈ASX₄₉X₅₀YX₅₁(SEQ ID NO:56)，其中X₄₈=S或F；X₄₉=F或Y；X₅₀=L或R；X₅₁=S、P、R、K或W，及HVR-L3包含胺基酸序列QQFPTYX₅₂PT(SEQ ID NO:57)，其中X₅₂=L、Q、S或K。
22. 如請求項17之抗體，其包含HVR-L1序列，該序列包含胺基酸序列RASQX₁VX₂X₃X₄X₅A(SEQ ID NO:17)，其中X₁=D或V；X₂=S或A；X₃=T或N；X₄=S或A；X₅=V或L。
23. 如請求項19之抗體，其包含HVR-L2序列，該序列包含胺基酸序列X₆ASFLYS(SEQ ID NO:18)或X₁₅ASX₁₆LYS(SEQ ID NO:41)，其中X₆=S或L；X₁₅=S、W或Y；且X₁₆=S或W。
24. 如請求項19之抗體，其包含HVR-L3序列，該序列包含胺基酸序列QQX₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂T(SEQ ID NO:19)，其中X₇=S、F、G、D或Y；X₈=Y、P、S或A；X₉=T或N；X₁₀=T、Y、D或S；X₁₁=P或L；X₁₂=P或T。
25. 如請求項19之抗體，其包含HVR-L1序列，該序列包含選自由SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:35組成之群的胺基酸序列。
26. 如請求項20之抗體，其包含HVR-L2序列，該序列包含

- 選自由SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:36至39及SEQ ID NO:58至64組成之群的胺基酸序列。
27. 如請求項20之抗體，其包含HVR-L3序列，該序列包含選自由SEQ ID NO:11至16、SEQ ID NO:40及SEQ ID NO:65至67組成之群的胺基酸序列。
28. 如請求項20之抗體，其包含對應於圖1(A)中之純系YW412.8、YW412.8.31、YW412.8.30、YW412.8.2、YW412.8.29及YW412.8.51及圖23(A)至(C)中之純系所述者之HVR-L1、HVR-L2及HVR-L3序列。
29. 如請求項20之抗體，其包含對應於圖2(A)中之純系Fab 12、LC6、LC9及LC10所述者之HVR-L1、HVR-L2及HVR-L3序列。
30. 如請求項20之抗體，其包含SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8之HVR-L1序列；SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10之HVR-L2序列；及選自由SEQ ID NO:11至16組成之群的HVR-L3序列。
31. 如請求項30之抗體，其中該HVR-L1序列為SEQ ID NO:7，該HVR-L2序列為SEQ ID NO:9，且該HVR-L3序列為SEQ ID NO:12。
32. 如請求項20之抗體，其包含SEQ ID NO:35之HVR-L1序列；選自由SEQ ID NO:36至39組成之群的HVR-L2序列；及SEQ ID NO:40之HVR-L3序列。
33. 如請求項20之抗體，其包含VL鏈序列，該鏈序列具有選自由SEQ ID NO:1至6、31至34及99至117組成之群的胺

基酸序列。

34. 如請求項33之抗體，其中該VL鏈之胺基酸序列為SEQ ID NO:2。
35. 如請求項15之抗體，其進一步包含：包含胺基酸序列SEQ ID NO:7之HVR-L1、包含胺基酸序列SEQ ID NO:9之HVR-L2及包含胺基酸序列SEQ ID NO:12之HVR-L3。
36. 如請求項34之抗體，其進一步包含VH鏈，該鏈包含胺基酸序列SEQ ID NO:21。
37. 一種分離之抗體或其片段，其結合至包含至少一個選自由SEQ ID NO:49之314 SER、316 GLU、317 LYS、327 GLN、330 CYS、331 TRP、332 GLN、335 THR及378 ASP組成之群的BACE1胺基酸殘基的抗原決定基。
38. 如請求項37之抗體，其中該抗原決定基包含SEQ ID NO:49之314 SER、316 GLU、317 LYS、327 GLN、330 CYS、331 TRP、332 GLN、335 THR及378 ASP。
39. 一種分離之抗體或其片段，其結合至包含至少一個選自由SEQ ID NO:49之胺基酸315至318、SEQ ID NO:49之胺基酸331至335、SEQ ID NO:49之胺基酸370至381及其任何組合組成之群的BACE1胺基酸區的抗原決定基。
40. 如請求項39之抗體，其中該抗原決定基包含SEQ ID NO:49之胺基酸315至318、331至335及370至381。
41. 一種分離之抗體或其片段，其結合至BACE1之抗原決定基且在結合時造成BACE1之P6及P7位點結構中之構形變化。

42. 一種分離之抗體或其片段，其結合至BACE1之抗原決定基且在結合時誘導SEQ ID NO:49之胺基酸218至231採取隨機環形(random loop)結構。
43. 如請求項37至42之抗體，其中該抗體降低或抑制BACE1活性。
44. 如請求項1至42中任一項之抗體，其為單株抗體。
45. 如請求項1至42中任一項之抗體，其為人類抗體、人類化抗體或嵌合抗體。
46. 如請求項1至42中任一項之抗體，其為抗體片段。
47. 如請求項1至42中任一項之抗體，其為全長IgG1抗體。
48. 一種分離之核酸，其編碼如請求項1至47中任一項之抗體。
49. 一種宿主細胞，其包含如請求項48之核酸。
50. 一種產生抗體之方法，其包含培養如請求項49之宿主細胞以產生該抗體。
51. 一種免疫結合物，其包含如請求項1至47中任一項之抗體及細胞毒性劑。
52. 一種藥物調配物，其包含如請求項1至47中任一項之抗體及醫藥上可接受之載劑。
53. 一種如請求項1至47中任一項之抗體的用途，其係用於製造用以減少罹患神經疾病或病症之患者或有感染神經疾病或病症風險之患者中之類澱粉斑塊或類澱粉- β (A β)蛋白的藥物。
54. 一種如請求項1至47中任一項之抗體的用途，其係用於

製造用以抑制罹患神經疾病或病症之患者或有發生神經疾病或病症風險之患者中之類澱粉斑塊形成的藥物。

55. 如請求項52至54中任一項之用途，其中該神經疾病或病症係選自由以下組成之群：阿茲海默氏病(Alzheimer's disease；AD)、創傷性腦損傷、中風、青光眼、癡呆症、肌肉萎縮症(MD)、多發性硬化症(MS)、肌萎縮性側索硬化症(ALS)、囊腫纖維化、安格曼氏症候群(Angelman's syndrome)、利德爾氏症候群(Liddle syndrome)、柏哲德氏病(Paget's disease)、創傷性腦損傷、路易體病(Lewy body disease)、脊髓灰質炎後症候群、夏伊-德雷格症候群(Shy-Draeger syndrome)、橄欖體腦橋小腦萎縮、帕金森氏病(Parkinson's disease)、多系統萎縮症、紋狀體黑質變性、核上麻痺、牛海綿狀腦病、綿羊癢病、庫賈氏症候群(Creutzfeldt-Jakob syndrome)、庫魯症(kuru)、格斯特曼-斯脫司勒-史茵格氏病(Gerstmann-Straussler-Scheinker disease)、慢性消耗性疾病、致死性家族失眠症、延髓性麻痺、運動神經元病、卡納萬病(Canavan disease)、亨廷頓氏病(Huntington's disease)、神經元蠟樣脂褐質沈積症、亞歷山大氏病(Alexander's disease)、妥瑞氏症候群(Tourette's syndrome)、門克氏捲髮症候群(Menkes kinky hair syndrome)、科凱恩症候群(Cockayne syndrome)、哈-斯二氏症候群(Halervorden-Spatz syndrome)、拉福拉病(lafora disease)、雷特氏症候群(Rett syndrome)、肝豆狀

核變性、萊施-奈恩症候群(Lesch-Nyhan syndrome)及翁韋里希特-倫德伯格症候群(Unverricht-Lundborg syndrome)、皮克氏病(Pick's disease)及脊髓小腦失調。

56. 如請求項55之用途，其中該神經疾病或病症係選自由阿茲海默氏病、中風、創傷性腦損傷及青光眼組成之群。
57. 一種診斷患者之神經疾病或病症的方法，其包含使自該患者分離之生物樣品與如請求項1至47中任一項之抗體在適合該抗體結合至BACE1多肽的條件下接觸，及偵測該抗體與該BACE1多肽之間是否形成複合物。
58. 一種確定患者是否適於抗-BACE1抗體療法之方法，其包含使自該患者分離之生物樣品與如請求項1至47中任一項之抗體在適合該抗體結合至BACE1多肽的條件下接觸，及偵測該抗體與該BACE1多肽之間是否形成複合物，其中該抗體與該BACE1之間存在複合物指示患者適於抗-BACE1抗體療法。
59. 如請求項57或58之方法，其中該生物樣品係選自由血清、血漿、唾液、胃分泌液、黏液、腦脊髓液、淋巴液、神經元組織、腦組織、心臟組織或血管組織組成之群。
60. 如請求項1至42中任一項之抗體，其係用作藥物。
61. 如請求項1至42中任一項之抗體，其係用於治療選自由以下組成之群的神經病症：阿茲海默氏病(AD)、創傷性腦損傷、中風、青光眼、癡呆症、肌肉萎縮症(MD)、多發性硬化症(MS)、肌萎縮性側索硬化症(ALS)、囊腫纖

維化、安格曼氏症候群、利德爾氏症候群、柏哲德氏病、創傷性腦損傷、路易體病、脊髓灰質炎後症候群、夏伊-德雷格症候群、橄欖體腦橋小腦萎縮、帕金森氏病、多系統萎縮症、紋狀體黑質變性、核上麻痺、牛海綿狀腦病、綿羊癢病、庫賈氏症候群、庫魯症、格斯特曼-斯脫司勒-史茵格氏病、慢性消耗性疾病、致死性家族失眠症、延髓性麻痺、運動神經元病、卡納萬病、亨廷頓氏病、神經元蠟樣脂褐質沈積症、亞歷山大氏病、妥瑞氏症候群、門克氏捲髮症候群、科凱恩症候群、哈-斯二氏症候群、拉福拉病、雷特氏症候群、肝豆狀核變性、萊施-奈恩症候群及翁韋里希特-倫德伯格症候群、皮克氏病及脊髓小腦失調。

62. 如請求項1至42中任一項之抗體，其係用於減少及/或抑制類澱粉- β (A β)蛋白產生。
63. 一種如請求項1至47中任一項之抗體之用途，其係用於製造藥物。
64. 如請求項63之用途，其中該藥物係用於治療選自由以下組成之群的神經病症：阿茲海默氏病(AD)、創傷性腦損傷、中風、青光眼、癡呆症、肌肉萎縮症(MD)、多發性硬化症(MS)、肌萎縮性側索硬化症(ALS)、囊腫纖維化、安格曼氏症候群、利德爾氏症候群、柏哲德氏病、創傷性腦損傷、路易體病、脊髓灰質炎後症候群、夏伊-德雷格症候群、橄欖體腦橋小腦萎縮、帕金森氏病、多系統萎縮症、紋狀體黑質變性、核上麻痺、牛海綿狀腦

病、綿羊癢病、庫賈氏症候群、庫魯症、格斯特曼-斯脫司勒-史茵格氏病、慢性消耗性疾病、致死性家族失眠症、延髓性麻痺、運動神經元病、卡納萬病、亨廷頓氏病、神經元蠟樣脂褐質沈積症、亞歷山大氏病、妥瑞氏症候群、門克氏捲髮症候群、科凱恩症候群、哈-斯二氏症候群、拉福拉病、雷特氏症候群、肝豆狀核變性、萊施-奈恩症候群及翁韋里希特-倫德伯格症候群、皮克氏病及脊髓小腦失調。

65. 如請求項63之用途，其中該藥物係用於減少及/或抑制類澱粉- β (A β)蛋白產生。
66. 一種BACE1抗原決定基，其係由抗體或其片段特異性識別，包含BACE1之胺基酸殘基中之至少一者，該等胺基酸殘基對應於選自由以下組成之群的胺基酸：SEQ ID NO:49之314 SER；316 GLU；317 LYS；327 GLN；330 CYS；331 TRP；332 GLN；335 THR；及378 ASP。
67. 如請求項66之BACE1抗原決定基，其中該抗原決定基包含對應於SEQ ID NO:49之314 SER、316 GLU、317 LYS、327 GLN、330 CYS、331 TRP、332 GLN、335 THR及378 ASP的胺基酸。
68. 一種BACE1抗原決定基，其係由抗體或其片段特異性識別，包含至少一個選自由以下組成之群的BACE1胺基酸區：SEQ ID NO:49之胺基酸315至318；SEQ ID NO:40之胺基酸331至335；SEQ ID NO:49之胺基酸370至381；及其任何組合。

69. 如請求項 68 之 BACE1 抗原決定基，其中該抗原決定基包含 SEQ ID NO:49 之胺基酸 315 至 318、331 至 335 及 370 至 381。

八、圖式：

Kabat#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	A	B	C	D	E	F	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37						
	Kabat - CDR L1																																																
	Chothia - CDR L1																																																
	接觸 - CDR L1																																																
YW412.8	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q							D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q						
YW412.8.31	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q							D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q						
YW412.8.30	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q							D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q						
YW412.8.2	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q							D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q						
YW412.8.29	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q							V	V	A	N	S	L	A	W	Y	Q						
YW412.8.51	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q							D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q						
Kabat#	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80						
	Kabat - CDR L2																																																
	Chothia - CDR L2																																																
	接觸 - CDR L2																																																
YW412.8	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P						
YW412.8.31	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P						
YW412.8.30	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P						
YW412.8.2	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P						
YW412.8.29	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P						
YW412.8.51	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P						
Kabat#	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108																					
	Kabat - CDR L3																																																
	Chothia - CDR L3																																																
	接觸 - CDR L3																																																
YW412.8	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R																					
YW412.8.31	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	F	P	T	Y	L	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R																					
YW412.8.30	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	G	Y	N	D	P	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R																					
YW412.8.2	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	S	T	D	P	T	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R																					
YW412.8.29	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	D	A	T	S	P	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R																					
YW412.8.51	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	A	T	D	P	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R																					

圖1A

Kabat#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40						
	Kabat - CDR H1 Chothia - CDR H1 接觸 - CDR H1																																													
YW412.8	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	G	Y	A	I	H	W	V	R	Q	A						
YW412.8.31	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	L	G	Y	G	I	H	W	V	R	Q	A						
YW412.8.30	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	G	Y	A	I	H	W	V	R	Q	A						
YW412.8.2	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	G	Y	A	I	H	W	V	R	Q	A						
YW412.8.29	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	G	Y	A	I	H	W	V	R	Q	A						
YW412.8.51	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	G	Y	A	I	H	W	V	R	Q	A						
Kabat#	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	A	B	C	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78					
	Kabat - CDR H2 Chothia - CDR H2 接觸 - CDR H2																																													
YW412.8	P	G	K	G	L	E	W	V	G	W	I	S	P	A	G	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	P	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A							
YW412.8.31	P	G	K	G	L	E	W	V	G	W	I	S	P	A	G	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	P	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A							
YW412.8.30	P	G	K	G	L	E	W	V	G	W	I	S	P	A	G	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	P	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A							
YW412.8.2	P	G	K	G	L	E	W	V	G	W	I	S	P	A	G	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	P	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A							
YW412.8.29	P	G	K	G	L	E	W	V	G	W	I	S	P	A	G	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	P	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A							
YW412.8.51	P	G	K	G	L	E	W	V	G	W	I	S	P	A	G	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	P	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A							
Kabat#	79	80	81	82	A	B	C	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	A	B	C	D	E	F	G	H	K	101	102	103	104	105	106	107					
	Kabat - CDR H3 Chothia - CDR H3 接觸 - CDR H3																																													
YW412.8	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	20					
YW412.8.31	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	21					
YW412.8.30	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	20					
YW412.8.2	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	20					
YW412.8.29	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	20					
YW412.8.51	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	20					

圖1B

Kabat#	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108

- 3 -

Kabat# 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40



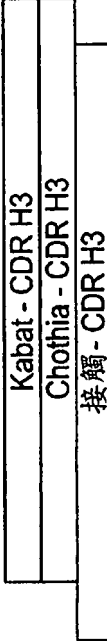
Fab12 E I S E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F N F Y Y S S I H W V R Q A
LC6 IgG E I S E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F N F Y Y S S I H W V R Q A
LC9 IgG E I S E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F N F Y Y S S I H W V R Q A
LC10 IgG E I S E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F N F Y Y S S I H W V R Q A

Kabat# 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 A B C 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78



Fab12 A S I S P Y S G Y T S Y A D S V K G R R F T I S A D T S K N T A
LC6 IgG A S I S P Y S G Y T S Y A D S V K G R R F T I S A D T S K N T A
LC9 IgG A S I S P Y S G Y T S Y A D S V K G R R F T I S A D T S K N T A
LC10 IgG A S I S P Y S G Y T S Y A D S V K G R R F T I S A D T S K N T A

