



## (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105348387 B

(45)授权公告日 2020.08.25

(21)申请号 201510802344.9  
(22)申请日 2011.08.12  
(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 105348387 A  
(43)申请公布日 2016.02.24  
(30)优先权数据  
61/373824 2010.08.14 US  
(62)分案原申请数据  
201180045820.7 2011.08.12  
(73)专利权人 ABBVIE 公司  
地址 美国伊利诺伊州  
专利权人 雅培股份有限两合公司  
(72)发明人 S.巴格霍恩 H.希伦  
A.施特里宾格 S.吉艾西  
U.埃伯特 谢仲明  
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公  
司 72001  
代理人 权陆军 徐厚才  
(51)Int.Cl.  
C07K 16/18(2006.01)

C12N 15/13(2006.01)  
A61K 39/395(2006.01)  
A61K 45/00(2006.01)  
A61K 39/39(2006.01)  
A61P 43/00(2006.01)  
A61P 7/10(2006.01)  
A61P 7/02(2006.01)  
A61P 17/04(2006.01)  
A61P 25/00(2006.01)  
A61P 25/20(2006.01)  
A61P 25/14(2006.01)  
A61P 21/00(2006.01)  
A61P 25/28(2006.01)  
A61P 7/06(2006.01)  
A61P 7/04(2006.01)  
A61P 25/16(2006.01)  
A61P 13/08(2006.01)  
A61P 9/00(2006.01)  
A61P 35/00(2006.01)  
A61P 3/10(2006.01)  
审查员 任长辉

权利要求书3页 说明书68页  
序列表27页 附图14页

### (54)发明名称

$\beta$  淀粉样蛋白结合蛋白

### (57)摘要

本发明涉及  $\beta$  淀粉样蛋白(A $\beta$ )结合蛋白。  
本发明的抗体对A $\beta$ (20-42)球聚体或包含球聚体  
表位的任何A $\beta$ 形式具有高亲和力。还提供了本  
发明的抗体的制备方法及其使用方法。

1. 抗β淀粉样蛋白 (Aβ) (20-42) 球聚体抗体, 其包含与选自SEQ ID NOs: 1、3、4、6、7、8、9、10、11、12、13、25、27、29和30的氨基酸序列至少95%相同的重链可变区, 和

与选自SEQ ID NOs: 2、5、14、15、16、26、28、31和32的氨基酸序列至少95%相同的轻链可变区, 其中

(a) 所述重链可变区包含的互补性决定区 (CDR) 1、CDR2和CDR3氨基酸序列分别为SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19, 且所述轻链可变区包含的CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列分别为SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22, 或

(b) 所述重链可变区包含的CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列分别为SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:35, 且所述轻链可变区包含的CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列分别为SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:38。

2. 权利要求1的抗β淀粉样蛋白 (Aβ) (20-42) 球聚体抗体, 其中所述抗体选自: 二硫键合的Fv、单克隆抗体、scFv、嵌合抗体、单结构域抗体、CDR嫁接的抗体、双抗体、人源化抗体、多特异性抗体、Fab、双重可变结构域结合分子、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>和Fv。

3. 权利要求1的抗β淀粉样蛋白 (Aβ) (20-42) 球聚体抗体, 其中所述抗体为双特异性抗体。

4. 权利要求1的抗β淀粉样蛋白 (Aβ) (20-42) 球聚体抗体, 其中所述抗体包含重链免疫球蛋白恒定结构域, 所述重链免疫球蛋白恒定结构域选自: 人IgM恒定结构域、人IgG4恒定结构域、人IgG1恒定结构域、人IgE恒定结构域、人IgG2恒定结构域、人IgG3恒定结构域和人IgA恒定结构域。

5. 权利要求2的抗β淀粉样蛋白 (Aβ) (20-42) 球聚体抗体, 其中所述抗体包含重链免疫球蛋白恒定结构域, 所述重链免疫球蛋白恒定结构域选自: 人IgM恒定结构域、人IgG4恒定结构域、人IgG1恒定结构域、人IgE恒定结构域、人IgG2恒定结构域、人IgG3恒定结构域和人IgA恒定结构域。

6. 权利要求3的抗β淀粉样蛋白 (Aβ) (20-42) 球聚体抗体, 其中所述抗体包含重链免疫球蛋白恒定结构域, 所述重链免疫球蛋白恒定结构域选自: 人IgM恒定结构域、人IgG4恒定结构域、人IgG1恒定结构域、人IgE恒定结构域、人IgG2恒定结构域、人IgG3恒定结构域和人IgA恒定结构域。

7. 权利要求1-6中任一项的抗β淀粉样蛋白 (Aβ) (20-42) 球聚体抗体, 进一步包含具有SEQ ID NO:41或SEQ ID NO:42的氨基酸序列的免疫球蛋白重链恒定区。

8. 权利要求1-6中任一项的抗β淀粉样蛋白 (Aβ) (20-42) 球聚体抗体, 进一步包含具有选自SEQ ID NO:43和SEQ ID NO:44的氨基酸序列的免疫球蛋白轻链恒定区。

9. 根据权利要求1-6中任一项所述的抗β淀粉样蛋白 (Aβ) (20-42) 球聚体抗体, 其中所述抗体进一步包含选自如下的试剂: 免疫粘附分子; 显像剂和治疗剂。

10. 根据权利要求9所述的抗β淀粉样蛋白 (Aβ) (20-42) 球聚体抗体, 其中所述显像剂选自放射性标记、酶、发光标记、磁性标记和生物素。

11. 根据权利要求9所述的抗β淀粉样蛋白 (Aβ) (20-42) 球聚体抗体, 其中所述显像剂为荧光标记。

12. 根据权利要求9所述的抗β淀粉样蛋白 (Aβ) (20-42) 球聚体抗体, 其中所述显像剂为生物发光标记。

13. 根据权利要求9所述的抗 $\beta$ 淀粉样蛋白 (A $\beta$ ) (20-42) 球聚体抗体, 其中所述显像剂是放射性标记, 所述放射性标记选自: $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{99}\text{Tc}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{166}\text{Ho}$ 和 $^{153}\text{Sm}$ 。

14. 根据权利要求1-6和10-13中任一项所述的抗 $\beta$ 淀粉样蛋白 (A $\beta$ ) (20-42) 球聚体抗体, 其中所述抗体具有人糖基化模式。

15. 根据权利要求1-6和10-13中任一项所述的抗 $\beta$ 淀粉样蛋白 (A $\beta$ ) (20-42) 球聚体抗体, 其中所述抗体是结晶抗体。

16. 根据权利要求15所述的抗 $\beta$ 淀粉样蛋白 (A $\beta$ ) (20-42) 球聚体抗体, 其中所述结晶抗体是无载体的药学控制释放的结晶抗体。

17. 根据权利要求15所述的抗 $\beta$ 淀粉样蛋白 (A $\beta$ ) (20-42) 球聚体抗体, 其中所述结晶抗体具有比所述抗体的可溶性配对物更长的体内半衰期。

18. 根据权利要求16所述的抗 $\beta$ 淀粉样蛋白 (A $\beta$ ) (20-42) 球聚体抗体, 其中所述结晶抗体具有比所述抗体的可溶性配对物更长的体内半衰期。

19. 根据权利要求15所述的抗 $\beta$ 淀粉样蛋白 (A $\beta$ ) (20-42) 球聚体抗体, 其中所述结晶抗体保留生物学活性。

20. 根据权利要求16所述的抗 $\beta$ 淀粉样蛋白 (A $\beta$ ) (20-42) 球聚体抗体, 其中所述结晶抗体保留生物学活性。

21. 根据权利要求17所述的抗 $\beta$ 淀粉样蛋白 (A $\beta$ ) (20-42) 球聚体抗体, 其中所述结晶抗体保留生物学活性。

22. 根据权利要求18所述的抗 $\beta$ 淀粉样蛋白 (A $\beta$ ) (20-42) 球聚体抗体, 其中所述结晶抗体保留生物学活性。

23. 分离的核酸, 编码权利要求1-22中任一项的抗 $\beta$ 淀粉样蛋白 (A $\beta$ ) (20-42) 球聚体抗体。

24. 载体, 包含权利要求23的分离的核酸。

25. 权利要求24的载体, 其中所述载体选自pcDNA、pTT、pTT3、pEFBOS、pBV、pJV和pBJ。

26. 宿主细胞, 包含权利要求24或25的载体。

27. 根据权利要求26所述的宿主细胞, 其中所述宿主细胞是原核细胞。

28. 根据权利要求27所述的宿主细胞, 其中所述原核细胞是大肠杆菌。

29. 根据权利要求26所述的宿主细胞, 其中所述宿主细胞是真核细胞。

30. 根据权利要求29所述的宿主细胞, 其中所述真核细胞选自原生生物细胞、动物细胞和真菌细胞。

31. 根据权利要求30所述的宿主细胞, 其中所述真核细胞是动物细胞, 所述动物细胞选自哺乳动物细胞、禽类细胞和昆虫细胞。

32. 根据权利要求30所述的宿主细胞, 其中所述真核细胞是CHO细胞。

33. 根据权利要求30所述的宿主细胞, 其中所述真核细胞是COS细胞。

34. 根据权利要求30所述的宿主细胞, 其中所述真核细胞是酵母细胞。

35. 根据权利要求34所述的宿主细胞, 其中所述酵母细胞是酿酒酵母。

36. 根据权利要求30所述的宿主细胞, 其中所述真核细胞是昆虫Sf9细胞。

37. 生产抗 $\beta$ 淀粉样蛋白 (A $\beta$ ) (20-42) 球聚体抗体的方法, 包括在足以生产所述抗体的条件下, 在培养基中培养权利要求26-36中任一项的宿主细胞。

38. 根据权利要求37的方法生产的抗 $\beta$ 淀粉样蛋白 (AB) (20-42) 球聚体抗体。

39. 药物组合物, 包含权利要求1-22中任一项的抗 $\beta$ 淀粉样蛋白 (AB) (20-42) 球聚体抗体和药学可接受的载体。

40. 权利要求39的药物组合物, 其中所述药学可接受的载体用作佐剂, 所述佐剂用于增加所述抗体的吸收或分散。

41. 权利要求40的药物组合物, 其中所述佐剂是透明质酸酶。

42. 权利要求39-41中任一项的药物组合物, 进一步包含至少一种另外的治疗剂。

43. 用于释放抗 $\beta$ 淀粉样蛋白 (AB) (20-42) 球聚体抗体的组合物, 所述组合物包含:

- (a) 制剂, 其中所述制剂包含权利要求15-22中任一项的结晶抗体, 和成分; 以及
- (b) 至少一种聚合载体。

44. 根据权利要求43所述的组合物, 其中所述聚合载体是选自下述的一种或多种的聚合物: 聚丙烯酸、聚氰基丙烯酸酯、聚氨基酸、聚酐、聚缩酚肽、聚酯、聚乳酸、乳酸乙醇酸共聚物或PLGA、聚 $\beta$ -羟基丁酸酯、聚己内酯、聚二氧环己酮; 聚乙二醇、聚羟丙基甲基丙烯酰胺、聚有机膦腈、聚原酸酯、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、马来酸酐-烷基乙烯醚共聚物、复合多元醇、白蛋白、海藻酸盐、纤维素和纤维素衍生物、胶原、纤维蛋白、明胶、透明质酸、寡糖、糖胺聚糖、硫酸化多糖、其掺和物和共聚物。

45. 根据权利要求43所述的组合物, 其中所述成分选自白蛋白、蔗糖、海藻糖、拉克替醇、明胶、羟丙基- $\beta$ -环糊精、甲氧基聚乙二醇和聚乙二醇。

46. 权利要求1-22中任一项的抗 $\beta$ 淀粉样蛋白 (AB) (20-42) 球聚体抗体在制备用于降低AB形式的活性的药物中的用途, 所述AB形式包含权利要求1-22中任一项的抗 $\beta$ 淀粉样蛋白 (AB) (20-42) 球聚体抗体与之反应的球聚体表位, 从而使得所述AB形式的活性被降低。

47. 权利要求1-22中任一项的抗 $\beta$ 淀粉样蛋白 (AB) (20-42) 球聚体抗体在制备用于治疗受试者的疾病的药物中的用途, 在所述疾病中, AB形式的活性是有害的, 所述AB形式包含权利要求1-22中任一项的抗 $\beta$ 淀粉样蛋白 (AB) (20-42) 球聚体抗体与之反应的球聚体表位, 从而使得实现治疗, 其中所述疾病选自 $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶缺乏、C1-抑制剂缺乏血管性水肿、抗凝血酶缺乏血栓栓塞性疾病、库鲁病、克雅二氏病/羊瘙痒症、牛海绵状脑病、Gerstmann-Straussler-Scheinker病、家族致命性失眠症、亨廷顿氏病、脊髓小脑性共济失调、Machado-Joseph萎缩、齿状红核苍白球肌萎缩症、额颞痴呆、镰状细胞性贫血、不稳定性血红蛋白包涵体溶血、药物诱导的包涵体溶血、帕金森氏病、全身性AL型淀粉样变性、结节性AL型淀粉样变性、全身性AA型淀粉样变性、前列腺淀粉样变性、血液透析淀粉样变性、遗传性脑血管病、家族性内脏淀粉样变性、家族性内脏多神经病、老年性全身性淀粉样变性、家族性淀粉样蛋白神经病、家族性心脏淀粉样变性、阿尔茨海默氏病、唐氏综合症、甲状腺髓样癌和2型糖尿病 (T2DM)。

48. 根据权利要求47所述的用途, 其中所述遗传性脑血管病是遗传性冰岛脑血管病。

## β淀粉样蛋白结合蛋白

[0001] 本申请是国际申请日为2011年8月12日的国际申请PCT/US2011/047622进入中国、申请号为201180045820.7的题为“β淀粉样蛋白结合蛋白”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 序列表

[0003] 本申请含有序列表,其已经通过EFS-Web以ASCII格式提交,其在此处通过引用完整地并入。所述ASCII拷贝,在2011年10月10日生成,命名为10478W00.txt,大小为50,523字节。

### 技术领域

[0004] 本发明涉及β淀粉样蛋白(Aβ)结合蛋白,编码所述蛋白的核酸,产生所述蛋白的方法,包含所述蛋白的组合物和所述蛋白在状况例如淀粉样变性例如阿尔茨海默氏病的诊断、治疗和预防中的用途。

### 背景技术

[0005] 阿尔茨海默氏病(AD)是特征在于认知能力的进行性丧失和特有的神经病理学特征的神经变性病症,所述神经病理学特征包含在脑的几个区域中的β淀粉样蛋白(Aβ)肽的沉积物、神经原纤维缠结和神经元丧失(Hardy和Selkoe,Science 297:353,2002;Mattson,Nature 431:7004,2004。与在阿尔茨海默氏病中观察到的那些非常类似的脑淀粉样蛋白沉积物和认知损害也是唐氏综合症(21三体)的标志,所述唐氏综合症以800次出生约1次的频率发生。

[0006] Aβ肽起于通过蛋白酶解加工的淀粉样蛋白前体蛋白(APP)。这种加工通过命名为α-、β-和γ-分泌酶的几种蛋白酶的合作活性实现,并且导致不同长度的许多特异性片段。淀粉样蛋白沉积物主要由长度为40或42个氨基酸(Aβ40,Aβ42)的肽组成。除了人变体外,这还包括存在于除人外的生物特别是其他哺乳动物尤其是大鼠中的淀粉样蛋白β(1-42)蛋白的同种型。在水环境中趋于聚合的这种蛋白可以以非常不同的分子形式存在。不溶性蛋白的沉积与痴呆病症例如阿尔茨海默氏病的出现或进展的简单关联已证明是不可信的(Terry等人,Ann. Neurol. 30:572-580,1991;Dickson等人,Neurobiol. Aging 16:285-298,1995)。相比之下,突触和认知感知的丧失看起来与可溶形式的Aβ(1-42)更好地关联(Lue等人,Am. J. Pathol. 155:853-862,1999;McLean等人,Ann. Neurol. 46:860-866,1999)。

[0007] 在过去已针对单体Aβ(1-42)产生的多克隆和单克隆抗体无一证明产生所需疗效,也不在动物和/或人中引起严重副作用。例如,来自在非常老的APP23小鼠中的临床前研究的被动免疫接种结果指示治疗上相关的副作用,所述小鼠每周接受一次针对N末端的抗Aβ(1-42)抗体,共5个月。特别地,与盐水处理的小鼠相比较,这些小鼠显示微出血数目和严重性中的增加(Pfeifer等人,Science 298:1379,2002)。在出血中的相似增加也对于非常老的(>24个月)Tg2576和PDAPP小鼠描述(Wilcock等人,J Neuroscience 23:3745-51,2003;Racke等人,J Neuroscience 25:629-636,2005)。在两个品系中,抗Aβ(1-42)的注射导致微

出血的显著增加。

[0008] WO 2004/067561涉及A $\beta$  (1-42) 肽的球形寡聚体(“球聚体(globulomers)”)和用于制备其的方法。WO 2006/094724涉及不可扩散的球形A $\beta$  (X - 38 .. 43) 寡聚物,其中X选自数目1 .. 24。WO 2004/067561和WO 2006/094724进一步描述球聚体的限制性蛋白酶解获得所述球聚体的截短形式,例如A $\beta$  (20-42) 或A $\beta$  (12-42) 球聚体。WO 2007/064917描述了重组形式的淀粉样蛋白 $\beta$ 肽(下文称为N-Met A $\beta$  (1-42))及其球聚体形式的克隆、表达和分离。数据暗示存在A $\beta$ 折叠且装配成A $\beta$ 球聚体的淀粉样蛋白纤维独立途径,所述A $\beta$ 球聚体显示一种或多种独特表位(下文称为球聚体表位)。因为球聚体表位在AD患者和APP转基因小鼠的脑中检测出,并且球聚体与神经元特异性结合且阻断LTP,所以球聚体代表病理学相关的A $\beta$ 构象子。已发现可溶性A $\beta$ 球聚体基本上通过与P/Q型突触前钙通道相互作用发挥其有害作用,并且这种相互作用的抑制剂因此对于淀粉样变性例如阿尔茨海默氏病的治疗是有用的(WO 2008/104385)。

[0009] 与A $\beta$ 的此类球聚体形式选择性结合的抗体已在WO 2007/064972、WO 2007/062852、WO 2008067464、WO 2008/150946和WO 2008/150949中描述。例如,由WO 2007/062852和WO 2008/150949已知的几种单克隆抗体特异性识别A $\beta$  (20-42) 球聚体。

[0010] 存在关于开发生物制品例如A $\beta$ 结合蛋白的巨大的、未满足的治疗需要,所述A $\beta$ 结合蛋白阻止或减慢疾病的进展而不诱导对人体的负面和潜在致死的作用。考虑到一般人群渐增的寿命,和随着这种增加每年诊断有阿尔茨海默氏病或相关病症的患者数目中的相关增加,此类需要是特别显而易见的。进一步地,此类A $\beta$ 结合蛋白将允许正确诊断在经历其症状的患者中的阿尔茨海默氏病,这是目前仅可在验尸后证实的诊断。另外,A $\beta$ 结合蛋白允许阐明负责这种衰竭性疾病的蛋白和其他生物因子的生物学性质。

## 发明内容

[0011] 本发明提供了能够结合可溶性A $\beta$ 球聚体例如如本文描述的A $\beta$  (20-42) 球聚体的A $\beta$ 结合蛋白(或简单地“结合蛋白”)的新家族,特别是抗体如鼠单克隆抗体、嵌合抗体、CDR嫁接的抗体、人源化抗体及其片段。应当指出本发明的结合蛋白还可以与除了本文描述的A $\beta$ 球聚体外A $\beta$ 形式反应(即,结合),此类A $\beta$ 形式可以存在于具有淀粉样变性例如阿尔茨海默氏病的患者的脑中。这些A $\beta$ 形式可以是或不是寡聚物或球聚体的。本发明的结合蛋白与之结合的A $\beta$ 形式包括任何A $\beta$ 形式,其包含鼠/小鼠单克隆抗体m4C9(下文描述并称为“m4C9”)或m10B3(下文描述并称为“m10B3”)与之反应的球聚体表位。此类A $\beta$ 形式在下文称为“靶向A $\beta$ 形式”。进一步地,本发明还提供了用其抑制所述靶向A $\beta$ 形式的活性的治疗方法,且提供用于治疗与所述靶向A $\beta$ 形式相关的疾病特别是淀粉样变性例如阿尔茨海默氏病的组合物和方法。

[0012] 在一个方面,本发明提供了包含下述的结合蛋白:与形成由下述组成的组的氨基酸序列至少75%、至少85%、至少90%或100%相同的6种氨基酸序列

SEQ ID NO:17: SYWMH,  
SEQ ID NO:18: RIDPKSGDTKYTEKFKS,  
[0013] SEQ ID NO:19: MSKLSGTHAWFAY,  
SEQ ID NO:20: KASQDINSYLT,  
SEQ ID NO:21: RANRLVD, 和

[0014] SEQ ID NO:22: LQYDEFPLT。

[0015] 此类结合蛋白在本文用术语“4C9-型”指定。

[0016] 在本发明的另一个方面,上文描述的4C9-型结合蛋白包含下述:与选自下述的氨基酸序列至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%相同的第一种氨基酸序列

SEQ ID NO:1:  
[0017] QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKAPGYTFTSYWMHWVKQRPQGQLEWIGRIDP-  
KSGDTKYTEKFKSKATLTVDKPSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTTMSKLSGTHAW-  
FAYWGQGTLVTVSA;

SEQ ID NO:3:  
[0018] X<sup>1</sup>VQLVQSGAEVKKPGX<sup>16</sup>SVKVSCASGX<sup>27</sup>TFX<sup>30</sup>SYWMHWVRQAPGQGLEW  
X<sup>48</sup>GRIDPKSGDTKYTEKFKSRX<sup>68</sup>TX<sup>70</sup>TX<sup>72</sup>DKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCX<sup>97</sup>X<sup>98</sup>  
MSKLSGTHAWFAYWGQGTLVTVSS,

[0019] 其中 X<sup>1</sup> 是 Q 或 E, X<sup>16</sup> 是 S 或 A, X<sup>27</sup> 是 G 或 Y, X<sup>30</sup> 是 S 或 T, X<sup>48</sup> 是 M 或 I, X<sup>68</sup> 是 V 或 A, X<sup>70</sup> 是 I 或 L, X<sup>72</sup> 是 A 或 V, X<sup>97</sup> 是 A 或 T, 并且 X<sup>98</sup> 是 R 或 T;

SEQ ID NO:4:  
[0020] X<sup>1</sup>VQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWX<sup>48</sup>GRIDP  
KSGDTKYTEKFKSRX<sup>68</sup>VX<sup>70</sup>SX<sup>72</sup>DX<sup>74</sup>SVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCX<sup>97</sup>X<sup>98</sup>MSKLS  
GTHAWFAYWGQGTLVTVSS,

[0021] 其中 X<sup>1</sup> 是 Q 或 E, X<sup>48</sup> 是 M 或 I, X<sup>68</sup> 是 F 或 A, X<sup>70</sup> 是 F 或 L, X<sup>72</sup> 是 L 或 V, X<sup>74</sup> 是 T 或 K, X<sup>97</sup> 是 A 或 T, 并且 X<sup>98</sup> 是 R 或 T;

SEQ ID NO:6:  
[0022] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYWMHWVRQAPGQGLEWMGRIDP-  
KSGDTKYTEKFKSRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARM SKLSGTHAW-  
FAYWGQGTLVTVSS;

SEQ ID NO:7:  
[0023] EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGRIDP-  
KSGDTKYTEKFKSRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARM SKLSGTHAW-  
FAYWGQGTLVTVSS;

- SEQ ID NO:8:  
[0024] EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWIGRIDP-KSGDTKYTEKFKSRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCTTMSKLSGTHAW-FAYWGQGTLVTVSS;
- SEQ ID NO:9:  
[0025] EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGRIDP-KSGDTKYTEKFKSRVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCATMSKLSGTHAW-FAYWGQGTLVTVSS;
- SEQ ID NO:10:  
[0026] QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGRIDP-KSGDTKYTEKFKSRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDNAVYYCARMSKLSGTHAW-FAYWGQGTLVTVSS;
- SEQ ID NO:11:  
[0027] EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGRIDP-KSGDTKYTEKFKSRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDNAVYYCARMSKLSGTHAW-FAYWGQGTLVTVSS;
- SEQ ID NO:12:  
[0028] EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWIGRIDP-KSGDTKYTEKFKSRAVLSVDKSVSTAYLQISSLKAEDNAVYYCTTMSKLSGTHAW-FAYWGQGTLVTVSS; 和
- SEQ ID NO:13:  
[0029] EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGRIDP-KSGDTKYTEKFKSRFVFSVDTSVSTAYLQISSLKAEDNAVYYCATMSKLSGTHAW-FAYWGQGTLVTVSS;
- [0030] 或与选自下述的氨基酸序列至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%相同的第二种氨基酸序列
- SEQ ID NO:2:  
[0031] DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSEYEDMGIYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELK;
- SEQ ID NO:5:  
[0032] DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDINSYLTWFQQKPG-KAPKX<sup>46</sup>LIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTDX<sup>71</sup>TLTISSLQPEDFATYYCLQYDEFPLTFGQGTKLEIK,
- [0033] 其中 X<sup>46</sup> 是 S 或 L 或 T, 并且 X<sup>71</sup> 是 F 或 Y;



**SEQ ID NO:14:**

[0034] **DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKSLIYRANRL-  
VDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQYDEFPLTFGQGGTKLEIK;**

**SEQ ID NO:15:**

[0035] **DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKLLIYRANRL-  
VDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQYDEFPLTFGQGGTKLEIK;** 和

**SEQ ID NO:16:**

[0036] **DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKTLIYRANRL-  
VDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCLQYDEFPLTFGQGGTKLEIK。**

[0038] 在本发明的另一个方面,上文描述的4C9-型结合蛋白包含如上文定义的第一种和第二种氨基酸序列。

[0039] 在一个方面,本文描述的4C9-型结合蛋白是抗体。这种抗体可以是例如免疫球蛋白分子、二硫键合的Fv、单克隆抗体(mab)、单链Fv(scFv)、鼠抗体、嵌合抗体、人源化抗体、单结构域抗体、CDR嫁接的抗体、双抗体、多特异性抗体、Fab、双重特异性抗体、双重可变结构域(DVD)结合分子、Fab'、双特异性抗体、F(ab')<sub>2</sub>或Fv。抗体序列可以对应人或鼠抗体序列。

[0040] 当本文描述的4C9-型结合蛋白是抗体时,它包含对应于如上文定义的序列组的一组6个互补性决定区(CDR)。例如,本发明的4C9-型抗体包含至少六个CDR,所述至少六个CDR与形成由SEQ ID NO: 17、18、19、20、21和22组成的CDR组的序列至少75%、至少85%、至少90%或100%相同。

[0041] 在本发明的另一个方面,抗体包含对应于如上定义的第一种氨基酸序列的至少一条可变重链,和对应于如上定义的第二种氨基酸序列的至少一条可变轻链。例如,本发明的4C9-型抗体包含(i)包含与选自SEQ ID NO: 1、3、4、6、7、8、9、10、11、12 和 13的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的至少一条可变重链;和(ii)包含与选自SEQ ID NO:2、5、14、15 和 16的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的至少一条可变轻链。

[0042] 本发明进一步提供了包含下述的结合蛋白:与形成由下述组成的组的氨基酸序列至少65%、至少75%、至少85%、至少90%或100%相同的6种氨基酸序列

**SEQ ID NO:33: DYEMV,**

**SEQ ID NO:34: YISSGSRTIHYADTVKG,**

[0043] **SEQ ID NO:35: TLLRLHFDY,**

**SEQ ID NO:36: KSSQSLLYSGNQKNFLA,**

**SEQ ID NO:37: WASTRES, 和**

[0044] **SEQ ID NO:38: QQYYSPWT。**

[0045] 此类结合蛋白在本文用术语“10B3-型”指定。

[0046] 在本发明的进一步方面,上文描述的10B3-型结合蛋白包含下述:与选自下述的氨

基酸序列至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%相同的第一种氨基酸序列

**SEQ ID NO:25:**

[0047] **EVKLVESGGGLVQPGGSRKLSAASGFTFSDYEMVWVRQAPGEGLEWVAYISSGS-  
RTIHYADTVKGRFTISRDNPKNTLFLQMSSLRSEDAMYYCARTLLRLHFDYW-  
GQGTILTVSS,**

**SEQ ID NO:27:**

[0048] **EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYEMVWVRQAPGK-  
GLEWVX<sup>49</sup>YISSGSRTIHYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR  
TLLRLHFDYWGQGTILTVSS,**

