

[19] Patents Registry  
The Hong Kong Special Administrative Region  
香港特別行政區  
專利註冊處

[11] 1117543 B  
CN 101193914 B

[12]

STANDARD PATENT SPECIFICATION  
標準專利說明書

[21] Application No. 申請編號  
08108092.2

[51] Int.C1.<sup>8</sup> C07K C12N A61K A61P

[22] Date of filing 提交日期  
23.07.2008

[54] ANTIBODIES DIRECTED AGAINST AMYLOID-BETA PEPTIDE AND METHODS USING SAME 抗  $\beta$ -澱粉樣肽抗體及其使用方法

[30] Priority 優先權  
29.04.2005 US 60/676,093  
01.08.2005 US 60/704,818  
[43] Date of publication of application 申請發表日期  
16.01.2009  
[45] Publication of the grant of the patent 批予專利的發表日期  
30.08.2013  
CN Application No. & Date 中國專利申請編號及日期  
CN 200680018904.0 28.04.2006  
CN Publication No. & Date 中國專利申請發表編號及日期  
CN 101193914 04.06.2008  
Date of Grant in Designated Patent Office 指定專利當局批予專利日期  
23.01.2013

[73] Proprietor 專利所有人  
RINAT NEUROSCIENCE CORP.  
230 E. GRAND AVENUE  
SOUTH SAN FRANCISCO  
CA 94080  
UNITED STATES/UNITED STATES OF AMERICA  
瑞納神經科學公司  
美國/美利堅合眾國  
加利福尼亞  
[72] Inventor 發明人  
ARNON ROSENTHAL A · 羅森塔爾  
JAUME PONS J · 彭斯  
HO, WEI-HSIEN 何維賢  
[74] Agent and / or address for service 代理人及/或送達地址  
CLT Patent & Trademark (H.K.) Ltd.  
Unit 09, 34/F, Office Tower  
Convention Plaza, No. 1 Harbour Road  
Wanchai, Hong Kong  
誠通專利商標(香港)有限公司  
香港灣仔港灣道1號會展廣場  
辦公大樓34樓09室



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101193914 B

(45) 授权公告日 2013.01.23

(21) 申请号 200680018904.0

A61P 25/28(2006.01)

(22) 申请日 2006.04.28

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

60/676,093 2005.04.29 US

60/704,818 2005.08.01 US

WO 99/58572 A1, 1999.11.18,

WO 03/077858 A2, 2003.09.25,

US 2004/0146512 A1, 2004.07.29,

US 2004/0146512 A1, 2004.07.29,

WO 03/086310 A2, 2003.10.23,

(85) PCT申请进入国家阶段日

2007.11.29

审查员 周霞

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2006/016071 2006.04.28

(87) PCT申请的公布数据

W02006/118959 EN 2006.11.09

(73) 专利权人 瑞纳神经科学公司

地址 美国加利福尼亚

(72) 发明人 A·罗森塔尔 J·彭斯 何维贤

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 罗菊华

(51) Int. Cl.

C07K 16/18(2006.01)

C12N 15/13(2006.01)

C12N 15/63(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 44 页

序列表 13 页 附图 6 页

(54) 发明名称

抗  $\beta$ -淀粉样肽抗体及其使用方法

(57) 摘要

本发明描述抗  $\beta$ -淀粉样肽的 C 端侧的抗体  
以及使用这些抗体诊断和治疗阿尔茨海默氏病和  
A $\beta$  肽相关疾病的方法。

1. 单克隆抗体, 所述抗体含有重链可变区和轻链可变区, 其中所述重链可变区含有 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:5 中所示的三个 CDR, 其中所述轻链可变区含有 SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:8 中所示的三个 CDR。
2. 权利要求 1 的抗体, 其中所述重链可变区含有 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列。
3. 权利要求 1 的抗体, 其中所述轻链可变区含有 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列。
4. 权利要求 3 的抗体, 其中所述重链氨基酸序列如 SEQ ID NO:11 所示, 和所述轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO:12 所示。
5. 权利要求 1 的抗体, 其中所述抗体结合  $A\beta_{1-40}$  的亲合力是其结合  $A\beta_{1-42}$  或  $A\beta_{1-43}$  的亲合力的至少大约 40 倍。
6. 权利要求 5 的抗体, 其中所述抗体的 Fab 片段以大约 10nM 或更低的亲合力结合  $A\beta_{1-40}$ 。
7. 权利要求 6 的抗体, 其中所述抗体的 Fab 片段以大约 5nM 或更低的亲合力结合  $A\beta_{1-40}$ 。
8. 权利要求 7 所述的抗体, 其中所述抗体的同种型选自: IgG1, IgG2, IgG3, 和 IgG4。
9. 权利要求 8 所述的抗体, 其中所述抗体包含含有 Fc 区的重链恒定区, 其中所述重链恒定区具有受损的效应子功能。
10. 权利要求 9 的抗体, 其中 Fc 区中的 N-糖基化被去除。
11. 权利要求 9 的抗体, 其中所述抗体的重链恒定区是含有氨基酸突变 A330P331 至 S330S331 的人 IgG2a 恒定区, 其中所述氨基酸位置参照人野生型 IgG2a 序列以 Kabat 编号为基础。
12. 权利要求 9 的抗体, 其中所述抗体的重链恒定区是含有氨基酸突变 E233F234L235 至 P233V234A235 的人 IgG4 恒定区, 其中所述氨基酸位置参照人野生型 IgG4 序列 Kabat 编号为基础。
13. 权利要求 1 所述的抗体, 其中所述抗体是人抗体。
14. 权利要求 1 所述的抗体, 其中所述抗体是人源化抗体。
15. 权利要求 4 所述的单克隆抗体的片段, 其中所述的片段具有或者保留所述单克隆抗体的结合特异性。
16. 权利要求 15 的片段, 其中所述片段是 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub> 或 Fv。
17. 多核苷酸, 其含有编码 SEQ ID NO:1 的抗体重链的和 SEQ ID NO:2 的抗体轻链的可变区的核苷酸序列。
18. 含有权利要求 17 的多核苷酸的载体。
19. 包含权利要求 17 的多核苷酸的宿主细胞。
20. 制备抗体的方法, 包括在使得所述抗体产生的条件下培养权利要求 19 的宿主细胞; 和自所述宿主细胞或培养物中分离所述抗体。
21. 药物组合物, 其含有有效量的权利要求 1-14 中任一项所述的抗体或权利要求 15 或 16 的任一项的片段, 和药物可接受赋形剂。
22. 权利要求 1-14 中任一项的抗体在制备用于治疗受试者中阿尔茨海默氏病的药物中的用途。
23. 权利要求 1-14 中任一项的抗体在制备用于抑制受试者中淀粉样蛋白斑形成的药

物中的用途。

24. 权利要求 1-14 中任一项的抗体在制备用于减少受试者中淀粉样蛋白斑的药物中的用途。

25. 权利要求 1-14 中任一项的抗体在制备用于延迟受试者中与阿尔茨海默氏病相关的症状发展的药物中的用途。

## 抗 $\beta$ -淀粉样肽抗体及其使用方法

### [0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2005 年 4 月 29 日提交的美国临时专利申请系列号 60/676,093 以及 2005 年 8 月 1 日提交的美国临时专利申请系列号 60/704,818 的优先权,这两份临时专利申请完整地并入此处作为参考。

### 技术领域

[0003] 本发明涉及抗  $\beta$ -淀粉样肽抗体。本发明还涉及此类抗体在治疗和/或预防疾病,例如阿尔茨海默氏病中的用途。

### [0004] 关于联邦政府资助的研究或开发的声明

[0005] 不适用。

### 背景技术

[0006] 阿尔茨海默氏病 (AD) 是退行性脑病变,其临床特征在于进行性的记忆缺损、混乱、逐渐身体恶化,以及最终死亡。全球大约一千五百万人患有阿尔茨海默氏病,预期该数目将随着人类寿命的延长而急剧地增加。组织学上,该疾病的特征在于主要出现在联络皮层、边缘系统和基底神经节中的神经炎性斑块 (neuritic plaque)。这些斑块的主要成分是  $\beta$ -淀粉样肽 (A $\beta$ ),该肽是  $\beta$ -淀粉样前体蛋白 ( $\beta$  APP 或 APP) 的切割产物。APP 是 I 型跨膜糖蛋白,含有一个大的异位 N 端域、一个跨膜域和一个小的胞质 C 端尾。染色体 21 上的 APP 单基因的转录物的可变拼接导致具有不同氨基酸数目的几种同种型。

[0007] A $\beta$  似乎在阿尔茨海默氏病的神经病理学上具有主要作用。该疾病的家族形式已经与 APP 及早老素 (presenilin) 基因中的突变联系起来 (Tanzi 等,1996, Neurobiol. Dis. 3:159-168;Hardy,1996,Ann. Med. 28:255-258)。这些基因中的疾病相关突变导致 A $\beta$  的 42 氨基酸形式——淀粉样蛋白斑中发现的主要形式——的产生增加。而且,用人 A $\beta$  免疫过表达 APP 的疾病相关突变形式的转基因小鼠,减轻了斑块负担及相关病理 (Schenk 等,1999, Nature, 400:173-177;W099/27944),并且外周施用抗 A $\beta$  抗体也降低脑中的斑块负担 (Bard 等,2000, Nature Medicine 6(8):916-919;W02004/032868;W000/72880)。

[0008] 已经有报道, Fc 介导的小胶质细胞和/或巨噬细胞的吞噬作用对于体内斑块的清除过程是重要的。Bard 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:2023-2028 (2003)。然而,也有报道,在通过免疫疗法体内清除  $\beta$ -淀粉样肽中涉及非 Fc 介导的机制。Bacskaï 等, J. Neurosci. 22:7873-7878 (2002);Das 等, J. Neurosci. 23:8532-8538 (2003)。

[0009] 因此,抗体疗法提供了一种有希望的治疗和预防阿尔茨海默氏病的方法。然而,使用包括 A $\beta$  1-42 的疫苗进行的人类临床试验由于一些患者中的脑膜脑炎而被暂停。Orgogozo 等, Neurology 61:7-8 (2003);Ferrer 等 Brain Pathol. 14:11-20 (2004)。已经报道,在表现出与人 AD 脑中观察到的相似的年龄相关性淀粉样蛋白斑发生以及神经变性和脑淀粉样血管病 (CAA) 的转基因小鼠中,使用 N 端特异的抗 A $\beta$  抗体实施被动免疫,导致大部分弥散的淀粉样蛋白的显著减少,但诱导脑微出血频率增加。Pfeifer 等, Science

298:1379(2002)。已经提示,在 APP 转基因小鼠中,由抗  $\beta$  淀粉样肽抗体的被动免疫引起的脑淀粉样血管病(CAA)相关性微出血的加剧,依赖于抗体对  $\beta$  淀粉样肽的沉积形式的识别。Racke 等, J. Neurosci. 25:629-636(2005)。为了减少发生炎症的风险,已经提议用缺乏 Fc 区的抗淀粉样蛋白沉积物的肽成分的抗体被动免疫。W003/086310。仍然需要具有改善的效果和安全谱并且适用于人类患者的、针对  $A\beta$  的抗体和其它免疫治疗剂。

[0010] 在本申请中引用了各种出版物(包括专利和专利申请)。这些出版物的公开内容特此完整地并入作为参考。

[0011] 发明概述

[0012] 在此公开的本发明涉及与  $A\beta$  肽 C 端结合的抗体和多肽。一方面,本发明提供与  $A\beta_{1-40}$ 、 $A\beta_{1-42}$  和  $A\beta_{1-43}$  结合的抗体或多肽,其中所述抗体或多肽以比其结合  $A\beta_{1-42}$  和  $A\beta_{1-43}$  的亲和力更高的亲和力与  $A\beta_{1-40}$  结合,而且其中所述抗体或多肽与  $A\beta_{1-40}$  上包括第 25-34 和 40 位氨基酸的表位结合。一些实施方案中,抗体与  $A\beta_{1-40}$  结合的亲和力是其与  $A\beta_{1-42}$  和 / 或  $A\beta_{1-43}$  结合的亲和力的至少大约 40 倍。一些实施方案中,所述抗体不是抗体 2294。

[0013] 另一方面,本发明提供抗体 6G(可以与术语“6G”互换)。6G 的重链和轻链可变区的氨基酸序列显示在图 1 中。抗体 6G 的互补决定区(CDR)部分(包括 Chothia 和 Kabat CDR)也显示在图 1 中。

[0014] 另一方面,本发明还提供具有表 3 所示氨基酸序列的 6G 的抗体变体。

[0015] 另一方面,本发明提供包含抗体 6G 或表 3 所示的其变体的片段或区域的抗体。一个实施方案中,所述片段是抗体 6G 的轻链。另一实施方案中,所述片段是抗体 6G 的重链。再一实施方案中,所述片段包含来自抗体 6G 轻链和 / 或重链的一个或多个可变区。再一实施方案中,所述片段包含来自图 1 所示轻链和 / 或重链的一个或多个可变区。再一实施方案中,所述片段包含来自抗体 6G 轻链和 / 或重链的一个或多个 CDR。

[0016] 另一方面,本发明提供包含以下项目中的任意一个或多个的多肽(其可以是或者可以不是抗体):a) 抗体 6G 或其显示在表 3 中的变体的一个或多个 CDR;b) 来自抗体 6G 或其显示在表 3 中的变体的重链的 CDR H3;c) 来自抗体 6G 或其显示在表 3 中的变体的轻链的 CDR L3;d) 来自抗体 6G 或其显示在表 3 中的变体的轻链的 3 个 CDR;e) 来自抗体 6G 或其显示在表 3 中的变体的重链的 3 个 CDR;f) 来自抗体 6G 或其显示在表 3 中的变体的轻链的 3 个 CDR 以及来自抗体 6G 或其显示在表 3 中的变体的重链的 3 个 CDR。本发明还提供包含以下项目中的任意一个或多个的多肽(其可以是或者可以不是抗体):a) 衍生自抗体 6G 或其显示在表 3 中的变体的一个或多个(一个、两个、三个、四个、五个或六个)CDR;b) 衍生自抗体 6G 重链 CDR H3 的 CDR;和 / 或 c) 衍生自抗体 6G 轻链 CDR L3 的 CDR。一些实施方案中,所述 CDR 是图 1 中所示的 CDR。一些实施方案中,所述衍生自抗体 6G 或其显示在表 3 中的变体的一个或多个 CDR 与 6G 或其变体的至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个或至少六个 CDR 有至少大约 85%、至少大约 86%、至少大约 87%、至少大约 88%、至少大约 89%、至少大约 90%、至少大约 91%、至少大约 92%、至少大约 93%、至少大约 94%、至少大约 95%、至少大约 96%、至少大约 97%、至少大约 98% 或至少大约 99% 的同一性。

[0017] 一些实施方案中,所述 CDR 是 Kabat CDR。一个实施方案中,所述 CDR 是 Chothia CDR。其它实施方案中,所述 CDR 是 Kabat 及 ChothiaCDR 的组合(也称作“组合 CDR”或“扩

展 CDR”)。换言之,对于包含一个以上 CDR 的任何给定的实施方案,这些 CDR 可以是选自 Kabat、Chothia 和 / 或组合 CDR 的任何 CDR。

[0018] 一些实施方案中,本发明抗体是人抗体。其它实施方案中,本发明抗体是人源化抗体。一些实施方案中,抗体是单克隆的。一些实施方案中,抗体(或多肽)是分离的。一些实施方案中,抗体(或多肽)是实质上纯的。

[0019] 抗体重链恒定区可以来自任何类型的恒定区,例如 IgG、IgM、IgD、IgA 和 IgE;以及任何同种型,例如, IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4。

[0020] 一些实施方案中,本文所述抗体或多肽具有被受损的效应子功能。一些实施方案中,抗体或多肽包含具有受损的效应子功能的重链恒定区,其中所述重链恒定区包含 Fc 区。一些实施方案中, Fc 区中的 N-糖基化被去除。一些实施方案中, Fc 区在 N-糖基化识别序列中包含突变,由此该抗体或多肽的 Fc 区不发生 N-糖基化。一些实施方案中, Fc 区被 PEG 化。一些实施方案中,抗体或多肽的重链恒定区是含有以下突变的人重链 IgG2a 恒定区: A330P331 至 S330S331(氨基酸编号参照野生型 IgG2 序列进行)。一些实施方案中,抗体或多肽包含含有如下突变的 IgG4 恒定区: E233F234L235 至 P233V234A235。这些氨基酸位置以 Kabat 编号方式为基础。

[0021] 另一方面,本发明提供包含编码抗体 6G 或其显示在表 3 中的变体的片段或区域的多核苷酸的多核苷酸(其可以是分离的)。一个实施方案中,所述片段是抗体 6G 的轻链。另一实施方案中,所述片段是抗体 6G 的重链。再一实施方案中,所述片段含有来自抗体 6G 的轻链和 / 或重链的一个或多个可变区。再一实施方案中,所述片段包含来自抗体 6G 的轻链和 / 或重链的一个或多个(即,一个、两个、三个、四个、五个、六个)互补决定区(CDR)。

[0022] 另一方面,本发明是包含编码抗体 6G 或其在表 3 中所示的变体的多核苷酸的多核苷酸(其可以是分离的)。一些实施方案中,所述多核苷酸包含 SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:10 中所示多核苷酸之一或两者。

[0023] 另一方面,本发明提供编码本文所述任何抗体(包括抗体片段)或多肽的多核苷酸。

[0024] 另一方面,本发明提供包含本文所述任何多核苷酸的载体(包括表达和克隆载体)和宿主细胞。

[0025] 另一方面,本发明是包含编码本文所述任何抗体的多核苷酸的宿主细胞。

[0026] 另一方面,本发明是 A $\beta$ <sub>1-40</sub> 与抗体 6G 或其在表 3 中显示的变体结合的复合物。

[0027] 另一方面,本发明是 A $\beta$ <sub>1-40</sub> 与本文所述任何抗体或多肽结合的复合物。

[0028] 另一方面,本发明是包含有效量的任何本文所述抗体、多肽或多核苷酸以及药物可接受赋形剂的药物组合物。一些实施方案中,所述抗体或多肽包含抗体 6G 的一个或多个 CDR。

[0029] 另一方面,本发明是制备抗体 6G 的方法,包括:在允许抗体 6G 产生的条件下培养宿主细胞或其后代,其中所述宿主细胞包含编码抗体 6G 的表达载体;和,在一些实施方案中,纯化该抗体 6G。一些实施方案中,表达载体包含 SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:10 中所示多核苷酸序列之一或两者。

[0030] 另一方面,本发明提供通过如下方式制备本文所述任何抗体或多肽的方法:在适宜细胞中表达编码所述抗体(其可以分开表达为单独的轻链或重链,或者从一个载体既表

达轻链也表达重链)或多肽的一种或多种多核苷酸,一般地随后回收和/或分离目的抗体或多肽。

[0031] 本发明也提供预防、治疗、抑制或延迟阿尔茨海默氏病及与改变的 A $\beta$  或  $\beta$  APP 表达或者 A $\beta$  肽的累积有关的其它疾病发展的方法,其中所述其它疾病有例如 Down 氏综合症、帕金森病、多发性脑梗塞痴呆、轻度认知缺损、脑淀粉样血管病、抑郁、Creutzfeldt-Jakob 病、伴有 Lewy 小体的痴呆和 AIDS。该方法包括给个体施用有效剂量的包含本发明抗体、多肽或多核苷酸的药物组合物。

[0032] 本发明还提供在个体中延迟和阿尔茨海默氏病或与 A $\beta$  肽累积有关的其它疾病相关的症状发展的方法,包括给个体施用有效剂量的包含本发明抗体、多肽或多核苷酸的药物组合物。

[0033] 本发明还提供抑制个体中淀粉样蛋白斑和/或淀粉样蛋白累积的形成的方法,包括给个体施用有效剂量的包含本发明抗体、多肽或多核苷酸的药物组合物。一些实施方案中,淀粉样蛋白斑存在于个体的脑(脑组织)中。一些实施方案中,淀粉样蛋白斑存在于脑血管结构中。其它实施方案中,淀粉样蛋白累积出现在循环系统中。

[0034] 本发明还提供在个体中减少淀粉样蛋白斑和/或淀粉样蛋白累积的方法,包括给个体施用有效剂量的包含本发明抗体、多肽或多核苷酸的药物组合物。一些实施方案中,淀粉样蛋白斑存在于个体的脑(脑组织)中。一些实施方案中,淀粉样蛋白斑存在于脑血管结构中。其它实施方案中,淀粉样蛋白累积出现在循环系统中。

[0035] 本发明还提供在个体中除去或清除淀粉样蛋白斑和/或淀粉样蛋白累积的方法,包括给个体施用有效剂量的包含本发明抗体、多肽或多核苷酸的药物组合物。一些实施方案中,淀粉样蛋白斑存在于个体的脑(脑组织)中。一些实施方案中,淀粉样蛋白斑存在于脑血管结构中。其它实施方案中,淀粉样蛋白累积出现在循环系统中。

[0036] 此外,本发明还提供抑制 A $\beta$  肽在组织中累积的方法,包括使所述组织与本发明抗体或多肽接触。

[0037] 本发明也提供在个体中减少 A $\beta$  肽(例如,可溶性的、寡聚体的和沉积的形式)的方法,包括给个体施用有效量的本发明抗体、多肽或多核苷酸。一些实施方案中,抑制和/或降低脑中 A $\beta$  肽的累积。一些实施方案中,抑制和/或降低 A $\beta$  肽的毒性作用。因此,本发明方法可以用于治疗其中存在或怀疑存在 A $\beta$  肽累积的任何疾病,例如,阿尔茨海默氏病、Down 氏综合症、帕金森病、多发性脑梗塞痴呆、轻度认知缺损、脑淀粉样血管病、抑郁、Creutzfeldt-Jakob 病或伴有 Lewy 小体的痴呆。

[0038] 本发明还提供在个体中改善认知功能或逆转与 A $\beta$  淀粉样蛋白沉积相关疾病(如,阿尔茨海默氏病)有关的认知衰退的方法,包括给个体施用有效剂量的包含本发明抗体、多肽或多核苷酸的药物组合物。

[0039] 本文所述任何抗体、多肽或多核苷酸均可以用于本发明的方法。一些实施方案中,所述抗体是抗体 6G。

[0040] 本发明抗体和多肽还可以用于检测、诊断和监测阿尔茨海默氏病及与改变的 A $\beta$  或  $\beta$  APP 表达有关的其它疾病,例如,Down 氏综合症和 AIDS。该方法包括使怀疑具有改变的 A $\beta$  或  $\beta$  APP 表达的患者样本与本发明抗体接触,以及确定 A $\beta$  或  $\beta$  APP 的水平是否不同于对照或比较样本的水平。一些实施方案中,在给予抗 A $\beta$  抗体之前和之后测量血清

A $\beta$  水平;并且评估血清 A $\beta$  水平的任何增加。

[0041] 本发明任何抗体或多肽的施用都可以通过本领域已知的任何方式进行,包括:静脉内、皮下、通过吸入、动脉内、肌内、心内、心室内、胃肠外、鞘内、以及腹膜内。施用可以是全身性的,例如,静脉内,或局部的。一般地,这也适用于本发明的多肽和多核苷酸。

[0042] 另一方面,本发明提供包含本文所述任何一种或多种组合物的药盒及组合物。这些药盒通常在适宜的包装中并提供了适当的说明,可以用于本文所述任何方法中。

[0043] 附图简述

[0044] 图 1 显示抗体 6G 的重链可变区氨基酸序列 (SEQ ID NO:1) 和轻链可变区氨基酸序列 (SEQ ID NO:2)。Kabat CDR 以粗体显示,ChothiaCDR 以下划线显示。重链和轻链可变区的氨基酸残基顺序地编号。

[0045] 图 2 显示通过 ELISA 对抗体 6G 进行的表位作图。A $\beta$  肽 (1-16、1-28、17-40、17-42、22-35、28-40、28-42、1-38、1-40、1-42、1-43、和 33-40) 固定于 ELISA 板上。单克隆抗体 6G (20nM) 与各种固定的肽温育 1 小时。使用 HRP 缀合的山羊抗人  $\kappa$  二抗测量与固定的 A $\beta$  肽结合的抗体 6G。

[0046] 图 3 显示通过 ELISA 对抗体 6G 进行的表位作图。将各种 A $\beta$  肽 (序列从上到下被指定为 SEQ ID NO:18-29) 固定于 ELISA 板上。单克隆抗体 6G 与各种固定的肽温育 1 小时。使用 HRP 缀合的山羊抗人  $\kappa$  二抗测量与固定的 A $\beta$  肽结合的抗体 6G。“NB”指未检测到结合。

[0047] 图 4 是显示 A $\beta$  上与抗体 6G 结合的表位的示意图。显示了 A $\beta$  在淀粉样前体蛋白 (APP) 及 APP 的细胞膜部分中的相对位置。“CT99”指 APP 的 C 端 99 个氨基酸。所示氨基酸序列被指定为 SEQ ID NO:30。

[0048] 图 5 是显示抗 A $\beta_{1-16}$  的单克隆抗体 (m2324) 和抗体 6G 对 APP 表达细胞进行免疫染色的照片。顶图显示在细胞与 m2324 或 6G (各 5  $\mu$ g/ml) 温育以及使用 Cy3 缀合的山羊抗小鼠或抗人二抗检测结合后荧光显微镜下观察到的细胞。底图显示显微镜下观察到的细胞。

[0049] 图 6 显示通过 ELISA 对抗体 2294 和 6G 进行的表位作图。将各种 A $\beta$  肽 (序列从上到下为 SEQ ID NO:18-26、31 及 27-29) 固定于 ELISA 板上。抗体与各种固定的肽温育 1 小时。使用 HRP 缀合的山羊抗人  $\kappa$  二抗测量与固定的 A $\beta$  肽结合的抗体 6G。使用山羊抗小鼠抗体测量与固定的 A $\beta$  肽结合的抗体 2294,其中所述山羊抗小鼠抗体能够既结合重链也结合轻链,是缀合了 HRP 的二抗。“NB”指未检测到结合。在“2294”和“6G”下的列中的数字表示 450nm 的吸收值。