Kabat# 79 80 81 82 A B C 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 A B C D E F G H K 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113



Fab12 Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R Q P T H Y Y Y A K G Y K A M D Y W G Q G T L V T V S S 27
LC6 IgG Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R Q P T H Y Y Y A K G Y K A M D Y W G Q G T L V T V S S 27
LC9 IgG Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R Q P T H Y Y Y A K G Y K A M D Y W G Q G T L V T V S S 27
LC10 IgG Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R Q P T H Y Y Y A K G Y K A M D Y W G Q G T L V T V S S 27

圖2B

CDRL1		CDRL2		CDRL3		CDRH1		FabID
33	V	S	S	96	V	I	M	Fab1
32	A	S	S	95	P	Y	S	Fab2
31	S	A	S	94b	S	S	S	Fab3
30	S	A	S	94a	Y	Y	S	Fab4
29	V	A	S	94	S	Y	S	Fab5
28	S	A	S	93	S	Y	S	Fab6
				92	S	Y	S	Fab7
				91	Y	Y	S	Fab8
								Fab9
								Fab10
								Fab11
								Fab12
								Fab14
								Fab19
								Fab23
								Fab24
								Fab27
								Fab32
								Fab47

図3A

3B
回

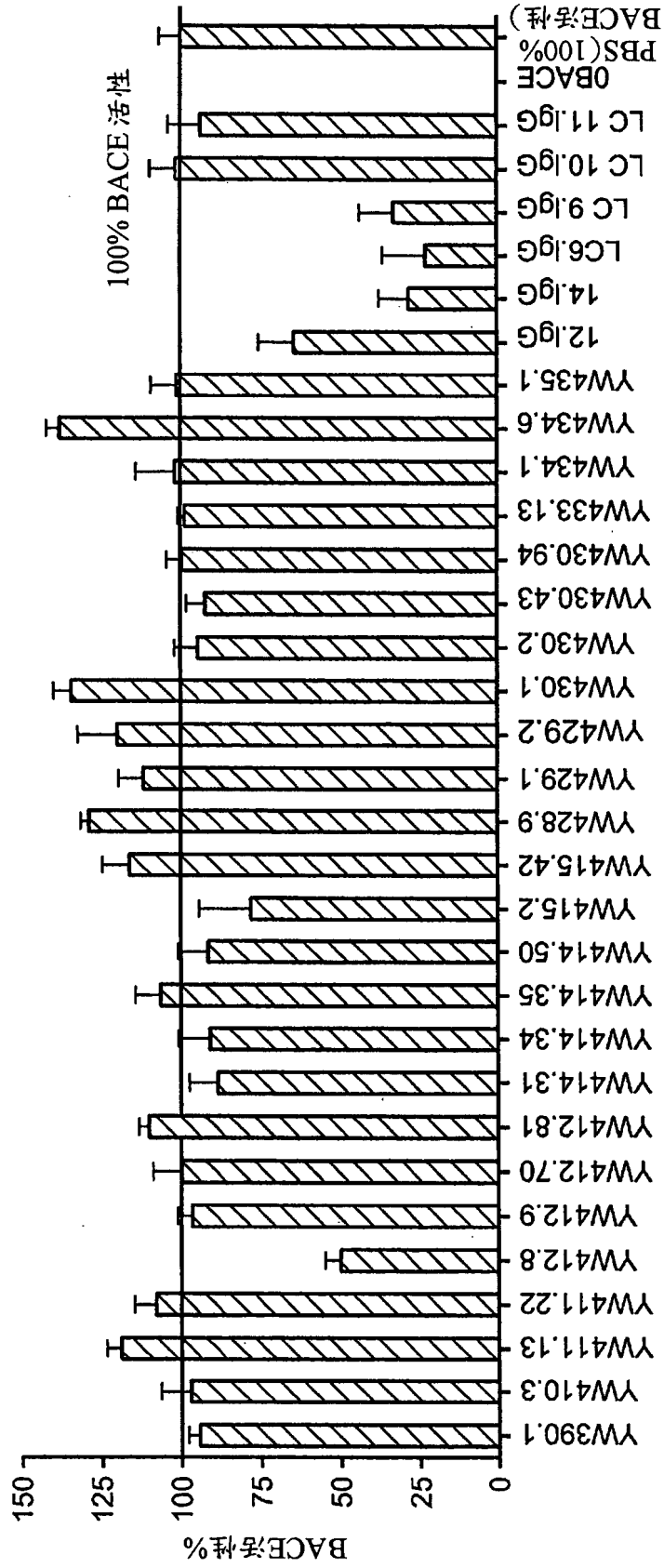


図4

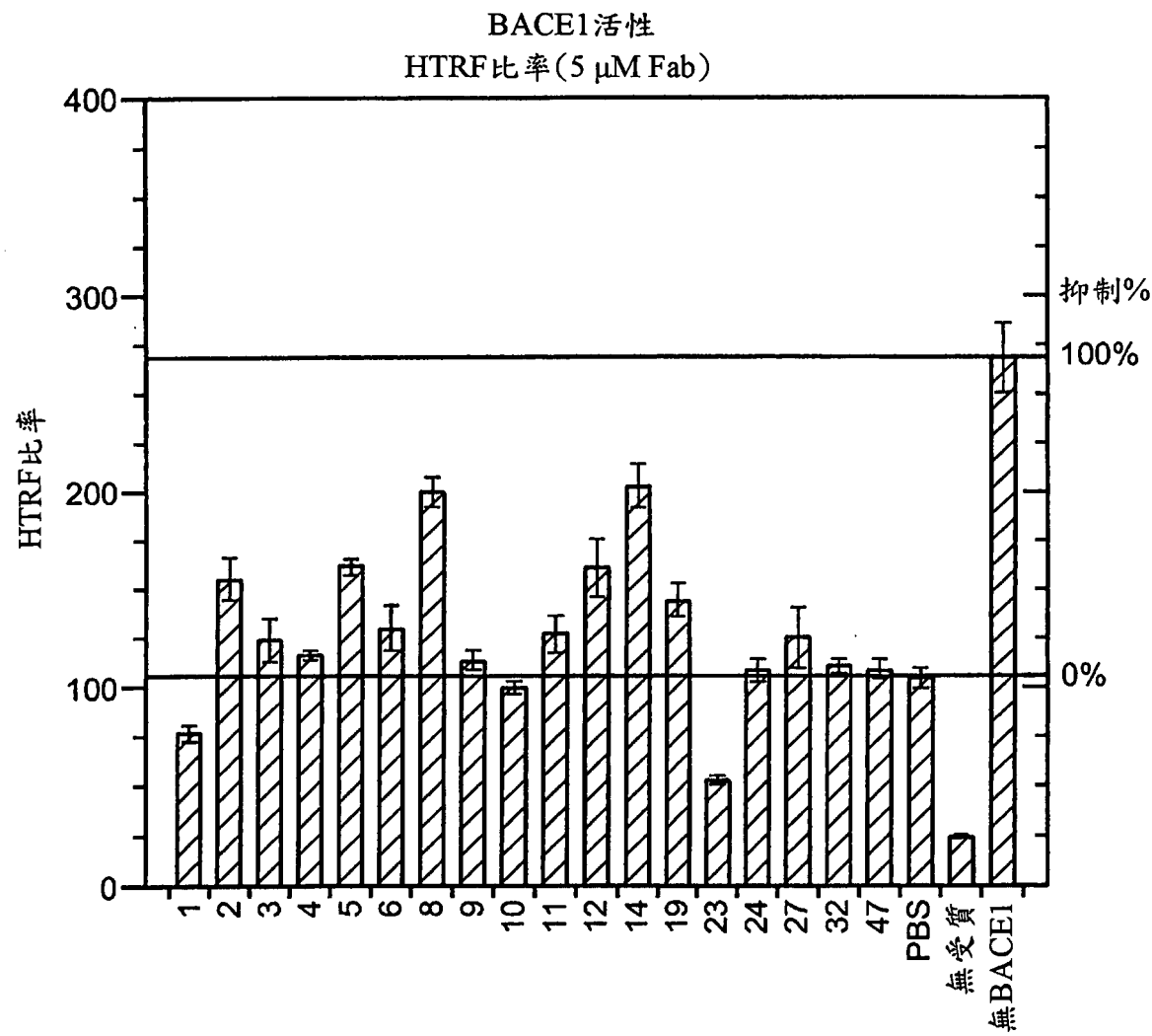


圖5

CDRL1								CDRL2					CDRL3								CDRH1						競爭ELISA 比率	Fab ID	親本																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
28	S	V	S	S	A	V	33	33a				49	Y	S	A	S	50	S	A	S	51	A	S	S	52	S	S	53	S																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		

