

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610143285.X

[51] Int. Cl.

C07K 16/18 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 12 月 5 日

[11] 公开号 CN 101081869A

[22] 申请日 2001.12.6

[21] 申请号 200610143285.X

分案原申请号 01820170.9

[30] 优先权

[32] 2000.12.6 [33] US [31] 60/251,892

[71] 申请人 神经实验室有限公司

地址 百慕大群岛史密斯

共同申请人 惠氏公司

[72] 发明人 古里奇·巴锡 乔斯·萨尔达尼亚
达勒·B·申克

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责任
公司

代理人 杨青 樊卫民

权利要求书 10 页 说明书 127 页 附图 10 页

[54] 发明名称

识别 β 淀粉样肽的人源化抗体

[57] 摘要

本发明提供了改进的药剂和方法，用于治疗与患者脑中的 $A\beta$ 淀粉样沉积物相关的疾病。优选的药剂包括人源化抗体。

1. 一种人源化免疫球蛋白或其抗原结合片段，其能够以至少 $10^7 M^{-1}$ 的结合亲和力特异性结合到 β 淀粉样肽(A β)，其含有

(i)包含来自 3D6 免疫球蛋白轻链可变区序列 SEQ ID NO:2 的互补决定区(CDR)，和来自人受体免疫球蛋白轻链序列的可变构架区的轻链，条件是所述轻链的至少一个构架残基用来自小鼠 3D6 轻链可变区序列的相应的氨基酸残基取代，和

(ii)包含来自 3D6 免疫球蛋白重链可变区序列 SEQ ID NO:4 的互补决定区(CDR)，和来自人受体免疫球蛋白重链序列的可变构架区的重链，条件是所述重链的至少一个构架残基用来自小鼠 3D6 重链可变区序列的相应的氨基酸残基取代，和

其中各构架残基独立地选自：

- (a) 直接非共价结合抗原的残基；
- (b) 与 CDR 区邻近的残基；
- (c) 与 CDR 相互作用的残基；和
- (d) 参与 VL-VH 界面的残基。

2. 如权利要求 1 中所述的免疫球蛋白或其抗原结合片段，其中所述轻链构架区残基是与 CDR 相互作用的残基，其通过基于抗朊病毒抗体 1F4 的名称为 1CR9 的解开结构建立 3D6 轻链的模型来进行确定。

3. 如权利要求 1 中所述的免疫球蛋白或其抗原结合片段，其中所述轻链构架区残基是与 CDR 相互作用的残基，其通过基于抗 Gp41 抗体的名称为 1NLD 的解开结构建立 3D6 轻链的模型来进行确定。

4. 如权利要求 1 中所述的免疫球蛋白或其抗原结合片段，其中所述重链构架区残基是与 CDR 相互作用的残基，其通过基于 OPG2 抗受体抗体的名称为 1OPG 的解开结构建立 3D6 重链的模型来进行确定。

5. 一种人源化免疫球蛋白或其抗原结合片段，其能够以至少 10^7M^{-1} 的结合亲和力特异性结合到 β 淀粉样肽(A β)，含有

(i) 包含来自 3D6 免疫球蛋白轻链可变区序列 SEQ ID NO:2 的互补决定区(CDR)，和来自人受体免疫球蛋白轻链序列的可变构架区的轻链，条件是该轻链的至少一个构架残基用来自小鼠 3D6 轻链可变区序列的相应的氨基酸残基取代，和

其中的轻链构架残基是一个如 3D6 免疫球蛋白轻链可变区的三维模型分析所鉴定的能影响轻链可变区构象或功能的残基，和

(ii) 包含来自 3D6 免疫球蛋白重链可变区序列 SEQ ID NO:4 的互补决定区(CDR)，和来自人受体免疫球蛋白重链序列的可变构架区的重链，条件是该重链的至少一个构架残基用来自小鼠 3D6 重链可变区序列的相应的氨基酸残基取代，和

其中的重链构架残基是一个如 3D6 免疫球蛋白重链可变区的三维模型分析所鉴定的能影响重链可变区构象或功能的残基。

6. 如权利要求 5 中所述的免疫球蛋白或其抗原结合片段，其中所述各构架残基选自能够与抗原相互作用的残基、近接于抗原结合位点的残基、能够与 CDR 相互作用的残基、与 CDR 相邻的残基、在离 CDR 残基 6 Å 内的残基、规范的残基、游标区残基、链间包装残基、稀有残基或在结构模型表面的糖基化位点的残基。

7. 如权利要求 5 或 6 中所述的免疫球蛋白或其抗原结合片段，其中的轻链构架残基通过基于抗朊病毒抗体 1F4 的名称为 1CR9 的解开结构建立 3D6 轻链的模型来进行确定。

8. 如权利要求 5 或 6 中所述的免疫球蛋白或其抗原结合片段，其中的轻链构架残基通过基于抗 Gp41 抗体的名称为 1NLD 的解开结构建立 3D6 轻链的模型来进行确定。

9. 如权利要求 5 或 6 中所述的免疫球蛋白或其抗原结合片段，其

中的重链构架残基通过基于 OPG2 抗受体抗体的名称为 1OPG 的解开结构建立 3D6 重链的模型来进行确定。

10. 如前述权利要求中任一项所述的人源化免疫球蛋白或其抗原结合片段, 包括的轻链含有(i)来自 3D6 免疫球蛋白轻链可变区序列 SEQ ID NO:2 的互补决定区(CDR), 和(ii)来自人受体免疫球蛋白轻链序列的可变构架区, 条件是至少一个选自 L1、L2、L36 和 L46(Kabat 编号规则)的构架残基用来自小鼠 3D6 轻链可变区序列的相应氨基酸取代。

11. 如前述权利要求中任一项所述的人源化免疫球蛋白或其抗原结合片段, 包括的重链含有(i)来自 3D6 免疫球蛋白重链可变区序列 SEQ ID NO:4 的互补决定区(CDR), 和(ii)来自人受体免疫球蛋白重链序列的可变构架区, 条件是至少一个选自 H49、H93 和 H94(Kabat 编号规则)的构架残基用来自小鼠 3D6 重链可变区序列的相应氨基酸取代。

12. 如前述权利要求中任一项所述的免疫球蛋白或其抗原结合片段, 其中人受体轻链属于亚型 κ II(Kabat 规则)。

13. 如前述权利要求中任一项所述的免疫球蛋白或其抗原结合片段, 其中人受体重链属于亚型 III(Kabat 规则)。

14. 如权利要求 12 中所述的免疫球蛋白或其抗原结合片段, 其中的人受体轻链选自 Kabat ID 019230、Kabat ID 005131、Kabat ID 005058、Kabat ID 005057、Kabat ID 005059、Kabat ID U21040 和 Kabat ID U41645。

15. 如权利要求 12 中所述的免疫球蛋白或其抗原结合片段, 其中的人受体轻链是 Kabat ID 019230。

16 如权利要求 13 中所述的免疫球蛋白或其抗原结合片段，其中的人受体重链选自 Kabat ID 045919、Kabat ID 000459、Kabat ID 000553、Kabat ID 000386 和 Kabat ID M23691。

17. 如权利要求 13 中所述的免疫球蛋白或其抗原结合片段，其中的人受体重链是 Kabat ID 045919。

18. 如前述权利要求中任一项所述的免疫球蛋白或其抗原结合片段，其中所述轻链的至少一个稀有人构架残基用人可变轻链序列的普通氨基酸残基在该位置进行取代。

19. 如前述权利要求中任一项所述的免疫球蛋白或其抗原结合片段，其中所述轻链的至少一个稀有人构架残基用来自种系可变轻链序列的相应氨基酸残基进行取代。

20. 如权利要求 19 中所述的免疫球蛋白或其抗原结合片段，其中的种系可变轻链序列选自 A1、A17、A18、A2 和 A19。

21. 如前述权利要求中任一项所述的免疫球蛋白或其抗原结合片段，其中所述重链的至少一个稀有人构架残基用人可变重链序列的普通氨基酸残基在该位置进行取代。

22. 如前述权利要求中任一项所述的免疫球蛋白或其抗原结合片段，其中所述重链的至少一个稀有人构架残基用来自种系可变重链序列的相应氨基酸残基进行取代。

23. 如权利要求 22 中所述的免疫球蛋白或其抗原结合片段，其中的种系可变重链序列选自 VH3-48、VH3-23、VH3-7、VH3-21 和 VH3-11。

24. 如权利要求 22 中所述的免疫球蛋白或其抗原结合片段，其中

的种系可变重链序列是 VH3-23。

25. 如权利要求 18-20 中任一项所述的免疫球蛋白或其抗原结合片段，其中所述轻链的稀有构架残基选择基于轻链可变区亚组中的人轻链可变区在该位置的出现小于 10%，而普通残基选择基于轻链可变区亚组中的人轻链可变区在该位置的出现超过 50%。

26. 如权利要求 21-23 中任一项的免疫球蛋白或其抗原结合片段，其中所述重链的稀有构架残基选择基于重链可变区亚组中的人重链可变区在该位置的出现小于 10%，而普通残基选择基于重链可变区亚组中的人重链可变区在该位置的出现超过 50%。

27. 如前述权利要求中任一项所述的免疫球蛋白或其抗原结合片段，其包含来自 3D6 免疫球蛋白轻链可变区序列的互补决定区(CDR)和可变区构架残基 L1、L2、L36 和 L46(Kabat 编号规则)，其中轻链的其它部分来自人免疫球蛋白。

28. 如前述权利要求中任一项所述的免疫球蛋白或其抗原结合片段，其包含来自 3D6 免疫球蛋白重链可变区的互补决定区(CDR)和可变构架残基 H49、H93 和 H94(Kabat 编号规则)，其中重链的其它部分来自人免疫球蛋白。

29. 如前述权利要求中任一项所述的抗原结合片段，其中所述片段选自 Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc, Fv, 单链和单链抗体。

30. 如权利要求 1-29 中任一项所述的免疫球蛋白或抗原结合片段，其特异性结合于β淀粉样肽(Aβ)，具有至少 10^8 M^{-1} 的结合亲和力。

31. 如权利要求 1-29 中任一项所述的免疫球蛋白或抗原结合片段，其特异性结合于β淀粉样肽(Aβ)，具有至少 10^9 M^{-1} 的结合亲和力。

32. 如权利要求 1-29 中任一项所述的免疫球蛋白或抗原结合片段，其中的重链同种型是 $\gamma 1$ 。

33. 如权利要求 1-29 中任一项所述的免疫球蛋白或抗原结合片段，其结合于可溶性 β 淀粉样肽(A β)和聚集的 A β 。

34. 如权利要求 33 中所述的免疫球蛋白，其中的可溶性 β 淀粉样肽(A β)是非聚集的 A β 。

35. 如权利要求 1-29 中任一项所述的免疫球蛋白或抗原结合片段，其介导 β 淀粉样肽(A β)的吞噬作用。

36. 如权利要求 1-29 中任一项所述的免疫球蛋白或抗原结合片段，其在受试者中越过血脑屏障。

37. 如权利要求 1-29 中任一项所述的免疫球蛋白或抗原结合片段，其减少受试者的 β 淀粉样肽(A β)沉积和神经炎性营养不良。

38. 一种含有人源化重链和人源化轻链的人源化免疫球蛋白，其中

(a) 人源化轻链包含 3 个具有来自小鼠 3D6 免疫球蛋白轻链可变区 SEQ ID NO:2 的相应互补决定区的氨基酸序列的互补决定区(CDR1、CDR2 和 CDR3)和 1 个来自人轻链可变区构架序列的可变区构架，条件是至少一个选自由 L1、L2、L36 和 L46(Kabat 编号规则)组成的第一组的位置被小鼠 3D6 免疫球蛋白轻链可变区构架的同等位置的相同氨基酸占据；和

(b) 人源化重链包含 3 个具有来自小鼠 3D6 免疫球蛋白重链可变区 SEQ ID NO:4 的相应互补决定区的氨基酸序列的互补决定区(CDR1、CDR2 和 CDR3)和 1 个来自人重链可变区构架序列的可变区构架，条

件是至少一个选自由 H49、H93 和 H94(Kabat 编号规则)组成的第二组的位置被小鼠 3D6 免疫球蛋白重链可变区构架的同等位置的相同氨基酸占据；

其中人源化免疫球蛋白特异性结合于 β 淀粉样肽(A β)，具有至少 10^7 M^{-1} 的结合亲和力，其中 3D6 免疫球蛋白具有可变区 SEQ ID NO:2 的轻链和可变区 SEQ ID NO: 4 的重链。

39. 如权利要求 38 中所述的人源化免疫球蛋白，其中的人轻链可变区构架来自 κ 轻链可变区。

40. 如权利要求 38 中所述的人源化免疫球蛋白，其中的人重链可变区构架来自 IgG1 重链可变区。

41. 如权利要求 38 中所述的人源化免疫球蛋白，其中的人源化轻链可变区构架来自选自 Kabat ID 019230、Kabat ID 005131、Kabat ID 005058、Kabat ID 005057、Kabat ID 005059、Kabat ID U21040 和 Kabat ID U41645 的轻链。

42. 如权利要求 38 中所述的人源化免疫球蛋白，其中的人源化重链可变区构架来自选自 Kabat ID 045919、Kabat ID 000459、Kabat ID 000553、Kabat ID 000386 和 Kabat ID M23691 的重链。

43. 如权利要求 38 中所述的人源化免疫球蛋白，其中的人源化轻链可变区构架除来自第一组的位置之外与 Kabat ID 019230 轻链可变区构架序列相同，以及重链可变区构架除来自第二组的位置之外与 Kabat ID 045919 重链可变区构架序列相同。

44. 如权利要求 38 中所述的人源化免疫球蛋白，其中的人源化轻链含有与小鼠 3D6 轻链的相应互补决定区相同的互补决定区，以及人源化重链含有与小鼠 3D6 重链的相应互补决定区相同的互补决定区。

45. 人源化免疫球蛋白或其抗原结合片段，其以至少 $10^7 M^{-1}$ 的亲合力与 β 淀粉样肽(A β)特异性结合，包括 (i) 含有 3D6 可变轻链区序列 SEQ ID NO:2 的互补决定区(CDR1、CDR2 和 CDR3)，和与人轻链构架区具有至少 90%序列同一性的构架区序列的轻链；和 (ii) 含有 3D6 可变重链区序列 SEQ ID NO:4 的互补决定区(CDR1、CDR2 和 CDR3)，和与人重链构架区具有至少 90%序列同一性的构架区序列的重链。

46. 权利要求 45 的人源化免疫球蛋白或其抗原结合片段，其中所述轻链构架区序列与人轻链构架区具有至少 95%序列同一性。

47. 权利要求 45 的人源化免疫球蛋白或其抗原结合片段，其中所述重链构架区序列与人重链构架区具有至少 95%序列同一性。

48. 一种人源化免疫球蛋白或其抗原结合片段，其结合 β 淀粉样肽(A β)，具有至少 $10^7 M^{-1}$ 的亲合力，其包括：

(a)一个含有鼠 3D6 互补决定区(CDR)氨基酸残基和人 VL 亚组 II 可变区构架区(FR)氨基酸残基的轻链可变区；和

(b)一个含有鼠 3D6 互补决定区(CDR)氨基酸残基和人 VH 亚组 III 可变区构架区(FR)氨基酸残基的重链可变区。

49. 一种嵌合免疫球蛋白，其含有来自基本如 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:4 所示的 3D6 免疫球蛋白可变区序列。

50. 一种免疫球蛋白或其抗原结合片段，其含有如 SEQ ID NO:8 所述的可变重链区和如 SEQ ID NO:5 所述的可变轻链区。

51. 一种免疫球蛋白或其抗原结合片段，其含有如 SEQ ID NO:12 所述的可变重链区和如 SEQ ID NO:11 所述的轻链区。

52. 一种免疫球蛋白，其含有如 SEQ ID NO:8 所述的可变重链区、如 SEQ ID NO:5 所述的可变轻链区和来自 IgG1 的恒定区。

53. 一种免疫球蛋白，其含有如 SEQ ID NO:12 所述的可变重链区、如 SEQ ID NO:11 所述的轻链区和来自 IgG1 的恒定区。

54. 一种含有如权利要求 29-53 中任一项所述的免疫球蛋白和药用载体的药物组合物。

55. 一种分离的核酸分子，其编码如权利要求 29-53 中任一项所述的免疫球蛋白。

56. 一种分离的核酸分子，其包含选自 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37 的核苷酸序列。

57. 一种载体，其含有如权利要求 55 或 56 所述的核酸分子。

58. 一种宿主细胞，其含有如权利要求 55 或 56 所述的核酸分子。

59. 一种制备抗体的方法，其包括在使得抗体或片段能够产生的条件下培养如权利要求 58 中所述的宿主细胞并从宿主细胞或培养物中分离所述的抗体。

60. 包含权利要求 55 的分离的核酸分子的药物组合物。

61. 一种鉴定人源化 3D6 免疫球蛋白可变构架区中负责取代的残基的方法，其包括基于解开的免疫球蛋白结构建立 3D6 可变区的三维结构模型并分析所述模型的能够影响 3D6 免疫球蛋白可变区构象或

功能的残基，从而负责取代的残基得到鉴定。

62. 如 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:4 所述的可变区或其任意部分在产生 3D6 免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其结构域的三维图像中的应用。

63. 权利要求 1 到 53 任一项所述的免疫球蛋白在制备用于预防或者治疗患者的致淀粉样疾病的药物中的应用。

64. 权利要求 1 到 53 任一项所述的免疫球蛋白在制备用于预防或者治疗患者的阿耳兹海默氏病的药物中的应用。

识别 β 淀粉样肽的人源化抗体

本申请为国际申请 PCT/US2001/046587 于 2003 年 6 月 6 日进入中国国家阶段、申请号为 01820170.9、发明名称为“识别 β 淀粉样肽的人源化抗体”的分案申请。

相关申请

本申请要求以名称为“识别 β -淀粉样肽的人源化抗体”的在先临时申请 U.S.60/251,892(2000 年 12 月 6 日提交)为优先权。上述申请在这里全文引用作为参考。

发明背景

阿尔茨海默氏病(AD)是一种导致老年性痴呆的渐进性疾病。通常参见 Selkoe, TINS 16: 403(1993);Hardy 等, WO92/13069; Selkoe, J. Neuropathol.Exp. Neurol. 53: 438(1994); Duff 等, Nature, 373: 476(1995); Games 等, Nature, 373:523(1995)。广义上讲,该疾病分为两类:发生在晚年(65 岁以上)的晚期发作,和老年期之前例如 35-60 岁之间形成的早期发作。在该病的两种类型中,病理学是相同的,但是如果在早年开始,异常可能更加严重且分布更广泛。该疾病特征在于至少两种类型的大脑损伤、神经纤维缠结和老年斑。神经纤维缠结是由两根互相缠绕在一起的细丝组成的微管相关的 τ 蛋白质的胞内沉积物。老年斑(即淀粉样斑)是直径达 $150\mu\text{m}$ 通过脑组织切片的显微分析观察到的中心穿插有胞外淀粉样沉积物的紊乱的神经纤维网区域。淀粉样斑在大脑中的积累也与唐氏综合征和其它的认知紊乱有关。

老年斑的主要成分是被称为 $A\beta$ 或 β -淀粉样肽的肽。 $A\beta$ 肽是 4-kDa 的称作淀粉样前体蛋白(APP)的较大跨膜糖蛋白的 39-43 个氨基酸的中间片段。通过不同分泌型酶蛋白水解 APP, 结果人们发现 $A\beta$

主要为 40 个氨基酸长度的短型和 42-43 个氨基酸长度的长型两种。APP 的部分疏水跨膜区域被发现在 A β 的羧基末端，且其可说明 A β 聚集成斑的能力，特别是长型的情况。淀粉样斑在大脑中的积累最终导致神经细胞坏死。与这种类型的神经系统坏死相关联的生理症状被描绘为阿耳茨海默氏病的特征。

APP 蛋白的若干突变与阿耳茨海默氏病有关系。参见，例如，Goate 等，Nature 349:704(1991)(缬氨酸⁷¹⁷突变为异亮氨酸); Chartier Harlan 等，Nature 353:844(1991)(缬氨酸⁷¹⁷突变为甘氨酸); Murrell 等，Science 254:97(1991)(缬氨酸⁷¹⁷突变为苯丙氨酸); Mullan 等，Nature Genet. 1:345(1992)(双突变，赖氨酸⁵⁹⁵-甲硫氨酸⁵⁹⁶突变为天冬酰胺⁵⁹⁵-亮氨酸⁵⁹⁶)。这种突变被认为是通过增加或改变 APP 到 A β 的加工，特别是 APP 增量加工成为长型 A β (即 A β 1-42 和 A β 1-43)，导致阿耳茨海默氏病。其它基因例如早衰素 (presenilin) 基因 PS1 和 PS2 中的突变被认为是间接影响 APP 加工来产生增量的长型 A β (参见 Hardy, TINS 20: 154(1997))。

小鼠模型已被成功的用于检测淀粉样斑在阿耳茨海默氏病中的意义(Games 等，同上，Johnson-Wood 等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:1550(1997))。特别地，当 PDAPP 转基因小鼠(其表达人 APP 的突变体形式且在年青阶段发展阿耳茨海默氏病)被注射长型的 A β 时，它们显示出阿耳茨海默氏病状态的衰退和对 A β 肽的抗体效价的增加(Schenk 等，Nature 400, 173(1999))。上述论述表明 A β ，特别是它的长型，是引起阿耳茨海默氏病的病因。

McMichael 在 EP526511 中提出了对预先确定为 AD 的患者采用顺势疗法的剂量给药 A β (小于或等于 10⁻²mg/天)。对于带有约 5 升血浆的一般人，甚至该剂量的上限预计产生不超过 2 pg/ml 浓度。在人血浆中 A β 的正常浓度一般地在 50-200pg/ml 范围内(Seubert 等，Nature 359: 325(1992))。由于在 EP 526, 511 中建议的剂量只是改变内源性循环 A β

的水平，且在 EP 526511 中没有建议使用佐剂作为免疫刺激剂，因此产生的任何治疗性结果似乎都是难以置信的。

因此，存在着用于阿耳茨海默氏病的新的疗法和药剂的需求，特别是能够在生理学(例如，无毒的)剂量上产生有益治疗效果的治疗方法和药剂。

发明的概述

本发明提供新的免疫药物，特别是用于致淀粉样的 (amyloidogenic) 疾病(例如，阿耳茨海默氏病)的预防和治疗的抗体药物。本发明是基于，至少部分基于，两种特异性结合于 A β 肽并有效减少斑沉积和/或减少与致淀粉样紊乱有关的神经性营养障碍的单克隆抗体的鉴定和表征。这些抗体的结构和功能分析导致了用于预防和/或治疗的各种人源化抗体的设计。特别地，本发明突出了这些抗体的不同区域的人源化，并因此提供了人源化的免疫球蛋白或抗体链，完全人源化的免疫球蛋白或抗体以及功能性免疫球蛋白或抗体片段，尤其是特征抗体的抗原结合片段。

含有所述特征单克隆抗体的互补决定区的多肽和多核苷酸药物以及适用于编码所述多肽的载体和宿主也被本发明公开。

淀粉样遗传疾病(例如，阿耳茨海默氏病)的治疗方法以及在此方法中使用的药物组合物和试剂盒也被公开。

本发明还提供鉴定在所述特征单克隆抗体中对于特有免疫功能重要的残基的方法以及鉴定能够在当用于治疗药物时提高了结合亲合力和/或减少了免疫原性的人源化抗体的设计中负责取代的残基的方法。

附图的简要描述

图 1 描述了小鼠 3D6、人源化 3D6、Kabat ID 109230 和种系 A19

抗体轻链的氨基酸序列的比对。CDR 区域用箭头显示。粗斜体显示鼠稀有残基。粗体表示包装(VH + VL)残基。实体表示规范/CDR 相互作用残基。星号表示人源化 3D6 改型 1 回复突变所选择的残基。

图 2 描述小鼠 3D6、人源化 3D6、Kabat ID 045919 和种系 VH3-23 抗体的重链的氨基酸序列的比对。注解同图 1。

图 3 图示了 3D6、嵌合 3D6 和 10D5 的 A β 结合特性。图 3A 图解了 A β 结合于嵌合的 3D6(PK1614)以及与结合于鼠 3D6 的比较。图 3B 图示了生物素酰化的 3D6 对未标记的 3D6、PK1614 和 10D5 竞争性结合 A β 。

图 4 描述了 3D6 VH 和 VL 的同源性模型,显示了 α -碳主链迹线。VH 被显示为点线,且 VL 被显示为实线。CDR 区域被显示为条带的形式。

图 5 图示了嵌合 3D6 和人源化 3D6 的 A β 结合特性。图 5A 描述了人源化 3D6v1 和嵌合 3D6 结合于聚集 A β 的测定的 ELISA 结果。图 5B 描述了人源化 3D6v1 和人源化 3D6v2 结合于聚集 A β 的测定的 ELISA 结果。

图 6 是定量测定人源化 3D6 和嵌合 3D6 与来自 PDAPP 小鼠脑切片的 A β 斑结合的图表。

图 7 显示人源化 3D6 改型 1 和 2、嵌合 3D6、鼠 3D6 和 10D5 与鼠 3D6 竞争性结合 A β 的能力的竞争性结合测定试验的结果。

图 8 图示了测定人源化 3D6v2、嵌合 3D6 和人 IgG 通过小神经胶质细胞介导 A β 摄取能力的离体吞噬作用测定试验。

图 9 描述了 10D5 VL 和 3D6 VL 氨基酸序列的比对。黑体表示与 10D5 精确匹配的残基。

图 10 描述了 10D5 VH 和 3D6 VH 氨基酸序列的比对。黑体表示与 10D5 精确匹配的残基。

发明的具体描述

本发明提供了一种新的用于预防或治疗阿耳茨海默氏病或其它致淀粉样疾病的免疫药物和方法。本发明是基于,至少部分基于,在结

合 β 淀粉样蛋白(A β)(例如, 结合可溶性和/或聚集性 A β)、介导吞噬作用(例如, 聚集性 A β 的吞噬)、减少斑沉积和/或减少神经性营养障碍(例如在患者中)方面有效的两种单克隆免疫球蛋白 3D6 和 10D5 的表征。本发明进一步基于这些免疫球蛋白的可变轻链和重链的一级和二级结构的确定和结构表征以及对于活性和免疫原性是重要的残基的鉴定。

本发明提供免疫球蛋白, 其包括此处所述的优选的单克隆免疫球蛋白的可变轻链和/或重链。还提供优选的免疫球蛋白, 例如治疗性免疫球蛋白, 其包括人源化的可变轻链和/或人源化的可变重链。优选的可变轻链和/或重链包括来自单克隆免疫球蛋白(例如, 供体免疫球蛋白)的互补决定区(CDR)和基本上来自人受体免疫球蛋白的可变构架区。短语“基本上来自人受体免疫球蛋白”是指大多数或关键的构架残基是来自人受体序列, 然而允许用选择来提高人源化免疫球蛋白活性(例如, 改变活性使得其更接近模拟供体免疫球蛋白的活性)或降低人源化免疫球蛋白的免疫原性的残基在特定的位置进行残基取代。

在一个实施方案中, 本发明提供了一种人源化免疫球蛋白轻链或重链, 其包含 3D6 可变区互补决定区(CDR)(即包括一个、两个或三个来自轻链可变区序列如 SEQ ID NO:2 所阐述的 CDR 或包括一个、两个或三个来自重链可变区序列如 SEQ ID NO:4 所阐述的 CDR), 并包括一个基本上来自人受体免疫球蛋白轻链或重链序列的可变构架区, 条件是至少一个构架残基被回复突变为相应的鼠残基, 其中所述的回复突变基本上不影响链和 A β 直接结合的能力。

在另一个实施方案中, 本发明提供了一种人源化免疫球蛋白轻链或重链, 其包含 3D6 可变区互补决定区(CDR)(例如包括一个、两个或三个来自轻链可变区序列如 SEQ ID NO:2 所阐述的 CDR 和/或包括一个、两个或三个来自重链可变区序列如 SEQ ID NO:4 所阐述的 CDR), 并包括一个基本上来自人受体免疫球蛋白轻链或重链序列的可变构架区, 条件是至少一个构架残基用来自小鼠 3D6 轻链或重链可变区序列

的相应氨基酸残基取代，其中构架残基选自(a)非共价直接结合抗原的残基;(b)与 CDR 相邻的残基;(c)CDR-相互作用的残基(例如，通过在同源的已知免疫球蛋白链的解开结构上模拟轻链或重链来确定);以及(d)在 VL-VH 界面上共同参与的残基。

在另一个实施方案中，本发明提供了一种人源化免疫球蛋白轻链或重链，其包含 3D6 可变区 CDR 和来自人受体免疫球蛋白轻链或重链序列的可变构架区，条件是至少一个构架残基用来自小鼠 3D6 轻链或重链可变区序列的相应氨基酸残基取代，其中通过可变区的三维模型分析，构架残基是一种能够影响轻链可变区构型或功能的残基，例如能够与抗原相互作用的残基、近接于抗原结合位点的残基、能够与 CDR 相互作用的残基、与 CDR 相邻的残基、在离 CDR 残基 6 Å 内的残基、规范的残基、游标区残基、链间包装残基、稀有残基或在结构模型表面上的糖基化位点残基。

在另一个实施方案中，本发明提供了一种人源化免疫球蛋白轻链，其包括 3D6 可变区 CDR(例如，来自 3D6 轻链可变区序列，如 SEQ ID NO:2 所阐述)，并包括人受体免疫球蛋白可变构架区，条件是至少一个选自 L1、L2、L36 和 L46(Kabat 编号规则)的构架残基用来自小鼠 3D6 轻链可变区序列的相应氨基酸残基取代。在另一个实施方案中，本发明提供了一种人源化免疫球蛋白重链，其包括 3D6 可变区 CDR(例如，来自 3D6 重链可变区序列如 SEQ ID NO:4 所阐述)，并包括人受体免疫球蛋白可变构架区，条件是至少一个选自 H49、H93 和 H94(Kabat 编号规则)的构架残基用来自小鼠 3D6 重链可变区序列的相应氨基酸残基取代。

优选的轻链包括亚型 κ II 的 κ II 构架区(Kabat 规则)，例如，来自受体免疫球蛋白 Kabat ID 019230、Kabat ID 005131、Kabat ID 005058、Kabat ID 005057、Kabat ID 005059、Kabat ID U21040 和 Kabat ID U41645 的构架区。优选的重链包括亚型 III 的构架区(Kabat 规则)，例

如，来自受体免疫球蛋白 Kabat ID 045919、Kabat ID 000459、Kabat ID 000553、Kabat ID 000386 和 Kabat ID M23691 的构架区。

在一个实施方案中，本发明提供了一种人源化免疫球蛋白轻链或重链，其包括 10D5 可变区互补决定区(CDR)(例如包括一个、两个或三个来自如 SEQ ID NO: 14 所述的轻链可变区序列的 CDR 或包括包括一个、两个或三个来自如 SEQ ID NO: 16 所述的重链可变区序列的 CDR)，且包括一个基本上来自人受体免疫球蛋白轻链或重链序列的可变构架区，条件是至少一个构架残基被回复突变为相应的鼠残基，其中所述的回复突变基本上不影响链和 A β 直接结合的能力。

在另一个实施方案中，本发明提供了一种人源化免疫球蛋白的轻链或重链，其包含 10D5 可变区互补决定区(CDR)(例如包括一个、两个或三个来自如 SEQ ID NO:14 所述的轻链可变区序列的 CDR 和/或包括一个、两个或三个来自如 SEQ ID NO:16 所述的重链可变区序列的 CDR)，并包括一个基本上来自人受体免疫球蛋白轻链或重链序列的可变构架区，条件是至少一个构架残基用来自小鼠 3D6 轻链或重链可变区序列的相应的氨基酸残基取代，其中构架残基选自(a)非共价直接结合抗原的残基;(b)与 CDR 相邻的残基;(c)与 CDR-相互作用的残基(例如，通过在同源的已知免疫球蛋白链的解开结构上模拟轻链或重链来确定); 以及(d)在 VL-VH 界面上共同参与的残基。

在另一个实施方案中，本发明提供了一种人源化免疫球蛋白轻链或重链，其包含 10D5 可变区 CDR 和自人受体免疫球蛋白轻链或重链序列的可变构架区，条件是至少一个构架残基用来自小鼠 10D5 轻链或重链可变区序列的相应的氨基酸残基取代，其中通过可变区的三维模型分析，构架残基是一种能够影响轻链可变区构型或功能的残基、例如能够与抗原相互作用的残基、近接于抗原结合位点的残基、能够与 CDR 相互作用的残基、与 CDR 相邻的残基、在离 CDR 残基 6 Å 内的残基、规范的残基、游标区残基、链间包装残基、稀有残基或在结构

模型表面上的糖基化位点残基。

在另一个实施方案中，本发明提供了除上述取代之外的至少一个稀有人构架残基的取代。例如，稀有残基可用在此位置上的人可变链序列的普通氨基酸残基取代。或者，稀有残基可用来自同源的种系可变链序列的相应的氨基酸残基取代(例如，稀有的轻链构架残基可用来自 A1、A17、A18、A2 或 A19 种系免疫球蛋白序列的相应种系残基取代或稀有的重链构架残基可用来自 VH3-48、VH3-23、VH3-7、VH3-21 或 VH3-11 种系免疫球蛋白序列的相应种系残基取代。

在另一个实施方案中，本发明提供了一种包含上述轻链和重链的人源化免疫球蛋白，或所述免疫球蛋白的抗原结合片段。在一个示例实施方案中，人源化免疫球蛋白结合(例如，特异性结合) β 淀粉样肽(A β)，结合亲和力至少为 $10^7 M^{-1}$ 、 $10^8 M^{-1}$ 或 $10^9 M^{-1}$ 。在另一个实施方案中，免疫球蛋白或抗原结合片段包括具有同种型 $\gamma 1$ 的重链。在另一个实施方案中，免疫球蛋白或抗原结合片段结合(例如，特异性结合)可溶性 β 淀粉样肽(A β)和聚集性 A β 。在另一个实施方案中，免疫球蛋白或抗原结合片段介导 β 淀粉样肽(A β)的吞噬作用(例如，诱导吞噬作用)。在另外一个实施方案中，免疫球蛋白或抗原结合片段越过受试者的血脑屏障。在另外一个实施方案中，免疫球蛋白或抗原结合片段减少受试者的 β 淀粉样肽(A β)沉积和神经炎性营养障碍。

在另一个实施方案中，本发明提供了一种包含 3D6 可变区的嵌合免疫球蛋白(例如，如 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:4 所述的可变区序列)。在另一个实施方案中，本发明提供了一种免疫球蛋白或其抗原结合片段，其包括 SEQ ID NO:8 所示的可变重链区以及 SEQ ID NO:5 所示的可变轻链区。在另一个实施方案中，本发明提供了一种免疫球蛋白或其抗原结合片段，其包括 SEQ ID NO:12 所示的可变重链区以及 SEQ ID NO:11 所示的可变轻链区。在另一个实施方案中，本发明提供了一种包含 10D5 可变区的嵌合免疫球蛋白(例如，SEQ ID NO:14 或