[0050] 发明详述

[0051] 此处公开的本发明提供与 A $\beta$  的 C 端结合的抗体和多肽。本发明还提供编码这些抗体和 / 或多肽的多核苷酸。本发明还提供制备和使用这些抗体和多肽的方法。

[0052] 本发明还提供通过给个体施用有效量的包含本文所述抗体、多肽或编码本文所述抗体或多肽的多核苷酸的药物组合物,治疗或预防个体中与  $\beta$ -淀粉样蛋白沉积有关的疾病的方法,所述疾病有例如,阿尔茨海默氏病、Down 氏综合症、多发性脑梗塞痴呆、轻度认知缺损、脑淀粉样血管病、抑郁、Creutzfeldt-Jakob 病及伴有 Lewy 小体的痴呆。

[0053] 一般技术

[0054] 除非另有说明,否则本发明的实施将利用分子生物学(包括重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学的常规技术,这些技术属于本领域技术的范围。这些技术在文献中有全面的说明,例如, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第二版 (Sambrook 等, 1989) Cold Spring Harbor Press; *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait 编, 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J. E. Cellis, 编, 1998) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney, 编, 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J. P. Mather and P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J. B. Griffiths, 和 D. G. Newell 编, 1993-1998) J. Wiley and Sons; *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *Handbook of Experimental Immunology* (D. M. Weir 和 C. C. Blackwell, 编); *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells* (J. M. Miller 和 M. P. Calos 编, 1987); *Current Protocols in Molecular Biology* (F. M. Ausubel 等, 编, 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction* (Mullis 等编, 1994); *Current Protocols in Immunology* (J. E. Coligan 等, 编, 1991); *Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley and Sons, 1999); *Immunobiology* (C. A. Janeway 和 P. Travers, 1997); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: A practical approach* (D. Catty. 编, IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal antibodies: a practical approach* (P. Shepherd 和 C. Dean 编, Oxford University Press, 2000); *Using antibodies: a laboratory manual* (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); *The Antibodies* (M. Zanetti 和 J. D. Capra 编, Harwood Academic Publishers, 1995)。

[0055] 定义

[0056] “抗体”是能够通过至少一个抗原识别位点特异结合靶(例如糖、多核苷酸、脂质、多肽等)的免疫球蛋白分子,其中所述抗原识别位点位于该免疫球蛋白分子的可变区中。本文中,该术语不仅包括完整的多克隆或单克隆抗体,也包括其片段(例如 Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv)、单链 (ScFv)、其突变体、包含抗体部分的融合蛋白、以及包含抗原识别位点的该免疫球蛋白分子的任何其它经修饰的构型(configuration)。本发明抗体包括任何类型的抗体,例如 IgG, IgA 或 IgM(或其亚型),该抗体不必是任何特定类型的。根据抗体重链恒定区的氨基酸序列,免疫球蛋白可以划分为不同的类型。有五大类的免疫球蛋白: IgA, IgD, IgE, IgG 和 IgM,其中几种可以进一步细分成亚型(同种型),例如, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 和 IgA2。对应于不同类型的免疫球蛋白的重链恒定区被分别称作  $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$  和  $\mu$ 。不同类型的免疫球蛋白的亚基结构和三维构型是熟知的。

[0057] 本文中,“单克隆抗体”指从基本上均质的抗体群体(即,构成该群体的各个抗体,除了可能微量存在的可能的天然突变外,都是相同的)获得的抗体。单克隆抗体是高度特异的,指向单个抗原位点。而且,与典型地包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制备物不同,每个单克隆抗体针对抗原上的单个决定簇。修饰词“单克隆”指的是抗体获自基本上均质的抗体群的该特征,而不能理解为需要通过任何特定的方法来产生该抗体。例如,根据本发明使用的单克隆抗体可以通过 Kohler 和 Milstein, 1975, *Nature* 256: 495 最先描述的杂交瘤方法制备,或者可以通过诸如美国专利 4,816,567 描述的重组 DNA 方法制备。单克隆抗体也可以从使用例如 McCafferty 等, 1990, *Nature*, 348: 552-554 中描述

的技术制备的噬菌体文库分离。

[0058] 本文中,“人源化”抗体指含有最少的源于非人免疫球蛋白的序列的非人(例如鼠)抗体形式,该抗体形式是特异的嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链、或其片段(例如 Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> 或抗体的其它抗原结合亚序列)。人源化抗体主要是人免疫球蛋白(受体抗体),在该蛋白中来自该受体的互补决定区(CDR)的残基被来自具有期望特异性、亲和性和能力的、非人物种(供体抗体)例如小鼠、大鼠或兔的 CDR 的残基替换。一些情况下,人免疫球蛋白的 Fv 构架区(FR)残基被相应的非人残基替换。而且,人源化抗体可以包含既不存在于受体抗体也不存在于引入的 CDR 或构架序列中但被包括在人源化抗体中以进一步改善和优化抗体的性能的残基。一般地,人源化抗体包含至少一个,以及典型地两个,可变区的基本上所有部分,其中全部或基本上全部的 CDR 区对应于非人免疫球蛋白的 CDR 区,而全部或基本上全部的 FR 区是具有人免疫球蛋白共有序列的那些 FR 区。最佳地,人源化抗体还将包含免疫球蛋白(典型地,人免疫球蛋白)的恒定区或域(Fc)的至少一部分。抗体可以具有按照 W099/58572 所述修饰的 Fc 区。其它人源化抗体形式具有相对于原始抗体发生了改变的一个或多个 CDR(一个、两个、三个、四个、五个、六个),这些 CDR 也被称作“衍生自”原始抗体的一个或多个 CDR 的一个或多个 CDR。

[0059] 本文中,“人抗体”指具有与人产生的抗体的氨基酸序列相对应的氨基酸序列的抗体,和/或使用本领域已知的或本文所述的制备人抗体的任何技术制备的抗体。人抗体的该定义包括含有至少一条人重链多肽或至少一条人轻链多肽的抗体。一个这样的实例是包含鼠轻链和人重链多肽的抗体。人抗体可以使用本领域已知的各种技术制备。一个实施方案中,从噬菌体文库选择人抗体,其中该噬菌体文库表达人抗体(Vaughan 等 1996, Nature Biotechnology, 14:309-314; Sheets 等, 1998, PNAS, (USA) 95:6157-6162; Hoogenboom 和 Winter, 1991, J. Mol. Biol. 227:381; Marks 等, 1991, J. Mol. Biol. 222:581)。人抗体也可以通过将人免疫球蛋白基因座引入转基因动物,例如,内源性免疫球蛋白基因已经部分或完全被失活的小鼠,而制备。该方法描述在美国专利 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425 和 5,661,016 中。或者,人抗体可以通过使产生靶抗原的抗体的人 B 淋巴细胞(该 B 淋巴细胞可以从个体回收或者可以已经在体外免疫)永生化而制备。见例如, Cole 等, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner 等, 1991, J. Immunol. 147(1)86-95; 和美国专利 5,750,373。

[0060] 本文中,术语“6G”和“抗体 6G”可互换使用,指具有 SEQ ID NO:11 所示重链氨基酸序列和 SEQ ID NO:12 所示轻链氨基酸序列的抗体。图 1 中显示了重链和轻链可变区的氨基酸序列。图 1 中图解显示了抗体 6G 的 CDR 部分(包括 Chothia 和 Kabat CDR)。编码重链和轻链的多核苷酸显示在 SEQ ID NO:13 和 SEQ ID NO:14 中。6G 的特征在实施例中描述。

[0061] 术语“多肽”、“寡肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用,指任何长度的氨基酸聚合物。该聚合物可以是直链的或分支的,它可以包含修饰的氨基酸,并且可以被非氨基酸中断。该术语也包括已经天然地或通过干预的方式被修饰的氨基酸聚合物;所述修饰有例如,二硫键形成、糖基化、脂质化、乙酰化、磷酸化、或任何其它操作或修饰,例如与标记成分缀合。该定义也包括例如,含有一个或多个氨基酸类似物(包括例如,非天然的氨基酸等)以及本领域已知的其它修饰的多肽。可以理解,由于本发明多肽是以抗体为基础的,故该多

肽可以是单链形式或连接在一起的多条链的形式。

[0062] “多核苷酸”或“核酸”在本文中可互换使用,指任何长度的核苷酸聚合物,包括 DNA 和 RNA。核苷酸可以是脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、修饰的核苷酸或碱基,和 / 或它们的类似物,或者是可以通过 DNA 或 RNA 聚合酶掺入聚合物中的任何底物。多核苷酸可以包含修饰的核苷酸,例如,甲基化的核苷酸及它们的类似物。如果存在修饰的话,对核苷酸结构的修饰可以在聚合物组装之前或之后发生。核苷酸序列可以被非核苷酸成分中断。多核苷酸可以在聚合之后被进一步修饰,例如,与标记成分缀合。其它类型的修饰包括,例如,“带帽”、将一个或多个天然存在的核苷酸替换成类似物、核苷酸间的修饰,例如,不带电荷的链接(例如,甲基膦酸酯、磷酸三酯、phosphoamidates、cabamates 等)、带电荷的链接(例如,硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等)、含有吊挂部分例如蛋白质(例如,核酸酶、毒素、抗体、信号肽、聚-L-赖氨酸等)、具有嵌入剂(例如,吡啶、补骨脂素等)、含有螯合剂(例如,金属、放射性金属、硼、氧化金属等)、含有烷化剂、具有修饰的链接(例如, $\alpha$  异头核酸等),以及这些多核苷酸的未修饰形式。而且,任何通常存在于糖中的羟基基团均可以被置换为例如膦酸基团、磷酸基团,被标准保护基保护、或被活化以预备与另外核苷酸的另外连接、或者可以缀合至固相支持物上。5' 和 3' 端 OH 可以被磷酸化或者替代为胺或具有 1 至 20 个碳原子的有机封端基团部分。其它羟基也可以被衍生化为标准的保护基。多核苷酸也可以含有本领域通常已知的核糖或脱氧核糖的糖的类似形式,包括例如,2' -O- 甲基 -、2' -O- 烯丙基、2' - 氟 - 或 2' - 叠氮 - 核糖、碳环糖类似物、 $\alpha$  - 异头糖、差向异构糖例如阿拉伯糖、木糖类或来苏糖类、吡喃糖类、呋喃糖类、景天庚酮糖类、无环类似物及脱碱基核苷类似物例如甲基核苷。可以将一个或多个磷酸二酯键替换成备选的连接基团。这些备选连接基团包括,但不限于,其中磷酸酯被 P(O)S(“硫代酯”)、P(S)S(“二硫代酯”)、(O)NR<sub>2</sub>(“酰胺化物”)、P(O)R、P(O)OR'、CO 或 CH<sub>2</sub>(“formacetal”)替代的实施方案,其中每一个 R 或 R' 均独立地是 H 或是取代的或未取代的烷基(1-20C)(任选地含有醚(-O-)键)、芳基、烯基、环烷基、环烯基或 araldyl。多核苷酸中并不是所有的连接都需要相同。前面的描述适用于本文中提及的所有多核苷酸,包括 RNA 和 DNA。

[0063] 抗体“可变区”指单独的抗体轻链可变区或抗体重链可变区或者两者的组合。重链和轻链的可变区均各自自由通过三个互补决定区(CDR,也称作超变区)连接在一起的 4 个构架区(FR)组成。每条链中的 CDR 通过 FR 而紧靠在一起,并与来自另一链的 CDR 一起促成抗体的抗原结合位点的形成。存在至少两种确定 CDR 的技术:(1) 基于交叉物种序列变异性的方法(即,Kabat 等,Sequences of Proteinsof Immunological Interest(第 5 版,1991,National Institutesof Health, Bethesda, MD));和(2) 基于抗原抗体复合物的晶体学研究(Al-lazikani 等(1997),J. Molec. Biol. 273 :927-948))。本文中,CDR 可以指通过其中一种方法或者通过这两种方法组合确定的 CDR。

[0064] 抗体“恒定区”指单独的抗体轻链恒定区或抗体重链恒定区或者两者的组合。

[0065] 与抗体或多肽“优先地结合”或“特异地结合”(本文中可互换使用)的“表位”是本领域熟知的术语,确定此特异结合或优先结合的方法也是本领域熟知的。如果分子与特定细胞或物质比其与其它细胞或物质能以更高的频率、更快的速度、更长的持续时间和 / 或更大的亲和力反应或结合,则称该分子表现出“特异的结合”或“优先的结合”。如果抗体与靶的结合比其与其它物质的结合具有更高的亲和性、亲和力、更为容易和 / 或持续时间

更长,则该抗体“特异地结合”或“优先地结合”靶。例如,特异地或优先地与某  $A\beta_{1-40}$  表位结合的抗体是这样的抗体,该抗体与该表位的结合比它与其它  $A\beta_{1-40}$  表位或非  $A\beta_{1-40}$  表位的结合具有更高的亲和性、亲和力、更为容易和/或持续时间更长。通过阅读该定义也可以理解,例如,特异地或优先地与第一靶结合的抗体(或部分或表位)可以或者不可以特异地或优先地与第二靶结合。如此,“特异的结合”或“优先的结合”不必要求(尽管它可以包括)排他式的结合。一般地,但不是必需的,提及到结合意味着优先的结合。

[0066] 本文中,“基本上纯的”指至少 50% 纯(即,无杂质)、更优选地至少 90% 纯、更优选地至少 95% 纯、更优选地至少 98% 纯,更优先地至少 99% 纯的物质。

[0067] “宿主细胞”包括单个细胞或细胞培养物,其可以是或者已经是用于掺入多核苷酸插入物的载体的受体。宿主细胞包括单个宿主细胞的后代,该后代由于自然的、偶发的或有意的突变而可以不必与原始亲本细胞完全相同(在形态学上或在基因组 DNA 互补性上)。宿主细胞包括在体内被本发明多核苷酸转染的细胞。

[0068] 术语“Fc 区”用于定义免疫球蛋白重链的 C 端区域。“Fc 区”可以是天然序列的 Fc 区或者变异的 Fc 区。尽管免疫球蛋白重链 Fc 区的界限可以变化,但人 IgG 重链 Fc 区通常被定义为自 Cys226 或 Pro230 位置的氨基酸残基延伸至其羧基末端。Fc 区中残基的编号为如 Kabat 等,Sequence of Proteins of Immunological Interest,第 5 版,Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, Md., 1991 中 EU 索引(EU index)的编号。免疫球蛋白 Fc 区一般包含两个恒定区,CH2 和 CH3。

[0069] 本文中,“Fc 区”和“FcR”描述与抗体 Fc 区结合的受体。优选的 FcR 是天然序列的人 FcR。而且,优选的 FcR 是与 IgG 抗体结合( $\gamma$  受体)的 FcR,其包括 Fc  $\gamma$  RI、Fc  $\gamma$  RII 和 Fc  $\gamma$  RIII 亚型受体,包括这些受体的等位变体和可变拼接形式。Fc  $\gamma$  RII 受体包括 Fc  $\gamma$  RIIA(“激活性受体”)和 Fc  $\gamma$  RIIB(“抑制性受体”),两者具有相似氨基酸序列,它们的主要差异在于它们的胞质域。关于 FcR 的综述见 Ravetch 和 Kinet, 1991, Ann. Rev. Immunol. 9:457-92; Capel 等, 1994, Immunomethods, 4:25-34; 和 de Haas 等, 1995, J. Lab. Clin. Med. 126:330-41。“FcR”也包括新生儿受体 FcRn,该受体负责将母亲的 IgG 转移给胎儿(Guyer 等, 1976, J. Immunol. 117:587; 和 Kim 等, 1994, J. Immunol. 24:249)。

[0070] “补体依赖性细胞毒性”和“CDC”指靶在补体存在下发生的裂解。补体系统的第一成分(C1q)与和关连抗原形成复合物的分子(例如抗体)结合,将导致补体活化途径的起始。为了评价补体活化,可以实施 CDC 试验,例如 Gazzano-Santoro 等, J. Immunol. Methods, 202:163(1996)中描述的 CDC 试验。

[0071] “功能性 Fc 区”具有天然序列的 Fc 区的至少一种效应子功能。示例性“效应子功能”包括 C1q 结合;补体依赖性细胞毒性(CDC);Fc 受体结合;抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC);吞噬作用;细胞表面受体(例如,B 细胞受体;BCR)的下调,等。该效应子功能一般需要 Fc 区与结合域(例如,抗体可变区结构域)组合,并且可以使用本领域已知用于评价此类抗体效应子功能的各种试验来进行评价。

[0072] “天然序列的 Fc 区”包含与自然界中存在的 Fc 区的氨基酸序列相同的氨基酸序列。“变异的 Fc 区”包含由于至少一个氨基酸修饰而不同于天然序列的 Fc 区的氨基酸序列但保留了该天然序列的 Fc 区的至少一种效应子功能的氨基酸序列。优选地,变异的 Fc 区与天然序列的 Fc 区或者亲本多肽的 Fc 区相比具有至少一个氨基酸替代,例如,在天然序列

的Fc区中或在亲本多肽的Fc区中大约1个至大约10个氨基酸替代,优选地大约1个至大约5个氨基酸替代。本文中,变异的Fc区优选地与天然序列的Fc区和/或与亲本多肽的Fc区具有至少大约80%序列同一性,最优选地至少大约90%序列同一性,更优选地至少大约95%、至少大约96%、至少大约97%、至少大约98%、至少大约99%序列同一性。

[0073] 本文中,“抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”和“ADCC”指细胞介导的反应,其中表达Fc受体(FcR)的非特异性细胞毒性细胞(例如,自然杀伤(NK)细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞)识别靶细胞上结合的抗体并随后导致靶细胞的裂解。目的分子的ADCC活性可以使用体外ADCC试验,例如,美国专利5,500,362或5,821,337中所述的试验来评价。对于该试验有用的效应细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和NK细胞。备选地,或者此外,目的分子的ADCC活性可以在体内,例如,在动物模型,例如Clynes等1998 PNAS(USA)95:652-656中公开的动物模型中评价。

[0074] 本文中,药物、化合物或药物组合物的“有效剂量”或“有效量”是可以有效地实现有益或期望结果的量。对于预防性应用,有益的或期望的结果包括诸如消除或降低疾病的风险、减轻疾病的严重性或延迟疾病的发作,其中所述疾病包括疾病的生物化学的、组织学的和/或行为上的症状、其并发症以及疾病发展过程中表现出的中间病理学表型。对于治疗性应用,有益的或期望的结果包括临床结果,例如,抑制、阻碍或降低淀粉样蛋白斑的形成,减少、除去、清除淀粉样蛋白斑,改善认知、逆转或减慢认知衰退、隔离或增加生物学液体中循环的可溶性A $\beta$ 肽、减少因该疾病导致的一种或多种症状(生物化学的、组织学的和/或行为上的),包括其并发症和疾病发展过程中出现的中间病理学表型,增加该疾病患者的生活质量,降低其它药物治疗该疾病时所需的剂量,增强其它药物的效果,延迟疾病进展,和/或延长患者的存活时间。有效剂量可以分一次或多次施用。对于本发明的目的,药物、化合物或药物组合物的有效剂量是足以直接地或间接地实现预防性或治疗性治疗的量。在临床上可以理解,药物、化合物或药物组合物的有效剂量可以通过或者可以不通过与其它药物、化合物或药物组合物联合而实现。因此,可以在施用一种或多种治疗剂的情况下认定“有效剂量”,而且如果单个药剂在与一个或多个其它药剂联合时达到了或者可以达到期望的结果,则该单个药剂可被认为是以有效量给予的。

[0075] 本文中,“治疗”或“疗法”是用于获得有益的或期望的结果(包括临床结果)的方法。为了本发明目的,有益的或期望的临床结果包括,但不限于,以下之一或多种:抑制、阻碍或降低淀粉样蛋白斑的形成,减少、除去或清除淀粉样蛋白斑,改善认知、逆转或减慢认知衰退、隔离在生物学液体中循环的可溶性A $\beta$ 肽、减少组织(例如脑)中的A $\beta$ 肽(包括,可溶性的、寡聚体的和沉积的),抑制、减慢和/或降低脑中A $\beta$ 肽的累积,抑制、减缓和/或降低A $\beta$ 肽在组织(例如脑)中的毒性作用、减少因该疾病导致的症状,增加该疾病患者的生活质量,降低其它药物治疗该疾病时所需的剂量,延迟疾病进展,和/或延长患者的存活时间。

[0076] 本文中,“延迟”阿尔茨海默氏病的发展意味着推迟、阻碍、减缓、阻止、平抑和/或延缓该疾病的发展。根据该疾病的病史和/或待治疗的个体,此延迟可以具有不同的时间长度。正如本领域技术人员明了的,充分的或显著的延迟可以,实际上,包括预防,即,个体不出现该疾病。“延迟”阿尔茨海默氏病的发展的方法是,与未使用该方法相比,在给定的时间框架内降低疾病发展的可能性和/或在给定的时间框架内降低疾病的程度的方法。该比

较典型地使用统计学显著数量的个体基于临床研究进行。

[0077] 阿尔茨海默氏病的“发展”意味着阿尔茨海默氏病在个体内发作和 / 或进展。可以使用本文所述的标准临床技术检测阿尔茨海默氏病的发展。然而,发展也指最初可能检测不到的疾病进展。为了本发明的目的,进展指疾病状态的生物学过程,在此情况下,可以通过标准神经学检查、或患者访问来确定,或者可以通过更为专业的测试来确定。各种此类诊断试验包括,但不限于,神经成像、检测血清或脑脊液中特定蛋白质(例如,淀粉样肽和 Tau)的水平变化、计算机化的 X 线断层摄影术(CT)、和核磁共振成像(MRI)。“发展”包括发生、复发和发作。本文中,阿尔茨海默氏病的“发作”或“发生”包括最初的发作和 / 或复发。

[0078] 本文中,“联合”施用包括同时施用和 / 或在不同时间施用。联合施用也包括以共制剂的形式施用或者以分开的组合物的形式施用。本文中,联合施用意味着包括其中将抗 A $\beta$  抗体和另一药剂施用给个体的任何情况,其中抗 A $\beta$  抗体和另一药剂的施用可以同时和 / 或分开进行。如本文中进一步讨论的,应当理解抗 A $\beta$  抗体和所述另一药剂可以以不同的给药频率或间隔施用。例如,可以每周施用抗 A $\beta$  抗体,而所述另一药剂可以以较低的频率施用。可以理解,抗 A $\beta$  抗体和所述另一药剂可以使用相同的施用途径或不同的施用途径施用。

[0079] “生物学样品”包括各种从个体获得的样品类型,其可以用于诊断或监测试验中。该定义包括血液和生物学来源的其它液体样品、固体组织样品例如生物活检标本或组织培养物或来源于它们的细胞及其后代。该定义也包括在获得之后以任何方式被操作过的样品,所述操作例如用试剂处理、增溶或富集某些成分如蛋白质或多核苷酸、或包埋在半固体或固体基质中以便用于切片目的。术语“生物学样品”包括临床样品,也包括培养的细胞、细胞上清液、细胞裂解物、血清、血浆、生物学液体和组织样品。

[0080] “对象”(或者称作“个体”)是哺乳动物、更优选地人。哺乳动物也包括,但不限于,农畜(例如奶牛)、运动动物、宠物(例如猫、狗、马)、灵长类动物、小鼠和大鼠。

[0081] 本文中,“载体”指能够向宿主细胞递送,优选地在宿主细胞中表达,一个或多个目的基因或序列的构建体。载体的例子包括,但不限于,病毒载体、裸 DNA 或 RNA 表达载体、质粒、粘粒或噬菌体载体、与阳离子缩合剂结合的 DNA 或 RNA 表达载体、包在脂质体中的 DNA 或 RNA 表达载体、以及某些真核细胞例如生产细胞。

[0082] 本文中,“表达控制序列”指指导核酸表达的核酸序列。表达控制序列可以是启动子,例如组成型或诱导型启动子,或增强子。表达控制序列与待转录的核酸序列可操作地连接。

[0083] 本文中,“药物可接受载体”包括当与活性成分组合时能够允许所述成分保持生物学活性并且其与个体的免疫系统不发生反应的任何物质。实例包括,但不限于,任何标准的药物载体,例如,磷酸缓冲盐水溶液、水、乳剂如油 / 水乳剂、和各种类型的润湿剂。对于气雾剂或肠胃外施用,优选的稀释剂是磷酸缓冲盐水或生理盐水(0.9%)。包含此类载体的组合物可以通过熟知的常规方法配制(见例如,Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 18 版, A. Gennaro, 编, Mack Publishing Co., Easton, P. A., 1990; 和 Remington, The Science and Practice of Pharmacy 第 20 版, Mack Publishing, 2000)。

[0084] 术语“ $k_{on}$ ”在本文中旨在指抗体与抗原结合的结合速率常数(onrate constant)。

[0085] 术语“ $k_{\text{off}}$ ”在本文中旨在指抗体自抗体/抗原复合物解离的解离速率常数 (off rate constant)。

[0086] 术语“ $K_D$ ”在本文中旨在指抗体抗原相互作用的平衡解离常数。

[0087] 组合物和制备组合物的方法

[0088] 抗  $\beta$  淀粉样蛋白抗体和多肽

[0089] 本发明提供与  $A\beta$  肽的 C 端结合的抗体。本发明提供与  $A\beta_{1-40}$ 、 $A\beta_{1-42}$  和  $A\beta_{1-43}$  结合的抗体或多肽。一些实施方案中,所述抗体或多肽以比其结合  $A\beta_{1-42}$  和  $A\beta_{1-43}$  时更高的亲和性结合  $A\beta_{1-40}$ 。一些实施方案中,所述抗体与  $A\beta_{1-36}$ 、 $A\beta_{1-37}$ 、 $A\beta_{1-38}$  和  $A\beta_{1-39}$  结合。一些实施方案中,所述抗体与  $A\beta_{22-35}$  结合。一些实施方案中,所述抗体与  $A\beta_{28-40}$  结合。一些实施方案中,所述抗体或多肽与  $A\beta_{1-40}$  上包括氨基酸 25-34 及 40 的表位结合。

