



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103479998 B

(45) 授权公告日 2015. 11. 18

(21) 申请号 201310412048. 9

WO 2004/060965 A2, 2004. 07. 22,

(22) 申请日 2008. 01. 09

WO 2004071408 A2, 2004. 08. 26,

(30) 优先权数据

WO 2006040153 A2, 2006. 04. 20,

60/885, 439 2007. 01. 18 US

审查员 李恩

(62) 分案原申请数据

200880002621. 6 2008. 01. 09

(73) 专利权人 伊莱利利公司

地址 美国印第安纳州

(72) 发明人 K·R·贝尔斯 T·F·布摩尔

C·K·乔 R·B·德马托斯

R·J·汉森 U·库希波特拉 J·卢

P·C·麦克唐奈

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 凌立 黄革生

(51) Int. Cl.

A61K 39/395(2006. 01)

A61K 47/48(2006. 01)

A61P 25/28(2006. 01)

(56) 对比文件

US 2006257396 A1, 2006. 11. 16,

权利要求书1页 说明书16页

序列表6页

(54) 发明名称

聚乙二醇化的 Aβ FAB

(57) 摘要

本发明描述了在预防上和治疗上治疗与 Aβ 肽活性相关的病症的方法。该方法使用在第 13-28 位氨基酸之间特异结合人 Aβ 肽的人源化抗体片段,其中所述抗体片段共价结合聚乙二醇(PEG)分子。

1. 适合皮下施用的药物组合物,其包含抗体片段,所述抗体片段在第 13-28 位氨基酸之间特异结合人 Aβ 肽,其中所述抗体片段包含轻链可变区 SEQ ID NO:1 和重链可变区 SEQ ID NO:2,并且其中聚乙二醇分子共价结合所述抗体片段重链可变区的 CDR,其中所述聚乙二醇分子具有 0.5-30kD 的分子量。

2. 权利要求 1 的组合物,其中所述抗体片段为 Fab 片段。

3. 权利要求 1 或 2 中任一项的组合物,其中所述聚乙二醇分子共价结合所述重链可变区 SEQ ID NO:2 第 56 位氨基酸处的半胱氨酸。

4. 权利要求 3 的组合物,其中所述聚乙二醇经马来酰亚胺键进行共价结合。

5. 权利要求 1 的组合物,其中所述聚乙二醇经马来酰亚胺键进行共价结合。

6. 权利要求 1-5 中任一项的组合物在制备用于治疗选自阿尔茨海默氏病、前驱阿尔茨海默氏病和轻度认知缺损的病症的药物中的用途。

7. 根据权利要求 6 的组合物中的用途,其中所述病症为阿尔茨海默氏病。

聚乙二醇化的 A β FAB

[0001] 本申请是发明人于 2008 年 1 月 9 日提交的题为“聚乙二醇化的 A β FAB”的中国专利申请 200880002621.6 号的分案申请。

[0002] 本发明涉及结合淀粉样蛋白 β (A β) 肽且共价结合一个或多个聚乙二醇(PEG)分子的抗体片段。

[0003] 环状的 A β 肽由前体蛋白质淀粉样蛋白前体蛋白质(APP)切割产生的 39-43 个氨基酸(大部分为 40 或 42 个氨基酸)组成。A β 从可溶形式向具有高 β 折叠含量的不可溶形式的转换以及其在脑中作为神经炎斑点和脑血管斑点的沉积似乎与许多病症和疾病(包括阿尔茨海默氏病、唐氏综合症和脑淀粉样血管病(CAA))相关。预防和 / 或逆转 A β 的沉积可治疗与 A β 肽相关的病症。

[0004] 影响 A β 沉积的治疗剂包括针对 A β 肽的抗体,例如在 W02001/62801、W02004/071408 和 Tamura, Y., 等, Neurobiol. of Dis. (2005) 20:541-545 中讨论的人源化抗体和片段。

[0005] 尽管许多抗体及其衍生物可用于诊断和治疗,但对于特定应用而言常常无法获得理想的抗体药物代谢动力学。旨在治疗与 A β 肽相关的多种病症和疾病的治疗性抗体通常为具有完整 Fc 区的免疫球蛋白。Fc 区负责延长血浆中抗体的半衰期。然而,由于这种延长阻止了有效清除与靶肽结合的抗体,导致抗原抗体复合体在血浆循环中延时存在,因此该延长可能是不利的。随后施用抗体导致血浆中不想要复合体的进一步积累。抗体的 Fc 部分可能具有某些不必要的效应子作用,因此需要进行修饰以去除这种作用。此外, Fc 部分向整体治疗添加了显著的大小,所述治疗常产生与递送路径、递送装置和扩大制备过程相关的问题。

[0006] 已在体内研究了包括 Fab 在内的无 Fc 部分的抗体片段以测定是否此类片段可能为潜在的治疗法。然而,研究提示由于清除率快和半衰期短, 所以限制了涉及如 Fab 的片段的治疗有效性。因此,需要有活性的治疗性抗 A β 肽抗体分子,所述抗体分子具有这样的药物代谢动力学和药物动力学,其允许改善给药方案而避免由血浆中复合体的形成产生和潜在的效应子作用的潜在副作用。

[0007] 本发明克服了与可能靶向 A β 肽的治疗性抗体或抗体片段相关的许多问题。本发明的化合物包括结合 A β 且共价结合一个或多个聚乙二醇(PEG)分子的抗体片段。这些化合物可在细菌或酵母细胞系统中产生,所述细菌或酵母细胞系统消除了与哺乳动物细胞系中产生抗体相关的多种问题,例如成本问题、纯化问题和污染内源产生的抗原问题。此外,本发明的化合物可经皮下施用并具有理想的药物代谢动力学(PK)和药物动力学(PD)谱,同时保持抗体片段对 A β 亲和力和选择性。

[0008] 非常无法预测且意外地,申请人还发现共价结合 PEG 分子至抗体片段的互补决定区(CDR)未改变抗体片段对 A β 的活性、亲和力或选择性。

[0009] 本发明提供包含抗体片段的分子,所述抗体片段在第 13-28 位氨基酸之间特异性结合人 A β 肽,其中抗体片段共价结合 PEG 分子。优选地,抗体片段为 Fab 片段。

[0010] 在一个实施方案中,本发明提供包含抗体片段的分子,所述抗体片段具有重链

可变区和轻链可变区,其中所述轻链可变区包含具有以下氨基酸序列的 CDR 区:CFRL1:SSSQSLIYSDGNAYLH(SEQ ID NO:6)、CDRL2:KVSNRFS(SEQ ID NO:7)和 CDRL3:TQSTHSPWT(SEQ ID NO:8)且其中所述重链可变区包含具有以下氨基酸序列的 CDR 区:CDRH1:GYTFSRYSMS(SEQ ID NO:9)、CDRH2:QINIRGCNTYYPDTVKG(SEQ ID NO:10)或 QINIRGNNTYYPDTVKG(SEQ ID NO:11)和 CDRH3:GDF(SEQ ID NO:12)。优选地,此类分子具有共价结合抗体片段重链可变区或轻链可变区的 PEG 分子。更优选地,此类分子具有共价结合 CDR 的 PEG 分子。甚至更优选地,此类分子具有共价结合 CDR 内半胱氨酸残基的 PEG 分子。最优选地,此类分子具有共价结合抗体片段重链可变区 CDRH2:QINIRGCNTYYPDTVKG(SEQ ID NO:10)的 PEG 分子。

[0011] 在另一实施方案中,本发明提供包含抗体片段的分子,所述抗体片段具有轻链可变区 SEQ ID NO:1 和重链可变区 SEQ ID NO:2。优选地,此类分子具有共价结合抗体片段的轻链可变区或重链可变区的 PEG 分子。更优选地,此类分子具有共价结合抗体片段重链可变区的 CDR 的 PEG 分子。甚至更优选地,此类分子具有共价结合抗体片段的轻链可变区的 CDR 内半胱氨酸残基的 PEG 分子。最优选地,此类分子具有共价结合重链可变区 SEQ ID NO:2 的第 56 位氨基酸处的半胱氨酸的 PEG 分子。

[0012] 在另一实施方案中,本发明提供包含 Fab 片段或 ScFv 片段的分子,其中 Fab 片段或 ScFv 片段共价结合 PEG 分子并具有轻链可变区 SEQ ID NO:1 和重链可变区 SEQ ID NO:2。优选地,此类分子具有共价结合重链可变区 SEQ ID NO:2 的第 56 位氨基酸处的半胱氨酸的 PEG 分子。同样优选地,在此类分子中 PEG 的分子量约为 0.5kD 至 30kD,更优选为 20kD。

[0013] 在另一实施方案中,本发明提供包含具有轻链可变区 SEQ ID NO:1 和重链可变区 SEQ ID NO:2 的抗体片段的分子,其中所述抗体片段在重链可变区 SEQ ID NO:2 的第 56 位处共价结合 20kD 的 PEG 分子。优选地,在此类分子中 PEG 分子经马来酰亚胺键进行共价结合。

