

(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1426423 B

(45) 授权公告日 2010.05.12

(21) 申请号 01808430.3

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2001.02.26

C07K 16/18(2006.01)

C12N 15/13(2006.01)

(30) 优先权数据

C12N 5/10(2006.01)

60/184,601 2000.02.24 US

A61K 39/00(2006.01)

60/254,498 2000.12.08 US

A61P 25/28(2006.01)

60/254,465 2000.12.08 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

(56) 对比文件

2002.10.21

US 5766846 A, 1998.06.16, 说明书第4栏第21行—第22栏第42行.

(86) PCT申请的申请数据

审查员 马岚

PCT/US2001/006191 2001.02.26

(87) PCT申请的公布数据

W001/62801 EN 2001.08.30

(73) 专利权人 华盛顿大学

地址 美国密苏里州

专利权人 伊莱利利公司

(72) 发明人 D·M·霍尔茨曼 R·德马托斯

K·R·巴勒斯 S·M·保罗

N·特苏鲁施塔 M·瓦斯奎茨

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

司 72001

代理人 孟凡宏

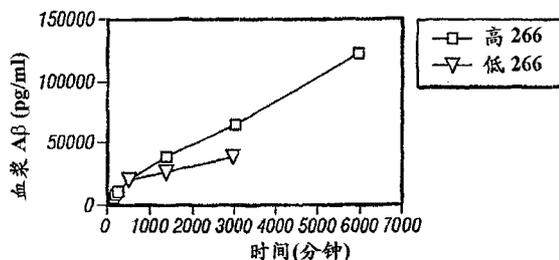
权利要求书 1 页 说明书 35 页 附图 7 页

(54) 发明名称

整合淀粉样蛋白  $\beta$  肽的人源化抗体

(57) 摘要

描述了一种预防性以及治疗性治疗特征在于淀粉样斑形成的病症的方法。所述方法使用的人源化抗体整合人体生物学液体中可溶性A $\beta$ 肽,或者优先特异性结合淀粉样蛋白 $\beta$ 肽A $\beta$ 位置13-28包含的表位。



1. 一种人源化抗体,所述抗体包含 SEQ ID NO :9 给出序列的轻链可变区以及 SEQ ID NO :10 给出的重链可变区。
2. 权利要求 1 的人源化抗体,所述抗体包含 SEQ ID NO :11 给出序列的轻链以及 SEQ ID NO :12 给出序列的重链。
3. 权利要求 1 的人源化抗体,所述抗体是一种 IgG1 免疫球蛋白同种型。
4. 一种核酸,它包含编码权利要求 1 的人源化抗体的轻链和重链的序列。
5. 权利要求 4 的核酸,它包含编码 SEQ ID NO :11 所给出的轻链的序列。
6. 权利要求 4 的核酸,它包含编码 SEQ ID NO :12 所给出的重链的序列。
7. 权利要求 4 的核酸,它包含编码权利要求 2 的人源化抗体的轻链和重链的序列。
8. 一种用于表达权利要求 1 或 2 的抗体的表达载体,所述载体包含编码所述抗体的核苷酸序列。
9. 一种用权利要求 8 的表达载体转染的细胞。
10. 一种药用组合物,所述药用组合物包含权利要求 1 或 2 任一项的人源化抗体和药学上可接受的赋形剂。
11. 按照权利要求 1 或 2 任一项的人源化抗体在生产用于治疗临床或临床前阿耳茨海默氏病、Down 氏综合征、或临床或临床前脑淀粉样血管病的药物中的应用。
12. 按照权利要求 1 或 2 任一项的人源化抗体在生产用于治疗、预防或逆转临床或临床前阿耳茨海默氏病、Down 氏综合征、或临床或临床前脑淀粉样血管病的认知力下降的药物中的应用。
13. 权利要求 1 或 2 任一项的人源化抗体在生产治疗阿耳茨海默氏病的药物中的应用。

## 整合淀粉样蛋白 $\beta$ 肽的人源化抗体

### [0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求对 2000 年 2 月 24 日申请的美国临时申请 60/184,601、2000 年 12 月 8 日申请的 60/254,465 和 2000 年 12 月 8 日申请的 60/254,498 的优先权,所述每项临时申请的内容都通过引用结合到本文中。

### 技术领域

[0003] 本发明涉及结合 A $\beta$  肽氨基酸 13 到 28 之间的表位的人源化抗体,以及涉及预防和治疗与  $\beta$  淀粉样蛋白有关的病症,例如阿耳茨海默氏病、Down 氏综合征和脑淀粉样血管病。更具体地说,本发明涉及使用人源化单克隆抗体整合血浆、脑和脑脊髓液中的淀粉样蛋白  $\beta$  (A $\beta$ ) 肽,以预防 A $\beta$  肽在脑和脑血管中的积累或逆转 A $\beta$  肽在脑和脑血管中的沉积,由此改善认知。

### 背景技术

[0004] 多种导致认知缺陷、中风、脑出血和一般性精神衰弱 (general mental debilitation) 的症状似乎与脑内包含淀粉样蛋白  $\beta$  肽 (A $\beta$ ) 的神经斑和脑血管斑有关。在这些病症中,有临床前和临床阿耳茨海默氏病、Down 氏综合征以及临床前和临床脑淀粉样血管病 (CAA)。淀粉样蛋白  $\beta$  肽形成所述淀粉样斑。这些肽在血液和脑脊髓液 (CSF) 中循环,通常为与脂蛋白复合的形式。循环形式的 A $\beta$  肽包含 39-43 个氨基酸 (大多数 40 或 42 个氨基酸),通过对共同前体蛋白的切割而产生,所述共同前体蛋白即淀粉样前体蛋白,通常命名为 APP。溶解性 A $\beta$  的某些形式本身有神经毒性,可能决定神经变性和 / 或认知下降的严重性 (McLean, C. A. 等, *Ann. Neurol.* (1999) 46 :860-866 ; Lambert, M. P. 等, (1998) 95 :6448-6453 ; Naslund, J. , *J. Am. Med. Assoc.* (2000) 283 :1571)。

[0005] 证据显示:A $\beta$  能够在脑和血液之间来回转运 (Gherssi-Egea, J-F. 等, *J. Neurochem.* (1996) 67 :880-883 ; Zlokovic, B. V. 等, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* (1993) 67 :1034-1040 ; Shibata M 等, *J. Clin. Invest.* (2000) 106 :1489-1499)。此外,斑内的 A $\beta$  与脑和血液中的溶解性 A $\beta$  形成平衡 (Kawarabayashi T 等, *J. Neurosci.* (2001) 372-381)。

[0006] 如 PCT 申请 US00/35681 和美国序号 09/153,130 所述,CSF 中 A $\beta$  肽的总循环水平在正常个体和倾向于呈现阿耳茨海默氏病的个体中相似,这两份文献都通过引用结合到本文中。然而,在患有阿耳茨海默氏病的个体中,平均 A $\beta_{42}$  水平要更低 (Nitsch, R. M. 等, *Ann. Neurol.* (1995) 37 :512-518)。已知 A $\beta_{42}$  比 A $\beta_{40}$  更易聚集,当发生聚集时,随后就出现不利后果,例如 A $\beta$  在淀粉样斑中沉积、A $\beta$  转化成毒性溶解型、神经细胞损伤和行为障碍如痴呆 (Golde, T. E. 等, *Biochem. Biophys. Acta.* (2000) 1502 :172-187)。

[0007] 在 1999 年 6 月 10 日公开的 PCT 公开号 W099/27944 中,描述了诱导免疫应答以减少淀粉样蛋白沉积的方法。该说明书假设全长聚集 A $\beta$  肽可能是有用的免疫原。给予与绵羊抗小鼠 IgG 缀合的 A $\beta$  片段 (氨基酸 13-28) 并不导致大脑皮质淀粉样蛋白量发生变化,

并且在接受 A $\beta$  13-28 片段缀合物注射的动物中,仅有九分之一显示 A $\beta$ <sub>40</sub> 作用下的淋巴增殖。该申请还指出:可以使用特异性结合 A $\beta$  肽的抗体作为治疗剂。然而,这看起来是推测性的,因为支持数据反映涉及使用例如 A $\beta$ <sub>42</sub> 主动免疫的方法。使用佐剂提供所述肽,并确定免疫形成的抗体滴度和 A $\beta$  肽及前体肽的水平。该出版物明显提示:为缓解阿耳茨海默氏病症状,必须减少 A $\beta$  斑,并且成功减少 A $\beta$  斑需要细胞介导的过程。

[0008] 1999 年 11 月 25 日公开的 WO 99/60024 涉及利用抗淀粉样蛋白抗体去除淀粉样蛋白的方法。然而根据陈述,该机制利用抗 A $\beta$  抗体结合预形成淀粉样沉积(即淀粉样斑)的能力,导致随后局部小神经胶质细胞清除局部斑。没有在体内证明该机制。该出版物进一步陈述:为有效对抗 A $\beta$  斑,抗 A $\beta$  抗体必需到达脑实质并穿过血脑屏障。

[0009] 在 2000 年 12 月 7 日公开了几份涉及尝试控制淀粉样斑的 PCT 申请。WO 00/72880 描述:在阿耳茨海默氏病的转基因鼠模型中,当用 A $\beta$  肽的 N 末端片段以及结合它们的抗体进行治疗时,在皮质和海马内的淀粉样斑显著减少,而用缀合绵羊抗鼠 IgG 的 A $\beta$  13-28 片段进行治疗或用对抗所述 13-28 片段的抗体即抗体 266 进行治疗时,则没有这种情况。人们断言所述 N 末端定向抗体在体外研究中穿过血脑屏障,并诱导对淀粉样斑的吞噬作用。

[0010] WO 00/72876 公开内容事实上与 WO 00/72880 相同,涉及用淀粉样蛋白原纤维成分本身进行免疫。

[0011] WO 00/77178 描述设计用于催化  $\beta$ -淀粉样蛋白水解的抗体,包括针对苯丙氨酸 statine 转换化合物 Cys-A $\beta$ <sub>10-25</sub>、statine Phe<sub>19</sub>-Phe<sub>20</sub> 和 Cys-A $\beta$ <sub>10-25</sub>Statine Phe<sub>20</sub>-Ala<sub>21</sub> 的混合物产生的抗体,以及针对在 Phe<sub>19</sub> 和 Phe<sub>20</sub> 之间具有还原性酰胺键的 A $\beta$ <sub>10-25</sub> 产生的抗体。该文件提到整合 A $\beta$ ,但这是猜测,因为它没有给出这种整合的证据。此外,该文件没有提供体内证据证明给予抗体导致 A $\beta$  从中枢神经系统流出、干扰斑形成、减少淀粉样斑负荷、在所述抗体和组织样品中的 A $\beta$  之间形成复合物、或影响认知。

[0012] 已经显示 A $\beta$  代谢的一条途径是从 CNS 转运到血浆 (Zlokovic, B. V. 等, Proc. Natl. Acad. Sci (USA) (1996) 93 :4229-4234 ;Ghersi-Egea, J-F. 等, J. Neurochem. (1996) 67 :880-883)。此外,已经显示血浆中的 A $\beta$  能够穿过血脑屏障并进入脑内 (Zlokovic, B. V. 等, Biochem. Biophys. Res. Comm. (1993) 67 :1034-1040)。已经显示:在阿耳茨海默氏病的 APP<sup>V717F</sup> 转基因小鼠模型中,给予某些多克隆和单克隆 A $\beta$  抗体降低淀粉样斑内的 A $\beta$  沉积 (Bard, F. 等, Nature Med. (2000) 6 :916-919);然而,据说这是由于某些抗 A $\beta$  抗体穿过血脑屏障,刺激小胶质细胞吞噬淀粉样斑。在 Bard 的试验中,对来自体内的脑切片的测定显示:加入的 A $\beta$  抗体与外源加入的小胶质细胞一起诱导对 A $\beta$  的吞噬,导致除去 A $\beta$  沉积。

[0013] 使用标准化测试可以容易地检测 CSF 和血液中溶解性 A $\beta$ <sub>40</sub> 和 A $\beta$ <sub>42</sub> 的水平,所述标准化测试使用针对 A $\beta$  链上表位的抗体。在例如美国专利 5,766,846、美国专利 5,837,672 和美国专利 5,593,846 中已经详细报道了所述测定。这些专利描述产生针对 A $\beta$  肽中心域的鼠单克隆抗体,据报道这些抗体在位置 16 和 17 周围、包括位置 16 和 17 上具有表位。还描述了针对 N-末端区的抗体。据称几种单克隆抗体与 A $\beta$  肽的位置 13-28 发生免疫反应;它们不结合代表位置 17-28 的肽,因此根据所引用的专利,这证明包括位置 16-17( $\alpha$ -分泌酶位点)在内的该区是这些抗体的靶。在已知结合 A $\beta$  氨基酸 13 到 28 的抗体中包括小鼠抗体 266、4G8 和 1C2。

[0014] 我们目前意外地发现：对 24 月龄半合子转基因小鼠 (APP<sup>V717F</sup>) 给予 266 抗体非常快速并且几乎完全地恢复认知 (目标记忆 (objectmemory))。然而,所述抗体并不具有本领域教导的有效治疗下列疾病和病症的抗体所需的特性：阿耳茨海默氏病、Down 氏综合征和其它涉及 A $\beta$  肽的病症。更令我们惊奇的是,我们观察到结合 A $\beta$  位置 13 到 28 之间的抗体 (266 和 4G8) 能够整合血液中结合的循环形式 A $\beta$  肽中的溶解型 A $\beta$ , 并且外周给予抗体 266 导致相当大量的 A $\beta$  肽从 CNS 快速流出到血浆。这导致溶解性 A $\beta$  的清除增加,防止淀粉样形成,最惊人的是改善认知,甚至不一定降低 A $\beta$  淀粉样斑负荷、穿过血脑屏障达到任何显著的程度、修饰斑、激活细胞机制或以强亲和力与聚集的 A $\beta$  结合。

[0015] 本发明的公开

[0016] 本发明提供人源化抗体或其片段,所述抗体或其片段积极地影响涉及 A $\beta$  的疾病和病症中的认知,所述疾病和病症如临床或临床前阿耳茨海默氏病、Down 氏综合征以及临床或临床前脑淀粉样血管病。所述抗体或其片段不必穿过血脑屏障、修饰淀粉样斑、激活细胞反应或甚至不必降低淀粉样斑负荷。另一方面,本发明提供提供人源化抗体及其片段,所述抗体或其片段整合血液中结合的循环形式 A $\beta$  肽中的 A $\beta$  肽,改变溶解型 A $\beta$  和结合型 A $\beta$  在中枢神经系统和血浆中的清除。又一方面,本发明提供人源化抗体及其片段,其中所述人源化抗体特异性结合 A $\beta$  氨基酸 13 到 28 之间的表位。再一方面,本发明提供人源化抗体及其片段,其中 CDR 源自小鼠单克隆抗体 266,并且其中所述抗体大致保留所述小鼠抗体的结合特性,具有与所述小鼠抗体在功能上等同的体外和体内特性 (序列 SEQ ID NO :1 到 SEQ ID NO :6)。另一方面,本发明提供人源化抗体及其片段,其中所述可变区具有包括以下的序列：来自小鼠抗体 266 的 CDR 和特异性人构架序列 (序列 SEQ ID NO :7-SEQ ID NO :10),其中所述抗体大致保留所述小鼠抗体的结合特性,具有与所述小鼠抗体 266 在功能上等同的体外和体内特性。再一方面,本发明提供人源化抗体及其片段,其中轻链是 SEQ ID NO :11,重链是 SEQ ID NO :12。

[0017] 本发明的另一部分是编码上文所公开的人源化抗体或其片段的多核苷酸序列、包含编码所述人源化抗体或其片段的多核苷酸序列的载体、用所述载体转化的宿主细胞或掺入表达所述人源化抗体或其片段的多核苷酸的宿主细胞、本文所公开的人源化抗体及其片段的药用制剂、以及制造和使用上述物质的方法。

