(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 120098122 A
(43)申请公布日 2025.06.06

(21)申请号 202510000560.5

(22)申请日 2020.05.28

(30)优先权数据
62/853,676 2019.05.28 US
62/873,019 2019.07.11 US

(62)分案原申请数据
202080054661.6 2020.05.28

(71)申请人 总医院公司
地址 美国
申请人 旗帜健康公司
斯格本斯眼科研究所有限公司

(72)发明人 Y·T·基罗斯
J·F·阿博莱达-贝拉斯克斯
埃里克·M·莱曼 F·洛佩拉

(74)专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事务所(普通合伙) 11277
专利代理师 李茂家 闫俊萍

(51)Int.Cl.
C07K 16/18(2006.01)
C12N 15/13(2006.01)
C12N 15/63(2006.01)
C07K 16/46(2006.01)
C12Q 1/6883(2018.01)
G01N 33/68(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61K 38/17(2006.01)
A61P 37/02(2006.01)
A61P 25/28(2006.01)

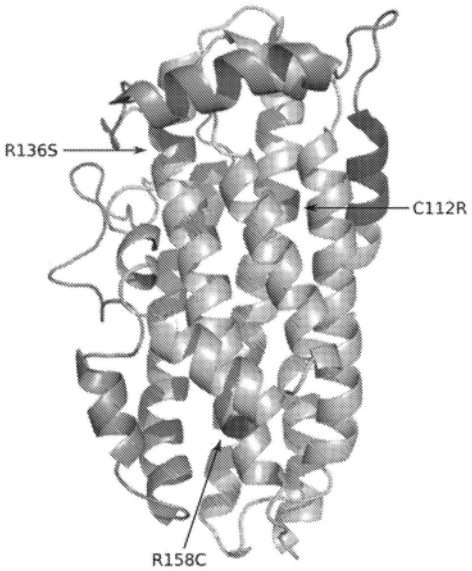
权利要求书4页 说明书90页
序列表（电子公布） 附图62页

(54)发明名称

APOE抗体、融合蛋白及其用途

(57)摘要

本发明涉及APOE抗体、融合蛋白及其用途。使用调节ApoE的HSPG/肝素结合亲和力的抗体、肽、融合蛋白或基因组编辑系统来预防或治疗与痴呆和/或轻度认知损害相关的认知下降和/或神经退行性病变的方法和组合物。



CN 120098122 A

1.一种分离的单克隆抗体,其特异性结合至野生型或突变载脂蛋白E(ApoE)的一个或多个HSPG结合位点或一个或多个HSPG结合的变构调节位点。

2.根据权利要求1所述的抗体,其中所述抗体结合至具有与TEELRVRLASHLRK(SEQ ID NO:3)为至少95%同一性的氨基酸序列的多肽。

3.根据权利要求1所述的抗体,其中所述抗体结合至具有与TEELRVSLASHLRK(SEQ ID NO:2)为至少95%同一性的氨基酸序列的多肽。

4.根据权利要求1至3中任一项所述的抗体,其中所述抗体结合至野生型或突变ApoE2、ApoE3或ApoE4的一个或多个HSPG结合位点。

5.根据权利要求1至4中任一项所述的抗体,其中所述抗体与包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)的参照抗ApoE抗体竞争和/或结合相同的表位,其中所述参照抗体的VH和VL:

(i)分别包含在SEQ ID NO:13中记载的氨基酸序列和在SEQ ID NO:12中记载的氨基酸序列;

(ii)分别包含在SEQ ID NO:23中记载的氨基酸序列和在SEQ ID NO:22中记载的氨基酸序列;

(iii)分别包含在SEQ ID NO:33中记载的氨基酸序列和在SEQ ID NO:32中记载的氨基酸序列;或

(iv)分别包含在SEQ ID NO:43中记载的氨基酸序列和在SEQ ID NO:42中记载的氨基酸序列。

6.根据权利要求1至4中任一项所述的抗体,其中所述抗体与包含重链和轻链的参照抗ApoE抗体竞争和/或结合相同的表位,其中所述参照抗体的重链和轻链包含在SEQ ID NO:53中记载的氨基酸序列和在SEQ ID NO:52中记载的氨基酸序列。

7.一种抗ApoE抗体,其包含含有VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3的VH和含有VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3的VL,其中VHCDR1、VHCDR2、VHCDR3、VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3:

(i)分别包含SEQ ID No:7、8、9、4、5、6;

(ii)分别包含SEQ ID No:17、18、19、14、15、16;

(iii)分别包含SEQ ID No:27、28、29、24、25、26;

(iv)分别包含SEQ ID No:37、38、39、34、35、36;或

(v)分别包含SEQ ID No:47、48、49、44、45、46。

8.根据权利要求7所述的抗体,其中:

(i)所述VH和所述VL分别包含与SEQ ID NO:13和12中记载的氨基酸序列为至少75%、80%、85%、90%、95%或100%同一性的氨基酸序列;

(ii)所述VH和所述VL分别包含与SEQ ID NO:23和22中记载的氨基酸序列为至少75%、80%、85%、90%、95%或100%同一性的氨基酸序列;

(iii)所述VH和所述VL分别包含与SEQ ID NO:33和32中记载的氨基酸序列为至少75%、80%、85%、90%、95%或100%同一性的氨基酸序列;或

(iv)所述VH和所述VL分别包含与SEQ ID NO:43和42中记载的氨基酸序列为至少75%、80%、85%、90%、95%或100%同一性的氨基酸序列。

9.根据权利要求7所述的抗体,其包含重链和轻链,所述重链和轻链分别包含与SEQ ID No:53和52中记载的氨基酸序列为至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%同一性的

氨基酸序列。

10.根据权利要求1至9中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含小鼠IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG2c或IgG3重链恒定区。

11.根据权利要求1至9中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4重链恒定区。

12.根据权利要求1至11中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含人κ或人λ轻链恒定区。

13.根据权利要求1至12中任一项所述的抗体,其中所述抗体是全抗体、单域抗体、人源化抗体、嵌合抗体、双特异性抗体、Fv、scFv、sc(Fv)2、双抗体、纳米抗体、Fab或F(ab')2。

14.根据权利要求1至13中任一项所述的抗体,其还包含半衰期延长部分。

15.根据权利要求1至14中任一项所述的抗体,其还包含血-脑屏障穿透部分。

16.根据权利要求1至12中任一项所述的抗体,其还包含可检测标签。

17.一种药物组合物,其包含根据权利要求1至16中任一项所述的抗体。

18.一种或多种多核苷酸,其编码根据权利要求1至13中任一项所述的抗体。

19.一种或多种载体,其包含根据权利要求18所述的一种或多种多核苷酸。

20.一种宿主细胞,其包含根据权利要求18所述的一种或多种多核苷酸、或根据权利要求19所述的一种或多种载体。

21.一种制备抗ApoE抗体的方法,所述方法包括:

(a)在允许所述抗体的表达的条件下培养根据权利要求20所述的宿主细胞;和

(b)分离所述抗体。

22.根据权利要求21所述的方法,其还包括将所述抗体配制成适用于施用至人的无菌制剂。

23.一种Fc融合蛋白,其包含:野生型ApoE或突变ApoE的HSPG结合结构域,所述HSPG结合结构域包含与选自由以下组成的组的氨基酸序列为至少95%同一性的氨基酸序列:STEELRVRLASHLRKLRKRLLRDADDLQK(SEQ ID NO:57)、STEELRVSLASHLRKLRKRLLRDADDLQK(SEQ ID NO:58)、RLVQYRGEVQAMLGQSTEELRVRLASHLRKL(SEQ ID NO:59)和RLVQYRGEVQAMLGQSTEELRVSLASHLRKL(SEQ ID NO:60)。

24.根据权利要求23所述的Fc融合蛋白,其包含人抗体的Fc区。

25.根据权利要求24所述的Fc融合蛋白,其中所述人抗体选自由人IgG1、IgG2、IgG3和IgG4分子组成的组。

26.一种药物组合物,其包含根据权利要求23至25中任一项所述的Fc融合蛋白。

27.一种或多种多核苷酸,其编码根据权利要求23至25中任一项所述的Fc融合蛋白。

28.一种或多种载体,其包含根据权利要求27所述的一种或多种多核苷酸。

29.一种宿主细胞,其包含根据权利要求28所述的一种或多种多核苷酸、或根据权利要求28所述的一种或多种载体。

30.一种用于引发免疫应答的药物组合物,其包含:

(i)野生型ApoE或突变ApoE的HSPG结合结构域,所述HSPG结合结构域包含与选自由以下组成的组的氨基酸序列为至少95%同一性的氨基酸序列:
STEELRVRLASHLRKLRKRLLRDADDLQK(SEQ ID NO:57)、STEELRVSLASHLRKLRKRLLRDADDLQK(SEQ

ID NO:58)、RLVQYRGEVQAMLGQSTEELRVRLASHLRKL(SEQ ID NO:59)和RLVQYRGEVQAMLGQSTEELRVSLASHLRKL(SEQ ID NO:60);和

(ii)药学上可接受的佐剂。

31.一种在有需要的人受试者中改善、减缓、延迟发病、预防或逆转与痴呆和/或轻度认知损害相关的认知下降的方法,所述方法包括向所述人受试者施用治疗有效量的根据权利要求1至16中任一项所述的抗体、根据权利要求23至25中任一项所述的Fc融合蛋白、或根据权利要求17或26所述的药物组合物。

32.一种在有需要的人受试者中改善、减缓、延迟发病、预防或逆转与痴呆和/或轻度认知损害相关的认知下降的方法,所述方法包括向所述受试者施用:

(i)包含编码gRNA分子的核苷酸序列的病毒载体,所述gRNA分子包含与来自APOE基因的靶结构域互补的靶向结构域;

(ii)包含编码Cas9分子的核苷酸序列的病毒载体;和

(iii)包含模板核酸的病毒载体,其中所述模板核酸包含腺嘌呤以替代APOE基因中位置19:g.45412013C>A处的胞嘧啶,

其中所述施用导致在所述受试者的一个或多个细胞中产生一个或多个ApoE R136S等位基因。

33.根据权利要求32所述的方法,其中所述gRNA分子的靶向结构域包含与来自表7的序列相同或相差不超过3个核苷酸的序列。

34.根据权利要求31或32所述的方法,其中所述人受试者诊断患有阿尔茨海默症或处于发展阿尔茨海默症的风险。

35.根据权利要求34所述的方法,其中所述人受试者携带APOE4等位基因的一个或多个拷贝。

36.根据权利要求34所述的方法,其中所述人受试者携带在选自由:APP、PSEN1和PSEN2组成的组的至少一种基因中的一种或多种突变。

37.根据权利要求34所述的方法,其中所述人受试者携带21号染色体的第三拷贝的全部或部分。

38.根据权利要求34所述的方法,其中所述人受试者通过脑成像诊断患有阿尔茨海默症。

39.根据权利要求34所述的方法,其中所述人受试者超过50岁。

40.根据权利要求31或32所述的方法,其中所述人受试者诊断患有选自由以下组成的组的病症或处于发展所述病症的风险:血管性认知损害、血管性痴呆、伴有皮质下梗死和白质脑病的常染色体显性遗传脑动脉病(CADASIL)、伴有皮质下梗死和白质脑病的常染色体隐性遗传脑动脉病(CARASIL)、路易体痴呆、额颞痴呆、肌萎缩侧索硬化、多发性硬化、帕金森病、亨廷顿病、神经退行性疾病、脑血管疾病、脑损伤、慢性创伤性脑病、tau蛋白病、淀粉样蛋白病、突触核蛋白病、克雅氏病、视网膜变性、青光眼、视网膜损伤、和衰老。

41.一种鉴定较不易发展早发性神经退行性疾病的人受试者的方法,所述方法包括:

从受试者获得或已经获得生物样品样品;

检测所述生物样品中至少一种APOE3突变等位基因的存在、或突变ApoE3基因产物的存在;和

基于所述生物样品中突变ApoE3等位基因或基因产物的存在,将受试者鉴定为较不易发展早发性神经退行性疾病。

42.根据权利要求41所述的方法,其中所述生物样品是血液、脑脊液、唾液、尿液、眼泪、玻璃体液、房水或组织标本。

43.根据权利要求41所述的方法,其中所述神经退行性疾病是阿尔茨海默症、帕金森病、亨廷顿病、肌萎缩侧索硬化、视网膜变性或青光眼。

44.根据权利要求43所述的方法,其中所述视网膜变性是年龄相关性黄斑变性。

45.根据权利要求41所述的方法,其中所述检测包括确定所述受试者中APOE3等位基因的序列。

46.根据权利要求41所述的方法,其中所述检测包括确定编码与野生型ApoE3蛋白相比具有R136处的突变的ApoE3蛋白的APOE3序列的存在与否。

47.根据权利要求46所述的方法,其中所述R136处的突变是R136S、R136H或R136C。

48.根据权利要求41至47中任一项所述的方法,其还包括选择受试者以包括在临床试验中,和任选地施用实验性治疗,或者如果受试者不具有突变APOE3等位基因,则将受试者排除在临床试验之外。

49.根据权利要求41至47中任一项所述的方法,其还包括选择受试者以包括在临床试验中,和任选地施用实验性治疗,或者如果受试者具有突变APOE3等位基因,则将受试者排除在临床试验之外。

APOE抗体、融合蛋白及其用途

[0001] 本申请是国际申请日2020年5月28日、申请号为202080054661.6(国际申请号PCT/US2020/034978)的专利申请“APOE抗体、融合蛋白及其用途”的分案申请。

[0002] 优先权要求

[0003] 本申请要求2019年5月28日提交的美国临时申请号62/853,676和2019年7月11日提交的美国临时申请号62/873,019的权益。前述的全部内容通过引用并入本文。

[0004] 联邦资助的研究或开发

[0005] 本发明是在美国政府的支持下、在美国国立卫生研究院(the National Institutes of Health)授予的授权号OD019833、美国国立老龄化研究所(the National Institute on Aging)授予的授权号AG054671、AG031581和AG19610、美国国家神经疾病和中风研究所(the National Institute of Neurological Disorders and Stroke)授予的授权号NS100121和NS110048下完成的。美国政府享有本发明的某些权利。

技术领域

[0006] 本文描述了通过调节载脂蛋白E(ApoE)的硫酸乙酰肝素蛋白聚糖(HSPG)/糖胺聚糖(GAG)肝素结合亲和力来预防或治疗与痴呆和/或轻度认知损害相关的认知下降的方法和组合物。

背景技术

[0007] 阿尔茨海默症(AD)是一种慢性神经退行性疾病,通常开始缓慢并随着时间的推移逐渐恶化。它是60-70%的痴呆病例的病因。该疾病过程与大脑中的斑块和神经原纤维缠结相关。目前没有任何治疗方法可以阻止或逆转其进展,但一些可能会暂时改善症状。大脑中淀粉样蛋白-β(Aβ)肽的积累、聚集和沉积是阿尔茨海默症(AD)发病机制的核心。越来越多的证据表明,ApoE通过控制Aβ聚集和代谢来强烈影响AD发病机制(Fu等人,Mol Neurodegener 11:37,2016)。APOE影响淀粉样蛋白的产生、聚集和清除,是淀粉样蛋白斑块的组成部分,并使tau介导的神经退行性病变恶化。ApoE为299个氨基酸长,并且是多态性的,具有三种主要等位基因(ε2、ε3和ε4),它们仅在位置112和158处有一或两个氨基酸不同:ApoE2(cys112,cys158)、ApoE3(cys112,arg158)和ApoE4(arg112,arg158)。因此,需要靶向和调节ApoE蛋白的功能用于治疗或预防与痴呆或轻度认知损害相关的AD和认知下降的疗法。

发明内容

[0008] 在一方面,本公开的特征在于一种分离的单克隆抗体,其特异性结合至野生型或突变载脂蛋白E(ApoE)的一个或多个(例如1、2、3或4个)HSPG结合位点或一个或多个(例如1、2、3或4个)HSPG结合的变构调节位点。在一些实施方案中,所述抗体结合至具有与TEELRVRLASHLRK(SEQ ID NO:3)为至少95%(例如96%、97%、98%、99%或100%)同一性的氨基酸序列的多肽。在一些实施方案中,所述抗体结合至具有与TEELRVSLASHLRK(SEQ ID

NO:2)为至少95％(例如96％、97％、98％、99％或100％)同一性的氨基酸序列的多肽。在一些实施方案中,所述抗体结合至野生型或突变ApoE2、ApoE3或ApoE4的一个或多个(例如1、2、3或4个)HSPG结合位点。

[0009] 在一些实施方案中,所述抗体与包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)的参照抗ApoE抗体竞争和/或结合相同的表位,其中参照抗体的VH和VL:(i)分别包含在SEQ ID NO:13中记载的氨基酸序列和在SEQ ID NO:12中记载的氨基酸序列;(ii)分别包含在SEQ ID NO:23中记载的氨基酸序列和SEQ ID NO:22中记载的氨基酸序列;(iii)分别包含在SEQ ID NO:33中记载的氨基酸序列和在SEQ ID NO:32中记载的氨基酸序列;或(iv)分别包含在SEQ IDNO:43中记载的氨基酸序列和在SEQ ID NO:42中记载的氨基酸序列。在任何本文所述的抗体的一些实施方案中,所述抗体与包含重链和轻链的参照抗ApoE抗体竞争和/或结合相同的表位,其中参照抗体的重链和轻链包含在SEQ ID NO:53中记载的氨基酸序列和在SEQ ID NO:52中记载的氨基酸序列。

[0010] 在另一方面,本文提供包含含有VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3的VH和含有VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3的VL的抗ApoE抗体,其中VHCDR1、VHCDR2、VHCDR3、VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3:(i)分别包含SEQ IDNo:7、8、9、4、5、6;(ii)分别包含SEQ ID No:17、18、19、14、15、16;(iii)分别包含SEQ ID No:27、28、29、24、25、26;(iv)分别包含SEQ ID No:37、38、39、34、35、36;或(v)分别地,SEQ ID No:47、48、49、44、45、46。在任何本文所述的抗体的一些实施方案中,(i)VH和VL分别包含与SEQ ID NO:13和12中记载的氨基酸序列为至少75％、80％、85％、90％、95％或100％同一性的氨基酸序列;(ii)VH和VL分别包含与SEQ ID NO:23和22中记载的氨基酸序列为至少75％、80％、85％、90％、95％或100％同一性的氨基酸序列;(iii)VH和VL分别包含与SEQ ID NO:33和32中记载的氨基酸序列为至少75％、80％、85％、90％、95％或100％同一性的氨基酸序列;或(iv)VH和VL分别包含与SEQ ID NO:43和42中记载的氨基酸序列为至少75％、80％、85％、90％、95％或100％同一性的氨基酸序列。在任何本文所述的抗体的一些实施方案中,抗体包含重链和轻链,所述重链和轻链分别包含与SEQ ID No:53和52中记载的氨基酸序列为至少70％、75％、80％、85％、90％、95％或100％同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体包含小鼠IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG2c或IgG3重链恒定区。在一些实施方案中,抗体包含人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4重链恒定区。在一些实施方案中,抗体包含人κ或人λ轻链恒定区。在一些实施方案中,抗体是完整抗体、单域抗体、人源化抗体、嵌合抗体、双特异性抗体、Fv、scFv、sc(Fv)2、双体抗体、纳米抗体、Fab或F(ab')2。在一些实施方案中,抗体还包含半衰期延长部分。在一些实施方案中,抗体还包含血-脑屏障穿透部分。在一些实施方案中,抗体还包含可检测标签。在一些实施方案中,本文提供包含任何本文所述的抗体的药物组合物。在一些实施方案中,本文提供编码任何本文所述的抗体的一种或多种多核苷酸。在一些实施方案中,本文提供包含本文所述的一种或多种多核苷酸的一种或多种载体。在一些实施方案中,本文提供包含本文所述的一种或多种多核苷酸、或本文所述的一种或多种载体的宿主细胞。在另一方面,本文提供制备抗ApoE抗体的方法,所述方法包括:(a)在允许抗体的表达的条件下培养任何本文所述的宿主细胞;和(b)分离抗体。在一些实施方案中,所述方法还包括将抗体配制成适用于施用至人的无菌制剂。

[0011] 在另一方面,本文提供一种Fc融合蛋白,其包含:野生型ApoE或突变ApoE的HSPG结

合结构域,所述HSPG结合结构域包含与选自由以下组成的组的氨基酸序列为至少95%同一性的氨基酸序列:STEELRVRLASHLRKLRKRLLRDADDLQK(SEQ ID NO:57)、STEELRVSLASHLRKLRKRLLRDADDLQK(SEQ ID NO:58)、RLVQYRGEVQAMLGQSTEELRVRLASHLRKL(SEQ ID NO:59)和RLVQYRGEVQAMLGQSTEELRVSLASHLRKL(SEQ ID NO:60)。在一些实施方案中,Fc融合蛋白包含人抗体的Fc区。在一些实施方案中,人抗体选自由人IgG1、IgG2、IgG3和IgG4分子组成的组。在一些实施方案中,本文提供包含任何本文所述的Fc融合蛋白的药物组合物。在一些实施方案中,本文提供编码本文所述的Fc融合蛋白的一种或多种多核苷酸。在一些实施方案中,本文提供包含任何本文所述的一种或多种多核苷酸的一种或多种载体。在一些实施方案中,本文提供包含本文所述的一种或多种多核苷酸、或本文所述的一种或多种载体的宿主细胞。

[0012] 在另一方面,本文提供用于引发免疫应答的药物组合物,其包含:(i)野生型ApoE或突变ApoE的HSPG结合结构域,所述HSPG结合结构域包含与选自由以下组成的组的氨基酸序列为至少95%同一性的氨基酸序列:STEELRVRLASHLRKLRKRLLRDADDLQK(SEQ ID NO:57)、STEELRVSLASHLRKLRKRLLRDADDLQK(SEQ ID NO:58)、RLVQYRGEVQAMLGQSTEELRVRLASHLRKL(SEQ ID NO:59)和RLVQYRGEVQAMLGQSTEELRVSLASHLRKL(SEQ ID NO:60);和(ii)药学上可接受的佐剂。

[0013] 在另一方面,本文提供包含表达任何本文所述的抗体或任何本文所述的Fc融合蛋白的人细胞的药物组合物。

[0014] 在另一方面,本文提供一种在有需要的人受试者中改善、减缓、延迟发病、预防或逆转与痴呆和/或轻度认知损害相关的认知下降和/或神经退行性病变的方法,所述方法包括向人受试者施用治疗有效量的任何本文所述的抗体、Fc融合蛋白、或药物组合物。

[0015] 在另一方面,本文提供一种在有需要的人受试者中改善、减缓、延迟发病、预防或逆转与痴呆和/或轻度认知损害相关的认知下降和/或神经退行性病变的方法,所述方法包括向所述受试者施用:(i)包含编码gRNA分子的核苷酸序列的病毒载体,所述gRNA分子包含与来自APOE基因的靶结构域互补的靶向结构域;(ii)包含编码Cas9分子的核苷酸序列的病毒载体;和(iii)包含模板核酸的病毒载体,其中模板核酸包含腺嘌呤以替代APOE基因中位置19:g.45412013C>A处的胞嘧啶,其中所述施用导致在所述受试者的一种或多种细胞中产生一种或多种ApoE R136S等位基因。在一些实施方案中,gRNA分子的靶向结构域包含与来自表5的序列相同或相差不超过3个核苷酸的序列。

[0016] 如本文所用,“预防”是指降低发展病症的风险。

[0017] 在一些实施方案中,人受试者诊断患有阿尔茨海默症或处于发展阿尔茨海默症的风险。在一些实施方案中,人受试者携带APOE4等位基因的一个或多个拷贝。在一些实施方案中,人受试者携带在选自由:APP、PSEN1和PSEN2组成的组的至少一种基因中的一种或多种突变。在一些实施方案中,人受试者携带在导致常染色体显性阿尔茨海默症的其它基因中的一种或多种突变(例如,在Bateman等人,Alzheimer's Research&Therapy 3(1):1,2011中描述的那些)。在一些实施方案中,人受试者携带21号染色体的第三拷贝的全部或部分。在一些实施方案中,人受试者通过确立的生物标志物,例如通过脑成像、或者血液或CSF样品获得的那些,而诊断患有阿尔茨海默症。在一些实施方案中,人受试者超过(over)50岁(例如超过55、60、65、70、75、80、85、90或95岁)。

[0018] 在一些实施方案中,人受试者诊断患有选自由以下组成的组的病症或处于发展所述病症的风险:血管性认知损害、血管性痴呆、伴有皮质下梗死和白质脑病的常染色体显性遗传脑动脉病(CADASIL)、伴有皮质下梗死和白质脑病的常染色体隐性遗传脑动脉病(CARASIL)、路易体痴呆、额颞痴呆、肌萎缩侧索硬化、多发性硬化、帕金森病、亨廷顿病、神经退行性疾病、脑血管疾病、脑损伤、慢性创伤性脑病、tau蛋白病(tauopathies)、淀粉样蛋白病(amyloidopathies)、突触核蛋白病(synucleinopathies)、克雅氏病(Creutzfeldt-Jakob disease)、视网膜变性、青光眼、视网膜损伤和衰老。

[0019] 在仍另一方面,本文提供一种鉴定较不易发展早发性神经退行性疾病的人受试者的方法,所述方法包括:从受试者获得生物样品;检测生物样品中至少一个APOE3突变等位基因的存在、或突变ApoE3基因产物的存在;并且基于生物样品中突变ApoE3等位基因或基因产物的存在,将受试者鉴定为较不易发展早发性神经退行性疾病。在一些实施方案中,生物样品是血液、脑脊液、唾液、尿液、眼泪、玻璃体液、房水或组织标本。在一些实施方案中,神经退行性疾病是阿尔茨海默症、帕金森病、亨廷顿病、肌萎缩侧索硬化、视网膜变性或青光眼。在一些实施方案中,视网膜变性是年龄相关性黄斑变性。在一些实施方案中,检测包括确定受试者中APOE3等位基因的序列。在一些实施方案中,检测包括确定编码与野生型ApoE3蛋白相比具有R136处的突变的ApoE3蛋白的APOE3序列的存在与否。在一些实施方案中,R136处的突变是R136S、R136H或R136C。在任何本文所述的鉴定人受试者较不易发展早发性神经退行性疾病的方法的一些实施方案中,所述方法还包括选择受试者以包括在临床试验中,并且任选地施用实验性治疗,或者如果受试者不具有突变APOE3等位基因,则将受试者排除在临床试验之外。在任何本文所述的鉴定人受试者较不易发展早发性神经退行性疾病的方法的一些实施方案中,所述方法还包括选择受试者以包括在临床试验中,并且任选地施用实验性治疗,或者如果受试者具有突变APOE3等位基因,则将受试者排除在临床试验之外。

[0020] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属技术领域的普通技术人员通常所理解的相同的含义。本文描述用于本发明的方法和材料;也可以使用本领域已知的其它的合适的方法和材料。材料、方法和实施例仅是说明性的而不旨在进行限制。本文提及的所有出版物、专利申请、专利、序列、数据库条目和其它参考文献均通过引用以其整体结合在此。在有冲突的情况中,本说明书包括定义将占主导。

[0021] 本发明的其它特征和优点将从以下详细描述和附图以及从权利要求中显而易见。

附图说明

[0022] 图1显示野生型APOE3蛋白的结构的模型。显示N末端(残基1-191)和C末端(残基201-299)结构域。显示APOE4(C112R)、APOE3ch(R136S)和APOE2(R158C)变体的氨基酸位置。

[0023] 图2显示来自对照、先证者和后代样品的APOE的代表性Sanger测序结果。

[0024] 图3描述受试者的系谱学,圆圈表示女性,方块表示男性,菱形表示为了隐私而掩盖性别的个体,箭头描述患有MCI的先证者个体,阴影表示具有痴呆病史的个体。已故个体用斜线(crossed bar)标记。根据需要,指示个体APOE和PSEN1基因型以保持匿名。

[0025] 图4A和4B分别是右眼和左眼的眼底照片。图4C显示右眼的红外图像,其描述图4D中所见的视网膜(线)的横截面。图4D显示右眼的光学相干断层扫描(OCT)的结果。图4E显示

左眼的红外图像。图4F显示左眼的OCT成像的结果。

[0026] 图5显示脑成像结果,显示患有晚发性MCI(轻度认知损害)的PSEN1突变携带者和在该突变的典型年龄(44岁)下具有MCI发病的PSEN1突变携带者的大脑中的淀粉样蛋白斑块负荷和PHF Tau负荷。

[0027] 图6显示PSEN1 E280A突变携带者中淀粉样蛋白负荷、tau负荷、海马体积和葡萄糖代谢水平的测定。红点表示对具有两个APOE3ch等位基因和MCI异常迟发的携带者的测定结果。黑点表示具有在MCI发病时在亲属的典型的年龄较小下患有MCI的PSEN1 E280A突变携带者。灰点表示尚未发展MCI的PSEN1 E280A突变携带者。

[0028] 图7显示通过硫磺素T荧光而检测的、在存在APOE3野生型APOE3ch或不存在APOE的情况下的Aβ42原纤维形成的速率。相对荧光单位(RFU)的变化对于以分钟(min)为单位的时间作图。(***P<0.001,****P<0.0001)

[0029] 图8显示由淀粉样蛋白寡聚化引发的分裂荧光素酶互补(上部)和在来自用ApoE3ch或ApoE3野生型转染的293T细胞的培养基中24小时后、通过分裂荧光素酶互补测定获得的发光百分比的示意图。

[0030] 图9显示APOE2和APOE4肝素结合亲和力的ELISA结果。

[0031] 图10显示ApoE2、ApoE3、ApoE4和ApoE3ch的肝素结合亲和力的免疫印迹分析。

[0032] 图11A和11B显示ApoE2、ApoE3、ApoE4和ApoE3ch的肝素结合亲和力的ELISA结果。

[0033] 图12A是显示用于测试单克隆ApoE3抗体在阻断ApoE3/肝素结合方面的特异性的实验装置的示意图。图12B和12C是显示使由单克隆抗体预孵育的ApoE3蛋白通过肝素结合柱、随后洗涤和洗脱的过程的示意图。

[0034] 图13A-13B显示对来自肝素结合柱的各种级分进行的BCA检验的结果。图13A显示不存在ApoE3抗体时、各种级分中的ApoE3的量。图13B显示存在ApoE3抗体时、各种级分中的ApoE3的量。

[0035] 图14显示免疫印迹结果,显示了由或不由单克隆ApoE3抗体预孵育的各种级分中的ApoE3的量。

[0036] 图15A-15G分别显示19G10-2、23B2、2H79-1、30E1-2、16H8、25F1-2和29G10-1抗体的ELISA分析。

[0037] 图16显示用野生型ApoE3肽和ApoE3ch突变肽处理的ApoE3的肝素结合亲和力的免疫印迹分析。

[0038] 图17A-17D显示ApoE片段与肝素的相互作用的建模。图17A显示含有与肝素相互作用的氨基酸129-157的野生型ApoE片段的模型。图17B显示含有与肝素相互作用的氨基酸129-157的ApoE R136S片段的模型。图17C显示含有与肝素相互作用的氨基酸114-144的野生型ApoE片段的模型。图17D显示含有与肝素相互作用的氨基酸114-144的ApoE R136S片段的模型。

[0039] 图18A-18B显示抗体1H4的肝素亲和色谱法和免疫印迹分析。

[0040] 图19A-19D显示用ApoE3 WT全长蛋白(A)、ApoE3 WT肽(B)、ApoE3ch全长蛋白(C)和ApoE3ch肽(D)测试的1H4-2血清的ELISA结果。

[0041] 图20显示用ApoE3 WT全长蛋白、ApoE3 WT肽、ApoE3ch全长蛋白和ApoE3ch肽测试的1H4-2血清的ELISA结果。

[0042] 图21显示用人重组ApoE3或小鼠重组ApoE3孵育的抗体1H4的系列稀释的代表性ELISA谱。

[0043] 图22显示从克隆的杂交瘤纯化的单克隆1H4抗体的ELISA结果。

[0044] 图23A和23B显示抗体7C11的肝素亲和色谱法和免疫印迹分析。

[0045] 图24A-24D显示用ApoE3 WT全长蛋白(A)、ApoE3 WT肽(B)、ApoE3ch全长蛋白(C)或ApoE3ch肽(D)测试7C11-1血清的ELISA结果。

[0046] 图25显示来自用ApoE3 WT全长蛋白、ApoE3 WT肽、ApoE3ch全长蛋白或ApoE3ch肽测试7C11-1血清的ELISA结果。

[0047] 图26显示从克隆的杂交瘤纯化的单克隆7C11-1抗体的ELISA结果。

[0048] 图27显示针对APOE3野生型(WT)和APOE3ch突变重组蛋白的肝素结合结构域的19G10-2抗体的ELISA筛选的结果。

[0049] 图28A和28B显示抗体19G10-2的肝素亲和色谱法和免疫印迹分析。

[0050] 图29显示用19G10-2血清抗体孵育的ApoE3 WT的免疫印迹。

[0051] 图30是代表性ELISA,显示血清和单克隆抗体杂交瘤上清液19G10-2二者对ApoE3WT或ApoE3ch的结合差异。

[0052] 图31是图30中Y轴的放大图。

[0053] 图32显示从克隆的杂交瘤纯化的单克隆19G10-2抗体的ELISA结果。

[0054] 图33显示针对APOE3野生型(WT)和APOE3ch突变重组蛋白的肝素结合结构域的25F1-2抗体的ELISA筛选的结果。

[0055] 图34A和34B显示抗体25F1-2的肝素亲和色谱法和免疫印迹分析。

[0056] 图35显示用25F1-2单克隆抗体孵育的ApoE3 WT的免疫印迹。

[0057] 图36是代表性ELISA,显示25F1-2血清和单克隆抗体杂交瘤上清液25F1-2二者对ApoE3WT或ApoE3ch的结合差异。

[0058] 图37是图36的Y轴的放大图。

[0059] 图38显示从克隆的杂交瘤纯化的单克隆25F1-2抗体的ELISA结果。

[0060] 图39显示针对APOE3野生型(WT)和APOE3ch突变重组蛋白的肝素结合结构域的1343抗体的ELISA筛选。

[0061] 图40显示针对APOE3野生型(WT)和APOE3ch突变重组蛋白的肝素结合结构域的1343抗体的ELISA筛选。

[0062] 图41A显示在存在或不存在1343抗体的情况下,从肝素柱洗脱的蛋白质级分中的ApoE的免疫印迹分析。图41B显示级分的ELISA分析。

[0063] 图42A显示诱导型APOE依赖性Tau过度磷酸化的眼内模型的示例性实验概要。图42B显示用PBS注射的对照视网膜中的PHF tau。图42C显示用重组人APOE3注射的视网膜。

[0064] 图43A-43I显示与用小鼠1H4-2抗体或人源化1343Ah抗体注射的视网膜相比,对照视网膜中的PHF tau。

[0065] 图44显示蛋白A生物传感器上增加浓度(nM)的ApoE3蛋白对1H4的代表性结合测定。

具体实施方式

[0066] 本公开揭示APOE3ch(具有两个拷贝的APOE3 Christchurch(R136S)突变)的纯合性与对阿尔茨海默症临床发病的强烈抵抗相关,并且R136S突变显著降低了ApoE结合硫酸乙酰肝素蛋白聚糖(HSPG)/肝素的能力。因此,本公开涉及结合至野生型ApoE和/或含有R136S突变的ApoE同种型(一种或多种)的抗体(例如阻断ApoE与HSPG/GAG/肝素之间的相互作用和/或降低其结合的抗体)。还考虑了包含野生型和含有R136S突变的突变ApoE的肽片段(例如HSPG/GAG/肝素结合结构域)的融合蛋白。这些蛋白可以通过表达此类组合物的人类细胞施用。本公开还涉及阻断ApoE和HSPG/肝素之间的相互作用的小分子,以及筛选同样的小分子的方法。还提供用基因组编辑系统编辑ApoE基因座的组合物和方法。本文所述的抗体、融合蛋白、小分子和基因组编辑系统可用于治疗或预防与痴呆和/或轻度认知损害(MCI)相关的认知下降和/或神经退行性病变,例如阿尔茨海默症、血管性痴呆、路易体痴呆、额颞痴呆、帕金森病或亨廷顿病。本文所述的抗体、融合蛋白、小分子和基因组编辑系统也可用于治疗或预防神经退行性疾病、脑血管病况、脑损伤、视网膜变性、视神经变性或视网膜损伤。

[0067] 载脂蛋白E(ApoE)

[0068] 载脂蛋白E变体是AD的主要遗传修饰因子,促进晚发性AD的易感性。APOE4等位基因导致位置112处的半胱氨酸改变为精氨酸,并与单等位基因携带者中AD风险中的5倍增加相关,在纯合子携带者中达到20倍增加。APOE2导致位置158处的精氨酸至半胱氨酸的氨基酸变化,并且对AD具有保护作用,而APOE3等位基因被认为是中性的(Corder等人,Nat Genet(7)180-184,1994;Hauser等人,Cure Alzheimer Res(10);808-817,2013)。APOE影响淀粉样蛋白的产生、聚集和清除,是淀粉样蛋白斑块的组分,并使tau介导的神经退行性病变恶化。APOE等位基因还调节脂质代谢和心血管风险。约5-10%的APOE2纯合子个体发展III型高脂蛋白血症(HLP III),而其它APOE罕见变异与常染色体显性HLP III相关。HLP III的特征在于增加的血浆胆固醇和甘油三酯水平,以及存在结节状或横纹状手掌黄色瘤。APOE等位基因改变AD风险和导致HLP III的机制尚不完全清楚。受特定突变影响的显著的APOE特性包括以下方面的差异:1)对脂质和LDL受体的结合亲和力;2)其N末端(氨基酸1至199)和C末端结构域(216至299)之间的结构域间相互作用的性质;和,3)形成由C末端结构域介导的同源低聚物的能力(Frieden等人,PNAS(109):8913-8918,2012;Georgiadou等人,PLoS One(6)e27037,2011;Lalazar等人,J Biol Chem(263)3542-3545,1988)。

[0069] 硫酸乙酰肝素(HS)是一种发现于所有动物组织中的线性多糖,它以蛋白聚糖(HSPG)的形式存在,其中两条或三条HS链以紧密靠近的形式连接至细胞表面或细胞外基质蛋白。HSPG部分存在于位于质膜和细胞外基质中的数百种蛋白质中。通过HSPG介导的蛋白质-蛋白质相互作用在与包括淀粉样蛋白和tau病理学的阿尔茨海默症的病理学相关的众多过程中起着关键作用。硫酸乙酰肝素是糖类的糖胺聚糖家族的一员,并且在结构上与肝素密切相关。两者均由可变硫酸化重复二糖单元组成。硫酸乙酰肝素与大量细胞外蛋白结合。这些通常统称为"肝素相互作用组(interactome)"或"肝素结合蛋白",因为它们是通过相关多糖肝素的亲和色谱法分离的。

[0070] 人ApoE3蛋白的示例性氨基酸序列(Uniprot登录号P02649)如下所示:

[0071] KVEQAVETEPEPELRQQTEWQSGQRWELALGRFWDYLRWVQTLSEQVQEELLSSQVTQELRALMDETMK ELKAYKSELEEQLTPVAEETRARLSKELQAAQARLGADMEDVCGRLVQYRGEVQAMLGQSTEELRVRLA SHL**RKLRKR**LLRDADDLQKRLAVYQAGAREGAERGLSAIRERLGPLVEQGRVRAATVGSLAGQPLQER AQAWGERLRARMEEMGSRTRDRLDEVKEQVAEVRAKLEEQAQQIRLQAEAFQARLKSWFEPLVEDMQRQ WAGLVEKVQAAVGTSAAPVPSDNH (SEQ ID NO: 1)

[0072] 已在人ApoE中识别出至少两种HSPG/肝素结合结构域,一种位于N末端结构域,一种位于C末端结构域(Weisgraber等人J Biol Chem,261(5):2068-76,1986;Saito等人,J Biol Chem,278(17):14782-7,2003)。精氨酸136(R136)附近的HSPG/肝素结合结构域(N末端HSPG/肝素结合结构域)在全长脂化的和脱脂的ApoE中起作用,而C末端结构域中的HSPG/肝素结合结构域结构域仅在不存在N末端结构域的情况中和脱脂的ApoE中起作用。N末端HSPG/肝素结合结构域被充分表征,并且包含SEQ ID NO:1的氨基酸残基142至147(粗体)。C末端HSPG/肝素结合结构域较少被充分表征,并且包含位置233处的赖氨酸(K)和附近的其它带电氨基酸,包括SEQ ID NO:1的氨基酸残基211至218和243至272。本发明人显示ApoE的位置136处的精氨酸在ApoE的肝素结合中起关键作用。不希望受理论束缚,潜在机制是由位置136处的精氨酸介导的肝素结合的变构调节。如本文所用的变构调节与一个或多个变构调节位点处的通过变构调节剂的配体结合的调节有关,所述变构调节位点与配体的结合位点(一个或多个)不同。在一些实施方案中,ApoE和HSPG/肝素结合的一个或多个变构调节位点包含如SEQ ID NO:1中所示的ApoE的位置136处的精氨酸。“HSPG/肝素结合结构域(一个或多个)”、“HSPG/肝素结合位点(一个或多个)”、“HSPG-结合结构域(一个或多个)”和“HSPG-结合位点(一个或多个)”在本文中可互换使用。

[0073] 抗ApoE抗体

[0074] 提供结合至野生型或突变ApoE蛋白(例如,人ApoE蛋白)的抗ApoE抗体。在一些情况中,本文所述的抗体结合至野生型ApoE蛋白(例如ApoE2、ApoE3或ApoE4),但不结合至突变ApoE蛋白(例如ApoEch)。在一些情况中,本文所述的抗体结合至突变ApoE蛋白(例如ApoEch),但不结合至野生型ApoE蛋白(例如ApoE2、ApoE3或ApoE4)。在一些情况中,本文所述的抗体结合至突变ApoE蛋白(例如ApoEch)和野生型ApoE蛋白(例如ApoE2、ApoE3或ApoE4)。

[0075] 在一些情况中,本文提供的抗体阻断野生型ApoE蛋白(例如ApoE2、ApoE3或ApoE4)和HSPG之间的相互作用。本文提供的抗体可以降低或调节ApoE蛋白(例如ApoE2、ApoE3或ApoE4)对HSPG的结合亲和力。在一些情况中,本文提供的抗体结合至野生型ApoE蛋白的HSPG结合结构域。在一些情况中,本文提供的抗体结合至一个或多个HSPG/ApoE结合的变构调节位点(例如,ApoE的氨基酸位置136)。在一些情况中,本文所述的抗体减少原纤维形成和/或淀粉样蛋白寡聚化。

[0076] 在一些情况中,本文提供的抗体结合至包含TEELRVSLASHLRK(SEQ ID NO:2)或由其组成的野生型或突变ApoE中的氨基酸序列。在一些情况中,本文提供的抗体结合至包含TEELRVRLASHLRK(SEQ ID NO:3)或由其组成的野生型或突变ApoE中的氨基酸序列。在一些情况中,氨基酸序列TEELRVSLASHLRK(SEQ ID NO:2)包含用于本文提供的抗体的表位或由其组成。在一些情况中,氨基酸序列TEELRVRLASHLRK(SEQ ID NO:3)包含用于本文提供的抗体的表位或由其组成。也可以使用这些序列的变体,例如,与这些序列为至少80%、85%、90%或95%同一性的那些。

[0077] 两条序列之间的“同一性”的计算可以如下进行。为了最佳比较目的比对序列(例如,为了最佳比对可以在第一和第二核酸序列之一或两者中引入空位,并且为了比较目的可以忽略不相同的序列)。为了比较目的比对的序列长度为参考序列长度的至少70％(例如,至少80％、90％或100％)。然后比较相应核苷酸位置处的核苷酸。当第一条序列中的一个位置被与第二条序列中相应位置相同的核苷酸占据时,则该位置的分子是相同的。两条序列之间的百分比同一性是序列共享的相同位置的数量的函数,考虑到空位的数量和各空位的长度,需要引入这些空位以实现两个序列的最佳比对。

[0078] 序列的比较和两条序列之间的百分比同一性的确定可以使用数学算法来完成。在一些实施方案中,两条核苷酸序列之间的百分比同一性是使用已并入GCG软件包(可在gcg.com上获得)中的GAP程序的Needleman和Wunsch((1970)J.Mol.Biol.48:444-453)算法、使用Blossum 62矩阵、PAM250矩阵、NWSgapdna.CMP矩阵确定的。在一些实施方案中,两条氨基酸或核苷酸序列之间的百分比同一性可以使用已并入ALIGN程序(版本2.0)的E.Meyers和W.Miller((1989)CABIOS,4:11-17)算法,使用PAM120权重残差表、空位长度罚值为12、和空位罚值为4确定的。

[0079] 本公开中术语“抗体”的使用意指涵盖全抗体(与微型抗体、纳米抗体或抗体片段相对)、双特异性抗体、四价抗体、多特异性抗体、微型抗体、纳米抗体和抗体片段。在一些情况中,本公开的抗ApoE抗体是全抗体。在一些情况中,本公开的抗ApoE抗体是嵌合抗体、人抗体或人源化抗体。在某些情况中,抗ApoE抗体的重链恒定区是人IgG1、人IgG2、人IgG3或人IgG4恒定区。在某些情况中,轻链恒定区是人κ恒定区。在其它情况下,轻链恒定区是人λ恒定区。在一些情况中,本公开的抗体被设计为具有低效应子功能性(例如,通过例如N297Q、T299A等Fc修饰。也参见,Wang,X.,Mathieu,M.&Brezski,R.J.Protein Cell(2018)9:63.doi.org/10.1007/s13238-017-0473-8(通过引用并入本文))。在一些情况中,抗体的Fc部分是hIgG1 Fc、a hIgG2 Fc、a hIgG3 Fc、a hIgG4 Fc、a hIgG1agly Fc、a hIgG2 SAA Fc、a hIgG4(S228P)Fc或a hIgG4(S228P)/G1 agly Fc(在这种格式中-最小化效应子功能-CH1和CH2结构域是具有“固定”铰链(S228P)的IgG4,并且是无糖基化的。CH3结构域是hIgG1,或hIgG4(S228P)agly Fc)。在一种情况中,抗体具有以下三种具有降低的效应子功能降低的支架之一:hIgG1 agly(N297Q);hIgG2 SAA(参见,Vafa等人Methods,65(1):114-26(2014);和hIgG4P/G1 agly(参见,US 2012/0100140A1)。

[0080] 在一些实施方案中,本文描述的抗体或其ApoE结合片段显示如在下文的实施例部分中说明的抗体1H4-2、7C11-1、19G10-2、23B2(1343)、2H79-1、30E1-2、16H8、25F1-2和29G10-1所概述的结合特征和/或生物学特性。

[0081] 在一些实施方案中,本公开提供结合至野生型人ApoE或其部分的抗体,并具有以下性质的一个或多个:(i)以KD≤20nM的高亲和力结合至野生型人ApoE;(ii)与野生型人ApoE竞争与肝素的结合;和(iii)减少视网膜细胞中配对螺旋样纤维(Paired Helical Filament)(PHF)Tau的形成。

[0082] 在一些实施方案中,本公开提供结合至突变人ApoE(例如,具有人ApoE的氨基酸位置136处的突变的那些,例如ApoEch)或其部分的抗体,并且具有以下性质的一个或多个:(i)以KD≤20nM的高亲和力结合至突变人ApoE(例如,在人ApoE的氨基酸位置136处的突变,例如ApoEch);(ii)与野生型人ApoE竞争与肝素的结合;(iii)减少视网膜细胞中配对螺旋

样纤维(PHF)Tau的形成。

[0083] 任何本文所述的抗ApoE抗体可用于治疗或预防与痴呆或轻度认知损害(MCI)相关的病症(例如阿尔茨海默症、血管性痴呆、路易体痴呆、额颞痴呆、帕金森病、或亨廷顿病)、神经退行性疾病、脑血管疾病、脑损伤、视网膜变性或视网膜损伤。

[0084] 示例性抗体1H4-2

[0085] 抗体1H4-2通过用APOE:KLH-CTEELRVRLASHLRK-CONH2免疫来产生。下文中提供1H4-2的互补决定区(CDR)和重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列。

[0086]

可变区	链类型	CDR-1	CDR-2	CDR-3
1H4-2 VL	轻链	KASQSVDYDGDSYMN (SEQ ID NO: 4)	AASNLES (SEQ ID NO: 5)	QQSNEDPWT (SEQ ID NO: 6)
1H4-2 VH	重链	SYTMS (SEQ ID NO: 7)	KIRNGGGITYYLDTLKG (SEQ ID NO: 8)	HYYGSEDYFDY (SEQ ID NO: 9)

[0087] 可变轻链:

[0088] 核苷酸序列:

[0089] 信号序列-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

[0090] **ATGGAGACAGACACAATCCTGCTATGGGTGCTGCTGCTCTGGGTTCCAGGCTCCACTGGT**GACAATGTGCTGACCCAATCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCCACCATCTCCTGCAAGGCCAGCCAAAGTGTTGATTATGATGGTGATAGTTATATGAACTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAAAGTCTTCATCTATGCTGCATCCAATCTAGAATCTGGGATCCCAGCCAGGTTTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCAAAGTAATGAGGATCCGTGGACGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGG AAATCAAA (SEQ ID NO: 10)

[0091] 氨基酸序列:

[0092] 信号肽-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

[0093] **METDTILLWVLLLWVPGSTG**DNVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGDSYMNWYQQKPGQPPKVFIYAASNLESGIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQSNEDPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 12)

[0094] 可变重链:

[0095] 核苷酸序列

[0096] 信号序列-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

[0097] **ATGAATTTCGGGCTCAGCTTGATTTTCCTTGTCCTTGTTTTAAAAGGTGTCCTGTGT**GAAGTGAAGCTGGTGGAATCTGGGGGAGGTGTGGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAGCTATACCATGTCTTGGGTTCGTCAGACTCCAGAGAAGAGGCTGGAGTGGGTCGCAAAATTCGTAATGGTGGTGGTATCACCTACTATTTAGACACTTTAAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACCCTATACCTGCAAATGAGCAGTCTGAAGTCTGAAGACACGGCCATTTATTTCTGTGCAAGACATTACTACGGTAGCGAGGACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 11)

[0098] 氨基酸序列:

[0099] 信号肽-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

[0100] **MNFGLSLIFLVLVLKGVLC**EVKLVESGGGVVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYTMS WVRQTPEKRLEWVAKIRNGGGITYYLDTLKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSE DTAIYFCARHYYGSEDYFDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 13)

[0101] 在一些情况中,抗ApoE抗体包含含有抗体1H4-2的三个VH CDR的VH和含有抗体1H4-2的三个VL CDR的VL。六个CDR可以基于本领域已知的任何定义,例如但不限于Kabat、Chothia、增强型Chothia、contact、IMGT或Honegger定义。这些CDR可以例如通过使用AbYsis数据库(bioinf.org.uk/abysis/sequence_input/key_annotation/key_annotation.cgi)来确定。

[0102] 在一种情况中,本公开的抗ApoE抗体包含(i)VH,其包括包含SEQ ID NO:7中记载的氨基酸序列的VHCDR1、包含SEQ ID NO:8中记载的氨基酸序列的VHCDR2、和包含SEQ ID NO:9中记载的氨基酸序列的VHCDR3;和(ii)VL,其包括包含SEQ ID NO:4中记载的氨基酸序列的VLCDR1、包含SEQ ID NO:5中记载的氨基酸序列的VLCDR2、和包含SEQ ID NO:6中记载的氨基酸序列的VLCDR3。

[0103] 在一些情况中,抗ApoE抗体包含与SEQ ID NO:13中记载的氨基酸序列为至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的VH。在一些情况中,抗ApoE抗体包含与SEQ ID NO:12中记载的氨基酸序列为至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的VL。在一种情况中,抗ApoE抗体包含与SEQ ID NO:13中记载的氨基酸序列为至少85%同一性的VH和与SEQ ID NO:12中记载的氨基酸序列为至少85%同一性的VL。在另一种情况中,抗ApoE抗体包含与SEQ ID NO:13中记载的氨基酸序列为至少90%同一性的VH和与SEQ ID NO:12中记载的氨基酸序列为至少90%同一性的VL。在仍另一种情况下,抗ApoE抗体包含与SEQ ID NO:13中记载的氨基酸序列相同的VH和与SEQ ID NO:12中记载的氨基酸序列相同的VL。

[0104] 在某些情况中,结合至ApoE的本公开的抗体是与具有SEQ ID NO:13中记载的氨基酸序列的VH和具有SEQ ID NO:12中记载的氨基酸序列的VL的参照抗体竞争或结合相同的表位的抗体。

[0105] 示例性抗体7C11-1

[0106] 抗体7C11-1通过用APOE:KLH-CTEELRVRLASHLRK-CONH2(SEQ ID NO:54)免疫来产生。下文中提供7C11-1的互补决定区(CDR)和重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列。

[0107]

可变区	链类型	CDR-1	CDR-2	CDR-3
7C11-1 VL	轻链	KASQSVDYDGD SYMN (SEQ ID NO: 14)	AASNLES (SEQ ID NO: 15)	QQSNEDPWT (SEQ ID NO: 16)
7C11-1 VH	重链	RYTMS (SEQ ID NO: 17)	KIRNVGGITYYP DTVKG(SEQ ID NO: 18)	HYYGSEDYFDY (SEQ ID NO: 19)

[0108] 可变重链:

[0109] 核苷酸序列

[0110] 信号序列-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

[0111] **ATGAATTTCGGGCTCAGCGTGATTTTCCTTGTCCTTGTTTTAAAAGGTGTCCTGTGT**
GAAGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGTTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAAA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAGGTATACCATGTCTTGGGTTCGG
CAGACTCCAGAGAAGAGGCTGGAGTGGGTCGCAAAAATTCGTAATGTTGGTGGTATC
ACCTACTATCCAGACACTGTAAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAG
AACACCCTTTACCTGCAAATGAGCAGTCTGAAGTCTGAAGACACGGCCATGTATTAC
TGTGCAAGACATTATTACGGTAGCGAGGACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACC
ACTCTCACAGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 20)

[0112] 氨基酸序列：

[0113] 信号肽-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

[0114] **MNFGLSVIFLVLVLKGVLC**EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSRYTMSWVR
QTPEKRLEWVAKIRNVGGITYYPDTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYY
CARHYYGSEDYFDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 22)

[0115] 可变轻链：

[0116] 核苷酸序列：

[0117] 信号序列-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

[0118] **ATGGAGACAGACACAATCCTGCTATGGGTGCTGCTGCTCTGGGTTCCAGGCTCCACTGGT**
GA
CAATGTGCTGACCCAATCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCCACCAT
CT
CCTGCAAGGCCAGCCAAAGTGTTGATTATGATGGTGATAGTTATATGAACTGGTACCAAC
AG
AAACCAGGACAGCCACCCAAAGTCTTCATCTATGCTGCATCCAATCTAGAATCTGGGATC
CC

AGCCAGGTTTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAAACTTCACCCTCAACATCCATCCTGTGGA
GG
AGGAGGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCAAAGTAATGAGGATCCGTGGACGTTCGGTG
GA GGCACCAAGCTGGAAATCAAA (SEQ ID NO: 21)

[0119] 氨基酸序列：

[0120] 信号序列-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

[0121] **METDTILLWVLLLWVPGSTG**DNVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGDSYMNWY
QQ
KPGQPPKVFIYAASNLESGIPARFSGSGSGTNFTLNIHPVEEEDAATYYCQQSNEDPWTF
GG GTKLEIK (SEQ ID NO: 23)

[0122] 在一些情况中,抗ApoE抗体包含含有抗体7C11-1的三个VH CDR的VH和含有抗体7C11-1的三个VL CDR的VL。六个CDR可以基于本领域已知的任何定义,例如但不限于Kabat、Chothia、增强型Chothia、contact、IMGT或Honegger定义。这些CDR可以例如通过使用AbYsis数据库(bioinf.org.uk/abysis/sequence_input/key_annotation/key_annotation.cgi)来确定。

[0123] 在一种情况下,本公开的抗ApoE抗体包含(i)VH,其包括包含SEQ ID NO:17中记载的氨基酸序列的VHCDR1、包含SEQ ID NO:18中记载的氨基酸序列的VHCDR2、和包含SEQ ID NO:19中记载的氨基酸序列VHCDR3;和(ii)VL,其包括包含SEQ ID NO:14中记载的氨基酸序列的VLCDR1、包含SEQ ID NO:15中记载的氨基酸序列VLCDR2、和包含SEQ ID NO:16中记载

的氨基酸序列VLCDR3。

[0124] 在一些情况中,抗ApoE抗体包含与SEQ ID NO:23中记载的氨基酸序列为至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的VH。在一些情况中,抗ApoE抗体包含与SEQ ID NO:22中记载的氨基酸序列为至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的VL。在一种情况中,抗ApoE抗体包含与SEQ ID NO:23中记载的氨基酸序列为至少85%同一性的VH和与SEQ ID NO:22中记载的氨基酸序列为至少85%同一性的VL。在另一种情况中,抗ApoE抗体包含与SEQ ID NO:23中记载的氨基酸序列为至少90%同一性的VH和与SEQ ID NO:22中记载的氨基酸序列为至少90%同一性的VL。在仍另一种情况中,抗ApoE抗体包含与SEQ ID NO:23中记载的氨基酸序列相同的VH和与SEQ ID NO:22中记载的氨基酸序列相同的VL。

[0125] 在某些情况中,结合至ApoE的本公开的抗体是与具有SEQ ID NO:23中记载的氨基酸序列的VH和具有SEQ ID NO:22中记载的氨基酸序列的VL的参照抗体竞争或结合相同的表位的抗体。

[0126] 示例性抗体19G10-2

[0127] 抗体19G10-2通过用KLH-CTEELRVSLASHLRK-CONH2免疫来产生。下文章提供19G10-2的互补决定区(CDR)和重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列。

[0128]

可变区	链类型	CDR-1	CDR-2	CDR-3
19G10-2 VL	轻链	KASQSVDYDG DSYMN (SEQ ID NO: 24)	AASNLES (SEQ ID NO: 25)	QQSNVDPWT (SEQ ID NO: 26)
19G10-2 VH	重链	DYHMH (SEQ ID NO: 27)	WIDPENGNTMY DPKFQG (SEQ ID NO: 28)	GTARASFDY (SEQ ID NO: 29)

[0129] 可变轻链:

[0130] 核苷酸序列:

[0131] 信号序列-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

[0132] **ATGGAGACAGACACAATCCTGCTATGGGTGCTGCTGCTCTGGGTTCCAG GCTCCACTGGT**GACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCT CTAGGGCAGAGGGCCACCATCTCCTGCAAGGCCAGCCAAAGTGTTGATTATG ATGGTGATAGTTATATGAATTGGTACCAACAGAAATCAGGACAGCCACCCAA ACTCCTCATCTATGCTGCATCCAATCTAGAATCTGGGATCCCAGCCAGGTTTA GTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGA GGAGGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCAAAGTAATGTGGATCCGTGGACG TTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA (SEQ ID NO: 30)

[0133] 氨基酸序列:

[0134] 信号序列-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

[0135] **METDTILLWVLLLWVPGSTG**DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGDSYM NWYQQKSGQPPKLLIYAASNLESGIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQS NVDPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 32)

[0136] 可变重链分析:

[0137] 核苷酸序列

[0138] 信号序列-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

[0139] **ATGAAATGCAGCTGGGTCATCTTCTTCCTGATGGCAGTGGTTACAGGGG TCAATTCA**GAGGTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTTGTGAGGCCAGG GGCCTTAGTCAAGTTGTCCTGCAAAGCTTCTGGCTTCAACATTAAAGACTACC ATATGCACTGGGTGAAGGAGAGGCCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGATG GATTGATCCTGAGAATGGTAATACTATGTATGACCCGAAGTTCCAGGGCAAG GCCAGTATAACAGCAGACACATCCTCCAACACAGCCTACCTGCAGCTCAGCA

GCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTACTGTGTTAGGGGGGACAGCTCGG GCTTCCTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 31)

[0140] 氨基酸序列:

[0141] 信号序列-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

MKCSWVIFFLMAVVTGVNSEVQLQQSGAELVRPGALVKLSCKASGFNIKDYHMHW

[0142] VKERPEQGLEWIGWIDPENGNTMYDPKFQGKASITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAV

YYCVRGTARASFDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 33)

[0143] 在一些情况中,抗ApoE抗体包含含有抗体19G10-2的三个VH CDR的VH和含有抗体19G10-2的三个VL CDR的VL。六个CDR可以基于本领域已知的任何定义,例如但不限于Kabat、Chothia、增强型Chothia、contact、IMGT或Honegger定义。这些CDR可以例如通过使用AbYsis数据库(bioinf.org.uk/abysis/sequence_input/key_annotation/key_annotation.cgi)来确定。

[0144] 在一种情况下,本公开的抗ApoE抗体包含(i)VH,其包括包含SEQ ID NO:27中记载的氨基酸序列的VHCDR1、包含SEQ ID NO:28中记载的氨基酸序列的VHCDR2、和包含SEQ ID NO:29中记载的氨基酸序列的VHCDR3;和(ii)VL,其包括包含SEQ ID NO:24中记载的氨基酸序列的VLCDR1、包含SEQ ID NO:25中记载的氨基酸序列的VLCDR2、和包含SEQ ID NO:26中记载的氨基酸序列的VLCDR3。

[0145] 在一些情况中,抗ApoE抗体包含与SEQ ID NO:33中记载的氨基酸序列为至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的VH。在一些情况中,抗ApoE抗体包含与SEQ ID NO:32中记载的氨基酸序列为至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的VL。在一种情况中,抗ApoE抗体包含与SEQ ID NO:33中记载的氨基酸序列为至少85%同一性的VH和与SEQ ID NO:32中记载的氨基酸序列为至少85%同一性的VL。在另一种情况中,抗ApoE抗体包含与SEQ ID NO:33中记载的氨基酸序列为至少90%同一性的VH和与SEQ ID NO:32中记载的氨基酸序列为至少90%同一性的VL。在仍另一种情况中,抗ApoE抗体包含与SEQ ID NO:33中记载的氨基酸序列相同的VH和与SEQ ID NO:32中记载的氨基酸序列相同的VL。

[0146] 在某些情况中,结合至ApoE的本公开的抗体是与具有SEQ ID NO:33中记载的氨基酸序列的VH和具有SEQ ID NO:32中记载的氨基酸序列的VL的参照抗体竞争或结合相同的表位的抗体。

[0147] 示例性抗体25F1-2

[0148] 抗体25F1-2通过用KLH-CTEELRVSLASHLRK-CONH2免疫来产生。下文中提供25F1-2的互补决定区(CDR)和重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列。

[0149]

可变区	链类型	CDR-1	CDR-2	CDR-3
25F1-2 VL	轻链	KASQSVDYDG DTYMN (SEQ ID NO: 34)	TASNLES (SEQ ID NO: 35)	QQSNEDPWT (SEQ ID NO: 36)
25F1-2 VH	重链	DYHIH (SEQ ID NO: 37)	WIDPEIDKTLY DPKFQG (SEQ ID NO: 38)	GTARASFDY (SEQ ID NO: 39)

[0150] 可变轻链分析：

[0151] 核苷酸序列：

[0152] 信号序列-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

[0153] **ATGGAGACAGACACAATCCTGCTATGGGTGCTGCTGCTCTGGGTTCCAG GCTCCACTGGT**GACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCT CTAGGGCAGAGGGCCACCATCTCCTGCAAGGCCAGCCAAAGTGTTGATTATG ATGGTGATACTTATATGAACTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAA ACTCCTCATCTATACTGCATCCAATCTAGAATCTGGGATCCCAGCCAGGTTTA GTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGA GGTGGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCAAAGTAATGAGGATCCATGGACG TTCGGTGGAGGCACCAAGCTGG AAATCAAA (SEQ ID NO: 40)

[0154] 氨基酸序列：

[0155] 信号序列-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

[0156] **METDTILLWVLLLWVPGSTG**DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGDTYM NWYQQKPGQPPKLLIYTASNLESGIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEVDAATYYCQQS NEDPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 42)

[0157] 可变重链分析：

[0158] 核苷酸序列

[0159] 信号序列-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

[0160] **ATGAAATGCAGCTGGGTCATCTTCTTCCTGATGGCAGTGGTTACAGGGG TCAATTCA**GAGGTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTTGTGAGGCCAGG GGCCTTAGTCAAGTGGTCCTGCAAAGCTTCTGGCTTCAACATTAAAGACTACC ATATACACTGGGTGAAACAGAGGCCTGAACAGGGCCTGGACTGGATTGGATG GATTGATCCTGAGATTGATAAAACTCTATATGACCCGAAGTTTCAGGGCAAG GCCAGAATAACAGCAGACACATCCTCCAATACAGCCTACCTGCAGCTCAGCA GCCTGACATCTGAAGACACTGCCGTCTATTACTGTGCCAGGGGGACAGCTCG GGCTTCCTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 41)

[0161] 氨基酸序列：

[0162] 信号序列-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

[0163] **MKCSWVIFFLMAVVTGVNS**EVQLQQSGAELVRPGALVKWSCKASGFNIKDYHIHW VKQRPEQGLDWIGWIDPEIDKTLYDPKFQGKARITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVY YCARGTARASFDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 43)

[0164] 在一些情况中，抗ApoE抗体包含含有抗体25F1-2的三个VH CDR的VH和含有抗体25F1-2的三个VL CDR的VL。六个CDR可以基于本领域已知的任何定义，例如但不限于Kabat、Chothia、增强型Chothia、contact、IMGT或Honegger定义。这些CDR可以例如通过使用

AbYsis数据库(bioinf.org.uk/abysis/sequence_input/key_annotation/key_annotation.cgi)来确定。

[0165] 在一种情况中,本公开的抗ApoE抗体包含(i)VH,其包括包含SEQ ID NO:37中记载的氨基酸序列的VHCDR1、包含SEQ ID NO:38中记载的氨基酸序列的VHCDR2、和包含SEQ ID NO:39中记载的氨基酸序列的VHCDR3;和(ii)VL,其包括包含SEQ ID NO:34中记载的氨基酸序列的VLCDR1、包含SEQ ID NO:35中记载的氨基酸序列的VLCDR2和包含SEQ ID NO:36中记载的氨基酸序列的VLCDR3。