[0049] 其中 X<sup>49</sup> 是 S 或 A,

**SEQ ID NO:29:**

[0050] **EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYEMVWVRQAPGKGLEWVSYISSGS-  
RTIHYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTLLRLHFDYW-  
GQGTILTVSS, 和**

**SEQ ID NO:30:**

[0051] **EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYEMVWVRQAPGKGLEWVAYISSGS-  
RTIHYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTLLRLHFDYW-  
GQGTILTVSS;**

[0052] 或与选自下述的氨基酸序列至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%相同的第二种氨基酸序列

**SEQ ID NO:26:**

[0053] **DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLYSGNQKNFLAWYQQKPGQSPKLLIY-  
WASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISLVKAEDLAVYYCQQYYSPWTFGGDTK-  
LEIK,**

**SEQ ID NO:28:**

[0054] **DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSGNQKNFLAWYQQKP-  
GQX<sup>49</sup>PKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYSPW  
TFGGGTKVEIK,**

[0055] 其中 X<sup>49</sup> 是 P 或 S,

**SEQ ID NO:31:**

[0056] **DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSGNQKNFLAWYQQKPGQPPKLLIY-  
WASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYSPWTFGGGT-  
KVEIK, 和**

**SEQ ID NO:32:**

[0057] **DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSGNQKNFLAWYQQKPGQSPKLLIY-  
WASTRESGVLPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSPWTFGGGT-**

[0058] **KVEIK**。

[0059] 在本发明的另一个方面,上文描述的10B3-型结合蛋白包含如上文定义的第一种和第二种氨基酸序列。

[0060] 在一个方面,本文描述的10B3-型结合蛋白是抗体。这种抗体可以是例如免疫球蛋白分子、二硫键合的Fv、单克隆抗体(mab)、单链Fv(scFv)、鼠抗体、嵌合抗体、人源化抗体、单结构域抗体、CDR嫁接的抗体、双抗体、多特异性抗体、Fab、双重特异性抗体、双重可变结构域(DVD)结合分子、Fab'、双特异性抗体、F(ab')<sub>2</sub>或Fv。抗体序列可以对应人或鼠抗体序列。

[0061] 当本文描述的10B3-型结合蛋白是抗体时,它包含对应于如上文定义的序列组的一组6个互补性决定区(CDR)。例如,本发明的10B3-型抗体包含至少六个CDR,所述至少六个CDR与形成由SEQ ID NO: 33、34、35、36、37和38组成的CDR组的序列至少75%、至少85%、至少90%或100%相同。

[0062] 在本发明的另一个方面,抗体包含对应于如上定义的第一种氨基酸序列的至少一条可变重链,和对应于如上定义的第二种氨基酸序列的至少一条可变轻链。例如,本发明的10B3-型抗体包含(i)包含与选自SEQ ID NO:25、27、29和30的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的至少一条可变重链,和(ii)包含与选自SEQ ID NO:26、28、31和32的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的至少一条可变轻链。

[0063] 本文描述的结合蛋白可以进一步(除了第一种和第二种氨基酸序列外)包含另一个部分,其可以是另一种氨基酸序列或其他化学部分。例如,本发明的抗体可以包含重链免疫球蛋白恒定结构域。所述重链免疫球蛋白恒定结构域可以选自人IgM恒定结构域、人IgG4恒定结构域、人IgG1恒定结构域、人IgE恒定结构域、人IgG2恒定结构域、人IgG3恒定结构域、和人IgA恒定结构域。在另一个方面,本发明的结合蛋白进一步包含具有选自SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:42的氨基酸序列的重链恒定区,另外具有选自SEQ ID NO:43和SEQ ID NO:44的氨基酸序列的轻链恒定区。

[0064] 本文描述的结合蛋白例如抗体可以进一步包含治疗剂、显像剂、能够促进形成免疫粘附分子的残基和/或另一种功能分子(例如另一种肽或蛋白)。显像剂可以是放射性标记包括但不限于<sup>3</sup>H、<sup>14</sup>C、<sup>35</sup>S、<sup>90</sup>Y、<sup>99</sup>Tc、<sup>111</sup>In、<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I、<sup>177</sup>Lu、<sup>166</sup>Ho和<sup>153</sup>Sm;酶、荧光标记、发光标记、生物发光标记、磁性标记或生物素。

[0065] 本发明的结合蛋白可以是糖基化的。根据本发明的一个方面,糖基化模式是人糖基化模式。

[0066] 在本发明的一个方面,上述结合蛋白结合包含球聚体表位的AB形式,鼠单克隆抗体m4C9或m10B3与所述球聚体表位是反应的(即靶向AB形式)。特别地,上述结合蛋白结合如本文描述的β淀粉样蛋白(20-42)球聚体。

[0067] 在本发明的一个方面,本文描述的结合蛋白能够调节Aβ(20-42)球聚体的生物学

功能。在本发明的进一步方面,本文描述的结合蛋白能够中和A $\beta$  (20-42) 球聚体活性。

[0068] 本发明的结合蛋白可以作为晶体存在。在一个方面,晶体是无载体的药学控制释放的晶体。在另一个方面,结晶结合蛋白具有比其可溶性配对物更长的体内半衰期。在另一个方面,结晶结合蛋白在结晶后保留生物学活性。

[0069] 本发明还提供了编码本文公开的任何一种结合蛋白的分离的核酸。进一步的实施方案提供包含所述核酸的载体。所述载体可以选自pcDNA、pTT (Durocher等人,Nucleic Acids Research 30 (2), 2002)、pTT3 (具有另外的多克隆位点的pTT)、pEFBOS (Mizushima和Nagata,Nucleic acids Research 18 (17), 1990)、pBV、pJV和pBJ。

[0070] 在本发明的另一个方面,用上文公开的载体转化宿主细胞。根据一个实施方案,宿主细胞是原核细胞,包括但不限于大肠杆菌。在相关实施方案中,宿主细胞是真核细胞,选自原生生物细胞、动物细胞、植物细胞和真菌细胞。动物细胞可以选自哺乳动物细胞、禽类细胞和昆虫细胞。根据本发明的一个方面,所述哺乳动物细胞选自CHO和COS,所述真菌细胞是酵母细胞例如酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*), 并且所述昆虫细胞是昆虫Sf9细胞。

[0071] 进一步地,本发明提供了产生如本文公开的结合蛋白的方法,其包括在适合于产生所述结合蛋白的条件和时间下在培养基中培养本文公开的任何一种宿主细胞。另一个实施方案提供了根据本文公开的方法产生的本发明的结合蛋白。在另一个实施方案中,本发明提供了根据上文公开的方法产生的结合蛋白。

[0072] 本发明还提供了包含如本文公开的结合蛋白例如抗体和药学可接受的载体的药物组合物。

[0073] 本发明的一个实施方案提供了用于释放本文描述的结合蛋白的组合物,其中所述组合物包含制剂,所述制剂又包含如上公开的结晶结合蛋白,例如结晶抗体,和成分;和至少一种聚合载体。在一个方面,聚合载体是选自下述中的一种或多种的聚合物:聚(丙烯酸)、聚(氰基丙烯酸酯)、聚(氨基酸)、聚(酐)、聚(缩酚肽)、聚(酯)、聚(乳酸)、乳酸乙醇酸共聚物或PLGA、聚( $\beta$ -羟基丁酸酯)、聚(己内酯)、聚(二氧环己酮);聚(乙二醇)、聚((羟丙基)甲基丙烯酸酯)、聚((有机)膦腈)、聚(原酸酯)、聚(乙烯醇)、聚(乙烯吡咯烷酮)、马来酸酐-烷基乙烯醚共聚物、复合多元醇(pluronic polyol)、白蛋白、海藻酸盐、纤维素和纤维素衍生物、胶原、纤维蛋白、明胶、透明质酸、寡糖、糖胺聚糖、硫酸化多糖、其掺和物和共聚物。在另一个方面,所述成分选自:白蛋白、蔗糖、海藻糖、拉克替醇、明胶、羟丙基- $\beta$ -环糊精、甲氧基聚乙二醇和聚乙二醇。

[0074] 本发明还涉及抑制(即,减少)A $\beta$  (20-42) 球聚体(或任何其他靶向A $\beta$ 形式)的活性的方法,其包含使所述靶向A $\beta$ 形式与本发明的一种或多种结合蛋白接触,从而使得所述靶向A $\beta$ 形式的活性被抑制(即,减少)。在特定实施方案中,所述活性在体外被抑制。这种方法可以包括将本发明的结合蛋白加入含有或怀疑含有靶向A $\beta$ 形式的样品或细胞培养物中,所述样品例如衍生自受试者的样品(例如全血、脑脊液、血清、组织等),以便抑制(即,减少)样品中的A $\beta$ 形式的活性。可替代地,所述靶向A $\beta$ 形式的活性可以在受试者体内被抑制(即,减少)。因此,本发明进一步涉及用于在抑制(即,减少)受试者中的靶向A $\beta$ 形式的活性中使用的本文描述的结合蛋白,其包括使所述A $\beta$ 形式与本发明的一种或多种结合蛋白接触,从而使得所述A $\beta$ 形式的活性被抑制(即,减少)。

[0075] 在相关方面,本发明提供了用于抑制(即,减少)患有其中所述AB形式的活性是有害的疾病或病症的受试者中靶向AB形式的活性的方法。在一个实施方案中,所述方法包括给受试者施用本文公开的至少一种结合蛋白,从而使得受试者中靶向AB形式的活性被抑制(即,减少)。因此,本发明提供了用于在抑制(即,减少)患有如本文描述的疾病或病症的受试者中的靶向AB形式中使用的本文描述的AB结合蛋白,其中本文公开的至少一种结合蛋白这样施用于受试者,从而使得受试者中所述AB形式的活性被抑制(即,减少)。

[0076] 在相关方面,本发明提供了用于治疗(例如治愈、抑制、改善、延迟选自下述的疾病或病症或预防选自下述的疾病或病症发作,或预防选自下述的疾病或病症重现或复发)或预防选自下述的疾病或病症的方法: $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶缺乏、C1-抑制剂缺乏血管性水肿、抗凝血酶缺乏血栓栓塞性疾病、库鲁病、克雅二氏(Creutzfeldt-Jacob)病/羊瘙痒症、牛海绵状脑病、Gerstmann-Straussler-Scheinker病、家族致命性失眠症、亨廷顿氏病、脊髓小脑性共济失调、Machado-Joseph萎缩、齿状红核苍白球肌萎缩症、额颞痴呆、镰状细胞性贫血、不稳定性血红蛋白包涵体溶血、药物诱导的包涵体溶血、帕金森氏病、全身性AL型淀粉样变性、结节性AL型淀粉样变性、全身性AA型淀粉样变性、前列腺淀粉样变性、血液透析淀粉样变性、遗传性(冰岛)脑血管病、亨廷顿氏病、家族性内脏淀粉样变性、家族性内脏多神经病、家族性内脏淀粉样变性、老年性全身性淀粉样变性、家族性淀粉样蛋白神经病、家族性心脏淀粉样变性、阿尔茨海默氏病、唐氏综合症、甲状腺髓样癌和2型糖尿病(T2DM)。在特定实施方案中,所述疾病或病症是淀粉样变性例如阿尔茨海默氏病或唐氏综合症。在一个实施方案中,所述方法包括施用本文公开的任何一种AB结合蛋白的步骤,从而使得实现治疗。在另一个实施方案中,本发明提供了治疗患有选自本文公开的疾病或病症的受试者的方法,其包括与一种或多种另外的治疗剂施用同时或之后施用本文公开的任何一种AB结合蛋白的步骤。因此,本发明提供了用于在治疗患有本文公开的疾病或病症的受试者中使用的本文公开的AB结合蛋白,其包括与一种或多种另外的治疗剂施用同时或之后施用本文公开的任何一种结合蛋白的步骤。例如,另外的治疗剂选自本文列出的治疗剂。

[0077] 本文公开的结合蛋白和包含所述结合蛋白的药物组合物通过选自下述的至少一种模式施用于受试者:肠胃外、皮下、肌肉内、静脉内、关节内、支气管内、腹内、囊内、软骨内、腔内、体腔内、小脑内、脑室内、结肠内、颈管内、胃内、肝内、心肌内、骨内、骨盆内、心包内(intrapericardiac)、腹膜内、胸膜内、前列腺内、肺内、直肠内、肾内、视网膜内、脊柱内、滑膜内、胸内、子宫内、膀胱内、推注、阴道、直肠、颊、舌下、鼻内和经皮。

[0078] 在另一个实施方案中,本发明提供了用于检测样品中的靶向AB形式的方法,其包括(i)使所述样品与本发明的一种或多种结合蛋白接触,和(ii)检测在一种或多种所述结合蛋白和所述样品的元件之间的复合物的形成,其中相对于对照样品,在样品中复合物的形成或增加的形成指示样品中所述AB形式的存在。样品可以是得自怀疑具有如本文公开的疾病或病症的受试者的生物学样品(例如全血、脑脊液、血清、组织等)或含有或怀疑含有所述AB形式的细胞培养物。对照样品不含所述AB形式或得自不具有如上所述的疾病的患者。在一种或多种所述结合蛋白和得自怀疑具有阿尔茨海默氏病的患者的样品元件之间的复合物的存在指示所述患者中这种疾病的诊断。

[0079] 在可替代的实施方案中,靶向AB形式的检测可以例如通过受试者中的体内成像在体内进行。为了这个目的,本发明的一种或多种结合蛋白可以在允许一种或多种所述蛋白

与靶向AB形式的结合的条件下施用于受试者或对照受试者,且检测在一种或多种所述结合蛋白和所述AB形式之间的复合物的形成,其中相对于对照受试者,在受试者中复合物的形成或增加的形成指示受试者中所述AB形式的存在。受试者可以是已知或怀疑患有其中靶向AB形式的活性是有害的病症或疾病的受试者。

#### 附图说明

[0080] 图1举例说明鼠抗体m4C9 (m4C9\_VH)的可变重链的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)。所有CDR区都是下有划线的。

[0081] 图2举例说明鼠抗体m4C9 (m4C9\_VL)的可变轻链的氨基酸序列(SEQ ID NO:2)。所有CDR区都是下有划线的。

[0082] 图3举例说明包含人VH1-69 和JH4构架区的人源化4C9-型抗体的可变重链的氨基酸序列(SEQ ID NO:3)。所有CDR区都是下有划线的。

[0083] 图4举例说明包含人VH7-4.1和JH4构架区的人源化4C9-型抗体的可变重链的氨基酸序列(SEQ ID NO:4)。所有CDR区都是下有划线的。

[0084] 图5举例说明包含人1-16/L1和Jk2构架区的人源化4C9-型抗体的可变轻链的氨基酸序列(SEQ ID NO:5)。所有CDR区都是下有划线的。

[0085] 图6举例说明包含人VH1-69和JH4构架区的人源化4C9-型抗体的可变重链(4C9hum\_VH.1z)的氨基酸序列(SEQ ID NO:6)。所有CDR区都是下有划线的。

[0086] 图7举例说明包含人VH1-69和JH4构架区的人源化4C9-型抗体的可变重链(4C9hum\_VH.1)的氨基酸序列(SEQ ID NO:7),所述构架区具有防止N末端焦谷氨酸形成的Q1E变化以及共有变化S16A、G27Y和S30T。所有CDR区都是下有划线的。

[0087] 图8举例说明包含人VH1-69和JH4构架区的人源化4C9-型抗体的可变重链(4C9hum\_VH.1a)的氨基酸序列(SEQ ID NO:8),所述构架区具有防止N末端焦谷氨酸形成的Q1E变化、共有变化S16A、G27Y和S30T以及构架回复突变M48I、V68A、I70L、A72V、A97T和R98T。所有CDR区都是下有划线的。

[0088] 图9举例说明包含人VH1-69和JH4构架区的人源化4C9-型抗体的可变重链(4C9hum\_VH.1b)的氨基酸序列(SEQ ID NO:9),所述构架区具有防止N末端焦谷氨酸形成的Q1E变化、共有变化S16A、G27Y和S30T以及构架回复突变A72V和R98T。所有CDR区都是下有划线的。

[0089] 图10举例说明包含人VH7-4.1和JH4构架区的人源化4C9-型抗体的可变重链(4C9hum\_VH.2z)的氨基酸序列(SEQ ID NO:10)。所有CDR区都是下有划线的。

[0090] 图11举例说明包含人VH7-4.1和JH4构架区的人源化4C9-型抗体的可变重链(4C9hum\_VH.2)的氨基酸序列(SEQ ID NO:11),所述构架区具有防止N末端焦谷氨酸形成的Q1E变化。所有CDR区都是下有划线的。

[0091] 图12举例说明包含人VH7-4.1和JH4构架区的人源化4C9-型抗体的可变重链(4C9hum\_VH.2a)的氨基酸序列(SEQ ID NO:12),所述构架区具有防止N末端焦谷氨酸形成的Q1E变化以及构架回复突变M48I、F68A、F70L、L72V、T74K、A97T和R98T。所有CDR区都是下有划线的。

[0092] 图13举例说明包含人VH7-4.1和JH4构架区的人源化4C9-型抗体的可变重链

(4C9hum\_VH.2b)的氨基酸序列(SEQ ID NO:13),所述构架区具有防止N末端焦谷氨酸形成的Q1E变化以及构架回复突变L72V和R98T。所有CDR区都是下有划线的。

[0093] 图14举例说明包含人1-16/L1和Jk2构架区的人源化4C9-型抗体的可变轻链(4C9hum\_VL.1z)的氨基酸序列(SEQ ID NO:14)。所有CDR区都是下有划线的。

[0094] 图15举例说明包含人1-16/L1和Jk2构架区的人源化4C9-型抗体的可变轻链(4C9hum\_VL.1)的氨基酸序列(SEQ ID NO:15),所述构架区具有共有变化S46L。所有CDR区都是下有划线的。

[0095] 图16举例说明包含人1-16/L1和Jk2构架区的人源化4C9-型抗体的可变轻链(4C9hum\_VL.1a)的氨基酸序列(SEQ ID NO:16),所述构架区具有构架回复突变L46T和F71Y。所有CDR区都是下有划线的。

[0096] 图17举例说明包含人VH1-69和JH4构架区的鼠单克隆抗体4C9 (m4C9)和人源化4C9-型抗体(4C9hum)的可变重链的氨基酸序列比对。所有CDR区都以粗体字母印刷。在位置1的X是Q或E;在位置16的X是S或A;在位置27的X是G或Y;在位置30的X是S或T;在位置48的X是M或I;在位置68的X是V或A;在位置70的X是I或L;在位置72的X是A或V;在位置97的X是A或T;以及在位置98的X是R或T。

[0097] 图18举例说明包含人VH7-4.1和JH4构架区的鼠单克隆抗体4C9 (m4C9)和人源化4C9-型抗体(4C9hum)的可变重链的氨基酸序列比对。所有CDR区都以粗体字母印刷。在位置1的X是Q或E;在位置48的X是M或I;在位置68的X是F或A;在位置70的X是F或L;在位置72的X是L或V;在位置74的X是T或K;在位置97的X是A或T;以及在位置98的X是R或T。

[0098] 图19举例说明包含人1-16/L1和Jk2构架区的鼠单克隆抗体4C9 (m4C9)和人源化4C9-型抗体(4C9hum)的可变轻链的氨基酸序列比对。所有CDR区都以粗体字母印刷。在位置46的X是S、L或T;以及在位置71的X是F或Y。

[0099] 图20举例说明鼠抗体m10B3的可变重链(m10B3\_VH)的氨基酸序列(SEQ ID NO:25)。所有CDR区都是下有划线的。

[0100] 图21举例说明鼠抗体m10B3的可变轻链(m10B3\_VL)的氨基酸序列(SEQ ID NO:26)。所有CDR区都是下有划线的。

[0101] 图22举例说明包含人VH3-48和JH4构架区的人源化10B3-型抗体的可变重链的氨基酸序列(SEQ ID NO:27)。所有CDR区都是下有划线的。

[0102] 图23举例说明包含人4-1/B3和Jk4构架区的人源化10B3-型抗体的可变轻链的氨基酸序列(SEQ ID NO:28)。所有CDR区都是下有划线的。

[0103] 图24举例说明包含人VH3-48和JH4构架区的人源化10B3-型抗体的可变重链(10B3hum\_VH.1)的氨基酸序列(SEQ ID NO:29)。所有CDR区都是下有划线的。

[0104] 图25举例说明包含人VH3-48和JH4构架区的人源化10B3-型抗体的可变重链(10B3hum\_VH.1a)的氨基酸序列(SEQ ID NO:30),所述构架区具有构架回复突变S49A。所有CDR区都是下有划线的。

[0105] 图26举例说明包含人4-1/B3和Jk4构架区的人源化10B3-型抗体的可变轻链(10B3hum\_VL.1)的氨基酸序列(SEQ ID NO:31)。所有CDR区都是下有划线的。

[0106] 图27举例说明包含人4-1/B3和Jk4构架区的人源化10B3-型抗体的可变轻链(10B3hum\_VL.1a)的氨基酸序列(SEQ ID NO:32),所述构架区具有构架回复突变P49S。所有

CDR区都是有下列划线的。

[0107] 图28举例说明包含人VH3-48和JH4构架区的鼠单克隆抗体10B3 (m10B3) 和人源化10B3-型抗体(10B3hum) 的可变重链的氨基酸序列比对。所有CDR区都以粗体字母印刷。在位置49的X是S或A。

[0108] 图29举例说明包含人4-1/B3和Jk4构架区的鼠单克隆抗体10B3 (m10B3) 和人源化10B3-型抗体(10B3hum) 的可变轻链的氨基酸序列比对。所有CDR区都以粗体字母印刷。在位置49的X是P或S。X。

[0109] 图30显示不同的鼠抗-A $\beta$ 抗体m4C9、m10B3和m6E10针对不同形式的A $\beta$ 的特异性的斑点印迹分析。检测抗-A $\beta$ 抗体与固定化A $\beta$ 的结合。

[0110] 1 = A $\beta$  (1-42) 单体, 0.1% NH<sub>4</sub>OH

[0111] 2 = A $\beta$  (1-40) 单体, 0.1% NH<sub>4</sub>OH

[0112] 3 = A $\beta$  (1-42) 单体, 0.1%NaOH

[0113] 4 = A $\beta$  (1-40) 单体, 0.1% NaOH

[0114] 5 = A $\beta$  (1-42) 球聚体

[0115] 6 = A $\beta$  (12-42) 球聚体

[0116] 7 = A $\beta$  (20-42) 球聚体

[0117] 8 = A $\beta$  (1-42) 纤维制剂

[0118] 9 = sAPP $\alpha$  (Sigma); (首个斑点: 1pmol)。

[0119] 图31A和31B显示如通过夹心ELISA测定的, 在(A) 食蟹猴血浆和(B) 人血浆中的鼠单克隆抗体m4C9、m10B3和m1G5、抗人PF-4抗体(阳性对照) 和IgG2a(阴性对照) 的血小板因子4(PF-4) 交叉反应。检测到PF-4与固定的抗体的结合。

[0120] 图32A和32B显示如通过比对夹心ELISA测定的, 在(A) 食蟹猴血浆和(B) 人血浆中的鼠单克隆抗体m4C9、m10B3和m1G5、抗人PF-4抗体(阳性对照) 和IgG2a(阴性对照) 的血小板因子4(PF-4) 交叉反应。抗体通过固定的抗小鼠IgG在板上捕获。检测到PF-4与捕获的抗体的结合。

## 具体实施方式

[0121] 除非本文另有定义, 与本发明结合使用的科学和技术术语应具有由本领域普通技术人员通常理解的含义。术语的含义和范围应是明确的, 然而, 在任何潜在含糊的情况下, 本文提供的定义优先超过任何字典或外部定义。进一步地, 除非上下文另有要求, 单数术语应包括复数, 并且复数术语应包括单数。在本申请中, “或”的使用意指“和/或”, 除非另有说明。此外, 术语“包括”以及其他形式如“包括(includes)”和“包括(included)”的使用并非限制性的。此外, 术语例如“元件”或“组分”包括包含一个单位的元件和组分以及包含超过一个亚单位的元件和组分, 除非另有具体说明。

[0122] 一般地, 与本文描述的细胞和组织培养、分子生物学、免疫学、微生物学、遗传学、蛋白和核酸化学以及杂交结合使用的命名法及其技术是本领域众所周知和通常使用的那些。本发明的方法和技术一般根据本领域众所周知的常规方法并且如本说明书自始至终引用且讨论的多种一般和更具体的参考文献中所述进行, 除非另有说明。酶促反应和纯化技术根据制造商的说明书进行, 如本领域通常实现的或如本文描述的。与本文描述的分析化



学、合成有机化学、以及医学和药物化学结合使用的命名法以及其实验室程序和技术是本领域众所周知和通常使用的那些。标准技术用于化学合成、化学分析、药物制备、制剂和递送以及患者的治疗。

[0123] 本发明涉及A $\beta$ 结合蛋白,特别是抗A $\beta$ 抗体或其A $\beta$ 结合部分,特别是与A $\beta$  (20-42) 球聚体结合的那些。这些A $\beta$ 结合蛋白不仅能够甄别其他形式的A $\beta$ 肽,特别是单体和纤丝(fibrils),还能够甄别非截短形式的A $\beta$ 球聚体。因此,本发明涉及具有与A $\beta$  (20-42) 球聚体结合亲和力的A $\beta$ 结合蛋白,所述结合亲和力大于这种A $\beta$ 结合蛋白与A $\beta$  (1-42) 球聚体的结合亲和力。

[0124] 如本文使用的术语“A $\beta$  (X-Y)”指从人淀粉样蛋白 $\beta$  (A $\beta$ ) 蛋白的氨基酸位置X到氨基酸位置Y的氨基酸序列,包括X和Y,特别指氨基酸序列DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF AEDVGSNKGAIIGLMVGGVV IAT (SEQ ID NO:45) (对应于氨基酸位置1 - 43) 的从氨基酸位置X到氨基酸位置Y的氨基酸序列或任何其天然存在的变体,特别是具有选自下述的至少一个突变的那些:A2T、H6R、D7N、A21G (“佛兰芒 (Flemish)”)、E22G (“北极 (Arctic)”)、E22Q (“荷兰 (Dutch)”)、E22K (“意大利 (Italian)”)、D23N (“爱荷华州 (Iowa)”)、A42T和A42V,其中编号相对于A $\beta$ 肽的起始,包括位置X和位置Y或具有最高达三个另外的氨基酸置换的序列,所述氨基酸置换无一可以阻止球聚体形成。根据一个方面,在从氨基酸12或X (无论哪一个数目更高) 到氨基酸42或Y (无论哪一个数目更低) 的部分中不存在另外的氨基酸置换。根据另一个方面,在从氨基酸20或X (无论哪一个数目更高) 到氨基酸42或Y (无论哪一个数目更低) 的部分中不存在另外的氨基酸置换。根据另一个方面,在从氨基酸20或X (无论哪一个数目更高) 到氨基酸40或Y (无论哪一个数目更低) 的部分中不存在另外的氨基酸置换。本文“另外的”氨基酸置换是在自然界中未发现的来自规范序列的任何偏差。

[0125] 更具体而言,如本文使用的术语“A $\beta$  (1-42)”指从人A $\beta$ 蛋白的氨基酸位置1到氨基酸位置42的氨基酸序列,包括1和42,特别指氨基酸序列DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF AEDVGSNKGAIIGLMVGGVV IA (SEQ ID NO:46) 或任何其天然存在的变体,特别是具有选自下述的至少一个突变的那些:A2T、H6R、D7N、A21G (“佛兰芒”)、E22G (“北极”)、E22Q (“荷兰”)、E22K (“意大利”)、D23N (“爱荷华州”)、A42T和A42V,其中编号相对于A $\beta$ 肽的起始,包括1和42或具有最高达三个另外的氨基酸置换的序列,所述氨基酸置换无一可以阻止球聚体形成。根据一个方面,在从氨基酸20到氨基酸42的部分中不存在另外的氨基酸置换。同样地,如本文使用的术语“A $\beta$  (1-40)”指从人A $\beta$ 蛋白的氨基酸位置1到氨基酸位置40的氨基酸序列,包括1和40,特别指氨基酸序列DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF AEDVGSNKGAIIGLMVGGVV (SEQ ID NO:47) 或任何其天然存在的变体,特别是具有选自下述的至少一个突变的那些:A2T、H6R、D7N、A21G (“佛兰芒”)、E22G (“北极”)、E22Q (“荷兰”)、E22K (“意大利”) 和D23N (“爱荷华州”),其中编号相对于A $\beta$ 肽的起始,包括1和40或具有最高达三个另外的氨基酸置换的序列,所述氨基酸置换无一可以阻止球聚体形成。根据一个方面,在从氨基酸20到氨基酸40的部分中不存在另外的氨基酸置换。