[0018] 所述人源化抗体及其片段可用于整合人体内的 A $\beta$ ; 用于治疗和预防特征在于脑内有 A $\beta$  斑或 A $\beta$  毒性的疾病和病症,例如人类阿耳茨海默氏病、Down 氏综合征和脑淀粉样血管病; 用于诊断人体内的这些疾病; 以及用于确认人体是否会对使用针对 A $\beta$  的人类抗体的治疗有反应。

[0019] 体内给予合适的人源化抗体以整合在生物学液体中循环的 A $\beta$  肽可用于预防性治疗以及治疗性治疗涉及脑内形成包含 A $\beta$  的弥散斑 (diffuse plaque)、神经斑和脑血管斑的病症。所述人源化抗体 (包括其免疫反应性片段) 导致从大分子复合物中去除 A $\beta$  肽,所述大分子复合物在正常情况下涉及在体液和形成斑的位点或所述 A $\beta$  肽有毒性的位点之间转运所述 A $\beta$  肽。此外,用所述抗体或其片段整合血浆 A $\beta$  肽的作用象是一个“接受器 (sink)”,有效整合血浆区室中的溶解性 A $\beta$  肽,并诱导 A $\beta$  从中枢神经系统 (CNS) 的各位置进入血浆。通过整合血液中的 A $\beta$ , 增强从脑的净流出,防止溶解性 A $\beta$  沉积在不溶性斑内,并防止溶解性 A $\beta$  在脑内形成有毒性的溶解性种类。此外,斑内的不溶性 A $\beta$  与溶解

性 A $\beta$  形成平衡,通过血液中的螯合效应,可以从脑内除去斑内不溶性 A $\beta$ 。用所述抗体螯合 A $\beta$  肽也增强从体内去除所述 A $\beta$  肽,抑制溶解性 A $\beta$  在脑内的毒性效应,并抑制不溶性 A $\beta$  发展并进一步积累成为斑内的淀粉样蛋白。用于本发明的抗体并不大量穿过血脑屏障 ( $\leq 0.1\%$  血浆水平)。此外,当外周给予用于本发明的人源化抗体时,所述抗体不必在结合 A $\beta$  肽后或自由循环时在脑内引发细胞免疫应答以发挥它们的有益作用。此外,当外周给予时,所述抗体不必可观地结合脑内聚集的 A $\beta$  肽以发挥它们的有益作用。

[0020] 因此,一方面,本发明涉及治疗和预防特征在于在人体内形成包含  $\beta$ -淀粉样蛋白的斑的病症,该方法包括给予(最好是外周给予)需要所述治疗的人治疗有效量或预防有效量的人源化单克隆抗体或其免疫反应性片段,所述抗体特异性结合 A $\beta$  肽的中心区。又一方面,本发明涉及抑制人体内淀粉样斑形成和清除人体内淀粉样斑的方法,所述方法包括给予需要所述抑制作用的人类个体有效量的人源化抗体,所述抗体螯合其血液循环形式中的 A $\beta$  肽,诱导 A $\beta$  肽流出脑,并改变血浆和脑中的 A $\beta$  清除。再一方面,本发明涉及所述人源化抗体(包括其免疫有效部分)以及制备它们的方法。

[0021] 本发明还包括对诊断患有临床或临床前阿耳茨海默氏病、Down 氏综合征或临床或临床前脑淀粉样血管病的患者逆转认知下降、改善认知、治疗认知下降和预防认知下降的方法,所述方法包括给予所述个体有效量本发明的人源化抗体。

[0022] 本发明还包括使用本发明的人源化抗体生产药物,包括延长所述抗体或抗体片段的重组序列在人体组织内的表达,以治疗、预防或逆转阿耳茨海默氏病、Down 氏综合征或大脑血管淀粉样变性;以治疗、预防或逆转临床或临床前阿耳茨海默氏病、Down 氏综合征或临床或临床前大脑血管淀粉样变性的认知下降;或抑制淀粉样斑的形成或抑制毒性溶解性 A $\beta$  在人体内的效应。

[0023] 本发明涉及惊人的观察结果:在给予本发明抗体后短时间内,相当大量的 A $\beta$  从中枢神经系统流出到血液。因此,本发明包括评价方法,评价人类个体对于用结合 A $\beta$  或其片段的抗体治疗的反应,该方法包括:a) 给予所述个体所述抗体或其片段;然后 b) 测量 A $\beta$  在所述个体血液中的浓度。

[0024] 本发明还包括用结合 A $\beta$  或其片段的抗体治疗人类个体的方法,该方法包括:a) 给予所述个体首次量的所述抗体或其片段;b) 给予第一次剂量后 3 小时到 2 周内,测量 A $\beta$  在所述个体体内的浓度;c) 如果需要,根据步骤 b) 的结果计算抗体或其片段第二次的量,其中第二次的量与第一次的量相同或不同;然后 d) 给予第二次剂量的所述抗体或其片段。

[0025] 本发明还包括评价方法,评价在人类个体中抗体结合 A $\beta$  或其片段以抑制或预防 A $\beta$  淀粉样斑形成、减少 A $\beta$  淀粉样斑、降低毒性溶解性 A $\beta$  的作用或治疗与 A $\beta$  斑有关的病症或疾病的效能,该方法包括:a) 获取所述个体血浆或 CSF 的第一份样品;b) 测量第一份样品中 A $\beta$  的基线浓度;c) 给予所述个体所述抗体或其片段;d) 给予所述抗体或其片段后 3 小时到 2 周,获取所述个体血浆或 CSF 的第二份样品;然后 e) 测量第二份样品中 A $\beta$  的浓度;其中,效能与血液中结合所述抗体的 A $\beta$  的量以及 CSF 中 A $\beta$  的浓度有关。

[0026] 附图简述

[0027] 图 1 显示通过 Mab 266 用透析膜从人脑脊髓液回收 A $\beta$  肽的百分率与透析膜截止分子量的函数。

[0028] 图 2 显示在注射 200  $\mu$ g 或 600  $\mu$ g Mab 266 后 APP<sup>V717F</sup> 转基因小鼠血浆内存在的

A $\beta$ <sub>Total</sub> 浓度与时间的函数。

[0029] 图 3A 显示在用盐水、小鼠 IgG 或 Mab 266 治疗的 APP<sup>V717F</sup> 转基因小鼠皮质内 A $\beta$  肽沉积的量。图 3B 显示这些结果与亲代来源的相关性。

[0030] 图 4 显示用于从质粒 pVk-Hu266 表达人源化 266 轻链的多核苷酸序列以及所表达的人源化 266 轻链的单氨基酸编码（成熟时对应于 SEQ ID NO :11）。

[0031] 图 5 显示用于从质粒 pVg1-Hu266 表达人源化 266 重链的多核苷酸序列和所表达的人源化 266 重链的单氨基酸编码（成熟时对应于 SEQ ID NO :12）。

[0032] 图 6 是 pVk-Hu266 的质粒图。

[0033] 图 7 是 pVg1-Hu266 的质粒图。

[0034] 发明实施方式

[0035] 在人类生物学液体内循环的 A $\beta$  肽代表染色体 21 编码的前体蛋白的羧基末端区。根据体外实验的结果，已经报道 A $\beta$  肽在生理溶液内溶解度很小，因为它包含一段疏水氨基酸，该段氨基酸构成将其更长的前体锚定到细胞脂质膜的区段的一部分。因此，并不奇怪循环 A $\beta$  肽通常与其它部分结合，防止其聚集。这导致难以检测生物学液体中循环 A $\beta$  肽。

[0036] 上面提到的专利文件（美国专利 5,766,846、美国专利 5,837,672 和美国专利 5,593,846）描述抗体制备，包括单克隆抗体，由于所述抗体针对克隆 266，因此将其命名为克隆 266，已经显示该抗体特异性结合包含 A $\beta$  肽氨基酸 13-28 的肽。本发明申请人已经发现：结合该区的抗体与结合 A $\beta$  氨基酸序列中其它位点的抗体不同，能够非常有效地从大分子复合物中整合溶解性 A $\beta$  肽。该整合将实现 A $\beta$  肽从 CNS 的净流出，改变其在 CNS 和血浆中的清除，降低其用于形成斑的有效性。因此，具有该特异性的抗体提供预防性治疗和治疗性治疗与形成  $\beta$ -淀粉样蛋白斑有关的病症的机会，其中将所述抗体转化为人源化形式以降低它们的免疫原性。如上文提到的，这些病症包括临床前和临床阿耳茨海默氏病、Down 氏综合征以及临床前和临床脑淀粉样血管病。

[0037] 本文所用的术语“治疗”包括治疗性治疗（已知存在需要治疗的病症）、预防（即防止）或改善未来可能发生的病症。

[0038] “结合 A $\beta$  肽中区的单克隆抗体”指结合氨基酸序列的单克隆抗体 (Mab 或 Mabs)，所述氨基酸序列代表 A $\beta$  位置 13 到 28 之间所包含的表位。不一定针对整个区。只要所述抗体结合该区内的至少一个表位（例如，尤其是包括  $\alpha$  分泌酶位点 16-17 或抗体 266 结合的位点），所述抗体就可以有效用于本发明的方法。

[0039] “抗体”本质上指单克隆抗体或其免疫有效片段，例如其 F<sub>ab</sub>、F<sub>ab'</sub> 或 F<sub>(ab')<sub>2</sub></sub> 片段。在本文的一些地方，将特别强调片段；然而，应当知道不论是否特定指出是片段，术语“抗体”包括这样的片段以及单链形式。只要所述蛋白保持特异性结合其既定靶且在这种情况下从血液中 A $\beta$  肽的载体蛋白中整合 A $\beta$  肽的能力，它就在术语“抗体”的范围内。定义“抗体”还包括，例如，具有该特异性的抗体的单链形式，该形式一般情况下名为 F<sub>v</sub> 区。用于本发明的抗体最好但不一定是重组产生，因为需要操作具有合适特异性的抗体，所述抗体一般情况下是小鼠抗体或其它非人类抗体，将它们转化为人源化形式。抗体可以是糖基化的或未糖基化的，而优选糖基化抗体。众所周知，抗体通过二硫键适当交联。

[0040] 已知基本抗体结构单位包含四聚体。每个四聚体由两对相同的多肽链组成，每对链包含一条“轻”链（约 25kDa）和一条“重”链（约 50-70kDa）。每条链的氨基末端部分包

括一个约 100 到 110 个氨基酸或更长的可变区,该可变区负责抗原识别。每条链的羧基末端部分定义一个恒定区,该区主要负责效应子功能。

[0041] 轻链分为  $\gamma$ 、 $\mu$ 、 $\alpha$  和  $\lambda$ 。重链分为  $\gamma$ 、 $\mu$ 、 $\alpha$ 、 $\delta$  或  $\epsilon$ ,分别将抗体同种型定义为 IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE。在轻链和重链内,可变区和恒定区通过一个约 12 个氨基酸或更长的“J”区连接,重链还包括一个约 10 多个氨基酸长的“D”区。

[0042] 每个轻链 / 重链对的可变区形成抗体结合位点。因此,完整的抗体具有两个结合位点。所有链都呈现同样的通用结构,其中三个高变区连接相对保守的构架区 (FR),所述通用结构也称为互补决定区或 CDR。所述构架区使来自每一对两条链的 CDR 平行排列,使其能够结合特异性表位。从 N 末端到 C 末端,轻链和重链都包含结构域 FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 和 FR4。按照众所周知的惯例划分每个域的氨基酸 [Kabat“具有免疫价值的蛋白质序列”National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 和 1991; Chothia 等, J. Mol. Biol., 196 :901-917 (1987); Chothia 等, Nature 342 :878-883 (1989)]。

[0043] 本领域内众所周知,通过标准技术可以容易地产生具有合适特异性的单克隆抗体:接种哺乳动物,从所述哺乳动物的抗体生成细胞形成杂交瘤,或用其它方法使所述细胞无限增殖化,然后培养所述杂交瘤或无限增殖化细胞,评价它们的合适特异性。在本发明的情况下,可以如下产生所述抗体:例如,用代表一个表位的肽免疫人、兔、大鼠或小鼠,所述表位包括 A $\beta$  肽的 13-28 区或其合适亚区。从产生所需抗体的杂交瘤或其它细胞回收所述核苷酸序列,获得用于重组操作的材料。然后操作这些核苷酸序列,以人源化形式提供它们。

[0044] “人源化抗体”指这样的抗体:通过改变具有非人类互补决定区 (CDR) 的抗体的序列,使所述抗体部分或全部由来自人抗体种系的氨基酸序列组成。最简单的所述改变包括仅仅用人抗体的恒定区取代小鼠恒定区,产生人 / 小鼠嵌合体,该嵌合体具有药物应用可接受的足够低的免疫原性。然而,最好也用目前本领域内众所周知的技术人源化所述抗体的可变区甚至 CDR。用对应的人构架区取代所述可变区的构架区,保持所述非人类 CDR 基本完整,或甚至用来自人类基因组的序列取代所述 CDR。在遗传改造小鼠体内产生完全的人抗体,其中已经改变所述小鼠的免疫系统使其对应于人免疫系统。如上文所提到的,使用所述抗体的免疫特异性片段、包括代表单链形式的片段足以应用于本发明方法。

[0045] 人源化抗体还指这样的抗体:所述抗体包含人类构架区、至少一个来自非人类抗体的 CDR,其中存在的任何恒定区与人免疫球蛋白恒定区基本相同,即至少约 85-90% 相同,优选至少 95% 相同。因此,人源化抗体的所有部分,可能除 CDR 外,都与一种或多种天然人免疫球蛋白序列的对应部分基本相同。例如,人源化免疫球蛋白一般不包括嵌合型小鼠可变区 / 人恒定区抗体。

[0046] 当用于人类治疗时,人源化抗体与非人类和嵌合抗体相比至少有三个潜在的优势:

[0047] 1) 因为效应部分来自人类,因此它可以与人类免疫系统的其它部分更好地相互作用(如通过依赖补体的细胞毒性 (CDC) 或依赖抗体的细胞毒性 (ADCC) 更有效地破坏靶细胞)。

[0048] 2) 人类免疫系统不会将所述人源化抗体的构架区或 C 区识别为外源成分,因此针对所述注射抗体的抗体应答应该比针对完全外源的非人类抗体或部分外源的嵌合抗体的



以减少潜在的免疫原性：

[0074]	1	5	10	15
[0075]	Asp Xaa Val Met Thr Gln Xaa Pro Leu Ser Leu Pro Val Xaa Xaa			
[0076]		20	25	30
[0077]	Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Xaa			
[0078]		35	40	45
[0079]	Tyr Ser Asp Gly Asn Ala TyrLeu His Trp Phe Leu Gln Lys Pro			
[0080]		50	55	60
[0081]	Gly Gln Ser Pro Xaa Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe			
[0082]		65	70	75
[0083]	Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp			
[0084]		80	85	90
[0085]	Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Xaa Gly Val			
[0086]		95	100	105
[0087]	Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Xaa			
[0088]		110		
[0089]	Gly Thr Xaa Xaa Glu Ile Lys Arg (SEQ ID NO :7)			

[0090] 其中：

- [0091] 在位置 2 的 Xaa 是 Val 或 Ile ；
- [0092] 在位置 7 的 Xaa 是 Ser 或 Thr ；
- [0093] 在位置 14 的 Xaa 是 Thr 或 Ser ；
- [0094] 在位置 15 的 Xaa 是 Leu 或 Pro ；
- [0095] 在位置 30 的 Xaa 是 Ile 或 Val ；
- [0096] 在位置 50 的 Xaa 是 Arg、Gln 或 Lys ；
- [0097] 在位置 88 的 Xaa 是 Val 或 Leu ；
- [0098] 在位置 105 的 Xaa 是 Gln 或 Gly ；
- [0099] 在位置 108 的 Xaa 是 Lys 或 Arg ；和
- [0100] 在位置 109 的 Xaa 是 Val 或 Leu。