[0166] 在一些情况中,抗ApoE抗体包含与SEQ ID NO:43中记载的氨基酸序列为至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的VH。在一些情况中,抗ApoE抗体包含与SEQ ID NO:42中记载的氨基酸序列为至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的VL。在一种情况中,抗ApoE抗体包含与SEQ ID NO:43中记载的氨基酸序列为至少85%同一性的VH和与SEQ ID NO:42中记载的氨基酸序列为至少85%同一性的VL。在另一种情况中,抗ApoE抗体包含与SEQ ID NO:43中记载的氨基酸序列为至少90%同一性的VH和与SEQ ID NO:42中记载的氨基酸序列为至少90%同一性的VL。在仍另一种情况中,抗ApoE抗体包含与SEQ ID NO:43中记载的氨基酸序列相同的VH和与SEQ ID NO:42中记载的氨基酸序列相同的VL。

[0167] 在某些情况中,结合至ApoE的本公开的抗体是与具有SEQ ID NO:43中记载的氨基酸序列的VH和具有SEQ ID NO:42中记载的氨基酸序列的VL的参照抗体竞争或结合相同的表位的抗体。

[0168] 示例性抗体1343ab

[0169] 抗体1343ab通过用KLH-CTEELRVSLASHLRK-CONH2免疫来产生。下文中提供互补决定区(CDR)和全长重链和轻链的氨基酸序列。

[0170]

可变区	链类型	CDR-1	CDR-2	CDR-3
1343 VL	轻链	KASQSVDYDGENYMN (SEQ ID NO: 44)	VASNLES (SEQ ID NO: 45)	QQSNLDPWT (SEQ ID NO: 46)
1343 VH	重链	GFNIKDY (SEQ ID NO: 47)	DPENGN (SEQ ID NO: 48)	GTARASFDY (SEQ ID NO: 49)

[0171] 全长重链

EVQLQQSGAELVRPGALVKLSCKASGFNIKDYHLHWVKQRPEQGLE
WIGWIDPENGNVIYDPKFQGKATMTV
VTSSNTAYLQLRSLTSEDTAVYFCTRGTARASFDYWGQGTSLTVSSAK
TTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLG
CLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSST
WPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIV

[0172] PRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLTITLTPKVTCVVVDISKDDP
EVQFSWFVDDVEVHTAQTQPRE
EQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGR
PKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSL
TCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLNV
QKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHT
EKSLSHSPGK (SEQ ID NO: 53)

[0173] 全长轻链

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGENYMNWYQQKPGQS
PKLLIYVASNLESGIPARFSGSGSG
TDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQSNLDPWTFGGGTKLEIKRADAAPTVS
[0174] IFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFY
PKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYE
RHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRN (SEQ ID NO: 52)

[0175] EC

[0176] 对292处的重链恒定区N检测到N连接的糖基化。在重链上观察到C末端赖氨酸的丢失。

[0177] 在一些情况中,抗ApoE抗体包含含有抗体1343ab的三个VH CDR的VH和含有抗体1343ab的三个VL CDR的VL。六个CDR可以基于本领域已知的任何定义,例如但不限于Kabat、Chothia、增强型Chothia、contact、IMGT或Honegger定义。这些CDR可以例如通过使用AbYsis数据库(bioinf.org.uk/abysis/sequence_input/key_annotation/key_annotation.cgi)来确定。

[0178] 在一种情况中,本公开的抗ApoE抗体包含:(i)VL,其包括包含SEQ ID NO:47中记载的氨基酸序列的VHCDR1、包含SEQ ID NO:48中记载的氨基酸序列的VHCDR2、和包含SEQ ID NO:49中记载的氨基酸序列VHCDR3;和(ii)VL,其包括包含SEQ ID NO:44中记载的氨基酸序列的VLCDR1、包含SEQ ID NO:45中记载的氨基酸序列的VLCDR2、和包含SEQ ID NO:46中记载的氨基酸序列的VLCDR3。

[0179] 在一些情况中,抗ApoE抗体包含与SEQ ID NO:53中记载的氨基酸序列为至少70%、71%、72%、73%、74%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的重链。在一些情况中,抗ApoE抗体包含与SEQ ID NO:52中记载的

氨基酸序列为至少70％、71％、72％、73％、74％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％同一性的轻链。在一种情况中,抗ApoE抗体包含与SEQ ID NO:53中记载的氨基酸序列为至少80％同一性的重链和与SEQ ID NO:52中记载的氨基酸序列为至少80％同一性的轻链。在另一种情况中,抗ApoE抗体包含与SEQ ID NO:53中记载的氨基酸序列为至少85％同一性的重链和与SEQ ID NO:52中记载的氨基酸序列为至少85％同一性的轻链。在仍另一种情况中,抗ApoE抗体包含与SEQ ID NO:53中记载的氨基酸序列相同的重链和与SEQ ID NO:52中记载的氨基酸序列相同的轻链。

[0180] 在某些情况中,结合至ApoE的本公开的抗体是与具有SEQ ID NO:53中记载的氨基酸序列的重链和具有SEQ ID NO:52中记载的氨基酸序列的轻链的参照抗体竞争或结合相同的表位的抗体。

[0181] 具有任何上述抗体的CDR序列的嵌合抗体、人抗体或人源化抗体可基于本文所述的方法产生。

[0182] 抗体片段

[0183] 抗体片段(例如,Fab、Fab'、F(ab')2、Facb和Fv)可以通过完整抗体的蛋白水解消化来制备。例如,可以通过用酶如木瓜蛋白酶、胃蛋白酶或纤维蛋白溶酶(plasmin)处理全抗体来获得抗体片段。全抗体的木瓜蛋白酶消化产生F(ab)2或Fab片段;全抗体的胃蛋白酶消化产生F(ab')2或Fab';全抗体的纤维蛋白溶酶消化产生Facb片段。

[0184] 可选地,可以重组产生抗体片段。例如,可以构建编码感兴趣的抗体片段的核酸,将其引入表达载体,并在合适的宿主细胞中表达。参见,例如,Co,M.S.等人,J.Immunol.,152:2968-2976(1994);Better,M.和Horwitz,A.H.,Methods in Enzymology,178:476-496(1989);Pluckthun,A.和Skerra,A.,Methods in Enzymology,178:476-496(1989);Lamoyi,E.,Methods in Enzymology,121:652-663(1989);Rousseaux,J.等人,Methods in Enzymology,(1989)121:663-669(1989);和Bird,R.E.等人,TIBTECH,9:132-137(1991))。抗体片段可以在大肠杆菌中表达并从其中分泌,因此允许轻松产生大量的这些片段。抗体片段可以从抗体噬菌体文库中分离。可选地,Fab'-SH片段可以直接从大肠杆菌中回收并化学偶联以形成F(ab)2片段(Carter等人,Bio/Technology,10:163-167(1992))。根据另一种方法,可以直接从重组宿主细胞培养物中分离F(ab')2片段。包含补救受体结合表位残基的具有增加的体内半衰期的Fab和F(ab')2片段描述于美国专利号5,869,046。

[0185] 缀合抗体

[0186] 本文公开的抗体可以是结合至各种分子的缀合抗体,包括大分子物质如聚合物(例如,聚乙二醇(PEG)、用PEG改性的聚乙烯亚胺(PEI)(PEI-PEG)、聚谷氨酸(PGA)(N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺(HPMA)共聚物)、透明质酸、放射性物质(例如^{90}Y、^{131}I)、荧光物质、发光物质、半抗原、酶、金属螯合物和药物。

[0187] 在一些实施方案中,本文所述的抗体由部分修饰,所述部分改善其在循环中如在血液、血清或其它组织中、包括脑中的稳定性和/或保留例如至少1.5、2、5、10、15、20、25、30、40或50倍。例如,本文所述的抗体可以结合(例如,缀合至)聚合物,例如实质上非抗原性的聚合物,例如聚环氧烷或聚环氧乙烷。合适的聚合物在重量上将会有显著不同。可以使用具有约200至约35,000道尔顿(或约1,000至约15,000和2,000至约12,500)的数均分子量的聚合物。例如,本文所述的抗体可缀合至水溶性聚合物,例如亲水性聚乙烯聚合物,例如聚

乙烯醇或聚乙烯吡咯烷酮。此类聚合物的实例包括聚环氧烷均聚物如聚乙二醇(PEG)或聚丙二醇、聚氧乙烯化多元醇、其共聚物和其嵌段共聚物,条件是保持嵌段共聚物的水溶性。另外的其它有用的聚合物包括聚氧化烯,例如聚氧乙烯、聚氧丙烯和聚氧乙烯和聚氧丙烯的嵌段共聚物;聚甲基丙烯酸酯;卡波姆;和支链或非支链多糖。在一些实施方案中,本文所述的抗体用改善其血-脑屏障的穿透的部分修饰(例如在Pardridge,J Cereb Blood Flow Metab 32(11):1959-1972,2012中描述的那些)。示例性的血-脑屏障穿透部分包括但不限于1型葡萄糖转运蛋白(GLUT1)、1型阳离子氨基酸转运蛋白(CAT1)、1型单羧酸转运蛋白(MCT1)、2型集中核苷转运蛋白(CNT2)、主动外排转运蛋白(AET)(例如,p-糖蛋白,以及在Pardridge,J Cereb Blood Flow Metab 32(11):1959-1972,2012中描述的那些),另外的血-脑屏障穿透部分是本领域已知的。

[0188] 上述缀合抗体可以通过对本文所述的抗体或其低分子量形式进行化学修饰来制备。修饰抗体的方法是本领域众所周知的(例如,US 5,057,313和US 5,156,840)。

[0189] 抗ApoE抗体可以是全长(或全)抗体的形式,或抗ApoE抗体的低分子量形式(例如,生物活性抗体片段或微型抗体),例如Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fv、Fd、dAb、scFv和sc(Fv)2。本公开涵盖的其它抗ApoE抗体包括含有单个可变链例如VH或VL或其生物活性片段的单域抗体(sdAb)。参见,例如,Moller等人,J.Biol.Chem.,285(49):38348-38361(2010);Harmsen等人,Appl.Microbiol.Biotechnol.,77(1):13-22(2007);U.S.2005/0079574和Davies等人(1996)Protein Eng.,9(6):531-7。与全抗体一样,sdAb能够选择性地结合至特定抗原(例如ApoE2、ApoE3、ApoE4或ApoEch)。sdAb的分子量仅为12-15kDa,比普通抗体小得多,甚至比Fab片段和单链可变片段还要小。

[0190] 在某些实施方案中,抗ApoE抗体或其抗原结合片段或其低分子量抗体特异性结合至ApoE的HSPG/肝素结合结构域并在施用至患有以下一种或多种疾病的人类患者或动物模型时降低症状的严重程度:痴呆和/或轻度认知损害(MCI)(例如与阿尔茨海默症、血管性痴呆、路易体痴呆、额颞痴呆、帕金森病、亨廷顿病或神经退行性病变相关的那些)。在某些实施方案中,抗ApoE抗体或其抗原结合片段或其低分子量抗体特异性结合至ApoE的HSPG/肝素结合结构域并在施用至患有以下一种或多种疾病的人类患者或动物模型时降低症状的严重程度:神经退行性疾病、脑血管疾病(例如中风、颈动脉狭窄、椎管狭窄或动脉瘤)、脑损伤(例如外伤性脑损伤、获得性脑损伤)、视网膜变性、青光眼或视网膜损伤。可以根据本领域已知的方法测量抗ApoE抗体或其低分子量抗体的这些特征。

[0191] 核酸、载体、宿主细胞

[0192] 本公开的特征还在于编码本文公开的抗体的核酸。本文提供编码本文所述抗ApoE抗体的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3的核酸。还提供编码本文所述抗ApoE抗体的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3的核酸。本文提供编码本文所述抗ApoE抗体的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3的核酸。还提供编码本文描述的抗ApoE抗体的重链可变区(VH)的核酸,和/或编码本文描述的抗ApoE抗体的轻链可变区(VL)的核酸。在某些情况中,本文提供编码本文所述抗ApoE抗体的VH和/或VL的核酸,分别与人重链恒定区和/或人轻链恒定区连接。本文还提供编码本文描述的抗ApoE抗体的VH和VL二者的核酸。在一些情况中,本文所述的核酸包括编码人抗体(例如,人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)的Fc区的核酸。在某些情况中,核酸包括编码人抗体的Fc区的核酸,所述抗体已被修饰以降低或消除效应子功能(例

如,人IgG1 Fc区中的N297Q或T299A取代(根据EU编号而编号))。在一些情况中,核酸包括编码Fc部分的核酸,所述Fc部分是hIgG1 Fc、hIgG2 Fc、hIgG3 Fc、hIgG4 Fc、hIgG1agly Fc、hIgG2 SAAFc、hIgG4(S228P)Fc或hIgG4(S228P)/G1 agly Fc。

[0193] 本文还公开了包含任何上述核酸的载体(例如表达载体)。

[0194] 此外,本公开涉及含有上述载体(一种或多种)或核酸(一种或多种)的宿主细胞(例如细菌细胞、酵母细胞、昆虫细胞或哺乳动物细胞)。

[0195] 获得抗ApoE抗体的方法

[0196] 本文还提供制备用于本方法的抗ApoE抗体的方法。用于制备抗体例如单特异性、多克隆或单克隆抗体的一般方法是本领域已知的。对于单克隆抗体,过程涉及从先前已用感兴趣的抗原(例如,如本文所述的肽抗原)体内或体外免疫的哺乳动物(例如小鼠)的脾脏获得分泌抗体的免疫细胞(淋巴细胞)。然后将分泌抗体的淋巴细胞与骨髓瘤细胞或能够在细胞培养中无限复制的转化细胞融合,从而产生永生的、分泌免疫球蛋白的细胞系。培养产生的融合细胞或杂交瘤,并筛选所得菌落以产生期望的单克隆抗体。克隆产生此类抗体的菌落,并在体内或体外生长以产生大量的抗体。Kohler和Milstein,Nature 256:495(1975)中记载了融合此类细胞的理论基础和实践方法的描述。

[0197] 哺乳动物淋巴细胞可以通过用肽抗原对动物(例如小鼠)进行体内免疫来免疫,所述肽抗原例如与KLH-CTEELRVRLASHLRK-$CONH_2$(SEQ ID NO:54)或KLH-CTEELRVSLASHLRK-$CONH_2$(SEQ ID NO:55)为至少80%、85%、90%或95%同一性的肽抗原,任选地例如多至20%的残基具有一种或多种取代或缺失。例如,所述方法可以包括用包含与来自以下的至少10个连续氨基酸为至少80%同一性的序列的肽对动物进行免疫:APOE的肝素结合结构域,例如包含TEELRVRLASHLRK(SEQ ID NO:3)或TEELRVSLASHLRK(SEQ ID NO:2)的肽。根据需要,以多至几周的间隔重复此类免疫以获得足够的抗体滴度。在最后一次抗原加强后,处死动物,取出脾细胞。

[0198] 与哺乳动物骨髓瘤细胞或能够在细胞培养中无限复制的其它融合伴侣的融合是通过已知技术,例如使用聚乙二醇("PEG")或其它融合剂(参见Milstein和Kohler,Eur.J.Immunol.6:511(1976),其通过引用并入本文)实现的。选择该缺乏利用某些营养素所必需的酶的、能够快速生长、并且具有良好的融合能力的永生细胞系,优选为鼠的,但也可为源自其它哺乳动物物种的细胞,包括但不限于大鼠和人类。许多这样的细胞系是本领域技术人员已知的,并且有规律地描述了其它细胞系。

[0199] 产生多克隆抗体的程序也是已知的。通常,可以通过将本发明的蛋白质或多肽皮下施用于新西兰白兔来产生这种抗体,所述新西兰白兔首先取血以获得免疫前血清。例如,可以在六个不同部位以100μl每部位的总体积注射抗原。各个注射材料将包含合成的表面活性剂佐剂聚醚多元醇(pluronic polyol),或SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后含有蛋白质或多肽的粉碎的丙烯酰胺凝胶。然后,在第一次注射后两周对兔子取血,并每六周定期用相同的抗原加强三次。然后在每次加强后10天收集血清样品。然后通过使用相应的抗原以捕获抗体的亲和色谱法从血清中回收多克隆抗体。最终,例如,用戊巴比妥150mg/Kg IV安乐死兔子。E.Harlow,等人,编辑,Antibodies:ALaboratory Manual(1988)中公开了用于其它产生多克隆抗体的该过程和其它过程。

[0200] 本文描述的方法包括产生嵌合抗体、人源化抗体、单链抗体、Fab片段、双特异性抗

体、融合抗体、标记抗体或其中任何一种的类似物的步骤(一个或多个)的任何一步。相应的方法对于本领域技术人员是已知的并且描述于例如Harlow和Lane″Antibodies,ALaboratory Manual″,CSH Press,Cold Spring Harbor(1988)。当通过噬菌体展示技术获得所述抗体的衍生物时,BIAcore系统中采用的表面等离子共振可用于提高结合至与本文所述的抗体的任何一种的表位相同的表位的噬菌体抗体的效率(Schier,Human Antibodies Hybridomas 7(1996),97-105;Malmborg,J.Immunol.Methods 183(1995),7-13)。例如,在国际申请WO89/09622中描述嵌合抗体的产生。产生人源化抗体的方法描述于例如欧洲申请EP-A1 0 239 400和国际申请WO90/07861。根据本发明使用的其它抗体来源是所谓的异种抗体。在小鼠中产生异种抗体例如人样抗体的一般原理描述于例如国际申请WO91/10741、WO94/02602、WO96/34096和WO 96/33735。如上所述,本文所述的抗体除了完全抗体外还可以多种形式存在;包括,例如,Fv、Fab和F(ab)2,以及单链;参见例如国际申请WO88/09344。

[0201] 可以使用本领域已知的多种技术制备单克隆抗体,包括使用杂交瘤、重组、和噬菌体展示技术、或其组合。例如,可以使用杂交瘤技术产生单克隆抗体,包括本领域已知的和例如在Harlow等人,Antibodies:ALaboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,第2版.(1988);Hammerling等人,in:Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas Elsevier,N.Y.,563-681(1981)中教导的那些,所述参考文献通过引用以其整体并入。如本文所用的术语“单克隆抗体”不限于通过杂交瘤技术产生的抗体。术语“单克隆抗体”是指源自包括任何真核、原核或噬菌体克隆的单个克隆的抗体,而不是产生它的方法。因此,术语“单克隆抗体”不限于通过杂交瘤技术产生的抗体。

[0202] 在已知的杂交瘤方法(Kohler等人,Nature 256(1975),495)中,来自哺乳动物的相对短寿命的或不永生的淋巴细胞,例如源自如本文所述的鼠受试者的B细胞,与永生肿瘤细胞系(例如,骨髓瘤细胞系)融合,因此,产生杂交细胞或“杂交瘤”,它们是永生的并且能够产生B细胞的基因编码的抗体。通过选择、稀释和再生长,将所得杂交物(hybrids)分离成单个遗传株,各单个株包含用于形成单个抗体的特定基因。它们产生针对期望的抗原为均质性(homogeneous)的抗体,根据它们的纯遗传世系,称为“单克隆”。

[0203] 将如此制备的杂交瘤细胞接种在合适的培养基中并生长,所述培养基含有一种或多种抑制未融合的亲代骨髓瘤细胞的生长或存活的物质。本领域技术人员将理解用于杂交瘤的形成、选择和生长的试剂、细胞系和培养基可从许多来源商购获得并且很好地建立了标准化的方案。通常,测定其中生长杂交瘤细胞的培养基用于产生针对期望的抗原的单克隆抗体。由杂交瘤细胞产生的单克隆抗体的结合特异性通过体外检验例如本文所述的免疫沉淀、放射免疫测定(RIA)或酶联免疫吸附测定(ELISA)来确定。在识别产生期望的特异性、亲和力和/或活性的抗体的杂交瘤细胞后,可以通过有限稀释过程对克隆进行亚克隆并通过标准方法来生长;参见例如Goding,Monoclonal Antibodies:Principles and Practice,Academic Press,pp 59-103(1986)。还将进一步理解,通过亚克隆来分泌的单克隆抗体可以通过常规纯化过程例如如蛋白-A、羟基磷灰石色谱法、凝胶电泳法、透析或亲和色谱法而从培养基、腹水或血清分离。

[0204] 在另一实施方案中,可以通过显微操作来选择淋巴细胞并分离可变基因。例如,外周血单核细胞可以从免疫的或天然免疫的哺乳动物例如人中分离,并在体外培养约7天。可

以对培养物筛选满足筛选标准的特定免疫球蛋白。可以分离来自阳性孔的细胞。单个产生Ig的B细胞可以通过FACS来分离或通过在补体介导的溶血斑块测定中识别它们。可以将产生Ig的B细胞显微操作至管中,并且可以使用例如RT-PCR扩增VH和VL基因。可将VH和VL基因克隆至抗体表达载体中并转染至细胞(例如,真核或原核细胞)中进行表达。

[0205] 可选地,可以使用技术人员熟知的技术选择和培养产生抗体的细胞系。这些技术描述于各种实验室手册和主要出版物。在这方面,适用于如下所述的发明的技术描述于Current Protocols in Immunology,Coligan等人,编辑,Green Publishing Associates and Wiley-Interscience,John Wiley and Sons,New York(1991),通过引用以其整体包括补充并入本文。

[0206] 例如上述那些等的抗体可以例如通过制备和表达编码所述氨基酸序列的合成基因来制备。产生任何抗ApoE抗体的变体(例如,包含氨基酸取代)的方法是本领域公知的。这些方法包括但不限于通过编码抗体或其任何部分(例如框架区、CDR、恒定区)的制备的DNA分子的定点(或寡核苷酸介导的)诱变、PCR诱变和盒式诱变来制备。定点诱变是本领域众所周知的(参见,例如,Carter等人,Nucl.Acids Res.,13:4431-4443(1985)和Kunkel等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,82:488(1987))。PCR诱变也适用于制备起始多肽的氨基酸序列变体。参见Higuchi,在PCR Protocols,第177-183页(Academic Press,1990);和Vallette等人,Nucl.Acids Res.17:723-733(1989)。另一种制备序列变体的方法,盒式诱变,是基于Wells等人,Gene,34:315-323(1985)描述的技术。

[0207] 抗体可以在细菌细胞或真核细胞中产生。一些抗体,例如Fab的,可以在细菌细胞例如大肠杆菌细胞中产生。抗体也可以在真核细胞例如转化细胞系(例如CHO、293E、COS、Hela)中产生。此外,抗体(例如,scFv的)可以在酵母细胞如毕赤酵母(Pichia)(参见,例如,Powers等人,J Immunol Methods.251:123-35(2001))、汉逊酵母(Hanseula)或酿酒酵母(Saccharomyces)中表达。为了产生感兴趣的抗体或其抗原结合片段,构建编码抗体的多核苷酸,将其引入表达载体,然后在合适的宿主细胞中表达。使用标准分子生物学技术制备重组表达载体、转染宿主细胞、选择转化体、培养宿主细胞并回收抗体。

[0208] 如果抗体要在细菌细胞(例如大肠杆菌)中表达,则表达载体应具有允许载体在细菌细胞中扩增的特征。此外,当使用诸如JM109、DH5α、HB101或XL1-Blue等大肠杆菌作为宿主时,载体必须具有启动子,例如lacZ启动子(Ward等人,341:544-546(1989)、araB启动子(Better等人,Science,240:1041-1043(1988)),或允许在大肠杆菌中有效表达的T7启动子。此类载体的实例包括,例如,M13系列载体、pUC-系列载体、pBR322、pBluescript、pCR-Script,pGEX-5X-1(Pharmacia),“QIAexpress system”(QIAGEN),pEGFP和pET(当使用该表达载体时,宿主优选为表达T7 RNA聚合酶的BL21)。表达载体可含有抗体分泌的信号序列。为了产生至大肠杆菌的周质中,pelB信号序列(Lei等人,J.Bacteriol.,169:4379(1987))可以用作抗体分泌的信号序列。对于细菌表达,可采用氯化钙法或电穿孔法将表达载体导入细菌细胞。

[0209] 如果抗体要在动物细胞如CHO、COS和NIH3T3细胞中表达,则表达载体包括用于在这些细胞中表达所必需的启动子,例如SV40启动子(Mulligan等人,Nature,277:108(1979))、MMLV-LTR启动子、EF1α启动子(Mizushima等人,Nucleic Acids Res.,18:5322(1990))或CMV启动子。除了编码免疫球蛋白或其结构域的核酸序列之外,重组表达载体可

以携带附加的序列,例如调节载体在宿主细胞中的复制(例如,复制起点)和选择性标记基因(marker gene)的序列。选择性标记基因有助于选择已引入载体的宿主细胞(参见,例如美国专利号4,399,216、4,634,665和5,179,017)。例如,通常选择性标记基因赋予已引入载体的宿主细胞对药物例如G418、潮霉素或甲氨蝶呤的抗性。具有选择性标记的载体的实例包括pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV和pOP13。

[0210] 在一个实施方案中,抗体在哺乳动物细胞中产生。用于表达抗体的示例性哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢(CHO细胞)(包括dhfr-CHO细胞,描述于Urlaub和Chasin(1980)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4216-4220,与DHFR选择性标记一起使用,例如,如Kaufman和Sharp(1982)Mol.Biol.159:601-621)中所述,人胚胎肾293细胞(例如,293、293E、293T)、COS细胞、NIH3T3细胞、淋巴细胞系,例如,NS0骨髓瘤细胞和SP2细胞,以及来自转基因动物例如转基因哺乳动物的细胞。

[0211] 本公开的抗体可以从宿主细胞的内部或外部(例如培养基)分离并且纯化为基本上纯的和均质性抗体。通常用于抗体纯化的分离和纯化方法可用于抗体的分离和纯化,不限于任何特定的方法。可通过适当地选择和组合例如柱色谱、过滤、超滤、盐析、溶剂沉淀、溶剂萃取、蒸馏、免疫沉淀、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、等电聚焦、透析和重结晶来分离和纯化抗体。色谱法包括,例如亲和色谱法、离子交换色谱法、疏水色谱法、凝胶过滤、反相色谱法和吸附色谱法(Strategies for Protein Purification and Characterization:ALaboratory Course Manual.Ed Daniel R.Marshak等人,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1996)。色谱法可使用液相色谱法如HPLC和FPLC进行。用于亲和色谱法的柱包括蛋白A柱和蛋白G柱。使用蛋白A柱的柱的实例包括Hyper D、POROS和Sepharose FF(GE Healthcare Biosciences)。本发明还包括使用这些纯化方法高度纯化的抗体。

[0212] 抗体的特征

[0213] 本文所述的抗体的ApoE结合特性可以通过任何标准方法测定,例如以下方法中的一种或多种:OCTET®、表面等离子共振(SPR)、BIACORE™分析、酶联免疫吸附测定(ELISA)、EIA(酶免疫测定)、RIA(放射免疫测定)和荧光共振能量转移(FRET)。

[0214] 使用SPR的方法描述于,例如美国专利号5,641,640;Raether(1988)Surface Plasmons Springer Verlag;Sjolander and Urbaniczky(1991)Anal.Chem.63:2338-2345;Szabo等人(1995)Curr.Opin.Struct.Biol.5:699-705和BIAcore International AB提供的在线资源。来自SPR的信息可用于为生物分子与靶标的结合提供平衡解离常数(Kd)和包括K_{on}和K_{off}的动力学参数的准确和定量测定。

[0215] 还可以通过使用BIACORE色谱技术(Pharmacia BIAtechnology Handbook,"Epitope Mapping",第6.3.2节,(1994年5月);也参见Johne等人(1993)J.Immunol.Methods,160:191-198)评价不同抗体彼此竞争结合野生型ApoE或突突ApoE(例如ApoEch)的能力。

[0216] 当采用酶免疫测定时,将含有抗体的样品,例如产生抗体的细胞的培养上清液或纯化的抗体添加至抗原包被的板上。添加用例如碱性磷酸酶等酶标记的二抗,孵育平板,洗涤后加入如对硝基苯磷酸等酶底物,测量吸光度,评价抗原结合活性。

[0217] 用于评价抗体的另外的通用指南,例如,免疫印迹和免疫沉淀测定,可以在Antibodies:A Laboratory Manual,ed.by Harlow and Lane,Cold Spring Harbor press

(1988))中找到。

[0218] 突变ApoE蛋白、肽及其融合蛋白

[0219] 本公开提供与野生型ApoE蛋白相比,在HSPG结合结构域中的一个或多个位置处含有氨基酸取代的突变ApoE蛋白或其片段。在一些实施方案中,突变ApoE蛋白或其片段在位置136处包含除精氨酸之外的氨基酸。在一些实施方案中,突变ApoE蛋白或其片段在位置136处包含丝氨酸、组氨酸或半胱氨酸。还提供编码突变ApoE蛋白或其片段的核酸(例如,DNA或RNA)序列,以及包含所述核酸序列的载体。突变ApoE蛋白或其片段、编码此类蛋白或片段的核酸、以及包含核酸序列的载体可用于治疗或预防与痴呆或轻度认知损害(MCI)相关的病症(例如阿尔茨海默症、血管性痴呆、路易体痴呆、额颞痴呆、帕金森病或亨廷顿病)、神经退行性疾病、脑血管疾病、脑损伤、视网膜变性或视网膜损伤。

[0220] 在一些实施方案中,突变ApoE蛋白是ApoEch蛋白(例如ApoE2ch、ApoE3ch或ApoE4ch蛋白)。此处还考虑包括氨基酸位置136的ApoEch蛋白的片段。全长ApoE3ch蛋白的示例性序列如下所示。从精氨酸至丝氨酸的突变用粗体和双下划线标出。

[0221] MKVLWAALLVTFLAGCQAKVEQAVETEPEPELRQQTEWQSGQRWELALG
RFWDYLRWVQTLSEQVQEELLSSQVTQELRALMDETMKELKAYKSELEEQ
LTPVAEETRARLSKELQAAQARLGADMEDVCGRLVQYRGEVQAMLGQST
EELRV**<u>S</u>**LASHLRKLRKRLLRDADDLQKRLAVYQAGAREGAERGLSAIRERL
GPLVEQGRVRAATVGSLAGQPLQERAQAWGERLRARMEEMGSRTRDRLD
EVKEQVAEVRAKLEEQAQQIRLQAEAFQARLKSWFEPLVEDMQRQWAGL
VEKVQAAVGTSAAPVPSDNH (SEQ ID NO: 45)

[0222] 在一些实施方案中,本文公开的方法允许突变ApoE蛋白或其片段穿过血-脑屏障。可以使用纳米载体递送突变ApoE蛋白或其片段,包括但不限于聚合物纳米颗粒、基于脂质的纳米颗粒、脂质体、胶束、树枝状分子(dendrimer)、表达蛋白质的人细胞、和纳米管(参见,Dominguez等人J Nanosci nanotechnol.14(1):766-79,2014)。在一些实施方案中,突变ApoE蛋白或其片段通过颈动脉内或经粘膜递送(例如颈动脉内输注高渗溶液(阿拉伯糖或甘露醇);参见,Sanchez-Covarrubias等人,Curr Pharm Des.20(10):1422-49,2014和Miyake等人,World J Otorhinolaryngol Head Neck Surg.1(1):11-16,2015)、或通过使用氯毒素(参见,McCall等人,Tissue Barriers 2(4):e944449,2014)鼻内递送。低温技术、受体介导的转运、细胞穿透肽和细胞介导的递送也可用于促进ApoE3ch蛋白穿过血-脑屏障(参见,Pandey等人,Tissue Barriers 4(1):e1129476,2016)。例如,免疫细胞和干细胞(例如,神经干细胞、诱导性多能细胞和间充质干细胞)可用于携带治疗载荷(payload)跨过BBB。负载纳米颗粒的间充质干细胞可用于此目的(参见例如,Roger等人Biomaterials 31:8393-401,2010)。也可以使用基因修饰的干细胞(例如基因修饰的间充质干细胞)(参见例如Ebrahimi和Lalvand Hygeia.J.D.Med.第5卷(1):90-104,2013)。也可以使用化学药物递送系统(CDDS),例如在He等人,Cells,7(4):24,2018中描述的那些。运输蛋白跨过血-脑屏障的其它方法是本领域已知的。

[0223] 本文考虑了编码突变ApoE蛋白(例如,任何本文所述的突变ApoE蛋白,例如ApoEch)或其片段的核酸(例如,DNA或mRNA)。在一些实施方案中,可以修饰编码ApoEch蛋白的mRNA以增加稳定性(例如在Zangi等人,Nat Biotechnol.31(10):898-907,2013中描述的并且由Moderna,Inc.开发的那些;以及在Alberer et al.,Lancet 390(10101):1511-

1520,2017中描述的并且由Curevac和BioNTech开发的那些)。

[0224] 本文考虑了含有编码突变ApoE或其片段的DNA序列的病毒载体。编码全长ApoE3ch蛋白(包括信号肽区)的示例性cDNA序列如下所示。从胞嘧啶至腺嘌呤的突变用粗体和双下划线标出。

[0225] ATGAAGGTTCTGTGGGCTGCGTTGCTGGTCACATTCCTGGCAGGATGCCAGGCC
AAGGTGGAGCAAGCGGTGGAGACAGAGCCGGAGCCCGAGCTGCGCCAGCAGA
CCGAGTGGCAGAGCGGCCAGCGCTGGGAACTGGCACTGGGTCGCTTTTGGGAT
TACCTGCGCTGGGTGCAGACACTGTCTGAGCAGGTGCAGGAGGAGCTGCTCAG
CTCCCAGGTCACCCAGGAACTGAGGGCGCTGATGGACGAGACCATGAAGGAGT
TGAAGGCCTACAAATCGGAACTGGAGGAACAACTGACCCCGGTGGCGGAGGA
GACGCGGGCACGGCTGTCCAAGGAGCTGCAGGCGGCGCAGGCCCGGCTGGGC
GCGGACATGGAGGACGTGTGCGGCCGCCTGGTGCAGTACCGCGGCGAGGTGCA
GGCCATGCTCGGCCAGAGCACCGAGGAGCTGCGGGTG**A**GCCTCGCCTCCCACC
TGCGCAAGCTGCGTAAGCGGCTCCTCCGCGATGCCGATGACCTGCAGAAGCGC
CTGGCAGTGTACCAGGCCGGGGCCCGCGAGGGCGCCGAGCGCGGCCTCAGCGC
CATCCGCGAGCGCCTGGGGCCCCTGGTGGAACAGGGCCGCGTGCGGGCCGCCA
CTGTGGGCTCCCTGGCCGGCCAGCCGCTACAGGAGCGGGCCCAGGCCTGGGGC
GAGCGGCTGCGCGCGCGGATGGAGGAGATGGGCAGCCGGACCCGCGACCGCC
TGGACGAGGTGAAGGAGCAGGTGGCGGAGGTGCGCGCCAAGCTGGAGGAGCA
GGCCCAGCAGATACGCCTGCAGGCCGAGGCCTTCCAGGCCCGCCTCAAGAGCT
GGTTCGAGCCCCTGGTGGAAGACATGCAGCGCCAGTGGGCCGGGCTGGTGGAG
AAGGTGCAGGCTGCCGTGGGCACCAGCGCCGCCCCTGTGCCCAGCGACAATCA
CTGA (SEQ ID NO: 56)

[0226] 合适的载体是本领域已知的。在一些实施方案中,病毒载体是AAV载体(例如在Rosenberg等人,Hum Gene Ther Clin Dev 29(1):24-47,2018中描述的那些)。还包括编码包含在R136位置处除了R136S以外的突变的ApoE蛋白的cDNA序列。在一些实施方案中,突变是R136H或R136C。

[0227] 肽和融合蛋白

[0228] 在一些实施方案中,本文提供的是包含野生型或突变ApoE(例如,本文所述的任何突变ApoE蛋白)的HSPG/肝素结合结构域或由其组成的肽。在一些情况中,本文提供的肽的氨基酸序列包含选自由以下组成的组的序列或由其组成:
STEELRVRLASHLRKLRKRLLRDADDLQK(SEQ ID NO:57)、STEELRVSLASHLRKLRKRLLRDADDLQK(SEQ ID NO:58)、RLVQYRGEVQAMLGQSTEELRVRLASHLRKL(SEQ ID NO:59)和RLVQYRGEVQAMLGQSTEELRVSLASHLRKL(SEQ ID NO:60)。也可以使用与这些序列为至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上的序列同一性的变体。还公开了包含以上提供的肽的融合蛋白。在一些实施方案中,融合蛋白还包括人抗体(例如,人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)的Fc区。在一些情况中,融合蛋白在野生型或突变ApoE的HSPG/肝素结合结构域的C末端处包含人抗体的Fc区。在一些情况中,融合蛋白在野生型或突变ApoE的HSPG/肝素结合结构域的N末端处包含人抗体的Fc区。

[0229] 在一些情况中,本文提供的肽和融合蛋白与野生型ApoE蛋白竞争结合HSPG/肝素。在一些情况中,本文提供的肽和融合蛋白降低或调节野生型ApoE蛋白与HSPG/肝素之间的结合。在某些实施方案中,本文提供的肽和融合蛋白抑制和/或降低野生型ApoE蛋白的HSPG/肝素结合,并在施用至患有以下的一种或多种的人类患者或以下的动物模型时降低症状的严重程度:与痴呆或轻度认知损害(MCI)相关的病症(例如阿尔茨海默症、血管性痴

呆、路易体痴呆、额颞痴呆、帕金森病、亨廷顿病)、神经退行性疾病、脑血管疾病、脑损伤、视网膜变性或视网膜损伤。可以根据本领域已知的方法测定本文提供的肽和融合蛋白的这些特征。

[0230] 本文还提供抗ApoE疫苗,其可用于引发针对ApoE的保护性免疫应答。在一些实施方案中,抗ApoE疫苗包括一种或多种的本文提供的ApoE肽(例如,和药学上可接受的佐剂。药学上可接受的佐剂是本领域已知的。

[0231] 药物组合物和施用方法

[0232] 本文描述的方法包括使用包含任何本文所述的抗体、肽或融合蛋白作为活性成分的药物组合物。

[0233] 药物组合物通常包括药学上可接受的载体。如本文所用,语言"药学上可接受的载体"包括与药物施用相容的盐水、溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。

[0234] 药物组合物通常被配制成与其预期的施用途径相容。施用途径的实例包括肠胃外,例如颅内、鼻内、颈动脉内、静脉内、皮内、皮下、口服(例如吸入)和经粘膜。

[0235] 配制合适的药物组合物的方法是本领域已知的,参见例如Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第21版,2005;以及在系列Drugs and the Pharmaceutical Sciences:a Series ofTextbooks and Monographs(Dekker,NY)中的书籍。例如,用于肠胃外、皮内或皮下施用的溶液或悬浮液可包括以下组分:无菌稀释剂,例如注射用水、盐水溶液、不挥发油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它合成溶剂;抗菌剂,如苯甲醇或尼泊金甲酯;抗氧化剂,例如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,例如乙二胺四乙酸;缓冲液,例如醋酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐,以及用于调节张力的试剂,例如氯化钠或葡萄糖。可以用酸或碱调节pH,例如盐酸或氢氧化钠。肠胃外制剂可以封装在安瓿、一次性注射器或玻璃或塑料制成的多剂量小瓶中。

[0236] 适用于注射用途的药物组合物可包括无菌水溶液(其是水溶性的)或分散液和用于临时制备无菌注射溶液或分散液的无菌粉末。对于静脉施用,合适的载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor EL™(BASF,Parsippany,NJ)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。在所有情况中,组合物必须是无菌的并且应该以容易注射的程度的流体存在。它在制造和贮存条件下应该是稳定的,并且必须防止微生物如细菌和真菌的污染作用。载体可以是含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)及其合适混合物的溶剂或分散介质。适当的流动性可以例如通过使用诸如卵磷脂的涂层、在分散的情况下通过保持所需的粒径、以及通过使用表面活性剂来保持。可以通过各种抗菌剂和抗真菌剂,例如尼泊金酯类(parabens)、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、和硫柳汞等来防止微生物的作用。在许多情况中,优选在组合物中包括等渗剂,例如糖类、多元醇类如甘露醇、山梨糖醇、氯化钠。可注射组合物的延长吸收可以通过在组合物中包含延迟吸收的试剂来实现,例如单硬脂酸铝和明胶。

[0237] 无菌注射溶液可以通过将所需量的活性化合物混入上述列举的一种成分或多种成分的组合适当的溶剂中,根据需要,然后过滤除菌来制备。一般来说,通过将活性化合物混入无菌载体中来制备分散体,所述无菌载体含有基本分散介质和来自上述列举的那些的所需的其它成分。在用于制备无菌注射溶液的无菌粉末的情况中,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥,其产生活性成分加上来自其先前无菌过滤的溶液的任何附加的期望的成

分的粉末。

[0238] 口服组合物通常包括惰性稀释剂或可食用载体。为了口服治疗施用的目的,活性化合物可以与赋形剂混合并以片剂、锭剂或胶囊剂如明胶胶囊的形式使用。还可以使用流体载体制备口腔组合物以用作漱口水。药学上相容的粘合剂和/或佐剂材料可以作为组合物的一部分包括在内。片剂、丸剂、胶囊剂、锭剂等可含有以下任何成分或类似性质的化合物:粘合剂,例如微晶纤维素、黄蓍胶或明胶;赋形剂,例如淀粉或乳糖,崩解剂,例如海藻酸、Primogel、玉米淀粉;润滑剂,例如硬脂酸镁或Sterotes;助流剂,例如胶态二氧化硅;甜味剂,例如蔗糖或糖精;或调味剂,例如胡椒薄荷、水杨酸甲酯或橙味调味剂。

[0239] 对于通过吸入施用,化合物可以以气溶胶喷雾的形式从含有合适喷射剂如气体如二氧化碳的加压容器或分配器、或雾化器递送。此类方法包括美国专利号6,468,798中描述的那些。

[0240] 如本文所述的治疗性化合物的全身施用也可以通过经粘膜来进行。对于经粘膜施用,在制剂中使用适合待渗透的屏障的渗透剂。此类渗透剂通常是本领域中已知的,并且包括例如洗涤剂、胆汁盐和夫西地酸衍生物。经粘膜施用可以通过使用鼻喷雾剂或栓剂或注射剂来实现。

[0241] 在一个实施方案中,用将保护治疗化合物免于从体内快速消除的载体制备活性化合物,例如控释制剂,包括植入物和微封装的递送系统。可以使用可生物降解的生物相容性聚合物,例如乙烯醋酸乙烯酯、聚酐类、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。此类制剂可使用标准技术类制备,或例如从Alza Corporation和Nova Pharmaceuticals,Inc.商购获得。脂质体悬浮液(包括靶向具有针对细胞抗原的单克隆抗体的选定细胞的脂质体)也可用作药学上可接受的载体。这些可以根据本领域技术人员已知的方法制备,例如,如美国专利号4,522,811中所述。

[0242] 药物组合物可与施用说明一起包含在容器、包装或分配器中。

[0243] APOE的CRISPR/Cas9介导的基因编辑

[0244] 本文包括通过使用基因组编辑系统编辑APOE基因以用于治疗或预防以下的方法:与痴呆和/或轻度认知损害(MCI)相关的病症(例如阿尔茨海默症、血管性痴呆、路易体痴呆、额颞痴呆、帕金森病或亨廷顿病)、神经退行性疾病、脑血管疾病、脑损伤、视网膜变性或视网膜损伤。通常,该方法包括向需要此类治疗的受试者、或已确定需要此类治疗的受试者施用治疗有效量的如本文所述的基因组编辑系统。术语“基因组编辑系统”是指具有RNA指导的DNA编辑活性的任何系统。本公开的基因组编辑系统包括至少两种改编自天然存在的CRISPR系统的组分:gRNA和RNA指导的核酸酶。这两种组分形成复合物,该复合物能够与细胞中的特定核酸序列结合并例如通过产生一个或多个单链断裂(SSB或切口)、双链断裂(DSB)和/或碱基置换来编辑核酸序列中或周围的DNA。基因组编辑系统的完整描述参见例如WO2018/026976。在某些方面中,本公开提供编码CRISPR/Cas9基因组编辑系统的AAV载体,以及此类载体在治疗或预防如本文所述的病症中的用途。

[0245] RNA指导的核酸酶/Cas9

[0246] 各种RNA指导的核酸酶可用于本方法中,例如,如WO 2018/026976中所述。在一些实施方案中,用于本方法的RNA指导的核酸酶和组合物是金黄色葡萄球菌(S.aureus)Cas9或化脓性链球菌(S.pyogenes)cas9。本公开的示例性Cas9蛋白可为分离的或源自任何物

种,包括但不限于细菌或古细菌。在本公开的一些实施方案中,修饰Cas9序列以在Cas9蛋白的C末端和N末端处包括两个核定位序列(NLS)(例如PKKKRKV(SEQ ID NO:61),以及小聚腺苷酸化(mini-polyadenylation)信号(或Poly-A序列)。示例性NLS是SV40大T抗原NLS(PKKKRRV(SEQ ID NO:62))和核质蛋白NLS(KRPAATKKAGQAKKKK(SEQ ID NO:63))。其它NLS是本领域已知的;参见,例如,Cokol等人,EMBO Rep.2000年11月15日;1(5):411-415;Freitas和Cunha,Curr Genomics.2009年12月;10(8):550-557。示例性的聚腺苷酸化信号是

[0247] TAGCAATAAAGGATCGTTTATTTTCATTGGAAGCGTGTGTTGGTTTTTTGATCAGGCGCG(SEQ ID NO:64)。在一些实施方案中,RNA指导的核酸酶是核酸酶死亡的Cas蛋白(例如,dCas9)。

[0248] 指导RNA

[0249] 本文提供设计成靶向野生型ApoE的HSPG结合结构域中的一个或多个位点的指导RNA(gRNA)。在一些实施方案中,gRNA设计成在野生型ApoE中引入导致氨基酸位置136处的突变的突变。在一些实施方案中,本文提供的指导RNA设计成在野生型APOE基因(例如APOE2、APOE3或APOE4)中引入R136S突变,其中示例性指导RNA可以在表5中找到。在一些实施方案中,还提供了用于修复双链断裂和引入R136S突变的模板。示例性模板序列如下:

[0250] CGCCTGGTGCAGTACCGCGGCGAGGTGCAGGCCATGCTCGGCCAGAGCACaGAGGAGCTcCGcGTGaGtCTCGCaagCCACCTGCGCAAGCTGCGTAAGCGGCTCCTCCGCGATGCCGATGACCTGC (SEQ ID NO:65)

[0251] 其中消除PAM基序的沉默突变用双下划线标出,对应于R136S突变的密码子用粗体标出,产生SacI位点以从接收模板的克隆中切割PCR产物的沉默突变用斜体标出。

[0252] 在一些实施方案中,本文提供的指导RNA设计成靶向野生型APOE基因的或存在于受试者中的变体的外显子3(氨基酸1-61)(因此该方法可以包括确定受试者中APOE基因的序列,并使用该序列来确定用于靶向该受试者中的外显子3的合适的指导RNA的序列)。在一些实施方案中,通过非同源末端连接(NHEJ)的双链断裂修复引起导致ApoE敲除的短插入或缺失。用于ApoE敲除的示例性指导RNA序列示于表6。

[0253] 碱基编辑

[0254] 在一些实施方案中,使用碱基编辑技术(例如在Rees和Liu,Nature Reviews Genetics 19,770-788,2018;Komor等人,Nature 533,420-424中描述的那些)编辑APOE基因。在一些实施方案中,使用碱基编辑设计指导RNA以在野生型APOE基因(例如APOE2、APOE3或APOE4)中引入R136H突变,其中示例性指导RNA可以在表6中找到。将C/G转换为A/T的碱基编辑器和将A/T转换为G/C的腺嘌呤碱基编辑器可用于引入点突变。示例性碱基编辑器包括在Komor等人,Nature 533,420-424和Gaudelli等人,Nature 551,464-471)中描述的那些。

[0255] AAV递送系统

[0256] 方法包括将包括Cas9核酸酶和一种或两种指导RNA的CRISPR/Cas9基因组编辑系统递送至有需要的受试者。递送方法可包括例如病毒递送,例如优选使用包含编码Cas9和指导RNA(一种或多种)的序列的腺相关病毒(AAV)载体。腺相关病毒是一种天然存在的缺陷病毒,需要另一种病毒如腺病毒或疱疹病毒作为辅助病毒,以实现高效复制和生产性生命周期。(综述参见Muzyczka等人,Curr.Topics in Micro and Immunol.158:97-129(1992))。AAV载体可有效转导各种细胞类型,并可在体内产生长期表达的转基因。AAV载体

已广泛用于基因增强或替代,并在一系列动物模型以及临床中显示治疗效果;参见,例如,Mingozzi和High,Nature Reviews Genetics 12,341-355(2011);Deyle和Russell,Curr Opin Mol Ther.2009年8月;11(4):442-447;Asokan等人,Mol Ther.2012年4月;20(4):699-708。可以包装含有少至300个AAV碱基对的AAV载体,并可以产生重组蛋白表达。例如,AAV2、AAV5、AAV2/5、AAV2/8和AAV2/7载体已被用于将DNA引入光感受细胞(参见,例如,Pang等人,Vision Research 2008,48(3):377-385;Khani等人,Invest Ophthalmol Vis Sci.2007年9月;48(9):3954-61;Allocca等人,J.Virol.2007 81(20):11372-11380)。在一些实施方案中,AAV载体可以包括在PCT/US2014/060163中描述的AAV衣壳多肽(或包括编码在PCT/US2014/060163中描述的AAV衣壳多肽的序列);例如,包含AAV衣壳多肽的病毒颗粒,所述AAV衣壳多肽具有选自由PCT/US2014/060163的SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、13、15和17组成的组的氨基酸序列,以及如本文所述的Cas9序列和指导RNA序列。在一些实施方案中,AAV衣壳多肽是Anc80多肽,例如Anc80L27;Anc80L59;Anc80L60;Anc80L62;Anc80L65;Anc80L33;Anc80L36;或Anc80L44。在一些实施方案中,AAV混入源自AAV2血清型的反向末端重复(ITR)。示例性的左和右ITR示于WO 2018/026976的表6中。然而,应注意的是,AAV2 ITR的许多修饰形式用于该领域,并且下文中显示的ITR序列是示例性的,而不旨在进行限制。这些序列的修饰是本领域已知的,或者对技术人员来说是显而易见的,因此包括在本公开的范围内。

[0257] Cas9表达由本领域已知的启动子驱动。在一些实施方案中,表达由三种启动子之一驱动:巨细胞病毒(CMV)、延伸因子-1(EFS)或人g-蛋白受体偶联激酶-1(hGRK1),其在视网膜光感受细胞中特异性表达。这些启动子各自的核苷酸序列提供于WO 2018/026976的表5。在某些应用中,这些序列的修饰是可能的或合乎需要的,并且此类修饰在本公开的范围内。

[0258] AAV载体中gRNA的表达由本领域已知的启动子驱动。在一些实施方案中,聚合酶III启动子,例如人U6启动子。示例性U6启动子序列如下所示:

[0259] AAGGTCGGGCAGGAAGAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAATTAGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACC (SEQ ID NO:66).

[0260] 在一些实施方案中,核酸或AAV载体与上述列举的核酸或AAV载体之一分享至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上的序列同一性。

[0261] 可以将上述AAV基因组包装至AAV衣壳(例如,AAV5衣壳),该衣壳可以包含在组合物(例如药物组合物)中和/或施用至受试者。包含根据本公开的AAV衣壳的示例性药物组合物可以包括药学上可接受的载体,例如平衡盐水溶液(BSS)和一种或多种表面活性剂(例如,Tween 20)和/或热敏或反向热敏聚合物(reverse-thermosensitive polymer)(例如,普朗尼克)。本领域已知的其它药物制剂成分也可适用于本文所述的组合物。

[0262] 包含根据本公开的AAV载体的组合物可以通过任何合适的方式施用至受试者,包

括但不限于注射(例如,颅内注射)和鼻内递送。考虑到注射装置内的死体积和可以安全施用的相对有限的体积,除了其它之外,选择组合物中AAV载体的浓度,以确保向受试者的大脑施用足够的AAV剂量。合适的剂量可以包括例如$1x10^{11}$个病毒基因组(vg)/mL、$2x10^{11}$个病毒基因组(vg)/mL、$3x10^{11}$个病毒基因组(vg)/mL、$4x10^{11}$个病毒基因组(vg)/mL、$5x10^{11}$个病毒基因组(vg)/mL、$6x10^{11}$个病毒基因组(vg)/mL、$7x10^{11}$个病毒基因组(vg)/mL、$8x10^{11}$个病毒基因组(vg)/mL、$9x10^{11}$个病毒基因组(vg)/mL、$1x10^{12}$vg/mL、$2x10^{12}$个病毒基因组(vg)/mL、$3x10^{12}$个病毒基因组(vg)/mL、$4x10^{12}$个病毒基因组(vg)/mL、$5x10^{12}$个病毒基因组(vg)/mL、$6x10^{12}$个病毒基因组(vg)/mL、$7x10^{12}$个病毒基因组(vg)/mL、$8x10^{12}$个病毒基因组(vg)/mL、$9x10^{12}$个病毒基因组(vg)/mL、$1x10^{13}$vg/mL、$2x10^{13}$个病毒基因组(vg)/mL、$3x10^{13}$个病毒基因组(vg)/mL、$4x10^{13}$个病毒基因组(vg)/mL、$5x10^{13}$个病毒基因组(vg)/mL、$6x10^{13}$个病毒基因组(vg)/mL、$7x10^{13}$个病毒基因组(vg)/mL、$8x10^{13}$个病毒基因组(vg)/mL或$9x10^{13}$个病毒基因组(vg)/mL。可以将任何合适体积的组合物递送至视网膜下或耳蜗空间。在一些情况中,选择体积以在视网膜下空间形成泡(bleb),例如1微升、10微升、50微升、100微升、150微升、200微升、250微升、300微升等。

[0263] 外植体对于研究病毒转导后gRNA和/或Cas9的表达、以及对于在相对较短的时间间隔内研究基因组编辑特别有用。这些模型还允许比动物模型中可能的更高的通量,并且可以预测动物模型和受试者中的表达和基因组编辑。小型(小鼠、大鼠)和大型动物模型(例如兔、猪、非人灵长类动物)可用于药理学和/或毒理学研究、以及用于在近似于将在临床中使用的那些的条件和体积下测试本公开的系统、核苷酸、载体和组合物。由于选择模型系统来概括人解剖学和/或生理学的相关方面,所以在这些系统中获得的数据通常(尽管不一定)将预测根据本公开的AAV载体和组合物在人和动物受试者中的行为。

[0264] 筛选方法(试验化合物)

[0265] 本文包括用于筛选试验化合物如多肽、多核苷酸、无机或有机大分子或小分子试验化合物以识别用于治疗或预防以下的试剂的方法:与痴呆和/或轻度认知损害相关的病症(例如,阿尔茨海默症、血管性痴呆、路易体痴呆、额颞痴呆、帕金森病或亨廷顿病)、神经退行性疾病、脑血管疾病、脑损伤、视网膜变性或视网膜损伤。在一些实施方案中,试验化合物调节ApoE蛋白(例如野生型ApoE蛋白)的HSPG/肝素结合特性。在一些实施方案中,试验化合物降低ApoE蛋白(例如野生型ApoE蛋白)的HSPG/肝素结合特性。

[0266] 如本文所用,“小分子”是指分子量低于约3,000道尔顿的有机或无机小分子。通常,可用于本发明的小分子具有小于3,000道尔顿(Da)的分子量。小分子可以是例如至少约100Da至约3,000Da(例如,在约100至约3,000Da、约100至约2500Da、约100至约2,000Da、约100至约1,750Da、约100至约1,500Da、约100至约1,250Da、约100至约1,000Da、约100至约750Da、约100至约500Da、约200至约1500、约500至约1000、约300至约1000Da或约100至约250Da之间)。

[0267] 试验化合物可以是例如天然产物或组合化学文库的成员。应使用不同分子的组来覆盖各种功能,例如电荷、芳香性、氢键、柔性、大小、侧链的长度、疏水性和刚性。适用于合成小分子的组合技术是本领域已知的,例如,如Obrecht和Villalgordo,Solid-Supported Combinatorial and Parallel Synthesis of Small-Molecular-Weight Compound Libraries,Pergamon-Elsevier Science Limited(1998)所示例,并且包括那些例如“分离

和合并”或“平行”合成技术、固相和液相技术、以及编码技术(参见,例如,Czarnik,Curr.Opin.Chem.Bio.1:60-6(1997))。此外,许多小分子文库是可商购获得的。许多合适的小分子试验化合物列于美国专利号6,503,713中,通过引用以其整体并入本文。

[0268] 使用本发明的方法筛选的文库可以包含多种类型的试验化合物。给定的文库可以包含结构相关或不相关的试验化合物的组。在一些实施方案中,试验化合物是肽或肽模拟物分子。在一些实施方案中,试验化合物是核酸。

[0269] 在一些实施方案中,例如使用本领域已知的方法或本文描述的方法,并将结构与所得生物活性相关联,例如进行结构-活性关系研究,可以通过系统地改变第一试验化合物例如在结构上类似于靶多肽的已知天然结合伴侣的第一试验化合物、或识别为能够结合靶多肽的第一小分子的结构来获得试验化合物及其文库。本领域技术人员将理解,有各种用于产生这种结构-活性关系的标准方法。因此,在一些情况中,工作可能主要是经验性的,而在其它情况种,内源性多肽或其部分的三维结构可用作合理设计一种或多种小分子化合物的起点。例如,在一个实施方案中,例如使用本文所述的方法筛选小分子的通用文库。

[0270] 在一些实施方案中,将试验化合物应用于试验样品,例如,含有一种或多种ApoE蛋白的样品,以及评价试验化合物的一种或多种作用(例如,ApoE蛋白(一种或多种)的HSPG/肝素结合亲和力)。例如使用如本文所述的肝素琼脂糖凝胶柱或特异性识别ApoE的HSPG结合结构域的抗体可以评价试验化合物修饰ApoE蛋白(一种或多种)的HSPG/肝素结合亲和力的能力。在一些实施方案中,用于筛选如本文所述的试验化合物的方法包括评价试验化合物修饰(例如抑制或降低)如本文所述的结合野生型或突变ApoE的一个或多个HSPG结合位点或一个或多个HSPG结合的变构调节位点的抗体的结合的能力。在一些实施方案中,试验化合物与如本文所述的抗体竞争ApoE结合。

[0271] 在一些实施方案中,试验样品是本文所述病症的体内模型或源自(例如,取自)本文所述病症的体内模型。例如,可以使用动物模型,例如啮齿动物如大鼠。

[0272] 已经通过本文所述的方法筛选并确定降低或修饰ApoE和HSPG/肝素结合的试验化合物可以被认为是候选化合物。已在例如病症的体内模型中筛选的,所述病症例如痴呆和/或轻度认知损害(例如与阿尔茨海默症、血管性痴呆、路易体痴呆、额颞痴呆、帕金森病或亨廷顿氏病相关的那些)、神经退行性疾病、脑血管疾病、脑损伤、视网膜变性或视网膜损伤,并且确定对病症、例如对病症的一种或多种症状具有期望的效果的候选化合物,可以被认为是候选治疗剂。一旦在临床环境中筛选,候选治疗剂为治疗剂。候选化合物、候选治疗剂和治疗剂可以任选地优化和/或衍生化,并与生理学上可接受的赋形剂一起配制以形成药物组合物。

[0273] 因此,可以例如使用合理设计选择和系统地改变在第一次筛选中识别为“命中(hit)”的试验化合物(例如,具有对病症期望的效果的试验化合物),以优化结合亲和力(affinity)、亲合力(avidity)、特异性或其它参数。也可以使用本文所述的方法筛选此类优化。因此,在一个实施方案中,本发明包括使用本领域已知的和/或本文所述的方法筛选化合物的第一文库,识别该文库中的一个或多个命中,对这些命中进行系统地结构改变以产生结构上与命中相关的化合物的第二文库,并使用本文所述的方法筛选第二文库。

[0274] 识别为命中的试验化合物可以被认为是候选治疗化合物,可用于治疗、预防或延迟如本文所述的与痴呆和/或轻度认知损害相关的病症例如阿尔茨海默症、血管性痴呆、路

易体痴呆、额颞痴呆、帕金森病或亨廷顿病的发展和进展，并可用于治疗、预防或延迟神经退行性疾病、脑血管疾病、脑损伤、视网膜变性或视网膜损伤的发展或进展。可用于确定“命中”的结构的各种技术可用于本文所述的方法中，例如NMR、质谱法、装配有电子捕获检测器的气相色谱法、荧光和吸收光谱法。因此，本发明还包括通过本文所述的方法识别为“命中”的化合物，以及它们的施用方法和用于治疗、预防或延迟本文所述的病症的发展或进展的方法。

[0275] 识别为候选治疗化合物的试验化合物可以通过施用至与如本文所述的任何病症相关的病症的动物模型来进一步筛选。可以监测动物的病症的变化，例如病症的参数的改善，例如与临床结果相关的参数。

[0276] 治疗方法

[0277] 本文所述的方法包括用于治疗、预防或延迟与痴呆和/或轻度认知损害相关的病症、神经退行性疾病、脑血管疾病、脑损伤、视网膜变性或视网膜损伤的发展或进展的方法。在一些实施方案中，与痴呆和/或轻度认知损害相关的病症是阿尔茨海默症、血管性痴呆、路易体痴呆、额颞痴呆、帕金森病或亨廷顿病。神经退行性疾病的其它非限制性实例包括朊病毒病、运动神经元病和肌萎缩侧索硬化(ALS)。脑血管疾病的非限制性实例包括中风、颈动脉狭窄、椎管狭窄和动脉瘤。脑损伤的非限制性实例包括外伤性脑损伤和获得性脑损伤。视网膜变性，例如青光眼、年龄相关性黄斑变性，可涉及淀粉样蛋白β和神经原纤维缠结毒性，在视网膜变性和神经退行性(例如阿尔茨海默症)之间建立联系(参见，例如McKinnon，Frontiers in Bioscience 8,s1140-1156,2003;Johnson等人PNAS 99(18)11830-11835,2002;和Sivak,Investigative Ophthalmology&Visual Science,54(1)871-880,2013)。因此，用于神经退行性病变的治疗可用于治疗视网膜或视神经变性。

[0278] 所述方法包括向需要或已确定需要此类治疗的受试者施用治疗有效量的如本文所述的任何抗体、肽、融合蛋白或基因组编辑系统。

[0279] 本文所述的方法也可用于处于发展本文所述的任何病症的风险的受试者。处于发展阿尔茨海默症的风险的受试者可包括为APOE4等位基因纯合或杂合的受试者、常染色体显性阿尔茨海默症致病突变(例如淀粉样蛋白β前体(APP)基因、PSEN1基因或PSEN2基因突变)的携带者，三体21(例如，其认知损害仅是发展性的受试者)。处于发展阿尔茨海默症的风险的受试者还可包括具有与增加的发展疾病的风险相关的多基因风险评分的受试者，以及具有阿尔茨海默症的脑成像或其它生物标志物(例如体液中的生物标志物)证据的受试者。用于预防或延迟本文所述的病症的发展的方法也可用于未处于发展上述病症的风险的受试者，例如50岁以上(例如55岁、60岁、65岁、70岁、75岁、80岁、85岁、90岁或95岁以上)的受试者。

[0280] 在本上下文中使用时，“治疗”是指改善与本文所述的病症相关的病症的至少一种症状。通常，阿尔茨海默症导致原纤维形成、淀粉样蛋白聚集和认知能力下降；因此，治疗可导致脑中原纤维形成和/或淀粉样蛋白聚集的减少、缠结的tau蛋白形成减少、脑代谢改善、神经认知功能和/或认知能力改善。

[0281] 实施例

[0282] 提供以下实施例以更好地说明所要求保护的发明并且不应被解释为限制本发明的范围。在所提及的具体材料的方面来说，其仅用于说明的用途，并不旨在限制本发明。本

领域技术人员在不行使发明能力和不脱离本发明范围的情况下,可以开发出等效的手段或反应物。

[0283] 实施例1:PSEN1突变携带者中的APOE3 Christchurch R136S突变的鉴定材料和方法:

[0284] 临床评价:安蒂奥基亚大学(the University of Antioquia)、马萨诸塞州总医院(Massachusetts General Hospital)和马萨诸塞州眼耳医院斯格本斯眼科研究所(the Schepens Eye Research Institute of Massachusetts Eye and Ear)的机构审查委员会批准了本研究。与所有研究参与者一样,先证者病例提供了她的书面知情同意书。如表1所示进行临床评级和神经心理学测试。PSEN1 E280A基因分型如前所述进行[1]。

[0285] 所有临床措施均在安蒂奥基亚大学(Medellín,Colombia)进行,并由接受过评估培训的医生和心理学家用西班牙语进行。神经认知测试包括全面的多领域评估。进行的一些测试是西班牙版本的简易精神状态检查表(MMSE)、临床痴呆评级(CDR)和建立阿尔茨海默症注册联盟组系(Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's disease battery),这些测试已适应于该哥伦比亚人口[2]。其它测试由Yesavage老年抑郁量表(Yesavage Geriatric Depression Scale)[3]和功能评估分期测试[4]组成,这些测试是在脑成像的六个月内完成的。

[0286] 进行了详细的眼科评价。它包括视敏度评估、裂隙灯和间接检眼镜检查。获得使用Optos Panoramic 200Tx成像系统(Optos PLC,Dunfermline,Scotland,UK)的超宽视野眼底和眼底自体荧光图像。此外,还进行Spectralis SD-OCT(Heidelberg Engineering,Heidelberg,Germany)和使用配有AngioPlex的Cirrus HD-OCT(Carl Zeiss Meditec,Dublin,CA)的OCT血管造影术。

[0287] 在发现PSEN1 E280A突变携带者具有两个拷贝的APOE3ch变体后,进行了附加的研究。进行空腹血清脂质检测以探索III型高脂蛋白血症的可能性,III型高脂蛋白血症是一种在5-10%的对于相对AD保护性APOE2等位基因为纯合的人和大多数但并非所有APOE3ch携带者中发现的病况[5]。