[0090] 本发明还提供包含本文所述任何抗体或多肽(例如,抗体 6G 和其显示在表 3 中的变体或者来源于抗体 6G 和其显示在表 3 中的变体的多肽);或本文所述多核苷酸的组合物,包括药物组合物。本文中,组合物包含一种或多种与  $A\beta_{1-40}$  的 C 端结合的抗体或多肽(其可以是或可以不是抗体)和/或一种或多种包含编码一种或多种与  $A\beta_{1-40}$  的 C 端结合的抗体或多肽的序列的多核苷酸。这些组合物还可以包含适宜的赋形剂,例如,本领域熟知的药物可接受赋形剂,包括缓冲液。

[0091] 本发明抗体和多肽的特征在于以下特征之任何(一个或多个):(a) 与  $A\beta_{1-40}$ 、 $A\beta_{1-42}$  和  $A\beta_{1-43}$  结合;(b) 与  $A\beta_{1-40}$ 、 $A\beta_{1-42}$  和  $A\beta_{1-43}$  结合,其中与  $A\beta_{1-40}$  结合的亲和性高于与  $A\beta_{1-42}$  和  $A\beta_{1-43}$  结合的亲和性;(c) 与  $A\beta_{1-40}$  上包括氨基酸 25-34 及 40 的表位结合;(d) 与  $A\beta_{1-36}$ 、 $A\beta_{1-37}$ 、 $A\beta_{1-38}$  和  $A\beta_{1-39}$  结合,但是亲和性低于其结合  $A\beta_{1-36}$  的亲和性;(e) 以小于大约  $1\ \mu\text{M}$  的  $K_D$  与  $A\beta_{22-37}$  结合;(f) 与  $A\beta_{22-35}$  结合;(g) 与  $A\beta_{28-40}$  结合;(h) 不结合细胞中表达的 APP;(i) 抑制个体中淀粉样蛋白斑的形成;(j) 减少个体中的淀粉样蛋白斑;(k) 治疗、预防、改善阿尔茨海默氏病或其它  $A\beta$  累积相关疾病(例如,Down 氏综合症、帕金森病、多发性脑梗塞痴呆、轻度认知缺损、脑淀粉样血管病、抑郁、Creutzfeldt-Jakob 病、伴有 Lewy 小体的痴呆)的一个或多个症状;(l) 改善认知功能。本发明抗体和多肽也可以具有本文所述的受损的效应子功能。与报道的其它抗  $A\beta$  抗体不同,具有受损的效应子功能的抗体和多肽可以表现出期望的完全谱。例如,本发明组合物可以不造成显著或不可接受水平的任一种或多种下列情况:脑血管系统中的出血(脑出血);脑膜脑炎(包括改变的核磁共振扫描);脑脊液中升高的白细胞计数;中枢神经系统炎症。

[0092] 因此,本发明提供任何以下物质,或包含任何以下物质的组合物(包括药物组合物):(a) 抗体 6G 或其显示在表 3 中的变体;(b) 抗体 6G 或其显示在表 3 中的变体的片段或区域;(c) 抗体 6G 或其显示在表 3 中的变体的轻链;(d) 抗体 6G 或其显示在表 3 中的变体的重链;(e) 来自抗体 6G 或其显示在表 3 中的变体的轻链和/或重链的一个或多个可变区;(f) 抗体 6G 或其显示在表 3 中的变体的一个或多个 CDR(1,2,3,4,5,或 6 个 CDR);(g) 来自抗体 6G 重链的 CDR H3;(h) 来自抗体 6G 或其显示在表 3 中的变体的轻链的 CDR L3;(i) 来自抗体 6G 或其显示在表 3 中的变体的轻链的 3 个 CDR;(j) 来自抗体 6G 或其显示在表 3 中的变体的重链的 3 个 CDR;(k) 来自抗体 6G 或其显示在表 3 中的变体的轻链的 3 个 CDR 以及来自抗体 6G 或其显示在表 3 中的变体的重链的 3 个 CDR;和 (l) 包含 (b) 至 (k) 中的任意一个的抗体。本发明还提供包含以上项目任意一个或多个的多肽。

[0093] 抗体 6G 的 CDR 部分（包括 Chothia 和 Kabat CDR）图解显示在图 1 中。CDR 区的确定是本领域技术人员熟知的。可以理解，在一些实施方案中，CDR 可以是 Kabat 和 Chothia CDR 的组合（也称作“组合 CDR”或“扩展 CDR”）。一些实施方案中，CDR 是 Kabat CDR。其它实施方案中，CDR 是 Chothia CDR。换言之，在具有一个以上 CDR 的实施方案中，所述 CDR 可以是 Kabat、Chothia、组合 CDR 或其组合中的任意一种。

[0094] 一些实施方案中，本发明提供多肽（可以是或可以不是抗体），该多肽包含与 6G 或其显示在表 3 中的变体的至少一个 CDR、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个或全部六个 CDR 基本上相同的至少一个 CDR、至少两个、至少三个、或至少四个、至少五个或全部六个 CDR。其它实施方案包括具有与 6G 的或衍生自 6G 的至少两个、三个、四个、五个或六个 CDR 基本上相同的至少两个、三个、四个、五个或六个 CDR 的抗体。一些实施方案中，所述至少一个、两个、三个、四个、五个、或六个 CDR 与 6G 或其显示在表 3 中的变体的至少一个、两个、三个、四个、五个或六个 CDR 有至少大约 85%、86%、87%、88%、89%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的同一性。可以理解，为了本发明的目的，结合特异性和 / 或总的活性一般地得到保持，但是与 6G 或其显示在表 3 中的变体相比活性程度可以不同（可以较高或较低）。

[0095] 本发明还提供包含 6G 或其显示在表 3 中的变体的氨基酸序列的多肽（可以是或可以不是抗体），其中所述氨基酸序列具有以下之任一：抗体 6G 或其显示在表 3 中的变体的序列中的至少 5 个连续氨基酸、至少 8 个连续氨基酸、至少大约 10 个连续氨基酸、至少大约 15 个连续氨基酸、至少大约 20 个连续氨基酸、至少大约 25 个连续氨基酸、至少大约 30 个连续氨基酸，其中这些氨基酸中的至少 3 个来自 6G（图 1）或其显示在表 3 中的变体的可变区。一个实施方案中，所述可变区来自 6G 的轻链。另一实施方案中，所述可变区来自 6G 的重链。一个示例性多肽具有来自 6G 的重链可变区和轻链可变区的连续氨基酸（长度如上述）。另一实施方案中，所述 5 个（或更多个）连续氨基酸来自图 1 所示 6G 的互补决定区（CDR）。一些实施方案中，所述连续氨基酸来自 6G 的可变区。

[0096] 本发明抗体和多肽的结合亲和性可以变化，不必（但可以）是特定的值或范围，如下述示例性实施方案。本发明抗体和多肽与  $A\beta_{1-40}$  的结合亲和性 ( $K_D$ ) 可以是大约 0.10 至大约 0.80nM、大约 0.15 至大约 0.75nM、和大约 0.18 至大约 0.72nM。一些实施方案中，所述结合亲和性是大约 2pM、大约 5pM、大约 10pM、大约 15pM、大约 20pM、大约 40pM、或大于大约 40pM。一个实施方案中，结合亲和性是大约 2pM 至大约 22pM。其它实施方案中，结合亲和性小于大约 10nM、大约 5nM、大约 4nM、大约 3nM、大约 2nM、大约 1nM、大约 900pM、大约 800pM、大约 700pM、大约 600pM、大约 500pM、大约 400pM、大约 300pM、大约 200pM、大约 150pM、大约 100pM、大约 90pM、大约 80pM、大约 70pM、大约 60pM、大约 50pM、大约 40pM、大约 30pM、大约 10pM。一些实施方案中，结合亲和性为大约 10nM。其它实施方案中，结合亲和性小于大约 10nM、小于大约 50nM、小于大约 100nM、小于大约 150nM、小于大约 200nM、小于大约 250nM、小于大约 500nM、或小于大约 1000nM。其它实施方案中，结合亲和性小于大约 5nM。其它实施方案中，结合亲和性小于大约 1nM。其它实施方案中，结合亲和性为大约 0.1nM 或大约 0.07nM。其它实施方案中，结合亲和性小于大约 0.1nM 或小于大约 0.07nM。其它实施方案中，结合亲和性为从大约 10nM、大约 5nM、大约 1nM、大约 900pM、大约 800pM、大约 700pM、大约 600pM、大约 500pM、大约 400pM、大约 300pM、大约 200pM、大约 150pM、大约 100pM、大约 90pM、大约 80pM、大约 70pM、大约 60pM、大约 50pM、大约 40pM、大约 30pM、大约 10pM 中的任意一个至大

约 2pM、大约 5pM、大约 10pM、大约 15pM、大约 20pM、或大约 40pM 中的任意一个。一些实施方案中,结合亲和性是大约 10nM、大约 5nM、大约 1nM、大约 900pM、大约 800pM、大约 700pM、大约 600pM、大约 500pM、大约 400pM、大约 300pM、大约 200pM、大约 150pM、大约 100pM、大约 90pM、大约 80pM、大约 70pM、大约 60pM、大约 50pM、大约 40pM、大约 30pM、大约 10pM 中的任意一个。再其它实施方案中,结合亲和性为大约 2pM、大约 5pM、大约 10pM、大约 15pM、大约 20pM、大约 40pM 或大于大约 40pM。

[0097] 本发明抗体和多肽还可以与  $A\beta_{1-36}$ 、 $A\beta_{1-37}$ 、 $A\beta_{1-38}$ 、 $A\beta_{1-39}$ 、 $A\beta_{1-42}$  和  $A\beta_{1-43}$  中的任意一个或多个结合,但是与这些肽中的任意一个或多个的结合亲和性小于它们与  $A\beta_{1-40}$  的结合亲和性。一些实施方案中,所述抗体或多肽与  $A\beta_{1-36}$ 、 $A\beta_{1-37}$ 、 $A\beta_{1-38}$ 、 $A\beta_{1-39}$ 、 $A\beta_{1-42}$  和  $A\beta_{1-43}$  中的任意一个或多个的  $K_D$  是其与  $A\beta_{1-40}$  的  $K_D$  的至少大约 5 倍、至少大约 10 倍、至少大约 20 倍、至少大约 30 倍、至少大约 40 倍、至少大约 50 倍、至少大约 80 倍、至少大约 100 倍、至少大约 150 倍、至少大约 200 倍或至少大约 250 倍。

[0098] 本发明还提供制备这些抗体或多肽中的任何抗体或多肽的方法。本发明抗体可以通过本领域已知的方法制备。例如,可以通过用  $A\beta$  肽(例如,  $A\beta_{25-40}$  作为免疫原)免疫哺乳动物,制备所述抗体。可以通过蛋白水解或其它的方式降解抗体,或通过如上述的重组方法(即,单个的或融合的多肽)或通过化学合成,而制备所述多肽。所述抗体的多肽,尤其是不超过大约 50 个氨基酸的较短多肽,可以通过化学合成方便地制备。化学合成方法是本领域已知的,并且是可以通过商业途径获得的。例如,可以通过自动多肽合成仪,使用固相方法,制备抗体。也参见美国专利 5,807,715 ;4,816,567 ;和 6,331,415。

[0099] 在另一备选方案中,抗体可以使用本领域熟知的方法重组制备。一个实施方案中,多核苷酸包含 SEQ ID NO :9 和 SEQ ID NO :10 中所示编码抗体 6G 的重链和 / 或轻链可变区的序列。另一实施方案中,包含 SEQ ID NO :9 和 SEQ ID NO :10 中所示核苷酸序列的多核苷酸被克隆至一个或多个用于表达或扩增的载体中。编码目的抗体的序列在宿主细胞中可以维持在载体中,然后可以扩增宿主细胞并将之冷冻以备用。对载体(包括表达载体)和宿主细胞,本文将进一步作出描述。

[0100] 本发明还包括本发明抗体,例如 6G,的单链可变区片段(“scFv”)。单链可变区片段可以通过使用短的连接肽将轻链和 / 或重链可变区连接在一起而制备。Bird 等 (1988) Science 242 :423-426。连接肽的一个实例是  $(GGGS)_3$ , 其在一个可变区的羧基端和另一可变区的氨基端之间形成了大约 3.5nm 的桥。具有其它序列的接头也已有设计和应用。Bird 等 (1988)。接头反过来可以被修饰以具有额外的功能,例如附着药物或附着固相支持物。所述单链变体可以通过重组方式或合成方式制备。对于 scFv 的合成制备,可以使用自动合成仪。对于 scFv 的重组制备,可以将含有编码该 scFv 的多核苷酸的适宜质粒导入适宜的宿主细胞,它可以是真核细胞如酵母、植物、昆虫或哺乳动物细胞,或者原核细胞例如大肠杆菌 (E. coli)。编码目的 scFv 的多核苷酸可以通过常规操作例如多核苷酸的连接而产生。所得 scFv 可以使用本领域已知的标准蛋白质纯化技术分离。

[0101] 本发明也包括其它形式的单链抗体,例如 diabody。Diabody 是二价双特异性抗体,其中 VH 和 VL 域表达在单一一条多肽链上,但是通过使用短至不允许同一条链上的这两个域发生配对的接头,从而迫使这些域与另一条链上的互补域配对而产生两个抗原结合位点(见例如, Holliger, P. 等 (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 :6444-6448 ;Poljak,

R. J. 等 (1994) Structure 2:1121-1123)。

[0102] 例如,双特异性抗体,对至少两种不同抗原具有结合特异性的单克隆抗体可以使用本文公开的抗体制备。制备双特异性抗体的方法是本领域已知的(见例如, Suresh 等, 1986, Methods in Enzymology 121:210)。传统上,双特异性抗体的重组制备以共表达两对免疫球蛋白重链-轻链为基础,其中所述两条重链具有不同的特异性 (Millstein 和 Cuello, 1983, Nature, 305:537-539)。

[0103] 根据制备双特异性抗体的一个方法,将具有所述期望结合特异性的抗体可变域(抗体-抗原结合位点)与免疫球蛋白恒定域序列融合。该融合物优选具有包含至少一部分铰链, CH2 和 CH3 区的免疫球蛋白重链恒定域。优选地,在至少一个融合物中存在含有结合轻链所必需的位点的第一重链恒定区 (CH1)。将编码这些免疫球蛋白重链融合物以及,如果期望的话,免疫球蛋白轻链的 DNA 插入分开的表达载体中,并共转染至适宜的宿主生物。在所述构建体中所用的这三条多肽链具有不等比率可以提供最佳产率的实施方案中,这使得可以极为灵活地调整这三个多肽片段的相互比例。然而,当至少两条多肽链以等比率表达可以导致高产率时或者当所述比率不具有特别意义时,将两条或全部三条多肽链的编码序列插入一个表达载体中是可能的。

[0104] 一个方法中,双特异性抗体由位于一条臂中的具有第一结合特异性的杂合免疫球蛋白重链和位于另一臂中的杂合免疫球蛋白重链-轻链对(提供第二结合特异性)组成。该不对称结构——免疫球蛋白轻链仅存在于该双特异性分子的一半中——有利于将期望的双特异性化合物与不想要的免疫球蛋白链组合分开。该方法描述在 1994 年 3 月 3 日公布的 PCT 公布号 W094/04690 中。

[0105] 包含两个共价连接的抗体的杂缀合抗体 (heteroconjugate antibody) 也在本发明范围内。此类抗体已经用于使免疫系统细胞靶向不想要的细胞 (美国专利号 4,676,980) 和用于治疗 HIV 感染 (PCT 申请公开号 W091/00360 和 W092/200373; EP03089)。杂缀合抗体可以使用任何方便的交联方法制备。适宜的交联剂和技术是本领域熟知的,描述在美国专利号 4,676,980 中。

[0106] 嵌合或杂合抗体也可以使用合成蛋白质化学的已知方法,包括涉及交联剂的那些方法,在体外制备。例如,可以使用二硫化物交换反应或者通过形成硫醚键,构建免疫毒素。适用于此目的的试剂的例子包括亚氨基硫醇酯和甲基-4-巯基丁酰亚胺酸酯 (butyrimidate)。

[0107] 包含抗体 6G 的一个或多个 CDR 或者衍生自抗体 6G 的一个或多个 CDR 的人源化抗体可以使用本领域已知的任何方法制备。例如,可以使用 4 个一般步骤对单克隆抗体实施人源化。这些步骤是:(1) 确定起始抗体轻链和重链可变域的核苷酸序列和预测的氨基酸序列;(2) 设计人源化抗体,即,决定在此人源化过程中使用何种抗体构架区;(3) 实际的人源化方法/技术;和 (4) 转染和表达该人源化抗体。见例如,美国专利号 4,816,567; 5,807,715; 5,866,692; 6,331,415; 5,530,101; 5,693,761; 5,693,762; 5,585,089; 6,180,370; 5,225,539; 6,548,640。

[0108] 在重组人源化抗体中,可以修饰 Fc $\gamma$  部分以避免与 Fc $\gamma$  受体及补体免疫系统发生相互作用。剑桥大学病理学系的 Mike Clark 博士设计了该类型的修饰,并且在 1999 年 11 月 18 日公开的 W099/58572 中描述制备此类抗体的技术。

[0109] 例如,如果抗体用于临床试验和人类治疗中,则可以对恒定区进行工程化改造以便更类似于人类恒定区从而避免免疫反应。见例如美国专利号 5,997,867 和 5,866,692。

[0110] 本发明包括抗体 6G 的修饰形式,包括不显著影响其性质的功能等价抗体和具有增强的或减弱的活性和/或亲和性的变体。例如,可以突变抗体 6G 的氨基酸序列以获得具有期望的  $AB_{1-40}$  肽结合亲和性的抗体。多肽的修饰是本领域的常规操作,无需在此详细描述。在实施例 1 中举例说明了对多肽的修饰。修饰的多肽的实例包括具有保守的氨基酸残基替代、一个或多个不显著有害地改变功能活性的氨基酸缺失或添加、或应用化学类似物的多肽。

[0111] 氨基酸序列插入包括长度从 1 个残基至含有 100 个或更多个残基的多肽的氨基和/或羧基端融合,以及序列内的单个或多个氨基酸残基插入。末端插入的实例包括具有 N 末端甲硫氨酰残基的抗体或与表位标签融合的抗体。抗体分子的其它插入变体包括抗体 N 或 C 端与酶或增加抗体血清半衰期的多肽的融合。

[0112] 替代变体在抗体分子中去掉至少一个氨基酸残基并在该位置插入不同的残基。对于替代诱变而言最有意义的位点包括超变区,但是 FR 改变也在考虑之列。保守替代显示表 1 中“保守替代”标题之下。如果此类替代导致生物学活性改变,则可以引入表 1 中命名为“示例性替代”的或者以下参考氨基酸类别进一步描述的更实质性改变,并筛选产物。

[0113] 表 1:氨基酸替代

[0114]

| 原始残基    | 保守替代 | 示例性替代                         |
|---------|------|-------------------------------|
| Ala (A) | Val  | Val; Leu; Ile                 |
| Arg (R) | Lys  | Lys; Gln; Asn                 |
| Asn (N) | Gln  | Gln; His; Asp; Lys; Arg       |
| Asp (D) | Glu  | Glu; Asn                      |
| Cys (C) | Ser  | Ser; Ala                      |
| Gln (Q) | Asn  | Asn; Glu                      |
| Glu (E) | Asp  | Asp; Gln                      |
| Gly (G) | Ala  | Ala                           |
| His (H) | Arg  | Asn; Gln; Lys; Arg            |
| Ile (I) | Leu  | Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸 |
| Leu (L) | Ile  | 正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe |
| Lys (K) | Arg  | Arg; Gln; Asn                 |
| Met (M) | Leu  | Leu; Phe; Ile                 |
| Phe (F) | Tyr  | Leu; Val; Ile; Ala; Tyr       |
| Pro (P) | Ala  | Ala                           |
| Ser (S) | Thr  | Thr                           |
| Thr (T) | Ser  | Ser                           |
| Trp (W) | Tyr  | Tyr; Phe                      |
| Tyr (Y) | Phe  | Trp; Phe; Thr; Ser            |
| Val (V) | Leu  | Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸 |

[0115] 抗体生物学性质的实质性修饰可以通过选择对于维持 (a) 替代区域中多肽骨架的结构,例如,片层或螺旋构象;(b) 靶位点处分子的电荷或疏水性;或(c) 侧链体积具有显著不同的影响的替代而实现。天然残基基于通常的侧链性质可以划分为以下几组:

[0116] (1) 非极性:正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile;

[0117] (2) 极性不带电荷:Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;

[0118] (3) 酸性(带负电荷):Asp、Glu;

[0119] (4) 碱性(带正电荷):Lys、Arg;

[0120] (5) 影响侧链取向的残基:Gly、Pro;和

[0121] (6) 芳族的:Trp、Tyr、Phe、His。

[0122] 非保守性替代可以通过将属于这些类型中的一种类型的成员变换为另一种类型来进行。

[0123] 任何不参与维持抗体正常构象的半胱氨酸残基也可以被替代,一般地使用丝氨酸替代,以改善该分子的氧化稳定性和防止异常的交联。反过来,可以给抗体添加半胱氨酸键,尤其是当所述抗体是抗体片段如 Fv 片段时,以便提高其稳定性。

[0124] 氨基酸修饰的范围可以从改变或修饰一个或多个氨基酸到完全地重现设计一个区域,例如可变区。可变区中的变化可以改变结合亲和性和/或特异性。在一些实施方案中,在 CDR 域中进行不超过 1 个至 5 个保守氨基酸替代。在其它实施方案中,在 CDR 域中进行不超过 1 个至 3 个保守氨基酸替代。在再其它实施方案中,所述 CDR 域是 CDRH3 和/或 CDR L3。

[0125] 修饰也包括糖基化的和非糖基化的多肽,以及具有其它翻译后修饰的多肽,例如,具有不同糖的糖基化、乙酰化和磷酸化。抗体在其恒定区的保守位置发生糖基化(Jefferis 和 Lund,1997,Chem. Immunol. 65:111-128;Wright 和 Morrison,1997,TibTECH15:26-32)。免疫球蛋白的寡糖侧链影响该蛋白的功能(Boyd 等,1996,Mol. Immunol. 32:1311-1318;Wittwe 和 Howard,1990,Biochem. 29:4175-4180)以及该糖蛋白的不同部分之间的分子内相互作用——这可以影响该糖蛋白的构象和所呈现出的三维表面(Hefferis 和 Lund,上述引文;Wyss 和 Wagner,1996,Current Opin. Biotech. 7:409-416)。寡糖也可以用于使给定的糖蛋白基于特异的识别结构而靶向某些分子。抗体的糖基化也已经被报道可以影响抗体依赖的细胞介导的细胞毒性(ADCC)。具体地,据报道,在四环素的调节下表达  $\beta$  (1,4)-N-乙酰基葡萄糖胺转移酶 III (GnTIII)——一种催化分叉性 GlcNAc 形成的糖基转移酶——的 CHO 细胞具有改善的 ADCC 活性(Umana 等,1999,Mature Biotech. 17:176-180)。

[0126] 抗体的糖基化典型地是 N-连接的或 O-连接的。N-连接的糖基化指糖部分与天冬酰胺残基的侧链连接。三肽序列,天冬酰胺-X-丝氨酸、天冬酰胺-X-苏氨酸和天冬酰胺-X-半胱氨酸(其中 X 是除了脯氨酸之外的任何氨基酸),是使糖部分与天冬酰胺侧链发生酶促连接的识别序列。因此,当多肽中存在这些三肽序列之任一个时将产生潜在的糖基化位点。O-连接的糖基化指糖 N-乙酰基半乳糖胺、半乳糖或木糖之一与羟基氨基酸的连接,其中所述羟基氨基酸最通常是丝氨酸或苏氨酸,但是也可以使用 5-羟基脯氨酸或 5-羟基赖氨酸。

[0127] 向抗体添加糖基化位点可以通过改变氨基酸序列使其包含上述三肽序列之一或多个(对 N-连接的糖基化位点)而方便地实现。该改变也可以通过向原始抗体序列中添

加或替代入一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基而实现（对 O- 连接的糖基化位点）。

[0128] 也可以改变抗体的糖基化模式而不改变基础的核苷酸序列。糖基化在相当大程度上取决于用于表达抗体的宿主细胞。由于用于表达重组糖蛋白，例如抗体，作为潜在治疗剂的细胞类型很少是原初的细胞，故可以预期抗体糖基化模式的变化（见例如，Hse 等，1997，J. Biol. Chem. 272 :9062-9070）。

[0129] 除了宿主细胞的选择外，在抗体重组生产过程中影响糖基化的因素还包括生长模式、培养基的配制、培养密度、充氧、pH、纯化方案等。已经提出各种方法来改变在特定宿主生物体中获得的糖基化模式，包括引入或过表达参与寡糖产生的某些酶（美国专利号 5,047,335 ;5,510,261 和 5,278,299）。糖基化，或某些类型的糖基化，可以通过酶学方法，例如，使用内切糖苷酶 H(Endo H)、N-糖苷酶 F（见实施例 1 的描述）、内切糖苷酶 F1、内切糖苷酶 F2、内切糖苷酶 F3，从糖蛋白上除去。此外，可以遗传工程改造重组宿主细胞以便在某些类型的多糖的加工上出现缺陷。这些以及类似技术是本领域熟知的。

[0130] 其它修饰方法包括使用本领域已知的偶联技术，包括，但不限于，酶学方法、氧化取代和螯合。可以通过修饰来例如连接标记物用于免疫分析试验。可以使用本领域成熟的程序制备修饰的 6G 多肽，并且可以使用本领域已知的标准分析试验（其中一些在下面和实施例中进行了描述）筛选该多肽。