[0126] 更具体而言,如本文使用的术语“A $\beta$  (12-42)”指从人A $\beta$ 蛋白的氨基酸位置12到氨基酸位置42的氨基酸序列,包括12和42,特别指氨基酸序列VHHQKLVFF AEDVGSNKGAIIGLMVGGVV IA (SEQ ID NO:48) 或任何其天然存在的变体,特别是具有选自下述的至少一个突变的那些:A21G (“佛兰芒”)、E22G (“北极”)、E22Q (“荷兰”)、E22K (“意大利”)、D23N (“爱

荷华州”)、A42T和A42V,其中编号相对于A $\beta$ 肽的起始,包括12和42或具有最高达三个另外的氨基酸置换的序列,所述氨基酸置换无一可以阻止球聚体形成。根据一个方面,在从氨基酸20到氨基酸42的部分中不存在另外的氨基酸置换。同样地,如本文使用的术语“A $\beta$  (20-42)”指从人淀粉样蛋白 $\beta$ 蛋白的氨基酸位置20到氨基酸位置42的氨基酸序列,包括20和42,特别指氨基酸序列F AEDVGSNKG A IIGLMVGGV V I A (SEQ ID NO:49) 或任何其天然存在的变体,特别是具有选自下述的至少一个突变的那些:A21G (“佛兰芒”)、E22G (“北极”)、E22Q (“荷兰”)、E22K (“意大利”)、D23N (“爱荷华州”)、A42T和A42V,其中编号相对于A $\beta$ 肽的起始,包括20和42或具有最高达三个另外的氨基酸置换的序列,所述氨基酸置换无一可以阻止球聚体形成。根据一个方面,不存在任何另外的氨基酸置换。

[0127] 如本文使用的术语“A $\beta$  (X-Y) 球聚体” (A $\beta$  (X-Y) 球状寡聚物) 指如上定义的A $\beta$  (X-Y) 肽的可溶性、球状、非共价结合,具有同质性和独特的物理特征。根据一个方面,A $\beta$  (X-Y) 球聚体是A $\beta$  (X-Y) 肽的稳定、非纤维状、寡聚装配,其可通过与阴离子型去污剂一起孵育而获得。与单体和纤维形成对比,这些球聚体的特征在于亚单位的限定装配数目(例如,具有4-6个亚单位的早期装配形式,“寡聚物A”;和具有12-14个亚单位的晚期装配形式,“寡聚物B”;如W02004/067561中所述)。球聚体具有三维球形结构(“熔球”,参见Barghorn等人,J Neurochem 95:834-847,2005)。它们的特征可以进一步在于下述特点中的一个或多个:

[0128] - N末端氨基酸X-23用混杂蛋白酶的可切割性(例如嗜热菌蛋白酶或胞内蛋白酶GluC),获得截短形式的球聚体;

[0129] - C末端氨基酸24-Y对于混杂蛋白酶和抗体的不易接近性;

[0130] - 截短形式的这些球聚体维持所述球聚体的三维核心结构,核心表位A $\beta$  (20-Y) 以其球聚体构型具有更佳接近性。

[0131] 根据本发明且特别是为了评估本发明的A $\beta$ 结合蛋白的结合亲和力的目的,术语“A $\beta$  (X-Y) 球聚体”在此处特别指可通过如通过引用并入本文的W02004/067561中所述的方法获得的产物。所述方法包含使天然、重组或合成A $\beta$  (X-Y) 肽或其衍生物解折叠;使至少部分解折叠的A $\beta$  (X-Y) 肽或其衍生物暴露于去污剂,减少去污作用且继续孵育。

[0132] 为了使肽解折叠的目的,可以允许氢键破坏试剂例如六氟异丙醇(HFIP)作用于蛋白。当作用温度是约20 - 50°C,并且特别是约35 - 40°C时,数分钟例如约10 - 60分钟的作用时间是足够的。例如以浓缩形式在与含水缓冲液例如二甲亚砜(DMSO)能混溶的合适有机溶剂中蒸发至干燥的残渣的后续溶解导致至少部分解折叠的肽或其衍生物的悬液,其可以随后使用。需要时,原悬液可以贮存于低温例如在约20°C用于中间时期。可替代地,肽或其衍生物可以吸收在微酸性例如水溶液例如约10 mM HCl水溶液中。在通常数分钟的孵育时间后,通过离心去除不溶性组分。在10,000 g数分钟是有利的。这些方法步骤可以在室温即在20 - 30°C的温度进行。在离心后获得的上清液含有A $\beta$  (X-Y) 肽或其衍生物,并且可以贮存于低温例如在约-20°C用于中间时期。后续暴露于去污剂涉及肽或其衍生物的寡聚化,以给出中间类型的寡聚物(在W0 2004/067561中称为寡聚物A)。为了这个目的,允许去污剂作用于至少部分解折叠的肽或其衍生物,直至已产生足够的中间寡聚物。使用离子型去污剂特别是阴离子型去污剂是优先的。

[0133] 根据特定实施方案,使用下式(I)的去污剂:

[0134] R-X,

[0135] 其中基团R是具有6 - 20、例如10 - 14个碳原子的未分支或分支的烷基,或具有6 - 20、例如10 - 14个碳原子的未分支或分支的烯基,基团X是酸性基团或其盐,其中X选自例如-COO-M<sup>+</sup>、-SO<sub>3</sub>-M<sup>+</sup>等且尤其是-OSO<sub>3</sub>-M<sup>+</sup>,并且M<sup>+</sup>是氢阳离子,或选自例如碱金属和碱土金属阳离子和铵阳离子的无机或有机阳离子。有利的是其中R是未分支的烷基的式(I)的去污剂,其中必须特别提及烷-1-基基团。例如,可以有利地使用十二烷基硫酸钠(SDS)、月桂酸、去污剂月桂基肌酸钠盐(也称为肌氨酰NL-30或Gardol<sup>®</sup>)和油酸。去污作用的时间特别依赖于实施寡聚化的肽或其衍生物是否已解折叠(并且如果是,则至何种程度)。如果根据解折叠步骤,肽或其衍生物已预先用氢键破坏试剂即特别用六氟异丙醇处理,则当作用温度是约20 - 50℃,并且特别是约35 - 40℃时,在数小时的范围中有利地约1 - 20且特别是约2 - 10小时的作用时间是足够的。如果较少解折叠或基本上未解折叠的肽或其衍生物是起始点,则相应更长的作用时间是有利的。如果肽或其衍生物已例如根据上述程序作为HFIP处理的替代方案预处理,或直接对所述肽或其衍生物实施寡聚化,则当作用温度是约20 - 50℃,并且特别是约35 - 40℃时,在约5 - 30小时且特别是约10 - 20小时范围中的作用时间是足够的。在孵育后,有利地通过离心去除不溶性组分。在10,000 g数分钟是有利的。待选择的去污剂浓度取决于使用的去污剂。如果使用SDS,则在按重量计0.01 - 1%范围中,例如按重量计0.05 - 0.5%,例如按重量计约0.2%的浓度证明是有利的。如果使用月桂酸或油酸,则略微更高的浓度是有利的,例如在按重量计0.05 - 2%范围中,例如按重量计0.1 - 0.5%,例如按重量计约0.5%。去污剂作用应在大致在生理学范围中的盐浓度时发生。因此,特别在50 - 500 mM范围中,例如100 - 200 mM或在约140 mM的NaCl浓度是有利的。去污剂作用的后续减少和孵育的继续涉及进一步的寡聚化,以给出本发明的Aβ(X-Y)球聚体(在WO2004/067561中称为球聚体B)。因为得自先前步骤的组合物通常含有去污剂和生理学范围中的盐浓度,所以随后减少去污剂作用以及盐浓度是有利的。这可以通过减少去污剂和盐的浓度来进行,例如通过方便地用水或更低盐浓度的缓冲液例如Tris-HCl, pH 7.3稀释。在约2 - 10范围中、有效地在约3 - 8范围中且特别是约4的稀释因子已证明是合适的。去污剂作用中的减少也可以通过加入可以中和所述去污剂作用的物质实现。这些的例子包括能够络合去污剂的物质,如在纯化和提取措施的过程中能够稳定细胞的物质,例如特别是E0/P0嵌段共聚物,特别是在商标名Pluronic<sup>®</sup> F 68下的嵌段共聚物。同样地可以使用在特定临界微团浓度周围或其上的浓度范围中的烷基化且特别是乙氧基化烷基酚例如Triton<sup>®</sup> X系列的乙氧基化叔辛基酚,特别是Triton<sup>®</sup> X100, 3-(3-胆酰胺丙基二甲氨基)-1-丙磺酸酯(CHAPS<sup>®</sup>),或烷氧基化且特别是乙氧基化脱水山梨糖醇脂肪酯例如Tween<sup>®</sup>系列的那些,特别是Tween<sup>®</sup> 20。随后,将溶液孵育直至已产生足够的本发明的Aβ(X-Y)球聚体。当作用温度是约20 - 50℃,并且特别是约35 - 40℃时,在数小时的范围中例如在约10 - 30小时的范围中或在约15 - 25小时的范围中的作用时间是足够的。随后可以将溶液浓缩并且可以通过离心去除可能的残渣。此处再次,在10,000 g数分钟证明是有利的。在离心后获得的上清液含有本发明的Aβ(X-Y)球聚体。本发明的Aβ(X-Y)球聚体可以最后以本身已知的方式回收,例如通过超滤、透析、沉淀或离心。例如,Aβ(X-Y)球聚体在变性条件下例如通过SDS-PAGE的电泳分离可以产生双重带(例如对于Aβ(1-42)具有38/48 kDa的表观分子量),并且在分离前在球聚体的戊二醛处理后,这两个带可以合并成一个。球聚体的大小排阻层析可以分别导致单一峰(例如对应于对于Aβ(1-42)球聚体约100 kDa的

分子量或对于戊二醛交联的A $\beta$  (1-42) 球聚体约60 kDa的分子量)。从A $\beta$  (1-42) 肽、A $\beta$  (12-42) 肽和A $\beta$  (20-42) 肽开始,所述方法特别适合于获得A $\beta$  (1-42) 球聚体、A $\beta$  (12-42) 球聚体和A $\beta$  (20-42) 球聚体。

[0136] 在本发明的特定实施方案中,其中X选自数目2 .. 24并且Y如上定义的A $\beta$  (X-Y) 球聚体是可通过将A $\beta$  (1-Y) 球聚体截短成较短形式的那些,其中X选自数目2 .. 24,例如X是20或12,并且Y如上定义,这可以通过用合适的蛋白酶处理来实现。例如,A $\beta$  (20-42) 球聚体可以通过对A $\beta$  (1-42) 球聚体实施嗜热菌蛋白酶蛋白酶解来获得,并且A $\beta$  (12-42) 球聚体可以通过对A $\beta$  (1-42) 球聚体实施胞内蛋白酶GluC蛋白酶解来获得。当达到所需蛋白酶解程度时,蛋白酶以一般已知的方式进行灭活。所得到的球聚体随后可以根据本文已描述的程序进行分离,并且需要时,通过进一步的操作(work-up) 和纯化步骤进行进一步加工。所述方法的详细描述公开于通过引用并入本文的W0 2004/067561中。

[0137] 为了本发明的目的,A $\beta$  (1-42) 球聚体特别是如下文实施例1a中所述的A $\beta$  (1-42) 球聚体;A $\beta$  (20-42) 球聚体特别是如下文实施例1b中所述的A $\beta$  (20-42) 球聚体,并且A $\beta$  (12-42) 球聚体特别是如下文实施例1c中所述的A $\beta$  (12-42) 球聚体。根据本发明的一个方面,球聚体显示与神经元细胞的亲和力和/或显示出神经调节作用。

[0138] 根据本发明的另一个方面,球聚体由11 - 16例如12- 14个A $\beta$  (X-Y) 肽组成。根据本发明的另一个方面,术语“A $\beta$  (X-Y) 球聚体”在本文中基本上由A $\beta$  (X-Y) 亚单位组成的球聚体,其中例如平均12个亚单位中的至少11个是A $\beta$  (X-Y) 类型的,或小于10%的球聚体包含任何非A $\beta$  (X-Y) 肽,或非A $\beta$  (X-Y) 肽的含量低于检测阈值。更具体而言,术语“A $\beta$  (1-42) 球聚体”在本文中基本上由如上定义的A $\beta$  (1-42) 单位组成的球聚体;术语“A $\beta$  (12-42) 球聚体”在本文中基本上由如上定义的A $\beta$  (12-42) 单位组成的球聚体;并且术语“A $\beta$  (20-42) 球聚体”在本文中基本上由如上定义的A $\beta$  (20-42) 单位组成的球聚体。

[0139] 术语“交联的A $\beta$  (X-Y) 球聚体”在本文中可通过球聚体的组成成分单位的交联得自如上所述的A $\beta$  (X-Y) 球聚体的分子,所述交联例如化学交联、醛交联、戊二醛交联。在本发明的另一个方面,交联的球聚体基本上是其中单位至少部分通过共价键连接而不是仅通过非共价相互作用结合在一起的球聚体。为了本发明的目的,交联的A $\beta$  (1-42) 球聚体特别是如下文实施例1d中所述的交联的A $\beta$  (1-42) 球聚体。

[0140] 术语“A $\beta$  (X-Y) 球聚体衍生物”在本文中特别指通过共价连接至促进检测的基团进行标记的球聚体,所述基团例如荧光团,例如异硫氰酸荧光素、藻红蛋白、维多利亚水母 (*Aequorea victoria*) 荧光蛋白、网鳃 (*Dictyosoma*) 荧光蛋白、或其任何组合或荧光活性衍生物;生色团;化学发光体例如萤光素酶,特别是北美萤火虫 (*Photinus pyralis*) 萤光素酶、费氏弧菌 (*Vibrio fischeri*) 萤光素酶、或其任何组合或化学发光活性衍生物;酶促活性基团例如过氧化物酶,例如辣根过氧化物酶、或其任何酶促活性衍生物;电子致密基团例如含重金属基团,例如含金基团;半抗原,例如酚衍生的半抗原;强抗原性结构,例如预测为抗原性例如通过Kolaskar和Tongaonkar的算法预测为抗原性的肽序列;关于另一种分子的适配体;螯合基团,例如六组氨酸 (SEQ ID NO: 71);介导进一步的特异性蛋白-蛋白相互作用的天然或天然衍生的蛋白结构,例如fos/jun对的成员;磁性基团,例如磁性铁基团;或放射性基团例如包含<sup>1</sup>H、<sup>14</sup>C、<sup>32</sup>P、<sup>35</sup>S或<sup>125</sup>I的基团或其任何组合;或通过共价或非共价亲和力和相互作用连接至基团进行标志的球聚体,所述基团促进失活、隔离、降解和/或沉淀,例

如用促进体内降解的基团例如泛素进行标志,这种标志的寡聚物例如在体内装配;或通过上述的任何组合修饰的球聚体。此类标记和标志基团和用于将其结合至蛋白的方法是本领域已知的。标记和/或标志可以在球聚体化之前、过程中或之后进行。在本发明的另一个方面,球聚体衍生物是可通过标记和/或标志反应得自球聚体的分子。相应地,术语“AB(X-Y)单体衍生物”在此处特别指如对于球聚体所述进行标记或标志的AB单体。

[0141] 在本发明的进一步方面,本文描述的结合蛋白以高亲和力与AB(20-42)球聚体结合,例如具有至多约 $10^{-6}$  M;至多约 $10^{-7}$  M;至多约 $10^{-8}$  M;至多约 $10^{-9}$  M;至多约 $10^{-10}$  M;至多约 $10^{-11}$  M;至多约 $10^{-12}$  M;和至多 $10^{-13}$  M的解离常数( $K_d$ )。在一个方面,如通过表面等离子测量的,本文描述的结合蛋白与AB(20-42)球聚体的结合速率常数( $k_{on}$ )选自:至少约 $10^2$   $M^{-1}s^{-1}$ ;至少约 $10^3$   $M^{-1}s^{-1}$ ;至少约 $10^4$   $M^{-1}s^{-1}$ ;至少约 $10^5$   $M^{-1}s^{-1}$ ;和至少约 $10^6$   $M^{-1}s^{-1}$ 。在另一个方面,如通过表面等离子测量的,结合蛋白具有选自下述的与AB(20-42)球聚体的解离速率常数( $k_{off}$ ):至多约 $10^{-3}$   $s^{-1}$ ;至多约 $10^{-4}$   $s^{-1}$ ;至多约 $10^{-5}$   $s^{-1}$ ;和至多约 $10^{-6}$   $s^{-1}$ 。

[0142] 在本发明的另一个方面,本文描述的结合蛋白与AB(20-42)球聚体的结合亲和力大于与AB(1-42)球聚体的结合亲和力。

[0143] 术语“更大的亲和力”在本文中指一方面未结合的AB结合蛋白和未结合的AB球聚体以及另一方面AB结合蛋白-球聚体复合物之间的平衡进一步有利于AB结合蛋白-球聚体复合物时的相互作用程度。同样地,术语“更小的亲和力”在此处指一方面未结合的AB结合蛋白和未结合的AB球聚体以及另一方面AB结合蛋白-球聚体复合物之间的平衡进一步有利于未结合的AB结合蛋白和未结合的AB球聚体时的相互作用程度。术语“更大的亲和力”与术语“更高的亲和力”是同义的,并且术语“更小的亲和力”与术语“更低的亲和力”是同义的。

[0144] 在本发明的相关方面,本文描述的结合蛋白与AB(20-42)球聚体的结合亲和力是结合蛋白与AB(1-42)球聚体的结合亲和力的至少2倍(例如至少3或至少5倍)、至少10倍(例如至少20倍、至少30倍或至少50倍)、至少100倍(例如至少200倍、至少300倍或至少500倍)和至少1,000倍(例如至少2,000倍、至少3,000倍或至少5000倍)、至少10,000倍(例如至少20,000倍、至少30,000倍或至少50,000倍)、或至少100,000倍高。

[0145] 在本发明的另一个方面,本文描述的结合蛋白与AB(20-42)球聚体的结合亲和力大于与AB(12-42)球聚体的结合亲和力。

[0146] 在本发明的相关方面,本文描述的结合蛋白与AB(20-42)球聚体的结合亲和力是结合蛋白与AB(12-42)球聚体的结合亲和力的至少2倍(例如至少3或至少5倍)、至少10倍(例如至少20倍、至少30倍或至少50倍)、至少100倍(例如至少200倍、至少300倍或至少500倍)和至少1,000倍(例如至少2,000倍、至少3,000倍或至少5000倍)、至少10,000倍(例如至少20,000倍、至少30,000倍或至少50,000倍)、或至少100,000倍高。

[0147] 根据一个特定实施方案,本发明因此涉及与AB(20-42)球聚体具有的结合亲和力大于抗体与AB(1-40)球聚体和AB(1-42)球聚体的结合亲和力的结合蛋白。

[0148] 根据一个方面,本发明的AB结合蛋白与如上定义的至少一种AB球聚体结合,并且对于至少一种非球聚体形式的AB具有比较小的亲和力。对于至少一种非球聚体形式的AB具有比对于至少一种AB球聚体比较小的亲和力的本发明AB结合蛋白包括对于AB(20-42)球聚体具有大于与AB(1-42)单体的结合亲和力的AB结合蛋白。根据本发明的可替代或另外的方面,AB结合蛋白与AB(20-42)球聚体的结合亲和力大于与AB(1-40)单体的亲和力。特别地,A

$\beta$ 结合蛋白与A $\beta$  (20-42) 球聚体的亲和力大于其与A $\beta$  (1-40) 和A $\beta$  (1-42) 单体的亲和力。

[0149] 如本文使用的术语“A $\beta$  (X-Y) 单体”指分离形式的A $\beta$  (X-Y) 肽,特别是基本上不参加与其他A $\beta$ 肽的非共价相互作用的A $\beta$  (X-Y) 肽形式。实际上,A $\beta$  (X-Y) 单体通常以水溶液的形式提供。在本发明的特定实施方案中,单体水溶液含有0.05% - 0.2%,例如约0.1% NH<sub>4</sub>OH。在本发明的另一个特定实施方案中,单体水溶液含有0.05% - 0.2%,例如约0.1% NaOH。当使用时(例如用于测定本发明的A $\beta$ 结合蛋白的结合亲和力时),以合适方式稀释所述溶液可以是有利的。进一步地,在其制备后2小时内,特别是在1小时内且尤其是在30分钟内使用所述溶液通常是有利的。

[0150] 更具体而言,术语“A $\beta$  (1-40) 单体”在此处指如本文描述的A $\beta$  (1-40) 单体制剂,并且术语“A $\beta$  (1-42) 单体”在此处指如本文描述的A $\beta$  (1-42) 制剂。

[0151] 有利地,本发明的A $\beta$ 结合蛋白以低亲和力与一种或两种单体结合,例如具有 $1 \times 10^{-8}$  M的K<sub>D</sub>或更小的亲和力,例如具有 $3 \times 10^{-8}$  M的K<sub>D</sub>或更小的亲和力,具有 $1 \times 10^{-7}$  M的K<sub>D</sub>或更小的亲和力,例如具有 $3 \times 10^{-7}$  M的K<sub>D</sub>或更小的亲和力,或具有 $1 \times 10^{-6}$  M的K<sub>D</sub>或更小的亲和力,例如具有 $3 \times 10^{-5}$  M的K<sub>D</sub>或更小的亲和力,或具有 $1 \times 10^{-5}$  M的K<sub>D</sub>或更小的亲和力。

[0152] 根据本发明的一个方面,本发明的A $\beta$ 结合蛋白与A $\beta$  (20-42) 球聚体的结合亲和力是A $\beta$ 结合蛋白与一种或两种单体的结合亲和力的至少2倍,例如至少3倍或至少5倍、至少10倍,例如至少20倍、至少30倍或至少50倍、至少100倍,例如至少200倍、至少300倍或至少500倍、至少1,000倍,例如至少2,000倍、至少3,000倍或至少5,000倍、至少10,000倍,例如至少20,000倍、至少30,000或至少50,000倍,或至少100,000倍高。

[0153] 对于至少一种非球聚体形式的A $\beta$ 具有比对于至少一种A $\beta$ 球聚体比较小的亲和力的本发明的A $\beta$ 结合蛋白进一步包括对于A $\beta$  (20-42) 球聚体具有大于与A $\beta$  (1-42) 纤维的结合亲和力的A $\beta$ 结合蛋白。根据本发明的可替代或另外的方面,A $\beta$ 结合蛋白与A $\beta$  (20-42) 球聚体的结合亲和力大于与A $\beta$  (1-40) 纤维的亲和力。根据一个特定实施方案,本发明涉及与A $\beta$  (20-42) 球聚体具有的结合亲和力大于其与A $\beta$  (1-40) 和A $\beta$  (1-42) 纤维的结合亲和力的A $\beta$ 结合蛋白。

[0154] 术语“纤维”在本文中指包含非共价结合的个别A $\beta$  (X-Y) 肽的装配的分子结构,其在电子显微镜中显示纤维结构,其结合刚果红且随后在偏振光下显示出双折射,并且其X射线衍射图样是十字形 $\beta$ 结构。在本发明的另一个方面,纤维是可通过此类过程获得的分子结构,所述过程包含合适的A $\beta$ 肽在不存在去污剂的情况下例如在0.1 M HCl中自诱导的聚合聚集,导致超过24或超过100个单位的聚集物形成。这个过程是本领域众所周知的。有利地,A $\beta$  (X-Y) 纤维以水溶液的形式使用。在本发明的特定实施方案中,纤维水溶液通过下述进行制备:将A $\beta$ 肽溶解于0.1% NH<sub>4</sub>OH中,将其用20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,140 mM NaCl,pH 7.4稀释1:4,随后将pH再调整至7.4,并且将溶液在37℃孵育20小时,随后以10,000 g离心10分钟,并且重悬浮于20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,140 mM NaCl,pH 7.4。术语“A $\beta$  (X-Y) 纤维”在本文中还包括包含A $\beta$  (X-Y) 亚单位的纤维,其中例如平均至少90%的亚单位具有A $\beta$  (X-Y) 类型,至少98%的亚单位具有A $\beta$  (X-Y) 类型,或非A $\beta$  (X-Y) 肽的含量低于检测阈值。更具体而言,术语“A $\beta$  (1-42) 纤维”在本文中指如实施例3中所述的A $\beta$  (1-42) 纤维制剂。

[0155] 有利地,本发明的A $\beta$ 结合蛋白以低亲和力与一种或两种纤维结合,例如具有 $1 \times 10^{-8}$  M的K<sub>D</sub>或更小的亲和力,例如具有 $3 \times 10^{-8}$  M的K<sub>D</sub>或更小的亲和力,具有 $1 \times 10^{-7}$  M的K<sub>D</sub>或更小的

亲和力,例如具有 $3 \times 10^{-7}$  M的 $K_D$ 或更小的亲和力,或具有 $1 \times 10^{-6}$  M的 $K_D$ 或更小的亲和力,例如具有 $3 \times 10^{-5}$  M的 $K_D$ 或更小的亲和力,或具有 $1 \times 10^{-5}$  M的 $K_D$ 或更小的亲和力。

[0156] 根据本发明的一个方面,本发明的A $\beta$ 结合蛋白与A $\beta$  (20-42) 球聚体的结合亲和力是A $\beta$ 结合蛋白与一种或两种纤维的结合亲和力的至少2倍,例如至少3倍或至少5倍、至少10倍,例如至少20倍、至少30倍或至少50倍、至少100倍,例如至少200倍、至少300倍或至少500倍、至少1,000倍,例如至少2,000倍、至少3,000倍或至少5,000倍、至少10,000倍,例如至少20,000倍、至少30,000或至少50,000倍,或至少100,000倍高。

[0157] 根据特定实施方案,本发明涉及对于单体和纤维形式的A $\beta$ 具有对于至少一种A $\beta$ 球聚体特别是A $\beta$  (20-42) 球聚体比较小的亲和力的A $\beta$ 结合蛋白。这些A $\beta$ 结合蛋白有时称为球聚体特异性A $\beta$ 结合蛋白。

[0158] 本发明的结合蛋白包括与例如竞争抗体例如m266和3D6相比较,占优势地识别A $\beta$  (20-42) 球聚体形式而不是A $\beta$  (1-40) 单体、A $\beta$  (1-42) 单体、A $\beta$ 纤维或sAPP (即,不溶性A $\beta$ 前体) 的标准制剂的球聚体特异性结合蛋白。对于球聚体的此类特异性是重要的,因为用本发明的结合蛋白特异性靶向球聚体形式的A $\beta$ 将: 1) 避免靶向不溶性淀粉样蛋白沉淀物,与该沉淀物的结合将解释在用不溶性A $\beta$ 的免疫接种过程中观察到的炎症副作用; 2) 据报道具有识别前 (precognitive) 生理功能的多余A $\beta$ 单体和APP (Plan等人, J Neurosci 23:5531-5535, 2003; 和3) 增加抗体的生物利用度,因为它通过与不溶性沉淀物的广泛结合将是不被遮蔽或无法接近的。

[0159] PF-4是属于CXC趋化因子家族的小的、70氨基酸细胞因子,并且也称为趋化因子(C-X-C基序) 配体4 (CXCL4)。PF-4在血小板聚集过程中从活化血小板的 $\alpha$ -颗粒中释放,并且通过调节肝素样分子的效应促进血液凝固。由于这些功能,预测它涉及伤口修复和炎症(Eismann等人, Blood 76 (2):336-44, 1990)。PF-4通常在具有蛋白聚糖的复合物中发现,并且可以与抗凝剂肝素形成复合物,其作为血栓形成的药理学治疗使用。它在肝素诱导的血小板减少症(HIT)中具有充分描述的病理学功能,所述HIT是对于抗凝剂肝素施用的特异性自身免疫反应(Warkentin, N. Engl. J. Med. 356 (9):891-3, 2007),其中肝素:PF4复合物是抗原。PF4自身抗体也已在患者中发现,所述患者具有血栓形成并且特征类似HIT但无肝素的先前施用(Warkentin等人, Am. J. Med. 121 (7):632-6, 2008)。肝素诱导的血小板减少症的特征在于血小板减少症的发展(低血小板计数),并且另外HIT倾向于血栓形成。考虑到PF-4在病理过程中的这些功能和牵涉,可以得出结论施用显示与受试者中存在的PF-4的结合(例如交叉反应性)的结合蛋白(例如抗体)可以影响所述PF-4功能,且从而导致不良(副)作用。此类不良作用的程度和性质可以取决于参数而改变,例如在PF-4上的表位的定位和大小、各自的结合蛋白的结合强度和性质。