SEQ ID NO:16 所示的可变区序列)。在另一个实施方案中, 免疫球蛋白或其抗原结合片段进一步含有来自 IgG1 的恒定区。

本文所述的免疫球蛋白特别适用于以预防或治疗致淀粉样疾病为目的的治疗方法中。在另一个实施方案中, 本发明提供了一种预防或治疗致淀粉样疾病(例如, 阿耳茨海默氏病)的方法, 其包括给药患者有效量的此处所述的人源化免疫球蛋白。另一个实施方案中, 本发明提供了含有本文所述人源化免疫球蛋白和药用载体的药物组合物。也提供了用于制备本文所述免疫球蛋白或免疫球蛋白片段或链的分离的核酸分子、载体和宿主细胞, 以及用于制备所述免疫球蛋白、免疫球蛋白片段或免疫球蛋白链的方法。

本发明进一步提供了一种当制备人源化 3D6 或 10D5 免疫球蛋白时用于分别确定负责取代的人源化 3D6 或 10D5 残基的方法。例如, 确定负责取代的可变构架区残基的方法包括建立在解开同源免疫球蛋白结构上制作 3D6 或 10D5 可变区的三维结构模型并对能够影响 3D6 或 10D5 免疫球蛋白可变区构型或功能的残基分析所述模型, 因而负责取代的残基得到确定。本发明进一步提供了 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:4 所示的可变区序列或其任意部分在产生 3D6 免疫球蛋白、3D6 免疫球蛋白链或其结构域的三维图像中的应用。本发明也提供了 SEQ ID NO:14 或 SEQ ID NO:16 所示的可变区序列或其任意部分在产生 10D5 免疫球蛋白、10D5 免疫球蛋白链或其结构域的三维图像中的应用。

在描述本发明之前, 下面所用特定术语的定义将对理解是有帮助的。

术语“免疫球蛋白”或“抗体”(在这里交换使用)是指具有由两个重链和两个轻链组成的四条多肽链基本结构的抗原结合蛋白, 所述链的稳定化, 例如通过链间二硫键进行, 其具有特异性结合抗原的能力。

重链和轻链折叠到结构域中。术语“结构域”是指含有肽环(如含有 3 到 4 个肽环)的重链或轻链多肽的球形区域,所述肽环例如通过 β -折叠和/或链内二硫键而稳定化。结构域本文进一步指“恒定的”或“可变的”,基于在为“恒定”域的情况下,不同类别的域中相对缺乏序列变化,或在为“可变”域的情况下,不同类别的域中有显著的序列变化。“恒定的”域在轻链上可被交换称为“轻链恒定区”、“轻链恒定域”、“CL”区或“CL”域。“恒定的”域在重链上可被交换称为“重链恒定区”、“重链恒定域”、“CH”区或“CH”域。“可变的”域在轻链上可被交换称为“轻链可变区”、“轻链可变域”、“VL”区或“VL”域。“可变的”域在重链上可被交换称为“重链可变区”、“重链可变域”、“CH”区或“CH”域。

术语“区”是指抗体链的局部或一部分且其包括此处所定义的恒定或可变的域,以及所述域的更多不连续的局部或部分。例如,轻链可变域或区包括分散在此处所定义的“构架区”或“FR”中的“互补决定区”或“CDR”。

免疫球蛋白或抗体可以为单体或多聚体的形式存在。术语“抗原结合片段”是指一个与抗原结合或与抗原结合(即特异性结合)的完整抗体(即与它们所衍生的完整抗体)竞争的免疫球蛋白或抗体的多肽片段。术语“构型”是指蛋白或多肽(例如,抗体、抗体链、结构域或其区域)的三级结构。例如,短语“轻(或重)链构型”是指轻(或重)链可变区的三级结构,短语“抗体构型”或“抗体片段构型”是指抗体或其片段的三级结构。

抗体的“特异性结合”是指抗体对抗原或优选的表位显示出可感知的亲合力并且优选不显示显著的交叉反应。“可感知”或优选的结合包括具有至少 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 M^{-1} 或 10^{10} M^{-1} 的亲合力的结合。亲合力大于 10^7 M^{-1} , 优选大于 10^8 M^{-1} 是更优选的。本文所述这些值的中间的数值也确定在本发明的范围中且优选的结合亲合力可显示为

亲合力的范围,例如 10^6 到 10^{10} M^{-1} , 优选 10^7 到 10^{10} M^{-1} , 更优选 10^8 到 10^{10} M^{-1} 。“不显示显著的交叉反应”的抗体是一种不会可感知地结合于不期望的物质(例如,不期望的蛋白质物质)的抗体。例如,特异性结合于 $\text{A}\beta$ 的抗体将可感知地结合 $\text{A}\beta$ 但不会显著地与非- $\text{A}\beta$ 蛋白或肽(例如,包含在淀粉样斑中的非- $\text{A}\beta$ 蛋白质或肽)反应。对优选表位特异的抗体将,例如,与相同蛋白或肽上的较远的表位不产生显著的交叉反应。特异性结合可通过任意的用于检测此结合的本领域已知手段来测定。优选地,特异性结合是通过 Scatchard 分析和/或竞争性结合试验来测定的。

结合片段通过重组 DNA 技术来产生,或通过完整免疫球蛋白的酶解或化学裂解来产生。结合片段包括 Fab、Fab'、 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 、Fabc、Fv、单链、以及单链抗体。不同于“双特异的”或“双功能的”免疫球蛋白或抗体、免疫球蛋白或抗体被认为具有各个同一的结合位点。“双特异的”或“双功能的抗体”是人工杂交的抗体,其具有两个不同的重/轻链对和两个不同结合位点。双特异抗体可通过不同的方法包括杂交瘤融合或 Fab'片段的连接来制备。参见,例如, Songsvilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321(1990); Kostelny 等, J. Immunol. 148, 1547-1553(1992)。

术语“人源化免疫球蛋白”或“人源化抗体”是指免疫球蛋白或抗体,其包括至少一种人源化免疫球蛋白或抗体链(即至少一种人源化轻或重链)。术语“人源化免疫球蛋白链”或“人源化抗体链”(即“人源化免疫球蛋白轻链”或“人源化免疫球蛋白重链”)是指一种免疫球蛋白或抗体链(即分别为轻链或重链)具有包括基本上来自人免疫球蛋白或抗体的构架区和互补决定区(CDR)(例如,至少一个 CDR、优选两个 CDR、更优选三个 CDR)的可变区并进一步含有恒定区(例如,在轻链的情况下,至少一个恒定区或其部分,且在重链的情况下优选三个恒定区)的恒定区,术语“人源化可变区”(例如,“人源化轻链可变区”或“人源化重链可变区”)是指包括基本上来自人免疫球蛋白或抗体的构架区和基

基本上来自非人免疫球蛋白或抗体的互补决定区(CDRs)的可变区。

短语“基本上来自人免疫球蛋白或抗体”或“基本上人”是指为比较目的比对人免疫球蛋白或抗体氨基酸序列时，区域与人的构架或恒定区序列具有至少 80-90%，优选 90-95%，更优选 95-99% 的同一性(即局部序列同一性)，例如允许保守性取代、共有序列取代、种系取代、回复突变等。保守性取代、共有序列取代、种系取代、回复突变等的导入，通常被称为人源化抗体或链的“优化”。短语“基本上来自非人免疫球蛋白或抗体”或“基本上非人”是指与非人的生物，例如非人的哺乳动物的免疫球蛋白或抗体序列具有至少 80-95%，优选 90-95%，更优选 96%、97%、98% 或 99% 的同一性。

相应地，所有的人源化免疫球蛋白或抗体或人源化免疫球蛋白或抗体链的区域或残基，除了可能的 CDR 外，基本上与相应的一个或多个天然人免疫球蛋白序列的区域或残基相同。术语“相应的区域”或“相应的残基”是指当第一和第二序列为比较目的进行最佳比对时，在第二个氨基酸或核苷酸序列上的区域或残基与在第一个氨基酸或核苷酸序列上的区域或残基占有相同的(即同等的)位置。

术语“人源化免疫球蛋白”或“人源化抗体”不想包括嵌合的免疫球蛋白或抗体，如下面所定义的。尽管人源化免疫球蛋白或抗体在其构建中是嵌合的(即包含来自不止一种蛋白质的区域)，其包括在此处所定义的嵌合免疫球蛋白或抗体中没有发现的其他特征(即含有供体 CDR 残基和受体构架残基的可变区)。

术语“显著的同源性”是指两个多肽序列，当进行最佳比对时，例如通过 GAP 或 BESTFIT 程序采用默认间隙权重，具有至少 50-60% 序列同一性，优选 60-70% 序列同一性，更优选 70-80% 序列同一性，更优选至少 80-90% 同一性，更优选至少 90-95% 同一性，以及甚至更优选至少 95% 序列同一性或更多(例如，99% 的序列同一性或更多)。术

语“基本上同一性”是指两个多肽序列，当进行最佳比对时，例如通过 GAP 或 BESTFIT 程序采用默认间隙权重，具有至少 80-90% 序列同一性，优选 90-95% 序列同一性，以及更优选至少 95% 序列同一性或更多(例如，99% 序列同一性或更多)。对于序列比较来说，通常，一个序列充当被比较的测试序列的参考序列。当使用序列比较算法时，测试序列和参考序列被输入到计算机中，如果需要，指定序列座标，以及指定序列算法程序参数。序列比较算法然后基于所设定的程序参数计算测试序列相对于参考序列的序列同一性百分比。术语“序列同一性”和“序列同一性”在此处可以互用。

序列比较的最佳比对可以通过，例如，Smith & Waterman 的局部同源性算法，*Adv. Appl. Math.* 2:482(1981)，通过 Needleman & Wunsch 的同源性排列算法，*J. Mol. Biol.* 48:443(1970)，通过 Pearson & Lipman 的相似性检索法，*Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444(1988)，通过计算机实施的这些算法(威斯康星遗传学软件包中 GAP、BESTFIT、FASTA 和 TFASTA，遗传学计算机组，575 Science Dr., Madison, WI)，或通过目测(通常参见 Ausubel 等，*Current Protocols in Molecular Biology*)来进行。一个适于确定序列同一性和序列相似性百分比的算法的实例是 BLAST 算法，其被描述在 Altschul 等，*J. Mol. Biol.* 215:403(1990)中。进行 BLAST 分析的软件可通过国家生物技术信息中心公开获得(公众可通过国家卫生研究所 NCBI 因特网服务器来获得)。通常，可以利用默认的程序参数进行序列比对，尽管也可以使用用户参数。对于氨基酸序列来说，BLASTP 程序默认码长(W)为 3，期望值(E)为 10，BLOSUM62 计分矩阵(参见 Henikoff & Henikoff，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915(1989))。

优选地，不相同的残基位置通过保守性氨基酸取代区分。为了将氨基酸取代分为保守性取代或非保守性取代，氨基酸分组如下：组 I(疏水侧链):亮氨酸、甲硫氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸;组 II(中性亲水侧链):半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸;组 III(酸性侧链):天冬氨

酸、谷氨酸;组 IV(碱性侧链):天冬酰胺、谷氨酰胺、组氨酸、赖氨酸、精氨酸;组 V(影响链方向的残基):甘氨酸、脯氨酸;和组 VI(芳香族侧链):色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸。保守替代涉及同类氨基酸之间的替代。非保守替代由一组中的一个成员变为另一组中的一个成员。

优选地,人源化免疫球蛋白或抗体结合抗原的亲合力是相应的非人抗体的 3、4 或 5 倍。例如,如果非人抗体具有 10^9 M^{-1} 的亲合力,人源化抗体则会具有至少 $3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 、 $4 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 或 10^9 M^{-1} 的结合亲合力。当描述免疫球蛋白或抗体链的结合特性时,链可被描述基于其“抗原(例如, A β)直接结合”的能力。当一条链针对完整的免疫球蛋白或抗体(或其抗原结合片段)赋予特异性结合特性或结合亲合力时,其被称为“抗原直接结合”。突变(例如,回复突变)被称为基本上影响重或轻链抗原直接结合的能力,如果其影响(例如,减小)与含有缺少所述突变的等同链的抗体(或其抗原结合片段)比较时含有至少一个数量级别的含有所述链的完整免疫球蛋白或抗体(或其抗原结合片段)的结合亲合力。突变“基本上不影响(例如,减小)链直接结合抗原的能力”,如果其影响(例如,减小)含有所述链的完整免疫球蛋白或抗体(或其抗原结合片段)的结合亲合力仅仅是含有缺少所述突变的等同链的抗体(或其抗原结合片段)的 2、3 或 4 倍。

术语“嵌合免疫球蛋白”或抗体是指免疫球蛋白或抗体其轻链和重链来自不同的种。嵌合免疫球蛋白或抗体可例如通过基因工程构建自属于不同种的免疫球蛋白基因区段。

“抗原”是一种与抗体特异性结合的物质(例如,蛋白质物质或肽)。

术语“表位”或“抗原决定簇”是指免疫球蛋白或抗体(或其抗原结合片段)特异性结合的抗原上的位点。表位可以自连续的氨基酸或非连续的氨基酸通过蛋白的三级折叠来形成。从连续的氨基酸形成的表位一般在接触变性溶剂后仍保留活性而通过三级折叠形成的表位则在变

性溶剂中失活。表位通常在单一的空间构型上包括至少 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15 个氨基酸。检测表位空间构型的方法包括, 例如, x-射线晶体照相术以及 2-维的核磁共振。参见, 例如, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, G. E. Morris 编(1996)。

识别相同表位的抗体可通过显示一个抗体阻碍另一个抗体与靶抗原结合能力的简单的免疫测定, 即竞争性结合试验来进行检测。竞争性结合通过在测免疫球蛋白抑制参照抗体特异性结合共同抗原例如 A β 的试验来测定。已知的竞争性结合试验有很多种, 例如: 固相直接或间接放射免疫测定(RIA)、固相直接或间接的酶免疫测定(EIA)、夹心竞争性试验(参见 Stahli 等, *Methods in Enzymology* 9:242(1983)); 固相直接生物素-抗生物素蛋白 EIA 法(参见 Kirkland 等, *J. Immunol.* 137:3614(1986)); 固相直接标记测定法、固相直接标记夹心测定法(参见 Harlow 和 Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press(1988)); 采用 I-125 标记的固相直接标记 RIA 法(参见 Morel 等, *Mol. Immunol.* 25(1):7(1988)); 固相直接生物素-抗生物素蛋白 EIA 法(Cheung 等, *Virology* 176:546(1990)); 以及直接标记 RIA 法(Moldenhauer 等, *Scand. J. Immunol.* 32:77(1990))。通常, 这种测定包括使用纯化抗原结合到携带未标记的测试免疫球蛋白和标记的参照免疫球蛋白之一的固体表面或细胞。竞争性抑制通过在测试免疫球蛋白的存在下测定结合到固体表面或细胞的标记量而测定。通常, 当竞争性抗体过量存在时, 其将抑制参照抗体与共同抗原特异性结合至少 50-55%、55-60%、60-65%、65-70%、70-75%或更多。

表位也被免疫学细胞例如 B 细胞和/或 T 细胞所识别。表位的细胞识别可以通过测定抗原依赖性增殖的体外试验而检测, 如通过掺入 ³H-胸苷, 通过细胞因子分泌, 通过抗体分泌, 或通过抗原-依赖性杀伤(细胞毒性 T 淋巴细胞试验)进行测定。

示例性表位或抗原决定簇可在人淀粉状前体蛋白(APP)中发现,但优选在 APP 的 A β 肽中发现。APP 存在多重同工型,例如 APP⁶⁹⁵ APP⁷⁵¹ 和 APP⁷⁷⁰。 APP 中的氨基酸依据 APP⁷⁷⁰ 同工型的序列被编号(参见,例如, GenBank 登录号 No. P05067, 也如 SEQ ID NO:38 所述)。A β (在这里也称为 β 淀粉样肽和 A- β)肽是 APP 的 39-43 个氨基酸的~4-kDa 的内部片段(A β 39、A β 40、A β 41、A β 42 和 A β 43)。A β 40, 例如, 由 APP 的第 672-711 位残基组成且 A β 42 由 APP 的第 673-713 位残基组成。通过不同分泌型酶体内或原位水解处理 APP, 结果发现 A β 有“短型”, 40 个氨基酸长, 以及“长型”, 42-43 个氨基酸长。优选的表位或抗原决定簇, 如这里所描述, 位于 A β 肽的 N-末端且包括 A β 的第 1-10 位氨基酸的残基, 优选来自 A β 42 第 1-3 位、第 1-4 位、第 1-5 位、第 1-6 位、第 1-7 位或第 3-7 位的残基。其它优选的表位或抗原决定簇包括 A β 第 2-4 位、第 5、6、7 或 8 位的残基, A β 第 3-5 位、第 6、7、8 或 9 位的残基, 或 A β 42 第 4-7 位、第 8、9 或 10 位的残基。

术语“致淀粉样疾病”包括任意与不溶解的淀粉样纤维的形成或沉积相关(或引起)的疾病。示例的致淀粉样疾病包括但不限于全身性淀粉样变性、阿耳茨海默氏病、成年糖尿病、帕金森氏病、杭廷顿氏舞蹈病、额-暂时性痴呆以及朊病毒-相关的传染性海绵状脑病(分别在人中为 kuru 和 Creutzfeldt-Jacob 疾病, 在羊和牛中为瘙痒病和 BSE)。不同的致淀粉样疾病由沉积的原纤维的多肽组分的特性所定义和表征。例如, 患有阿耳茨海默氏病、 β -淀粉样蛋白(例如, 野生型、变体或平截的 β -淀粉样蛋白)的受试者或患者具有淀粉样沉积物的多肽组分的特征。因此, 例如在受试者或患者的脑中, 阿耳茨海默氏病是一个“通过 A β 沉积物表征的疾病”或“与 A β 沉积物相关的疾病”的例子。术语“ β -淀粉状蛋白”、“ β -淀粉样肽”、“ β -淀粉样”、“A β ”和“A β 肽”在这里可以互用。

术语“有效量”或“有效剂量”定义为足以获得或至少部分获得所期望的效果的量。术语“治疗有效量”定义为足以治愈或至少部分抑制疾

病和已由该病引起的并发症的量。有效作用的量依据感染的程度以及患者本身免疫系统的基本状态。

术语“患者”包括接受预防性或治疗性治疗的人或其它哺乳动物对象。

“可溶解的”或“分离的” $A\beta$ 是指非-聚集性或解聚的 $A\beta$ 多肽。“不溶解的” $A\beta$ 是指聚集的 $A\beta$ 多肽，例如，通过非共价键连在一起的 $A\beta$ 。 $A\beta$ (例如， $A\beta_{42}$)被认为是聚集性的，至少部分是由于肽的C末端的疏水残基的存在(APP 的部分跨膜结构域)。制备可溶性 $A\beta$ 的一种方法是用超声波在纯的DMSO中溶解冷冻干燥的肽。产生的溶液被离心以去除任意不溶解的微粒。

I. 免疫和治疗剂

本发明的免疫和治疗剂含有或由这里所定义的免疫原或抗体，或功能性的或其抗原结合片段所组成。已知基本的抗体结构单位包括亚单位的四聚体。每个四聚体包含两个相同的多肽链对，每对含有一个“轻”链(约25kD)的和一个“重”链(约50-70kD)。每个链的氨基末端包括一个约100-110或更多个氨基酸的可变区，主要负责抗原识别。每个链的羧基末端限定一个主要负责效应子功能的恒定区。

轻链分为 κ 或 λ 且大约230个残基的长度。重链分为 γ (gamma)、 μ (mu)、 α (alpha)、 δ (delta)或 ϵ (epsilon)，大约450-600个残基的长度，分别把抗体的同种型定义为IgG、IgM、IgA、IgD和IgE。重链和轻链折叠成结构域。术语“结构域”是指蛋白例如免疫球蛋白或抗体的球形区域。免疫球蛋白或抗体的结构域包括，例如，通过 β 折叠和链内二硫键形成的3或4肽环。完整的轻链具有，例如，两个结构域(V_L 和 C_L)而完整的重链具有，例如4或5个结构域(V_H 、 C_{H1} 、 C_{H2} 、和 C_{H3})。

轻链和重链中约12或更多个氨基酸形成的“J”区连接可变区与

恒定区，重链还包括约 10 或更多个氨基酸形成的“D”区(通常参见，*Fundamental Immunology*(Paul, W 编，第二版，Raven Press, N.Y.(1989)，第 7 章，为了各种目的在此全文引入作为参考)。

每对轻链/重链的可变区形成抗体结合位点。因此，完整的抗体有两个结合位点。除了双功能或双特异性抗体，这两个结合位点是相同的。所有的链都显示同样的基本结构，由三个高度可变区也称为互补决定区或 CDR 所连接的相对保守的构架区。天然产生的链或重组产生的链的表达可带有在细胞加工过程中被去除而产生成熟链的前导序列。成熟的链也重组产生，具有非天然产生的前导序列，例如为增强分泌或改变特定目的链的加工。

每对两个成熟链的 CDR 通过构架区排列，使其能够与特异性表位结合。从 N 末端到 C 末端，轻链和重链包括区 FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 和 FR4。“FR4”在本领域中也称作可变重链的 D/J 区和可变轻链的 J 区。每区氨基酸的排列按照 Kabat 定义，免疫学目的蛋白序列 (Sequences of Proteins of Immunological Interest) (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 和 1991)。另一结构定义已由 Chothia 等提出，*J. Mol. Biol.* 196:901(1987); *Nature* 342:878(1989); 以及 *J. Mol. Biol.* 186:651(1989)(此后共同简称为“Chothia 等”，为了各种目的在此全文引入作为参考)。

A. A β 抗体

本发明的治疗剂包括与 A β 或淀粉斑的其它组分特异性结合的抗体。此种抗体可以是单克隆或多克隆的。其中有些抗体特异性结合 A β 的聚集形式而不结合可溶形式。一些特异性结合可溶形式而不结合聚集形式。还有一些与聚集和可溶形式均结合。一些这样的抗体结合 A β 天然产生的短型(即 A β 39、40 或 41)而不结合 A β 天然产生的长型(即 A β 42 和 A β 43)。一些抗体体结合 A β 长型而不结合短型。一些抗体结合 A β 而不结合全长的淀粉样前体蛋白。在治疗方法中使用的抗体优选具

有一个完整的恒定区或至少足以与 Fc 受体相互作用的恒定区。人同种型 IgG1 是优选的, 因为其对吞噬细胞上的 FcRI 受体具有最高亲合力的人同种型。双特异性 Fab 片段也可以采用, 其中抗体的一个臂对 A β 具有特异性, 另一个臂对 Fc 受体具有特异性。优选的抗体结合 A β 的结合亲合力大于(或等于)大约 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 或 10^{10} M^{-1} (包括这些值的中间的数值)。

多克隆血清通常含有沿着 A β 长度与若干表位结合的抗体的混合群。然而, 多克隆血清可特异于 A β 的特殊区段, 例如 A β 1-10。单克隆抗体与 A β 内的特异表位结合, 其可以是构象或非构象的表位。抗体的预防和治疗效用可通过实施例中所描述的转基因动物模型法来测定。优选的单克隆抗体结合于 A β 第 1-10 位残基中的表位(天然 A β 的第一个 N 末端残基编号为 1)。一些优选的单克隆抗体结合于第 1-5 位氨基酸的表位, 而一些结合于第 5-10 位氨基酸的表位。一些优选的抗体结合于第 1-3 位、第 1-4 位、第 1-5 位、第 1-6 位、第 1-7 位或第 3-7 位氨基酸的表位。一些优选的抗体结合于从 A β 第 1-3 位残基开始至第 7-11 位残基终止的表位。较不优选的抗体包括那些结合于 A β 第 10-15 位、第 15-20 位、第 25-30 位、第 10-20 位、第 20、30 位或第 10-25 位残基的表位的抗体。建议这种抗体在使用前利用实施例中所描述的小鼠模型筛选其活性。例如人们已经发现特定结合第 10-18 位、第 16-24 位、第 18-21 位和第 33-42 位残基的表位的抗体缺少活性(例如, 缺少减少斑沉积和/或消除与阿耳茨海默氏病相关的神经炎性病症的能力)。在一些方法中, 采用具有结合不同表位的特异性的多单克隆抗体。此种抗体可按序或同时给药。对除 A β 外的其它淀粉样组分的抗体也可采用(例如, 给药或辅助给药)。例如, 抗体可针对淀粉样相关的蛋白共核蛋白 (Synuclein)。

当一种抗体据说结合于指定残基中的表位, 例如 A β 1-5 时, 意指其特异性结合含有指定残基的多肽(即本实施例中的 A β 1-5)。此种抗体不必要接触 A β 1-5 中的所有残基。也并非 A β 1-5 中的每一个氨基酸取

代或缺失都必然显著影响结合亲和力。抗体的表位特异性可被检测，例如通过形成噬菌体展示文库，其中不同的成员显示不同的 A β 的亚序列。然后在噬菌体展示文库筛选其特异性结合在测抗体的成员。分离序列家族。通常，此族包括一个共有的核心序列，以及在不同成员中侧接序列的长度发生变化。显示与抗体特异性结合的最短的核心序列限定了通过抗体结合的表位。抗体也可用来与其表位特异性已被测定的抗体一起在竞争性试验中测定其表位特异性。例如，与 3D6 抗体竞争结合 A β 的抗体结合到与 3D6 相同或相似的表位即 A β 1-5 的残基中。同样，与 10D5 抗体竞争的抗体结合到相同或相似的表位即 A β 3-7 的残基中。筛选表位特异性的抗体对治疗效力的预知是有用的。例如，一个确定结合到 A β 第 1-7 位残基的表位的抗体可能在本发明预防和治疗阿耳茨海默氏病的方法中是有效的。

特异性的结合于优选的 A β 区段而不结合 A β 的其它区域的单克隆或多克隆抗体相对于结合其它区域的单克隆抗体或结合完整 A β 的多克隆血清具有大量的优点。首先，对于相等的重量剂量来说，特异性结合优选区段的抗体的剂量含有在清除淀粉样斑中有效的抗体的较高克分子剂量。第二，特异性结合优选区段的抗体可诱导抗淀粉样沉积物的清除反应而不诱导抗完整 APP 多肽的清除反应，从而减少可能的副作用。

1. 非人抗体的制备

本发明提供了非人抗体，例如，对本发明的优选的 A β 表位具有特异性的抗体。此种抗体可被用于配制本发明的各种治疗组合物，或优选地，提供用于人源化或嵌合抗体生产的互补决定区(具体描述在下文)。非人单克隆抗体，例如鼠科动物、豚鼠、灵长类动物、兔或大鼠可以通过例如用 A β 免疫动物来制备。也可以使用含有 A β 、A β 的免疫原性片段或 A β 抗体的抗-独特型抗体的更长多肽链。参见 Harlow & Lane, 同上(为各种目的全文引入作为参考)。这样一种免疫原可以从天然来源获得、通过肽合成或者通过重组表达获得。可选择地，如以下

所述，免疫原可以融合载体蛋白或与其复合给药。可选择地，免疫原可以结合佐剂给药。术语"佐剂"是指一种化合物当与抗原联合给药时增强对抗原的免疫应答，但当单独给药时不产生对抗原的免疫应答。佐剂可以增强免疫应答，其机制包括淋巴细胞募集、刺激 B 和/或 T 细胞以及刺激巨噬细胞。如下文所述，可以使用若干佐剂。完全弗氏佐剂和不完全佐剂的依次使用对于实验动物的免疫是优选的。

兔或豚鼠通常用于制备多克隆抗体。制备多克隆抗体的示例，例如，用于被动保护，可如下所述来进行。125 个非-转基因小鼠用 100 μg 的 A β 1-42 加上 CFA/IFA 佐剂致免疫，并在 4-5 月时安乐死。从免疫的小鼠中收集血液。IgG 分离自其它的血液组分。对免疫原特异的抗体可通过亲和层析部分纯化。每个小鼠获得平均约 0.5-1 mg 免疫原特异的抗体，总共获得 60-120 mg。

小鼠通常用于制备单克隆抗体。抗片段的单克隆的制备方法是注射长型的 A β 或其片段到小鼠中，制备杂交瘤和筛选特异性结合 A β 的抗体的杂交瘤。可选择地，筛选结合 A β 的特异区域或所需片段而不结合 A β 的其它非重叠片段的抗体。通过确定抗体与 A β 肽的缺失突变体的集合，并测定哪些缺失突变体与抗体结合，从而完成后者的筛选。可以通过如 Western 印迹和 ELISA 的方法评估结合作用。显示特异性结合抗体的最小片段限定了该抗体的表位。可选择地，表位的特异性可以通过其中测试和参照抗体对 A β 的竞争结合的竞争试验来进行确定。如果测试抗体与参照抗体竞争，则它们结合相同表位或足够接近的表位，以至一个抗体的结合干扰了另一个抗体的结合。这些抗体的优选同种型是小鼠同种型 IgG2a 或其它物种中的等同的同种型。小鼠同种型 IgG2a 与人同种型 IgG1 等同。

2. 嵌合和人源化抗体

本发明也提供了对 β 淀粉样肽特异的嵌合和/或人源化抗体(即嵌合和/或人源化免疫球蛋白)。嵌合和/或人源化抗体具有与提供构建该嵌

合或人源化抗体的初始材料的小鼠或其它非人抗体有相同或相似的结合特异性和亲合力。

A.嵌合抗体的制备

术语“嵌合抗体”是指其轻链和重链基因通常通过基因工程从属于不同物种的免疫球蛋白基因区段已被构建的抗体。例如，小鼠单克隆抗体基因的可变区（V）区段可能结合人恒定（C）区段如 IgG1 和 IgG4。优选人同种型 IgG1。因此，典型的嵌合抗体是由小鼠抗体 V 或抗原结合结构域和人抗体的 C 或效应子结构域的杂种蛋白。

B.人源化抗体的制备

术语“人源化抗体”是指一种抗体其包括至少一个含有基本上来自人抗体链(称为受体免疫球蛋白或抗体)的可变区构架残基的链以及至少一个基本上来自小鼠抗体的互补决定区(称为供体免疫球蛋白或抗体)。参见, Queen 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029-10033(1989)、US5,530,101、US5,585,089、US5,693,761、US5,693,762、Selick 等, WO 90/07861, 以及 Winter, US5,225,539(全文引入作为参考)。恒定区, 如果存在, 也基本上或整个来自人免疫球蛋白。

小鼠 CDR 在人可变区构架中的取代最可能导致保留其正确的空间取向, 如果人可变区构架与其 CDR 源自的小鼠可变构架采用相同或相似的构象。此可以通过从构架序列显示与其 CDR 来源的鼠科动物可变构架区有高度的序列同一性的人抗体中获得人可变区来完成。轻链和重链可变构架区可衍生自相同的或不同的人抗体序列。人抗体序列可以是天然产生的人抗体序列或可以是几种人抗体的共有序列。参见 Kettleborough 等, Protein Engineering 4:773(1991); Kolbinger 等, Protein Engineering 6:971(1993)以及 Carter 等, WO 92/22653。

在鉴定鼠供体免疫球蛋白和适当的人受体免疫球蛋白的互补决定区后, 接下来是确定, 如果有, 是哪些来自组分的残基应被取代以优

化产生的人源化抗体的特性。通常，用鼠氨基酸取代人氨基酸残基应最小化，因为鼠残基的导入增加了抗体激发人体的人-抗-小鼠-抗体(HAMA)反应的危险。本领域公认的检测免疫应答的方法可用来控制特定患者或在临床试验中的 HAMA 反应。给药人源化抗体的患者在进行所述治疗的开始和自始至终进行免疫原性评估。利用本领域公知的方法，包括表面胞质共振技术(BIACORE)和/或固相 ELISA 分析，例如通过测定在患者血清样品中对人源化治疗剂的抗体，来测定 HAMA 反应。

来自人可变区构架残基的特定氨基酸基于其对 CDR 构象和/或结合抗原的可能影响进行筛选取代。鼠 CDR 区与人可变构架区的非天然并列可产生非天然的构象抑制，除非通过特定氨基酸残基的取代来修正，否则会导致结合亲和力的丧失。

筛选用于取代的氨基酸残基部分是通过计算机模型来测定。计算机硬件和软件在此描述用于产生免疫球蛋白分子的三维图像。通常，分子模型产生自免疫球蛋白链或其结构域的解开结构。将待建模型的链与解开三维结构的链或结构域进行氨基酸序列相似性比较，且显示出最大序列相似性的链或结构域被选为分子模型构建的起始点。显示至少 50% 序列同一性的链或结构域被选择用于分子模型的构建，且优选至少 60%、70%、80%、90%或更多的序列同一性的那些链或结构域被选择用于建模。解开的起始结构经修饰允许正在建模的免疫球蛋白链或结构域的实际氨基酸和起始结构间的差别。然后把修饰的结构装配到合成的免疫球蛋白中。最后，通过能量最小化以及通过核实所有的原子相互之间都在适当的距离内以及键长和角度在化学上可接受的限度内，使模型改进。

用于取代的氨基酸残基的选择也可部分通过测定在特定位置的氨基酸的特性，或跟据经验观察特定氨基酸取代或诱变的效果来确定。例如，当鼠可变区构架残基和所选择的人可变区构架残基之间不同时，人构架氨基酸通常应被来自小鼠抗体中等同的构架氨基酸取代，当合

理地预期该氨基酸：

- (1) 直接非共价结合抗原，
- (2) 与 CDR 区相邻，
- (3) 或者与 CDR 区相互作用(例如，通过计算机模型测定在 CDR 区的约 3-6 Å 内)，或
- (4) 参与 VL-VH 界面。

“直接非共价结合抗原”残基包括在构架区的适当位置的氨基酸，通过建立的化学力，例如通过氢键、范德华力、疏水作用等，具有与抗原上的氨基酸直接相互作用的较好概率。

CDR 和构架区由 Kabat 等或 Chothia 等，同上所定义。当构架残基，如由 Kabat 等，同上所定义，构成结构环残基，如由 Chothia 等，同上所定义时，在小鼠抗体中存在的氨基酸可选择来取代至人源化抗体中。“与 CDR 区相邻”的残基包括在紧邻一个或多个个人源化免疫球蛋白链的一级序列中的 CDR 位置上的氨基酸残基，例如在紧邻由 Kabat 所限定的 CDR 或由 Chothia 所限定的 CDR 的位置上的氨基酸残基(参见，例如，Chothia 和 Lesk JMB 196:901(1987))。这些氨基酸特别可能与 CDR 中的氨基酸相互作用，并且如果选自于受体，则特别可能使供体 CDR 变形和降低亲合力。此外，相邻氨基酸可与抗原直接相互作用(Amit 等，Science, 233:747(1986)，在此引入作为参考)且筛选这些来自供体的氨基酸可能理想地保持所有的抗原接触，提供在原始抗体中的亲合力。