[0101] 本发明人源化抗体的优选重链可变区具有如下氨基酸序列，其中所述构架来自人种系 VH 区段 DP53 和 J 区段 JH4，并且在同一人亚组的共有氨基酸发生几个氨基酸取代以减少潜在的免疫原性：

[0102]	1	5	10	15
[0103]	Xaa Val Gln Leu Val Glu Xaa Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly			
[0104]		20	25	30
[0105]	Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser			
[0106]		35	40	45
[0107]	Arg Tyr Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu			
[0108]		50	55	60
[0109]	Xaa Leu Val Ala Gln Ile Asn Ser Val Gly Asn Ser Thr Tyr Tyr			

[0110] 65 70 75  
 [0111] Pro Asp Xaa Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Xaa  
 [0112] 80 85 90  
 [0113] Xaa Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Xaa Asp  
 [0114] 95 100 105  
 [0115] Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 [0116] 110  
 [0117] Thr Xaa Val Thr Val Ser Ser (SEQ ID NO :8)

[0118] 其中：

[0119] 在位置 1 的 Xaa 是 Glu 或 Gln；  
 [0120] 在位置 7 的 Xaa 是 Ser 或 Leu；  
 [0121] 在位置 46 的 Xaa 是 Glu、Val、Asp 或 Ser；  
 [0122] 在位置 63 的 Xaa 是 Thr 或 Ser；  
 [0123] 在位置 75 的 Xaa 是 Ala、Ser、Val 或 Thr；  
 [0124] 在位置 76 的 Xaa 是 Lys 或 Arg；  
 [0125] 在位置 89 的 Xaa 是 Glu 或 Asp；和  
 [0126] 在位置 107 的 Xaa 是 Leu 或 Thr。

[0127] 本发明人源化抗体尤其优选的轻链可变区具有如下氨基酸序列，其中所述构架来自人种系 Vk 区段 DPK18 和 J 区段 JK1，并且在同一人 V 亚组的共有氨基酸发生几个氨基酸取代以减少潜在的免疫原性：

[0128] 1 5 10 15  
 [0129] Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu  
 [0130] 20 25 30  
 [0131] Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ile  
 [0132] 35 40 45  
 [0133] Tyr Ser Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His Trp Phe Leu Gln Lys Pro  
 [0134] 50 55 60  
 [0135] Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe  
 [0136] 65 70 75  
 [0137] Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp  
 [0138] 80 85 90  
 [0139] Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val  
 [0140] 95 100 105  
 [0141] Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln  
 [0142] 110  
 [0143] Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg (SEQ ID NO :9)

[0144] 本发明人源化抗体特别优选的重链可变区具有如下氨基酸序列，其中所述构架来自人种系 VH 区段 DP53 和 J 区段 JH4：

[0145] 1 5 10 15

[0146]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly		
[0147]		20	25 30
[0148]	Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser		
[0149]		35	40 45
[0150]	Arg Tyr Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu		
[0151]		50	55 60
[0152]	Glu Leu Val Ala Gln Ile Asn Ser Val Gly Asn Ser Thr Tyr Tyr		
[0153]		65	70 75
[0154]	Pro Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala		
[0155]		80	85 90
[0156]	Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp		
[0157]		95	100 105
[0158]	Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly		
[0159]		110	
[0160]	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser (SEQ ID NO :10)		
[0161]	本发明人源化抗体优选的轻链具有如下氨基酸序列：		
[0162]	1	5	10 15
[0163]	Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu		
[0164]		20	25 30
[0165]	Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ile		
[0166]		35	40 45
[0167]	Tyr Ser Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His Trp Phe Leu Gln Lys Pro		
[0168]		50	55 60
[0169]	Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe		
[0170]		65	70 75
[0171]	Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp		
[0172]		80	85 90
[0173]	Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val		
[0174]		95	100 105
[0175]	Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln		
[0176]		110	115 120
[0177]	Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val		
[0178]		125	130 135
[0179]	Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala		
[0180]		140	145 150
[0181]	Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys		
[0182]		155	160 165
[0183]	Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln		
[0184]		170	175 180

[0185]	Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu		
[0186]		185	190 195
[0187]	Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys		
[0188]		200	205 210
[0189]	Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val		
[0190]		215	
[0191]	Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys (SEQ ID NO :11)		
[0192]	本发明人源化抗体优选的重链具有如下氨基酸序列：		
[0193]	1	5	10 15
[0194]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly		
[0195]		20	25 30
[0196]	Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser		
[0197]		35	40 45
[0198]	Arg Tyr Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu		
[0199]		50	55 60
[0200]	Glu Leu Val Ala Gln Ile Asn Ser Val Gly Asn Ser Thr Tyr Tyr		
[0201]		65	70 75
[0202]	Pro Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala		
[0203]		80	85 90
[0204]	Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp		
[0205]		95	100 105
[0206]	Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly		
[0207]		110	115 120
[0208]	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val		
[0209]		125	130 135
[0210]	Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala		
[0211]		140	145 150
[0212]	Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr		
[0213]		155	160 165
[0214]	Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe		
[0215]		170	175 180
[0216]	Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val		
[0217]		185	190 195
[0218]	Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys		
[0219]		200	205 210
[0220]	Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val		
[0221]		215	220 225
[0222]	Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro		
[0223]		230	235 240

[0224]	Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro		
[0225]		245	250 255
[0226]	Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr		
[0227]		260	265 270
[0228]	Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe		
[0229]		275	280 285
[0230]	Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys		
[0231]		290	295 300
[0232]	Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val		
[0233]		305	310 315
[0234]	Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys		
[0235]		320	325 330
[0236]	Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr		
[0237]		335	340 345
[0238]	Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr		
[0239]		350	355 360
[0240]	Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu		
[0241]		365	370 375
[0242]	Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		
[0243]		380	385 390
[0244]	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro		
[0245]		395	400 405
[0246]	Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu		
[0247]		410	415 420
[0248]	Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys		
[0249]		425	430 435
[0250]	Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser		
[0251]		440	
[0252]	Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys (SEQ ID NO :12)		

[0253] 还有其它可能可以作为本发明人源化抗体和人源化 266 的轻链和重链的序列。所述免疫球蛋白具有两对轻链 / 重链复合物, 至少一条链包含与人构架区段功能性连接的一个或多个互补决定区。

[0254] 另一方面, 本发明涉及编码抗体的重组多核苷酸, 当所述抗体得到表达时, 其包含本发明抗体的重链和轻链 CDR。至于人构架区, 将提供 CDR 的非人类免疫球蛋白构架区或可变区氨基酸序列与人免疫球蛋白可变区序列集合中的对应序列相比较, 选择相同氨基酸百分率高的序列。图 4 和图 5 给出代表性多核苷酸, 当所述多核苷酸表达时编码包含单克隆抗体 266 重链和轻链 CDR 的多肽链。由于密码子简并性和非关键氨基酸取代, 可以使用其它多核苷酸序列容易地取代那些序列。本发明尤其优选的多核苷酸编码抗体, 当所述抗体得到表达时, 其包含 SEQ ID NO :1-SEQ ID NO :6 的 CDR、或 SEQ ID NO :7-SEQ ID NO :10 的任

何可变区、或 SEQ ID NO :11 和 SEQ IDNO :12 的轻链和重链。

[0255] 所述多核苷酸一般还包括有效连接人源化免疫球蛋白编码序列的表达控制多核苷酸序列,包括天然连接或异源的启动子区。所述表达控制序列最好是处于能够转化或转染真核宿主细胞的载体中的真核启动子系统,但也可以使用针对原核宿主的控制序列。一旦将所述载体掺入合适的宿主细胞系,就在适于高水平表达所述核苷酸序列的条件下培养所述宿主细胞,然后根据需要收集和纯化轻链、重链、轻链 / 重链二聚体或完整抗体、结合片段或其它免疫球蛋白形式。

[0256] 可以从多种不同多核苷酸(基因组或 cDNA、RNA、合成寡核苷酸等等)和成分(如 V、J、D 和 C 区),并通过多种不同技术形成能够最终表达所需人源化抗体的本发明核苷酸序列。连接合适的基因组序列和合成序列是生产的通用方法,但也可以利用 cDNA 序列。

[0257] 可以按照众所周知的程序,从多种人类细胞(优选无限增殖化的 B 细胞)分离人恒定区 DNA 序列。相似地,可以从能够结合 A $\beta$  肽氨基酸 13 到 28 之间表位的非人类单克隆抗体获得用于生产本发明免疫球蛋白的 CDR,所述单克隆抗体如上文所述,通过众所周知的方法在任何方便的哺乳动物来源中生产,包括小鼠、大鼠、兔或能够产生抗体的其它脊椎动物。可以从本领域内众所周知的多种来源获取适合所述多核苷酸序列的来源细胞以及用于表达和分泌免疫球蛋白的宿主细胞。

[0258] 除本文专门描述的人源化免疫球蛋白外,利用本领域内技术人员众所周知的各种重组 DNA 技术可以容易地设计和生产其它“基本同源”的修饰免疫球蛋白。例如,所述构架区可能因为几个氨基酸取代、末端和中间添加和缺失等等,在一级结构水平上与天然序列有所不同。此外,可以单独使用或组合使用多种不同的人构架区作为本发明人源化免疫球蛋白的基础。一般地说,通过各种众所周知的技术可以容易地进行基因修饰,所述技术例如定点诱变。

[0259] 或者,可以产生仅包含部分一级抗体结构的多肽片段,所述片段具有一种或多种免疫球蛋白活性(如补体结合活性)。如下产生这些多肽片段:通过本领域内众所周知的方法蛋白水解切割完整的抗体,或使用定点诱变在载体中所需位点插入终止密码子,如在 CH1 后插入以产生 Fab 片段或在铰链区后插入以产生 F(ab')<sub>2</sub> 片段。通过用 DNA 接头连接 VL 和 VH,可以产生单链抗体。

[0260] 如以前所述,当将所述序列有效连接表达控制序列(即定位以保证表达控制序列发挥作用)后,在宿主中表达所述编码核苷酸序列。这些表达载体一般在宿主生物中或者作为附加体、或者作为宿主染色体 DNA 的整合部分复制。表达载体一般包含选择标记(如四环素或新霉素),以便可以检测出那些受到所需 DNA 序列转化的细胞。

[0261] 大肠杆菌(E. coli)是尤其适用于克隆本发明多核苷酸的原核宿主。适用的其它微生物宿主包括杆菌,如枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis),以及其它肠杆菌科,如沙门氏菌属、沙雷菌属(Serratia)和各种假单胞菌属菌。也可以制造在这些原核宿主中的表达载体,所述表达载体一般将包含适合所述宿主细胞的表达控制序列(如复制原点)。此外,可以利用多种众所周知的启动子中的任何一种,例如乳糖启动子系统、色氨酸(trp)启动子系统、 $\beta$ -内酰胺酶启动子系统或来自 $\lambda$ 噬菌体的启动子系统。所述启动子一般控制表达,可选地与操纵基因一起控制表达,并且具有核糖体结合位点序列等等,以起始和完成转录和翻译。

[0262] 其它微生物如酵母也可用于表达。酵母属是优选宿主, 根据需要, 合适的载体具有表达控制序列, 如启动子 (包括 3- 磷酸甘油酸激酶或其它糖酵解酶) 和复制原点、终止序列等等 (根据需要)。

[0263] 除微生物外, 也可使用哺乳动物组织细胞培养物表达和产生本发明的多肽。事实上优选真核细胞, 因为本领域已经发展出多种能够分泌完整免疫球蛋白的合适宿主细胞系, 包括 CHO 细胞系、各种 COS 细胞系、金黄仓鼠卵巢细胞系、HeLa 细胞, 最好是骨髓瘤细胞系、转化 B 细胞、人胚胎肾细胞系或杂交瘤。用于这些细胞的表达载体可以包括表达控制序列, 例如复制原点、启动子、增强子和必需的加工信息位点如核糖体结合位点、RNA 剪接位点、聚腺苷酸化位点和转录终止子序列。优选的表达控制序列是来自免疫球蛋白基因、SV40、腺病毒、牛乳头瘤病毒、巨细胞病毒等等的启动子。

[0264] 可以通过众所周知的方法将包含目标核苷酸序列 (如重链和轻链编码序列以及表达控制序列) 的载体转移进宿主细胞, 所使用的方法根据细胞宿主类型而不同。例如, 氯化钙转染一般用于原核细胞, 而磷酸钙处理或电穿孔可用于其它细胞宿主。

[0265] 一旦表达本发明的完整抗体、其二聚体、各个轻链和重链或其它免疫球蛋白形式后, 就可以根据本领域内标准程序纯化它们, 所述程序包括硫酸铵沉淀、离子交换、亲和层析、反相层析、疏水相互作用柱层析、凝胶电泳等等。对于药物应用, 优选具有至少约 90 到 95% 同质性的基本纯免疫球蛋白、最优选具有 98 到 99% 或更高同质性。一旦根据需要部分纯化所述多肽或纯化所述多肽至同质性后, 可以如本文所述将所述多肽用于治疗或预防。

[0266] 使用标准给药技术, 将所述抗体 (包括免疫反应性片段) 给予表现 A $\beta$  相关症状或疾病或受到所述症状或疾病威胁的个体, 所述症状或疾病例如临床或临床前阿耳茨海默氏病、Down 氏综合征、或临床或临床前淀粉样血管病, 所述标准给药技术最好是通过静脉内给予、腹膜内给予、皮下给予、肺部给予、经皮给予、肌内给予、鼻内给予、口腔含化给药法、舌下给予或栓剂给予 (suppository administration) 进行外周给药 (即不给予中枢神经系统)。虽然可以将所述抗体直接给予脑室系统、脊髓液或脑实质, 并且对这些位置给药的技术是本领域内众所周知的, 但不必利用这些更困难的程序。当通过依赖于外周循环系统的更简单技术给予时, 本发明抗体是有效的。本发明的优点包括所述抗体能够在甚至不直接提供给中枢神经系统本身的情况下发挥其有益的效果。而本文确实已经证明: 穿过血脑屏障的抗体量低于血浆水平的 0.1%, 而本发明抗体表现出能够整合外周循环中的 A $\beta$ , 并且改变 CNS 和血浆中溶解性 A $\beta$  的清除。

[0267] 设计用于给药的药用组合物, 使其适于选定的给药模式, 合适地使用药学上可接受的赋形剂如分散剂、缓冲剂、表面活性剂、防腐剂、增溶剂、等张剂、稳定剂等等。Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Co., Easton PA, 最新版, 通过引用结合到本文中, 提供医师众所周知的制剂技术纲要。改变本发明抗体的溶解度特性是特别有用的, 例如通过将它们包囊在脂质体中, 或通过封闭极性基团而使它们更加亲脂。

[0268] 优选通过静脉内注射或腹膜内注射或皮下注射进行的外周系统性传递。用于所述注射剂的合适媒介是简单的。然而, 此外, 可以采用鼻气雾剂或栓剂的方法通过粘膜进行给药。用于所述给药模式的合适制剂是众所周知的, 所述制剂一般包括便利跨膜转运的表面活性剂。所述表面活性剂常常是类固醇衍生物或者是阳离子脂类, 例如 N-[1-(2,3-二油酰基)丙基-N,N,N-三甲基氯化铵 (DOTMA) 或各种化合物如半琥珀酸胆固醇酯、磷脂酰甘油

等等。

[0269] 制剂中人源化抗体的浓度低至约 0.1% 重量比, 高至 15 或 20% 重量比, 该浓度主要根据液体体积、粘度等等, 按照选定的具体给药模式选择。因此, 典型的注射用药用组合物将包含 1mL 磷酸缓冲盐水的无菌缓冲水和 1-100mg 本发明人源化抗体。制造所述制剂后, 无菌过滤, 或用其它方法处理使其在微生物学上可接受。典型的用于静脉内输注的组合物可包括高至 250mL 液体体积, 如无菌 Ringer 氏溶液, 以及 1-100mg/mL 或更高的抗体浓度。