[0160] 根据本发明的一个方面,本发明的结合蛋白未显示与血小板因子4 (PF-4) 的结合或显示低结合。与PF-4的所述交叉反应可以通过使用标准化体外免疫测定例如ELISA、斑点印迹或BIAcore分析进行评价。

[0161] 根据特定实施方案,本文定义的结合蛋白与PF-4的交叉反应指通过下述获得的关于所述结合蛋白和参考抗PF-4抗体的值的比: (i) 用约1:3.16到约1:3160 (最终血浆稀释度) 的人或食蟹猴血浆的~1:3稀释系列进行夹心ELISA (例如如实施例4.1和4.2中所述), (ii) 针对对数转化的血浆稀释度(x轴) 标绘检测到的信号(y轴), 和 (iii) 由在测量范围中



(约1:3.16到约1:3160的最终血浆稀释度)的这些非曲线拟合的数据测定曲线下面积(AUC,或总峰面积)。根据本发明的特定实施方案,通过夹心ELISA测定与PF-4的交叉反应包括下述:特定量的在研究下的结合蛋白或参考抗PF-4抗体或方便地其合适稀释物,例如100  $\mu$ l溶于100 mM碳酸氢钠pH 9.6中的10  $\mu$ g/ml结合蛋白或抗体溶液用于包被蛋白吸收微量滴定板的孔;随后将板洗涤,封闭且再次洗涤;随后与约1:3.16到约1:3160(最终血浆稀释度)的食蟹猴或人血浆,例如用人PF-4掺料的人血浆的~1:3稀释系列接触,随后为例如借助于PF-4特异性一抗、酶缀合的二抗和比色反应,检测与每个孔结合的PF-4。

[0162] 如本文使用的,“参考抗PF-4抗体”是与PF-4特别是人(HPF4)特异性反应的抗体,特别是单克隆抗体。此类抗体可通过下述获得:提供包含人PF-4的抗原,例如具有氨基酸序列EAEEDGDLQCLCVKTTSQVRPRHITSLEVIKAGPHCPTAQLIATLKNRGIKICLDLQAPLYKKIIKKLLES (SEQ ID NO:70)的人PF-4,使抗体储库暴露于所述抗原且从所述抗原储库中选择与人PF-4特异性结合的抗体。抗体可以任选是使用免疫原(人PF-4)亲和力纯化的。此类参考抗PF4抗体是商购可得的,例如单克隆抗HPF4抗体,Abcam目录号:ab49735。

[0163] 根据另一个特定实施方案,本文定义的结合蛋白与PF-4的交叉反应指通过下述获得的关于所述结合蛋白和参考抗PF-4抗体的AUC值的比:(i)用人或食蟹猴血浆以及约10 ng/ml到约10000 ng/ml(终浓度)的结合蛋白和参考抗PF-4抗体的~1:3稀释系列进行比对夹心ELISA(例如如实施例4.3和4.4中所述),(ii)针对对数转化的结合蛋白或参考抗PF-4抗体浓度(x轴)标绘检测到的信号(y轴),和(iii)由在测量范围中(约10 ng/ml到约10000 ng/ml的结合蛋白或参考抗-PF-4抗体浓度)的这些非曲线拟合的数据测定曲线下面积(AUC,或峰总面积)。根据本发明的特定实施方案,通过比对夹心ELISA测定与PF-4的交叉反应包括下述:用特定量的适合于捕获在研究下的结合蛋白和参考抗PF-4抗体的比对抗体,例如100  $\mu$ l/孔的50  $\mu$ g/ml Fc特异性抗小鼠IgG,Sigma目录号:M3534的100 mM碳酸氢钠pH 9.6溶液)包被蛋白吸收微量滴定板的孔;随后将板洗涤,封闭且再次洗涤;随后与约10 ng/ml到约10000 ng/ml(终浓度)的在研究下的结合蛋白或参考抗PF-4抗体的~1:3稀释系列接触;在另一个洗涤步骤后,使板与例如1:10稀释的人或食蟹猴血浆,例如用人PF-4掺料的人血浆接触,随后为例如借助于PF-4特异性一抗、酶缀合的二抗和比色反应,检测与板结合的PF-4。

[0164] 根据本发明的一个方面,当如本文描述的经由夹心ELISA用食蟹猴血浆分析时,本发明的4C9-型结合蛋白如本文描述与PF-4的交叉反应小于参考抗PF-4抗体的相应交叉反应,例如小至少2倍、至少5倍、至少10倍、至少15倍、至少20倍、至少30倍或至少40倍;和/或当如本文描述的经由夹心ELISA用人血浆分析时,小于参考抗PF-4抗体的相应交叉反应,例如小至少2倍、至少5倍、至少10倍、至少15倍、至少20倍、至少30倍或至少40倍。

[0165] 根据本发明的一个进一步方面,当如本文描述的经由比对夹心ELISA用食蟹猴血浆分析时,本发明的4C9-型结合蛋白如本文描述与PF-4的交叉反应小于参考抗PF-4抗体的相应交叉反应,例如小至少2倍、至少5倍、至少10倍、至少20倍、至少50倍、至少80倍、至少120倍或至少160倍;和/或当如本文描述的经由比对夹心ELISA用人血浆分析时,小于参考抗PF-4抗体的相应交叉反应,例如小至少2倍、至少10倍、至少50倍、至少100倍或至少200倍。

[0166] 根据本发明的另一个方面,当如本文描述的经由夹心ELISA和比对夹心ELISA用食



蟹猴血浆分析时,本发明的4C9-型结合蛋白如本文描述与PF-4的交叉反应小于参考抗PF-4抗体的相应交叉反应,例如小至少2倍、至少5倍、至少10倍、至少15倍、至少20倍、至少30倍或至少40倍。

[0167] 根据本发明的另一个方面,当如本文描述的经由夹心ELISA和比对夹心ELISA用人血浆分析时,本发明的4C9-型结合蛋白如本文描述与PF-4的交叉反应小于参考抗PF-4抗体的相应交叉反应,例如小至少2倍、至少5倍、至少10倍、至少15倍、至少20倍、至少30倍或至少40倍。

[0168] 根据本发明的另一个方面,当如本文描述的经由夹心ELISA和比对夹心ELISA用食蟹猴和人血浆分析时,本发明的4C9-型结合蛋白如本文描述与PF-4的交叉反应小于参考抗PF-4抗体的相应交叉反应,例如小至少2倍、至少5倍、至少10倍、至少15倍、至少20倍、至少30倍或至少40倍。

[0169] 根据本发明的一个方面,当如本文描述的经由夹心ELISA用食蟹猴血浆分析时,本发明的10B3-型结合蛋白如本文描述与PF-4的交叉反应小于参考抗PF-4抗体的相应交叉反应,例如小至少2倍、至少5倍、至少10倍、至少15倍、至少20倍或至少25倍;和/或当经由夹心ELISA用人血浆分析时,小于参考抗PF-4抗体的相应交叉反应,例如小至少2倍、至少5倍、至少15倍、至少20倍或至少25倍。

[0170] 根据本发明的一个进一步方面,当如本文描述的经由比对夹心ELISA用食蟹猴血浆分析时,本发明的10B3-型结合蛋白如本文描述与PF-4的交叉反应小于参考抗PF-4抗体的相应交叉反应,例如小至少2倍、至少4倍、至少6倍、至少8倍、至少10倍、至少20倍、至少40倍或至少80倍;和/或当如本文描述的经由比对夹心ELISA用人血浆分析时,小于参考抗PF-4抗体的相应交叉反应,例如小至少2倍、至少10倍、至少20倍、至少40倍或至少70倍。

[0171] 根据本发明的另一个方面,当如本文描述的经由夹心ELISA和比对夹心ELISA用食蟹猴血浆分析时,本发明的10B3-型结合蛋白如本文描述与PF-4的交叉反应小于参考抗PF-4抗体的相应交叉反应,例如小至少2倍、至少4倍、至少5倍、至少6倍、至少8倍或至少10倍。

[0172] 根据本发明的另一个方面,当如本文描述的经由夹心ELISA和比对夹心ELISA用人血浆分析时,本发明的10B3-型结合蛋白如本文描述与PF-4的交叉反应小于参考抗PF-4抗体的相应交叉反应,例如小至少2倍、至少5倍、至少10倍、至少15倍、至少20倍或至少25倍。

[0173] 根据本发明的另一个方面,当如本文描述的经由夹心ELISA和比对夹心ELISA用食蟹猴和人血浆分析时,本发明的10B3-型结合蛋白如本文描述与PF-4的交叉反应小于参考抗PF-4抗体的相应交叉反应,例如小至少2倍、至少4倍、至少5倍、至少6倍、至少8倍或至少10倍。

[0174] 如本文使用的术语“多肽”指氨基酸的任何聚合链。术语“肽”和“蛋白”与术语多肽可互换使用,并且也指氨基酸的聚合链。术语“多肽”包含天然或人工蛋白、蛋白片段和蛋白序列的多肽类似物。多肽可以是单体或聚合的。

[0175] 术语“分离的蛋白”或“分离的多肽”是此类蛋白或多肽,由于其起源或衍生来源,不与在其自然状态伴随其的天然结合的组分结合;基本上不含来自相同物种的其他蛋白;通过来自不同物种的细胞表达;或在自然界中不出现。因此,化学合成或在不同于它天然源于其的细胞的细胞系统中合成的多肽是与其天然结合的组分“分离的”。蛋白还可以使用本领域众所周知的蛋白纯化技术,通过分离致使基本上不含天然结合的组分。

[0176] 如本文使用的,术语“回收”指例如使用本领域众所周知的蛋白纯化技术,通过分离致使化学种类例如多肽基本上不含天然结合的组分的过程。

[0177] 如本文使用的,提及抗体、蛋白或肽与第二种化学种类的相互作用中的术语“特异性结合”意指该相互作用取决于在化学种类上特定结构(例如抗原决定簇或表位)的存在;例如抗体识别且结合特异性蛋白结构而不是一般的蛋白。如果抗体对于表位“A”是特异性的,那么在含有标记的“A”和抗体的反应中含有表位A(或游离的、未标记的A)的分子的存在将减少与抗体结合的标记的A的量。

[0178] 如本文使用的,术语“抗体”泛指由四条多肽链(两条重(H)链和两条轻(L)链)组成的任何免疫球蛋白(Ig)分子,或其任何功能片段、突变体、变体或衍生物,其保留Ig分子的基本表位结合特征。此类功能片段、突变体、变体或衍生抗体形式是本领域已知的。其非限制性实施方案在下文讨论。如本文使用的,“全长抗体”指包含四条多肽链(两条重链和两条轻链)的Ig分子。链通常经由二硫键彼此连接。每条重链包含重链可变区(在本文中缩写为HCVR或VH)和重链恒定区。重链恒定区包含三个结构域:CH1、CH2和CH3。每条轻链包含轻链可变区(在本文中缩写为LCVR或VL)和轻链恒定区。轻链恒定区包含一个结构域:CL。VH和VL区可以进一步再分成称为互补性决定区(CDR)的高变区,由称为构架区(FR)的更保守区域点缀。每个VH和VL由三个CDRs和四个FRs组成,从氨基末端到羧基末端以下述次序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。免疫球蛋白分子可以具有任何类型(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类别(例如IgG 1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或亚类。

[0179] 如本文使用的,术语抗体的“抗原结合部分”(或简单地“抗体部分”)、抗体的“抗原结合部分”(或简单地“抗体部分”)指抗体的一种或多种片段,其保留与抗原(例如,AB(20-42)球聚体)特异性结合的能力,即是抗体的功能片段。已显示抗体的抗原结合功能可以通过全长抗体的一种或多种片段行使。此类抗体实施方案还可以是双特异性、双重特异性或多特异性的,与两种或更多种不同抗原特异性结合。术语抗体的“抗原结合部分”内包含的结合片段的例子包括(i) Fab片段,由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段;(ii) F(ab')<sub>2</sub>片段,包含在铰链区通过二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段;(iii) 由VH和CH1结构域组成的Fd片段;(iv) 由抗体单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段,(v) 包含单一可变结构域的dAb片段(通过引用并入本文的Ward等人,Nature 341:544-546,1989;Winter等人,WO 90/05144 A1);和(vi) 分离的互补决定区(CDR)。此外,尽管Fv片段的两个结构域VL和VH由分开的基因编码,但它们可以使用重组方法通过合成接头进行连接,所述合成接头使得它们能够制备为单条蛋白链,其中VL和VH区配对以形成单价分子(称为单链Fv(scFv);参见例如,Bird等人,Science 242:423-426,1988;和Huston等人,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883,1988)。此类单链抗体也包含在术语抗体的“抗原结合部分”内。还包含其他形式的单链抗体,例如双抗体。双抗体是二价、双特异性抗体,其中VH和VL结构域在单条多肽链上表达,但使用太短而不允许相同链上的两个结构域之间配对的接头,从而迫使结构域与另一条链的互补结构域配对,并且产生两个抗原结合位点(参见例如,Holliger等人,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448,1993;Poljak等人,Structure 2:1121-1123,1994)。此类抗原结合部分是本领域已知的(Kontermann和Dubel编辑,Antibody Engineering,Springer-Verlag. New York. 790 第2001页,ISBN 3-540-41354-5)。

[0180] 如本文使用的,术语“抗体”还包含抗体构建体。如本文使用的术语“抗体构建体”

指包含与接头多肽或免疫球蛋白恒定结构域连接的本发明的一个或多个抗原结合部分。接头多肽包含通过肽键连接的两个或更多个氨基酸残基,并且用于连接一个或多个抗原结合部分。此类接头多肽是本领域众所周知的(参见例如,Holliger等人,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448,1993;Poljak等人,Structure 2:1121-1123,1994)。

[0181] 免疫球蛋白恒定结构域指重或轻链恒定结构域。人IgG重链和轻链恒定结构域氨基酸序列是本领域已知的并且在表1中表示。

[0182] 表1:人IgG重链恒定结构域和轻链恒定结构域的序列

[0183]

蛋白	序列标识符	序列
		123456789012345678901234567890
Ig Y-1 恒定区	SEQ ID NO:41	ASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
Ig Y-1 恒定区 突变体	SEQ ID NO:42	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
Ig κ 恒定区	SEQ ID NO:43	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
Ig λ 恒定区	SEQ ID NO:44	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLIS DFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQ SNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTH EGSTVEKTVAPTECS

[0184] 再进一步地,本发明的结合蛋白(例如抗体)可以通过本发明的结合蛋白与一种或多种其他蛋白或肽的共价或非共价结合形成的较大免疫粘附分子的部分。此类免疫粘附分子的例子包括链霉抗生物素蛋白核心区的使用,以制备四聚scFv分子(Kipriyanov等人, Human Antibodies and Hybridomas 6:93-101,1995),以及半胱氨酸残基、标记肽和C末端多组氨酸标签的使用,以制备二价和生物素化的scFv分子(Kipriyanov等人, Mol. Immunol. 31:1047-1058,1994)。抗体部分例如Fab和F(ab')<sub>2</sub>片段可以使用常规技术由完

整抗体制备,例如完整抗体分别的木瓜蛋白酶或胃蛋白酶消化。此外,抗体、抗体部分和免疫粘附分子可以如本文描述的使用标准重组DNA技术获得。

[0185] 如本文使用的,“分离抗体”意指基本上不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体。然而,特异性结合A $\beta$  (20-42) 球聚体的分离抗体可以具有与其他抗原例如A $\beta$ 球聚体例如A $\beta$  (12-42) 球聚体或其他A $\beta$ 形式的交叉反应性。此外,分离抗体可以基本上不含其他细胞材料和/或化学制品和/或任何其他的靶向A $\beta$ 形式。

[0186] 本发明的分离的抗体包括单克隆抗体。如本文使用的,“单克隆抗体”意指抗体分子的制备物,与含有不同氨基酸序列的抗体混合物的“多克隆”抗体制备物相比,所述抗体享有共同的重链和共同的轻链氨基酸序列。单克隆抗体可以通过几种新技术,如噬菌体、细菌、酵母或核糖体展示,以及通过由源自杂交瘤的抗体(例如由通过杂交瘤技术,如标准的Kohler和Milstein杂交瘤方法((1975) Nature 256:495-497) 制备的杂交瘤分泌的抗体)所例证的经典方法来生成。因此,具有相同序列的非源自杂交瘤的抗体在本文仍然称为单克隆抗体,尽管它可能已通过非经典方法获得,术语“单克隆”不限于源自杂交瘤的抗体,但用来指所有源自一种核酸克隆的抗体。

[0187] 因此,本发明的单克隆抗体包括重组抗体。术语“重组”在本文中是指例如通过化学合成或通过基因工程技术操作分离的核酸区段的两个否则分离的序列区段的任何人工组合。具体而言,术语“重组抗体”是指通过重组方法生产、表达、生成或分离的抗体,如使用转染进宿主细胞中的重组表达载体表达的抗体;从重组组合抗体文库分离的抗体;从由于人免疫球蛋白基因导致的转基因动物(例如小鼠)中分离的抗体(参见,例如,Taylor, L.D., 等人.(1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295);或以任何其他方式(其中将特定免疫球蛋白基因序列(如人免疫球蛋白基因序列)与其他DNA序列装配在一起)生产、表达、生成或分离的抗体。重组抗体包括,例如,嵌合抗体,CDR嫁接抗体和人源化抗体。本领域技术人员将意识到,常规源自杂交瘤的单克隆抗体在异源系统中的表达将需要生成重组抗体,即使获得的抗体蛋白的氨基酸序列没有改变或没有意欲改变。

[0188] 如本文使用的,术语“鼠抗体”预期包括具有衍生自鼠种系免疫球蛋白序列的可变和恒定区的抗体。本发明的鼠抗体可以包括例如在CDRs且特别是CDR3中,不由鼠种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,在体外通过随机或定点诱变或在体内通过体细胞突变引入的突变)。

[0189] 如本文使用的,术语“人抗体”预期包括具有衍生自人种系免疫球蛋白序列的可变和恒定区的抗体。本发明的人抗体可以包括例如在CDRs且特别是CDR3中,不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,在体外通过随机或定点诱变或在体内通过体细胞突变引入的突变)。然而,如本文使用的,术语“人抗体”不预期包括其中衍生自另一个哺乳动物物种例如小鼠的种系的CDR序列已嫁接到人构架序列上的抗体。

[0190] 如本文使用的,术语“重组人抗体”预期包括通过重组方法制备、表达、产生或分离的所有人抗体,例如使用转染到宿主细胞内的重组表达载体表达的抗体(在下文章节B中进一步描述),从重组、组合人抗体文库中分离的抗体(Hoogenboom, TIB Tech. 15:62-70, 1997; Azzazy和Highsmith, Clin. Biochem. 35:425-445, 2002; Gavilondo J.V.和Larrick J.W. (2002) BioTechniques 29:128-145; Hoogenboom H.和Chames P. (2000) Immunology Today 21:371-378),从对于人免疫球蛋白基因是转基因的动物(例如小鼠)中分离的抗体

(参见例如Taylor, L. D.等人(1992) *Nucl. Acids Res.* 20:6287-6295; Kellermann S-A.和Green L.L. (2002) *Current Opinion in Biotechnology* 13:593-597; Little M.等人(2000) *Immunology Today* 21:364-370), 或通过涉及使人免疫球蛋白基因序列与其他DNA序列剪接的任何其他方法制备、表达、产生或分离的抗体。此类重组人抗体具有衍生自人种系免疫球蛋白序列的可变和恒定区。然而, 在某些实施方案中, 对此类重组人抗体实施体外诱变(或, 当使用对于人Ig序列转基因的动物时, 体内体细胞诱变), 且因此重组抗体的VH和VL区的氨基酸序列是此类序列, 其尽管衍生自人种系VH和VL序列且与人种系VH和VL序列相关, 但可能在体内的人抗体种系谱内并非天然存在。

[0191] 术语“嵌合抗体”指包含来自一个物种的重和轻链可变区序列以及来自另一个物种的恒定区序列的抗体, 例如具有与人恒定区连接的鼠重和轻链可变区的抗体。

[0192] 术语“CDR嫁接的抗体”指包含来自一个物种的重和轻链可变区序列的抗体, 但其中VH和/或VL的一个或多个CDR区域的序列用另一个物种的CDR序列替换, 例如具有鼠CDRs(例如CDR3)的抗体, 其中一个或多个鼠可变重和轻链区已用人可变重和轻链序列替换。

[0193] 术语“Kabat编号”、“Kabat定义”和“Kabat标记”在本文中可互换使用。本领域公认的这些术语指氨基酸残基编号系统, 所述氨基酸残基比抗体或其抗原结合部分的重和轻链可变区中的其他氨基酸残基更可变(即高变) (Kabat等人(1971) *Ann. NY Acad. Sci.* 190:382-391和Kabat, E.A.等人(1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第五版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH公开号91-3242)。对于重链可变区, 高变区对于CDR1为氨基酸位置31-35, 对于CDR2为氨基酸位置50-65, 且对于CDR3为氨基酸位置95-102。对于轻链可变区, 高变区对于CDR1为氨基酸位置24-34, 对于CDR2为氨基酸位置50-56, 且对于CDR3为氨基酸位置89-97。

[0194] 如本文使用的, 术语“受体(acceptor)”和“受体抗体”指提供或编码一个或多个构架区的至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%氨基酸序列的抗体或核酸序列。在一些实施方案中, 术语“受体”指提供或编码一个或多个恒定区的抗体氨基酸或核酸序列。在另外一个实施方案中, 术语“受体”指提供或编码一个或多个构架区和一个或多个恒定区的抗体氨基酸或核酸序列。在特定实施方案中, 术语“受体”指提供或编码一个或多个构架区的至少80%, 例如至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%氨基酸序列的人抗体氨基酸或核酸序列。根据这个实施方案, 受体可以含有至少1、至少2、至少3、至少4、至少5或至少10个氨基酸残基, 其在人抗体的一个或多个特异性位置上不出现。受体构架区和/或一个或多个受体恒定区可以例如衍生自或得自种系抗体基因、成熟抗体基因、功能抗体(例如本领域众所周知的抗体、在开发中的抗体或商购可得的抗体)。

[0195] 如本文使用的, 术语“CDR”指在抗体可变序列内的互补性决定区。在重链和轻链的每个可变区中存在三个CDRs, 所述CDRs对于每个可变区命名为CDR1、CDR2和CDR3。如本文使用的, 术语“CDR组”指在能够结合抗原的单一可变区中出现的三个CDRs的组。这些CDRs的确切边界已根据不同系统不同地限定。由Kabat (Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) 和(1991))描述的系统, 不仅提供了可应用于抗体的任何可变区的明确残基编号系统, 还提供了限定三个CDRs的精确残基边界。这些CDRs可以被称为Kabat CDRs。Chothia和同事(Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987) 和Chothia等人, *Nature* 342:877-

883 (1989)) 发现Kabat CDRs内的某些亚部分采取几乎相同的肽主链构象, 尽管在氨基酸序列水平上具有大的多样性。这些亚部分命名为L1、L2和L3或H1、H2和H3, 其中“L”和“H”分别指轻链和重链区域。这些区域可以被称为Chothia CDRs, 所述Chothia CDRs具有与Kabat CDRs重叠的边界。与Kabat CDRs重叠的限定CDRs的其他边界已由Padlan (FASEB J. 9:133-139 (1995)) 和MacCallum (J Mol Biol 262 (5):732-45 (1996)) 描述。再其他的CDR边界定义可能不严格地遵循上述系统之一, 但仍将与Kabat CDRs重叠, 尽管按照特定残基或残基组或甚至整个CDRs并不显著影响抗原结合的预测或实验发现, 它们可以缩短或加长。本文使用的方法可以利用根据这些系统中的任何一种限定的CDRs, 特定实施方案使用Kabat或Chothia限定的CDRs。

[0196] 如本文使用的, 术语“规范”残基指在CDR或构架中限定特定规范CDR结构的残基, 如通过Chothia 等人 (J. Mol. Biol. 196:901-907 (1987); Chothia等人, J. Mol. Biol. 227:799 (1992), 两者都通过引用并入本文) 限定的。根据Chothia等人, 许多抗体的CDRs的关键部分具有几乎相同的肽主链构象, 尽管在氨基酸序列水平上的极大多样性。每个规范结构主要为形成环的氨基酸残基的邻接区段限定了一组肽主链扭转角。

[0197] 如本文使用的, 术语“供体”和“供体抗体”指提供一个或多个CDRs的抗体。在一个实施方案中, 供体抗体是来自与由其获得或衍生构架区的抗体不同的物种的抗体。在人源化抗体的背景中, 术语“供体抗体”指提供一个或多个CDRs的非人抗体。

[0198] 如本文使用的, 术语“构架”或“构架序列”指减去CDRs的可变区的剩余序列。因为CDR序列的确切定义可以由不同系统来决定, 所以对构架序列的含义进行相应不同的解释。六个CDRs (轻链的CDR-L1、-L2和-L3, 以及重链的CDR-H1、-H2和-H3) 也将轻链和重链上的构架区分成在每条链上的四个亚区 (FR1、FR2、FR3和FR4), 其中CDR1位于FR1和FR2之间, CDR2位于FR2和FR3之间, 且CDR3位于FR3和FR4之间。不将特定亚区指定为FR1、FR2、FR3或FR4, 如其他人提及的, 构架区代表单条天然存在的免疫球蛋白链可变区内的组合FR's。如本文使用的, FR代表四个亚区之一, 且FRs代表构成构架区的四个亚区中的两个或更多。

[0199] 人重链和轻链受体序列是本领域已知的。在本发明的一个实施方案中, 人重链和轻链受体序列选自与表2A和表2B中所述的序列至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或至少相同的序列。

[0200] 表2A: 对于4C9-型的重链和轻链受体序列

[0201]

SEQ ID NO	蛋白区域	序列
		123456789012345678901234567890
50	VH1_69/JH4 FR1	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFS
51	VH1_69/JH4 FR2	WVRQAPGQGLEWMG
52	VH1_69/JH4 FR3	RVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYC AR
53	VH1_69/JH4 FR4	WGQGTLVTVSS
54	VH7_4.1/JH4 FR1	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFT
55	VH7_4.1/JH4 FR2	WVRQAPGQGLEWMG
56	VH7_4.1/JH4 FR3	RFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAED TAVYYC AR
57	VH7_4.1/JH4 FR4	WGQGTLVTVSS
58	1-16/L1/JK2 FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC
59	1-16/L1/JK2 FR2	WFQQKPGKAPKSLIY
60	1-16/L1/JK2 FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY YC
61	1-16/L1/JK2 FR4	FGQGTKLEIK

[0202] 表2B: 对于10B3-型的重链和轻链受体序列

[0203]

SEQ ID NO	蛋白区域	序列
		123456789012345678901234567890
62	VH3-48/JH4 FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
63	VH3-48/JH4 FR2	WVRQAPGKGLEWVS
64	VH3-48/JH4 FR3	RFTISRDNKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCA R
65	VH3-48/JH4 FR4	WGQGTLVTVSS
66	4-1/B3/JK4 FR1	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC
67	4-1/B3/JK4 FR2	WYQQKPGQPPLLIY
68	4-1/B3/JK4 FR3	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYY C
69	4-1/B3/JK4 FR4	FGGGTKVEIK

[0204] 如本文使用的,术语“种系抗体基因”或“基因片段”指由非淋巴样细胞编码的免疫球蛋白序列,所述非淋巴样细胞尚未经过成熟过程,所述成熟过程导致用于表达特定免疫球蛋白的遗传重排和突变(参见例如,Shapiro等人,Crit. Rev. Immunol. 22(3):183-200(2002);Marchalonis等人,Adv Exp Med Biol. 484:13-30(2001))。由本发明的各种实施方案提供的优点之一源于下述认识:种系抗体基因比成熟抗体基因更可能保存物种中个体特有的基本氨基酸序列结构,因此当在那个物种中治疗上使用时,被识别为来自外来来源的可能性更低。

[0205] 如本文使用的,术语“关键”残基指在可变区内对抗体特别是人源化抗体的结合特异性和/或亲和力具有更多影响的某些残基。关键残基包括但不限于下述中的一个或多个:与CDR接近的残基、潜在糖基化位点(可以是N或O-糖基化位点)、稀有残基、能够与抗原相互作用的残基、能够与CDR相互作用的残基、规范残基、在重链可变区和轻链可变区之间的接触残基、在Vernier区内的残基、和在可变重链CDR1的Chothia定义和第一个重链构架的Kabat定义之间重叠的区域中的残基。

[0206] 如本文使用的,术语“人源化抗体”是抗体或其变体、衍生物、类似物或部分,其与目的抗原免疫特异性结合,且包含基本上具有人抗体的氨基酸序列的构架(FR)区、和基本