[0014] 在另一实施方案中,本发明提供包含在第 13-28 位氨基酸间特异结合人 A β 肽的抗体片段的分子,其中所述抗体片段共价结合 PEG 分子并具有轻链可变区 SEQ ID NO:1 和重链可变区 SEQ ID NO:3。优选地,此类分子具有共价结合抗体片段绞链区的 PEG 分子。更优选地,所述 PEG 经马来酰亚胺键共价结合绞链区。

[0015] 本发明还包括包含抗体片段的分子,所述抗体片段优选为人源化抗体片段,其中 PEG 分子共价结合抗体片段,所述抗体片段产生具有允许每周给药方案的药物代谢动力学和药物动力学的活性治疗分子,同时将可能是由血浆中复合体形成造成的潜在副作用最小化且保留或改善抗体片段对 A β 的活性、亲和力和选择性。

[0016] 本发明还包括治疗、预防或逆转与 A β 肽相关的病症和疾病的方法,所述病症和疾病包括临床前和临床(pre-clinical and clinical)阿尔茨海默氏病、唐氏综合征和临床前和临床脑淀粉样血管病(CAA)认知缺陷、中风、脑溢血和一般性精神衰弱。这些方法包含向受试者施用有效量的此处描述和要求保护的分子。

[0017] 本发明提供包含在第 13-28 位氨基酸间特异结合 A β 肽的抗体片段的分子,其中所述抗体片段共价结合 PEG 分子。我们已发现 PEG 分子共价连接结合 A β 的抗体片段未负面地改变抗体片段对 A β 的活性、亲和力或选择性。更令人惊奇地,我们发现具有高达 20kD 分子量的 PEG 分子共价连接结合 A β 的抗体片段的 CDR 也未负面地改变抗体片段对 A β 肽

的活性、亲和力或选择性。这些抗体片段可经皮下施用且具有用于支持可变通给药方案的治疗用途的改善的 PK/PD 谱。此外,这些抗体片段可在细菌或酵母细胞系统中产生,所述细菌或酵母细胞系统消除了与在哺乳动物细胞中制备全长抗体相关的多种问题。本发明的聚乙二醇化抗体片段提供了在预防和治疗上预防和治疗人与 A β 肽相关的病症的可能性。

[0018] 天然存在的全长抗体为包含四条肽链的免疫球蛋白分子,所述四条肽链为通过二硫键互相连接的两条重(H)链(全长时约为 50-70kDa)和两条轻(L)链(全长时约为 25kDa)。每一条链的氨基端部分包括主要负责抗原识别的约 100-110 个或更多个氨基酸的可变区。每一条链的羧基端部分定义主要负责效应子作用的恒定区。

[0019] 轻链分为 κ 或 λ 且特征为具有特定的恒定区。每一条轻链包含 N 端轻链可变区(此处为“LCVR”)和包含一个结构域 CL 的轻链恒定区。重链分为 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ ,且分别将抗体的同种型定义为 IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE,并且这些中的几种可进一步分为亚类(同种型)例如 IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁和 IgA₂。每一种重链类型的特征在于特定的恒定区。每一重链包含 N 端重链可变区(此处为“HCVR”)和重链恒定区。对 IgG、IgD 和 IgA 而言,重链恒定区包含 3 个结构域(CH1、CH2 和 CH3);而对 IgM 和 IgE 而言,重链恒定区包含 4 个结构域(CH1、CH2、CH3 和 CH4)。

[0020] HCVR 区和 LCVR 区可进一步细分为高变区,命名为互补决定区(“CDR”),其上散布更保守的命名为框架区(“FR”)的区域。每一个 HCVR 和 LCVR 由三个 CDR 和四个 FR 组成,自氨基端向羧基端按如下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。此处重链的 3 个 CDR 称为“CDRH1、CDRH2 和 CDRH3”并且轻链的 3 个 CDR 称为“CDRL1、CDRL2 和 CDRL3”。CDR 包含与抗原形成特异性相互作用的大部分残基。HCVR 和 LCVR 区内的 CDR 氨基酸残基的编号及位置与众所周知的 Kabat 编号规定一致。

[0021] 每一条轻-重链对的可变区形成抗体的抗原结合位点。如此处所用,“抗原结合部分”或“抗原结合区”或“抗原结合结构域”或“抗原结合位点”可相互取代地指代抗体分子的部分,其包含与抗原相互作用且赋予抗体对抗原的特异性和亲和力的氨基酸残基。该抗体部分包括维持抗原结合残基正常构象所必需的“框架”氨基酸残基。优选地,本发明抗体的框架区为人起源或基本为人起源(至少为 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 人起源)且遵循 Kabat 编号。或者,抗原结合区可来自人序列。

[0022] 如此处所用,术语“抗体片段”指保留特异结合抗原(例如 A β)能力的抗体的一个或多个片段。包含在术语抗体的“抗体片段”中的分子的实例包括(i) Fab 片段,由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域组成的单价片段;(ii) F(ab')₂片段,包含在绞链区由二硫键连接的两个 Fab 片段的二价片段;(iii) 由 VH 和 CH1 结构域组成的 Fd 片段;(iv) 由抗体单个臂的 VL 和 VH 结构域组成的 Fv 片段,和(v) dAb 片段(Ward, 等, (1989) Nature 341:544-546),其由 VH 结构域组成。此外,尽管 Fv 片段的两个结构域 VL 和 VH 由不同基因编码,但可使用重组方法通过合成接头(该接头使它们形成单条蛋白质链,其中 VL 区和 VH 区配对以形成单价分子)将它们连接起来(称为单链 Fv (scFv);参阅,例如 Bird 等 (1988) Science 242:423-426: 和 Huston 等 (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883)。此类单链抗体也旨在包含于术语“抗体片段”中。术语“抗体片段”也包含单链抗体的其他形式,例如双体(diabody)。双体是二价双特异性结合蛋白质,其中 VH 和 VL 结构域表达于单条多肽链上,但使用的接头太短以至于无法在同一条链的两个结构域之间形成配对,因此迫使该结构域与另一条链的

互补结构域配对并形成两个抗原结合位点(参阅,例如 Holliger, P., 等 (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak, R. J., 等 (1994) *Structure* 2:1121-1123)。

[0023] 更进一步,抗体或其抗体片段可为通过抗体或抗体片段与一种或多种其他蛋白质或肽共价或非共价结合形成的更大免疫粘着分子的一部分。此类免疫粘着分子的实例包括使用链霉抗生物素蛋白核心区以产生四聚体 scFv 分子(Kipriyanov, S. M., 等 (1995) *Human Antibodies and Hybridomas* 6:93-101),和使用半胱氨酸残基、标记肽和 C 端多组氨酸标签以产生二价和生物素化的 scFv 分子(Kipriyanov, S. M., 等 (1994) *Mol. Immunol.* 31:1047-1058)。可使用常规技术如整个抗体的木瓜蛋白酶或胃蛋白酶消化分别从整个抗体中制备抗体片段,例如 Fab 和 F(ab')₂ 片段。此外,如本领域中众所周知,可使用标准重组 DNA 技术获得抗体、抗体片段和免疫粘着分子。抗体、抗体片段和免疫粘着分子可为糖基化或非糖基化的且仍落在本发明的范围内。优选地,抗体片段为 Fab 片段。

[0024] 术语“人源化抗体”指部分或全部由来自人抗体种系的氨基酸序列或重排序列组成的抗体,其通过改变具有非人 CDR 的抗体序列获得。可变区的框架区可由对应的人框架区取代。人框架区包括基因组框架区以及包含一个或多个氨基酸取代的那些区域。具体而言,此类取代包括其中由来自非人 CDR 的天然框架相应位置的氨基酸取代人框架中特定位置的氨基酸的突变。例如,具有小鼠 CDR 的人源化抗体可包含用相应的小鼠框架氨基酸取代特定的人框架氨基酸的一处或多处取代。其他描述参与人源化可能使用的小鼠抗体的方法的参考是例如 Queen 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:2869, 1991; 美国专利号 5,693,761; 美国专利号 4,816,397; 美国专利号 5,225,539; 在 Levitt, M., *J. Mol. Biol.* 168:595-620, 1983 中描述的计算机程序 ABMOD 和 ENCAD; 人源化可基本上按 Winter 及其同事的方法进行(Jones 等, *Nature*, 321:522-525, 1986; Riechmann 等, *Nature*, 332:323-327, 1988; Verhoeyen 等, *Science*, 239:1534-1536, 1988)。优选地,本发明的抗体为人源化抗体片段。更优选地,本发明的抗体是人源化抗体 fab 片段。