[0131] 其它抗体修饰包括按照 1999 年 11 月 18 日公布的 PCT 公布号 W099/58572 所述修饰的抗体。这些抗体，除了包含指向靶分子的结合域外，还包含具有与人免疫球蛋白重链恒定域之全部或部分基本上同源的氨基酸序列的效应子域。这些抗体能够结合靶分子而不触发显著的补体依赖性裂解、或者细胞介导的靶破坏。一些实施方案中，所述效应子域能够特异地结合 Fc $\gamma$ Rn 和 / 或 Fc $\gamma$ RIIb。这些典型地以衍生自两个或更多个人免疫球蛋白重链 C $\mu$ 2 域的嵌合域为基础。以此方式修饰的抗体特别适合用于长期抗体治疗中，以避免针对常规抗体治疗出现的炎症和其它不良反应。

[0132] 本发明包括亲和力饱和的实施方案。例如，亲和力饱和的抗体可以通过本领域已知的程序制备 (Marks 等，1992，Bio/Technology, 10 :779-783 ;Barbas 等，1994，Proc Nat. Acad. Sci, USA91 :3809-3813 ;Schier 等，1995，Gene, 169 :147-155 ;Yelton 等，1995，J. Immunol. 155 :1994-2004 ;Jackson 等，1995，J. Immunol. 154(7) :3310-9 ;Hawkins 等，1992，J. Mol. Biol. , 226 :889-896 ;和 W02004/058184)。

[0133] 以下方法可以用于调整抗体的亲和力以及用于表征 CDR。表征抗体 CDR 和 / 或改变（例如提高）多肽如抗体的结合亲和力的一种方法称作“文库扫描诱变”。一般地，文库扫描诱变按如下方式进行。使用本领域已知的方法，用两个或更多个（例如，3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 个）氨基酸替换 CDR 中的一个或多个氨基酸位置。这产生小的克隆文库（在一些实施方案中，针对每一个分析的氨基酸位置有 1 个文库），每一个文库具有两个或更多个成员的复杂度（如果在每一个位置替换两个或更多个氨基酸）。一般地，该文库还包括含有原始（未被替代的）氨基酸的克隆。每个文库取少量克隆，例如，大约 20-80 个克隆（取决于文库的复杂度），基于与靶多肽（或其它结合剂）的结合亲和力，筛选这些克隆，并鉴定具有增加的、相同的、降低的结合或无结合的候选物。确定结合亲和力的方法是本领域熟知的。可以使用检测大约 2 倍或更多的结合亲和力差异的 BIAcore 表面等离子共振分析来测定结合亲和力。当起始抗体已经以相对高的亲和力，

例如大约 10nM 或更低的  $K_D$ , 发生结合时, BIAcore 是特别有用的。本文实施例中描述了使用 BIAcore 表面等离子共振进行的筛选。

[0134] 可以使用 Kinexa Biocensor、亲近闪烁检测法 (Scintillation Proximity Assay)、ELISA、ORIGEN 免疫分析 (IGEN)、荧光淬灭、荧光转移、和 / 或酵母展示, 测定结合亲和力。也可以使用适宜的生物分析试验, 筛选结合亲和力。

[0135] 一些实施方案中, 使用本领域认可的诱变方法 (本文中描述了其中一些方法), 在 CDR 的每一个氨基酸位置 (一些实施方案中, 每次一个位置) 实施所有 20 种天然氨基酸的替换。这产生小的克隆文库 (一些实施方案中, 每一个分析的氨基酸位置一个文库), 每一个文库具有 20 个成员的复杂度 (如果每一个位置发生全部的 20 种氨基酸替代)。

[0136] 一些实施方案中, 待筛选的文库包含发生在两个或更多个位置的替代, 所述位置可以位于相同 CDR 中或位于两个或更多个 CDR 中。因此, 该文库可以包含发生在一个 CDR 中的两个或更多个位置的替代。该文库可以包含发生在两个或更多个 CDR 中的两个或更多个位置的替代。该文库可以包含发生在 3 个、4 个、5 个或更多个位置的替代, 所述位置存在于两个、三个、四个、五个或六个 CDR 中。所述替代可以使用低冗余密码子制备。见例如 Balint 等 (1993) Gene 137 (1): 109-18 之表 2。

[0137] 所述 CDR 可以是 CDRH3 和 / 或 CDRL3。所述 CDR 可以是 CDRL1、CDRL2、CDRL3、CDRH1、CDRH2 和 / 或 CDRH3 中的一个或多个。所述 CDR 可以是 Kabat CDR、Chothia CDR 或扩展 CDR。

[0138] 可以对具有改良的结合的候选物进行测序, 由此鉴定导致改善的亲力的 CDR 替代突变体 (也称作“改善的”替代)。也可以对发生结合的候选物进行测序, 由此鉴定保持结合的 CDR 替代。

[0139] 可以实施多轮筛选。例如, 具有改善的结合的候选物 (每一个包含位于一个或多个 CDR 的一个或多个位置的氨基酸替代) 也可以用于设计在每一个改善的 CDR 位置 (即, 显示出改良的结合的替代突变体所在的 CDR 氨基酸位置) 包含至少原始的和替代的氨基酸的第二文库。以下进一步讨论该文库的制备、和筛选或选择。

[0140] 文库扫描诱变也为表征 CDR 提供了一种手段, 具有改良的结合、相同的结合、降低的结合或无结合的克隆的频率也提供了有关每个氨基酸位置对于抗体抗原复合物的稳定性而言所具有的重要性的信息。例如, 如果 CDR 的一个位置在变化成所有 20 种氨基酸时仍保持结合, 则该位置可以被鉴定为不可能是抗原结合所必需的位置。相反地, 如果 CDR 的一个位置仅在一小部分替代中保持结合, 则该位置被鉴定为是对 CDR 功能具有重要性的位置。因此, 文库扫描诱变方法可以产生关于 CDR 中可以被变化成许多不同氨基酸 (包括全部 20 种氨基酸) 的位置以及 CDR 中不能被改变或仅能够被改变成少数几种氨基酸的位置的信息。

[0141] 可以将具有改良的亲力的候选物合并到第二文库中, 该文库包括在该位置的改良的氨基酸、原始氨基酸, 并且还可以包括在该位置的其它替代, 这取决于所期望的或者使用期望的筛选或选择方法所能允许的文库复杂度。此外, 如果期望的话, 可以随机地赋予邻近的氨基酸位置至少两种或更多种氨基酸。邻近氨基酸的随机化可以允许在突变 CDR 中具有额外的构象灵活性, 这反过来可以允许或有利于引入更大数量的改良突变。该文库也可以包含在第一轮筛选中未显示出改良的亲力的位置的替代。

[0142] 使用任何本领域已知方法,包括利用 BIAcore 表面等离子共振分析进行筛选,以及利用本领域已知用于选择的任何选择方法,包括噬菌体展示、酵母展示和核糖体展示,进行选择,从第二文库筛选或选择具有改良的和/或改变的结合亲和力的文库成员。

[0143] 本发明还包括包含来自本发明抗体(如 6G)或多肽的一个或多个片段或区域的融合蛋白。一个实施方案中,提供包含 SEQ ID NO:2 所示轻链可变区(图 1)的至少 10 个连续氨基酸和/或 SEQ ID NO:1 所示重链可变区(图 1)的至少 10 个氨基酸的融合多肽。其它实施方案中,提供包含 SEQ ID NO:2 所示轻链可变区(图 1)的至少大约 10 个、至少大约 15 个、至少大约 20 个、至少大约 25 个、或至少大约 30 个连续氨基酸和/或 SEQ ID NO:1 所示重链可变区(图 1)的至少大约 10 个、至少大约 15 个、至少大约 20 个、至少大约 25 个、或至少大约 30 个连续氨基酸的融合多肽。在另一实施方案中,融合多肽包含如图 1 之 SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:1 所示的 6G 轻链可变区和/或重链可变区。在另一实施方案中,融合多肽包含 6G 的一个或多个 CDR。在再一实施方案中,融合多肽包含抗体 6G 的 CDR H3 和/或 CDR L3。为了本发明的目的,6G 融合蛋白含有一个或多个 6G 抗体和在天然分子中并不与 6G 连接的另一氨基酸序列,例如,异源序列或来自另一区域的同源序列。异源序列的实例包括但不限于“标签”,例如 FLAG 标签或 6His 标签。标签是本领域熟知的。

[0144] 6G 融合多肽可以通过本领域已知的方法,例如,合成或重组方法,制备。典型地,本发明 6G 融合蛋白通过使用本文所述重组方法制备并表达编码它们的多核苷酸而产生,但是也可以通过本领域已知的其它方式,包括例如化学合成来产生。

[0145] 本发明也提供包含与利于和固相支持物偶联的试剂(例如生物素或抗生物素蛋白)缀合(例如,连接)的 6G 抗体或多肽的组合物。为了简便,一般提及 6G 或抗体,但应明了这些方法适用于本文描述的任何  $A\beta_{1-40}$  结合实施方案。缀合一般指按本文所述将这些成分连接起来。连接(其一般是指至少为了施用的目的而固定这些成分使它们处于紧密联系中)可以通过多种方式实现。例如,当试剂和抗体各具有能够与对方反应的取代基时,试剂和抗体可以直接反应。例如,位于其中一个分子上的亲核基团,例如,氨基或巯基,可能能够与位于另一分子上的含羰基基团,例如,酐或酰基卤,或者含有良好离去基团(例如卤素)的烷基基团反应。

[0146] 本发明抗体或多肽可以与标记试剂(或者称作“标记物”)例如荧光分子、放射性分子或本领域已知的任何其它标记物连接。标记物是本领域已知的,一般提供(直接地或者间接地)信号。

[0147] 本发明还提供包含抗体 6G,以及,正如本公开所解释的,本文所述任何或所有的抗体和/或多肽的组合物(包括药物组合物)和药盒。

[0148] 具有受损的效应子功能的抗  $A\beta$  抗体和多肽

[0149] 本文所述抗体或多肽(包括包含该抗体或多肽的药物组合物)可以具有受损的效应子功能。在本文中,具有“受损的效应子功能”(可以与“免疫学惰性的”或“部分免疫学惰性的”互换使用)的抗体或多肽指不具有任何效应子功能或者具有一种或多种降低的效应子功能活性(与具有未修饰的或者天然存在的恒定区的抗体或多肽相比)的抗体或多肽,例如不具有或具有降低的如下活性之任一种或多种:a) 触发补体介导的裂解;b) 刺激抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC);和 c) 激活小胶质细胞。该效应子功能活性可以降低大约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99% 或 100%。一些实施

方案中,抗体与  $\beta$ -淀粉样肽结合而不触发显著的补体依赖性靶裂解或者细胞介导的靶破坏。例如,恒定区上的 Fc 受体结合位点可以被修饰或突变以去除或降低与某些 Fc 受体,例如 Fc  $\gamma$  RI、Fc  $\gamma$  RII 和 / 或 Fc  $\gamma$  RIII 的结合亲和力。为了简便,提及抗体时应理解所述实施方案也适用于多肽。EU 编号系统 (Kabat 等, Sequences of Proteins of Immunological Interest; 第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991) 被用于指示恒定区 (例如, IgG 抗体的恒定区) 中哪个 (或哪些) 氨基酸残基被改变或突变。该编号可以用于特定类型的抗体 (例如, IgG1) 或物种 (例如人), 但应理解可以跨抗体和物种类型进行类似变化。

[0150] 一些实施方案中,特异地结合 A $\beta$  肽的抗体包含具有受损的效应子功能的重链恒定区。该重链恒定区可以具有天然序列或者是变体。一些实施方案中,突变天然重链恒定区的氨基酸序列,例如,通过氨基酸替代、插入和 / 或缺失进行突变,由此损害该恒定区的效应子功能。一些实施方案中,也可以改变,例如,可以完全或部分地除去,重链恒定区 Fc 区的 N-糖基化,由此损害该恒定区的效应子功能。

[0151] 一些实施方案中,通过去除抗 A $\beta$  肽 Fc 区 (例如, IgG 的 CH2 域中的) 的 N-糖基化,损害效应子功能。一些实施方案中,通过突变被糖基化的氨基酸残基或者构成恒定区糖基化识别序列一部分的侧翼残基,去除 Fc 区的 N-糖基化。三肽序列,天冬酰胺 -X- 丝氨酸 (N-X-S)、天冬酰胺 -X- 苏氨酸 (N-X-T) 和天冬酰胺 -X- 半胱氨酸 (N-X-C) (其中 X 是除脯氨酸之外的任何氨基酸),是糖部分与天冬酰胺侧链发生酶促连接形成 N-糖基化的识别序列。对恒定区中此三肽序列中任何氨基酸进行突变,产生无糖基化的 IgG。例如,可以将人 IgG1 和 IgG3 的 N-糖基化位点 N297 突变为 A、D、Q、K 或 H。见, Tao 等, J. Immunology, 143: 2595-2601 (1989); 和 Jefferis 等, Immunological Reviews 163: 59-76 (1998)。已经报道,具有 Asn-297 至 Gln、His 或 Lys 的替代的人 IgG1 和 IgG3 不与人 Fc  $\gamma$  RI 结合,并且不激活补体,其中对于 IgG1 而言 C1q 结合能力完全丧失,对于 IgG3 而言该能力急剧降低。一些实施方案中,三肽序列中的氨基酸 N 被突变为以下任一种氨基酸: A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, Y。在一些实施方案中,三肽序列中的氨基酸 N 被突变为保守替代。一些实施方案中,三肽序列中的氨基酸 X 被突变为脯氨酸。一些实施方案中,三肽序列中的氨基酸 S 被突变为 A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, V, W, Y。一些实施方案中,三肽序列中的氨基酸 T 被突变为 A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, V, W, Y。一些实施方案中,三肽序列中的氨基酸 C 被突变为 A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, V, W, Y。一些实施方案中,位于该三肽之后的氨基酸被突变为 P。一些实施方案中,恒定区的 N-糖基化通过酶学方式去除 (例如,如实施例 1 中所示的 N-糖苷酶 F、内切糖苷酶 F1、内切糖苷酶 F2、内切糖苷酶 F3 和内切糖苷酶 H)。也可以通过在具有 N-糖基化作用缺陷的细胞系中生产抗体,而去除 N-糖基化。Wright 等, J. Immunol. 160 (7): 3393-402 (1998)。

[0152] 一些实施方案中,对与附着于恒定区 N-糖基化位点的寡糖发生相互作用的氨基酸残基进行突变,以降低和 Fc  $\gamma$  RI 的结合亲和力。例如,可以突变人 IgG3 的 F241、V264、D265。见, Lund 等, J. Immunology 157: 4963-4969 (1996)。

[0153] 一些实施方案中,通过修饰区域例如人 IgG 的 233-236, 297, 和 / 或 327-331 (参见 PCT W099/58572 和 Armour 等, Molecular Immunology 40: 585-593 (2003); Reddy 等, J. Immunology 164: 1925-1933 (2000)), 损害效应子功能。PCT W099/58572 和 Armour 等

描述的抗体除了包含指向靶分子的结合域外还包含具有与人免疫球蛋白重链恒定区之全部或部分基本上同源的氨基酸序列的效应子域。这些抗体能够结合靶分子同时不触发显著的补体依赖性靶裂解或细胞介导的靶破坏。一些实施方案中,所述效应子域对 Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RIIa 和 / 或 Fc $\gamma$ RIII 具有降低的亲合力。一些实施方案中,所述效应子域能够特异地结合 FcRn 和 / 或 Fc $\gamma$ RIIb。这些典型地以衍生自两个或更多个人免疫球蛋白重链 C $\mu$ 2 域的嵌合域为基础。以此方式修饰的抗体尤其适用于长期抗体治疗,以避免常规抗体治疗时出现的炎症和其它不良反应。一些实施方案中,抗体重链恒定区是具有任何如下突变的人重链 IgG1:1)A327A330P331 至 G327S330S331;2)E233L234L235G236 至 P233V234A235 且 G236 缺失;3)E233L234L235 至 P233V234A235;4)E233L234L235G236A327A330P331 至 P233V234A235G327S330S331 且 G236 缺失;5)E233L234L235A327A330P331 至 P233V234A235G327S330S331;和6)N297 至 A297 或除 N 之外的任何其它氨基酸。这些突变可以组合,例如,1) 至 5) 之任一可以和 6) 组合。一些实施方案中,所述抗体重链恒定区是具有如下突变的人重链 IgG2:A330P331 至 S330S331;N297 至 Q297;和 N297G327A330P331 至 Q297G327S330S331。一些实施方案中,所述抗体重链恒定区是具有以下任何突变的人重链 IgG4:E233F234L235G236 至 P233V234A235 且 G236 缺失;E233F234L235 至 P233V234A235;P228L235 至 S228E235;N297 至 Q297;和 E233F234L235G236N297 至 P233V234A235G236Q297。

[0154] 也可以修饰所述抗体恒定区以破坏补体的活化。例如, IgG 抗体在结合补体的 C1 成分后的补体激活作用可以通过突变恒定区中 C1 结合基序(例如, C1q 结合基序)内的氨基酸残基而降低。已经报道,针对人 IgG1 的 D270、K322、P329 和 P331 之每一个的 Ala 突变均显著地降低该抗体结合 C1q 和激活补体的能力。对于鼠 IgG2b, C1q 结合基序由残基 E318、K320 和 K322 组成。Idusogie 等, J. Immunology 164:4178-4184 (2000); Duncan 等, Nature 322:738-740 (1988)。

[0155] 据认为,针对鼠 IgG2b 所鉴定的 C1q 结合基序 E318、K320 和 K322 是其它抗体同种型所共有的。Duncan 等, Nature 322:738-740 (1988)。可以通过将所述三个特定残基中的任意一个残基置换为在其侧链上具有不适宜的功能性的残基,而废除 IgG2b 的 C1q 结合活性。不一定只有用 Ala 替代离子残基才能废除 C1q 的结合。也可以使用其它烷基取代的非离子残基,例如, Gly, Ile, Leu 或 Val, 或者芳族非极性残基如 Phe, Tyr, Trp 和 Pro 替代所述三个残基中的任意一个以废除 C1q 的结合。此外,也可以使用极性非离子残基例如 Ser, Thr, Cys 和 Met 替代残基 320 和 322 而非残基 318,以废除 C1q 结合活性。

[0156] 本发明还提供具有受损的效应子功能的抗体,其中所述抗体具有修饰的铰链区。人 IgG 对其 Fc 受体的结合亲和力可以通过修饰铰链区来调整。Canfield 等, J. Exp. Med. 173:1483-1491 (1991); Hezareh 等, J. Virol. 75:12161-12168 (2001); Redpath 等, Human Immunology 59:720-727 (1998)。可以突变或缺失特定的氨基酸残基。修饰的铰链区可以包含从与 CH1 域的抗体类型或亚类不同的抗体类型或亚类的抗体衍生的完整铰链区。例如, IgG 类抗体的恒定区 (CH1) 可以与 IgG4 类抗体的铰链区连接。或者,该新的铰链区可以包含部分的天然铰链或者重复单元,其中所述重复中的每一个单元都衍生自天然铰链区。一些实施方案中,通过将一个或多个半胱氨酸残基转换成中性残基,例如,丙氨酸,或者通过将位于适宜位置的残基转换成半胱氨酸残基,而改变天然铰链区。美国专利号 5,677,425。这些改变可以使用本领域认可的蛋白化学以及优选地,遗传工程技术,按照本

文所述进行。

[0157] 特异地与 A $\beta$  肽结合并与具有受损的效应子功能的重链恒定区融合的多肽也可以用于本文所述的方法中。一些实施方案中,所述多肽包含衍生自抗体 6G 或其显示在表 3 中的变体的序列。一些实施方案中,所述多肽衍生自与 A $\beta$  肽结合的单域抗体。单域抗体可以使用本领域已知的方法制备。Omidfar 等, *Tumour Biol.* 25 :296-305 (2004) ;Herring 等, *Trends in Biotechnology* 21 :484-489 (2003)。

[0158] 一些实施方案中,所述抗体或多肽是 F(ab')<sub>2</sub> 片段。一些实施方案中,所述抗体或多肽是 Fab 片段。一些实施方案中,所述抗体或多肽是单链抗体 scFv。一些实施方案中,所述抗体或多肽是 PEG 化的 F(ab')<sub>2</sub> 片段。一些实施方案中,所述抗体或多肽是 PEG 化的 Fab 片段。一些实施方案中,所述抗体或多肽是 PEG 化的单链抗体 scFv。

[0159] 也可以使用本领域已知的制备具有受损的效应子功能的抗体的其它方法。

[0160] 可以在一或多个试验中检测具有修饰的恒定区的抗体或多肽,以评价相对于起始抗体而言效应子功能的生物活性降低水平。例如,可以使用本文所公开的试验以及任何本领域认可的试验,评价具有改变的 Fc 区的抗体或多肽与补体或 Fc 受体(例如,小胶质细胞上的 Fc 受体)结合的能力或具有改变的铰链区的抗体或多肽的能力。PCT W099/58572 ; Armour 等, *Molecular Immunology* 40 :585-593 (2003) ;Reddy 等, *J. Immunology* 164 :1925-1933 (2000) ;Song 等, *Infection and Immunity* 70 :5177-5184 (2002)。

[0161] 可以使用竞争试验确定是否是两个抗体通过识别相同的或空间上重叠的表位而与相同的表位结合还是一个抗体竞争地抑制另一抗体与抗原的结合。这些试验是本领域已知的。典型地,将抗原固定在多孔板上并测量未标记的抗体阻断标记抗体的结合的能力。对此此类竞争试验,常用的标记物是放射性标记物或酶标记物。

[0162] 可以基于清除淀粉样蛋白沉积物的效力和其它有益效果,例如改善的认知能力,筛选与 A $\beta$  特异地结合的抗体和多肽。例如,可以将抗体或多肽施用给具有阿尔茨海默氏病的病理情况的动物。本领域已知各种阿尔茨海默氏病动物模式。在施用之后,可以使用本领域已知的和实施例 2 中详细描述的方法,检测致密的和弥散的淀粉样蛋白斑的水平、认知的行为分析、以及小胶质细胞的活化和微出血。PCT W02004/032868 ;Wilcock 等, *J. Neurosci.* 23 :3745-3751 (2003) ;Wilcock 等, *J. Neuroinflammation* 1 :24 (2004)。

[0163] 多核苷酸、载体和宿主细胞

[0164] 本发明还提供编码本发明抗体和多肽(包括包含图 1 所示轻链和重链可变区的多肽序列的抗体)的分离的多核苷酸、以及包含该多核苷酸的载体和宿主细胞。

[0165] 因此,本发明提供包含编码如下之任一项的多核苷酸的多核苷酸(或者组合物,包括药物组合物):a) 抗体 6G 或其显示在表 3 中的变体;b) 抗体 6G 或其显示在表 3 中的变体的片段或区域;c) 抗体 6G 或其显示在表 3 中的变体的轻链;d) 抗体 6G 或其显示在表 3 中的变体的重链;e) 来自抗体 6G 或其显示在表 3 中的变体的轻链和/或重链的一个或多个可变区;f) 抗体 6G 或其显示在表 3 中的变体的一个或多个 CDR(一个、两个、三个、四个、五个或六个 CDR);g) 来自抗体 6G 重链的 CDR H3;h) 来自抗体 6G 或其显示在表 3 中的变体的轻链的 CDR L3;i) 来自抗体 6G 或其显示在表 3 中的变体的轻链的 3 个 CDR;j) 来自抗体 6G 或其显示在表 3 中的变体的重链的 3 个 CDR;k) 来自抗体 6G 或其显示在表 3 中的变体的轻链的 3 个 CDR 以及来自抗体 6G 或其显示在表 3 中的变体的重链的 3 个 CDR;和

1) 包含 (b) 至 (k) 至任一项的抗体。一些实施方案中,所述多核苷酸包含 SEQ ID NO :9 和 SEQ ID NO :10 中所示多核苷酸之一或两者。

[0166] 另一方面,本发明提供编码本文所述任何抗体(包括抗体片段)和多肽,例如,具有受损的效应子功能的抗体和多肽的多核苷酸。多核苷酸可以通过本领域已知的方法制备。

[0167] 另一方面,本发明提供包含本发明任何多核苷酸的组合物(例如药物组合物)。一些实施方案中,所述组合物包含含有编码本文所述抗体 6G 的多核苷酸的表达载体。其它实施方案中,所述组合物包含含有编码本文所述任何抗体或多肽的多核苷酸的表达载体。再其它实施方案中,所述组合物包含 SEQ ID NO :9 和 SEQ ID NO :10 中所示多核苷酸之一或两者。表达载体和多核苷酸组合物的施用将在本文中作进一步描述。

[0168] 另一方面,本发明提供制备本文所述任何多核苷酸的方法。

[0169] 与任何此类序列互补的多核苷酸也包括在本发明中。多核苷酸可以是单链的(编码链或反义链)或者双链的,并且可以是 DNA(基因组 DNA、cDNA 或合成的 DNA)或 RNA 分子。RNA 分子包括含有内含子并以一对一的方式对应于 DNA 分子的 HnRNA 分子,以及不含内含子的 mRNA 分子。其它的编码或非编码序列可以,但不必然,存在于本发明的多核苷酸中。多核苷酸可以,但不必然,与其它分子和/或支持材料相连。

[0170] 多核苷酸可以包含天然序列(即,编码抗体或其部分的内源序列)或者可以包含该序列的变体。多核苷酸变体含有一个或多个替代、添加、缺失和/或插入以致所编码的多肽的免疫反应性相对于天然免疫反应性分子而言不减低。对所编码的多肽的免疫反应性的影响一般可以按照本文所述进行评估。变体优选地表现出与编码天然抗体或其部分的多核苷酸序列具有至少大约 70% 同一性,更优选地至少大约 80% 同一性,最优选地至少大约 90% 同一性。