上具有非人抗体的氨基酸序列的互补决定区 (CDR)。如此处使用的,在CDR上下文中的术语“基本上”指具有的氨基酸序列至少90%、至少95%、至少98%或至少99%相同于非人抗体CDR的氨基酸序列的CDR。人源化抗体包含基本上所有至少一个、且一般为2个可变结构域 (Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、FabC、Fv),其中所有或基本上所有CDR区对应非人免疫球蛋白(即,供体抗体)的那些,且所有或基本上所有构架区是人免疫球蛋白共有序列的那些。根据一个方面,人源化抗体也包含至少部分免疫球蛋白恒定区 (Fc),一般为人免疫球蛋白的那种。在一些实施方案中,人源化抗体包含轻链以及至少重链的可变结构域。抗体还可以包括重链的CH1、铰链、CH2、CH3、和CH4区。在一些实施方案中,人源化抗体只包含人源化轻链。在一些实施方案中,人源化抗体只包含人源化重链。在特定实施方案中,人源化抗体只包含轻链和/或重链的人源化可变结构域。

[0207] 人源化抗体可以选自任何种类的免疫球蛋白,包括IgM、IgG、IgD、IgA和IgE,和任何同种型,包括但不限于IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。人源化抗体可以包括来自超过一个种类或同种型的序列,并且可以使用本领域众所周知的技术选择特定恒定结构域,以最佳化所需效应子功能。

[0208] 人源化抗体的构架和CDR区无需精确对应于亲本序列,例如供体抗体CDR,或共有构架可以通过至少一个氨基酸残基的取代、插入和/或缺失进行诱变,从而使得在那个位点上的CDR或构架残基不对应于供体抗体或共有构架。然而,在一个实施方案中,此类突变将不是广泛的。通常,至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的人源化抗体残基将对应于亲本FR和CDR序列的那些。如本文使用的,术语“共有构架”指在共有免疫球蛋白序列中的构架区。如本文使用的,术语“共有免疫球蛋白序列”指由相关免疫球蛋白序列家族中最频繁出现的氨基酸(或核苷酸)形成的序列(参见例如,Winnaker, From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, 德国 1987))。在免疫球蛋白家族中,共有序列中的每个位置由家族中在那个位置上最频繁出现的氨基酸占据。如果两个氨基酸同样频繁出现,那么任一个可以包括在共有序列中。

[0209] 如本文使用的,“Vernier”区指可以调整CDR结构且精调与抗原的配合 (fit) 的构架残基的亚群,如通过Foote和Winter描述的 (1992, J. Mol. Biol. 224:487-499, 其通过引用并入本文)。Vernier区残基形成CDRs基础层,并且可以影响CDRs的结构和抗体的亲和力。

[0210] 如本文使用的,术语“抗体”还包含多价结合蛋白。术语“多价结合蛋白”在本说明书中用于指示包含两个或更多抗原结合位点的结合蛋白。多价结合蛋白经工程改造为具有三个或更多抗原结合位点,且一般不是天然存在的抗体。术语“多特异性结合蛋白”指能够结合两种或更多相关或无关靶的结合蛋白。如本文使用的双重可变结构域 (DVD) 结合蛋白是此类结合蛋白,其包含两个或更多抗原结合位点,且是四价或多价结合蛋白。此类DVDs可以是单特异性的,即能够结合一种抗原,或多特异性的,即能够结合两种或更多抗原。包含两条重链DVD多肽和两条轻链DVD多肽的DVD结合蛋白称为DVD-Ig。每一半DVD-Ig包含重链DVD多肽,和轻链DVD多肽,和两个抗原结合位点。每个结合位点包含重链可变结构域和轻链可变结构域,其中每个抗原结合位点总共6个与抗原结合有关的CDRs。DVD结合蛋白和制备DVD结合蛋白的方法公开于美国专利申请号11/507,050中且通过引用并入本文。

[0211] 术语“表位”包括能够与免疫球蛋白或T细胞受体特异性结合的任何多肽决定簇。在某些实施方案中,表位决定簇包括分子例如氨基酸、糖侧链、磷酸基、或磺酰基的化学活

性表面定组 (grouping), 且在某些实施方案中, 可以具有特定三维结构特征、和/或特定电荷特征。表位是由结合蛋白特别是抗体结合的抗原区域。在某些实施方案中, 当结合蛋白或抗体在蛋白和/或大分子复杂混合物中优先识别其靶抗原时, 其被说成特异性结合抗原。

[0212] 本发明的抗体的结合亲和力可以通过使用标准化体外免疫测定进行评估, 例如 ELISA、斑点印迹或 BIAcore 分析 (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, NJ)。关于进一步描述, 参见 Jönsson, U., 等人 (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51: 19-26; Jönsson, U., 等人 (1991) *Biotechniques* 11: 620-627; Johnsson, B., 等人 (1995) *J. Mol. Recognit.* 8: 125-131; 和 Johnsson, B., 等人 (1991) *Anal. Biochem.* 198: 268-277。

[0213] 根据一个特定实施方案, 本文定义的亲和力指通过进行斑点印迹且通过密度测定法评估其而获得的值。根据本发明的一个特定实施方案, 通过斑点印迹测定结合亲和力包括下述: 将特定量的抗原 (例如如上定义的  $\text{A}\beta$  (X-Y) 球聚体、 $\text{A}\beta$  (X-Y) 单体或  $\text{A}\beta$  (X-Y) 纤丝), 或方便地, 其例如在 20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、140 mM  $\text{NaCl}$ 、pH 7.4, 0.2 mg/ml BSA 中至例如 100 pmol/ $\mu\text{l}$ 、10 pmol/ $\mu\text{l}$ 、1 pmol/ $\mu\text{l}$ 、0.1 pmol/ $\mu\text{l}$  和 0.01 pmol/ $\mu\text{l}$  的抗原浓度的合适稀释物, 点在硝酸纤维素膜上, 随后用乳封闭膜以阻止非特异性结合, 并且洗涤, 随后与目的抗体接触, 随后借助于酶缀合的二抗和比色反应检测后者; 在限定抗原浓度下, 结合的抗体量允许亲和力测定。因此, 2 种不同抗体与 1 种靶或 1 种抗体与 2 种不同靶的相对亲和力, 在此处定义为在其他方面相同的斑点印迹条件下用 2 种抗体-靶组合观察到的靶结合抗体的分别量的关系。与基于蛋白印迹的相似方法不同, 斑点印迹方法将测定在给定靶的天然构型中抗体对于给定靶的亲和力; 与 ELISA 方法不同, 斑点印迹方法不具有在不同靶和基质之间的亲和力中的差异, 从而允许在不同靶之间的更精确比较。

[0214] 如本文使用的, 术语“表面等离振子共振”指通过检测生物传感器基质内的蛋白浓度改变, 例如使用 BIAcore 系统 (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, 瑞典和 Piscataway, NJ), 允许分析实时生物特异性相互作用的光学现象。关于进一步的描述, 参见 Jönsson, U., 等人 (1993) *Ann. Biol. Clin.*, 51: 19-26; Jönsson 等人, (1991) *BioTechniques*, 11: 620-627; Johnsson 等人, (1995) *J. Mol. Recognit.*, 8: 125-131; 和 Johnsson 等人 (1991) *Anal. Biochem.*, 198: 268-277。

[0215] 如本领域已知的, 如本文使用的术语“ $k_{\text{on}}$ ” (同样地, “ $K_{\text{on}}$ ”、“ $k_{\text{on}}$ ”、“ $K_{\text{on}}$ ”) 意指结合蛋白 (例如抗体) 与抗原结合以形成结合复合物例如抗体/抗原复合物的结合速率常数。也将“ $k_{\text{on}}$ ”称为术语“结合速率常数”或“ $k_{\text{a}}$ ”, 如此处可互换使用的。该值指示结合蛋白 (例如抗体) 与其靶抗原的结合速率、或结合蛋白 (例如抗体) 与抗原之间的复合物形成速率, 如由下列等式表示:

[0216] 抗体 (“Ab”) + 抗原 (“Ag”)  $\rightarrow$  Ab-Ag。

[0217] 如本领域已知的, 如本文使用的术语“ $k_{\text{off}}$ ” (同样地, “ $K_{\text{off}}$ ”、“ $k_{\text{off}}$ ”、“ $K_{\text{off}}$ ”) 意指结合蛋白 (例如抗体) 从结合复合物 (例如抗体/抗原复合物) 中解离的解离速率常数或“解离速率常数”。该值指示结合蛋白 (例如抗体) 从其靶抗原的解离速率、或 Ab-Ag 复合物随时间过去分离为游离抗体和抗原的解离速率, 其表示为下列等式:

[0218]  $\text{Ab} + \text{Ag} \leftarrow \text{Ab-Ag}$ 。

[0219] 如本文使用的术语“ $K_{\text{D}}$ ” (同样地, “ $K_{\text{d}}$ ”或“ $K_{\text{D}}$ ”) 意指“平衡解离常数”, 并指在滴定测量中在平衡时、或者通过将解离速率常数 ( $k_{\text{off}}$ ) 除以结合速率常数 ( $k_{\text{on}}$ ) 所获得的值。使用结

合速率常数 ( $k_{on}$ )、解离速率常数 ( $k_{off}$ ) 和平衡解离常数 ( $K_D$ ) 表示结合蛋白 (例如抗体) 对抗原的结合亲和力。确定结合和解离速率常数的方法是本领域众所周知的。使用基于荧光的技术提供了高灵敏度以及在生理缓冲液中在平衡时检查样品的能力。可以使用其他实验方法和仪器例如 BIAcore® (生物分子相互作用分析) 测定 (例如, 可以从 BIAcore International AB, a GE Healthcare company, Uppsala, 瑞典获得的仪器)。另外, 也可以使用可以从 Sapidyne Instruments (Boise, Idaho) 获得的 KinExA® (动态排阻测定 (Kinetic Exclusion Assay)) 测定。

[0220] 如本文使用的术语“标记的结合蛋白”指具有标记掺入的结合蛋白, 所述标记为结合蛋白提供鉴定。同样地, 如本文使用的术语“标记的抗体”指具有标记掺入的抗体, 所述标记为抗体提供鉴定。在一个方面, 标记是可检测标记, 例如, 掺入放射性标记的氨基酸或使生物素化 (biotinyl) 部分与多肽结合, 所述生物素化部分可以通过标记的抗生物素蛋白 (例如包含可以通过光学或比色法检测的荧光标记或酶促活性的链霉抗生物素蛋白) 进行检测。关于多肽的标记例子包括但不限于下述: 放射性同位素或放射性核素 (例如,  $^3H$ 、 $^{14}C$ 、 $^{35}S$ 、 $^{90}Y$ 、 $^{99}Tc$ 、 $^{111}In$ 、 $^{125}I$ 、 $^{131}I$ 、 $^{177}Lu$ 、 $^{166}Ho$  或  $^{153}Sm$ ); 荧光标记 (例如, FITC、罗丹明、镧系磷光体), 酶促标记 (例如, 辣根过氧化物酶、萤光素酶、碱性磷酸酶); 化学发光标记; 生物素化基团; 由次级报道分子识别的预定多肽表位 (例如, 亮氨酸拉链对序列、关于二抗的结合位点、金属结合结构域、表位标签); 和磁性试剂例如钆螯合物。

[0221] 如本文使用的, 术语“抗体”还包含抗体缀合物。术语“抗体缀合物”指与第二种化学部分例如治疗剂化学连接的结合蛋白例如抗体。

[0222] 术语“治疗剂”在本文中用于指示化学化合物、化学化合物的混合物、生物大分子、或由其为“认知增强药物”的生物学材料制备的提取物, 所述认知增强药物是改善受损的人脑认知能力 (即思考、学习和记忆) 的药物。认知增强药物通过改变神经化学物质 (例如神经递质、酶和激素) 的可用度、改善供氧、刺激神经生长或抑制神经损害来起作用。认知增强药物的例子包括增加乙酰胆碱的活性的化合物, 例如但不限于乙酰胆碱受体激动剂 (例如烟碱  $\alpha$ -7 受体激动剂或变构调节剂、 $\alpha$ 4 $\beta$ 2 烟碱受体激动剂或变构调节剂)、乙酰胆碱酯酶抑制剂 (例如多奈哌齐、利斯的明和加兰他敏)、丁酰胆碱酯酶抑制剂、N-甲基-D-天冬氨酸 (NMDA) 受体拮抗剂 (例如美金刚)、活性依赖性神经保护蛋白 (ADNP) 激动剂、血清素 5-HT<sub>1A</sub> 受体激动剂 (例如扎利罗登)、5-HT<sub>4</sub> 受体激动剂、5-HT<sub>6</sub> 受体拮抗剂、血清素 1A 受体拮抗剂、组胺 H<sub>3</sub> 受体拮抗剂、钙蛋白酶抑制剂、血管内皮生长因子 (VEGF) 蛋白或激动剂、营养生长因子、抗细胞凋亡化合物、AMPA 型谷氨酸受体激活物、L 型或 N 型钙通道阻滞剂或调节剂、钾通道阻滞剂、缺氧诱导因子 (HIF) 激活物、HIF 脯氨酰 4-羟化酶抑制剂、抗炎剂、淀粉样蛋白 A $\beta$  肽或淀粉样蛋白斑的抑制剂、 $\tau$  高磷酸化抑制剂、磷酸二酯酶 5 抑制剂 (例如他达拉非、西地那非)、磷酸二酯酶 4 抑制剂、单胺氧化酶抑制剂或其药学可接受的盐。此类认知增强药物的具体例子包括但不限于胆碱酯酶抑制剂例如多奈哌齐 (Aricept®)、利斯的明 (Exelon®)、加兰他敏 (Reminyl®)、N-甲基-D-天冬氨酸拮抗剂例如美金刚 (Namenda®)。

[0223] 如本文使用的, 术语“晶体”和“结晶的”指以晶体形式存在的结合蛋白 (例如抗体或其抗原结合部分)。晶体是物质固态的一种形式, 它不同于其他形式例如无定形固态或液晶态。晶体由规则、重复、三维排列的原子、离子、分子 (例如, 蛋白例如抗体)、或分子装配 (例如, 抗原/抗体复合物) 组成。这些三维排列根据本领域充分了解的特定数学关系排列。

晶体中重复的基本单位或构件被称为不对称单位。符合给定、明确的晶体学对称性的排列中的不对称单位重复提供了晶体的“晶胞 (unit cell)”。通过在所有3个维度中规则平移的晶胞重复提供了晶体。参见Giege, R. 和 Ducruix, A. Barrett, *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach*, 第2版, 第20 1-16页, Oxford University Press, New York, New York, (1999)。”。

[0224] 如本文使用的, 术语“中和”指当结合蛋白特异性结合所述A $\beta$ 形式时, 靶向A $\beta$ 形式的生物学活性的中和。例如, 中和结合蛋白是其与球聚体的A $\beta$  (20-42) 氨基酸区域 (和/或任何其他靶向A $\beta$ 形式) 的结合导致球聚体的生物学活性抑制的中和抗体。根据本发明的一个方面, 中和结合蛋白与球聚体的A $\beta$  (20-42) 区域 (和/或任何其他靶向A $\beta$ 形式) 结合, 且使靶向A $\beta$ 形式的生物学活性减少至少约20%、40%、60%、80%、85%或更多。靶向A $\beta$ 形式的生物学活性通过中和结合蛋白的抑制可以通过测量本领域众所周知的靶向A $\beta$ 形式生物学活性的一种或多种指示剂进行评估, 例如靶向A $\beta$ 形式与P/Q型电压门控的突触前钙通道的相互作用 (例如结合)、P/Q型电压门控的突触前钙通道活性的抑制、通过P/Q型电压门控的突触前钙通道的Ca<sup>++</sup>流量、局部 (例如细胞内) Ca<sup>++</sup>浓度、突触活性。

[0225] 术语“活性”包括活性例如结合蛋白特别是抗体对于抗原例如A $\beta$  (20-42) 球聚体 (和任何其他靶向A $\beta$ 形式) 的结合特异性/亲和力; 和/或抗体例如其与靶向A $\beta$ 形式的结合抑制靶向A $\beta$ 形式的生物学活性的抗体的中和效力。所述靶向A $\beta$ 形式的生物学活性包含A $\beta$ 形式与P/Q型电压门控的突触前钙通道的相互作用, 这导致所述钙通道活性的抑制。

[0226] 本发明还提供了编码本发明的结合蛋白的分离核苷酸序列。本发明提供了具有此类序列的那些核苷酸序列 (或其片段), 所述序列包含与这些编码核苷酸序列至少约70% (例如70% 71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%或79%)、至少约80% (例如80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%或89%)、或至少约90% (例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性、与其对应、相同、可杂交或互补。(在70%和100%之间且包括70%和100%的所有整数 (及其部分) 就同一性百分比而言视为在本发明的范围内)。此类序列可以衍生自任何来源 (例如从天然来源中分离、经由半合成途径产生或重新合成)。特别地, 此类序列可以从除了实施例所述以外的来源 (例如细菌、真菌、藻类、小鼠或人) 分离或衍生。

[0227] 为了本发明的目的, 核苷酸序列的“片段”定义为对应于指定核苷酸序列的区域, 大约至少6个、例如至少约8、至少约10个核苷酸或至少约15个核苷酸的邻接序列。

[0228] 术语“同一性”指经过特定比较窗或区段在逐个核苷酸的基础上两个序列的关联性。因此, 同一性定义为在两个DNA区段 (或两个氨基酸序列) 的相同链 (有义或反义) 之间的相同、对应或等价程度。“序列同一性百分比”通过下述计算: 经过特定区域比较两个最佳比对的序列, 测定在其上相同碱基或氨基酸在两个序列中出现的位置数目, 以便获得匹配位置数目, 将此类位置数目除以待比较的区段中的位置总数目, 并且将结果乘以100。序列的最佳比对可以通过下述进行: Smith & Waterman, *Appl. Math.* 2:482, 1981的算法, Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443, 1970的算法, Pearson & Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 85:2444, 1988的方法, 和执行有关算法的计算机程序 (例如 Clustal Macaw Pileup (<http://cmgm.stanford.edu/biochem218/11Multiple.pdf>; Higgins等人, *CABIOS*. 5L151-153, 1989)、FASTDB (Intelligenetics)、BLAST (National Center for Biomedical Information; Altschul等人, *Nucleic Acids Research* 25:

3389-3402,1997)、PILEUP (Genetics Computer Group, Madison, WI) 或GAP、BESTFIT、FASTA 和TFASTA (Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, Madison, WI))。(参见美国专利号5,912,120)。

[0229] 为了本发明的目的,“互补性”定义为在两个DNA区段之间的关联性程度。它通过在合适条件下测量一个DNA区段的有义链与另一个DNA区段的反义链杂交以形成双螺旋的能力进行测定。“互补体”定义为基于规范碱基配对规则其与给定序列配对的序列。例如,在一条核苷酸链中的序列A-G-T与另一条链中的T-C-A是“互补的”。在双螺旋中,腺嘌呤在一条链中出现,胸腺嘧啶在另一条链中出现。类似地,无论何时在一条链中发现鸟嘌呤,在另一条链中发现胞嘧啶。两个DNA区段的核苷酸序列之间的关联性越大,在两个DNA区段的链之间形成杂交双链体的能力越大。

[0230] 在两个氨基酸序列之间的“相似性”定义为在两个序列中一系列相同以及保守氨基酸残基的存在。在两个氨基酸序列之间的相似性程度越高,两个序列的对应、相同或等价性越高。(“在两个氨基酸序列之间的同一性”定义为在两个序列中一系列确切相同或不变的氨基酸残基的存在。)”互补性”、“同一性”和“相似性”的定义是本领域普通技术人员众所周知的。

[0231] “由……编码”指编码多肽序列的核酸序列,其中所述多肽序列或其部分含有来自核酸序列编码的多肽的至少3个氨基酸,例如至少8个氨基酸或至少15个氨基酸的氨基酸序列。

[0232] 如本文提及的,术语“多核苷酸”意指两个或更多核苷酸的聚合形式,所述核苷酸为核糖核苷酸或脱氧核苷酸(deoxynucleotides),或任一类型核苷酸的修饰形式。该术语包括单和双链形式的DNA,但优选是双链DNA。

[0233] 如本文使用的,术语“分离的多核苷酸”应意指下述多核苷酸(例如,基因组的、cDNA、或合成来源的,或其某一组合),由于其来源,“分离的多核苷酸”:不与在自然界中发现“分离的多核苷酸”与之结合的全部或部分多核苷酸结合;与在自然界中它不与之连接的多核苷酸可操作地连接;或在自然界中不作为较大序列的部分存在。

[0234] 如本文使用的,术语“载体”意指能够运输它已与之连接的另一种核酸的核酸分子。一种类型的载体是“质粒”,它指另外的DNA区段可以连接到其内的环状双链DNA环。另一种类型的载体是病毒载体,其中另外的DNA区段可以连接到病毒基因组内。某些载体能够在它们已引入其内的宿主细胞中自主复制(例如,具有细菌复制起点的细菌载体和游离型哺乳动物载体)。其他载体(例如非游离型哺乳动物载体)在引入宿主细胞内后可以整合到宿主细胞基因组内,且因此连同宿主基因组一起进行复制。此外,某些载体能够指导它们与之可操作地连接的基因表达。此类载体在本文中被称作“重组表达载体”(或简单地,“表达载体”)。一般而言,在重组DNA技术中使用的表达载体通常为质粒的形式。在本说明书中,“质粒”和“载体”可以互换使用,因为质粒是最常用的载体形式。然而,本发明预期包括此类其他形式的表达载体,例如提供等价功能的病毒载体(例如复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒)。

[0235] 术语“可操作地连接的”指其中所述组分处于允许它们以其预期方式起作用的关系中的并列。与编码序列“可操作地连接的”控制序列以此类方式连接,从而使得编码序列的表达在与控制序列相容的条件下完成。“可操作地连接的”序列包括与目的基因邻接的表

达控制序列,和反式或在远处起作用以控制目的基因的表达控制序列。如本文使用的,术语“表达控制序列”指实现它们与之连接的编码序列表达和加工所必需的多核苷酸序列。表达控制序列包括合适的转录起始、终止、启动子和增强子序列;有效的RNA加工信号例如剪接和多腺苷酸化信号;稳定细胞质mRNA的序列;增强翻译效率的序列(即,Kozak共有序列);增强蛋白稳定性的序列;和需要时,增强蛋白分泌的序列。此类控制序列的性质依赖于宿主生物而不同;在原核生物中,此类控制序列一般包括启动子,核糖体结合位点,和转录终止序列;在真核生物中,此类控制序列一般包括启动子和转录终止序列。术语“控制序列”预期包括其存在是表达和加工必需的组分,且还可以包括其存在是有利的另外组分,例如前导序列和融合配偶体序列。

[0236] 如本文定义的,“转化”指外源DNA通过其进入宿主细胞的任何方法。转化可以使用本领域众所周知的各种方法在天然或人工条件下发生。转化可以依赖于用于将外来核酸序列插入原核或真核宿主细胞内的任何已知方法。该方法基于待转化的宿主细胞进行选择,且可以包括但不限于,病毒感染、电穿孔、脂质转染、和粒子轰击。此类“转化的”细胞包括其中插入的DNA能够作为自主复制质粒或作为宿主染色体部分复制的稳定转化的细胞。它们还包括瞬时表达插入的DNA或RNA有限时间段的细胞。

[0237] 如本文使用的,术语“重组宿主细胞”(或简单地“宿主细胞”)意指其中已引入外源DNA的细胞。应当理解此类术语不仅意指特定的受试细胞,还意指此类细胞的后代。因为由于突变或环境影响可能在随后世代中出现某些修饰,所以此类后代实际上可能不同于亲本细胞,但仍包括在如本文使用的术语“宿主细胞”的范围内。在一个方面,宿主细胞包括选自任何生物界的原核和真核细胞。真核细胞包括原生生物、真菌、植物和动物细胞。在另一个方面,宿主细胞包括但不限于原核细胞系大肠杆菌;哺乳动物细胞系CHO、HEK 293和COS;昆虫细胞系Sf9;和真菌细胞酿酒酵母。

[0238] 标准技术可以用于重组DNA、寡核苷酸合成、以及组织培养和转化(例如,电穿孔、脂质转染)。酶促反应和纯化技术可以根据制造商的说明书或如本领域通常完成的或如本文所述的来进行。前述技术和程序一般可以根据本领域众所周知以及如各种一般和更具体的参考文献中所述的常规方法来进行,所述参考文献在本说明书自始至终引用和讨论。参见例如,为了任何目的通过引用并入本文的Sambrook等人Molecular Cloning:A Laboratory Manual(第2版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.(1989))。

[0239] 如本领域已知的和如本文使用的,“转基因生物”指具有包含转基因的细胞的生物,其中引入生物(或生物祖先)内的转基因表达在该生物中非天然表达的多肽。“转基因”是DNA构建体,所述DNA构建体稳定且可操作地整合到转基因生物由其发育的细胞的基因组内,从而指导编码的基因产物在转基因生物的一种或多种细胞类型或组织中表达。

[0240] 术语“调整”和“调节”可互换使用,且如本文使用的,指目的分子活性(例如,靶向A $\beta$ 形式的生物学活性)中的变化或改变。调节可以是目的分子的某些活性或功能量级中的增加或减少。分子的示例性活性和功能包括但不限于,结合特征、酶促活性、细胞受体激活、和信号转导。

[0241] 相应地,如本文使用的,术语“调节剂”是能够改造或改变目的分子活性或功能(例如,靶向A $\beta$ 形式的生物学活性)的化合物。例如,与在不存在调节剂的情况下观察到的活性

或功能量级相比较,调节剂可以引起分子某些活性或功能量级中的增加或减少。在某些实施方案中,调节剂是减少分子至少一种活性或功能量级的抑制剂。

[0242] 如本文使用的,术语“激动剂”指当与目的分子接触时,与在不存在激动剂的情况下观察到的活性或功能量级相比较,引起分子某些活性或功能量级中的增加的调节剂。

[0243] 如本文使用的,术语“拮抗剂”或“抑制剂”指当与目的分子接触时,与在不存在拮抗剂的情况下观察到的活性或功能量级相比较,引起分子某些活性或功能量级中的减少的调节剂。具体目的拮抗剂包括阻断或调节靶向A $\beta$ 形式的生物学活性的那些。靶向A $\beta$ 形式的拮抗剂和抑制剂可以包括但不限于本发明的结合蛋白,其与A $\beta$  (20-42) 球聚体和任何其他靶向A $\beta$ 形式结合。靶向A $\beta$ 形式的拮抗剂或抑制剂可以例如减少所述A $\beta$ 形式对P/Q型电压门控的突触前钙通道活性的抑制作用。

[0244] 如本文使用的,术语“有效量”指疗法的量,其足以减少或改善病症或其一种或多种症状的严重性和/或持续时间,预防病症进展,引起病症消退,预防与病症相关的一种或多种症状复发、发展、发作或进展,检测病症,或增强或改善另一种疗法(例如,预防或治疗剂)的一种或多种预防或治疗作用。

[0245] 如本文使用的,术语“样品”以其最广泛的含义使用。如本文使用的,“生物学样品”包括但不限于,来自生物(living thing)或从前生物的任何量的物质。此类生物包括但不限于,人、小鼠、大鼠、猴、狗、兔和其他动物。此类物质包括但不限于,血液、血清、尿、滑液、细胞、器官、组织、骨髓、淋巴结和脾。

[0246] I. 本发明的抗体

[0247] 本发明的第一个特定方面提供了结合A $\beta$  (20-42) 球聚体和/或任何其他靶向A $\beta$ 形式的鼠抗体或其抗原结合部分。本发明的第二个特定方面提供了结合A $\beta$  (20-42) 球聚体和/或任何其他靶向A $\beta$ 形式的嵌合抗体或其抗原结合部分。本发明的第三个特定方面提供了结合A $\beta$  (20-42) 球聚体和/或任何其他靶向A $\beta$ 形式的CDR嫁接的抗体或其抗原结合部分。本发明的第四个特定方面提供了结合A $\beta$  (20-42) 球聚体和/或任何其他靶向A $\beta$ 形式的人源化抗体或其抗原结合部分。根据一个特定方面,抗体或其部分是分离的抗体。根据进一步特定方面,本发明的抗体中和A $\beta$  (20-42) 球聚体和/或任何其他靶向A $\beta$ 形式的活性。

[0248] A. 重组A $\beta$  (20-42) 球聚体抗体的产生

[0249] 本发明的抗体可以通过本领域已知的许多技术中的任何一种来生产。例如,来自宿主细胞的表达,其中编码重和轻链的一种或多种表达载体通过标准技术转染到宿主细胞内。术语“转染”的各种形式预期包含通常用于将外源DNA引入原核或真核宿主细胞内的广泛多样的技术,例如,电穿孔、磷酸钙沉淀、DEAE葡聚糖转染等。可能在原核或真核宿主细胞中表达本发明的抗体。根据本发明的特定方面,使用真核细胞例如哺乳动物宿主细胞进行抗体的表达,这是因为此类真核细胞(且特别是哺乳动物细胞)比原核细胞更可能装配和分泌正确折叠和免疫学活性的抗体。