[0025] 本发明还包括共价结合一个或多个 PEG 分子的抗体片段。希望术语“聚乙二醇”和“PEG”可相互取代使用且指代本领域中公知的聚乙二醇或其衍生物(参阅,例如美国专利号:5,445,090;5,900,461;5,932,462;6,436,386;6,448,369;6,437,025;6,448,369;6,495,659;6,515,100 和 6,514,491)。优选地,PEG 共价结合抗体片段的一个或多个赖氨酸或半胱氨酸残基。更优选地,PEG 共价结合抗体片段重链可变区中的一个或多个赖氨酸或半胱氨酸残基。甚至更优选地,PEG 共价结合抗体片段 CDR 内的一个或多个赖氨酸或半胱氨酸残基。最优选地,PEG 结合所述重链可变区 SEQ ID NO:2 的第 56 位氨基酸的半胱氨酸残基。或者,PEG 分子可经连接抗体片段绞链区的接头或间隔分子结合到抗体片段上。向绞链区添加接头和间隔分子是本领域众所周知的。此外,PEG 可通过本领域公知的技术共价结合到抗体片段的被修饰非天然氨基酸上。

[0026] 在其一般形式中,“PEG”为具有末端羟基的线性聚合物且具有分子式 $\text{HO}-\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{OH}$, 其中 n 从约为 8 至约为 4000。端基氢可由保护基团如烷基或链烷醇基团(M-PEG 取代。优选地,PEG 具有至少一个羟基,更优选地其为末端羟基。优选激活该羟基以与肽反应。使用多种化学修饰来制备具有功能性基团(例如活性碳酸盐、活性酯、醛、tresylate 或使用适合于偶联给定靶分子的 PEG 丙醛)的活性 PEG 衍生物。活性 PEG 衍生物随后共价结合多肽药物的反应性基团。有许多用于本发明的 PEG 形式。本领域中存

在大量 PEG 衍生物且均适合在本发明中使用。共价结合本发明抗体片段的 PEG 分子不旨在局限于具体类型或大小。PEG 分子量优选从约 0.5 千道尔顿(kD)至约 100kD,更优选地从约 5kD 至约 30kD,最优选地从约 1kD 到约 20kD。PEG 可为线性的或分支的,且本发明的抗 A β 肽抗体片段可具有 1、2、3、4、5 或 6 个与肽结合的 PEG 分子。最优选为一个 PEG 分子抗体片段;然而,当每个肽分子存在多于一个 PEG 分子时,优选为不多于六个。本发明还涵盖 PEG 分子的两端均适合与两个或多个抗 A β 肽抗体片段分子共同交联。将 PEG 分子结合到蛋白质、抗体及其片段的方法在本领域是众所周知的。

[0027] 如此处所用的术语“ K_D ”旨在指特定抗体-抗原相互作用的解离常数。根据方程式: $K_D=k_{off}/k_{on}$ (以 M 测定)计算。如此处所用术语“ k_{on} ”旨在指结合速率常数,或前者或复合体形成反应的反应比速(specific reaction rate),以单位: $M^{-1}sec^{-1}$ 测定。如此处所用术语“ k_{off} ”旨在指抗体从抗体/抗原复合体上解离的解离速率常数或反应比速,以单位: sec^{-1} 测定。

[0028] 如此处所用的术语“特异结合”指其中特异结合对中的一个成员不显著地结合除它特异结合的一个或多个配偶体之外的其他分子的情况。该术语也适用于例如本发明抗体的抗原结合结构域对于由许多抗原携带的特定表位是特异的,在这种情况下带有抗原结合结构域的特异性抗体将能够结合带有该表位的多种抗原。因此,本发明的分子特异结合 A β 肽,而不特异结合 APP。此外,本发明的分子在线性、非线性或包含氨基酸 HHQKLVFFAEDVGSNK(13-28)(SEQ ID NO:4)的构象 A β 表位间特异地结合。

[0029] 参考本发明的分子,术语“活性”包括但不限于表位/抗原亲和力和特异性、在体内或体外中和或拮抗 A β 肽活性的能力、 IC_{50} 、抗体的体内稳定性和抗体的免疫特性。本领域中抗体识别的其他可识别的生物学特性或特征包括例如交叉反应性、(即通常与靶肽的非人同源物、或与其他蛋白质或组织的交叉反应性)、和在哺乳动物细胞中保持蛋白质高表达水平的能力。可使用包括但不限于 ELISA、竞争性 ELISA、Biacore 或 KinExA 表面等离子共振分析、不受限的体外或体内中和试验、受体结合、细胞因子或生长因子产生和/或分泌、信号转导和对于来自包括人、灵长类或任何其他来源的不同来源的组织切片的免疫组织化学在内的领域认可的技术观察、测定或评估前文提到的特性或特征。

[0030] 此处可互相取代使用的术语“个体”、“受试者”和“患者”指哺乳动物,优选为人。在特定实施方案中,受试者特征还在于患有将从 A β 肽活性下降中受益的疾病或障碍或病症。

[0031] 如此处所用,表述“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”可互相取代使用并包括单独的细胞或细胞培养物,其为本发明任何分离的多核苷酸或包含编码 HCVR、LCVR 或本发明单克隆抗体的序列的任何一个或多个重组载体的接受者。宿主细胞包括单个宿主细胞的后代。由于自然的、意外的或有目的性的突变和/或改变,后代可能在形态或总 DNA 补体上与原始亲本细胞不完全一致。宿主细胞包括用表达本发明的抗体片段或其轻链或重链的重组载体或多核苷酸转化的、转导的或感染的细胞。包含本发明重组载体的宿主细胞无论是否稳定整合入宿主染色体,也可称为“重组宿主细胞”。用于产生本发明宿主细胞的优选细胞为 CHO 细胞(例如 ATCC CRL-9096)、NS0 细胞、SP2/0 细胞、COS 细胞(ATCC 例如, CRL-1650、CRL-1651)和 HeLa(ATCC CCL-2)。本发明中使用的另外的宿主细胞包括植物细胞、酵母细胞、其他哺乳动物细胞和原核细胞。更优选地,本发明中使用的细胞为酵母

或原核细胞。

[0032] 术语“涉及 A β 肽的病症或疾病”或“与具有 A β 活性的疾病相关的病症”意指包括所有与以下相关的病症、病症和疾病：1) 脑中 β 淀粉样蛋白斑的发展，2) A β 异常形式的合成，3) A β 独特毒性形式的形成，或 4) 异常的 A β 合成速率、降解速率或清除速率。已知或推测如阿尔茨海默氏病、唐氏综合症、脑淀粉样血管病、某些血管性痴呆和轻度认知缺损的病症和疾病与 A β 具有这样的关系。

[0033] 本发明提供包含在第 13-28 位氨基酸间特异结合 A β 肽的抗体片段的分子，其中所述抗体片段共价结合到 PEG 分子上。该抗体片段优选为人源化抗体片段，如 Fab 片段和 / 或 scFv 片段。最优选地，该抗体片段为 Fab 片段。本发明的分子特异结合 A β 肽允许所述分子待用于治疗与 A β 肽相关的疾病和病症，即从抑制 A β 肽的生物活性中受益的病症、疾病或病症。

[0034] 在本发明的一个实施方案中，抗体片段具有重链可变区和轻链可变区，其中轻链可变区包含具有以下氨基酸序列的 CDR 区：CDRL1：SSSQSLIYSDGNAYLH (SEQ ID NO:6)、CDRL2：KVSNRFS (SEQ ID NO:7) 和 CDRL3：TQSTHSPWT (SEQ ID NO:8)，和 / 或其中重链可变区包含具有以下氨基酸序列的 CDR 区：CDRH1：GYTFSRYSMS (SEQ ID NO:9)、CDRH2：QINIRGCNTYYPDTVKG (SEQ ID NO:10) 或 QINIRGNNTYYPDTVKG (SEQ ID NO:11)，和 CDRH3：GDF (SEQ ID NO:12)。优选地，本发明抗体片段的六个 CDR 共同存在。包含本发明 CDR 的组合物通常为抗体重链或轻链序列或其基本部分，其中 CDR 位于与 Kabat 编号一致的位置上。在框架区内提供由以下化学式呈现的作为连续序列的每条重链和轻链的三个 CDR 区：FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。当以有序状态与 CDR 排列为连续序列时，重链或轻链 FR1、FR2、FR3 和 FR4 结合形成抗体片段的完整框架区。优选地，本发明抗体的框架区为人起源或基本为人起源（即超过约 80、82、85、87、90、92、95、97%）。

[0035] 优选地，本发明的抗体片段包含 LCVR 和 HCVR，

[0036] 所述 LCVR 包含以下序列的肽：

[0037] DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCSSSSQSLIYSDGNAYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEADVGVYYCTQSTHSPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:1)，

[0038] 所述 HCVR 包含具有选自以下序列的序列的肽：

[0039] EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGYTFSRYSMSWVRQAPGKGLEWVGQINIRGCNTYYPDTVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTGDFWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:2)