[0270] 本发明的治疗剂可以冷冻或冻干保存, 然后使用前用合适的无菌载体重建。冻干和重建会导致不同程度的抗体活性丧失 (如对于常规免疫球蛋白, IgM 抗体的活性丧失比 IgG 抗体更严重)。可能需要调整剂量以进行补偿。选择所述制剂的 pH 以平衡抗体稳定性 (化学和物理稳定性) 并使其在给予患者时更舒服。一般地说, 4 到 8 之间的 pH 是可以接受的。

[0271] 虽然前述方法看起来对于给予蛋白如人源化抗体是最方便和最合适的, 但其它给药技术 (如经皮给药和口服给药) 经过改进后, 只要设计合适的制剂, 也可以使用。

[0272] 此外, 比较理想的是采用控释制剂, 所述控释制剂使用生物可降解膜和基质、或渗透性微型泵、或基于葡聚糖珠、藻酸盐或胶原蛋白的传递系统。

[0273] 总的来说, 可以获得用于给予本发明抗体的制剂, 所述制剂是本领域内众所周知的, 可以从多种选择中选出合适的制剂。

[0274] 可以使用标准临床技术最优化一般剂量水平, 并且一般剂量水平取决于给药模式和患者的状况。

[0275] 下面的实施例将举例说明本发明而不是限制本发明。

[0276] 其中下文的实施例使用名为“266”的小鼠单克隆抗体, 该抗体最初通过用包含人 A $\beta$  肽残基 13-28 的肽接种而制备。已经证实该抗体与所述肽发生免疫反应, 但以前报道该抗体不与仅包含人 A $\beta$  肽残基 17-28 的肽、或在所述 A $\beta$  肽内其它任何表位上反应。美国专利 5, 766, 846 描述了该抗体的制备, 通过引用结合到本文中。由于本文的实施例描述在小鼠系统内进行的实验, 使用小鼠单克隆抗体是令人满意的。然而, 在本发明应用于人类的治疗方法中, 优选具有对应于抗体 266 的免疫特异性的人源化形式抗体。

[0277] 实施例 1

[0278] 整合人类液体中加入的 A $\beta$  肽

[0279] 如下在室温下温育人脑脊髓液 (CSF) 样品 (50  $\mu$  l) 和人血浆样品 1 小时:

[0280] 1. 单独温育;

[0281] 2. 与 5ng A $\beta$  40 肽一起温育; 或

[0282] 3. 5ng A $\beta$  40 肽和 1mg 单克隆抗体 266 (在例如美国专利 5, 766, 846 中描述, 通过引用结合到本文中)。

[0283] 所述样品随后在 4-25% 非变性梯度胶上电泳 (即非变性梯度电泳 (NDGGE)), 然后转移到硝酸纤维素上。所述印迹随后用 Ponceau S 染色或者用针对 A $\beta$  肽头五个氨基酸的生物素标记单克隆抗体 (3D6) 探测 (蛋白质印迹分析), 用链霉抗生物素-辣根过氧化物酶显象, 然后通过增强化学发光 (ECL) 检测。根据 Pharmacia 分子量标记估计所述印迹带中所包含材料的水合直径。因此, 假如所述 A $\beta$  肽结合其它分子, 它将按照所得复合物的尺寸大小迁移。

[0284] 用或不用 5ng A $\beta$  肽对 CSF 进行的蛋白质印迹显示:没有证据表明 A $\beta$  肽响应由抗体 3D6 介导的检测。对于人血浆获得相似的结果。尽管对于同样的 CSF 样品,使用同样技术通过 SDS-PAGE 以及随后的蛋白质印迹可以检测到 A $\beta$  肽,但这是事实。大概是该肽与所检测液体中其它因子的相互作用阻止对 A $\beta$  肽的检测。然而,当在温育物中加入 Mab 266,代表与所述抗体复合的整合 A $\beta$  肽的特征带在血浆和 CSF 中同时存在。主要带约 11nm 水合直径,对应于抗体单体,另有一个 13nm 的小带,对应于抗体二聚体。

#### [0285] 实施例 2

##### [0286] 整合抗体的特异性

[0287] 使用含 50  $\mu$ l 人 CSF 或 10  $\mu$ l APP<sup>V717F</sup> CSF 的样品。APP<sup>V717F</sup> 是转基因小鼠,代表阿耳茨海默氏病的小鼠模型,在该模型中表达带有家族性阿耳茨海默氏病突变的人淀粉样蛋白前体转基因,从而导致在中枢神经系统中产生人 A $\beta$  肽。

[0288] 如实施例 1 所述,将所述样品在存在或不存在各种 Mab (1  $\mu$ g) 的情况下于室温下温育 1 小时,然后在 4-25% NDGGE 上电泳,随后在硝酸纤维素上形成印迹。所述抗体如下:

[0289] Mab 266 (结合位置 13-28);

[0290] Mab 4G8 (结合位置 17-24);

[0291] QCBpan (针对位置 1-40 的兔多克隆抗体);

[0292] 小鼠 IgG (非特异性);

[0293] Mab 3D6 (结合位置 1-5);

[0294] Mab 21F12 (结合位置 33-42);

[0295] Mab 6E10 (结合位置 1-17);和

[0296] QCB<sub>40,42</sub> (针对 A $\beta$ <sub>40</sub> 和 A $\beta$ <sub>42</sub> 的兔多克隆抗体)。

[0297] 如实施例 1 所述检测 A $\beta$  肽抗体复合物:首先使用生物素标记的 3D6 (针对 A $\beta$  肽 N-末端),随后使用链霉抗生物素蛋白-HRP 和 ECL。在人 CSF 中的相似检测与 Mab 266 一起温育,在某些情况下用结合 A $\beta$  肽羧基末端的 QCB<sub>40,42</sub> 取代 3D6。

[0298] 结果显示:在测试的抗体中,只有在 Mab 4G8 和 Mab 266 的情况下检测到 A $\beta$  肽。

[0299] 结果显示:对于人 CSF,只有 Mab 266 和 Mab 4G8 能够以可检测到的量整合抗体 A $\beta$  复合物(同样,在没有抗体存在的情况下,检测不到 A $\beta$ )。Mab 266 也能够对于使用人 CSF、APP<sup>V717F</sup> 转基因小鼠 CSF 的实验产生相似结果。不论是否使用 3D6 或 QCB<sub>40,42</sub> 抗体显影蛋白质印迹,使用 Mab 266 都能够整合人 CSF 中的 A $\beta$  肽。

#### [0300] 实施例 3

##### [0301] 通过双向电泳显示 A $\beta$ 肽-266 复合物

[0302] 包含 50ng A $\beta$ <sub>40</sub> 肽的样品与 2  $\mu$ g Mab266 在 37 $^{\circ}$ C 温育 3 小时。对应地单独温育 Mab 266 作为对照。

[0303] 然后对所述样品进行双向凝胶电泳。

[0304] 在第一向,如实施例 1 所述对所温育的样品进行 NDGGE。将聚丙烯酰胺凝胶以垂直于第一向的方向切成单独的泳道,然后在变性/还原条件下,通过 SDS-PAGE (Tricine 尿素凝胶) 在第二向进行凝胶分离。通过 Ponceau-S 染色(任何蛋白),或通过基于 HRP 的检测系统中使用 6E10Mab (Senetek, Inc.) 和生物素化抗小鼠 A $\beta$  进行特异性显影,检测带的存在。

[0305] 转移后对硝酸纤维素印迹进行 Ponceau-S 染色,使 Mab 266 的重链和轻链可见。经证实, A $\beta$  肽与 Mab 266 形成复合物,表现为一条 4kD 的带,该带与第一向 NDGGE 后看到的全长 Mab 266 的大小对齐。

#### [0306] 实施例 4

##### [0307] 证明在结合与整合之间没有对等性

[0308] 人们认为当 A $\beta$  肽在血浆和 CSF 中循环时,它与蛋白质形成复合物,所述蛋白质包括载脂蛋白 E。本实施例证明:针对 apoE 的抗体虽然能够结合所述复合物,但不能整合分离 apoE 与所述复合物的其它部分。

[0309] 将 ApoE 复合物 (500ng) 与针对 apoE 的 Mab 或多克隆抗体 (2  $\mu$ g) 在 37 $^{\circ}$ C 温育 1 小时。然后使用在实施例 1 中描述的技术,对所温育的样品进行 NDGGE。NDGGE 后,用亲和纯化的山羊抗 apoE 抗体进行蛋白质印迹分析,通过 ECL 检测。当不存在抗体时,检测到 apoE 处在 8-13nm,该直径与其以脂蛋白颗粒存在一致。针对 apoE 的单克隆抗体或多克隆抗体的存在导致 apoE 群体漂移到更大的分子,即“超级漂移 (super shift)”。这证明:针对 apoE 的抗体并不整合分开 apoE 与脂蛋白颗粒 (即从脂蛋白颗粒去除 apoE),而是结合于脂蛋白上的 apoE,产生更大的分子。

#### [0310] 实施例 5

##### [0311] 抗 apoE 抗体并不干扰对 A $\beta$ 的整合

[0312] 100  $\mu$ l 人 CSF 样品或者仅与 Mab 266、或者与多克隆抗 apo-E、或者与这两种抗体一起在 37 $^{\circ}$ C 温育 60 分钟。随后如实施例 1 所述通过 NDGGE 分析所述样品,如实施例 1 所述检测带。

[0313] 结果显示:只要 Mab 266 加入所述样品中,整合的 266-A $\beta$  肽复合物约 11nm 直径的特征带是可见的。不论抗 apoE 存在与否,情况都是如此。在 Mab 266 存在的情况下,假如在所述温育混合物中加入 50ng A $\beta$  肽,仍然出现代表受整合 A $\beta$  的该带。因此,抗 apoE 抗体的存在对 apoE 分子量的改变并不干扰 Mab 266 整合 A $\beta$  肽。

#### [0314] 实施例 6

##### [0315] 体内整合 A $\beta$ 肽

[0316] A. 转基因 APP<sup>V717F</sup> 小鼠也称为 PDAPP 小鼠,该小鼠过度表达人 APP 蛋白的突变体形式。这些小鼠在 CNS 中产生人 A $\beta$ ,在 CSF 和血浆中循环的人 A $\beta$  肽水平提高。对八月龄小鼠静脉内注射盐水或 100  $\mu$ g Mab 266。所述小鼠在初次注射 10 分钟后取血,初次注射 20 小时后再次取血。

[0317] 如实施例 1 所述,通过 NDGGE 和使用抗体 3D6 的蛋白质印迹,分析来自每只动物的 20  $\mu$ l 血浆样品。注射盐水的动物在 10 分钟或 20 小时后都不显示整合 A $\beta$  肽特征性 11nm 带的存在。然而,注射 Mab 266 的两只动物在 20 小时后确实显示该带的存在。

[0318] B. 该研究使用两月龄 APP<sup>V717F</sup> 小鼠。第 0 天,小鼠或者不接受 Mab 266、或者接受 1mg Mab 266、或者接受 100  $\mu$ g 该抗体。在给予所述抗体前两天以及在第 1、3、5 和 7 天取血浆样品。如实施例 1 所述,所述血浆样品进行 NDGGE,然后用 3D6 进行蛋白质印迹分析和检测。在给予 Mab 266 后的所有时间点,除非血浆样品已经用蛋白 G 处理,否则都检测到 266/A $\beta$  复合物,蛋白 G 结合免疫球蛋白,因此有效去除 Mab 266。复合物水平在测试时间内保持稳定,只是在注射 100  $\mu$ g Mab 266 的动物中在第 7 天有轻微下降;一般地说,给予 100  $\mu$ g

该抗体的动物体内的水平总是比给予 1mg 该抗体的小鼠体内发现的水平低。

[0319] C. 静脉内给予两月龄 APP<sup>V717F</sup> 小鼠 1mg Mab 266, 从每只小鼠取 25  $\mu$ l 血浆样品。如上文所述对所述血浆样品进行 NDGGE, 然后进行蛋白质印迹分析, 不同之处是生物素化 3D6 结合后用链霉抗生物素 <sup>125</sup>I (Amersham) 检测, 然后暴露于荧光成像屏。根据与标准曲线的比较估计复合物水平, 标准曲线如下制备: 用已知量 A $\beta$  与饱和水平 Mab 266 结合并相似检测。据估计, 结合 Mab 266 的 A $\beta$  肽的量是约 100ng/ml, 比以前测定的这些小鼠中的内源 A $\beta$  肽水平约 100pg/ml 增加约 1000 倍。这也与 APP<sup>V717F</sup> 脑中 A $\beta$  沉积前的 A $\beta$  肽水平 (50-100ng/g) 相似; APP<sup>V717F</sup> Tg 小鼠中的人 APP 和人 A $\beta$  几乎仅在脑中产生。因此, 看起来 Mab 266 在血浆中的存在象是 A $\beta$  肽接受器, 便利 A $\beta$  肽从 CNS 到血浆的净流出。所述增加的净流出可能是由于 A $\beta$  从 CNS 到血浆的流出增加, 同时防止血浆中的 A $\beta$  再次进入脑。

[0320] 如下确认整合 A $\beta$  肽的正确大小: APP<sup>V717F</sup> 小鼠注射 1mg Mab 266 后 24 小时获得的 20  $\mu$ l 血浆样品在 TRIS-tricine SDS-PAGE 凝胶上电泳, 在使用结合蛋白 G 的珠暴露于蛋白 G 之前或之后, 用抗 A $\beta$  抗体 6E10 进行蛋白质印迹分析。检测到蛋白 G 除去的带位于 4-8kD, 与 A $\beta$  肽单体、可能有二聚体的存在一致。

[0321] D. 用 PBS (n = 7) 或者 500  $\mu$ g 生物素化 Mab 266 (即 m266B) (n = 9) 腹膜内处理两月龄 APP<sup>V717F</sup> 小鼠。在注射前和注射后 24 小时, 使用 Johnson-Wood, K. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1997) 94 :1550-1555; 和 Bales, K. R. 等, Nature Genet (1997) 17 : 263-264 的 ELISA 方法的改进形式, 分析血浆中的总 A $\beta$  肽。通过用 m3D6 包被的 96 孔 Optiplate (Packard, Inc.) 测量结合 m266B 的总 A $\beta$ 。稀释的血浆样品和标准品 (各种浓度的 A $\beta$ <sub>40</sub> 和 m266B) 在所述包被的板中温育过夜, 应用 <sup>125</sup>I- 链霉抗生物素测定总 A $\beta$  /m266B 复合物的量。此外, 在 24 小时的时间点, 首先用蛋白 G 处理血浆样品以定量未结合 Mab 266 的 A $\beta$  肽, 然后通过 ELISA 测定 CSF 中的 A $\beta$ <sub>Total</sub> 和 A $\beta$ <sub>42</sub>。在注射 PBS 的动物中, 注射前后血浆 A $\beta$  肽水平都是 140pg/ml。注射 Mab 266 的小鼠体内血浆水平在注射前相似, 但未结合 Mab 266 的 A $\beta$  肽的水平在注射后 24 小时检测不到。

[0322] 还测量了 CSF 中的水平, CSF 代表 CNS 内的细胞外区室, CSF 中的分子浓度在某种程度上反映脑内细胞外空间中的物质浓度。从小脑延髓池区室分离 CSF。用戊巴比妥麻醉小鼠, 取出从颅骨基部到第一椎骨的肌肉系统。如下收集 CSF: 在解剖显微镜下, 用微量针小心刺穿覆盖延髓池的蛛网膜, 吸取 CSF 到聚丙烯微量移液管中。注射 24 小时后, 发现注射 Mab 266 的小鼠的 CSF 中总 A $\beta$  肽增加, 与注射 PBS 的小鼠相比, 在 CSF 中获得的 A $\beta$ <sub>42</sub> 增加约两倍。使用变性凝胶电泳以及随后使用 A $\beta$ <sub>42</sub> 特异性抗体 21F12 的蛋白质印迹分析确认了这一点。