[0250] 根据一个方面,用于表达本发明的重组抗体的哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢(CHO细胞)(包括在Urlaub和Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216-4220中描述,与DHFR选择标记一起使用的dhfr-CHO细胞,例如,如R. J. Kaufman和P. A. Sharp (1982) Mol. Biol., 159:601-621中描述的)、NS0骨髓瘤细胞、COS细胞和SP2细胞。当编码抗体基因的重组表达载体被引入哺乳动物宿主细胞内时,抗体通过将宿主细胞培养足

够时间段来生产,以允许抗体在宿主细胞中表达,或抗体分泌到其中宿主细胞生长的培养基内。抗体可以使用标准蛋白纯化法从培养基中回收。

[0251] 宿主细胞也可以用于产生功能抗体片段,例如Fab片段或scFv分子。将理解关于上述程序的变化在本发明的范围内。例如,可以希望用编码本发明抗体的轻链和/或重链的功能片段的DNA转染宿主细胞。重组DNA技术还可以用于去除对于与目的抗原的结合不是必需的编码轻和重链中任一个或两者的一些或全部DNA。由此类截短的DNA分子表达的分子也由本发明的抗体包含。此外,通过经由标准化学交联法使本发明的抗体与第二种抗体交联可以产生双功能抗体,其中一条重链和一条轻链是本发明的抗体,并且另一条重链和轻链对于除目的抗原外的抗原是特异性的。

[0252] 在用于重组表达本发明的抗体或其抗原结合部分的特定系统中,编码抗体重链和抗体轻链的重组表达载体通过磷酸钙介导的转染引入dhfr-CHO细胞内。在重组表达载体内,抗体重和轻链基因各自与CMV增强子/AdMLP启动子调节元件可操作地连接,以驱动基因的高水平转录。重组表达载体还携带DHFR基因,所述DHFR基因允许使用氨甲蝶呤选择/扩增选择已用载体转染的CHO细胞。培养所选转化体宿主细胞以允许表达抗体重和轻链,且从培养基中回收完整的抗体。使用标准分子生物学技术以制备重组表达载体、转染宿主细胞、选择转化体、培养宿主细胞和从培养基中回收抗体。更进一步地,本发明提供了合成本发明的重组抗体的方法,其通过在合适的培养基中培养本发明的宿主细胞直至本发明的重组抗体被合成。该方法可以进一步包括从培养基中分离重组抗体。

[0253] 识别特异性表位的抗体片段可以通过已知技术生成。例如,本发明的Fab和F(ab')<sub>2</sub>片段可以通过免疫球蛋白分子的蛋白酶切割产生,其中使用酶例如木瓜蛋白酶(以产生Fab片段)或胃蛋白酶(以产生F(ab')<sub>2</sub>片段)。F(ab')<sub>2</sub>片段包含可变区、轻链恒定区和重链的CH1结构域。

[0254] 1. 抗Aβ(20-42)球聚体鼠抗体

[0255] 表3A是鼠单克隆抗体m4C9的VH和VL区的氨基酸序列列表。

[0256] 表3A: m4C9的VH和VL区的氨基酸序列列表



[0257]

蛋白区域	SEQ ID NO	序列
		123456789012345678901234567890
m4C9_VH	1	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKAP- GYTFTSYWMHWVKQRPQGLEWI- GRIDPKSGDTKYTEKF <del>SKATLTVDKPSST</del> AYMQLSSLTSEDSAVYYCTTMSKLSGTHAW- FAYWGQGT <del>LVTVSA</del>
4C9_CDR-H1	SEQ ID NO: 17 SEQ ID NO: 1 的残基31-34	SYWMH
4C9_CDR-H2	SEQ ID NO: 18 SEQ ID NO: 1 的残基50-66	RIDPKSGDTKYTEKF <del>KS</del>
4C9_CDR-H3	SEQ ID NO: 19 SEQ ID NO: 1 的残基99-111	MSKLSGTHAWFAY
m4C9_VL	2	DIKMTQSPSSMYASLGERTITCKASQDIN- SYLTWFQQKPGKSPKTLIY- RANRLVDGVPSRFS <del>SGSGSGQDYSLTISSE</del> YEDMGIYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELK
4C9_CDR-L1	SEQ ID NO: 20 SEQ ID NO: 2 的残基24-34	KASQDINSYLT
4C9_CDR-L2	SEQ ID NO: 21 SEQ ID NO: 2 的残基50-56	RANRLVD
4C9_CDR-L3	SEQ ID NO: 22 SEQ ID NO: 2 的残基89-97	LQYDEFPLT

[0258] \*CDR是鼠轻和重链中有下划线的。

[0259] 表3B是鼠单克隆抗体m10B3的VH和VL区的氨基酸序列列表。

[0260] 表3B: m10B3的VH和VL区的氨基酸序列列表

[0261]

蛋白区域	SEQ ID NO	序列
		123456789012345678901234567890
m10B3_VH	25	EVKLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFS DYEMVWVRQAPGEGLEWVAYISSGSRTIHY- ADTVKGRFTISRDNPKNTLFLQMSSLRSED TAMYYCARTLLRLHFDYWGQGTILTSS
10B3_CDR-H1	SEQ ID NO: 33 SEQ ID NO: 25 的残基31-35	DYEMV
10B3_CDR-H2	SEQ ID NO: 34 SEQ ID NO: 25 的残基50-66	YISSGSRTIHYADTVKG
10B3_CDR-H3	SEQ ID NO: 35 SEQ ID NO: 25 的残基99-107	TLLRLHFDY
m10B3_VL	26	DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLL YSGNQKNFLAWYQQKPGQSPKLLIYWAS- TRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISS- VKAEDLAVYYCQQYYSYPWTFGGDTKLEIK
10B3_CDR-H1	SEQ ID NO: 36 SEQ ID NO: 26 的残基24-40	KSSQSLLYSGNQKNFLA
10B3_CDR-H2	SEQ ID NO: 37 SEQ ID NO: 26 的残基56-62	WASTRES
10B3_CDR-H3	SEQ ID NO: 38 SEQ ID NO: 26 的残基95-103	QQYYSYPWT

[0262] \*CDR是鼠轻和重链中有下划线的。

[0263] 2. 抗Aβ (20-42) 球聚体嵌合抗体

[0264] 嵌合抗体是其中抗体的不同部分衍生自不同动物物种的分子,例如具有衍生自鼠单克隆抗体的可变区和人免疫球蛋白恒定区的抗体。用于产生嵌合抗体的方法是本领域已知的且在本文中详细讨论。参见例如,Morrison,Science 229:1202 (1985); Oi等人,BioTechniques 4:214 (1986); Gillies等人,(1989) J. Immunol. Methods 125:191-202; 美国专利号5,807,715; 4,816,567; 和4,816,397,其整体通过引用并入本文。此外,可以使用开发用于产生“嵌合抗体”的技术 (Morrison等人,1984,Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 851-855; Neuberger等人,1984,Nature 312:604-608; Takeda等人,1985,Nature 314:452-454,其整体通过引用并入本文),其通过剪接来自具有合适抗原特异性的小鼠抗体分子的基因连同来自具有合适生物学活性的人抗体分子的基因实现。

[0265] 在一个实施方案中,本发明的嵌合抗体通过用人IgG1恒定区替换本文所述的鼠单克隆抗Aβ (20-42) 球聚体抗体的重链恒定区产生。

[0266] 3. 抗Aβ (20-42) 球聚体CDR嫁接的抗体

[0267] 本发明的CDR嫁接的抗体包含来自人抗体的重和轻链可变区序列,其中VH和/或VL

的一个或多个CDR区替换为本发明的鼠抗体的CDR序列。来自任何人抗体的构架序列可以充当用于CDR嫁接的模板。然而,在此类构架上的直接链替换通常导致与抗原的结合亲和力的一些丧失。人抗体与最初鼠抗体越同源,使鼠CDRs与人构架组合将在CDRs中引入可减小亲和力的变形的可能性越小。因此,选择为替换除CDRs外的鼠可变构架的人可变构架与鼠抗体可变区构架具有例如至少65%的序列同一性。除CDRs外的人和鼠可变区具有例如至少70%、至少75%的序列同一性、或至少80%的序列同一性。用于生产嵌合抗体的方法是本领域已知的,并且在本文中详细讨论。(还参见EP 239,400;PCT公开W0 91/09967;美国专利号5,225,539;5,530,101;和5,585,089),镶面(veneering)或表面重建(resurfacing)(EP 592,106;EP 519,596;Padlan,Molecular Immunology 28(4/5):489-498(1991);Studnicka等人,Protein Engineering 7(6):805-814(1994);Roguska等人,PNAS 91:969-973(1994)),和链改组(美国专利号5,565,352)。

[0268] 下表4A举例说明本发明的CDR嫁接的4D10-型抗体和其中含有的CDRs的序列。

[0269] 表4A:CDR嫁接的4C9-型抗体的VH和VL区的氨基酸序列列表

蛋白区域	SEQ ID NO	序列
		123456789012345678901234567890
4C9hum_VH.1z	SEQ ID NO: 6	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFS SYWMHWVRQAP- GQGLEWMGRIDPKSGDTKYTEKFKSRVTI- TADKSTSTAYMELSSLRSED <del>TAVYY</del> - CARMSKLSGTHAWFAYWGQGT <del>LTV</del> VSS
4C9hum_VH.2z	SEQ ID NO: 10	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSKAS- GYTFTSYWMHWVRQAP- GQGLEWMGRIDPKSGDTKYTEKFKSRFVFS LDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYY- CARMSKLSGTHAWFAYWGQGT <del>LTV</del> VSS
4C9_CDR-H1	SEQ ID NO: 17 SEQ ID NOs: 6, 10 的残基26-34	SYWMH
4C9_CDR-H2	SEQ ID NO: 18 SEQ ID NOs: 6, 10 的残基50-66	RIDPKSGDTKYTEKFKS
4C9_CDR-H3	SEQ ID NO: 19 SEQ ID NOs: 6, 10 的残基98-111	MSKLSGTHAWFAY
4C9hum_VL.1z	SEQ ID NO: 14	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIN SYLTWFAQKPGKAPKSLIYRANRLVDGVPS RFGSGSGTDFTLT <del>ISS</del> LQPEDFATYYC <del>LQ</del> YDEFPLT <del>FGQ</del> GTKLEIK
4C9_CDR-L1	SEQ ID NO: 20 SEQ ID NO: 14 的残基24-34	KASQDINSYLT
4C9_CDR-L2	SEQ ID NO: 21 SEQ ID NO: 14 的残基50-56	RANRLVD
4C9_CDR-L3	SEQ ID NO: 22 SEQ ID NO: 14 的残基89-97	LQYDEFPLT

[0271] \*CDRs是人源化轻和重链中有下划线的。

[0272] 下表4B举例说明本发明的CDR嫁接的4D10-型抗体和其中含有的CDRs的序列。

[0273] 表4B:CDR嫁接的10B3-型抗体的VH和VL区的氨基酸序列列表

蛋白区域	SEQ ID NO	序列
		123456789012345678901234567890
10B3hum_VH.1	SEQ ID NO: 29	EVQL- VESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDY- EMVWVRQAPGKGLEWVSYISSGSRTIHY- ADTVKGRFTISRDAKN- SLYQMNSLRAEDTAVYY- CARTLLRLHFDYWGQGTLLVTVSS
10B3_CDR-H1	SEQ ID NO:33 SEQ ID NOs: 29 的残基31-35	DYEMV
10B3_CDR-H2	SEQ ID NO:34 SEQ ID NOs: 29 的残基50-66	YISSGSRTIHYADTVKG
10B3_CDR-H3	SEQ ID NO:35 SEQ ID NOs: 29 的残基99-107	TLLRLHFDY
10B3hum_VL.1	SEQ ID NO: 31	DIVMTQSPDSLAVSLGERAT- INCKSSQSLLYSGNQKNFLAWYQQKPGQPP KLLIYWAS- TRESGVFDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAED VAVYYCQQYYSYPWTFGGGTKVEIK
10B3_CDR-L1	SEQ ID NO:36 SEQ ID NOs: 31 的残基24-40	KSSQSLLYSGNQKNFLA
10B3_CDR-L2	SEQ ID NO:37 SEQ ID NOs: 31 的残基56-62	WASTRES
10B3_CDR-L3	SEQ ID NO:38 SEQ ID NOs: 31 的残基95-103	QQYYSYPWT

[0275] \*CDRs是人源化轻和重链中有下划线的。

[0276] 4. 抗AB (20-42) 球聚体人源化抗体

[0277] 人源化抗体是来自结合所需抗原的非人物种抗体的抗体分子,具有来自非人物种的一个或多个互补性决定区(CDRs)和来自人免疫球蛋白分子的构架区。

[0278] 已知的人Ig序列在例如下述中公开, [www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez-/query.fcgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez-/query.fcgi);[www.atcc.org/phage/hdb.html](http://www.atcc.org/phage/hdb.html); [www.sciquest.com/](http://www.sciquest.com/); [www.abcam.com/](http://www.abcam.com/);[www.antibodyresource.com/onlinecomp.html](http://www.antibodyresource.com/onlinecomp.html);[www.public.iastate.edu/.about.pedro/research\\_tools.html](http://www.public.iastate.edu/.about.pedro/research_tools.html); [www.mgen.uni-](http://www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/IT/IT.html)[www.whfreeman.com/immunology/CH-05/kuby05.htm](http://www.whfreeman.com/immunology/CH-05/kuby05.htm);[0279] [www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html](http://www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html);[www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/](http://www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/); [www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/m-ikei-](http://www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/m-ikei-images.html)[www.antibodyresource.com/](http://www.antibodyresource.com/); [mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html](http://mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html).[www.immunologylink.com/](http://www.immunologylink.com/); [pathbox.wustl.edu/.about.hcenter/index.-html](http://pathbox.wustl.edu/.about.hcenter/index.-html);

[www.biotech.ufl.edu/about.hcl/](http://www.biotech.ufl.edu/about.hcl/); [www.pebio.com/pa/340913/340913.html](http://www.pebio.com/pa/340913/340913.html);  
[www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/](http://www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/); [www.m.ehime-u.ac.jp/about.yasuhito-/Elisa.html](http://www.m.ehime-u.ac.jp/about.yasuhito-/Elisa.html);  
[www.biodesign.com/table.asp](http://www.biodesign.com/table.asp); [www.icnet.uk/axp/facs/davies/lin-ks.html](http://www.icnet.uk/axp/facs/davies/lin-ks.html);  
[www.biotech.ufl.edu/about.fccl/protocol.html](http://www.biotech.ufl.edu/about.fccl/protocol.html); [www.isac-net.org/sites\\_geo.html](http://www.isac-net.org/sites_geo.html);  
[aximtl.imt.uni-marburg.de/about.rek/AEP-Start.html](http://aximtl.imt.uni-marburg.de/about.rek/AEP-Start.html);  
[baserv.uci.kun.nl/about.jraats/linksl.html](http://baserv.uci.kun.nl/about.jraats/linksl.html); [www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/](http://www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/);  
[www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html](http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html); [www.ibt.unam.mx/vir/V\\_mice.html](http://www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html);  
[0280] [imgt.cnusc.fr:8104/](http://imgt.cnusc.fr:8104/); [www.biochem.ucl.ac.uk/about.martin/abs/index.html](http://www.biochem.ucl.ac.uk/about.martin/abs/index.html); [anti-body.bath.ac.uk/](http://anti-body.bath.ac.uk/); [abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html](http://abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html);  
[www.unizh.ch/about.honegger/AHOsem-inar/Slide01.html](http://www.unizh.ch/about.honegger/AHOsem-inar/Slide01.html);  
[www.cryst.bbk.ac.uk/about.ubcg07s/](http://www.cryst.bbk.ac.uk/about.ubcg07s/); [www.nimr.mrc.ac.uk/CC/caewg/caewg.htm](http://www.nimr.mrc.ac.uk/CC/caewg/caewg.htm);  
[www.path.cam.ac.uk/about.mrc7/humanisation/TAHHP.html](http://www.path.cam.ac.uk/about.mrc7/humanisation/TAHHP.html);  
[www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat\\_aim.html](http://www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html); [www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html](http://www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html);  
[www.cryst.bioc.cam.ac.uk/about.fmolina/Web-pages/Pept/spottech.html](http://www.cryst.bioc.cam.ac.uk/about.fmolina/Web-pages/Pept/spottech.html); [www.jerini.de/fr](http://www.jerini.de/fr)  
[roduts.htm](http://roduts.htm); [www.patents.ibm.com/ibm.html](http://www.patents.ibm.com/ibm.html). Kabat et al., Sequences of Proteins of Immu-

[0281] **nological Interest, U.S. Dept. Health (1983)**,各自整体通过引用并入本文。如本领域已知的,此类输入的序列可以用于减少免疫原性,或减少、增强或修饰结合、亲和力、结合速率、解离速率、抗体亲抗原性、特异性、半衰期、或任何其他合适的特征。

[0282] 人构架区中的构架残基可以用来自CDR供体抗体的相应残基取代,以改变优选改善抗原结合。这些构架取代通过本领域众所周知的方法鉴定,例如通过对CDR和构架残基的相互作用建模以鉴定对抗原结合重要的构架残基,和序列比较以鉴定在特定位置上的罕见构架残基。(参见例如,Queen 等人,美国专利号5,585,089;Riechmann 等人,Nature,332:323 (1988),在此将其整体通过引用并入本文)。三维免疫球蛋白模型通常是可获得的且是本领域技术人员熟悉的。举例说明且展示所选候选免疫球蛋白序列的可能三维构象结构的计算机程序是可获得的。这些展示的检查允许分析残基在候选免疫球蛋白序列功能发挥中的可能作用,即分析影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基。以这种方式,可以选择FR残基且从共有和输入序列组合,从而使得达到所需抗体特征,例如对一种或多种靶抗原的亲和力增加。一般而言,CDR残基直接且最重要地与影响抗原结合有关。抗体可以使用本领域已知的多种技术进行人源化,例如但不限于下述参考文献中描述的那些:Jones等人,Nature 321:522 (1986);Verhoeyen等人,Science 239:1534 (1988),Sims等人,J. Immunol. 151:2296 (1993);Chothia和Lesk,J. Mol. Biol. 196:901 (1987),Carter等人,Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:4285 (1992);Presta等人,J. Immunol. 151:2623 (1993),Padlan,Molecular Immunology 28 (4/5):489-498 (1991);Studnicka等人,Protein Engineering 7 (6):805-814 (1994);Roguska.等人,PNAS 91:969-973 (1994);PCT公开W0 91/09967、PCT/:US98/16280、US96/18978、US91/09630、US91/05939、US94/01234、GB89/01334、GB91/01134、GB92/01755;W090/14443、W090/14424、W090/14430、EP 229246、EP 592,106;EP 519,596、EP 239,400、美国专利号5,565,332、5,723,323、5,976,862、5,824,514、5,817,483、5814476、5763192、5723323、5,766886、5,714,352、6,204,023、6,180,

370、5,693,762、5,530,101、5,585,089、5,225,539;4,816,567,各自整体通过引用并入本文,包括其中引用的参考文献。

[0283] 下表5A举例说明本发明的人源化4C9-型抗体和其中含有的CDRs的序列。

[0284] 表5A:人源化4C9-型抗体的VH和VL区的氨基酸序列列表

[0285]

蛋白区域	SEQ ID NO	序列
		123456789012345678901234567890
4C9hum_VH.1	SEQ ID NO: 7	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKAS- GYTFTSYWMHWVRQAP- GQGLEWMGRIDPKSGDTKYTEKFKSRVTI- TADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYY- CARMSKLSGTHAWFAYWGQGLTVTVSS

[0286]

蛋白区域	SEQ ID NO	序列
		123456789012345678901234567890
4C9hum_VH.1a	SEQ ID NO: 8	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT SYWMHWVRQAPGQGLEWIGRIDPKSGDTKY TEKFKSRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCTTMSKLSGTHAWFAYWGQGLTVTV SS
4C9hum_VH.1b	SEQ ID NO: 9	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT SYWMHWVRQAPGQGLEWMGRIDPKSGDTKY TEKFKSRVTITVDKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCATMSKLSGTHAWFAYWGQGLTVTV SS
4C9hum_VH.2	SEQ ID NO: 11	EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFT SYWMHWVRQAPGQGLEWMGRIDPKSGDTKY TEKFKSRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAED TAVYYCARMSKLSGTHAWFAYWGQGLTVTV SS
4C9hum_VH.2a	SEQ ID NO: 12	EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFT SYWMHWVRQAPGQGLEWIGRIDPKSGDTKY TEKFKSRVLSVDKSVSTAYLQISSLKAED TAVYYCTTMSKLSGTHAWFAYWGQGLTVTV SS
4C9hum_VH.2b	SEQ ID NO: 13	EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFT SYWMHWVRQAPGQGLEWMGRIDPKSGDTKY TEKFKSRFVFSVDTSVSTAYLQISSLKAED TAVYYCATMSKLSGTHAWFAYWGQGLTVTV SS
4C9_CDR-H1	SEQ ID NO: 17 SEQ ID NOs: 7, 8, 9, 11, 12, 13 的残基26-34	SYWMH
4C9_CDR-H2	SEQ ID NO: 18 SEQ ID NOs: 7, 8, 9, 11, 12, 13 的残基50-66	RIDPKSGDTKYTEKFKS
4C9_CDR-H3	SEQ ID NO: 19 SEQ ID NOs: 7, 8, 9, 11, 12, 13 的残基98-111	MSKLSGTHAWFAY
4C9hum_VL.1	SEQ ID NO: 15	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIN SYLTWFQQKPGKAPKLLIYRANRLVDGVP RFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLO YDEFPLTFGQGTKLEIK
4C9hum_VL.1a	SEQ ID NO: 16	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIN SYLTWFQQKPGKAPKLLIYRANRLVDGVP RFGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYCLO YDEFPLTFGQGTKLEIK
4C9_CDR-L1	SEQ ID NO: 20 SEQ ID NOs: 15, 16 的残基24-34	KASQDINSYLT
4C9_CDR-L2	SEQ ID NO: 21 SEQ ID NOs: 15, 16 的残基50-56	RANRLVD

[0287]

蛋白区域	SEQ ID NO	序列
		123456789012345678901234567890
4C9_CDR-L3	SEQ ID NO: 22 SEQ ID NOs: 15, 16 的残基89-97	LQYDEFPLT

[0288] \*CDRs是人源化轻和重链中有下划线的。

[0289] 下表5B举例说明本发明的人源化10B3-型抗体和其中含有的CDRs的序列。

[0290] 表5B:人源化10B3-型抗体的VH和VL区的氨基酸序列列表

[0291]

蛋白区域	SEQ ID NO	序列
		123456789012345678901234567890
10B3hum_VH.1a	SEQ ID NO: 30	EVQL- VESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDY- EMVWVRQAPGKGLEWVAYISSGSRTIHY- ADTVKGRFTISRDAKN- SLYLQMNSLRADTAVYY- CARTLLRLHFDYWGQGTLLTVSS
10B3_CDR-H1	SEQ ID NO:33 SEQ ID NOs: 30 的残基31-35	DYEMV
10B3_CDR-H2	SEQ ID NO:34 SEQ ID NOs: 30 的残基50-66	YISSGSRTIHYADTVKG
10B3_CDR-H3	SEQ ID NO:35 SEQ ID NOs: 30 的残基99-107	TLLRLHFDY
10B3hum_VL.1a	SEQ ID NO: 32	DIVMTQSPDSLAVSLGERAT- INCKSSQSLLYSGNQKNFLAWYQQKPGQSP KLLIYWAS- TRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAED VAVYYCQQYYSPWTFGGGTKVEIK
10B3_CDR-L1	SEQ ID NO:36 SEQ ID NOs: 32 的残基24-40	KSSQSLLYSGNQKNFLA
10B3_CDR-L2	SEQ ID NO:37 SEQ ID NOs: 32 的残基56-62	WASTRES
10B3_CDR-L3	SEQ ID NO:38 SEQ ID NOs: 32 的残基95-103	QQYYSPWT

[0292] B. 抗体和抗体生产细胞系

[0293] 根据一个方面,本发明的抗Aβ(20-42)球聚体抗体或针对任何其他靶向Aβ形式的抗体显示出减少或中和Aβ(20-42)球聚体(和/或任何其他靶向Aβ形式)的活性的高能力。

[0294] 在特定实施方案中,抗体包含重链恒定区,例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM或IgD恒定区。根据一个方面,重链恒定区是IgG1重链恒定区或IgG4重链恒定区。根据进一步方面,抗体包含轻链恒定区、κ轻链恒定区或λ轻链恒定区。根据一个方面,抗体包含κ轻链恒定区。抗体部分可以是例如Fab片段或单链Fv片段。

[0295] Fc部分中改变抗体效应子功能的氨基酸残基替换是本领域已知的(Winter等人,美国专利号5,648,260和5,624,821)。抗体的Fc部分介导几种重要的效应子功能,例如细胞因子诱导、ADCC、吞噬作用、依赖补体的细胞毒性(CDC)以及抗体和抗原-抗体复合物的半衰期/清除率。取决于治疗目的,在一些情况下这些效应子功能对于治疗性抗体是所需的,但在其他情况下可能是不必要的或甚至有害的。某些人IgG同种型,特别是IgG1和IgG3,经由分别与FcγRs和补体C1q结合介导ADCC和CDC。新生Fc受体(FcRn)是决定抗体循环半衰期的关键组分。在另外一个实施方案中,至少一个氨基酸残基在抗体恒定区例如抗体Fc区中进行替换,从而使得抗体的效应子功能被改变。

[0296] 一个实施方案提供了标记的抗体,其中本发明的抗体与另一种功能分子(例如,另



一种肽或蛋白)衍生化或连接。例如,本发明的标记的抗体可以通过使本发明的抗体与一种或多种其他分子实体功能性连接(通过化学偶联、遗传融合、非共价结合或其他方式)来衍生,所述其他分子实体例如另一种抗体(例如,双特异性抗体或双抗体)、可检测试剂、药学试剂、和/或可以介导抗体与另一种分子(例如链霉抗生物素蛋白核心区或聚组氨酸标签)结合的蛋白或肽。

[0297] 本发明的抗体可以由之衍生化的有用的可检测试剂包括荧光化合物。示例性荧光可检测试剂包括荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、5-二甲胺-1-萘磺酰氯、藻红蛋白等。抗体也可以用可检测酶衍生化,例如碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、葡萄糖氧化酶等。当抗体用可检测酶衍生化时,它通过添加酶用于生产可检测反应产物的另外的试剂进行检测。例如,当可检测试剂辣根过氧化物酶存在时,添加过氧化氢和二氨基联苯胺导致可检测的有色反应产物。抗体也可以用生物素衍生化,且通过抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白结合的间接测量进行检测。

[0298] 本发明的另一个实施方案提供了结晶抗体。根据一个方面,本发明涉及如本文公开的完整抗A $\beta$  (20-42) 球聚体抗体及其片段的晶体,以及包含此类晶体的制剂和组合物。根据进一步方面,结晶抗体具有比抗体的可溶性配对物更长的体内半衰期。根据进一步方面,抗体在结晶后保留生物学活性。

[0299] 本发明的结晶抗体可以根据本领域已知的和如通过引用并入本文的W002/072636中公开的方法来生产。

[0300] 本发明的另一个实施方案提供了糖基化的抗体,其中抗体包含一个或多个碳水化合物残基。新生体内蛋白生产可以经历称为翻译后修饰的进一步加工。特别地,糖(糖基)残基可以酶促添加,这个过程称为糖基化。所得到的具有共价连接的寡糖侧链的蛋白被称为糖基化蛋白或糖蛋白。

[0301] 抗体是在Fc结构域以及可变结构域中具有一个或多个碳水化合物残基的糖蛋白。Fc结构域中的碳水化合物残基对Fc结构域的效应子功能有重要作用,对抗体的抗原结合或半衰期有最低的作用(R. Jefferis, *Biotechnol. Prog.* 21 (2005), 第11-16页)。相比之下,可变结构域的糖基化可能对抗体的抗原结合活性有作用。可变结构域中的糖基化可能对抗体结合亲和力具有负面作用,可能是由于空间位阻(Co, M.S., 等人, *Mol. Immunol.* (1993) 30:1361-1367), 或导致对抗原的亲和力增加(Wallick, S.C., 等人, *Exp. Med.* (1988) 168:1099-1109; Wright, A., 等人, *EMBO J.* (1991) 10:2717-2723)。