圖6

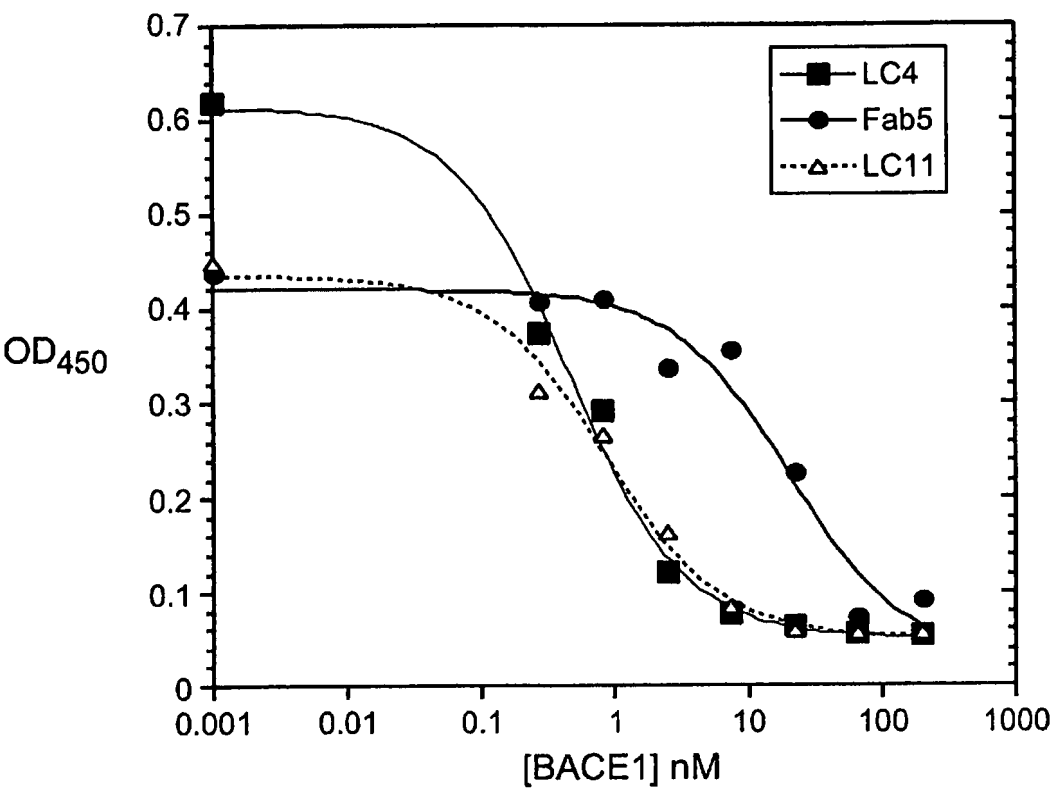


圖 7A

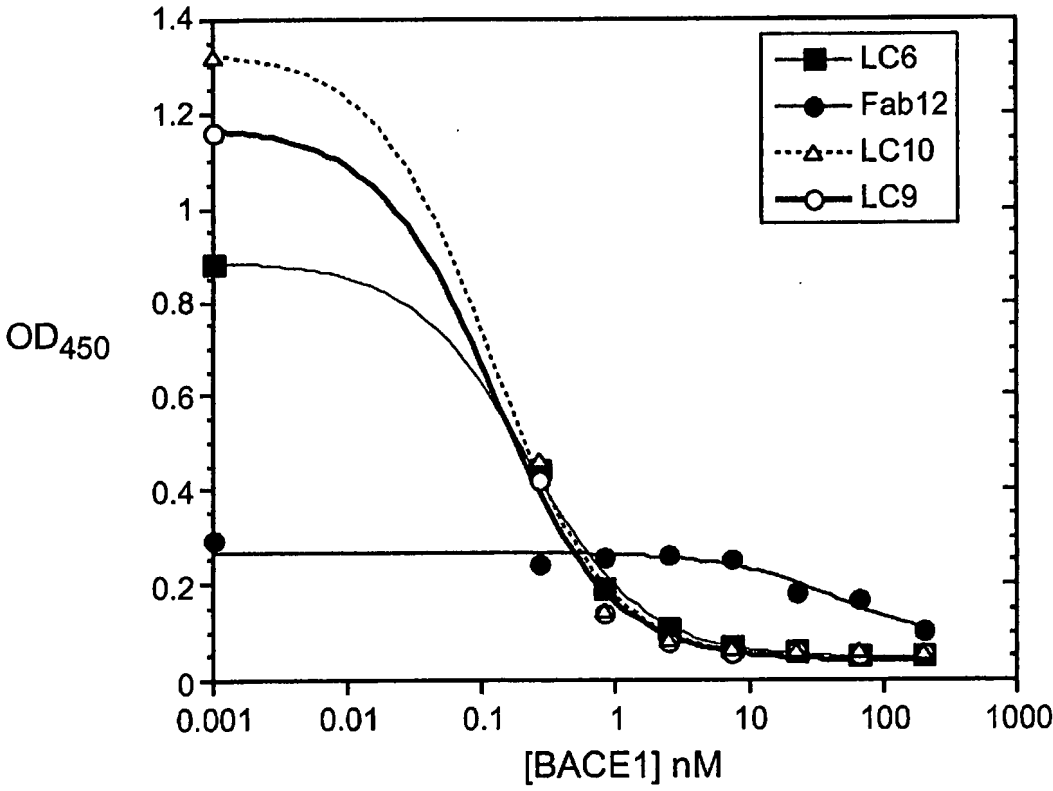


圖 7B

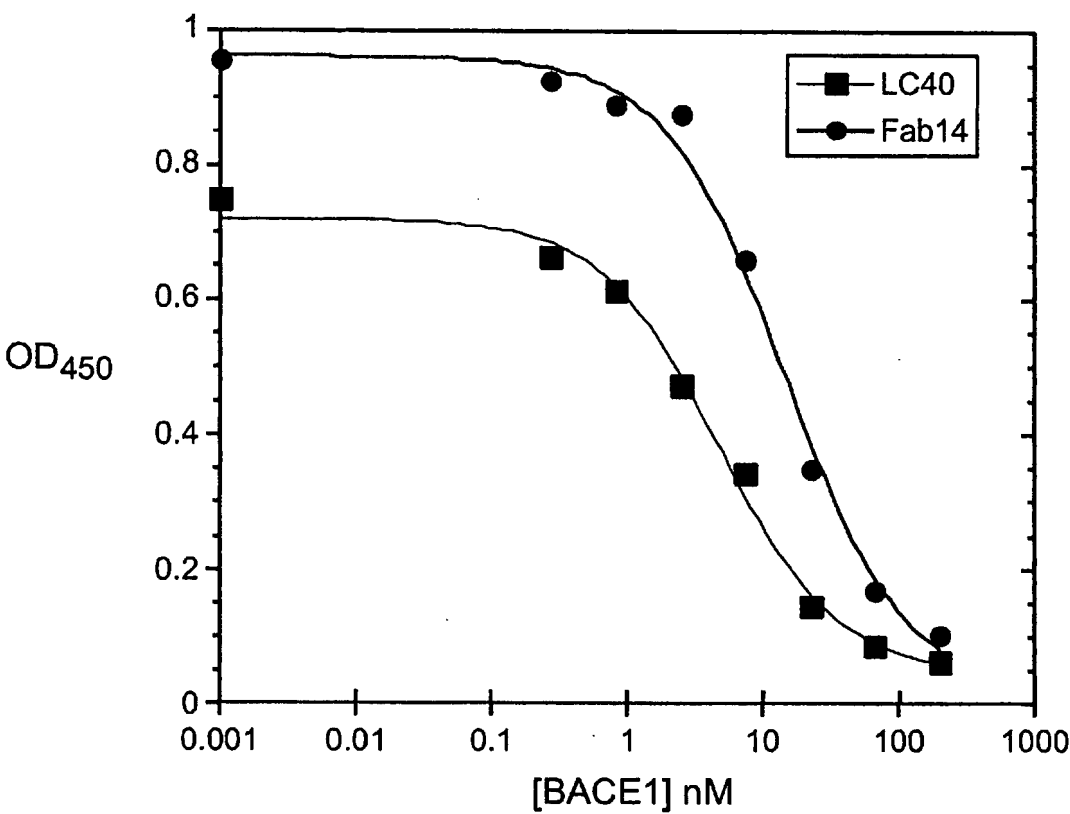


圖7C

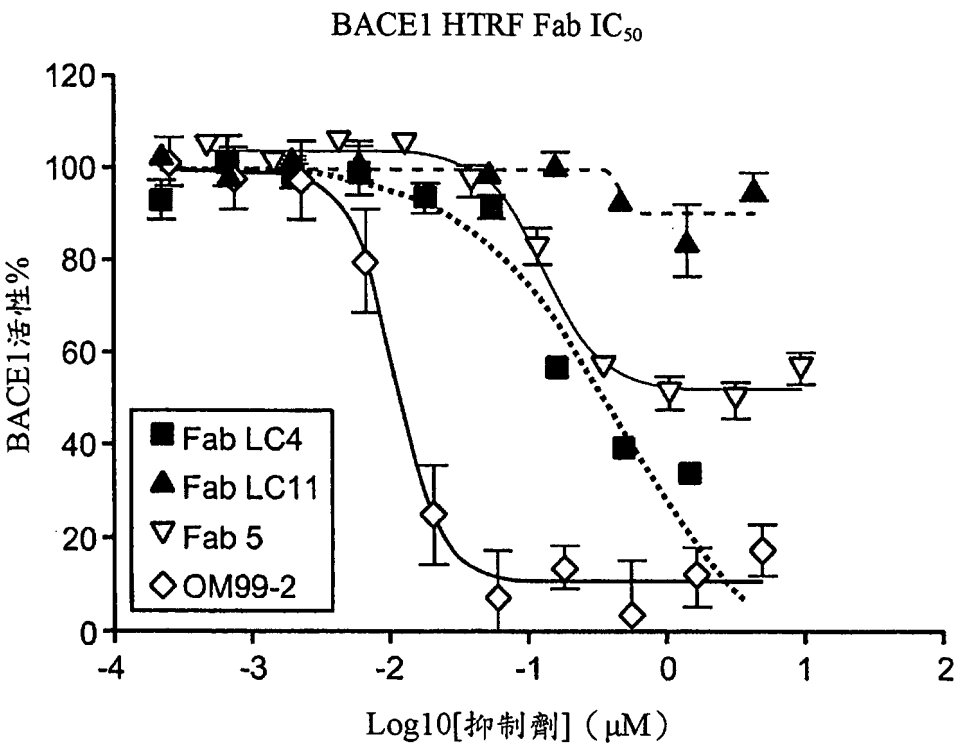


圖8A

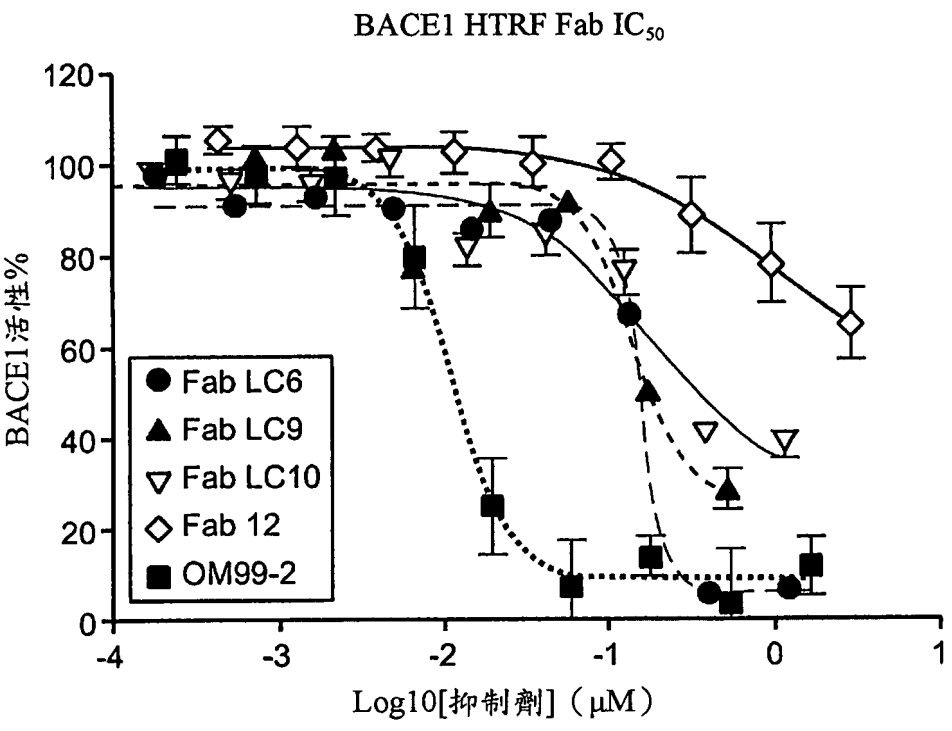


圖 8B

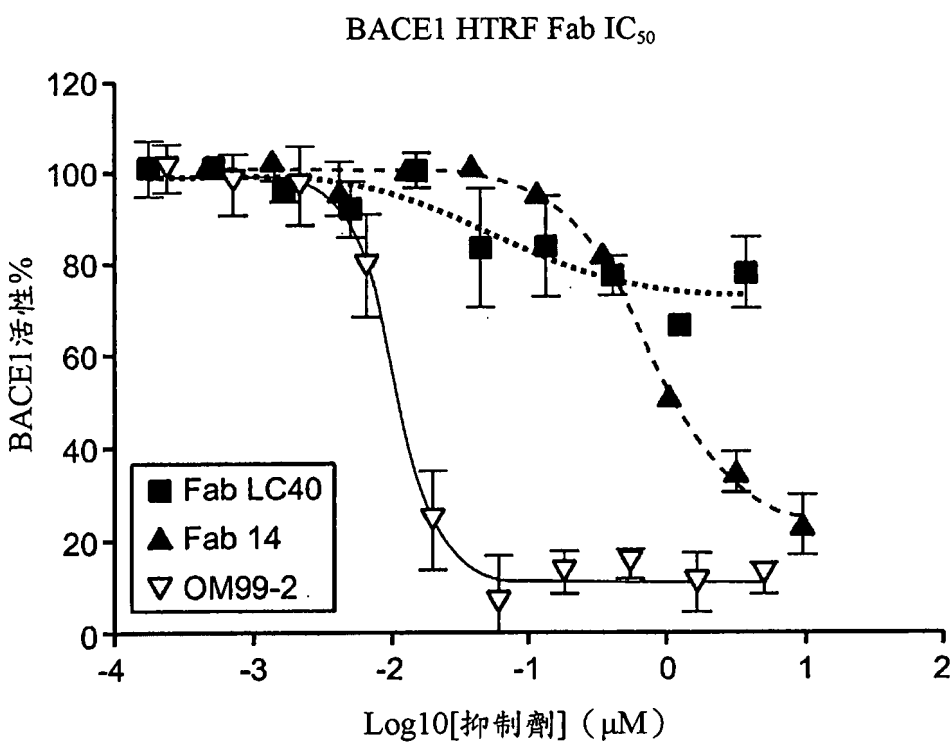


圖 8C