[0288] 最后,来自AD遗传学联盟的临床和神经病理学验证的AD病例和对照的数据的分析用于阐明对于APOE2等位基因的纯合性是否与晚发性AD痴呆的极低风险相关。

[0289] 全外显子组测序:使用Illumina化学进行全外显子组捕获和测序以进行变体发现;考虑先前与AD相关的基因中具有低于1%频率的罕见变体用于寻找候选风险修饰因子。具体地,使用生物信息学工具识别了基因的外显子区域和剪接位点连接(进入内含子5bp)内的罕见DNA变体(次要等位基因频率<1%)。使用151bp双端(paired-end)读长,在Illumina HiSeq 4000测序仪上构建和测序全外显子组文库。使用如下修改的先前描述的方案[6]进行文库构建。10μL溶液中的基因组DNA输入量从3μg减少至50ng,并进行酶促剪切。将双索引Illumina双端接头替换为回文分叉接头(palindromic forked adapter),所述回文分叉接头中内嵌了独特的8个碱基索引序列,并添加至各末端用于接头连接。使用具有38Mb靶区域(29Mb诱饵)的Illumina快速捕获外显子组富集试剂盒进行溶液中杂交选择。靶区域包括Refseq外显子组数据库中98.3%的区间。在杂交之前,双索引文库合并至多达96个样品的组中。从链霉亲和素珠中洗脱后,通过PicoGreen对富集的文库池(pools)进行定量,然后进行标准化。对于簇扩增和测序,使用定量PCR(KAPA生物系统)对使用分叉的、索引

的接头制备的文库进行定量,使用Hamilton Starlet液体处理系统标准化至2nM,并使用Hamilton Starlet液体处理系统等体积合并。然后在0.1N NaOH中使池变性。使用Hamilton Starlet液体处理系统将变性样品稀释至带状管中。根据制造商的方案(Illumina)使用Illumina cBot进行模板的簇扩增。在HiSeq 4000合成测序试剂盒上测序流动池(flowcell),然后使用RTA2.7.3进行分析。

[0290] 外显子组测序数据使用个性化医学中心(the Center for Personalized Medicine)(CPM)临床基因组学实验室和转化基因组学研究所的中心临床外显子组测序的生物信息学分析流程(pipeline)进行处理和分析。简而言之,使用默认参数的Edico Genome的Dragen Genome Pipeline用于进行序列比对和变体检测(variant calling)。开源软件samtools和bcftools(samtools.github.io/)与一组自定义脚本一起使用,以基于ExAC(Exome Aggregation Consortium,exac.broadinstitute.org/)等位基因频率进行覆盖率确定和初始变体过滤[7]。针对人hs37d5诱饵基因组进行序列比对。[8]为了识别潜在的修饰变体,基于两个HPO术语:HP:0002511,阿尔茨海默症;HP:0003584,晚发性,产生15个基因的主要基因列表。这些基因是AAGAB、ABCC8、AKT2、APOE、APP、BEAN1、GATA1、GCK、HMGA1、HNF1B、HNF4A、LDB3、PAX4、PSEN1和PSEN2。[9]使用商业工具(Cartagenia v5.0)进一步注释和分析这些基因的外显子区域和剪接位点连接(进入内含子5bp)中的罕见DNA变体(次要等位基因频率<1%)。根据人类基因组变异协会(HGVS v2.0)命名指南报告了序列改变。

[0291] 全基因组测序:全基因组测序(WGS)和Genomizer分析(v 10.1.0)用于进行其它潜在的遗传风险修饰因子(包括与阿尔茨海默氏症的较低风险相关的那些)的全面且无偏见的排序,有助于排除其它潜在的保护性遗传因子。[10]为了处理WGS数据,使用与上述相同的dragen分析流程。数据与GRCh37诱饵基因组(hs37d5)比对。过滤掉在<10X的深度下检测的变体,然后使用Ensembl的变体效应预测器(VEP)工具进行注释。使用的VEP版本为v93。然后编译过滤和注释的变体集用于Genomizer分析。

[0292] APOE结构显示:图像是使用NGL Viewer[12]从先前公开的PDB 2L7B的结构[11]的RCSB PDB(rcsb.org)获得并修改的。

[0293] 通过Sanger测序进行APOE基因分型:用于扩增过程的反应混合物在50μL体积中进行,包括以下组分:1xPfuUltra II Hostart Master Mix,1μL的各引物(10μmol/L)(正向引物:5'-AGCCCTTCTCCCCGCCTCCCACTGT-3'(SEQ ID NO:67)和反向引物:5'-CTCCGCCACCTGCTCCTTCACCTCG-3'(SEQ ID NO:68)),5% DMSO和1μL的基因组DNA(100ng/μL)。[13]PCR循环如下运行:在95℃下初始变性2分钟,然后进行35个循环,95℃下变性20秒,60℃下退火30秒,72℃下延伸40秒,并在72℃下最终延伸5分钟。PCR产物使用来自Qiagen的QIAquick凝胶提取试剂盒纯化,并使用来自Applied Biosystems的3730xl测序仪通过MGH CCIB DNA核来测序。

[0294] MRI和PET成像:匹兹堡化合物B(Pittsburgh Compound B)(PiB)、flortaucipir(FTP)正电子发射断层扫描(PET)和结构磁共振成像(MRI)测定如前所述在马萨诸塞州总医院获得、并在马萨诸塞州总医院和Banner阿尔茨海默症研究所进行分析。[14]氟脱氧葡萄糖PET图像如前所述在哥伦比亚安蒂奥基亚大学获得,并进行分析[15]。将病例的成像数据与来自在亲属的预期临床发病年龄下发展MCI的较年轻的PSEN1 E280A突变携带者的数据、和来自认知未受损的突变携带者的数据进行比较。

[0295] 如前所述[16-19],MRI在3T Tim Trio(Siemens)上进行,包括用Freesurfer(FS)处理的磁化准备的快速梯度回波(MPRAGE)以识别灰白质和软脑膜(pial)表面,以允许感兴趣的区域(ROI)分割如下:小脑灰质、海马和以下Braak阶段相关的皮质:内嗅皮质、海马旁回、颞下回、梭状回、后扣带回。

[0296] 18F-Flortaucipir(FTP)在MGH制备,放射化学产率为14±3%,合成结束时(60分钟)的比活性(specific activity)为216±60GBq/μmol,并已验证可用于人类(Shoup等人,2013)。制备11C-匹兹堡化合物B,并如前所述获得PET图像。[16]所有的PET图像均使用Siemens/CTI(Knoxville,TN)ECAT HR+扫描仪获得(3D模式;63个图像平面;15.2cm轴向视野;5.6mm横轴分辨率和2.4mm切片间隔。11C PiB PET使用8.5至15mCi团注,紧接着在69帧(12x15秒、57x60秒))中进行60分钟的动态采集获得。18F FTP是在9.0至11.0mCi团注后80-100分钟内以4x 5分钟帧获得的。重建PET图像并进行衰减校正,并对各帧进行评价以验证足够的计数统计数据和头部运动的缺失。

[0297] 18F FTP特异性结合在FS ROI中表示为对小脑的标准化摄取值比(SUVR),类似于先前的报告[19],使用FS小脑灰质ROI作为参照。对于体素取向(voxelwise)分析,将每个受试者的MPRAGE注册至SPM8(SPM)中的模板MR,并使用8mm高斯核对空间变换的SUVR PET数据进行平滑处理以说明个体解剖差异[20]。为了说明脉络丛中可能的18F FTP脱靶结合(这可能会混淆海马信号),我们使用线性回归来回归脉络丛,如先前所报道的[21]。

[0298] 11C PiB PET数据表示为以小脑灰质为参照组织的分布容积比(DVR);区域时间-活动曲线用于计算各ROI的区域DVR,使用Logan图形方法应用于注射后40到60分钟的数据[16,22]。使用大的皮质ROI聚合体评价11C PiB保留,该聚合体包括先前描述的额叶、侧颞和脾后皮质(FLR)[23,24]

[0299] 在黑暗的房间静息时、在30分钟放射性示踪剂摄取期后,使用5mCi(185百万Bq)的18F-氟脱氧葡萄糖的静脉施用,接着30分钟的动态发射扫描(六个5分钟的帧),在64节PET/计算机断层扫描成像系统(Biograph mCT;Siemens)上进行8F-氟脱氧葡萄糖PET。使用计算机断层扫描衰减校正重建图像。使用自动大脑映射算法(SPM8;fil.ion.ucl.ac.uk/spm/software/spm8)从各参与者的18F-氟脱氧葡萄糖PET图像中的双侧感兴趣的区域(ROI)表征楔前叶与全脑大脑葡萄糖代谢率(CMRgl)的比。使用FreeSurfer(surfer.nmr.mgh.harvard.edu)从各参与者的T1加权MR图像中的双侧ROI表征海马与总颅内体积比。目视检查所有图像以验证ROI表征。

[0300] 淀粉样蛋白聚集研究:在细菌中合成含有和不含有Christchurch变体的人ApoE3蛋白片段(包括羧基末端结构域和组氨酸标签)、纯化(Innovagen),并用于使用硫磺素T(SensoLyte®ThTβ-淀粉样蛋白(1-42)聚集试剂盒,目录号AS-72214)体外评价这些蛋白对$A\beta_{42}$聚集的不同作用。对于该检测,将55μM的$A\beta_{42}$添加至透明、无结合的96孔板中的10μM野生型apoE3蛋白或突变136Arg→Ser ApoE3蛋白的溶液中。然后将样品与2mM硫磺素T染料混合,并在2小时内以间歇时间间隔、以Ex/Em=440/484读取荧光。将板保持在37℃,读取之间摇动15秒。

[0301] 具有和不具有Christchurch突变的全长ApoE3蛋白也通过瞬时转染在Flp-In™T-REx™293(Thermo Fisher Scientific)哺乳动物细胞中表达,以使用先前公布的分裂-荧光素酶互补测定确认这些蛋白对$A\beta_{42}$聚集的作用。[26]后一种分析是使用来自Addgene(质粒#

87086[27])的人APOE3表达作为WT或APOE3通过定点诱变引入Christchurch变体来进行的。荧光素酶测定试剂购自Promega。

[0302] 结果

[0303] 识别了约1,200名哥伦比亚早老素1(PSEN1)E280A突变携带者和4,600名非携带者,他们共同构成了世界上最大的已知的常染色体显性阿尔茨海默症(ADAD)族。[28,29]突变携带者通常在各自的中位数年龄44(95% CI,43-45)和49(95% CI,49-50)岁发展轻度认知损害(MCI)和痴呆。[30,31]研究直至较大年龄之前保持认知未受损的常染色体显性AD(ADAD)突变携带者可有助于发现降低风险的基因变体。[32]表征这些个体中的AD生物标志物有助于了解这些基因发挥其相对保护作用的潜在可靶向机制。我们识别了PSEN1 E280A突变携带者,她直至70多岁才发展MCI,是发病的中位数年龄后的将近30年。

[0304] 本研究是在参与者的书面知情同意下、按照机构审查委员会的指导方针进行的(为了保护她的匿名性和保密性,略去了她的确切年龄和其它识别信息)。参与者被证实携带淀粉样蛋白-β_{42}($A\beta_{42}$)-过度产生的PSEN1 E280A突变,家庭信息提供者的报告证实在她70岁之前认知未受损,随后在24个月周期的年度评价中符合MCI [33]的标准。她在日常生活的基本和工具性活动方面保持完全独立,没有明显迹象表明她进行这些活动的能力的恶化。在摄入评价中,她的记忆缺陷限于最近发生的事件,并且她的神经系统检查正常。她的年龄和教育调整的神经心理学测试得分表明,在24个月的评价期内,回忆记忆、相对保留的识别记忆、初始学习、命名、视觉空间能力和语言流利能力以及相对稳定的认知表现有优先损害(表1)。

[0305] 表1:认知测试得分和百分位数

[0306]

认知测试	原始得分(百分位数**)			平均值(SD)**
MMSE/30*	18 (1^{st})	16 ($<1^{st}$)	19 (4^{th})	22 (1.7)
命名/15	9 (7^{th})	9 (7^{th})	8 (3^{rd})	12.03 (2.1)
CERAD 单词表学习/30	10 (5^{th})	6 ($<1^{st}$)	8 (1^{st})	15.64 (3.44)
CERAD 单词表回忆/10	0 ($<1^{st}$)	0 ($<1^{st}$)	0 ($<1^{st}$)	5.77 (1.98)
CERAD 单词表识别/10	9 (27^{th})	8 (5^{th})	7 (1^{st})	9.58 (0.98)
CERAD 实践- 复制/11	8 (18^{th})	9 (39^{th})	6 (1^{st})	9.42 (1.57)
CERAD 实践-回忆/11	0 ($<1^{st}$)	2 (3^{rd})	0 ($<1^{st}$)	7.52 (2.84)
语义流畅性(动物)	12 (13^{th})	12 (13^{th})	12 (13^{th})	16.97 (4.3)
音位流畅性(“F”字)	10 (13^{th})	11(14^{th})	10 (13^{th})	23.75 (11.89)
Raven 矩阵测试，表格 A/12	7 (27^{th})	7 (27^{th})	8 (47^{th})	8.21 (2.13)
GDS/15	9	2	9	
EDG/7	3	3	4	

[0307] MMSE:简易精神状态检查

[0308] CERAD:建立阿尔茨海默症注册联盟组系

[0309] GDS:老年抑郁量表

[0310] EDG:全面衰退量表

[0311] *由于她的读写能力受限,没有进行需要阅读和写作技能的MMSE子测试。她的最高可能得分是23(而不是30)。

[0312] **百分位数是使用该哥伦比亚人口的标准计算的。

[0313] 25和75之间的百分位数将她的表现置于她的年龄和教育的平均范围内。

[0314] 9和25之间的百分位数将她的表现归类为低于平均水平。2和8之间的百分位数将她的表现归类为低。低于1的百分位数将她的表现归类为极低。

[0315] #本报告中描述的脑成像是在初始认知测试后三个月获得的。

[0316] 全外显子组测序证实了她的PSEN1 E280A突变,并发现她还具有两个拷贝的罕见的APOE3 Christchurch R136S(APOEch)突变。Sanger测序证实了后者的发现。全基因组测序和Genomizer分析用于全面识别和排序所有潜在的重要的罕见和常见变体。[34]使用这种方法,PSEN1 E280A突变被证实是参与者的主要风险因素,APOE3ch纯合性被证实是她的主要抵抗因素。

[0317] APOE,晚发型AD的主要易感基因,具有三个常见的等位基因(APOE2、3和4)。与最常见的APOE3/3基因型相比,APOE2与较低的AD风险和较大的痴呆发病年龄相关,[35]并且APOE4的各额外的拷贝都与较高的风险和较年轻的发病年龄相关。[36,37]APOEch变体,氨基酸136处的精氨酸-至-丝氨酸取代(136Arg→Ser),对应于密码子154,[38]可以位于任何常见的APOE等位基因上,[39]包括该参与者的两个APOE3等位基因。图1显示野生型ApoE3蛋白的结构模型。突出显示N末端(残基1-191)和C末端(残基201-299)结构域。显示APOE4(C112R)、APOE3ch(R136S)和APOE2(R158C)变体的氨基酸位置。

[0318] 报告约180,000个外显子组的AlzAD或ExAC数据库中不存在APOE3ch变体。R136S先前在患有HLP III的APOE2个体中识别,但先前尚未报道过其在AD的进展中的潜在影响。[40]我们通过全基因组测序对来自其它两名具有延迟的发病年龄(发病年龄为62岁和70岁)的PSEN1 E280A携带者的DNA样品进行测序。这些个体都没有APOE3 R136S变体,也没有APOE2;后者先前已显示延迟该家族的疾病发病。[41]

[0319] 为了证实APOE3 R136S突变与延迟的AD发病年龄之间的潜在关联,我们对先证者病例的四名后代进行了全基因组测序、神经学和神经心理学测试,这些后代均超过50岁,并预计携带APOE3 R136S。图2显示来自对照、先证者和后代样品的APOE的代表性Sanger测序结果。上行:在所有病例中显示的C112纯合序列。中间行:来自对照个体的R136纯合序列显示在左图中。中间图显示导致R136S突变的纯合变化。右图显示先证者的后代的R136S杂合突变实例。下行:在所有病例中显示的R158纯合序列。图3显示了先证者的系谱,圆圈代表女性,方块代表男性,菱形代表为了隐私而掩盖性别的个体,箭头描述患有MCI的先证者个体,阴影表示有痴呆的病史的个体。已故个体用斜线标记。适当地显示个体APOE和PSEN1基因型以保持匿名。尽管其它未知的遗传或表观遗传因素可能导致这两个相关的PSEN1 E280A携带者中出现认知障碍的年龄晚,我们认为APOE3 R136S变体通过缓冲脑中淀粉样蛋白β积累的影响来改变AD表型和随后延迟tau病理、神经退行性病变(即脑萎缩)、和症状发作的出现。

[0320] APOEch和APOE的低密度脂蛋白受体(LDLR)结合区中的其它罕见突变的携带者通常具有III型高脂蛋白血症(HLP-III),类似于在5-10%的APOE2纯合子中观察到的。[43,44]本报告中的参与者证实患有HLP-III,包括APOEch和升高的甘油三酯和总胆固醇水平(参见表2)。

[0321] 表2:血脂异常检查

[0322]

测试 脂质检测	受试者	正常范围*
甘油三酯(mg/dl)	691.88	<250
总胆固醇(mg/dl)	511.76	150 – 199
VLDL-C (mg/dl)	(-)	<30
LDL-C (mg/dl)	(-)	≤130
直接 LDL-C (mg/dl)	147	≤130
HDL-C (mg/dl)	55.74	≥40
胆固醇/HDL 比	9.18	<5
载脂蛋白 A-I (mg/dl)	177	F: 98-210
载脂蛋白 B (mg/dl)	217	F: 44-148
Apo B/Apo-I 比	1.23	F: 0.35-1.15
脂蛋白 A (mg/dl)	86.6	≤30

[0323] HDL-C:高密度脂蛋白胆固醇,VLDL-C:极低密度脂蛋白胆固醇,LDL-C:低密度脂蛋白胆固醇。*根据默克手册和实验室值的正常范围。

[0324] 详细的实验室检查显示我们的先证者个体和携带APOE3 R136S的四名后代中的三名中的异常脂质谱(lipid profile)(表3)。这四名受试者的总胆固醇和甘油三酯水平高。两名后代中的极低密度脂蛋白(VLDL)和低密度脂蛋白(LDL)较高,并且在先证者个体和一名后代中无法测定,其甘油三酯水平高于400mg/dL(脂质分析间接方法的准确性阈值)(表3)。使用直接酶促测试的进一步分析显示,这两名个体的LDL高于正常LDL。尽管携带APOE3 R136S和APOE4,但一名后代的脂质谱在正常范围内。先前已经报道了APOE2和R136S突变携带者的HLP III的不完全外显。[45]我们排除了这些受试者中脂质病症的次要原因,如糖尿病、肥胖、酒精中毒、肾病症或甲状腺疾病。突变携带者个体中没有一人患有作为HLP III的诊断的黄色瘤(xanthomas),或心血管疾病。这些受试者中异常脂质谱和APOE3 R136S突变的组合与家族性HLP III的诊断一致。

[0325] 表3:研究人群中的痴呆和血脂异常检查

[0326]

测试	患者编号(性别-年龄)					
CBC	**1 (F-75)**	**2 (F-51)**	**3 (F-53)**	**4 (M-49)**	**5 (M-54)**	**正常范围***
RBC 计数($x10^6mm^3$)	4.7	4.73	4.47	5.26	5.37	4.2 - 5.9
血红蛋白(g/dl)	13	14.1	12.9	15.1	15.1	M: 14-17 F: 12-16
血细胞比容(%)	38.5	42.3	39.2	46.3	45.7	M: 41-51 F: 36-47
MCV (fL)	81.9	89.4	87.8	88.1	85	80 - 100
MCH (pg)	27.6	29.8	28.8	28.6	28.1	28 - 32
MCHC (g/dl)	33.7	33.4	32.8	32.5	33	32 - 36
RDW (%)	13.7	12.5	13	13.3	13.5	11.5 - 14.5
WBC 计数($x10^3mm^3$)	5.51	10.45	9.61	12.78	20.18	4.5 - 11
血小板($x10^3mm^3$)	264	289	334	256	295	150 - 350
MPV (fL)	7	8.2	8.8	8.3	7.8	6.5 - 13.5
ESR (mm/h)	30	20	51	18	2	M: 0-15 F: 0-20
BMP						
葡萄糖(mg/dl)	107.1	128.28	107.82	112.15	131.19	70 - 105
BUN (mg/dl)	11.98	13.03	9.71	15.65	14.39	8 - 20
肌酐(mg/dl)	0.57	0.59	0.67	1.04	0.95	0.7 - 1.3
钠(mmol/l)	139.3	141.4	140	137.3	136.6	136 - 145
钾(mmol/l)	3.79	4.03	4.92	4.76	4.29	3.5 - 5
氯化物(mmol/l)	102	106.5	108.3	106.6	107.1	98 - 106
LPP						
总胆固醇(mg/dl)	511.76	192.6	434.25	336.21	323.2	150 - 199
HDL-C (mg/dl)	55.74	60.52	60.56	53.76	33.78	≥40
胆固醇/HDL 比	9.18	3.18	7.17	6.25	9.57	<5
甘油三酯(mg/dl)	691.88	50.32	321.3	282.49	437.92	<250
VLDL-C (mg/dl)	(-)	10.06	64.26	56.5	(-)	<30
LDL-C (mg/dl)	(-)	122.02	309.43	225.95	(-)	≤130
附加测试						
载脂蛋白 A-I (mg/dl)	177	106	150	126	133	M: 88-180 F: 98-210
载脂蛋白 B (mg/dl)	217	75	179	173	160	M: 55-151 F: 44-148
Apo B/Apo-I 比	1.23	0.71	1.19	1.37	1.2	M:0.45-1.25F: 0.35-1.15
溶血补体 50% (U/ml)	50.8	58	58.6	56.1	68.8	31.6 - 57.6
血浆同型半胱氨酸(μmol/l)	9.54	6.47	7.48	15.34	13.55	M: 4-16 F: 3-14
脂蛋白 A (mg/dl)	86.6	6	86.1	6.5	62	≤30
血清补体 C3 (mg/dl)	130.1	1202.6	1314.5	1281.9	1292.6	55 - 120
血清补体 C4 (mg/dl)	20.6	177.9	131.7	146.5	245.5	20 - 59
补体 C1q (mg/dl)	24	23	28	28	33	10 - 25
游离甲状腺素(ng/dl)	1.38	1.13	1.12	1.26	1.09	0.9 - 2.4
TSH (μIU/ml)	4.5	0.78	4.08	3.56	3.72	0.50 - 5.0
维生素 B12 (pg/ml)	517	382	294	263	352	200 - 800
叶酸(ng/ml)	16.14	7.52	8.38	2.14	6.6	2.5 - 20

[0327] 对具有两个APOE3ch等位基因的PSEN1 E280A突变携带者进行了详细的眼科评价。该携带者的右眼视力为20/70,左眼视力为20/40。前段检查注意到右眼中后房型人工晶状体具有致密的后囊混浊。左眼的前段注意到核硬化性白内障(图4A和4B)。双眼的后段检查正常,玻璃体腔清晰,视神经、黄斑及周边视网膜正常。除了覆盖中央凹(fovea)的小超反射性(hyper-reflectivity)区域之外,通过右眼的光学相干断层扫描(OCT)进行的进一步测

试是正常的(图4D)。图4C显示右眼的红外图像,其描绘了图4D中所见的视网膜(线)的横截面。此外,左眼的OCT成像显示退行性板层孔(degenerative lamellar hole)(由图4F中的*表示),具有外界膜和椭球层中的小缺陷(图4F中的箭头)。

[0328] 虽然已经提出了几种机制来解释APOE变体对AD风险的影响,但大多数研究都集中在它们对$A\beta_{42}$聚集和斑块负荷的不同影响(APOE2<3<4)。[47]在本研究中,神经影像学测定用于阐明参与者对AD的临床发病的抵抗是否与以下相关:a)尽管超过七十年的$A\beta_{42}$的过度产生,但Aβ斑块负荷相对较小或b)相对高的Aβ斑块负荷但受限的配对螺旋样纤维(PHF)tau(神经原纤维缠结负荷)和神经退行性病变的下游测定。

[0329] 参与者的神经影像学发现如图5所示。正电子发射断层扫描(PET)图像叠加在左半球的内侧面和外侧面上。上行显示淀粉样斑块负荷(PiB DVR)的PET测量值。下行显示配对螺旋样纤维(PHF)tau(即神经原纤维缠结)负荷的PET测量值。晚发性MCI的人为70多岁,MCI典型发病年龄的人为44岁。

[0330] 如图5所示,晚发性MCI的人具有异常高的Aβ斑块负荷的PET测量值,如通过与在40几岁发展MCI的PSEN1 E280A携带者(1.49-1.60的DVR)相比的更高的平均皮质与小脑匹兹堡化合物B(PiB)的分布容积比(DVR=1.96)所表示的。尽管她的Aβ斑块负荷高,但她的PHF tau负荷和神经退行性病变的幅度和/或空间范围相对有限:她的flortaucipir(tau)PET测定仅限于内侧颞区和通常不太受到影响的枕部区域,而在AD的临床阶段受到特征性影响的其它区域相对较少(图5)。她的大脑葡萄糖代谢率的氟脱氧葡萄糖PET测量值保留在已知优先受AD影响的大脑区域中,包括比在较年轻年龄下发展MCI的PSEN1 E280A突变携带者和许多较年轻的、认知未受损的突变携带者更高的楔前叶-至-全脑测量值。

[0331] 图6显示平均皮质淀粉样蛋白斑块负荷、内嗅皮质PHF tau负荷、海马体积、楔前叶葡萄糖代谢的测量值。这些测量值基于脑成像结果,获得自具有两个APOE3ch等位基因和异常晚发性MCI的PSEN1 E280A突变携带者(红色圆点)、在亲属的典型的MCI发病年龄较小下患有MCI的PSEN1 E280A突变携带者(黑色圆点)、以及尚未发展MCI的PSEN1 E280A突变携带者(灰色圆点)获得的。淀粉样蛋白斑块负荷表示为平均皮质-对-小脑分布容积比(DVR)。配对螺旋样纤维(PHF)tau负荷表示为内嗅皮质-对-小脑flortaucipir(FTP)标准摄取值比(SUVR)。可因海马萎缩而减少的海马体积表示为海马-对-全脑体积比。在伴有突触功能障碍和丧失的受AD影响的大脑区域中降低的大脑葡萄糖代谢反映为楔前叶-对-全脑大脑葡萄糖代谢率(CMRgl)比。如图6所示,虽然具有两个APOE3ch等位基因的PSEN1 E280A突变携带者目前具有最高的淀粉样蛋白斑块负荷,但她没有相对严重的PHF tau负荷或海马萎缩,并且她没有楔前叶葡萄糖代谢减退的证据。她的基于MRI的海马-对-全脑体积(可受AD和/或正常衰老影响的海马萎缩测量值)在40多岁发展MCI的突变携带者的范围内。不希望受理论束缚,这些结果表明,该APOE3ch纯合子对AD临床发病的抵抗是通过即使在面对高Aβ斑块负荷时也限制tau病理和神经退行性病变的机制介导的。

[0332] 为了研究APOE3ch变体的功能后果,在存在细菌来源的野生型人ApoE3蛋白、存在突变ApoE3ch蛋白或不存在任何ApoE蛋白的情况下,对$A\beta_{42}$体外聚集进行了比较。通过硫磺素T荧光检测$A\beta_{42}$原纤维形成的速率。$A\beta_{42}$聚集在存在野生型人ApoE3蛋白(C末端结构域)时最高,在存在人ApoE3ch时较低(类似于在ApoE2存在下观察到的[48]),而在不存在任何ApoE时最低(图7)。

[0333] 使用灵敏性分裂荧光素酶互补测定证实了这一发现,其中一旦淀粉样蛋白形成寡聚体,荧光素酶信号就会重建,[48]其中寡聚体是一些最具毒性的淀粉样蛋白种类。[49]与野生型ApoE3相比,哺乳动物细胞中的全长ApoE3ch表达引发显著较少的$A\beta_{42}$寡聚化,因为与野生型ApoE3相比,通过寡聚体形成的荧光素酶发光在ApoE3ch中显著降低(图8)。这些结果为遗传分析提供了验证,并表明ApoEch蛋白的保护作用可能至少部分是由于其促进$A\beta_{42}$聚集的能力有限。仍存在研究参与者可具有更大的Aβ斑块沉积的可能,使她在没有APOEch/3ch基因型的情况下存活至70多岁,并且ApoE3ch蛋白以限制下游神经炎症、tau病理学、神经退行性病变和认知能力下降的方式来改变Aβ聚集的形态学。

[0334] 发现一小部分哥伦比亚血缘关系成员携带一个拷贝的APOE3ch突变,[50]包括四名PSEN1 E280A突变携带者,他们在45岁的中位数年龄下发展MCI。因此,推测可能需要APOE3ch纯合性以显著降低风险并推迟常染色体显性AD的临床发病。由于样品量小,APOEch杂合子个体仍可能具有针对常染色体显性AD相关的认知能力下降的部分保护作用,和针对散发型晚发性AD和/或神经退行性病变的实质性保护作用。

[0335] 这些结果表明,APOE变体的致病功能的程度不同(APOEch和APOE2<3<4),并且APOE3ch/3ch和APOE2/2与最大的功能丧失相关。安全并充分地编辑APOE、降低其表达、或抑制其致病功能的干预可对AD的治疗和预防产生深远的影响。有趣的是,在Aβ过度生产的小鼠中使用反义寡核苷酸抑制大脑中APOE表达以改变Aβ斑块形态改变和减少营养不良性神经突。[51]这种方法可能是可行的,因为APOE表达的缺失在对于移码变体为纯合的中年男性中是耐受的,[52]而且他汀类药物(statins)治疗HPL-III的可用性支持降低ApoE治疗的潜在耐受性。参见,例如Reiman等人Nat Commun 1191):667,2020。

[0336] 不希望受理论束缚,这些结果进一步表明对于APOE3ch和APOE2的纯合性与对AD临床发病的强烈抵抗相关;这些基因型通过直接或间接限制下游tau病理学和神经退行性病变来发挥其有益效果;这些效果并不仅基于Aβ斑块负荷的大小,尽管ApoE介导的Aβ聚集相对减少。这些发现暗示了APOE在AD的理解、治疗和预防中的作用,并可能激发对该病症开发APOE修饰基因和药物疗法的兴趣。

[0337] 实施例2:APOE3ch突变蛋白的肝素结合特性

[0338] 材料和方法

[0339] 肝素柱方案:使用1ml肝素柱(BioVision-6554-1)比较ApoE2、ApoE3、ApoE3ch和ApoE4蛋白同种型(isoform)的肝素结合亲和力。柱在使用前适应室温1小时。用5mL的20mM TRIS-HCL(pH7.5)洗涤柱。然后使20mM TRIS-HCL(pH7.5)中含有50μg/mL的APOE重组蛋白的1mL样品循环通过柱5次。然后用20mM TRIS-HCL(pH7.5)洗涤柱5次。使20mM TRIS-HCL中增加的NaCl梯度(0.025-1M)穿过柱,收集1mL级分,随后准备用于免疫印迹。

[0340] 免疫印迹:免疫印迹证实了从肝素结合柱收集的级分中ApoE同种型的洗脱。在10μl RIPA缓冲液(Cell Signaling Technology)、4μl DTT(1M)和10μlLaemmli缓冲液中将级分稀释至40μl的最终体积。在4-20% Mini-PROTEAN® TGX™预制蛋白质凝胶(Bio-Rad)上分离样品,转移至硝酸纤维素膜(VWR;27376-991),用Odyssey封闭缓冲液(LI-COR Biosciences,Lincoln,NE)封闭,并使用小鼠抗his标签(Novus biologicals.)和IRDye 800CW驴抗兔(LI-COR Biosciences)抗体进行探针标记。使用Odyssey红外成像系统可视化免疫反应条带,并在Image Studio版本2.1(LI-COR Biosciences)上可视化。将单独的凝胶

合在一起以生成图10。

[0341] 肝素板ELISA方案:使用肝素微孔板(Bioworld;50-197-531)进行ELISA。使用样品制备试剂(DY008)将它们封闭一小时。用0.1μg/孔的各重组ApoE蛋白同种型(ApoE2、ApoE3、ApoE3ch和ApoE4)孵育肝素板2小时,然后用含有NaCl梯度(0-0.5M)的PBS中洗涤板五次,然后在洗涤缓冲液(DY008)中洗涤3次。将抗His标签抗体以1:10,000孵育过夜(Novus biologicals;NBP2-61482)。然后洗涤板五次以确保去除未结合的一抗,用驴抗兔-HRP(1:10000)孵育45分钟,然后洗涤五次以确保去除二抗。在添加100μl四甲基联苯胺(Millipore)起始反应的检测阶段之前,将来自ELISA试剂盒(DY008)的硫酸加热至37℃。孵育5分钟后,加入硫酸以终止反应。然后使用SPECTRAmax plus 384(Molecular Devices)对板读数。读数波长为450nm。为了计算样品中存在的抗原量,使用Prism 6(GraphPad Software)基于连续稀释的重组Notch3蛋白绘制标准曲线。

[0342] 结果

[0343] 硫酸肝素蛋白聚糖(HSPG)部分是存在于质膜和细胞外基质中的数百种蛋白质中的糖胺聚糖。通过HSPG介导的蛋白质-蛋白质相互作用在与包括淀粉样蛋白和tau病理学的阿尔茨海默症病理学以及神经退行性病变相关的众多过程中发挥着关键作用。研究了包括ApoEch的各种ApoE同种型结合肝素(常用于模拟HSPG-蛋白质相互作用的糖胺聚糖)的能力。简而言之,使用ELISA分析了在增加的NaCl梯度(0-0.65M)下从肝素柱洗脱的含有ApoE同种型ApoE2和ApoE4的级分。如图9所示,与已知为保护性的ApoE2变体相比,与阿尔茨海默症的较高风险相关的ApoE变体ApoE4对肝素具有更高的亲和力。接下来,使用免疫印迹法分析了在增加的NaCl梯度(0-0.65M)下从肝素柱中洗脱的含有His标记的ApoE2、ApoE3、ApoE4和ApoE3ch的级分。如图10所示,ApoE3ch的肝素结合受损,远低于ApoE2的肝素结合。还使用如材料和方法中所述的肝素板ELISA方案分析了ApoE同种型对肝素的亲和力。如图11A-11B所示,ApoE3ch显示出显著低水平的肝素结合,因为与ApoE4释放所需的NaCl浓度相比,ApoE3ch在低得多的NaCl浓度下从肝素柱中释放。

[0344] 实施例3:针对野生型ApoE和ApoEch突变蛋白的抗体的产生

[0345] 材料和方法

[0346] 抗体竞争测定:将抗体与ApoE3重组蛋白(20mM Tris-HCL中50ug/ml)以1:10的比例孵育,并在室温下孵育3小时。使用仅含有培养基的阴性对照和仅包含重组蛋白ApoE3的阳性对照。使抗体/ApoE3重组蛋白溶液和对照穿过肝素柱并暴露于增加的NaCl梯度(如以上实施例2中所述)。通过ELISA和免疫印迹收集和评价级分。

[0347] BCA测定:首先使用二喹啉甲酸测定(BCA测定)(Pierce BCA蛋白测定试剂盒)筛选从肝素柱收集的级分。使用200μl的试剂A和B混合液以及25μl的各级分进行测定。在37℃下孵育96孔板30分钟,并在562nm处读数。使用Synery2酶标仪(BioTek Instrument.Inc)和Gen5版本1.11软件)对板读数。

[0348] 免疫印迹:免疫印迹证实了从肝素结合柱收集的级分内的ApoE3重组蛋白的洗脱。使用RIPA缓冲液(Cell Signaling Technology)、10x(DTT 1M)和4xLaemmli缓冲液将10μl的级分稀释为40μl的最终体积。在4-20％ Mini-PROTEAN® TGX™预制蛋白质凝胶(Bio-Rad)上分离样品,转移至硝酸纤维素膜(VWR;27376-991),用Odyssey封闭缓冲液(LI-COR Biosciences,Lincoln,NE)封闭,并用小鼠抗his标签(Novus bios)和IRDye 800CW驴抗兔

(LI-COR Biosciences)抗体进行探针标记。使用Odyssey红外成像系统可视化免疫反应条带,并在Image Studio版本2.1(LI-COR Biosciences)上可视化。

[0349] ELISA:使用ELISA测试针对ApoE的肝素结合结构域设计的抗体对ApoE3和ApoEch突变重组蛋白的亲和力。用洗涤缓冲液1(DY008)洗涤Ni-NTA HisSorb板(Qiagen)3次。将ApoE重组蛋白悬浮在缓冲液(DY008)中以产生0.5ug/ml的最终浓度。用200μl的ApoE重组蛋白孵育板2小时,并用1x洗涤缓冲液(DY008)洗涤5次。然后在4℃下用从1:1,000至1:32,000的连续稀释的抗体孵育板过夜。然后将板在1X洗涤缓冲液(DY008)中洗涤5次,并用抗小鼠HRP(Abcam;ab97046,1:10,000)孵育45分钟,然后用1x洗涤缓冲液洗涤5次,以确保完全去除未结合的二抗。将来自ELISA试剂盒(DY008)的硫酸加热至37℃。添加100μl四甲基联苯胺(Millipore)以起始反应的检测阶段。孵育5分钟后,添加硫酸以终止反应。然后使用Synery 2酶标仪(BioTek Instrument.Inc)和Gen5版本1.11软件对板读数。

[0350] 结果

[0351] 产生了针对ApoE的氨基酸130至143的单克隆抗体,并测试了其对全长ApoE3蛋白与肝素之间结合的影响。简而言之,将全长野生型ApoE3蛋白或用单克隆抗体预孵育的那些穿过肝素柱并循环五次以确保最大ApoE3结合。然后用20mM Tris-HCl(pH=7.5)洗涤柱五次,并暴露于20mM Tris-HCl(pH=7.5)中增加的NaCl(0至1M)梯度。收集来自Tris-HCl洗涤液和来自不同NaCl浓度的洗脱液(图12A-12C)。

[0352] 首先通过二喹啉甲酸(BCA)测定对从柱中收集的级分进行筛选。如图13A所示,在曲线右侧的级分中检测到野生型ApoE3的蛋白质信号,表明ApoE3与肝素的强结合。相反地,当用单克隆抗体预孵育ApoE3时,在具有低离子强度的早期级分中观察到强信号(图13B)。为了验证结果,使用免疫印迹分析从肝素柱收集的柱洗涤液和NaCl梯度级分。如图14所示,用单克隆抗体(A3Ab)(该抗体在Arboleda-Velasquez等人,Nature Medicine,25,pages1680-1683(2019)中命名为1343)预培养野生型ApoE3降低其结合肝素的能力,达到与ApoE3ch突变蛋白的结合肝素的能力相似的水平。将单独的凝胶合在一起以生成图14。这些结果表明抗体可用于改变ApoE与肝素的结合特性,从而预防或治疗阿尔茨海默症或相关的痴呆或神经退行性病变。

[0353] 为了产生针对ApoE肝素结合结构域的单克隆抗体,使用野生型ApoE肽:KLH-CTEELRVRLASHLRK-$CONH_2$(SEQ ID NO:54)和ApoEch肽:KLH-CTEELRVSLASHLRK-$CONH_2$(SEQ ID NO:55)免疫小鼠。在N末端添加半胱氨酸残基以促进肽的结合。从测试针对野生型和突变肽和蛋白的活性的阳性克隆和细胞悬浮液中获得细胞融合物。如材料和方法部分中所述,通过ELISA分析了产生的七种抗体作为示例。19G10-2抗体血清显示对APOE3ch突变蛋白的全长和C末端二者的特异性以及与野生型APOE3蛋白的一些相互作用(图15A)。23B2抗体显示对野生型ApoE3和ApoE3ch突变体C末端和全长重组蛋白二者的反应性(图15B)。2H79-1抗体显示对牛血清白蛋白(BSA)的非特异性结合并且对野生型ApoE3或ApoE3ch突变体不显示亲和力(图15C)。30E1-2和16H8抗体二者显示对全长和C末端ApoE3ch突变蛋白以及野生型ApoE3的C末端形式的反应性,但不与全长野生型APOE3蛋白反应(图15D和15E)。25F1-2抗体血清对全长和C末端ApoE3ch突变蛋白显示高亲和力,似乎具有与野生型ApoE3蛋白的C末端的可变结合,并与全长野生型ApoE3有一些相互作用(图15F)。29G10-2抗体对ApoE3ch突变蛋白的全长和C末端显示高亲和力,并且还对C末端野生型ApoE3和BSA显示反应性。最后,

29G10-2抗体不与全长野生型ApoE3蛋白相互作用(图15G)。

[0354] 本文描述25F1-2和19G10-2的可变重链(VH)、可变轻链(VL)和互补决定区(CDR)序列。

[0355] 此外,产生了以下对野生型ApoE具有特异性的亲本克隆,并且如表4所示测试对野生型ApoE肽(WT肽)、野生型ApoE蛋白(WT蛋白)、突变ApoE肽(ApoEch;Mut肽)和突变ApoE3ch蛋白(Mut蛋白)的特异性。这些值表示通过ELISA检测的吸光度水平。粗体克隆显示对野生型ApoE肽(KLH-CTEELRVRLASHLRK-CONH2(SEQ ID NO:54)和野生型ApoE蛋白)的特异性。

[0356] 表4

[0357]

	WT肽	WT蛋白	Mut蛋白	Mut蛋白
1D5	1.742	1.086	0.060	0.062
1H4	2.578	2.113	0.070	0.056
3A6	2.412	0.733	0.059	0.056
7C3	1.698	1.245	0.064	0.051
7C4	2.097	0.586	0.057	0.056
7C11	1.282	0.689	0.058	0.055
16G6	0.739	0.449	0.076	0.067
阳性对照	1.980	1.171	0.254	0.144
阴性对照	0.068	0.051	0.056	0.048

[0358] 实施例4:含有APOE肝素结合结构域的融合蛋白的产生

[0359] 材料和方法

[0360] 肽竞争测定:用ApoE3重组蛋白(50ug/ml,在20mM Tris-HCL中制备)在室温下孵育野生型ApoE3和ApoE3ch突变肽(50ug/ml)3小时。然后使肽/ApoE3重组蛋白溶液穿过肝素柱并暴露于增加的NaCl梯度(如上文实施例2和3中所述)。通过免疫印迹收集和评价级分。

[0361] 免疫印迹:免疫印迹证实了从肝素结合柱收集的级分内的ApoE3的洗脱。在10μl RIPA缓冲液(Cell Signaling Technology)、10X(DTT 1M)和4X Laemmli缓冲液中将级分稀释至40μl的最终体积。在4-20% Mini-PROTEAN®TGX™预制蛋白质凝胶(Bio-Rad)上分离样品,转移至硝酸纤维素膜(VWR;27376-991),用Odyssey封闭缓冲液(LI-COR Biosciences,Lincoln,NE)封闭,并使用小鼠抗his标签(Novus biologicals)和IRDye 800CW驴抗兔(LI-COR Biosciences)抗体进行探针标记。使用Odyssey红外成像系统可视化免疫反应条带,并在Image Studio版本2.1(LI-COR Biosciences)上可视化。

[0362] 结果

[0363] 产生了分别含有野生型ApoE蛋白和ApoEch突变蛋白的氨基酸130-143的肽。为了检查这些肽对野生型ApoE3重组蛋白和肝素琼脂糖之间结合的影响,如材料和方法中所述进行肽竞争测定。如图16所示,野生型ApoE肽导致野生型ApoE3重组蛋白结合的一个级分的移位(one-fraction shift),表明该肽可以与野生型全长ApoE3竞争结合肝素。这些结果表明,含有野生型ApoE蛋白氨基酸130-143的ApoE片段可用于改变ApoE与肝素的结合特性,从而预防或治疗阿尔茨海默症或相关的痴呆或神经退行性病变。

[0364] 为了增加肽的蛋白稳定性,使用骨架Fc IgG2构建体pfuse-hfc1和pfcn-hg2(Invivogen)产生含有人ApoE(野生型和R136S突变形式)的肝素结合结构域或肝素结合结

构域的变构调节位点的C末端和N末端融合蛋白。人ApoE片段排除了APOE2和APOE4变体的位点。在位置136处具有R的ApoE片段的施用可以与内源性ApoE竞争与包括HSPG的结合伴侣的相互作用,引起针对神经退行性病变的保护。在位置136处具有S的ApoE片段的施用可以结合不与野生型ApoE结合的分子,引起针对神经退行性病变的保护。来自用于产生融合蛋白的野生型和R136S突变ApoE的片段的氨基酸序列如下所示(用粗体和双下划线标出R136位置)。

[0365] R136片段的下游

[0366] WT

[0367] STEELRV**R**LASHLRKLRKRLLRDADDLQK (SEQ ID NO:57)

[0368] 突变体

[0369] STEELRV**S**LASHLRKLRKRLLRDADDLQK (SEQ ID NO:58)

[0370] R136片段的上游

[0371] WT

[0372] RLVQYRGEVQAMLGQSTEELRV**R**LASHLRKL (SEQ ID NO:59)

[0373] 突变体

[0374] RLVQYRGEVQAMLGQSTEELRV**S**LASHLRKL (SEQ ID NO:60)

[0375] 图17A-17D显示ApoE片段与肝素相互作用的模型。图17A显示与肝素相互作用的野生型ApoE片段(R136片段的下游,螺旋)的模型。图17B显示与肝素相互作用的ApoE R136S片段(R136片段的下游,螺旋)的模型。图17C显示与肝素相互作用的野生型ApoE片段(R136片段的上游,螺旋)的模型。图17D显示与肝素相互作用的ApoE R136S片段(R136片段的上游,螺旋)的模型。

[0376] 含有R136片段的下游或R136片段的上游的示例性融合蛋白构建体的核酸和氨基酸序列如下所示。

[0377] 184Q pfcn-hg2 ApoE 114-144

[0378] 核酸序列(SEQ ID NO:81)

[0379]

```
   1 GGATCTGCGA TCGCTCCGGT GCCCGTCAGT GGGCAGAGCG CACATCGCCC ACAGTCCCCG
  61 AGAAGTTGGG GGGAGGGGTC GGCAATTGAA CGGGTGCCTA GAGAAGGTGG CGCGGGGTAA
 121 ACTGGGAAAG TGATGTCGTG TACTGGCTCC GCCTTTTTCC CGAGGGTGGG GGAGAACCGT
 181 ATATAAGTGC AGTAGTCGCC GTGAACGTTC TTTTTCGCAA CGGGTTTGCC GCCAGAACAC
 241 AGCTGAAGCT TCGAGGGGCT CGCATCTCTC CTTCACGCGC CCGCCGCCCT ACCTGAGGCC
 301 GCCATCCACG CCGGTTGAGT CGCGTTCTGC CGCCTCCCGC CTGTGGTGCC TCCTGAACTG
 361 CGTCCGCCGT CTAGGTAAGT TTAAAGCTCA GGTCGAGACC GGGCCTTTGT CCGGCGCTCC
 421 CTTGGAGCCT ACCTAGACTC AGCCGGCTCT CCACGCTTTG CCTGACCCtg cttgctcaac
 481 tctacgTCTT TGTTTCGTTT TCTGTTCTGC GCCGTTACAG ATCCAAGCTG TGACCGGCGC
 541 CTACCTGAGA TCACCGGCGA AGGAGGGCCA CCATGTACAG GATGCAACTC CTGTCTTGCA
 601 TTGCACTAAG TCTTGCACTT GTCACGAATT CGGCACCTCT CGAGCGCAAA TCTAGTGTCG
 661 AGTGCCCACC GTGCCCAGCA CCACCTGTGG CAGGACCGTC AGTCTTCCTC TTCCCCCCAA
 721 AACCCAAGGA CACCCTCATG ATCTCCCGGA CCCCTGAGGT CACGTGCGTG GTGGTGGACG
 781 TGAGCCACGA AGACCCCGAG GTCCAGTTCA ACTGGTACGT GGACGGCGTG GAGGTGCATA
 841 ATGCCAAGAC AAAGCCACGG GAGGAGCAGT TCAACAGCAC GTTCCGTGTG GTCAGCGTCC
 901 TCACCGTTGT GCACCAGGAC TGGCTGAACG GCAAGGAGTA CAAGTGCAAG GTCTCCAACA
 961 AAGGCCTCCC AGCCCCCATC GAGAAAACCA TCTCCAAAAC CAAAGGGCAG CCCCGAGAAC
1021 CACAGGTGTA CACCCTGCCC CCATCCCGGG AGGAGATGAC CAAGAACCAG GTCAGCCTGA
1081 CCTGCCTGGT CAAAGGCTTC TACCCCAGCG ACATCGCCGT GGAGTGGGAG AGCAATGGGC
1141 AGCCGGAGAA CAACTACAAG ACCACGCCTC CCATGCTGGA CTCCGACGGC TCCTTCTTCC
1201 TCTACAGCAA GCTCACCGTG GACAAGAGCA GGTGGCAGCA GGGGAACGTC TTCTCATGCT
1261 CCGTGATGCA TGAGGCTCTG CACAACCACT ACACGCAGAA GAGCCTCTCC CTGTCTCCGG
1321 GTGCACGTAC GCGCCTGGTG CAGTACCGCG GCGAGGTGCA GGCCATGCTC GGCCAGAGCA
1381 CCGAGGAGCT GCGGGTGCGC CTCGCCTCCC ACCTGCGCAA GCTGtgaTAT CTCGAGCTAG
1441 CTGGCCAGAC ATGATAAGAT ACATTGATGA GTTTGGACAA ACCACAACTA GAATGCAGTG
1501 AAAAAAATGC TTTATTTGTG AAATTTGTGA TGCTATTGCT TTATTTGTAA CCATTATAAG
1561 CTGCAATAAA CAAGTTAACA ACAACAATTG CATTCATTTT ATGTTTCAGG TTCAGGGGGA
1621 GGTGTGGGAG GTTTTTTAAA GCAAGTAAAA CCTCTACAAA TGTGGTATGG AATTAATTCT
1681 AAAATACAGC ATAGCAAAAC TTTAACCTCC AAATCAAGCC TCTACTTGAA TCCTTTTCTG
1741 AGGGATGAAT AAGGCATAGG CATCAGGGGC TGTTGCCAAT GTGCATTAGC TGTTTGCAGC
1801 CTCACCTTCT TTCATGGAGT TTAAGATATA GTGTATTTTC CCAAGGTTTG AACTAGCTCT
1861 TCATTTCTTT ATGTTTTAAA TGCACTGACC TCCCACATTC CCTTTTTAGT AAAATATTCA
```

[0380]

```
1921 GAAATAATTT AAATACATCA TTGCAATGAA AATAAATGTT TTTTATTAGG CAGAATCCAG
1981 ATGCTCAAGG CCCTTCATAA TATCCCCCAG TTTAGTAGTT GGACTTAGGG AACAAAGGAA
2041 CCTTTAATAG AAATTGGACA GCAAGAAAGC GAGCTTCTAG CTTATCCTCA GTCCTGCTCC
2101 TCTGCCACAA AGTGCACGCA GTTGCCGGCC GGGTCGCGCA GGGCGAACTC CCGCCCCCAC
2161 GGCTGCTCGC CGATCTCGGT CATGGCCGGC CCGGAGGCGT CCCGGAAGTT CGTGGACACG
2221 ACCTCCGACC ACTCGGCGTA CAGCTCGTCC AGGCCGCGCA CCCACACCCA GGCCAGGGTG
2281 TTGTCCGGCA CCACCTGGTC CTGGACCGCG CTGATGAACA GGGTCACGTC GTCCCGGACC
2341 ACACCGGCGA AGTCGTCCTC CACGAAGTCC CGGGAGAACC CGAGCCGGTC GGTCCAGAAC
2401 TCGACCGCTC CGGCGACGTC GCGCGCGGTG AGCACCGGAA CGGCACTGGT CAACTTGGCC
2461 ATGATGGCTC CTCctgtcag gagaggaaag agaagaaggt tagtacaatt gCTATAGTGA
2521 GTTGTATTAT ACTATGCAGA TATACTATGC CAATGATTAA TTGTCAAACT AGGGCTGCAg
2581 ggttcatagt gccacttttc ctgcactgcc ccatctcctg cccacccttt cccaggcata
2641 gacagtcagt gacttacCAA ACTCACAGGA GGGAGAAGGC AGAAGCTTGA GACAGACCCG
2701 CGGGACCGCC GAACTGCGAG GGGACGTGGC TAGGGCGGCT TCTTTTATGG TGCGCCGGCC
2761 CTCGGAGGCA GGGCGCTCGG GGAGGCCTAG CGGCCAATCT GCGGTGGCAG GAGGCGGGGC
2821 CGAAGGCCGT GCCTGACCAA TCCGGAGCAC ATAGGAGTCT CAGCCCCCCG CCCCAAAGCA
2881 AGGGGAAGTC ACGCGCCTGT AGCGCCAGCG TGTTGTGAAA TGGGGGCTTG GGGGGGTTGG
2941 GGCCCTGACT AGTCAAAACA AACTCCCATT GACGTCAATG GGGTGGAGAC TTGGAAATCC
3001 CCGTGAGTCA AACCGCTATC CACGCCCATT GATGTACTGC CAAAACCGCA TCATCATGGT
3061 AATAGCGATG ACTAATACGT AGATGTACTG CCAAGTAGGA AAGTCCCATA AGGTCATGTA
3121 CTGGGCATAA TGCCAGGCGG GCCATTTACC GTCATTGACG TCAATAGGGG GCGTACTTGG
3181 CATATGATAC ACTTGATGTA CTGCCAAGTG GGCAGTTTAC CGTAAATACT CCACCCATTG
3241 ACGTCAATGG AAAGTCCCTA TTGGCGTTAC TATGGGAACA TACGTCATTA TTGACGTCAA
3301 TGGGCGGGGG TCGTTGGGCG GTCAGCCAGG CGGGCCATTT ACCGTAAGTT ATGTAACGCC
3361 TGCAGGTTAA TTAAGAACAT GTGAGCAAAA GGCCAGCAAA AGGCCAGGAA CCGTAAAAAG
3421 GCCGCGTTGC TGGCGTTTTT CCATAGGCTC CGCCCCCCTG ACGAGCATCA CAAAAATCGA
3481 CGCTCAAGTC AGAGGTGGCG AAACCCGACA GGACTATAAA GATACCAGGC GTTTCCCCCT
3541 GGAAGCTCCC TCGTGCGCTC TCCTGTTCCG ACCCTGCCGC TTACCGGATA CCTGTCCGCC
3601 TTTCTCCCTT CGGGAAGCGT GGCGCTTTCT CATAGCTCAC GCTGTAGGTA TCTCAGTTCG
3661 GTGTAGGTCG TTCGCTCCAA GCTGGGCTGT GTGCACGAAC CCCCCGTTCA GCCCGACCGC
3721 TGCGCCTTAT CCGGTAACTA TCGTCTTGAG TCCAACCCGG TAAGACACGA CTTATCGCCA
3781 CTGGCAGCAG CCACTGGTAA CAGGATTAGC AGAGCGAGGT ATGTAGGCGG TGCTACAGAG
3841 TTCTTGAAGT GGTGGCCTAA CTACGGCTAC ACTAGAAGAA CAGTATTTGG TATCTGCGCT
3901 CTGCTGAAGC CAGTTACCTT CGGAAAAAGA GTTGGTAGCT CTTGATCCGG CAAACAAACC
3961 ACCGCTGGTA GCGGTGGTTT TTTTGTTTGC AAGCAGCAGA TTACGCGCAG AAAAAAAGGA
4021 TCTCAAGAAG ATCCTTTGAT CTTTTCTACG GGGTCTGACG CTCAGTGGAA CGAAAACTCA
4081 CGTTAAGGGA TTTTGGTCAT GGCTAGTTAA TTAACATTTA AATCAGCGGC CGCAATAAAA
4141 TATCTTTATT TTCATTACAT CTGTGTGTTG GTTTTTTGTG TGAATCGTAA CTAACATACG
4201 CTCTCCATCA AAACAAAACG AAACAAAACA AACTAGCAAA ATAGGCTGTC CCCAGTGCAA
4261 GTGCAGGTGC CAGAACATTT CTCTATCGAA
```

[0381] 氨基酸序列((SEQ ID NO:82)

[0382]

MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPLERKSSVECPPCPAPPVAGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF
NSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQV
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGARTRL
VQYRGEVQAMLGQSTEELRVRLASHLRKL

[0383] 184R pfcn-hg2 ApoE 114-144R136S核苷酸序列(SEQ ID NO:83)

[0384]

```
  1 GGATCTGCGA TCGCTCCGGT GCCCGTCAGT GGGCAGAGCG CACATCGCCC ACAGTCCCCG
 61 AGAAGTTGGG GGGAGGGGTC GGCAATTGAA CGGGTGCCTA GAGAAGGTGG CGCGGGGTAA
121 ACTGGGAAAG TGATGTCGTG TACTGGCTCC GCCTTTTTCC CGAGGGTGGG GGAGAACCGT
181 ATATAAGTGC AGTAGTCGCC GTGAACGTTC TTTTTCGCAA CGGGTTTGCC GCCAGAACAC
241 AGCTGAAGCT TCGAGGGGCT CGCATCTCTC CTTCACGCGC CCGCCGCCCT ACCTGAGGCC
```

301 GCCATCCACG CCGGTTGAGT CGCGTTCTGC CGCCTCCCGC CTGTGGTGCC TCCTGAACTG
361 CGTCCGCCGT CTAGGTAAGT TTAAAGCTCA GGTCGAGACC GGGCCTTTGT CCGGCGCTCC
421 CTTGGAGCCT ACCTAGACTC AGCCGGCTCT CCACGCTTTG CCTGACCCtg cttgctcaac
481 tctacgTCTT TGTTTCGTTT TCTGTTCTGC GCCGTTACAG ATCCAAGCTG TGACCGGCGC
541 CTACCTGAGA TCACCGGCGA AGGAGGGCCA CCATGTACAG GATGCAACTC CTGTCTTGCA
601 TTGCACTAAG TCTTGCACTT GTCACGAATT CGGCACCTCT CGAGCGCAAA TCTAGTGTCG
661 AGTGCCCACC GTGCCCAGCA CCACCTGTGG CAGGACCGTC AGTCTTCCTC TTCCCCCCAA
721 AACCCAAGGA CACCCTCATG ATCTCCCGGA CCCCTGAGGT CACGTGCGTG GTGGTGGACG
781 TGAGCCACGA AGACCCCGAG GTCCAGTTCA ACTGGTACGT GGACGGCGTG GAGGTGCATA
841 ATGCCAAGAC AAAGCCACGG GAGGAGCAGT TCAACAGCAC GTTCCGTGTG GTCAGCGTCC
901 TCACCGTTGT GCACCAGGAC TGGCTGAACG GCAAGGAGTA CAAGTGCAAG GTCTCCAACA
961 AAGGCCTCCC AGCCCCCATC GAGAAAACCA TCTCCAAAAC CAAAGGGCAG CCCCGAGAAC
1021 CACAGGTGTA CACCCTGCCC CCATCCCGGG AGGAGATGAC CAAGAACCAG GTCAGCCTGA
1081 CCTGCCTGGT CAAAGGCTTC TACCCCAGCG ACATCGCCGT GGAGTGGGAG AGCAATGGGC
1141 AGCCGGAGAA CAACTACAAG ACCACGCCTC CCATGCTGGA CTCCGACGGC TCCTTCTTCC
1201 TCTACAGCAA GCTCACCGTG GACAAGAGCA GGTGGCAGCA GGGGAACGTC TTCTCATGCT
1261 CCGTGATGCA TGAGGCTCTG CACAACCACT ACACGCAGAA GAGCCTCTCC CTGTCTCCGG
1321 GTGCACGTAC GCGCCTGGTG CAGTACCGCG GCGAGGTGCA GGCCATGCTC GGCCAGAGCA
1381 CCGAGGAGCT GCGGGTGaGC CTCGCCTCCC ACCTGCGCAA GCTGtgaTAT CTCGAGCTAG
1441 CTGGCCAGAC ATGATAAGAT ACATTGATGA GTTTGGACAA ACCACAACTA GAATGCAGTG
1501 AAAAAAATGC TTTATTTGTG AAATTTGTGA TGCTATTGCT TTATTTGTAA CCATTATAAG
1561 CTGCAATAAA CAAGTTAACA ACAACAATTG CATTCATTTT ATGTTTCAGG TTCAGGGGGA
1621 GGTGTGGGAG GTTTTTTAAA GCAAGTAAAA CCTCTACAAA TGTGGTATGG AATTAATTCT
1681 AAAATACAGC ATAGCAAAAC TTTAACCTCC AAATCAAGCC TCTACTTGAA TCCTTTTCTG
1741 AGGGATGAAT AAGGCATAGG CATCAGGGGC TGTTGCCAAT GTGCATTAGC TGTTTGCAGC
1801 CTCACCTTCT TTCATGGAGT TTAAGATATA GTGTATTTTC CCAAGGTTTG AACTAGCTCT
1861 TCATTTCTTT ATGTTTTAAA TGCACTGACC TCCCACATTC CCTTTTTAGT AAAATATTCA
1921 GAAATAATTT AAATACATCA TTGCAATGAA AATAAATGTT TTTTATTAGG CAGAATCCAG
1981 ATGCTCAAGG CCCTTCATAA TATCCCCCAG TTTAGTAGTT GGACTTAGGG AACAAAGGAA
2041 CCTTTAATAG AAATTGGACA GCAAGAAAGC GAGCTTCTAG CTTATCCTCA GTCCTGCTCC
[0385] 2101 TCTGCCACAA AGTGCACGCA GTTGCCGGCC GGGTCGCGCA GGGCGAACTC CCGCCCCCAC
2161 GGCTGCTCGC CGATCTCGGT CATGGCCGGC CCGGAGGCGT CCCGGAAGTT CGTGGACACG
2221 ACCTCCGACC ACTCGGCGTA CAGCTCGTCC AGGCCGCGCA CCCACACCCA GGCCAGGGTG
2281 TTGTCCGGCA CCACCTGGTC CTGGACCGCG CTGATGAACA GGGTCACGTC GTCCCGGACC
2341 ACACCGGCGA AGTCGTCCTC CACGAAGTCC CGGGAGAACC CGAGCCGGTC GGTCCAGAAC
2401 TCGACCGCTC CGGCGACGTC GCGCGCGGTG AGCACCGGAA CGGCACTGGT CAACTTGGCC
2461 ATGATGGCTC CTCctgtcag gagaggaaag agaagaaggt tagtacaatt gCTATAGTGA
2521 GTTGTATTAT ACTATGCAGA TATACTATGC CAATGATTAA TTGTCAAACT AGGGCTGCAg
2581 ggttcatagt gccacttttc ctgcactgcc ccatctcctg cccacccttt cccaggcata
2641 gacagtcagt gacttacCAA ACTCACAGGA GGGAGAAGGC AGAAGCTTGA GACAGACCCG
2701 CGGGACCGCC GAACTGCGAG GGGACGTGGC TAGGGCGGCT TCTTTTATGG TGCGCCGGCC
2761 CTCGGAGGCA GGGCGCTCGG GGAGGCCTAG CGGCCAATCT GCGGTGGCAG GAGGCGGGGC
2821 CGAAGGCCGT GCCTGACCAA TCCGGAGCAC ATAGGAGTCT CAGCCCCCCG CCCCAAAGCA
2881 AGGGGAAGTC ACGCGCCTGT AGCGCCAGCG TGTTGTGAAA TGGGGGCTTG GGGGGGTTGG
2941 GGCCCTGACT AGTCAAAACA AACTCCCATT GACGTCAATG GGGTGGAGAC TTGGAAATCC
3001 CCGTGAGTCA AACCGCTATC CACGCCCATT GATGTACTGC CAAAACCGCA TCATCATGGT
3061 AATAGCGATG ACTAATACGT AGATGTACTG CCAAGTAGGA AAGTCCCATA AGGTCATGTA
3121 CTGGGCATAA TGCCAGGCGG GCCATTTACC GTCATTGACG TCAATAGGGG GCGTACTTGG
3181 CATATGATAC ACTTGATGTA CTGCCAAGTG GGCAGTTTAC CGTAAATACT CCACCCATTG
3241 ACGTCAATGG AAAGTCCCTA TTGGCGTTAC TATGGGAACA TACGTCATTA TTGACGTCAA
3301 TGGGCGGGGG TCGTTGGGCG GTCAGCCAGG CGGGCCATTT ACCGTAAGTT ATGTAACGCC
3361 TGCAGGTTAA TTAAGAACAT GTGAGCAAAA GGCCAGCAAA AGGCCAGGAA CCGTAAAAAG
3421 GCCGCGTTGC TGGCGTTTTT CCATAGGCTC CGCCCCCCTG ACGAGCATCA CAAAAATCGA
3481 CGCTCAAGTC AGAGGTGGCG AAACCCGACA GGACTATAAA GATACCAGGC GTTTCCCCCT
3541 GGAAGCTCCC TCGTGCGCTC TCCTGTTCCG ACCCTGCCGC TTACCGGATA CCTGTCCGCC
3601 TTTCTCCCTT CGGGAAGCGT GGCGCTTTCT CATAGCTCAC GCTGTAGGTA TCTCAGTTCG
3661 GTGTAGGTCG TTCGCTCCAA GCTGGGCTGT GTGCACGAAC CCCCCGTTCA GCCCGACCGC
3721 TGCGCCTTAT CCGGTAACTA TCGTCTTGAG TCCAACCCGG TAAGACACGA CTTATCGCCA
3781 CTGGCAGCAG CCACTGGTAA CAGGATTAGC AGAGCGAGGT ATGTAGGCGG TGCTACAGAG
3841 TTCTTGAAGT GGTGGCCTAA CTACGGCTAC ACTAGAAGAA CAGTATTTGG TATCTGCGCT
3901 CTGCTGAAGC CAGTTACCTT CGGAAAAAGA GTTGGTAGCT CTTGATCCGG CAAACAAACC