[0171] 如果两个多核苷酸或多肽序列在按照下述进行比对以获得最大对应性的情况下两个序列中的核苷酸或氨基酸序列相同,则这两个多核苷酸或多肽序列被称作是“同一的”。两个序列之间的比较典型地通过比较窗中比较序列以鉴定和比较局部区域的序列相似性来进行。本文中,“比较窗”指具有至少大约 20 个连续位置、通常 30 至大约 75, 40 至大约 50 个连续位置的区段,在该区段中序列可以在实施最佳比对之后与具有相同数目的连续位置的参考序列进行比较。

[0172] 为了比较的目的实施的序列最佳比对可以使用 Lasergene 生物信息软件组(DNASTAR, Inc., Madison, WI) 中的 Megalign 程序以及默认参数进行。该程序体现了以下参考文献中描述的几种比对方案:Dayhoff, M. O. (1978) 蛋白质的进化改变模型 - 用于检测远源关系的矩阵 (A model of evolutionary change in proteins-Matrices for detecting distant relationships.) Dayhoff, M. O. (编) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC Vol. 5, Suppl. 3, pp. 345-358; Hein J., 1990, Unified Approach to Alignment and Phylogenesis pp. 626-645 Methods in Enzymology vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D. G. 和 Sharp, P. M., 1989, CABIOS 5:151-153; Myers, E. W. 和 Muller W., 1988, CABIOS 4:11-17; Robinson, E. D., 1971, Comb. Theor. 11:105; Santou, N., Nes, M., 1987, Mol. Biol. Evol. 4:406-425; Sneath, P. H. A. 和 Sokal, R. R., 1973, Numerical Taxonomy the

Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA; Wilbur, W. J. 和 Lipman, D. J., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:726-730。

[0173] 优选地,通过在至少 20 个位置的比较窗中比较两个最佳比对的序列,确定“序列同一性百分数”,其中为了获得所述两个序列的最佳比对,比较窗中的多核苷酸或多肽序列部分可以相对于参考序列(不含添加或缺失)而言包含 20%或更少、通常 5%至 15%或 10%至 12%的添加或缺失(即,缺口)。该百分数通过如下方式计算:确定两个序列中出现相同酸碱基或氨基酸残基的位置的数目以产生匹配位置的数目,然后用该匹配位置的数目除以参考序列中位置的总数(即,窗的大小),并将结果乘以 100 以产生序列同一性百分数。

[0174] 变体也或者备选地可以与天然基因或其部分或互补物基本上同源。此类多核苷酸变体能够在中等严紧条件下与编码天然抗体的天然 DNA 序列(或互补序列)杂交。

[0175] 适宜的“中等严紧条件”包括在 5XSSC, 0.5% SDS, 1.0mM EDTA (pH8.0) 的溶液中预洗涤;在 50℃-65℃, 5XSSC 中杂交过夜;之后在 65℃分别用含有 0.1% SDS 的 2X, 0.5X 和 0.2XSSC 各洗涤两次 20 分钟。

[0176] 本文中,“高严紧条件”或“高严紧性条件”是指利用以下条件的那些:(1) 使用低离子强度和高温进行洗涤,例如,0.015M 氯化钠/0.0015M 柠檬酸钠/0.1%十二烷基硫酸钠于 50℃;(2) 杂交过程中使用变性剂,例如甲酰胺,例如,50% (v/v) 甲酰胺与 0.1% 牛血清白蛋白/0.1% Ficoll/0.1% 聚乙烯吡咯烷酮/50mM 磷酸钠缓冲液 pH6.5 和 750mM 氯化钠, 75mM 柠檬酸钠于 42℃;或者(3) 使用 50% 甲酰胺, 5XSSC (0.75M NaCl, 0.075M 柠檬酸钠), 50mM 磷酸钠 (pH6.8), 0.1% 焦磷酸钠, 5xDenhardt 氏溶液, 超声的鲑鱼精子 DNA (50  $\mu$ g/ml), 0.1% SDS, 和 10% 硫酸葡聚糖于 42℃, 并在 0.2 x SSC (氯化钠/柠檬酸钠) 中 42℃ 洗涤和在 50% 甲酰胺中 55℃ 洗涤,之后用含有 EDTA 的 0.1xSSC 在 55℃ 下进行高严紧性洗涤。本领域技术人员将明了如何按照需要调整温度、离子强度等以适应诸如探针长度等因素。

[0177] 本领域技术人员将明了,由于遗传密码的简并性,存在许多编码本文所述多肽的核苷酸序列。其中一些多核苷酸与任何天然基因的核苷酸序列具有极小的同源性。然而,由于密码子使用差异而不同的多核苷酸是本发明所特别考虑。而且,包含此处提供的多核苷酸序列的基因的等位基因也在本发明范围内。等位基因是由于一个或多个核苷酸突变,例如缺失、添加和/或替代而被改变的内源性基因。所产生的 mRNA 和蛋白质可以,但不必,具有改变的结构或功能。等位基因可以使用标准技术(例如,杂交、扩增和/或数据库序列比较)鉴定。

[0178] 本发明多核苷酸可以使用化学合成、重组方法、或 PCR 获得。化学多核苷酸合成方法是本领域熟知的,无需在此作详细的描述。本领域技术人员可以使用本文提供的序列和商业 DNA 合成仪产生期望的 DNA 序列。

[0179] 对于使用重组方法制备多核苷酸,可以将含有期望序列的多核苷酸插入适宜载体中,接着将该载体导入适宜的宿主细胞以便复制和扩增,这将在本文中作进一步讨论。可以利用本领域已知的任何方式,将多核苷酸插入宿主细胞中。可以通过直接摄取、胞吞作用、转染、F- 交配或电穿孔引入外源多核苷酸,来转化细胞。一旦引入后,外源多核苷酸可以以非整合型载体(例如质粒)的形式维持在细胞中或者可以整合至宿主细胞基因组中。如此

扩增的多核苷酸可以通过本领域熟知的方法从宿主细胞中分离出来。见例如, Sambrook 等 (1989)。

[0180] 备选地, PCR 允许 DNA 序列进行复制。PCR 技术是本领域熟知的, 描述在美国专利号 4,683,195、4,800,159、4,754,065 和 4,683,202 以及 PCR: The Polymerase Chain Reaction, Mullis et al. eds., Birkauwer Press, Boston (1994) 中。

[0181] 可以通过在适宜的载体中使用分离的 DNA 并将其插入适宜的宿主细胞, 获得 RNA。当所述细胞复制和所述 DNA 转录为 RNA 时, 可以使用本领域熟知的方法 (见例如 Sambrook 等 (1989)) 分离该 RNA。

[0182] 适宜的克隆载体可以使用标准技术构建, 或者可以从本领域可以获得的大量克隆载体中选择。尽管所选的克隆载体可以因意在使用的宿主细胞而变化, 但一般地有用的克隆载体将具有自我复制能力, 可以具有用于特定限制性内切核酸酶的单一靶, 和 / 或可以带有标记基因, 其中所述标记可以用于选择含有所述载体的克隆。适宜的实例包括质粒和细菌病毒, 例如, pUC18, pUC19, Bluescript (如 pBS SK+) 及其衍生物, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, 噬菌体 DNA, 和穿梭载体如 pSA3 和 pAT28。这些和许多其它的克隆载体可以从供应商如 BioRad、Strategene 和 Invitrogen 获得。

[0183] 表达载体一般是含有本发明多核苷酸的可复制的多核苷酸构建体。这意味着表达载体必须以附加体形式或者作为整合至染色体 DNA 中的部分能够在宿主细胞中复制。适宜的表达载体包括但不限于质粒、病毒载体, 包括腺病毒、腺相关病毒、逆转录病毒、粘粒和 PCT 公布号 W087/04462 中公开的表达载体。载体成分一般可以包括但不限于以下一种或多种: 信号序列; 复制起点; 一个或多个标记基因; 适宜的转录控制元件 (例如, 启动子、增强子和终止子)。为了表达 (即, 翻译), 通常也需要一个或多个翻译控制元件, 例如, 核糖体结合位点、翻译起始位点和终止密码子。

[0184] 含有目的多核苷酸的载体可以通过多种适宜方式中的任何一种, 包括电穿孔, 使用氯化钙、氯化铷、磷酸钙、DEAE-葡聚糖或其它物质的转染; 微粒轰击; 脂转染; 和感染 (例如, 当载体是感染剂如痘苗病毒时)。对载体或多核苷酸引入的选择常常取决于宿主细胞的特性。

[0185] 本发明也提供包含本文所述任何多核苷酸的宿主细胞。能够过表达异源 DNA 的任何宿主细胞都可以用于分离编码目的抗体、多肽或蛋白质的基因的目的。哺乳动物宿主细胞的非限制性例子包括但不限于 COS、HeLa 和 CHO 细胞。也参见 PCT 公布号 W087/04462。适宜的非哺乳动物宿主细胞包括原核细胞 (例如大肠杆菌 (*E. coli*) 或枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*)) 和酵母 (例如, 酿酒酵母 (*S. cerevisiae*)、粟酒裂殖酵母 (*S. pombe*) ; 或乳酸克鲁维酵母 (*K. lactis*))。优选地, 宿主细胞以比宿主细胞中相应的目的内源抗体或蛋白质 (如果存在的话) 的水平高大约 5 倍、更优选地 10 倍、甚至更优选地 20 倍的水平表达所述 cDNA。通过免疫分析试验或 FACS, 基于与 A $\beta$ <sub>1-40</sub> 的特异结合, 筛选宿主细胞。可以鉴定过表达目的抗体或多肽的细胞。

[0186] 6G 衍生抗体和具有受损的效应子功能的抗 A $\beta$  抗体的诊断用途

[0187] 可以使用与 A $\beta$  的 C 端结合的抗体 6G 鉴定或检测 A $\beta$  存在与否。为了简便, 一般地提及 6G 或抗体, 但应理解这些方法适用于本文所述的任何 A $\beta$  结合实施方案 (如多肽)。检测一般涉及本文所述和 A $\beta$  结合的抗体与生物学样品的接触以及 A $\beta$  和可以特异地结合

A $\beta$  的抗体（例如，6G）之间复合物的形成。此复合物可以在体外或体内形成。术语“检测”在本文中包括在参考或不参考对照的情况下的定性和 / 或定量（测量水平）检测。

[0188] 多种已知的方法均可以用于检测，包括，但不限于，使用可以结合所述多肽的抗体的免疫分析试验，例如，酶联免疫吸附试验（ELISA）、放射免疫分析试验（RIA）等；和用于所编码的多肽的功能分析试验，例如，结合活性或酶分析试验。一些实施方案中，所述抗体被可检测地标记。其它实施方案是本领域已知的并在本文中描述。

[0189] 本发明抗体和多肽可以用于检测、诊断和监测与改变的或异常的 A $\beta$  或  $\beta$  APP 表达有关的疾病、状况或病症，例如，阿尔茨海默氏病和 Down 氏综合症。因此，一些实施方案中，本发明提供方法，所述方法包括使被怀疑具有改变的或异常的 A $\beta$  表达的个体的样本（样品）与本发明抗体或多肽接触，和确定此 A $\beta$  水平是否不同于对照或比较样本的 A $\beta$  水平。其它实施方案中，本发明提供方法，所述方法包括接触个体样本（样品）和确定 A $\beta$  表达水平。

[0190] 对于诊断应用，可以用可检测的部分，包括但不限于放射性同位素、荧光标记物和各种酶 - 底物标记物，来标记抗体。用于将标记物和抗体缀合的方法是本领域已知的。本发明其它实施方案中，本发明抗体无需标记，其存在可以通过使用能够与本发明抗体结合的标记抗体来检测。

[0191] 本发明抗体可以用于任何已知的分析试验方法，例如，竞争结合试验、直接和间接的三明治分析试验和免疫沉淀分析试验。Zola, Monoclonal Antibodies :A Manual of Techniques, pp. 147-158 (CRC Press, Inc. 1987)。

[0192] 也可以将抗体用于体内诊断试验，例如体内成像。一般地，用放射性核素（例如， $^{111}\text{In}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ , 或  $^3\text{H}$ ）标记抗体以便可以使用免疫闪烁术（immunosciintigraphy）定位目的细胞或组织。

[0193] 也可以利用本领域熟知的技术，将抗体作为染色剂用于病理学中。

[0194] 具有受损的效应子功能的抗 A $\beta$  抗体可以用于测量脑淀粉样蛋白负担，以诊断有罹患 AD 危险的个体或者已经诊断为患有 AD 的个体，和评价任何治疗的进展和疾病阶段。已经报道，外周施用单克隆抗 A $\beta$  抗体导致血浆 A $\beta$  快速增加，并且该增加的幅度与海马和皮层中的淀粉样蛋白负担高度相关。DeMattos 等, Science 295 :2264-2267 (2002)。一些实施方案中，将具有受损的效应子功能的抗 A $\beta$  抗体施用给个体，并测量血浆中 A $\beta$  水平，由此血浆 A $\beta$  的增加将指示个体中脑淀粉样负担的存在和 / 或水平。这些方法可以用于监测治疗的有效性和疾病阶段以及用于确定未来的给药剂量和频率。具有受损的效应子功能的抗体可以具有更好的安全谱并为这些诊断应用提供优势。

[0195] 将抗 A $\beta$  抗体用于治疗目的的方法

[0196] 本文所述抗体（包括多肽）、多核苷酸和药物组合物可以用于治疗、预防和抑制阿尔茨海默氏病及与改变的 A $\beta$  或  $\beta$  APP 表达或 A $\beta$  肽的累积或沉积相关的其它疾病（总称为“A $\beta$  相关疾病”），例如，Down 氏综合症、帕金森病、多发性脑梗塞痴呆、轻度认知缺损、脑淀粉样血管病、由血管中 A $\beta$  肽的沉积引起的血管病症（例如中风和 HCHWA-D）、抑郁、Creutzfeldt-Jakob 病、伴有 Lewy 小体的痴呆等的方法中。该方法包括给个体施用所述抗体、多肽、或多核苷酸、或药物组合物。在预防性应用中，将药物组合物或药物施用给阿尔茨海默氏病的易感患者或有罹患阿尔茨海默氏病（或其它 A $\beta$  相关疾病）的危险的患者，施

用量为足以消除或降低所述危险、减轻疾病严重程度、或延迟疾病发作的量,其中所述疾病包括疾病的生物化学的、组织学的和 / 或行为的症状、其并发症和疾病发展过程出现的中间病理学表型。在治疗性应用中,将组合物或药物施用给此类疾病的疑似患者或者已经患有此类疾病的患者,施用量将足以治愈或者至少部分地抑制该疾病的症状(生物化学的、组织学的和 / 或行为的),包括其并发症和疾病发展过程中存在的中间病理学表型。

[0197] 本发明还提供在个体中延迟阿尔茨海默氏病(或其它 A $\beta$  相关疾病)的有关症状发展的方法,包括给个体施用有效剂量的包含本文所述抗体、多肽或多核苷酸的药物组合物。与阿尔茨海默氏病有关的症状包括但不限于记忆、问题解决、语言、计算、视觉空间感知、判断和行为的异常。

[0198] 本发明还提供在个体中抑制或减低淀粉样蛋白斑和 / 或 A $\beta$  累积的形成的方法,包括给个体施用有效剂量的包含本文所述抗体、多肽或多核苷酸的药物组合物。一些实施方案中,淀粉样蛋白斑存在于个体的脑中。一些实施方案中,淀粉样蛋白斑存在于个体的脑血管系统中。其它实施方案中,A $\beta$  累积存在于个体的循环系统中。

[0199] 本发明还提供在个体中减少淀粉样蛋白斑和 / 或减少或减缓 A $\beta$  累积的方法,包括给个体施用有效剂量的包含本文所述抗体、多肽或多核苷酸的药物组合物。一些实施方案中,淀粉样蛋白斑存在于个体的脑中。一些实施方案中,淀粉样蛋白斑存在于个体的脑血管系统中。其它实施方案中,A $\beta$  累积存在于个体的循环系统中。

[0200] 本发明还提供在个体中去除或清除淀粉样蛋白斑和 / 或 A $\beta$  累积的方法,包括给个体施用有效剂量的包含本文所述抗体、多肽或多核苷酸的药物组合物。一些实施方案中,淀粉样蛋白斑存在于个体的脑中。一些实施方案中,淀粉样蛋白斑存在于个体的脑血管系统中。其它实施方案中,A $\beta$  累积存在于个体的循环系统中。

[0201] 本发明还提供在个体中减少组织(例如脑)中 A $\beta$  肽、抑制和 / 或降低组织(例如脑)中 A $\beta$  肽的累积、和抑制和 / 或降低组织(例如脑)中 A $\beta$  肽的毒性作用的方法,包括给个体施用有效剂量的包含本文所述抗体、多肽或多核苷酸的药物组合物。A $\beta$  多肽可以是可溶性的、寡聚体的或沉积的形式。寡聚体形式的 A $\beta$  可以由 2 至 50 个 A $\beta$  多肽组成,其可以是全长 1-40 和 1-42 肽和 / 或这些肽的任何截短形式的混合物。

[0202] 本发明还提供在个体中改善认知或逆转与 A $\beta$  淀粉样蛋白沉积相关疾病(例如阿尔茨海默氏病)有关的认知降低的方法,包括给个体施用有效剂量的包含本文所述抗体、多肽或多核苷酸的药物组合物。

[0203] 此处所述方法(包括预防或治疗)可以通过在一个时间点或多个时间点单次直接注射至单个或多个位点来进行。也可以几乎同时施用于多个位点。施用频率可以在治疗过程中进行确定和调整,并且以所要达到的期望结果为基础。一些情况下,本发明抗体(包括多肽)、多核苷酸和药物组合物的持久的连续释放制剂可能是合适的。本领域已知多种制剂和装置可以用于实现持久释放。

[0204] 患者、对象或个体包括哺乳动物、例如,人、牛、马、狗、猫、猪和羊动物。对象优选是人,其可以患有或未患有疾病或者可以目前表现出或不表现出症状。就阿尔茨海默氏病而言,实际上任何人如果他或她活得够长则都有罹患阿尔茨海默氏病的危险。因此,本发明方法可以预防性地施用给一般群体而无需对患者个体的危险性作任何评价。本发明方法对于确实具有已知的阿尔茨海默氏病遗传危险的个体是有用的。此类个体包括有罹患该病的亲

属的个体、和通过对遗传或生物化学标志分析被确定存在危险的个体。对于阿尔茨海默氏病,患病危险性的遗传标志包括 APP 基因中的突变,尤其是分别称作 Hardy 和 Swedish 突变的 717 位和 670 及 671 位的突变(见 Hardy(1997) Trends Neurosci. 20 :154-9)。危险性的其它标志是早老素基因 PS1 和 PS2、及 ApoE4 中的突变、AD 家族史、高胆固醇血症或动脉粥样硬化。当前患有阿尔茨海默氏病的个体可以通过特征性痴呆以及上述危险因素的存在而识别。此外,可以获得多种诊断试验用于鉴定患有 AD 的个体。这些试验包括测量 CSF tau 和 A $\beta$  42 的水平。升高的 tau 和降低的 A $\beta$  42 水平意味着存在 AD。也可以通过 ADRDA(阿尔茨海默氏病及相关病症协会)的标准,诊断患有阿尔茨海默氏病的个体。在无症状患者中,可以在任何年龄(例如,10、20、30 岁)开始治疗。然而,通常,在患者达到 40、50、60、或 70 岁前无需开始治疗。治疗典型地需要在一段时间内多次给药。可以利用本领域已知的多种方法,随着时间推移对治疗实施监测。在潜在的 Down 氏综合症患者的情况下,治疗可以通过将治疗剂施用给母亲在出生前开始或者在出生后不久开始。

[0205] 可以用于上述方法的药物组合物包括本文所述任何抗体、多肽和 / 或多核苷酸。一些实施方案中,抗体是抗体 6G 或其显示在表 3 中的变体。一些实施方案中,抗体是能够特异地结合 A $\beta$  肽并包含具有受损的效应子功能的恒定区的抗体。

#### [0206] 施用和剂量

[0207] 抗体优选地在载体,优选地药物可接受载体中施用给哺乳动物。适宜的载体和其配制描述在 Remington's Pharmaceutical Sciences, 18 版, A. Gennaro, 编, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990 ; 和 Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20 版. Mack Publishing, 2000。典型地,在制剂中施用合适量的药物可接受盐以使所述制剂等渗。该载体的实例包括盐水、Ringer 氏溶液和葡萄糖溶液。该溶液的 pH 优选为大约 5 至大约 8, 更优选大约 7 至大约 7.5。其它载体包括持久释放制品,例如,包含抗体的固体疏水性聚合物的半透性基质,该基质是成形的物体的形式,例如,膜、脂质体或微粒。本领域技术人员明了,根据例如施用途和所施用的抗体浓度,某些载体可能更为优选。

[0208] 抗体可以通过注射(例如,全身、静脉、腹膜内、皮下、肌内、门静脉内、脑内、脑室内和鼻内)或者通过保证将抗体以有效形式递送至血流的其它方法,例如输注,施用给哺乳动物。也可以通过隔离灌注技术,例如,隔离组织灌注,施用抗体以实行局部治疗作用。优选静脉内注射。

[0209] 施用抗体的有效剂量和进度表可以通过经验决定,而且如何作出此类决定属于本领域技术的范畴。本领域技术人员明了,取决于例如接受抗体的哺乳动物、施用途、所用的抗体特定类型和正在施用给所述哺乳动物的其它药物,必须施用的抗体剂量将发生变化。在关于抗体治疗应用的文献中可以找到如何选择适当剂量的抗体的指导,所述文献有例如, Handbook of Monoclonal Antibodies, Ferrone 等编, Nokes Publications, Park Ridge, N. J., 1985, ch. 22 and pp. 303-357 ; Smith 等, Antibodies in Human Diagnosis and Therapy, Haber 等编, Raven Press, New York, 1977, pp. 365-389。单独使用的抗体的典型日剂量,根据上述因素,可以是每天大约 1  $\mu$ g/kg 体重至不超过 100mg/kg 体重或更多。一般地,可以使用以下任何剂量:施用至少大约 50mg/kg 体重;至少大约 10mg/kg 体重;至少大约 3mg/kg 体重;至少大约 1mg/kg 体重;至少大约 750  $\mu$ g/kg 体重;至少大约 500  $\mu$ g/kg 体重;至少大约 250  $\mu$ g/kg 体重;至少大约 100  $\mu$ g/kg 体重;至少大约 50  $\mu$ g/kg 体重;至少

大约  $10 \mu\text{g/kg}$  体重 ; 至少大约  $1 \mu\text{g/kg}$  体重 ; 或更大剂量。在治疗开始时可以以较低的剂量或较低的频率施用抗体以避免潜在的副作用, 例如, 暂时性淀粉样脑血管病 (CAA)。

[0210] 一些实施方案中, 可以存在一种以上抗体。此类组合物可以含有至少一种、至少两种、至少三种、至少四种、至少五种不同的本发明抗体 (包括多肽)。

[0211] 抗体也可以与有效量的一种或多种其它治疗剂联合施用给哺乳动物。所述抗体与所述一种或多种治疗剂可以相继地或同时地施用。抗体和治疗剂的量取决于例如所用的药物类型、正在治疗的病理学情况、和施用的进度和途径, 但是通常该量少于每一种单独使用时的量。

[0212] 在将抗体施用给哺乳动物后, 可以以本领域技术人员熟知的各种方法监测该哺乳动物的生理学状况。

[0213] 以上的施用和剂量原则可以根据本文所述的多肽进行适应性修改。

[0214] 编码本文所述抗体或多肽的多核苷酸也可以用于将所述抗体或多肽递送至期望的细胞以及在该细胞中表达。明显地, 可以使用表达载体指导抗体表达。表达载体可以全身地、腹膜内、静脉内、肌内、皮下、鞘内、心室内、经口、肠、胃肠外、鼻内、经皮、或通过吸入施用。例如, 表达载体的施用包括局部或全身施用, 包括注射、口服、基因枪或插导管施用和表面施用。本领域技术人员对于施用表达载体以获得外源蛋白在体内的表达是熟悉的。见例如, 美国专利号 6, 436, 908 ; 6, 413, 942 ; 和 6, 376, 471。

[0215] 也可以定向递送包含编码本发明抗体的多核苷酸的治疗性组合物。受体介导的 DNA 递送技术描述在例如, Findeis 等, Trends Biotechnol. (1993) 11 : 202 ; Chiou 等, Gene Therapeutics : Methods And Applications Of Direct Gene Transfer (J. A. Wolff, ed.) (1994) ; Wu 等, J. Biol. Chem. (1988) 263 : 621 ; Wu 等, J. Biol. Chem. (1994) 269 : 542 ; Zenke 等, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1990) 87 : 3655 ; Wu 等, J. Biol. Chem. (1991) 266 : 338。在基因治疗方案中含有多核苷酸的治疗性组合物以大约 100ng 至大约 200mg DNA 局部施用。基因治疗方案过程中也可以使用大约 500ng 至大约 50mg, 大约  $1 \mu\text{g}$  至大约 2mg, 大约  $5 \mu\text{g}$  至大约  $500 \mu\text{g}$ , 以及大约  $20 \mu\text{g}$  至大约  $100 \mu\text{g}$  的 DNA 的浓度范围。本发明的治疗性多核苷酸和多肽可以使用基因递送载体递送。基因递送载体可以是病毒和非病毒来源的 (一般, 见, Jolly, Cancer Gene Therapy (1994) 1 : 51 ; Kimura, Human Gene Therapy (1994) 5 : 845 ; Connelly, Human Gene Therapy (1995) 1 : 185 ; 和 Kaplitt, Nature Genetics (1994) 6 : 148)。这些编码序列的表达可以使用内源性哺乳动物启动子或异源启动子诱导。编码序列的表达可以是组成型的或是受到调节的。