[0302] 本发明的一个方面涉及生成糖基化位点突变体,其中抗体的O或N糖基化位点已进行突变。本领域技术人员可以使用标准的众所周知的技术来生成此类突变体。保留生物学活性但具有增加或减少的结合活性的糖基化位点突变体的产生是本发明的另一个目的。

[0303] 在另外一个实施方案中,本发明的抗体的糖基化得到修饰。例如,可以制备无糖基化(aglycosylated)抗体(即该抗体缺乏糖基化)。糖基化可以进行改变,以例如增加抗体对抗原的亲和力。此类碳水化合物修饰可以通过例如改变抗体序列内的一个或多个糖基化位点来完成。例如,可以制备导致一个或多个可变区糖基化位点消除的一个或多个氨基酸取代,从而消除那个位点上的糖基化。此类无糖基化可以增加抗体对抗原的亲和力。此类方法在国际申请公开号W003/016466A2以及美国专利号5,714,350和6,350,861中进一步详细描述,它们各自整体通过引用并入本文。

[0304] 此外或可替代地,可以制备具有改变的糖基化类型的修饰的本发明的抗体,例如具有减少量的岩藻糖基残基的岩藻糖基化不足(hypofucosylated)抗体,或具有增加的等分GlcNAc结构的抗体。此类改变的糖基化模式已显示增加抗体的ADCC能力。此类碳水化合物修饰可以通过例如在具有改变的糖基化机构的宿主细胞中表达抗体来完成。具有改变的糖基化机构的细胞已在本领域得到描述,且可以用作在其中表达本发明的重组抗体的宿主细胞,以从而生产具有改变的糖基化的抗体。参见例如,Shields,R. L.等人(2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740;Umana等人(1999) Nat. Biotech. 17:176-1,以及欧洲专利号:EP1,176,195;国际申请公开号W003/035835和W099/54342 80,它们各自整体通过引用并入本文。

[0305] 蛋白糖基化取决于目的蛋白的氨基酸序列,以及在其中表达蛋白的宿主细胞。不同生物可以产生不同的糖基化酶(例如,糖基转移酶和糖苷酶),且具有不同的可用底物(核苷酸糖)。由于此类因素,蛋白糖基化模式和糖基残基组成可以依赖于在其中表达特定蛋白的宿主系统而不同。在本发明中有用的糖基残基可以包括但不限于,葡萄糖、半乳糖、甘露糖、岩藻糖、n-乙酰葡萄糖胺和唾液酸。根据一个方面,糖基化的抗体包含糖基残基,从而使得糖基化模式是人的。

[0306] 不同的蛋白糖基化可以导致不同的蛋白特征,这是本领域技术人员已知的。例如,与哺乳动物细胞例如CHO细胞系中表达的相同蛋白的那种相比较,在微生物宿主例如酵母中生产,和利用酵母内源性途径糖基化的治疗性蛋白的功效可能是减少的。此类糖蛋白在人中也可以是免疫原性的,且在施用后显示减少的体内半衰期。人和其他动物中的特定受体可以识别特定糖基残基且促进蛋白从血流中快速清除。其他不利效应可以包括蛋白折叠、可溶性、对蛋白酶的易感性、运输、转运、区室化、分泌、由其他蛋白或因因子识别、抗原性、或变应原性中的变化。因此,从业者可能更喜欢具有特定糖基化组成和模式的治疗性蛋白,例如等同于或至少类似于在人细胞或预期受试动物的物种特异性细胞中生产的那种的糖基化组成和模式。

[0307] 表达不同于宿主细胞那种的糖基化蛋白可以通过遗传修饰宿主细胞以表达异源糖基化酶来完成。使用本领域已知的技术,从业者可以生成显示人蛋白糖基化的抗体。例如,酵母菌株已进行遗传修饰以表达非天然存在的糖基化酶,从而使得在这些酵母菌株中生产的糖基化蛋白(糖蛋白)显示等同于动物细胞特别是人细胞那种的蛋白糖基化(美国专利申请公开号20040018590和20020137134;和W005/100584)。

[0308] 另一个实施方案涉及对本发明的此类抗体特异性的抗独特型(抗Id)抗体。抗Id抗体是识别独特决定簇的抗体,所述独特决定簇一般与另一种抗体的抗原结合区相关。抗Id可以通过用抗体或其含CDR区免疫接种动物来制备。免疫接种的动物将识别,且对免疫接种抗体的独特型决定簇应答且产生抗Id抗体。抗Id抗体也可以用作“免疫原”以在另外一种动物中诱导免疫应答,从而产生所谓的抗抗Id抗体。

[0309] 此外,本领域技术人员将认识到,目的蛋白可以使用宿主细胞文库来表达,所述宿主细胞进行基因工程改造以表达各种糖基化酶,从而使得文库的成员宿主细胞生产具有变体糖基化模式的目的蛋白。从业者随后可以选择并分离具有特定新糖基化模式的目的蛋白。根据进一步方面,具有特定选择的新糖基化模式的蛋白显示改善或改变的生物学性质。

[0310] C. 抗A $\beta$  (20-42) 球聚体抗体的用途

[0311] 鉴于其与A $\beta$  (20-42) 球聚体结合的能力,本发明的抗A $\beta$  (20-42) 球聚体抗体或针对任何其他靶向A $\beta$ 形式的抗体可以用于检测A $\beta$  (20-42) 球聚体和/或任何其他靶向A $\beta$ 形式(例如,在生物样品中,例如血清、CSF、脑组织或血浆),其中使用常规免疫测定,例如酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)或组织免疫组织化学。本发明提供了用于检测生物样品中的A $\beta$  (20-42) 球聚体和/或任何其他靶向A $\beta$ 形式的方法,其包括使生物样品与本发明的抗体接触,且检测与A $\beta$  (20-42) 球聚体(和/或和/或任何其他靶向A $\beta$ 形式)结合的抗体或未结合的抗体,以从而检测生物样品中的A $\beta$  (20-42) 球聚体和/或任何其他靶向A $\beta$ 形式。抗体用可检测物质直接或间接标记,以促进结合或未结合的抗体的检测。合适的可检测物质包括各种酶、辅基、荧光材料、发光材料和放射性材料。合适酶的例子包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;合适辅基复合物的例子包括链霉抗生物素蛋白/生物素和抗生物素蛋白/生物素;合适荧光材料的例子包括伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪基胺(dichlorotriazinylamine)荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白;发光材料的例子包括鲁米诺;且合适放射性材料的例子包括 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{99}\text{Tc}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{166}\text{Ho}$ 或 $^{153}\text{Sm}$ 。

[0312] 作为标记抗体的替代方案,A $\beta$  (20-42) 球聚体和/或任何其他靶向A $\beta$ 形式可以通过竞争免疫测定在生物学流体中进行测定,其中利用由可检测物质标记的A $\beta$  (20-42) 球聚体标准和未标记的抗A $\beta$  (20-42) 球聚体抗体。在这种测定中,组合生物样品、标记的A $\beta$  (20-42) 球聚体标准和抗A $\beta$  (20-42) 球聚体抗体,并且测定与未标记的抗体结合的标记的A $\beta$  (20-42) 球聚体标准的量。在生物样品中A $\beta$  (20-42) 球聚体和/或任何其他靶向A $\beta$ 形式的量与和抗A $\beta$  (20-42) 球聚体抗体结合的标记的A $\beta$  (20-42) 球聚体标准的量成反比。

[0313] 根据本发明的一个方面,本发明的抗体能够在体外和体内中和A $\beta$  (20-42) 球聚体活性和/或任何其他靶向A $\beta$ 形式的活性。因此,本发明的此类抗体可以例如,在包含A $\beta$  (20-42) 球聚体和/或任何其他靶向A $\beta$ 形式的细胞培养物中、在具有A $\beta$  (20-42) 球聚体和/或本发明的抗体与其交叉反应的任何其他靶向A $\beta$ 形式的人受试者中或其他哺乳动物受试者中用于抑制(即,减少)A $\beta$  (20-42) 球聚体活性和/或任何其他靶向A $\beta$ 形式的活性。在一个实施方案中,本发明提供了用于抑制(即,减少)A $\beta$  (20-42) 球聚体活性和/或任何其他靶向A $\beta$ 形式的活性的方法,其包括使A $\beta$  (20-42) 球聚体和/或任何其他靶向A $\beta$ 形式与本发明的抗体接触,从而使得A $\beta$  (20-42) 球聚体活性和/或任何其他靶向A $\beta$ 形式的活性被抑制(即,减少)。例如,在包含或怀疑包含A $\beta$  (20-42) 球聚体和/或任何其他靶向A $\beta$ 形式的细胞培养物中,本发明的抗体可以添加到培养基中,以抑制(即,减少)培养物中的A $\beta$  (20-42) 球聚体活性和/或任何其他靶向A $\beta$ 形式的活性。

[0314] 在另一个实施方案中,本发明提供了用于抑制(即,减少)在有利地受试者中的靶向A $\beta$ 形式活性的方法,所述受试者患有其中所述A $\beta$ 形式活性是有害的疾病或病症或选自下述的疾病或病症或病症: $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶缺乏、C1-抑制剂缺乏血管性水肿、抗凝血酶缺乏血栓栓塞性疾病、库鲁病、克雅二氏病/羊瘙痒症、牛海绵状脑病、Gerstmann-Straussler-Scheinker病、家族致命性失眠症、亨廷顿氏病、脊髓小脑性共济失调、Machado-Joseph萎缩、齿状红核苍白球肌萎缩症、额颞痴呆、镰状细胞性贫血、不稳定性血红蛋白包涵体溶血、药物诱导的包涵体溶血、帕金森氏病、全身性AL型淀粉样变性、结节性AL型淀粉样变性、全身性AA型淀粉样变性、前列腺淀粉样变性、血液透析淀粉样变性、遗传性(冰岛)脑血管病、

亨廷顿氏病、家族性内脏淀粉样变性、家族性内脏多神经病、家族性内脏淀粉样变性、老年性全身性淀粉样变性、家族性淀粉样蛋白神经病、家族性心脏淀粉样变性、阿尔茨海默氏病、唐氏综合症、甲状腺髓样癌和2型糖尿病(T2DM)。

[0315] 本发明提供了用于抑制(即,减少)患有此类疾病或病症的受试者中的靶向A $\beta$ 形式活性的方法,所述方法包括给受试者施用本发明的抗体,从而使得受试者中的所述A $\beta$ 形式活性被抑制(即,减少)。在本发明的一个方面,所述靶向A $\beta$ 形式是人A $\beta$ 形式,并且受试者是人受试者。可替代地,受试者可以是表达APP或任何A $\beta$ 形式的非人哺乳动物,导致产生本发明的抗体能够与之结合的靶向A $\beta$ 形式。更进一步地,受试者可以是靶向A $\beta$ 形式已引入其内的非人哺乳动物(例如通过施用靶向A $\beta$ 形式或通过表达导致靶向A $\beta$ 形式产生的APP或任何其他A $\beta$ 形式。本发明的抗体可以施用于人受试者用于治疗目的。此外,本发明的抗体可以施用于非人哺乳动物,其中APP或任何A $\beta$ 形式的表达导致产生抗体能够与之结合的靶向A $\beta$ 形式,用于兽医学目的或作为人疾病的动物模型。关于后者,此类动物模型可以用于评价本发明的抗体的治疗功效(例如测试施用剂量和时程)。

[0316] 另一个实施方案是用于抑制(即,减少)患有淀粉样变性例如阿尔茨海默氏病或唐氏综合症的受试者中的靶向A $\beta$ 形式活性的方法。

[0317] 其中靶向A $\beta$ 形式的活性是有害的病症包括疾病和其他病症,其中患有该病症的受试者中靶向A $\beta$ 形式的存在已显示或怀疑负责病症的病理生理学或是或怀疑是促进病症恶化的因素。因此,其中靶向A $\beta$ 形式的活性是有害的病症是其中所述A $\beta$ 形式活性的抑制(即,减少)预期减轻病症的一些或所有症状和/或进展的病症。此类病症可以例如由患有该病症的受试者的生物学流体中靶向A $\beta$ 形式浓度中的增加(例如受试者血清、脑组织、血浆、脑脊液等中靶向A $\beta$ 形式浓度中的增加)来证实,这可以例如使用如上所述的抗A $\beta$  (20-42) 球聚体抗体和/或针对任何其他靶向A $\beta$ 形式的抗体,或针对包含本发明的抗体与之反应的球聚体表位的任何A $\beta$ 形式的任何抗体进行检测。可以用本发明的抗体治疗的病症的非限制性例子包括本文公开的那些病症和下文关于本发明抗体的药物组合物部分中讨论的那些。

[0318] 在另外一个实施方案中,本发明涉及用于预防本文所述的疾病状况进展(例如恶化)的方法。该方法包括给有此治疗需要的受试者(例如哺乳动物,例如人)施用治疗有效量的如本文描述的任何结合蛋白或抗体。可替代地,该方法包括给受试者施用与治疗有效量的至少一种治疗剂组合的,治疗有效量的如本文描述的任何蛋白。

[0319] 在上文描述的用于预防本文所述病症发展或进展的方法中,本领域技术人员已知的一种或多种生物标记、诊断测试或生物标记和诊断测试的组合可以用于测定(1)受试者是否处于发展本文描述的一种或多种病症的危险中;或(2)先前诊断有一种或多种上述病症的受试者中本文所述病症是否正在进展(例如恶化)。

[0320] 本领域已知的一种或多种生物标记、诊断测试或生物标记和诊断测试的组合可以用于鉴定处于发展本文所述病症的危险中的受试者。同样地,本领域已知的一种或多种生物标记、诊断测试或生物标记和诊断测试的组合可以用于测定已鉴定为患有本文所述病症的受试者的疾病或状况的进展。例如,一种或多种生物标记、神经成像标记或者生物或神经成像标记(例如MRI等)的组合可以用于鉴定处于发展阿尔茨海默氏病的危险中的受试者,或对于鉴定为患有阿尔茨海默氏病的那些受试者,该疾病的进展。可以检查的生物标记包括但不限于 $\beta$ -淀粉样蛋白<sub>1-42</sub>、 $\tau$ 、磷酸化 $\tau$  (p $\tau$ )、血浆A $\beta$ 抗体、 $\alpha$ -抗胰凝乳蛋白酶、淀粉样蛋

白前体蛋白、血小板中的APP同种型比、 $\beta$ -分泌酶(也称为BACE)、CD59、8-羟基-脱氧鸟嘌呤、谷氨酰胺合成酶、神经胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)、针对GFAP的抗体、白细胞介素-6-受体复合物、血管舒缓素、黑素转铁蛋白、神经微丝蛋白、硝基酪氨酸、羟固醇、硫苷脂、突触标记、S100 $\beta$ 、NPS、血浆信号传导蛋白等,或其任何组合(参见Shaw,L.,等人,*Nature Reviews* 2007,6,295-303. Borroni,B.,等人,*Current Med. Chem.* 2007,14,1171-1178. Phillips,K.,等人,*Nature Reviews* 2006,5 463-469. Bouwman,F.H.,等人,*Neurology* 2007,69,1006-1011;Ray,S.,等人,*Nature Medicine* 2007,13(11),1359-1362. Cummings,J.,等人,*Neurology* 2007,69,1622-1634.)。

#### [0321] D. 药物组合物

[0322] 本发明还提供了包含本发明的抗体和药学可接受的载体的药物组合物。包含本发明的抗体的药物组合物用于在下述方面使用,但不限于下述方面,诊断、检测或监控病症,预防、治疗、管理或改善病症或其一种或多种症状,和/或研究。在特定实施方案中,组合物包含本发明的一种或多种抗体。在另一个实施方案中,药物组合物包含本发明的一种或多种抗体,以及除本发明抗体外用于治疗其中靶向AB形式的活性是有害的病症的一种或多种预防或治疗剂。在进一步实施方案中,预防或治疗剂已知在病症或其一种或多种症状的预防、治疗、管理或改善中 useful,或已在其中使用或目前正在其中使用。根据这些实施方案,组合物可以进一步包含载体、稀释剂或赋形剂。

[0323] 本发明的抗体可以掺入适合于给受试者施用的药物组合物内。一般地,药物组合物包含本发明的抗体和药学可接受的载体。如本文使用的,“药学可接受的载体”包括生理学相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂等。药学可接受的载体的例子包括下述一种或多种:水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、葡萄糖、甘油、乙醇等,及其组合。在许多情况下,将优选在组合物中包括等渗剂,例如糖、多元醇例如甘露糖醇、山梨糖醇、或氯化钠。药学可接受的载体可以进一步包含少量辅助物质,例如湿润剂或乳化剂、防腐剂或缓冲剂,所述辅助物质增强抗体的保存期限或效力。

[0324] 在进一步的实施方案中,药物组合物包含用于治疗如本文描述的病症的至少一种另外的治疗剂。

[0325] 各种递送系统是已知的,且可以用于施用本发明的一种或多种抗体或本发明的一种或多种抗体与预防剂或治疗剂的组合,所述预防剂或治疗剂用于预防、管理、治疗或改善病症或其一种或多种症状,例如被囊化在脂质体中、微粒、微胶囊、能够表达抗体或抗体片段的重组细胞、受体介导的胞吞(参见例如,Wu和Wu,J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987))、作为逆转录病毒或其他载体等的部分的核酸构建。施用本发明的预防或治疗剂的方法包括但不限于,肠胃外施用(例如,皮内、肌肉、腹膜内、静脉内和皮下),硬膜外(epidural)施用,瘤内施用和粘膜施用(例如,鼻内和经口途径)。此外,可以使用肺施用,例如利用吸入器或喷雾器,和含气溶胶化剂(aerosolizing agent)的制剂。参见例如,美国专利号6,019,968、5,985,320、5,985,309、5,934,272、5,874,064、5,855,913、5,290,540和4,880,078;以及PCT公开号W0 92/19244、W097/32572、W097/44013、W098/31346和W099/66903,其各自整体引入通过引用并入本文。在一个实施方案中,本发明的抗体、组合疗法、或本发明的组合物使用Alkermes AIR® 肺药物递送技术(Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.)来施用。在特定实施方案中,本发明的预防或治疗剂肌肉、静脉内、瘤内、经口、鼻内、

肺、或皮下施用。预防或治疗剂可以通过任何方便的途径施用,例如通过输注或推注注射,通过经由上皮或粘膜皮肤衬里(例如,口腔粘膜、直肠和肠粘膜等)吸收,且可以连同其他生物学活性剂一起施用。施用可以是全身或局部的。

[0326] 在特定实施方案中,可能需要使本发明的抗体局部施用在需要治疗的区域;这可以通过例如但不限于局部输注、注射、或通过植入物来完成,所述植入物为多孔或无孔材料,包括膜和基质,例如硅橡胶(silastic)膜、聚合物、纤维基质(例如,Tissuel®)、或胶原基质。在一个实施方案中,有效量的本发明的一种或多种抗体局部施用于受试者的受影响区域,以预防、治疗、管理、和/或改善病症或其症状。在另一个实施方案中,有效量的本发明的一种或多种抗体,与有效量的除本发明抗体外的一种或多种疗法(例如,一种或多种预防或治疗剂)组合,局部施用于受试者的受影响区域,以预防、治疗、管理、和/或改善病症或其一种或多种症状。

[0327] 在另一个实施方案中,抗体可以在控释或持续释放系统中递送。在一个实施方案中,可以使用泵以达到控释或持续释放(参见Langer,同上;Sefton,1987,CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:20;Buchwald等人,1980,Surgery 88:507;Saudek等人,1989,N. Engl. J. Med. 321:574)。在另一个实施方案中,聚合材料可以用于达到本发明疗法的控释或持续释放(参见例如,Medical Applications of Controlled Release,Langer和Wise(编辑),CRC Pres.,Boca Raton,Fla.(1974);Controlled Drug Bioavailability,Drug Product Design and Performance,Smolen和Ball(编辑),Wiley,New York(1984);Ranger和Peppas,1983,J.,Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61;还参见Levy等人,1985,Science 228:190;During等人,1989,Ann. Neurol. 25:351;Howard等人,1989,J. Neurosurg. 71:105);美国专利号5,679,377;美国专利号5,916,597;美国专利号5,912,015;美国专利号5,989,463;美国专利号5,128,326;PCT公开号W099/15154;和PCT公开号W099/20253。在持续释放制剂中使用的聚合物的例子包括但不限于,聚甲基丙烯酸2-羟乙酯、聚甲基丙烯酸甲酯、聚丙烯酸、乙烯-乙酸乙烯酯共聚物、聚甲基丙烯酸、聚乙醇酸交酯(PLG)、聚酐、聚N-乙烯吡咯烷酮、聚乙烯醇、聚丙烯酰胺、聚乙二醇、聚丙交酯(PLA)、丙交酯-乙醇酸交酯共聚物(PLGA)、和聚原酸酯。在特定实施方案中,持续释放制剂中使用的聚合物是惰性的、不含可沥滤杂质、贮藏稳定、无菌和生物可降解的。在另外一个实施方案中,控释或持续释放系统可以接近预防或治疗靶放置,从而只需要全身剂量的部分(参见例如,Goodson,在Medical Applications of Controlled Release,同上,第2卷,第115-138页(1984))。

[0328] 控释系统在Langer(1990,Science 249:1527-1533)的综述中讨论。本领域技术人员已知的任何技术都可以用于生产包含本发明的一种或多种抗体的持续释放制剂。参见例如,美国专利号4,526,938,PCT公开W091/05548,PCT公开W096/20698,Ning等人,1996,"Intratumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel," Radiotherapy & Oncology 39:179-189,Song等人,1995,"Antibody Mediated Lung Targeting of Long- Circulating Emulsions," PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397,Cleek等人,1997,"Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application," Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854,和Lam

等人,1997,"Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery," Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760,其各自整体通过引用并入本文。

[0329] 在特定实施方案中,当本发明的组合物是编码抗体的核酸时,核酸可以体内施用以促进其编码的抗体的表达,这通过下述实现,将其构建为合适的核酸表达载体的部分且施用它,从而使得其成为细胞内的,例如利用逆转录病毒载体(参见美国专利号4,980,286),或直接注射,或使用微粒轰击(例如,基因枪;Biolistic,Dupont),或用脂质或细胞表面受体或转染剂包被,或与已知进入核的同源异型框样肽连接施用它(参见例如,Joliot等人,1991,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868)。可替代地,核酸可以细胞内引入且通过同源重组整合入宿主细胞DNA内用于表达。

[0330] 本发明的药物组合物配制为与其预期施用途径相容。施用途径的例子包括但不限于,肠胃外,例如,静脉内、皮内、皮下、经口、鼻内(例如,吸入)、经皮(例如,局部)、跨粘膜、和直肠施用。在特定实施方案中,组合物根据常规程序配制为药物组合物,所述药物组合物适合于静脉内、皮下、肌肉、经口、鼻内或局部施用于人类。一般地,用于静脉内施用的组合物是在无菌等渗水性缓冲液中的溶液。必要时,组合物还可以包括增溶剂和局部麻醉剂例如利诺卡因(lignocaine),以减轻注射部位处的疼痛。

[0331] 如果本发明的组合物将局部施用,那么组合物可以配制为软膏、乳膏、经皮贴剂、洗剂、凝胶、洗发剂、喷雾剂、气溶胶、溶液、乳剂形式或本领域技术人员众所周知的其他形式。参见例如,Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms,第19版,Mack Pub. Co.,Easton,Pa.(1995)。对于不可喷雾的局部剂型,一般采用包含与局部应用相容的载体或一种或多种赋形剂,且具有大于水的动态粘度的粘性至半固体或固体形式。合适的制剂包括但不限于,溶液、悬浮液、乳剂、乳膏、软膏、粉末、搽剂、油膏等,必要时进行灭菌或与助剂(例如防腐剂、稳定剂、湿润剂、缓冲剂或盐)混合用于影响各种性质,例如,渗透压。其他合适的局部剂型包括可喷雾的气溶胶制剂,其中活性成分,例如与固体或液体惰性载体组合,与加压挥发物(例如,气体推进剂,例如氟利昂)在混合物中包装或包装在挤压瓶中。需要时保湿剂(moisturizer)或湿润剂也可以加到药物组合物和剂型中。此类另外成分的例子是本领域众所周知的。

[0332] 如果本发明的方法包括组合物的鼻内施用,那么组合物可以配制为气溶胶形式、喷雾剂、雾或滴剂形式。特别地,用于根据本发明使用的预防或治疗剂可以以从加压包或喷雾器呈递的气溶胶喷雾剂形式方便地递送,使用合适的推进剂(例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其他合适的气体)。在加压气溶胶的情况下,剂量单位可以通过提供阀来确定,以递送计量的量。可以配制包含化合物和合适粉末基例如乳糖或淀粉的粉末混合物的胶囊和药液筒(由例如明胶组成),用于在吸入器或吹入器中使用。

[0333] 如果本发明的方法包括经口施用,那么组合物可以配制为片剂、胶囊、扁囊剂、粒状胶囊(gelcaps)、溶液、悬浮液等经口形式。片剂或胶囊可以通过常规方法用药学可接受的赋形剂制备,所述赋形剂例如粘合剂(例如,预凝胶玉米淀粉、聚乙烯吡咯烷酮、或羟丙基甲基纤维素);填充剂(例如,乳糖、微晶纤维素、或磷酸氢钙);润滑剂(例如,硬脂酸镁、滑石粉或硅土);崩解剂(例如,马铃薯淀粉或羟基乙酸淀粉钠);或湿润剂(例如,十二烷基硫酸钠)。片剂可以通过本领域众所周知的方法进行包被。用于经口施用的液体制剂可以采取下



述形式,但不限于下述形式,溶液、糖浆或悬浮液,或它们可以呈现为干燥产品,用于在使用前用水或其他合适的载体构建。此类液体制剂可以通过常规方法用药学可接受的添加剂制备,所述添加剂例如悬浮剂(例如,山梨糖醇糖浆、纤维素衍生物、或氢化可食用脂肪);乳化剂(例如,卵磷脂或阿拉伯胶);非水载体(例如,杏仁油、油酯、乙醇、或分馏植物油);和防腐剂(例如,对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯或山梨酸)。适当时制剂还可以包含缓冲盐、调味剂、着色剂和甜味剂。用于经口施用的制剂可以适当地配制,用于缓慢释放、控释、或持续释放一种或多种预防或治疗剂。

[0334] 本发明的方法可以包括用气溶胶化剂(aerosolizing agent)配制的组合物的肺施用,例如利用吸入器或喷雾器。参见例如,美国专利号6,019,968、5,985,320、5,985,309、5,934,272、5,874,064、5,855,913、5,290,540和4,880,078;以及PCT公开号WO 92/19244、WO 97/32572、WO 97/44013、WO 98/31346和WO 99/66903,其各自整体通过引用并入本文。在特定实施方案中,本发明的抗体、组合疗法、和/或本发明的组合物使用Alkermes AIR®肺药物递送技术(Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.)来施用。

[0335] 本发明的方法可以包括配制用于通过注射(例如通过推注注射或连续输注)肠胃外施用的组合物的施用。用于注射的制剂可以与添加的防腐剂一起以单位剂型(例如,在安瓿或多剂容器中)呈递。组合物可以采取此类形式,如在油性或水性载体中的悬浮液、溶液或乳剂,且可以包含配制试剂例如悬浮、稳定和/或分散剂。可替代地,活性成分可以为粉末形式用于在使用前用合适的载体(例如,无菌无致热原水)构建。本发明的方法可以另外包括配制为贮库(depot)制剂的组合物的施用。此类长效制剂可以通过植入(例如皮下或肌肉内)或通过肌肉注射来施用。因此,例如,组合物可以用合适的聚合或疏水材料(例如,作为在可接受的油中的乳剂)或离子交换树脂配制,或配制为微溶衍生物(例如,作为微溶盐)。

[0336] 本发明的方法包括配制为中性或盐形式的组合物的施用。药学可接受的盐包括由阴离子形成的那些,例如来源于盐酸、磷酸、乙酸、草酸、酒石酸等的那些,以及由阳离子形成的那些,例如来源于钠、钾、铵、钙、铁氢氧化物,异丙胺,三乙胺,2-乙氨基乙醇,组氨酸,普鲁卡因等的那些。

[0337] 一般地,组合物的成分分开或混合在一起以单位剂型提供,例如,作为在指示活性剂的量的密封容器中的干冷冻干燥粉末或无水浓缩剂,所述密封容器例如安瓿或小药囊(sachette)。当施用方式是输注时,组合物可以用包含无菌药物级别的水或盐水的输注瓶分配。当施用方式是注射时,可以提供无菌注射用水或盐水的安瓿,从而使得成分可以在施用前进行混合。