[0386]

```
3961 ACCGCTGGTA GCGGTGGTTT TTTTGTTTGC AAGCAGCAGA TTACGCGCAG AAAAAAAGGA
4021 TCTCAAGAAG ATCCTTTGAT CTTTTCTACG GGGTCTGACG CTCAGTGGAA CGAAAACTCA
4081 CGTTAAGGGA TTTTGGTCAT GGCTAGTTAA TTAACATTTA AATCAGCGGC CGCAATAAAA
4141 TATCTTTATT TTCATTACAT CTGTGTGTTG GTTTTTTGTG TGAATCGTAA CTAACATACG
4201 CTCTCCATCA AAACAAAACG AAACAAAACA AACTAGCAAA ATAGGCTGTC CCCAGTGCAA
4261 GTGCAGGTGC CAGAACATTT CTCTATCGAA
```

[0387] 氨基酸序列(SEQ ID NO:84)

[0388]

MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPLERKSSVECPPCPAPPVAGPSVFLFPP

KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF

NSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQV

YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDS

DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGARTRL

VQYRGEVQAMLGQSTEELRVSLASHLRKL

[0389] 197F pfuse hfc2 ApoE 114-144核酸序列(SEQ ID NO:85)

[0390]

```
   1 GGATCTGCGA TCGCTCCGGT GCCCGTCAGT GGGCAGAGCG CACATCGCCC ACAGTCCCCG
  61 AGAAGTTGGG GGGAGGGGTC GGCAATTGAA CGGGTGCCTA GAGAAGGTGG CGCGGGGTAA
 121 ACTGGGAAAG TGATGTCGTG TACTGGCTCC GCCTTTTTCC CGAGGGTGGG GGAGAACCGT
 181 ATATAAGTGC AGTAGTCGCC GTGAACGTTC TTTTTCGCAA CGGGTTTGCC GCCAGAACAC
 241 AGCTGAAGCT TCGAGGGGCT CGCATCTCTC CTTCACGCGC CCGCCGCCCT ACCTGAGGCC
 301 GCCATCCACG CCGGTTGAGT CGCGTTCTGC CGCCTCCCGC CTGTGGTGCC TCCTGAACTG
 361 CGTCCGCCGT CTAGGTAAGT TTAAAGCTCA GGTCGAGACC GGGCCTTTGT CCGGCGCTCC
 421 CTTGGAGCCT ACCTAGACTC AGCCGGCTCT CCACGCTTTG CCTGACCCTG CTTGCTCAAC
 481 TCTACGTCTT TGTTTCGTTT TCTGTTCTGC GCCGTTACAG ATCCAAGCTG TGACCGGCGC
 541 CTACCTGAGA TCAccggcGA AGGAGGGCCA CCATGTACAG GATGCAACTC CTGTCTTGCA
 601 TTGCACTAAG TCTTGCACTT GTCACGAATT CGATaCGCCT GGTGCAGTAC CGCGGCGAGG
 661 TGCAGGCCAT GCTCGGCCAG AGtACtGAGG AGCTGCGGGT GCGCCTCGCC TCCCACCTGC
 721 GCAAGCTGat ATCGGCCATG GTTAGATCTG TGGAGTGCCC ACCTTGCCCA GCACCACCTG
 781 TGGCAGGACC TTCAGTCTTC CTCTTCCCCC CAAAACCCAA GGACACCCTG ATGATCTCCA
 841 GAACCCCTGA GGTCACGTGC GTGGTGGTGG ACGTGAGCCA CGAAGACCCC GAGGTCCAGT
 901 TCAACTGGTA CGTGGACGGC ATGGAGGTGC ATAATGCCAA GACAAAGCCA CGGGAGGAGC
 961 AGTTCAACAG CACGTTCCGT GTGGTCAGCG TCCTCACCGT CGTGCACCAG GACTGGCTGA
1021 ACGGCAAGGA GTACAAGTGC AAGGTCTCCA ACAAAGGCCT CCCAGCCCCC ATCGAGAAAA
1081 CCATCTCCAA AACCAAAGGG CAGCCCCGAG AACCACAGGT GTACACCCTG CCCCCATCCC
1141 GGGAGGAGAT GACCAAGAAC CAGGTCAGCC TGACCTGCCT GGTCAAAGGC TTCTACCCCA
1201 GCGACATCGC CGTGGAGTGG GAGAGCAATG GGCAGCCGGA GAACAACTAC AAGACCACAC
1261 CTCCCATGCT GGACTCCGAC GGCTCCTTCT TCCTCTACAG CAAGCTCACC GTGGACAAGA
1321 GCAGGTGGCA GCAGGGGAAC GTCTTCTCAT GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAACC
1381 ACTACACACA GAAGAGCCTC TCCCTGTCTC CGGGTAAATG AgtgccacgG CTAGCTGGCC
1441 AGACATGATA AGATACATTG ATGAGTTTGG ACAAACCACA ACTAGAATGC AGTGAAAAAA
1501 ATGCTTTATT TGTGAAATTT GTGATGCTAT TGCTTTATTT GTAACCATTA TAAGCTGCAA
1561 TAAACAAGTT AACAACAACA ATTGCATTCA TTTTATGTTT CAGGTTCAGG GGGAGGTGTG
1621 GGAGGTTTTT TAAAGCAAGT AAAACCTCTA CAAATGTGGT ATGGAATTAA TTCTAAAATA
1681 CAGCATAGCA AAACTTTAAC CTCCAAATCA AGCCTCTACT TGAATCCTTT TCTGAGGGAT
1741 GAATAAGGCA TAGGCATCAG GGGCTGTTGC CAATGTGCAT TAGCTGTTTG CAGCCTCACC
1801 TTCTTTCATG GAGTTTAAGA TATAGTGTAT TTTCCCAAGG TTTGAACTAG CTCTTCATTT
1861 CTTTATGTTT TAAATGCACT GACCTCCCAC ATTCCCTTTT TAGTAAAATA TTCAGAAATA
1921 ATTTAAATAC ATCATTGCAA TGAAAATAAA TGTTTTTTAT TAGGCAGAAT CCAGATGCTC
1981 AAGGCCCTTC ATAATATCCC CCAGTTTAGT AGTTGGACTT AGGGAACAAA GGAACCTTTA
2041 ATAGAAATTG GACAGCAAGA AAGCGAGCTT CTAGCTTATC CTCAGTCCTG CTCCTCTGCC
2101 ACAAAGTGCA CGCAGTTGCC GGCCGGGTCG CGCAGGGCGA ACTCCCGCCC CCACGGCTGC
```

[0391]

```
2161 TCGCCGATCT CGGTCATGGC CGGCCCGGAG GCGTCCCGGA AGTTCGTGGA CACGACCTCC
2221 GACCACTCGG CGTACAGCTC GTCCAGGCCG CGCACCCACA CCCAGGCCAG GGTGTTGTCC
2281 GGCACCACCT GGTCCTGGAC CGCGCTGATG AACAGGGTCA CGTCGTCCCG GACCACACCG
2341 GCGAAGTCGT CCTCCACGAA GTCCCGGGAG AACCCGAGCC GGTCGGTCCA GAACTCGACC
2401 GCTCCGGCGA CGTCGCGCGC GGTGAGCACC GGAACGGCAC TGGTCAACTT GGCCATGATG
2461 GCTCCTCctg tcaggagagg aaagagaaga aggttagtac aattgCTATA GTGAGTTGTA
2521 TTATACTATG CAGATATACT ATGCCAATGA TTAATTGTCA AACTAGGGCT GCAgggttca
2581 tagtgccact tttcctgcac tgccccatct cctgcccacc ctttcccagg catagacagt
2641 cagtgactta cCAAACTCAC AGGAGGGAGA AGGCAGAAGC TTGAGACAGA CCCGCGGGAC
2701 CGCCGAACTG CGAGGGGACG TGGCTAGGGC GGCTTCTTTT ATGGTGCGCC GGCCCTCGGA
2761 GGCAGGGCGC TCGGGGAGGC CTAGCGGCCA ATCTGCGGTG GCAGGAGGCG GGGCCGAAGG
2821 CCGTGCCTGA CCAATCCGGA GCACATAGGA GTCTCAGCCC CCCGCCCCAA AGCAAGGGGA
2881 AGTCACGCGC CTGTAGCGCC AGCGTGTTGT GAAATGGGGG CTTGGGGGGG TTGGGGCCCT
2941 GACTAGTCAA AACAAACTCC CATTGACGTC AATGGGGTGG AGACTTGGAA ATCCCCGTGA
3001 GTCAAACCGC TATCCACGCC CATTGATGTA CTGCCAAAAC CGCATCATCA TGGTAATAGC
3061 GATGACTAAT ACGTAGATGT ACTGCCAAGT AGGAAAGTCC CATAAGGTCA TGTACTGGGC
3121 ATAATGCCAG GCGGGCCATT TACCGTCATT GACGTCAATA GGGGGCGTAC TTGGCATATG
3181 ATACACTTGA TGTACTGCCA AGTGGGCAGT TTACCGTAAA TACTCCACCC ATTGACGTCA
3241 ATGGAAAGTC CCTATTGGCG TTACTATGGG AACATACGTC ATTATTGACG TCAATGGGCG
3301 GGGGTCGTTG GGCGGTCAGC CAGGCGGGCC ATTTACCGTA AGTTATGTAA CGCCTGCAGG
3361 TTAATTAAGA ACATGTGAGC AAAAGGCCAG CAAAAGGCCA GGAACCGTAA AAAGGCCGCG
3421 TTGCTGGCGT TTTTCCATAG GCTCCGCCCC CCTGACGAGC ATCACAAAAA TCGACGCTCA
3481 AGTCAGAGGT GGCGAAACCC GACAGGACTA TAAAGATACC AGGCGTTTCC CCCTGGAAGC
3541 TCCCTCGTGC GCTCTCCTGT TCCGACCCTG CCGCTTACCG GATACCTGTC CGCCTTTCTC
3601 CCTTCGGGAA GCGTGGCGCT TTCTCATAGC TCACGCTGTA GGTATCTCAG TTCGGTGTAG
3661 GTCGTTCGCT CCAAGCTGGG CTGTGTGCAC GAACCCCCCG TTCAGCCCGA CCGCTGCGCC
3721 TTATCCGGTA ACTATCGTCT TGAGTCCAAC CCGGTAAGAC ACGACTTATC GCCACTGGCA
3781 GCAGCCACTG GTAACAGGAT TAGCAGAGCG AGGTATGTAG GCGGTGCTAC AGAGTTCTTG
3841 AAGTGGTGGC CTAACTACGG CTACACTAGA AGAACAGTAT TTGGTATCTG CGCTCTGCTG
3901 AAGCCAGTTA CCTTCGGAAA AAGAGTTGGT AGCTCTTGAT CCGGCAAACA AACCACCGCT
3961 GGTAGCGGTG GTTTTTTTGT TTGCAAGCAG CAGATTACGC GCAGAAAAAA AGGATCTCAA
4021 GAAGATCCTT TGATCTTTTC TACGGGGTCT GACGCTCAGT GGAACGAAAA CTCACGTTAA
4081 GGGATTTTGG TCATGGCTAG TTAATTAACA TTTAAATCAG CGGCCGCAAT AAAATATCTT
4141 TATTTTCATT ACATCTGTGT GTTGGTTTTT TGTGTGAATC GTAACTAACA TACGCTCTCC
4201 ATCAAAACAA AACGAAACAA AACAAACTAG CAAAATAGGC TGTCCCCAGT GCAAGTGCAG
4261 GTGCCAGAAC ATTTCTCTAT CGAA
```

[0392] 氨基酸序列(SEQ ID NO:86)

[0393]

MYRMQLLSCIALSLALVTNSIRLVQYRGEVQAMLGQSTEELRVRLAS

HLRKLISAMVRSVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV

SHEDPEVQFNWYVDGMEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNG

KEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV

KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN

VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0394] 197G pfuse-hfc2 ApoE 114-144R136S核酸序列(SEQ ID NO:87)

```
   1 GGATCTGCGA TCGCTCCGGT GCCCGTCAGT GGGCAGAGCG CACATCGCCC ACAGTCCCCG
  61 AGAAGTTGGG GGGAGGGGTC GGCAATTGAA CGGGTGCCTA GAGAAGGTGG CGCGGGGTAA
 121 ACTGGGAAAG TGATGTCGTG TACTGGCTCC GCCTTTTTCC CGAGGGTGGG GGAGAACCGT
 181 ATATAAGTGC AGTAGTCGCC GTGAACGTTC TTTTTCGCAA CGGGTTTGCC GCCAGAACAC
 241 AGCTGAAGCT TCGAGGGGCT CGCATCTCTC CTTCACGCGC CCGCCGCCCT ACCTGAGGCC
 301 GCCATCCACG CCGGTTGAGT CGCGTTCTGC CGCCTCCCGC CTGTGGTGCC TCCTGAACTG

 361 CGTCCGCCGT CTAGGTAAGT TTAAAGCTCA GGTCGAGACC GGGCCTTTGT CCGGCGCTCC
 421 CTTGGAGCCT ACCTAGACTC AGCCGGCTCT CCACGCTTTG CCTGACCCTG CTTGCTCAAC
 481 TCTACGTCTT TGTTTCGTTT TCTGTTCTGC GCCGTTACAG ATCCAAGCTG TGACCGGCGC
 541 CTACCTGAGA TCAccggcGA AGGAGGGCCA CCATGTACAG GATGCAACTC CTGTCTTGCA
 601 TTGCACTAAG TCTTGCACTT GTCACGAATT CGATaCGCCT GGTGCAGTAC CGCGGCGAGG
 661 TGCAGGCCAT GCTCGGCCAG AGtActGAGG AGCTGCGGGT GaGCCTCGCC TCCCACCTGC
 721 GCAAGCTGat ATCGGCCATG GTTAGATCTG TGGAGTGCCC ACCTTGCCCA GCACCACCTG
 781 TGGCAGGACC TTCAGTCTTC CTCTTCCCCC CAAAACCCAA GGACACCCTG ATGATCTCCA
 841 GAACCCCTGA GGTCACGTGC GTGGTGGTGG ACGTGAGCCA CGAAGACCCC GAGGTCCAGT
 901 TCAACTGGTA CGTGGACGGC ATGGAGGTGC ATAATGCCAA GACAAAGCCA CGGGAGGAGC
 961 AGTTCAACAG CACGTTCCGT GTGGTCAGCG TCCTCACCGT CGTGCACCAG GACTGGCTGA
1021 ACGGCAAGGA GTACAAGTGC AAGGTCTCCA ACAAAGGCCT CCCAGCCCCC ATCGAGAAAA
1081 CCATCTCCAA AACCAAAGGG CAGCCCCGAG AACCACAGGT GTACACCCTG CCCCCATCCC
1141 GGGAGGAGAT GACCAAGAAC CAGGTCAGCC TGACCTGCCT GGTCAAAGGC TTCTACCCCA
1201 GCGACATCGC CGTGGAGTGG GAGAGCAATG GGCAGCCGGA GAACAACTAC AAGACCACAC
1261 CTCCCATGCT GGACTCCGAC GGCTCCTTCT TCCTCTACAG CAAGCTCACC GTGGACAAGA
1321 GCAGGTGGCA GCAGGGGAAC GTCTTCTCAT GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAACC
1381 ACTACACACA GAAGAGCCTC TCCCTGTCTC CGGGTAAATG AgtgccacgG CTAGCTGGCC
1441 AGACATGATA AGATACATTG ATGAGTTTGG ACAAACCACA ACTAGAATGC AGTGAAAAAA
1501 ATGCTTTATT TGTGAAATTT GTGATGCTAT TGCTTTATTT GTAACCATTA TAAGCTGCAA
1561 TAAACAAGTT AACAACAACA ATTGCATTCA TTTTATGTTT CAGGTTCAGG GGGAGGTGTG
1621 GGAGGTTTTT TAAAGCAAGT AAAACCTCTA CAAATGTGGT ATGGAATTAA TTCTAAAATA
1681 CAGCATAGCA AAACTTTAAC CTCCAAATCA AGCCTCTACT TGAATCCTTT TCTGAGGGAT
1741 GAATAAGGCA TAGGCATCAG GGGCTGTTGC CAATGTGCAT TAGCTGTTTG CAGCCTCACC
1801 TTCTTTCATG GAGTTTAAGA TATAGTGTAT TTTCCCAAGG TTTGAACTAG CTCTTCATTT
1861 CTTTATGTTT TAAATGCACT GACCTCCCAC ATTCCCTTTT TAGTAAAATA TTCAGAAATA
1921 ATTTAAATAC ATCATTGCAA TGAAAATAAA TGTTTTTTAT TAGGCAGAAT CCAGATGCTC
1981 AAGGCCCTTC ATAATATCCC CCAGTTTAGT AGTTGGACTT AGGGAACAAA GGAACCTTTA
2041 ATAGAAATTG GACAGCAAGA AAGCGAGCTT CTAGCTTATC CTCAGTCCTG CTCCTCTGCC
2101 ACAAAGTGCA CGCAGTTGCC GGCCGGGTCG CGCAGGGCGA ACTCCCGCCC CCACGGCTGC
2161 TCGCCGATCT CGGTCATGGC CGGCCCGGAG GCGTCCCGGA AGTTCGTGGA CACGACCTCC
2221 GACCACTCGG CGTACAGCTC GTCCAGGCCG CGCACCCACA CCCAGGCCAG GGTGTTGTCC
2281 GGCACCACCT GGTCCTGGAC CGCGCTGATG AACAGGGTCA CGTCGTCCCG GACCACACCG
2341 GCGAAGTCGT CCTCCACGAA GTCCCGGGAG AACCCGAGCC GGTCGGTCCA GAACTCGACC
2401 GCTCCGGCGA CGTCGCGCGC GGTGAGCACC GGAACGGCAC TGGTCAACTT GGCCATGATG
2461 GCTCCTCctg tcaggagagg aaagagaaga aggttagtac aattgCTATA GTGAGTTGTA
2521 TTATACTATG CAGATATACT ATGCCAATGA TTAATTGTCA AACTAGGGCT GCAgggttca
2581 tagtgccact tttcctgcac tgccccatct cctgcccacc ctttcccagg catagacagt
2641 cagtgactta cCAAACTCAC AGGAGGGAGA AGGCAGAAGC TTGAGACAGA CCCGCGGGAC
2701 CGCCGAACTG CGAGGGGACG TGGCTAGGGC GGCTTCTTTT ATGGTGCGCC GGCCCTCGGA
2761 GGCAGGGCGC TCGGGGAGGC CTAGCGGCCA ATCTGCGGTG GCAGGAGGCG GGGCCGAAGG
2821 CCGTGCCTGA CCAATCCGGA GCACATAGGA GTCTCAGCCC CCCGCCCCAA AGCAAGGGGA
2881 AGTCACGCGC CTGTAGCGCC AGCGTGTTGT GAAATGGGGG CTTGGGGGGG TTGGGGCCCT
2941 GACTAGTCAA AACAAACTCC CATTGACGTC AATGGGGTGG AGACTTGGAA ATCCCCGTGA
3001 GTCAAACCGC TATCCACGCC CATTGATGTA CTGCCAAAAC CGCATCATCA TGGTAATAGC
3061 GATGACTAAT ACGTAGATGT ACTGCCAAGT AGGAAAGTCC CATAAGGTCA TGTACTGGGC
3121 ATAATGCCAG GCGGGCCATT TACCGTCATT GACGTCAATA GGGGGCGTAC TTGGCATATG
3181 ATACACTTGA TGTACTGCCA AGTGGGCAGT TTACCGTAAA TACTCCACCC ATTGACGTCA
3241 ATGGAAAGTC CCTATTGGCG TTACTATGGG AACATACGTC ATTATTGACG TCAATGGGCG
3301 GGGGTCGTTG GGCGGTCAGC CAGGCGGGCC ATTTACCGTA AGTTATGTAA CGCCTGCAGG
3361 TTAATTAAGA ACATGTGAGC AAAAGGCCAG CAAAAGGCCA GGAACCGTAA AAAGGCCGCG
3421 TTGCTGGCGT TTTTCCATAG GCTCCGCCCC CCTGACGAGC ATCACAAAAA TCGACGCTCA
3481 AGTCAGAGGT GGCGAAACCC GACAGGACTA TAAAGATACC AGGCGTTTCC CCCTGGAAGC
3541 TCCCTCGTGC GCTCTCCTGT TCCGACCCTG CCGCTTACCG GATACCTGTC CGCCTTTCTC
3601 CCTTCGGGAA GCGTGGCGCT TTCTCATAGC TCACGCTGTA GGTATCTCAG TTCGGTGTAG
3661 GTCGTTCGCT CCAAGCTGGG CTGTGTGCAC GAACCCCCCG TTCAGCCCGA CCGCTGCGCC
3721 TTATCCGGTA ACTATCGTCT TGAGTCCAAC CCGGTAAGAC ACGACTTATC GCCACTGGCA
3781 GCAGCCACTG GTAACAGGAT TAGCAGAGCG AGGTATGTAG GCGGTGCTAC AGAGTTCTTG
3841 AAGTGGTGGC CTAACTACGG CTACACTAGA AGAACAGTAT TTGGTATCTG CGCTCTGCTG
3901 AAGCCAGTTA CCTTCGGAAA AAGAGTTGGT AGCTCTTGAT CCGGCAAACA AACCACCGCT
3961 GGTAGCGGTG GTTTTTTTGT TTGCAAGCAG CAGATTACGC GCAGAAAAAA AGGATCTCAA

4021 GAAGATCCTT TGATCTTTTC TACGGGGTCT GACGCTCAGT GGAACGAAAA CTCACGTTAA
4081 GGGATTTTGG TCATGGCTAG TTAATTAACA TTTAAATCAG CGGCCGCAAT AAAATATCTT
4141 TATTTTCATT ACATCTGTGT GTTGGTTTTT TGTGTGAATC GTAACTAACA TACGCTCTCC
4201 ATCAAAACAA AACGAAACAA AACAAACTAG CAAAATAGGC TGTCCCCAGT GCAAGTGCAG
4261 GTGCCAGAAC ATTTCTCTAT CGAA
```

[0395]

[0396] 氨基酸序列(SEQ ID NO:88)

[0397]

MYRMQLLSCIALSLALVTNSIRLVQYRGEVQAMLGQSTEELRVSLASH
LRKLISAMVRSVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVQFNWYVDGMEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGK
EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0398] 184U pfcn hg2 ApoE 129-157核酸序列(SEQ ID NO:89)

[0399]

```
   1 GGATCTGCGA TCGCTCCGGT GCCCGTCAGT GGGCAGAGCG CACATCGCCC ACAGTCCCCG
  61 AGAAGTTGGG GGGAGGGGTC GGCAATTGAA CGGGTGCCTA GAGAAGGTGG CGCGGGGTAA
 121 ACTGGGAAAG TGATGTCGTG TACTGGCTCC GCCTTTTTCC CGAGGGTGGG GGAGAACCGT
 181 ATATAAGTGC AGTAGTCGCC GTGAACGTTC TTTTTCGCAA CGGGTTTGCC GCCAGAACAC
 241 AGCTGAAGCT TCGAGGGGCT CGCATCTCTC CTTCACGCGC CCGCCGCCCT ACCTGAGGCC
 301 GCCATCCACG CCGGTTGAGT CGCGTTCTGC CGCCTCCCGC CTGTGGTGCC TCCTGAACTG
 361 CGTCCGCCGT CTAGGTAAGT TTAAAGCTCA GGTCGAGACC GGGCCTTTGT CCGGCGCTCC
 421 CTTGGAGCCT ACCTAGACTC AGCCGGCTCT CCACGCTTTG CCTGACCCtg cttgctcaac
 481 tctacgTCTT TGTTTCGTTT TCTGTTCTGC GCCGTTACAG ATCCAAGCTG TGACCGGCGC
 541 CTACCTGAGA TCACCGGCGA AGGAGGGCCA CCATGTACAG GATGCAACTC CTGTCTTGCA
 601 TTGCACTAAG TCTTGCACTT GTCACGAATT CGGCACCTCT CGAGCGCAAA TCTAGTGTCG
 661 AGTGCCCACC GTGCCCAGCA CCACCTGTGG CAGGACCGTC AGTCTTCCTC TTCCCCCCAA
 721 AACCCAAGGA CACCCTCATG ATCTCCCGGA CCCCTGAGGT CACGTGCGTG GTGGTGGACG
 781 TGAGCCACGA AGACCCCGAG GTCCAGTTCA ACTGGTACGT GGACGGCGTG GAGGTGCATA
 841 ATGCCAAGAC AAAGCCACGG GAGGAGCAGT TCAACAGCAC GTTCCGTGTG GTCAGCGTCC
 901 TCACCGTTGT GCACCAGGAC TGGCTGAACG GCAAGGAGTA CAAGTGCAAG GTCTCCAACA
 961 AAGGCCTCCC AGCCCCCATC GAGAAAACCA TCTCCAAAAC CAAAGGGCAG CCCCGAGAAC
1021 CACAGGTGTA CACCCTGCCC CCATCCCGGG AGGAGATGAC CAAGAACCAG GTCAGCCTGA
1081 CCTGCCTGGT CAAAGGCTTC TACCCCAGCG ACATCGCCGT GGAGTGGGAG AGCAATGGGC
1141 AGCCGGAGAA CAACTACAAG ACCACGCCTC CCATGCTGGA CTCCGACGGC TCCTTCTTCC
1201 TCTACAGCAA GCTCACCGTG GACAAGAGCA GGTGGCAGCA GGGGAACGTC TTCTCATGCT
1261 CCGTGATGCA TGAGGCTCTG CACAACCACT ACACGCAGAA GAGCCTCTCC CTGTCTCCGG
1321 GTGCACGTAC GAGCACCGAG GAGCTGCGGG TGCGCCTCGC CTCCCACCTG CGCAAGCTGC
1381 GTAAGCGGCT CCTCCGCGAT GCCGATGACC TGCAGAAGtg aTATCTCGAG CTAGCTGGCC
1441 AGACATGATA AGATACATTG ATGAGTTTGG ACAAACCACA ACTAGAATGC AGTGAAAAAA
1501 ATGCTTTATT TGTGAAATTT GTGATGCTAT TGCTTTATTT GTAACCATTA TAAGCTGCAA
1561 TAAACAAGTT AACAACAACA ATTGCATTCA TTTTATGTTT CAGGTTCAGG GGGAGGTGTG
1621 GGAGGTTTTT TAAAGCAAGT AAAACCTCTA CAAATGTGGT ATGGAATTAA TTCTAAAATA
1681 CAGCATAGCA AAACTTTAAC CTCCAAATCA AGCCTCTACT TGAATCCTTT TCTGAGGGAT
1741 GAATAAGGCA TAGGCATCAG GGGCTGTTGC CAATGTGCAT TAGCTGTTTG CAGCCTCACC
1801 TTCTTTCATG GAGTTTAAGA TATAGTGTAT TTTCCCAAGG TTTGAACTAG CTCTTCATTT
1861 CTTTATGTTT TAAATGCACT GACCTCCCAC ATTCCCTTTT TAGTAAAATA TTCAGAAATA
1921 ATTTAAATAC ATCATTGCAA TGAAAATAAA TGTTTTTTAT TAGGCAGAAT CCAGATGCTC
1981 AAGGCCCTTC ATAATATCCC CCAGTTTAGT AGTTGGACTT AGGGAACAAA GGAACCTTTA
2041 ATAGAAATTG GACAGCAAGA AAGCGAGCTT CTAGCTTATC CTCAGTCCTG CTCCTCTGCC
2101 ACAAAGTGCA CGCAGTTGCC GGCCGGGTCG CGCAGGGCGA ACTCCCGCCC CCACGGCTGC
2161 TCGCCGATCT CGGTCATGGC CGGCCCGGAG GCGTCCCGGA AGTTCGTGGA CACGACCTCC
```

2221 GACCACTCGG CGTACAGCTC GTCCAGGCCG CGCACCCACA CCCAGGCCAG GGTGTTGTCC
2281 GGCACCACCT GGTCCTGGAC CGCGCTGATG AACAGGGTCA CGTCGTCCCG GACCACACCG
2341 GCGAAGTCGT CCTCCACGAA GTCCCGGGAG AACCCGAGCC GGTCGGTCCA GAACTCGACC
2401 GCTCCGGCGA CGTCGCGCGC GGTGAGCACC GGAACGGCAC TGGTCAACTT GGCCATGATG
2461 GCTCCTCctg tcaggagagg aaagagaaga aggttagtac aattgCTATA GTGAGTTGTA
2521 TTATACTATG CAGATATACT ATGCCAATGA TTAATTGTCA AACTAGGGCT GCAgggttca
2581 tagtgccact tttcctgcac tgccccatct cctgcccacc ctttcccagg catagacagt
2641 cagtgactta cCAAACTCAC AGGAGGGAGA AGGCAGAAGC TTGAGACAGA CCCGCGGGAC
2701 CGCCGAACTG CGAGGGGACG TGGCTAGGGC GGCTTCTTTT ATGGTGCGCC GGCCCTCGGA
2761 GGCAGGGCGC TCGGGGAGGC CTAGCGGCCA ATCTGCGGTG GCAGGAGGCG GGGCCGAAGG
2821 CCGTGCCTGA CCAATCCGGA GCACATAGGA GTCTCAGCCC CCCGCCCCAA AGCAAGGGGA
2881 AGTCACGCGC CTGTAGCGCC AGCGTGTTGT GAAATGGGGG CTTGGGGGGG TTGGGGCCCT
2941 GACTAGTCAA AACAAACTCC CATTGACGTC AATGGGGTGG AGACTTGGAA ATCCCCGTGA
3001 GTCAAACCGC TATCCACGCC CATTGATGTA CTGCCAAAAC CGCATCATCA TGGTAATAGC
3061 GATGACTAAT ACGTAGATGT ACTGCCAAGT AGGAAAGTCC CATAAGGTCA TGTACTGGGC
3121 ATAATGCCAG GCGGGCCATT TACCGTCATT GACGTCAATA GGGGGCGTAC TTGGCATATG
3181 ATACACTTGA TGTACTGCCA AGTGGGCAGT TTACCGTAAA TACTCCACCC ATTGACGTCA
[0400] 3241 ATGGAAAGTC CCTATTGGCG TTACTATGGG AACATACGTC ATTATTGACG TCAATGGGCG
3301 GGGGTCGTTG GGCGGTCAGC CAGGCGGGCC ATTTACCGTA AGTTATGTAA CGCCTGCAGG
3361 TTAATTAAGA ACATGTGAGC AAAAGGCCAG CAAAAGGCCA GGAACCGTAA AAAGGCCGCG
3421 TTGCTGGCGT TTTTCCATAG GCTCCGCCCC CCTGACGAGC ATCACAAAAA TCGACGCTCA
3481 AGTCAGAGGT GGCGAAACCC GACAGGACTA TAAAGATACC AGGCGTTTCC CCCTGGAAGC
3541 TCCCTCGTGC GCTCTCCTGT TCCGACCCTG CCGCTTACCG GATACCTGTC CGCCTTTCTC
3601 CCTTCGGGAA GCGTGGCGCT TTCTCATAGC TCACGCTGTA GGTATCTCAG TTCGGTGTAG
3661 GTCGTTCGCT CCAAGCTGGG CTGTGTGCAC GAACCCCCCG TTCAGCCCGA CCGCTGCGCC
3721 TTATCCGGTA ACTATCGTCT TGAGTCCAAC CCGGTAAGAC ACGACTTATC GCCACTGGCA
3781 GCAGCCACTG GTAACAGGAT TAGCAGAGCG AGGTATGTAG GCGGTGCTAC AGAGTTCTTG
3841 AAGTGGTGGC CTAACTACGG CTACACTAGA AGAACAGTAT TTGGTATCTG CGCTCTGCTG
3901 AAGCCAGTTA CCTTCGGAAA AAGAGTTGGT AGCTCTTGAT CCGGCAAACA AACCACCGCT
3961 GGTAGCGGTG GTTTTTTTGT TTGCAAGCAG CAGATTACGC GCAGAAAAAA AGGATCTCAA
4021 GAAGATCCTT TGATCTTTTC TACGGGGTCT GACGCTCAGT GGAACGAAAA CTCACGTTAA
4081 GGGATTTTGG TCATGGCTAG TTAATTAACA TTTAAATCAG CGGCCGCAAT AAAATATCTT
4141 TATTTTCATT ACATCTGTGT GTTGGTTTTT TGTGTGAATC GTAACTAACA TACGCTCTCC
4201 ATCAAAACAA AACGAAACAA AACAAACTAG CAAAATAGGC TGTCCCCAGT GCAAGTGCAG
4261 GTGCCAGAAC ATTTCTCTAT CGAA

[0401] 氨基酸序列(SEQ ID NO:90)

MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPLERKSSVECPPCPAPPVAGPSVFLFPP

KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF

NSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQV

[0402] YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDS

DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGARTSTE

ELRVRLASHLRKLRKRLLRDADDLQK

[0403] 184V pfcn hg2 129-157R136S核酸序列(SEQ ID NO:91)

1 GGATCTGCGA TCGCTCCGGT GCCCGTCAGT GGGCAGAGCG CACATCGCCC ACAGTCCCCG
61 AGAAGTTGGG GGGAGGGGTC GGCAATTGAA CGGGTGCCTA GAGAAGGTGG CGCGGGGTAA
121 ACTGGGAAAG TGATGTCGTG TACTGGCTCC GCCTTTTTCC CGAGGGTGGG GGAGAACCGT
[0404] 181 ATATAAGTGC AGTAGTCGCC GTGAACGTTC TTTTTCGCAA CGGGTTTGCC GCCAGAACAC
241 AGCTGAAGCT TCGAGGGGCT CGCATCTCTC CTTCACGCGC CCGCCGCCCT ACCTGAGGCC
301 GCCATCCACG CCGGTTGAGT CGCGTTCTGC CGCCTCCCGC CTGTGGTGCC TCCTGAACTG
361 CGTCCGCCGT CTAGGTAAGT TTAAAGCTCA GGTCGAGACC GGGCCTTTGT CCGGCGCTCC

```
 421 CTTGGAGCCT ACCTAGACTC AGCCGGCTCT CCACGCTTTG CCTGACCCtg cttgctcaac
 481 tctacgTCTT TGTTTCGTTT TCTGTTCTGC GCCGTTACAG ATCCAAGCTG TGACCGGCGC
 541 CTACCTGAGA TCACCGGCGA AGGAGGGCCA CCATGTACAG GATGCAACTC CTGTCTTGCA
 601 TTGCACTAAG TCTTGCACTT GTCACGAATT CGGCACCTCT CGAGCGCAAA TCTAGTGTCG
 661 AGTGCCCACC GTGCCCAGCA CCACCTGTGG CAGGACCGTC AGTCTTCCTC TTCCCCCCAA
 721 AACCCAAGGA CACCCTCATG ATCTCCCGGA CCCCTGAGGT CACGTGCGTG GTGGTGGACG
 781 TGAGCCACGA AGACCCCGAG GTCCAGTTCA ACTGGTACGT GGACGGCGTG GAGGTGCATA
 841 ATGCCAAGAC AAAGCCACGG GAGGAGCAGT TCAACAGCAC GTTCCGTGTG GTCAGCGTCC
 901 TCACCGTTGT GCACCAGGAC TGGCTGAACG GCAAGGAGTA CAAGTGCAAG GTCTCCAACA
 961 AAGGCCTCCC AGCCCCCATC GAGAAAACCA TCTCCAAAAC CAAAGGGCAG CCCCGAGAAC
1021 CACAGGTGTA CACCCTGCCC CCATCCCGGG AGGAGATGAC CAAGAACCAG GTCAGCCTGA
1081 CCTGCCTGGT CAAAGGCTTC TACCCCAGCG ACATCGCCGT GGAGTGGGAG AGCAATGGGC
1141 AGCCGGAGAA CAACTACAAG ACCACGCCTC CCATGCTGGA CTCCGACGGC TCCTTCTTCC
1201 TCTACAGCAA GCTCACCGTG GACAAGAGCA GGTGGCAGCA GGGGAACGTC TTCTCATGCT
1261 CCGTGATGCA TGAGGCTCTG CACAACCACT ACACGCAGAA GAGCCTCTCC CTGTCTCCGG
1321 GTGCACGTAC GAGCACCGAG GAGCTGCGGG TGaGCCTCGC CTCCCACCTG CGCAAGCTGC
1381 GTAAGCGGCT CCTCCGCGAT GCCGATGACC TGCAGAAGtg aTATCTCGAG CTAGCTGGCC
1441 AGACATGATA AGATACATTG ATGAGTTTGG ACAAACCACA ACTAGAATGC AGTGAAAAAA
1501 ATGCTTTATT TGTGAAATTT GTGATGCTAT TGCTTTATTT GTAACCATTA TAAGCTGCAA
1561 TAAACAAGTT AACAACAACA ATTGCATTCA TTTTATGTTT CAGGTTCAGG GGGAGGTGTG
1621 GGAGGTTTTT TAAAGCAAGT AAAACCTCTA CAAATGTGGT ATGGAATTAA TTCTAAAATA
1681 CAGCATAGCA AAACTTTAAC CTCCAAATCA AGCCTCTACT TGAATCCTTT TCTGAGGGAT
1741 GAATAAGGCA TAGGCATCAG GGGCTGTTGC CAATGTGCAT TAGCTGTTTG CAGCCTCACC
1801 TTCTTTCATG GAGTTTAAGA TATAGTGTAT TTTCCCAAGG TTTGAACTAG CTCTTCATTT
1861 CTTTATGTTT TAAATGCACT GACCTCCCAC ATTCCCTTTT TAGTAAAATA TTCAGAAATA
1921 ATTTAAATAC ATCATTGCAA TGAAAATAAA TGTTTTTTAT TAGGCAGAAT CCAGATGCTC
1981 AAGGCCCTTC ATAATATCCC CCAGTTTAGT AGTTGGACTT AGGGAACAAA GGAACCTTTA
2041 ATAGAAATTG GACAGCAAGA AAGCGAGCTT CTAGCTTATC CTCAGTCCTG CTCCTCTGCC
2101 ACAAAGTGCA CGCAGTTGCC GGCCGGGTCG CGCAGGGCGA ACTCCCGCCC CCACGGCTGC
2161 TCGCCGATCT CGGTCATGGC CGGCCCGGAG GCGTCCCGGA AGTTCGTGGA CACGACCTCC
2221 GACCACTCGG CGTACAGCTC GTCCAGGCCG CGCACCCACA CCCAGGCCAG GGTGTTGTCC
2281 GGCACCACCT GGTCCTGGAC CGCGCTGATG AACAGGGTCA CGTCGTCCCG GACCACACCG
2341 GCGAAGTCGT CCTCCACGAA GTCCCGGGAG AACCCGAGCC GGTCGGTCCA GAACTCGACC
2401 GCTCCGGCGA CGTCGCGCGC GGTGAGCACC GGAACGGCAC TGGTCAACTT GGCCATGATG
2461 GCTCCTCctg tcaggagagg aaagagaaga aggttagtac aattgCTATA GTGAGTTGTA
2521 TTATACTATG CAGATATACT ATGCCAATGA TTAATTGTCA AACTAGGGCT GCAgggttca
2581 tagtgccact tttcctgcac tgccccatct cctgcccacc ctttcccagg catagacagt
2641 cagtgactta cCAAACTCAC AGGAGGGAGA AGGCAGAAGC TTGAGACAGA CCCGCGGGAC
2701 CGCCGAACTG CGAGGGGACG TGGCTAGGGC GGCTTCTTTT ATGGTGCGCC GGCCCTCGGA
2761 GGCAGGGCGC TCGGGGAGGC CTAGCGGCCA ATCTGCGGTG GCAGGAGGCG GGGCCGAAGG
2821 CCGTGCCTGA CCAATCCGGA GCACATAGGA GTCTCAGCCC CCCGCCCCAA AGCAAGGGGA
2881 AGTCACGCGC CTGTAGCGCC AGCGTGTTGT GAAATGGGGG CTTGGGGGGG TTGGGGCCCT
2941 GACTAGTCAA AACAAACTCC CATTGACGTC AATGGGGTGG AGACTTGGAA ATCCCCGTGA
3001 GTCAAACCGC TATCCACGCC CATTGATGTA CTGCCAAAAC CGCATCATCA TGGTAATAGC
3061 GATGACTAAT ACGTAGATGT ACTGCCAAGT AGGAAAGTCC CATAAGGTCA TGTACTGGGC
3121 ATAATGCCAG GCGGGCCATT TACCGTCATT GACGTCAATA GGGGGCGTAC TTGGCATATG
3181 ATACACTTGA TGTACTGCCA AGTGGGCAGT TTACCGTAAA TACTCCACCC ATTGACGTCA
3241 ATGGAAAGTC CCTATTGGCG TTACTATGGG AACATACGTC ATTATTGACG TCAATGGGCG
3301 GGGGTCGTTG GGCGGTCAGC CAGGCGGGCC ATTTACCGTA AGTTATGTAA CGCCTGCAGG
3361 TTAATTAAGA ACATGTGAGC AAAAGGCCAG CAAAAGGCCA GGAACCGTAA AAAGGCCGCG
3421 TTGCTGGCGT TTTTCCATAG GCTCCGCCCC CCTGACGAGC ATCACAAAAA TCGACGCTCA
3481 AGTCAGAGGT GGCGAAACCC GACAGGACTA TAAAGATACC AGGCGTTTCC CCCTGGAAGC
3541 TCCCTCGTGC GCTCTCCTGT TCCGACCCTG CCGCTTACCG GATACCTGTC CGCCTTTCTC
3601 CCTTCGGGAA GCGTGGCGCT TTCTCATAGC TCACGCTGTA GGTATCTCAG TTCGGTGTAG
3661 GTCGTTCGCT CCAAGCTGGG CTGTGTGCAC GAACCCCCCG TTCAGCCCGA CCGCTGCGCC
3721 TTATCCGGTA ACTATCGTCT TGAGTCCAAC CCGGTAAGAC ACGACTTATC GCCACTGGCA
3781 GCAGCCACTG GTAACAGGAT TAGCAGAGCG AGGTATGTAG GCGGTGCTAC AGAGTTCTTG
3841 AAGTGGTGGC CTAACTACGG CTACACTAGA AGAACAGTAT TTGGTATCTG CGCTCTGCTG
3901 AAGCCAGTTA CCTTCGGAAA AAGAGTTGGT AGCTCTTGAT CCGGCAAACA AACCACCGCT
3961 GGTAGCGGTG GTTTTTTTGT TTGCAAGCAG CAGATTACGC GCAGAAAAAA AGGATCTCAA
4021 GAAGATCCTT TGATCTTTTC TACGGGGTCT GACGCTCAGT GGAACGAAAA CTCACGTTAA
```

[0405]

[0406]

```
4081 GGGATTTTGG TCATGGCTAG TTAATTAACA TTTAAATCAG CGGCCGCAAT AAAATATCTT
4141 TATTTTCATT ACATCTGTGT GTTGGTTTTT TGTGTGAATC GTAACTAACA TACGCTCTCC
4201 ATCAAAACAA AACGAAACAA AACAAACTAG CAAAATAGGC TGTCCCCAGT GCAAGTGCAG
4261 GTGCCAGAAC ATTTCTCTAT CGAA
```

[0407] 氨基酸序列(SEQ ID NO:92)

[0408]

MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPLERKSSVECPPCPAPPVAGPSVFLFPP

KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF

NSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQV

YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDS

DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGARTSTE

ELRVSLASHLRKLRKRLLRDADDLQK

[0409] 197H pfuse hfc2 ApoE 129-157核酸序列(SEQ ID NO:93)

[0410]

```
   1 GGATCTGCGA TCGCTCCGGT GCCCGTCAGT GGGCAGAGCG CACATCGCCC ACAGTCCCCG
  61 AGAAGTTGGG GGGAGGGGTC GGCAATTGAA CGGGTGCCTA GAGAAGGTGG CGCGGGGTAA
 121 ACTGGGAAAG TGATGTCGTG TACTGGCTCC GCCTTTTTCC CGAGGGTGGG GGAGAACCGT
 181 ATATAAGTGC AGTAGTCGCC GTGAACGTTC TTTTTCGCAA CGGGTTTGCC GCCAGAACAC
 241 AGCTGAAGCT TCGAGGGGCT CGCATCTCTC CTTCACGCGC CCGCCGCCCT ACCTGAGGCC
 301 GCCATCCACG CCGGTTGAGT CGCGTTCTGC CGCCTCCCGC CTGTGGTGCC TCCTGAACTG
 361 CGTCCGCCGT CTAGGTAAGT TTAAAGCTCA GGTCGAGACC GGGCCTTTGT CCGGCGCTCC
 421 CTTGGAGCCT ACCTAGACTC AGCCGGCTCT CCACGCTTTG CCTGACCCtg cttgctcaac
 481 tctacgTCTT TGTTTCGTTT TCTGTTCTGC GCCGTTACAG ATCCAAGCTG TGACCGGCGC
 541 CTACCTGAGA TCAccggcGA AGGAGGGCCA CCATGTACAG GATGCAACTC CTGTCTTGCA
 601 TTGCACTAAG TCTTGCACTT GTCACGAATT CGATAAGCAC CGAGGAGCTG CGGGTGCGCC
 661 TCGCCTCCCA CCTGCGCAAG CTGCGTAAGC GGCTCCTCCG CGATGCCGAT GACCTGCAGA
 721 AGatatcgGC CATGGTTAGA TCTGTGGAGT GCCCACCTTG CCCAGCACCA CCTGTGGCAG
 781 GACCTTCAGT CTTCCTCTTC CCCCCAAAAC CCAAGGACAC CCTGATGATC TCCAGAACCC
 841 CTGAGGTCAC GTGCGTGGTG GTGGACGTGA GCCACGAAGA CCCCGAGGTC CAGTTCAACT
 901 GGTACGTGGA CGGCATGGAG GTGCATAATG CCAAGACAAA GCCACGGGAG GAGCAGTTCA
 961 ACAGCACGTT CCGTGTGGTC AGCGTCCTCA CCGTCGTGCA CCAGGACTGG CTGAACGGCA
1021 AGGAGTACAA GTGCAAGGTC TCCAACAAAG GCCTCCCAGC CCCCATCGAG AAAACCATCT
1081 CCAAAACCAA AGGGCAGCCC CGAGAACCAC AGGTGTACAC CCTGCCCCCA TCCCGGGAGG
1141 AGATGACCAA GAACCAGGTC AGCCTGACCT GCCTGGTCAA AGGCTTCTAC CCCAGCGACA
1201 TCGCCGTGGA GTGGGAGAGC AATGGGCAGC CGGAGAACAA CTACAAGACC ACACCTCCCA
1261 TGCTGGACTC CGACGGCTCC TTCTTCCTCT ACAGCAAGCT CACCGTGGAC AAGAGCAGGT
1321 GGCAGCAGGG GAACGTCTTC TCATGCTCCG TGATGCATGA GGCTCTGCAC AACCACTACA
1381 CACAGAAGAG CCTCTCCCTG TCTCCGGGTA AATGAgtgcc acgGCTAGCT GGCCAGACAT
1441 GATAAGATAC ATTGATGAGT TTGGACAAAC CACAACTAGA ATGCAGTGAA AAAAATGCTT
1501 TATTTGTGAA ATTTGTGATG CTATTGCTTT ATTTGTAACC ATTATAAGCT GCAATAAACA
1561 AGTTAACAAC AACAATTGCA TTCATTTTAT GTTTCAGGTT CAGGGGGAGG TGTGGGAGGT
1621 TTTTTAAAGC AAGTAAAACC TCTACAAATG TGGTATGGAA TTAATTCTAA AATACAGCAT
1681 AGCAAAACTT TAACCTCCAA ATCAAGCCTC TACTTGAATC CTTTTCTGAG GGATGAATAA
1741 GGCATAGGCA TCAGGGGCTG TTGCCAATGT GCATTAGCTG TTTGCAGCCT CACCTTCTTT
1801 CATGGAGTTT AAGATATAGT GTATTTTCCC AAGGTTTGAA CTAGCTCTTC ATTTCTTTAT
1861 GTTTTAAATG CACTGACCTC CCACATTCCC TTTTTAGTAA AATATTCAGA AATAATTTAA
1921 ATACATCATT GCAATGAAAA TAAATGTTTT TTATTAGGCA GAATCCAGAT GCTCAAGGCC
1981 CTTCATAATA TCCCCCAGTT TAGTAGTTGG ACTTAGGGAA CAAAGGAACC TTTAATAGAA
2041 ATTGGACAGC AAGAAAGCGA GCTTCTAGCT TATCCTCAGT CCTGCTCCTC TGCCACAAAG
2101 TGCACGCAGT TGCCGGCCGG GTCGCGCAGG GCGAACTCCC GCCCCCACGG CTGCTCGCCG
2161 ATCTCGGTCA TGGCCGGCCC GGAGGCGTCC CGGAAGTTCG TGGACACGAC CTCCGACCAC
```

```
2221 TCGGCGTACA GCTCGTCCAG GCCGCGCACC CACACCCAGG CCAGGGTGTT GTCCGGCACC
2281 ACCTGGTCCT GGACCGCGCT GATGAACAGG GTCACGTCGT CCCGGACCAC ACCGGCGAAG
2341 TCGTCCTCCA CGAAGTCCCG GGAGAACCCG AGCCGGTCGG TCCAGAACTC GACCGCTCCG
2401 GCGACGTCGC GCGCGGTGAG CACCGGAACG GCACTGGTCA ACTTGGCCAT GATGGCTCCT
2461 Cctgtcagga gaggaaagag aagaaggtta gtacaattgC TATAGTGAGT TGTATTATAC
2521 TATGCAGATA TACTATGCCA ATGATTAATT GTCAAACTAG GGCTGCAggg ttcatagtgc
2581 cacttttcct gcactgcccc atctcctgcc cacccttcc caggcataga cagtcagtga
2641 cttacCAAAC TCACAGGAGG GAGAAGGCAG AAGCTTGAGA CAGACCCGCG GGACCGCCGA
2701 ACTGCGAGGG GACGTGGCTA GGGCGGCTTC TTTTATGGTG CGCCGGCCCT CGGAGGCAGG
2761 GCGCTCGGGG AGGCCTAGCG GCCAATCTGC GGTGGCAGGA GGCGGGGCCG AAGGCCGTGC
2821 CTGACCAATC CGGAGCACAT AGGAGTCTCA GCCCCCCGCC CCAAAGCAAG GGGAAGTCAC
2881 GCGCCTGTAG CGCCAGCGTG TTGTGAAATG GGGGCTTGGG GGGGTTGGGG CCCTGACTAG
2941 TCAAAACAAA CTCCCATTGA CGTCAATGGG GTGGAGACTT GGAAATCCCC GTGAGTCAAA
3001 CCGCTATCCA CGCCCATTGA TGTACTGCCA AAACCGCATC ATCATGGTAA TAGCGATGAC
3061 TAATACGTAG ATGTACTGCC AAGTAGGAAA GTCCCATAAG GTCATGTACT GGGCATAATG
3121 CCAGGCGGGC CATTTACCGT CATTGACGTC AATAGGGGGC GTACTTGGCA TATGATACAC
3181 TTGATGTACT GCCAAGTGGG CAGTTTACCG TAAATACTCC ACCCATTGAC GTCAATGGAA
3241 AGTCCCTATT GGCGTTACTA TGGGAACATA CGTCATTATT GACGTCAATG GGCGGGGGTC
3301 GTTGGGCGGT CAGCCAGGCG GGCCATTTAC CGTAAGTTAT GTAACGCCTG CAGGTTAATT
3361 AAGAACATGT GAGCAAAAGG CCAGCAAAAG GCCAGGAACC GTAAAAAGGC CGCGTTGCTG
3421 GCGTTTTTCC ATAGGCTCCG CCCCCCTGAC GAGCATCACA AAAATCGACG CTCAAGTCAG
3481 AGGTGGCGAA ACCCGACAGG ACTATAAAGA TACCAGGCGT TTCCCCCTGG AAGCTCCCTC
3541 GTGCGCTCTC CTGTTCCGAC CCTGCCGCTT ACCGGATACC TGTCCGCCTT TCTCCCTTCG
3601 GGAAGCGTGG CGCTTTCTCA TAGCTCACGC TGTAGGTATC TCAGTTCGGT GTAGGTCGTT
3661 CGCTCCAAGC TGGGCTGTGT GCACGAACCC CCCGTTCAGC CCGACCGCTG CGCCTTATCC
3721 GGTAACTATC GTCTTGAGTC CAACCCGGTA AGACACGACT TATCGCCACT GGCAGCAGCC
3781 ACTGGTAACA GGATTAGCAG AGCGAGGTAT GTAGGCGGTG CTACAGAGTT CTTGAAGTGG
3841 TGGCCTAACT ACGGCTACAC TAGAAGAACA GTATTTGGTA TCTGCGCTCT GCTGAAGCCA
3901 GTTACCTTCG GAAAAAGAGT TGGTAGCTCT TGATCCGGCA AACAAACCAC CGCTGGTAGC
3961 GGTGGTTTTT TTGTTTGCAA GCAGCAGATT ACGCGCAGAA AAAAAGGATC TCAAGAAGAT
4021 CCTTTGATCT TTTCTACGGG GTCTGACGCT CAGTGGAACG AAAACTCACG TTAAGGGATT
4081 TTGGTCATGG CTAGTTAATT AACATTTAAA TCAGCGGCCG CAATAAAATA TCTTTATTTT
4141 CATTACATCT GTGTGTTGGT TTTTTGTGTG AATCGTAACT AACATACGCT CTCCATCAAA
4201 ACAAAACGAA ACAAAACAAA CTAGCAAAAT AGGCTGTCCC CAGTGCAAGT GCAGGTGCCA
4261 GAACATTTCT CTATCGAA
```

[0411]

[0412] 氨基酸序列(SEQ ID NO:94)

MYRMQLLSCIALSLALVTNSISTEELRVRLASHLRKLRKRLLRDADDL

QKISAMVRSVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE

DPEVQFNWYVDGMEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEY

[0413]

KCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF

YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS

CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0414] 197I pfuse hfc2 ApoE 129-157R136S核酸序列(SEQ ID NO:95)

```
  1 GGATCTGCGA TCGCTCCGGT GCCCGTCAGT GGGCAGAGCG CACATCGCCC ACAGTCCCCG
 61 AGAAGTTGGG GGGAGGGGTC GGCAATTGAA CGGGTGCCTA GAGAAGGTGG CGCGGGGTAA
121 ACTGGGAAAG TGATGTCGTG TACTGGCTCC GCCTTTTTCC CGAGGGTGGG GGAGAACCGT
181 ATATAAGTGC AGTAGTCGCC GTGAACGTTC TTTTTCGCAA CGGGTTTGCC GCCAGAACAC
241 AGCTGAAGCT TCGAGGGGCT CGCATCTCTC CTTCACGCGC CCGCCGCCCT ACCTGAGGCC
301 GCCATCCACG CCGGTTGAGT CGCGTTCTGC CGCCTCCCGC CTGTGGTGCC TCCTGAACTG
361 CGTCCGCCGT CTAGGTAAGT TTAAAGCTCA GGTCGAGACC GGGCCTTTGT CCGGCGCTCC
```

[0415]

```
 421 CTTGGAGCCT ACCTAGACTC AGCCGGCTCT CCACGCTTTG CCTGACCCtg cttgctcaac
 481 tctacgTCTT TGTTTCGTTT TCTGTTCTGC GCCGTTACAG ATCCAAGCTG TGACCGGCGC
 541 CTACCTGAGA TCAccggcGA AGGAGGGCCA CCATGTACAG GATGCAACTC CTGTCTTGCA
 601 TTGCACTAAG TCTTGCACTT GTCACGAATT CGATAAGCAC CGAGGAGCTG CGGGTGaGCC
 661 TCGCCTCCCA CCTGCGCAAG CTGCGTAAGC GGCTCCTCCG CGATGCCGAT GACCTGCAGA
 721 AGatatcgGC CATGGTTAGA TCTGTGGAGT GCCCACCTTG CCCAGCACCA CCTGTGGCAG
 781 GACCTTCAGT CTTCCTCTTC CCCCCAAAAC CCAAGGACAC CCTGATGATC TCCAGAACCC
 841 CTGAGGTCAC GTGCGTGGTG GTGGACGTGA GCCACGAAGA CCCCGAGGTC CAGTTCAACT
 901 GGTACGTGGA CGGCATGGAG GTGCATAATG CCAAGACAAA GCCACGGGAG GAGCAGTTCA
 961 ACAGCACGTT CCGTGTGGTC AGCGTCCTCA CCGTCGTGCA CCAGGACTGG CTGAACGGCA
1021 AGGAGTACAA GTGCAAGGTC TCCAACAAAG GCCTCCCAGC CCCCATCGAG AAAACCATCT
1081 CCAAAACCAA AGGGCAGCCC CGAGAACCAC AGGTGTACAC CCTGCCCCCA TCCCGGGAGG
1141 AGATGACCAA GAACCAGGTC AGCCTGACCT GCCTGGTCAA AGGCTTCTAC CCCAGCGACA
1201 TCGCCGTGGA GTGGGAGAGC AATGGGCAGC CGGAGAACAA CTACAAGACC ACACCTCCCA
1261 TGCTGGACTC CGACGGCTCC TTCTTCCTCT ACAGCAAGCT CACCGTGGAC AAGAGCAGGT
1321 GGCAGCAGGG GAACGTCTTC TCATGCTCCG TGATGCATGA GGCTCTGCAC AACCACTACA
1381 CACAGAAGAG CCTCTCCCTG TCTCCGGGTA AATGAgtgcc acgGCTAGCT GGCCAGACAT
1441 GATAAGATAC ATTGATGAGT TTGGACAAAC CACAACTAGA ATGCAGTGAA AAAAATGCTT
1501 TATTTGTGAA ATTTGTGATG CTATTGCTTT ATTTGTAACC ATTATAAGCT GCAATAAACA
1561 AGTTAACAAC AACAATTGCA TTCATTTTAT GTTTCAGGTT CAGGGGGAGG TGTGGGAGGT
1621 TTTTTAAAGC AAGTAAAACC TCTACAAATG TGGTATGGAA TTAATTCTAA AATACAGCAT
1681 AGCAAAACTT TAACCTCCAA ATCAAGCCTC TACTTGAATC CTTTTCTGAG GGATGAATAA
1741 GGCATAGGCA TCAGGGGCTG TTGCCAATGT GCATTAGCTG TTTGCAGCCT CACCTTCTTT
1801 CATGGAGTTT AAGATATAGT GTATTTTCCC AAGGTTTGAA CTAGCTCTTC ATTTCTTTAT
1861 GTTTTAAATG CACTGACCTC CCACATTCCC TTTTTAGTAA AATATTCAGA AATAATTTAA
1921 ATACATCATT GCAATGAAAA TAAATGTTTT TTATTAGGCA GAATCCAGAT GCTCAAGGCC
1981 CTTCATAATA TCCCCCAGTT TAGTAGTTGG ACTTAGGGAA CAAAGGAACC TTTAATAGAA
2041 ATTGGACAGC AAGAAAGCGA GCTTCTAGCT TATCCTCAGT CCTGCTCCTC TGCCACAAAG
2101 TGCACGCAGT TGCCGGCCGG GTCGCGCAGG GCGAACTCCC GCCCCCACGG CTGCTCGCCG
2161 ATCTCGGTCA TGGCCGGCCC GGAGGCGTCC CGGAAGTTCG TGGACACGAC CTCCGACCAC
2221 TCGGCGTACA GCTCGTCCAG GCCGCGCACC CACACCCAGG CCAGGGTGTT GTCCGGCACC
2281 ACCTGGTCCT GGACCGCGCT GATGAACAGG GTCACGTCGT CCCGGACCAC ACCGGCGAAG
2341 TCGTCCTCCA CGAAGTCCCG GGAGAACCCG AGCCGGTCGG TCCAGAACTC GACCGCTCCG
2401 GCGACGTCGC GCGCGGTGAG CACCGGAACG GCACTGGTCA ACTTGGCCAT GATGGCTCCT
2461 Cctgtcagga gaggaaagag aagaaggtta gtacaattgC TATAGTGAGT TGTATTATAC
2521 TATGCAGATA TACTATGCCA ATGATTAATT GTCAAACTAG GGCTGCAggg ttcatagtgc
2581 cacttttcct gcactgcccc atctcctgcc cacccтttcc caggcataga cagtcagtga
2641 cttacCAAAC TCACAGGAGG GAGAAGGCAG AAGCTTGAGA CAGACCCGCG GGACCGCCGA
2701 ACTGCGAGGG GACGTGGCTA GGGCGGCTTC TTTTATGGTG CGCCGGCCCT CGGAGGCAGG
2761 GCGCTCGGGG AGGCCTAGCG GCCAATCTGC GGTGGCAGGA GGCGGGGCCG AAGGCCGTGC
2821 CTGACCAATC CGGAGCACAT AGGAGTCTCA GCCCCCCGCC CCAAAGCAAG GGGAAGTCAC
2881 GCGCCTGTAG CGCCAGCGTG TTGTGAAATG GGGGCTTGGG GGGGTTGGGG CCCTGACTAG
2941 TCAAAACAAA CTCCCATTGA CGTCAATGGG GTGGAGACTT GGAAATCCCC GTGAGTCAAA
3001 CCGCTATCCA CGCCCATTGA TGTACTGCCA AAACCGCATC ATCATGGTAA TAGCGATGAC
3061 TAATACGTAG ATGTACTGCC AAGTAGGAAA GTCCCATAAG GTCATGTACT GGGCATAATG
3121 CCAGGCGGGC CATTTACCGT CATTGACGTC AATAGGGGGC GTACTTGGCA TATGATACAC
3181 TTGATGTACT GCCAAGTGGG CAGTTTACCG TAAATACTCC ACCCATTGAC GTCAATGGAA
3241 AGTCCCTATT GGCGTTACTA TGGGAACATA CGTCATTATT GACGTCAATG GGCGGGGGTC
3301 GTTGGGCGGT CAGCCAGGCG GGCCATTTAC CGTAAGTTAT GTAACGCCTG CAGGTTAATT
3361 AAGAACATGT GAGCAAAAGG CCAGCAAAAG GCCAGGAACC GTAAAAAGGC CGCGTTGCTG
3421 GCGTTTTTCC ATAGGCTCCG CCCCCCTGAC GAGCATCACA AAAATCGACG CTCAAGTCAG
3481 AGGTGGCGAA ACCCGACAGG ACTATAAAGA TACCAGGCGT TTCCCCCTGG AAGCTCCCTC
3541 GTGCGCTCTC CTGTTCCGAC CCTGCCGCTT ACCGGATACC TGTCCGCCTT TCTCCCTTCG
3601 GGAAGCGTGG CGCTTTCTCA TAGCTCACGC TGTAGGTATC TCAGTTCGGT GTAGGTCGTT
3661 CGCTCCAAGC TGGGCTGTGT GCACGAACCC CCCGTTCAGC CCGACCGCTG CGCCTTATCC
3721 GGTAACTATC GTCTTGAGTC CAACCCGGTA AGACACGACT TATCGCCACT GGCAGCAGCC
3781 ACTGGTAACA GGATTAGCAG AGCGAGGTAT GTAGGCGGTG CTACAGAGTT CTTGAAGTGG
3841 TGGCCTAACT ACGGCTACAC TAGAAGAACA GTATTTGGTA TCTGCGCTCT GCTGAAGCCA
3901 GTTACCTTCG GAAAAAGAGT TGGTAGCTCT TGATCCGGCA AACAAACCAC CGCTGGTAGC
3961 GGTGGTTTTT TTGTTTGCAA GCAGCAGATT ACGCGCAGAA AAAAAGGATC TCAAGAAGAT
4021 CCTTTGATCT TTTCTACGGG GTCTGACGCT CAGTGGAACG AAAACTCACG TTAAGGGATT

4081 TTGGTCATGG CTAGTTAATT AACATTTAAA TCAGCGGCCG CAATAAAATA TCTTTATTTT
4141 CATTACATCT GTGTGTTGGT TTTTTGTGTG AATCGTAACT AACATACGCT CTCCATCAAA
4201 ACAAAACGAA ACAAAACAAA CTAGCAAAAT AGGCTGTCCC CAGTGCAAGT GCAGGTGCCA
4261 GAACATTTCT CTATCGAA
```

[0416]

[0417] 氨基酸序列(SEQ ID NO:96)

[0418] MYRMQLLSCIALSLALVTNSISTEELRVSLASHLRKLRKRLLRDADDL QKISAMVRSVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVQFNWYVDGMEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEY KCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0419] 实施例5:APOE的CRISPR-Cas9介导的编辑和碱基编辑

[0420] 为了使用CRISPR-Cas9在APOE中引入R136S突变,设计了gRNA序列(表5)。在一个实施例中,使用2个寡核苷酸将gRNA序列克隆至lentiCRISPR v2中以形成含有20个碱基序列的接头,该接头克隆至U6启动子的下游的BsmB1位点。为了支持修复,设计具有2个额外的沉默突变的模板。该模板具有位于突变区域的两侧的50个碱基。示例性模板序列如下:

[0421] CGCCTGGTGCAGTACCGCGGCGAGGTGCAGGCCATGCTCGGCCAGAGCACa GAGGAGCTcCGcGTGaGtCTCGCaagCCACCTGCGCAAGCTGCGTAAGCGGCT CCTCCGCGATGCCGATGACCTGC (SEQ ID NO:65)

[0422] 其中消除PAM基序的沉默突变用双下划线标出,对应于R136S突变的密码子为粗体,产生用于接收模板的克隆中切割PCR产物的SacI位点的沉默突变用斜体标出。

[0423] 表5:用于引入R136S突变的gRNA设计

[0424]

质粒	gRNA	SEQ ID NO:	与DSB的距离	中靶得分	脱靶得分
184O1	CTTACGCAGCTTGCGCAGGT	69	16	61.2	90.5
184O2	GCTTGCGCAGGTGGGAGGCG	70	6	59.5	53.9
184O3	ACGCAGCTTGCGCAGGTGGG	71	13	59.4	62.9
184O4	CCAGAGCACCGAGGAGCTGC	72	9	49.3	42.7
任选的184O5	GCCAGAGCACCGAGGAGCTG	73	10	52.8	33.7
任选的184O6	GAGGCGCACCCGCAGCTCCT	74	11	51.1	60.5