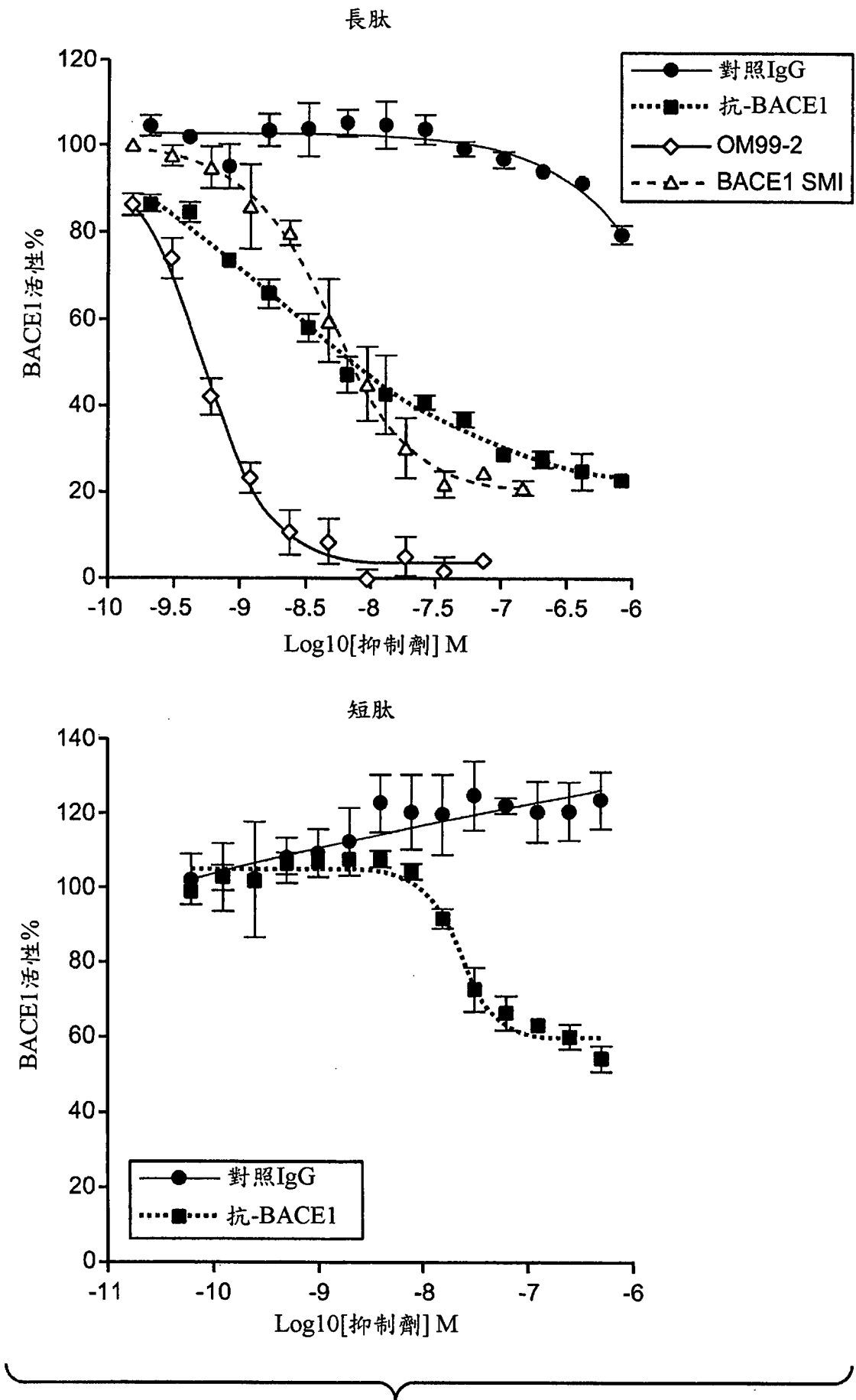


圖9A

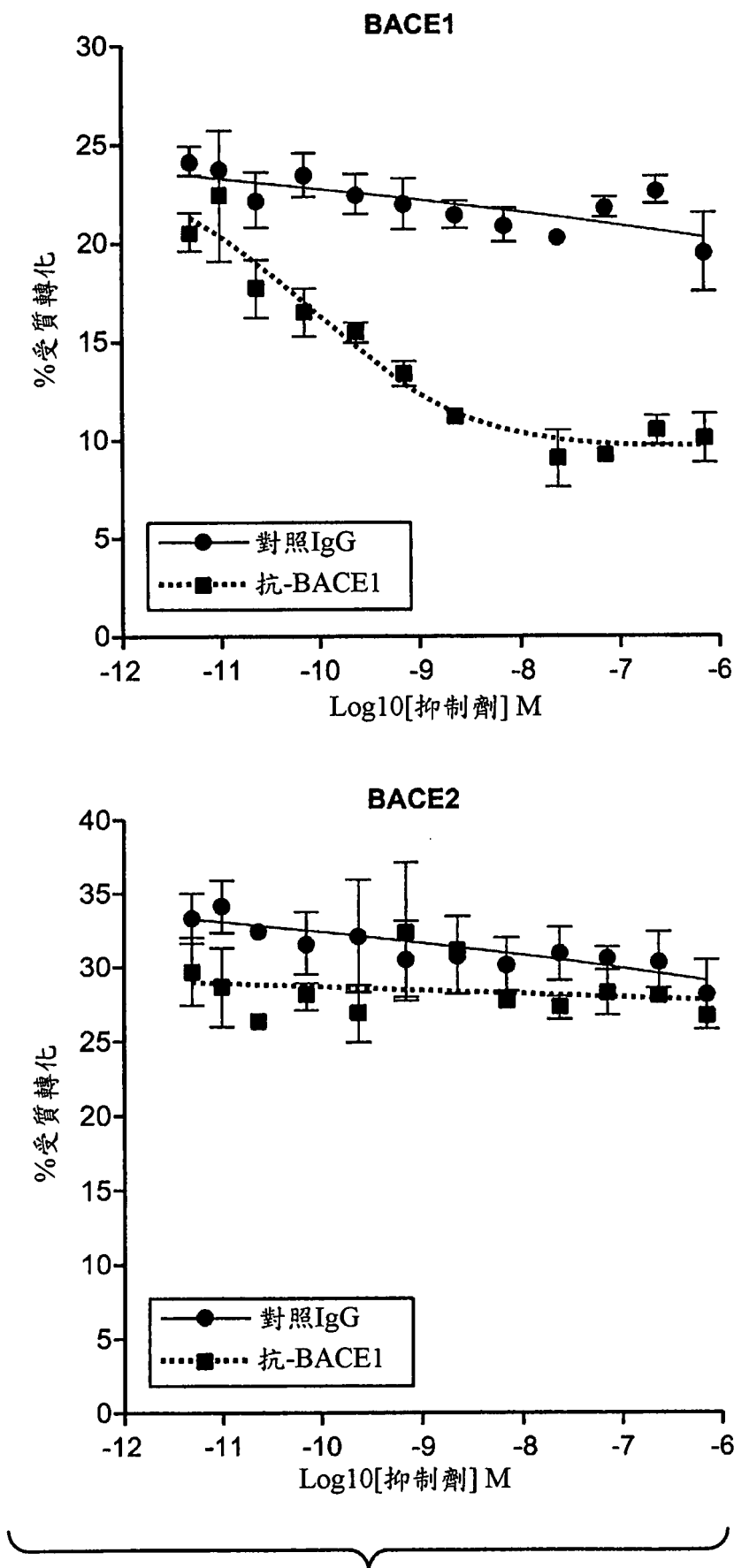


圖 9B-1

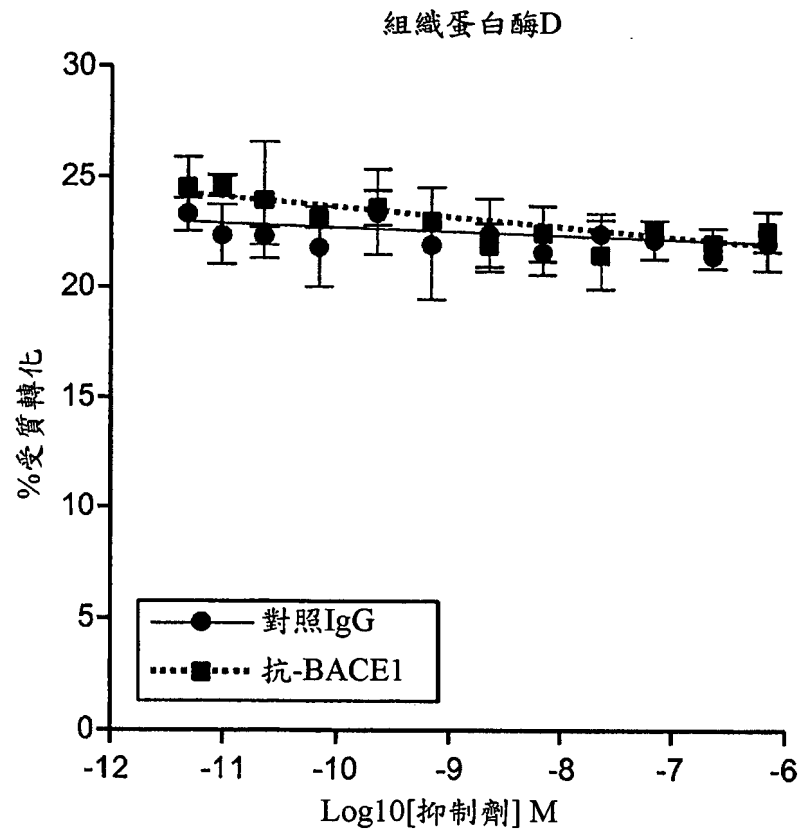


圖 9B-2

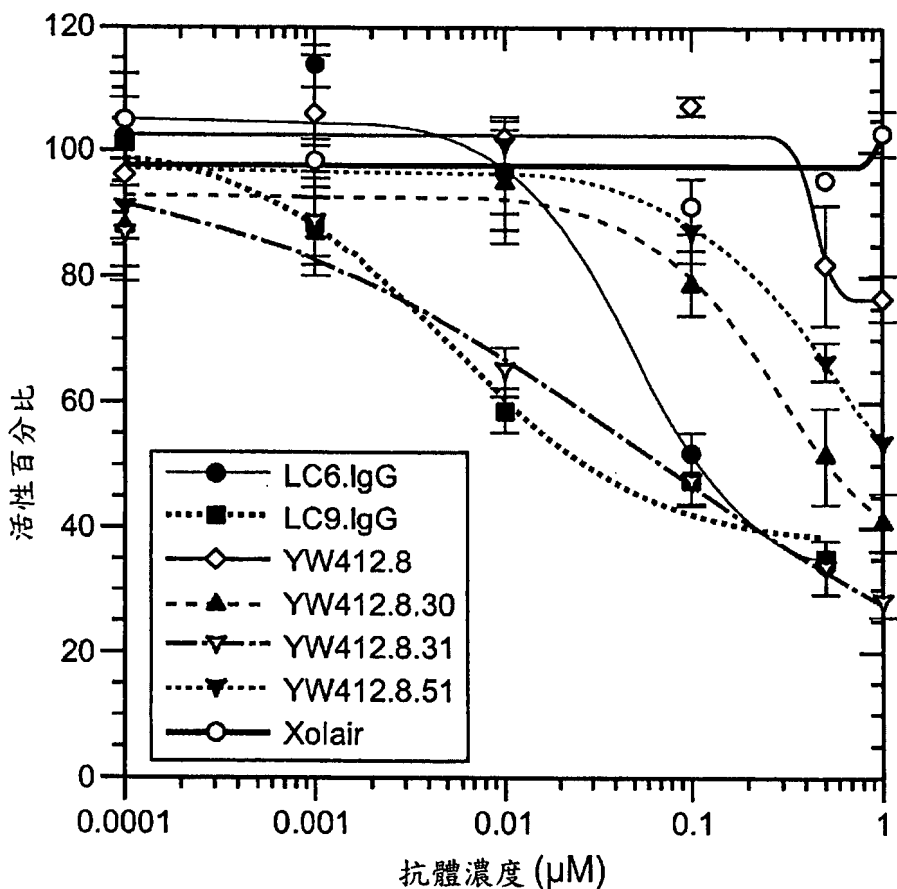


圖 10

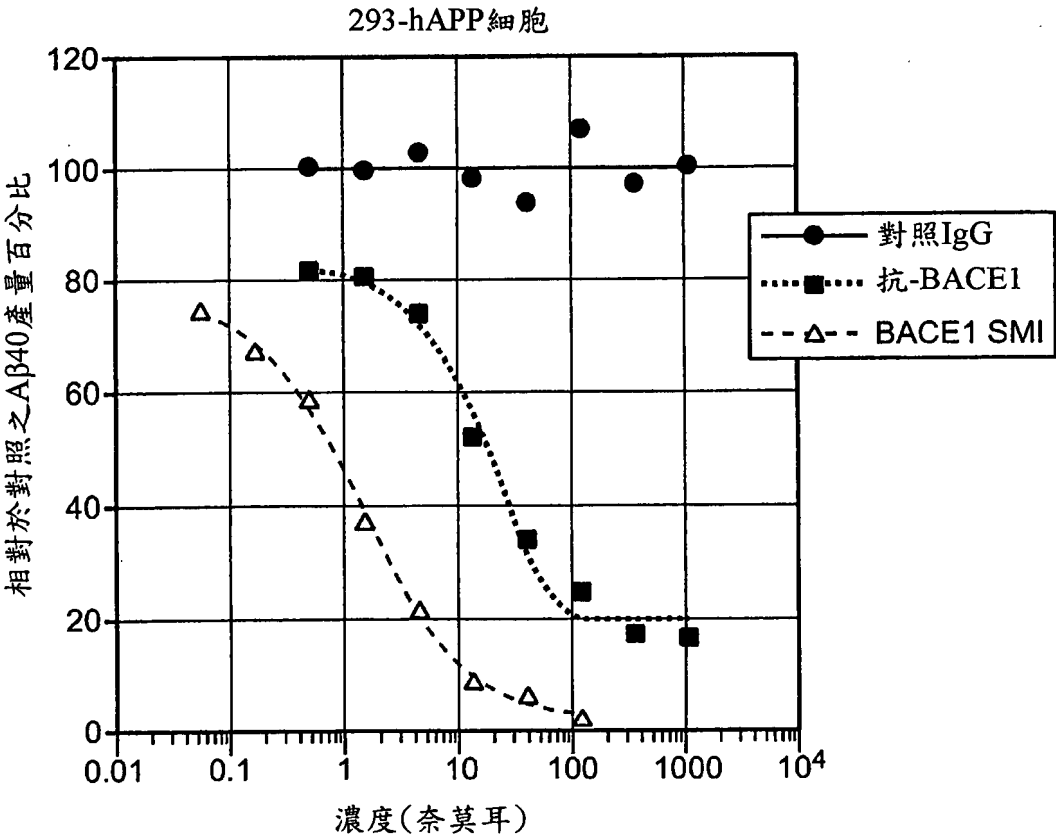


圖11A

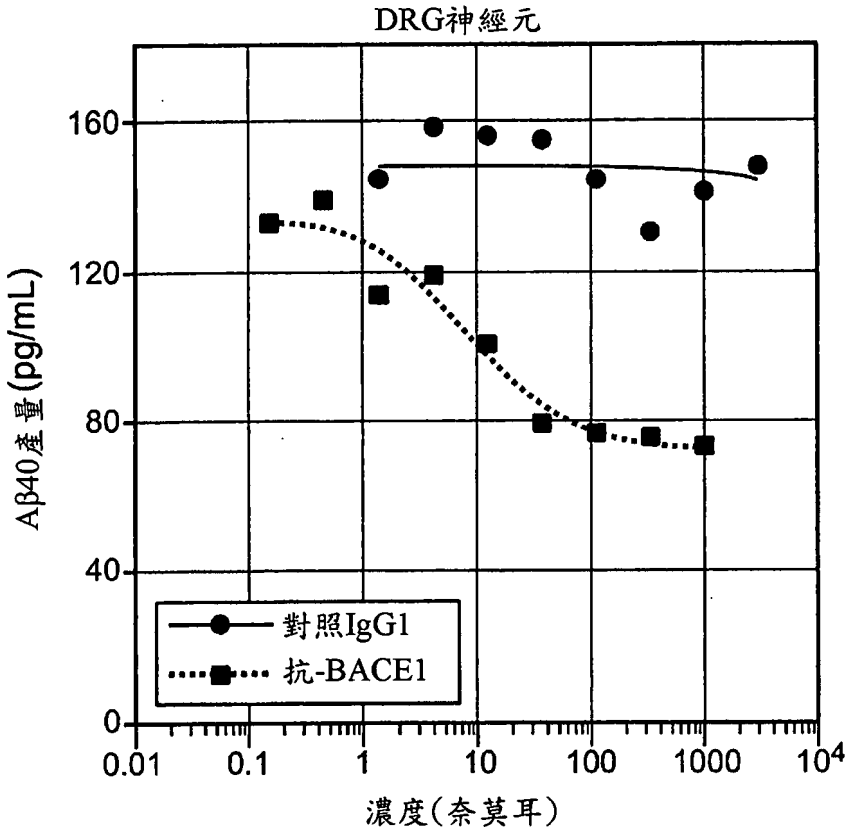


圖11B

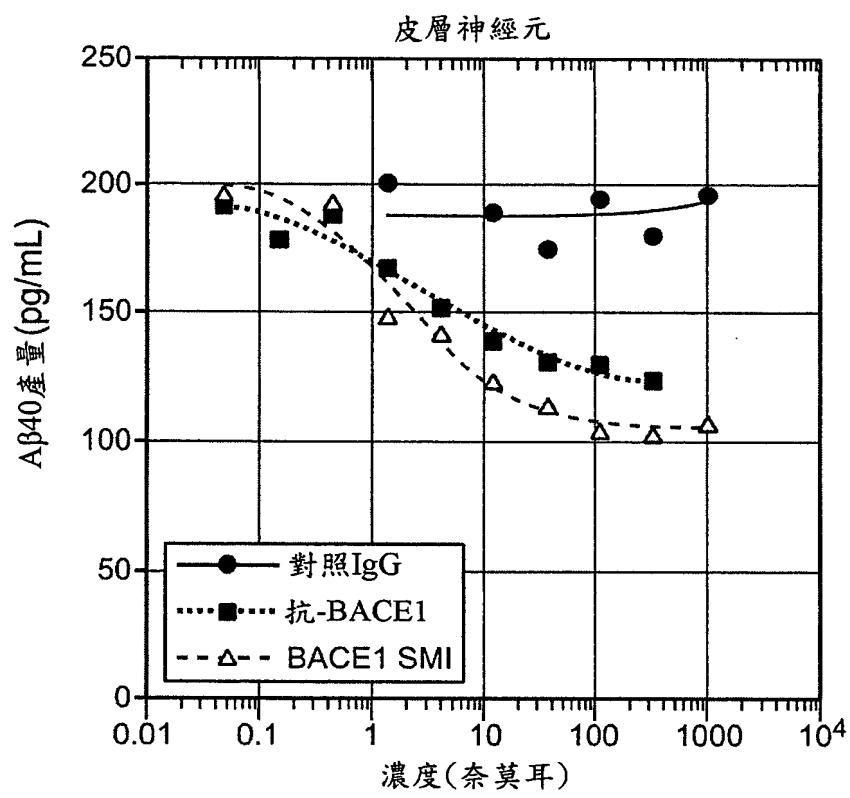