[0040] EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGYTFSRYSMSWVRQAPGKGLEWVGQINIRGNNTYYPDTVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTGDFWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:3)；

[0041] 或者，抗体片段包含 LCVR (包含具有由 SEQ ID NO:1 组成的序列的肽) 和 HCVR (包含具有选自 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的序列的肽)，其中所述 HCVR 和 LCVR 共同存在于抗体片段中。本领域技术人员将理解本发明的抗体片段不局限于 HCVR 和 LCVR 的特异性序列，而且还包括这些序列的变体，所述变体当在本发明的分子中存在时，其保持或改善抗原结合能力和亲本抗体的至少一种其他功能特性，例如表位特异性、与亲本抗体竞争结合 A β 肽的能力、结合 A β 肽的 IC₅₀ 和 / 或 K_D 或 k_{off} 值。

[0042] 在本发明的另一实施方案中，所有可变区或部分可变区受限于由 SEQ ID NO:1 显示的特殊 LCVR 序列和在 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 中显示的 HCVR，并且进一步的特征在

于其在体内或体外拮抗或中和至少一种 A β 肽活性。本发明抗体进一步的特征在于其特异结合人 A β 肽但不结合人 APP, 所述抗体中所有可变区或部分可变区受限于由此处的 LCVR SEQ ID NO:1, 和 HCVR SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 中显示的特殊序列。

[0043] 在本发明的一个方面中, PEG (或其衍生物) 共价结合抗体片段的一个或多个赖氨酸、半胱氨酸或非天然修饰的氨基酸残基。优选地, PEG 分子共价结合抗体片段的重链可变区或轻链可变区。更优选地, 此类分子具有共价结合到抗体片段重链可变区的 CDR 上的 PEG 分子。最优选地, 此类分子具有共价结合重链可变区 SEQ ID NO:2 的第 56 位氨基酸处的半胱氨酸的 PEG 分子。或者, PEG 分子可经针对抗体片段绞链区的接头或间隔分子结合到抗 A β 肽 Fab 抗体片段上。

[0044] 在本发明的另一方面中, PEG 分子共价结合本发明抗体的一个或多个改造的赖氨酸、半胱氨酸或非天然修饰的氨基酸残基, 以取代抗体分子上存在的糖基化而不显著影响抗体片段对 A β 的亲力和选择性。优选地, PEG 分子在抗体片段的重链可变区或轻链可变区上取代糖基化信号。更优选地, PEG 分子在抗体片段重链可变区的 CDR 上取代糖基化信号。最优选地, PEG 分子在重链可变区 SEQ ID NO:2 的第 56 位处取代糖基化信号。

[0045] 在本发明中共价结合到抗体上的 PEG 分子不旨在局限于特定的类型或大小。PEG 分子量优选从约 0.5kD 至约 100kD, 更优选地从约 0.5kD 至约 30kD, 最优选地从约 1kD 到约 20kD。或者 PEG 分子量可选自约 0.5kD、约 1kD、约 5kD、约 10kD 和约 20kD。PEG 可为线性的或分支的, 且本发明的聚乙二醇化的抗 A β 肽抗体可具多于一个结合到肽上的 PEG 分子。优选地, 每一聚乙二醇化的抗 A β 肽抗体具有一个 PEG 分子。

[0046] 更优选地, 本发明的抗体分子包含具有轻链可变区 SEQ ID NO:1 和重链可变区 SEQ ID NO:2 的抗体片段, 其中所述抗体片段在重链可变区 SEQ ID NO:2 的第 56 位处共价结合到 20kD 的 PEG 分子上。

[0047] 本发明抗体结合的抗原性 A β 肽表位是包含氨基酸 HHQKL VFFAEDVGSNK (SEQ ID NO:4) 的线性、非线性或构象表位。结合所述表位的抗体与它们结合的 APP 相比特异且优先结合 A β 肽。本发明的单克隆抗体结合 A β 肽比它结合人 APP 高出至少 2、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90 或 100 倍 (例如更高亲和力或更高特异性); 更优选地比它结合 APP 高出至少 150、200、250、300、350、400、450、500、550 或 600 倍, 甚至更优选地它在高于如 ELISA 试验、竞争性 ELISA 试验或 Biacore 或 KinExA 试验中的 K_D 值测定的背景水平的水平上不结合 APP。

[0048] 本发明的抗体片段结合氨基酸 HQKL VFFAEDVGSNK (SEQ ID NO:5) 间的表位比不包含氨基酸 HQKL VFFAEDVGSNK (SEQ ID NO:5) 的表位高出至少 2、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90 或 100 倍 (例如更高亲和力或更高特异性)。更优选地, 比不包含氨基酸 HQKL VFFAEDVGSNK (SEQ ID NO:5) 的表位高出至少 150、200、250、300、350、400、450、500、550 或 600 倍, 甚至更优选地它在高于如 ELISA 试验、竞争性 ELISA 试验测定的背景水平的水平上, 或 Biacore 或 KinExA 试验中的 K_D 值不结合不包含氨基酸 HQKL VFFAEDVGSNK (SEQ ID NO:5) 的表位。

[0049] 在优选的实施方案中, 本发明提供抗体片段, 所述抗体片段对 A β 肽具有强亲和力, 即结合 A β 肽或其包含序列 HQKL VFFAEDVGSNK (SEQ ID NO:5) 的部分 [即与 HQKL VFFAEDVGSNK 多肽接触的抗体], 具有通过 KinExA 方法测定的对人 A β 肽低于约

200pM、100pM、50pM、40pM 或 30pM,优选地为低于 20pM 的结合亲和力(K_D)。或者,对人 A β 肽的结合亲和力(K_D)介于 0.1pM-200pM 之间。可按下文实施例中或本领域可得的其他方法中描述的测定抗体亲和力。

[0050] 本发明抗体的给药途径可为口服、肠胃外、通过吸入或局部。优选地,本发明抗体可整合入适合肠胃外给药的药物组合物中。如此处所用的术语肠胃外包括静脉内、肌内、皮下、直肠、阴道、腹膜内施用。优选通过静脉内或腹膜内或皮下注射的外周全身给药。更优选地,本发明抗体的给药途径是经皮下注射。用于此类注射的合适载体在本领域是显而易见的。

[0051] 本发明的抗体片段在血浆中较相应的抗 A β 肽全长抗体具有更短的半衰期,且较相应的抗 A β 肽全长抗体能更快地被从血浆中清除。或者,本发明的抗体较相应的非共价结合 PEG 分子的抗 A β 肽 Fab 片段具有更长的血浆半衰期,且较相应的非共价结合 PEG 分子的抗 A β 肽 Fab 片段能更慢地被从血浆中清除(实施例 1、2 和 3)。参考如此处所用的抗体的术语“相应的”指具有相同 LCVR 和 HCVR 的抗体。例如,参考具有 SEQ ID NO:1 的 LCVR 和由 SEQ ID NO:2 组成的 HCVR 的抗体 Fab 片段的相应全长抗体将具有相同的 SEQ ID NO:1 的 LCVR 和由 SEQ ID NO:2 组成的 HCVR,及完整的 Fc 结构域。

[0052] 在另一方面,本发明涉及当表达时编码抗体的重组多核苷酸包含 SEQ ID NO:1 的 LCVR 和由 SEQ ID NO:2 组成的 HCVR。由于密码子简并性,其他多核苷酸序列可容易被取代成这些序列。本发明特别优选的多核苷酸编码当表达时包含 SEQ ID NO:6-8 的轻链 CDR,和 SEQ ID NO:9、10 或 11 和 12 的重链 CDR,或 SEQ ID NO:1 - SEQ ID NO:3 的任何可变区的抗体。编码 SEQ ID NO:1 的 LCVR 和 SEQ ID NO:2 的 HCVR 的多核苷酸序列的实例分别示于 SEQ ID NO:13 (LCVR) 和 SEQ ID NO:14 (HCVR) 中。

[0053] 多核苷酸通常还将包括有效连接到人源化免疫球蛋白编码序列上的表达控制多核苷酸,其包含天然结合的或异源的启动子区。优选地,表达控制序列将为在能够转化或转染真核细胞的载体中的真核启动子系统,但也 可使用用于原核细胞的控制序列。一旦将载体整合进合适的宿主细胞系中,宿主细胞在适合表达核苷酸序列的条件下繁殖,并且如期望的,可接着收集和纯化轻链、重链、轻 / 重链二聚体或完整抗体、结合片段或其他免疫球蛋白形式。

[0054] 可使用多种众所周知的技术从多种不同多核苷酸(基因组寡核苷酸或 cDNA、RNA、合成寡核苷酸等)和组分(例如 V、J、D 和 C 区)形成能够最终表达所期望抗体或抗体片段的本发明的核酸序列。将合适的基因组序列和合成序列连接起来是制备的常用方法,但也可利用 cDNA 序列。