[0425] 不希望受理论束缚,关于APOE3ch突变提出的机制是功能(例如与HSPG结合)的丧失。因此,使用CRISPR-Cas9将gRNA序列设计为“敲除”APOE(表6)。设计gRNA以靶向ApoE的外显子3(氨基酸1-61)。在一个实例中,通过使用2个寡核苷酸将gRNA序列克隆至lentiCRISPR v2中以形成含有20个碱基序列的接头,该接头被克隆至U6启动子的下游的BsmB1位点。修复是通过非同源末端连接(NHEJ)完成的,这是一个易错过程且通常会导致短的插入或缺失,从而导致APOE敲除。

[0426] 表6:用于APOE敲除的gRNA设计

[0427]

质粒	gRNA	SEQ ID NO:	氨基酸处的断裂	中靶得分	脱靶得分
184Q1	AGCTGCGCCAGCAGACCGAG	75	18	66.3	74.4
184Q2	CCAGGCCAAGGTGGAGCAAG	76	3	65.6	49.3
184Q3	CACAGGATGCCAGGCCAAGG	77	1	65.4	44.5
184Q4	ACAGTGTCTGCACCCAGCGC	78	38	60.6	71.4
184Q5	GGCCAAGGTGGAGCAAGCGG	79	5	59.3	71.3

[0428] 预计APOE中的R136H突变具有与R136S突变类似的效果。因此,为了使用碱基编辑技术在APOE中引入R136H突变,设计了以下gRNA(表7)。将gRNA序列GAGGCGCACCCGCAGCTCCT克隆至pLenti sgRNA(addgene 71409),使用2个寡核苷酸形成含有20个碱基序列的接头,该接头克隆至U6启动子的下游的BsmB1位点。Plasmid Addgene碱基编辑器质粒pCMV-BE3(#73021)用于产生碱基编辑。

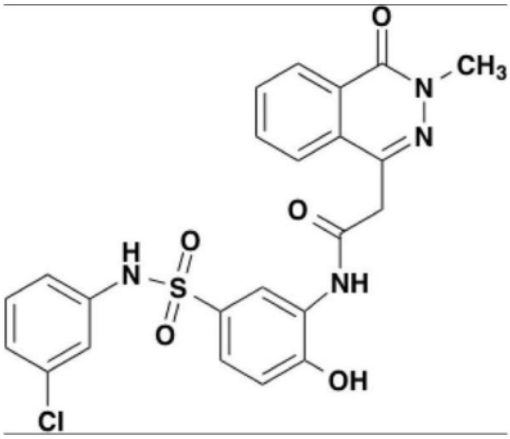
[0429] 表7:用于APOE碱基编辑的gRNA设计

[0430]

gRNA	SEQ ID NO:	R136H 变化	碱基编辑得分	脱靶得分
GAGGCGCACCCGCAGCTCCT	80	CGC→CAC	4.6	60.5

[0431] 实施例6:修饰ApoE和肝素结合的分子的高通量筛选

[0432] 为了筛选影响ApoE和肝素结合的分子,用候选多肽、小分子、核酸、脂质或碳水化合物预孵育ApoE蛋白。将预孵育的ApoE蛋白引入肝素包被的表面(如板或柱),使其结合肝素/HSPG/GAG,并洗掉未结合的ApoE和候选分子。可选地,在施加ApoE蛋白之前,可用候选分子预孵育肝素包被的表面(如板)。使用抗体、蛋白测定或荧光检测ApoE结合肝素的水平,并评价候选分子对ApoE/肝素结合的影响。降低ApoE/肝素结合的候选分子可以代表在有此类治疗需要的人受试者中用于预防或治疗与痴呆和/或轻度认知损害相关的认知下降的新疗法。此类分子的实例包括EZ-482(参见,例如Mondal等人Biochemistry 55(18):2613-21,2016。EZ-482的结构如下所示)。

[0433] 

[0434] 实施例7:修饰ApoE和抗ApoE抗体结合的分子的高通量筛选

[0435] 为了筛选影响ApoE和抗ApoE抗体结合的分子,用候选多肽、小分子、核酸、脂质或碳水化合物预孵育ApoE蛋白。将预孵育的ApoE蛋白引入用结合ApoE的HSPG结合位点的抗体(如本文所述的任何抗ApoE抗体)包被的表面(例如板或柱),使其结合抗体,并洗掉未结合的ApoE和候选分子。可选地,在施加ApoE蛋白之前,可用候选分子预孵育肝素包被的表面(如板)。使用抗体、蛋白测定或荧光检测抗ApoE结合抗ApoE抗体的水平,并评价候选分子对结合的影响。增加或减少ApoE/肝素结合的候选分子可以代表在有此类治疗需要的人受试者中用于预防或治疗与痴呆和/或轻度认知损害相关的认知下降的新疗法。

[0436] 实施例8:抗体表征

[0437] 使用肝素亲和色谱法、免疫印迹法、亚克隆分析、单克隆抗体筛选、huApoE3和msApoE之间的选择性的筛选以及体内视网膜下注射进一步评价结合野生型ApoE和ApoEch突变体的抗体。

[0438] 方法

[0439] 色谱实验

[0440] 在室温(R.T.)下、用在20mM Tris HCl缓冲液(pH7.5)中以1:10稀释的各抗体孵育His标记的重组ApoE肽(50μg/mL)3小时。使用肝素琼脂糖柱试验样品的肝素结合。简而言之,使柱达到室温并用20mM Tris-HCL洗涤5次。收集10μL用于WB实验后,将蛋白输入(input)加载至柱上。输入循环穿过柱5次。收集流出物,随后洗涤柱5次,将回收的级分标记为“洗涤物”。对于从0到1M的NaCl盐梯度的各0.05M阶梯(step),回收1mL级分。还测试5M级分以确保蛋白从柱中完全释放。WB或ELISA用于测试ApoE结合肝素的变化。

[0441] 免疫印迹

[0442] 用于WB分析的样品是通过在4X样品缓冲液(Laemmli’s SDS-Sample buffer,BP-110R,Boston bioproducts)、4μL DTT(Sigma Aldrich)和16μL 1XRIPA缓冲液中稀释10μL的各级分来制备的。使用垂直电泳室(Biorad)在变性条件下进行电泳。使用恒定电压(15’70V,1h 100V)在4-20%预制凝胶(Biorad)上分离条带。在70V恒定电压下在硝酸纤维素膜(Millipore)上转移蛋白1小时。在用一抗(Anti-His,rb,1:5000,Novus biological)和二抗(Donkey anti-rb-800,1:10000,Licor)孵育之前,使用Odyssey封闭缓冲液(Licor)在常温下封闭膜1小时并用TBS-0.05% Tween 20(Thermo fisher)洗涤膜3X 10’。使用Odyssey扫描仪完成图像采集。使用Image J分析数据。通过输入将数据标准化,并表示为相对于级

分数的标准化的强度(0＝输入,1-27＝20mM Tris HCl pH 7.5中增加的0.05M NaCl阶梯梯度,28＝20mM Tris HCl pH 7.5中5M NaCl)。

[0443] ELISA

[0444] 为了测试抗体对huApoE3WT、huApoE3ch或msApoE的选择性,在室温下在缓慢摇动下用0.0025μg/μL靶蛋白孵育抗his ELISA包被的板2小时。用1X洗涤缓冲液(R&D)洗涤孔5次,然后在4℃下在振荡器(100μL/孔)上用感兴趣的Innovagen抗体的连续稀释孵育过夜。第二天,用样品缓冲液洗涤孔5次,并使用兔抗小鼠HRP偶联缓冲液(1:10,000;100μL/孔;Abcam)孵育45分钟。再洗涤5次后,将板与色原A+B 1:1孵育以起始比色反应(100μL/孔)。用2N硫酸(R&D终止溶液,50μL/孔)终止反应,并光谱检测450nm处的吸光度。

[0445] 使用ELISA测试针对APOE的肝素结合结构域设计的抗体对APOE3和APOEch突变重组蛋白的亲和力。用洗涤缓冲液1(DY008)洗涤Ni-NTA HisSorb Plates(Qiagen)板3次,将APOE重组蛋白悬浮在缓冲液(DY008)中以产生0.5ug/ml的最终浓度。用200ul孵育板2小时。然后用1x洗涤缓冲液(DY008)洗涤板5次,然后在4℃下、用从1:1000至1:32000的连续稀释系列的抗体孵育板过夜。然后在1X洗涤缓冲液(DY008)中洗涤板5次。然后用抗小鼠HRP(Abcam;ab97046)(1:10000)孵育板45分钟。然后在1x洗涤缓冲液中洗涤板5次,以确保完全去除未结合的二抗。在添加起始反应的检测阶段的100μl的四甲基联苯胺(Millipore)之前,将来自ELISA试剂盒(DY008)的硫酸加热至37℃。孵育5分钟后,添加硫酸以终止反应。然后使用Synery 2酶标仪(BioTek Instrument.Inc)和Gen5版本1.11软件对板读数。

[0446] 结果

[0447] 使用肝素亲和色谱和免疫印迹评价抗体1H4。用阴性对照(溶媒(vehicle),顶部印迹)或1H4(底部印迹)孵育ApoE3,并对各级分进行肝素亲和色谱和免疫印迹(图18A)。ApoE3阳性条带由箭头指示,并使用特异性检测重组人APOE的his标签的抗体抗his标签(rb,1:5,000)检测。图18B显示由如图18A中所示的抗his标签抗体检测的WB印迹条带的定量。强度标准化至输入。这些结果表明,在存在抗体的情况下,ApoE3与肝素的结合降低,并且抗体1H4与ApoE竞争肝素结合。N＝2个独立实验。

[0448] 接下来,进行1H4血清的亚克隆分析。图19A-19D显示用ApoE3 WT全长蛋白(A)、ApoE3 WT肽(B)、ApoE3ch全长蛋白(C)和ApoE3ch肽(D)测试的1H4-2血清的ELISA结果。结果表示为450nm处的光密度对所测试血清的稀释系数。图20是比较图19A-19D所示结果的图。

[0449] 图21显示用人重组ApoE3或小鼠重组ApoE3孵育的抗体1H4的系列稀释的代表性ELISA谱。结果表明,抗体优选结合至人蛋白而不是小鼠,并且抗体1H4对人ApoE具有选择性。结果显示为在450nm±s.e.m.(n＝2)处检测的平均光密度。

[0450] 接下来,从克隆的杂交瘤中纯化单克隆1H4抗体,并进行ELISA评价。图22显示ELISA实验的结果。

[0451] 使用肝素亲和色谱法、免疫印迹法、色谱级分的定量ELISA和结合分析的竞争性ELISA评价抗体7C11。

[0452] 用阴性对照(溶媒,顶部印迹)或抗体7C11(底部印迹)孵育ApoE3的肝素亲和色谱级分并进行免疫印迹(图23A)。ApoE3阳性条带由箭头指示,并使用特异性检测重组肽的his标签的抗体抗his标签(rb,1:5,000)检测。图23B显示由如图23A中所示的抗his标签抗体检测的WB印迹条带的定量。强度标准化至输入。这些结果表明,在存在抗体的情况下,ApoE3与

肝素的结合降低,并且7C11与ApoE竞争肝素结合。

[0453] 接下来,进行7C11-1血清的亚克隆分析。图24A-24D显示用ApoE3 WT全长蛋白(A)、ApoE3 WT肽(B)、ApoE3ch全长蛋白(C)或ApoE3ch肽(D)测试7C11-1血清的ELISA结果。结果显示为450nm处的光密度对所测试血清的稀释系数。图25是比较图19A-19D所示结果的图。接着,从克隆的杂交瘤中纯化单克隆7C11-1抗体,并进行ELISA评价。图26显示ELISA实验的结果。

[0454] 使用肝素亲和色谱法、免疫印迹法、色谱级分的定量ELISA和结合分析的ELISA进一步评价19G10-2抗体。针对APOE3野生型(WT)和APOE3ch突变重组蛋白的肝素结合结构域进行19G10-2抗体的ELISA筛选。如图27所示,19G10-2抗体表现对APOE3ch(氨基酸125至299)突变重组蛋白的全长和C末端结构域二者的特异性、和与APOE3 WT的一些相互作用。

[0455] 对用阴性对照(溶媒,顶部印迹)或抗体19G10-2(底部印迹)孵育的ApoE3的肝素亲和色谱级分进行ELISA分析(图28A)。ApoE3阳性条带由箭头指示,并使用特异性检测重组肽的his标签的抗体抗his标签(rb,1:5,000)检测。图28B显示由如图28A中所示的抗his标签抗体检测的WB印迹带的定量。强度标准化至输入。这些结果表明,尽管是针对ApoE3ch-HSPG结构域设计的,但19G10-2与野生型ApoE竞争肝素结合并导致ApoE3与肝素的结合降低。不希望受理论束缚,抗体19G10-2可以识别和/或稳定不太可能结合肝素/HSPG/GAG的APOE(例如APOE聚合物或聚集体)的构象特异性特征。

[0456] 图29显示用19G10-2血清抗体孵育的ApoE3 WT的免疫印迹。顶部印迹:用二抗小鼠探针标记膜以检测19G10-2抗体。如前所述,用抗his标签孵育底膜以检测ApoE3阳性部分。该分析表明抗体-APOE复合物(左侧印迹;顶部和底部)不结合肝素,而游离APOE以高亲和力结合肝素(右侧印迹;底部)。

[0457] 图30是显示血清和单克隆抗体杂交瘤上清液19G10-2二者对ApoE3WT或ApoE3ch的结合差异的代表性ELISA。数据证实了该抗体对ApoE3ch变体的优势选择性。图31是Y轴的放大图,显示在存在ApoE3WT的情况下,抗体19G10-2的一些有限结合部分(血清,灰色部分;单克隆,黑色结合部分)。接下来,从克隆的杂交瘤中纯化单克隆19G10-2抗体,并进行ELISA评价。图32显示来自ELISA实验的结果。全长WT APOE的识别的信号高于WT ApoE肽的识别的信号表明结合了构象特异性特征。

[0458] 使用肝素亲和色谱法、免疫印迹法、色谱级分的定量ELISA和结合分析的ELISA进一步评价25F1-2抗体。图33显示针对APOE3野生型(WT)和APOE3ch突变重组蛋白的肝素结合结构域的25F1-2抗体的ELISA筛选。如图33所示,25F1-2抗体显示对APOE3突变体全长和C末端蛋白的高亲和力,然而,它似乎不具有与APOE3WT蛋白的C末端的强结合,并且显示与APOE3WT全长蛋白的有限的相互作用。结果显示为450nm处的光密度对所测试血清的稀释系数。

[0459] 对用阴性对照(溶媒,顶部印迹)或抗体25F1-2(底部印迹)孵育的ApoE3的肝素亲和色谱级分进行免疫印迹(图34A)。ApoE3阳性条带由箭头指示,并使用特异性检测重组肽的his标签的抗体抗His标签(rb,1:5,000)检测。图34B显示由如图34A中所示的抗his标签抗体检测的WB印迹条带的定量。强度标准化至输入。这些结果表明,尽管是针对ApoE3ch-HSPG结构域设计的,25F1-2与野生型ApoE竞争肝素结合并导致ApoE3与肝素的结合降低。

[0460] 图35显示用25F1-2单克隆抗体孵育的ApoE3 WT的免疫印迹。顶部印迹:用二抗小

鼠探针标记膜以检测25F1-2。如前所述,用抗his标签孵育底膜以检测ApoE3阳性部分。该分析表明抗体-APOE复合物(左侧印迹;顶部和底部)不结合肝素,而游离ApoE以高亲和力结合肝素(右侧印迹,底部)。

[0461] 图36是显示25F1-2血清和单克隆抗体杂交瘤上清液25F1-2二者对ApoE3WT或ApoE3ch的结合差异的代表性ELISA。这些结果证实了该抗体对ApoE3ch变体的优势选择性。图37是图36的Y轴的放大图,显示在存在ApoE3WT的情况下的抗体25F1-2的结合性质(binding profile)。接下来,从克隆的杂交瘤中纯化单克隆25F1-2抗体,并进行ELISA评价。图38显示来自ELISA实验的结果。全长WT APOE的一些识别的信号高于WT ApoE肽的识别的信号,表明构象特异性特征的结合。

[0462] 使用肝素亲和色谱法和免疫印迹法、以及色谱级分的定量ELISA评价小鼠抗体1343ab(由23B2重命名)。图39和40显示针对APOE3野生型(WT)和APOE3ch突变重组蛋白的肝素结合结构域的1343抗体的ELISA筛选。1343表现对APOE3 WT和APOE3ch突变体C末端二者和全长重组APOE蛋白的反应性(突变体是指Christchurch突变体)。

[0463] 对在存在或不存在1343的情况下使用增加的NaCl梯度从肝素柱洗脱的蛋白级分中的ApoE进行免疫印迹(图41A)。单个印迹被裁剪为25到50kDa之间。空白间隔分隔单个印迹。FT=流过。进行ELISA以定量存在和不存在1343的情况下的不同ApoE的NaCl洗脱模式的差异(图41B)。独立实验中N=3柱每异构体在不同的日子并排分析两次以定量差异。误差线描述平均值的标准误差。

[0464] 经验证,来自小鼠抗体1H4-2、7C11-1、19G10-2、25F1-2和1343ab的CDR序列被移植到人IgG骨架(IgG2或IgG4)中以产生人源化对应物(counterpart)。

[0465] 实施例9:ApoE抗体的体内验证

[0466] 产生了诱导型APOE依赖性Tau过度磷酸化(配对螺旋样纤维形成)的眼内模型。该模型用于测试ApoE抗体抑制Tau病理学(其是神经退行性病变的标志物)的能力。图42A显示示例性实验概要。

[0467] 简而言之,将his标签的重组人APOE3体内注射至B6;C3-Tg(Prnp-MAPT*P301S)PS19Vle/J小鼠(杰克逊实验室008169)(Yoshiyama等人53(3):337-51,2007)。该小鼠模型含有人tau P301S突变并且是经过验证的阿尔茨海默病和其它tau病如额颞痴呆的动物模型(参见例如Bugiani等人58(6):667-77,1999)。使用PBS注射的小鼠作为对照。

[0468] 如图42B所示,在6周龄小鼠的对照视网膜中,神经节细胞及其轴突纤维中不存在磷酸化tau(PHF)的配对螺旋样纤维(用同工凝集素B4标记的血管内的信号是背景信号)。相反地,重组人APOE3(his标签)的施用引发了用AT8抗体检测到的PHF的强烈形成。PHF在神经节细胞轴突(箭头)和神经节细胞体中为强力的。使用抗His抗体在神经节细胞体周围检测到人APOE。

[0469] 将小鼠1H4-2抗体和人源化1343Ah抗体玻璃体内注射至来自上述小鼠模型的小鼠眼中(最终体积2μL)。在注射后第3天处死动物,解剖视网膜并进行免疫标记。视网膜由DAPI、同工凝集素和AT8(pTAU)染色,其可识别磷酸化的配对螺旋样纤维tau(PHF tau)。使用SP8共聚焦显微镜对视网膜进行成像。如图43B、43C、43F和43G所示,APOE3 WT导致PHF Tau显著增加,这通过1H4-2显著降低(***$p<0.001$)。类似地,人源化1H4-2 IgG2/κ重组单克隆抗体的施用在体内有效降低了APOE依赖性PHF tau病理学的诱导(图43H;**$p<0.01$,***p

<0.001)。如图43D和43H所示,人源化1343Ah显著降低了PHF Tau水平(**p<0.01,***p<0.001)。

[0470] 小鼠单克隆抗体和相应的人源化抗体之间功效的相似性证实了结合结构域对ApoE或ApoEch的亲和力,并且在人源化过程中保留了结合特性。这表明CDR的结合特性可以从原始小鼠IgG1转移至包括人IgG2的其它蛋白。

[0471] ApoE3和单克隆抗体1H4(mAb 1H4)之间的结合亲和力使用BLItz系统的高级动力学模块(Blitz Pro,FB-609928,1.3.1.3版)测定。简而言之,用mAb1H4加载蛋白A生物传感器,并在从0至571.4nM的增加的全长ApoE3蛋白(Innovagen)的浓度下测定缔合常数和解离常数。使用了以下运行设置:实验介质中30s的初始基线,生物传感器上配体(mAb 1H4)的120s加载,结合(120s)和解离(120s)步骤之前的30s新基线。在2200rpm和室温下进行总共6次420s的运行以确定ApoE3的结合参数。使用BLItz软件(1.1.0.7版本)对解离实验进行全局拟合和步进校正(step correction)。图44显示增加的浓度(nM)的ApoE3蛋白与1H4在蛋白A生物传感器上的代表性结合测量。使用BLItz系统测量(表8)并计算KD、Ka和Kd。上图代表缔合步骤,下图代表结合动力学的解离步骤。X轴和Y轴分别表示以秒为单位的时间和以nM为单位的结合。

[0472] 表8

运行索引	浓度 ApoE3 (nM)	KD (nM)	ka (1/Ms)	Ka 误差	kd (1/s)	Kd 误差
1	0					
2	35.71	14.28	2900000	0.04142	0.001119	0.1543
3	71.43	14.28	2900000	0.04142	0.001119	0.1425
4	142.9	14.28	2900000	0.04142	0.001119	0.3063
7	285.7	14.28	2900000	0.04142	0.001119	0.09633
8	571.4	14.28	2900000	0.04142	0.001119	0.146

[0473]

运行索引	浓度 ApoE3 (nM)	Rmax	Rmax 误差	R 平衡
1	0			
2	35.71	0.1543	0.005199	0.1102
3	71.43	0.1425	0.003305	0.1187
4	142.9	0.3063	0.003587	0.2785
7	285.7	0.09633	0.001949	0.09174
8	571.4	0.146	0.001883	0.1425

[0474] 实施例10:APOE片段融合蛋白的体内验证

[0475] 接下来,使用类似的体内模型测试了含有APOE片段的融合蛋白,该片段包含HSPG结合结构域和人IgG的Fc区。简而言之,0.78μg的重组全长APOE用于诱导tau病理。将0.14μg融合蛋白玻璃体内注射至小鼠。如图43E和43I所示,融合蛋白减少了神经元中APOE依赖性tau病理。

[0476] 实施例11:嵌合抗体的序列

[0477] CDR从小鼠转移到人IgG2或IgG4的嵌合抗体序列如下所示:正常字体=载体

[0478] 斜体=信号肽

[0479] 下划线=VL/VH

[0480] 双下划线=恒定部分(人κ/IgG4/IgG2)mAb 1H4 IgG2/κ的表达载体的序列:

[0481]

>p1H4.VL.hk

GTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATTGATTATT
GACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCC
GCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTG
ACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATG
GGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTA
CGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACC
TTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGAT
GCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTC
TCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAA
TGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTA
TATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTG
ACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGGACTCTAGAGGATCGAACCCTTAAG
CTTGCCACC*ATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCATTGCACTAAGTCTTGCACTTGTCAC*
*GAATTCA*GACAACGTGCTGACACAGAGCCCTGCCAGCCTGGCTGTTTCTCTGGGACAGAGAG
CCACCATCAGCTGCAAGGCCAGCCAGAGCGTTGACTACGACGGCGACAGCTACATGAACTGG
TATCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCACCTAAGGTGTTCATCTACGCCGCCAGCAACCTGGAAAG
CGGCATCCCTGCCAGATTTTCTGGCTCTGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGAATATCCATC
CTGTGGAAGAAGAGGACGCCGCCACCTACTACTGCCAGCAGAGCAATGAGGACCCCTGGACA
TTTGGCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTT
CCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACT
TCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC

CAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGAC
GCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCC
TGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAGAGGGAGCTAGCGTGGCAT
CTAGACACTCTCGAGAAGGGTTCGATCCCTACCGGTTAGTAATGAGTTTGATATCTCGACAA
TCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTT
TTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCT
TTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGT
TGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCA
TTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCG
GAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAA
TTCCGTGGTGTTGTCGGGGAAGCTGACGTCCTTTCCATGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCT
GGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCT
TCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAG
TCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCCTGGAAACGGGGGAGGCTAACTGAAACACGGAA
GGAGACAATACCGGAAGGAACCCGCGCTATGACGGCAATAAAAAGACAGAATAAAACGCACG
GGTGTTGGGTCGTTTGTTCATAAACGCGGGGTTCGGTCCCAGGGCTGGCACTCTGTCGATAC
CCCACCGAGACCCCATTGGGGCCAATACGCCCGCGTTTCTTCCTTTTCCCCACCCCACCCCC
CAAGTTCGGGTGAAGGCCCAGGGCTCGCAGCCAACGTCGGGGCGGCAGGCCCTGCCATAGCA
GATCTGCGCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCCACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGC
GGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTC
CTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAAT
CGGGGCATCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAACTTGA
TTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGT
TGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATC
TCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGGGGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGA
GCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTAATTCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGG
AAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAA
[0482] CCAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAAT
TAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTC
CGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCT
CTGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAA
AAGCTCCCGGGAGCTTGTATATCCATTTTCGGATCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTT
TCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTAT
TCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCA
GCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCA
GGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCG
ACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTC
CTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCT
GCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAG
CACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGG
CTCGCGCCAGCCGAACTGTTCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGT
CGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGAT
TCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGT
GATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGC
CGCTCCCGATTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGGAC
TCTGGGGTTCGCGAAATGACCGACCAAGCGACGCCCAACCTGCCATCACGAGATTTCGATTC
CACCGCCGCCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCCGGCTGGATGA
TCCTCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCGCCCACCCCAACTTGTTTATTGCAGCT
TATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACT
GCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGTATACCGTCGA
CCTCTAGCTAGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCG
CTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATG
AGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGT
CGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGC
TCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATC

AGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACA
TGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTC
CATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAA
CCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTG
TTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTT
TCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTG
TGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGT
CCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGA
GCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAG
AAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTA
GCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAG
ATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGC
TCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCA
CCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACT
TGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCG
TTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCAT
CTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCA
ATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCAT
CCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCA
ACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTC
AGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGT
TAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGG
TTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACT
GGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCC
GGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAA
AACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAA
CCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGC
[0483] AAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATAC
TCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGA
TACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAA
AGTGCCACCTGACGTCGACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTCGACTCTCAGTAC
AATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATCTGCTCCCTGCTTGTGTGTTGGAGGTCG
CTGAGTAGTGCGCGAGCAAAATTTAAGCTACAACAAGGCAAGGCTTGACCGACAATTGCATG
AAGAATCTGCTTAGG

>p1H4.VH.hIgG2

GTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATTGATTATT
GACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCC
GCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTG
ACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATG
GGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTA
CGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACC
TTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGAT
GCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTC
TCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAA
TGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTA
TATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTG
ACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGGACTCTAGAGGATCGAACCCTTAAG
CTTGCCACC*ATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCATTGCACTAAGTCTTGCACTTGTCAC*
*GAATTC*GGAAGTGAAGCTGGTGGAAAGCGGCGGAGGTGTTGTTCAGCCTGGCGGATCTCTGA
AGCTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCAGCTACACAATGAGCTGGGTCCGACAG
ACCCCTGAGAAGAGACTGGAATGGGTCGCCAAGATCCGGAACGGCGGAGGCATCACCTACTA
CCTGGATACCCTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACGCCAAGAACACCCTGTACC

TGCAGATGAGCAGCCTGAAGTCCGAGGACACCGCCATCTACTTTTGCGCCAGACACTACTAC
GGCAGCGAGGACTACTTCGACTATTGGGGCCAGGGCACCACACTGACCGTTAGCTCTGCTAG
CACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAG
CGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCA
GGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTC
CCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACG
TAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTCGAG
TGCCCACCGTGCCCAGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACC
CAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC
ACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG
ACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTTGT
GCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCAG
CCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACC
CTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGG
CTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACA
AGACCACGCCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTG
GACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCA
CAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGACCTAGCGTGGCATCTA
GACACTCTCGAGAAGGGTTCGATCCCTACCGGTTAGTAATGAGTTTGATATCTCGACAATCA
ACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTA
CGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTC
ATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGT
CAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTG
CCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAA
CTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTC
CGTGGTGTTGTCGGGGAAGCTGACGTCCTTTCCATGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGA
TTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCC
[0484] CGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCG
GATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCCTGGAAACGGGGGAGGCTAACTGAAACACGGAAGGA
GACAATACCGGAAGGAACCCGCGCTATGACGGCAATAAAAAGACAGAATAAAACGCACGGGT
GTTGGGTCGTTTGTTCATAAACGCGGGGTTCGGTCCCAGGGCTGGCACTCTGTCGATACCCC
ACCGAGACCCCATTGGGGCCAATACGCCCGCGTTTCTTCCTTTTCCCCACCCCACCCCCCAA
GTTCGGGTGAAGGCCCAGGGCTCGCAGCCAACGTCGGGGCGGCAGGCCCTGCCATAGCAGAT
CTGCGCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCCACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGC
GGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTT
TCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGG
GGCATCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAACTTGATTA
GGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGG
AGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCG
GTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGGGGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCT
GATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTAATTCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAA
GTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA
GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAG
TCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGC
CCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCTG
CCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAG
CTCCCGGGAGCTTGTATATCCATTTTCGGATCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCG
CATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCG
GCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCG
CAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAGGA
CGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACG
TTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTG
TCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCA
TACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCAC
GTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTC

GCGCCAGCCGAACTGTTCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCGT
GACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTCA
TCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGAT
ATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGC
TCCCGATTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGGACTCT
GGGGTTCGCGAAATGACCGACCAAGCGACGCCCAACCTGCCATCACGAGATTTCGATTCCAC
CGCCGCCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCCGGCTGGATGATCC
TCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCGCCCACCCCAACTTGTTTATTGCAGCTTAT
AATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCA
TTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGTATACCGTCGACCT
CTAGCTAGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTC
ACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGT
GAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGT
GCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCT
TCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGC
TCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGT
GAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCAT
AGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCC
GACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTC
CGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCT
CAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGT
GCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCA
ACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCG
AGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAG

[0485] GACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCT
CTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATT
ACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCA
GTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCT
AGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGG
TCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTTC
ATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTG
GCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATA
AACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCA
GTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACG
TTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGC
TCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAG
CTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTA
TGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGT
GAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGC
GTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAAC
GTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCC
ACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAA
AACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCA
TACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATAC
ATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGT
GCCACCTGACGTCGACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTCGACTCTCAGTACAAT
CTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATCTGCTCCCTGCTTGTGTGTTGGAGGTCGCTG
AGTAGTGCGCGAGCAAAATTTAAGCTACAACAAGGCAAGGCTTGACCGACAATTGCATGAAG
AATCTGCTTAGG

[0486] mAb 1343Ah IgG2/κ的表达载体的序列:

>p1343Ah.VL.hk

GTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATTGATTATT
GACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCC

GCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTG
ACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATG
GGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTA
CGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACC
TTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGAT
GCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTC
TCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAA
TGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTA
TATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTG
ACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGGACTCTAGAGGATCGAACCCTTAAG
CTTGCCACC*ATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCATTGCACTAAGTCTTGCACTTGTCAC*
*GAATTCA*GACATCGTGCTGACACAGAGCCCTGCCAGCCTGGCTGTTTCTCTGGGACAGAGAG
CCACCATCAGCTGCAAGGCCAGCCAGAGCGTTGACTACGACGGCGAGAACTACATGAACTGG
TATCAGCAGAAGCCCGGACAGAGCCCCAAGCTGCTGATCTACGTGGCCAGCAATCTGGAAAG
CGGCATCCCCGCCAGATTTTCTGGCAGCGGAAGCGGCACCGACTTCACCCTGAATATCCATC
CTGTGGAAGAAGAGGACGCCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTCCAATCTGGACCCCTGGACA
TTTGGCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTT
CCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACT
TCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC
CAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGAC
GCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCC
TGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAGAGGGAGCTAGCGTGGCAT
CTAGACACTCTCGAGAAGGGTTCGATCCCTACCGGTTAGTAATGAGTTTGATATCTCGACAA
TCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTT
TTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCT
[0487] TTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGT
TGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCA
TTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCG
GAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAA
TTCCGTGGTGTTGTCGGGGAAGCTGACGTCCTTTCCATGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCT
GGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCT
TCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAG
TCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCCTGGAAACGGGGGAGGCTAACTGAAACACGGAA
GGAGACAATACCGGAAGGAACCCGCGCTATGACGGCAATAAAAAGACAGAATAAAACGCACG
GGTGTTGGGTCGTTTGTTCATAAACGCGGGGTTCGGTCCCAGGGCTGGCACTCTGTCGATAC
CCCACCGAGACCCCATTGGGGCCAATACGCCCGCGTTTCTTCCTTTTCCCCACCCCACCCCC
CAAGTTCGGGTGAAGGCCCAGGGCTCGCAGCCAACGTCGGGGCGGCAGGCCCTGCCATAGCA
GATCTGCGCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCCACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGC
GGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTC
CTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAAT
CGGGGCATCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAACTTGA
TTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGT
TGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATC
TCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGGGGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGA
GCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTAATTCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGG
AAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAA
CCAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAAT
TAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTC
CGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCT
CTGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAA
AAGCTCCCGGGAGCTTGTATATCCATTTTCGGATCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTT
TCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTAT
TCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCA
GCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCA
GGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCG

ACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTC
CTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCT
GCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAG
CACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGG
CTCGCGCCAGCCGAACTGTTCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGT
CGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGAT
TCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGT
GATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGC
CGCTCCCGATTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGGAC
TCTGGGGTTCGCGAAATGACCGACCAAGCGACGCCCAACCTGCCATCACGAGATTTCGATTC
CACCGCCGCCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCCGGCTGGATGA
TCCTCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCGCCCACCCCAACTTGTTTATTGCAGCT
TATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACT
GCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGTATACCGTCGA
CCTCTAGCTAGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCG
CTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATG
AGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGT
CGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGC
TCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATC
AGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACA
TGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTC
CATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAA
CCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTG
TTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTT
TCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTG
TGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGT
[0488] CCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGA
GCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAG
AAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTA
GCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAG
ATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGC
TCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCA
CCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACT
TGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCG
TTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCAT
CTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCA
ATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCAT
CCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCA
ACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTC
AGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGT
TAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGG
TTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACT
GGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCC
GGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAA
AACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAA
CCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGC
AAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATAC
TCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGA
TACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAA
AGTGCCACCTGACGTCGACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTCGACTCTCAGTAC
AATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATCTGCTCCCTGCTTGTGTGTTGGAGGTCG
CTGAGTAGTGCGCGAGCAAAATTTAAGCTACAACAAGGCAAGGCTTGACCGACAATTGCATG
AAGAATCTGCTTAGG

>p1343Ah.VH.hIgG2

[0489]

GTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATTGATTATT
GACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCC
GCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTG
ACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATG
GGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTA
CGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACC
TTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGAT
GCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTC
TCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAA
TGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTA
TATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTG
ACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGGACTCTAGAGGATCGAACCCTTAAG
CTTGCCACC*ATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCATTGCACTAAGTCTTGCACTTGTCAC*
*GAATTC*GGAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGCGCCGAACTTGTTAGACCTGGCGCTCTGGTCA
AGCTGAGCTGTAAAGCCAGCGGCTTCAACATCAAGGACTACCATCTGCACTGGGTCAAGCAG
AGGCCTGAGCAGGGACTCGAGTGGATCGGCTGGATCGACCCCGAGAACGGCAACGTGATCTA
CGACCCCAAGTTCCAGGGCAAAGCCACCATGACCGTGGTCACCAGCAGCAACACAGCCTACC
TGCAGCTGAGAAGCCTGACCAGCGAAGATACCGCCGTGTACTTCTGCACCAGAGGCACAGCC
AGAGCCAGCTTCGATTATTGGGGCCAGGGCACCAGCCTGACCGTTTCTTCTGCTAGCACCAA
GGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCC
TGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCT
CTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAG
CAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATC
ACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTCGAGTGCCCA
CCGTGCCCAGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGA
CACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAG
ACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG
CCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTTGTGCACCA
GGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCAGCCCCCA
TCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCC
CCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTA
CCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCA
CGCCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAG
AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCA
CTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGACCTAGCGTGGCATCTAGACACT
CTCGAGAAGGGTTCGATCCCTACCGGTTAGTAATGAGTTTGATATCTCGACAATCAACCTCT
GGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTAT
GTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTC
TCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCA
ACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCA
CCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATC
GCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGT
GTTGTCGGGGAAGCTGACGTCCTTTCCATGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGC
GCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGC
CTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTC
CCTTTGGGCCGCCTCCCCGCCTGGAAACGGGGGAGGCTAACTGAAACACGGAAGGAGACAAT
ACCGGAAGGAACCCGCGCTATGACGGCAATAAAAAGACAGAATAAAACGCACGGGTGTTGGG
TCGTTTGTTCATAAACGCGGGGTTCGGTCCCAGGGCTGGCACTCTGTCGATACCCCACCGAG
ACCCCATTGGGGCCAATACGCCCGCGTTTCTTCCTTTTCCCCACCCCACCCCCCAAGTTCGG
GTGAAGGCCCAGGGCTCGCAGCCAACGTCGGGGCGGCAGGCCCTGCCATAGCAGATCTGCGC
AGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCCACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGT
GGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTT
TCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGCATC
CCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAACTTGATTAGGGTGA

TGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCA
CGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTAT
TCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGGGGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTA
ACAAAAATTTAACGCGAATTAATTCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCC
AGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTG
GAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCA
ACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTC
TCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCTGCCTCTG
AGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTCCCG
GGAGCTTGTATATCCATTTTCGGATCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGAT
TGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATG
ACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGG
CGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAGGACGAGGC
AGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCA
CTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCT
CACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCT
TGATCCGGCTACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTC
GGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCA
GCCGAACTGTTCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCGTGACCCA
TGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTCATCGACT
GTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCT
GAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGA
TTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGGACTCTGGGGTT
CGCGAAATGACCGACCAAGCGACGCCCAACCTGCCATCACGAGATTTCGATTCCACCGCCGC
CTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCCGGCTGGATGATCCTCCAGC
GCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCGCCCACCCCAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGT
TACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAG
[0490] TTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGTATACCGTCGACCTCTAGCT
AGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATT
CCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTA
ACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGC
TGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCT
TCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTC
AAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAA
AAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTC
CGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGG
ACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCC
TGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAATGC
TCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGA
ACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGG
TAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTAT
GTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGT
ATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGAT
CCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGC
AGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAA
CGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCC
TTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGAC
AGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTTCATCCAT
AGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCA
GTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAG
CCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTAT
TAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTG
CCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGT
TCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTT
CGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAG

[0491]

CACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTAC
TCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAAT
ACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTT
CGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGT
GCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGG
AAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCT
TCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTT
GAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACC
TGACGTCGACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTCGACTCTCAGTACAATCTGCTC
TGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATCTGCTCCCTGCTTGTGTGTTGGAGGTCGCTGAGTAGT
GCGCGAGCAAAATTTAAGCTACAACAAGGCAAGGCTTGACCGACAATTGCATGAAGAATCTG
CTTAGG

[0492] mAb 19G10 IgG4/κ的表达载体的序列:

>p19G10.VL.hk

[0493]

GTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATTGATTATT
GACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCC
GCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTG
ACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATG
GGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTA
CGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACC
TTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGAT
GCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTC
TCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAA
TGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTA
TATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTG
ACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGGACTCTAGAGGATCGAACCCTTAAG
CTTGCCACC*ATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCATTGCACTAAGTCTTGCACTTGTCAC*
*GAATTCA*GACATCGTGCTGACACAGAGCCCTGCCAGCCTGGCTGTTTCTCTGGGACAGAGAG
CCACCATCAGCTGCAAGGCCAGCCAGAGCGTTGACTACGACGGCGACAGCTACATGAACTGG
TATCAGCAGAAGTCCGGCCAGCCTCCTAAGCTGCTGATCTACGCCGCCAGCAATCTGGAAAG
CGGCATCCCTGCCAGATTTTCCGGCTCTGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGAATATCCATC
CTGTGGAAGAAGAGGACGCCGCCACCTACTACTGCCAGCAGAGCAATGTGGACCCCTGGACA
TTTGGCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAG*CGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTT*
CCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACT
TCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC
CAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGAC
GCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCC
*TGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT*TAGAGGGAGCTAGCGTGGCAT
CTAGACACTCTCGAGAAGGGTTCGATCCCTACCGGTTAGTAATGAGTTTGATATCTCGACAA
TCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTT
TTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCT
TTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGT
TGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCA
TTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCG
GAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAA
TTCCGTGGTGTTGTCGGGGAAGCTGACGTCCTTTCCATGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCT
GGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCT
TCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAG
TCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCCTGGAAACGGGGGAGGCTAACTGAAACACGGAA
GGAGACAATACCGGAAGGAACCCGCGCTATGACGGCAATAAAAAGACAGAATAAAACGCACG
GGTGTTGGGTCGTTTGTTCATAAACGCGGGGTTCGGTCCCAGGGCTGGCACTCTGTCGATAC
CCCACCGAGACCCCATTGGGGCCAATACGCCCGCGTTTCTTCCTTTTCCCCACCCCACCCCC
CAAGTTCGGGTGAAGGCCCAGGGCTCGCAGCCAACGTCGGGGCGGCAGGCCCTGCCATAGCA

GATCTGCGCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCCACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGC
GGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTC
CTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAAT
CGGGGCATCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAACTTGA
TTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGT
TGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATC
TCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGGGGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGA
GCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTAATTCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGG
AAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAA
CCAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAAT
TAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTC
CGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCT
CTGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAA
AAGCTCCCGGGAGCTTGTATATCCATTTTCGGATCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTT
TCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTAT
TCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCA
GCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCA
GGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCG
ACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTC
CTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCT
GCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAG
CACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGG
CTCGCGCCAGCCGAACTGTTCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGT
CGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGAT
TCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGT
GATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGC
CGCTCCCGATTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGGAC
[0494] TCTGGGGTTCGCGAAATGACCGACCAAGCGACGCCCAACCTGCCATCACGAGATTTCGATTC
CACCGCCGCCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCCGGCTGGATGA
TCCTCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCGCCCACCCCAACTTGTTTATTGCAGCT
TATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACT
GCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGTATACCGTCGA
CCTCTAGCTAGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCG
CTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATG
AGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGT
CGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGC
TCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATC
AGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACA
TGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTC
CATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAA
CCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTG
TTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTT
TCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTG
TGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGT
CCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGA
GCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAG
AAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTA
GCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAG
ATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGC
TCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCA
CCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACT
TGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCG
TTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCAT
CTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCA
ATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCAT

CCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCA
ACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTC
AGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGT
TAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGG
TTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACT
GGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCC
GGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAA
AACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAA
CCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGC
AAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATAC
TCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGA
TACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAA
AGTGCCACCTGACGTCGACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTCGACTCTCAGTAC
AATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATCTGCTCCCTGCTTGTGTGTTGGAGGTCG
CTGAGTAGTGCGCGAGCAAAATTTAAGCTACAACAAGGCAAGGCTTGACCGACAATTGCATG
AAGAATCTGCTTAGG

>p19G10.VH.hIgG4

GTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATTGATTATT
GACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCC
GCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTG
ACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATG
GGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTA
CGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACC
TTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGAT
GCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTC
TCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAA
[0495] TGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTA
TATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTG
ACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGGACTCTAGAGGATCGAACCCTTAAG
CTTGCCACC*ATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCATTGCACTAAGTCTTGCACTTGTCAC*
*GAATTC*GGAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGCGCCGAACTTGTTAGACCTGGCGCTCTGGTCA
AGCTGAGCTGTAAAGCCAGCGGCTTCAACATCAAGGACTACCACATGCACTGGGTCAAAGAG
CGGCCTGAGCAGGGACTCGAGTGGATCGGATGGATCGACCCCGAGAACGGCAACACTATGTA
CGACCCCAAGTTCCAGGGCAAAGCCAGCATCACCGCCGACACCTCTAGCAACACAGCCTACC
TGCAGCTGAGCAGCCTGACCTCTGAAGATACCGCCGTGTACTACTGCGTGCGGGGAACAGCC
AGAGCCAGCTTTGATTATTGGGGCCAGGGCACCACACTGACCGTGTCATCTGCTAGCACCAA
GGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCC
TGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCC
CTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAG
CAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATC
ACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCCA
TCATGCCCAGCACCTGAGTTCCTGGGGGGACCATCAGTCTTCCTGTTCCCCCCAAAACCCAA
GGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGG
AAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACA
AAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCA
CCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCCT
CCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTG
CCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTT
CTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGA
CCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGAC
AAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAA
CCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAATAACCTAGCGTGGCATCTAGAC
ACTCTCGAGAAGGGTTCGATCCCTACCGGTTAGTAATGAGTTTGATATCTCGACAATCAACC
TCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGC

TATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATT
TTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAG
GCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCA
CCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTC
ATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGT
GGTGTTGTCGGGGAAGCTGACGTCCTTTCCATGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTC
TGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGC
GGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGAT
CTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCCTGGAAACGGGGGAGGCTAACTGAAACACGGAAGGAGAC
AATACCGGAAGGAACCCGCGCTATGACGGCAATAAAAAGACAGAATAAAACGCACGGGTGTT
GGGTCGTTTGTTCATAAACGCGGGGTTCGGTCCCAGGGCTGGCACTCTGTCGATACCCCACC
GAGACCCCATTGGGGCCAATACGCCCGCGTTTCTTCCTTTTCCCCACCCCACCCCCCAAGTT
CGGGTGAAGGCCCAGGGCTCGCAGCCAACGTCGGGGCGGCAGGCCCTGCCATAGCAGATCTG
CGCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCCACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGG
TGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCG
CTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGC
ATCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAACTTGATTAGGG
TGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGT
CCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTC
TATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGGGGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGAT
TTAACAAAAATTTAACGCGAATTAATTCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTC
CCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGT
GTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCA
GCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCA
TTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCTGCCT
CTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTC
CCGGGAGCTTGTATATCCATTTTCGGATCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCAT
[0496] GATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCT
ATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAG
GGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAGGACGA
GGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTG
TCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCA
TCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATAC
GCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTA
CTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCG
CCAGCCGAACTGTTCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCGTGAC
CCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTCATCG
ACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATT
GCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCC
CGATTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGGACTCTGGG
GTTCGCGAAATGACCGACCAAGCGACGCCCAACCTGCCATCACGAGATTTCGATTCCACCGC
CGCCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCCGGCTGGATGATCCTCC
AGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCGCCCACCCCAACTTGTTTATTGCAGCTTATAAT
GGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTC
TAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGTATACCGTCGACCTCTA
GCTAGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACA
ATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAG
CTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCC
AGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCC
GCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCA
CTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAG
CAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGG
CTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGAC
AGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGA
CCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAA

TGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCA
CGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACC
CGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGG
TATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGAC
AGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTT
GATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACG
CGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTG
GAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGA
TCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCT
GACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTTCATC
CATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCC
CCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAAC
CAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTC
TATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTG
[0497] TTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCC
GGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTC
CTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGG
CAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAG
TACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTC
AATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTT
CTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACT
CGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAAC
AGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATAC
TCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATA
TTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCC
ACCTGACGTCGACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTCGACTCTCAGTACAATCTG
CTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATCTGCTCCCTGCTTGTGTGTTGGAGGTCGCTGAGT
AGTGCGCGAGCAAAATTTAAGCTACAACAAGGCAAGGCTTGACCGACAATTGCATGAAGAAT
CTGCTTAGG

[0498] mAb 25F1 IgG4/κ的表达载体的序列：

>p25F1.VL.hk

GTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATTGATTATT
GACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCC
GCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTG
ACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATG
GGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTA
CGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACC
TTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGAT
GCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTC
TCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAA
TGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTA
[0499] TATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTG
ACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGGACTCTAGAGGATCGAACCCTTAAG
CTTGCCACC*ATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCATTGCACTAAGTCTTGCACTTGTCAC*
*GAATTCA*GACATCGTGCTGACACAGAGCCCTGCCAGCCTGGCTGTTTCTCTGGGACAGAGAG
CCACCATCAGCTGCAAGGCCAGCCAGAGCGTTGACTACGACGGCGACACCTACATGAACTGG
TATCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCACCTAAGCTGCTGATCTACACAGCCAGCAACCTGGAAAG
CGGCATCCCCGCCAGATTTTCTGGCAGCGGAAGCGGCACCGACTTCACCCTGAATATCCATC
CTGTGGAAGAGGTGGACGCCGCCACCTACTACTGCCAGCAGAGCAATGAGGACCCCTGGACA
TTTGGCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTT
CCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACT
TCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC
CAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGAC

GCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCC
TGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAGAGGGAGCTAGCGTGGCAT
CTAGACACTCTCGAGAAGGGTTCGATCCCTACCGGTTAGTAATGAGTTTGATATCTCGACAA
TCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTT
TTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCT
TTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGT
TGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCA
TTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCG
GAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAA
TTCCGTGGTGTTGTCGGGGAAGCTGACGTCCTTTCCATGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCT
GGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCT
TCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAG
TCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCCTGGAAACGGGGGAGGCTAACTGAAACACGGAA
GGAGACAATACCGGAAGGAACCCGCGCTATGACGGCAATAAAAAGACAGAATAAAACGCACG
GGTGTTGGGTCGTTTGTTCATAAACGCGGGGTTCGGTCCCAGGGCTGGCACTCTGTCGATAC
CCCACCGAGACCCCATTGGGGCCAATACGCCCGCGTTTCTTCCTTTTCCCCACCCCACCCCC
CAAGTTCGGGTGAAGGCCCAGGGCTCGCAGCCAACGTCGGGGCGGCAGGCCCTGCCATAGCA
GATCTGCGCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCCACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGC
GGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTC
CTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAAT
CGGGGCATCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAACTTGA
TTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGT
TGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATC
TCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGGGGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGA
GCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTAATTCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGG
AAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAA
CCAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAAT
[0500] TAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTC
CGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCT
CTGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAA
AAGCTCCCGGGAGCTTGTATATCCATTTTCGGATCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTT
TCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTAT
TCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCA
GCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCA
GGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCG
ACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTC
CTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCT
GCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAG
CACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGG
CTCGCGCCAGCCGAACTGTTCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGT
CGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGAT
TCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGT
GATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGC
CGCTCCCGATTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGGAC
TCTGGGGTTCGCGAAATGACCGACCAAGCGACGCCCAACCTGCCATCACGAGATTTCGATTC
CACCGCCGCCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCCGGCTGGATGA
TCCTCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCGCCCACCCCAACTTGTTTATTGCAGCT
TATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACT
GCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGTATACCGTCGA
CCTCTAGCTAGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCG
CTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATG
AGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGT
CGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGC
TCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATC
AGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACA

TGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTC
CATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAA
CCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTG
TTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTT
TCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTG
TGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGT
CCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGA
GCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAG
AAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTA
GCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAG
ATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGC
TCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCA
CCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACT
TGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCG
TTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCAT
CTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCA
ATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCAT
CCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCA
ACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTC
AGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGT
TAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGG
TTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACT
GGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCC
GGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAA
AACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAA
CCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGC
AAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATAC
[0501] TCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGA
TACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAA
AGTGCCACCTGACGTCGACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTCGACTCTCAGTAC
AATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATCTGCTCCCTGCTTGTGTGTTGGAGGTCG
CTGAGTAGTGCGCGAGCAAAATTTAAGCTACAACAAGGCAAGGCTTGACCGACAATTGCATG
AAGAATCTGCTTAGG

>p20F1.VH.hIgG4

GTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATTGATTATT
GACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCC
GCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTG
ACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATG
GGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTA
CGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACC
TTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGAT
GCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTC
TCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAA
TGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTA
TATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTG
ACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGGACTCTAGAGGATCGAACCCTTAAG
CTTGCCACC*ATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCATTGCACTAAGTCTTGCACTTGTCAC*
*GAATTC*GGAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGCGCCGAACTTGTTAGACCTGGCGCTCTGGTCA
AGTGGTCCTGTAAAGCCAGCGGCTTCAACATCAAGGACTACCACATCCACTGGGTCAAGCAG
AGGCCTGAGCAGGGCCTCGATTGGATCGGCTGGATCGACCCCGAGATCGACAAGACCCTGTA
CGACCCCAAGTTCCAGGGCAAAGCCAGAATCACCGCCGACACCAGCAGCAACACAGCCTACC
TGCAACTGAGCAGCCTGACCAGCGAAGATACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGGAACAGCC
AGAGCCAGCTTCGATTATTGGGGCCAGGGCACCACACTGACCGTGTCATCTGCTAGCACCAA
GGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCC

TGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCC
CTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAG
CAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATC
ACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCCA
TCATGCCCAGCACCTGAGTTCCTGGGGGGACCATCAGTCTTCCTGTTCCCCCCAAAACCCAA
GGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGG
AAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACA
AAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCA
CCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCCT
CCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTG
CCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTT
CTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGA
CCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGAC
AAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAA
CCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAATAACCTAGCGTGGCATCTAGAC
ACTCTCGAGAAGGGTTCGATCCCTACCGGTTAGTAATGAGTTTGATATCTCGACAATCAACC
TCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGC
TATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATT
TTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAG
GCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCA
CCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTC
ATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGT
GGTGTTGTCGGGGAAGCTGACGTCCTTTCCATGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTC
TGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGC
GGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGAT
CTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCCTGGAAACGGGGGAGGCTAACTGAAACACGGAAGGAGAC
AATACCGGAAGGAACCCGCGCTATGACGGCAATAAAAAGACAGAATAAAACGCACGGGTGTT
[0502] GGGTCGTTTGTTCATAAACGCGGGGTTCGGTCCCAGGGCTGGCACTCTGTCGATACCCCACC
GAGACCCCATTGGGGCCAATACGCCCGCGTTTCTTCCTTTTCCCCACCCCACCCCCCAAGTT
CGGGTGAAGGCCCAGGGCTCGCAGCCAACGTCGGGGCGGCAGGCCCTGCCATAGCAGATCTG
CGCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCCACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGG
TGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCG
CTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGC
ATCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAACTTGATTAGGG
TGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGT
CCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTC
TATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGGGGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGAT
TTAACAAAAATTTAACGCGAATTAATTCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTC
CCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGT
GTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCA
GCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCA
TTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCTGCCT
CTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTC
CCGGGAGCTTGTATATCCATTTTCGGATCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCAT
GATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCT
ATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAG
GGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAGGACGA
GGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTG
TCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCA
TCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATAC
GCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTA
CTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCG
CCAGCCGAACTGTTCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCGTGAC
CCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTCATCG
ACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATT

GCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCC
CGATTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGGACTCTGGG
GTTCGCGAAATGACCGACCAAGCGACGCCCAACCTGCCATCACGAGATTTCGATTCCACCGC
CGCCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCCGGCTGGATGATCCTCC
AGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCGCCCACCCCAACTTGTTTATTGCAGCTTATAAT
GGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTC
TAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGTATACCGTCGACCTCTA
GCTAGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACA
ATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAG
CTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCC
AGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCC
GCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCA
CTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAG
CAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGG
CTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGAC
AGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGA
CCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAA
TGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCA
CGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACC
CGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGG
TATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGAC
AGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTT
[0503] GATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACG
CGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTG
GAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGA
TCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCT
GACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTTCATC
CATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCC
CCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAAC
CAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTC
TATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTG
TTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCC
GGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTC
CTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGG
CAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAG
TACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTC
AATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTT
CTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACT
CGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAAC
AGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATAC
TCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATA
TTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCC
ACCTGACGTCGACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTCGACTCTCAGTACAATCTG
CTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATCTGCTCCCTGCTTGTGTGTTGGAGGTCGCTGAGT
AGTGCGCGAGCAAAATTTAAGCTACAACAAGGCAAGGCTTGACCGACAATTGCATGAAGAAT
CTGCTTAGG

[0504] mAb 7C11.1 IgG2/κ的表达载体的序列：

>p7C11.1.VL.hk

GTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATTGATTATT
GACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCC
[0505] GCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTG
ACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATG
GGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTA

CGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACC
TTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGAT
GCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTC
TCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAA
TGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTA
TATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTG
ACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGGACTCTAGAGGATCGAACCCTTAAG
CTTGCCACC*ATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCATTGCACTAAGTCTTGCACTTGTCAC*
*GAATTCA*GACAACGTGCTGACACAGAGCCCTGCCAGCCTGGCTGTTTCTCTGGGACAGAGAG
CCACCATCAGCTGCAAGGCCAGCCAGAGCGTTGACTACGACGGCGACAGCTACATGAACTGG
TATCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCACCTAAGGTGTTCATCTACGCCGCCAGCAACCTGGAAAG
CGGCATCCCTGCCAGATTTTCTGGCTCTGGCAGCGGCACCAACTTCACCCTGAACATTCACC
CCGTGGAAGAAGAGGACGCCGCCACCTACTACTGCCAGCAGAGCAATGAGGACCCCTGGACA
TTTGGCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTT
CCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACT
TCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC
CAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGAC
GCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCC
TGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAGAGGGAGCTAGCGTGGCAT
CTAGACACTCTCGAGAAGGGTTCGATCCCTACCGGTTAGTAATGAGTTTGATATCTCGACAA
TCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTT
TTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCT
TTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGT
TGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCA
TTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCG
GAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAA
TTCCGTGGTGTTGTCGGGGAAGCTGACGTCCTTTCCATGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCT
[0506] GGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCT
TCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAG
TCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCCTGGAAACGGGGGAGGCTAACTGAAACACGGAA
GGAGACAATACCGGAAGGAACCCGCGCTATGACGGCAATAAAAAGACAGAATAAAACGCACG
GGTGTTGGGTCGTTTGTTCATAAACGCGGGGTTCGGTCCCAGGGCTGGCACTCTGTCGATAC
CCCACCGAGACCCCATTGGGGCCAATACGCCCGCGTTTCTTCCTTTTCCCCACCCCACCCCC
CAAGTTCGGGTGAAGGCCCAGGGCTCGCAGCCAACGTCGGGGCGGCAGGCCCTGCCATAGCA
GATCTGCGCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCCACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGC
GGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTC
CTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAAT
CGGGGCATCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAACTTGA
TTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGT
TGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATC
TCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGGGGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGA
GCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTAATTCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGG
AAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAA
CCAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAAT
TAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTC
CGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCT
CTGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAA
AAGCTCCCGGGAGCTTGTATATCCATTTTCGGATCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTT
TCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTAT
TCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCA
GCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCA
GGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCG
ACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTC
CTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCT
GCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAG

CACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGG
CTCGCGCCAGCCGAACTGTTCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGT
CGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGAT
TCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGT
GATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGC
CGCTCCCGATTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGGAC
TCTGGGGTTCGCGAAATGACCGACCAAGCGACGCCCAACCTGCCATCACGAGATTTCGATTC
CACCGCCGCCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCCGGCTGGATGA
TCCTCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCGCCCACCCCAACTTGTTTATTGCAGCT
TATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACT
GCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGTATACCGTCGA
CCTCTAGCTAGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCG
CTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATG
AGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGT
CGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGC
TCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATC
AGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACA
TGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTC
CATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAA
CCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTG
TTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTT
TCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTG
TGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGT
CCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGA
GCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAG
AAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTA
GCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAG
[0507] ATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGC
TCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCA
CCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACT
TGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCG
TTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCAT
CTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCA
ATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCAT
CCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCA
ACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTC
AGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGT
TAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGG
TTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACT
GGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCC
GGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAA
AACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAA
CCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGC
AAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATAC
TCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGA
TACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAA
AGTGCCACCTGACGTCGACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTCGACTCTCAGTAC
AATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATCTGCTCCCTGCTTGTGTGTTGGAGGTCG
CTGAGTAGTGCGCGAGCAAAATTTAAGCTACAACAAGGCAAGGCTTGACCGACAATTGCATG
AAGAATCTGCTTAGG

>p7C11.1.VH.hIgG2

GTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATTGATTATT
GACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCC
GCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTG

ACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATG
GGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTA
CGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACC
TTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGAT
GCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTC
TCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAA
TGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTA
TATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTG
ACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGGACTCTAGAGGATCGAACCCTTAAG
CTTGCCACC*ATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCATTGCACTAAGTCTTGCACTTGTCAC*
*GAATTC*GGAAGTGAAGCTGGTGGAAAGCGGCGGAGGACTGGTTCAACCTGGCGGATCTCTGA
AGCTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGATACACAATGAGCTGGGTCCGACAG
ACCCCTGAGAAGAGACTGGAATGGGTCGCCAAGATCAGAAACGTCGGCGGCATCACCTACTA
TCCCGACACCGTGAAGGGCAGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACCCTGTACC
TGCAGATGAGCAGCCTGAAGTCCGAGGACACCGCCATGTACTACTGCGCCAGACACTACTAC
GGCAGCGAGGACTACTTCGACTATTGGGGCCAGGGCACCACACTGACCGTTAGCTCTGCTAG
CACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAG
CGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCA
GGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTC
CCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACG
TAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTCGAG
TGCCCACCGTGCCCAGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACC
CAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC
ACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG
ACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTTGT
GCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCAG
CCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACC
[0508] CTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGG
CTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACA
AGACCACGCCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTG
GACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCA
CAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGACCTAGCGTGGCATCTA
GACACTCTCGAGAAGGGTTCGATCCCTACCGGTTAGTAATGAGTTTGATATCTCGACAATCA
ACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTA
CGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTC
ATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGT
CAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTG
CCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAA
CTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTC
CGTGGTGTTGTCGGGGAAGCTGACGTCCTTTCCATGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGA
TTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCC
CGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCG
GATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCCTGGAAACGGGGGAGGCTAACTGAAACACGGAAGGA
GACAATACCGGAAGGAACCCGCGCTATGACGGCAATAAAAAGACAGAATAAAACGCACGGGT
GTTGGGTCGTTTGTTCATAAACGCGGGGTTCGGTCCCAGGGCTGGCACTCTGTCGATACCCC
ACCGAGACCCCATTGGGGCCAATACGCCCGCGTTTCTTCCTTTTCCCCACCCCACCCCCCAA
GTTCGGGTGAAGGCCCAGGGCTCGCAGCCAACGTCGGGGCGGCAGGCCCTGCCATAGCAGAT
CTGCGCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCCACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGC
GGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTT
TCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGG
GGCATCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAACTTGATTA
GGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGG
AGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCG
GTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGGGGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCT
GATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTAATTCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAA

GTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA
GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAG
TCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGC
CCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCTG
CCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAG
CTCCCGGGAGCTTGTATATCCATTTTCGGATCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCG
CATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCG
GCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCG
CAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAGGA
CGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACG
TTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTG
TCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCA
TACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCAC
GTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTC
GCGCCAGCCGAACTGTTCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCGT
GACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTCA
TCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGAT
ATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGC
TCCCGATTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGGACTCT
GGGGTTCGCGAAATGACCGACCAAGCGACGCCCAACCTGCCATCACGAGATTTCGATTCCAC
CGCCGCCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCCGGCTGGATGATCC
TCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCGCCCACCCCAACTTGTTTATTGCAGCTTAT
AATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCA
TTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGTATACCGTCGACCT
CTAGCTAGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTC
ACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGT
GAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGT
[0509] GCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCT
TCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGC
TCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGT
GAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCAT
AGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCC
GACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTC
CGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCT
CAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGT
GCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCA
ACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCG
AGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAG
GACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCT
CTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATT
ACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCA
GTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCT
AGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGG
TCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTTC
ATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTG
GCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATA
AACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCA
GTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACG
TTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGC
TCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAG
CTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTA
TGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGT
GAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGC
GTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAAC
GTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCC

[0510] ACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAA
AACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCA
TACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATAC
ATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGT
GCCACCTGACGTCGACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTCGACTCTCAGTACAAT
CTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATCTGCTCCCTGCTTGTGTGTTGGAGGTCGCTG
AGTAGTGCGCGAGCAAAATTTAAGCTACAACAAGGCAAGGCTTGACCGACAATTGCATGAAG
AATCTGCTTAGG

[0511] 参考文献

[0512] 1.Lendon,C.L.,et al.E280A PS-1mutation causes Alzheimer's disease but age of onset is not modified by ApoE alleles.Hum Mutat 10,186-195(1997).

[0513] 2.Aguirre-Acevedo,D.C.,et al.[Validity and reliability of the CERAD-Col neuropsychological battery].Rev Neurol 45,655-660(2007).

[0514] 3.Yesavage,J.A.Opportunities for and obstacles to treatments for dementias.J Am Geriatr Soc 31,59-60(1983).

[0515] 4.Reisberg,B.Functional assessment staging(FAST).Psychopharmacol Bull 24,653-659(1988).

[0516] 5.Mahley,R.W.,Huang,Y.&Rall,S.C.,Jr.Pathogenesis of type III hyperlipoproteinemia(dysbetalipoproteinemia).Questions,quandaries,and paradoxes.J Lipid Res 40,1933-1949(1999).

[0517] 6.Fisher,S.,et al.A scalable,fully automated process for construction of sequence-ready human exome targeted capture libraries.Genome Biol 12,R1 (2011).

[0518] 7.Lek,M.,et al.Analysis of protein-coding genetic variation in 60, 706humans.Nature 536,285-291(2016).

[0519] 8.Li,H.Aligning sequence reads,clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM..arXiv:1303.3997v1[q-bio.GN](2013).

[0520] 9.Kohler,S.,et al.The Human Phenotype Ontology project:linking molecular biology and disease through phenotype data.Nucleic Acids Res 42, D966-974(2014).

[0521] 10.Smedley,D.,et al.A Whole-Genome Analysis Framework for Effective Identification of Pathogenic Regulatory Variants in Mendelian Disease.Am J Hum Genet 99,595-606(2016).