圖11C

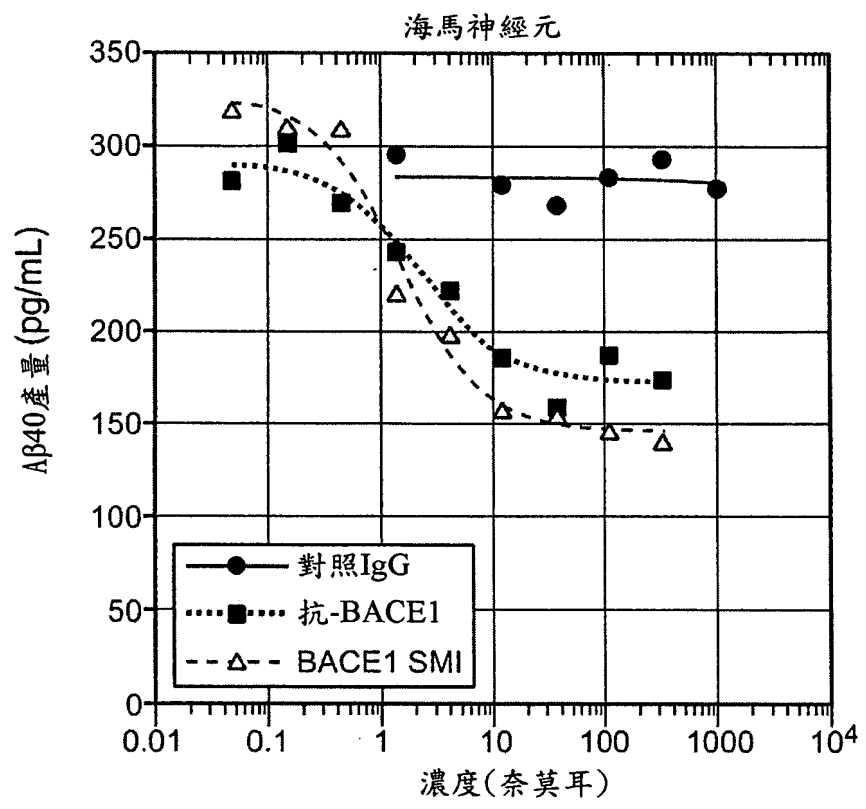


圖11D

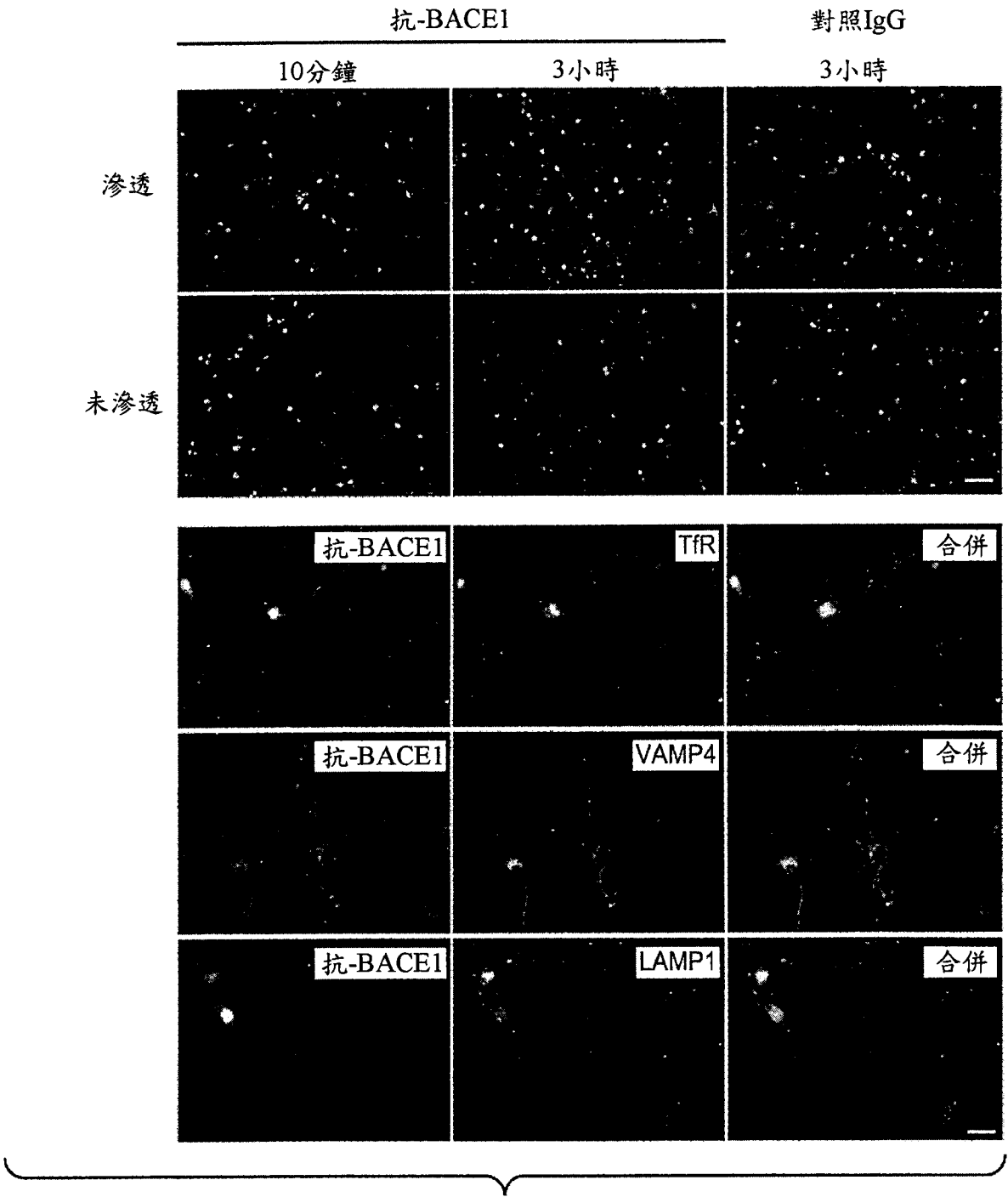


圖12A

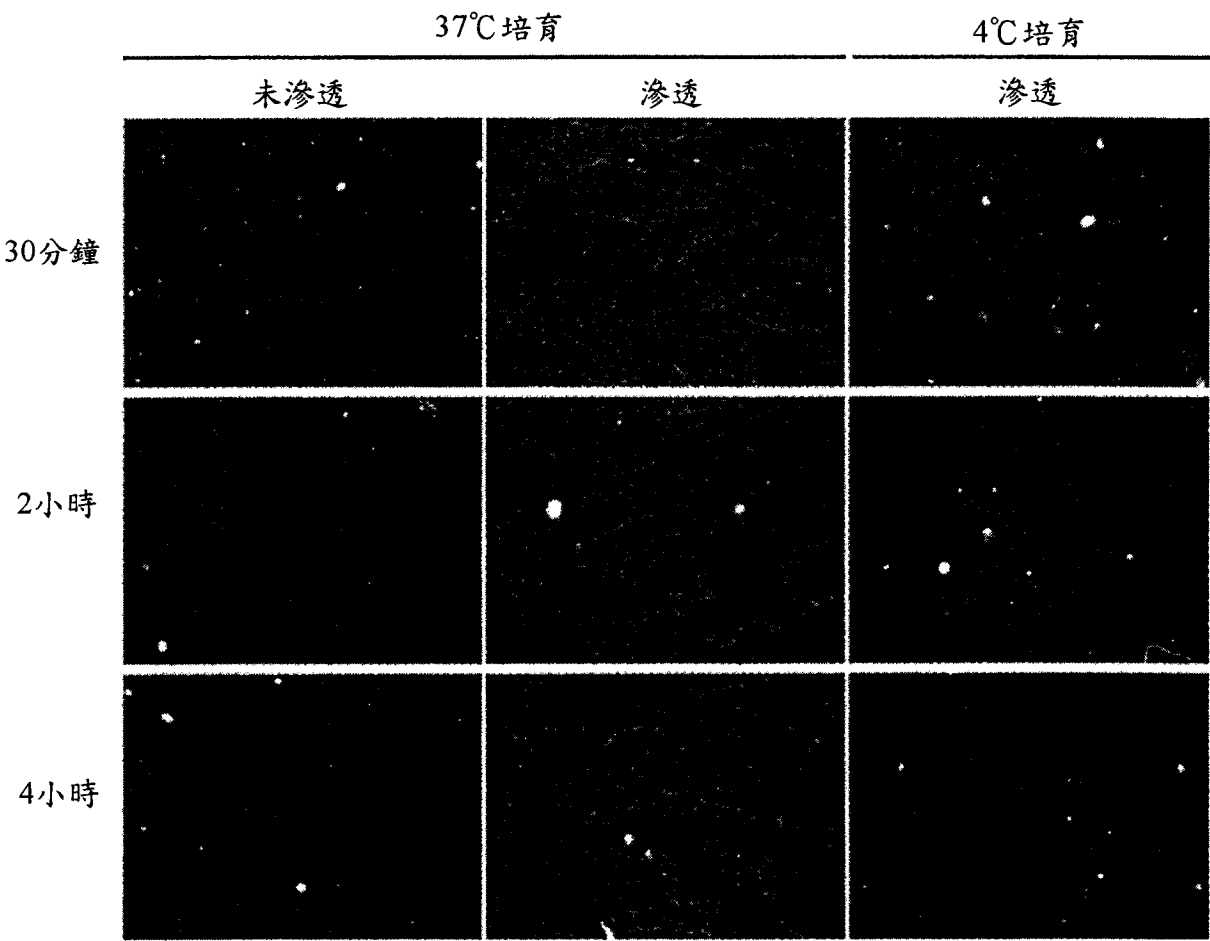


圖 12B

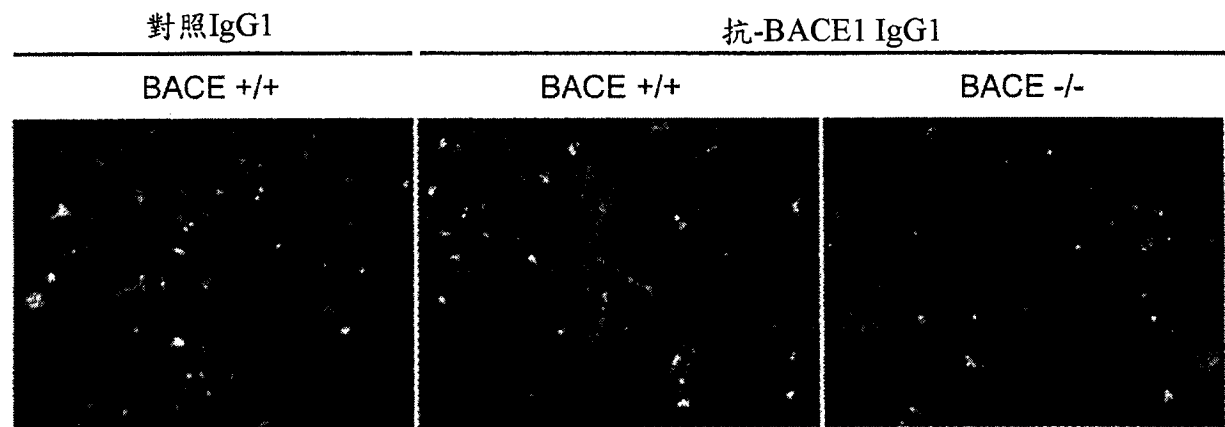


圖 12C

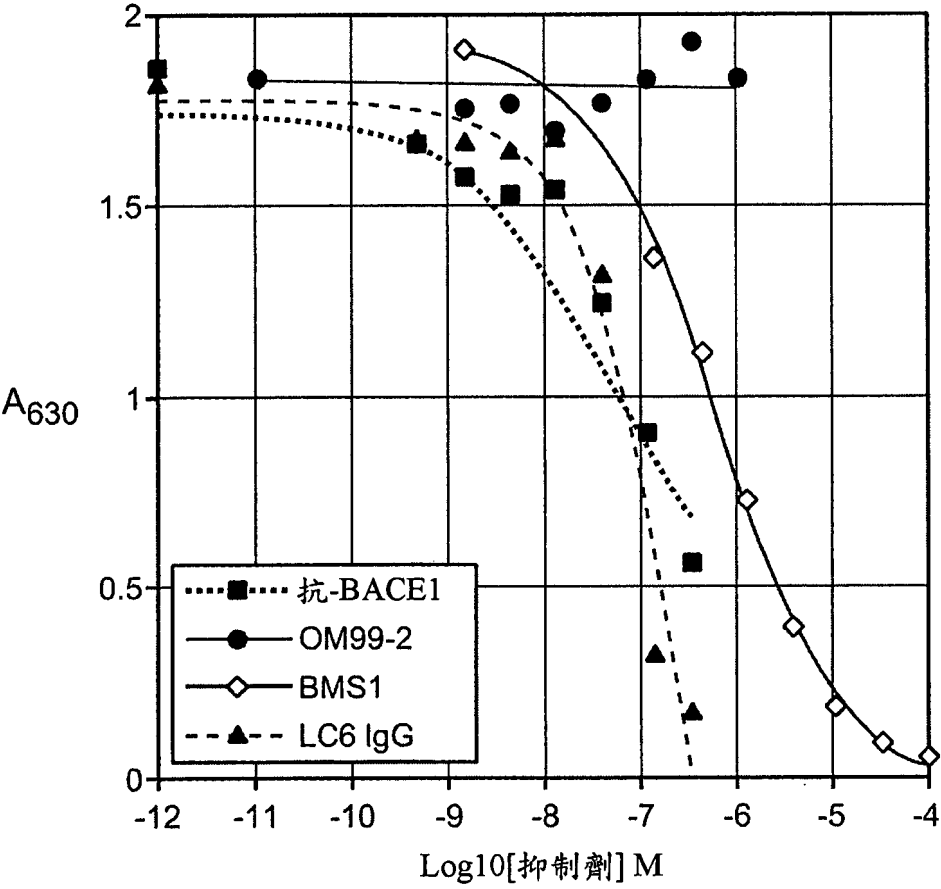


圖13

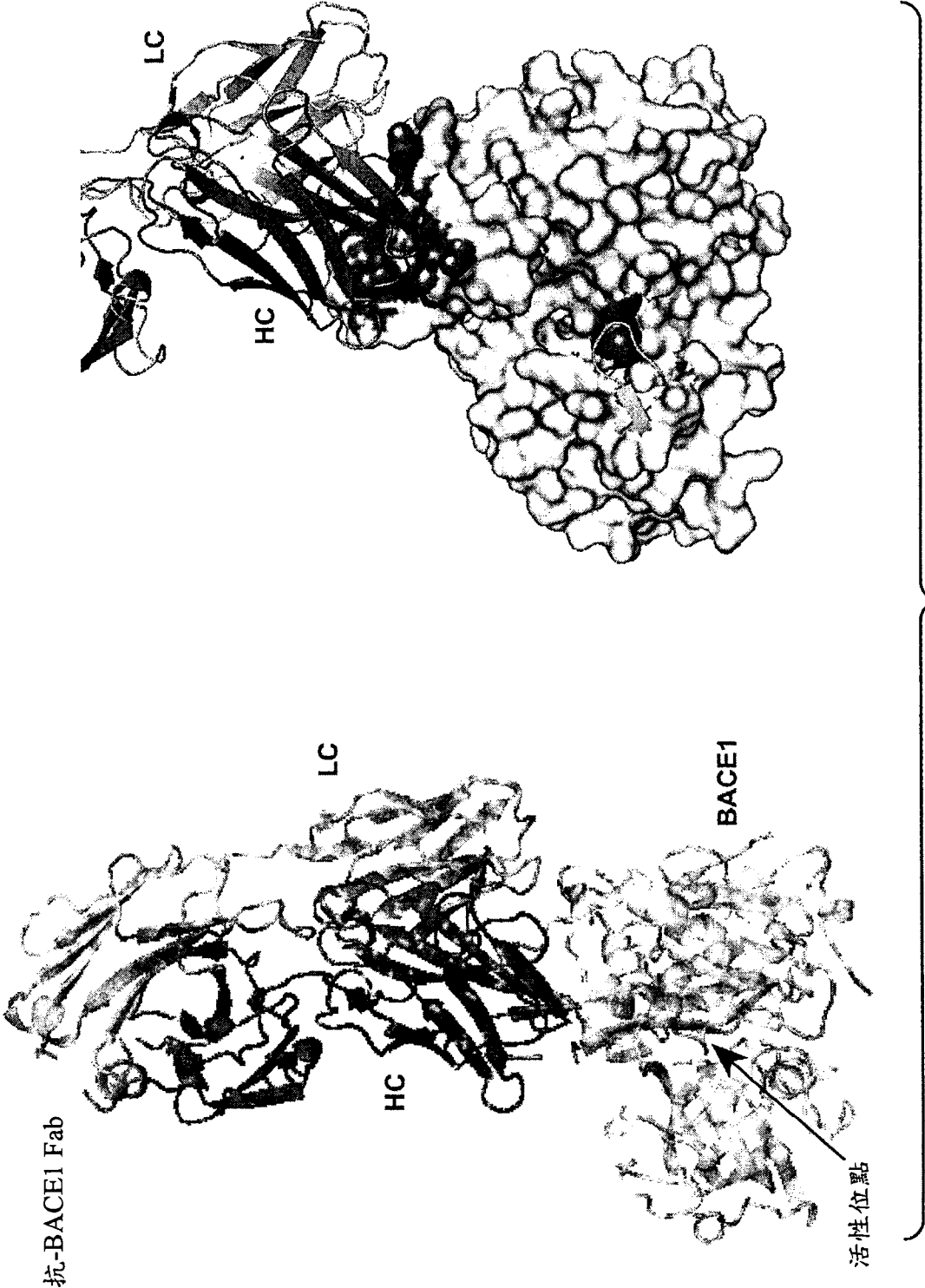