[0055] 可根据众所周知的方法从多种人细胞中分离人恒定区 DNA 序列,但优选从不凋亡的 B 细胞中分离。可从本领域众所周知的多种来源中获得用于多核苷酸序列的合适的来源细胞和用于免疫球蛋白表达和分泌的宿主细胞。

[0056] 除此处特别描述的人源化抗体或抗体片段外,可利用对本领域技术人员熟知的多种重组 DNA 技术容易地设计并制备其他“基本同源的”修饰后抗体。例如,框架区可通过几个氨基酸替代、末端和中部添加和缺失等而在一级结构水平上与天然序列不同。此外,多种不同的人框架区可单独或组合用作与本发明人源化抗体的基础。通常,可通过多种众所周知的技术如定向诱变来容易地完成基因修饰。

[0057] 如前文陈述,当序列已有效连接到(即定位以确保功能)表达控制序列之后多核苷酸将在宿主中进行表达。这些表达载体通常作为游离基因或作为宿主染色体 DNA 的整合部分在宿主细胞中复制。通常,表达载体将包含选择标记,例如四环素或新霉素以允许检测那些转化有所期望 DNA 序列的宿主细胞。这些细胞的表达载体可包括表达控制序列,如复制起始区、启动子、增强子和必需的加工信息位点例如核糖体结合位点、RNA 剪切位点、多腺苷酸化位点和转录终止序列。优选的表达控制序列是来自免疫球蛋白基因、SV40、腺病毒、牛乳头状瘤病毒、巨细胞病毒等的启动子。

[0058] 可通过众所周知的方法(其根据细胞类型而有所不同)将包含目的多核苷酸序列(例如重链和轻链编码序列和表达控制序列)的载体转入宿主细胞。可使用本领域周知的技术将多种宿主用于表达本发明的抗体。优选的细胞系包括 COS、CHO、SP2/0、NS0 (可从如公共保藏处 ATCC,美国典型培养物保藏中心 Manassas,VA 获得)和酵母细胞系。优选地,本发明的宿主细胞包含一种或多种包含本发明核酸分子的载体或构建体。本发明的宿主细胞是已引入本发明载体的细胞,所述载体包含编码本发明的 LCVR 的多核苷酸和/或编码本发明的 HCVR 的多核苷酸。本发明也提供已引入本发明的两个载体的宿主细胞;一个载体包含编码本发明抗体的 LCVR 的多核苷酸,一个载体包含编码存在于本发明抗体中的 HCVR 的多核苷酸,并且每一载体有效连接启动子序列。细胞类型包括哺乳动物细胞、细菌细胞、植物细胞和酵母细胞。优选地,细胞为 CHO 细胞、COS 细胞、SP2/0 细胞、NS0 细胞、酵母细胞或任何优选细胞类型的衍生物或后代。

[0059] 本发明的完整抗体、其二聚体、各个轻链和重链、或其他免疫球蛋白形式一旦表达,可根据本领域的标准方法对其进行纯化,所述方法包括硫酸铵沉淀、离子交换、亲和、反相、疏水性相互作用柱层析、凝胶电泳等。对药物使用而言,优选基本上至少约 90%、92%、94% 或 96% 同质性的基本纯免疫球蛋白,且最优选 98% 至 99% 或更高同质性的基本纯免疫球蛋白。肽一旦被部分纯化或纯化达到所期望的同质性,就可如此处所示在治疗上或预防上使用。

[0060] 导致认知缺陷、中风、脑溢血和一般性精神衰弱的许多症状似乎与含 A β 肽的脑中神经炎和脑血管斑相关。这些病症为临床前和临床阿尔茨海默氏病、唐氏综合症、和临床前和临床淀粉样血管病(CAA)。淀粉样蛋白斑形成自 A β 肽。这些肽通常以与脂蛋白的复合形式在血液和脑脊液(CSF)中循环。循环形式的 A β 肽由从常见前体蛋白质,常命名为 APP 的淀粉样前体蛋白质剪切获得的 39-43 个氨基酸(主要为 40 或 42 个氨基酸)组成。可溶性 AP 的一些形式自身具有神经毒性且可决定神经变性和/或认知衰退的严重性(McLean, C. A., 等, Ann. Neurol. (1999) 46:860-866; Lambert, M. P., 等 (1998) 95:6448-6453; Naslund, J., J. Am. Med. Assoc. (2000) 283:1571)。

[0061] 因此,包含本发明分子的药物组合物可用于治疗或预防这样的病症,其中 A β 肽的存在引起或促进不期望的病理学效果或 A β 肽活性的降低在哺乳动物优选人中具有治疗益处,所述病症包括但不限于临床或临床前阿尔茨海默氏病、唐氏综合症、临床或临床前淀粉样蛋白血管病(CAA)、前驱阿尔茨海默氏病、轻度认知缺损(MCI)和认知缺陷、中风、脑溢血和一般性精神衰弱,所述病症似乎与含 A β 肽的脑中神经炎和脑血管斑相关。此处涵盖本发明的分子用于治疗或预防至少一种上述病症(其中 A β 肽活性是有害的或其从生物活性 A β 肽水平降低中受益)的用途。此外,涵盖本发明分子用于制备治疗至少一种上述病

症的药物中的用途。

[0062] 如此处所用,术语“治疗(treatment)”、“治疗(treating)”等指获得所期望的药理学和/或生理学效果。所述效果可以是对疾病和/或归属于疾病发展的不利作用的部分治疗或完全治疗。如此处所用,“治疗(treatment)”包括尤其是向人施用化合物,且包括:(a)抑制疾病,即停滞其发展;或(b)缓解疾病,即导致疾病或病症的复原或缓和其症状或并发症。可调整给药方案来提供最佳的期望应答(例如,治疗或预防应答)。例如,可快速浓注施用,可在一段时间内施用几份分次剂量或根据治疗情况的紧急程度所示按比例减少或增加剂量。

[0063] 可将本发明分子掺入适合于向受试者施用的药物组合物中。本发明分子可按一次剂量或多剂量单独施用或与可药用载体、稀释剂和/或赋形剂组合施用。设计用于施用的药物组合物以适合选定的施用方式,并在适当时使用可药用稀释剂、载体和/或赋形剂如分散剂、缓冲液、表面活性剂、防腐剂、增溶剂、等渗剂、稳定剂等(例如见此处的实施例14)。按照例如 Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 第19版, Gennaro 编著, Mack Publishing Co., Easton, PA1995中的常规技术设计所述组合物,所述文献提供了从业者公知的制备技术一览表。

[0064] 可使用包括口服、静脉内、腹膜内、皮下、肺部、透皮、肌内、鼻内、口腔、舌下或栓剂施用在内的标准施用技术向具有如此处所述病理学风险或出现如此处所述病理学的受试者施用包含本发明分子的药物组合物。优选地,可通过皮下施用向具有如此处所述病理学风险或出现如此处所述病理学的受试者施用本发明的分子。

[0065] 本发明的药物组合物优选为“治疗有效量”或“预防有效量”的本发明分子。“治疗有效量”指在剂量和必需的时间周期上获得所期望治疗结果的有效量。分子的治疗有效量可根据如个体的疾病病症、年龄、性别和体重等因素以及分子在个体中诱导所期望应答的能力而有所变化。治疗有效量还是其中治疗有益作用大于分子的任何毒害作用或不利作用的量。“预防有效量”指在剂量和必需的时间周期上获得所期望的预防结果的有效量。通常,由于在受试者患病之前或早期使用预防剂量,预防有效量将少于治疗有效量。

[0066] 治疗有效量或预防有效量是必需给予受试者治疗益处的活性物质的至少最小剂量但低于中毒剂量。换言之,治疗有效量的本发明分子在哺乳动物优选为人中降低A β 肽活性(例如结合A β 肽)的量,其中A β 肽的存在引起或促进不想要的病理效应或A β 肽的降低在哺乳动物优选人中引起有益的疗效。

[0067] 本发明分子的给药途径可以是口服、肠胃外、通过吸入、或局部给药。优选地,可将本发明的抗体掺入到适合肠胃外给药的药物组合物中。如此处所用的术语肠胃外包括静脉内、肌内、皮下、直肠、阴道、或腹膜内施用。优选通过静脉内或腹膜内或皮下注射的外周全身给药。最优选皮下注射。用于此类注射的合适载体在本领域中是显而易见的。

[0068] 药物组合物通常必须为无菌且在生产和所提供的容器(例如包括密封的管或注射器)中贮存的条件是稳定的。因此,药物组合物可在制成后进行无菌过滤,或另在微生物(方面)上制成可接受的。静脉输注的典型组合物可以具有多达250-1000ml液体的体积(例如无菌的林格氏溶液、生理盐水、葡萄糖溶液和Hank's溶液)和治疗有效剂量(例如1至100mg/ml或更多)的治疗剂,以递送下文列出的典型剂量。剂量可基于疾病的类型和严重性而变化。如在医学领域众所周知的,用于任何一名受试者的剂量取决于许多因素,所述