[0522] 11.Chen,J.,Li,Q.&Wang,J.Topology of human apolipoprotein E3 uniquely regulates its diverse biological functions.Proc Natl Acad Sci U S A 108, 14813-14818(2011).

[0523] 12.Rose,A.S.,et al.NGL viewer:web-based molecular graphics for large complexes.Bioinformatics 34,3755-3758(2018).

[0524] 13.Zhong,L.,et al.A rapid and cost-effective method for genotyping apolipoprotein E gene polymorphism.Mol Neurodegener 11,2(2016).

[0525] 14.Quiroz,Y.T.,et al.Association Between Amyloid and Tau Accumulation

in Young Adults With Autosomal Dominant Alzheimer Disease.JAMA Neurol(2018).

[0526] 15.Fleisher,A.S.,et al.Associations between biomarkers and age in the presenilin 1 E280A autosomal dominant Alzheimer disease kindred:a cross-sectional study.JAMA Neurol 72,316-324(2015).

[0527] 16.Becker,J.A.,et al.Amyloid-βassociated cortical thinning in clinically normal elderly.Ann Neurol 69,1032-1042(2011).

[0528] 17.Braak,H.,Rüb,U.,Schultz,C.&Del Tredici,K.Vulnerability of cortical neurons to Alzheimer's and Parkinson's diseases.J Alzheimers Dis 9,35-44(2006).

[0529] 18.Braak,H.&Braak,E.Diagnostic criteria for neuropathologic assessment of Alzheimer's disease.Neurobiol Aging 18,S85-88(1997).

[0530] 19.Johnson,K.A.,et al.Tau positron emission tomographic imaging in aging and early Alzheimer disease.Ann Neurol 79,110-119(2016).

[0531] 20.Chien,D.T.,et al.Early clinical PET imaging results with the novel PHF-tau radioligand[F-18]-T807.J Alzheimers Dis 34,457-468(2013).

[0532] 21.Wang,L.,et al.Evaluation of Tau Imaging in Staging Alzheimer Disease and Revealing Interactions Between beta-Amyloid and Tauopathy.JAMA Neurol 73,1070-1077(2016).

[0533] 22.Logan,J.,et al.Graphical analysis of reversible radioligand binding from time-activity measurements applied to[N-11C-methyl]-(-)-cocaine PET studies in human subjects.J Cereb Blood Flow Metab 10,740-747(1990).

[0534] 23.Amariglio,R.E.,et al.Subjective cognitive concerns,amyloid-β,and neurodegeneration in clinically normal elderly.Neurology 85,56-62(2015).

[0535] 24.Hedden,T.,et al.Disruption of functional connectivity in clinically normal older adults harboring amyloid burden.J Neurosci 29,12686-12694(2009).

[0536] 25.Beecham,G.W.,et al.Genome-wide association meta-analysis of neuropathologic features of Alzheimer's disease and related dementias.PLoS Genet 10,e1004606(2014).

[0537] 26.Hashimoto,T.,et al.Apolipoprotein E,especially apolipoprotein E4,increases the oligomerization of amyloid beta peptide.J Neurosci 32,15181-15192(2012).

[0538] 27.Hudry,E.,et al.Gene transfer of human Apoe isoforms results in differential modulation of amyloid deposition and neurotoxicity in mouse brain.Sci Transl Med 5,212ra161(2013).

[0539] 28.Lemere,C.A.,et al.The E280A presenilin 1 Alzheimer mutation produces increased A beta 42 deposition and severe cerebellar pathology.Nat Med 2,1146-1150(1996).

[0540] 29.Quiroz,Y.T.,et al.Association Between Amyloid and Tau Accumulation

in Young Adults With Autosomal Dominant Alzheimer Disease.JAMA Neurol (2018).

[0541] 30.Acosta-Baena,N.,et al.Pre-dementia clinical stages in presenilin 1E280A familial early-onset Alzheimer's disease:a retrospective cohort study.Lancet Neurol 10,213-220(2011).

[0542] 31.Lopera,F.,et al.Clinical features of early-onset Alzheimer disease in a large kindred with an E280A presenilin-1 mutation.JAMA 277,793-799 (1997).

[0543] 32.Cacace,R.,Sleegers,K.&Van Broeckhoven,C.Molecular genetics of early-onset Alzheimer's disease revisited.Alzheimers Dement 12,733-748(2016).

[0544] 33.Albert,M.S.,et al.The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease:recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease.Alzheimers Dement 7,270-279(2011).

[0545] 34.Smedley,D.,et al.A Whole-Genome Analysis Framework for Effective Identification of Pathogenic Regulatory Variants in Mendelian Disease.Am J Hum Genet 99,595-606(2016).

[0546] 35.Corder,E.H.,et al.Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease.Nat Genet 7,180-184(1994).

[0547] 36.Corder,E.H.,et al.Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families.Science 261,921-923 (1993).

[0548] 37.Farrer,L.A.,et al.Effects of age,sex,and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease.A meta-analysis.APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium.JAMA 278,1349-1356(1997).

[0549] 38.Wardell,M.R.,Brennan,S.O.,Janus,E.D.,Fraser,R.&Carrell, R.W.Apolipoprotein E2-Christchurch(136 Arg----Ser).New variant of human apolipoprotein E in a patient with type III hyperlipoproteinemia.J Clin Invest 80,483-490(1987).

[0550] 39.Candas-Estebanez,B.,et al.APOE Variants E2,E3,and E4 Can Be Miscalled By Classical PCR-RFLP When The Christchurch Variant Is Also Present.J Clin Lab Anal 31(2017).

[0551] 40.Wardell MR,Brennan SO,Janus ED,Fraser R,Carrell RW.Apolipoprotein E2-Christchurch(136 Arg----Ser).New variant of human apolipoprotein E in a patient with type III hyperlipoproteinemia.J Clin Invest 1987;80:483-90.

[0552] 41.Velez JI,Lopera F,Sepulveda-Falla D,et al.APOE*E2 allele delays age of onset in PSEN1 E280AAlzheimer's disease.Mol Psychiatry 2016;21:916-24.

[0553] 42.Hollingworth P,Harold D,Sims R,et al.Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E,EPHA1,CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's

disease.Nat Genet 2011;43:429-35.

[0554] 43.Wardell,M.R.,Brennan,S.O.,Janus,E.D.,Fraser,R.&Carrell,R.W.Apolipoprotein E2-Christchurch(136 Arg----Ser).New variant of human apolipoprotein E in a patient with type III hyperlipoproteinemia.J Clin Invest 80,483-490(1987).

[0555] 44.Mahley,R.W.,Huang,Y.&Rall,S.C.,Jr.Pathogenesis of type III hyperlipoproteinemia(dysbetalipoproteinemia).Questions,quandaries,and paradoxes.J Lipid Res 40,1933-1949(1999).

[0556] 45.Mahley RW.Apolipoprotein E:from cardiovascular disease to neurodegenerative disorders.J Mol Med(Berl)2016;94:739-46.

[0557] 46.Romeo S,Pennacchio LA,Fu Y,et al.Population-based resequencing of ANGPTL4 uncovers variations that reduce triglycerides and increase HDL.Nat Genet 2007;39:513-6.

[0558] 47.Mahley,R.W.Apolipoprotein E:from cardiovascular disease to neurodegenerative disorders.J Mol Med(Berl)94,739-746(2016).

[0559] 48.Hashimoto,T.,et al.Apolipoprotein E,especially apolipoprotein E4,increases the oligomerization of amyloid beta peptide.J Neurosci 32,15181-15192(2012).

[0560] 49.Walsh,D.M.,et al.Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo.Nature 416,535-539(2002).

[0561] 50.Lalli,M.A.,et al.Whole-genome sequencing suggests a chemokine gene cluster that modifies age at onset in familial Alzheimer's disease.Mol Psychiatry20,1294-1300(2015).

[0562] 51.Huynh,T.V.,et al.Age-Dependent Effects of apoE Reduction Using Antisense Oligonucleotides in a Model of beta-amyloidosis.Neuron 96,1013-1023e1014(2017).

[0563] 52.Huynh,T.V.,et al.Age-Dependent Effects of apoE Reduction Using Antisense Oligonucleotides in a Model of beta-amyloidosis.Neuron 96,1013-1023e1014(2017).

[0564] 其它实施方案

[0565] 应理解,虽然已经结合本发明的详细描述描述了本发明,但前述描述旨在说明而不限制本发明的范围,本发明的范围由所附权利要求的范围限定。其它方面、优点和修改在所附权利要求的范围内。

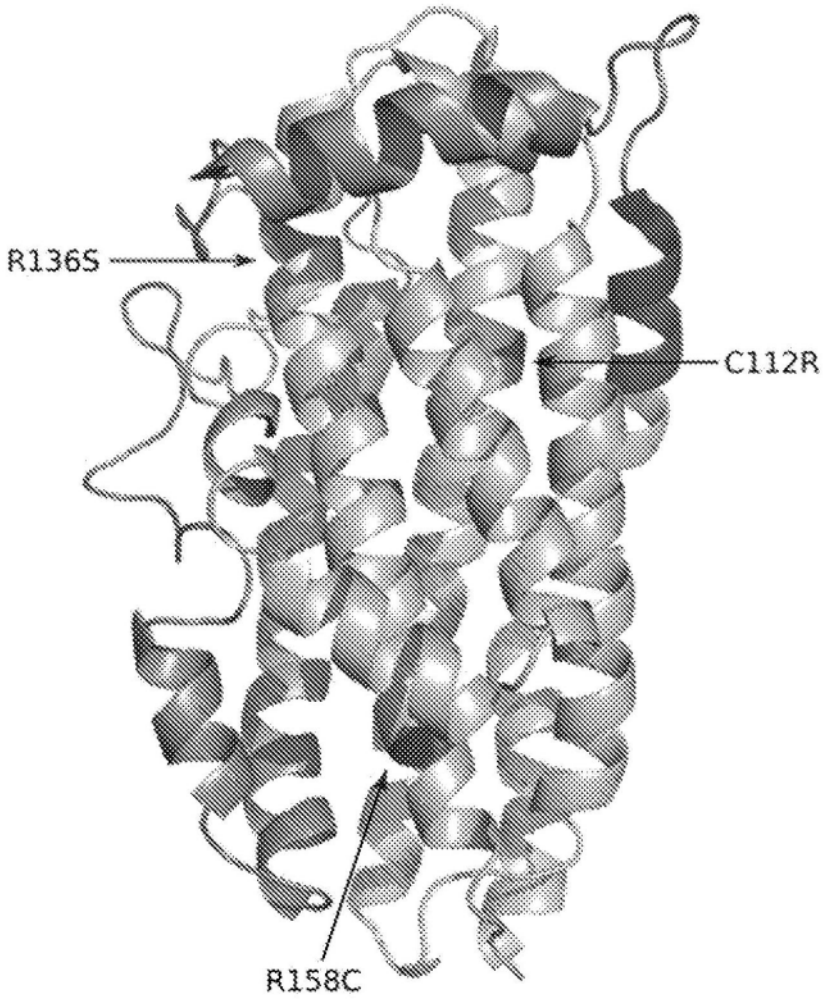


图1

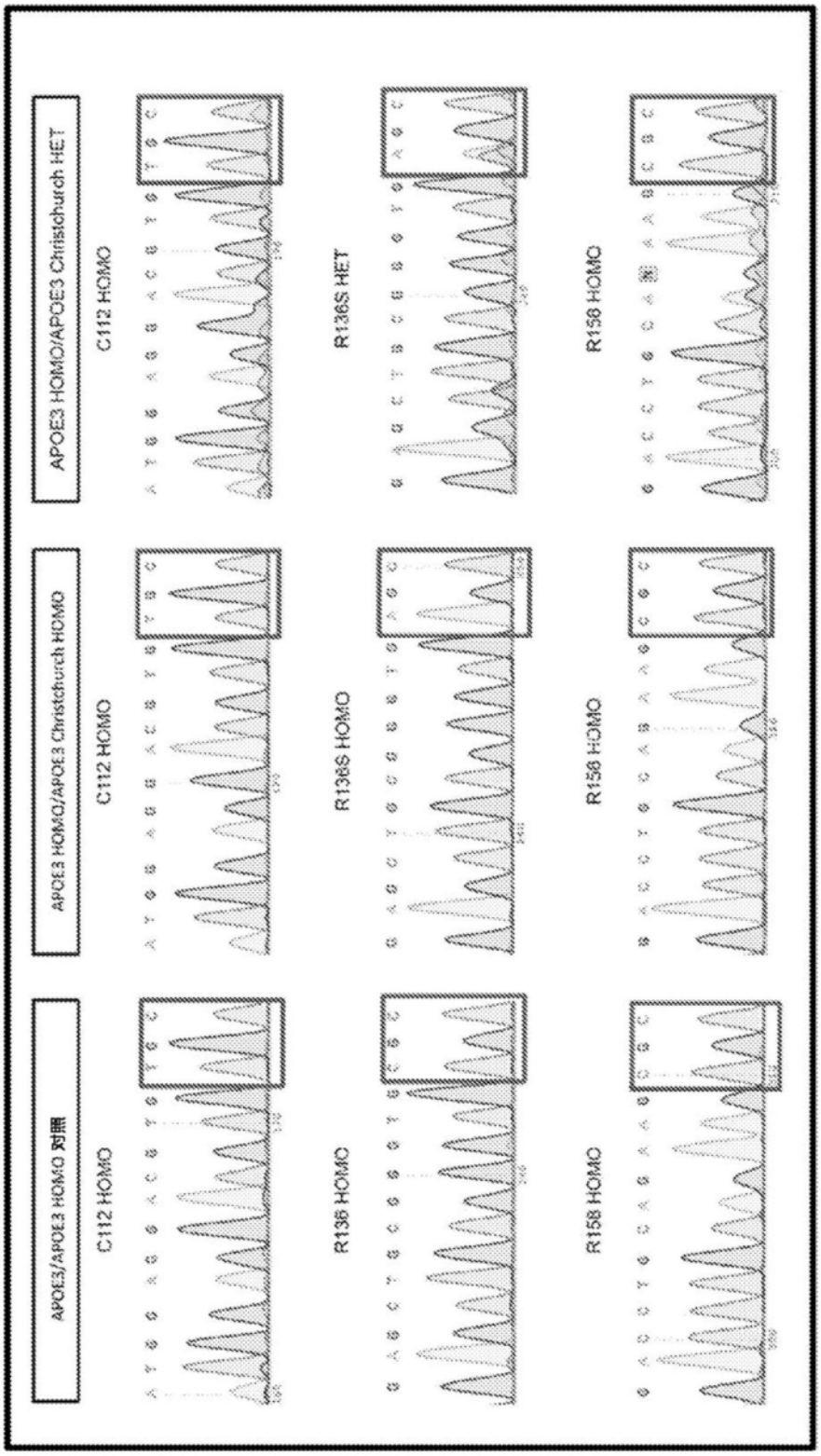

APOE3/APOE3 HOMO 对照
C112 HOMO
R136 HOMO
R158 HOMO
APOE3 HOMO/APOE3 Christchurch HOMO
C112 HOMO
R136S HOMO
R158 HOMO
APOE3 HOMO/APOE3 Christchurch HET
C112 HOMO
R136S HET
R158 HOMO

图2

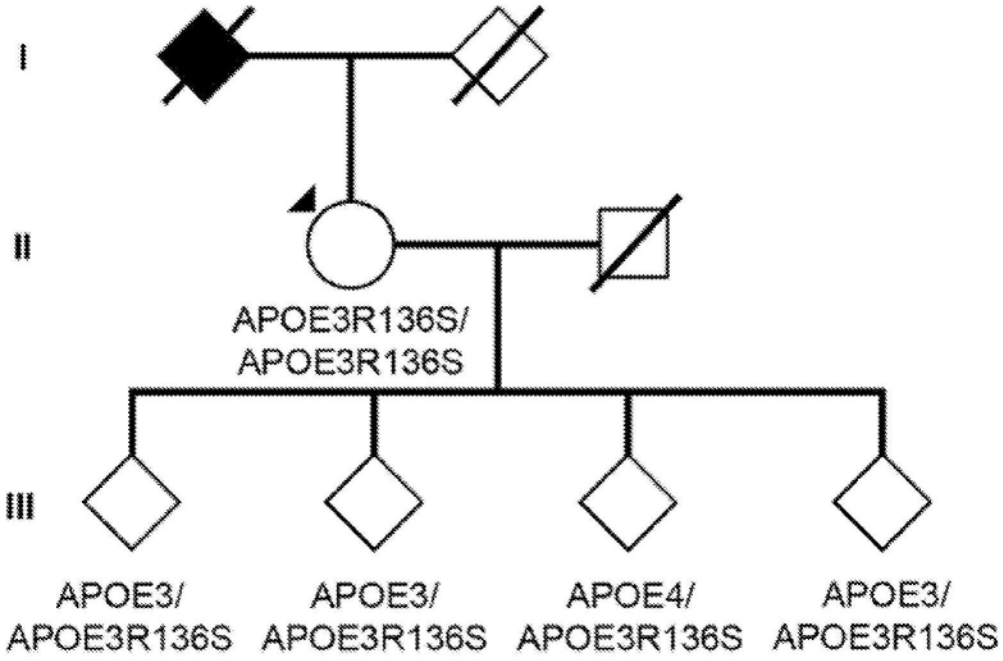

I
II
APOE3R136S/
APOE3R136S
III
APOE3/
APOE3R136S
APOE3/
APOE3R136S
APOE4/
APOE3R136S
APOE3/
APOE3R136S

图3

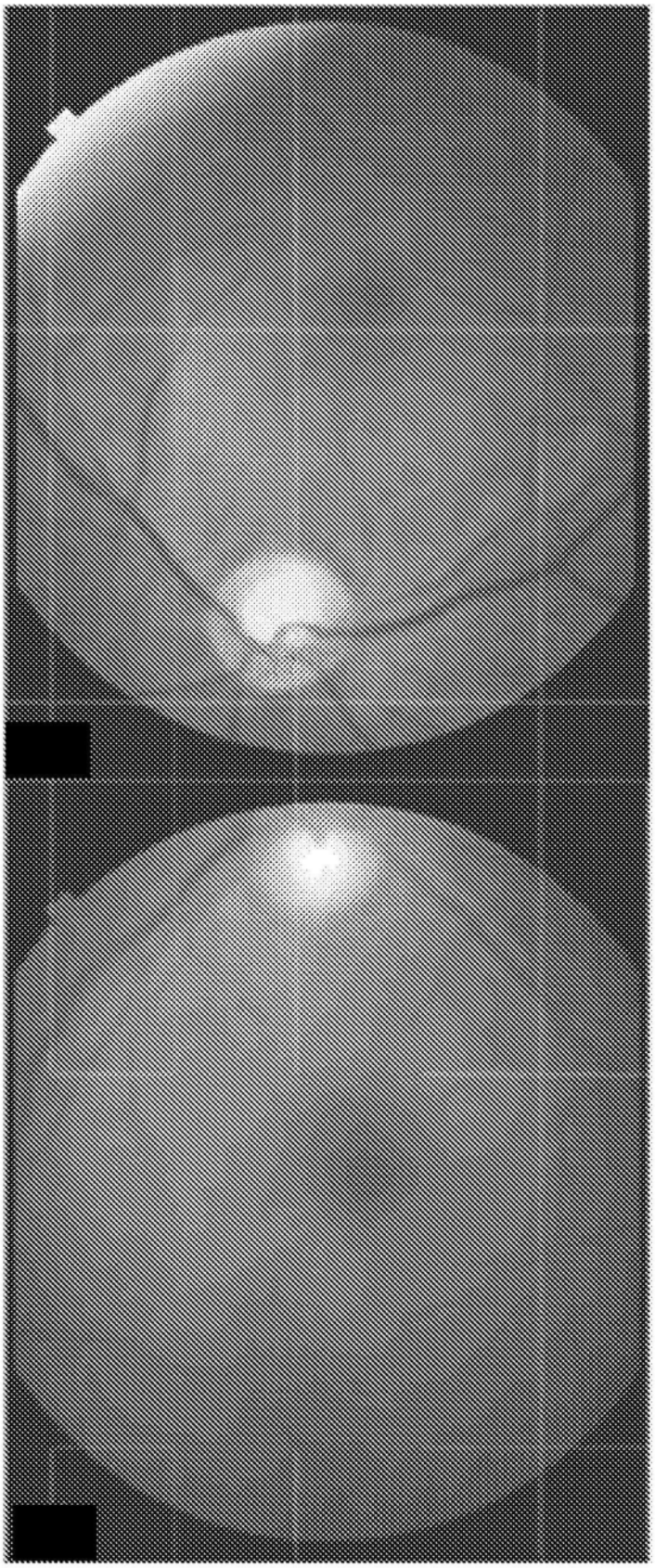


图 4B

图 4A

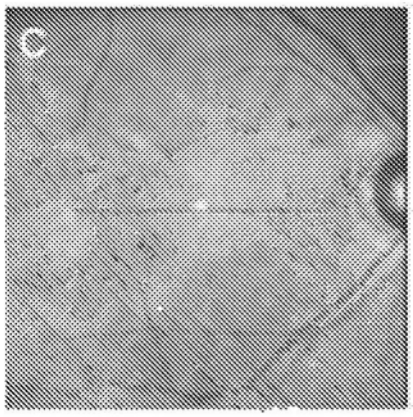


图4C

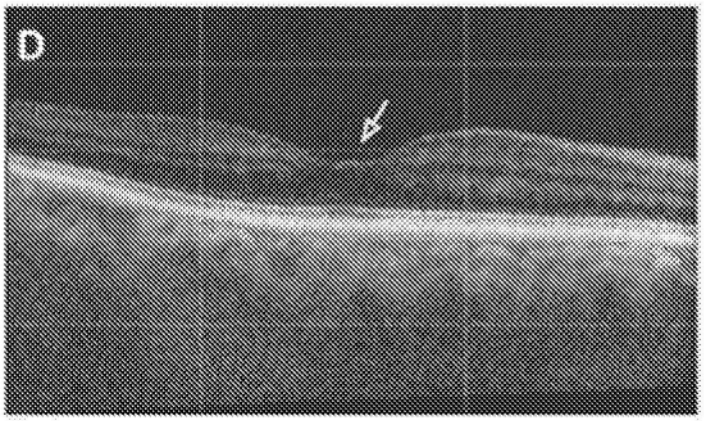


图4D

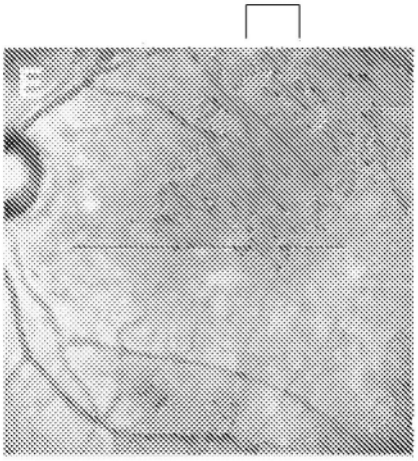


图4E

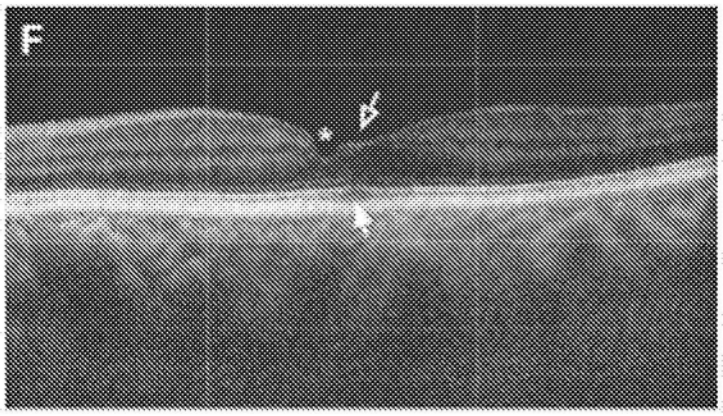


图4F

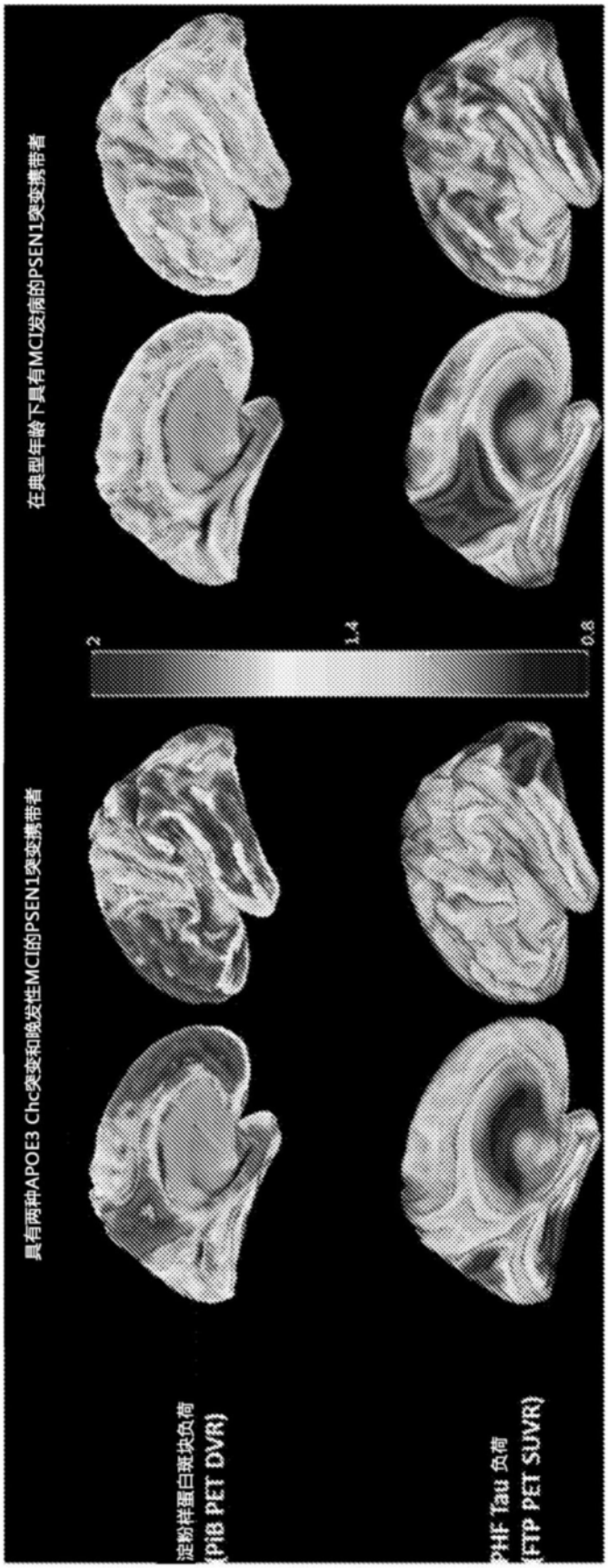

具有两种APOE3 Chc突变和晚发性MCI的PSEN1突变携带者
在典型年龄下具有MCI发病的PSEN1突变携带者
2
1.4
0.8
淀粉样蛋白斑块负荷
(PiB PET DVR)
PHF Tau 负荷
(FTP PET SUVR)

图5

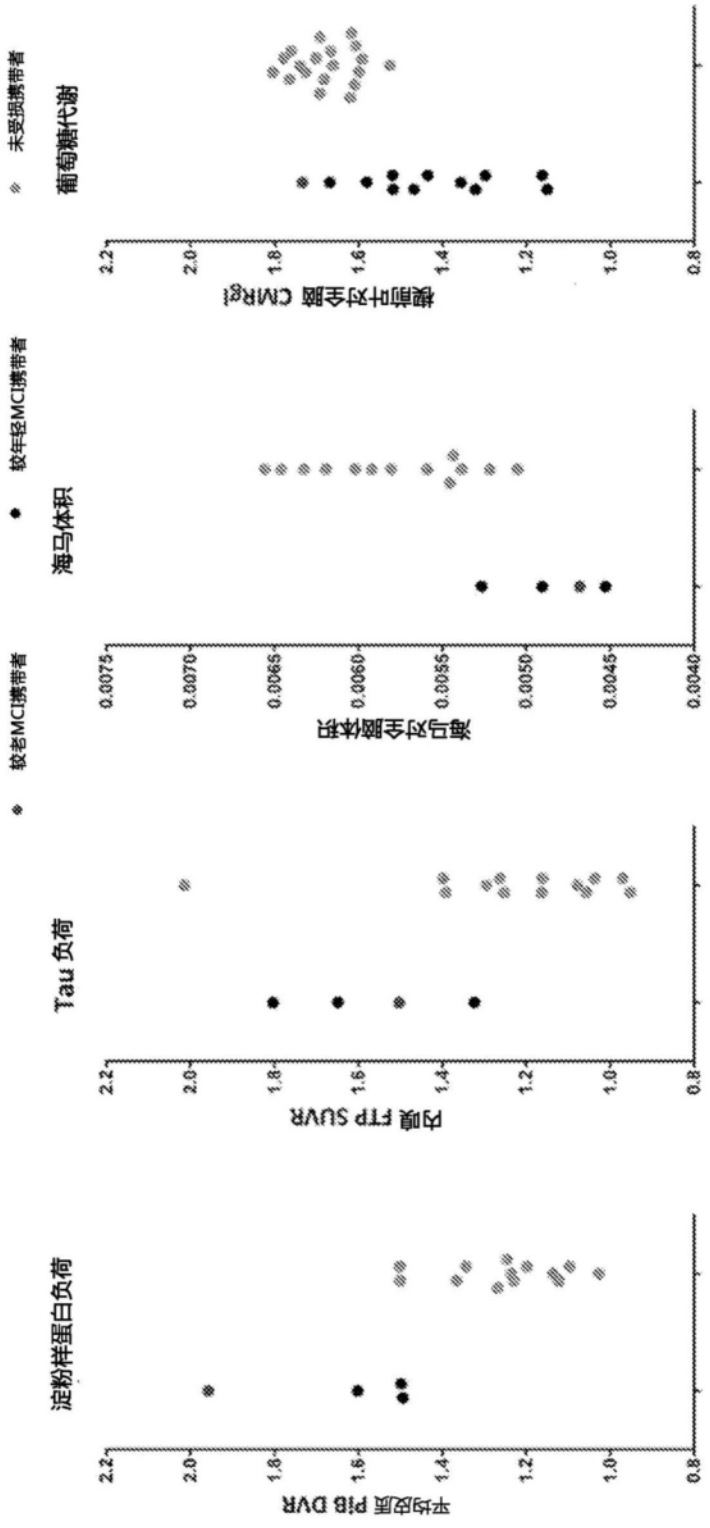

较老MCI携带者
较年轻MCI携带者
未受损携带者
淀粉样蛋白负荷
平均皮质 PiB DVR
Tau 负荷
内嗅 FTP SUVR
海马体积
海马对全脑体积
葡萄糖代谢
楔前叶对全脑 CMRgl

图6

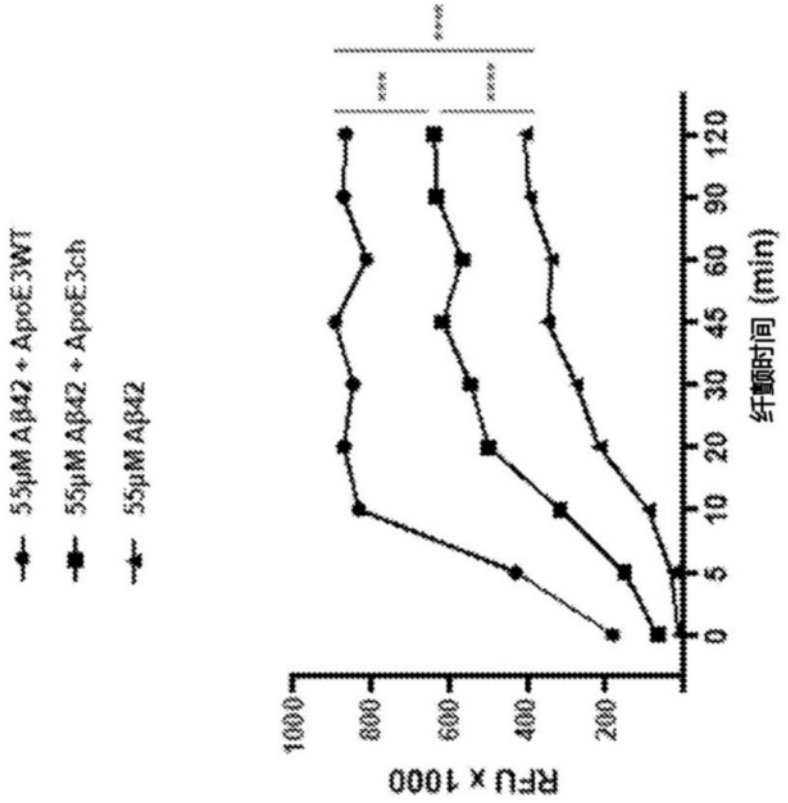

55μM Aβ42 + ApoE3WT
55μM Aβ42 + ApoE3ch
55μM Aβ42
RFU x 1000
1000
800
600
400
200
0
5
10
20
30
45
60
90
120
纤颤时间 (min)
***
****
****

图7

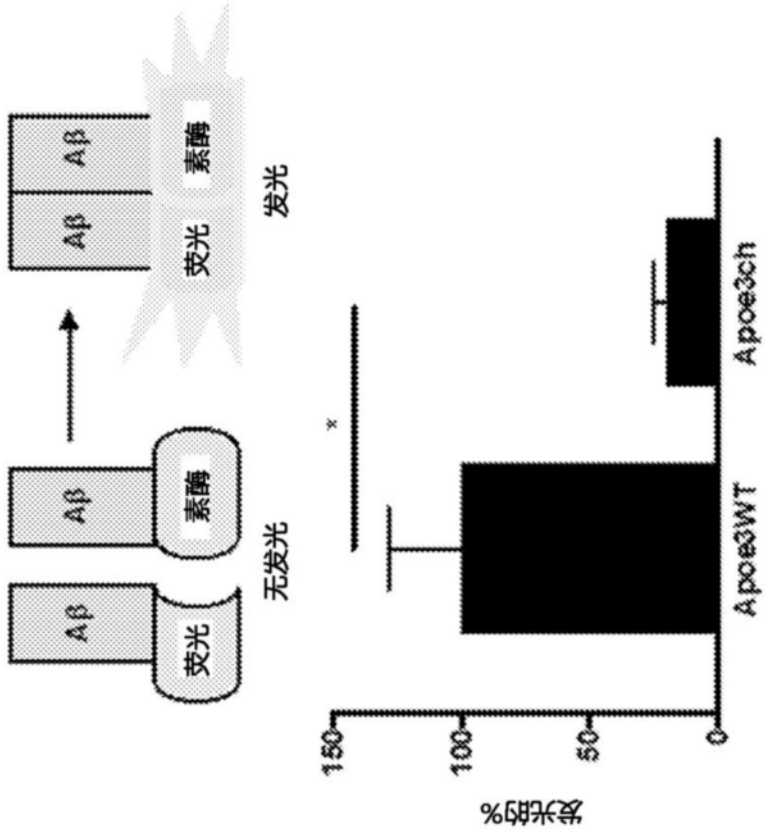


图8

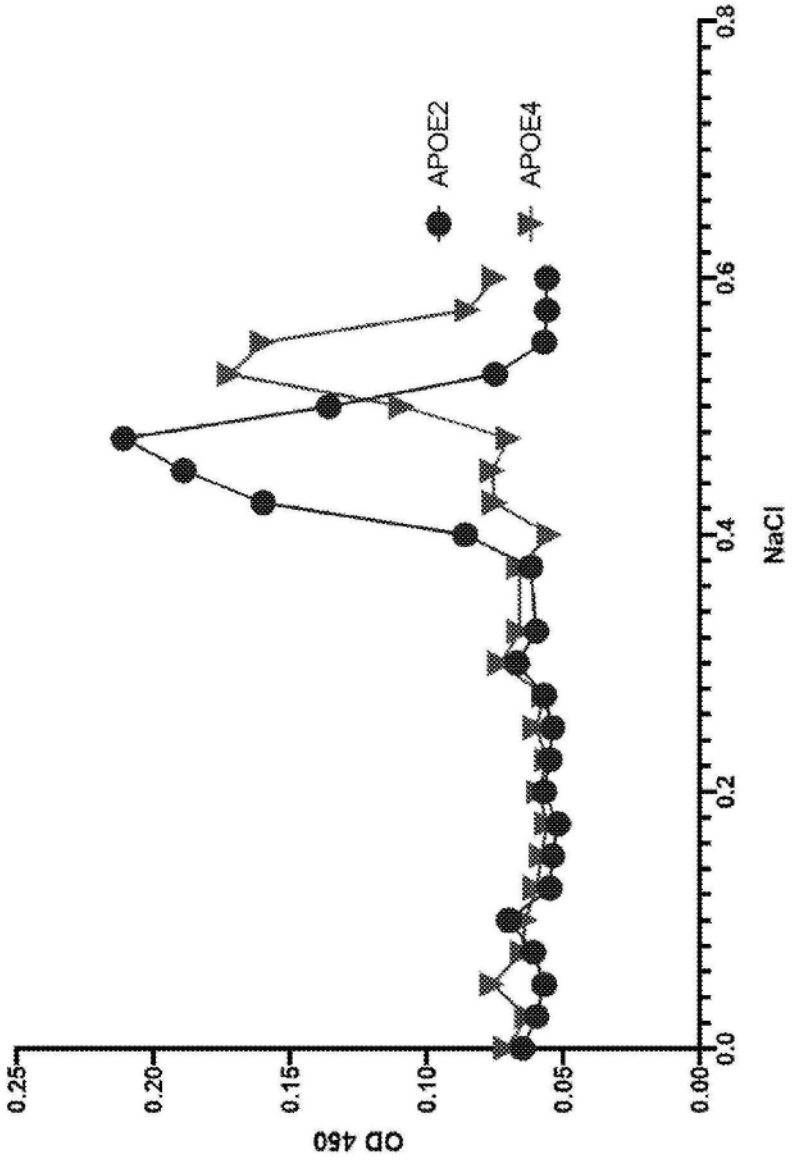


图9

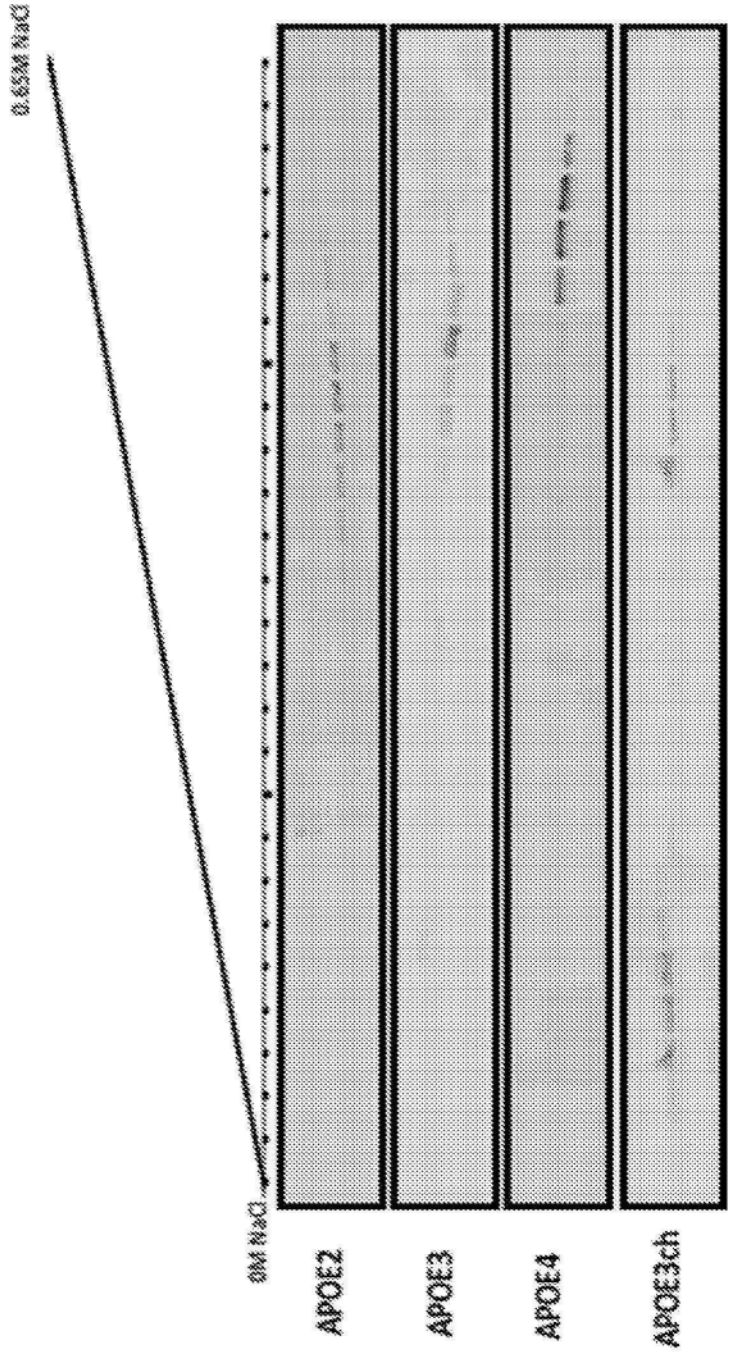


图10

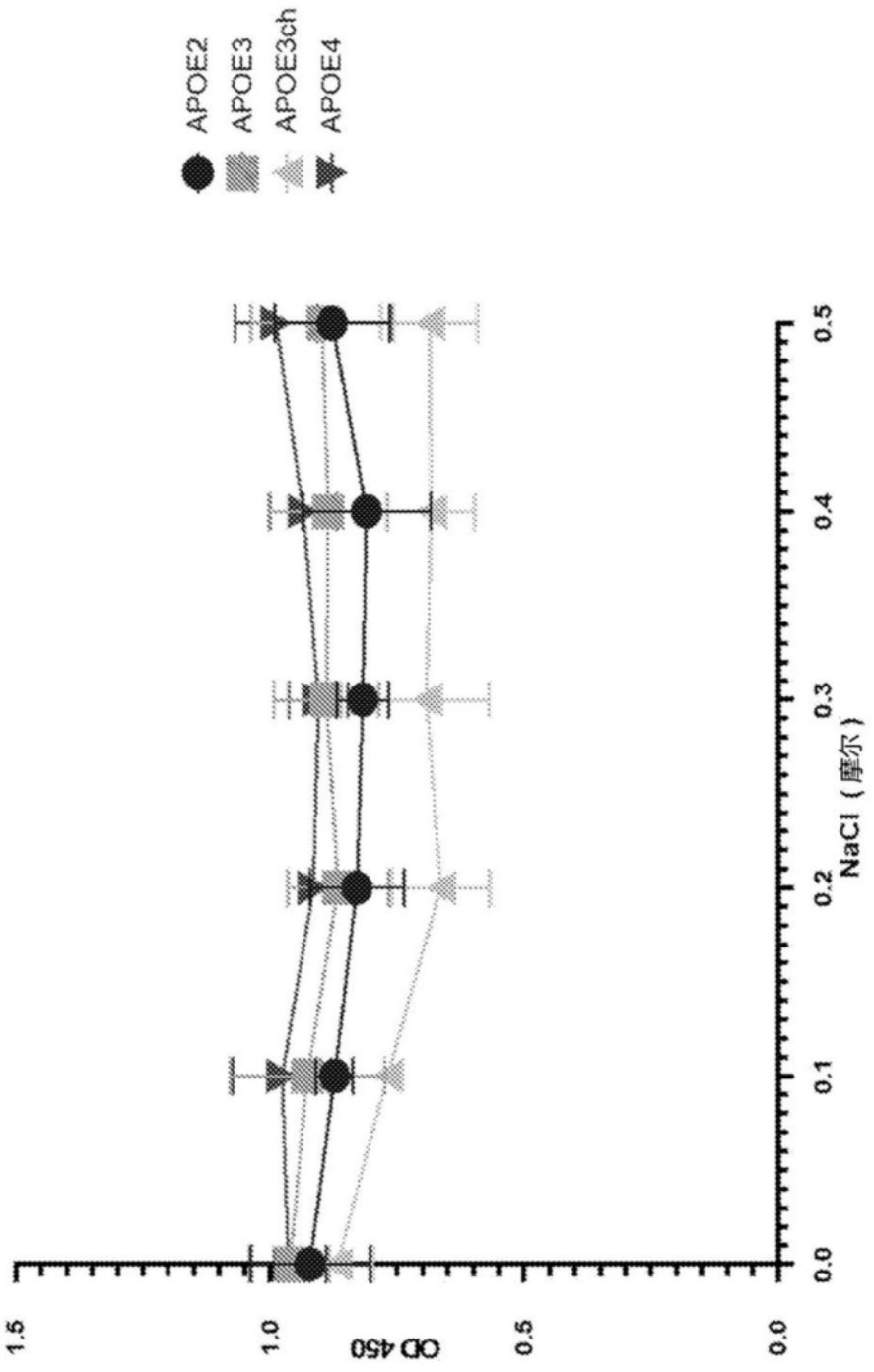

APOE2
APOE3
APOE3ch
APOE4
OD 450
1.5
1.0
0.5
0.0
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
NaCl（摩尔）

图11A

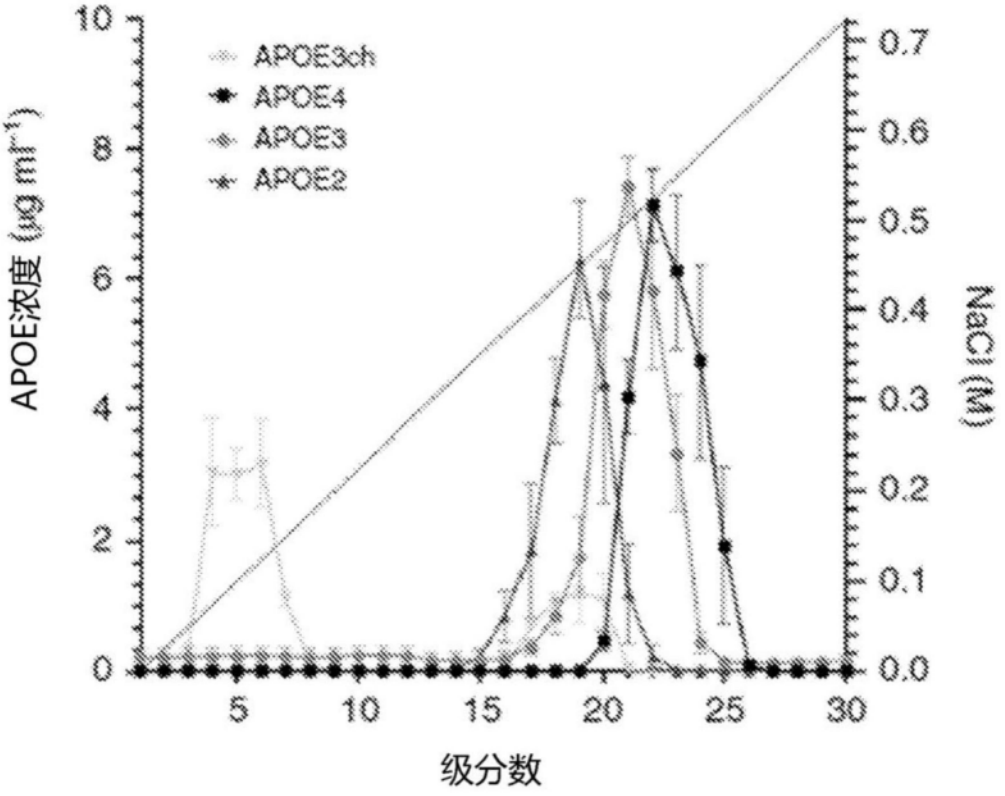

APOE3ch
APOE4
APOE3
APOE2
APOE浓度 (μg ml⁻¹)
NaCl (M)
级分数
0
2
4
6
8
10
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0.7
5
10
15
20
25
30

图11B

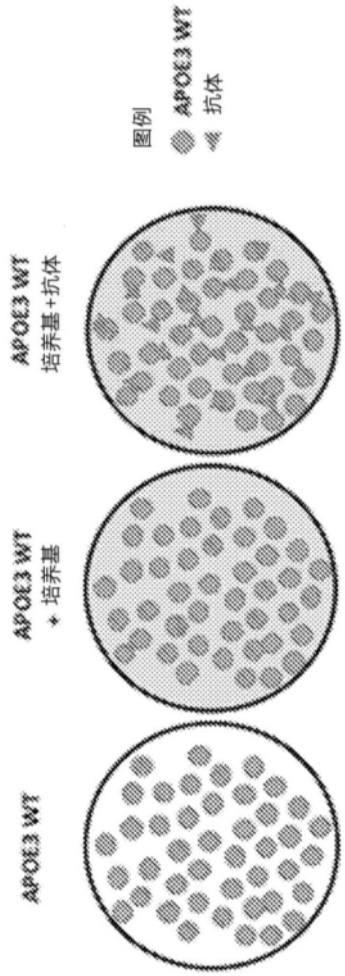

图例
APOE3 WT
抗体
APOE3 WT
培养基+抗体
APOE3 WT
+ 培养基
APOE3 WT

图12A

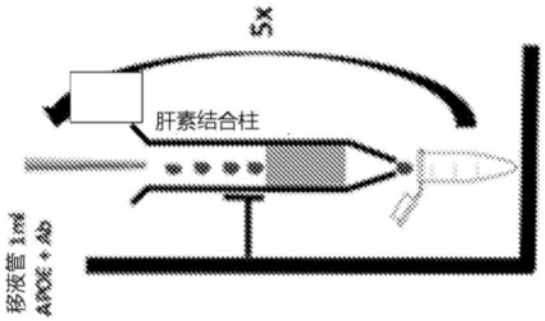

5x
肝素结合柱
移液管 1ml
APOE + Ab

图12B

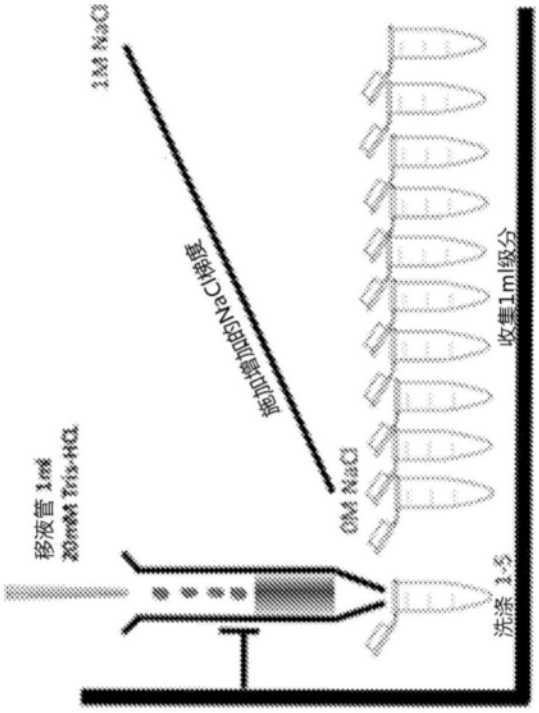

1M NaCl
梯度增加的NaCl浓度
移液管 1ml
20mM Tris-HCl
0M NaCl
收集1ml级分
洗涤 1-5

图12C

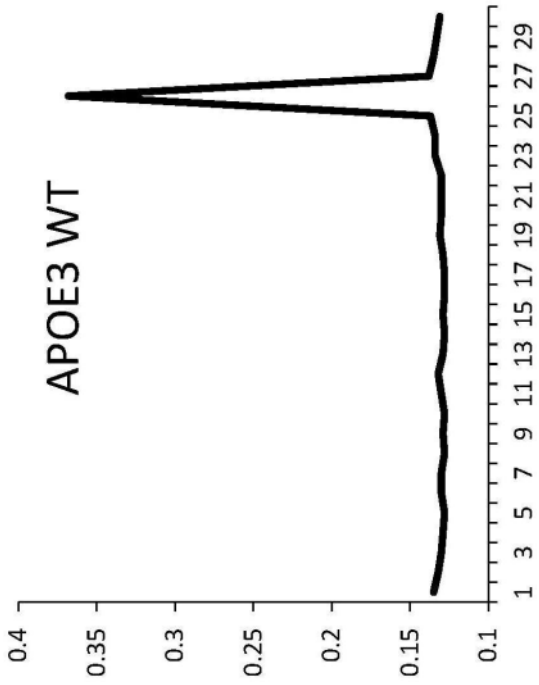

APOE3 WT
0.4
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
1 3 5 7 9 11 13 15 17 19 21 23 25 27 29

图13A

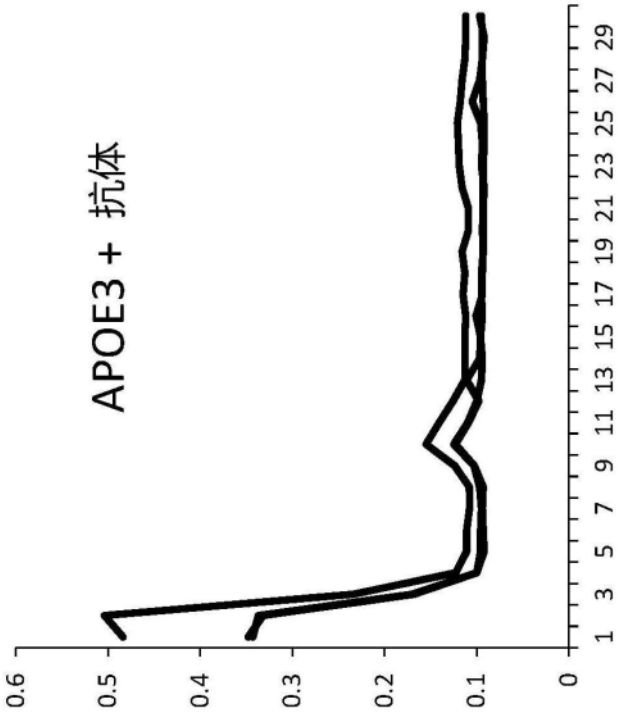


图13B

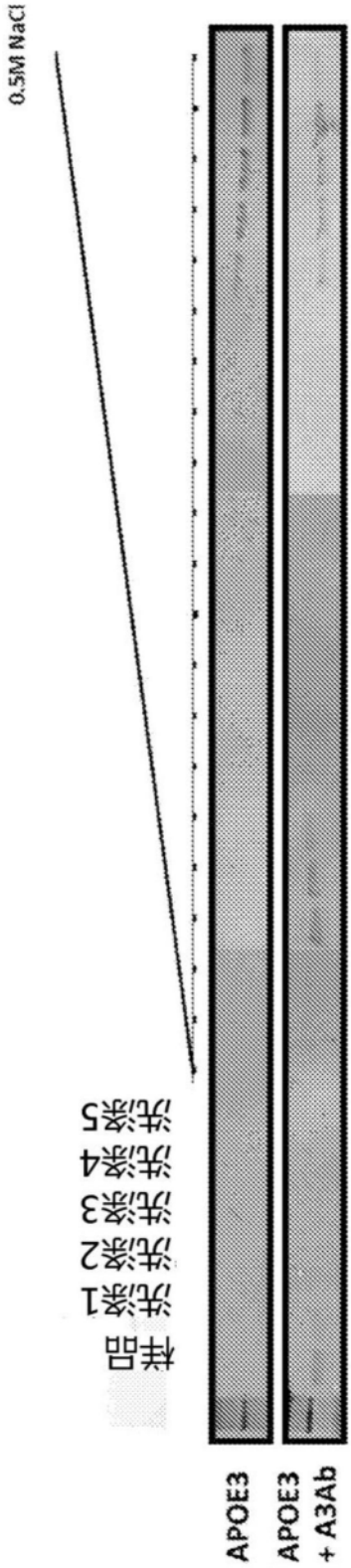


图14

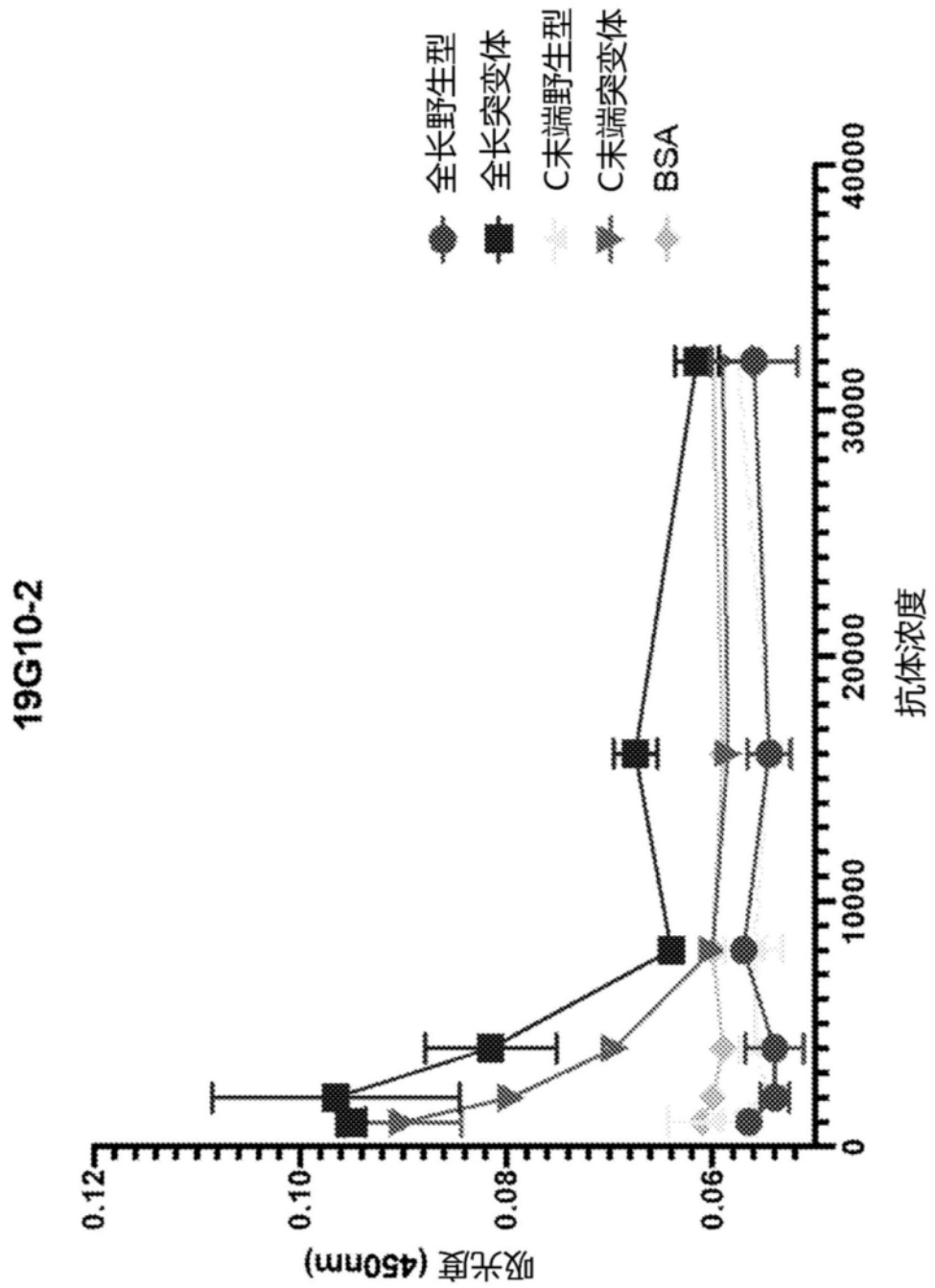

19G10-2
全长野生型
全长突变体
C末端野生型
C末端突变体
BSA
吸光度 (450nm)
0.12
0.10
0.08
0.06
0
10000
20000
30000
40000
抗体浓度

图15A

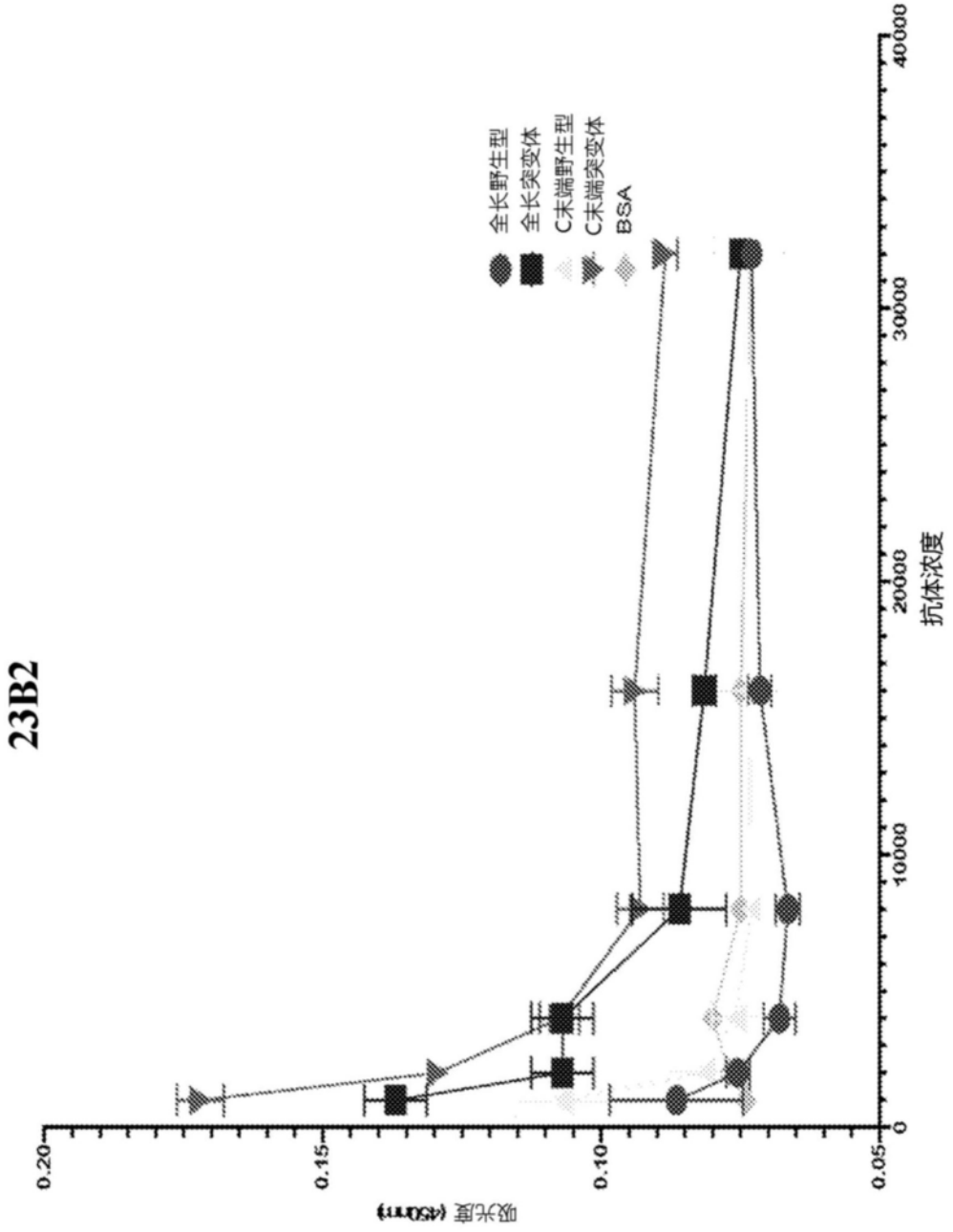

23B2
全长野生型
全长突变体
C末端野生型
C末端突变体
BSA
0.20
0.15
0.10
0.05
0
10000
20000
30000
40000
抗体浓度

图15B

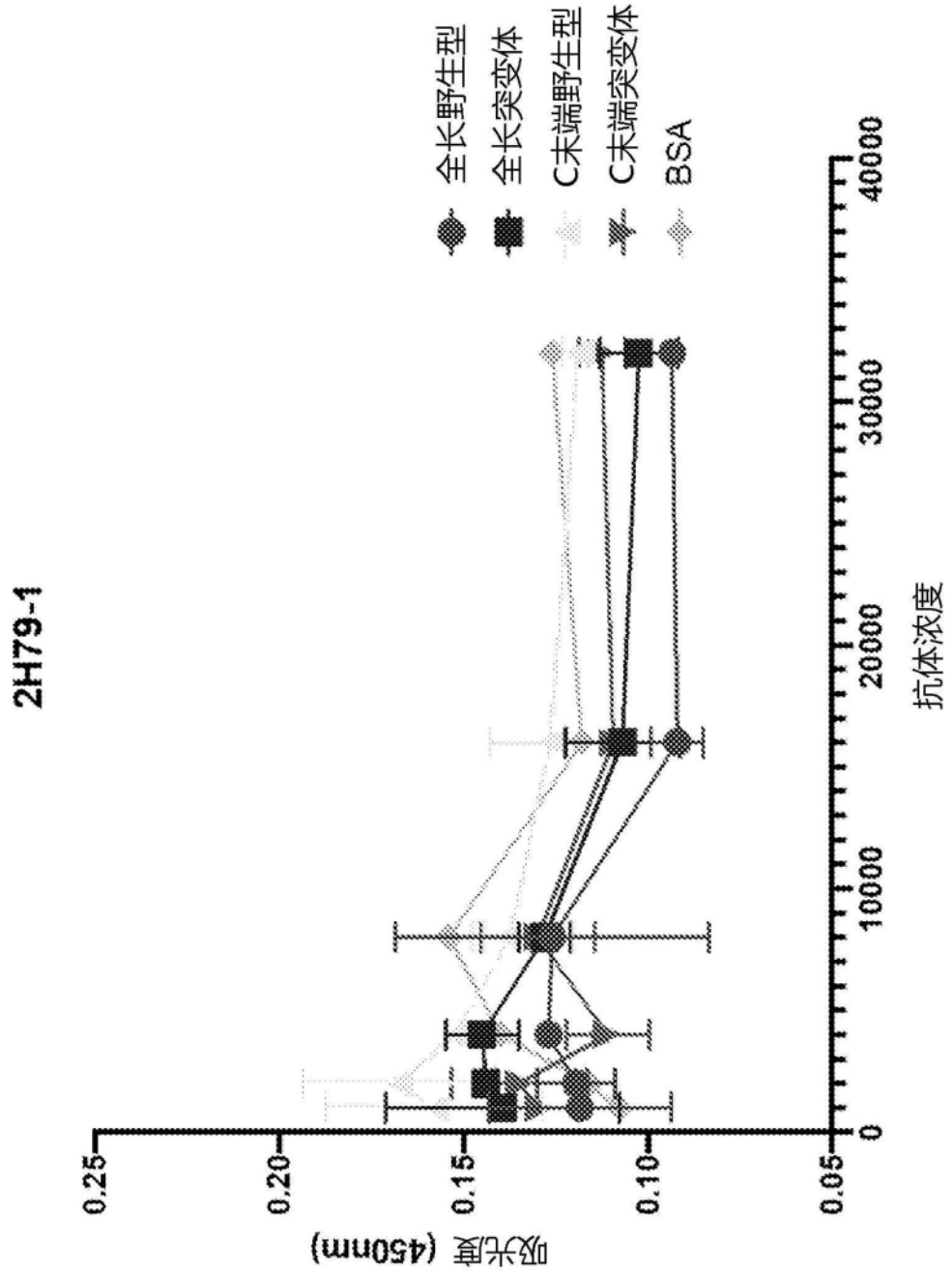

2H79-1
全长野生型
全长突变体
C末端野生型
C末端突变体
BSA
吸光度 (450nm)
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0
10000
20000
30000
40000
抗体浓度