[0216] 用于递送期望多核苷酸和在期望细胞中实施表达的基于病毒的载体是本领域熟知的。示例性基于病毒的载体包括, 但不限于, 重组逆转录病毒 (见例如, PCT 公布号 W090/07936 ; W094/03622 ; W093/25698 ; W093/25234 ; W093/11230 ; W093/10218 ; W091/02805 ; 美国专利号 5, 219, 740 ; 4, 777, 127 ; GB 专利号 2, 200, 651 ; 和 EP0345242), 基于甲病毒的载体 (例如, 辛德毕斯病毒载体, Semliki 森林病毒 (ATCC VR-67 ; ATCC VR-1247), 罗斯河病毒 (Ross river virus) (ATCC VR-373 ; ATCC VR-1246) 和委内瑞拉马脑炎病毒 (Venezuelan equine encephalitis virus) (ATCC VR-923 ; ATCC VR-1250 ; ATCC VR-1249 ; ATCC VR-532)), 以及腺相关病毒 (AAV) 载体 (见例如 PCT 公布号 W094/12649, W093/03769 ; W093/19191 ; W094/28938 ; W095/11984 和 W095/00655)。也可以如 Curiel,

Hum. Gene Ther. (1992)3:147 中所述施用与杀死的腺病毒连接的 DNA。

[0217] 也可以使用非病毒递送载体和方法,包括但不限于,单独的与杀死的腺病毒连接的或未连接的聚阳离子缩合的 DNA(见例如, Curiel, Hum. Gene Ther. (1992)3:147); 配体连接的 DNA(见例如 Wu, J. Biol. Chem. (1989)264:16985); 真核细胞递送载体细胞(见例如, 美国专利号 5,814,482; PCT 公布号 W095/07994; W096/17072; W095/30763; 和 W097/42338) 以及核酸电荷中和 (nucleic charge neutralization) 或与细胞膜的融合。也可以使用裸 DNA。引入裸 DNA 的方法的例子描述在 PCT 公布号 W090/11092 和美国专利号 5,580,859 中。可以充当基因递送载体的脂质体描述在美国专利号 5,422,120; PCT 公布号 W095/13796; W094/23697; W091/14445; 和 EP0524968 中。Philip, Mol. Cell Biol. (1994)14:2411, 和 Woffendin, Proc. Natl. Acad. Sci. (1994)91:1581 中描述了其它方法。

#### [0218] 药盒

[0219] 本发明还提供含有用于治疗诸如阿尔茨海默氏病或其它 A $\beta$  相关疾病(例如 Down 氏综合症、帕金森病、多发性脑梗塞痴呆、轻度认知缺损、脑淀粉样血管病、因 A $\beta$  肽在血管中的沉积引起的血管病症(例如中风和 HCHWA-D))等病理情况或者用于检测或纯化 A $\beta$  或  $\beta$  APP 的物质的产品和药盒。所述产品包含带有标签的容器。适宜的容器包括例如瓶、小瓶和试管。所述容器可以利用各种材料例如玻璃或塑料形成。所述容器容纳具有可以有效地治疗病理学情况或检测或纯化 A $\beta$  或  $\beta$  APP 的活性剂的组合物。组合物中的活性剂是抗体,优选地包含对 A $\beta$  或  $\beta$  APP 特异的单克隆抗体。一些实施方案中,活性剂包含抗体 6G 或衍生自抗体 6G 的任何抗体或多肽。一些实施方案中,活性剂包含本文所述具有受损的效应子功能的抗 A $\beta$  抗体或多肽。一些实施方案中,所述抗 A $\beta$  抗体或多肽包含重链恒定区,其中所述恒定区具有受损的效应子功能。容器上的标签指示所述组合物用于治疗诸如阿尔茨海默氏病等病理情况或者用于检测或纯化 A $\beta$  或  $\beta$  APP, 并且还可以指示用于体内或体外应用,例如上述那些应用的用法。

[0220] 本发明还提供包含本文所述任何抗体(例如 6G)、多肽、多核苷酸的药盒。一些实施方案中,本发明药盒包含上述容器。其它实施方案中,本发明药盒包含上述容器以及含有缓冲液的第二容器。其还可以包括从商业和用户角度看可能期望的其它物质,包括其它缓冲液、稀释剂、滤器、针、注射器以及带有实施本文所述任何方法(例如,用于治疗阿尔茨海默氏病的方法、和用于抑制或减低脑中 A $\beta$  肽累积的方法)的说明书的包裹插页。在用于检测或纯化 A $\beta$  或  $\beta$  APP 的药盒中,抗体典型地用可检测标记物,例如,放射性同位素、荧光化合物、生物发光化合物、化学发光化合物、金属螯合剂或酶标记。

[0221] 一些实施方案中,本发明提供无论是在用作药物和/或用于制备药物的情况下用于本文所述任何方法的组合物(见本文描述)。

[0222] 提供下列实施例用于举例说明而非限制本发明。

#### [0223] 实施例

##### [0224] 实施例 1: 抗体 6G 及其变体的结合亲和力测定

##### [0225] A. 一般方法

[0226] 在该实施例和其它实施例中使用了以下一般方法。

##### [0227] 用于克隆表征的表达载体

[0228] 类似于 Barbas(2001) Phage display: a laboratory manual, Cold Spring

Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press pg2. 10. Vector pComb3X) 中所述, 在 IPTG 诱导型 lacZ 启动子控制下表达抗体 Fab 片段, 但改变包括添加和表达下列额外结构域: 人  $\kappa$  轻链恒定域和 IgG2a 人免疫球蛋白 CHI 恒定域, Ig  $\gamma$  2 链 C 区, 蛋白登录号 P01859; 免疫球蛋白  $\kappa$  轻链 (智人 (homo sapiens)), 蛋白登录号 CAA09181。

#### [0229] 小规模 Fab 制备

[0230] 按下述在 96 孔板中小规模表达 Fab。从转化了 Fab 文库的大肠杆菌开始, 挑取菌落接种母板 (琼脂 LB+ 氨苄青霉素 (50  $\mu$ g/ml)+2% 葡萄糖) 和工作板 (2ml/孔, 96 孔/板, 含有 1.5ml LB+ 氨苄青霉素 (50  $\mu$ g/ml)+2% 葡萄糖)。两板均在 30°C 生长 8 至 12 小时。母板 4°C 保存, 来自工作板的细胞以 5000rpm 沉淀并用 1ml LB+ 氨苄青霉素 (50  $\mu$ g/ml)+1mM IPTG 重悬以诱导 Fab 表达。30°C 5 小时的表达时间后, 离心收获细胞, 然后重悬于 500  $\mu$ L 缓冲液 HBS-EP (100mM HEPES 缓冲液 pH7.4, 150mM NaCl, 0.005% P20)。通过一轮冻 (-80°C) 融 (37°C), 裂解 HBS-EP 重悬的细胞。细胞裂解物以 5000rpm 离心 30 分钟以分离细胞碎片和含有 Fab 的上清液。然后将上清液注射入 BIAcore 等离子体共振仪以获得每种 Fab 的亲合力信息。从母板营救表达 Fab 的克隆以对该 DNA 进行测序和大规模的 Fab 生产和详细表征, 见下述。

#### [0231] 大规模 Fab 制备

[0232] 为了获得详细的动力学参数, 从大培养物表达和纯化 Fab。用来自所选择的表达 Fab 的大肠杆菌克隆的 5ml 过夜培养物, 接种含有 200ml LB+ 氨苄青霉素 (50  $\mu$ g/ml)+2% 葡萄糖的三角瓶。30°C 温育克隆直到获得 1.0 的 OD<sub>550nm</sub>, 然后通过将该培养基置换成 200ml LB+ 氨苄青霉素 (50  $\mu$ g/ml)+1mM IPTG 进行诱导。30°C 5h 表达时间后, 离心沉淀细胞, 然后重悬于 10ml PBS (pH8) 中。通过两轮冻融 (分别于 -80°C 和 37°C) 循环裂解细胞。将细胞裂解物的上清液加载于 PBS (pH8) 平衡的 Ni-NTA Superflow 琼脂糖 (Qiagen, Valencia, CA) 柱上, 然后用 5 倍柱体积的 PBS (pH8) 洗涤。利用 PBS (pH8)+300mM 咪唑将各个 Fab 洗脱在不同级分中。汇合含有 Fab 的级分, 并在 PBS 中透析, 然后通过 ELISA 定量之后进行亲和力表征。

#### [0233] 全抗体制备

[0234] 为了表达全抗体, 将重链和轻链可变区克隆在哺乳动物表达载体中, 使用 lipofectamine 将其转染至 HEK293 细胞中以便实现瞬时表达。使用标准方法, 利用蛋白 A 纯化抗体。

[0235] 载体 pDb. 6G. hFc2a 是含有抗体 6G 重链的表达载体, 其适于瞬时和稳定表达该重链。载体 pDb. 6G. hFc2a 具有相应于以下区域的核苷酸序列: 鼠巨细胞病毒启动子区 (核苷酸 1-612); 合成的内含子 (核苷酸 619-1507); DHFR 编码区 (核苷酸 707-1267); 人生长激素信号肽 (核苷酸 1525-1602); 6G 重链可变区; 含有以下突变的人重链 IgG2a 恒定区: A330P331 至 S330S331 (氨基酸编号参照野生型 IgG2a 序列进行; 见 Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624); SV40 晚期聚腺苷酸化信号; SV40 增强子区域; 噬菌体 f1 区域和  $\beta$  内酰胺酶 (AmpR) 编码区。

[0236] 载体 pEb. 6G. hK 是包含 6G 抗体轻链的表达载体, 其适于瞬时表达该轻链。载体 pEb. 6G. hK 具有相应于以下区域的核苷酸序列: 鼠巨细胞病毒启动子区域 (核苷酸 1-612); 人 EF-1 内含子 (核苷酸 619-1142); 人生长激素信号肽 (核苷酸 1173-1150); 抗体 6G 轻

链可变区 ; 人  $\kappa$  链恒定区 ; SV40 晚期聚腺苷酸化信号 ; SV40 增强子区域 ; 噬菌体 f1 区域和  $\beta$  内酰胺酶 (AmpR) 编码区。

#### [0237] BIAcore 试验

[0238] 使用 BIAcore3000™ 表面等离子体共振 (SPR) 系统 (BIAcore, INC, Piscaway NJ), 测定 6G 单克隆抗体的亲和力。测定亲和力的一个方法是将 6G 固定在 CM5 芯片上并测量 A $\beta$ <sub>1-40</sub> 肽或其它 A $\beta$  肽与该抗体的结合动力学。CM5 芯片用 N- 乙基 -N'-(3- 二甲基氨基丙基)- 碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 和 N- 羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 根据供应商的说明书活化。将抗体 6G 或其变体稀释在 10mM 乙酸钠 pH4.0 或 pH5.0 中, 并以 0.005mg/mL 的浓度注射在活化的芯片上。使用不同的流动时间通过各芯片通道, 获得一系列抗体密度: 1000-2000 或 2000-3000 响应单位 (RU)。用乙醇胺封闭芯片。再生研究显示, 含有 2 体积 PIERCE 洗脱缓冲液和 1 体积 4M NaCl 的溶液有效地除去结合的 A $\beta$  肽同时保持芯片上 6G 的活性长达 200 次以上注射。HBS-EP 缓冲液 (0.01M HEPES, pH7.4, 0.15NaCl, 3mM EDTA, 0.005% 表面活性剂 P20) 用作所有 BIAcore 试验的运行缓冲液。将纯化的 A $\beta$ <sub>1-40</sub> 合成肽或其它 A $\beta$  肽样品的系列稀释物 (0.1-10 $\times$  估计的  $K_D$ ) 以 100  $\mu$ L/min 注射 1 分钟, 允许 10 分钟的解离时间。通过用 BIA 评价程序以该数据模拟 1 : 1 Langmuir 结合模型 (Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B. (1994). Methods Enzymology 6. 99-110), 同时获得动力学结合速率 ( $k_{on}$ ) 和解离速率 ( $k_{off}$ )。以  $k_{on}/k_{off}$  计算平衡解离常数 ( $K_D$ ) 值。

[0239] 备选地, 通过将 A $\beta$ <sub>1-40</sub> 肽或其它 A $\beta$  肽固定在 SA 芯片上并测量 6G 的 Fab 和 6G 变体的 Fab 与固定的 A $\beta$  肽的结合动力学, 由此确定亲和力。6G Fab 片段及其变体的 Fab 片段的亲和力通过表面等离子体共振 (SPR) 系统 (BIAcore 3000™, BIAcore, Inc., Piscaway NJ) 确定。SA 芯片 (链霉亲和素) 根据供应商说明书使用。将生物化的 A $\beta$  肽稀释在 HBS-EP (100mM HEPES, pH7.4, 150mM NaCl, 3mM EDTA, 0.005% P20) 中并以 0.005mg/mL 浓度注射在芯片上。使用不同的流动时间通过各芯片通道, 获得两组抗原密度: 100-400 响应单位 (RU) 用于详细的动力学研究和 500-2000 RU 用于浓度研究和筛选。再生研究显示, 100mM 磷酸 (也可以尾随含有 2 体积 50mM NaOH 和 1 体积 70% 乙醇的溶液) 有效地除去结合的 Fab 同时保持芯片上 A $\beta$  肽的活性长达 200 次以上注射。HBS-EP 缓冲液用作所有 BIAcore 试验的运行缓冲液。纯化的 Fab 样品的系列稀释物 (0.1-10 $\times$  估计的  $K_D$ ) 以 100  $\mu$ L/min 注射 2 分钟, 允许 10 分钟的解离时间。通过 ELISA 和 / 或 SDS-PAGE 电泳, 使用已知浓度 (通过氨基酸分析确定) 的标准 Fab, 确定所述 Fab 蛋白的浓度。通过用 BIA 评价程序通过以数据模拟 1 : 1 Langmuir 结合模型 (Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B. (1994). Methods Enzymology 6. 99-110), 同时获得动力学结合速率 ( $k_{on}$ ) 和解离速率 ( $k_{off}$ )。以  $k_{on}/k_{off}$  计算平衡解离常数 ( $K_D$ ) 值。

#### [0240] ELISA 试验

[0241] 使用 ELISA 测量抗体 6G 和变体与未生物素化的 A $\beta$  肽的结合。NUNC maxisorp 板用 PBS pH7.4 中的 2.5  $\mu$ g/ml A $\beta$  肽 4℃ 包被 1 小时以上。用 PBS 缓冲液 pH7.4 中的 1% BSA 封闭板子。一抗 (来自细胞上清液, 含有抗 A $\beta$  抗体的血清、或期望稀释度的纯化的全抗体或 Fab) 与固定的 A $\beta$  肽室温孵育 1 小时。洗涤后, 板子与 1 : 5000 稀释的二抗 (HRP 缀合的山羊抗人  $\kappa$  链抗体, MP Biomedicals, 55233) 一起孵育。洗涤后, 通过添加 TMB 底物 (KPL, 50-76-02, 50-65-02) 测量结合的二抗。通过添加 1M 磷酸终止 HRP 反应并测量 450nm

的吸光度。

[0242] 使用 ELISA 测量抗体 6G 和变体与生物素化的 A $\beta$  肽的结合。NUNCmaxisorp 板用 6  $\mu$ g/ml 链霉亲和素 (Pierce, 21122) 在 PBS pH7.4 中 4°C 包被 1 小时以上。用 1% BSA 在 PBS 缓冲液 pH7.4 中封闭板子。洗涤后, 在 PBS pH7.4 中室温温育生物素化的 A $\beta$  肽 1 小时。一抗 (来自细胞上清液、含有抗 A $\beta$  抗体的血清、或期望稀释度的纯化的全抗体或 Fab) 与固定的 A $\beta$  肽一起室温温育小时。洗涤后, 板子与 1 : 5000 稀释的二抗 (HRP 缀合的山羊抗人  $\kappa$  链抗体, MP Biomedicals, 55233) 一起孵育。洗涤后, 通过添加 TMB 底物 (KPL, 50-76-02, 50-65-02) 测量结合的二抗。通过添加 1M 磷酸终止 HRP 反应并测量 450nm 的吸光度。

[0243] B. 抗体 6G 和变体与 A $\beta_{1-40}$ 、A $\beta_{1-42}$  和其它 A $\beta$  肽的结合亲和力

[0244] 图 1 显示抗体 6G 的重链和轻链可变区的氨基酸序列。使用以上描述的 Biacore 测定的 6G 抗体与 A $\beta_{1-40}$ 、A $\beta_{1-42}$  和 A $\beta_{22-37}$  的结合亲和力显示在下表 2 中。

[0245] 表 2. 抗体 6G Fab 片段的结合亲和力

| [0246] |                                                   | $k_{on}$ (1/Ms)   | $k_{off}$ (1/s)      | $K_D$ (nM) |
|--------|---------------------------------------------------|-------------------|----------------------|------------|
|        | 生物素化的 A $\beta_{1-40}$ 固定在链霉亲和素芯片上, 6G Fab 在其上流过  | $3.0 \times 10^5$ | $7.0 \times 10^{-4}$ | 2          |
|        | 生物素化的 A $\beta_{1-42}$ 固定在链霉亲和素芯片上, 6G Fab 在其上流过  | $1.8 \times 10^4$ | $1.6 \times 10^{-3}$ | 80         |
|        | 生物素化的 A $\beta_{22-37}$ 固定在链霉亲和素芯片上, 6G Fab 在其上流过 | $3.6 \times 10^5$ | $3.9 \times 10^{-3}$ | 11         |

[0247] 6G 变体的氨基酸序列显示在下表 3 中。表 3 中所示变体的所有氨基酸替代是相对于 6G 序列进行描述的。6G 变体的相对结合也显示在表 3 中。按照上述 ELISA 使用固定在 ELISA 板表面上的未生物素化的 A $\beta_{1-40}$  或 A $\beta_{1-42}$  测定结合。

[0248] 表 3. 抗体 6G 变体的氨基酸序列和结合数据

[0249]

| 通过 ELISA 获得的 6G 重链突变变体的结合数据 |     |      |      |      |      |      | A450 ELISA      |                 |
|-----------------------------|-----|------|------|------|------|------|-----------------|-----------------|
| 克隆编号                        | 突变  |      |      |      |      |      | $A\beta_{1-40}$ | $A\beta_{1-42}$ |
| 6G                          | F99 | D100 | N101 | Y102 | D103 | R104 | 2.55            | 0.95            |
| 1A                          | Y   |      |      |      |      |      | 1.60            | 0.26            |
| 1B                          | M   |      |      |      |      |      | 0.37            | 0.22            |
| 1G                          | L   |      |      |      |      |      | 0.51            | 0.21            |
| 2G                          | P   |      |      |      |      |      | 0.30            | 0.50            |
| 3E                          | C   |      |      |      |      |      | 0.26            | 0.40            |
| 4G                          |     | S    |      |      |      |      | 1.41            | 0.30            |
| 5D                          |     | N    |      |      |      |      | 1.52            | 0.39            |
| 6A                          |     | T    |      |      |      |      | 0.86            | 0.31            |
| 7B                          |     |      | S    |      |      |      | 0.44            | 0.27            |
| 7D                          |     |      | C    |      |      |      | 0.23            | 0.31            |
| 8H                          |     |      | H    |      |      |      | 0.21            | 0.19            |
| 9E                          |     |      | R    |      |      |      | 0.22            | 0.26            |
| 10A                         |     |      |      | F    |      |      | 1.85            | 0.34            |
| 10E                         |     |      |      | L    |      |      | 0.41            | 0.24            |
| 10G                         |     |      |      | I    |      |      | 0.63            | 0.22            |
| 11D                         |     |      |      | M    |      |      | 0.29            | 0.24            |
| 2F                          |     |      |      |      | P    |      | 1.89            | 0.38            |
| 3A                          |     |      |      |      | A    |      | 1.16            | 0.28            |
| 3B                          |     |      |      |      | R    |      | 1.43            | 0.43            |
| 3C                          |     |      |      |      | G    |      | 2.30            | 0.76            |
| 4A                          |     |      |      |      |      | G    | 2.17            | 0.40            |
| 4B                          |     |      |      |      |      | F    | 2.48            | 0.71            |
| 4D                          |     |      |      |      |      | Q    | 2.45            | 1.00            |
| 6F                          |     |      |      |      |      | S    | 2.28            | 0.62            |

[0250]

| 通过 ELISA 获得的 6G 轻链突变变体的结合数据 |     |     |     |     |     |     |     |      |      | A450 ELISA      |                 |
|-----------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|-----------------|-----------------|
| 克隆编号                        | 突变  |     |     |     |     |     |     |      |      | $A\beta_{1-40}$ | $A\beta_{1-42}$ |
| 6G                          | Q93 | Q94 | S95 | K96 | E97 | F98 | P99 | W100 | S101 | 2.49            | 0.61            |
| 2H                          | K   |     |     |     |     |     |     |      |      | 0.07            | 0.13            |
| 3A                          | P   |     |     |     |     |     |     |      |      | 0.08            | 0.13            |
| 4F                          | S   |     |     |     |     |     |     |      |      | 2.00            | 0.30            |
| 5B                          |     | G   |     |     |     |     |     |      |      | 0.09            | 0.14            |
| 7E                          |     | R   |     |     |     |     |     |      |      | 0.09            | 0.18            |
| 7F                          |     | K   |     |     |     |     |     |      |      | 0.12            | 0.19            |
| 10E                         |     |     | L   |     |     |     |     |      |      | 0.08            | 0.12            |
| 1A                          |     |     |     | N   |     |     |     |      |      | 2.02            | 0.32            |
| 1C                          |     |     |     | F   |     |     |     |      |      | 0.05            | 0.05            |
| 4A                          |     |     |     | A   |     |     |     |      |      | 2.09            | 0.28            |
| 4G                          |     |     |     | F   |     |     |     |      |      | 1.07            | 0.28            |
| 5H                          |     |     |     |     | R   |     |     |      |      | 2.60            | 0.85            |
| 6C                          |     |     |     |     | G   |     |     |      |      | 0.05            | 0.05            |
| 6D                          |     |     |     |     | T   |     |     |      |      | 2.41            | 1.34            |
| 6E                          |     |     |     |     | P   |     |     |      |      | 0.12            | 0.20            |
| 8G                          |     |     |     |     | V   |     |     |      |      | 2.60            | 0.90            |

[0251] 实施例 2. 表征 A $\beta$  肽上与抗体 6G 结合的表位

[0252] 为了确定 A $\beta$  肽上抗体 6G 所识别的表位, 使用 ELISA 结合分析。将各种 A $\beta$  肽 (Global Peptide Services, CO) 固定在 ELISA 板上。通过上述 ELISA 测定 6G 全抗体 (20nM)

与固定的 A $\beta$  的结合。下表 5 显示 A $\beta$ <sub>1-40</sub>、A $\beta$ <sub>1-42</sub> 和 A $\beta$ <sub>1-43</sub> 的氨基酸序列。如图 2 所示, 抗体 6G 与 A $\beta$  肽 17-40、17-42、22-35、28-40、1-38、1-40、1-42、1-43 和 28-42 结合; 但与 28-42 的结合比其它 A $\beta$  肽弱得多。抗体 6G 不结合 A $\beta$  肽 1-16、1-28 和 33-40。因此, 抗体 6G 与各种截短的 A $\beta$  肽, 例如, 22-35、1-38、1-40、1-42 和 1-43 的 C 端结合。

[0253] 下表 4 显示使用 Biacore 试验通过  $k_{off}$  (1/s) 测定的 A $\beta$ <sub>1-40</sub> 与其它 A $\beta$  肽和 6G 的结合亲和力的比较。与其它肽相比, 抗体 6G 与 A $\beta$ <sub>1-40</sub> 具有最高的结合亲和力, 与截短的 A $\beta$ <sub>1-40</sub> (例如, 1-36、1-37、1-38 和 1-39)、A $\beta$ <sub>1-42</sub> 和 A $\beta$ <sub>1-43</sub> 具有显著较低的亲和力。这说明, A $\beta$  的氨基酸 40 (缬氨酸) 的侧链或骨架参与 6G 和 A $\beta$ <sub>1-40</sub> 的结合; 而且, 在缺少该氨基酸的情况下结合显著地降低 (例如, 大约 10 至大约 50-250 倍的亲和力降低)。与羧基末端酰胺化的 A $\beta$ <sub>1-40</sub> 以较低的亲和力结合, 这说明 6G 与 A $\beta$ <sub>1-40</sub> 的结合涉及但不依赖于 A $\beta$ <sub>1-40</sub> 的游离 C 端。与 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 和 A $\beta$ <sub>1-43</sub> 的较低亲和力结合可能是由于 A $\beta$ <sub>1-40</sub> 与 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 或 A $\beta$ <sub>1-43</sub> 的单体形式之间的构象差异所致的。已经证实, 溶液中 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 单体具有与 A $\beta$ <sub>1-40</sub> 单体不同的构象。见, 蛋白质数据库 Protein DataBank (pbd 档案) 中登录号 1IYT 下所示 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 的单体结构坐标; 和蛋白质数据库 (pbd 档案) 中登录号 1BA6 和 1BA4 下所示 A $\beta$ <sub>1-40</sub> 的单体结构坐标。

[0254] 表 4

| A $\beta$ 肽片段 | $k_{off}$ (1/s)       | $k_{off}$ A $\beta$ 肽/ $k_{off}$ A $\beta$ <sub>1-40</sub><br>(亲和力降低的倍数) |
|---------------|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| 1-28          | -                     |                                                                          |
| 1-43          | 非常低的结合                |                                                                          |
| 22-35         | 0.0285                | 215.9                                                                    |
| 1-36          | 0.0205                | 155.3                                                                    |
| 1-37          | 0.0149                | 112.8                                                                    |
| 1-38          | $9.3 \times 10^{-3}$  | 70.4                                                                     |
| 1-39          | $7.92 \times 10^{-3}$ | 60.0                                                                     |
| 17-42         | 0.0465                | 352.2                                                                    |
| 1-42          | $1.9 \times 10^{-3}$  | 14.4                                                                     |
| 28-42         | $3.37 \times 10^{-3}$ | 25.5                                                                     |
| 28-40-NH2#    | $3.62 \times 10^{-3}$ | 27.4                                                                     |
| 28-40         | $6.4 \times 10^{-4}$  | 4.8                                                                      |
| 17-40         | $2.15 \times 10^{-4}$ | 1.6                                                                      |
| 1-40          | $1.32 \times 10^{-4}$ | 1                                                                        |