“或者与 CDR 区相互作用”的残基包括那些通过二级结构分析而测定在空间方向足以影响 CDR 区的残基。在一个实施方案中，“或者与 CDR 区相互作用”的残基通过分析供体免疫球蛋白的三维模型而测定(例如，计算机产生的模型)。一种通常是原始供体模型的三维模型显示 CDR 外的特定氨基酸临近于 CDR，并具有通过氢键、范德华力、疏水作用等与 CDR 中的氨基酸相互作用的良好概率。在这些氨基酸位置，

选择供体免疫球蛋白氨基酸而非受体免疫球蛋白氨基酸。与此标准相符的氨基酸通常具有在 CDR 某个原子的约 3 埃单位(\AA)内的侧链原子且必须含有一个能够通过建立的化学力,例如上述所列举,与 CDR 原子相互作用的原子。

在原子可以形成氢键的情况下,测定它们原子核之间的距离为 3 \AA , 但不形成键的原子, 3 \AA 测定在其范德华表面之间。因此,在后一种情况下,原子核心必须在大约 6 \AA (3 \AA 加总范德华半径)内原子才被认为是能够相互作用的。在一些情况下原子核距离 4 或 5 到 6 \AA 。在测定氨基酸能否与 CDR 相互作用, 优选不考虑作为 CDR 部分的重链 CDR2 的最后 8 个氨基酸, 因为从结构的观点来看, 这 8 个氨基酸更多地充当构架的一部分。

能够与 CDR 中的氨基酸相互作用的氨基酸也可以通过其它的方式测定。每一构架氨基酸的溶剂可到达的表面面积以两种方式计算:(1)在完整抗体中, 以及(2)在由去除 CDR 的抗体组成的假定分子中。在这些大约 10 平方埃或更多的数之间的差异显示构架氨基酸接近溶剂至少部分被 CDR 阻断, 且因此氨基酸与 CDR 接触。氨基酸的溶剂可进入的表面面积可以基于抗体的三维模型, 利用本领域公知的算法计算(例如, Connolly, *J. Appl. Cryst.* 16:548(1983)以及 Lee 和 Richards, *J. Mol. Biol.* 55:379(1971), 二者均被引入作为参考)。通过影响另一个依次接触 CDRs 的构架氨基酸的构象, 构架氨基酸偶而也与 CDR 直接作用。

在构架的一些位置的氨基酸已知能够与很多抗体的 CDR 相互作用(Chothia 和 Lesk, 同上, Chothia 等, 同上, 以及 Tramontano 等, *J. Mol. Biol.* 215:175(1990), 所有文献均在此引入作为参考)。显著的是在轻链的位置 2、48、64 和 71 和重链的位置 26-30、71 和 94(编号方式符合于 Kabat)的氨基酸已知能够与很多抗体中的 CDR 相互作用。轻链位置 35 以及重链位置 93 和 103 的氨基酸也可能与 CDR 相互作用。在所有的这些编号位置, 在人源化免疫球蛋白中选择供体氨基酸

而非受体氨基酸(当不同时)是优选的。在其它方面,特定的残基能够与 CDR 区相互作用,例如轻链的头 5 个氨基酸,有时可选自受体免疫球蛋白而不会损失人源化免疫球蛋白中的亲合力。

“参与 VL-VH 界面”的残基或“包装残基”包括那些在 VL 和 VH 之间界面上的残基,如被 Novotny 和 Haber, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:4592-66(1985)或 Chothia 等,同上所定义。通常,如果不常见的包装残基是不同于人构架中的那些,它们应保留在人源化抗体中。

一般而言,符合上述条件的一个或多个氨基酸被取代。在一些实施方案中,所有或大部分的符合上述条件的氨基酸被取代。有时候,一个特定的氨基酸是否符合上述条件很含糊,且可选择的变体免疫球蛋白被制备,其中的一个具有特定的取代,而其它的没有。如此产生的可选择的变体免疫球蛋白采用这里所描述的任何测定方法对其期望的活性进行检测,且挑出优选的免疫球蛋白。

通常人源化抗体的 CDR 区基本上是相同的,且更通常,与供体抗体的相应 CDR 区相同。尽管不是通常所期望的,有时候可能进行 CDR 残基的保守氨基酸取代而不明显影响产生的人源化免疫球蛋白的结合亲合力。保守性氨基酸取代是指组合例如甘氨酸、丙氨酸;缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸;天冬氨酸、谷氨酸;天冬酰胺、谷氨酰胺;丝氨酸、苏氨酸;赖氨酸、精氨酸;和苯丙氨酸、酪氨酸。

其它的候选取代为受体人构架氨基酸,其对于人免疫球蛋白的该位置来讲是不寻常或“稀有”的。这些氨基酸可用来自小鼠供体抗体的等同位置的或来自更通常人免疫球蛋白的等同位置的氨基酸取代。例如,当在受体免疫球蛋白的人构架区的氨基酸对于该位置是稀少的并且相应的在供体免疫球蛋白的氨基酸对于人免疫球蛋白序列的该位置是普通的情况时,或当受体免疫球蛋白的氨基酸对该位置是稀少的并且相应的供体免疫球蛋白的氨基酸相对于其它的人序列也是稀少的

时候，取代应是可期望的。这些标准有助于确保人构架中的非典型氨基酸不破坏抗体的结构。此外，通过用来自供体抗体的对人抗体碰巧是常见的氨基酸替换不常见的人受体氨基酸，人源化抗体可以产生较少的免疫原性。

此处所用的术语“稀有”是指一个在该位置处出现的氨基酸在序列的代表性样本中占少于序列的约 20%但通常少于序列的约 10%，且此处所用的术语“普通的”是指在该位置处出现的氨基酸在序列的代表性样本中占多于序列的约 25%但通常超过序列的约 50%。例如，所有的人轻链和重链可变区序列分别被归类到序列“亚组”中，其彼此尤其同源且在特定的关键位置具有相同的氨基酸(Kabat 等，同上)。当判定人受体序列中的氨基酸在人序列中是“稀有”还是“普通的”时，通常优选仅考虑那些与受体序列在相同亚组中的人序列。

其它的取代候选为受体构架氨基酸，其在可选择的定义下被鉴定为 CDR 区的一部分，所述定义由 Chothia 等提出，同上。其它的取代候选为受体人构架氨基酸，其在 AbM 和/或接触定义下被鉴定为 CDR 区的一部分。尤其是，在可变重链中的 CDR1 被定义包括第 26-32 位的残基。

其它的取代候选为对应于稀有或非常见的供体构架残基的受体构架残基。稀有或非常见的供体构架残基是那些对鼠抗体而言在该位置为稀有的或非常见的。对于鼠抗体而言，亚组根据 Kabat 和经鉴定区别于共有序列的残基位置来确定。这些供体特异性差异可指向增强活性的鼠序列中的体细胞突变。预计影响结合的非常见残基被保留，而预计对结合不重要的残基被取代。

其它的取代候选为在受体构架区中出现的非种系残基。例如，当受体抗体链(即人抗体链与供体抗体链具有显著的序列同一性)与种系抗体链(同样与抗体链具有显著的序列同一性)比对时，在受体链构架和

种系链构架之间不匹配的残基可用相应的来自种系序列的残基取代。

除了上面所讨论的特定氨基酸取代之外，人源化免疫球蛋白的构架区通常基本上相同，且更通常与它们所衍生的人抗体的构架区相同。当然，很多构架区中的氨基酸对抗体的特异性或亲合力有较少的或没有直接的帮助。因此，许多单独的构架残基的保守性取代可以容许而无需明显改变产生的人源化免疫球蛋白的特异性或亲合力。因此，在一个实施方案中，人源化免疫球蛋白的可变构架区与人可变构架区序列或此序列的共有序列有至少 85% 的序列同一性。在另一个实施方案中，人源化免疫球蛋白的可变构架区与人可变构架区序列或此序列的共有序列有至少 90%，优选 95%，更优选 96%、97%、98%或 99% 的序列同一性。然而，通常这种取代是未期望的。

人源化抗体优选显示对抗原有至少 10^7 、 10^8 、 10^9 或 10^{10} M^{-1} 的特定结合亲合力。通常人源化抗体对抗原的结合亲合力的上限在供体免疫球蛋白的 3、4 或 5 倍之内。通常结合亲合力的下限也在供体免疫球蛋白的 3、4 或 5 倍之中。可选择地，结合亲合力可与没有取代的人源化抗体的相比较(例如，具有供体 CDR 和受体 FR，但没有 FR 取代的抗体)。在这种情况下，最优化的抗体(带有取代)的结合是优选至少二-到三倍大于，或三-到四-倍大于未取代的抗体的结合。为了进行比较，不同抗体的活性可通过例如 BIACORE(即使用未标记的试剂的表面胞质团共振)或竞争性结合试验来确定。

C.人源化 3D6 抗体的制备

本发明的一个优选的实施方案提供了一种针对 A β 的 N 末端的人源化抗体特别用于此处所述的治疗和/或诊断的方法中。一个特定的优选的用于人源化抗体生产的起始材料是 3D6。3D6 对 A β 的 N 末端是特异性的且已显示介导淀粉斑的吞噬作用(例如，诱导吞噬作用)(参见实施例 I-V)。编码 3D6 抗体重链和轻链可变区的 cDNA 的克隆和测序描述在实施例 VI 中。

合适的人受体抗体序列通过计算机比较小鼠可变区的氨基酸与已知人抗体的序列得到鉴定。重链和轻链的比较分别进行，但原理是相似的。具体地，来自其构架序列显示与鼠 VL 和 VH 构架区高度序列同一性的人抗体的可变区的鉴定可通过 Kabat 数据库利用 NCBI BLAST(公众通过国家卫生研究所 NCBI 因特网服务器来获得)与各自的鼠构架序列进行同一性检索。在一个实施方案中，选择与鼠供体序列有大于 50% 序列同一性的受体序列。优选地，选择有 60%、70%、80%、90% 或更多的序列同一性的受体抗体序列。

3D6 计算机比较显示 3D6 轻链与亚型 κ II 的人轻链有最大的序列同一性，且 3D6 重链与亚型 κ III 的人重链有最大的序列同一性，如 Kabat 等所定义的，同上。因此，轻链和重链人构架区优选来自这些亚型的人抗体，或来自此亚型的共有序列。与相应的来自 3D6 的区域有最大的序列同一性的优选的轻链人可变区是来自具有 Kabat ID NO. 019230、005131、005058、005057、005059、U21040 和 U41645 的抗体，其中 019230 是较优选的。与相应的来自 3D6 的区域有最大序列同一性的优选的重链人可变区是来自 Kabat ID NO. 045919、000459、000553、000386 和 M23691 的抗体，其中 045919 是较优选的。

接下来如下筛选残基用于取代。当氨基酸在 3D6 可变构架区和等同的人可变构架区之间有差别时，人构架氨基酸通常应被等同的小鼠氨基酸取代，如果合理地预期该氨基酸：

- (1) 非共价直接结合抗原，
- (2) 与一个 CDR 区相邻，在由 Chothia 等，同上提出的可选择定义下是 CDR 区的一部分，或者另与一个 CDR 区相互作用(例如，CDR 区的约 3A 内)(例如，在 3D6 的 L2、H49 和 H94 位置上的氨基酸)，或
- (3) 参与 VL-VH 界面(例如，氨基酸在 3D6 的 L36、L46 和 H93 位置上的氨基酸)。

3D6 抗体重链和轻链可变区以及 3D6 抗体的人源化的计算机模拟描述在实施例 VII 中。简单地说，三维模型的生成是基于重链和轻链的最接近解开的鼠抗体结构。为此目的，命名为 1CR9(蛋白质数据库(PDB)ID: 1CR9, Kanyo 等, J. Mol. Biol. 293:855(1999))的抗体被选作模拟 3D6 轻链的模板，而命名为 1OPG(PDB ID: 1OPG, Kodandapani 等, J. Biol. Chem. 270:2268(1995))的抗体被选作模拟 3D6 重链的模板。模型通过一系列的能量最小化步骤来解除不期望的原子接触以及优化静电的和范德华相互作用而进一步被改进。1qkz 的解开结构(PDB ID: 1QKZ, Derrick 等, J. Mol. Biol. 293:81(1999))被选作模拟重链如 3D6 的 CDR3 的模板，因为 3D6 和 1OPG 在此区域中当用于比较目的进行比对时不显示显著的序列同源性。

此处所述的抗体的三维结构信息是公众可获得的，例如从生物结构信息学研究协作体的蛋白质数据库（Research Collaboratory for Structural Bioinformatics' Protein Data Bank）(PDB)。PDB 是通过万维网免费进入的且由 Berman 等(2000)*Nucleic Acids Research*, 28:235 描述。计算机模型化允许 CDR-相互作用残基的测定。3D6 结构的计算机模型可依次作为起始点，用于预测含有取代在人构架结构中的 3D6 互补决定区的抗体的三维结构。其它的模型可被构建，表示结构中导入进一步的氨基酸取代。

通常，满足上述条件的一个、大多数或所有的氨基酸的取代是所期望的。因此，本发明的人源化抗体通常会含有人轻链构架残基用相应的 3D6 残基在下述位置的至少 1、2 或 3 以及更通常 4 个位置上进行取代：L1、L2、L36 和 L46。人源化抗体也通常含有人重链构架残基用相应的 3D6 残基在下述位置的至少 1、2 以及有时 3 个位置上进行取代：H49、H93 和 H94。人源化抗体也可含有人重链构架残基用相应的种系残基在下述位置的至少 1、2 以及有时 3 个位置上进行取代：H74、H77 和 H89。

然而有时候，一个特定的氨基酸是否符合上述条件很含糊，且产生可选择的变体免疫球蛋白，其中的一个具有特定的取代，而其它的没有。在其中用鼠残基的取代将导入在人免疫球蛋白的特定位置是稀有的残基的情况下，理想的是对带有或不带有取代的抗体的活性进行检测。如果带有或不带有取代的抗体的活性(例如，结合亲合力和/或结合特异性)大约相同，没有取代的抗体则是优选的，因为这将预计引起HAHA 应答的减少，如本文所述。

其它的取代候选为受体人构架氨基酸，其在人免疫球蛋白的该位置上是非常见的。这些氨基酸可用来自更平常的人免疫球蛋白的等同位置的氨基酸进行取代。可选择地，当此种氨基酸在人免疫球蛋白的位置是特有的时，来自小鼠 3D6 的等同位置的氨基酸可被导入到人构架区。

在其它的实施方案中，当人轻链构架受体免疫球蛋白为 Kabat ID NO 019230 时，轻链含有在下列位置的至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 或更通常 13 个取代: L7、L10、L12、L15、L17、L39、L45、L63、L78、L83、L85、L100 或 L104。在其它的实施方案中，当人重链构架受体免疫球蛋白为 Kabat ID NO.045919 时，重链含有在下列位置的至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、或更通常 15 个取代: H3、H5、H13、H16、H19、H40、H41、H42、H44、H72、H77、H82A、H83、H84 或 H108。这些位置用来自具有更典型氨基酸残基的人免疫球蛋白的等同位置的氨基酸进行取代。适当的氨基酸取代的实例显示于图 1 和 2。

其它的取代候选为构架区中的非-种系残基。3D6 与已知的种系序列的计算机比较表明显示最大程度的序列同一性的重链序列包括种系可变区序列 VH3-48、VH3-23、VH3-7、VH3-21 和 VH3-11，其中 VH3-23 为较优选的。Kabat ID 045919 与 VH3-23 的序列比对表明残基 H74、H77 和/或 H89 可选择用相应的种系残基取代(例如，残基 H74、H77

和/或 H89，当比较 Kabat ID 045919 和 VH3-23 时)。同样，与 3D6 轻链有最大程度序列同一性的种系序列包括 A1、A17、A18、A2 和 A19，其中 A19 是最优选的。在所选择的轻链受体构架和其中一个种系序列之间没有匹配的残基可选择用相应的种系残基来取代。

表 1 总结了 3D6 VH 和 VL 区的序列分析。其它的可以用于 3D6 抗体和其它的人抗体的计算机建模的小鼠和人结构与用于筛选氨基酸取代的种系序列一样被充分阐述。稀有的小鼠残基也列在表 1 中。稀有小鼠残基的鉴定方法是比较供体 VL 和/或 VH 序列与其它的供体 VL 和/或 VH 序列所属的亚组的成员的序列并鉴定其不同于共有序列的残基位置。这些供体的特异差异可指向增强活性的体细胞突变。接近于结合位点的不常见或稀有的残基可能接触抗原，使其理想地保留小鼠残基。然而，如果不常见的小鼠残基对于结合是不重要的，相应的受体残基的采用是优选的，因为小鼠残基可以在人源化抗体中产生免疫原性的新表位。如果在供体序列中的不常见残基在相应的受体序列中实际上是一个普通残基，则优选的残基毫无疑问是受体残基。

表 1: 3D6 V-区序列的概况

链	重链	轻链
小鼠亚组(Kabat seq ID#)	IIID(002688)	II(005840-005844、005851-005853、005857、005863)
小鼠同源物(Kabat/Genbank)	002727/163.1'CL 002711/H35-C6'CL 002733/8-1-12-5-3-1(A2-1)'CL 002715/ASWA2'CL 020669/#14'CL	005840/1210.7 005843/42.4b.12.2'CL 005842/BXW-14'CL 005841/42.7B3.2'CL 005851/36-60CRI-
稀有氨基酸(在种类中出现的频率%)	N40(0.233%) D42(0.699%)	Y1(.035%) I15(3.3%) D27(0.867%)-CDR1 I78(0.677%) L85(0.625%) W89(0.815%)-CDR3 K106A(0.295%)
人亚组	III(000488-000491、000503、000624)	II(005046)
Chothia 规范 CDR 分组 [pdb 实例]	H1: 1 型 [2fbj] H2: 3 型[1igc]	L1:4 型 [1rmf] L2:1 型[1lmk] L3:1 型[1tet]
最接近的解开小鼠结构	PDB ID: 1OPG Kodandapani 等, 同上;(72% 2Å)	PDB ID: 1CR9; Kanyo 等, 同上;(94%, 2Å) PDB ID: 1NLD; Davies 等, Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallog. 53:186(1997); (98%, 2.8Å)
最接近的解开人结构	1VH(68%, nmr) 443560(65%, IgG, λ 骨髓瘤, 1.8Å) KOL/2FB4H(60%, 骨髓瘤, 3Å)	1LVE(57%, LEN) 1B6DA(54%, B-J 二聚体, 2.8Å); 1VGEL(54%, 自身 Ab)
种系查询(Hu)结果(top 4)	VH3-48(4512283/BAA75032.1) VH3-23(4512287/BAA75046.1) VH3-7(4512300/BAA75056.1) VH3-21(4512287/BAA75047.1) VH3-11(4152300/BAA75053.1)	A1(x63402) A17(x63403) A18(X63396) A2(m31952) A19(x63397)

*来自相同抗体的重链和轻链(O-81, Hirabayashi 等, NAR 20:2601).

这里所指的 **Kabat ID** 序列是公众可获得的，例如，获自西北大学生物医学工程系(Northwestern University Biomedical Engineering Department)的免疫学目的蛋白序列的 **Kabat** 数据库。此处所述的抗体的三维结构信息是公众可获得的，例如，获自生物结构信息学研究协作体的蛋白质数据库(PDB)。PDB 是通过万维网免费进入的且描述在 **Berman** 等，(2000)*Nucleic Acids Research*，第 235-242 页。此处所述的种系基因序列是公众可获得的，例如，获自收集了 **Igh**、**Ig κ** 和 **Ig λ** 种系 **V** 基因的序列的国家生物技术信息中心(NCBI)数据库(作为在国家卫生研究所(NIH)的国家医学图书馆(NLM)的分支机构)。NCBI “Ig 种系基因” 数据库的同源性检索由 **IgG BLAST™** 所提供。

在一个优选的实施方案中，本发明的人源化抗体含有(i)包括含有鼠 **3D6 VL CDR** 和人受体构架的可变区的轻链，其中构架具有至少一个，优选两个、三个或四个选自 **L1**、**L2**、**L36** 和 **L46** 用相应的 **3D6** 残基取代的残基，以及(ii)含有 **3D6 VH CDR** 和人受体构架的重链，其中构架具有至少一个，优选两个或三个选自 **H49**、**H93** 和 **H94** 用相应的 **3D6** 残基取代的残基，以及可优选地，至少一个，优选两个或三个选自 **H74**、**H77** 和 **H89** 用相应的人种系残基取代的残基。

在另一个优选的实施方案中，本发明的人源化抗体含有(i)包括含有鼠 **3D6 VL CDR** 和人受体构架的可变区的轻链，其中构架具有用酪氨酸(**Y**)取代的残基 **1**，用缬氨酸(**V**)取代的残基 **2**，用亮氨酸(**L**)取代的残基 **36** 和/或用精氨酸(**R**)取代的残基 **46**，和(ii)包括 **3D6 VH CDR** 和人受体构架的重链，其中构架具有用丙氨酸(**A**)取代的残基 **49**，用缬氨酸(**V**)取代的残基 **93** 和/或用精氨酸(**R**)取代的残基 **94**，以及可优选地，具有用丝氨酸(**S**)取代的残基 **74**，用苏氨酸(**T**)取代的残基 **77** 和/或用缬氨酸(**V**)取代的残基 **89**。

在一个特别优选的实施方案中，本发明的人源化抗体具有此处所描述的结构特征，且进一步具有至少一个(优选两个、三个、四个或全

部)下述的活性(1)结合聚集的 A β 1-42(例如,通过 ELISA 测定);(2)结合斑中的 A β (例如,AD 和/或 PDAPP 斑的染色);(3)结合与嵌合 3D6 相比较具有两倍到三倍的结合亲合力的 A β (例如,具有鼠 CDR 和人受体 FR 的 3D6);(4)介导 A β 的吞噬作用(例如,在离体吞噬作用测定中,如这里所述);以及(5)通过血脑屏障(例如,证明短期的脑定位作用,例如在 PDAPP 动物模型中,如这里所述)。

在另一个实施方案中,本发明的人源化抗体具有此处所述的结构特征,以一种方式或足以激发至少一种下述体内影响的亲合力结合 A β :(1)减少 A β 斑沉积;(2)预防斑形成;(3)降低可溶性 A β 的水平;(4)减少与致淀粉样疾病相关的神经炎性病症;(5)减少或改善至少一种与致淀粉样疾病相关的生理症状;和/或(6)提高认知功能。

在另一个实施方案中,本发明人源化抗体具有此处所述的结构特征,并且特异性结合于含有 A β 第 1-5 位或第 3-7 位残基的抗原决定簇。

3. 人抗体

抗 A β 人抗体通过以下所述的多种技术提供。一些人抗体通过竞争性结合实验选择,或相反具有与特定的小鼠抗体相同的表位特异性,例如在这里所述的小鼠单克隆抗体之一。人抗体也可以通过仅用 A β 的片段作为免疫原,和/或通过筛选抗 A β 缺失突变体集合的抗体,对特定表位特异性进行筛选。人抗体优选具有人 IgG1 同种型特异性。

a. 三杂交瘤(trioma)法

Oestberg 等, Hybridoma 2:361(1983), 美国专利 No. 4,634,664; 以及 Engleman 等, 美国专利 4,634,666(为所有目的分别在此引入作为参考)描述了基本方法和该方法中作为范例的细胞融合组分 SPAZ-4。由于抗体产生细胞系来自三个细胞:两个人细胞和一个小鼠细胞,这种获得抗体产生细胞系的方法称为三杂交瘤法。首先,将小鼠骨髓瘤细胞系与人 B 淋巴细胞融合,得到非抗体产生的异种杂交细胞,如 Oestberg

同上所述的 SPAZ-4 细胞系。接着使该异种细胞与免疫化的人 B 淋巴细胞融合，获得抗体产生的三杂交瘤细胞系。发现三杂交瘤比来自人细胞的普通杂交瘤细胞有更稳定的抗体生产。

免疫化的 B 淋巴细胞从人供体的血液、脾脏、淋巴结或骨髓中获得。如果期望抗体抗特异抗原或表位，优选使用该抗原或其表位免疫。免疫可以是体外或体内。对于体内免疫，B 细胞通常从用 A β 、其片段，带有 A β 或其片段的更大的多肽或 A β 抗体的抗-独特型抗体免疫的人中获得。在一些方法中，B 细胞来自最终被给药抗体治疗的同一患者。对于体外免疫，通常使 B 淋巴细胞在添加有 10%人血浆的培养基如 RPM-1640 中(参见 Engleman, 同上)接触抗原 7- 14 天的时间。

通过本领域公知的方法，免疫化的 B 淋巴细胞与异种杂交细胞如 SPAZ-4 融合。例如，细胞用分子量为 1000-4000 的 40-50%聚乙二醇在 37°C 处理约 5-10 分钟。从融合混合物中分离细胞并在选择性培养基中扩增所需的杂交细胞(如 HAT 或 AH)。通过分析三杂交瘤培养基中结合 A β 或其片段的能力，可以鉴定分泌具有所需的结合特异性抗体的克隆。生产具有所期望特异性的人抗体的三杂交瘤细胞用限制稀释技术亚克隆，并在培养基中体外培养。然后，测定获得的三杂交瘤细胞系结合 A β 或其片段的能力。

尽管三杂交瘤细胞遗传上稳定，但并不高水平产生抗体。可以将来自三杂交瘤细胞的抗体基因克隆到一个或多个表达载体中，并把载体转化标准的哺乳动物、细菌或酵母细胞系，以增加表达水平。

b. 转基因非人哺乳动物

抗 A β 人抗体也可以由转基因的非人哺乳动物生产，其具有至少编码人免疫球蛋白基因座区段的转基因。通常，这种转基因哺乳动物的内源免疫球蛋白基因座在功能上是无活性的。优选地，人免疫球蛋白基因座区段包括重链和轻链成分的未经重排的序列。内源免疫球蛋白

基因的失活和外源免疫球蛋白基因的导入都可以通过定向同源重组，或 YAC 染色体的导入实现。由此过程获得的转基因哺乳动物能够功能性重排免疫球蛋白成分序列，大量表达由人免疫球蛋白基因编码的各种同种型抗体，且不表达内源免疫球蛋白基因。具有这些特性的哺乳动物的生产与特性详细描述于例如，Lonberg 等，WO93/12227(1993); US5,877,397, US5,874,299, US5,814,318, US5,789,650, US5,770,429, US5,661,016, US5,633,425, US5,625,126, US5,569,825, US5,545,806, Nature 148:1547(1994) , Nature Biotechnology 14:826(1996) , Kucherlapati, WO 91/10741(1991)(为各种目的分别引入本文作为参考)。转基因小鼠是特别合适的。用 A β 或其片段免疫转基因的非人哺乳动物可以获得抗-A β 抗体，如 Lonberg 或 Kucheriapati, 同上所述。利用常规的 Kohler-Milstein 技术，通过例如将来自这些哺乳动物的 B 细胞和合适杂交瘤细胞系融合可以用来制备单克隆抗体。还可以从用免疫原性药剂免疫的人血清中提供人多克隆抗体。或者，该多克隆抗体可以利用 A β 或其它淀粉样肽作为亲合试剂，通过亲和纯化来浓缩。

c. 噬菌体展示法

另外获得人抗-A β 抗体的方法是筛选人 B 细胞的 DNA 文库，一般方案概述见 Huse 等，Sciences 246: 1275-1281(1989)。如在三杂交瘤法中所描述，B 细胞可以从用 A β 、其片段，带有 A β 或片段的更大的多肽或抗-独特型抗体免疫的人中获得。或者，B 细胞可以从最终接受抗体治疗的患者中获得。选择结合 A β 或其片段的抗体。然后克隆并扩增编码这些抗体(或结合片段)的序列。Huse 所述方案和噬菌体展示法一同使用将会更加有效。参见例如，Dower 等，WO 91/17271, McCafferty 等，WO 92/01047, Herzig 等，US5, 877, 218, Winter 等，US5, 871, 907, Winter 等，US5, 858, 657, Holliger 等，US5, 837, 242, Johnson 等，US5, 733, 743 和 Hoogenboom 等，US5, 565, 332(为各种目的分别引入本文作为参考)。在这些方法中，产生噬菌体文库，其中的成员在它们的外表面上展示不同的抗体。抗体通常展示为 Fv 或 Fab 片段。通过亲和富集选择对 A β 或其片段具有所期望的特异性的噬菌体展示抗

体。

在变化的噬菌体展示方法中，生产具有所选择的鼠抗体结合特异性的人抗体。参见 Winter WO 92/20791。这种方法中，选择的鼠抗体的轻链或重链的可变区用作起始材料。例如，如果轻链的可变区用作起始材料，构建的噬菌体文库其成员展示相同的轻链可变区(即鼠起始材料)和不同的重链可变区。重链可变区获自重排的人重链可变区文库。选择对 A β 显示强特异性结合(例如，至少 10^8 ，优选至少 $10^9 M^{-1}$)的噬菌体。然后来自该噬菌体的人重链可变区作为构建另一个噬菌体文库的起始材料。该文库中，每个噬菌体展示相同的重链可变区(即从第一个展示文库中鉴定的区域)和不同的轻链可变区。轻链可变区获自重排的人轻链可变区文库。再一次，选择对 A β 显示强特异性结合的噬菌体。这些噬菌体展示完全的人抗-A β 抗体的可变区。这些抗体通常与鼠起始材料具有相同或相似的表位特异性。

4. 可变区的制备

在已经概念性地选择人源化免疫球蛋白的 CDR 和构架组分之后，各种各样的方法可以用来制备这样的免疫球蛋白。因为密码子的简并性，各种核酸序列将编码各自的免疫球蛋白氨基酸序列。所需核酸序列的产生方法是全程固相 DNA 合成或对较早制备的所需多核苷酸进行 PCR 诱变。寡核苷酸介导的诱变是优选的制备靶多肽 DNA 的取代、缺失和插入的变体的方法。参见 Adelman 等，DNA 2:183(1983)。简而言之，靶多核苷酸 DNA 通过杂交编码所需突变的寡核苷酸与单链 DNA 模板而改变。在杂交后，DNA 聚合酶用于合成模板的整个第二互补链，所述模板掺入寡核苷酸引物且编码靶多肽 DNA 中选择的改变。

5. 恒定区的选择

如上所述制备的抗体的可变片段(例如，嵌合、人源化或人抗体的重链和轻链可变区)通常连接于免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分，一般是人免疫球蛋白的部分。人恒定区 DNA 序列可通过公知的方法分

离自各种人细胞，但优选无限增值化的 B 细胞(参见 Kabat 等，同上，以及 Liu 等，W087/02671)(为所有目的分别以全文引入作为参考)。照例，抗体将含有轻链和重链恒定区。重链恒定区通常包括 CH1、铰链、CH2、CH3 和 CH4 区。这里描述的抗体包括具有所有类型恒定区的抗体，包括 IgM、IgG、IgD、IgA 和 IgE 以及任意的同种型，包括 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4。恒定区的选择部分依赖于期望的是否是抗体依赖性补体和/或细胞介导的毒性。例如，同种型 IgG1 和 IgG3 有补体活性但同种型 IgG2 和 IgG4 没有。当所期望的抗体(例如，人源化抗体)显示胞毒活性时，恒定区一般是固定恒定区的补体，通常为 IgG1 类。当此种胞毒不是所期望的时，恒定区可以属于 IgG2 类。同种型的选择也影响抗体进入脑部的通路。人同种型 IgG1 是优选的。轻链恒定区可以是 λ 或 κ 。人源化抗体可含有来自一个以上的类型或同种型的序列。抗体可以表达为含有两个轻链和两个重链的四聚体，可以为单独的轻链和重链，如 Fab、Fab' F(ab')₂ 和 Fv，也可以作为其中轻链和重链可变区通过间隔区连接的单链抗体。

6. 重组抗体的表达

嵌合、人源化和人抗体通常通过重组表达来制备。将编码可选择地连接于恒定区的人源化轻链和重链可变区的核酸插入到表达载体中。轻链和重链可被克隆到相同或不同的表达载体中。使编码免疫球蛋白链的 DNA 区段可操作连接到表达载体中的调控序列来确保免疫球蛋白多肽的表达。表达调控序列包括但不限于启动子(例如，天然相关的或异源的启动子)、信号序列、增强子元件以及转录终止序列。优选地，表达调控序列是能转化和转染真核宿主细胞的载体中的真核启动子系统。一旦该载体进入合适的宿主后，使宿主维持在适合该核苷酸序列高水平表达以及适合交叉反应抗体的收集和纯化的环境中。

这些表达载体通常作为游离基因或作为宿主染色体 DNA 的整合部分可在宿主生物体中复制。通常，表达载体含有选择标记(例如，氨苄青霉素-抗性、潮霉素-抗性、四环素抗性 or 新霉素抗性)以使得这些

用所需 DNA 序列转化的细胞得以检测(参见例如, Itakura 等, 美国专利 4, 704, 362)。

大肠杆菌 (E. Coli) 是对于本发明的多核苷酸(例如 DNA 序列)的克隆特别有用的一种原核宿主。其它适用的微生物宿主包括杆菌, 例如枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*), 以及其它的肠细菌, 例如沙门氏菌(*Salmonella*)、沙雷氏菌(*Serratia*)以及各种假单胞菌(*Pseudomonas*)种。在这些原核宿主中, 其也可以产生表达载体, 通常含有与宿主细胞相容的表达调控序列(例如复制的起点)。另外, 任意的各种已知的启动子也会存在, 例如乳糖启动子系统、色氨酸(trp)启动子系统、 β -内酰胺酶启动子系统或来自噬菌体 λ 的启动子系统。启动子一般将调控表达, 可选择地与操纵基因序列一起, 且具有核糖体结合位点序列等, 用于启动和完成转录和翻译。

其它的微生物, 例如酵母, 也可用于表达。糖酵母(*Saccharomyces*)是优选的酵母宿主, 带有具有表达调控序列(例如启动子)、复制的起点、终止序列等的合适载体是所期望的。典型的启动子包括 3-磷酸甘油激酶和其它糖酵解酶。可诱导的酵母启动子尤其包括来自乙醇脱氢酶、同型细胞色素和参与麦芽糖和半乳糖利用的酶的启动子。

除了微生物外, 哺乳动物组织细胞培养物也可用于表达和生产本发明的多肽(例如编码免疫球蛋白或其片段的多核苷酸)。参见 Winnacker, *From Genes to Clones*, VCH Publishers, N.Y., N.Y.(1987)。真核细胞实际上是优选的, 因为本领域中开发了许多能够分泌异源蛋白(如完整的免疫球蛋白)的合适宿主细胞系, 包括 CHO 细胞系、各种 COS 细胞系、HeLa 细胞, 优选骨髓瘤细胞系或转化的 B 细胞和杂交瘤。优选地, 细胞为非人的细胞。这些细胞的表达载体包括表达调控序列, 如复制起点、启动子和增强子(Queen 等, *Immunol. Rev.* 89:49(1986)), 以及必须的加工信号位点, 如核糖体结合位点、RNA 剪接位点、多聚腺苷酸化位点和转录终止序列。优选的

表达调控序列是来自免疫球蛋白基因、巨细胞病毒、SV40、腺病毒、牛乳头瘤病毒等的启动子。参见 Co 等, *J. Immunol.* 148:1149(1992)。