圖14

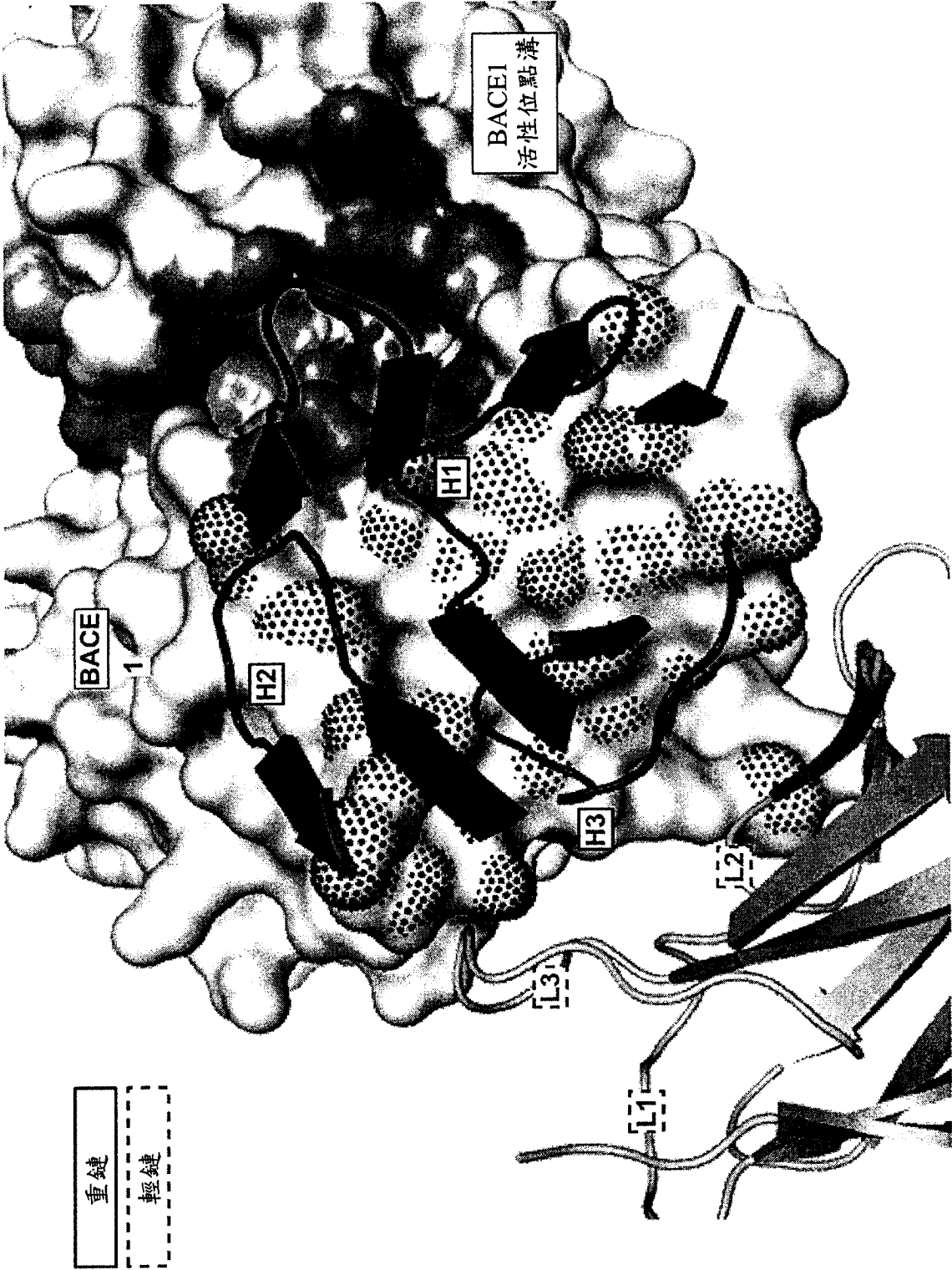


圖15

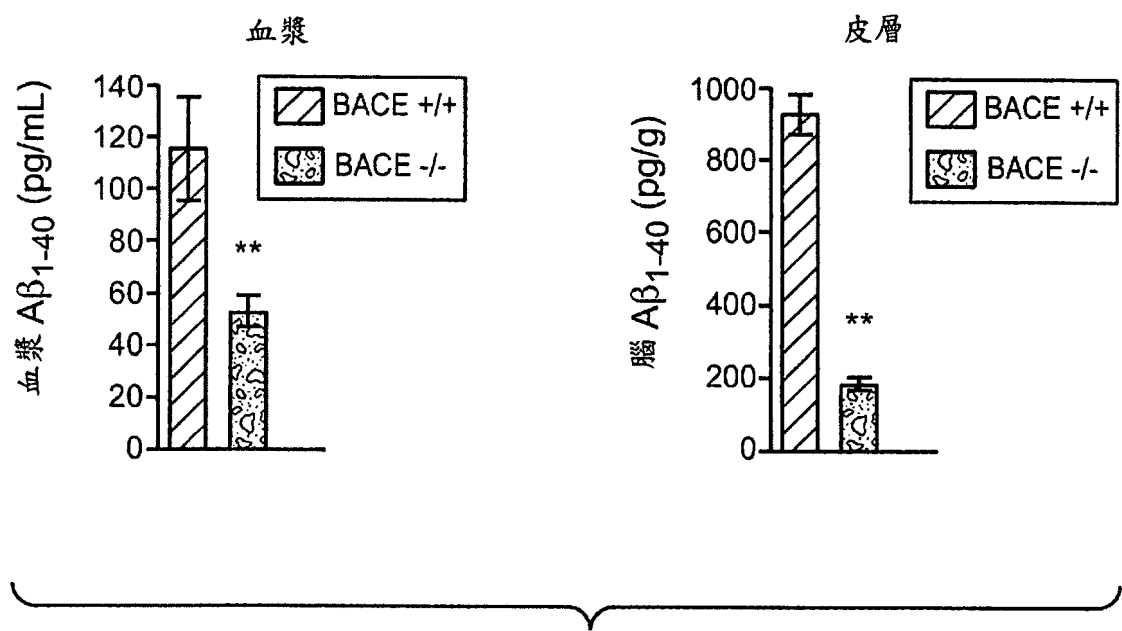


圖 16A

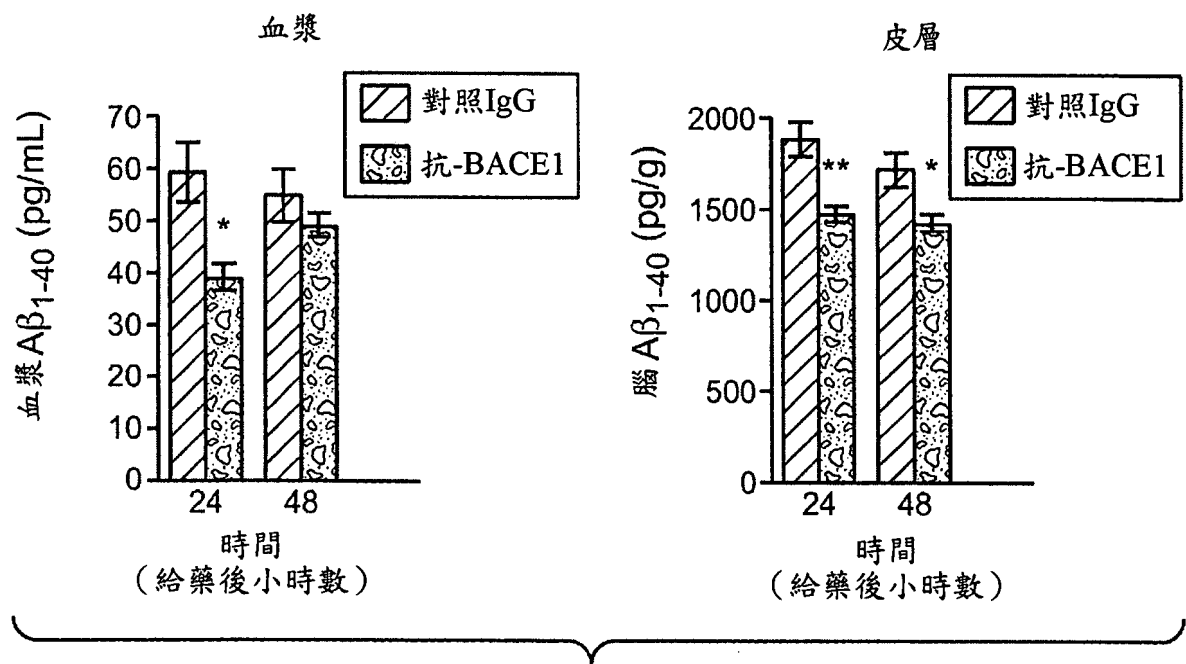


圖 16B

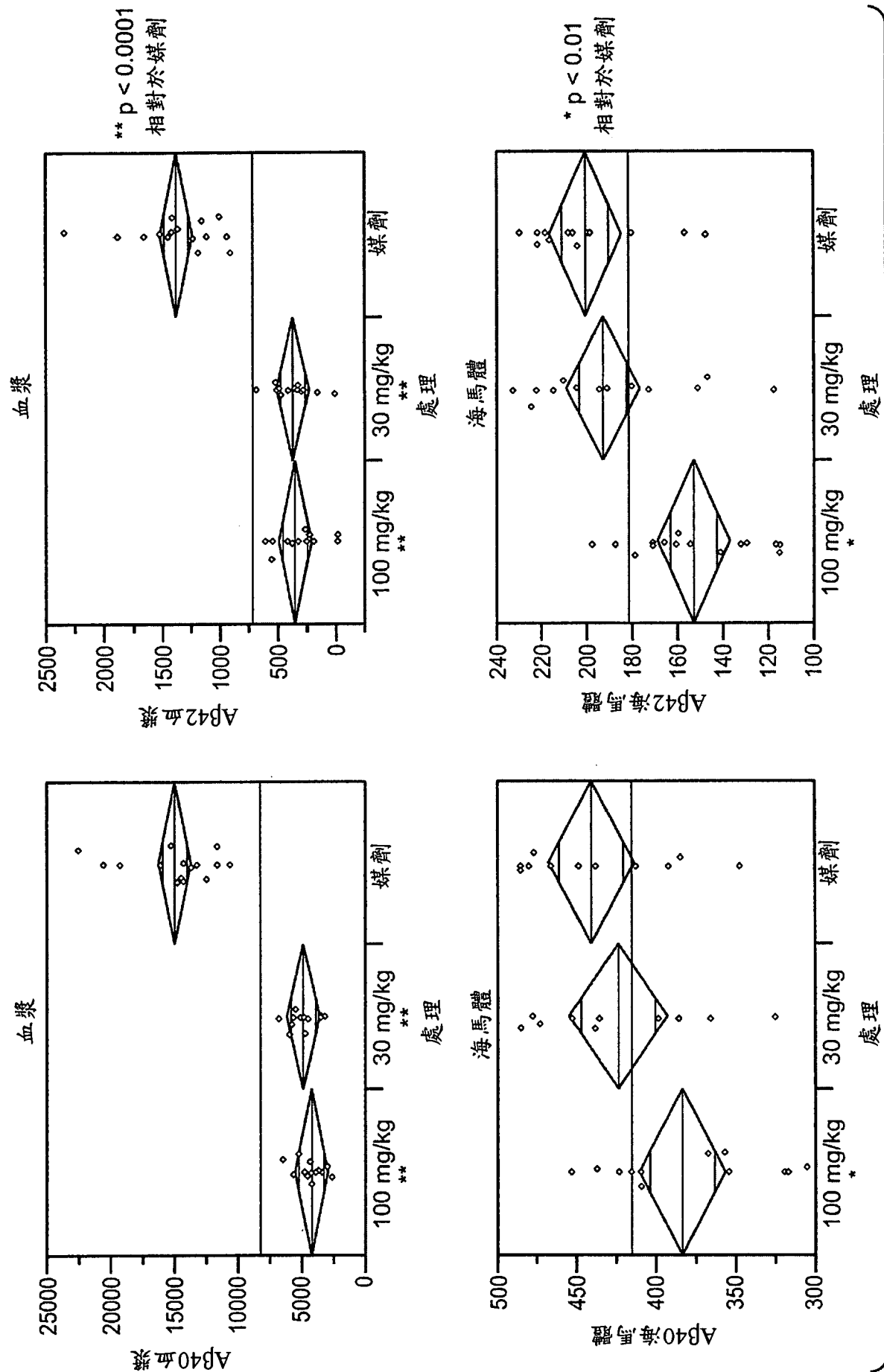


圖17A

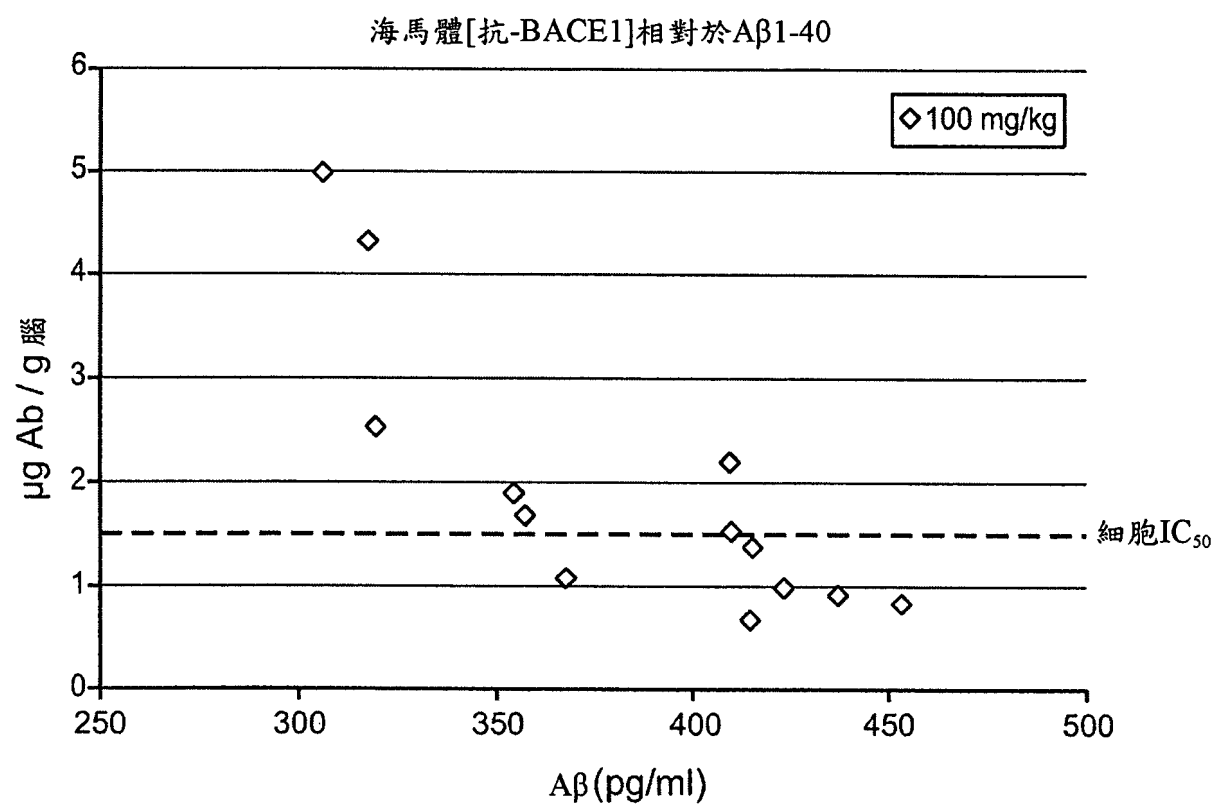


圖 17B

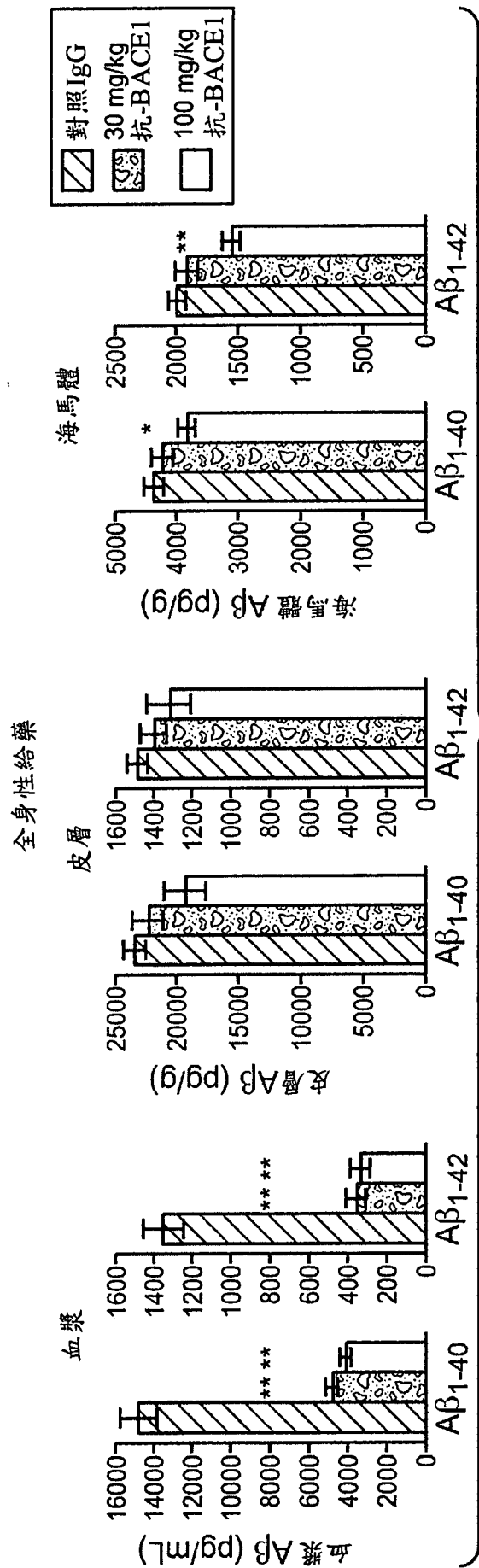


圖18A