[0323] 在另一个实验中, 三月龄 APP<sup>V717F</sup> Tg 小鼠静脉内注射 PBS 或者 Mab 266, 如下评价 CSF 中的 A $\beta$ <sub>40</sub> 水平和 A $\beta$ <sub>42</sub> 水平:

[0324] 为测量 A $\beta$ <sub>40</sub>, 使用特异性针对 A $\beta$ <sub>40</sub> 的单克隆抗体 m2G3。用 <sup>125</sup>I- 链霉抗生物素取代链霉抗生物素-HRP 试剂, 改变文献所述 ELISA 方法 (Johnson-Wood, K. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1997) 94 :1550-1555) 成为 RIA。对于血浆样品和 CSF 样品, 在缓冲液中缺乏胍的非变性条件下进行所述程序。为评价脑匀浆中碳酸盐可溶和不溶性 A $\beta$ , 样品与 100mM 碳酸盐, 40mM NaCl, pH 11.5 (4 $^{\circ}$ C) 匀浆, 10,000xg 离心 15 分钟, 如文献所述 (Johnson-Wood, K. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1997) 94 :1550-1555) 和上文列出的程

序,评价上清液(可溶)和沉淀(不溶性)中的A $\beta$ 。通过改良的RIA测量血浆中的A $\beta$ /Mab 266复合物。对小鼠注射生物素化Mab 266(Mab 266B),在多个时间点分离血浆。通过用m3D6包被的96孔Optiplate(Packard, Inc.)测量结合Mab266的总A $\beta$ 。稀释的血浆样品和标准品(各种浓度的A $\beta_{40}$ 和Mab266B)在所述包被的板中温育过夜,应用<sup>125</sup>I-链霉抗生物素测定总A $\beta$ /Mab266B复合物的量。

[0325] 静脉内注射Mab 266三小时后,CSF中A $\beta_{40}$ 水平增加两倍,A $\beta_{42}$ 没有显著增加。然而,在24小时和72小时,CSF中的A $\beta_{40}$ 和A $\beta_{42}$ 都增加两到三倍。使用变性凝胶分析和随后对汇集的CSF的A $\beta$ 蛋白质印迹分析获得相似结果。A $\beta$ 通过脑间隙液的流出(CSF水平在某种程度上反映出这种流出)可能引起所观察到的CSF A $\beta$ 增加。

[0326] 意义重大的,CSF A $\beta$ 肽水平的变化并不是由于Mab 266进入CSF引起的,因为在注射后24小时测量到的水平低于Mab 266血浆水平的0.1%,不足以引起这些变化。这些结果提示:抗体在血流中的存在引起A $\beta$ 肽流出脑实质,进入CSF。

[0327] 在已经注射Mab 266并如上所述分析CSF的同一小鼠的脑皮质匀浆内,测量可溶于PBS或碳酸盐缓冲液的A $\beta$ 肽形式。观察到在皮质匀浆中这些溶解型的相似增加。

#### [0328] 实施例 7

##### [0329] Mab 266 在体外作为 A $\beta$ 肽接受器起作用

[0330] 构建作为体外系统的透析室,测试Mab 266作为A $\beta$ 肽接受器的能力。将1mL人CSF置于聚丙烯管的顶室内,该顶室由一块特定截断值为10-100kD的透析膜将其与底室分开,底室内盛有含或不含1 $\mu$ g Mab 266的75 $\mu$ LPBS。

[0331] 在不同时间点将底室内的物质加载到酸尿素凝胶,然后用6E10针对A $\beta$ 肽进行蛋白质印迹分析,看起来3小时后达到平衡。样品在蚁酸中变性,达到80%(体积比)的终浓度,然后用 $\beta$ -巯基乙醇(1%)还原。样品在0.9M乙酸电泳缓冲液内电泳(阳极到阴极)通过4%-35%的聚丙烯酰胺梯度凝胶,所述梯度凝胶含6M尿素、5%(体积比)冰乙酸和2.5%TEMED。转移到硝酸纤维素之前,中和凝胶的酸性pH。然后使用标准蛋白质印迹技术鉴定A $\beta$ 。检测到的带对应于4kD。

[0332] 3小时后,通过ELISA分析顶室和底室(n=4),由此确定从顶室移除的A $\beta$ 的量。图1显示存在和不存在Mab 266的情况下,不同分子量截断值获得的结果。如图显示,虽然当将PBS置于底室内时仅有最小量的A $\beta$ 肽穿过膜,但当存在Mab 266、分子量截断值是25kD的情况下,50%的A $\beta$ 肽在底室中受到整合;当分子量截断值增加到100kD时穿过膜的量增加,吸引几乎100%的A $\beta$ 肽穿过膜。

[0333] 还观察到抗N末端A $\beta$ 抗体3D6和10D5能够在该系统中吸引A $\beta$ 肽穿过膜,虽然所述抗体不能在实施例1所述测定中整合A $\beta$ 肽。这些结果显示:针对A $\beta$ 肽的抗体在这些条件下有足够亲和力整合生理溶液中的所述肽,使其与其它结合蛋白质分离,但对于位置13-28的表位有免疫反应性的Mab如266实际上更有效、以更高亲和力结合。

[0334] 在相似的测定中,如DeMattos, R. B. 等, J. Biol. Chem. (1998) 273 :4206-4212 ; Sun, Y. 等, J. Neurosci. (1998) 18 :3261-3272 所述方法纯化的星形细胞分泌的apoE4对于增加底室内A $\beta$ 肽量有微小但在统计学上显著的效应。当用多克隆IgG或BSA取代Mab 266时,没有观察到明显效应。

#### [0335] 实施例 8

[0336] A $\beta$  肽从 CNS 流出到血浆

[0337] A. 将 1  $\mu$ g A $\beta$  40 溶解于 5  $\mu$ L 小鼠 CSF, 保持其可溶, 然后将其注射入野生型 Swiss-Webster 小鼠小脑延髓池的蛛网膜下腔, 在此之前所述小鼠已经接受 PBS ( $n = 3$ ) 或 200  $\mu$ g 生物素化 Mab 266 ( $n = 3$ ) 的静脉内注射。在处理后的不同时间点, 通过 A $\beta$  ELISA 测定小鼠血浆中的 A $\beta_{\text{Total}}$ , 在 A $\beta$  ELISA 中使用 3D6 作为包被抗体, 并使用与过量生物素化 266 混合的 A $\beta$  标准品。从每只动物取出血浆样品后, 将每份血浆样品与过量生物素化 266 混合, 以在 ELISA 中进行 A $\beta$  检测。在注射 PBS 的小鼠中, 30-60 分钟后检测到 0.15ng/ml 水平的峰值, 即最低限度可检测量的肽, 在此之后所述水平基本上为零。然而, 在给予 Mab 266 的小鼠中, 60 分钟后血浆 A $\beta$  肽达到在注射 PBS 的小鼠中所检测到水平的 330 倍水平 (约 50ng/ml), 在 180 分钟后达到约 90ng/ml 的值。

[0338] B. 将 200  $\mu$ g ( $n = 3$ ) 或 600  $\mu$ g ( $n = 3$ ) 静脉内注射入两月龄 APP<sup>V717F</sup> 小鼠, 重复该程序。以上述剂量将 Mab 266 静脉内注射入 3 月龄 APP<sup>V717F</sup>/+ 小鼠。在静脉注射前和注射后的不同时间点, 通过 RIA 测定结合 Mab 266 的 A $\beta$  血浆浓度。图 2 显示来自一只有代表性的小鼠的详细结果。

[0339] 发现结合单克隆抗体 Mab 266 的 A $\beta$  的浓度在 4 天内从 150pg/ml 的基础水平增加到超过 100ng/ml 的水平。通过分析该曲线上的早期时间点, 确定在存在饱和水平所述抗体的情况下, APP<sup>V717F</sup> Tg 小鼠 A $\beta_{\text{Total}}$  进入血浆的净速率是 42pg/ml/分钟。

[0340] Mab 266 在野生型和 APP<sup>V717F</sup> Tg 小鼠体内对血浆 A $\beta$  水平的效应以及所述抗体对 CSF 中 A $\beta$  浓度的效应显示: 循环 Mab 266 的存在改变 CNS 和血浆间 A $\beta$  流动或转运平衡。

[0341] 实施例 9

[0342] Mab 266 对脑中 A $\beta$  的效应

[0343] 对四月龄 APP<sup>V717F</sup>/+ 小鼠腹膜内注射盐水、Mab 266 (500  $\mu$ g) 或对照鼠 IgG (100  $\mu$ g, Pharmigen), 每 2 周处理一次, 共进行 5 个月。在九月龄处死小鼠, 测定皮质中的 A $\beta$  沉积。如 Holtzman, D. M. 等, Ann. Neurol. (2000) 97:2892-2897 所述, 在用兔淘选 A $\beta$  抗体 (QCB, Inc.) 覆盖背海马后, 立即定量皮质中所述抗体鉴定的呈现 A $\beta$  免疫反应性的面积%。结果显示于图 3A。在该鼠龄, 每纽约一半动物仍然没有开始出现 A $\beta$  沉积。然而, 在用 266 处理的组中, 皮质中带有 > 50% A $\beta$  的小鼠的%显著更少 ( $P = 0.02$ ,  $\chi^2$  检验法)。虽然九月龄 APP<sup>V717F</sup> 小鼠出现大量 A $\beta$  沉积, 但有很大可变性, 约 50% 显示没有沉积, 约 50% 显示有大量沉积。在 PBS 和 IgG 处理的动物中, 6/14 和 5/13 小鼠有超过 50% 皮质被 A $\beta$  染色覆盖, 而用 Mab 266 处理的 14 只小鼠中仅有一只达到该染色水平。在 9 月龄时, 所有组中几乎 50% 的动物没有发展出 A $\beta$  沉积。后者看起来是由于我们使用的实验动物中各个小鼠的亲本来源, 因为即使研究的所有小鼠都证实是 APP<sup>V717F</sup>/+, 但仅在从 4/8 育种对获得的小鼠中观察到高水平 A $\beta$  沉积 (高病理幼仔)。来自其它 4 个育种对的小鼠看起来没有 A $\beta$  沉积 (低病理幼仔)。使用亲本来源作为共变量, M266 对于降低 A $\beta$  沉积有强烈、显著的效应 ( $p = 0.0082$ , 图 3B)。

[0344] 实施例 10

[0345] 在 APPV717F Tg 小鼠中外周注射 Mab 并不结合淀粉样斑

[0346] 为确定在 5 个月内腹膜内注射的 Mab 266 是否结合脑中的 A $\beta$ , 利用来自包含 A $\beta$  沉积并且已经用 Mab 266、盐水或对照 IgG 治疗的 9 月龄 APP<sup>V717F</sup>/+ Tg 小鼠的脑切片。如文

献所述进行组织加工和免疫染色 (Bales, K. R. 等, Nature Genet. (1997) 17 :263-264)。用荧光素标记的抗小鼠 IgG (Vector, Inc.) 温育来自所有组动物的组织,然后在荧光显微镜下检查。在任何组中没有观察到 A $\beta$  沉积的特异性染色。与此相反,当在用抗小鼠 IgG 温育所述切片前应用 Mab 266 于所述切片,则可以清楚地检测到 A $\beta$  沉积。

[0347] 实施例 11

[0348] 给予抗体 266 对于 24 月龄转基因半合子 PDAPP 小鼠的认知的效应

[0349] 使用 16 只半合子转基因小鼠 (APP<sup>V717F</sup>)。研究开始时所述小鼠约 24 月龄。所有注射都是腹膜内注射 (i. p.)。一半小鼠每周注射磷酸盐缓冲液 (PBS,“对照”),另一半接受溶解于 PBS 中的 500 微克小鼠抗体 266。注射在 7 周 (42 天) 内进行,总共注射 6 次。最后一次注射后 3 天,基本如 J. -C. Dodart 等, Bahavioral Neuroscience, 113 (5) 982-990 (1999) 所述,使用目标认知任务评价动物行为。计算认知指数  $(T_b \times 100) / (T_b - T_A)$ 。结果显示于下面表 1。

[0350] 表 1. 认知指数的统计学描述

[0351] 认知指数 (分钟)

[0352]

	N	平均值	标准差	标准误
对照(PBS)	8	71.2**	8.80	3.11
抗体 266	8	54.35	7.43	2.62

[0353] \*\*p = 0.0010

[0354] 对 24 月龄半合子转基因小鼠每周给予 500 微克抗体 266 与行为显著变化有关。抗体处理的转基因小鼠具有与野生型对照动物相似的认知指数 [J. -C. Dodart 等]。认知指数上的差异在 0.001 概率水平上具有统计学显著性。认知指数的增加表明:用结合  $\beta$  淀粉样蛋白肽氨基酸 13-28 区的抗体处理将逆转在该阿耳茨海默氏病小鼠模型中记录到的行为障碍。因此,给予结合  $\beta$  淀粉样蛋白肽氨基酸 13-28 区的抗体将治疗疾病如阿耳茨海默氏病和 Down 氏综合征,并将阻止通常与疾病进程有关的认知下降。

[0355] 如上所述,用小鼠抗体 266 处理 7 周的 24 月龄动物的脑海马 (包括扣带区和顶皮质) 覆盖后,立即定量皮质中的淀粉样蛋白负荷 (用抗 A $\beta$  抗体 3D6 或 21F12 染色后被免疫反应性材料覆盖的面积%)。结果显示于下表。处理组间的差异在统计学上并不显著。

[0356] 表 2. 用小鼠 266 抗 A $\beta$  抗体处理后 APP<sup>V717F+/-</sup> 小鼠中的淀粉样斑负荷

[0357] 淀粉样斑负荷 (%)

[0358]

	N	使用 3D6		使用 21F12	
		平均值	标准误	平均值	标准误
对照(PBS)	7	44.3	5.93	0.77	0.14
抗体 266	8	38.0	2.96	0.93	0.11

[0359] 对于这些年龄非常大的动物,根据用 3D6 或 21F12 测量,用小鼠抗体 266 处理与 PBS 处理组相比并不导致显著不同的淀粉样负荷。此外,与更年轻的动物中的淀粉样蛋白负荷相比, A $\beta$  负荷确实更多并且显著增加(见下文),所述更年轻的动物在目标认知任务中不能分辨新对象与熟悉的对象。最惊人的是,这些结果证明:抗 A $\beta$  抗体能够逆转认知缺陷,而不需降低淀粉样负荷本身。

[0360] 处理 7 周后, m266 处理组的认知指数与 24 月龄野生型动物预期的认知指数没有显著不同! 这指出在这些转基因动物中完全逆转认知下降。

[0361] 实施例 12

[0362] 给予抗体 266 对于年轻转基因半合子 PDAPP 小鼠的认知的效应

[0363] 使用五十四 (54) 只纯合子转基因小鼠 (APP<sup>V717F</sup>)。二十三 (23) 只小鼠在研究开始时约二月龄。其余小鼠在研究开始时约四月龄。处理时间五个月。因此,在研究终止时,小鼠约七 (7) 个月龄或约九 (9) 个月龄。

[0364] 所有注射都是腹膜内注射 (i. p.)。每只“PBS”对照组的小鼠每周接受磷酸盐缓冲溶液注射 (PBS ;200  $\mu$  L)。“IgG”对照组的每只小鼠每周接受 IgG1  $\kappa$  1 同种型对照注射 (100  $\mu$  g/ 小鼠 / 周)。每只“高剂量”组的小鼠每周接受溶解于 PBS 中的 500 微克抗体 266 注射 (“HD”)。“低剂量组”中的每只小鼠每周接受溶解于 PBS 中的 100 微克抗体 266 注射 (“LD”)。如上面实施例 10 所述,最后一次注射后三天,使用目标识别任务评价动物行为,计算辨别指数,辨别指数是花费在新对象上和花费在熟悉对象上的时间差异。结果显示于下表 3。结果按照研究结束时小鼠的年龄分组。