或者, 抗体编码序列可掺入到转基因中, 用于导入转基因动物基因组并随后在转基因动物乳汁中表达(参见, 例如 Deboer 等, US5,741,957, Rosen, US5,304,489, 和 Meade 等, US5,849,992)。合适的转基因包括与哺乳动物乳腺特异基因, 例如酪蛋白或 β 乳球蛋白的启动子和增强子可操作连接的轻链和重链的编码序列。

含有目的多核苷酸序列(例如重链和轻链编码序列和表达调控序列)的载体可依据细胞宿主的类型通过公知的方法被转到宿主中。例如, 氯化钙转染常用于原核细胞, 而磷酸钙处理、电穿孔、脂质转染、生物裂解(biolistics)和病毒介导的转染可用于其它细胞宿主。(通常参见 Sambrook 等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*(Cold Spring Harbor Press, 第 2 版, 1989)(全文引入作为参考)。转化哺乳动物的其它方法包括使用聚凝胺(Polybrene)、原生质体融合、脂质体、电穿孔以及显微注射(通常参见, Sambrook 等, 同上)。为了获得转基因动物, 转基因可以置微注射入受精卵细胞, 或可以引入胚胎干细胞的基因组中, 以及将这些细胞的细胞核转入去核卵母细胞中。

当重链和轻链克隆在单独的表达载体上时, 载体被共转染从而获得完整免疫球蛋白的表达和装配。一旦表达, 整个抗体、其二聚物、独立的轻链和重链或本发明的其它免疫球蛋白形式可通过本领域标准的技术纯化, 包括硫酸铵沉淀、亲和柱层析、柱层析法、HPLC 纯化、凝胶电泳等(通常参见 Scopes, *Protein Purification*(Springer-Verlag, N.Y., (1982))。作为药物用途, 至少 90 到 95%同质性的基本上纯化的免疫球蛋白是优选的, 98 到 99%或更高的同质性更优选的。

7. 抗体片段

也在本发明的范围内的是抗体片段。在一个实施方案中, 提供非

人的片段、嵌合和/或人抗体。在另一个实施方案中，提供人源化抗体的片段。通常，这些片段显示特异性结合抗原，其具有至少 10^7 ，且更通常 10^8 或 10^9 M^{-1} 亲合力。人源化抗体片段包括单独的重链，轻链 Fab、Fab' F(ab')₂、Fabc 以及 Fv。片段通过重组 DNA 技术，或通过酶解或化学分离完整的免疫球蛋白来产生。

8. 抗体在动物模型中的治疗功效的测试

各组 7-9 月大的 PDAPP 小鼠用 0.5mg PBS 中的多克隆抗-A β 或特异性抗-A β 单克隆抗体注射。所有的抗体制剂纯化到具有低的内毒素水平。抗片段单克隆的制备方法是将 A β 的片段或长型注射到小鼠中，制备杂交瘤并筛选特异性结合 A β 的所需片段而不结合 A β 的其它非重叠片段的抗体的杂交瘤。

如有必要，小鼠腹膜内注射 4 个月时期以维持流动的抗体浓度，通过 ELISA 测定的效价大于对 A β 42 或其它的免疫原由 ELISA 所确定的 1/1000。监测效价且小鼠在 6 个月注射的末期实施安乐死。死后进行组织化学、A β 水平以及毒理学操作。每组使用 10 个小鼠。

9. 筛选具有清除活性的抗体

本发明也提供在淀粉样沉积物或任何其它抗原或相关生物实体的清除中具有活性的抗体的筛选方法，这种清除活性是所期望的。为了筛选对淀粉样沉积物的清除活性，将来自阿尔茨海默氏病患者的脑部组织样品或具有阿尔茨海默氏病病理现象之动物模型与带有 Fc 受体的吞噬细胞，如小胶质细胞，以及受测抗体在培养基中体外接触。吞噬细胞可以是初级培养物或如 BV-2、C8-B4 或 THP-1 之类的细胞系。在一些方法中，这些成分被集合于显微镜载玻片上以便显微监控。一些方法中，多个反应在微量滴定板的孔中平行进行。以这种方式，独立的微型显微镜载玻片可以放置在独立的小孔中，或者在可以使用非显微检测的方式，如 A β 的 ELISA 检测。优选地，对体外反应混合物中淀粉样沉积物的量进行一系列测定，从反应前的基线值开始，以及反

应进行中的一个或多个测试值。抗原可以通过染色检测，如荧光标记的 A β 抗体或其它淀粉样斑的成分。用于染色的抗体可以与受测清除活性的抗体相同，也可以不同。如果在淀粉样沉积的反应中出现相对于基线的降低，则认为受测抗体具有清除活性。这些抗体可能在用于预防或治疗阿尔茨海默氏病和其它致淀粉样病中是有用的。

类似的方法可以用于筛选在清除其它类型生物实体中具有活性的抗体。该分析可以用于对几乎任何类型生物实体检测清除活性。通常，生物实体在人和动物的疾病中有某个作用。生物实体可以组织样品或分离的形式提供。如果是组织样品，优选非固定的组织样品，以使其成分易于接触，以及避免伴随着固定对成分构象的干扰。在本分析中可用于测试的组织样品的例子包括癌组织、癌变前组织、良性生长的组织如疣或痣、感染了病原微生物的组织、炎性细胞所浸润的组织、含有细胞间病理基质(如血纤维蛋白性心包炎)的组织、带有异常抗原的组织以及瘢痕组织。可以使用的分离的生物实体包括 A β 、病毒抗原或病毒、蛋白聚糖、其它病原微生物的抗原、肿瘤抗原以及粘连分子。这些抗原可以从天然来源、重组表达或化学合成方法或其它方式获得。使该组织样品或分离的生物实体与带有 Fc 受体的吞噬细胞，如小胶质细胞或单核细胞以及受测抗体在培养基中接触。该抗体可针对受测生物实体或与之相关的抗原。在后一种情况中，目的在于测试带有该抗原的生物实体是否替代性地被吞噬。通常，尽管并不必需，抗体与生物实体(有时带有相关抗原)相互接触发生在吞噬细胞加入之前。然后监测残存于培养基中的生物实体和/或相关抗原的浓度，如果存在的话。培养基中的生物实体或相关抗原浓度或量的减少显示，在吞噬细胞参与时，该抗体对于该生物实体和/或相关抗原具有清除活性(参见例如，实施例 IV)。

B. 编码免疫和治疗剂的核酸

对淀粉样沉积物的免疫应答也可以通过给药编码用于被动免疫的抗体及其组分链的核酸进行诱导。所述核酸可以是 DNA 或 RNA。编

码免疫原的核酸区段通常与调控元件相连，例如启动子和增强子，这使DNA区段得以在患者的预期靶细胞中表达。对于在血细胞中的表达，诱导免疫应答理想的是，来自免疫球蛋白轻链或重链基因的启动子和增强子元件或者CMV主要中早期启动子和增强子适用于指导表达。相连的调控元件和编码序列经常被克隆到载体中。给药双链抗体时，其两条链可以克隆于同一个载体中，也可以分别克隆于不同载体中。

一些可获得的病毒载体系统包括逆转录病毒系统(参见例如，Lawrie 和 Tumin, *Cur. Opin. Genet. Develop.* 3:102-109(1993)); 腺病毒载体(参见例如，Bett 等, *J. Virol.* 67:5911(1993)); 腺相关病毒载体(参见例如，Zhou 等, *J. Exp. Med.* 179:1867(1994)); 来自痘病毒家族的病毒载体，包括牛痘病毒和禽痘病毒；来自 α 病毒属的病毒载体，例如来自新培斯病毒和塞姆利基森林病毒的那些载体(参见例如，Dubensky 等, *J. Virol.* 70:508(1996)); 委内瑞拉马脑炎病毒(参见 Johnston 等, US5, 643, 576)和甲病毒，如水泡性口膜炎病毒(参见，Rose, WO 96/34625)以及乳头瘤病毒(Ohe 等, *Human Gene Therapy* 6:325(1995); Woo 等, WO 94/12629 和 Xiao & Brandsma, *Nucleic Acids. Res.* 24, 2630-2622(1996))。

编码免疫原的DNA或含该DNA的载体可以包装于脂质体中。合适的脂质和相关类似物描述于Eppstein 等, US5,208,036, Felgner 等, US5,264,618, Rose, US5,279,833 以及 Epanand 等, US5,283,185。载体和编码免疫原的DNA还可以吸附或连接到颗粒性载体上，载体的例子包括聚甲基丙烯酸甲酯聚合物和聚丙交酯类以及聚(丙交酯-共-乙交酯)，参见例如，McGee 等, *J. Micro Encap.*(1996)。

可以通过向体内传递基因治疗载体或裸DNA对个体患者给药，一般通过全身性给药(例如静脉内、腹膜内、鼻腔、胃、皮内、肌内、皮下或头颅内灌输)或者局部给药(参见例如，Anderson 等, US5, 399, 346)。术语“裸多核苷酸”是指多核苷酸没有与胶体物质复合。裸多核

苷酸有时被克隆到质粒载体中。这种载体进一步可以包含如丁哌卡因的辅助药剂(Attardo 等, US5, 593, 970)。还可以利用基因枪给药 DNA。参见 Xiao 和 Brandsma, 同上。编码免疫原的 DNA 可以沉淀到显微的金属珠表面。用冲击波或扩散氦气加速微粒, 使它透过组织到达几个细胞层的深度。例如, Agacetus, Inc. Middleton WI 生产的 Accel™ 基因传送装置是适用的。或者, 仅需用化学或机械刺激将裸 DNA 点在皮肤上即可使 DNA 穿过皮肤到达血流(参见 Howell 等, WO 95/05853)。

在进一步变例中, 可以将编码免疫原的载体输送给离体细胞, 例如来自个体患者的移植细胞(例如淋巴细胞、骨髓穿刺液、组织活检)或者一般供体的造血干细胞, 通常对已插入了载体的细胞进行挑选后, 再次将细胞移植到患者体内。

II. 预防和治疗方法

本发明尤其涉及阿耳茨海默氏病和其它的致淀粉样疾病的治疗, 通过给患者施用针对 A β 特异表位的治疗免疫剂(例如, 人源化免疫球蛋白)在患者中产生有益治疗反应的情况下(例如, 诱导 A β 吞噬作用, 减少斑沉积、抑制斑的形成、减少神经炎性营养障碍、改进认知功能和/或回复、治疗或预防认知衰退), 例如, 用于预防和/或治疗致淀粉样疾病。本发明也公开了 已知的免疫因子(例如, 人源化免疫球蛋白)在用于治疗和预防致淀粉样疾病的药物的应用。

在此所述的术语“治疗”定义为治疗剂对患者应用或给药, 或治疗剂对来自具有疾病、疾病症状或发病倾向的患者的分离的组织或细胞系应用或给药, 其目的在于治愈、痊愈、减轻、缓解、改变、改善、改进或影响疾病、疾病症状或发病倾向。

在一方面, 本发明提供了预防和/或治疗与患者脑中的 A β 淀粉样沉积物相关的疾病的方法。此种疾病包括阿耳茨海默氏病、唐氏综合症和认知损伤。后者可与有或没有致淀粉样疾病的其它特征一起出现。本

发明的一些方法需要给患者施用有效剂量的特异性结合淀粉样沉积物成分的抗体。这些方法特别适用于人类患者阿尔茨海默氏病的预防与治疗。示例的方法需要给药有效剂量的结合 A β 的抗体。优选的方法需要给药有效剂量的特异性结合位于 A β 第 1-10 位残基内的表位的抗体，例如特异性结合于 A β 第 1-3 位残基的表位的抗体，特异性结合于 A β 第 1-4 位残基的表位的抗体，特异性结合于 A β 第 1-5 位残基的表位的抗体，特异性结合于 A β 第 1-6 位残基的表位的抗体，特异性结合于 A β 第 1-7 位残基的表位的抗体，或特异性结合于 A β 第 3-7 位残基的表位的抗体。在另一方面，本发明提供了给药结合于包含 A β 游离 N-末端残基的表位的抗体。在另一方面，本发明提供了给药结合于 A β 第 1-10 位残基内的表位的抗体，其中 A β 的第 1 位残基和/或第 7 位残基为天冬氨酸。然而在另一方面，本发明提供了给药特异性结合于 A β 肽而不结合全长淀粉样前体蛋白(APP)的抗体。在另一个方面，所述抗体的同种型是 IgG1。

在另一方面，本发明提供了给药结合患者的淀粉样沉积物并诱导对淀粉样沉积物的清除反应。例如，这种清除反应可以通过 Fc 受体介导的吞噬作用来实现。

本发明的治疗剂通常是基本上纯的，不含不需要的污染物。这是指药剂通常至少约 50% w/w(重量/重量)纯度，同时基本上不含干扰蛋白和污染物。有时候药剂至少约 80% w/w 以及更优选至少 90 或约 95% w/w 纯度。然而，使用常规蛋白纯化技术，至少 99% w/w 的均一性蛋白可以获得。

这些方法可以用于无症状的患者和那些目前出现症状的患者。在这些方法中使用的抗体可以是人抗体、人源化的、嵌合的或非人的抗体或其片段(例如抗原结合片段)且可以是单克隆或多克隆的，如本文所述。在另一个方面，本发明提供了给药由用 A β 肽免疫人中制备的抗体，该人可以是将由抗体治疗的患者。

在另一个方面，本发明提供了给药抗体和药用载体作为药用组合物。或者，抗体可给药于患者通过给药编码至少一个抗体链的多核苷酸。多核苷酸在患者体内表达产生抗体连。或者，多核苷酸编码抗体的重链和轻链。这种多核苷酸在患者中表达产生重链和轻链。在示例的实施方案中，监控患者给药抗体在血液中的水平。

因此本发明满足了预防或改善神经病理的治疗方法以及在一些患者中与阿耳茨海默氏病相关的认知损伤的长期需求。

A. 接受治疗的患者

接受治疗的患者包括具有患病危险但没有表现出症状的个体，以及目前表现出症状的患者。对于阿尔茨海默氏病，实际上任何人，只要他或她活得足够长，都存在患阿尔茨海默氏病的风险。因此，本发明方法可以对普通群体预防性给药，而无需评估受试患者的危险。本发明尤其对已知具有阿尔茨海默氏病遗传危险的个体有用。所述个体包括那些有亲属已患该病的个体，和那些通过遗传学和生化标记分析确定存在风险的个体。对于阿尔茨海默氏病的危险遗传学标记包括 APP 基因的突变，尤其是在第 717 位、第 670 和 671 位的分别被称为 Hardy 突变和 Swedish 突变的突变(参见 Hardy, 同上)。其它危险标记是早衰素基因 PS1 和 PS2 以及 ApoE4 中的突变、AD 家族史、血胆固醇过多或动脉粥样硬化。目前正患阿尔茨海默氏的个体可以通过特征性痴呆以及上述危险因子的存在来识别。另外，大量诊断测试可用来鉴定患 AD 的患者。这些测试包括测定 CSF τ 和 A β 42 的水平。 τ 水平升高和 A β 42 水平下降表示患有 AD。也可以通过实施例部分论述的 ADRDA 标准来诊断患阿尔茨海默氏病的个体。

对于无症状患者，可以在任何年龄开始治疗(例如 10、20、30 岁)。然而，通常在患者到 40、50、60 或 70 岁时才需要开始治疗。治疗通常需要在一段时期内进行多剂量给药。可以通过随时间分析抗体水平

来监测治疗。如果应答失败，表明需要升高剂量。对于潜在的唐氏综合症患者，可以在产前对母亲给药治疗剂开始治疗，也可以在出生后不久对患者给药。

B. 治疗方案和剂量

在预防应用中，对易患阿尔茨海默氏病或有患阿尔茨海默氏病危险的患者给药足以消除或降低危险、减轻严重性或延缓疾病发作的剂量的药物组合物或药物，包括疾病的生化、组织学和/或行为症状，疾病发展中呈现的中间病理现象及其并发症。在治疗应用中，对易患或已经患所述疾病的患者给药足以治愈或至少部分抑制疾病症状(生化、组织学和/或行为症状)包括疾病发展中出现的中间病理现象及其并发症的剂量的组合物或药物。

在一些方法中，药剂的给药减少或消除了尚未表现典型阿尔茨海默氏病病理现象的患者的认知损伤。足以实现治疗或预防治疗的量称为治疗-或预防-有效剂量。在预防和治疗方案中，通常药剂给药几个剂量，直到实现充分的免疫应答。术语“免疫应答”或“免疫学应答”包括体液(抗体介导)和/或细胞(通过抗原特异的 T 细胞或其分泌产物介导)针对接受者中的抗原反应的发展。此种反应可以是主动反应，即通过给药免疫原诱导，或被动反应，即通过给药免疫球蛋白或抗体或接触过抗原的 T 细胞诱导。

“免疫原因子”或“免疫原”在给药哺乳动物后能够诱导抵抗其本身的免疫应答，可选择地与佐剂结合。通常免疫应答受到监控，并且如果免疫应答开始减弱则重复给药。

本发明用于治疗上述病症的组合物的有效剂量随一些不同因素而改变，包括给药方法、靶部位、患者的生理状况、患者是人还是动物、所给药的其它药物以及处理是治疗性的还是预防性的。通常，患者为人，但也可以治疗包括转基因哺乳动物在内的非人哺乳动物。治疗剂

量需要用滴定法测量，以优化安全性和有效性。

对于利用抗体的被动免疫，剂量范围为约 0.0001 到 100 mg/kg 受体体重，更经常为 0.01 到 5 mg/kg 受体体重。例如，剂量可能为 1mg/kg 受体体重或 10mg/kg 受体体重或在 1-10mg/kg 受体体重范围之内，优选至少 1 mg/kg 受体体重。受试者可每天、几天间隔、每周或根据任何其它的经验给药这些剂量。一种示例的治疗需要以多剂量给药延续一段时间，例如至少 6 个月。其它的示例的治疗方案包括每两周一次或一个月一次或每 3 到 6 个月一次给药。示范性的给药时间表包括 1-10 mg/kg 或 15 mg/kg 连续多天，30 mg/kg 几天间隔或每周 60 mg/kg。在一些方法中，同时给药两种或多种具有不同结合特异性的抗体，其中所给药的每种抗体的剂量都落入所述的范围之内

抗体通常多次给药。每次的间隔可以是以周、月、年计。间隔也可以是不定期的，如通过测试患者中 A β 的抗体血液水平所示。在一些方法中，把剂量调整到血浆中抗体浓度达 1-1000 μ g/ml，而在一些方法中为 25-300 μ g/ml。或者，抗体可以持续释放剂量给药，这种情况下，不需要频繁给药。根据患者中抗体的半衰期改变使用的剂量和频率。通常，人抗体有最长的半衰期，接下来依次为人源化抗体、嵌合抗体和非人抗体。

给药的剂量和频率可依赖于处理是治疗性还是预防性的。在预防性应用中，将含有本发明抗体或其合剂的组合物给药于并非在病态的患者以增强病人的抗性。该量定义为“预防有效量”。在此应用中，精确量再次取决于患者的健康状态和基本的免疫力，但通常在 0.1-25 mg/剂量的范围，特别是 0.5-2.5 mg/剂量的范围。在一段长的时期内，以相对不频繁的间隔给药相对低的剂量。一些患者在余生中继续接受治疗。

在治疗应用中，有时要求以相对短的间隔给药相对高的剂量(例

如，从大约 1 到 200 mg 抗体/剂量，更普遍地使用从 5 到 25 mg)直到疾病进展得以减轻或终止，更优选地直到该患者的疾病症状有部分或完全的改善。此后，可以给患者施用一种预防性的方案。

编码抗体的核酸的剂量范围为每位患者约 10ng 到 1g，100 ng 到 100 mg，1 μ g 到 10 mg，或 30-300 μ g DNA。感染性病毒载体的剂量为每剂量 10-100 个毒粒或更多毒粒。

治疗剂可以经非肠道、局部、静脉内、口腔、皮下、关节内、颅内、腹膜内、鼻内或肌内方式给药，用于预防和/或治疗处理。最典型的免疫原药剂给药途径为皮下给药，当然其它的途径同样有效。其次最常用的途径是肌内注射。这种注射类型最通常在胳膊或腿的肌肉内注射。在一些方法中，直接将药剂注射到沉积物已累积的特定组织中，例如颅内注射。抗体给药优选静脉输注或肌内注射。一些方法中，特殊的治疗抗体直接注射于颅内。一些方法中，抗体以一种缓释组合物或装置如 MedipadTM 装置进行给药。

本发明的药剂可选择性地与其它治疗致淀粉样病至少部分有效的药剂组合给药。对于脑中发生淀粉样沉积物的阿尔茨海默氏病和唐氏综合症，还可以将本发明的药剂与其它促进本发明药剂穿过血脑屏障的药剂一起组合给药。

C. 药物组合物

本发明的药剂通常作为包含活性治疗因子即很多其它可药用成分的药物组合物给药。参见 Remington's Pharmaceutical Science(第 15 版, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania(1980))。优选剂型根据预期给药和治疗应用方式决定。组合物还可以根据所需的剂型包括可药用的、非毒性载体或稀释剂，它们被认为是常规用于配制给动物或人施用的药物组合物的载体。稀释剂以不影响组合后的生物活性来选择。这类稀释剂的例子是蒸馏水、生理磷酸盐缓冲液、林格液、葡

葡萄糖溶液、和 Hank 氏溶液。另外，药物组合物或制剂还可以包括其它载体，佐剂或非毒性、非治疗性、非免疫原性稳定剂等。

药物组合物还可以包括较大的、代谢缓慢的大分子，例如蛋白质、多糖如聚氨基葡糖、聚乳酸、聚羟基乙酸和共聚物(例如树胶官能化的琼脂糖凝胶 TM、琼脂糖、纤维素等)、多聚氨基酸、氨基酸共聚物、以及脂类聚集物(例如油滴或脂质体)。另外，这些载体具备作为免疫刺激剂的功能(即佐剂)。

对于非肠道给药，本发明的药剂可以作为物质在生理可接受稀释剂中的溶液或悬浮液与药物载体的可注射剂型一起给药，所述药物载体可以是无菌液体，例如水油、盐水、甘油或乙醇。另外，组合物中还可以含有辅助物质，例如湿润剂或乳化剂、表面活性剂、pH 缓冲物质等。药物组合物的其它成分是石油，动物、植物或合成来源的，例如花生油、大豆油和矿物油。液体载体通常优选二醇例如丙二醇或聚乙二醇，尤其是对可注射溶液。抗体可以以补给注射 (clepot injection) 的形式或移植制剂的形式给药，其可以以使活性成分持续释放的方式进行配制。一个示例的组合物包括 5mg/ml 的单克隆抗体，配制于由 50mM L-组氨酸、150mM NaCl 组成、用 HCl 调整 pH 到 6.0 的水相缓冲液中。

通常，将组合物制备成液体溶液或悬浮液的可注射形式;也可以制备成注射前可适于溶解或悬浮在液体媒介物的固体剂型。如前面所述，还可以将制剂乳化于或包埋于脂质体或微颗粒，例如聚丙交酯、聚乙交酯或共聚物中来增强佐剂效果(参见 Langer, *Science* 249: 1527(1990) 和 Hanes, *Advanced Drug Delivery Reviews* 28:97(1997))。本发明的药剂可以以储存注射的形式或移植制剂的形式给药，其可以以使活性成分持续或脉动释放的方式来配制。

适合其它给药方式的其它剂型包括口服、鼻内和肺部施用的制剂、

栓剂和经皮应用制剂。对于栓剂，粘合剂和载体包括例如，聚亚烷基二醇或甘油三酯；该种栓剂可以从含活性成分在 0.5%到 10%，优选 1%-2%范围内的混合物制备。口服制剂包括赋形剂，例如药用级甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素和碳酸镁。这些组合物配制成溶液、悬浮液、片剂、丸剂、胶囊、控释制剂或粉剂的形式，含有 10%-95%活性成分，优选 25%-70%活性成分。

局部应用可导致经皮或皮内送递。局部给药可以通过共同给药霍乱毒素或其脱毒衍生物或亚基或者其它类似的细菌毒素促进(参见 Glenn 等, *Nature* 391, 851(1998))。通过应用经化学交联得到的作为混合剂或连接分子的成分，或者表达为融合蛋白，来实现共同给药。

或者，可利用皮肤通道或利用转移体 (transfersome) 实现经皮送递(Paul 等, *Eur. J. Immunol.* 25:3521(1995); Cevc 等, *Biochem. Biophys. Acta* 1368:201-15(1998))。

III. 治疗过程的监测

本发明提供了监测患有或易患阿尔茨海默氏病的患者的治疗的方法，即监测给药患者的治疗的过程。该方法可用于监测有症状患者的治疗处理以及无症状患者的预防处理。尤其地，该方法对于监测被动免疫(例如，检测给药抗体的水平)是有用的。

一些方法需要在确定药剂的给药剂量之前测定患者体内例如抗体的免疫应答水平基线值，然后将该值与治疗后的免疫应答值相比较。免疫应答水平的显著增加(即同一样品重复测定中，高于一般的试验误差幅度，表示为所述测定平均值的标准差)表明治疗结果为阳性(即药剂的给药已得到了所需的反应。如果免疫应答的水平没有显著改变或者有所降低，表明治疗结果为阴性。

在其它方法中，测定对照组免疫应答的对照值(即平均值和标准

差)。通常，对照组中的个体没有接受预先治疗。然后将给药治疗剂后患者体内的免疫应答测量值与对照值比较。相对于对照值的显著增加(例如高于平均值的一个标准差)表明阳性或足够的治疗结果。缺乏明显的增加或降低则表明阴性或不够的治疗结果。通常连续给药药剂，免疫应答相对于对照值不断增加。和前面一样，相对于对照值出现稳定期，表明治疗给药可以间断或者降低剂量或次数。

在其它方法中，测定接受治疗药剂治疗并且其免疫应答对治疗的响应已经达到稳定期的个体对照组的免疫应答对照值(例如平均值和标准差)。患者体内免疫应答的测定值与对照值相比较。如果患者的测定值与对照值没有显著的不同(例如，高于一个标准差)，则治疗可以间断。如果患者体内的水平显著低于对照值，则需要保证连续给药药剂。如果患者体内的水平持续低于对照值，则表明应改变治疗方案。

在其它方法中，对目前没有接受治疗但以前曾接受一个疗程治疗的患者监测其抗体的水平或分布，以确定是否需要恢复治疗。在起始一个疗程治疗之后，可以将患者体内免疫应答的测量值与患者以前获得的免疫应答值比较。相对于前期测量显著降低(即在相同样品的重复测量中，高于一般误差幅度)表明可以恢复治疗。或者，可以将患者的测量值与接受一个疗程治疗后的患者组所测定的对照值相比较(平均值加标准差)。或者，可以将患者的测量值与接受预防处理、保持没有疾病综合症的患者组或者接受治疗处理、表现疾病症状改善的患者组体内的对照值相比较。在所有的这些情况下，相对于对照水平的显著降低(即超过一个标准差)表明患者应当恢复治疗。

用于分析的组织样品通常是来自患者的血液、血浆、血清、粘液或脑脊液。分析样品，例如对 A β 肽的抗体的水平或分布，例如人源化抗体的水平和分布进行分析。在实施例部分描述了检测特异于 A β 的抗体的 ELISA 法。在一些方法中，给药抗体的水平和分布通过清除分析进行测定，例如本文所述的体外吞噬作用测定。这些方法中，来自被

测试患者的组织样品与淀粉样沉积物(例如, 来自 PDAPP 小鼠)及带有 Fc 受体的吞噬细胞接触。接着检测随后的淀粉样沉积物的清除。清除反应的存在和程度显示了在被测患者组织样品中有效清除 A β 的抗体的存在和水平。

被动免疫后的抗体图通常先是抗体浓度迅速上升到峰值, 接着指数式降低。如果没有进一步给药, 根据给药抗体半衰期的不同将在几天到几个月的时期内降低至治疗前的水平。例如, 一些人抗体半衰期为 20 天。

在一些方法中, 在给药前对患者的 A β 抗体进行基线测量, 在此不久之后的第二次测量是为确定抗体的峰值, 间隔进行一次或更多次的测量, 以监测抗体水平的下降。当抗体降低到基线或预先确定峰值百分数的更低基线(如 50%、25% 或 10%), 给药另一剂量的抗体。一些方法中, 峰值或其后测定值的更低背景与预先确定的参照水平比较, 以构成对其它患者产生有益的预防性或治疗性处理方案。如果测得的抗体水平明显小于参照水平(例如, 小于治疗受益的患者群中参照值平均数减去一个标准差)则表明需要施用额外剂量的抗体。

其它的方法包括在治疗过程的自始至终监测本领域识别的任意生理症状(例如, 身体或精神症状), 这些症状通常依赖研究者或医师诊断或监控致淀粉样疾病(例如, 阿耳茨海默氏病)。例如, 可监测认知损伤。后者是阿耳茨海默氏病和唐氏综合症的症状但也可产生没有这些疾病的其它症状。例如, 认知损伤可根据惯例在治疗全过程中通过检测患者在微型精神状态测试(Mini-Mental State Exam)中的得分来监测。

C. 试剂盒

本发明进一步提供了实施上述监测方法的试剂盒。通常, 该试剂盒含有特异性结合 A β 抗体的试剂。试剂盒还包括一种标记物。对于检测 A β 抗体, 标记物通常是标记的抗-独特型抗体的形式。对于检测抗体,

可以预先将试剂结合到固相上使用，例如结合到微滴定板的孔中。试剂盒一般还含有提供指导试剂盒使用的标签。该标签还可以包括显示测定的标记水平与 A β 抗体水平之间相关性的图或其它相应方式。术语标签是指在试剂盒的生产、运输、销售或使用过程的任何时间，贴附于或附在试剂盒中的任何书面或记录材料。例如，术语标签包括广告宣传页和手册、包装材料、说明书、音频或视听磁带、计算机磁盘以及直接印刷在试剂盒上的书写印记。

本发明还提供了诊断试剂盒，例如，研究、检测和/或诊断的试剂盒。该试剂盒通常含有结合于 A β 表位的抗体，优选是与其第 1-10 位残基结合。优选地，标记是抗体或试剂盒含有二级标记试剂。优选地，试剂盒含有用于实施所需应用的说明书的标签，例如，用于进行体内成像分析。示例性的抗体为在这里所述的那些。

D. 体内成像

本发明提供了对患者中的淀粉样沉积物进行体内成像方法。这种方法可用于诊断或确证阿尔茨海默氏病或对其的怀疑。例如，该方法可用于出现痴呆症状的患者身上。如果患者有异常的淀粉样沉积物，则该患者可能患有阿尔茨海默氏病。该方法也可用于无症状的患者。异常淀粉样沉积物的存在表明将来易发展成有症状疾病。该方法也可用于监测早先被诊断为阿尔茨海默氏病患者的疾病发展和/或对治疗的反应。

该方法是给药患者一种药剂，如结合 A β 的抗体，并在其结合后检测该药剂。优选的抗体结合患者的 A β 沉积物，但不结合全长的 APP 多肽。特别优选结合于 A β 第 1-10 位氨基酸内表位的抗体。在一些方法中，抗体结合于 A β 第 7-10 位氨基酸内的表位。这类抗体通常结合且不诱导显著的清除反应。在其它方法中，抗体结合于 A β 第 1-7 位氨基酸内的表位。这类抗体通常结合并诱导对 A β 的清除反应。然而，利用缺少全长恒定区的抗体片段，如 Fabs，可以避免这种清除反应。在一些方法

中，同样的抗体可以作为治疗和诊断试剂。通常，结合 A β 的 C 末端到第 10 位残基的表位的抗体没有显示与结合第 1-10 位残基内表位的抗体一样强的信号，可能是因为淀粉样沉积物内的 C 末端表位是难于接触的。因此，这种抗体较不优选。

可以通过静脉内注射到患者身体，或颅内注射或钻孔穿过头骨直接对大脑给药诊断试剂。试剂的剂量应在与治疗方法中相同的剂量范围内。通常，试剂是标记的。尽管在一些方法中，对 A β 有亲和性的一级试剂未标记，而二级标记药剂用于结合一级试剂，标记的选择基于检测的方式。例如，荧光标记适用于光学检测。顺磁标记适用于无须手术参与的 X 射线断层检测。放射性标记也可以用 PET 或 SPECT 来检测。

比较标记位点与相应基线值的数目、大小和/或强度来进行诊断。基线值代表未生病群体的平均水平。基线值也代表同一患者先前确定的水平。例如，基线值可以在患者治疗开始前确定，而将之后的测定值与基线值比较。相对于基线的数值的下降是对治疗阳性反应的信号。

本发明将通过下面的非限制性实施例更充分地描述。

实施例

实施例 I: 抗-A β 抗体: mAb 2H3、mAb 10D5、mAb 266、mAb 21F12 和 pAb A β 1-42 的治疗功效

本实施例测试各种 A β 多克隆和单克隆抗体抑制 A β 在异源转基因小鼠脑中累积的能力。

A. 实验设计

60 只 8.5-10.5 月龄的雄性和雌性杂合 PADPP 转基因小鼠获自 charles River 实验室。小鼠被分成 6 组，分别用针对 A β 的各种抗体处理。将动物分配以使组内的动物在性别、月龄、家系和来源上尽可能

近地匹配。表 2 显示了试验设计。

表 2: 试验设计

处理组	N ^a	处理抗体	抗体特异性	抗体同种型
1	9	无(仅 PBS)	NA ^b	NA
2	10	多克隆	A β 1-42	混合的
3	0	mAb ^d 2H3	A β 1-12	IgG1
4	8	mAb 10D5	A β 3-7	IgG1
5	6	mAb 266	A β 13-28	IgG1
6	8	mAb 21F12	A β 33-42	IgG2a

- a. 实验终止时组内的小鼠数所有的组以每组 10 只动物开始。
- b. NA: 不适用的
- c. 小鼠多克隆: 抗-聚集的 A β 42
- d. mAb: 单克隆抗体

如表 2 所显示, 抗体包括四种鼠 A β -特异的单克隆抗体: 2H3(针对 A β 第 1-12 位残基)、10D5(针对 A β 第 1-16 位残基)、266(针对 A β 第 13-28 位残基结合于可溶性而非聚集的 AN1792)、21F12(针对 A β 第 33-42 位残基)。第五组用 A β 特异的多克隆抗体组分(用聚集的 AN1792 免疫获得)处理。阴性对照组仅接受稀释剂 PBS, 没有抗体。

B. 监测处理过程

单克隆抗体以约 10mg/kg(假设小鼠重 50 克)的剂量注射。抗体的效价在处理的 28 周期间检测。平均每七天进行腹膜内注射给药, 使抗 A β 效价维持在 1000 以上。尽管因 mAb 266 不与本测定中用作捕捉抗原的聚集的 AN1792 良好结合, 从而效价测定较低, 但对该组仍然维持同样的剂量方案。由于抗体在体内被快速清除, 接受单克隆抗体 2H3 的组在前三周内实验中断。