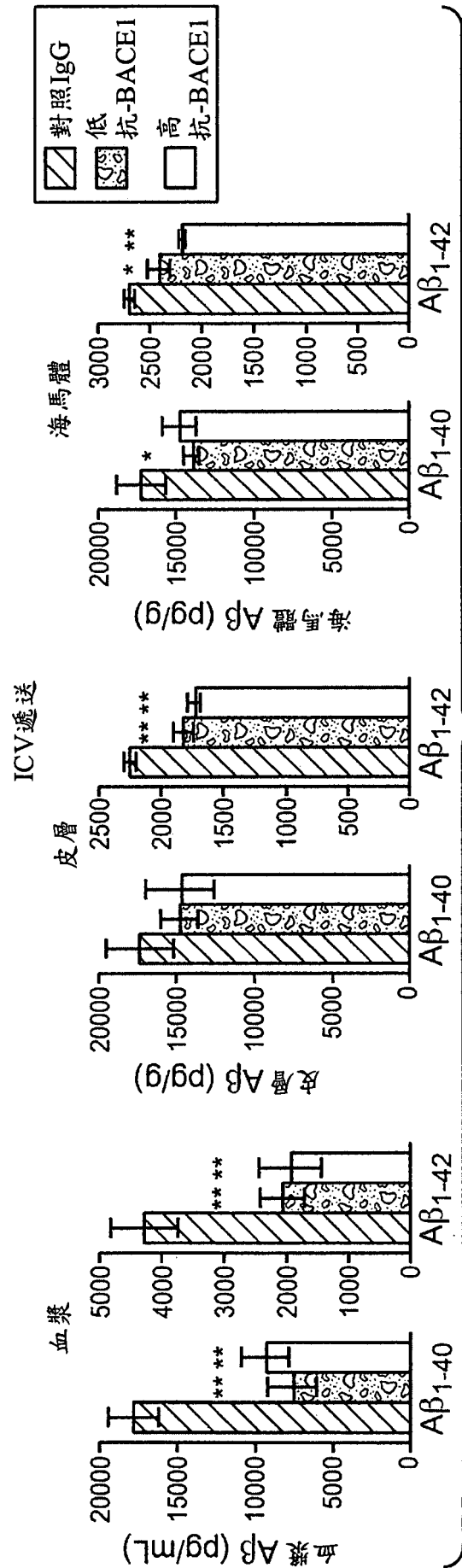


圖18B

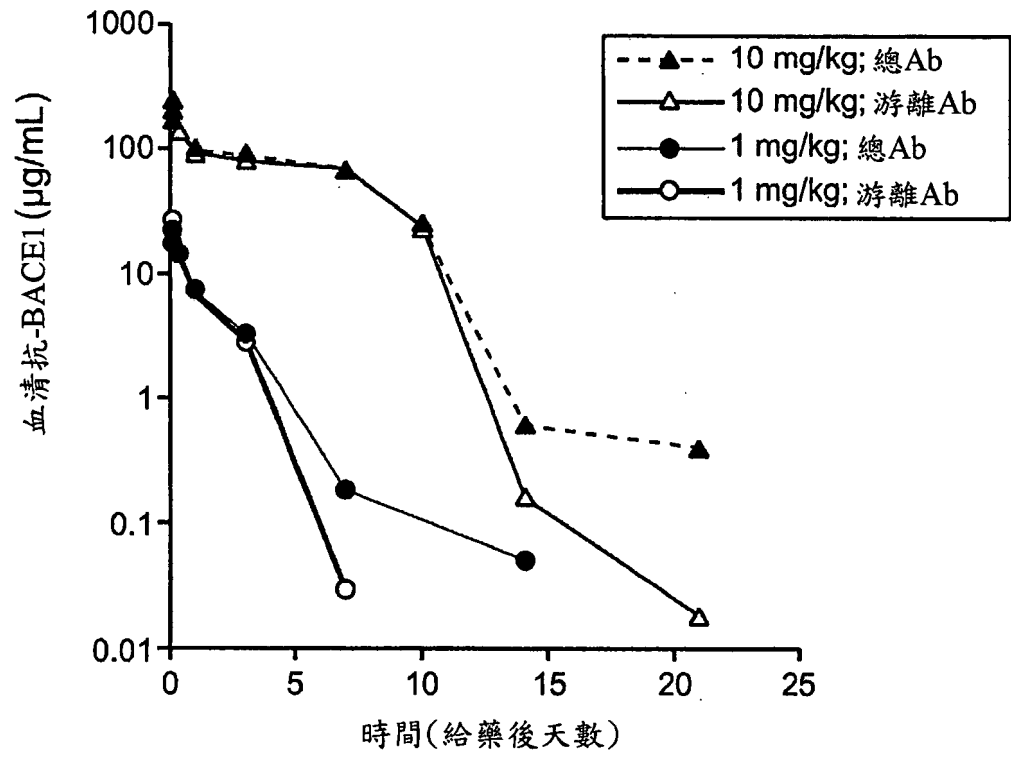


圖 19A

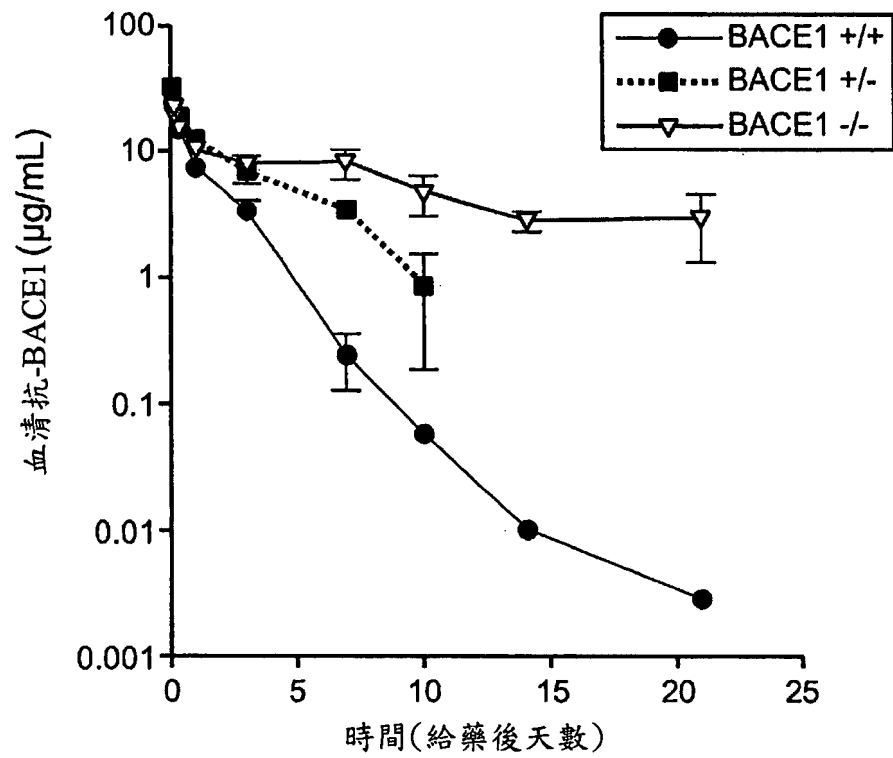


圖 19B

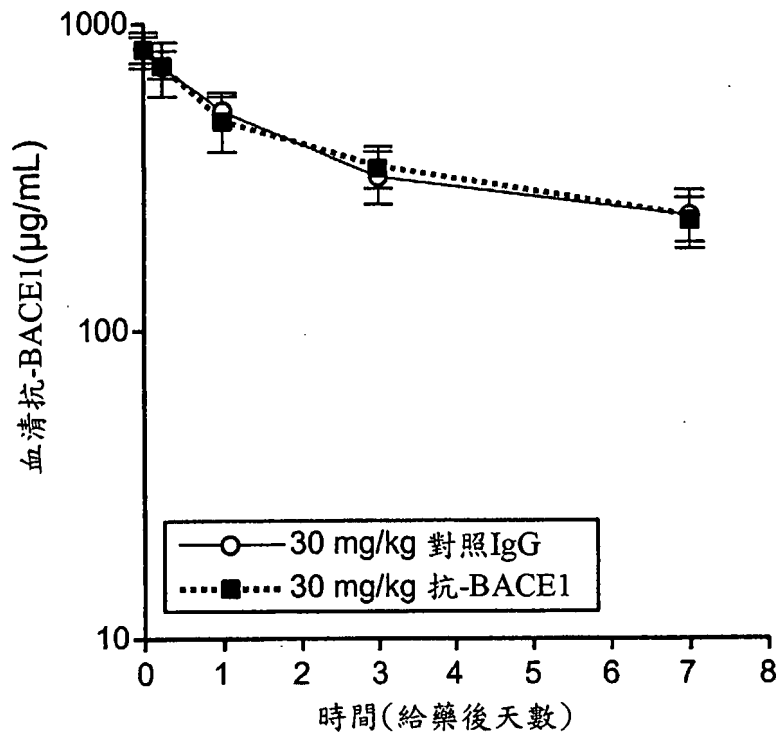


圖20A

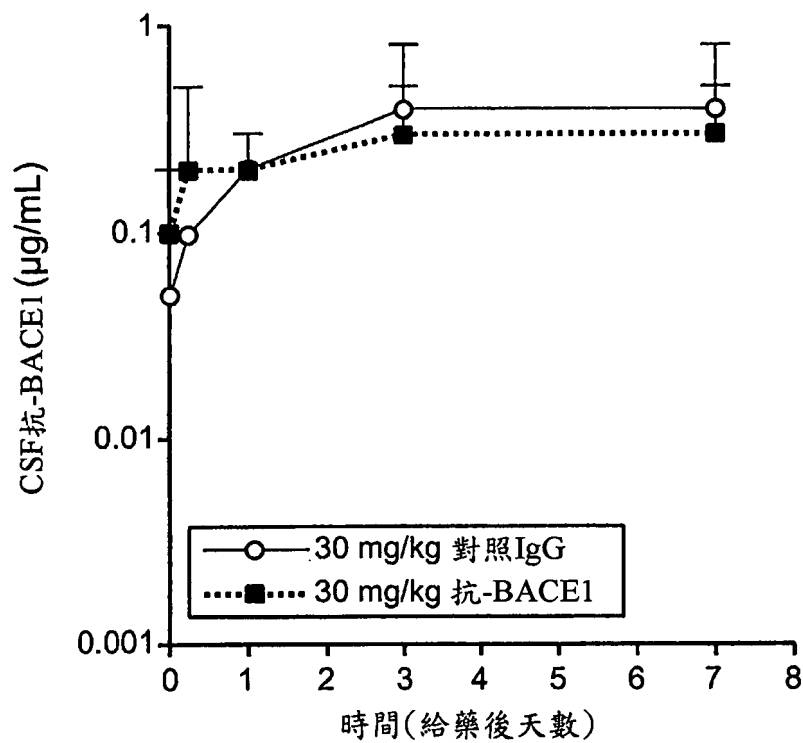
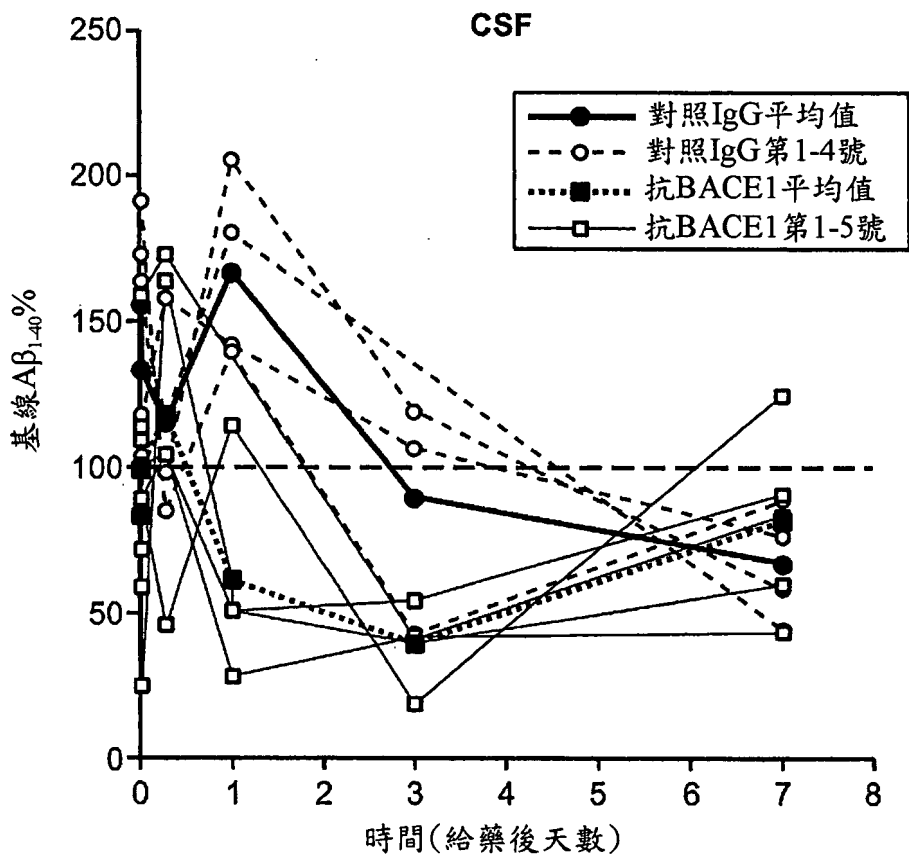
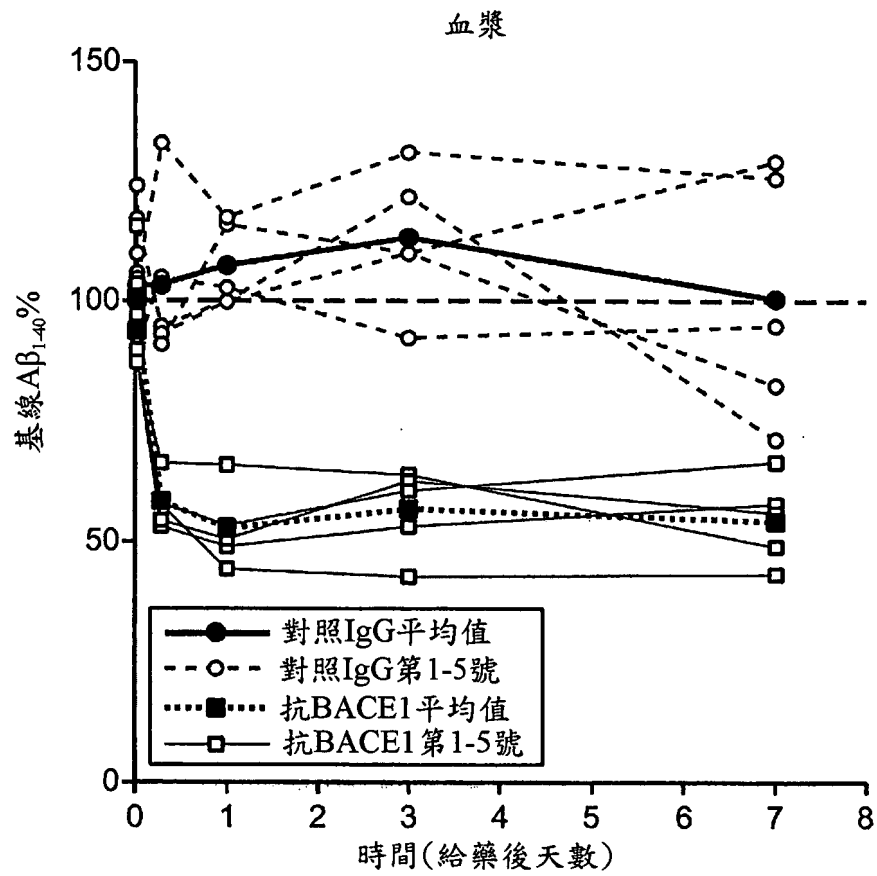