图15C

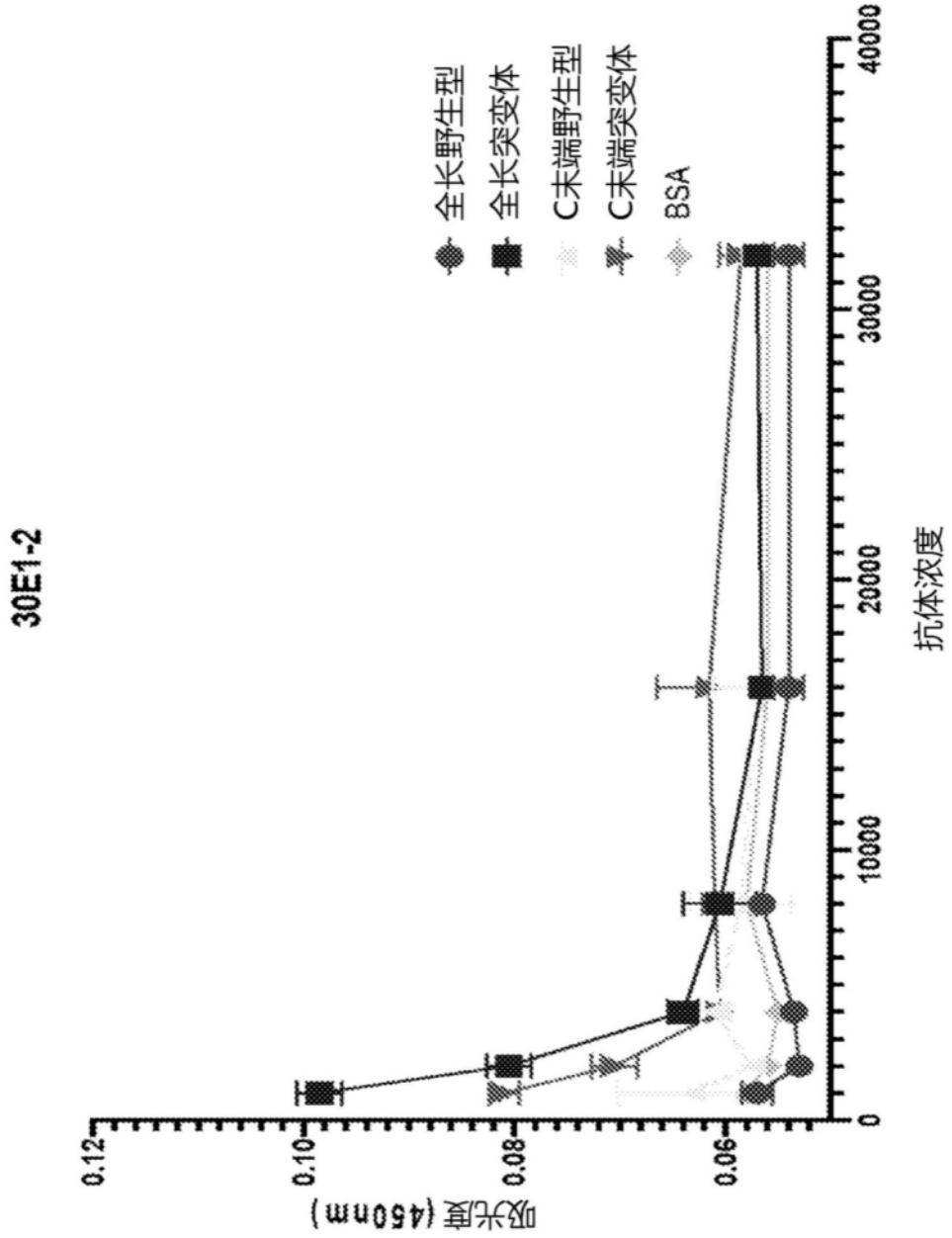

30E1-2
全长野生型
全长突变体
C末端野生型
C末端突变体
BSA
吸光度 (450nm)
0.12
0.10
0.08
0.06
0
10000
20000
30000
40000
抗体浓度

图15D

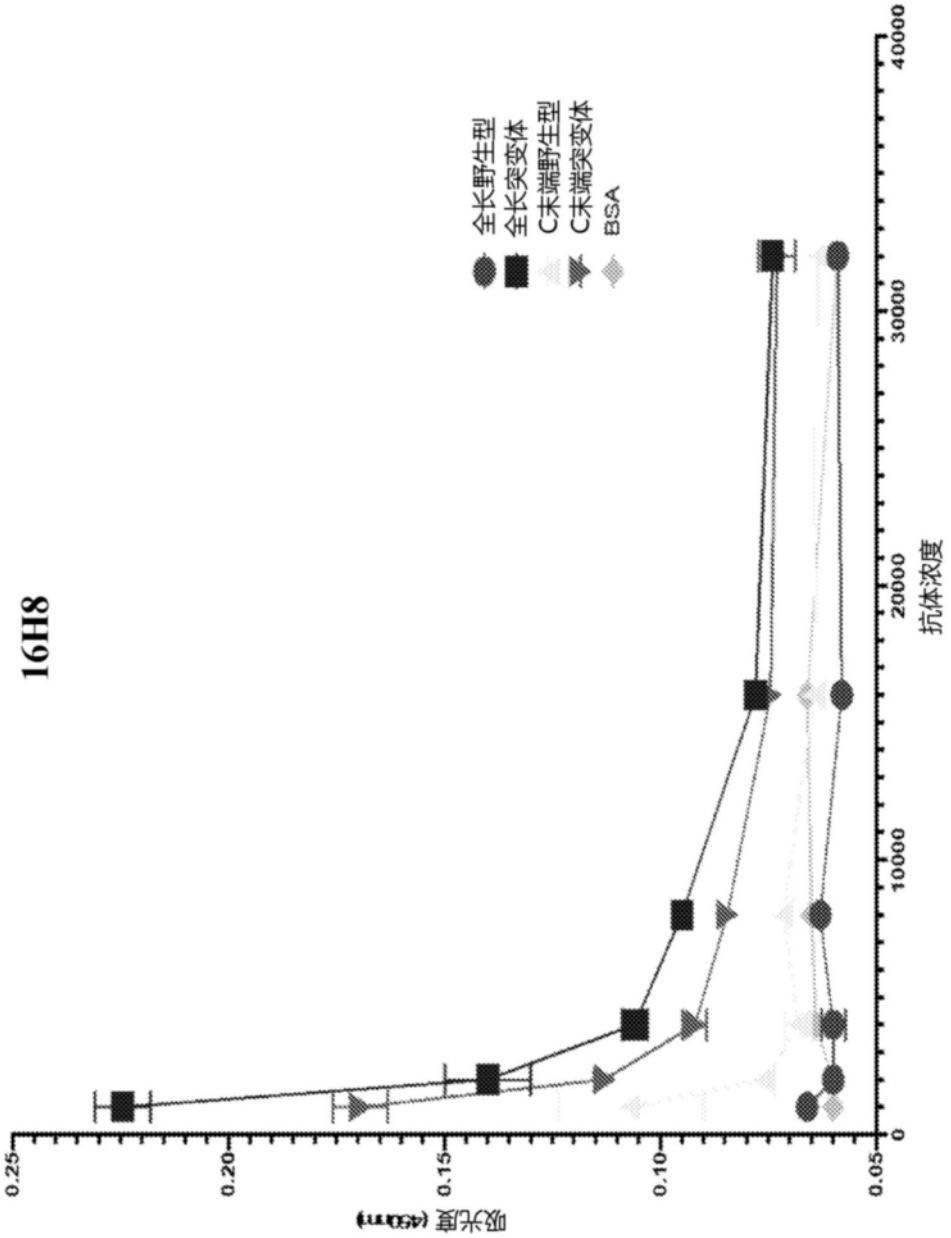

16H8
全长野生型
全长突变体
C末端野生型
C末端突变体
BSA
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0
10000
20000
30000
40000
抗体浓度

图15E

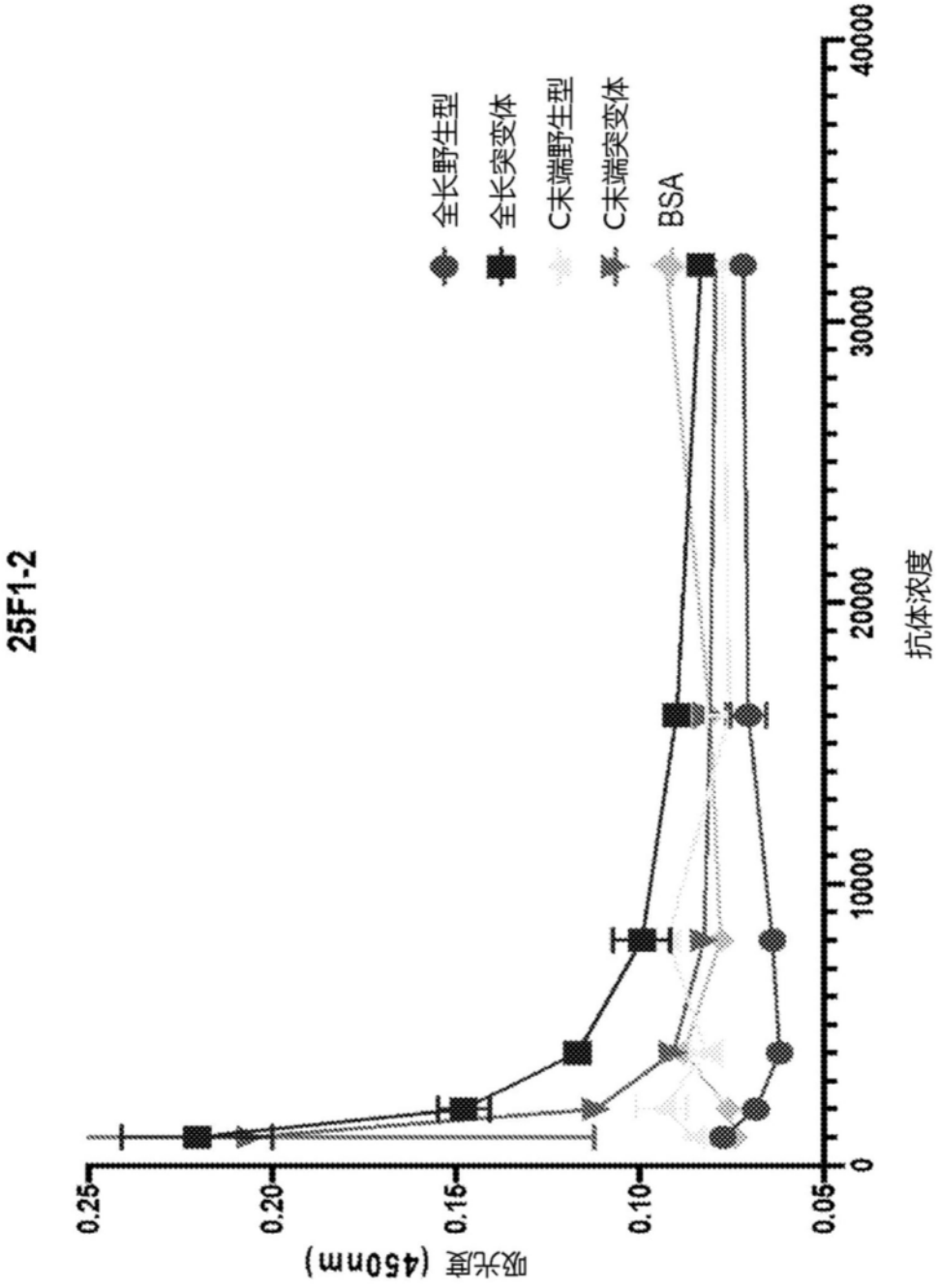

25F1-2
全长野生型
全长突变体
C末端野生型
C末端突变体
BSA
吸光度 (450nm)
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0
10000
20000
30000
40000
抗体浓度

图15F

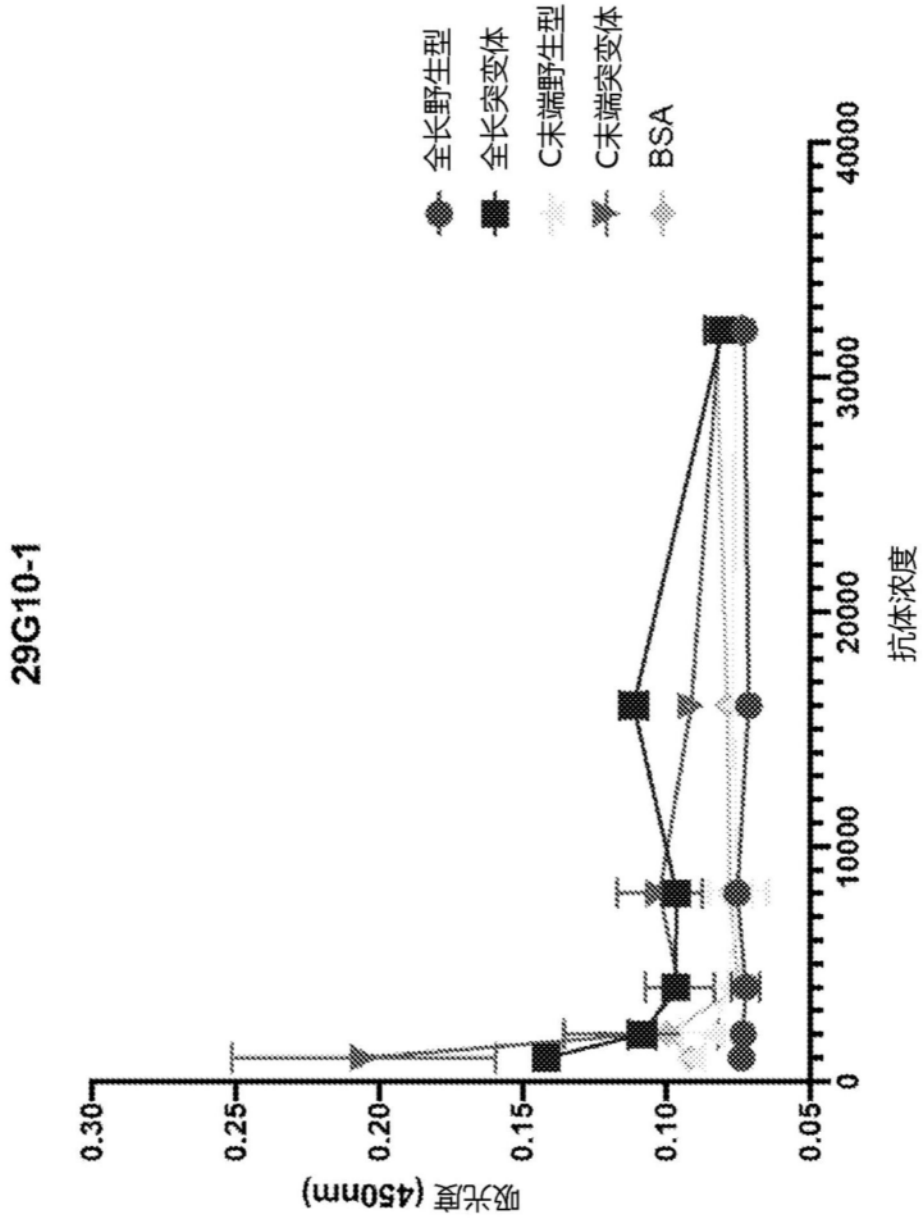

29G10-1
全长野生型
全长突变体
C末端野生型
C末端突变体
BSA
吸光度 (450nm)
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0
10000
20000
30000
40000
抗体浓度

图15G

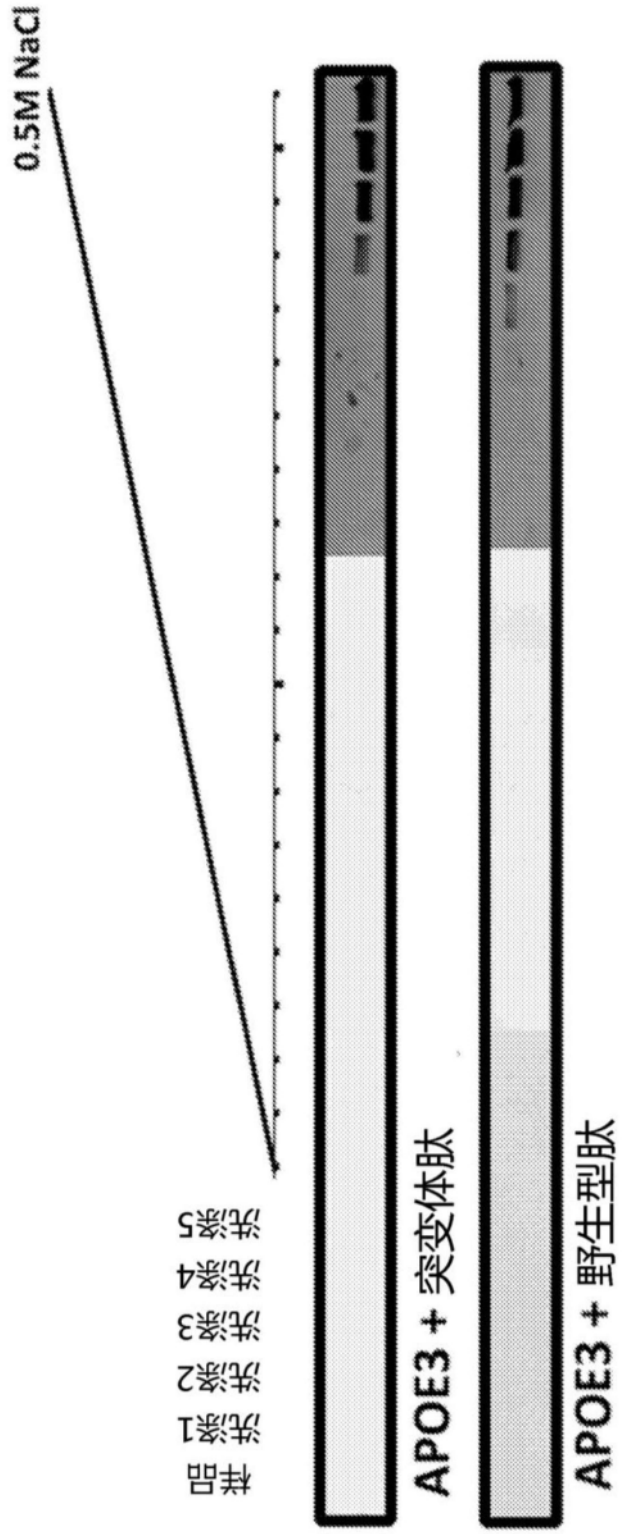


图16

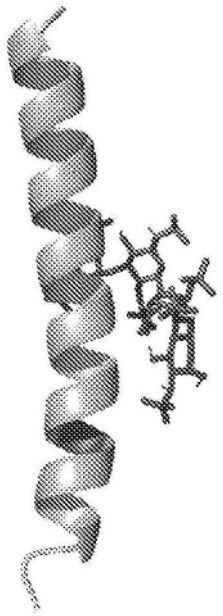


图17A

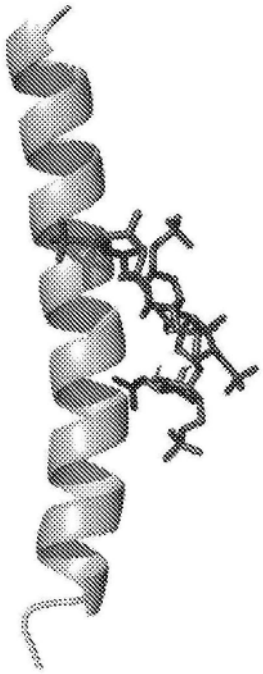


图17B

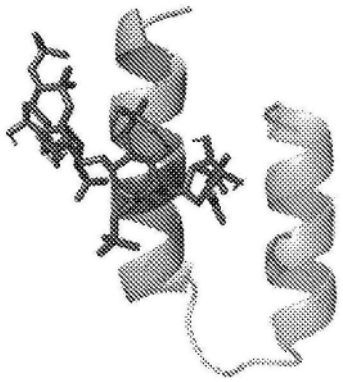


图17C

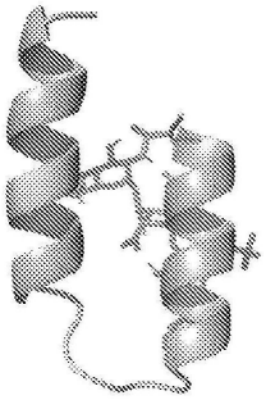


图17D

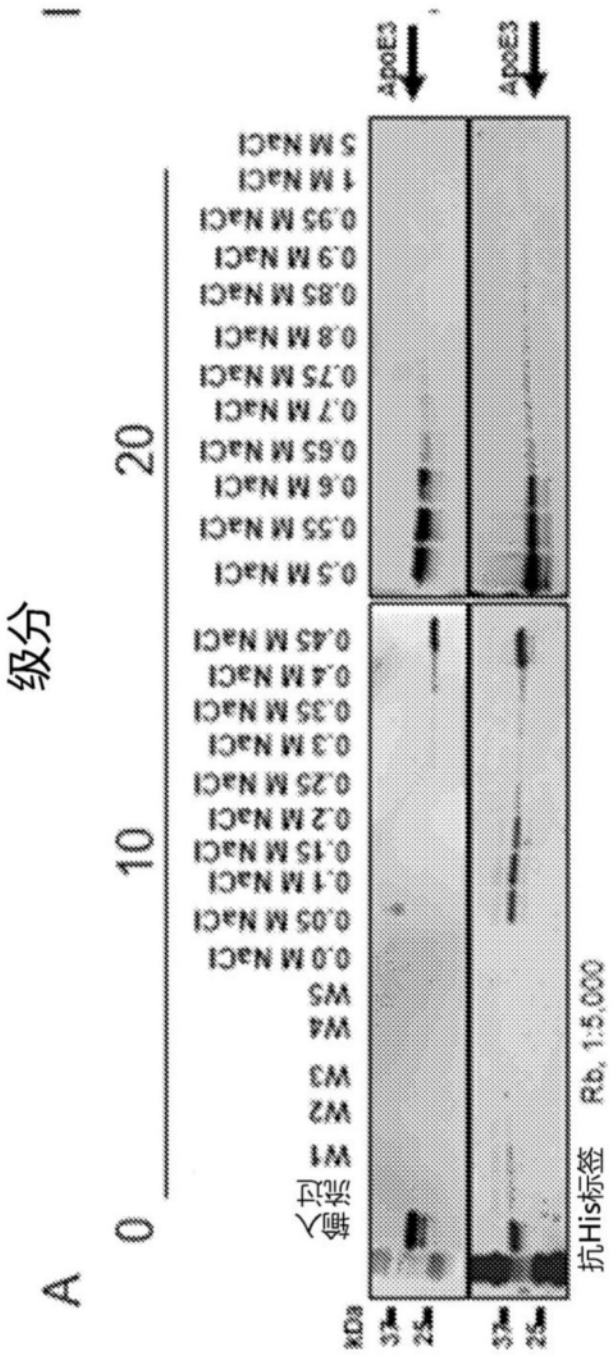

A
级分
0
10
20
上样
洗过
W1
W2
W3
W4
W5
0.0 M NaCl
0.05 M NaCl
0.1 M NaCl
0.15 M NaCl
0.2 M NaCl
0.25 M NaCl
0.3 M NaCl
0.35 M NaCl
0.4 M NaCl
0.45 M NaCl
0.5 M NaCl
0.55 M NaCl
0.6 M NaCl
0.65 M NaCl
0.7 M NaCl
0.75 M NaCl
0.8 M NaCl
0.85 M NaCl
0.9 M NaCl
0.95 M NaCl
1 M NaCl
5 M NaCl
ApoE3
ApoE3
抗His标签 Rb, 1:5,000
kDa
35
25
35
25

图18A

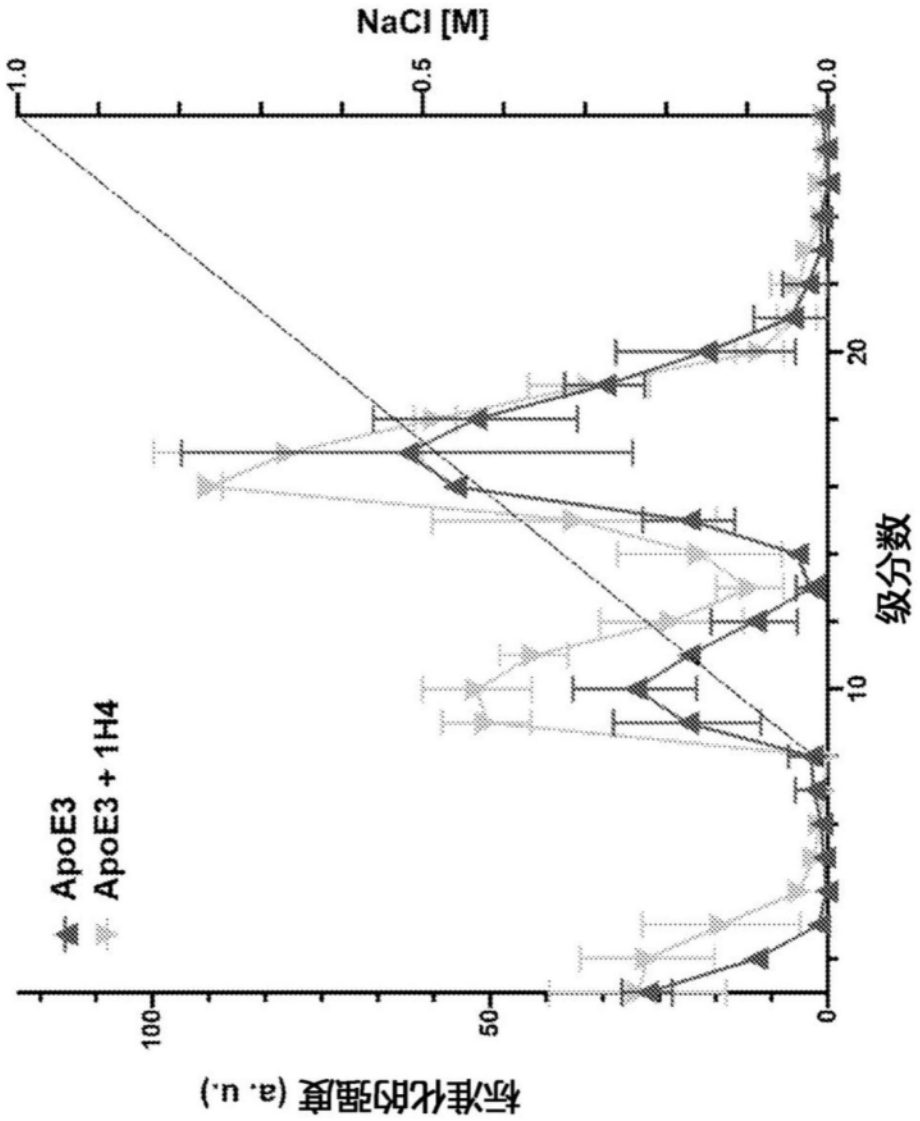


图18B

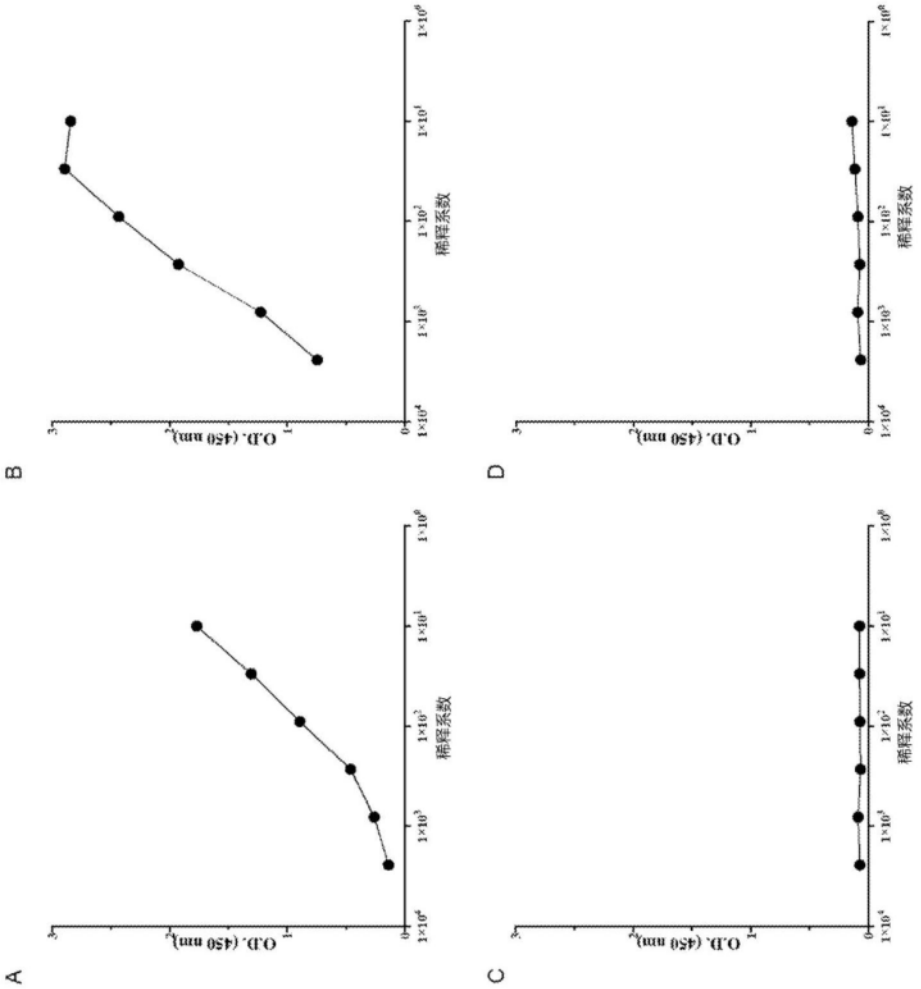


图19

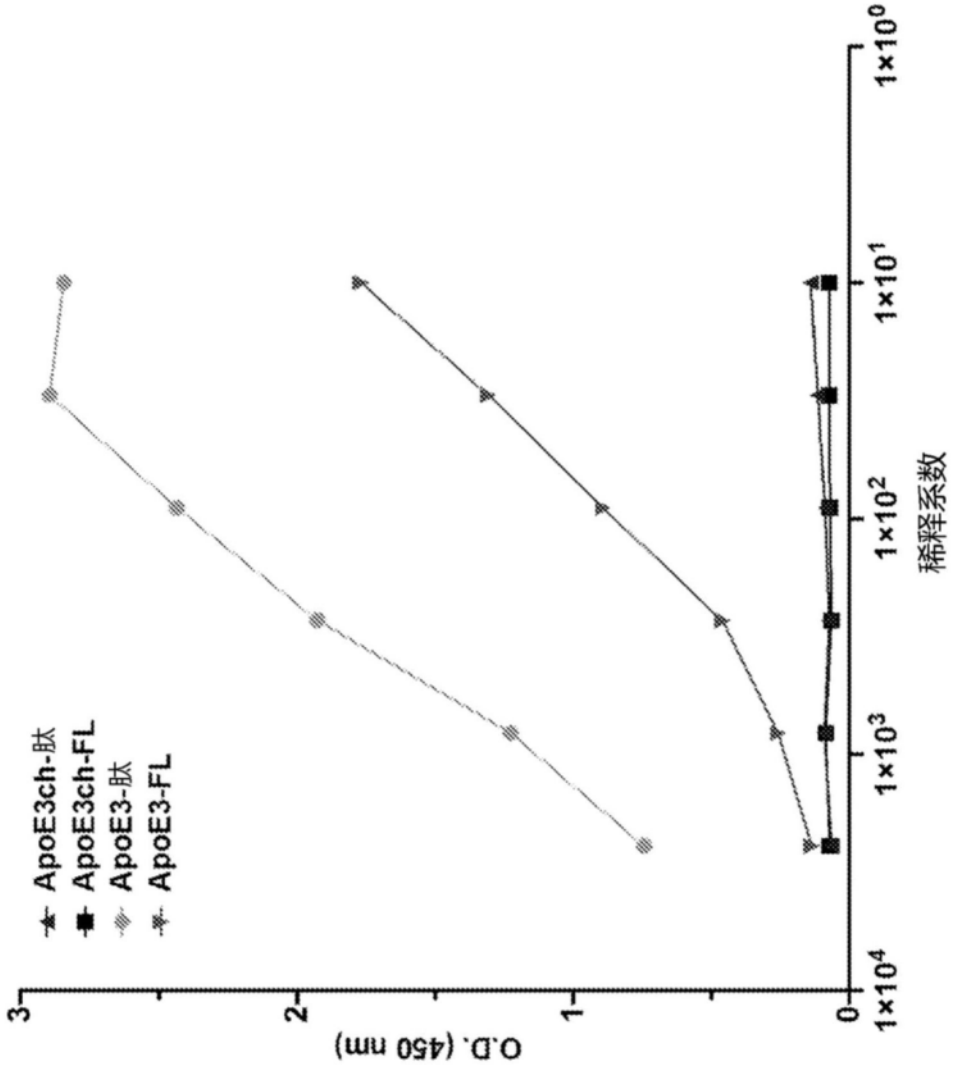

ApoE3ch-肽
ApoE3ch-FL
ApoE3-肽
ApoE3-FL
O.D. (450 nm)
稀释系数
0
1
2
3
1×10^0
1×10^1
1×10^2
1×10^3
1×10^4

图20

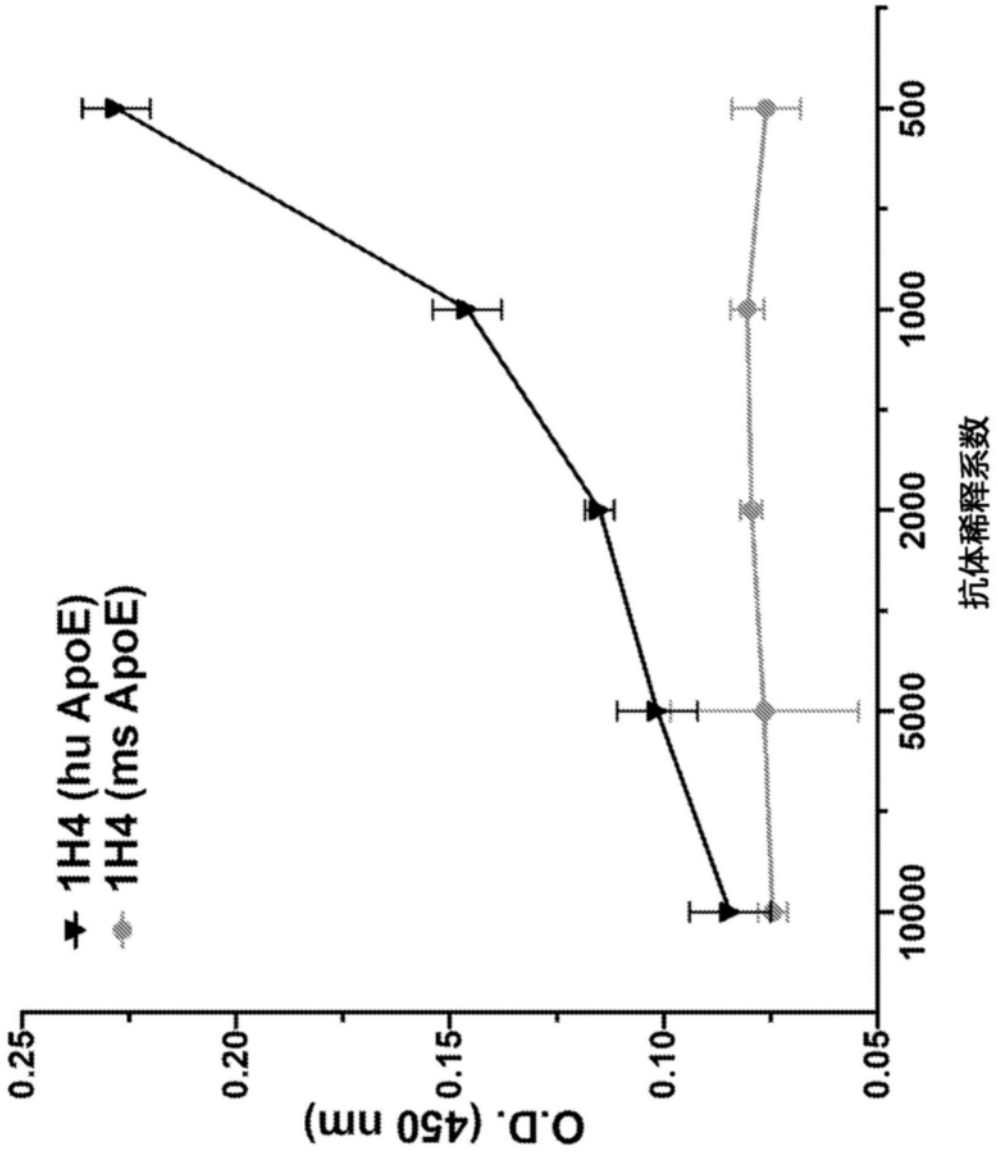

1H4 (hu ApoE)
1H4 (ms ApoE)
O.D. (450 nm)
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
500
1000
2000
5000
10000
抗体稀释系数

图21

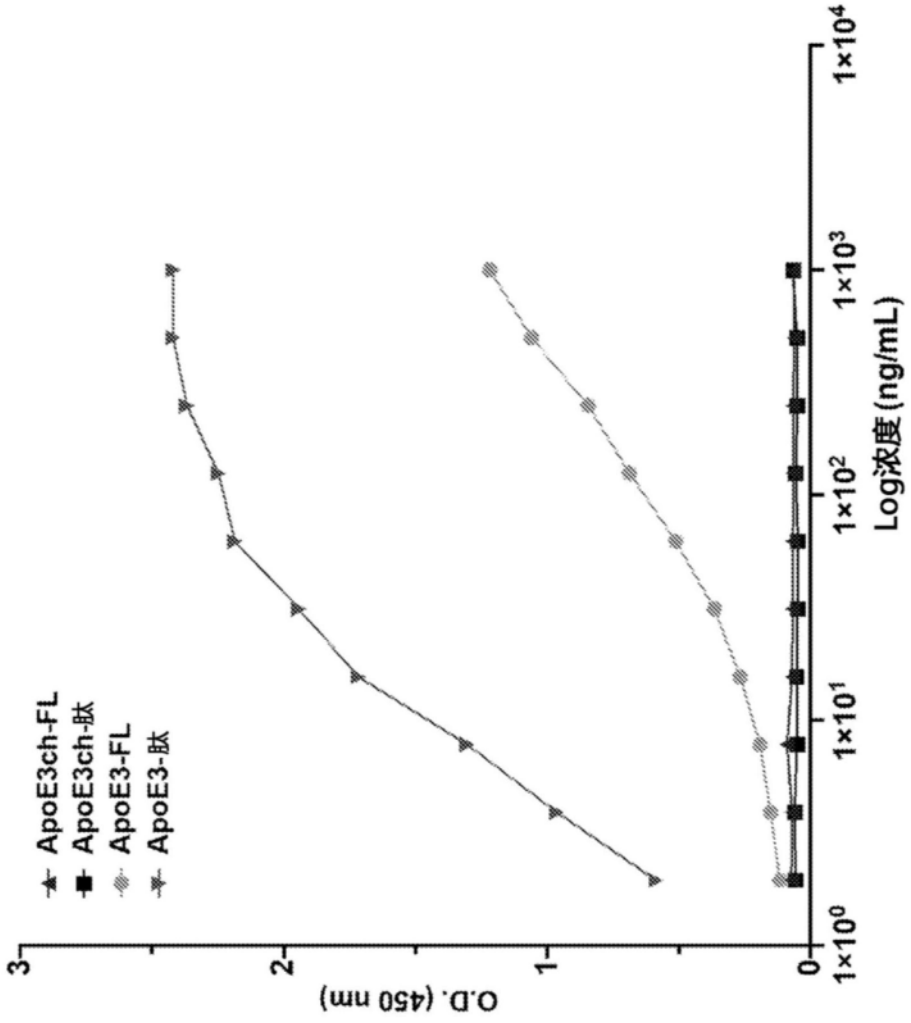

ApoE3ch-FL
ApoE3ch-肽
ApoE3-FL
ApoE3-肽
O.D. (450 nm)
0
1
2
3
1×10⁰
1×10¹
1×10²
1×10³
1×10⁴
Log浓度 (ng/mL)

图22

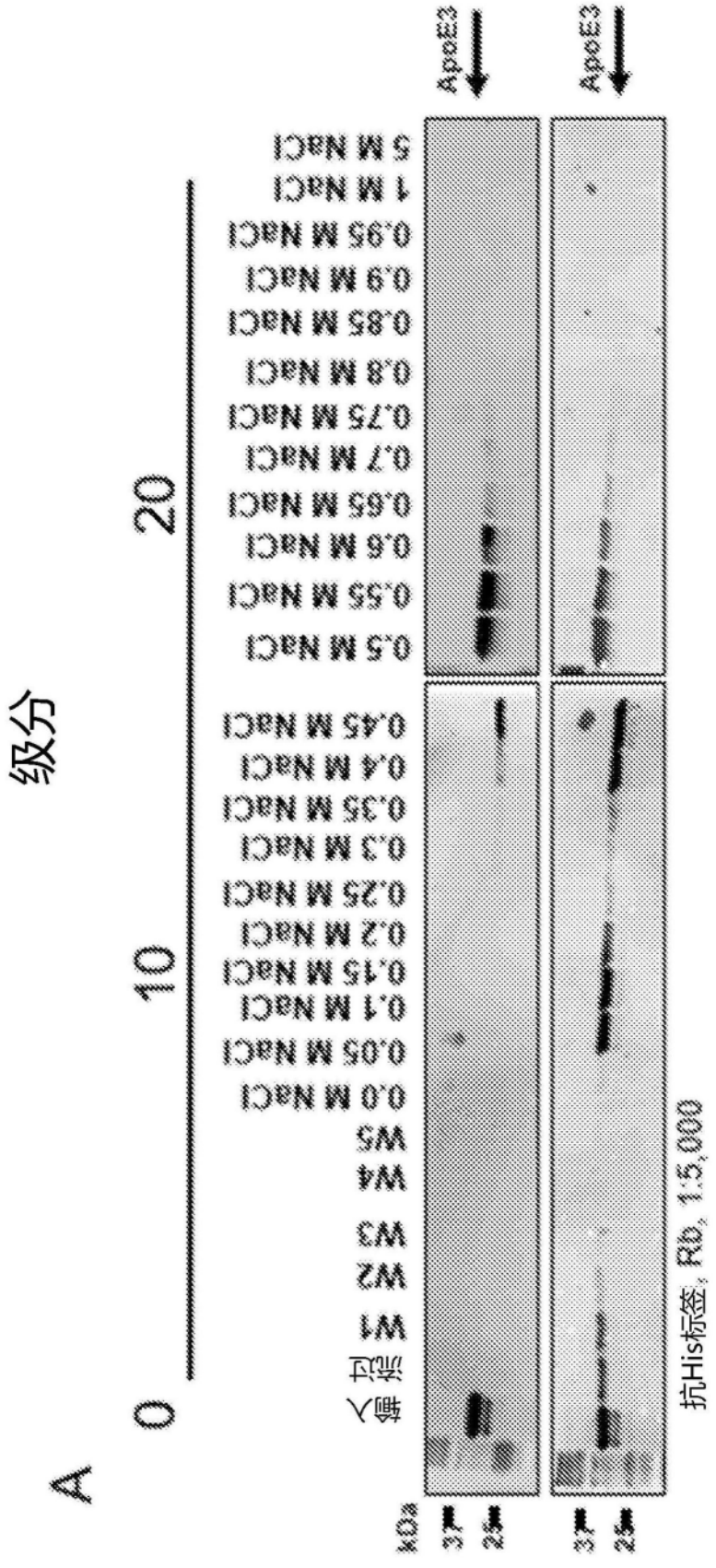

A
0
10
20
级分
输入
流过
W1
W2
W3
W4
W5
0.0 M NaCl
0.05 M NaCl
0.1 M NaCl
0.15 M NaCl
0.2 M NaCl
0.25 M NaCl
0.3 M NaCl
0.35 M NaCl
0.4 M NaCl
0.45 M NaCl
0.5 M NaCl
0.55 M NaCl
0.6 M NaCl
0.65 M NaCl
0.7 M NaCl
0.75 M NaCl
0.8 M NaCl
0.85 M NaCl
0.9 M NaCl
0.95 M NaCl
1 M NaCl
5 M NaCl
ApoE3
ApoE3
kDa
35
25
35
25
抗His标签, Rb, 1:5,000

图23A

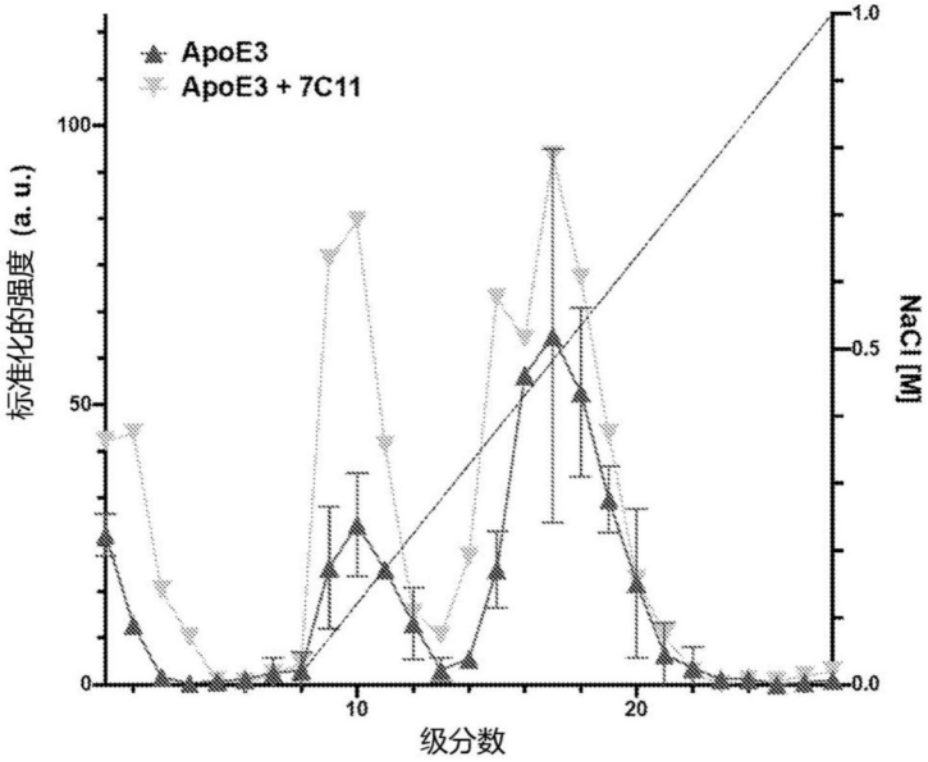


图23B

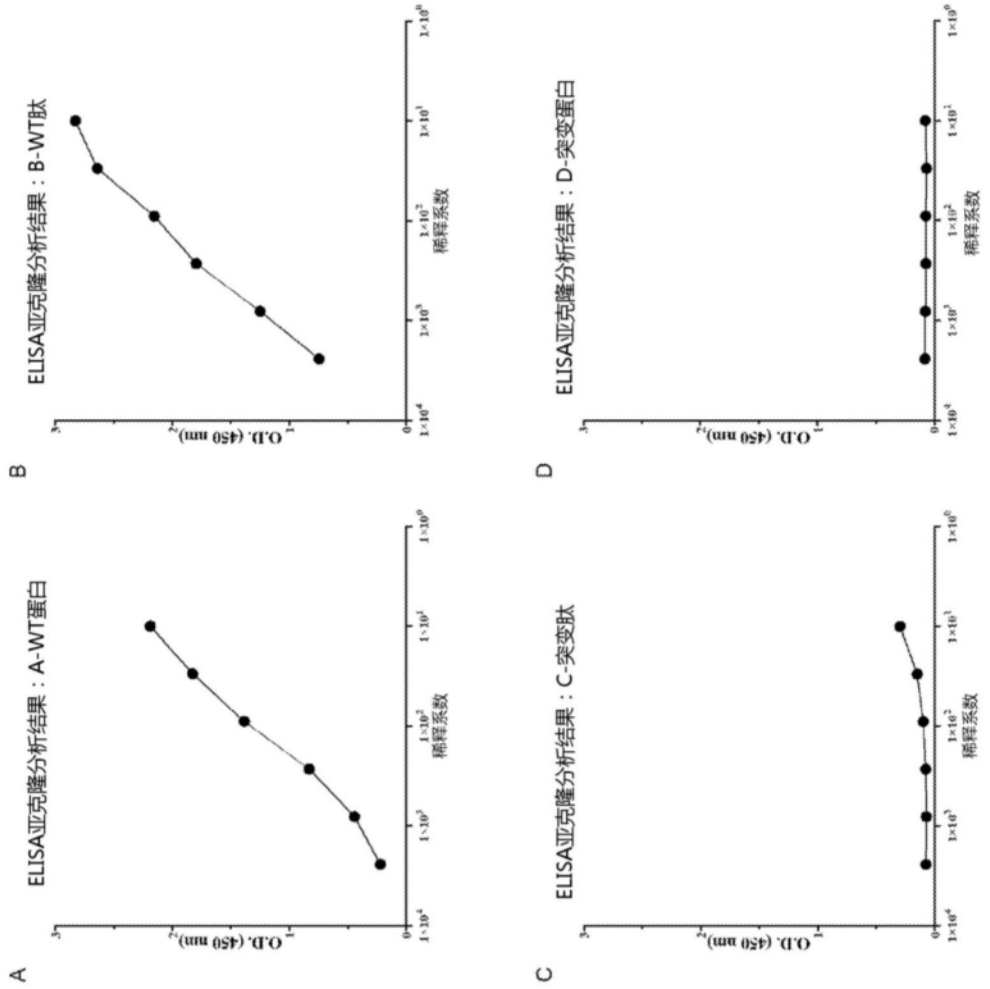

A
ELISA亚克隆分析结果：A-WT蛋白
B
ELISA亚克隆分析结果：B-WT肽
C
ELISA亚克隆分析结果：C-突变肽
D
ELISA亚克隆分析结果：D-突变蛋白
O.D.(450 nm)
稀释系数

图24

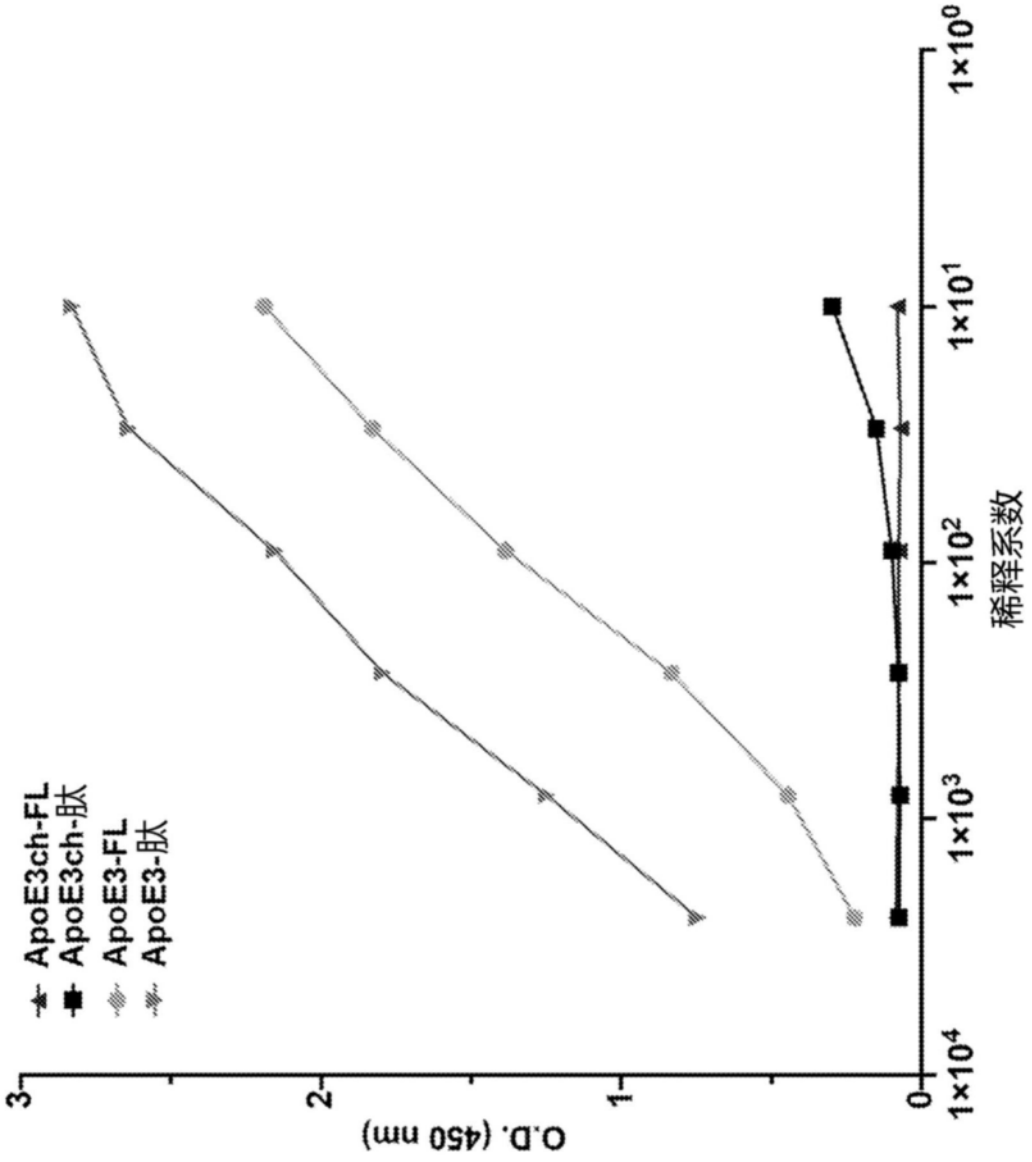

ApoE3ch-FL
ApoE3ch-肽
ApoE3-FL
ApoE3-肽
O.D. (450 nm)
稀释系数
3
2
1
0
1×10^0
1×10^1
1×10^2
1×10^3
1×10^4

图25

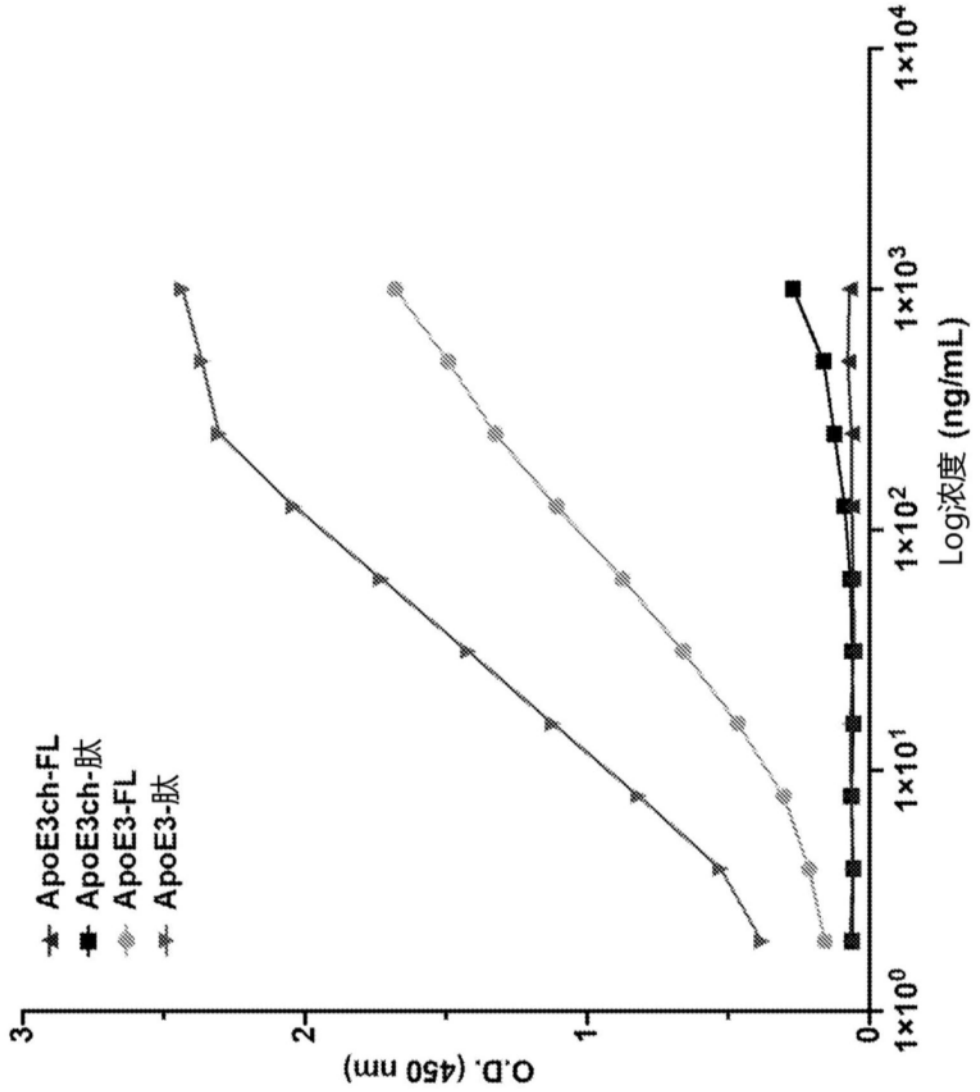

ApoE3ch-FL
ApoE3ch-肽
ApoE3-FL
ApoE3-肽
O.D. (450 nm)
0
1
2
3
1×10⁰
1×10¹
1×10²
1×10³
1×10⁴
Log浓度 (ng/mL)

图26

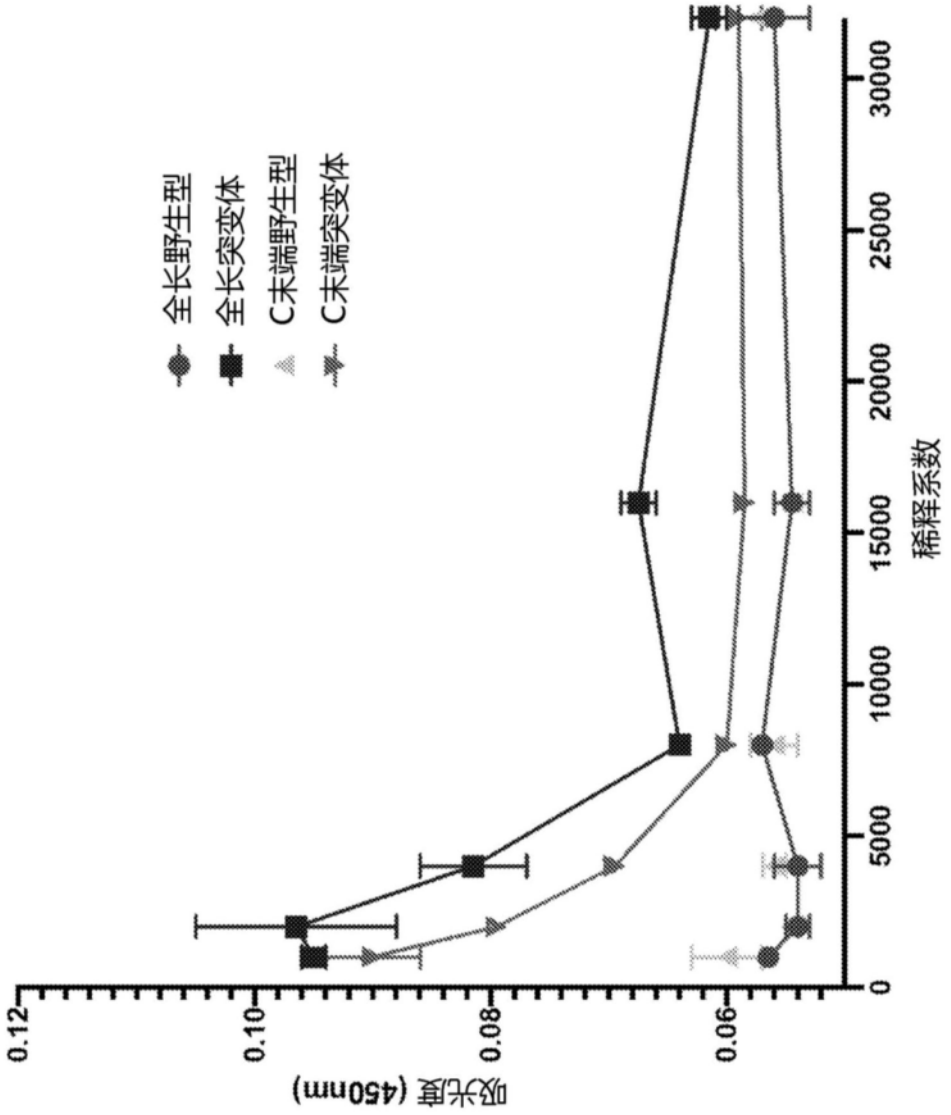

全长野生型
全长突变体
C末端野生型
C末端突变体
吸光度 (450nm)
0.12
0.10
0.08
0.06
0
5000
10000
15000
20000
25000
30000
稀释系数

图27

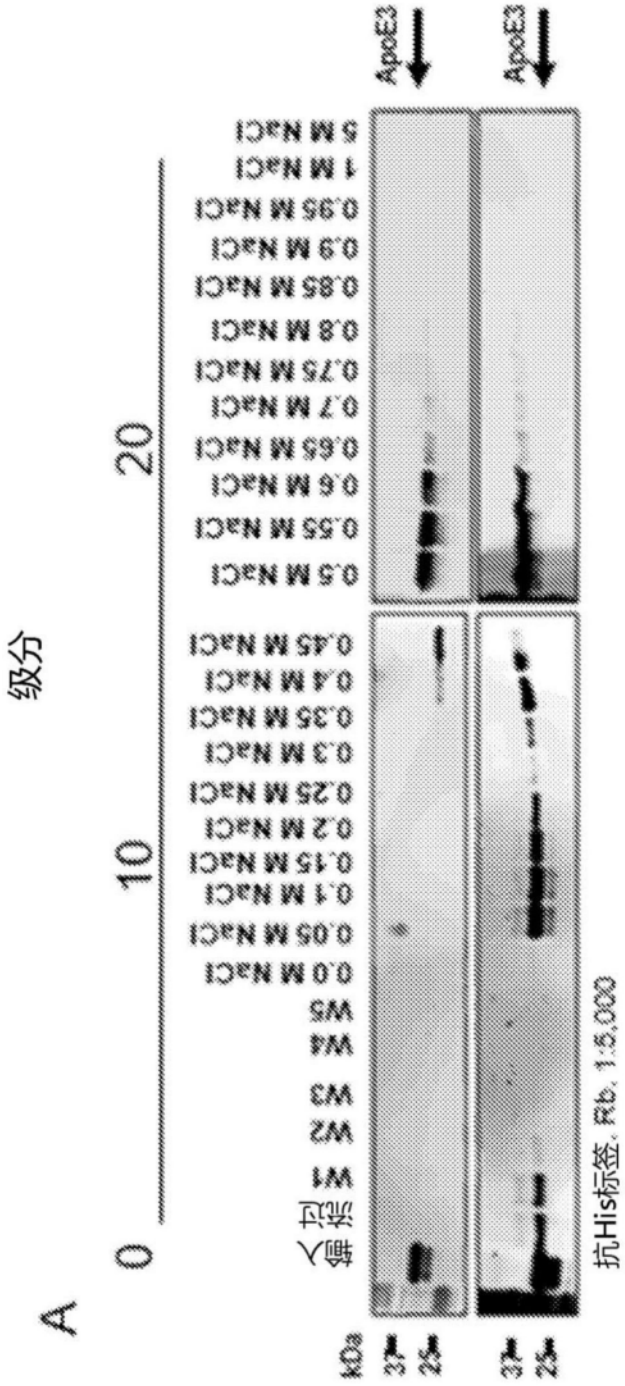

A
级分
0
10
20
载入
洗过
W1
W2
W3
W4
W5
0.0 M NaCl
0.05 M NaCl
0.1 M NaCl
0.15 M NaCl
0.2 M NaCl
0.25 M NaCl
0.3 M NaCl
0.35 M NaCl
0.4 M NaCl
0.45 M NaCl
0.5 M NaCl
0.55 M NaCl
0.6 M NaCl
0.65 M NaCl
0.7 M NaCl
0.75 M NaCl
0.8 M NaCl
0.85 M NaCl
0.9 M NaCl
0.95 M NaCl
1 M NaCl
5 M NaCl
ApoE3
ApoE3
kDa
31
24
31
24
抗His标签, Rb, 1:5,000