对于测定抗体的效价, 仅在腹膜内接种之前从每组中随机选出三个小鼠进行采血, 总共 30 次取血。A β 1-42-结合抗体的抗体效价采用 A β 1-42 包被的塑料多孔板进行夹心 ELISA 来测定, 具体描述在“基本材料和方法”部分。每一血液的多克隆抗体和单克隆 10D5 和 21F12

的平均效价显示在表 3 中。

表 3:

周 21F12	21F12	周 10D5	10D5	周多克隆	多克隆
0.15	500	0.15	3000	0.15	1600
0.5	800	0.5	14000	0.5	4000
1	2500	1	5000	1	4500
1.5	1800	1.1	5000	1.5	3000
2	1400	1.2	1300	2	1300
3	6000	2	3000	3	1600
3.5	550	3	4000	3.5	650
4	1600	3.5	500	4	1300
5	925	4	2400	5	450
6	3300	5	925	6	2100
7	4000	6	1700	7	1300
8	1400	7	1600	8	2300
9	1900	8	4000	9	700
10	1700	9	1800	10	600
11	1600	10	1800	11	600
12	1000	11	2300	12	1000
13	1500	12	2100	13	900
14	1300	13	2800	14	1900
15	1000	14	1900	15	1200
16	1700	15	2700	16	700
17	1700	16	1300	17	2100
18	5000	17	2200	18	1800
19	900	18	2200	19	1800
20	300	19	2500	20	1200
22	1750	20	980	22	1000
23	1600	22	2000	23	1200
24	1000	23	1000	24	675
25	1100	24	850	25	850
26	2250	25	600	26	1600
27	1400	26	1100	27	1900
28		27	1450	28	
		28			

多克隆抗体在此段时间的效价平均值大约 1000 且其稍高于 10D5-和 21F12-处理的动物的此种水平。

处理持续超过六个月的时间，总共 196 天。动物在最后一次给药一周后实施安乐死。

C. 脑中 A β 和 APP 水平:

用各种抗-A β 抗体制剂处理约 6 个月后, 移出动物脑部, 然后盐水灌注。脑的一个半球准备用于免疫组织化学分析, 第二个半球用于定量测定 A β 和 APP 水平。为了测定各种形式的 β 淀粉样沉积物和淀粉样前体蛋白(APP)的浓度, 解剖大脑半球, 并在 5M 胍中制备海马区、皮层区和小脑区三个区的匀浆。进行一系列稀释, 通过与 ELISA 模式中已知浓度的 A β 肽或 APP 的一系列稀释标准比较, 来量化淀粉样肽或 APP 的水平。

通过 ELISA 测定的皮层和海马匀浆液中总 A β 和 A β 1-42 的水平, 以及小脑中总 A β 的水平分别显示在表 4、5 和 6 中。接种 PBS 的对照组总 A β 浓度的中值在海马中比皮层中高 3.6 倍(海马组织中值 63, 389 ng/g 而皮层组织中值 17, 818 ng/g)。对照组小脑的中值(30.6 ng/g 组织)比海马中要低 2000 倍以上。这些水平与从前报道的此年龄的杂合 PDAPP 转基因小鼠水平相似(Johnson-Wood 等, 同上)。

对于皮层, 一个处理组具有 A β 中值水平, 以 A β 1-42 测定, 与对照组的显著不同($p < 0.05$), 那些动物接受了表 4 所示的多克隆抗-A β 抗体。与本处理组的对照组相比, A β 1-42 的中值水平降低了 65%。与另外一个处理组中的对照相比, A β 61-42 的中值水平也显著降低了 55%, 这些动物服以单克隆抗体(mAb)10D5($p = 0.0433$)。

表 4
皮层

处理组	N ^a	中值						平均数	
		总 A β		A β 42		总 A β		A β 42	
		ELISA 值 ^b	P 值 ^c	变化%	ELISA 值	P 值	变化%	ELISA 值	P 值
PBS	9	17818	NA ^d	NA	13802	NA	NA	16150+/-7456 ^e	12621+/-5738
多克隆抗-A β 42	10	6160	0.0055	-65	4892	0.0071	-65	5912+/-4492	4454+/-3347
MAb 10D5	8	7915	0.1019	-56	6214	0.0433	-55	9695+/-6929	6943+/-3351
MAb 266	6	9144	0.1255	-49	8481	0.1255	-39	9204+/-9293	7489+/-6921
MAb 21F12	8	15158	0.2898	-15	13578	0.7003	-2	12481+/-7082	11005+/-6324

脚注:

- a. 实验结束时每组动物的数目
- b. ng/g 组织
- c. Mann Whitney 分析
- d. NA: 不适用的
- e. 标准偏差

在海马区中，与多克隆抗-A β 抗体处理相关的总 A β 的中值降低的百分率(50%， $p=0.0055$)小于皮层中观察到的(65%)(表 5)。但海马区中降低的绝对量几乎比皮层大 3 倍，海马中净降低为 31,683 ng/g 组织而皮层中为 11,685ng/g 组织。如不以总 A β ，而以 A β 1-42 这种更加致淀粉样的 A β 形式为测定基准，多克隆抗体导致的降低是显著的($p=0.0025$)。单克隆抗体 10D5 和 266 处理组的中值分别降低 33%和 21%。

表 5

处理组	N ^a	中值						平均数	
		总的 A β			A β 42			总 A β	A β 42
		ELISA 值 ^b	P 值 ^c	变化%	ELISA 值	P 值	变化%	ELISA 值	ELISA 值
PBS	9	63389	NA ^d	NA	54429	NA	NA	58351+/-13308 ^e	52801+/-14701
多克隆 抗-A β 42	10	31706	0.0055	-50	27127	0.0025	-50	30058+/-22454	24853+/-18262
MAb 10D5	8	46779	0.0675	-26	36290	0.0543	-33	44581+/-18632	36465+/-17146
MAb 266	6	48689	0.0990	-23	43034	0.0990	-21	36419+/-27304	32919+/-25372
MAb 21F12	8	51563	0.7728	-19	47961	0.8099	-12	57327+/-28927	50305+/-23927

a. 实验结束时每组动物的数目

b. ng/g 组织

c. Mann Whitney 分析

d. NA: 不适用的

e. 标准偏差

也测定了小脑中的总 A β (表 6)。在服用多克隆抗-A β 抗体和 266 抗体的处理组中, 总 A β 水平显著降低(分别为 43%和 46%, $p=0.0033$ 和 $p=0.0184$), 而用 10D5 处理组有几乎显著的降低(29%, $p=0.0675$)。

表 6

小脑					
处理组	N ^a	中值			平均数
		总 A β			总 A β
		ELISA 值 ^b	P 值 ^c	变化%	ELISA 值
PBS	9	30.64	NA ^d	NA	40.00+/-31.89 ^e
多克隆抗-A β 42	10	17.61	0.0033	-43	18.15+/-4.36
mAb 10D5	8	21.68	0.0675	-29	27.29+/-19.43
mAb 266	6	16.59	0.0184	-46	19.59+/-6.59
mAb 21F12	8	29.80	>0.9999	-3	32.88+/-9.90

- 实验结束时每组动物的数目
- ng/g 组织
- Mann Whitney 分析
- NA:不适用的
- 标准偏差

通过 ELISA 测定了来自抗原处理、对照和 PBS 处理的小鼠皮层和小脑 APP 浓度。使用两种不同的 APP 分析。第一种分析命名为 APP- α /FL, 识别 APP- α (α , APP 的分泌型, 已在 A β 序列中切割)和 APP 的全长型(FL)。第二种分析只识别 APP- α 。与 A β 在处理组亚组中的处理相关性降低相反, 与对照动物相比, 在所有处理组中 APP 水平几乎不变。这些结果表明用 A β 抗体免疫消耗 A β , 但不消耗 APP。

总之, 在抗 AN1792 的多克隆抗体处理的小鼠中, 其皮层、海马和小脑中 A β 的水平显著降低。在较小程度上, 针对 A β 1-42 的氨基末

端区域特别是第 1-16 位和第 13-28 位的氨基酸的单克隆抗体也表现显著的治疗效果。

D. 组织化学分析:

在用 PBS、多克隆 A β 42、21F12、266 和 10D5 处理组的小鼠脑的亚组中, A β 免疫活性斑的形态与之前接着使用 A β 42 的标准免疫方法的研究中的形态进行定性比较。

淀粉样斑的程度和外形的最大变化均产生在多克隆 A β -42 抗体免疫的动物中。淀粉样沉积、侵蚀的斑形态以及细胞相关的 A β 免疫活性, 这三者的降低非常类似由标准免疫程序所产生的效果。这些观察支持 ELISA 的结果, 其中给药多克隆 A β 42 抗体可以导致总 A β 和 A β 42 显著降低。

在类似的定性评估中, 10D5 组的淀粉样斑在数量和外形上也有所减少, 并存在细胞相关的 A β 免疫活性。相对于对照处理动物, 抗 A β 的多克隆 Ig 组分和单克隆抗体之一 (10D5) 分别降低了 93%和 81%的斑沉积($p < 0.005$)。似乎 21F12 对斑沉积有相对较弱的效果。相对于对照处理的动物, 对多克隆 pabA β_{1-42} 处理后的脑部显微照相显示出弥散的沉积物, 以及 pabA β_{1-42} 处理组中许多更大紧密斑消失。

E. 淋巴细胞增殖反应

利用最后一次抗体输注 8 天后收集的脾细胞, 测定 A β -依赖的淋巴细胞增殖。将新鲜收集的细胞以每孔 10^5 个, 在起刺激作用的浓度为 $5 \mu\text{M}$ 的 A β_{1-40} 存在下培养 5 天。作为阳性对照, 另外的细胞与 T 细胞促细胞分裂剂 PHA 共同培养, 作为阴性对照, 细胞的培养无外加的肽。

用各种抗 A β 抗体被动免疫的衰老 PDAPP 小鼠的脾细胞在体外经 AN1792 刺激, 并测定增殖和细胞因子反应。这些分析的目的在于确定

被动免疫是否促使抗原呈递，并因此引发对 AN1792 特异的 T 细胞反应。在用抗-A β 抗体被动免疫的小鼠中未观察到 AN1792 特异的增殖或细胞因子反应。

实施例 II: 抗-A β 抗体: mAb 2H3、mAb 10D5、mAb 266、mAb 21F12、mAb 3D6、mAb 16C11 和 pAb A β 1-42 的治疗功效

在第二项研究中，重复 10D5 的处理并检测另外两种抗 A β 抗体：单克隆抗体 3D6(A β 1-5)及 16C11(A β 33-42)。对照组接受 PBS 或一种不相关的同种型-匹配抗体(TM2a)。小鼠较前述研究中大(11.5-12 月龄的杂合体)，其它的实验设计都相同。再一次，在处理 6 个月后，相对于 PBS 或同种型-匹配抗体对照组，10D5 使斑沉积降低了超过 80%($p=0.003$)。另外一个抗 A β 抗体 3D6 同样有效，产生 86%的降低($p=0.003$)。相反，第三个抗该肽的抗体 16C11 对斑沉积无效。A β 42 的 ELISA 测定也获得相似的结果。

这些结果表明在缺少 T 细胞免疫情况下，抗 A β 肽的抗体反应足以降低 PDAPP 小鼠中的淀粉样沉积，但并非所有的抗-A β 抗体都有效。针对含有 A β 第 1-5 位或第 3-7 位氨基酸的表位的抗体特别有效。总之，可以表明被动给药抗 A β 抗体(即被动免疫)降低了患阿尔茨海默氏病的小鼠模型中的斑沉积的程度。

实施例 III: CNS 中抗体结合的监测

此实施例证明了在较为温和的血清浓度(25-70 $\mu\text{g/ml}$)时，获得的抗体以足以修饰 β -淀粉样斑的水平进入 CNS。

为了检测抗 A β 抗体是否可以在 CNS 内直接作用，取实施例 II 结束时盐水灌注的小鼠脑部，检查外周给药的抗体是否存在。未固定的恒冷脑切片暴露于抗鼠免疫球蛋白(羊抗小鼠 IgG-Cy3)的荧光试剂中。10D5 和 3D6 处理组的脑中的斑被抗体强烈地着色，而 16C11 组无染色。为充分展示斑沉着的程度，首先用抗-A β 抗体与各个脑组织的系列切片

进行免疫反应，然后与第二种试剂进行免疫反应。10D5 和 3D6 在外周给药后获得接触 CNS 内的大多数淀粉样斑。与 16C11 组相比，这些组中的斑沉积极大地降低。抗体进入 CNS 并非由于血脑屏障的异常泄漏，因为 Evans Blue 检测 PDAPP 小鼠，未发现血管通透性的增加。此外，衰老 PDAPP 小鼠脑软组织中的抗体浓度和非转基因小鼠相同，血清中抗体浓度显示 0.1%(不考虑同种型)。

这些数据表明，外周给药的抗体可以进入 CNS 内，并在其中直接引发淀粉样沉积物的清除。可能 16C11 也已接触到淀粉样斑，但却不能结合。

实施例 IV: 抗淀粉样沉积物抗体的活性的离体筛选试验

为了检测抗体对斑清除的效果，我们建立了一种离体分析，其中将初级小胶质细胞与来自 PDAPP 小鼠或人 AD 脑的未固定的恒冷切片共同培养。小胶质细胞获自新生 DBA/2N 小鼠(1-3 天)的脑皮层。在 HBSS⁻(Hank 氏平衡盐溶液, Sigma)和 50 μ g/ml DNA 酶 I 中通过机械方法解离皮层。用 100 μ m 细胞滤器(Falcon)过滤解离的细胞，1000rpm 离心 5 分钟。沉淀重悬于生长培养基中(高葡萄糖 DMEM、10%FBS、25ng/ml rmGM-CSF)，以每个 T-75 培养瓶两个脑组织的密度铺细胞。7-9 天后，培养瓶在定轨摇床以 200rpm 的速度 37 $^{\circ}$ C 培养 2 小时。细胞悬浮物以 1000rpm 离心，重悬于分析培养基。

PDAPP 小鼠或人 AD 脑(死亡时间<3 小时)的 10- μ m 恒冷切片融化后，装到多聚赖氨酸包被的圆形玻璃盖片上，并放置在 24 孔组织培养平板的孔中。用分析培养基冲洗盖玻片二次，分析培养基由含有 1%FBS、谷氨酰胺、青霉素/链霉素以及 5ng/ml rmGM-CSF(R&D)的 H-SFM(无杂交瘤细胞血清培养基, Gibco BRL)组成。一小时内加入两倍浓度的对照或抗-A β 抗体(终浓度 5ng/ml)。然后以 0.8 \times 10⁶ 细胞/ml 分析培养基的密度接种小胶质细胞。培养物在加湿的培养箱内(37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂)孵育 24 小时或更长时间。孵育结束后，用 4%的低聚甲醛固定

培养物并浸透于 0.1% 的 Triton-X100。切片用生物素酰化的 3D6 染色，接着链霉素/Cy3 共轭物(Jackson ImmunoResearch)染色。外源的小胶质细胞通过核染色(DAPI)可见。用倒置荧光显微镜(尼康, TE300)观察培养物，以 SPOT 数码相机用 SPOT 软件(Diagnostic instruments)进行光学显微照相。对于 Western 印迹分析，培养物用 8M 尿素抽提，在还原 tricine 样品缓冲液中以 1:1 稀释，并上样于 16%tricine 凝胶中(Novex)。转至转移膜 (immobilon) 上后，印迹暴露于 5 μ g/ml 的 pabA β 42，接着与 HRP 共轭的抗小鼠抗体接触，并在 ECL(Amersham)中显影。

当有 16C11 (一种抗 A β 抗体，在体内无效) 存在下对 PDAPP 脑切片进行分析时， β 淀粉样斑保持其完整性，并且未观察到吞噬作用。相反，当邻近的切片在 10D5 存在下进行培养时，淀粉样沉积物大多不存在，并且小胶质细胞显示许多含有 A β 的吞噬泡。AD 脑切片也有同样的结果；10D5 诱导对 AD 斑的吞噬，而 16C11 无效。此外，当以小鼠或人小胶质细胞和小鼠、兔或灵长类动物抗 A β 抗体进行操作时，该分析提供了可比性结果。

表 7 比较几种不同抗体结合特异性的 A β 结合与吞噬作用。可见，结合于第 1-7 位氨基酸内表位的抗体结合并清除淀粉样沉积物，而结合于第 4-10 位氨基酸内表位的抗体结合但不清除淀粉样沉积物。结合于 C 末端到第 10 位残基的表位的抗体既不结合也不清除淀粉样沉积物。

Table 7: 表位特异性分析

	抗体		染色	吞噬作用
	表位	同种型		
<u>N-末端</u>				
单克隆抗体				
3D6	1-5	IgG2b	+	+
10D5	3-7	IgG1	+	+
22C8	3-7	IgG2a	+	+
6E10	5-10	IgG1	+	-
14A8	4-10	大鼠 IgG1	+	-
<u>第 13-28 位氨</u>				
<u>基酸</u>				
18G11	10-18	大鼠 IgG1	-	-
266	16-24	IgG1	-	-
22D12	18-21	IgG2b	-	-
<u>C-末端</u>				
2G3	-40	IgG1	-	-
16C11	-40/-42	IgG1	-	-
21F12	-42	IgG2a	-	-
<u>免疫血清</u>				
兔(CFA)	1-6		+	+
小鼠(CFA)	3-7		+	+
小鼠(QS-21)	3-7		+	+
猴(QS-21)	1-5		+	+
小鼠(MAP1-7)			+	+

表 8 显示的结果获自几种抗 A β 抗体, 比较其离体分析中诱导吞噬作用的能力, 以及在体内被动转移研究中减少斑沉积的能力。尽管 16C11 和 21F12 可以高亲合力结合于聚集的合成 A β 肽, 这些抗体不能与未固定的脑切片中的 A β 淀粉样斑反应, 因此不能引发离体分析中的吞噬作用, 并在体内没有功效。在三种测定中, 10D5、3D6 和多克隆抗 A β 抗体都有活性。这些结果显示体内效果是基于 CNS 中抗体直接介

导的斑清除作用，并且离体分析可以预示体内效果。

表 8: 离体分析预示体内功效

抗体	同种型	对聚集的 A β 的 亲和力(pM)	与 β -淀粉斑 的结合	离体的 功效	体内的 功效
单克隆					
3D6	IgG2b	470	+	+	+
10D5	IgG1	43	+	+	+
16C11	IgG1	90	-	-	-
21F12	IgG2a	500	-	-	-
TM2a	IgG1	-	-	-	-
多克隆					
1-42	混合	600	+	+	+

同样的分析已用来检测抗一个称为 NAC 的共核蛋白片段的抗体的清除活性。共核蛋白已显示是一种淀粉样斑相关蛋白。NAC 的抗体与含有淀粉样斑的脑组织样品和小胶质细胞接触，同前。用兔血清作对照。随后的监测表明斑的数目和大小有显著的减少，显示了抗体的清除活性。

共聚焦显微镜用来确认在离体分析过程中 A β 已内化。在对照抗体的存在下，使外源的小胶质细胞维持在组织上方的一个共聚焦平面，在此区域没有含 A β 的吞噬泡，并且淀粉样斑在切片内是完整的。在 10D5 存在时，几乎所有的淀粉样斑物质都存在于外源小胶质细胞的小泡中。为了确定内化肽的最终命运，在各个时间点对 10D5 处理的培养物用 8M 尿素抽提，并通过 Western 印迹分析检测。在第一小时时间点，还未产生吞噬作用，与多克隆抗 A β 抗体的反应显示一个强的 4kD 条带（相应于 A β 肽）。A β 的免疫活性在第一天降低，并第三天消失。因此，抗体介导 A β 的吞噬作用导致了其降解。

为了确定在离体分析中吞噬作用是否由 Fc-介导, 制备抗 A β 抗体 3D6 的 F(ab')₂ 片段。尽管 F(ab')₂ 片段保持了其与淀粉样斑反应的全部能力, 它们不能引发小胶质细胞发生吞噬作用。此外, 整个抗体的吞噬可以被抗鼠 Fc 受体 (抗-CD16/32) 的试剂阻断。这些数据显示 A β 的体内清除是通过 Fc 受体介导的吞噬作用进行的。

实施例 V: 抗体通过血脑屏障的途径

本实施例在静脉内注射抗体到正常或 PDAPP 小鼠外周组织后, 测定进入脑部的抗体的浓度。处理后, 用 0.9%NaCl 溶液灌注 PDAPP 或对照的正常小鼠。剖出脑区 (海马和皮层) 并快速冷冻。在 0.1%Triton+蛋白酶抑制剂中匀浆脑组织。ELISA 检测抽提物中的免疫球蛋白。F(ab')₂ 羊抗小鼠 IgG 包被到 RIA 板上作为捕捉剂。将脑抽提物或血清孵育 1 小时。用抗小鼠 I IgG1-HRP 或 IgG2a-HRP 或 IgG2b-HRP(Caltag) 检测同种型。发现无论何种同种型, 存在于 CNS 中的抗体与其在血液中的浓度都为 1:1000。例如, 当血液中 IgG1 浓度是血液中 IgG2a 浓度的三倍时, 在脑部的浓度也是它的三倍, 二者的浓度都是血液中浓度水平的 0.1%。在转基因或未转基因的小鼠中都观察到这一结果, 这表明 PDAPP 没有独特的血脑屏障泄漏。

实施例 VI. 小鼠 3D6 可变区的克隆和测序

3D6 VH 的克隆和测序分析。3D6 的重链可变 VH 区利用由两种独立的方法从杂交瘤细胞制备的 mRNA 通过 RT-PCR 进行克隆。首先, 共有引物用于包括翻译起始密码子的 VH 区前导肽作为 5' 引物(DNA #3818-3829), 以及 g2b(DNA #3832)作为恒定区特异的 3'引物。来自 PCR 扩增的产物和来自多种独立衍生的克隆的序列彼此完全一致。对 3D6 VH 区的序列进一步核查, 结果通过对由 5' RACE RT-PCR 法和 3' g2b 特异性引物(DNA #3832)获得的 VH 片段进行测序而得到确认。再一次, 该序列获自 PCR 产物以及多种独立分离的克隆。两个序列彼此完全一致, (在来自 5' RACE 产物前导区的 V8I 取代除外), 表明该序列是来自编码 3D6 的 VH 区的 mRNA。3D6 VH 区的核苷酸(SEQ ID NO:3)和

氨基酸序列 SEQ ID NO:4)分别显示在表 9A 和图 2 中。

表 9A: 小鼠 3D6 VH 核苷酸序列

ATGAACTTCGGGCTCAGCTTGATTTTCCTTGTCCTTGTTTTAA
AAGGTGTCCAGTGTGAAGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGC
 TTAGTGAAGCCTGGAGCGTCTCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCT
 GGATTCACTTTCAGTAACTATGGCATGTCTTGGGTTCGCCAGAAT
 TCAGACAAGAGGCTGGAGTGGGTTGCATCCATTAGGAGTGGTGG
 TGGTAGAACCTACTATTCAGACAATGTAAAGGGCCGATTCACCAT
 CTCCAGAGAGAATGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAAATGAGTA
 GTCTGAAGTCTGAGGACACGGCCTTGTATTATTGTGTCAGATATG
 ATCACTATAGTGGTAGCTCCGACTACTGGGGCCAGGGCACCCT(
 SEQ ID NO:3)

*前导肽加下划线。

小鼠 3D6 VL 的克隆和测序分析。将 3D6 的轻链可变 VH 区以和 VH 区类似的方式克隆。在第一个实验中，用于扩增鼠 VL 区的共有引物设计如下：5'引物(DNA #3806-3816)设计来杂交于包含翻译起始密码子的 VL 区，以及 3'引物(DNA#3817)特异于 V-J 结合区下游的鼠 Ck 区。PCR 片段以及使用此共有轻链引物对分离出的独立衍生的克隆的 DNA 序列分析，揭示了获得的 cDNA 是来自非功能性重排信息，因为该序列含有在 V-J 区接点之间的移码突变。

在第二个实验中，5'RACE 用于克隆编码 cDNA 的第二 VL。此产物(共有序列 11)的 DNA 序列分析显示其编码一个功能性的 mRNA。因此，可以推断该序列编码正确的 3D6 轻链 mRNA。3D6 VL 区的核苷酸(SEQ ID NO:1)和氨基酸序列(SEQ ID NO:2)分别显示在表 9B 和图 1。

表 9B: 小鼠 3D6 VL 核苷酸序列

ATGATGAGTCCTGCCAGTTCCTGTTTCTGTTAGTGCTCTGG
ATTCGGGAAACCAACGGTTATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTC
 ACTTTGTCGGTTACCATTTGGACAACCAGCCTCCATCTCTTGCAAG
 TCAAGTCAGAGCCTCTTAGATAGTGATGGAAAGACATATTTGAAT
 TGGTTGTTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCGCCTAATCTAT
 CTGGTGTCTAAACTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTCACTGGC
 AGTGGATCAGGGACAGATTTTACACTGAAAATCAGCAGAATAGA
 GGCTGAGGATTTGGGACTTTATTATTGCTGGCAAGGTACACATTT
 TCCTCGGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA (SEQ
 ID NO:1)

*前导肽加下划线

用于 3D6 VL cDNA 克隆的引物显示在表 10 中。

DNA	大小	编码链?	DNA 序列	备注
3806	40	是	ACT.AGT.CGA.CAT.GAA.GTT.GCC.T GT.TAG.GCT.GTT.GGT.GCT.G(SEQ ID NO:39)	小鼠 κ 可变引物 1 MKV 引物 1, MRC 对; % A+T = 50.00 [20]; % C+G = 50.00 [20] Davis, Botstein, Roth 解链 温度 72.90°C
3807	39	是	ACT.AGT.CGA.CAT.GGA.GWC.AGA. CAC.ACT.CCT.GYT.ATG.GGT(SEQ ID NO:40)	小鼠 κ 可变引物 2 MKV 引物 2, MRC 对 % A+T = 46.15 [18]; % C+G = 48.72 [19] Davis, Botstein, Roth 解链 温度 72.05°C
3808	40	是	ACT.AGT.CGA.CAT.GAG.TGT.GCT.C AC.TCA.GGT.CCT.GGS.GTT.G(SEQ ID NO:41)	小鼠 κ 可变引物 3 MKV 引物 3, MRC 对; % A+T = 45.00 [18]; % C+G = 52.50 [21] Davis, Botstein, Roth 解链 温度 73.93°C

3809	43	是	ACT.AGT.CGA.CAT.GAG.GRC.CCC.T GC.TCA.GWT.TYT.TGG.MWT.CTT.G (SEQ ID NO:42)	小鼠 κ 可变引物 4 MKV 引物 4, MRC 对; % A+T = 41.86 [18]; % C+G = 46.51 [20] Davis, Botstein, Roth 解链 温度 72.34°C
3810	40	是	ACT.AGT.CGA.CAT.GGA.TTT.WCA. GGT.GCA.GAT.TWT.CAG.CTT.C (SEQ ID NO:43)	小鼠 κ 可变引物 5 MKV 引物 5, MRC 对 % A+T = 52.50 [21]; % C+G = 42.50 [17] Davis, Botstein, Roth 解链 温度 69.83°C
3811	37	是	ACT.AGT.CGA.CAT.GAG.GTK.CYY.T GY.TSA.GYT.YCT.GRG.G (SEQ ID NO:44)	小鼠 κ 可变引物 6 MKV 引物 6, MRC 对; % A+T = 37.84 [14]; % C+G = 40.54 [15] Davis, Botstein, Roth 解链 温度 68.01°C
3812	41	是	ACT.AGT.CGA.CAT.GGG.CWT.CAA. GAT.GGA.GTC.ACA.KWY.YCW.GG (SEQ ID NO:45)	小鼠 κ 可变引物 7 MKV 引物 7, MRC 对; % A+T = 39.02 [16]; % C+G = 46.34 [19] Davis, Botstein, Roth 解链 温度 71.70°C
3813	41	是	ACT.AGT.CGA.CAT.GTG.GGG.AYC.T KT.TTY.CMM.TTT.TTC.AAT.TG (SEQ ID NO:46)	小鼠 κ 可变引物 8 MKV 引物 8, MRC 对; % A+T = 53.66 [22]; % C+G = 34.15 [14] Davis, Botstein, Roth 解链 温度 66.70°C
3814	35	是	ACT.AGT.CGA.CAT.GGT.RTC.CWC.A SC.TCA.GTT.CCT.TG (SEQ ID NO:47)	小鼠 κ 可变引物 9 MKV 引物 9, MRC 对. % A+T = 45.71 [16]; % C+G = 45.71 [16] Davis, Botstein, Roth 解链 温度 69.36°C

3815	37	是	ACT.AGT.CGA.CAT.GTA.TAT.ATG.TT.GTT.GTC.TAT.TTC.T (SEQ ID NO:48)	小鼠 κ 可变引物 10 MKV 引物 10, MRC 对; % A+T = 70.27 [26]; % C+G = 29.73 [11] Davis, Botstein, Roth 解链 温度 63.58°C
3816	38	是	ACT.AGT.CGA.CAT.GGA.AGC.CCC.AGC.TCA.GCT.TCT.CTT.CC (SEQ ID NO:49)	小鼠 κ 可变引物 11 MKV 引物 11, MRC 对; % A+T = 44.74 [17]; % C+G = 55.26 [21] Davis, Botstein, Roth 解链 温度 74.40°C
3817	27	否	GGA.TCC.CGG.GTG.GAT.GGT.GGG.AAG.ATG(SEQ ID NO:50)	小鼠 κ 轻链反向引物, 第 116-122 位氨基酸; Ck 恒定区 引物, MRC 对 +SmaI 位点; % A+T = 47.06 [8]; % C+G = 52.94 [9] Davis, Botstein, Roth 解链 温度 57.19°C
3818	37	是	ACT.AGT.CGA.CAT.GAA.ATG.CAG.CTG.GGT.CAT.STT.CTT.C (SEQ ID NO:51)	小鼠重链可变引物 1 MHV 引物 1, MRC 对;
3819	36	是	ACT.AGT.CGA.CAT.GGG.ATG.GAG.CTR.TAT.CAT.SYT.CTT (SEQ ID NO:52)	小鼠重链可变引物 2 MHV 引物 2, MRC 对;
3820	37	是	ACT.AGT.CGA.CAT.GAA.GWT.GTG.GTT.AAA.CTG.GGT.TTT.T (SEQ ID NO:53)	小鼠重链可变引物 3 MHV 引物 3, MRC 对;
3821	35	是	ACT.AGT.CGA.CAT.GRA.CTT.TGG.GYT.CAG.CTT.GRT.TT (SEQ ID NO:54)	小鼠重链可变引物 4 MHV 引物 4, MRC 对;
3822	40	是	ACT.AGT.CGA.CAT.GGA.CTC.CAG.GCT.CAA.TTT.AGT.TTT.CCT.T (SEQ ID NO:55)	小鼠重链可变引物 5 MHV 引物 5, MRC 对;
3823	37	是	ACT.AGT.CGA.CAT.GGC.TGT.CYT.RGS.GCT.RCT.CTT.CTG.C (SEQ ID NO:56)	小鼠重链可变引物 6 MHV 引物 6, MRC 对;

3824	36	是	ACT.AGT.CGA.CAT.GGR.ATG.GAG.C KG.GRT.CTT.TMT.CTT (SEQ ID NO:57)	小鼠重链可变引物 7 MHV 引物 7, MRC 对;
3825	33	是	ACT.AGT.CGA.CAT.GAG.AGT.GCT.G AT.TCT.TTT.GTG (SEQ ID NO:58)	小鼠重链可变引物 8 MHV 引物 8, MRC 对;
3826	40	是	ACT.AGT.CGA.CAT.GGM.TTG.GGT. GTG.GAM.CTT.GCT.ATT.CCT.G (SEQ ID NO:59)	小鼠重链可变引物 9 MHV 引物 9, MRC 对;
3827	37	是	ACT.AGT.CGA.CAT.GGG.CAG.ACT.T AC.ATT.CTC.ATT.CCT.G (SEQ ID NO:60)	小鼠重链可变引物 10 MHV 引物 10, MRC 对;
3828	38	是	ACT.AGT.CGA.CAT.GGA.TTT.TGG.G CT.GAT.TTT.TTT.TAT.TG (SEQ ID NO:61)	小鼠重链可变引物 11 MHV 引物 11, MRC 对;
3829	37	是	ACT.AGT.CGA.CAT.GAT.GGT.GTT.A AG.TCT.TCT.GTA.CCT.G (SEQ ID NO:62)	小鼠重链可变引物 12 MHV 引物 12, MRC 对;
3832	27	否	GGA.TCC.CGG.GAG.TGG.ATA.GAC.t GA.TGG (SEQ ID NO:63)	mouse IgG2b 重链反向引 物 第 119-124 位氨基酸, MRC 对;

从 N 末端到 C-末端, 轻链和重链含有结构域 FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 和 FR4。每一结构域氨基酸的分配与 Kabat 等的编号规则一致, 同上。

嵌合 3D6 抗体的表达: 可变重链和轻链区经重新改造来编码各自 VDJ 或 VJ 接头下游剪接的供体序列, 并被克隆到重链的哺乳动物表达载体 PCMV-hy1 和轻链的载体 PCMV-hκ1 中。这些载体编码人 γ 1 和 C κ 恒定区作为插入的可变区表达盒下游的外显子片段。在证实序列之后, 重链和轻链表达载体被共同转染到 COS 细胞中。两个不同的重链克隆(H2.2 & H3.2)独立地与 3 种不同的嵌合轻链克隆(L3、L4、&L10)共转染以确证结果的再现性。嵌合的 21.6 抗体转染作为载体的阳性对照。转染 48 小时后收集调节的培养基并通过 western 印迹来分析抗体的产生或通过 ELISA 分析其 A β 结合。

多种转染子全部表达了重链+轻链组合，其在 western 印迹上由羊抗人 IgG(H+L)抗体识别。

3D6 和嵌合 3D6(PK1614)抗体与 A β 的直接结合通过 ELISA 分析来进行测定。发现嵌合 3D6 高亲和性地结合 A β ，类似于由 3D6 所论证的(图 3A)。此外，基于竞争性抑制试验的 ELISA 表明嵌合 3D6 和鼠 3D6 抗体与生物素化-3D6 同等地竞争结合于 A β (图 3B)。嵌合抗体显示与 3D6 参考样品不能区分的结合特性。

表 11.

浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	3D6	PK1614	IgG1
0.037		119.3	
0.11	118.6	118.9	
0.33	99.7	71.25	
1	98.63	84.53	134.4

此外，3D6 和 PK1614 在清除 A β 斑中是有效的。离体分析表明随着抗体的浓度增加，A β 量减少的方式类似于鼠和嵌合 3D6 抗体。因此，可以推断该序列分别编码功能性 3D6 重链和轻链。

实施例 VII. 3D6 人源化

同源性/分子建立模型。为了鉴定鼠 3D6 抗体中的关键结构构架残基，三维模型的建立基于最接近的重链和轻链的鼠抗体。为达到此目的，一个称为 1CR9 的抗体选择作为建立 3D6 轻链模型的模板(PDB ID: 1CR9, Kanyo 等, 同上)，以及命名为 1OPG 的抗体选择作为建立 3D6 重链模型的模板(PDB ID: 1OPG Kodandapani 等, 同上)(也参见表 1)。3D6 与这些抗体的重链和轻链的氨基酸序列的比对揭示，除了重链的 CDR3 以外，1CR9 和 1OPG 抗体与 3D6 有显著的序列同源性。此外，所选抗体的 CDR 环如同 3D6 的 CDR 环落入到相同的规范 Chothia 结构分类中，同样除了重链的 CDR3 以外。因此，1CR9 和 1OPG 最初

选作解开结构的抗体，用于 3D6 的同源性建模。

基于上述抗体的 3D6 可变区的第一同源性模型是利用 Look & SegMod Modules GeneMine(v3.5)软件包来构建的。此软件可购买自 Molecular Applications Group(Palo Alto, CA)。此软件包由 Michael Levitt 和 Chris Lee 博士开发，通过自动运行步骤基于序列的同源性在已知结构的模板上建立一级序列结构模型，促进了分子建模的进程。其运行在 Silicon Graphics IRIS 工作站的 UNIX 环境下，模型的结构通过一系列能量最小化步骤来去除不必要的原子接触并优化静电的和范德华作用而自动改进。

更精确的模型的建立利用 Quanta®的建模能力。3D6 重链的 CDR3 在 PDB 数据库中的查询鉴定了 1qkz 为最同源的且具有与 3D6 相同的残基数。因此，3D6 重链的 CDR3 的建模利用 1qkz 的晶体结构作为模板。3D6 模型的 α -碳主链迹线显示于图 4。VH 结构域显示为点画线，且 VL 区域显示为实线，以及 CDR 环显示为条带形式。

人受体抗体序列的筛选。合适的人受体抗体序列通过计算机比较小鼠可变区的氨基酸序列与已知人抗体的序列来进行鉴定。3D6 重链和轻链的比较分别进行。特别地，来自其构架序列显示与鼠 VL 和 VH 构架区高度序列同一性的人抗体的可变区使用 NCBI BLAST(公众可通过国家卫生研究所 NCBI 因特网服务器获得)通过 Kabat 数据库查询各自的鼠构架序列来进行鉴定。

两个候选的序列选作受体序列基于下述的条件:(1)与受试序列同源；(2)与供体序列共有规范的 CDR 结构；以及(3)在构架区不含有任何稀有氨基酸残基。所选 VL 的受体序列是 Kabat ID NO(KABID)019230(Genbank 登录号 No. S40342)，VH 的受体序列是 KABID 045919(Genbank 登录号 No. AF115110)。人源化 3D6 抗体的第一个改型利用了这些所选的受体抗体序列。

氨基酸残基的取代。如上所述，本发明的人源化抗体含有基本上来自人免疫球蛋白的可变构架区(受体免疫球蛋白)以及基本上来自小鼠免疫球蛋白称为 3D6 的互补决定区(供体免疫球蛋白)。在鉴定了 3D6 的互补决定区和适当的人受体免疫球蛋白后，接下来的步骤是确定来自这些元件的哪一些残基，如果有的话，被取代以优化产生的人源化抗体的特性。前面所述的标准用于筛选取代的残基。

图 1 和 2 分别描述了原始鼠 3D6 VL 和 VH 与人源化序列的改型 1、相应的人构架受体序列，以及显示与人构架受体序列有最高的同源性的人种系 V 区序列的比对。阴影部分的残基显示规范(实体)、游尺(点线)、包装(粗体)以及稀有氨基酸(粗斜体)，并标在图上。星号表明残基在人受体构架序列中回复突变为鼠残基，且 CDR 区显示为上划线的。插入到人源化 3D6 VH 和 VL 的变体 1 中的变化概括在表 12 中。

表 12.人源化 3D6.v1 中变化的概括

变化	VL(112 残基)	VH(119 残基)
Hu->Mu: 构架	4/112	3/119(1 规范, 1 包装)
CDR1	6/16	3/5
CDR2	4/7	7/14
CDR3	5/8	4/10
Hu->Mu	19/112(17%)	17/119(14%)
Mu->Hu:构架	13/112	14/119
回复突变注解	1. I2V 其是一个规范的位置 2. Y36L 其是一个包装残基且也位于 CDR 的下方 3. L46R 其是一个包装残基且也位于 CDR 的下方	4. S49A 游标/在 CDRs 下方. 5. A93V 其是包装和游标区残基 6. K94R 是一个规范的残基

受体注解	7.KABID 019230/Genbank Acc#S40342 8. HukLc 亚组 II 9. CDR 来自相同的规范的结构组作为供体(m3D6) L1= 4 型 L2= 1 型 L3=1 型 10. 未知的特异性	11. KABID045919/Genbank Acc#AF115110 12. Hu HC 亚组 III 13. CDRs 来自相同的规范的结构组作为供体(m3D6) H1=1 型 H2=3 型 识别脑膜炎奈瑟氏球菌 (Neisseria meningitidis)的荚膜多糖
受体种系	15. VH3-23	16. A3 & A19

表 13 和 14 分别阐述了不同轻链和重链的 Kabat 编号检索

表 13: 轻链 Kabat 编号检索

KAB		小鼠		A19-		备注	
#	#	TYPE	3D6 VL	HUM 3D6VL	KABI D 019230		种系
1	1	FR1	Y	Y	D	D	稀有的小鼠，可接触 CDR
2	2		V	V	I	I	规范/CDR 接触
3	3		V	V	V	V	
4	4		M	M	M	M	
5	5		T	T	T	T	
6	6		Q	Q	Q	Q	
7	7		T	S	S	S	
8	8		P	P	P	P	
9	9		L	L	L	L	
10	10		T	S	S	S	
11	11		L	L	L	L	
12	12		S	P	P	P	
13	13		V	V	V	V	
14	14		T	T	T	T	
15	15		I	P	P	P	
16	16		G	G	G	G	

17	17		Q	E	E	E	
18	18		P	P	P	P	
19	19		A	A	A	A	
20	20		S	S	S	S	
21	21		I	I	I	I	
22	22		S	S	S	S	
23	23		C	C	C	C	
24	24	CDR1	K	K	R	R	
25	25		S	S	S	S	
26	26		S	S	S	S	
27	27		Q	Q	Q	Q	
27A	28		S	S	S	S	
27B	29		L	L	L	L	
27C	30		L	L	L	L	
27D	31		D	D	H	H	
27E	32		S	S	S	S	
28	33		D	D	N	N	
29	34		G	G	G	G	
30	35		K	K	Y	Y	
31	36		T	T	N	N	
32	37		Y	Y	Y	Y	
33	38		L	L	L	L	
34	39		N	N	D	D	
35	40	FR2	W	W	W	W	
36	41		L	L	Y	Y	包装残基
37	42		L	L	L	L	
38	43		Q	Q	Q	Q	
39	44		R	K	K	K	
40	45		P	P	P	P	
41	46		G	G	G	G	
42	47		Q	Q	Q	Q	
43	48		S	S	S	S	
44	49		P	P	P	P	
45	50		K	Q	Q	Q	
46	51		R	R	L	L	包装残基
47	52		L	L	L	L	
48	53		I	I	I	I	
49	54		Y	Y	Y	Y	

50	55	CDR2	L	L	L	L
51	56		V	V	G	G
52	57		S	S	S	S
53	58		K	K	N	N
54	59		L	L	R	R
55	60		D	D	A	A
56	61		S	S	S	S
57	62	FR3	G	G	G	G
58	63		V	V	V	V
59	64		P	P	P	P
60	65		D	D	D	D
61	66		R	R	R	R
62	67		F	F	F	F
63	68		T	S	S	S
64	69		G	G	G	G
65	70		S	S	S	S
66	71		G	G	G	G
67	72		S	S	S	S
68	73		G	G	G	G
69	74		T	T	T	T
70	75		D	D	D	D
71	76		F	F	F	F
72	77		T	T	T	T
73	78		L	L	L	L
74	79		K	K	K	K
75	80		I	I	I	I
76	81		S	S	S	S
77	82		R	R	R	R
78	83		I	V	V	V
79	84		E	E	E	E
80	85		A	A	A	A
81	86		E	E	E	E
82	87		D	D	D	D
83	88		L	V	V	V
84	89		G	G	G	G
85	90		L	V	V	V
86	91		Y	Y	Y	Y
87	92		Y	Y	Y	Y
88	93		C	C	C	C

89	94	CDR3	W	W	M	M
90	95		Q	Q	Q	Q
91	96		G	G	A	A
92	97		T	T	L	L
93	98		H	H	Q	Q
94	99		F	F	T	T
95	100		P	P	P	P
96	101		R	R	R	
97	102		T	T	T	
98	103	FR4	F	F	F	
99	104		G	G	G	
100	105		G	Q	Q	
101	106		G	G	G	
102	107		T	T	T	
103	108		K	K	K	
104	109		L	V	V	
105	110		E	E	E	
106	111		I	I	I	
106A	112		K	K	K	

Table 14. 重链 Kabat 编号检索

KAB	小鼠						注解
	#	#	TYPE	<u>3D6</u> VH	<u>HUM</u> 3D6 VH	<u>KABI</u> D 045919	
1	1	FR1	E	E	E	E	
2	2		V	V	V	V	
3	3		K	Q	Q	Q	
4	4		L	L	L	L	
5	5		V	L	L	L	
6	6		E	E	E	E	
7	7		S	S	S	S	
8	8		G	G	G	G	
9	9		G	G	G	G	
10	10		G	G	G	G	
11	11		L	L	L	L	
12	12		V	V	V	V	

13	13		K	Q	Q	Q	
14	14		P	P	P	P	
15	15		G	G	G	G	
16	16		A	G	G	G	
17	17		S	S	S	S	
18	18		L	L	L	L	
19	19		K	R	R	R	
20	20		L	L	L	L	
21	21		S	S	S	S	
22	22		C	C	C	C	
23	23		A	A	A	A	
24	24		A	A	A	A	
25	25		S	S	S	S	
26	26		G	G	G	G	
27	27		F	F	F	F	
28	28		T	T	T	T	
29	29		F	F	F	F	
30	30		S	S	S	S	
31	31	CDR1	N	N	S	S	
32	32		Y	Y	Y	Y	
33	33		G	G	A	A	
34	34		M	M	V	M	
35	35		S	S	S	S	
36	36	FR2	W	W	W	W	
37	37		V	V	V	V	
38	38		R	R	R	R	
39	39		Q	Q	Q	Q	
40	40		N	A	A	A	稀有小鼠, 替换 w/人 (Hum)
41	41		S	P	P	P	
42	42		D	G	G	G	稀有小鼠, 替换 w/人
43	43		K	K	K	K	
44	44		R	G	G	G	
45	45		L	L	L	L	
46	46		E	E	E	E	
47	47		W	W	W	W	
48	48		V	V	V	V	
49	49		A	A	S	S	CDR 接触/贴面(veneer)

50	50	CDR2	S	S	A	A
51	51		I	I	I	I
52	52		R	R	S	S
52A	53		S	S	G	G
53	54		G	G	S	S
54	55		G	G	G	G
55	56		G	G	G	G
56	57		R	R	S	S
57	58		T	T	T	T
58	59		Y	Y	Y	Y
59	60		Y	Y	Y	Y
60	61		S	S	A	A
61	62		D	D	D	D
62	63		N	N	S	S
63	64		V	V	V	V
64	65		K	K	K	K
65	66		G	G	G	G
66	67	FR3	R	R	R	R
67	68		F	F	F	F
68	69		T	T	T	T
69	70		I	I	I	I
70	71		S	S	S	S
71	72		R	R	R	R
72	73		E	D	D	D
73	74		N	N	N	N
74	75		A	A	A	S
75	76		K	K	K	K
76	77		N	N	N	N
77	78		T	S	S	T
78	79		L	L	L	L
79	80		Y	Y	Y	Y
80	81		L	L	L	L
81	82		Q	Q	Q	Q
82	83		M	M	M	M
82A	84		S	N	N	N
82B	85		S	S	S	S
82C	86		L	L	L	L
83	87		K	R	R	R
84	88		S	A	A	A
85	89		E	E	E	E

86	90		D	D	D	D	
87	91		T	T	T	T	
88	92		A	A	A	A	
89	93		L	L	L	V	
90	94		Y	Y	Y	Y	
91	95		Y	Y	Y	Y	
92	96		C	C	C	C	
93	97		V	V	A	A	包装残基, 使用小鼠
94	98		R	R	K	K	规范残基, 使用小鼠
95	99	CDR3	Y	Y	D		
96	100		D	D	N		
97	101		H	H	Y		
98	102		Y	Y	D		
99	103		S	S	F		
100	104		G	G	W		
100	105		S	S	S		
		A					
100B	106		S	S	G		
100C	107		-	-	T		
100	108		-	-	F		
		D					
101	109		D	D	D		
102	110		Y	Y	Y		
103	111	FR4	W	W	W		
104	112		G	G	G		
105	113		Q	Q	Q		
106	114		G	G	G		
107	115		T	T	T		
108	116		T	L	L		
109	117		V	V	V		
110	118		T	T	T		
111	119		V	V	V		
112	120		S	S	S		
113	121		S	S	S		

人源化抗体优选显示出特异性结合 A β 的亲合力至少为 10^7 、 10^8 、 10^9 或 10^{10} M^{-1} 。通常人源化抗体对 A β 的结合亲合力的上限为 3D6 的亲合力上限的三、四或五倍(即 $\sim 10^9 \text{ M}^{-1}$)。通常结合亲合力的下限也为 3D6 的亲合力下限的三、四或五倍。

人源化 3D6 VH 和 VL、改型 1 的组装和表达

简单地说，对于每一个 V 区，把 4 个大的单链重叠寡核苷酸进行合成。此外，将 4 个短的 PCR 引物合成用于每一 V 区域以进一步促进特定 V 区的组装。用于此目的寡核苷酸的 DNA 序列显示在表 15 中。

表 15: DNA 寡核苷酸

DNA#	大小	编码?	序列	注解
4060	136	是	tccgc aagct tgcgg ccacc ATGGA CATGC GCGTG CCCGC CCAGC TGCTG GGCCT GCTGA TGCTG TGGGT GTCCG GCTCC TCCGG CTACG TGGTG ATGAC CCAGT CCCC CTGTC CCTGC CCGTG ACCC CGGCG A (SEQ ID NO:17)	人 3D6 VL-A
4061	131	否	CTGGG GGGAC TGGCC GGGCT TCTGC AGCAG CCAGT TCAGG TAGGT CTTGC CGTCG GAGTC CAGCA GGGAC TGGGA GGA CT TGCAG GAGAT GGAGG CGGGC TCGCC GGGGG TCACG GGCAG GGACA GGGGG G (SEQ ID NO:18)	人 3D6 VL-B
4062	146	是	ACCTG AACTG GCTGC TGCAG AAGCC CGGCC AGTCC CCCCA GCGCC TGATC TACCT GGTGT CCAAG CTGGA CTCCG GCGTG CCCGA CCGCT TCTCC GGCTC CGGCT CCGGC ACCGA CTTCA CCCTG AAGAT CTCCC GCGTG GAGGC C (SEQ ID NO:19)	人 3D6 VL-C
4063	142	否	aattc tagga tccac tcacg CTTGA TCTCC ACCTT GGTGC CCTGG CCGAA GGTGC GGGGG AAGTG GGTGC CCTGC CAGCA GTAGT ACACG CCCAC GTCCT CGGCC TCCAC GCGGG AGATC TTCAG GGTGA AGTCG GTGCC GG (SEQ ID NO:20)	人 3D6 VL-D
4064	16	否	CTGGG GGGAC TGGCC G (SEQ ID NO: 21)	人 3D6 VL A+B 反向 %A+T = 18.75 [3]; % C+G = 81.2[13] Davis, Botstein, Roth 解链温度 66.96°C
4065	22	是	ACCTG AACTG GCTGC TGCAG AA (SEQ ID NO:22)	人 3D6 VL C+D 正 向 % A+T = 45.45 [10]; % C+G = 54.55 [12] Davis, Botstein, Roth 解 链温度 64.54°C

4066	138	是	acaga aagct tgccg ccacc ATGGA GTTTG GGCTG AGCTG GCTTT TTCTT GTGGC TATTT TAAAA GGTGT CCAGT GTGAG GTGCA GCTGC TGGAG TCCGG CGGCG GCCTG GTGCA GCCCG GCGGC TCCCT GCGCC TGT (SEQ ID NO:23)	人 3D6 VH-A
4067	135	No	GCCGC CGGAG CGGAT GGAGG CCACC CACTC CAGGC CCTTG CCGGG GGCCT GGCGC ACCCA GGACA TGCCG TAGTT GGAGA AGGTG AAGCC GGAGG CGGCG CAGGA CAGGC GCAGG GAGCC GCCGG GCTGC ACCAG (SEQ ID NO:24)	人 3D6 VH-B
4068	142	是	CTGGA GTGGG TGGCC TCCAT CCGCT CCGGC GGCGG CCGCA CCTAC TACTC CGACA ACGTG AAGGG CCGCT TCACC ATCTC CCGCG ACAAC GCCAA GAACT CCCTG TACCT GCAGA TGAAC TCCCT GCGCG CCGAG GACAC CG(SEQ ID NO:25)	人 3D6 VH-C
4069	144	否	ctgca aggat ccaact caccG GAGGA CACGG TCACC AGGGT GCCCT GGCCC CAGTA GTCGG AGGAG CCGGA GTAGT GGTCG TAGCG CACGC AGTAG TACAG GGCGG TGTC TCGGC GCGCA GGGAG TTCAT CTGCA GGTAC AGGG(SEQ ID NO:26)	人 3D6 VH-D
4070	16	否	GCCGC CGGAG CGGAT G (SEQ ID NO:27)	人 3D6 VH A+B 反向 % A+T = 18.75 [3]; % C+G = 81.25[13] Davis, Botstein, Roth 解链温度 66.96°C
4071	20	是	CTGGA GTGGG TGGCC TCCAT (SEQ ID NO:28)	人 3D6 VH C+D 正向 % A+T = 35.00 [7]; % C+G = 65.00 [13] Davis, Botstein, Roth 解 链温度 66.55°C

4072	19	是	tcc gca agc ttg ccg cca c (SEQ ID NO:29)	人 3D6 VL A+B 正向 % A+T = 31.58 [6]; % C+G = 68.42[13] Davis, Botstein, Roth 解链温度 66.64°C
4073	29	否	aat tct agg atc cac tca cgC TTG ATC TC (SEQ ID NO:30)	人 3D6 VL C+D 反向 % A+T = 55.17[16]; % C+G = 44.83 [13] Davis, Botstein, Roth 解链温度 66.04°C
4074	23	是	aca gaa agc ttg ccg cca ccA TG (SEQ ID NO:31)	人 3D6 VH A+B 正向 % A+T = 43.48 [10]; % C+G = 56.52 [13] Davis, Botstein, Roth 解 链温度 66.33°C
4075	22	否	ctg caa gga tcc act cac cGG A (SEQ ID NO:32)	人 3D6 VH C+D 反向 % A+T = 40.91 [9]; % C+G = 59.09[13] Davis, Botstein, Roth 解链温度 66.40°C

人源化轻链利用 PCR 进行装配。至于所预计的序列，对两打以上的 DNA 序列进行分析表明分散的点突变和贯穿 VL 区的缺失。序列的分析显示克隆 2.3 负责修复氨基末端区域的 2 个间隔接近的单核苷酸缺失。因此定点诱变在克隆 pCRShum3D6v12.3 上进行，通过寡核苷酸来导入 2 个缺失的核苷酸，且点突变的修复通过 DNA 序列分析得到确认，以及将 VL 插入片段克隆到轻链表达载体 pCMV-cK 中。

利用基于 PCR 的方法装配人源化 VH 产生了 5'端一半序列全部缺失的克隆。进一步地努力优化 PCR 的条件来满足部分的成功。通过优化的 PCR 条件而装配的克隆在定位到 A+B 片段重叠的区域中仍具有 10-20 核苷酸缺失。所以，可选择的路线应用于 VH 装配，通过利用

DNA 聚合酶(T4、Klenow 和 Sequenase)介导的重叠延伸, 然后通过 T4 DNA 连接酶来共价连接重叠末端。利用后一方法对来自 VH 装配的克隆亚组进行 DNA 序列分析揭示了克隆中的分散的点突变和缺失。对两打以上克隆的分析揭示了克隆的如图所示基本相同的模式。在 VH 和 VL 克隆的第一次装配之后所观察到的类似结果表明 DNA 序列误差产生在用于装配的长 DNA 的合成过程中自动合成仪的误差。

人源化 VH 克隆 2.7 选择用于通过观察含有的 3 个核苷酸缺失的定点诱变介导的修复。

实施例 XIII: 人源化 3D6v2 抗体的特征鉴定

人源化 3D6 的第二改型具有改型 1 所显示的所有取代, 除了在残基 1 处 D→Y 的取代。在改型 1 中该残基的取代是因为该残基被鉴定为一个 CDR 作用残基。但是, 取代缺失了一个在该位点对与人免疫球蛋白来说稀有的残基。然而, 建立了一个没有该取代的改型。此外, 在重链构架区的非种系残基被命名为 H74 = S, H77 = T 和 H89 = V 的种系残基取代。改型 2 轻链和重链的 Kabat 编号分别与表 13 和 14 所述相同, 除了改型 2 轻链的残基 1 为天冬氨酸(D), 重链的残基 74 为丝氨酸(S), 重链的残基 77 为苏氨酸(T), 重链的残基 89 为缬氨酸(V)。人源化 3D6 改型 1 轻链和重链的核苷酸序列分别见序列 SEQ ID NO: 34 和 36。人源化 3D6 改型 2 轻链和重链的核苷酸序列分别见序列 SEQ ID NO: 35 和 37。

实施例 IX: 人源化 3D6 抗体的功能试验

人源化 3D6v1 结合聚集态 A β 。人源化 3D6v1 的功能性试验通过来自瞬时转染的 COS 细胞的条件培养基来进行。该细胞用嵌合重链+人源化轻链或嵌合轻链+人源化重链混合物的全嵌合抗体以及最终用完全人源化抗体转染。条件培养基通过 ELISA 试验测试其对聚集态 A β 1-42 的结合。人源化抗体在实验误差内显示出良好的活性, 且显示出与嵌合 3D6 参照样品不能区分的结合特性。结果显示在表 16 中。

表 16:

ng/ml	嵌合的	hu VH/ ChVL	ChVH/ HuVL	Hu VH/ HuVL
690			0.867	
600				0.895
260	0.83			
230			0.774	
200				0.81
190		0.811		
87	0.675			
77			0.594	
67				0.689
63		0.648		
29	0.45			
25			0.381	
22				0.496
21		0.438		
9.6	0.251			
8.5			0.198	
7.4				0.278
7		0.232		
3.2	0.129			
2.3		0.124		

为了比较人源化 3D6v1 和 3D6v2 抗体的结合亲和力，利用聚集态 A β 作为抗原进行 ELISA 分析。结果显示 3D6v1(H1L1)和 3D6v2(H2L2)具有几乎完全相同的 A β 结合特性(附图 5)。

h3D6v2 的替代网(rNET)分析。 rNET 表位图谱分析提供了关于在表位中的单个残基对抗体的综合结合活性的贡献的信息。 rNET 分析利用了合成的系统的单一取代的肽类似物。被测试抗体的结合被测定抗天然肽(天然抗原)和抗 19 个可选择的“单一取代”肽，每一个肽在第一位置用该位置的 19 个非天然氨基酸之一取代。一种分布图被产生来反映不同非天然残基位置取代的影响。在沿着抗原肽的连续位置同样地产生分布图。联合的分布图，或表位图谱，（反映所有 19 个非天然残基的每一位置的取代）可与第二抗体的类似图谱比较。大体上类似或相同的图谱表明被比较的抗体具有相同或相似的表位特异性。

此分析被用于 3D6 和人源化 3D6，改型 2。抗体被测试其对天然 A β 肽 DAEFRHDSGY(SEQ ID NO:33)的结合。残基 1-8 被系统地用 19 个非天然残基的每一个在其位置进行取代。3D6 和 h3D6v2 的相应的图谱被产生。结果显示在表 17 的表格中。

表 17: A β : wt3D6 和人源化 3D6 的替换网状表位(rNET)图谱

取代	野生型 3D6 [OD]	人源化 3D6 [OD]	取代	野生型 3D6 [OD]	人源化 3D6 [OD]
残基 1 = A	0.464	0.643	残基 5 = A	0.275	0.435
C	0.450	0.628	C	0.359	0.635
D	0.577	0.692	D	0.080	0.163
E	0.576	0.700	E	0.115	0.187
F	0.034	0.062	F	0.439	0.569
G	0.569	0.738	G	0.485	0.679
H	0.054	0.117	H	0.577	0.680
I	0.048	0.118	I	0.510	0.671
K	0.033	0.057	K	0.573	0.693
L	0.073	0.148	L	0.517	0.691
M	0.039	0.072	M	0.418	0.611
N	0.587	0.757	N	0.476	0.655
P	0.069	0.144	P	0.093	0.198
Q	0.441	0.689	Q	0.388	0.565
R	0.056	0.155	R	0.613	0.702
S	0.569	0.762	S	0.487	0.633
T	0.450	0.702	T	0.530	0.639
V	0.057	0.190	V	0.493	0.562
W	0.031	0.070	W	0.393	0.461
Y	0.341	0.498	Y	0.278	0.230
残基 2 = A	0.548	0.698	残基 6 = A	0.587	0.707
C	0.553	0.694	C	0.585	0.703
D	0.119	0.222	D	0.584	0.701
E	0.563	0.702	E	0.579	0.702
F	0.577	0.717	F	0.586	0.704
G	0.527	0.720	G	0.592	0.709
H	0.534	0.741	H	0.596	0.688
I	0.522	0.722	I	0.602	0.708
K	0.548	0.722	K	0.585	0.691
L	0.482	0.705	L	0.584	0.688
M	0.535	0.705	M	0.583	0.687
N	0.525	0.735	N	0.580	0.686
P	0.445	0.707	P	0.587	0.705
Q	0.567	0.756	Q	0.570	0.695
R	0.562	0.719	R	0.576	0.686

残基 3 = A	S	0.587	0.705	S	0.573	0.689	
	T	0.552	0.712	T	0.573	0.700	
	V	0.550	0.702	V	0.588	0.715	
	W	0.553	0.701	W	0.576	0.696	
	Y	0.547	0.704	Y	0.595	0.708	
	A	0.038	0.061	残基 7 = A	0.580	0.688	
	C	0.222	0.410	C	0.559	0.676	
	D	0.019	0.027	D	0.573	0.681	
	E	0.542	0.689	E	0.565	0.677	
	F	0.034	0.060	F	0.546	0.668	
	G	0.016	0.019	G	0.562	0.679	
	H	0.016	0.020	H	0.557	0.675	
	I	0.019	0.024	I	0.552	0.681	
	K	0.053	0.090	K	0.565	0.685	
	L	0.019	0.026	L	0.566	0.701	
	M	0.019	0.027	M	0.562	0.697	
	N	0.024	0.032	N	0.573	0.688	
	P	0.017	0.020	P	0.582	0.678	
	残基 4 = A	Q	0.153	0.406	Q	0.563	0.679
		R	0.015	0.023	R	0.551	0.677
S		0.016	0.021	S	0.563	0.674	
T		0.015	0.019	T	0.560	0.685	
V		0.016	0.021	V	0.563	0.687	
W		0.149	0.304	W	0.547	0.685	
Y		0.016	0.020	Y	0.560	0.682	
A		0.016	0.020	残基 8 = A	0.573	0.687	
C		0.020	0.023	C	0.583	0.700	
D		0.017	0.020	D	0.586	0.697	
E		0.016	0.021	E	0.601	0.701	
F		0.557	0.703	F	0.586	0.687	
G		0.016	0.020	G	0.569	0.681	
H		0.470	0.723	H	0.559	0.683	
I		0.119	0.360	I	0.568	0.686	
K		0.015	0.018	K	0.557	0.698	
L		0.559	0.716	L	0.570	0.686	
M		0.549	0.725	M	0.571	0.693	
N		0.085	0.089	N	0.573	0.700	
P		0.030	0.056	P	0.574	0.694	
Q	0.065	0.110	Q	0.590	0.703		
R	0.016	0.019	R	0.589	0.699		
S	0.026	0.031	S	0.599	0.719		
T	0.016	0.021	T	0.586	0.689		
V	0.213	0.494	V	0.578	0.688		
W	0.291	0.568	W	0.567	0.687		
Y	0.529	0.730	Y	0.574	0.680		

显著地，当注意每一位置的取代时，3D6 和 h3D6v2 的分布图实质上是相同的(即，当比较栏 1 (3D6)和栏 2(h3D6v2)的数据时，值以相同的方式波动)。这些数据证实了 h3D6v2 的特异性被保留，正如 h3D6v2 的 rNET 表位图谱与 m3D6 利用 A β 残基 1-4 和 5-8 的实质上相同性。

PDAPP 脑切片的免疫组织化学分析证实了 h3D6v1 抗体的特异性。人源化 3D6v1 抗体识别来自 PDAPP 小鼠的恒冷箱脑切片的 A β 。人源化 3D6v1 和 PK1614 以相同的剂量反应方式结合于 PDAPP 斑，通过测定每玻片荧光的量（像素的定量测定）对用于染色组织的抗体的量(附图 6)。相同的抗人第二抗体被用于此实验中。切片、染色和成像的方法如前面所述。在相同的试验中，h3D6v2 对 PDAPP 和 AD 脑切片的污染的成像分析表明 h3D6v2 以与 3D6v1 类似的方式识别 A β 斑(例如，高度修饰斑)。

h3D6 的竞争性结合分析。h3D6 抗体 v1 和 v2 与鼠 3D6 竞争性结合的能力通过 ELISA 利用生物素酰化的 3D6 抗体来测定。竞争性结合分析表明 h3D6v1, h3D6v2, 和嵌合 PK1614 均可与 m3D6 竞争性结合 A β (附图 7)。h3D6v1 和 h3D6v2 与 3D6 竞争性结合 A β 的能力是相同的。10D5 抗体被用作阴性对照，因为其具有与 3D6 不同的结合表位。BIAcore 分析也显示了 h3D6v1 和 h3D6v2 高度结合 A β 的亲合力(表 18)。

表 18: 利用 BIAcore 技术测定 A β 抗体的亲合力

抗体	ka1(1/Ms)	kd1(1/s)	Kd(nM)
Mu 3D6	4.06E +05	3.57E-04	0.88
嵌合 3D6	4.58E+05	3.86E-04	0.84
Hu 3D6v1	1.85E+05	3.82E-04	2.06
Hu 3D6v2	1.70E+05	3.78E-04	2.24

与具有 0.88 nM Kd 的 3D6 相比，h3D6v1 和 h3D6v2 具有大约小 2 到 3 倍的结合亲合力，测定 h3D6v1 和 h3D6v2 分别具有 2.06 nM 和

2.24 nM 的 K_d 。ELISA 竞争性结合试验表明 h3D6v1 和 h3D6v2 具有大约小 6-倍的结合亲和力。典型的，人源化抗体与其鼠的相应抗体比较损失大约 3-4 倍的结合亲和力。因此 h3D6v1 和 h3D6v2 的大约 3 倍（ELISA 和 BIAcore 结果的平均值）的损失是在可接受的范围内。

h3D6v2 抗体的离体试验。h3D6v2 刺激小神经胶质细胞的能力通过离体吞噬作用试验被测定(附图 8)。h3D6v2 与嵌合 3D6 在诱导来自 PDAPP 小鼠脑组织的 $A\beta$ 的吞噬作用中是同样有效的。IgG 在此实验中被用作阴性对照，因为其不能够结合 $A\beta$ 且因此不能够诱导吞噬作用。

h3D6 在体内脑中的定位。 ^{125}I 标记的 h3D6v2, m3D6, 和抗体 DAE13 在单独的实验中各自被 IV-注射到 14 个独立的 PDAPP 小鼠中。第 7 天后处死小鼠并灌注用于进一步的分析。其脑区被切割并测定在特异性脑区域的 ^{125}I 活性。脑中的放射性标记的活性与血清样品中的活性比较。血清和脑区域的结果分别显示在表 19 和 20 中。

表 19

M3D6	DAE13	Hu3D6
30389.1	17463.9	40963.8
12171	13200.6	24202.2
3418.2	36284.7	12472.4
18678.9	421.3	33851.8
27241	19702	27187.3
26398.8	24855.8	29016.9
27924.8	29287.4	33830.7
12008.4	12733.1	26734.9
29487.8	27722.5	30144.5
25498.6	30460.7	35126.9
9652	23320.1	28414.8
24599.3	7119.1	16956.1
29240	28093.5	18190.7
11922.7	24659.7	25671.4
17443.1	26748.9	

表 20

m3D6			DAE13			Hu3D6(H2L2)		
小脑	皮层	海马	小脑	皮层	海马	小脑	皮层	海马
1991.9	1201.1	4024	1277.5	2522.9	5711.9	2424.6	3759.4	11622
238.9	746.1	2523	502.5	2123.5	6965.8	1509.8	2274.9	7018.2
645.9	603	1241.1	2325	3528.2	7801.6	500	2265.9	5316.3
1000	2508.2	4644.2	232.7	849.8	1891.9	2736.2	5703.7	10395.5
1266.9	3737.9	7975.8	891.6	2621	8245.2	1192.2	3188	10170
1422	2398.7	7731.1	1102.6	2087.5	7292.3	2269.4	3481.4	9621.6
1700.4	2154.4	7124.1	1650.6	3488.4	10284.8	1526.7	3028	8331.3
542.5	812.4	2456.8	712.9	2318.5	6643.3	1538.1	4194.1	11244.8
1309	3010.5	8693.5	1172.9	1953.6	7363	1245.7	1699.4	6831.2
1372.2	997.5	2425.4	1067.9	3697.2	12280.7	2708.8	2789	7887.4
778.6	1291.9	5654.4	1952.2	2120.7	6412.7	2251.3	3897.5	11121.5
1199.3	1683.4	4887.3	1005.2	1852.5	5121.4	1529.6	1772.2	7986.9
1021.8	3234.5	8036.2	961.5	3382.9	8473.1	644.1	1663.4	5056.5
742.1	1056.7	3405.2	852.3	1943.2	6717.4	1516.4	1620.6	9888
1273.7	1320.8	4262.6	997.5	3065.7	10213.1			

数据表明 h3D6v2 集中到脑中，且特别聚集在已知 A β 集中的海马区。m3D6 和 DAE13 的脑部计数与 h3D6v2 可比。通过体内的 A β 斑结合证实所有的三种抗体能够通过血脑屏障。

实施例 X. 小鼠 10D5 可变区的克隆和测序

10D5 VH 的克隆和序列分析. 来自杂交瘤细胞的 10D5 的 VH 和 VL 区通过 RT-PCR 利用 5' RACE 法克隆。得自两个独立的编码假定 10D5 VL 区的 cDNA 克隆的核苷酸序列(SEQ ID NO:13)以及推导的氨基酸序列(SEQ ID NO:14), 被列在表 21 和附图 9 中。得自两个独立的编码假定 10D5 VH 区的 cDNA 克隆的核苷酸序列(SEQ ID NO:15)以及推导的氨基酸序列(SEQ ID NO:16), 被列在表 22 和附图 10 中。10D5 VL 和 VH 序列满足功能性 V 区的条件就需含有一个与 C 区的启动甲硫氨酸邻近的 ORF, 且具有免疫球蛋白 V 区基因的保守残基的特性。

表 21: 小鼠 10D5 VL DNA 序列

ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTACTGATGTTCTGGATT
CCTGCTTCCAGCAGTGATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCC
 CTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCT
 AGTCAGAACATTATACATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAATG
 GTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAA
 AGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAG
 TGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAAGAAAGTGGAGG
 CTGAGGATCTGGGAATTTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTC
 CGCTCACGTTCCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGGAA (SEQ ID
 NO:13)

*前导肽加下划线

表 22: 小鼠 10D5 VH DNA 序列

ATGGACAGGCTTACTTCCTCATTCCCTGCTGCTGATTGTCCCT
GCATATGTCCTGTCCCAGGCTACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGA
 ATATTGCAGTCTCCAGACCCTCAGTCTGACTTGTTCTTTCTCTG
 GGTTTTCACTGAGCACTTCTGGTATGGGAGTGAGCTGGATTCGTC
 AGCCTTCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGCACACATTTACTGG
 GATGATGACAAGCGCTATAACCCATCCCTGAAGAGCCGGCTCAC
 AATCTCCAAGGATACCTCCAGAAAGCAGGTATTCCTCAAGATCAC
 CAGTGTGGACCCTGCAGATACTGCCACATACTACTGTGTTCTGAAG
 GCCATTACTCCGGTACTAGTCGATGCTATGGACTACTGGGGTCA
 AGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:15)

*前导肽加下划线.