[0256] 肽作为被分析物在具有通过胺化学固定的 6G 单克隆抗体 (配体) 的 CM5 芯片上流动

[0257] # 羧基端酰胺化的肽

[0258] 通过 ELISA 试验进行抗体 6G 的表位作图。将生物素化的 15-mer 或 10-mer 各种 A $\beta$  肽 (这些肽在 C 末端添加了甘氨酸) 固定在链霉亲和素包被的板子上。抗体 6G (2.5  $\mu$ g/ml 至 10  $\mu$ g/ml) 与固定的肽一起孵育并如上所述测定结合。如图 3 所示, 抗体 6G 与具有氨基酸 20-34、21-35、22-36、23-37、24-38、25-39 和 25-34 且 C 端具有甘氨酸的 A $\beta$  肽结合; 但不与具有氨基酸 19-33、26-40、27-41、24-33 和 26-35 且在肽 C 端具有甘氨酸的 A $\beta$  肽结合。这提示, 抗体 6G 的表位包括从 25 至 34 位的氨基酸。

[0259] 基于以上所示数据, 抗体 6G 所结合的表位看来包括氨基酸 25-34 和 40。图 4 是显示抗体 6G 的表位的示意图。

[0260] 表 5.  $\beta$  淀粉样肽的氨基酸序列

|        |           |                                                            |
|--------|-----------|------------------------------------------------------------|
| [0261] | 1-40 (WT) | DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV (SEQ ID NO:15)    |
|        | 1-42 (WT) | DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA (SEQ ID NO:16)  |
|        | 1-43 (WT) | DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIAT (SEQ ID NO:17) |

[0262] B. 抗体 6G 不结合 APP

[0263] 为了确定 6G 是否结合淀粉样前体蛋白 (APP), 测定 6G 与转染了野生型 APP 的细胞的结合。用编码野生型人淀粉样前体蛋白的 cDNA 转染 HEK293 细胞。转染后 48 小时, 细胞在冰上与单克隆抗体抗  $A\beta_{1-16}$  (m2324) 或 6G ( $5 \mu\text{g/ml}$ , 在具有 10% FCS 的 DMEM 中) 一起孵育 45 分钟。然后在 PBS 中洗涤细胞 3 次 5 分钟, 用 4% PFA 固定。再次在 PBS 中洗涤细胞 3 次, 用来自 Jackson Immunoresearch 的二抗 Cy3 缀合的山羊抗小鼠抗体 (1 : 500 稀释) 在荧光显微镜下检测抗体的结合。

[0264] 如图 5 所示, 识别  $A\beta$  N 端表位的抗  $A\beta_{1-16}$  抗体显示出与细胞上表达的 APP 前体蛋白有显著的结合。相反, 6G 不结合 APP 表达细胞。

[0265] 实施例 3. 表征  $A\beta$  肽上抗体 2294 所结合的表位

[0266] 抗体 2294 是通过以  $A\beta_{1-40}$  免疫小鼠产生的鼠源抗体。该抗体描述在 US2004/0146512 和 W004/032868 中。

[0267] 抗体 2294 与  $A\beta_{1-40}$ 、 $A\beta_{1-42}$  或  $A\beta_{22-37}$  的结合亲和力使用上述 Biacore 进行测量。下表 6 显示抗体 2294Fab 片段与各种  $A\beta$  肽的亲和力。

[0268] 表 6. 抗体 2294Fab 片段的结合亲和力

[0269]

|                                                    | $k_{on}$ (1/Ms)   | $k_{off}$ (1/s)       | $K_D$ (nM) |
|----------------------------------------------------|-------------------|-----------------------|------------|
| 生物素化的 $A\beta_{1-40}$ 固定在链霉亲和素芯片上, 2294 Fab 在其上流过  | $6.6 \times 10^4$ | $3.95 \times 10^{-4}$ | 6          |
| 生物素化的 $A\beta_{1-42}$ 固定在链霉亲和素芯片上, 2294 Fab 在其上流过  | $1.1 \times 10^4$ | $4.87 \times 10^{-3}$ | 400        |
| 生物素化的 $A\beta_{22-37}$ 固定在链霉亲和素芯片上, 2294 Fab 在其上流过 | $5 \times 10^3$   | 0.049                 | 10,000     |

[0270] 通过 ELISA 试验对抗体 2294 进行表位作图。将生物素化的 15-mer 或 10-mer 各种  $A\beta$  肽 (这些肽在 C 末端添加了甘氨酸) 固定在链霉亲和素包被的板子上。用  $6 \mu\text{g/ml}$  链霉亲和素 (Pierce, 21122) 在 PBS pH7.4 中  $4^\circ\text{C}$  包被 NUNC maxisorp 板 1 小时以上。用 1% BSA 在 PBS 缓冲液 pH7.4 中封闭板子。洗涤后, 在 PBS pH7.4 中室温温育生物素化的  $A\beta$  肽 1 小时。抗体 2294 ( $2.5 \mu\text{g/ml}$  至  $10 \mu\text{g/ml}$ ) 与固定的  $A\beta$  肽一起室温温育 1 小时。洗涤后, 板子与 1 : 5000 稀释的二抗 (HRP 缀合的山羊抗人  $\kappa$  链抗体, MP Biomedicals, 55233) 一起孵育。洗涤后, 通过添加 TMB 底物 (KPL, 50-76-02, 50-65-02) 测量结合的二抗。通过添加 1M 磷酸终止 HRP 反应并测量 450nm 的吸光度。如图 6 所示, 抗体 2294 与具有氨基酸 20-34、21-35、22-36、23-37、24-38、25-39、26-40 和 25-34 且 C 端具有甘氨酸的  $A\beta$  肽结合; 但不与具有氨基酸 19-33、27-41、24-33 和 27-35 且在肽 C 端具有甘氨酸的  $A\beta$  肽结合。这提示, 抗体 2294 的表位包括从 26 至 34 位的氨基酸。

[0271] 为了进一步确定 A $\beta$  肽上抗体 2294 所识别的表位,使用 ELISA 结合分析。将各种 A $\beta$  肽 (Global Peptide Services, CO) 固定在 ELISA 板上。2294 全抗体 (20nM) 与固定的 A $\beta$  的结合通过上述 ELISA 进行测定。抗体 2294 与 A $\beta$  肽 17-40、17-42、28-40、1-38、1-40、1-42 和 1-43 结合。抗体 2294 不结合 A $\beta$  肽 1-16、1-28、28-42、22-35 和 33-40。因此,抗体 2294 与各种截短的 A $\beta$  肽,例如,1-38、1-40、1-42 和 1-43 的 C 端结合。

[0272] 下表 7 显示通过 Biacore 试验测定的 A $\beta$ <sub>1-40</sub> 与其它 A $\beta$  肽和 2294 结合的比较。与其它肽相比,抗体 2294 (全抗体) 与 A $\beta$ <sub>1-40</sub> 具有最强的结合,与截短的 A $\beta$ <sub>1-40</sub> (例如,1-36、1-37、1-38 和 1-39)、A $\beta$ <sub>1-42</sub> 和 A $\beta$ <sub>1-43</sub> 具有显著较低的结合。这说明, A $\beta$  的氨基酸 40 (缬氨酸) 的侧链或骨架参与 2294 和 A $\beta$ <sub>1-40</sub> 的结合;而且,在缺乏该氨基酸的情况下结合显著地降低。

[0273] 表 7

[0274]

| A $\beta$ 肽片段 | 结合   |
|---------------|------|
| 1-28          | -    |
| 1-43          | -    |
| 22-35         | -    |
| 1-36          | +    |
| 1-37          | +    |
| 1-38          | ++   |
| 1-39          | ++   |
| 17-42         | +++  |
| 1-42          | +++  |
| 17-40         | ++++ |
| 1-40          | ++++ |

[0275] “-”表示无结合;“+”表示非常低的结合;“++”表示中等程度的结合;“+++”表示强结合;以及“++++”表示非常强的结合。

[0276] 基于以上数据,抗体 2294 所结合的表位看来包括氨基酸 26-34 和 40。如图 6 中所示,抗体 2294 所结合的表位与抗体 6G 所结合的表位非常相似。然而,抗体 6G 的结合比抗体 2294 较少地依赖于氨基酸 40。

[0277] 使用 Biacore 试验在 2294、6G、2H6 和 2289 之间进行抗体结合竞争实验。抗体 2H6 是与 A $\beta$ <sub>33-40</sub> 结合的抗体,其描述在 2005 年 2 月 14 日提交的美国临时专利申请 60/653,197 中。抗体 2289 是与 A $\beta$  16-28 结合的抗体,描述在美国公开号 2004/0146512 和 PCT WO04.032868 中。使用 Biacore 试验进行竞争实验。抗体 2294、6G、2H6 和 2289 固定在 CM5 芯片的不同通道内。CM5 芯片通道用 N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 和 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 根据供应商的说明书活化。抗体 2294、6G、2H6 和 2289 分别稀释在 10mM 乙酸钠 pH4.0 中,并以 0.005mg/mL 的浓度注射在活化的芯片上。用乙醇胺封闭各通道。A $\beta$  1-40 肽 (150  $\mu$ M) 在芯片上流动 2 分钟。然后,0.6  $\mu$ M 的抗体 2294 (待检测对结合的竞争作用) 在芯片上流动 1 分钟。HBS-EP 缓冲液 (0.01M HEPES, pH7.4, 0.15 NaCl, 3mM EDTA, 0.005% 表面活性剂 P20) 用作所有这些 BIACore 试验的运行缓冲液。在测量 A $\beta$ <sub>1-40</sub> 的结合后,芯片上所有的通道通过用 Pierce 洗脱缓冲液 (产品号 21004, Pierce Biotechnology, Rockford, IL) 和 4M NaCl (2 : 1) 的混合物洗涤 2 次 6 秒

以再生。然后对抗体 6G、2H6、以及之后对抗体 2289 实施竞争结合。观察到 2294 和 6G 之间以及 2294 和 2H6 之间存在对  $A\beta_{1-40}$  的竞争结合,但是在 2294 和 2289 之间以及 6G 和 2289 之间未观察到竞争。通过对固定的抗体和在芯片上流动的不同抗体之间的竞争的观察,作为阳性对照。数据说明,抗体 2294 与 2H6 及 6G 竞争地与  $A\beta_{1-40}$  结合。

[0278] 实施例 4. 抗体 2294Fc 区与鼠  $Fc\gamma$  受体的结合亲和力

[0279] 使用上述 BIAcore 试验测量该抗体 Fc 区与  $Fc\gamma$  受体的结合亲和力。简要地,通过胺化学将纯化的鼠  $Fc\gamma$  受体 (来自 R&D Systems) 固定在 BIAcore CM5 芯片上。注射单克隆抗体的系列稀释物 (从 2nM 至表 8 中所示最大浓度)。HBS-EP (0.01M HEPES, pH7.4, 0.15M NaCl, 3mM EDTA, 0.005% 表面活性剂 P20) 用作运行缓冲液和样品缓冲液。使用用于高亲和力相互作用的 1:1 Langmuir 相互作用模型或者用于低亲和力相互作用的稳态亲和力模型,分析结合数据。

[0280] 下表 8 显示通过  $K_D$  (nM) 测量的抗体 2294 对鼠  $Fc\gamma$  RI、 $Fc\gamma$  RIIb 和  $Fc\gamma$  RIII 的结合亲和力。脱糖基化的抗体具有除去了 N-糖基化的恒定区。如表 8 中所示,脱糖基化的 2294 与未除去 N-糖基化的相应抗体相比,对所有被测的鼠  $Fc\gamma$  受体具有降低的亲和力。

[0281] 表 8. 通过  $K_D$  (nM) 测量的抗体对鼠  $Fc\gamma$  受体的结合亲和力

[0282]

| 抗体         | $Fc\gamma$ RI | $Fc\gamma$ RIIb | $Fc\gamma$ RIII | 同种型          | 测定的用于结合 $Fc\gamma$ 受体的最大抗体浓度 (nM) |
|------------|---------------|-----------------|-----------------|--------------|-----------------------------------|
| 2294       | 1,200         | 13,000          | 19,000          | 鼠 IgG2b      | 18,000                            |
| 脱糖基化的 2294 | 8,600         | NB              | NB              | 脱糖基化的鼠 IgG2b | 22,000                            |

[0283] NB:当以测定的最大浓度使用抗体时没有显著的结合。

[0284] 实施例 5. 抗体 2294 和脱糖基化的抗体 2294 在阿尔茨海默氏病

[0285] 动物模型中对减少  $A\beta$  沉积和认知的作用

[0286] 通过将纯化的抗体 2294 在 37°C 下与肽-N-糖苷酶 F (Prozyme, 每 mg 抗体 0.05U) 在 20mM Tris-HCl pH8.0 中温育 7 天,制备脱糖基化的抗体 2294。通过 MALDI-TOF-MS 和蛋白质凝胶电泳,验证脱糖基化的完全度。利用蛋白 A 层析纯化脱糖基化的抗体,并通过 Q-Sepharose 除去内毒素。使用上述 BIAcore 试验,测定脱糖基化的 2294 与  $A\beta_{1-40}$  的结合亲和力,发现脱糖基化的 2294 对  $A\beta_{1-40}$  的结合亲和力和完整抗体 2294 的相同。

[0287] 在转基因小鼠 APP Tg2576 中检查抗体 2294 和脱糖基化的 2294 对逆转认知缺陷、组织学症状及微出血 (microhemorrhage) 的作用。按下述进行抗体的施用、组织学和行为分析。

[0288] 抗体施用。过表达“Swedish”突变淀粉样前体蛋白的转基因小鼠 (具有 K670N/M671 的 APP Tg2576; Hsiao et al., Science 274:99-102(1996)) 用于该实验。这些小鼠中出现的阿尔茨海默氏病样表型已经得以充分的表征。Holcomb 等, Nat. Med. 4: 97-100(1998); Holcomb 等, Behav. Gen. 29:177-185(1999); 和 McGowan E, Neurobiol. Dis. 6:231-244(1999)。对于该 16 周的处理研究,将 20 月龄的 APP 转基因小鼠分为 4 组。第一组每周接受腹膜内抗  $A\beta$  抗体 2294 注射,持续 16 周 (n = 4)。第二组每周接受腹膜

内脱糖基化抗 A $\beta$  抗体 2294 注射,持续 16 周 ( $n = 5$ )。第三组每周接受腹膜内抗 AMN 抗体 (2906 ;小鼠单克隆抗果蝇 (*Drosophila*) amnesiac 蛋白 IgG1) 注射,持续 16 周 ( $n = 6$ )。非转基因的同窝出生仔畜用抗 AMN 抗体 ( $n = 4$ ) 或 2294 ( $n = 2$ ) 处理 16 周。

[0289] 行为分析。抗体处理 16 周后,按以前的描述使来自该研究的小鼠接受两天放射状臂形水迷宫训练。Wilcock 等, *J. Neuroinflammation* 1:24(2004)。该装置为早有描述的 6 臂迷宫。Gordon 等, *Neurobiol. Aging* 22:377-385(2001)。第 1 天,15 次试验分三批各 5 次试验进行。对于每一批一组 4 只小鼠相继地进行试验 (即,4 只小鼠中的每一只都进行试验 1,然后相同的小鼠进行试验 2,等等)。每个 5 次试验批次之后,试验第二组小鼠,使得在小鼠进行第二个批次 5 次试验之前有延长的休息期。目标臂对于一组中的每一只小鼠都是不同的以使气味线索最小化。起始臂对于每次试验是变化的,而目标臂对于给定的个体两天保持恒定。对于前 11 次试验,平台交替地可见然后隐藏 (对于最后 4 次试验,平台隐藏)。在第 2 天,除了平台在所有的试验中都隐藏外,按照以第 1 天完全相同的方式训练小鼠。在 1 分钟的时间框中测量错误 (不正确的臂进入) 次数。在 20 秒内未能对臂作出选择的小鼠被定为一次错误,但是在本研究中没有小鼠以此方式不得被定为错误。由于本研究中小鼠的数量,试验者不会知道每只小鼠的处理组身份。由于放射状臂形水迷宫任务中的依赖性测量是定量的而非估计性的,故降低了试验者偏见的可能性。为了使各单次试验的变异的影响最小化,将 3 次连续试验中每只小鼠的错误取平均值,每天得到 5 个数据点,使用 StatView (SAS Institute Inc., NC) 通过 ANOVA 统计学分析这些数据点。

[0290] 组织学分析。在处死当天,将小鼠称重,以 100mg/kg 过量给药 Nembutal (Abbott 实验室, North Chicago, IL),然后用 25ml 0.9%氯化钠进行心脏内灌流。快速取出脑,将左半脑在 100mM KPO<sub>4</sub> (pH7.2) 中的新鲜制备的 4%多聚甲醛中浸没固定 24 小时用于组织病理学。为了获得超低温保护,然后将该半脑相继地在 10%、20%和 30%蔗糖中孵育 24 小时。使用滑动切片机收集 25  $\mu$  厚的水平切片,4 $^{\circ}$ C 储存在具有叠氮化钠 (pH7.2) 的 Dulbecco 氏磷酸盐缓冲盐水中以防止微生物生长。随机挑选一系列相隔 600  $\mu$  的 8 个等间隔组织切片跨整个脑并按照早有的描述使用自由漂浮 (free-floating) 免疫组织化学染色总 A $\beta$  (兔多克隆抗总 A $\beta$  ;Biosource, Camarillo, CA, 1:10,000)。Gordon 等, *Exp. Neurol.* 173:183-195(2002);Wilcock 等, *J. Neurosci.* 24:6144-6151(2004)。使用 0.2% Congo 红在 NaCl 饱和的 80%乙醇中染色相隔 600  $\mu$ m 的第二个系列的组织切片。此外,还封固另一组切片,并使用 2%亚铁氰化钾在 2%盐酸中染色血铁黄素 15 分钟,之后在 1%中性红溶液中复染 10 分钟。使用 Image-ProPlus (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) 定量 Congo 红染色和 A $\beta$  免疫组织化学,以分析阳性染色所占的面积百分数。分析额皮质的一个区域和海马的三个区域 (以确保在海马值中不存在区域偏差)。最初分析 Congo 红给出总值。在手动编辑删除全部实质淀粉样沉淀后进行第二次分析以得到局限于血管 Congo 红染色的面积百分数。为了估计 Congo 红的实质面积,从总百分数中扣除血管淀粉样变的值。对于血铁黄素染色,在所有切片上计数普鲁士兰阳性位点的数目,并计算每切片的位点平均数目。在低放大倍率下在切片上定性地观察动物之间的差异。检查 8 个等间隔的切片,确定阳性谱的数目,并平均为每切片的值。为了评估可能的处理相关差异,通过单因素 ANOVA 以及之后通过 Fisher 氏 LSD 平均数比较,分析每个处理组的值。

[0291] 使用 ELISA 测量血清 A $\beta$  肽水平。在最后一次抗体给药后 1 天收集血清,将其稀

释,并在用 5  $\mu$ g/ml 抗体 6E10(与 A $\beta_{1-17}$  结合的抗  $\beta$  淀粉样蛋白抗体;Signet,Dedham,MA) 在 PBS 缓冲液 pH7.4 中预先包被的 96 孔微滴定板 (MaxiSorp;Nunc, Roskilde, Denmark) 中温育。二抗为 1 : 5000 稀释的生物素化的 4G8(与 A $\beta_{17-24}$  结合的抗  $\beta$  淀粉样蛋白抗体;Signet)。使用链霉亲和素-辣根过氧化物酶缀合物 (Amersham Biosciences), 之后用 TMB 底物 (KPL, Gaithersburg, MD) 进行检测。使用从 6 至 400pM 按比例增加的 A $\beta_{1-40}$  (AmericanPeptide) 制作标准曲线。

[0292] 应当理解,本文描述的实施例和实施方案仅用于举例说明的目的,在其基础上的各种修饰或改变是本领域技术人员可以想到的,并将包括在本申请的精神和范围内。为了所有的目的特此将本文引用的所有出版物、专利和专利申请完整地并入作为参考,这等同于专门单独地指出每一份单独的出版物、专利或专利申请如此并入作为参考一样。

#### [0293] 生物材料保藏

[0294] 以下材料保藏在美国典型培养物保藏中心,10801 UniversityBoulevard, Manassas, Virginia20110-2209, USA (ATCC) :

|        | 材料             | 抗体编号  | ATCC 保藏号 | 保藏日             |
|--------|----------------|-------|----------|-----------------|
| [0295] | pDb. 6G. hFc2a | 6G 重链 | PTA-6786 | 2005 年 6 月 15 日 |
|        | pEb. 6G. hK    | 6G 轻链 | PTA-6787 | 2005 年 6 月 15 日 |

[0296] 载体 pEb. 6G. hK 是编码 6G 轻链可变区和轻链  $\kappa$  恒定区的多核苷酸;载体 pDb. 6G. hFc2a 是编码 6G 重链可变区和含有突变 A330P331 至 S330S331 (氨基酸编号以 Kabat 编号为基础,参考野生型 IgG2a 序列进行;见 Eur. J. Immunol. (1999) 29 :2613-2624) 的重链 IgG2a 恒定区的多核苷酸。

[0297] 这些保藏是根据国际承认用于专利程序的微生物保藏布达佩斯条约和其实施细则 (布达佩斯条约) 的规定进行的。这保证该保藏物的活培养物自该保藏日起维持 30 年。该保藏物可以根据布达佩斯条约通过 ATCC 获得,并且其服从 Rinat Neuroscience 公司和 ATCC 之间的协议,这就保证在相关美国专利颁发后或者在任何美国或外国专利申请公布给公众后 (以先到者为准),公众可以持久而无限制地获得该保藏物的培养物后代,并且保证被美国专利商标局长根据 35USCSection 122 和据此的局长令 (包括 37CFR Section 1.14 并特别参考 886 OG 638) 确定为有资格的人可以获得该后代。

[0298] 本发明申请的受让人同意如果保藏材料的培养物在适宜条件下培养时死亡或丢失或损坏,在接到通知后将立即以相同的另一份材料替换该保藏材料。该保藏材料的可获得性并不能理解为违反任何政府权利机构根据其专利法授予的权利而许可实施本发明。

#### [0299] 抗体序列

[0300]

6G 重链可变区氨基酸序列 (SEQ ID NO: 1)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYAIHWVRQ  
APGQGLEWMGFTSPYSGVSNYNQKFKGRVTMTRDTSTST  
VYMELSSLRSEDVAVYYCARFDNYDRGYVRDYGWGQGLV  
TVS

6G 轻链可变区氨基酸序列 (SEQ ID NO: 2)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVNDNRISFLNW  
YQQKPGQPPKLLIYAATKQGTGVPDRFSGSGSGTDFTLT  
ISSLQAEDVAVYYCQQSKEFPWSFGGGTKVEIKRTV

6G CDR H1 (扩展 CDR) (SEQ ID NO: 3)

GYTFTTYAIH

6G CDR H2 (扩展 CDR) (SEQ ID NO: 4)

FTSPYSGVSNYNQKFKG

6G CDR H3 (扩展 CDR) (SEQ ID NO: 5)

FDNYDRGYVRDY

6G CDR L1 (扩展 CDR) (SEQ ID NO: 6)

RASESVNDNRISFLN

6G CDR L2 (扩展 CDR) (SEQ ID NO: 7)

AATKQGT

6G CDR L3 (扩展 CDR) (SEQ ID NO: 8)

QQSKEFPWS

6G 重链可变区核苷酸序列 (SEQ ID NO: 9)

CAGGTGCAACTGGTGCAATCCGGTGCCGAGGTGAAAAAGCCAGGCGCCTCCGTGA  
AAGTGTCCTGCAAAGCCTCCGGTTACACCTTTACCACCTATGCCATCCATTGGGTG  
CGCCAGGCCCCAGGCCAGGGTCTGGAGTGGATGGGCTTTACTTCCCCCTACTCCG  
GGGTGTCGAATTACAATCAGAAGTTCAAAGGCCGCGTCACCATGACCCGCGACAC

CTCCACCTCCACAGTGTATATGGAGCTGTCCTCTCTGCGCTCCGAAGACACCGCCG  
TGTATTACTGTGCCCGCTTCGACAATTACGATCGCGGCTATGTGCGTGACTATTGG  
GGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCC

6G 轻链可变区核苷酸序列 (SEQ ID NO: 10)

GACATCGTGATGACCCAGTCCCCAGACTCCCTGGCCGTGTCCCTGGGCGAGCGCG  
CCACCATCAACTGCCGCGCCAGCGAATCCGTGGATAACGATCGTATTTCTTTCT  
GAACTGGTACCAGCAGAAACCAGGCCAGCCTCCTAAGCTGCTCATTTACGCCGC  
CACCAAACAGGGTACCGGCGTGCCTGACCGCTTCTCCGGCAGCGGTTCCGGCAC  
CGATTTCACTCTGACCATCTCCTCCCTGCAGGCCGAAGATGTGGCAGTGTATTAC  
TGTCAGCAGTCCAAAGAGTTTCCCTGGTCCTTTGGCGGTGGCACCAAGGTGGAGA  
TCAAACGCACTGTG

6G 重链全抗体氨基酸序列 (包括本文中描述的经修饰的 IgG2a) (SEQ ID NO: 11)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYAIHWVRQAPGQGLEWMGFTSPYSG  
VSNYNQKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARFDNYDRGYVRDYW  
GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS  
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVE  
CPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEV  
HNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKG  
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPML  
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0301]

6G 轻链全抗体氨基酸序列 (SEQ ID NO: 12)

DIVMTQSPDSLAVSEGERATINCRASESVDNDRISFLNWIYQQKPGQPPKLLIYAATK  
QGTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSKPEPWSFGGGTKVEIKRTV  
AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD  
SKDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

6G 重链全抗体核苷酸序列 (包括本文中描述的经修饰的 IgG2a) (SEQ ID NO: 13)

CAGGTGCAACTGGTGCAATCCGGTGCCGAGGTGAAAAAGCCAGGCGCCTCCGTG  
AAAGTGTCTTGCAAAGCCTCCGGTTACACCTTTACCACCTATGCCATCCATTGGGT  
GCGCCAGGCCCCAGGCCAGGGTCTGGAGTGGATGGGCTTTACTTCCCCCTACTCC  
GGGGTGTGCAATTACAATCAGAAGTTCAAAGGCCGCGTCACCATGACCCGCGAC  
ACCTCCACCTCCACAGTGTATATGGAGCTGTCCTCTCTGCGCTCCGAAGACACCG  
CCGTGTATTACTGTGCCCGCTTCGACAATTACGATCGCGGCTATGTGCGTGACTAT  
TGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCTG  
TCTTCCCACTGGCCCCATGCTCCCGCAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGG

[0302]

CTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCAGAACCTGTGACCGTGTCTGGAACCTCTGGC  
GCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTGCAGTCCTCAGGTCTCTA  
CTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCATCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTAC  
ACCTGCAACGTAGATCACAAGCCAAGCAACACCAAGGTGACAAGACCGTGGAG  
AGAAAGTGTGTGTGGAGTGTCCACCTTGTCCAGCCCCTCCAGTGGCCGGACCAT  
CCGTGTTCTGTTCCTCCAAAGCCAAGGACACCCTGATGATCTCCAGAACCCC  
AGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGACCCAGAGGTGCAGTTC  
AACTGGTATGTGGACGGAGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCAAGAGAG  
GAGCAGTTCAACTCCACCTTCAGAGTGGTGAAGCTGTGACCGTGGTGCACCAGG  
ACTGGCTGAACGGAAAGGAGTATAAGTGTAAAGGTGTCCAACAAGGGACTGCCAT  
CCAGCATCGAGAAGACCATCTCCAAGACCAAGGGACAGCCAAGAGAGCCACAGG  
TGTATACCTGCCCCATCCAGAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGAC  
CTGTCTGGTGAAGGGATTCTATCCATCCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAAC  
GGACAGCCAGAGAACAATAAGACCACCCCTCCAATGCTGGACTCCGACGGA  
TCCTTCTTCTGTATTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGAA  
ACGTGTTCTCTTGTTCCTGTATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTATACCCAGAA  
GAGCCTGTCCCTGTCTCCAGGAAAG

6G 轻链全抗体核苷酸序列 (SEQ ID NO: 14)

GACATCGTGATGACCCAGTCCCCAGACTCCCTGGCCGTGTCCCTGGGCGAGCGCG  
CCACCATCAACTGCCGCGCCAGCGAATCCGTGGATAACGATCGTATTTCTTTCTG  
AACTGGTACCAGCAGAAACCAGGCCAGCCTCCTAAGCTGCTCATTTACGCCGCCA  
CCAAACAGGGTACCGGCGTGCCTGACCGCTTCTCCGGCAGCGGTTCCGGCACCGA  
TTTCACTCTGACCATCTCCTCCCTGCAGGCCGAAGATGTGGCAGTGTATTACTGTC  
AGCAGTCCAAAGAGTTTCCCTGGTCCTTTGGCGGTGGCACCAAGGTGGAGATCAA  
ACGCACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCTCCATCTGATGAGCAGTTGA  
AATCCGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCACGCGAGGCC  
AAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCCGGTAACTCCCAGGAGAGT  
GTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACC  
CTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCAT  
CAGGGCCTGAGTTCTCCAGTCACAAAGAGCTTCAACCGCGGTGAGTGC

[0001]

2006800189040-序列表.txt

## 序列表

&lt;110&gt; RINAT NEUROSCIENCE CORP.