圖20B



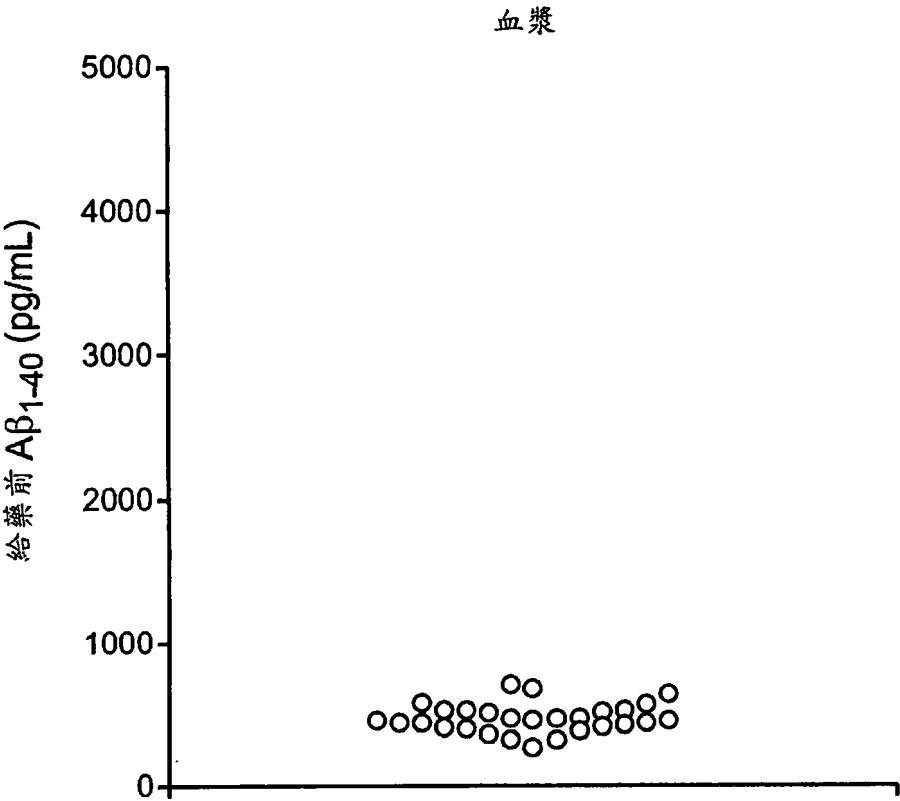


圖21C

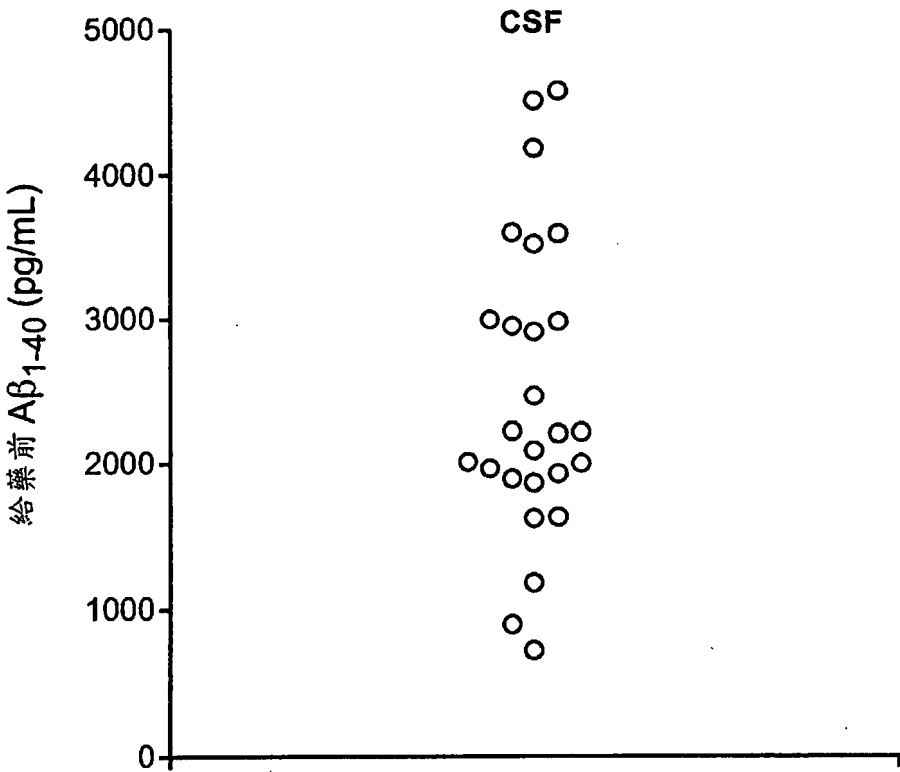


圖21D

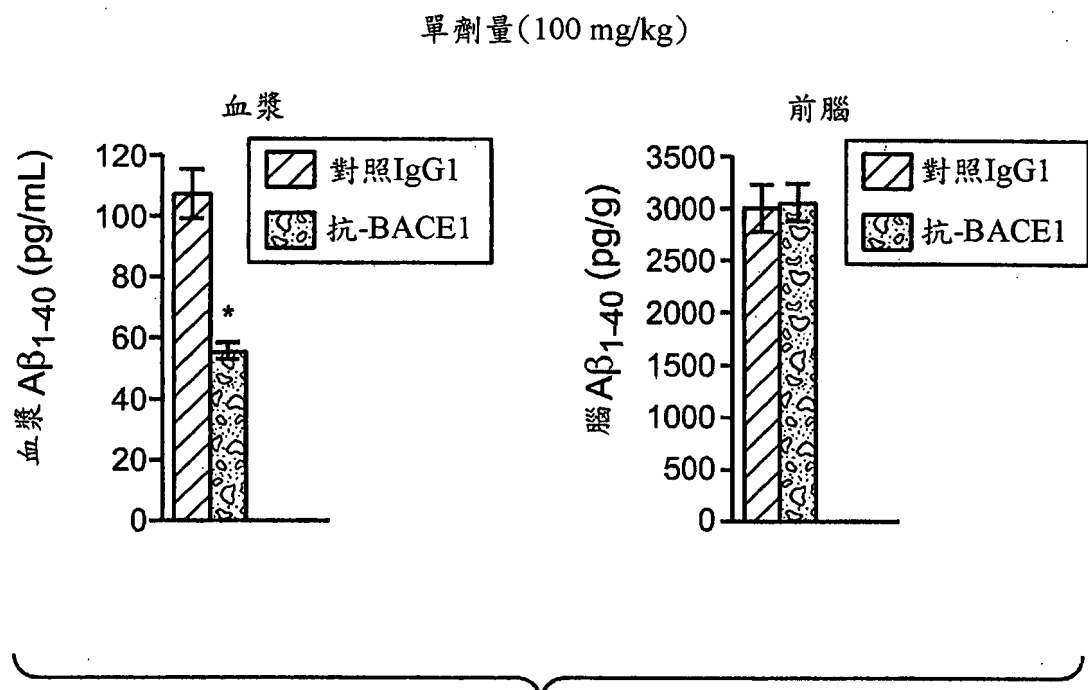


圖 22A

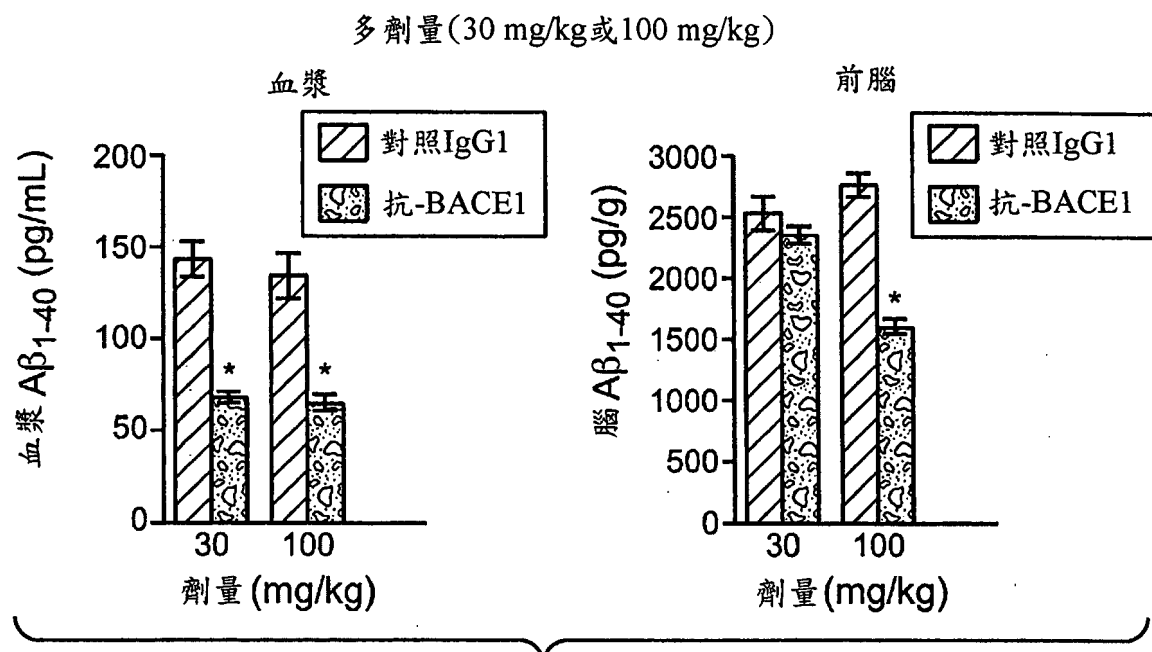


圖 22B

Kabat#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	Kabat - CDR L1												Chothia - CDR L1												接觸 - CDR L1											
YW412.8.31	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q																						
YW412.8.31.41S	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q																						
YW412.8.31.25BS	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q																						
YW412.8.31.81S	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q																						
YW412.8.31.6S	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q																						
YW412.8.31.75S	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q																						
YW412.8.31.9S	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q																						
YW412.8.31.65S	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q																						
YW412.8.31.86S	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q																						
YW412.8.31.55S	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q																						
YW412.8.31.58S	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q																						
YW412.8.31.25S	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q																						
YW412.8.31.3S	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q																						
YW412.8.31.89S	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q																						
YW412.8.31.54S	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q																						
YW412.8.31.71S	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q																						
YW412.8.31.51	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q																						
YW412.8.31.53	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q																						
YW412.8.31.69	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q																						
YW412.8.31.77	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q																						

圖23A

圖 23B

- 34 -

Kabat#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	
	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	S	C	A	A	S	G	F	T	F	L	G	Y	G	I	H	W	V	R	Q	A
YW412.8.31	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	S	C	A	A	S	G	F	T	F	L	G	Y	G	I	H	W	V	R	Q	A
YW412.8.31.41S	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	S	C	A	A	S	G	F	T	F	L	G	Y	G	I	H	W	V	R	Q	A
YW412.8.31.258S	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	S	C	A	A	S	G	F	T	F	L	G	Y	G	I	H	W	V	R	Q	A
YW412.8.31.81S	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	S	C	A	A	S	G	F	T	F	L	G	Y	G	I	H	W	V	R	Q	A
YW412.8.31.6S	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	S	C	A	A	S	G	F	F	Q	L	G	Y	G	I	H	W	V	R	Q	A
YW412.8.31.75S	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	S	C	A	A	S	G	F	T	F	L	G	Y	G	I	H	W	V	R	Q	A
YW412.8.31.9S	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	S	C	A	A	S	G	F	F	L	G	Y	G	I	H	W	V	R	Q	A	
YW412.8.31.65S	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	S	C	A	A	S	G	F	T	F	L	G	Y	G	I	H	W	V	R	Q	A
YW412.8.31.86S	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	S	C	A	A	S	G	F	T	F	L	G	Y	G	I	H	W	V	R	Q	A
YW412.8.31.55S	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	S	C	A	A	S	G	F	T	F	L	G	Y	G	I	H	W	V	R	Q	A
YW412.8.31.58S	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	S	C	A	A	S	G	F	T	F	L	G	Y	G	I	H	W	V	R	Q	A
YW412.8.31.25S	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	S	C	A	A	S	G	F	F	L	G	Y	G	I	H	W	V	R	Q	A	
YW412.8.31.3S	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	S	C	A	A	S	G	F	F	L	G	Y	G	I	H	W	V	R	Q	A	
YW412.8.31.89S	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	S	C	A	A	S	G	F	T	F	L	G	Y	G	I	H	W	V	R	Q	A
YW412.8.31.54S	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	S	C	A	A	S	G	F	T	F	L	G	Y	G	I	H	W	V	R	Q	A
YW412.8.31.71S	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	S	C	A	A	S	G	F	T	F	L	G	Y	G	I	H	W	V	R	Q	A
YW412.8.31.51	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	S	C	A	A	S	G	F	T	F	L	G	Y	G	I	H	W	V	R	Q	A
YW412.8.31.53	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	S	C	A	A	S	G	Y	T	I	G	Y	G	I	H	W	V	R	Q	A	
YW412.8.31.69	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	S	C	A	A	S	G	F	T	F	L	G	Y	G	I	H	W	V	R	Q	A
YW412.8.31.77	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	S	C	A	A	S	G	F	T	F	L	G	Y	G	I	H	W	V	R	Q	A

圖24A

Kabat#	Kabat - CDR H2										Chothia - CDR H2										接觸 - CDR H2																			
	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	A	B	C	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77
YW412.8.31	P	G	K	G	L	E	W	V	G	W	I	S	P	A	G	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	
YW412.8.31.41S	P	G	K	G	L	E	W	V	G	W	I	S	P	S	G	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	
YW412.8.31.25BS	P	G	K	G	L	E	W	V	G	W	I	S	P	Q	G	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	
YW412.8.31.81S	P	G	K	G	L	E	W	V	G	W	I	S	P	A	G	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	
YW412.8.31.6S	P	G	K	G	L	E	W	V	G	W	I	S	P	A	G	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	
YW412.8.31.75S	P	G	K	G	L	E	W	V	G	W	I	S	P	A	G	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	
YW412.8.31.9S	P	G	K	G	L	E	W	V	G	W	I	S	P	A	G	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	
YW412.8.31.65S	P	G	K	G	L	E	W	V	G	W	I	S	P	A	G	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	
YW412.8.31.86S	P	G	K	G	L	E	W	V	G	W	I	S	P	A	G	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	
YW412.8.31.55S	P	G	K	G	L	E	W	V	G	W	I	S	P	A	G	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	
YW412.8.31.58S	P	G	K	G	L	E	W	V	G	W	I	S	P	A	G	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	
YW412.8.31.25S	P	G	K	G	L	E	W	V	G	W	I	S	P	A	G	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	
YW412.8.31.3S	P	G	K	G	L	E	W	V	G	W	I	S	P	A	G	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	
YW412.8.31.89S	P	G	K	G	L	E	W	V	G	W	I	S	P	A	G	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	
YW412.8.31.54S	P	G	K	G	L	E	W	V	G	W	I	S	P	A	G	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	
YW412.8.31.71S	P	G	K	G	L	E	W	V	G	W	I	S	P	A	G	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	
YW412.8.31.51	P	G	K	G	L	E	W	V	G	W	I	S	P	A	G	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	
YW412.8.31.53	P	G	K	G	L	E	W	V	G	W	I	S	P	S	G	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	
YW412.8.31.69	P	G	K	G	L	E	W	V	G	W	I	S	P	A	G	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	
YW412.8.31.77	P	G	K	G	L	E	W	V	G	W	I	S	P	A	G	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	

圖24B

Kabat#	79	80	81	82	A	B	C	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	100	A	B	C	D	E	F	G	H	K	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113
	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	21				
YW412.8.31	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	80				
YW412.8.31.41S	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	81				
YW412.8.31.25BS	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	82				
YW412.8.31.81S	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	83				
YW412.8.31.6S	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	84				
YW412.8.31.75S	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	85				
YW412.8.31.9S	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	86				
YW412.8.31.65S	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	87				
YW412.8.31.86S	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	88				
YW412.8.31.55S	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	89				
YW412.8.31.58S	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	90				
YW412.8.31.25S	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	91				
YW412.8.31.3S	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	92				
YW412.8.31.89S	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	93				
YW412.8.31.54S	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	94				
YW412.8.31.71S	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	95				
YW412.8.31.51	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	96				
YW412.8.31.53	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	97				
YW412.8.31.69	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	98				
YW412.8.31.77	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	99				

Kabat - CDR H3		SEQ ID NO:
Choithia - CDR H3		
接觸 - CDR H3		

YW412.8.31	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	21
YW412.8.31.41S	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	80
YW412.8.31.25BS	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	81
YW412.8.31.81S	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	82
YW412.8.31.6S	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	83
YW412.8.31.75S	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	84
YW412.8.31.9S	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	85
YW412.8.31.65S	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	86
YW412.8.31.86S	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	87
YW412.8.31.55S	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	88
YW412.8.31.58S	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	89
YW412.8.31.25S	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	90
YW412.8.31.3S	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	91
YW412.8.31.89S	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	92
YW412.8.31.54S	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	93
YW412.8.31.71S	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	94
YW412.8.31.51	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	95
YW412.8.31.53	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	96
YW412.8.31.69	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	97
YW412.8.31.77	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	98

圖24C

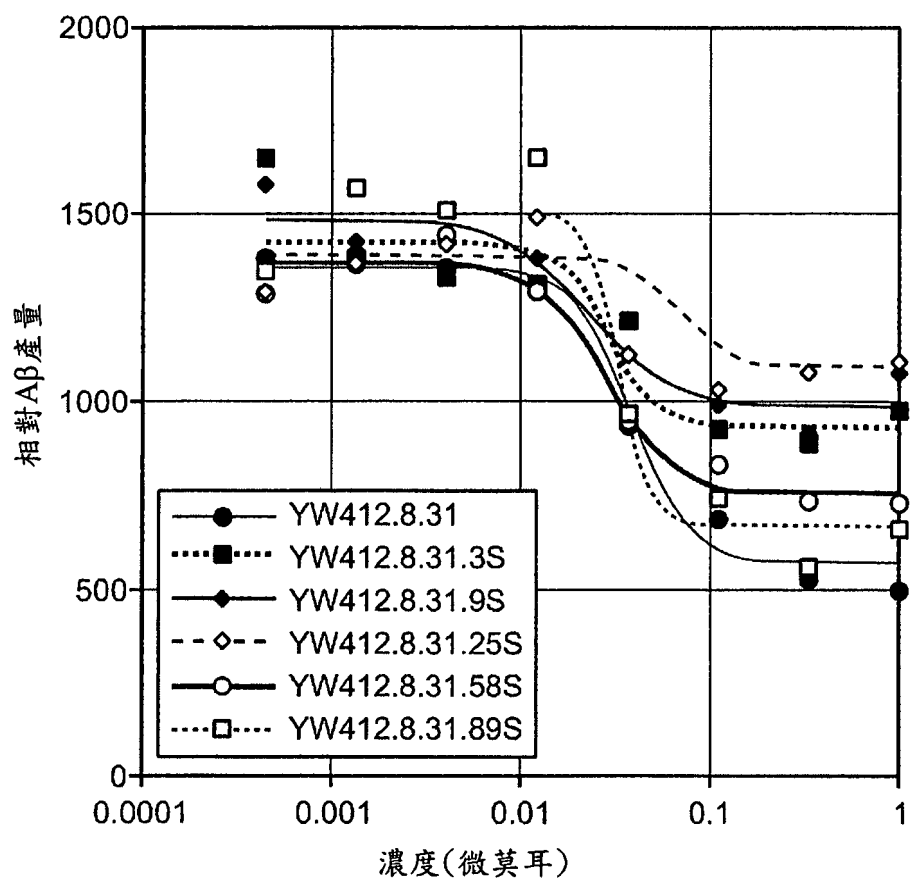


圖 25A

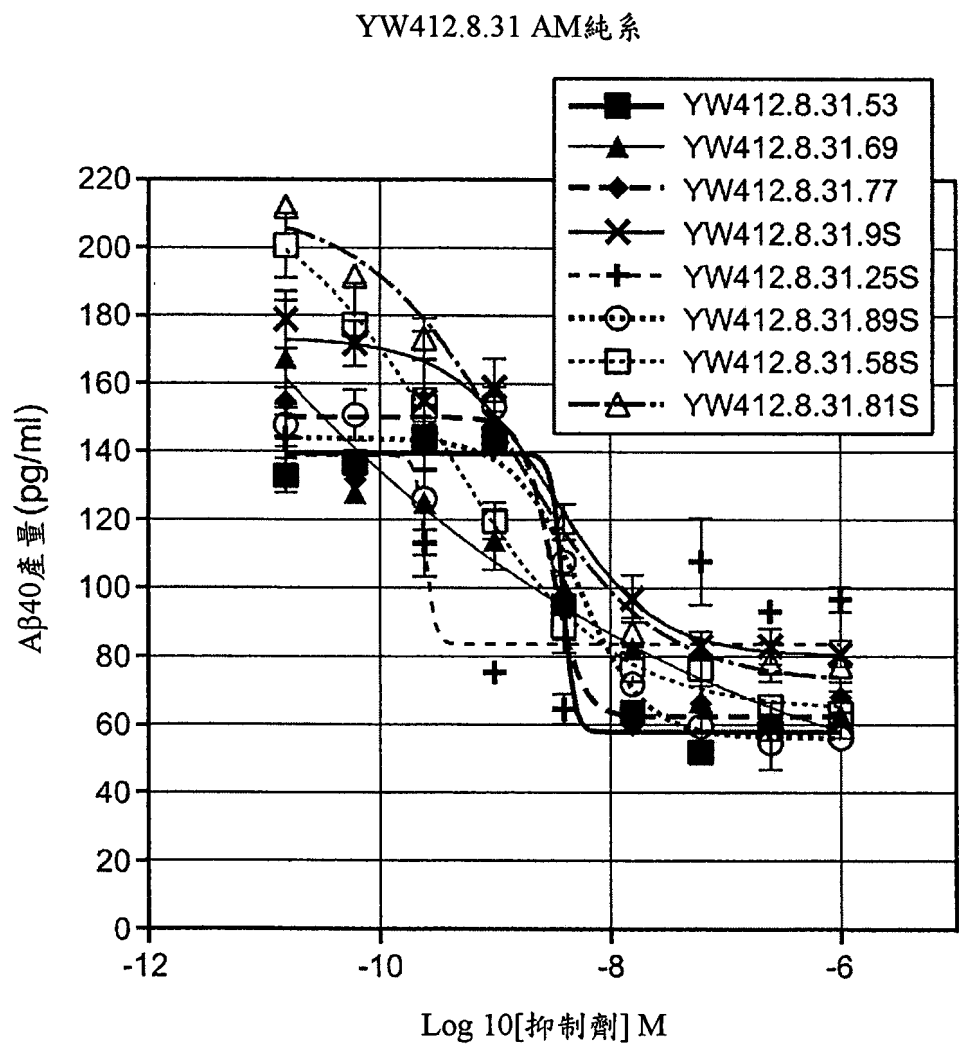


圖25B

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(4)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)