实施例 XI. 人受试者的预防和治疗

进行单剂量 I 期试验确定在人体内的安全性。以逐步增加的剂量对不同患者给药治疗药物，从推测功效的水平约 0.01 开始，以 3 为系数增长，直到达到 10 倍有效小鼠剂量的水平。

进行 II 期试验确定治疗的功效。挑选利用阿尔茨海默氏病和相关病症协会 (ADRD) 为可能发生的 AD 制定的标准确定的患早期到中度阿尔茨海默氏病的患者。按照做微精神状态检查 (MiniMental State Exam, MMSE), 合适的患者的得分在 12—26 范围内。其它选择标准是, 患者在研究期间容易生存, 且不会出现复杂问题, 例如可能带来干扰的伴随药物的使用。利用典型心理测量法例如 MMSE、ADAS 对患者功能作基线评价, 这些方法对于评价阿尔茨海默氏病的状况和功能是一种综合判断。这些心理测量标准能够测量阿尔茨海默氏病的发展。合适的定性生命标准也可以用来监测治疗。还可以通过 MRI 监测疾病的发展。也可以监测患者的血液状况, 包括分析免疫原特异性抗体和 T 细胞应答。

测定基线后, 患者开始接受治疗。将其完全打乱, 以双盲方式用治疗药物或安慰剂治疗。至少每六个月监测患者一次。通过进展中治疗组相对于安慰剂组的有效降低来确定效果。

进行第二次 II 期试验, 评价患者从非阿尔茨海默氏病的早期记忆丢失, 有时被称为年龄有关的记忆损伤 (AAMI) 或轻度认知损伤 (MCI) 到经 ADRDA 标准确定为可能的阿尔茨海默氏病的转变。通过筛选参照群体的记忆丢失早期迹象或其它与前阿尔茨海默氏病症候学、阿尔茨海默氏病的家族史、遗传危险因素、年龄、性别和已发现的其它预示阿尔茨海默氏病高危特征有关的不利特征, 从非临床群体中选择具有转化成阿尔茨海默氏病高风险的患者。收集基于包括 MMSE 和 ADAS 的合适法则和其它设计用来评价较为正常群体法则的基线积分。将这些患者群体分成合适的安慰剂对交替剂量药物组。以间隔约六个月, 对这些患者群体进行跟踪, 终点是每个患者到观察结束时他或她是否转化成按照 ADRDA 标准判断的可能的阿尔茨海默氏病。

一般材料和方法

A.多克隆和单克隆 A β 抗体的制备

从两组动物采集的血液中制备抗 A β 多克隆抗体。第一组含有 6-8 周龄的 100 只雌性 Swiss Webster 小鼠。在 0、15 和 29 天用 100 μ g 与 CFA/IFA 组合的 AN1792 免疫。第 36 天进行第四次注射，给药一半剂量的 AN1792。第 42 天放血法处死动物，制备血清，共收集血清 64ml。第二组含有 24 只 6-9 周龄的雌性小鼠，与 PDAPP 小鼠等基因，但对于人 APP 基因是非转基因的。在 0、14、28 和 56 天用 100 μ g 与 CFA/IFA 组合的 AN1792 免疫。第 63 天放血法处死动物，制备血清，共收集血清 14ml。混合这两种血清。使用 50%饱和硫酸铵进行两次连续的沉淀作用，以纯化抗体组分。最终的沉淀物在 PBS 中透析并检测内毒素。内毒素的水平小于 1EU/mg。

抗 A β 单克隆抗体制备于腹水液。冰冷的腹水液中加入浓缩的硫酸葡聚糖钠盐进行脱脂，在冰上搅动使终浓度为 0.238%。搅动加入浓缩的 CaCl₂，使其终浓度为 64 mM。10000xg 离心该溶液，弃沉淀。在冰上搅动逐滴加入等体积的饱和硫酸铵于上清液中。10000xg 再次离心该溶液，丢弃上清液。沉淀重悬并透析于 20 mM Tris-HCl, 0.4M NaCl 中，pH7.5。此部分上 Pharmacia FPLC Sepharose Q 柱，并以反向梯度从 0.4M 到 0.275M NaCl（溶于 20mM Tris-HCl, pH7.5）洗脱。

抗体的峰值可以通过 280 纳米的吸收被鉴定，从而收集合适的部分。通过 BCA 方式测定蛋白浓度，以及 SDS-PAGE 测定纯度，从而对纯化的抗体制备物进行定性。也检测抗体池的内毒素。内毒素水平低于 1EU/mg。低于 100 的效价被任意地给一个 25 的效价值。

B.抗体效价的测定

在小鼠尾静脉切开小口取血，采集约 200 μ l 血置于微量离心管。豚鼠如下取血，首先剃去后腿背面的毛，然后用 18 号针头划破跖骨静脉，采血于微量离心管。室温下（RT）静置 1 小时使血液凝结成块，旋涡振荡，然后在 14000xg 离心 10 分钟，将血块从血清中分离出来。

然后将血清转移到干净的微量离心管中，4℃储存直到测定效价。

用 ELISA 测定抗体效价。在 Well 包被缓冲液（0.1M 磷酸钠，pH 8.5，0.1%叠氮化钠）中含有 10 μg/ml Aβ42 或 SAPP 或如各单独报道的其它抗原的 100 μl 溶液包被 96 孔微滴定板（Costar EIA 平板），室温过夜。吸干各孔，从 1/100 稀释度的样品稀释液（0.014 M 磷酸钠、pH7.4、0.15 M NaCl、0.6%牛血清白蛋白、0.05%硫柳汞）开始向孔中加入血清。以三倍的跨度制备七个连续稀释度的样品，置于平板中，终稀释度为 1/218700。稀释液在经包被的平板的孔中室温保温 1 小时。然后用含 0.05%吐温 20 的 PBS 冲洗四次。将第二抗体，结合辣根过氧化物酶的羊抗小鼠 Ig（获自 Boehringer Mannheim），作为 100 μl 的 1/3000 稀释度的样品稀释液加到孔中，室温保温 1 小时。再次用 PBS、吐温 20 冲洗平板四次。为了形成色原体，将 100 μl 的 Slow TMB（3,3',5,5'-四甲基对二氨基联苯，获自 Pierce Chemicals）加入各孔，室温保温 15 分钟。加入 25 μl 的 2 M H₂SO₄ 终止反应。然后在 Molecular Devices Vmax 装置上读取 450 nm-650 nm 处的光密度。

效价被定义为得到最大 OD 一半时血清稀释度的倒数。最大 OD 通常取自起始的 1 / 100 稀释液，除非该条件下具有非常高的效价，在这种情况下，需要建立较高起始稀释度的最大 OD。如果 50%的点落在两个稀释液之间，则利用线性外推法计算最终效价。为了计算几何平均抗体效价，低于 100 的效价被任意地指定效价值为 25。

C.脑组织制备

无痛处死后取脑，一个脑半球准备进行免疫组织化学分析，解剖另一个脑半球的三个脑区（海马、皮层和小脑）用于利用特异性 ELISA 测定各种 Aβ蛋白质和 APP 型的浓度(Johnson-Wood 等，同上)。

将用于 ELISA 的组织在 10 体积的冰冷胍缓冲液（5.0M 胍-盐酸，50 mM Tris-HCl, pH 8.0）中匀浆。匀浆液利用 Adams Nutator(Fisher)

温和搅拌，室温下混合 3 到 4 小时，然后于-20℃储藏，留待定量 A β 和 APP 时使用。前面的试验已经表明，在该储藏条件下，分析物是稳定的，当合成的 A β 蛋白 (Bachem) 掺入同窝生小鼠的对照脑组织匀浆中时，可以定量提取(Johnson-Wood 等，同上)。

D. A β 水平的测定

用冰冷却的酪蛋白稀释液 (0.25%酪蛋白、PBS、0.05%叠氮化钠、20 μ g/ml 抑酶肽、5 mM EDTA pH 8.0, 10 μ g/ml 亮肽素) 以 1: 10 稀释脑匀浆，然后在 4℃，16000 \times g 离心 20 分钟。制备合成的 A β 蛋白质标准品 (1-42 氨基酸) 和 APP 标准品，使终组合物中包括 0.5 M 胍和 0.1%牛血清白蛋白 (BSA)。“总” A β 夹心 ELISA 利用单克隆抗体 266，特异于 A β 第 13-28 位的氨基酸 (Seubert 等，同上) 作为捕捉抗体，和生物素酰化的单克隆抗体 3D6，特异于 A β 第 1-5 位的氨基酸 (Johnson-Wood 等，同上) 作为报道抗体。3D6 单克隆抗体不能识别分泌型 APP 或全长 APP，仅可检测氨基末端为天冬氨酸的 A β 类型。该分析法灵敏度下限约为 50ng/ml(11nM)，不与浓度至多 1 ng/ml 内源性鼠 A β 蛋白质表现交叉反应性 (Johnson-Wood 等，同上)。

A β 1-42 特异性夹心 ELISA 采用 mA β 21F12，特异于 A β 的氨基酸 33-42 (Johnson-Wood 等，同上) 作为捕捉抗体。该分析同样用生物素酰化的 mA β 3D6 作为报道抗体，其灵敏度下限约为 125 μ g/ml (28 μ M, Johnson-Wood 等，同上)。当进行 A β ELISA 时，用 100 μ l mA β 266 (10 μ g/ml) 或 mA β 21F12(5 μ g/ml) 包被 96 孔的免疫测试平板 (Costar)，室温下保温过夜。通过抽吸除去溶液，向各孔中加入 200 μ l 0.25% 的人血清蛋白 PBS 溶液，于室温将各孔封闭至少 1 小时。除去封闭液，在 4℃ 下储藏干燥的平板直到使用。在使用前用冲洗缓冲液 (Tris-缓冲盐水 (0.15 M NaCl, 0.01 M Tris-HCl, pH 7.5) 加 0.05%吐温 20) 使平板再水化。将样品和标准品以每孔 100 μ l 三等份加入，然后于 4℃ 保温过夜。分析的每个步骤之间用冲洗缓冲液至少冲洗平板三次。加入生物素酰化的 mA β 3D6 (用酪蛋白分析缓冲液 (0.25%酪蛋白, PBS,

0.05%吐温 20, pH 7.4) 稀释到 $0.5 \mu\text{g/ml}$, 室温下保温 1 小时。将抗生物素蛋白-辣根过氧化物酶结合物((抗生物素蛋白-HRP 得自 Vector, Burlingame, CA) 用酪蛋白分析缓冲液以 1:4000 的比例稀释) 加到孔中, 室温保持 1 小时。加入比色物质, Slow TMB-ELISA (Pierce), 使反应在室温下进行 15 分钟, 之后, 加入 $25 \mu\text{l}$ $2 \text{ N H}_2\text{SO}_4$ 终止反应。利用 Molecular Devices Vmax 装置读取 450 nm 和 650 nm 处的吸收度差值, 定量反应产物。

E. APP 水平的测定

应用了两种不同 APP 测定法。其一种分析被命名为 APP- α /FL, 识别 APP- α 和 APP 的全长型 (FL)。第二种分析特异于 APP- α 。APP- α /FL 分析法识别包括 A β 的前 12 个氨基酸的分泌型 APP。因为报道抗体 (2H3) 对存在于 APP⁶⁹⁵ 第 612-613 位的氨基酸之间(Esch 等, Science 248:1122-1124(1990))的 α -发夹-位点不具有特异性;因此该分析也可以识别全长 APP (AP-FL)。利用针对 APP-FL 细胞质末端的固定 APP 抗体消耗脑匀浆 APP-FL 的初步试验表明, 约 30-40%的 APP- α /FL APP 是 FL(数据未显示)。APP- α /FL 和 APP- α 分析的捕捉抗体均为 mAb 8E5, 其针对 APP⁶⁹⁵ 型第 444 到 592 位的氨基酸 (Games 等, 同上)。用于 APP- α /FL 分析的报道 mAb 是 mAb 2H3, 其特异于 APP⁶⁹⁵ 第 597-608 位的氨基酸 (Johnson-Wood 等, 同上), APP- α 分析的报道抗体是 mAb 16H9 的生物素酰化衍生物, 其针对 APP 第 605-611 位的氨基酸。APP- α /FL 分析的灵敏度下限约为 11 ng/ml (150 pM)(Johnson-Wood 等), APP- α 特异性分析的灵敏度下限约为 22 ng/ml (0.3 nM)。对于这两种 APP 检测, 如前面 mAb 266 所述, 将 mAb 8E5 包被到 96 孔 EIA 平板上。纯化的重组分泌型 APP- α 用作 APP- α 分析和 APP- α / FL 分析的参照标准品 (Esch 等, 同上)。5 M 胍中的脑匀浆样品用 ELISA 样品稀释液 (0.014 M 磷酸盐缓冲液, pH 7.4, 0.6%牛血清白蛋白, 0.05% 硫柳汞, 0.5 M NaCl , 0.1% NP40) 以 1:10 的比例稀释。然后用含 0.5 M 胍的样品稀释液以 1:4 的比例稀释它们。然后在室温下, $16000 \times g$ 离心稀释的匀浆 15 秒。将 APP 标准品和样

品平行两份加入平板，室温下保温 1.5 小时。将生物素酰化的报道抗体 2H3 或 16H9 与样品一起在室温下保温 1 小时。链霉抗生物素蛋白-碱性磷酸酶(Boehringer Mannheim)，在样品稀释液中稀释 1000 倍，加入孔中室温下保温 1 小时。加入荧光物质 4-甲基-umbelliperyl-磷酸酯，室温下保温 30 分钟，在 Cytofluor tm 2350 荧光计 (Millipore) 上在激发光 365 nm 和发射光 450 nm 处对平板读数。

F.免疫组织化学

脑在 4%多聚甲醛的 PBS 液中于 4℃固定三天，然后在 1%多聚甲醛 PBS 液中于 4℃储存 1 到 7 天，直到被切片。在振动切片机上室温下将其切成 40 微米厚的冠状切片，在防冻剂（30%甘油，30%乙二醇，在磷酸缓冲液中）中于 -20 °C 储存直到进行免疫组织化学处理。对于每个脑，在背侧海马水平上的六个切片，连续间隔 240 μ m 彼此分离，与下述之一的抗体中一起温育过夜：（1）生物素酰化的抗-Aβ(mAb, 3D6, 特异于人 Aβ) 在 PBS 和 1%马血清中稀释到浓度为 2 μ g/ml;或（2）特异于人 APP 的生物素酰化的 mAb, 8E5, 在 PBS 和 1.0%马血清中稀释到浓度为 3 μ g/ml;或（3）特异于神经胶质纤丝酸性蛋白质的 mAb(GFAP; Sigma Chemical Co.)，用含 0.25% Triton X-100 和 1%马血清的 Tris-缓冲盐水 (pH7.4) (TBS)以 1:500 的比例稀释;或（4）特异于 CD11b (MAC-1 抗原)的 mAb(Chemicon International),用 0.25% Triton X-100 和 1%兔血清的 TBS 液以 1:100 的比例稀释;或（5）特异于 MHC II 抗原的 mAb (Pharmingen)，用含 0.25% Triton X-100 和 1%兔血清的 TBS 液以 1:100 的比例稀释;或（6）特异于 CD 43 的大鼠 mAb(Pharmingen), 用含 1%兔血清的 PBS 液以 1:100 的比例稀释;或（7）特异于 CD 45RA 的大鼠 mAb (Pharmingen)，用含 1%兔血清的 PBS 液以 1:100 的比例稀释;或（8）特异于 CD 45RB 的大鼠单克隆 Aβ(Pharmingen), 用含 1%兔血清的 PBS 液以 1:100 的比例稀释: 或（9）特异于 CD 45 的大鼠单克隆 Aβ (Pharminge)，用含 1%兔血清的 PBS 液以 1:100 的比例稀释;或（10）特异于 CD3e 的生物素酰化多克隆仓鼠 Aβ (Pharmingen)，用含 1%兔血清的 PBS 液以 1:100 的比

例稀释;或(11)特异于 CD 3 的大鼠 mAb (Serotec), 用含 1%兔血清的 PBS 液以 1:200 的比例稀释;或(12)含 1%正常马血清的无一级抗体的 PBS 溶液。

与上面所列的 1、2 和 6-12 号抗体溶液反应的切片首先用含 1.0% Triton X-100, 0.4%过氧化氢的 PBS 液在室温下预处理 20 分钟, 以阻断内源性过氧化物酶。接着将它们与一级抗体在 4℃下保温过夜。然后使与 3D6 或 8E5 或 CD3e mAb 反应的切片在室温下与辣根过氧化物酶-抗生物素蛋白-生物素-复合物与用 PBS 稀释 75 倍的试剂盒成分“ A ”和“ B ” (Vector Elite Standard Kit, Vector Labs, Burlingame, CA) 一起反应 1 小时。与特异于 CD 45RA、 CD 45RB、 CD45、 CD3 的抗体和无一级抗体的 PBS 溶液反应的切片分别与在 PBS 中稀释为 1:75 的生物素酰化的抗-大鼠 IgG (Vector), 或者在 PBS 中稀释为 1:75 的生物素酰化的抗-小鼠 IgG (Vectot) 一起在室温下保温 1 小时。然后将切片与辣根过氧化物酶-抗生物素蛋白-生物素-复合物与试剂盒成分“ A ”和“ B ” (用 PBS 稀释 75 倍) (Vector Elite Standard Kit, Vector Labs, Burlingame, CA) 在室温下反应 1 小时。

将切片置于 0.01%过氧化氢、0.05% 3,3'-二氨基联苯 (DAB) 中室温下。用于与 GFAP-、 MAC-1-和 MHC II-特异性抗体一起保温的切片首先用 0.6%过氧化氢在室温下预处理, 以阻断内源性过氧化物酶, 然后与一级抗体在 4℃下保温过夜。与 GFAP 抗体反应的切片与在 TBS 中稀释成 1:200 的生物素酰化的马抗-小鼠 IgG (Vector Laboratories;Vectastain Elite ABC 试剂盒) 在室温下保温 1 小时。接着将切片与在 TBS 中稀释成 1:1000 的抗生物素蛋白-生物素-过氧化物酶复合物 (Vector Laboratories;Vectastain Elite ABC 试剂盒) 反应 1 小时。接着将与 MAC-1 或 MHCII-特异性单克隆抗体作为一级抗体一同保温的切片与在 TBS 中稀释成 1:200 的生物素酰化的兔抗-大鼠 IgG 在室温下反应 1 小时, 随后与在 TBS 中稀释成 1:1000 的抗生物素蛋白-生物素-过氧化物酶复合物保温 1 小时。然后将与 GFAP-、 MAC-1-或

MHC II-特异性抗体一同保温的切片用 0.05%DAB、0.01%过氧化氢、0.04%氯化镍、TBS 液分别在室温下处理 4 和 11 分钟，使它们显色。

将免疫标记的切片在载玻片（VMR Superfrost 玻片）上制作成标本，空气干燥过夜，在 ProPar（Anatech）中浸渍，然后加盖玻片覆盖，用 Permount（Fisher）作为标本介质封固。

为了复染色 A β 斑，将 GFAP-阳性切片亚组在免疫组织化学处理后置于 Superfrost 载玻片上制作成标本，在 1%硫黄素 S(Thioflavin S)（Sigma）水溶液中保持 7 分钟。然后使切片脱水，在 Propar 中使其清晰，然后加盖玻片覆盖，用 Permount 封固。

G.成像分析

通过 CCD 摄像机和索尼特丽珑显示器连接于尼康 Microphot FX 显微镜的 Videometric 150 型图像分析系统(Oncor, Inc., Gaithersburg, MD)被用来定量免疫反应切片。切片的图像储存于影象缓冲区中，确定基于颜色和饱和度的阈值以选择和计算免疫标记结构物所占据的总像素面积。对于每个切片，人工描绘出海马区轮廓，计算海马区占据的总像素面积。如下测定淀粉样沉积百分率：（含与 mAb 3D6 具有免疫反应性的 A β 沉积物的海马区面积的分数的分数）x 100。同样，神经炎性沉积的百分率如下测定：（含与单克隆抗体 8E5 具有反应性的营养不良性神经突的海马区面积的分数的分数）x 100。运行 Simple 32 软件应用程序的 C-成像系统（Compix, Inc., Cranberry Township, PA）通过 Optronics 照相机连接于 Nikon Microphot FX 显微镜，用于定量 GFAP-阳性星形胶质细胞和 MAC-1 和 MHC II-阳性小胶质细胞占据的夹肌后（retrosplenial）皮层的百分率。免疫反应切片的图像储存于显影缓冲区中，确定单色阈值，以选择和计算免疫标记细胞占据的总像素面积。对于每个切片，手工绘制除夹肌后皮层（RSC）的轮廓，然后计算 RSC 占据的总像素面积。星形胶质细胞增多（astrocytosis）百分率如下确定：（GFAP-反应性星形胶质细胞占据的 RSC 的分数）x 100。同样，小胶质

细胞增多 (microgliosis) 百分率如下确定: (MAC-1 或 MHC II-反应性小胶质细胞占据的 RSC 的分数) x 100。对于所有的图像分析, 定量每个动物的背侧海马水平上的六个切片 (彼此连续以 240 μ m 的间隔分隔)。在所有的情况下, 动物的治疗状况对于观察者都是未知的。

尽管为了便于清楚理解, 前面已经详细描述了本发明, 但显然可以在权利要求范围内进行某些改动。本文为各种目的引证的所有出版物和专利文献以及附图和序列列表所示的文本以其全文内容引入作为参考。

根据前文, 显然本发明提供了多种用途。例如, 本发明提供了以上所述的 A β 抗体在致淀粉样病的治疗、预防或诊断中的应用, 或在用于相同疾病的药物或诊断组合物制备中的应用。

序列表

<110> 神经实验室有限公司 (Neuralab Limited)

<120> 识别 β 淀粉样肽的人源化抗体 (Humanized Antibodies that Recognize Beta-Amyloid Peptide)

<130> SPI065299-47

<150> 60/251,892

<151> 2000-12-06

<160> 63

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 396

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(396)

<221> sig_peptide

<222> (1)...(60)

<400> 1

atg atg agt cct gcc cag ttc ctg ttt ctg tta gtg ctc tgg att cgg	48
Met Met Ser Pro Ala Gln Phe Leu Phe Leu Leu Val Leu Trp Ile Arg	
-20	-15
	-10
	-5
gaa acc aac ggt tat gtt gtg atg acc cag act cca ctc act ttg tcg	96
Glu Thr Asn Gly Tyr Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser	
	1
	5
	10
gtt acc att gga caa cca gcc tcc atc tct tgc aag tca agt cag agc	144
Val Thr Ile Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser	
	15
	20
	25
ctc tta gat agt gat gga aag aca tat ttg aat tgg ttg tta cag agg	192
Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg	
	30
	35
	40
cca ggc cag tct cca aag cgc cta atc tat ctg gtg tct aaa ctg gac	240
Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp	
	45
	50
	55
	60
tct gga gtc cct gac agg ttc act ggc agt gga tca ggg aca gat ttt	288
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe	
	65
	70
	75
aca ctg aaa atc agc aga ata gag gct gag gat ttg gga ctt tat tat	336
Thr Leu Lys Ile Ser Arg Ile Glu Ala Glu Asp Leu Gly Leu Tyr Tyr	
	80
	85
	90

tgc tgg caa ggt aca cat ttt cct cgg acg ttc ggt gga ggc acc aag 384
 Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 95 100 105

ctg gaa atc aaa 396
 Leu Glu Ile Lys
 110

<210> 2
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> SIGNAL
 <222> (1)...(20)

<400> 2
 Met Met Ser Pro Ala Gln Phe Leu Phe Leu Leu Val Leu Trp Ile Arg
 -20 -15 -10 -5
 Glu Thr Asn Gly Tyr Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser
 1 5 10
 Val Thr Ile Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
 15 20 25
 Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg
 30 35 40
 Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp
 45 50 55 60
 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 65 70 75
 Thr Leu Lys Ile Ser Arg Ile Glu Ala Glu Asp Leu Gly Leu Tyr Tyr
 80 85 90
 Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 95 100 105
 Leu Glu Ile Lys
 110

<210> 3
 <211> 414
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(414)

<221> sig_peptide
 <222> (1)...(57)

<400> 3
 atg aac ttc ggg ctc agc ttg att ttc ctt gtc ctt gtt tta aaa ggt 48
 Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Val Leu Val Leu Lys Gly
 -15 -10 -5

gtc cag tgt gaa gtg aag ctg gtg gag tct ggg gga ggc tta gtg aag 96
 Val Gln Cys Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
 1 5 10

cct gga gcg tct ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttc 144

```

Pro Gly Ala Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
  15                20                25

agt aac tat ggc atg tct tgg gtt cgc cag aat tca gac aag agg ctg 192
Ser Asn Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Asn Ser Asp Lys Arg Leu
  30                35                40                45

gag tgg gtt gca tcc att agg agt ggt ggt ggt aga acc tac tat tca 240
Glu Trp Val Ala Ser Ile Arg Ser Gly Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser
                50                55                60

gac aat gta aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gag aat gcc aag aac 288
Asp Asn Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn
                65                70                75

acc ctg tac ctg caa atg agt agt ctg aag tct gag gac acg gcc ttg 336
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Leu
                80                85                90

tat tat tgt gtc aga tat gat cac tat agt ggt agc tcc gac tac tgg 384
Tyr Tyr Cys Val Arg Tyr Asp His Tyr Ser Gly Ser Ser Asp Tyr Trp
                95                100                105

ggc cag ggc acc act gtc aca gtc tcc tca 414
Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
110                115

```

```

<210> 4
<211> 138
<212> PRT
<213> Mus musculus

```

```

<220>
<221> SIGNAL
<222> (1)...(19)

```

```

<400> 4
Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Val Leu Val Leu Lys Gly
          -15                -10                -5
Val Gln Cys Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
          1                5                10
Pro Gly Ala Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
  15                20                25
Ser Asn Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Asn Ser Asp Lys Arg Leu
  30                35                40                45
Glu Trp Val Ala Ser Ile Arg Ser Gly Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser
                50                55                60
Asp Asn Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn
                65                70                75
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Leu
                80                85                90
Tyr Tyr Cys Val Arg Tyr Asp His Tyr Ser Gly Ser Ser Asp Tyr Trp
                95                100                105
Gly Gln Gly Thr Thr Ile Thr Val Ser Ser
110                115

```

```

<210> 5
<211> 132
<212> PRT

```


<213> Artificial Sequence

<220>

<221> SIGNAL

<222> (1)...(20)

<223> humanized 3D6 light chain variable region

<400> 5

```

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

```

<210> 6

<211> 125

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> SIGNAL

<222> (1)...(19)

<400> 6

```

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

```

<210> 7

<211> 100

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

```

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

```

<210> 8

<211> 138

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanized 3D6 heavy chain variable region

<221> SIGNAL

<222> (1)...(19)

<400> 8

```

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

```

<210> 9
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 9
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Asp Asn Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Thr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 10
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

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

<210> 11
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> SIGNAL
 <222> (1)...(20)
 <223> humanized 3D6 light chain variable region

```

<400> 11
Met Met Ser Pro Ala Gln Phe Leu Phe Leu Leu Val Leu Trp Ile Arg
-20          -15          -10          -5
Glu Thr Asn Gly Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro
          1          5          10
Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
          15          20          25
Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Lys
          30          35          40
Pro Gly Gln Ser Pro Gln Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp
45          50          55          60
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
          65          70          75
Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
          80          85          90
Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
          95          100          105
Val Glu Ile Lys
          110

```

```

<210> 12
<211> 138
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> Humanized 3D6 light chain variable region

```

```

<221> SIGNAL
<222> (1)...(19)

```

```

<400> 12
Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Val Leu Val Leu Lys Gly
          -15          -10          -5
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
          1          5          10
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
          15          20          25
Ser Asn Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
30          35          40          45
Glu Trp Val Ala Ser Ile Arg Ser Gly Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser
          50          55          60
Asp Asn Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
          65          70          75
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
          80          85          90
Tyr Tyr Cys Val Arg Tyr Asp His Tyr Ser Gly Ser Ser Asp Tyr Trp
          95          100          105
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110          115

```

```

<210> 13
<211> 393
<212> DNA
<213> Mus musculus

```

```

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(393)

<221> sig_peptide
<222> (1)...(57)

<400> 13
atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gta ctg atg ttc tgg att cct gct 48
Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
      -15                -10                -5

tcc agc agt gat gtt ttg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc 96
Ser Ser Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
      1                5                10

agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag aac att 144
Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile
      15                20                25

ata cat agt aat gga aac acc tat tta gaa tgg tac ctg cag aaa cca 192
Ile His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
      30                35                40                45

ggc cag tct cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct 240
Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
      50                55                60

ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca 288
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
      65                70                75

ctc aag atc aag aaa gtg gag gct gag gat ctg gga att tat tac tgc 336
Leu Lys Ile Lys Lys Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys
      80                85                90

ttt caa ggt tca cat gtt ccg ctc acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg 384
Phe Gln Gly Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu
      95                100                105

gag ctg gaa                                393
Glu Leu Glu
110

```

```

<210> 14
<211> 131
<212> PRT
<213> Mus musculus

```

```

<220>
<221> SIGNAL
<222> (1)...(19)

<400> 14
Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
      -15                -10                -5
Ser Ser Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
      1                5                10
Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile
      15                20                25

```

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

<210> 15
 <211> 426
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(426)

<221> sig_peptide
 <222> (1)...(57)

<400> 15
 atg gac agg ctt act tcc tca ttc ctg ctg ctg att gtc cct gca tat 48
 Met Asp Arg Leu Thr Ser Ser Phe Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr
 -15 -10 -5
 gtc ctg tcc cag gct act ctg aaa gag tct ggc cct gga ata ttg cag 96
 Val Leu Ser Gln Ala Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln
 1 5 10
 tcc tcc cag acc ctc agt ctg act tgt tct ttc tct ggg ttt tca ctg 144
 Ser Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu
 15 20 25
 agc act tct ggt atg gga gtg agc tgg att cgt cag cct tca gga aag 192
 Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys
 30 35 40 45
 ggt ctg gag tgg ctg gca cac att tac tgg gat gat gac aag cgc tat 240
 Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr
 50 55 60
 aac cca tcc ctg aag agc cgg ctc aca atc tcc aag gat acc tcc aga 288
 Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg
 65 70 75
 aag cag gta ttc ctc aag atc acc agt gtg gac cct gca gat act gcc 336
 Lys Gln Val Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Pro Ala Asp Thr Ala
 80 85 90

```

aca tac tac tgt gtt cga agg ccc att act ccg gta cta gtc gat gct 384
Thr Tyr Tyr Cys Val Arg Arg Pro Ile Thr Pro Val Leu Val Asp Ala
    95                100                105

```

```

atg gac tac tgg ggt caa gga acc tca gtc acc gtc tcc tca 426
Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
110                115                120

```

```

<210> 16
<211> 142
<212> PRT
<213> Mus musculus

```

```

<220>
<221> SIGNAL
<222> (1)...(19)

```

```

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

```

```

<210> 17
<211> 136
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> Primer

```

```

<400> 17
tccgcaagct tgccgccacc atggacatgc gcgtgcccgc ccagctgctg ggctgctga 60
tgctgtgggt gtccggctcc tccggctacg tggatgatgac ccagtcccc ctgtccctgc 120
ccgtgacccc cggcga                                     136