因素包括患者的大小、体表面积、年龄、待施用的特定化合物、性别、给药时间和途径、一般健康和同时施用的其他药物。例如,典型剂量可在 0.001 至 1000mg 范围内;然而,特别是考虑到上文提到的因素时,可考虑低于或高于该示例性范围的剂量。每日肠胃外剂量方案可以为每天从约 0.1mg/kg 至约 100mg/kg 总体重,优选为从约 0.3mg/kg 至约 10mg/kg 且更优选为从约 1mg/kg 至 1mg/kg,甚至更优选为从约 0.5 至 10mg/kg 体重。可通过周期评估来监测进程。对于在几天或更长时间的重复施用,根据情况重复治疗直至产生期望的疾病症状的抑制。然而,其他剂量方案也是有用的,并不由此未排除在外。根据从业人员希望获得的药物代谢动力学衰减模式(pattern of pharmacokinetic decay),可通过分子的单次快速浓注施用、多次浓注施用或连续输注施用来递送所期望的剂量。

[0069] 本发明分子的这些建议用量受许多治疗上的考虑。选择合适剂量和时间安排上的关键因素是所获得的结果。在该上下文中考虑的因素包括治疗的具体病症、治疗的具体哺乳动物、个别患者的临床情况、病症的原因、抗体递送位点、抗体的具体类型、施用方法、施用时间安排和医疗从业人员公知的其他因素。

[0070] 本发明的治疗剂可冷冻或冻干用于贮存并且在使用之前在合适的无菌载体中重构。冻干和重构可能会导致抗体活性不同程度的损失。可能需要调整剂量来补偿。

[0071] 以下实施例旨在说明而非不限制本发明。下文的实施例使用命名为“266”(m266)的鼠类单克隆抗体(其最初通过用人 A β 肽第 13-28 位残基组成的肽免疫制备)和命名为 266 (m266-Fab)的鼠类单克隆抗体的 Fab 片段。确认抗体与该肽可以进行免疫反应。前面已经描述过 m266 的制备。为将 PEG 分子共价结合到 m266-Fab 上,可在重链可变的 CDR2 (N56C) 中引入半胱氨酸残基将 Fab 突变且以下文显示的方式将其聚乙二醇化(实施例 4)。如此处实施例描述在鼠类系统中进行的实验,鼠类单克隆抗体的使用是令人满意的。然而,在旨在用于人的本发明的治疗方法中,优选本发明抗体的人源化形式或其片段。在下文的实施例中涉及的 1A1-Fab 是包含 SEQ ID NO:1 的 LCVR 和 SEQ ID NO:2 的 HCVR 的人源化抗体 Fab 片段。

[0072] 实施例 1

[0073] PDAPP 小鼠中 m266-Fab PEG 皮下 PK/PD 研究

[0074] 使用幼小的(3 个月大)转基因 PDAPP 小鼠以研究抗体和抗体-A β 复合体的药物代谢动力学/药物动力学血浆反应。研究了几种抗体,包括小鼠 Fab(m266-Fab)、m266-Fab+5KD PEG、m266-Fab+10KD PEG、m266-Fab+20KD PEG 和完整的全长 m266IgG 抗体。用 1mg/kg 的抗体通过皮下注射 PDAPP+/- 小鼠,随后在以下时间点分离血浆:服药后 1、4、8、24、48、96、168 和 240 小时。由于这部分的快速翻转,所以在额外早的时间点对接受 m266-Fab 抗体的动物进行分析。用于 m266-Fab 的时间点如下:服药后 1、4、8、12、16、24 和 48 小时。在每个时间点对每种抗体分析了总共 5 只动物。通过用连接到 1CC 注射器上的 23 号针头进行心脏穿刺获得全血,所述 1CC 注射器先前已经用 0.5M EDTA 冲洗过。在分离过程中将血样在冰上进行温育,并随后在 4℃,冷冻微量离心机中以 14,000 转/分钟离心 15 分钟。将所得血浆样品等分并储存在 -80℃。

[0075] A. 用于 Fab PK 分析的方法学

[0076] 使用抗原捕获 ELISA 测定血浆 Fab 的浓度。简言之,在 4℃用 A β -BSA 缀合物过夜包被平板或在 37℃包被 1 小时,然后用 Pierce 酪蛋白缓冲液进行封闭。向平板中加入标准

样品、对照样品和研究样品,然后在室温下温育 1 小时。山羊抗小鼠 HRP 用于检测并用 OPD 底物对比色反应进行显色。平板在 A493 的吸光度处进行读数,参考 A700。从标准曲线测定来自血浆样品的免疫反应性的浓度,使用 4/5- 参数算法从小鼠血浆中 m266Fab 的已知量制备所述标准曲线。m266Fab 的测定范围是 0.05 到 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 。聚乙二醇化的 Fab 的范围是 0.075 到 0.8 $\mu\text{g/mL}$ 。

[0077] 从标准曲线测定来自血浆样品的免疫反应性的浓度,使用 4/5- 参数算法从小鼠血浆中 m266Fab 的已知量制备所述标准曲线。266Fab 的测定范围是 0.05 到 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 。聚乙二醇化 Fab 的范围是 0.075 到 0.8 $\mu\text{g/mL}$ 。结果清晰地证实,添加 PEG 分子并增加 PEG 分子的大小提高了聚乙二醇化 Fab 相比于非聚乙二醇化 m266-Fab (8 小时后为 350ng/ml) 在血浆中的停滞(对 20K 聚乙二醇化 m266-Fab 而言,8 小时后为 2545ng/ml)。

[0078] B. m266A β ELISA 测定

[0079] 为了测定在不存在或存在治疗抗体(全长或 Fab 片段)的情况下血浆 A β 的量,发展并使用了 ELISA 测定。在这些测定法中测定的 A β 肽是全长 A β 1-40 或 A β 1-42。用 PBS 中 10 $\mu\text{g/mL}$ (每孔 100 μL) 的 C 端捕获抗体 (对 A β 40 平板而言为 m2G3 或对 A β 42 平板而言为 m21F12) 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜包被 96 孔 Immulon4HBX96 孔 ELISA 板 (ThermoLabsystems)。在过夜温育过程中将测试平板密封以防止蒸发。第二天,去除孔内溶液并用 Labsystems96- 孔板洗涤器用 PBS(每孔 400 μL) 将孔洗涤 3 次。加入封闭缓冲液(360 μL 的 1% 牛奶 -PBS) 并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育平板 1 小时。通过稀释血浆将样品制备成样品稀释液,以产生以下:20% 血浆、0.5M 胍、5mM Tris pH8.0、0.5X 蛋白酶抑制剂混合物、25 $\mu\text{g/mL}$ m266 和 PBS。因存在高水平的 A β 肽,所以在某些时间点上可能需要减少用于测定的血浆体积,并且在这些情况下,用大鼠血浆调整剩余的血浆体积(最终百分比体积维持在 20%)。在标准稀释液(20% 大鼠血浆、0.5M 胍、5mM Tris pH8.0 和完全无 EDTA 的 0.5X 蛋白酶抑制剂混合物 (Roche Diagnostics)、25 $\mu\text{g/mL}$ m266 和 PBS) 中产生浓度在 250pg/mL 到 3.9pg/mL 之间变化的 A β 标准物。需要在样品和标准稀释液中掺入 25 $\mu\text{g/mL}$ 的完整 m266,以中和测定中不同水平的中心结构域抗体可能产生的任何负干扰。封闭后,用 PBS 洗涤平板 4 次。一式三份来装载样品和标准物(每孔 100 μL),封闭平板并在 4 $^{\circ}\text{C}$ 温育过夜。第二天早晨,用 PBS-T (PBS+0.05%Tween-20) 洗涤平板 4 次,并在室温下将孔与生物素化的第二抗体 m3D6 (在 0.5%BSA/PBS-T 中稀释的每孔 100 μL) 温育 2 小时。用 PBS-T 洗涤平板 4 次后,它们与链霉抗生物素蛋白-多聚 HRP (在 0.5%BSA/PBS-T 中为 1:5000) 在室温下温育 1.5 小时。用 PBS-T 洗涤平板 4 次并每孔加入 100 μL 的 TMB(Sigma) 底物。在 15、30 和 60 分钟,650nm 处监测比色反应的进行。

[0080] 表 1. 药物动力学结果:用于 A β 40 (pg/mL) 的平均血浆浓度

[0081]

时 间 (h)	m266 Fab	m266 Fab + 5KD PEG	m266 Fab + 10KD PEG	m266 Fab + 20KD PEG	完 整 m266
1	246.7	253.5	178.4	196.3	223.7
4	498.8	693.2	898.1	816.6	1110
8	576.7	997.8	1011	1259	1852
12	530.9				
18	344.1				
24	181.2	914.7	1728	2966	6919
48		200.1	789.6	2642	8557
96		79.1	104.8	329.3	10792
168		62.64	76.49	143.3	9923
240		50.14	98.24	101.2	6114