[0365] 表 3. 辨别指数的统计学描述

[0366] 辨别指数 (分钟)

[0367]

	N	平均值	标准差	标准误
7 月龄				
PBS	7	2.12	4.22	1.59
IgG	8	0.81	3.64	1.29
HD	8	10.04*	6.52	2.30
9 月龄				
PBS	7	1.87	3.54	1.34
IgG	8	0.96	3.51	1.24
LD	8	10.75*	6.44	2.28
HD	8	12.06***	7.82	2.76

[0368] \*p < 0.05

[0369] \*\*\*p < 0.0001

[0370] 将这些数据结合起来,支持这样一个结论:给予针对 A $\beta$  中间域的抗体 266 缓解 7-9 月龄 APP<sup>V717F</sup> 转基因小鼠中的斑沉积,并逆转以前特征鉴定的行为损害。用针对 A $\beta$  肽中间域的抗体治疗患者将抑制或防止一般与疾病进程有关的认知下降,并逆转所述认知下降。

[0371] 受处理动物的辨别指数与同龄野生型小鼠预期的辨别指数在统计学上没有显著不同。因此,就如在更老的动物中一样(实施例 10),用 m266 处理在这些更年轻的转基因动物中完全逆转认知下降。

[0372] 实施例 13

[0373] 合成人源化抗体 266

[0374] 细胞和抗体。从 ATCC(Manassas, VA) 获得小鼠骨髓瘤细胞系 Sp2/0, 置于 37°C CO<sub>2</sub> 培养箱中,在含 10% FBS(Cat#SH32661.03, HyClone, Logan, UT) 的 DME 培养基中维持。小鼠 266 杂交瘤细胞首先在含 10% FBS(HyClone), 10mM HEPES, 2mM 谷氨酰胺, 0.1mM 非必需氨基酸, 1mM 丙酮酸钠, 25  $\mu$ g/ml 庆大霉素的 RPMI-1640 培养基中培养,然后在含 2% 低 Ig FBS(Cat#30151.03, HyClone) 的无血清培养基 (Hybridoma SFM, Cat#12045-076, Life Technologies, Rockville, MD) 中扩展到滚瓶中的 2.5 升体积。使用蛋白 G Sepharose 柱,通过亲和层析从所述培养物上纯化小鼠单克隆抗体 266 (Mu266)。使用 EZ-Link Sulfo-NHS-LC-LC-生物素 (Cat#21338ZZ, Pierce, Rockford, IL) 制备生物素化 Mu266。

[0375] 克隆不同区 cDNA。使用 TRIzol 试剂 (Life Technologies) 从约 10<sup>7</sup> 杂交瘤细胞提取总 RNA,使用 PolyAtract mRNA 分离系统 (Promega, Madison, WI),按照供应商的方法分离 poly(A)<sup>+</sup>RNA。使用 SMART<sup>TM</sup>RACE cDNA 扩增试剂盒 (Clontech, Palo Alto, CA),按照供应商的方法合成双链 cDNA。使用分别与小鼠  $\kappa$  链和  $\gamma$  链恒定区退火的 3' 引物,以及在 SMART<sup>TM</sup>RACE cDNA 扩增试剂盒中提供的 5' 通用引物,通过聚合酶链反应 (PCR) 扩增轻链

和重链的可变区 cDNA。对于 VLPCR, 3' 引物具有如下序列:

[0376] 5' -TATAGAGCTCAAGCTTGGATGGTGGGAAGATGGATACAGTTGGTGC-3'

[0377] [SEQ ID NO:13]

[0378] 其中残基 17-46 与小鼠 Ck 区杂交。对于 VH PCR, 3' 引物具有如下简并序列:

[0379] A G T

[0380] 5' -TATAGAGCTCAAGCTTCCAGTGGATAGACCGATGGGGCTGTCGTTTTGGC-3'

[0381] T

[0382] [SEQ ID NO:14]

[0383] 其中残基 17-50 与小鼠  $\gamma$  链 CH1 杂交。将 VL 和 VH cDNA 亚克隆入 pCR4Blunt-TOPO 载体 (Invitrogen, Carlsbad, CA), 进行序列测定。使用荧光双脱氧链终止剂 (Applied Biosystems, Foster City, CA), 按照厂家的指导通过 PCR 循环测序反应进行 DNA 测序。在 377 型 DNA 测序仪 (Applied Biosystems) 上分析所述测序反应。

[0384] 构建人源化 266 (Hu266) 可变区。如 Queen 等 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 10029-10033 (1988)] 所述人源化小鼠抗体 V 区。根据序列同源性, 选择人 V 区构架作为 Mu266CDR 的受体。使用计算机程序 ABMOD 和 ENCAD [Levitt, M., J. Mol. Biol. 168: 595-620 (1983)] 构建可变区的分子模型。用 Mu266 的对应残基取代人源化 V 区中预期接触 CDR 的氨基酸。取代重链残基 46、47、49 和 98, 取代轻链残基 51。将人源化 V 区中在同一 V 区亚型内稀有的氨基酸取代为共有氨基酸, 消除可能的免疫原性。取代轻链残基 42 和 44。

[0385] 使用长度从约 65 碱基到 80 碱基的八种重叠合成寡核苷酸, 构建和扩增轻链和重链可变区基因 [He, X. Y. 等, J. Immunol. 160: 1029-1035 (1998)]。所述寡核苷酸成对退火, 用 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段延伸, 产生四个双链片段。变性所获得的片段, 成对退火, 然后用 Klenow 延伸, 产生两个片段。变性这些片段, 成对退火, 再次延伸, 产生全长基因。使用延伸高保真 PCR 系统 (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN), 通过 PCR 扩增所得产物。所述 PCR 扩增片段通过凝胶纯化并克隆进 pCR4Blunt-TOPO 载体。确认序列后, 用 Mlu I 和 Xba I 消化所述 VL 和 VH 基因, 凝胶纯化, 分别亚克隆进用于表达轻链和重链的载体, 产生 pVk-Hu266 和 pVg1-Hu266 (分别见本文的图 6 和图 7) [Co, M. S. 等, J. Immunol. 148: 1149-1154 (1992)]。从这些质粒表达的成熟人源化 266 抗体具有 SEQ ID NO:11 的轻链和 SEQ ID NO:12 的重链。

[0386] 稳定转染。使用 Gene Pulser 仪器 (BioRad, Hercules, CA), 如所述 (Co 等, 1992) 应用 360V 和 25  $\mu$ F, 通过电穿孔完成对小鼠骨髓瘤 Sp2/0 的稳定转染。转染前, 用 Fsp I 线性化 pVk-Hu266 和 pVg1-Hu266 质粒 DNA。用 20  $\mu$ g pVk-Hu266 和 40  $\mu$ g pVg1-Hu266 转染约  $10^7$  Sp2/0 细胞。将转染细胞悬浮于含 10% FBS 的 DME 培养基, 然后接种几个 96 孔板。48 小时后, 应用选择培养基 (含 10% FBS, HT 培养基补加剂, 0.3mg/ml 黄嘌呤和 1  $\mu$ g/ml 霉酚酸的 DME 培养基)。开始选择后约 10 天, 如下所述通过 ELISA 分析培养物上清中的抗体生成。高产量克隆在含 10% FBS 的 DME 培养基中扩增, 然后进一步分析抗体表达。选定克隆然后在杂交瘤 SFM 中培养。

[0387] 通过 ELISA 测量抗体表达。用 100  $\mu$ l 在 0.2M 碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液 (pH 9.4) 中的 1  $\mu$ g/ml 山羊抗人 IgG、Fc  $\gamma$  片段特异性多克隆抗体 (Cat#109-005-098, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) 包被 96 孔 ELISA 板 (Nunc-Immuno 板, Cat#439454,

NalgeNunc, Naperville, IL), 在 4°C 过夜。用洗涤缓冲液 (含 0.1% Tween 20 的 PBS) 洗孔后, 用 400  $\mu$ l Superblock 封闭缓冲液 (Cat#37535, Pierce) 封闭孔 30 分钟, 然后用洗涤缓冲液洗涤。用 ELISA 缓冲液 (含 1% BSA 和 0.1% Tween 20 的 PBS) 合适稀释含 Hu266 的样品, 然后应用于 ELISA 板 (每孔 100  $\mu$ l)。使用人源化抗 CD33IgG1 单克隆抗体 HuM195 (Co 等, 1992, 见上文) 作为标准品。所述 ELISA 板在室温下温育 2 小时, 然后用洗涤缓冲液洗孔。然后将 100  $\mu$ l ELISA 缓冲液中的 1/1, 1000 稀释 HRP 缀合山羊抗人  $\kappa$  多克隆抗体 (Cat#1050-05, Southern Biotechnology, Birmingham, AL) 应用于每个孔。每孔在室温下温育 1 小时并用洗涤缓冲液洗涤后, 每孔中加入 100  $\mu$ l ABTS 底物 (Cat#507602 和 Cat#506502, Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD)。在每孔中加入 100  $\mu$ l 2% 草酸, 终止显色。使用 OPTImax 微量滴定板读数器 (Molecular Devices, Menlo Park, CA), 在 415nm 读出吸光度值。

[0388] 纯化 Hu266。将其中一个高度表达 Hu266 的 Sp2/0 稳定转染子 (克隆 1D9) 改为在杂交瘤 SFM 中培养, 然后扩展到滚瓶中的 2 升。当细胞生存力达到 10% 或更低时, 收获用过的培养物上清, 并加载到蛋白 A Sepharose 柱。用 PBS 洗涤该柱, 然后用 0.1M 甘氨酸-HCl (pH 2.5), 0.1M NaCl 洗脱抗体。洗脱蛋白对 2 升 PBS 透析, 更换 3 次, 然后过滤通过 0.2  $\mu$ m 滤膜, 随后于 4°C 贮存。通过在 280nm 处测量吸光度确定抗体浓度 ( $1\text{mg/ml} = 1.4A_{280}$ )。根据标准程序, 在 4-20% 梯度胶 (Cat#EC6025, Novex, San Diego, CA) 上, 在 Tris-甘氨酸缓冲液中进行 SDS-PAGE。减少纯化的人源化 266 抗体, 在 SDS-PAGE 凝胶上电泳。整个抗体显示分子量约 25kDa 和 50kDa 的两条带。这些结果与根据氨基酸组成计算的轻链和重链或重链片段的分子量一致。

#### [0389] 实施例 14

##### [0390] 人源化 266 抗体的体外结合特性

[0391] 在一个比较 ELISA 中, 比较小鼠 266 抗体 (用生物素化小鼠 266 抗体) 与如上所述合成并纯化的人源化 266 抗体的结合效能。用 100  $\mu$ l 在 0.2M 碳酸钠 / 碳酸氢钠缓冲液 (pH 9.4) 中缀合 BSA 的  $\beta$ -淀粉样蛋白肽 (1-42) (10  $\mu$ g/ml) 包被 96 孔 ELISA 板 (Nunc-Immuno 板, Cat#439454, NalgeNunc), 在 4°C 过夜。如下制备所述 A $\beta$  1-42-BSA 缀合物: 将 7.5mg A $\beta$  1-42-Cys43 (C 末端半胱氨酸 A $\beta$  1-42, AnaSpec) 溶解于 500  $\mu$ l 二甲基亚砜, 然后立即加入 1, 500  $\mu$ l 蒸馏水。将两 (2) 毫克马来酰亚胺激活的牛血清白蛋白 (Pierce) 溶解于 200  $\mu$ l 蒸馏水。完全混合两种溶液, 在室温下静置两 (2) 小时。使用凝胶层析柱将未反应的肽与 A $\beta$  1-42-Cys-BSA 缀合物分离开。

[0392] 使用 ELISA 板洗涤器, 用含 0.1% Tween 20 的磷酸盐缓冲液 (洗涤缓冲液) 洗孔, 然后每孔加入 300  $\mu$ l Superblock 试剂 (Pierce) 封闭孔。封闭 30 分钟后, 用洗涤缓冲液洗孔, 除去多余液体。

[0393] 一式三份, 加入在 ELISA 缓冲液中生物素化 Mu266 (0.3  $\mu$ g/ml 终浓度) 和竞争抗体 (Mu266 或 Hu266; 开始浓度为 750  $\mu$ g/ml, 顺序 3 倍稀释) 的混合物, 每孔达到 100  $\mu$ l 终体积。作为无竞争物的对照, 加入 100  $\mu$ l 0.3  $\mu$ g/ml 生物素化 Mu266。作为背景对照, 加入 100  $\mu$ l ELISA 缓冲液。所述 ELISA 板在室温下温育 90 分钟。用洗涤缓冲液洗板后, 每孔加入 100  $\mu$ l 11  $\mu$ g/ml HRP 缀合链霉抗生物素 (Cat#21124, Pierce)。所述板在室温下温育 30 分钟, 然后用洗涤缓冲液洗涤。为进行显色, 加入 100  $\mu$ l / 孔 ABTS 过氧化物酶底物

(Kirkegaard & Perry Laboratories)。加入 100  $\mu$ l/孔 2% 草酸, 终止显色。在 415nm 处读出吸光度值。吸光度值针对竞争物浓度的对数作图, 使用本领域内众所周知的方法, 作符合数据点的曲线 (使用 Prism), 并确定每种抗体的 IC<sub>50</sub>。

[0394] 小鼠 266 的平均 IC<sub>50</sub> 是 4.7  $\mu$ g/ml (三个独立实验, 标准差 = 1.3  $\mu$ g/ml), 人源化 266 的平均 IC<sub>50</sub> 是 7.5  $\mu$ g/ml (三个独立实验, 标准差 = 1.1  $\mu$ g/ml)。如上所述进行第二组的三个实验, 测得小鼠 266 的平均 IC<sub>50</sub> 是 3.87  $\mu$ g/ml (SD = 0.12  $\mu$ g/ml), 人 266 的平均 IC<sub>50</sub> 是 4.0  $\mu$ g/ml (SD = 0.5  $\mu$ g/ml)。在这些结果的基础上, 我们得出结论: 人源化 266 具有与小鼠抗体 266 非常相似的结合特性。因此, 我们预期人源化 266 具有与小鼠 266 非常相似的体外和体内活性, 并将在人体内表现与小鼠 266 在小鼠体内表现的相同效应。

#### [0395] 实施例 15

##### [0396] 小鼠抗体 266 和 4G8 的体外结合特性

[0397] 使用 BIAcore 生物传感器 2000 测定抗体亲和力 ( $KD = K_d/K_a$ ), 用 BIAevaluation (v. 3.1) 软件分析数据。使用 N-乙基-N-二甲基氨基丙基碳二亚胺和 N-羟基琥珀酰亚胺 (EDC/NHS), 将捕获抗体 (兔抗小鼠) 通过游离氨基缀合到生物传感器芯片 (CM5) 流动细胞 2 的羧基上。将非特异性兔 IgG 缀合到流动细胞 1 上, 作为背景对照。单克隆抗体被捕获, 产生 300 共振单位 (RU)。然后使淀粉样蛋白  $\beta$  1-40 或 1-42 (Biosource International, Inc.) 以递减浓度 (1000 倍到 0.1 倍 KD) 流过所述芯片。为再生芯片, 使用甘氨酸-HCl (pH 2) 洗涤, 从所述芯片上洗脱结合的抗 A $\beta$  抗体。使用不含淀粉样蛋白  $\beta$  的对照注射作为对照, 以进行基线扣除。分析显示结合相和解离相的传感器克数 (Sensorgram), 确定  $K_d$  和  $K_a$ 。使用该方法, 发现小鼠抗体 266 对于 A $\beta$  1-40 和对于 A $\beta$  1-42 的亲和力都是 4pM。4G8 对 A $\beta$  1-40 的亲和力是 23nM, 对 A $\beta$  1-42 的亲和力是 24nM。尽管 266 和 4G8 对 A $\beta$  的亲和力存在 6000 倍的差距, 但它们都结合 A $\beta$  氨基酸 13 到 28 之间的表位, 有效从人 CSF 中整合 A $\beta$ 。因此, 在测定抗体整合 A $\beta$  的能力以及提供本发明有利而惊人的益处时, 极为重要的是表位的位置, 而不是结合亲和力。