```

```

<210> 18
<211> 131
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

<220>

<223> Primer

<400> 18

ctgggggggac tggccgggct tctgcagcag ccagttcagg taggtcttgc cgtcggagtc 60
cagcagggac tgggaggact tgcaggagat ggaggcgggc tcgccggggg tcacgggcag 120
ggacaggggg g 131

<210> 19

<211> 146

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 19

acctgaactg gctgctgcag aagcccggcc agtcccccca ggcctgatc tacctgggtg 60
ccaagctgga ctccggcgtg cccgaccgct tctccggctc cggctccggc accgacttca 120
ccctgaagat ctcccgcgtg gaggcc 146

<210> 20

<211> 142

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 20

aattctagga tccactcacg cttgatctcc accttgggtg cctggccgaa ggtgccccgg 60
aagtgggtgc cctgccagca gtagtacag cccacgtcct cggcctccac gcgggagatc 120
ttcaggggtga agtcggtgcc gg 142

<210> 21

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 21

ctgggggggac tggccg 16

<210> 22

<211> 22

<212> DNA

<<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 22

acctgaactg gctgctgcag aa 22

<210> 23

<211> 138

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 23
acagaaagct tgccgccacc atggagtttg ggctgagctg gctttttctt gtggctattt 60
taaaaggtgt ccagtgtgag gtgcagctgc tggagtccgg cggcggcctg gtgcagcccg 120
gcggctcctt gcgctgtg 138

<210> 24
<211> 135
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 24
gccgccggag cggatggagg ccaccactc caggcccttg ccgggggcct ggcgcaccca 60
ggacatgccg tagttggaga aggtgaagcc ggaggcggcg caggacaggc gcagggagcc 120
gccgggctgc accag 135

<210> 25
<211> 142
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 25
ctggagtggg tggcctccat ccgctccggc gccggccgca cctactactc cgacaacgtg 60
aagggccgct tcaccatctc ccgcgacaac gccagaact ccctgtacct gcagatgaac 120
tccctgcgcg ccgaggacac cg 142

<210> 26
<211> 144
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 26
ctgcaaggat ccactcaccg gaggacacgg tcaccagggt gccctggccc cagtagtcgg 60
aggagccgga gtagtggtcg tagcgcacgc agtagtacag gccggtgtcc tcggcgcgca 120
gggagttcat ctgcaggtac aggg 144

<210> 27
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 27
gccgccggag cggatg 16

<210> 28
<211> 20
<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Primer
 <400> 28
 ctggagtggg tggcctccat 20
 <210> 29
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Primer
 <400> 29
 tccgcaagct tgccgccac 19
 <210> 30
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Primer
 <400> 30
 aattctagga tccactcacg cttgatctc 29
 <210> 31
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Primer
 <400> 31
 acagaaagct tgccgccacc atg 23
 <210> 32
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Primer
 <400> 32
 ctgcaaggat ccactcaccg ga 22
 <210> 33
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> internal peptide
 <400> 33

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr
 1 5 10

<210> 34
 <211> 402
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> h3D6 version 1 VL

<400> 34
 atggacatgc gcgtgcccgc ccagctgctg ggctgctga tgctgtgggt gtccggctcc 60
 tccggctacg tggatgatgac ccagtcctccc ctgtccctgc ccgtgacccc cggcgagccc 120
 gcctccatct cctgcaagtc ctcccagctc ctgctggact ccgacggcaa gacctacctg 180
 aactggctgc tgcagaagcc cggccagctc cccagcgcct tgatctacct ggtgtccaag 240
 ctggactccg gcgtgcccga ccgcttctcc ggctccggct ccggcaccga cttcaccttg 300
 aagatctccc gcgtggaggc cgaggacgtg ggcgtgtact actgctggca gggcacccac 360
 ttcccccgca ccttcggcca gggcaccaag gtggagatca ag 402

<210> 35
 <211> 402
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> h3D6 version 2 VL

<400> 35
 atggacatgc gcgtgcccgc ccagctgctg ggctgctga tgctgtgggt gtccggctcc 60
 tccggcgacg tggatgatgac ccagtcctccc ctgtccctgc ccgtgacccc cggcgagccc 120
 gcctccatct cctgcaagtc ctcccagctc ctgctggact ccgacggcaa gacctacctg 180
 aactggctgc tgcagaagcc cggccagctc cccagcgcct tgatctacct ggtgtccaag 240
 ctggactccg gcgtgcccga ccgcttctcc ggctccggct ccggcaccga cttcaccttg 300
 aagatctccc gcgtggaggc cgaggacgtg ggcgtgtact actgctggca gggcacccac 360
 ttcccccgca ccttcggcca gggcaccaag gtggagatca ag 402

<210> 36
 <211> 414
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> h3D6 version 1 VH

<400> 36
 atggagtttg ggctgagctg gctttttctt gtggctatth taaaagggtg ccagtgtgag 60
 gtgcagctgc tggagtccgg cggcggcctg gtgcagcccg gcggctccct gcgcctgtcc 120
 tgcgccgcct ccggcttcac cttctccaac tacggcatgt cctgggtgcy ccaggcccc 180
 ggcaagggcc tggagtgggt ggcctccatc cgctccggcg gcggccgcac ctactactcc 240
 gacaacgtga agggccgctt caccatctcc cgcgacaacg ccaagaactc cctgtacctg 300
 cagatgaact ccctgcgcgc cgaggacacc gccctgtact actgcgtgcy ctacgaccac 360
 tactccggct cctccgacta ctggggccag ggcaccctgg tgaccgtgtc ctcc 414

<210> 37
 <211> 414
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> h3D6 version 2 VH

<400> 37

```
atggagtttg ggctgagctg gctttttctt gtggctatth taaaagggtg ccagtgtag 60
gtgcagctgc tggagtccgg cggcggcctg gtgcagcccg gcggctcct gcgctgtcc 120
tgcgccgct ccggcttcac cttctccaac tacggcatgt cctgggtgcg ccaggcccc 180
ggcaagggcc tggagtgggt ggctccatc cgctccggcg gcggccgcac ctactactcc 240
gacaacgtga agggccgctt caccatctcc cgcgacaact ccaagaacac cctgtacctg 300
cagatgaact ccctgcgcg caggacacc gccgtgtact actgcgtgcg ctacgaccac 360
tactccggct cctccgacta ctggggccag ggcaccctgg tgaccgtgtc
```

<210> 38

<211> 770

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 38

```
Met Leu Pro Gly Leu Ala Leu Leu Leu Leu Ala Ala Trp Thr Ala Arg
 1           5           10           15
Ala Leu Glu Val Pro Thr Asp Gly Asn Ala Gly Leu Leu Ala Glu Pro
 20           25           30
Gln Ile Ala Met Phe Cys Gly Arg Leu Asn Met His Met Asn Val Gln
 35           40           45
Asn Gly Lys Trp Asp Ser Asp Pro Ser Gly Thr Lys Thr Cys Ile Asp
 50           55           60
Thr Lys Glu Gly Ile Leu Gln Tyr Cys Gln Glu Val Tyr Pro Glu Leu
 65           70           75           80
Gln Ile Thr Asn Val Val Glu Ala Asn Gln Pro Val Thr Ile Gln Asn
 85           90           95
Trp Cys Lys Arg Gly Arg Lys Gln Cys Lys Thr His Pro His Phe Val
 100          105          110
Ile Pro Tyr Arg Cys Leu Val Gly Glu Phe Val Ser Asp Ala Leu Leu
 115          120          125
Val Pro Asp Lys Cys Lys Phe Leu His Gln Glu Arg Met Asp Val Cys
 130          135          140
Glu Thr His Leu His Trp His Thr Val Ala Lys Glu Thr Cys Ser Glu
 145          150          155          160
Lys Ser Thr Asn Leu His Asp Tyr Gly Met Leu Leu Pro Cys Gly Ile
 165          170          175
Asp Lys Phe Arg Gly Val Glu Phe Val Cys Cys Pro Leu Ala Glu Glu
 180          185          190
Ser Asp Asn Val Asp Ser Ala Asp Ala Glu Glu Asp Asp Ser Asp Val
 195          200          205
Trp Trp Gly Gly Ala Asp Thr Asp Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Asp Lys
 210          215          220
Val Val Glu Val Ala Glu Glu Glu Glu Val Ala Glu Val Glu Glu Glu
 225          230          235          240
Glu Ala Asp Asp Asp Glu Asp Asp Glu Asp Gly Asp Glu Val Glu Glu
 245          250          255
Glu Ala Glu Glu Pro Tyr Glu Glu Ala Thr Glu Arg Thr Thr Ser Ile
 260          265          270
Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Glu Ser Val Glu Glu Val Val Arg
 275          280          285
Glu Val Cys Ser Glu Gln Ala Glu Thr Gly Pro Cys Arg Ala Met Ile
 290          295          300
Ser Arg Trp Tyr Phe Asp Val Thr Glu Gly Lys Cys Ala Pro Phe Phe
 305          310          315          320
Tyr Gly Gly Cys Gly Asn Arg Asn Asn Phe Asp Thr Glu Glu Tyr
 325          330          335
Cys Met Ala Val Cys Gly Ser Ala Met Ser Gln Ser Leu Leu Lys Thr
 340          345          350
```

Thr Gln Glu Pro Leu Ala Arg Asp Pro Val Lys Leu Pro Thr Thr Ala
 355 360 365
 Ala Ser Thr Pro Asp Ala Val Asp Lys Tyr Leu Glu Thr Pro Gly Asp
 370 375 380
 Glu Asn Glu His Ala His Phe Gln Lys Ala Lys Glu Arg Leu Glu Ala
 385 390 395 400
 Lys His Arg Glu Arg Met Ser Gln Val Met Arg Glu Trp Glu Glu Ala
 405 410 415
 Glu Arg Gln Ala Lys Asn Leu Pro Lys Ala Asp Lys Lys Ala Val Ile
 420 425 430
 Gln His Phe Gln Glu Lys Val Glu Ser Leu Glu Gln Glu Ala Ala Asn
 435 440 445
 Glu Arg Gln Gln Leu Val Glu Thr His Met Ala Arg Val Glu Ala Met
 450 455 460
 Leu Asn Asp Arg Arg Arg Leu Ala Leu Glu Asn Tyr Ile Thr Ala Leu
 465 470 475 480
 Gln Ala Val Pro Pro Arg Pro Arg His Val Phe Asn Met Leu Lys Lys
 485 490 495
 Tyr Val Arg Ala Glu Gln Lys Asp Arg Gln His Thr Leu Lys His Phe
 500 505 510
 Glu His Val Arg Met Val Asp Pro Lys Lys Ala Ala Gln Ile Arg Ser
 515 520 525
 Gln Val Met Thr His Leu Arg Val Ile Tyr Glu Arg Met Asn Gln Ser
 530 535 540
 Leu Ser Leu Leu Tyr Asn Val Pro Ala Val Ala Glu Glu Ile Gln Asp
 545 550 555 560
 Glu Val Asp Glu Leu Leu Gln Lys Glu Gln Asn Tyr Ser Asp Asp Val
 565 570 575
 Leu Ala Asn Met Ile Ser Glu Pro Arg Ile Ser Tyr Gly Asn Asp Ala
 580 585 590
 Leu Met Pro Ser Leu Thr Glu Thr Lys Thr Thr Val Glu Leu Leu Pro
 595 600 605
 Val Asn Gly Glu Phe Ser Leu Asp Asp Leu Gln Pro Trp His Ser Phe
 610 615 620
 Gly Ala Asp Ser Val Pro Ala Asn Thr Glu Asn Glu Val Glu Pro Val
 625 630 635 640
 Asp Ala Arg Pro Ala Ala Asp Arg Gly Leu Thr Thr Arg Pro Gly Ser
 645 650 655
 Gly Leu Thr Asn Ile Lys Thr Glu Glu Ile Ser Glu Val Lys Met Asp
 660 665 670
 Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu
 675 680 685
 Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly
 690 695 700
 Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr Val Ile Val Ile Thr Leu
 705 710 715 720
 Val Met Leu Lys Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile His His Gly Val Val
 725 730 735

Glu Val Asp Ala Ala Val Thr Pro Glu Glu Arg His Leu Ser Lys Met
 740 745 750
 Gln Gln Asn Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys Phe Phe Glu Gln Met
 755 760 765
 Gln Asn
 770

<210> 39
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primers

<400> 39
 acttatatct gtttt 15

<210> 40
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primers

<400> 40
 acttatacac tttgt 15

<210> 41
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primers

<400> 41
 acttatgttc attst 15

<210> 42
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primers

<400> 42
 acttatgccc attggt 16

<210> 43
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primers

<400> 43

acttatatat attgt	15
<210> 44	
<211> 14	
<212> DNA	
<213> <213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Primers	
<400> 44	
acttatgkyy attg	14
<210> 45	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> <213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Primers	
<400> 45	
acttatgtat acayw	15
<210> 46	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> <213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Primers	
<400> 46	
acttatggct ymtct	15
<210> 47	
<211> 13	
<212> DNA	
<213> <213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Primers	
<400> 47	
acttattccc att	13
<210> 48	
<211> 14	
<212> DNA	
<213> <213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Primers	
<400> 48	
acttatatgt tctc	14
<210> 49	
<211> 14	
<212> DNA	
<213> <213> Artificial Sequence	

<220>
 <223> Primers

 <400> 49
 acttataccc attt 14

 <210> 50
 <211> 11
 <212> DNA
 <213> <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Primers

 <400> 50
 ggacggttgg g 11

 <210> 51
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Primers

 <400> 51
 acttataggg tttt 14

 <210> 52
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Primers

 <400> 52
 acttatgggr tttt 14

 <210> 53
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Primers

 <400> 53
 acttatatgt agtt 14

 <210> 54
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Primers

 <400> 54
 acttatatgt gtt 13

<210> 55
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Primers

 <400> 55
 acttatacgt atttt 15

 <210> 56
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Primers

 <400> 56
 acttatcctts tttg 14

 <210> 57
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Primers

 <400> 57
 acttatrggg tttt 14

 <210> 58
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Primers

 <400> 58
 acttatgttt ttg 13

 <210> 59
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Primers

 <400> 59
 acttatmgtg mtttt 15

 <210> 60
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primers

<400> 60
acttatgggc tcct 14

<210> 61
<211> 14
<212> DNA
<213> <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primers

<400> 61
acttatatgt tttt 14

<210> 62
<211> 14
<212> DNA
<213> <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primers

<400> 62
acttattttg ttat 14

<210> 63
<211> 11
<212> DNA
<213> <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primers

<400> 63
ggacgggaca g

图2

重构3D6 VH

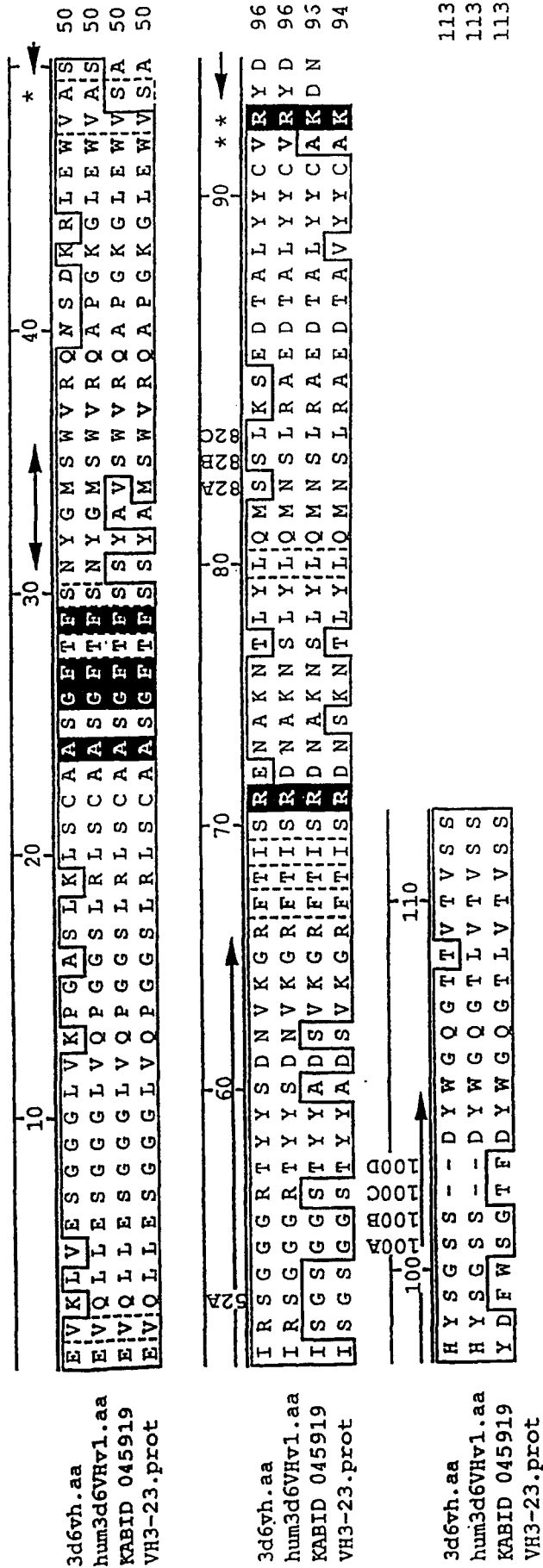


图3A

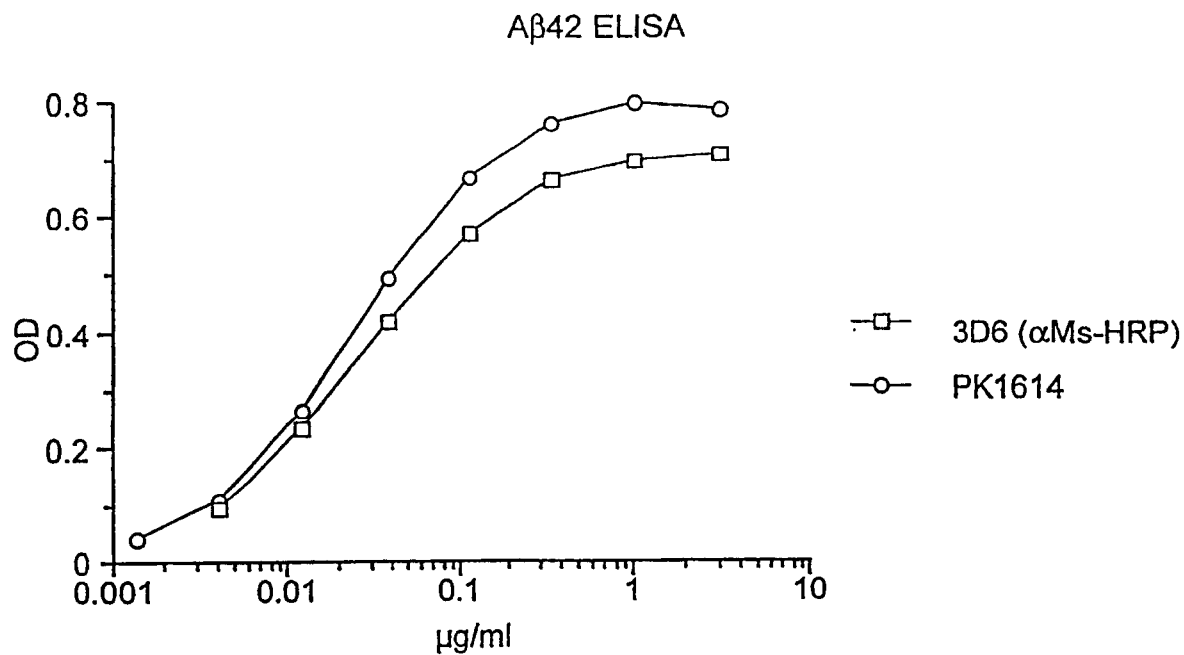


图3B

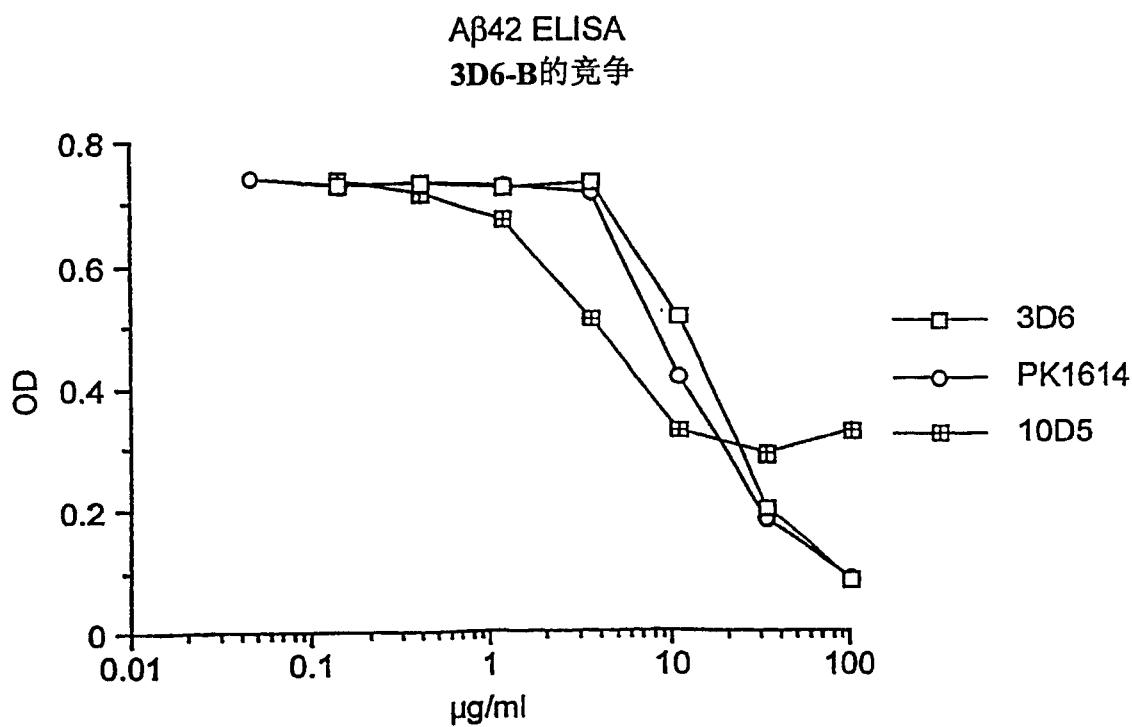


图4

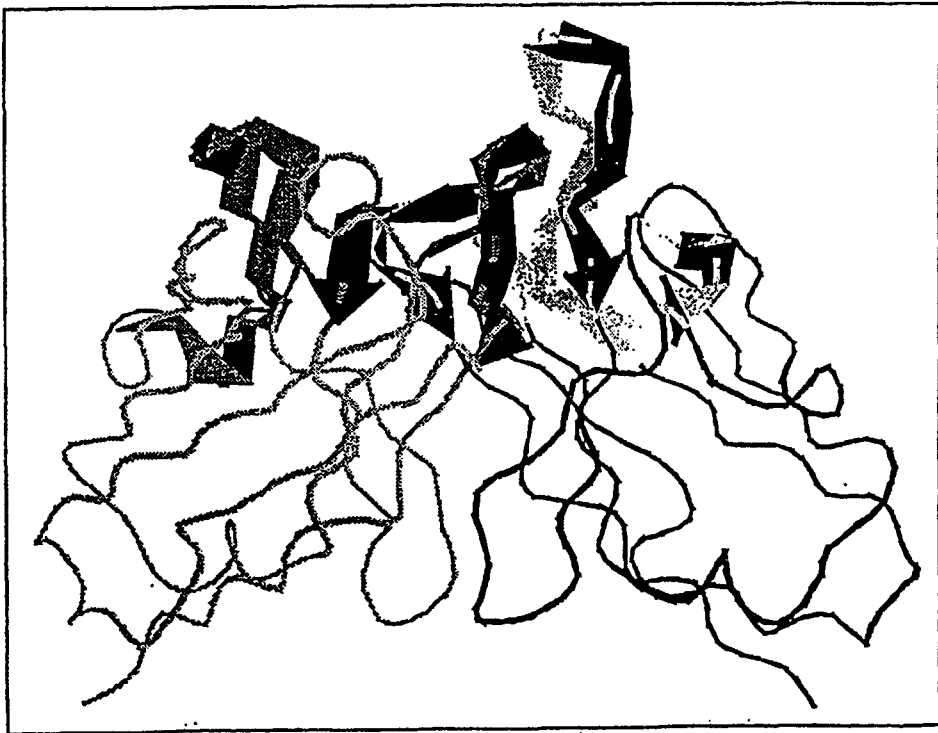


图5B
MF011101聚集的A β ELISA

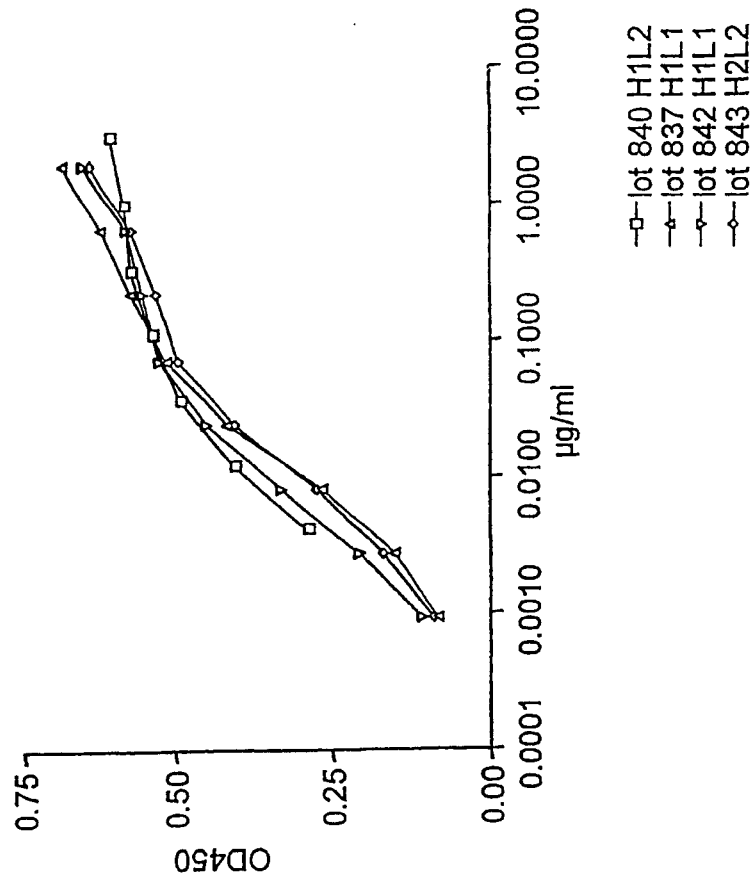


图5A
MF121400聚集的A β ELISA

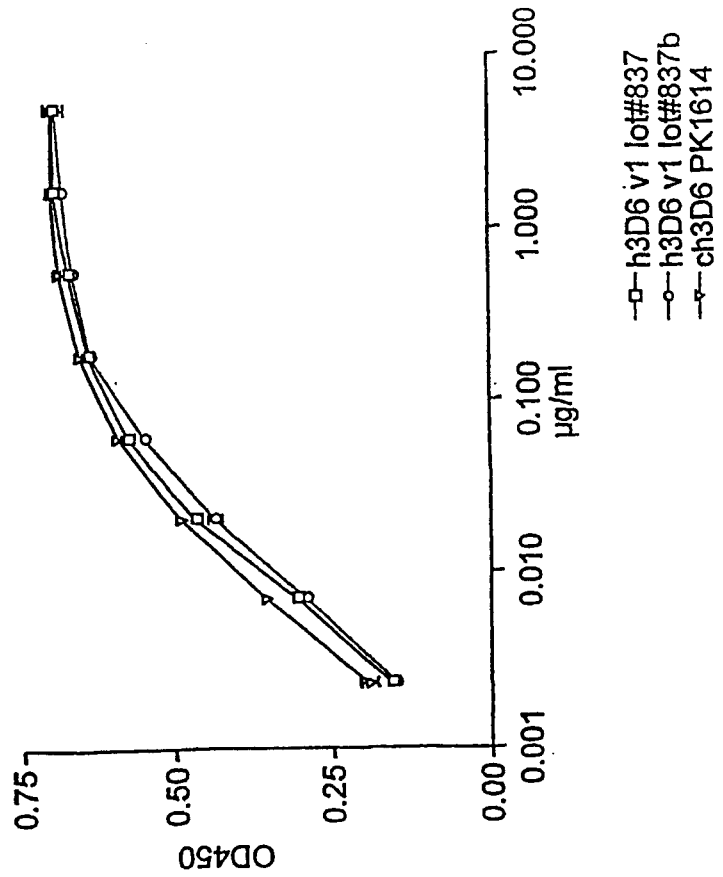


图6

PADPP脑切片用人源化3D6染色
PD-APP脑切片上的MAb滴定
通道70-256

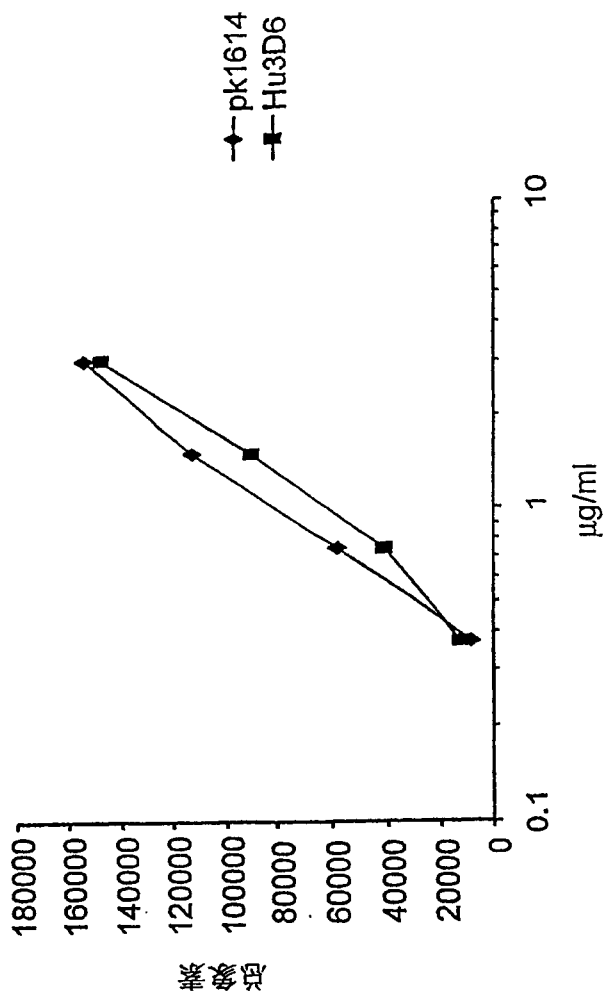


图7

h3D6亲和力:竞争性结合
Aβ42上的竞争

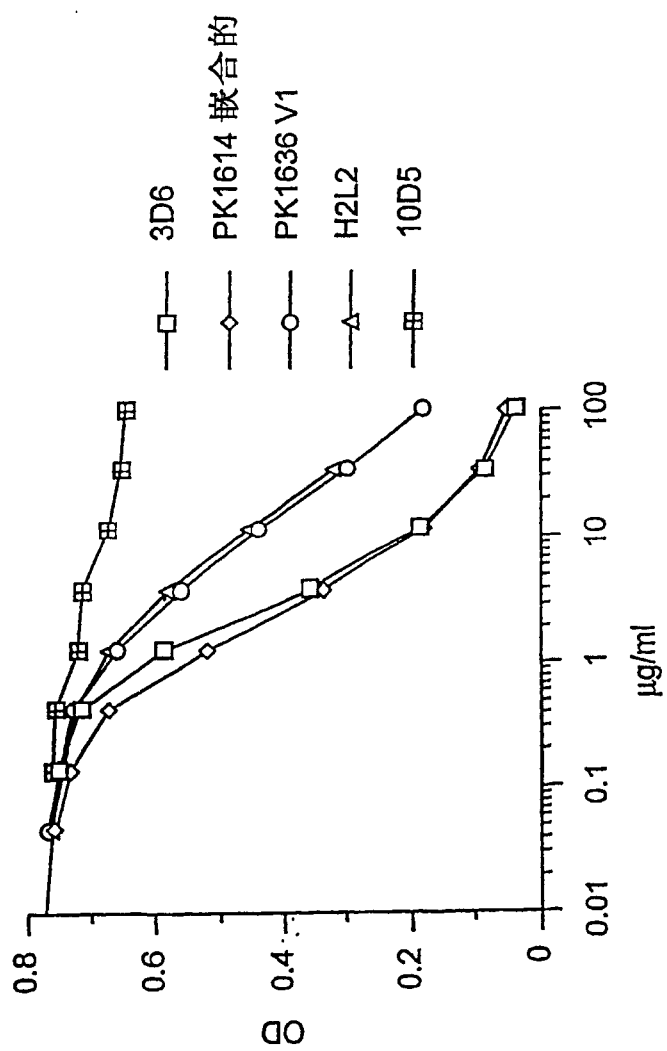


图8

离体测定:刺激小胶质质细胞的
吞噬作用,通过h3D6
离体PDAPP
266/3D6-B

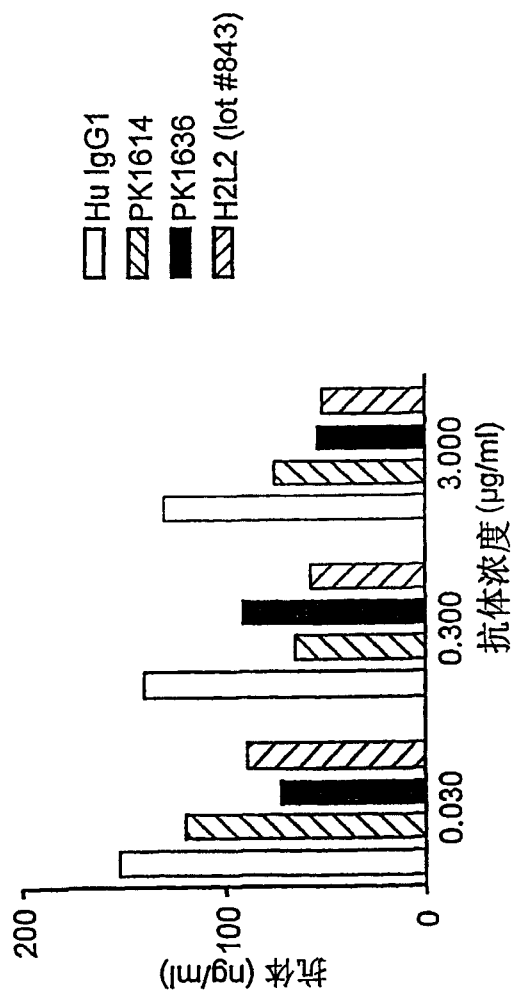


图9

	10		20		29
10D5v1.pro		M F W I P A S S S D V L M T Q T P L S			
3D6v1.pro		L L L V L W I R E T N G Y V V M T Q T P L T			30
	30		50		59
10D5v1.pro		L P V S L G D Q A S I S C R S S Q N I I H S N G N T Y L E W			
3D6v1.pro		L S V T I G Q P A S I S C K S S Q S L L D S D G K T Y L N W			60
	60		80		89
10D5v1.pro		Y L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F S G V P D R F S G S			
3D6v1.pro		L L Q R P G Q S P K R L I Y L V S K L D S G V P D R F T G S			90
	90		110		119
10D5v1.pro		G S G T D F T L K I K K V E A E D L G I Y Y C F Q G S H V P			
3D6v1.pro		G S G T D F T L K I S R I E A E D L G L Y Y C W Q G T H F P			120
	120		130		131
10D5v1.pro		L T F G A G T K L E L E			
3D6v1.pro		R T F G G G T K L E I K			132

图10

	10	20	30
10D5vh.pro			
3D6vh.PRO	M D - R L T S S F L L L I V P A Y V L S Q A T L K E S G P G		29
	M N F G L S L I F L V L V L K G - V Q C E V K L V E S G G G		29
	40	50	60
10D5vh.pro			
3D6vh.PRO	I L Q S S Q T L S L T C S F S G F S L S T S G M G V S W I R		59
	L V K P G A S L K L S C A A S G F T F S N Y G M - - S W V R		57
	70	80	90
10D5vh.pro			
3D6vh.PRO	Q P S G K G L E W L A H I Y W D D D K R Y - N P S L K S R L		88
	Q N S D K R L E W V A S I R S G G G R T Y Y S D N V K G R F		87
	100	110	120
10D5vh.pro			
3D6vh.PRO	T I S K D T S R K Q V F L K I T S V D P A D T A T Y Y C V R		118
	T I S R E N A K N T L Y L Q M S S L K S E D T A L Y Y C V R		117
	130	140	
10D5vh.pro			
3D6vh.PRO	R P I T P V L V D A M D Y W G Q G T S V T V S S		142
	- - - Y D H Y S G S S D Y W G Q G T T V T V S S		138