图28A

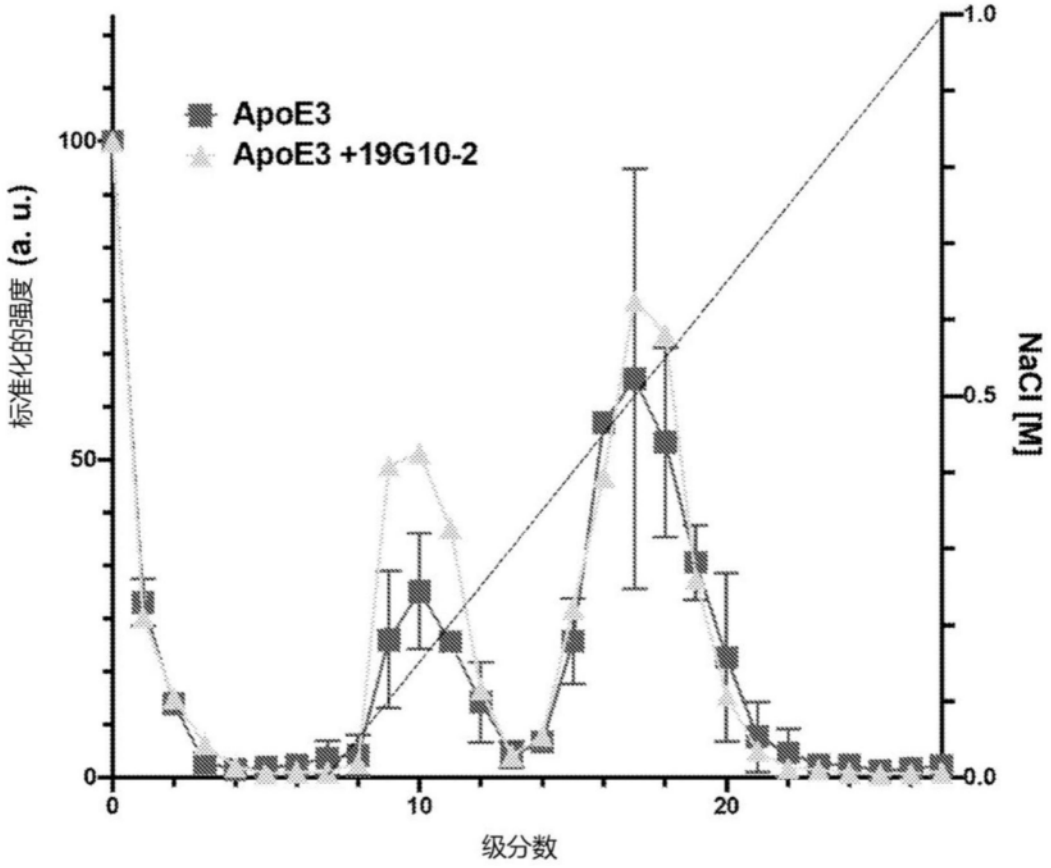


图28B

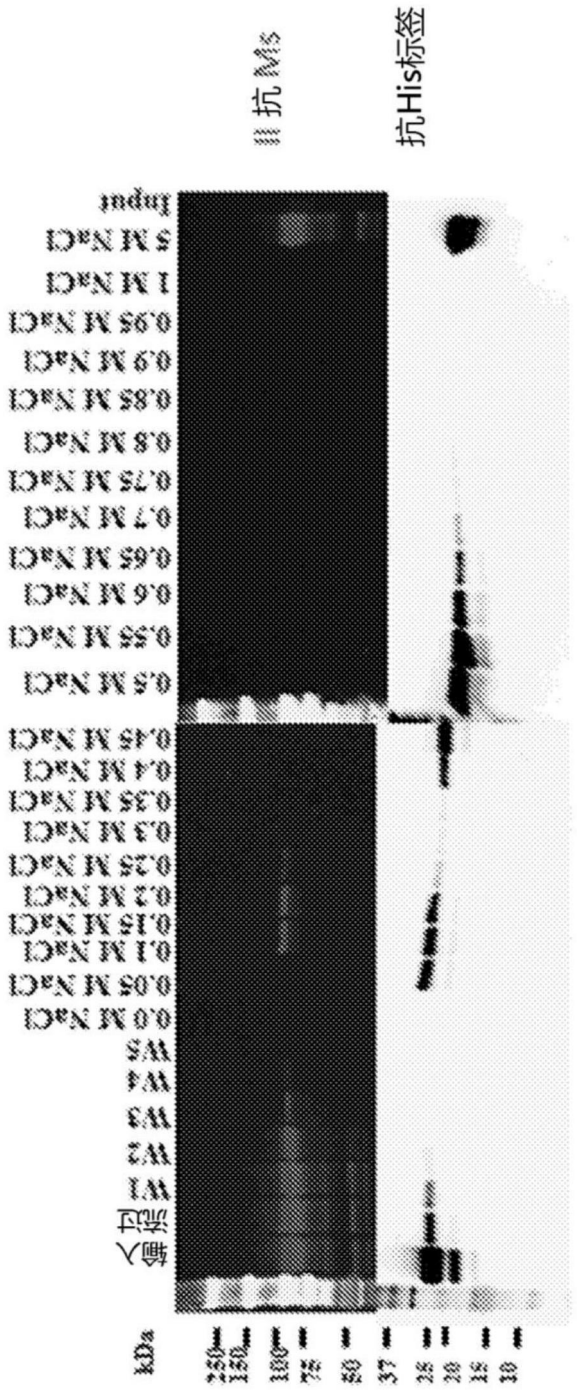

抗 Ms
抗His标签
Input
5 M NaCl
1 M NaCl
0.95 M NaCl
0.9 M NaCl
0.85 M NaCl
0.8 M NaCl
0.75 M NaCl
0.7 M NaCl
0.65 M NaCl
0.6 M NaCl
0.55 M NaCl
0.5 M NaCl
0.45 M NaCl
0.4 M NaCl
0.35 M NaCl
0.3 M NaCl
0.25 M NaCl
0.2 M NaCl
0.15 M NaCl
0.1 M NaCl
0.05 M NaCl
0.0 M NaCl
W5
W4
W3
W2
W1
流过
输入
kDa
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10

图29

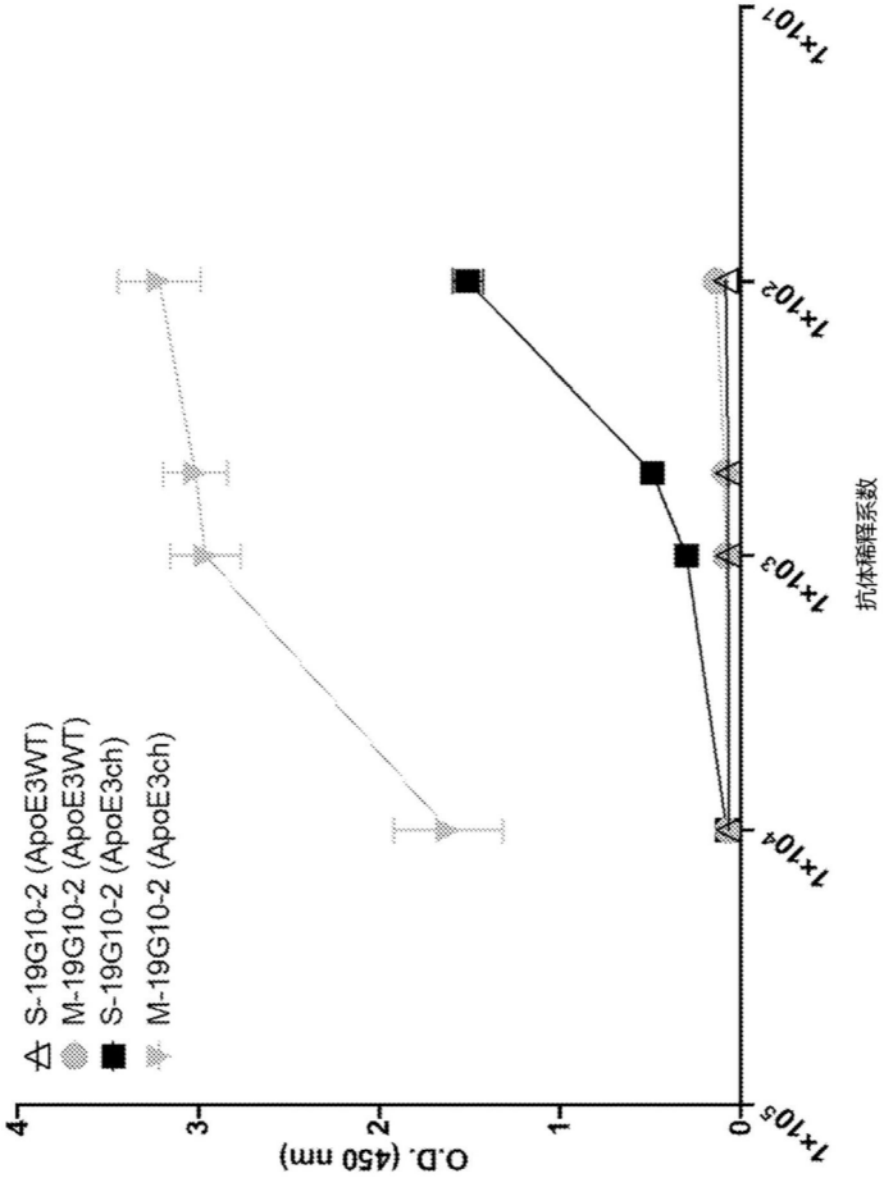

S-19G10-2 (ApoE3WT)
M-19G10-2 (ApoE3WT)
S-19G10-2 (ApoE3ch)
M-19G10-2 (ApoE3ch)
O.D. (450 nm)
0
1
2
3
4
抗体稀释系数
1×10⁵
1×10⁴
1×10³
1×10²
1×10¹

图30

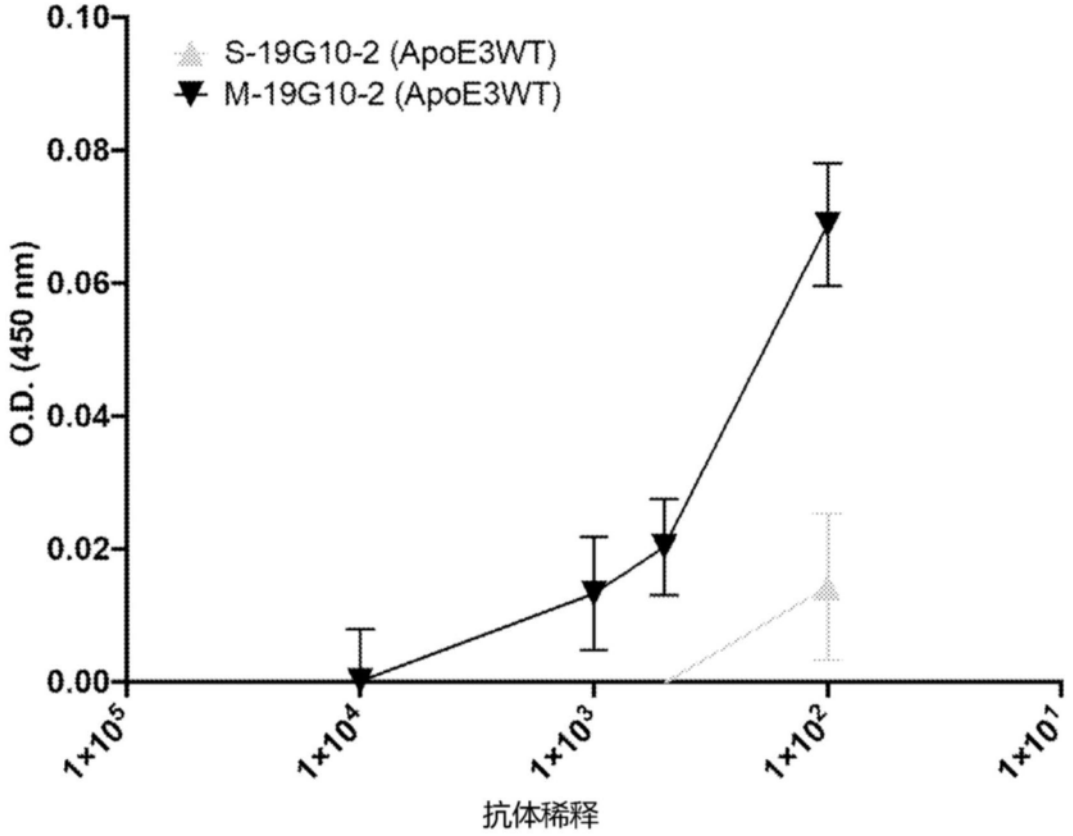

0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
O.D. (450 nm)
S-19G10-2 (ApoE3WT)
M-19G10-2 (ApoE3WT)
1×10^5
1×10^4
1×10^3
1×10^2
1×10^1
抗体稀释

图31

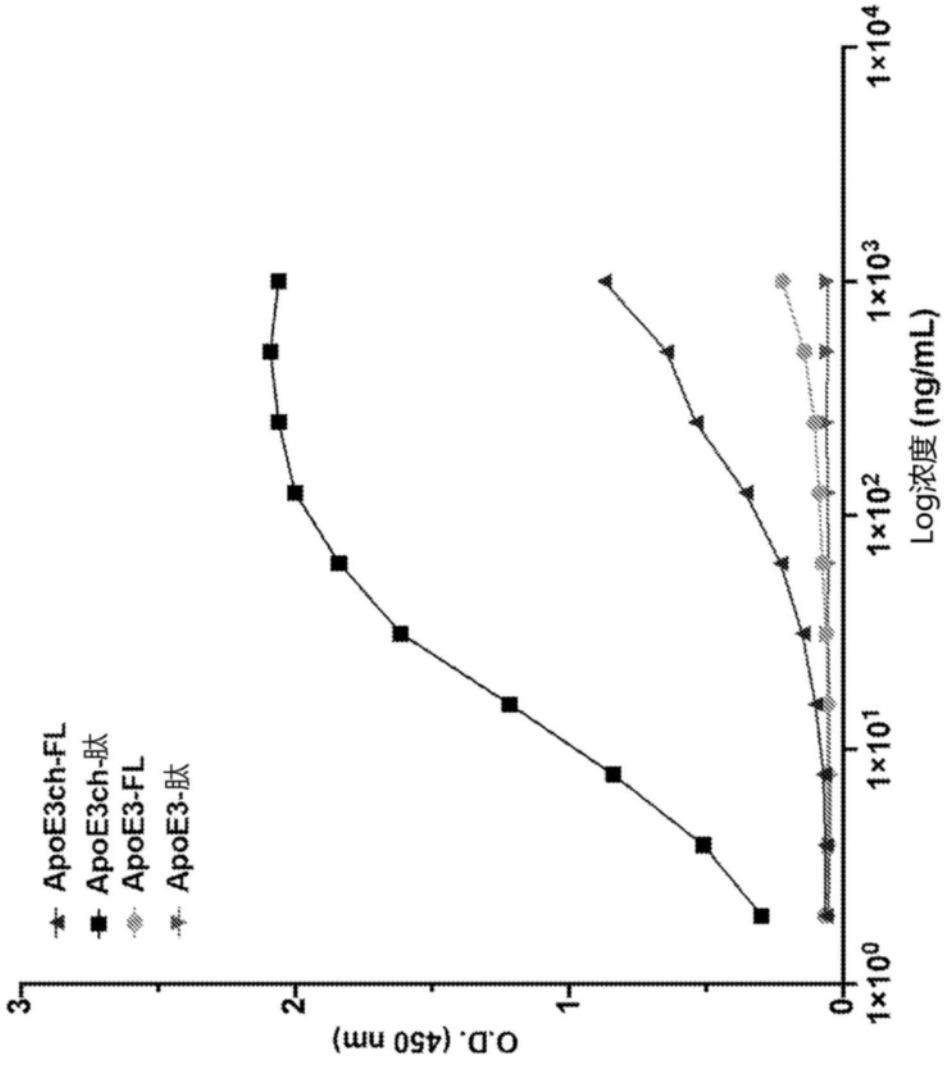

ApoE3ch-FL
ApoE3ch-肽
ApoE3-FL
ApoE3-肽
O.D. (450 nm)
Log浓度 (ng/mL)
0
1
2
3
1×10⁰
1×10¹
1×10²
1×10³
1×10⁴

图32

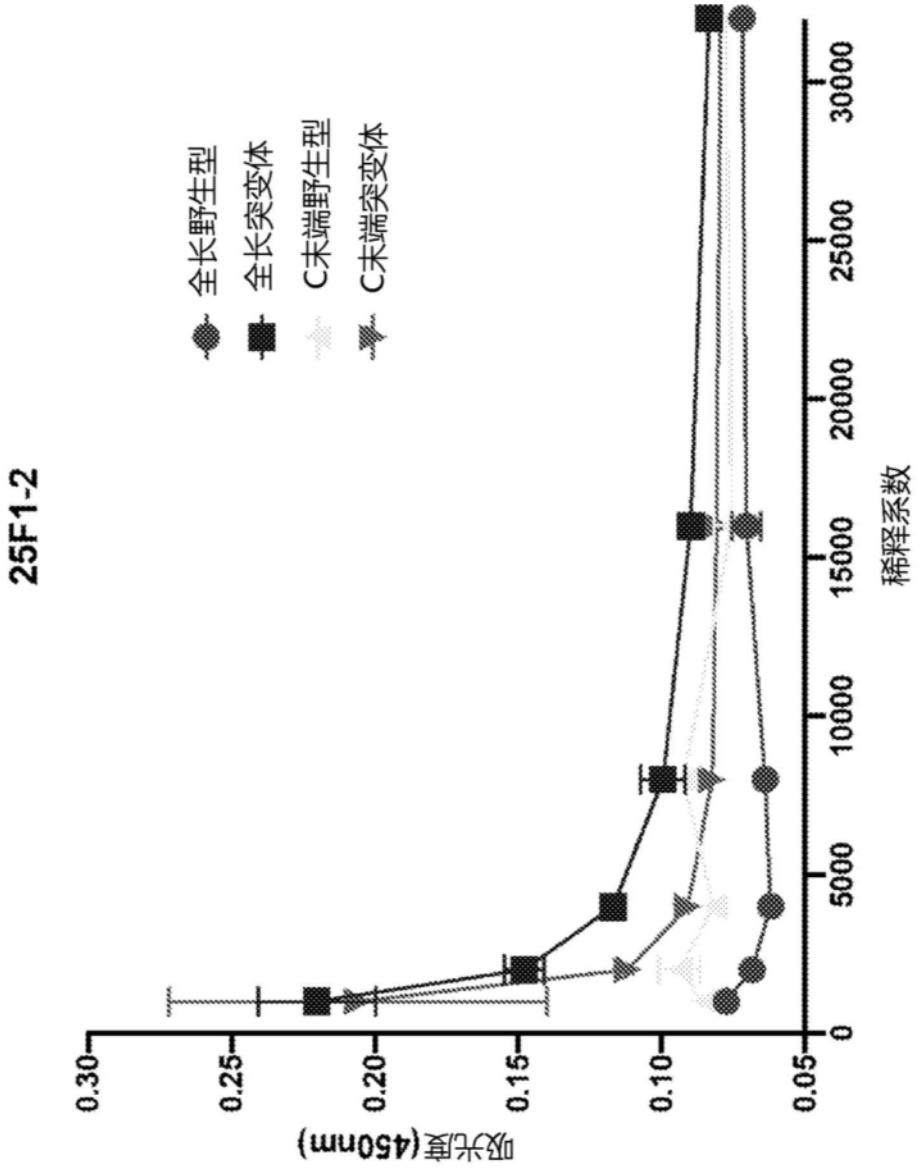

25F1-2
全长野生型
全长突变体
C末端野生型
C末端突变体
吸光度(450nm)
稀释系数
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0
5000
10000
15000
20000
25000
30000

图33

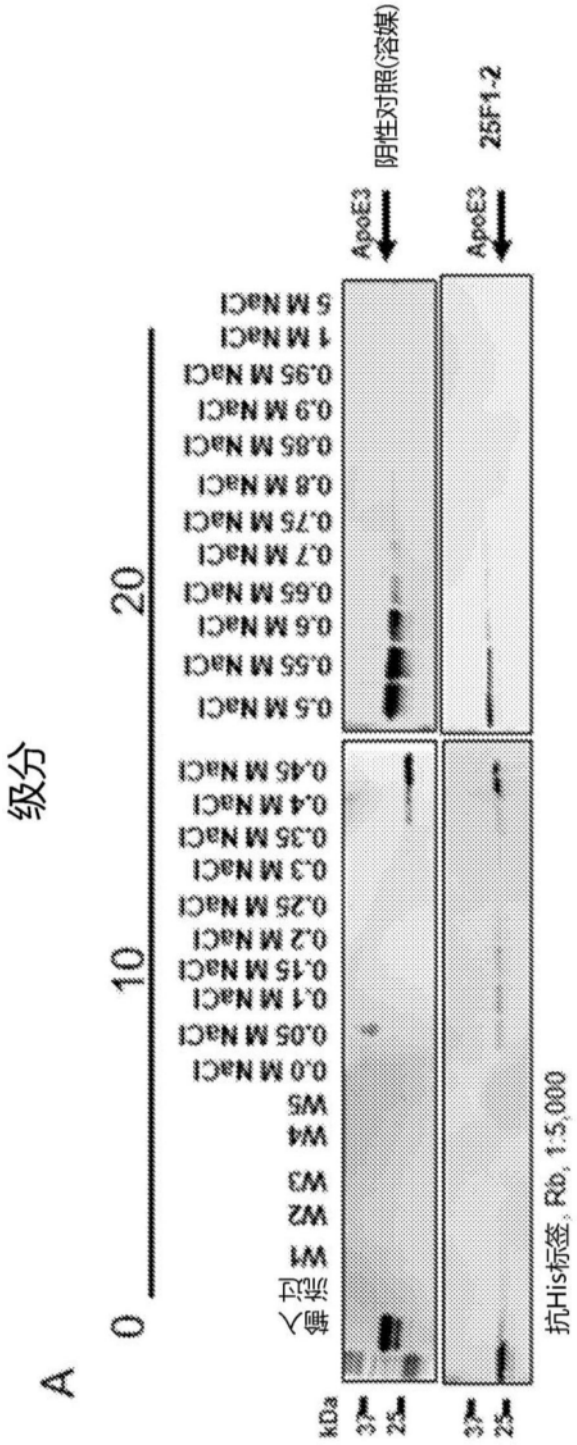

A
级分
0
10
20
载入
流过
W1
W2
W3
W4
W5
0.0 M NaCl
0.05 M NaCl
0.1 M NaCl
0.15 M NaCl
0.2 M NaCl
0.25 M NaCl
0.3 M NaCl
0.35 M NaCl
0.4 M NaCl
0.45 M NaCl
0.5 M NaCl
0.55 M NaCl
0.6 M NaCl
0.65 M NaCl
0.7 M NaCl
0.75 M NaCl
0.8 M NaCl
0.85 M NaCl
0.9 M NaCl
0.95 M NaCl
1 M NaCl
5 M NaCl
ApoE3
阴性对照(溶媒)
ApoE3
25F1-2
kDa
35
25
35
25
抗His标签, Rb, 1:5,000

图34A

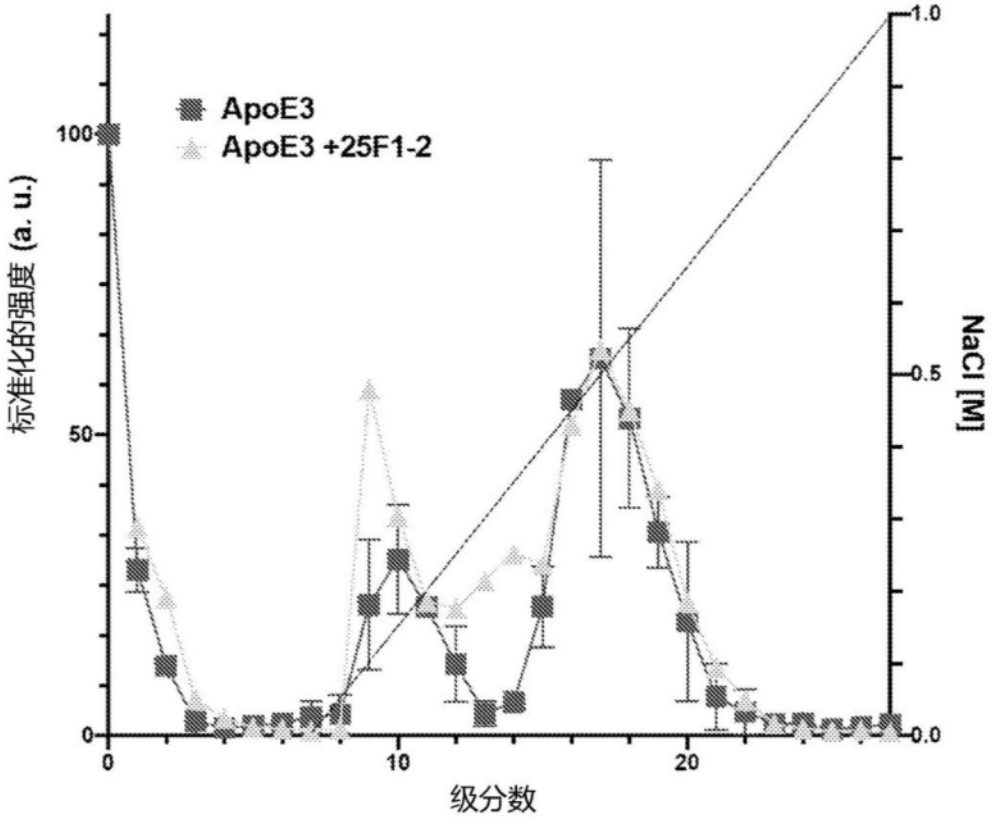


图34B

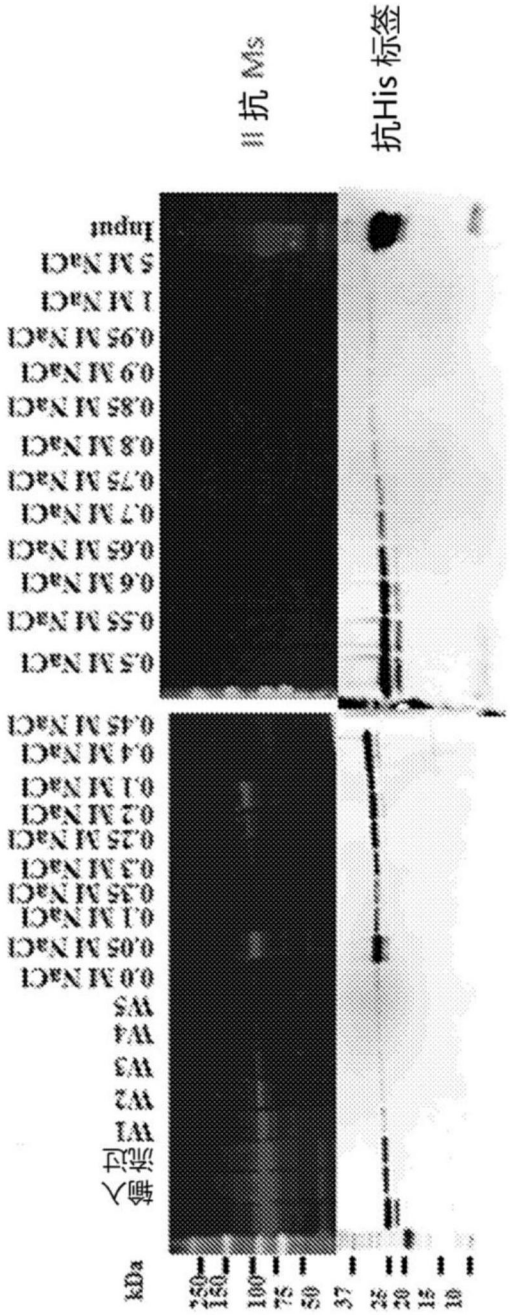

抗 Ms
抗His 标签
上样
5 M NaCl
1 M NaCl
0.95 M NaCl
0.9 M NaCl
0.85 M NaCl
0.8 M NaCl
0.75 M NaCl
0.7 M NaCl
0.65 M NaCl
0.6 M NaCl
0.55 M NaCl
0.5 M NaCl
0.45 M NaCl
0.4 M NaCl
0.1 M NaCl
0.2 M NaCl
0.25 M NaCl
0.3 M NaCl
0.35 M NaCl
0.1 M NaCl
0.05 M NaCl
0.0 M NaCl
W5
W4
W3
W2
W1
流过
载入
kDa
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10

图35

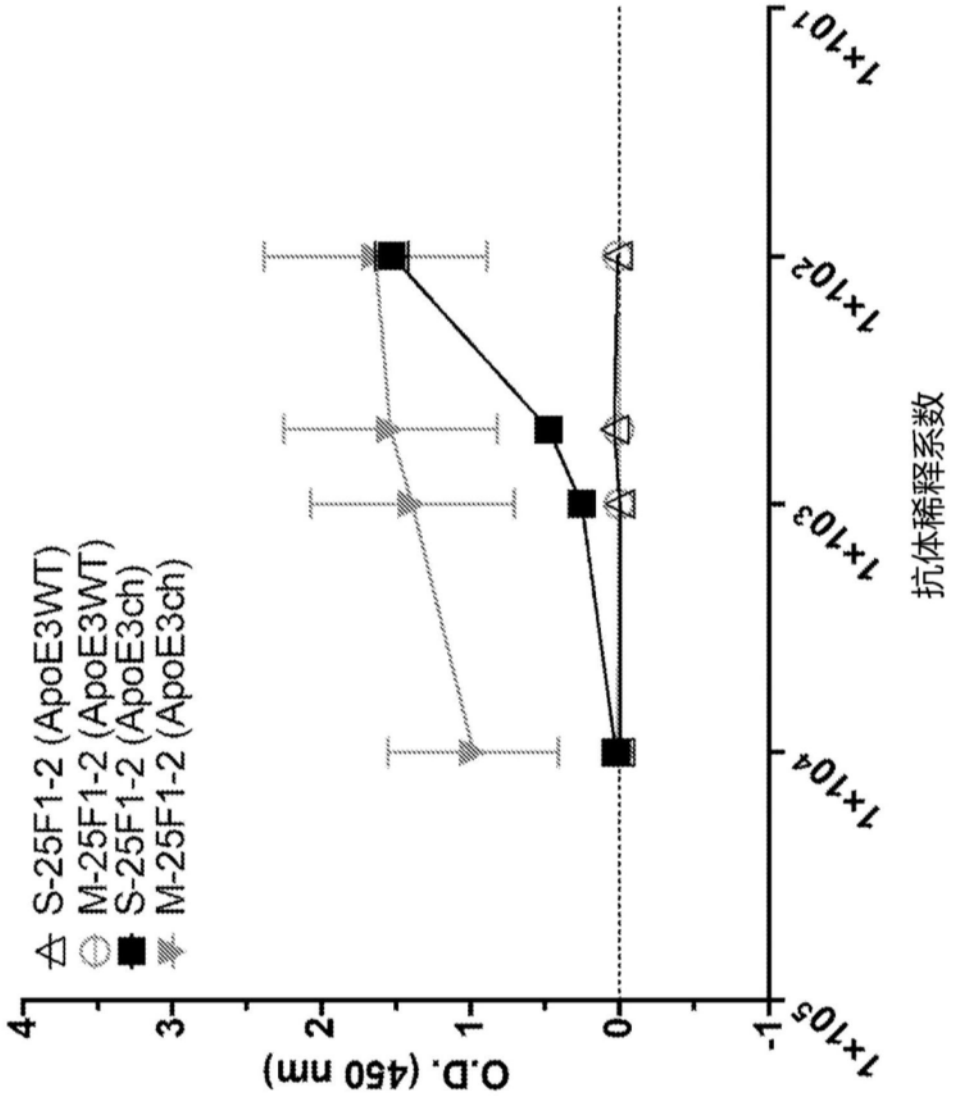

S-25F1-2 (ApoE3WT)
M-25F1-2 (ApoE3WT)
S-25F1-2 (ApoE3ch)
M-25F1-2 (ApoE3ch)
O.D. (450 nm)
4
3
2
1
0
-1
1×10⁷
1×10²
1×10³
1×10⁴
1×10⁵
抗体稀释系数

图36

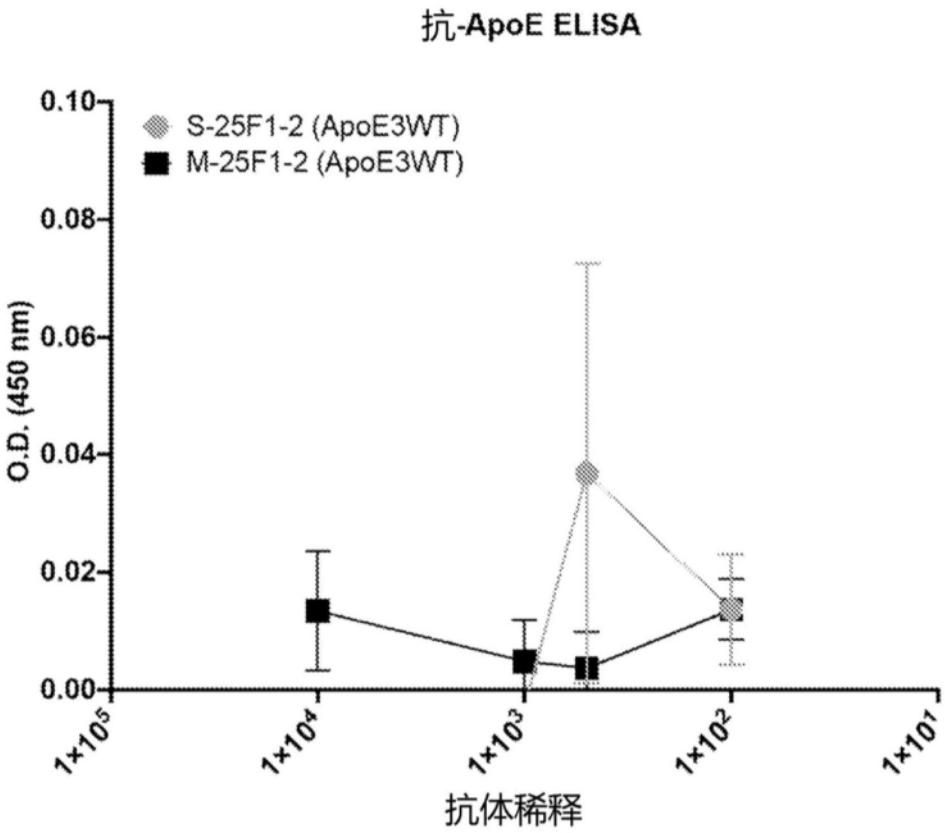

抗-ApoE ELISA
S-25F1-2 (ApoE3WT)
M-25F1-2 (ApoE3WT)
O.D. (450 nm)
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
1×10⁵
1×10⁴
1×10³
1×10²
1×10¹
抗体稀释

图37

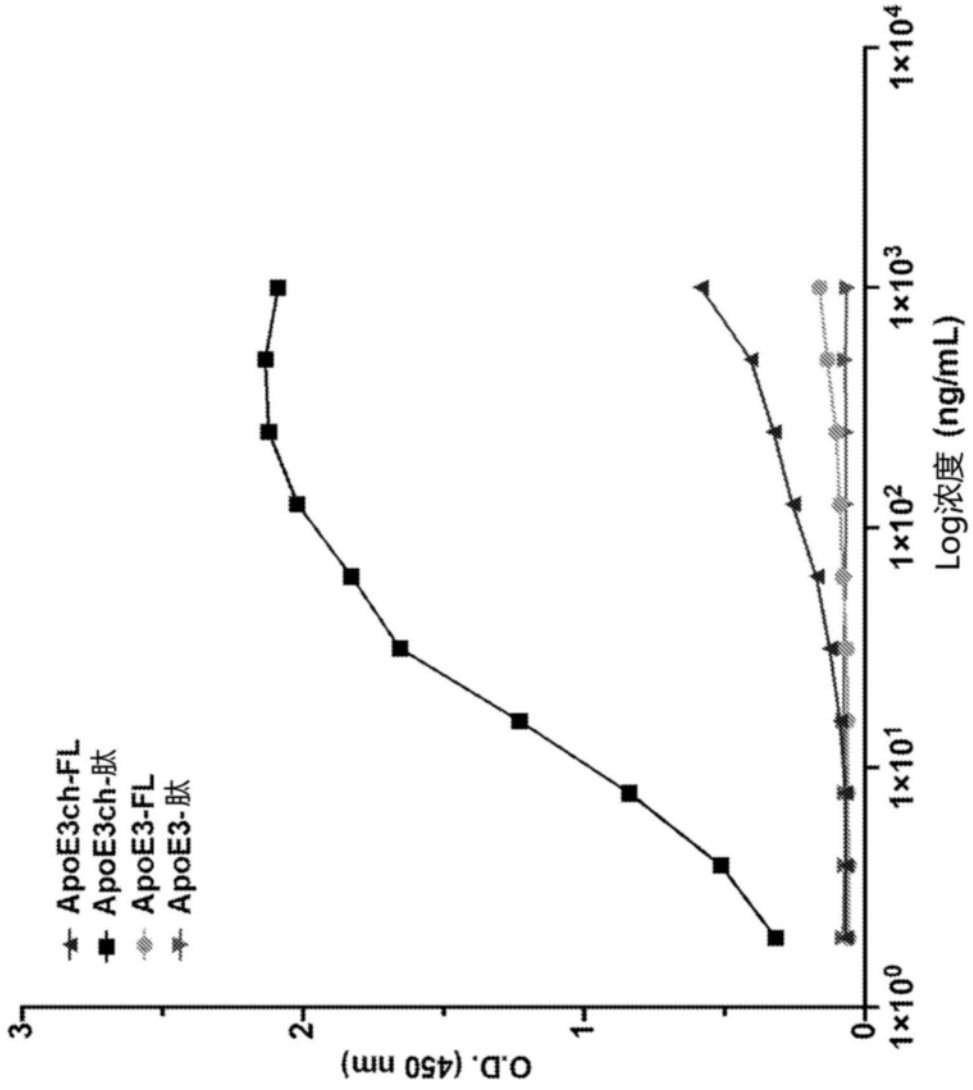

ApoE3ch-FL
ApoE3ch-肽
ApoE3-FL
ApoE3-肽
O.D. (450 nm)
0
1
2
3
1×10⁰
1×10¹
1×10²
1×10³
1×10⁴
Log浓度 (ng/mL)

图38

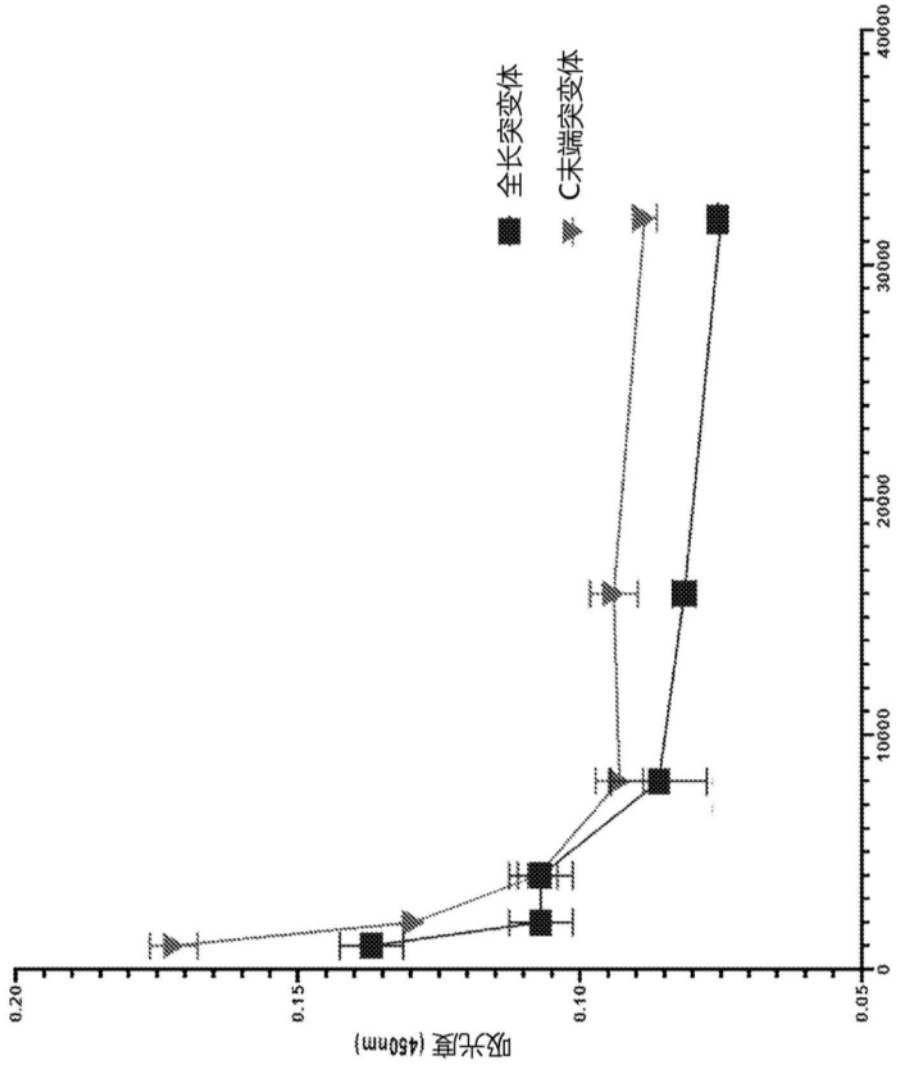

全长突变体
C末端突变体
吸光度 (450nm)
0.20
0.15
0.10
0.05
0
10000
20000
30000
40000

图39

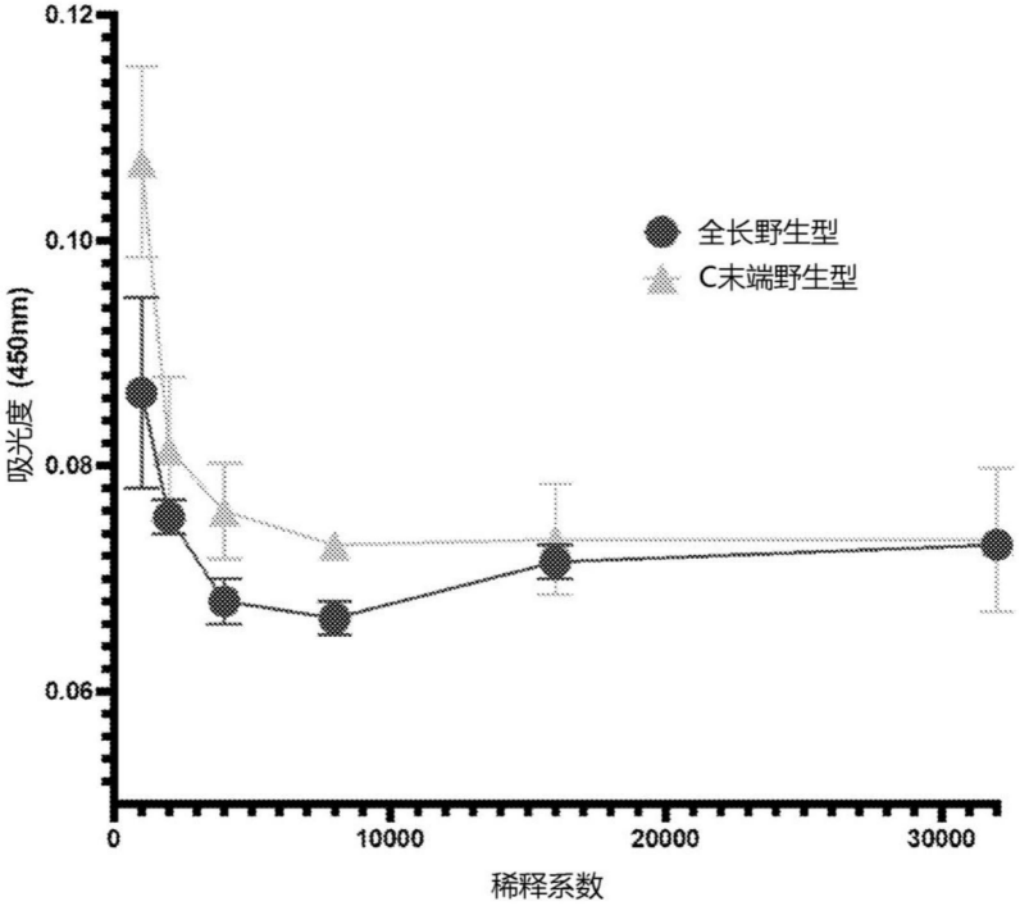

0.12
0.10
0.08
0.06
吸光度 (450nm)
0
10000
20000
30000
稀释系数
全长野生型
C末端野生型

图40

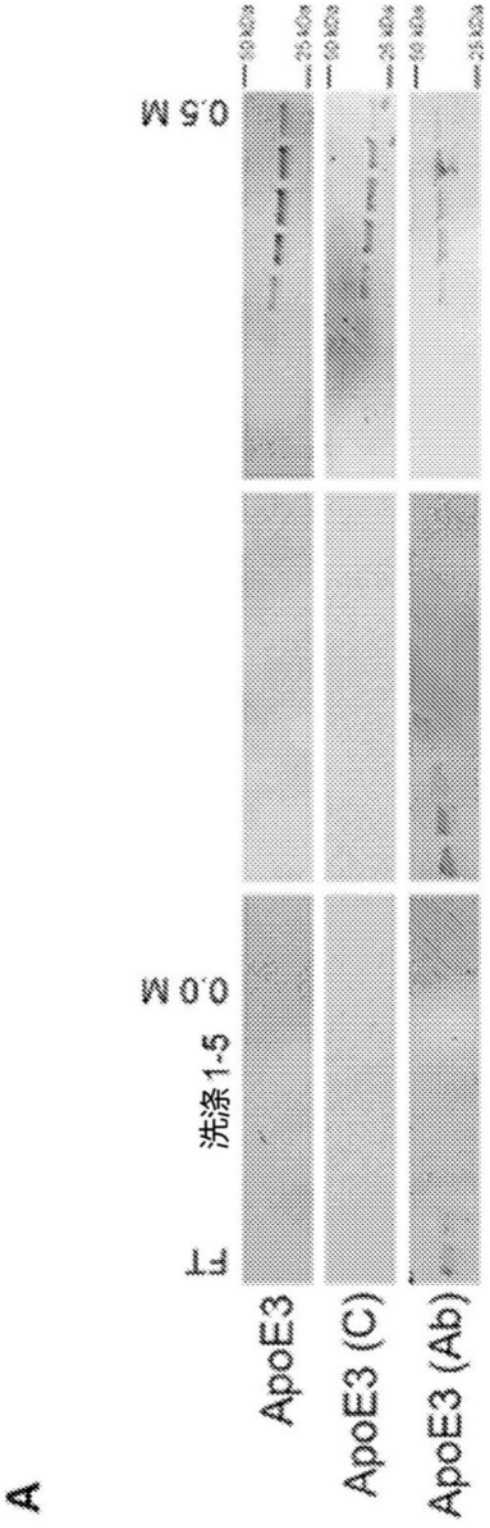


图41A

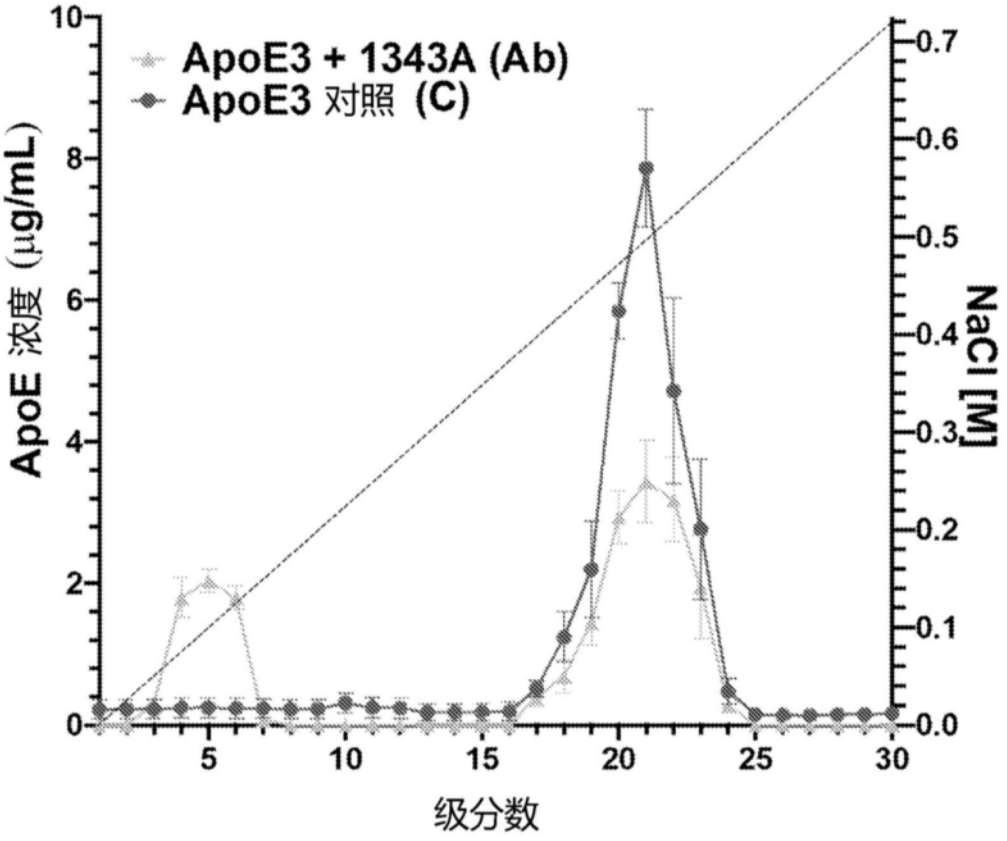

ApoE3 + 1343A (Ab)
ApoE3 对照 (C)
ApoE 浓度 (μg/mL)
NaCl [M]
级分数
0
2
4
6
8
10
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0.7
5
10
15
20
25
30

图41B

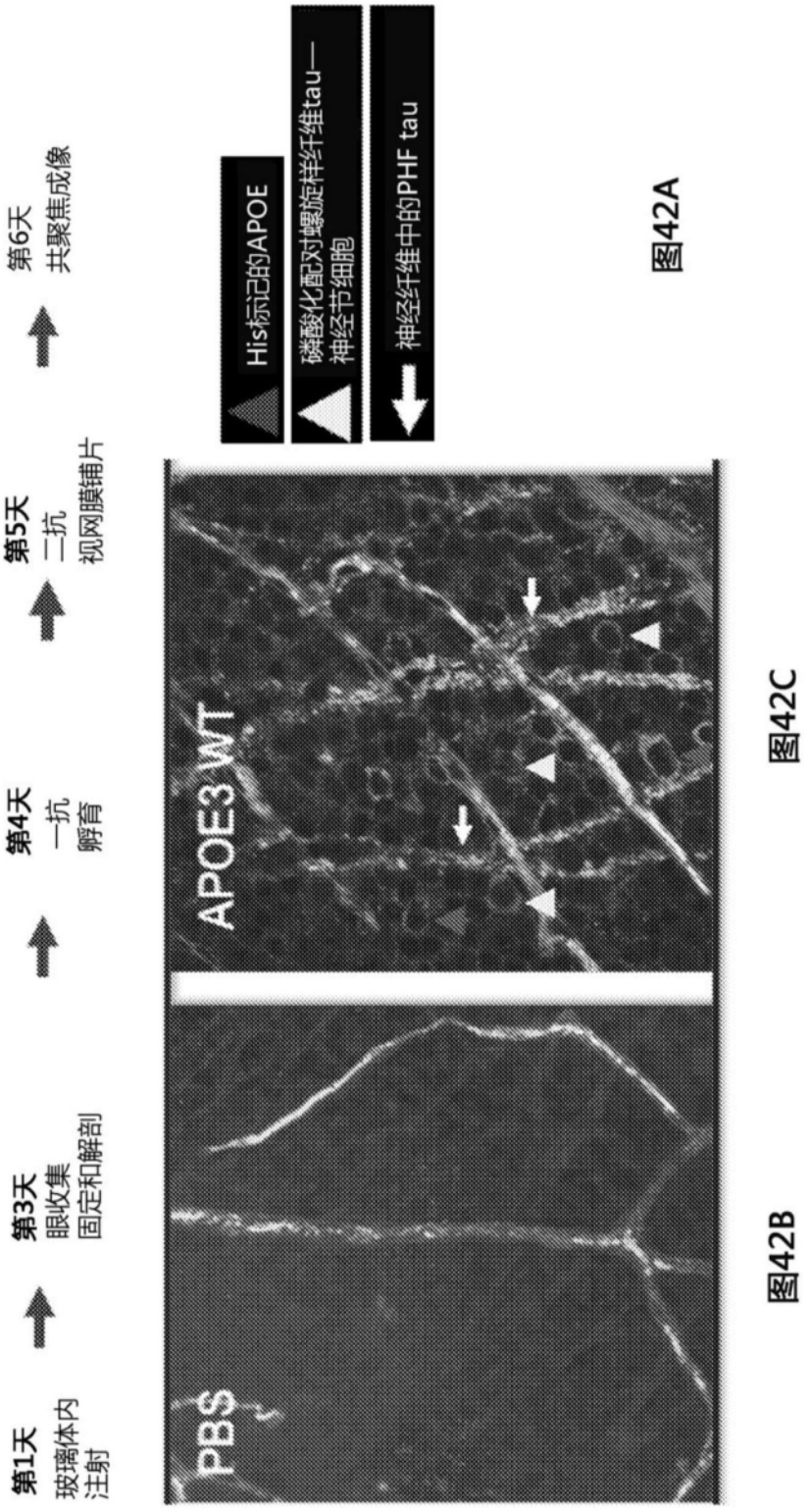


图42A

图42B

图42C

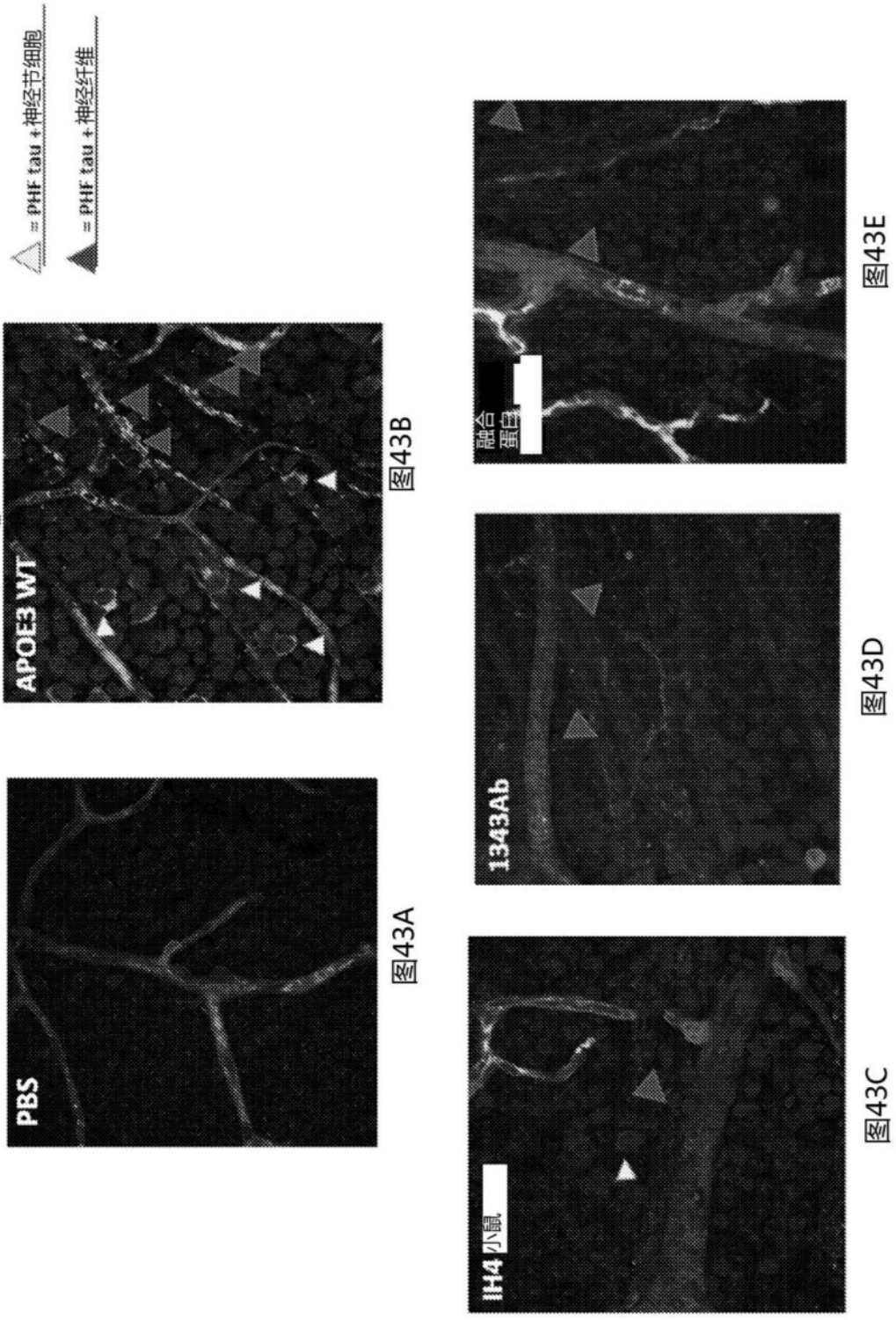


图43A 图43B 图43C 图43D 图43E

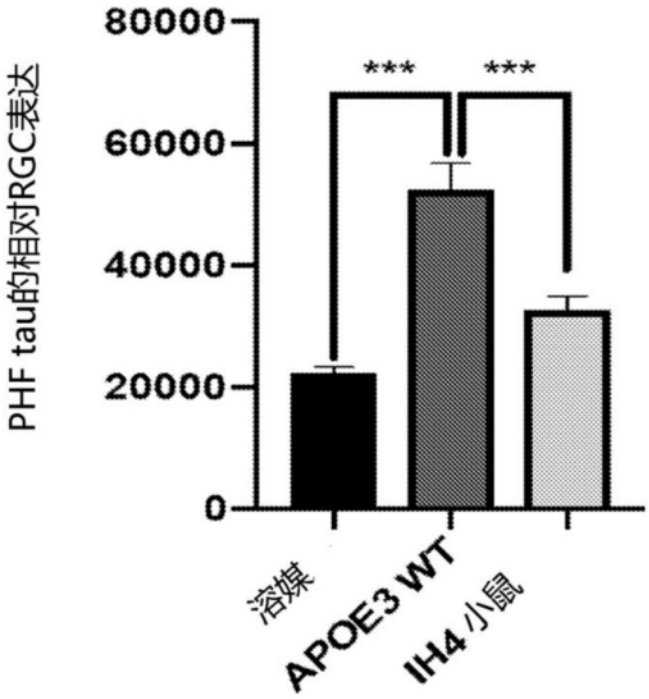

80000
60000
40000
20000
0
PHF tau的相对RGC表达
***
***
溶媒
APOE3 WT
IH4小鼠

图43F

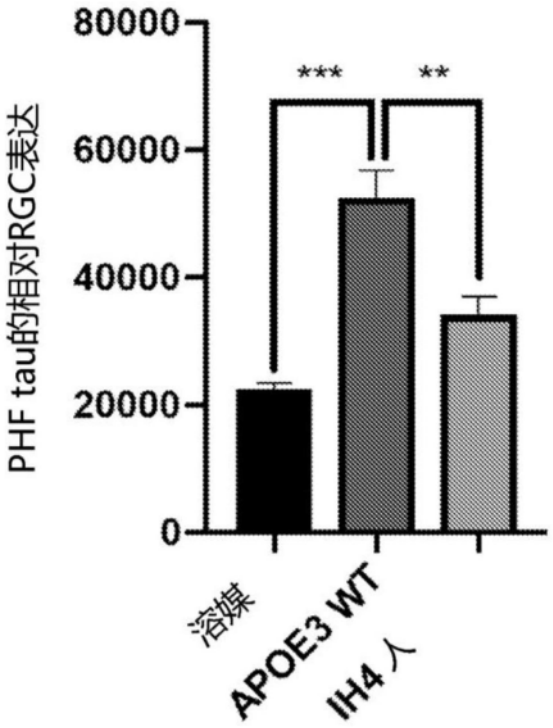

80000
60000
40000
20000
0
PHF tau的相对RGC表达
***
**
溶媒
APOE3 WT
IH4人

图43G

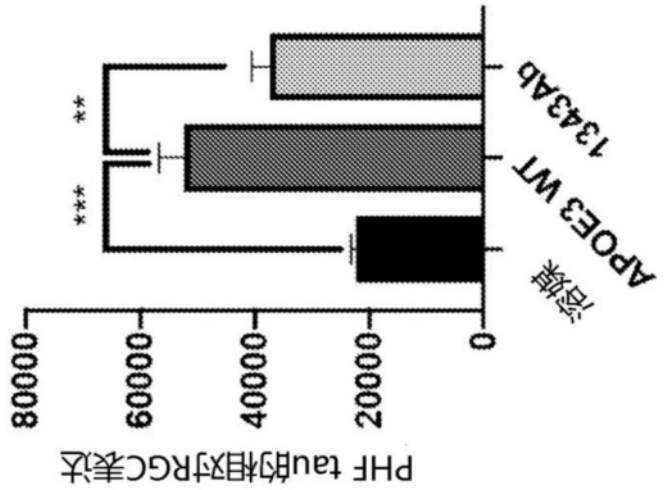

PHF tau的相对RGC表达
80000
60000
40000
20000
0
溶媒
APOE3 WT
1343Ab
***
**

图43H

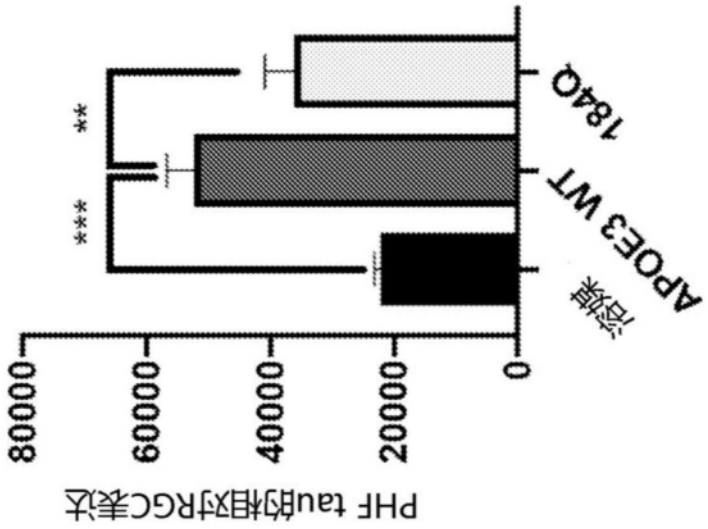

PHF tau的相对RGC表达
80000
60000
40000
20000
0
溶媒
APOE3 WT
184Q
***
**

图43I

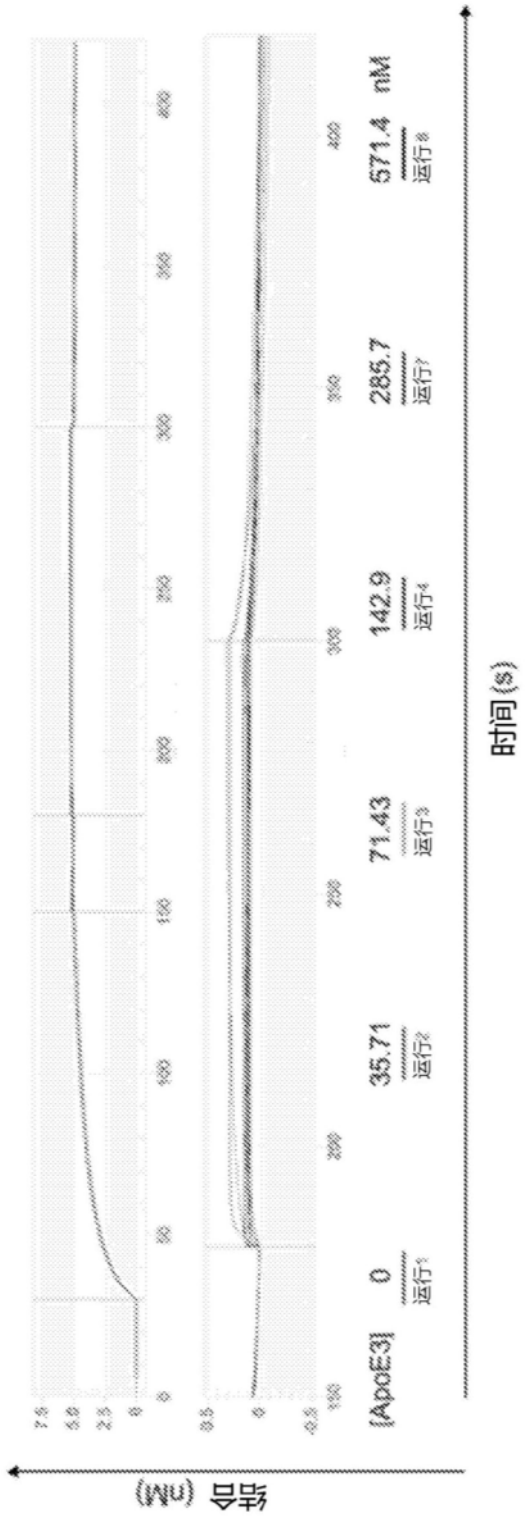

结合 (nM)
时间(s)
[ApoE3] 0 35.71 71.43 142.9 285.7 571.4 nM
运行1 运行2 运行3 运行4 运行7 运行8

图44