ROSENTHAL, Arnon

PONS, Jaume

HO, Wei-Hsien

<120> 抗 $\beta$ -淀粉样肽抗体及其使用方法

&lt;130&gt; 514712002840

&lt;140&gt; PCT/US2006/016071

&lt;141&gt; 2006-04-28

&lt;150&gt; US 60/704,818

&lt;151&gt; 2005-08-01

&lt;150&gt; US 60/676,093

&lt;151&gt; 2005-04-29

&lt;160&gt; 32

&lt;170&gt; 基于Windows Version 4.0的FastSEQ

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 120

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成构建体

&lt;400&gt; 1

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

[0002]

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser  
115 120

<210> 2  
<211> 114  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成构建体

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

<210> 3  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成构建体

<400> 3  
Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Ala Ile His  
1 5 10

<210> 4  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工序列

[0003]

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成构建体

&lt;400&gt; 4

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Phe | Thr | Ser | Pro | Tyr | Ser | Gly | Val | Ser | Asn | Tyr | Asn | Gln | Lys | Phe | Lys |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Gly |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成构建体

&lt;400&gt; 5

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Phe | Asp | Asn | Tyr | Asp | Arg | Gly | Tyr | Val | Arg | Asp | Tyr |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成构建体

&lt;400&gt; 6

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Arg | Ala | Ser | Glu | Ser | Val | Asp | Asn | Asp | Arg | Ile | Ser | Phe | Leu | Asn |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成构建体

&lt;400&gt; 7

[0004]

Ala Ala Thr Lys Gln Gly Thr  
1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 8

Gln Gln Ser Lys Glu Phe Pro Trp Ser  
1 5

<210> 9

<211> 360

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 9

```
caggtgcaac tgggtgcaatc cgggtgccgag gtgaaaaagc caggcgcctc cgtgaaagtg 60
tcttgcaaag cctccggtta cacctttacc acctatgcca tccattgggt gcgccaggcc 120
ccaggccagg gtctggagtg gatgggcttt acttccccct actccggggt gtcgaattac 180
aatcagaagt tcaaaggccg cgtcaccatg acccgcgaca cctccacctc cacagtgtat 240
atggagctgt cctctctgcg ctccgaagac accgccgtgt attactgtgc ccgcttcgac 300
aattacgatc gcggctatgt gcgtgactat tggggccagg gcaccctggt caccgtctcc 360
```

<210> 10

<211> 342

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 10

```
gacatcgtga tgacccagtc cccagactcc ctggccgtgt ccctggggcga gcgcgccacc 60
atcaactgcc gcgccagcga atccgtggat aacgatcgta ttccctttct gaactggtac 120
cagcagaaac caggccagcc tcctaagctg ctcatcttac ccgccaccaa acagggtacc 180
ggcgtgcctg accgcttctc cggcagcggt tccggcaccg atttcactct gaccatctcc 240
tccctgcagg ccgaagatgt ggcagtgtat tactgtcagc agtccaaaga gtttccctgg 300
```

[0005]

tcctttggcg gtggcaccaa ggtggagatc aaacgcactg tg

342

<210> 11

<211> 447

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 11

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

[0006]

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

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 218

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成构建体

&lt;400&gt; 12

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

[0007]

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Leu | Lys | Ser | Gly | Thr | Ala | Ser | Val | Val | Cys | Leu | Leu | Asn | Asn | Phe | Tyr |
| 130 |     |     |     |     |     | 135 |     |     |     | 140 |     |     |     |     |     |
| Pro | Arg | Glu | Ala | Lys | Val | Gln | Trp | Lys | Val | Asp | Asn | Ala | Leu | Gln | Ser |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
| Gly | Asn | Ser | Gln | Glu | Ser | Val | Thr | Glu | Gln | Asp | Ser | Lys | Asp | Ser | Thr |
|     |     |     | 165 |     |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Thr | Leu | Thr | Leu | Ser | Lys | Ala | Asp | Tyr | Glu | Lys |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| His | Lys | Val | Tyr | Ala | Cys | Glu | Val | Thr | His | Gln | Gly | Leu | Ser | Ser | Pro |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Val | Thr | Lys | Ser | Phe | Asn | Arg | Gly | Glu | Cys |     |     |     |     |     |     |
| 210 |     |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 1341

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成构建体

&lt;400&gt; 13

```

caggtgcaac tgggtgcaatc cgggtgccgag gtgaaaaagc caggcgcctc cgtgaaagtg 60
tcctgcaaaag cctccgggta cacctttacc acctatgcc tccattgggt gcgccaggcc 120
ccaggccagg gtctggagt gatgggcttt acttccccct actccgggt gtccaattac 180
aatcagaagt tcaaaggccg cgtcaccatg acccgcgaca cctccacct cacagtgtat 240
atggagctgt cctctctgcg ctccgaagac accgccgtgt attactgtgc ccgcttcgac 300

aattacgatc gcggctatgt gcggtgactat tggggccagg gcaccctggt caccgtctcc 360
tcagcctcca ccaagggccc atctgtcttc ccactggccc catgctccc cagcacctcc 420
gagagcacag ccgccttggg ctgctgtgtc aaggactact tcccagaacc tgtgaccgtg 480
tcctggaact ctggcgctct gaccagcggc gtgcacacct tcccagctgt cctgcagtcc 540
tcaggtctct actccctcag cagcgtgggt accgtgccat ccagcaactt cggcaccag 600
acctacacct gcaacgtaga tcacaagcca agcaacacca aggtcgacaa gaccgtggag 660
agaaagtgtt gtgtggagt tccacctgt ccagcccctc cagtggccgg accatccgtg 720
ttctgttcc ctccaaagcc aaaggacacc ctgatgatct ccagaacccc agaggtgacc 780
tgtgtggttg tggacgtgtc ccacgaggac ccagaggtgc agttcaactg gtatgtggac 840
ggagtggagg tgcacaacgc caagaccaag ccaagagagg agcagttcaa ctccaccttc 900
agagtggtag gcgtgctgac cgtggtgcac caggactggc tgaacggaaa ggagtataag 960
tgtaagggtg ccaacaaggg actgccatcc agcatcgaga agaccatctc caagaccaag
1020
ggacagccaa gagagccaca ggtgtatacc ctgcccccat ccagagagga gatgaccaag
1080
aaccaggtgt ccctgacctg tctggtgaag ggattctatc catccgacat cgccgtggag
1140
tgggagtcca acggacagcc agagaacaac tataagacca cccctccaat gctggactcc
1200
[0008]

```

gacggatcct tcttcctgta ttccaagctg accgtggaca agtccagatg gcagcaggga  
1260  
aacgtgttct cttgttccgt gatgcacgag gccctgcaca accactatac ccagaagagc  
1320  
ctgtccctgt ctccaggaaa g  
1341

<210> 14  
<211> 654  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成构建体

<400> 14  
gacatcgtga tgaccagtc cccagactcc ctggccgtgt ccctgggcca gcgcgccacc 60  
atcaactgcc gcgccagcga atccgtggat aacgatcgta tttcctttct gaactggtac 120  
  
cagcagaaac caggccagcc tcctaagctg ctcatTTacg ccgccacca acagggtacc 180  
ggcgtgcctg accgcttctc cggcagcggg tccggcaccg atttcaactct gaccatctcc 240  
tccctgcagg ccgaagatgt ggcagtgtat tactgtcagc agtccaaaga gtttccctgg 300  
tcctttggcg gtggcaccac ggtggagatc aaacgcactg tggctgcacc atctgtcttc 360  
atcttccttc catctgatga gcagttgaaa tccggaactg cctctgttgt gtgcctgctg 420  
aataacttct atccacgcga ggccaaagta cagtgggaagg tggataacgc cctccaatcc 480  
ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 540  
agcaccctga ccctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc 600  
acccatcagg gcctgagttc tccagtcaca aagagcttca accgcggtga gtgc 654

<210> 15  
<211> 40  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 15  
Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys  
1 5 10 15  
Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile  
20 25 30  
Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val  
35 40

<210> 16  
<211> 42  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
[0009]

&lt;400&gt; 16

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Ala | Glu | Phe | Arg | His | Asp | Ser | Gly | Tyr | Glu | Val | His | His | Gln | Lys |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Leu | Val | Phe | Phe | Ala | Glu | Asp | Val | Gly | Ser | Asn | Lys | Gly | Ala | Ile | Ile |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Gly | Leu | Met | Val | Gly | Gly | Val | Val | Ile | Ala |     |     |     |     |     |     |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     |     |     |     |     |

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 43

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 17

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Ala | Glu | Phe | Arg | His | Asp | Ser | Gly | Tyr | Glu | Val | His | His | Gln | Lys |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Leu | Val | Phe | Phe | Ala | Glu | Asp | Val | Gly | Ser | Asn | Lys | Gly | Ala | Ile | Ile |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Gly | Leu | Met | Val | Gly | Gly | Val | Val | Ile | Ala | Thr |     |     |     |     |     |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     |     |     |     |     |

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成构建体

&lt;400&gt; 18

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Phe | Phe | Ala | Glu | Asp | Val | Gly | Ser | Asn | Lys | Gly | Ala | Ile | Ile | Gly | Gly |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成构建体

&lt;400&gt; 19

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Phe | Ala | Glu | Asp | Val | Gly | Ser | Asn | Lys | Gly | Ala | Ile | Ile | Gly | Leu | Gly |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

[0010]

<210> 20  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成构建体

<400> 20  
Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Gly  
1 5 10 15

<210> 21  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成构建体

<400> 21  
Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly  
1 5 10 15

<210> 22  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成构建体

<400> 22  
Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly  
1 5 10 15

<210> 23  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成构建体

[0011]

&lt;400&gt; 23

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

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成构建体

&lt;400&gt; 24

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

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成构建体

&lt;400&gt; 25

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

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成构建体

&lt;400&gt; 26

Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Gly  
1 5 10 15

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

[0012]

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成构建体

&lt;400&gt; 27

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Val | Gly | Ser | Asn | Lys | Gly | Ala | Ile | Ile | Gly | Gly |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成构建体

&lt;400&gt; 28

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Ser | Asn | Lys | Gly | Ala | Ile | Ile | Gly | Leu | Gly |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成构建体

&lt;400&gt; 29

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Asn | Lys | Gly | Ala | Ile | Ile | Gly | Leu | Met | Gly |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 49

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 30

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Val | Lys | Met | Asp | Ala | Glu | Phe | Arg | His | Asp | Ser | Gly | Tyr | Glu | Val |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| His | His | Gln | Lys | Leu | Val | Phe | Phe | Ala | Glu | Asp | Val | Gly | Ser | Asn | Lys |
|     |     | 20  |     |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Gly | Ala | Ile | Ile | Gly | Leu | Met | Val | Gly | Gly | Val | Val | Ile | Ala | Thr | Val |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Ile |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

[0013]

<210> 31  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成构建体

<400> 31  
Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Gly  
1 5 10 15

<210> 32

<211> 15  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成构建体

<400> 32  
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
1 5 10 15

粗体=Kabat CDR

下划线=Chothia CDR

6G重链可变区

H1  
1 5 10 15 20 25 30 35  
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTT**Y**AIHWVRQ

H2  
40 45 50 55 60 65 70 75  
APGQGLEWMG**FTSPYSGVSNYNQKFKGRV**TMTRDTSTST

H3  
80 85 90 95 100 105 110 115  
VYMEISSLRSEDVAVYYCAR**FDNYDRGYVRDY**WGQGLV

120  
TVS

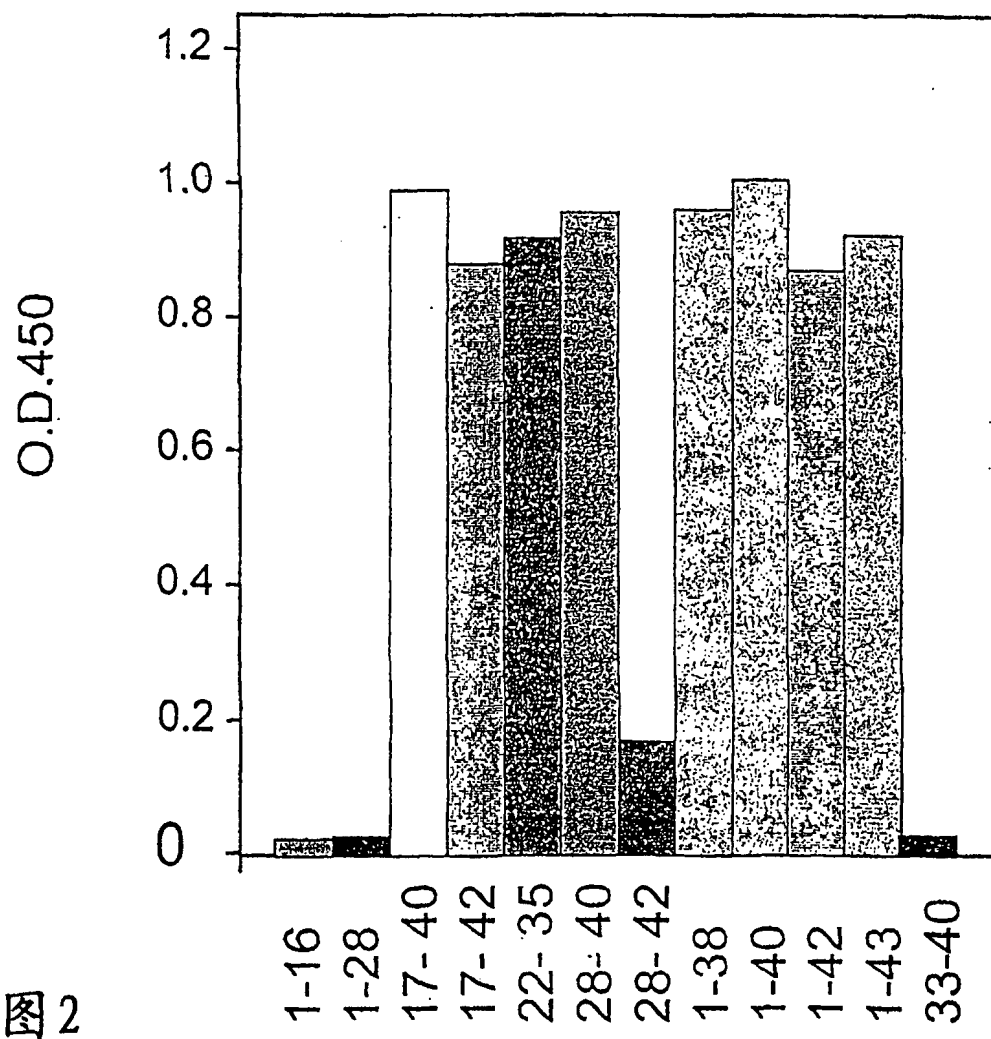
6G轻链可变区

L1  
1 5 10 15 20 25 30 35  
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCR**ASESVDNDRISFLN**W

L2  
40 45 50 55 60 65 70 75  
YQQKPGQPPKLLIY**AATKQGT**GVPDRFSGSGSGTDFTLT

L3  
80 85 90 95 100 105 110 114  
ISSSLQAEDVAVYYC**QQSKEFPWS**FGGGTKVEIKRTV

图 1



## 通过ELISA肽扫描对抗体6G的表位作图

| <u>15-mer肽</u>              | <u>A450 ELISA</u> |
|-----------------------------|-------------------|
| FFAEDVGSNKGAIIGG            | NB                |
| FAEDVGSNKGAIIGLG            | >3                |
| AEDVGSNKGAIIGLMG            | >3                |
| EDVGSNKGAIIGLMVG            | >3                |
| DVGSNKGAIIGLMVGG            | 2.3               |
| VGSNKGAIIGLMVGGG            | 2.1               |
| GSNKGAIIGLMVGGVG            | 1.5               |
| SNKGAIIGLMVGGVVG            | NB                |
| NKGAIIGLMVGGVWIG            | NB                |
|                             |                   |
| <u>10-mer肽</u><br>(测定的最小表位) |                   |
| VGSNKGAIIGG                 | NB                |
| GSNKGAIIGLG                 | 2                 |
| SNKGAIIGLMG                 | NB                |

图 3

抗体6G表位的示意图

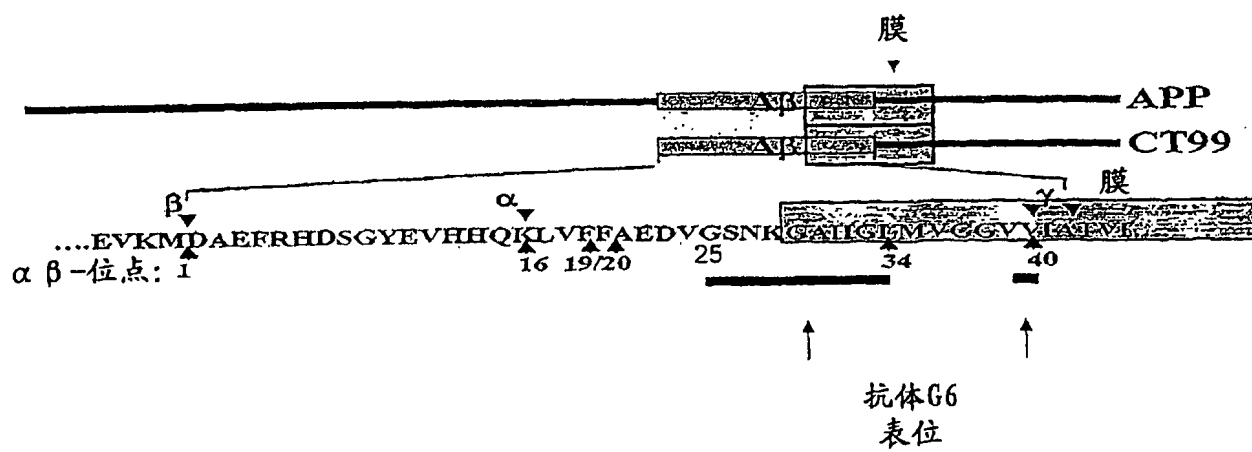
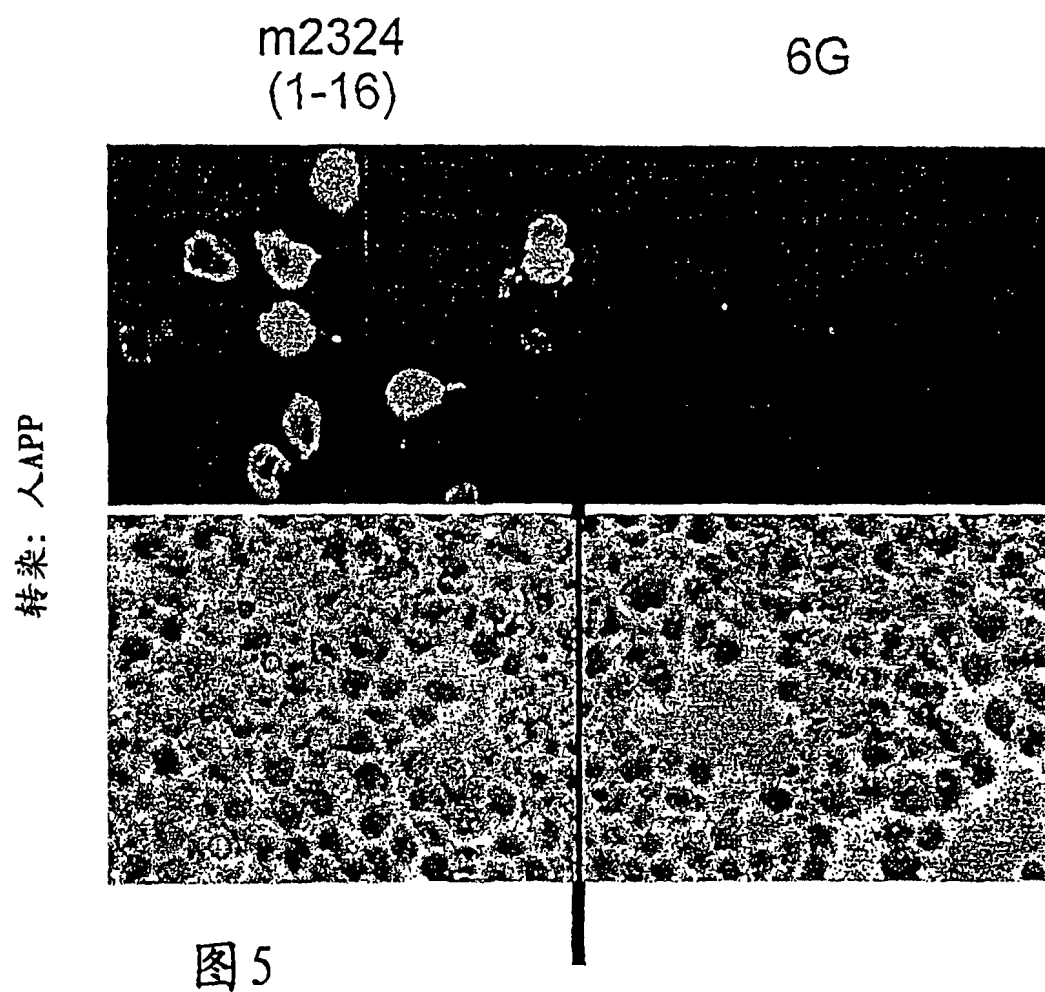


图4



表位作图:

15 MER肽

2294

6G

|    |                  |     |     |
|----|------------------|-----|-----|
| 19 | FFAEDVGSNKGAIIGG | NB  | NB  |
| 20 | FAEDVGSNKGAIIGLG | >3  | >3  |
| 21 | AEDVGSNKGAIIGLMG | 2.9 | >3  |
| 22 | EDVGSNKGAIIGLMVG | >3  | >3  |
| 23 | DVGSNKGAIIGLMVGG | >3  | 2.3 |
| 24 | VGSNKGAIIGLMVGGG | >3  | 2.1 |
| 25 | GSNKGAIIGLMVGGVG | >3  | 1.5 |
| 26 | SNKGAIIGLMVGGVVG | >3  | NB  |
| 27 | NKGAIIGLMVGGVVIG | NB  | NB  |
| 28 | KGAIIGLMVGGVVIAG | NB  | NB  |

10 MER肽结合数据: 测定的最小表位

|             |      |    |
|-------------|------|----|
|             | 2294 | 6G |
| VGSNKGAIIGG | NB   | NB |
| GSNKGAIIGLG | 2    | >3 |
| SNKGAIIGLMG | NB   | NB |

图 6