#### [0398] 实施例 16

##### [0399] 使用 Biacore 方法和溶解性肽对小鼠抗体 266 的表位作图

[0400] BIAcore 是测量分子相互作用的自动生物传感器系统 [Karlsson R. 等, J. Immunol. Methods 145:229-240 (1991)]。BIAcore 相对于其它结合测定的优点是可以测量抗原结合而不必标记或固定所述抗原 (即所述抗原保持更接近天然的构象)。基本如上文实施例 12 所述, 使用 BIAcore 方法评价各种淀粉样蛋白  $\beta$  肽片段与小鼠抗体 266 的结合, 不同之处是: 使用含 Tween 20 的 HEPES 缓冲盐溶液进行所有稀释, 注射 A $\beta$  (BioSource International) 的多种片段, 并注射每种片段的单一浓度 (440nM)。

[0401] 淀粉样蛋白  $\beta$  片段 1-28、12-28、17-28 和 16-25 结合小鼠抗体 266, 而 A $\beta$  片段 1-20、10-20 和 22-35 并不结合。片段 1-20、10-20 和 22-35 以对 A $\beta$  这些区已知的表位特异性结合其它 Mab。使用该方法, 小鼠抗体 266 的结合表位看起来是位于 A $\beta$  的氨基酸 17 到 25 之间。由于结合通常发生在所述表位的至少 3 个残基, 我们可以进一步推断所述表位在残基 19-23 之间。

#### [0402] 实施例 17

##### [0403] 人源化抗体 266 的体外结合特性



- [0442] <210>4  
[0443] <211>5  
[0444] <212>PRT  
[0445] <213>Mus sp.  
[0446] <400>4  
[0447] Arg Tyr Ser Met Ser  
[0448] 1 5  
[0449] <210>5  
[0450] <211>17  
[0451] <212>PRT  
[0452] <213>Mus sp.  
[0453] <400>5  
[0454] Gln Ile Asn Ser Val Gly Asn Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys  
[0455] 1 5 10 15  
[0456] Gly  
[0457] <210>6  
[0458] <211>3  
[0459] <212>PRT  
[0460] <213>Mus sp.  
[0461] <400>6  
[0462] Gly Asp Tyr  
[0463] 1  
[0464] <210>7  
[0465] <211>113  
[0466] <212>PRT  
[0467] <213>人工序列  
[0468] <220>  
[0469] <223>人源化抗体  
[0470] <220>  
[0471] <221>MISC\_FEATURE  
[0472] <222>(2)..(2)  
[0473] <223>位置 2 的 Xaa 是 Val 或 Ile  
[0474] <220>  
[0475] <221>MISC\_FEATURE  
[0476] <222>(7)..(7)  
[0477] <223>位置 7 的 Xaa 是 Ser 或 Thr  
[0478] <220>  
[0479] <221>MISC\_FEATURE  
[0480] <222>(14)..(14)



[0520]	65	70	75	80
[0521]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Xaa Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser			
[0522]		85	90	95
[0523]	Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Xaa Gly Thr Xaa Xaa Glu Ile Lys			
[0524]		100	105	110
[0525]	Arg			
[0526]	<210>8			
[0527]	<211>112			
[0528]	<212>PRT			
[0529]	<213>人工序列			
[0530]	<220>			
[0531]	<223>人源化抗体			
[0532]	<220>			
[0533]	<221>MISC_FEATURE			
[0534]	<222>(1)..(1)			
[0535]	<223>位置 1 的 Xaa 是 Glu 或 Gln			
[0536]	<220>			
[0537]	<221>MISC_FEATURE			
[0538]	<222>(7)..(7)			
[0539]	<223>位置 7 的 Xaa 是 Ser 或 Leu			
[0540]	<220>			
[0541]	<221>MISC_FEATURE			
[0542]	<222>(46)..(46)			
[0543]	<223>位置 46 的 Xaa 是 Glu、Val、Asp 或 Ser			
[0544]	<220>			
[0545]	<221>MISC_FEATURE			
[0546]	<222>(63)..(63)			
[0547]	<223>位置 63 的 Xaa 是 Thr 或 Ser			
[0548]	<220>			
[0549]	<221>MISC_FEATURE			
[0550]	<222>(75)..(75)			
[0551]	<223>位置 75 的 Xaa 是 Ala、Ser、Val 或 Thr			
[0552]	<220>			
[0553]	<221>MISC_FEATURE			
[0554]	<222>(76)..(76)			
[0555]	<223>位置 76 的 Xaa 是 Lys 或 Arg			
[0556]	<220>			
[0557]	<221>MISC_FEATURE			
[0558]	<222>(89)..(89)			

[0559] <223> 位置 89 的 Xaa 是 Glu 或 Asp  
 [0560] <220>  
 [0561] <221>MISC\_FEATURE  
 [0562] <222>(107)..(107)  
 [0563] <223> 位置 107 的 Xaa 是 Leu 或 Thr  
 [0564] <400>8  
 [0565] Xaa Val Gln Leu Val Glu Xaa Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 [0566] 1 5 10 15  
 [0567] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr  
 [0568] 20 25 30  
 [0569] Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Xaa Leu Val  
 [0570] 35 40 45  
 [0571] Ala Gln Ile Asn Ser Val Gly Asn Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Xaa Val  
 [0572] 50 55 60  
 [0573] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Xaa Xaa Asn Thr Leu Tyr  
 [0574] 65 70 75 80  
 [0575] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Xaa Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 [0576] 85 90 95  
 [0577] Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Xaa Val Thr Val Ser Ser  
 [0578] 100 105 110  
 [0579] <210>9  
 [0580] <211>113  
 [0581] <212>PRT  
 [0582] <213> 人工序列  
 [0583] <220>  
 [0584] <223> 人源化抗体  
 [0585] <400>9  
 [0586] Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly  
 [0587] 1 5 10 15  
 [0588] Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ile Tyr Ser  
 [0589] 20 25 30  
 [0590] Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 [0591] 35 40 45  
 [0592] Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 [0593] 50 55 60  
 [0594] Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 [0595] 65 70 75 80  
 [0596] Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser  
 [0597] 85 90 95

[0598] Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 [0599] 100 105 110  
 [0600] Arg  
 [0601] <210>10  
 [0602] <211>112  
 [0603] <212>PRT  
 [0604] <213>人工序列  
 [0605] <220>  
 [0606] <223>人源化抗体  
 [0607] <400>10  
 [0608] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 [0609] 1 5 10 15  
 [0610] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr  
 [0611] 20 25 30  
 [0612] Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val  
 [0613] 35 40 45  
 [0614] Ala Gln Ile Asn Ser Val Gly Asn Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val  
 [0615] 50 55 60  
 [0616] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
 [0617] 65 70 75 80  
 [0618] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 [0619] 85 90 95  
 [0620] Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 [0621] 100 105 110  
 [0622] <210>11  
 [0623] <211>219  
 [0624] <212>PRT  
 [0625] <213>人工序列  
 [0626] <220>  
 [0627] <223>人源化抗体  
 [0628] <400>11  
 [0629] Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly  
 [0630] 1 5 10 15  
 [0631] Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ile Tyr Ser  
 [0632] 20 25 30  
 [0633] Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 [0634] 35 40 45  
 [0635] Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 [0636] 50 55 60

[0637] Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 [0638] 65 70 75 80  
 [0639] Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser  
 [0640] 85 90 95  
 [0641] Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 [0642] 100 105 110  
 [0643] Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
 [0644] 115 120 125  
 [0645] Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
 [0646] 130 135 140  
 [0647] Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
 [0648] 145 150 155 160  
 [0649] Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
 [0650] 165 170 175  
 [0651] Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
 [0652] 180 185 190  
 [0653] Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
 [0654] 195 200 205  
 [0655] Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 [0656] 210 215  
 [0657] <210>12  
 [0658] <211>442  
 [0659] <212>PRT  
 [0660] <213>人工序列  
 [0661] <220>  
 [0662] <223>人源化抗体  
 [0663] <400>12  
 [0664] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 [0665] 1 5 10 15  
 [0666] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr  
 [0667] 20 25 30  
 [0668] Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val  
 [0669] 35 40 45  
 [0670] Ala Gln Ile Asn Ser Val Gly Asn Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val  
 [0671] 50 55 60  
 [0672] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
 [0673] 65 70 75 80  
 [0674] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 [0675] 85 90 95

[0676]	Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0677]	100 105 110
[0678]	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
[0679]	115 120 125
[0680]	Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
[0681]	130 135 140
[0682]	Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
[0683]	145 150 155 160
[0684]	Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
[0685]	165 170 175
[0686]	Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
[0687]	180 185 190
[0688]	Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
[0689]	195 200 205
[0690]	Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
[0691]	210 215 220
[0692]	Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
[0693]	225 230 235 240
[0694]	Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
[0695]	245 250 255
[0696]	Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
[0697]	260 265 270
[0698]	Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
[0699]	275 280 285
[0700]	Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
[0701]	290 295 300
[0702]	His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
[0703]	305 310 315 320
[0704]	Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
[0705]	325 330 335
[0706]	Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
[0707]	340 345 350
[0708]	Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
[0709]	355 360 365
[0710]	Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
[0711]	370 375 380
[0712]	Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
[0713]	385 390 395 400
[0714]	Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

[0715]		405	410	415
[0716]	Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr			
[0717]		420	425	430
[0718]	Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
[0719]		435	440	
[0720]	<210>13			
[0721]	<211>46			
[0722]	<212>DNA			
[0723]	<213> 合成核苷酸			
[0724]	<400>13			
[0725]	tatagagctc aagcttggat ggtgggaaga tggatacagt tgggtgc			46
[0726]	<210>14			
[0727]	<211>50			
[0728]	<212>DNA			
[0729]	<213> 合成核苷酸			
[0730]	<400>14			
[0731]	tatagagctc aagcttccag tggatagacc gatggggctg tcgttttggc			50

除去的总 A $\beta$  百分率

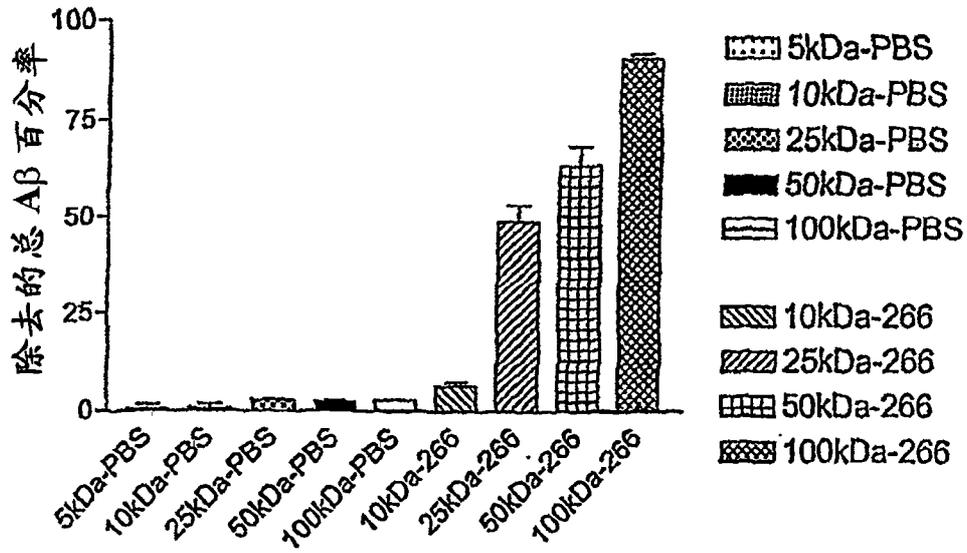


图 1

APPV717F 小鼠静脉内注射 266 后的血浆 A $\beta$  水平

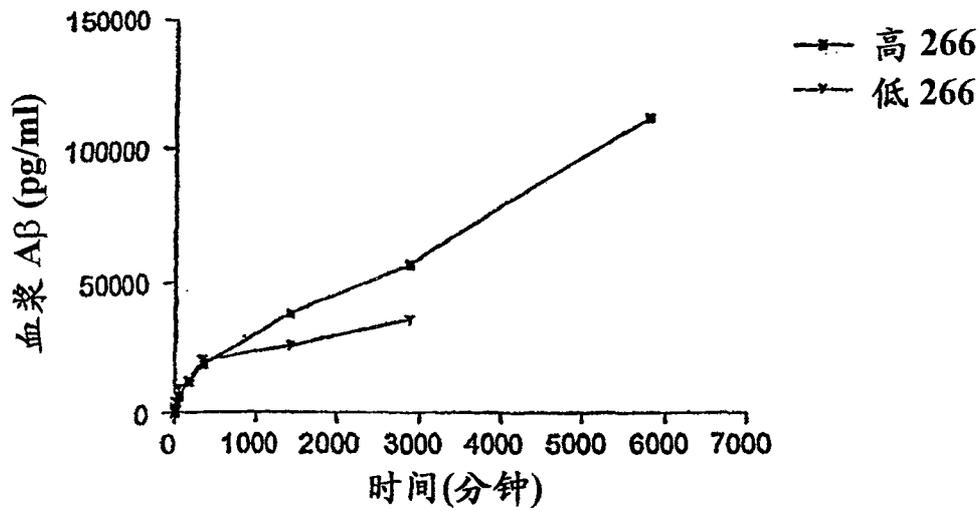


图 2



619 ACGCGTCCACCATGAAGTTGCCTGTAGGCTGTGGTGTGATGTTCTGGATTCTGCTCCAGGTGTGATGTTGIGATG  
M K L P V R L L V L M F W I P A S R C D V V M

699 ACCCAGAGCCCACTCTCCCTGCCTGTCAACCTTGGACAACCAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTATATA  
T Q S P L S L P V T L G Q P A S I S C R S S Q S L I Y

779 TAGTGATGGAAACGCCCTATTACATTGGTTCCTTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAGGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCA  
S D G N A Y L H W F L Q K P G Q S P R L L I Y K V S N

859 ACCGATTTTCTGGGGTCCAGACAGGTTCAATGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAG  
R F S G V P D R F S G S G S G T D P T L K I S R V E

939 GCCGAGGATGTGGGAGTTTATTACTGTTCTCAAAGTACACATGTTCCGTGGAGCTTCGGTCAAGGCCCAAGGTGGAAT  
A E D V G V Y Y C S Q S T H V P W T F G Q G T K V E I

1019 CAAACGTGACTAGAATTTAATCTAGAAATCTAAACTCTGAGGGGGTCCGGATGACGTGGCCATTCTTTGCCTAAAGCAAT  
K R

1099 GAGTTTACTGCAAGGTCAGAAAAGCATGCAAAGCCCTCAGAATGGCTGCAAAGAGCTCCACAAAACAATTTAGAACTTT

1179 ATTAAGGAATAGGGGAAGCTAGGAAGAACTCAAAACATCAAGATTTTAAATACGCTTCTTGGTCTCCTTGCTATAATT

1259 ATCTGGGATAAGCATGCTGTTTTCTGTCTGTCCCTAACATGCCCTGTGATTATCCGCAACAACACACCCCAAGGGCAGAA

1339 CTTTGTACTTAAACACCATCCTGTTTGCCTTTCTCTCAGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTCCCGCCAT  
T V A A P S V F I F P P S

1419 CTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTGTGTGCCTGCTGATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAG  
D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W

1499 TGAAGGTGGATAACGCCCTCCAAATCGGTAACCTCCAGGAGAGTGTCAAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAG  
K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L

1579 CCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTCAACCCATCAGGGCC  
S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L

1659 TGAGCTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAGAGGGAGAAGTGCCTCCACCTGCTCCTCAGTTCAGC  
S S P V T K S F N R G E C .