[0082] 除了可在 PEG 大小基础上进行调整的更灵活的给药方案外,该结果证实聚乙二醇化 Fab 抗原复合体不像完整抗体(完整的 m266)一样可在血浆循环中延时积累。完整抗体延长了血浆中抗体的半衰期并导致抗原:抗体复合体在血浆循环中延时存在(>240 小时)。另一方面,天然 Fab(m266Fab) 具有限制它们用于治疗得快清除率和短半衰期(<24 小时)。相反,如表 1 中证实,所述聚乙二醇化 Fab 提供具有允许改善给药方案的药物代谢动力学和药物动力学的抗体分子。

[0083] 实施例 2

[0084] PDAPP 小鼠中 1A1-Fab PEG 皮下 PK/PD 研究

[0085] 在幼小的(3 个月大)转基因 PDAPP 小鼠中进行研究,以研究抗体和抗体-AB 复合体的药物代谢动力学/药物动力学血浆反应。研究了几种抗体,包括人源化的 1A1-Fab、1A1-Fab+5KD PEG、1A1-Fab+10KD PEG 和 1A1-Fab+20KD PEG。用 1mg/kg 的抗体通过皮下注射 PDAPP+/- 小鼠,随后根据抗体注射组在不同的时间点分离血浆。以下时间点用于不同抗体:

[0086] 服药后 1、4、8、12、24 和 48 小时对 1A1-Fab 放血

[0087] 服药后 1、4、8、24、48、96 和 168 小时对 1A1-Fab+5KD PEG 放血

[0088] 服药后 1、4、8、24、48、96 和 168 小时对 1A1-Fab+10KD PEG 放血

[0089] 服药后 1、8、24、48、96、168 和 240 小时对 1A1-Fab+20KD PEG 放血

[0090] 在每个时间点上对每种抗体分析总共 5 只动物。将所得血浆样品等分并储存在 -80℃。

[0091] A. 用于 Fab PK 分析的方法学

[0092] 对 1A1Fab 而言,使用夹层 ELISA 测定血浆 1A1Fab 的浓度。用山羊抗人 IgG κ 包被平板,向平板中加入标准物、对照样品和研究样品,然后在室温下温育 1 小时。山羊抗人 IgG 用于检测,随后使用 OPD 用于比色反应。平板在 A493 的吸光度处读数,参考 A700。

[0093] 从标准曲线测定来自血浆样品的浓度,使用 4/5- 参数算法从小鼠血浆中 1A1Fab 的已知量制备所述标准曲线;用于 Fab 和 Fab-5K PEG 测定的范围为 0.003 到 0.3 μg/mL;

用于 Fab-10K PEG 测定的范围为 0.006 到 0.2 及 0.04 到 0.4 $\mu\text{g/mL}$; 用于 Fab20K PEG 测定的范围为 0.02-0.4 和 0.04-0.4 $\mu\text{g/mL}$ 。结果清晰地证实, 添加 PEG 分子并增加 PEG 分子的大小提高了聚乙二醇化 Fab 相比于非聚乙二醇化 1A1Fab (24 小时后检测不到) 在血浆中的停滞 (对 20K 聚乙二醇化 1A1Fab 而言, 96 小时后为 77ng/ml)。

[0094] B. 1A1A β ELISA 测定

[0095] ELISA 与如上对 m266 所述的基本上相同。通过稀释血浆将样品制备成样品稀释液, 以产生以下: 20% 血浆、0.5M 胍、5mM Tris pH8.0、0.5X 蛋白酶抑制剂混合物、20 $\mu\text{g/mL}$ 1A1 和 PBS。在这些测定法中测定的 A β 肽为全长 A β 1-40 或 A β 1-42。在 15、30 和 60 分钟, 650nm 处监测比色反应的进行。结果呈现于下文表 2 中。

[0096] 表 2. 药物动力学结果: 用于 A β 40 (pg/ml) 的平均血浆浓度

[0097]

时间 (h)	1A1 Fab	1A1 Fab + 5KD PEG	1A1 Fab + 10KD PEG	1A1 Fab + 20KD PEG
1	136.8	117.1	116.3	111.2
4	153.6	208.2	281.6	
8	96.65	198.4	406.3	529.2
12	131.9			
18	105.9			
24	114.7	133.6	585.1	1243
48	106.8	95.12	170.7	642
96		88.48	113.7	177.9
168		93.96	110.8	125.4
240				200

[0098] 以实施例 1 中与 m266Fab 相似的方式, 来自表 2 的数据证实, 共价结合 PEG 分子的人源化 Fab 也提供允许灵活的给药方案同时防止抗体-抗原复合体在血浆循环中延时积累的理想 PK/PD 谱。

[0099] 实施例 3

[0100] 鼠类 266 和人源化 1A1Fab 类似物的纯化

[0101] 使用两步层析法策略纯化来自转染有小鼠 266Fab 或人源化 1A1Fab 及类似物的细胞的培养上清, 所述两步层析法策略由阳离子交换层析后接使用 Superdex75 树脂 (GE Healthcare) 的大小排阻层析组成。收集后, 使用 TFF 浓缩培养上清并在 4°C 对 20 倍过量体积的 10mM 醋酸钠 (pH5) 进行透析过夜。通过离心去除沉淀物并将上清装载到充满 10mM 醋酸钠 (pH5) 的 SP 琼脂糖 (GE Healthcare) 填充床上。继续用含有更大量 NaCl 的 10mM 醋酸钠 (pH5) 洗涤柱子, 直至在大约 90 到 110mM NaCl 处洗脱 Fab 片段。鉴定并收集含有活性 Fab 的柱级分。使用离心浓缩装置 (Millipore) 减少体积并交换缓冲液 (PBS)。将终体积调整到 13ml 并装载到 Superdex75 分筛柱 (sizing column) 上。鉴定并收集含在大约 50kD 洗脱馏分的 Fab 用于进一步的表征和聚乙二醇化。

[0102] 实施例 4

[0103] 体外聚乙二醇化和表征

[0104] 封闭从细胞培养物纯化的 1A1-Fab 上的 N56C 半胱氨酸用于聚乙二醇化。使用 Pierce's Reduce-Imm™ 固定还原性小珠来选择性还原 N56C 半胱氨酸。从生产商提供的柱子中提取还原性小珠并以分批方式使用。首先用 Reduce-Imm 平衡缓冲液 #1 (磷酸钠 + EDTA, pH8.0) 中的 8ml 10mM DTT 激活 ~ 4ml 小珠 30 分钟。然后用 PBS 洗涤所述小珠 3 次。向小珠中加入 PBS pH7.4 中 1.7mg/ml 的 18ml 1A1N56C Fab 并向混合物中加入 10mM EDTA。在室温下旋转并温育所述混合物 4-5 小时。使用 Handee™ 树脂分离剂从小珠中分离 Fab 并用 PBS 洗涤小珠。将 Fab 与洗涤物组合, 并与 5 倍摩尔过量的 PEG- 马来酰亚胺 (来自 NOF 的 20kPEG ; 来自 Sunbio 的 10kPEG ; 来自 Nektar 的 5kPEG) 反应 1 小时。反应混合物对 4L 10mM 醋酸钠缓冲液 pH5.0 进行透析, 使得可在用 10mM 醋酸钠缓冲液 (pH5.0) 平衡的 SP 琼脂糖柱上捕获 Fab 和 Fab-PEG。用盐梯度洗脱未反应的 Fab 和 Fab-PEG。它们在 50mM 到 70mM NaCl 之间被洗脱。利用 PBS 作为流动相通过大小排阻层析 (Superdex75 柱, GE Healthcare) 进一步纯化蛋白质。还原反应可扩大和缩小。类似方法可用于制备聚乙二醇化的鼠类 266Fab N56C。

[0105] 利用大小排阻层析分析样品, 以确定向 Fab 中添加 PEG。用 TSK G3000PW XL (Tosoh Bioscience) 柱进行大小排阻层析法。该柱使用在 214nm 操作的 Agilent HP1100 系列分析 HPLC, 利用 PBS 加 0.35M NaCl (pH7.4) 以 0.5ml/ 分钟运行。此外, 用 SDS-PAGE 分析样品。10 μ g 纯化的材料装载到 4-12% NuPage® Bis-Tris 凝胶上并用 SimplyBlue™ SafeStain 染色。

[0106] 实施例 5

[0107] 用 Biacore 测定动力学常数

[0108] **Biacore®** 2000 仪器也用于测定结合动力学。**Biacore®** 利用表面等离子 共振的光学特性来检测葡聚糖生物传感器基质内相互作用分子的蛋白质浓度的变化。除了如指出的, 所有试剂和材料均购买于 **Biacore®** AB (Uppsala, Sweden)。所有测量均在 25°C 进行。样品溶解在 HBS-EP 缓冲液 (150mM 氯化钠, 3mM EDTA, 0.005% (w/v) 表面活性剂 P-20 和 10mM HEPES, pH7.4) 中。使用胺偶联试剂盒, 以 8000 反应单位 (Ru) 的水平将山羊抗人 κ 抗体固定在 CM5 传感器芯片的流动细胞 1 到 4 上。

[0109] 使用多轮分析循环来评估结合。每一循环以 50 μ L/ 分钟的流速进行, 并由以下步骤组成: 注射 ~ 20 μ L, 10 μ g/mL 旨在捕获 400-500Ru 的抗体结合组合物, 注射 250 μ L 人 Abeta (1-40) (对每一循环而言, 在 200nM 开始并使用两倍连续稀释), 接着是 20 分钟的分离, 和使用 ~ 30 μ L 10mM 盐酸甘氨酸 pH1.5 再生。使用 BIAevaluation 软件中的 "1:1 (Langmuir) 结合" 模型评估每一循环的结合与分离。结果显示 N56C 位点处的聚乙二醇化对结合人 abeta 的 Fab 的亲合力几乎没有影响。

[0110] 实施例 6

[0111] 用 KinExA 测定平衡常数

[0112] 由于抗原 Fab 复合体的低解离速率, KinExA 分析用作正交方法以通过平衡结合分析测定结合亲和力。KinExA3000 仪器 (Sapidyne Inst. Inc.) 用作测定结合动力学。简言之, 所述抗原共价偶联琼脂糖小珠并在该仪器上检测游离 Fab/Fab-PEG 与小珠的结合。为

了测定 K_d , 含有 Fab/Fab-PEG (对 1A1-Fab-20kPEG 而言为 20pM 或 500pM, 对 1A1Fab 而言为 5pM 或 50pM) 与减少的连续稀释抗原人类可溶性 Abeta(1-40) (0-10nM) 的各管在含有 1mg/ml BSA 的 PBS 中, 于 37℃ 温育 30-50 小时, 以保证平衡的完成。温育后, 根据生产商的说明书在 KinExA3000 上测定各平衡样品中的游离 Fab/Fab-PEG。使用 KinExA3000 软件通过 n 曲线分析测定 K_d 值。结果证实, 1A1Fab 与鼠类 266Fab (240pM) 相比, 以大于 ~10 倍的亲和力紧密结人 abeta (19pM)。此外, N56C 位点处 20K PEG 的共价结合对 1A1-Fab (12pM) 的亲和力没有影响。

[0113] 实施例 7

[0114] 使用基于细胞的 ELISA 的淀粉样蛋白前体蛋白质 (APP) 的结合分析

[0115] 为了评估 266Fab/mAb 与 Abeta 前体蛋白质 APP 的交叉反应性, 使用了稳定表达 APP (氨基酸 1-751) 的 HEK293 细胞。通过将 APP (1-751) 基因克隆进含有新霉素抗性标记的质粒中来产生这些细胞。将重组质粒转染进 HEK293 中, 并以 200 μ g/ml G418 选择细胞, 以产生过表达稳定细胞系。对于结合测定, 75,000 APP751 细胞置于 PDL 包被的 96 孔板的每一个孔中。在生长培养基 (DMEM F12、5%FBS、10mM Hepes pH7.5、200 μ g/ml G418) 中温育 2 天后, 除去液体并在含 10mg/ml BSA 的 PBS (含 Ca/Mg) 中加入 20 μ g/ml 的 Fab 或 mAb。结合在 4℃ 进行 2 小时, 并用 10mg/ml BSA 洗涤细胞 3 次。在 PBS/BSA (Southern Biotech) 中加入对人或小鼠轻链特异的第二抗体 (辣根过氧化物酶 (hrp) 缀合的抗 κ 轻链)。PBS/BSA 中 1:5000 的稀释用于抗人轻链, 1:2000 用于抗小鼠轻链。在 4℃ 温育 1 小时后, 细胞用 PBS/BSA 洗涤 5 次。作为 Fab/mAb 结合 APP 功能的 Hrp 活性通过加入底物 TMD10 分钟进行测定。将反应转移至澄清的 96 孔板并测量 650nm 处的吸光度。数据表明, 聚乙二醇化 (5kD、10kD 和 20kD) 1A1-Fab 和 m266-Fab 赋予 Abeta 肽优于 APP 的选择性。

[0001]

序 列 表

<110> 伊莱利利公司

<120> 聚乙二醇化的 A β FAB

<130> X17087

<150> US 60/885439

<151> 2007-01-18

<160> 14

<170> PatentIn 版本 3.4

<210> 1

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成构建体

<400> 1

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Ser Ser Gln Ser Leu Ile Tyr Ser
20 25 30

Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Thr Gln Ser
85 90 95

Thr His Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 2

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工的

[0002]

<220>

<223> 合成构建体

<400> 2

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Gln Ile Asn Ile Arg Gly Cys Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Thr Gly Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 3

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成构建体

<400> 3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Gln Ile Asn Ile Arg Gly Asn Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

[0003]

	85	90	95
Thr Thr Gly Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
	100	105	110
<210>	4		
<211>	16		
<212>	PRT		
<213>	人 (homo sapiens)		
<400>	4		
His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys			
1	5	10	15
<210>	5		
<211>	15		
<212>	PRT		
<213>	人		
<400>	5		
His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys			
1	5	10	15
<210>	6		
<211>	16		
<212>	PRT		
<213>	人工的		
<220>			
<223>	合成构建体		
<400>	6		
Ser Ser Ser Gln Ser Leu Ile Tyr Ser Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His			
1	5	10	15
<210>	7		
<211>	7		
<212>	PRT		
<213>	人工的		
<220>			
<223>	合成构建体		
<400>	7		
Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser			
1	5		
<210>	8		

[0004]

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成构建体

<400> 8

Thr Gln Ser Thr His Ser Pro Trp Thr

1 5

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成构建体

<400> 9

Gly Tyr Thr Phe Ser Arg Tyr Ser Met Ser

1 5 10

<210> 10

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成构建体

<400> 10

Gln Ile Asn Ile Arg Gly Cys Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys

1 5 10 15

<210> 11

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成构建体

<400> 11

Gln Ile Asn Ile Arg Gly Asn Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys

1 5 10 15

Gly

[0005]

<210> 12
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 12

Gly Asp Phe
 1

<210> 13
 <211> 657
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 13

```

gacatcggtta tgactcagac tccattgtcc ttgtctgtta ctccaggta accagettct 60
atttcctggt cctctccca atctttgate tactccgacg gtaacgtta cttgcactgg 120
tacttgcaaa agcctggta atccccaca ttgttgatct acaaggttc caacagattc 180
tctgggtgtc ctgacagatt ttctggttcc ggttcggta ctgacttcac ttgaagatc 240
tccagagttg aagctgagga tgttgggtt tactactgta ctgagtcac tcattcccca 300
tggacttttg gtggtgttac taaggttag atcaagagaa ctgttgctgc tccatccgtt 360
ttcattttcc caccatccga cgaacaattg aagtcggta ctgcttccgt tgtttgtttg 420
ttgaacaact tctaccaag agaggctaag gttcagtga aggttgacaa cgttttgcaa 480
tccgtaact cccaagaatc cgttacgag caagactcta aggactccac ttactccttg 540
tcttccactt tgactttgtc caagctgat tacgagaagc acaaggttta cgtttgtgag 600
gttacacatc agggtttgtc ctcccagtt actaagtcct tcaacagagg agagtcc 657

```

<210> 14
 <211> 657
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>

[0006]

<223> 合成构建体

<400> 14

gaggttcagt tggttgaatc tggtggtgga ttggttaagc ctggtggttc ttigagattg	60
tectgtgctg ctcccggtta cactttctcc agatactcca tgcctgggt tagacaaget	120
ccaggaaagg gatggagtg ggttggtcaa atcaacatca gaggttgtaa cacttactac	180
ccagacactg ttaagggaag attcactatc tccagagatg actccaagaa cactttgtac	240
ttgcagatga actccttgaa aactgaggac actgctgttt actactgtac tactggtgac	300
ttttggggac agggaaacttt ggttactgtt tctccgctt ctactaagg accatccgtt	360
tttccattgg ctccatctc taagtctact tccggtggtc ctgctgcttt gggatgtttg	420
gttaaggact acttcccaga gccagttact gtttcttga actccggtgc ttgacttct	480
ggtgttcaca ctttcccagc tgttttgcaa tcttccggtt tgtactcctt gtctccgtt	540
gttactgttc catctcttc cttgggtact cagacttaca tctgtaacgt taaccacaag	600
ccatccaaca ctaagggtga caagaaggt gaaccaaagt cctctgacaa gactcac	657