1739 CTGACCCCTCCCATCCTTTGGCCTCTGACCCTTTTCCACAGGGGACCTACCCCTATTGCGGTCTCCAGCTCATCTTT  
1819 CACCTCACCCCTCCTCCTCCTTGGCTTAATATATGCTAATGTTGGAGGAGAATGAATAAATAAAGTGAATCTTTGCAC  
1899 CTGTGGTTTCTCTCTTCTCCTCATTTAATAATATATATCTGTTGTTTTACCAACTACTCAATTTCTCTTATAAGGGACTAA  
1979 ATATGTAGTCACTCCTAAGGCGCATAACCATTTATAAAATCATCCTTCATTCATTTTACCCTATCATCCTCTGCAAGAC  
2059 AGTCTCCCTCAAACCCACAAGCCTTCTGTCTCACAGTCCCTGGGCCATGGTAGGAGAGACTTGCTTCTTGTTTTCC  
2139 CCTCCTCAGCAAGCCCTCATAGTCTTTTAAAGGGTGACAGGCTTACAGTCAATATATCCTTTGATTCAATTCCTGAGA  
2219 ATCAACCAAGCAATTTTCAAAGAAGAAACCTGCTATAAAGAGAATCATTCAATGCAACATGATATAAATAACAAC  
2299 ACAATAAAGCAATTAATAAACAACAATAGGGAATGTTTAAAGTTCATCATGGTACTTAGACTTAATGGAATGTCATG  
2379 CCTATTATACATTTTAAACAGGTAAGGACTCCTGTCTGCCAAGGGCGTATTGAGTACTTTCCACAACCTAATTT  
2459 AATCCACACTATACTGTGAGATTAARAACATTCATTAAAATGTTGCAAGGTTCTATAAGCTGAGAGACAAATATATT

图 4.

2539 TATAACTCAGCAATCCCACFTCTAGGATCC

**Hu266 轻链基因的完整序列位于 pVk-Hu266 的 MluI 位点和 BamHI 位点之间。核苷酸数指示其在 pVgk-Hu266 中的位置。V<sub>k</sub> 和 C<sub>k</sub> 外显子翻译为单字母编码；点指出翻译终止密码子。成熟重链起始于双下划线的天冬氨酸(D)。内含子序列以斜体表示。**

用于表达人源化 266 重链的 pVg1-Hu266 多核苷酸序列以及表达的人源化 266 重链的单一氨基酸编码

619 ACGCGTCCACCATGAATTCGGGCTCAGCTTGATTTTCCTTGTCTTGTGTTTAAAGGTGCTCTGTGGAAGTGCAGCTG  
M N F G L S L I F L V L V L K G V L C E V Q L

699 GTGGAGTCTGGGGAGGTTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTTAGTAG  
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 R

779 GTATTCCATGTCTTGGGTTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGCTGGAATGGTCCGACAAATTAATAGTGTGGTAATAGCA  
Y S M S W V R Q A P G K G L E L V A Q I N S V G N S

859 CCTACTATCCAGACACTGTAAAGGGCCGATTCCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACCCCTGTACCTGCAAATGAAC  
T Y Y P D T W K G R F T I S R D N A K N T L Y L Q M N

939 TCCCTGAGGGCCGAGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAGCGGAGACTACTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACACTCTC  
S L R A E D T A V Y Y C A S G D Y W G Q G T L V T V S

1019 CTCAGGTGAGTCTCAACAACCTCTAGAGCTTTCTGGGGCAGGCCAGGCCTGACCTTGGCTTTGGGGCAGGGAGGGGGCTA  
S

1099 AGGTGAGGCAGGTGGCCGCCAGGTCACACCCAAATGCCCATGAGCCAGACACTGGAGCTGAACCTCGGGACAGT  
1179 TAAGAACCCAGGGCCCTCTGCGCCCTGGGCCAGCTCTGTCCACACCCGGTCAATGGCACCAACCTCTCTTGCAGCCT  
A

1259 CCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCTGGCACCCCTCTCCAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTG  
S T K G P S V P P L A P S S K S T S G G T A A L G C L

1339 GTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGC  
V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A

1419 TGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACA  
V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y

1499 TCTGCAACGTGAATCAAGCCAGCAACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGGTGAGAGGCCAGCACAGGGAGGGAGGGTG  
I C N V N H K P S N T K V D K K V

1579 TCTGCTGGAAGCCAGGCTCAGCGCTCCTGCCTGGAAGCATCCGGCTATGCAGCCCCAGTCCAGGGCAGCAAGCCAGGCC  
1659 CCGTCTGCTCTTCAACCCGGAGGCTCTGCGCCGCCACTCATGTCTCAGGGAGAGGGTCTTCTGGCTTTTCCCAGGCT  
1739 CTGGGCAGGCAAGGCTAGGTGCCCTAACCCAGGCCCTGCACACAAGGGGCAGGTGCTGGGCTCAGACCTGCCAAGAG  
1819 CCATATCCGGGAGGACCCCTGCCCTGACCTAAGCCCAACCCAAAGGCCAAACTCTCTCACTCCCTCAGCTCGGACACCTTC  
1899 TCTCTCCAGATTCCAGTAACTCCCAATCTTCTCTGACAGGCCCAATCTTGTGACAAACTCACACATGCCACCCG  
E P K S C D K T H T C P P

1979 TGCCAGGTAAGCCAGCCAGGCCCTCGCCCTCCAGCTCAAGGGGGACAGGTGCCCTAGAGTAGCCTGCATCCAGGGACA  
C P

2059 GGGCCAGCCGGGTGCTGACAGTCCACCTCCATCTCTCTCTCAGCACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCACTCTCTC  
A P E L L G G P S V F L

2139 TTCCCCCAAACCCAAAGGACACCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGAGCGTGAGCCACGA  
F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E

2219 AGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCCGGGAGGAGCAGT  
D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q

2299 AACACAGCAGTACCGTGTGGTCCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAGGAGTACAAGTGCAG  
Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K

2379 GTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGTGGGACCCGTTGGGTTGCGAGGGCC  
V S N K A L P A P I E K T I S K A K

2459 ACATGGACAGAGGCGGCTCGGGCCACCCTCTGCCCTGAGAGTGACCGCTGTACCAACCTCTGTCCCTACAGGGCAGCCC  
G Q P

2539 CGAGAACACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGACCCCTGACCTGCTGGTCAA  
R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K

2519 AGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAGCCCTCCC

图 5.

G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P

2699 TGCTGGACTCCGACCGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAACGTCCTC  
V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F

2779 TCATGCTCCGIGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGAGTGGG  
S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K \*

2859 ACGGCCGGCAAGCCCCCGCTCCCGGGCTCTCGCGGTGCGACGAGGATGCTGGCACGTACCCCTGTACATACTCCCG  
2939 GCGGCCAGCATGGAATAAAGCACCCAGCGCTGCCTGGGCCCTGGGAGACTGTGATGGTTCCTTCCACGGGTGAGGC  
3019 CGAGTCTGAGGCTGAGTGGCATGAGGGAGGCAGAGCGGGTCCCACTGTCCCCACACTGGCCCAAGGCTGTGAGGTGTGC  
3099 CTGGGGCGCTTAGGGTGGGGCTCAGCCAGGGGCTGCCTCGGCAGGGTGGGGATTGGCCAGCGTGGCCCTCCCTCCAGC  
3179 AGCACCTGCCCTGGGGCTGGGCCAGGGAGCCCTAGGAGCCCTGGGGACAGACACAGCCCTGCCTCTGTAGGAGAC  
3259 TGTCTCTTCTGTGAGCGCCCTGTCTCCGACCTCCATGCCCACTCGGGGGCATGCCTAGTCCATGTGCGTAGGGACAGG  
3339 CCCTCCCTCACCCATCTACCCCAAGGCACTAACCCCTGGCTGCCTGCCCAGCCTCGCACCCGATGGGGACACACCG  
3419 ACTCCGGGGACATGCCTCTCGGGCCCTGTGGAGGGACTGGTGCAGATGCCACACACACTCAGCCAGACCCGTTCA  
3499 ACAACCCCGCACTGAGGTGGCCGGCCACAGGCCACACACACAGTGCACGCCCTCACACAGGAGCCCTCACCCGG  
3579 GCGAAGTGCACAGCACCCAGACAGCAAGGTCTCTCGCACAGTGAACACTCTCTCGGACACAGGCCCCACAGCCCCA  
3659 CGCGGCACCTCAAGGCCACAGGCTCTCGGCAGCTTCTCCACATGCTGACCTGCTCAGACAAACCCAGCCCTCTCTCA  
3739 CAAGGGTGCCTCTCAGCCGCCACACACACAGGGGATCACACACCAGTCACTGCTCCCTGGCCCTGGCCCACTCCACG  
3819 TGCCGCCCTTCCCTGAGGATCC

Hu266 重链基因的完整序列位于 pVg1-Hu266 的 MluI 位点和 BamHI 位点之间。核苷酸数指示其在 pVg1-Hu266 中的位置。V<sub>H</sub> 和 C<sub>H</sub> 外显子翻译为单字母编码。点指出翻译终止密码子。成熟重链起始于双下划线的谷氨酸(E)。内含子序列以斜体表示。

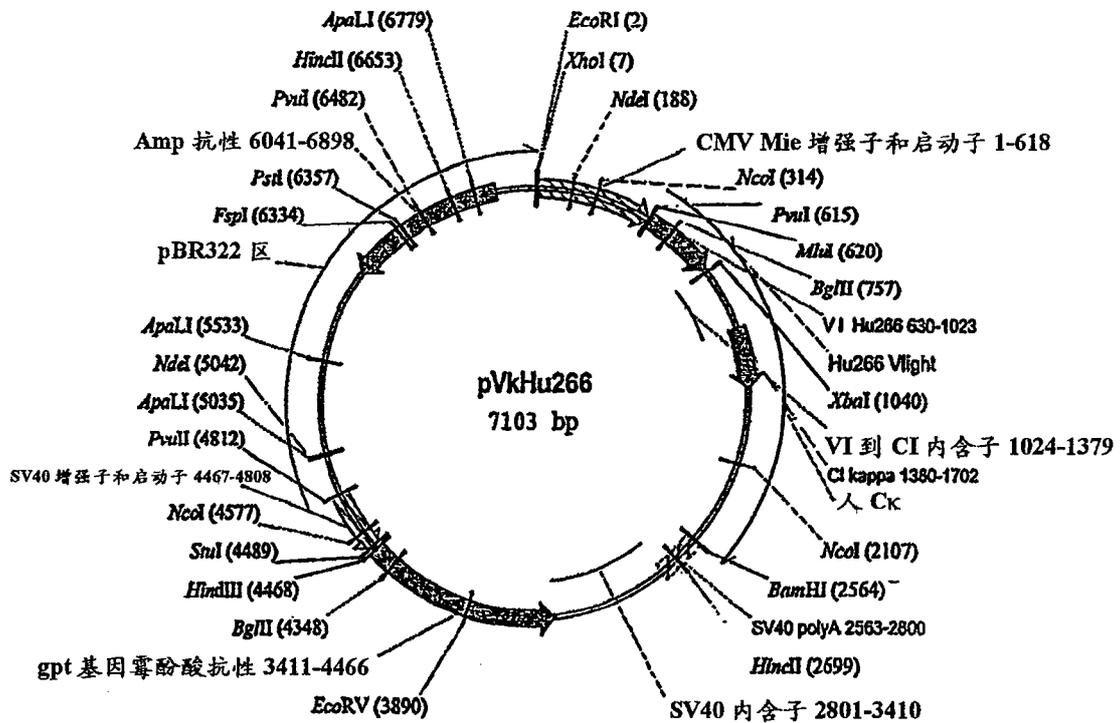


图 6. 质粒 pVkuHu266

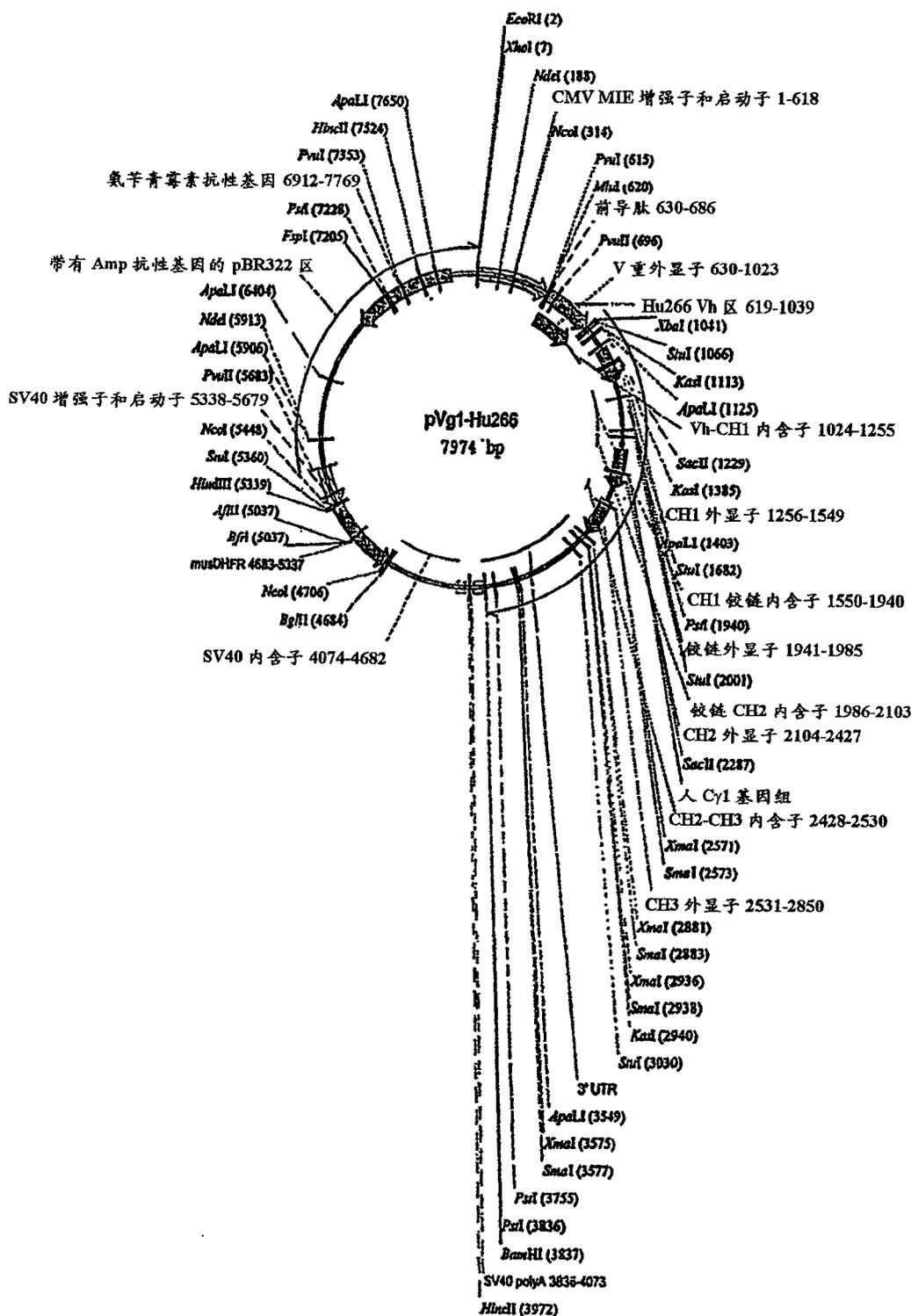


图 7. 质粒 pVg1-Hu266