[0338] 特别地,本发明还提供了包装在密封容器中的本发明的一种或多种抗体或药物组合物,所述密封容器例如指示抗体的量的安瓿或小药囊。在一个实施方案中,本发明的一种或多种抗体或药物组合物,作为在密封容器中的干无菌冷冻干燥粉末或无水浓缩剂提供,且可以重构(例如,用水或盐水)至合适浓度以用于给受试者施用。在一个实施方案中,本发明的一种或多种抗体或药物组合物,作为在密封容器中的干无菌冷冻干燥粉末提供,其单位剂量为至少5 mg,例如至少10 mg、至少15 mg、至少25 mg、至少35 mg、至少45 mg、至少50 mg、至少75 mg、或至少100 mg。冷冻干燥的本发明的抗体或药物组合物应在其原容器中贮存于2°C—8°C,并且本发明的抗体或药物组合物应在重构后1周内施用,例如重构后5天内、72小时内、48小时内、24小时内、12小时内、6小时内、5小时内、3小时内、或1小时内。在可替



代的实施方案中,本发明的一种或多种抗体或药物组合物,以液体形式在指示抗体的量和浓度的密封容器中提供。在进一步的实施方案中,液体形式的施用的组合物在密封容器中提供,其量为至少0.25 mg/ml,例如至少0.5 mg/ml、至少1 mg/ml、至少2.5 mg/ml、至少5 mg/ml、至少8 mg/ml、至少10 mg/ml、至少15 mg/kg、至少25 mg/ml、至少50 mg/ml、至少75 mg/ml或至少100 mg/ml。液体形式应在其原容器中贮存于2℃—8℃。

[0339] 本发明的抗体可以掺入适用于肠胃外施用的药物组合物内。在一个方面,抗体将制备为包含0.1—250 mg/ml抗体的可注射溶液。可注射溶液可以由在燧石小瓶或琥珀色小瓶、安瓿或预装注射器中的液体或冷冻干燥剂型组成。缓冲剂可以是L-组氨酸(1—50 mM),最佳5—10 mM, pH 5.0—7.0(最佳pH 6.0)。其他合适的缓冲剂包括但不限于,琥珀酸钠、柠檬酸钠、磷酸钠或磷酸钾。氯化钠可以用于修饰浓度0—300 mM(对于液体剂型最佳150 mM)的溶液的毒性。对于冷冻干燥剂型可以包括冷冻保护剂,主要为0—10%蔗糖(最佳0.5—1.0%)。其他合适的冷冻保护剂包括海藻糖和乳糖。对于冷冻干燥剂型可以包括膨胀剂,主要为1—10%甘露糖醇(最佳2—4%)。稳定剂可以在液体和冷冻干燥剂型中使用,主要为1—50 mM L-甲硫氨酸(最佳5—10 mM)。其他合适的膨胀剂包括甘氨酸、精氨酸,可以作为0—0.05%聚山梨醇酯80(最佳0.005—0.01%)包括。另外的表面活性剂包括但不限于,聚山梨醇酯20和BRIJ表面活性剂。制备为可注射溶液用于肠胃外施用、包含本发明的抗体的药物组合物可以进一步包含用作佐剂的试剂,例如用于增加抗体吸收、或分散的那些。特别有用的佐剂是透明质酸酶例如Hylenex®(重组人透明质酸酶)。在可注射溶液中添加透明质酸酶改善肠胃外施用,特别是皮下施用后的人生物利用度。它还允许具有较少疼痛和不适的更大注射部位体积(即大于1 ml),和最低的注射部位反应发生率。(参见通过引用并入本文的国际申请公开号WO 04/078140和美国专利申请公开号US2006104968)。

[0340] 本发明的组合物可以为多种形式。这些包括例如,液体、半固体和固体剂型,例如液体溶液(例如,可注射和可输注溶液)、分散体或悬浮液、片剂、丸剂、粉末、脂质体和栓剂。优选形式取决于预期施用方式 and 治疗应用。组合物可以是可注射或可输注溶液形式,例如类似于由其他抗体被动免疫接种人使用的那些的组合物。在一个实施方案中,抗体通过静脉内输注或注射来施用。在另一个实施方案中,抗体通过肌内或皮下注射来施用。

[0341] 治疗组合物一般必须是无菌且在制备和贮存条件下是稳定的。组合物可以配制为溶液、微乳剂、分散体、脂质体、或适合于高药物浓度的其他有序结构。无菌可注射溶液可以通过下述制备:将需要量的活性化合物(即,本发明的结合蛋白例如抗体)与上文列举的一种成分或成分组合一起掺入合适的溶剂中,需要时随后进行过滤灭菌。一般地,分散体通过将活性化合物掺入无菌载体内来制备,所述无菌载体包含基本分散介质和来自上文列举那些的所需的成分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌、冷冻干燥粉末的情况下,制备方法包括由其先前无菌过滤的溶液产生活性成分加任何另外所需成分的粉末的真空干燥和喷雾干燥。溶液的正确流动性可以通过下述来维持,例如利用包衣例如卵磷脂,在分散体的情况下维持所需颗粒大小和利用表面活性剂。可注射组合物的延长吸收可以通过在组合物中包括延迟吸收的试剂来引起,所述试剂例如单硬脂酸盐和明胶。

[0342] 本发明的抗体可以通过本领域已知的多种方法来施用。对于许多治疗应用,施途径/模式可以是皮下注射、静脉内注射或输注。如技术人员将认识到的,施途径和/或模式将依所需结果而变化。在某些实施方案中,活性化合物可以与载体一起制备,所述载体将

保护化合物免于快速释放,例如控释制剂,包括植入物、经皮贴剂、和微囊化递送系统。可以使用生物可降解的、生物相容的聚合物,例如乙烯乙酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。用于制备此类制剂的许多方法是获得专利保护的或是本领域技术人员一般已知的。参见例如,Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems,J.R. Robinson,编辑,Marcel Dekker,Inc.,New York,1978。

[0343] 在某些实施方案中,本发明的抗体可以例如,与惰性稀释剂或可同化食用载体一起经口施用。抗体(和若需要,其他成分)也可以装入硬或软壳明胶胶囊中,压缩成片剂,或直接掺入受试者的饮食内。对于经口治疗施用,抗体可以与赋形剂掺合,且以可摄食片剂、口腔含化片剂、锭剂、胶囊、酏剂、悬浮液、糖浆、薄片(wafer)等的形式使用。为了通过除肠胃外施用外施用本发明的抗体,可能必须用材料包被抗体、或将抗体与材料共施用,以防止其失活。

[0344] 补充性活性化合物也可以掺入组合物内。在某些实施方案中,本发明的抗体与一种或多种另外的治疗剂共配制和/或共施用,所述治疗剂用于治疗本文描述的病症或疾病。例如,本发明的抗AB(20-42)球聚体抗体可以与结合其他靶的一种或多种另外的抗体(例如,结合其他可溶性抗原或结合细胞表面分子的抗体)共配制和/或共施用。此外,本发明的一种或多种抗体可以与两种或更多前述治疗剂组合使用。此类组合疗法可以有利地利用较低剂量的施用的治疗剂,从而避免与各种单一疗法相关的可能毒性或并发症。

[0345] 在某些实施方案中,本发明的抗体与本领域已知的半衰期延长载体连接。此类载体包括但不限于,Fc结构域、聚乙二醇、和葡聚糖。此类载体在例如美国申请系列号09/428,082和公开的PCT申请号W0 99/25044中描述,为了任何目的将其通过引用并入本文。

[0346] 在特定实施方案中,施用包含编码本发明的抗体的核苷酸序列的核酸序列,以经由基因疗法治疗、预防、管理、或改善病症或其一种或多种症状。基因疗法指通过给受试者施用表达的或可表达核酸来进行的疗法。在本发明的这个实施方案中,核酸生产介导预防或治疗作用的其编码的本发明抗体。

[0347] 本领域可用的任何关于基因治疗的方法可以根据本发明使用。关于基因治疗方法的一般综述,参见Goldspiel等人,1993,Clinical Pharmacy 12:488-505;Wu和Wu,1991,Biotherapy 3:87-95;Tolstoshev,1993,Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596;Mulligan,Science 260:926-932(1993);以及Morgan和Anderson,1993,Ann. Rev. Biochem. 62:191-217;1993年5月,TIBTECH 11(5):155-215。可使用的重组DNA技术领域通常已知的方法描述于 Ausubel等人(编辑),Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley & Sons,NY(1993);和Kriegler,Gene Transfer and Expression,A Laboratory Manual,Stockton Press,NY(1990)。各种基因治疗方法的详细描述公开于通过引用并入本文的US20050042664 A1中。

[0348] 本发明的抗体可以单独或组合用于治疗疾病例如阿尔茨海默氏病、唐氏综合症、痴呆、帕金森氏病或与 $\beta$ 淀粉样蛋白在脑内的积累相关的任何其他疾病或状况。本发明的抗体可以用于治疗“构象疾病”。此类疾病起于组成成分蛋白内的二级至三级结构变化,伴随改变的蛋白的后续聚集(Hayden等人,JOP. J Pancreas 2005;6(4):287-302)。特别地,本发明的抗体可以用于治疗下述构象疾病中的一种或多种: $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶缺乏、C1-抑制因子缺乏血管性水肿、抗凝血酶缺乏血栓栓塞性疾病、库鲁病、克雅二氏病/羊瘙痒症、牛海绵状

脑病、Gerstmann-Straussler-Scheinker病、家族致命性失眠症、亨廷顿氏病、脊髓小脑性共济失调、Machado-Joseph萎缩、齿状红核苍白球肌萎缩症、额颞痴呆、镰状细胞性贫血、不稳定性血红蛋白包涵体溶血、药物诱导的包涵体溶血、帕金森氏病、全身性AL型淀粉样变性、结节性AL型淀粉样变性、全身性AA型淀粉样变性、前列腺淀粉样变性、血液透析淀粉样变性、遗传性(冰岛)脑血管病、亨廷顿氏病、家族性内脏淀粉样变性、家族性内脏多神经病、家族性内脏淀粉样变性、老年性全身性淀粉样变性、家族性淀粉样蛋白神经病、家族性心脏淀粉样变性、阿尔茨海默氏病、唐氏综合症、甲状腺髓样癌和2型糖尿病(T2DM)。优选地,本发明的抗体可以用于治疗淀粉样蛋白例如阿尔茨海默氏病和唐氏综合症。

[0349] 应当理解本发明的抗体可以单独或与一种或多种另外的试剂例如治疗剂(例如小分子或生物制品)组合使用,所述另外的试剂由技术人员根据其预期目的进行选择。例如,另外的治疗剂可以是“认知增强药物”,其是改善受损的人脑认知能力(即思考、学习和记忆)的药物。认知增强药物通过改变神经化学物质(例如神经递质、酶和激素)的可用度、改善供氧、刺激神经生长或抑制神经损害来起作用。认知增强药物的例子包括增加乙酰胆碱的活性的化合物,例如但不限于乙酰胆碱受体激动剂(例如烟碱 $\alpha$ -7受体激动剂或变构调节剂、 $\alpha$ 4 $\beta$ 2烟碱受体激动剂或变构调节剂)、乙酰胆碱酯酶抑制剂(例如多奈哌齐、利斯的明和加兰他敏)、丁酰胆碱酯酶抑制剂、N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体拮抗剂(例如美金刚)、活性依赖性神经保护蛋白(ADNP)激动剂、血清素5-HT<sub>1A</sub>受体激动剂(例如扎利罗登)、5-HT<sub>4</sub>受体激动剂、5-HT<sub>6</sub>受体拮抗剂、血清素1A受体拮抗剂、组胺H<sub>3</sub>受体拮抗剂、钙蛋白酶抑制剂、血管内皮生长因子(VEGF)蛋白或激动剂、营养生长因子、抗细胞凋亡化合物、AMPA型谷氨酸受体激活物、L型或N型钙通道阻滞剂或调节剂、钾通道阻滞剂、缺氧诱导因子(HIF)激活物、HIF脯氨酰4-羟化酶抑制剂、抗炎剂、淀粉样蛋白A $\beta$ 肽或淀粉样蛋白斑的抑制剂、 $\tau$ 高磷酸化抑制剂、磷酸二酯酶5抑制剂(例如他达拉非、西地那非)、磷酸二酯酶4抑制剂、单胺氧化酶抑制剂或其药学可接受的盐。此类认知增强药物的具体例子包括但不限于胆碱酯酶抑制剂例如多奈哌齐(Aricept®)、利斯的明(Exelon®)、加兰他敏(Reminy1®)、N-甲基-D-天冬氨酸拮抗剂例如美金刚(Namenda®)。至少一种认知增强药物可以与本发明的抗体同时施用或与本发明的抗体序贯施用(并且以任何次序),包括目前公认或未来公认为治疗待通过本发明的抗体治疗的疾病或状况有用的那些试剂)。另外,认为当在上述治疗中使用,本文描述的组合物可以具有累加或协同作用。另外的试剂还可以是对治疗组合物赋予有利属性的试剂,例如影响组合物粘度的试剂。

[0350] 应进一步理解将包括在本发明内的组合是对其预期目的有用的那些组合。上文所述试剂是举例说明性目的的且不希望是限制性的。作为本发明部分的组合可以包含本发明的抗体和选自下列的至少一种另外的试剂。组合还可以包括超过一种另外的试剂,例如,二种或三种另外的试剂,如果组合是使得形成的组合物可以行使其预期功能的话。

[0351] 本发明的药物组合物可以包括“治疗有效量”或“预防有效量”的本发明的抗体。“治疗有效量”指在所需剂量和时间段有效达到所需治疗结果的量。抗体的治疗有效量可以由本领域技术人员来确定,且可以根据下述因素而变化,例如个体疾病状态、年龄、性别、和重量,以及抗体在个体中引起所需应答的能力。治疗有效量也是其中治疗有利作用大于抗体的任何毒性或有害作用的量。“预防有效量”指在所需剂量和时间段有效达到所需预防结果的量。一般地,因为预防剂量在疾病前或疾病早期时在受试者中使用,所以预防有效量将

小于治疗有效量。

[0352] 剂量方案可以进行调整以提供最佳所需应答(例如,治疗或预防应答)。例如,可以施用单次推注,几个分份剂量可以随着时间过去而施用,或剂量可以如治疗情形的紧急状态所指示的按比例减少或增加。为了易于施用和剂量一致,以单位剂型配制肠胃外组合物是特别有利的。如本文使用的,单位剂型指适合作为单位剂量用于待治疗的哺乳动物受试者的物理上不连续单位;每个单位包含与所需药学载体结合的计算为产生所需疗效的预定量的活性化合物。关于本发明的单位剂型的详细说明由下述指示且直接取决于下述:(a) 活性化合物的独特特征和待达到的具体治疗或预防作用,和(b) 配制这种用于治疗个体中敏感性的活性化合物的领域固有的局限性。

[0353] 关于本发明的抗体的治疗或预防有效量的示例性非限制性范围是0.1-20 mg/kg,例如1-10 mg/kg。应当指出剂量值可以依待减轻的状况类型和严重性而变化。应进一步理解对于任何特定受试者,根据个体需要和施用或监督组合物施用的人的专业判断,具体剂量方案应当随着时间过去进行调整,并且本文所述的剂量范围仅是示例性的,且不希望限制要求保护的组合物的范围或实践。

[0354] 对于本领域技术人员将显而易见的是,本文描述的本发明方法的其他合适修改和适应是显而易见的,且无需背离本发明或本文公开的实施方案的范围使用合适的相同方案即可进行。尽管本发明目前已得到详细描述,但通过参考下述实施例将更清楚地理解本发明,所述实施例被包括仅用于举例说明性目的且不希望限制本发明。

## 实施例

[0355] 实施例1:球聚体的制备

[0356] a) A $\beta$  (1-42) 球聚体:

[0357] 将A $\beta$  (1-42) 合成肽(H-1368, Bachem, Bubendorf, 瑞士)以6 mg/ml悬浮于100%1,1,1,3,3,3-六氟-2-丙醇(HFIP)中,并且在振荡下在37°C下孵育1.5小时用于完全溶解。HFIP充当氢键破坏物,并且用于消除A $\beta$ 肽中预先存在的结构不均匀性。通过在SpeedVac中蒸发去除HFIP,并且使A $\beta$  (1-42)以5 mM的浓度重悬浮于二甲亚砜中,并且超声处理20秒。将HFIP预处理的A $\beta$  (1-42)在磷酸盐缓冲盐水(PBS) (20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 140 mM NaCl, pH 7.4)中稀释至400  $\mu$ M,并且加入1/10体积2%十二烷基硫酸钠(SDS) (H<sub>2</sub>O溶液) (0.2% SDS的终浓度)。在37°C孵育6小时导致16/20-kDa A $\beta$  (1-42) 球聚体(关于球形寡聚物的简单形式)中间产物。通过用三体积H<sub>2</sub>O进一步稀释和在37°C下孵育18小时而生成38/48-kDa A $\beta$  (1-42) 球聚体。以3000 g离心20分钟后,将样品通过超滤(30-kDa截止)浓缩,针对5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、35 mM NaCl, pH 7.4透析,以10,000 g离心10分钟,并且取出包含38/48-kDa A $\beta$  (1-42) 球聚体的上清液。作为透析的替代方案,38/48-kDa A $\beta$  (1-42) 球聚体还可以通过九倍过量(v/v)的冰冷的甲醇/乙酸溶液(33%甲醇、4%乙酸)在4°C沉淀1小时。随后将38/48-kDa A $\beta$  (1-42) 球聚体沉淀(以16200 g 10分钟),重悬浮于5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、35 mM NaCl, pH 7.4中,并且将pH调整至7.4。

[0358] b) A $\beta$  (20-42) 球聚体:

[0359] 将根据实施例1a制备的1.59 ml A $\beta$  (1-42) 球聚体制备物与38 ml缓冲液(50 mM MES/NaOH, pH 7.4)和200  $\mu$ l的1 mg/ml嗜热菌蛋白酶(Roche)的水溶液混合。将反应混合物

在RT搅拌20小时。随后,加入80  $\mu$ l的100 mM EDTA,pH 7.4的水溶液,并且另外用400  $\mu$ l的1%强度SDS溶液将混合物调整至0.01%的SDS含量。经由15 ml 30 kDa Centriprep管将反应混合物浓缩至约1 ml。将浓缩物与9 ml缓冲液(50 mM MES/NaOH、0.02% SDS,pH 7.4)混合,且再次浓缩至1 ml。将浓缩物在6°C在透析管中针对1 l缓冲液(5 mM磷酸钠、35 mM NaCl)透析16小时。用2%强度SDS的水溶液将透析液调整至0.1%的SDS含量。将样品以10,000 g离心10分钟,并且取出A $\beta$  (20-42) 球聚体上清液。

[0360] c) A $\beta$  (12-42) 球聚体:

[0361] 将根据实施例1a制备的2 ml A $\beta$  (1-42) 球聚体制备物与38 ml缓冲液(5 mM磷酸钠、35 mM氯化钠,pH 7.4)和150  $\mu$ l的1 mg/ml GluC胞内蛋白酶(Roche)的水溶液混合。将反应混合物在RT搅拌6小时,并且随后加入进一步150  $\mu$ l的1 mg/ml GluC胞内蛋白酶(Roche)的水溶液。将反应混合物在RT搅拌另外16小时,随后添加8  $\mu$ l 5 M DIFP溶液。经由15 ml 30 kDa Centriprep管将反应混合物浓缩至约1 ml。将浓缩物与9 ml缓冲液(5 mM磷酸钠、35 mM氯化钠,pH 7.4)混合,且再次浓缩至1 ml。将浓缩物在6°C在透析管中针对1 l缓冲液(5 mM磷酸钠、35 mM NaCl)透析16小时。用1%强度SDS的水溶液将透析液调整至0.1%的SDS含量。将样品以10,000 g离心10分钟,并且取出A $\beta$  (12-42) 球聚体上清液。

[0362] d) 交联的A $\beta$  (1-42) 球聚体:

[0363] 将A $\beta$  (1-42) 合成肽(H-1368,Bachem,Bubendorf,瑞士)以6 mg/ml悬浮于100%1,1,1,3,3,3-六氟-2-丙醇(HFIP)中,并且在振荡下在37°C下孵育1.5小时用于完全溶解。HFIP充当氢键破坏物,并且用于消除A $\beta$ 肽中预先存在的结构不均匀性。通过SpeedVac蒸发去除HFIP,并且使A $\beta$  (12-42) 球聚体A $\beta$  (1-42)以5 mM的浓度重悬浮于二甲亚砜中,并且超声处理20秒。将HFIP预处理的A $\beta$  (1-42)在PBS(20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、140 mM NaCl,pH 7.4)中稀释至400  $\mu$ M,并且加入1/10体积2% SDS(水溶液)(0.2% SDS的终浓度)。在37°C孵育6小时导致16/20-kDa A $\beta$  (1-42) 球聚体(关于球聚体寡聚物的简单形式)中间产物。通过用3体积水进一步稀释和在37°C下孵育18小时,生成38/48-kDa A $\beta$  (1-42) 球聚体。现在通过与1 mM戊二醛一起在21°C室温孵育2小时随后为乙醇胺(5 mM)在室温处理30分钟进行38/48-kDa A $\beta$  (1-42) 球聚体的交联。

[0364] 实施例2:人源化抗A $\beta$  (20-42) 球聚体4C9抗体的生成和分离

[0365] 实施例2.1:人抗体构架的选择

[0366] 人抗体构架的选择基于规范结构的相似性和人抗体的氨基酸序列同源性。进一步地,当基于人VH和V $\kappa$ 种系序列的氨基酸序列同源性鉴定合适的受体VL和VH构架序列时,考虑保留支持环结构和VH/VL界面的氨基酸残基以及保留Vernier区的氨基酸残基。此外,基于重叠肽对于多种MHC I类和/或MHC II类等位基因的预测亲和力,在计算机芯片上评价起因于将4C9 或 10B3 CDRs嫁接到潜在合适的受体VL和VH构架序列内的VH和VL序列的免疫原性。使VH和VL适合于各自VH或VL家族的共有区,以进一步使潜在免疫原性降到最低。进行选择的对于鼠氨基酸残基的回复突变,以保留支持环结构和VH/VL界面的氨基酸。这些回复突变在具有各自VH或VL种系基因的天然存在的人VH或VL序列的相应库中的频率通过氨基酸序列比对进行测定。在起因于上文描述的考虑的VH和VL序列中检查潜在的N联糖基化位点(NXS或NXT,其中X是除了P外的任何氨基酸)。

[0367] 实施例2.2:鼠抗A $\beta$  (20-42) 球聚体抗体的人源化

[0368] 4C9hum\_VH.1z (SEQ ID NO:6):将来自表3a中所述的鼠抗AB(20-42)球聚体抗体m4C9的重链CDR序列嫁接到人VH1-69和JH4序列的受体构架内。

[0369] 4C9hum\_VH.1 (SEQ ID NO:7):将来自表3a中所述的鼠抗AB(20-42)球聚体抗体m4C9的重链CDR序列嫁接到人VH1-69和JH4序列的受体构架内,所述受体构架包含防止N末端焦谷氨酸形成的Q1E变化以及共有变化S16A、G27Y和S30T。

[0370] 4C9hum\_VH.1a (SEQ ID NO:8):将来自表3a中所述的鼠抗AB(20-42)球聚体抗体m4C9的重链CDR序列嫁接到人VH1-69和JH4序列的受体构架内,所述受体构架包含防止N末端焦谷氨酸形成的Q1E变化、共有变化S16A、G27Y和S30T以及构架回复突变M48I、V68A、I70L、A72V、A97T和R98T。

[0371] 4C9hum\_VH.1b (SEQ ID NO:9):将来自表3a中所述的鼠抗AB(20-42)球聚体抗体m4C9的重链CDR序列嫁接到人VH1-69和JH4序列的受体构架内,所述受体构架包含防止N末端焦谷氨酸形成的Q1E变化、共有变化S16A、G27Y和S30T以及构架回复突变A72V和R98T。

[0372] 4C9hum\_VH.2z (SEQ ID NO:10):将来自表3a中所述的鼠抗AB(20-42)球聚体抗体m4C9的重链CDR序列嫁接到人VH7-4.1和JH4序列的受体构架内。

[0373] 4C9hum\_VH.2 (SEQ ID NO:11):将来自表3a中所述的鼠抗AB(20-42)球聚体抗体m4C9的重链CDR序列嫁接到人VH7-4.1和JH4序列的受体构架内,所述受体构架包含防止N末端焦谷氨酸形成的Q1E变化。

[0374] 4C9hum\_VH.2a (SEQ ID NO:12):将来自表3a中所述的鼠抗AB(20-42)球聚体抗体m4C9的重链CDR序列嫁接到人VH7-4.1和JH4序列的受体构架内,所述受体构架包含防止N末端焦谷氨酸形成的Q1E变化以及构架回复突变M48I、F68A、F70L、L72V、T74K、A97T和R98T。

[0375] 4C9hum\_VH.2b (SEQ ID NO:13):将来自表3a中所述的鼠抗AB(20-42)球聚体抗体m4C9的重链CDR序列嫁接到人VH7-4.1和JH4序列的受体构架内,所述受体构架包含防止N末端焦谷氨酸形成的Q1E变化以及构架回复突变L72V和R98T。

[0376] 4C9hum\_VL.1z (SEQ ID NO:14):将来自表3a中所述的鼠抗AB(20-42)球聚体抗体m4C9的轻链CDR序列嫁接到人1-16/L1和Jk2序列的受体构架内。

[0377] 4C9hum\_VL.1 (SEQ ID NO:15):将来自表3a中所述的鼠抗AB(20-42)球聚体抗体m4C9的轻链CDR序列嫁接到人1-16/L1和Jk2序列的受体构架内,所述受体构架包含共有变化S46L。

[0378] 4C9hum\_VL.1a (SEQ ID NO:16):将来自表3a中所述的鼠抗AB(20-42)球聚体抗体m4C9的轻链CDR序列嫁接到人1-16/L1和Jk2序列的受体构架内,所述受体构架包含构架回复突变L46T和F71Y。

[0379] 10B3hum\_VH.1 (SEQ ID NO:29):将来自表3a中所述的鼠抗AB(20-42)球聚体抗体m10B3的重链CDR序列嫁接到人VH3-48和JH4序列的受体构架内。

[0380] 10B3hum\_VH.1a (SEQ ID NO:30):将来自表3a中所述的鼠抗AB(20-42)球聚体抗体m10B3的重链CDR序列嫁接到人VH3-48和JH4序列的受体构架内,所述受体构架包含构架回复突变S49A。

[0381] 10B3hum\_VL.1 (SEQ ID NO:31):将来自表3a中所述的鼠抗AB(20-42)球聚体抗体m10B3的轻链CDR序列嫁接到人4-1/B3和Jk4序列的受体构架内。

[0382] 10B3hum\_VL.1a (SEQ ID NO:32):将来自表3a中所述的鼠抗AB(20-42)球聚体抗

体m10B3的轻链CDR序列嫁接到人4-1/B3和Jk4序列的受体构架内,所述受体构架包含构架回复突变P49S。

[0383] 所述VH和VL回复突变、共有变化或Q1E突变中的一些可能在后续亲和力成熟过程中去除。

[0384] 实施例2.3:人源化抗体的构建

[0385] 使用寡核苷酸重新构建上文描述的在计算机芯片上构建的人源化抗体。对于每个可变区cDNA,各60-80个核苷酸的6种寡核苷酸设计为在每种寡核苷酸的5'和/或3'末端上彼此重叠20个核苷酸。在退火反应中,将所有6种寡核苷酸合并,煮沸且在dNTPs的存在下退火。随后加入DNA聚合酶I,大(Klenow)片段(New England Biolabs #M0210,Beverly, MA.),以填充在重叠的寡核苷酸之间的约40 bp缺口。随后将使用含有与经修饰的pBOS载体中的多克隆位点互补的突出端序列的两种最外面的引物进行PCR,以扩增整个可变区基因(Mizushima,S.和Nagata,S.,(1990)Nucleic acids Research 第18卷,No. 17))。衍生自每种cDNA装配的PCR产物在琼脂糖凝胶上分离,并且将切除且纯化对应于预测的可变区cDNA大小的带。通过在细菌中的同源重组,将可变重区符合读框地插入编码含有2个铰链区氨基酸突变的人IgG1恒定区的cDNA片段上。这些突变是在位置234(EU编号)的亮氨酸至丙氨酸的改变和在位置235的亮氨酸至丙氨酸的改变(Lund等人,1991,J. Immunol.,147:2657)。通过同源重组将可变轻链区与人κ恒定区一起符合读框地插入。分离细菌菌落且提取质粒DNA;cDNA插入片段将整体测序。将对应于每种抗体的正确的人源化重和轻链共转染到COS细胞内,以瞬时产生全长人源化抗AB球聚体抗体。通过A蛋白琼脂糖层析纯化含有重组嵌合抗体的细胞上清液,且通过添加酸缓冲液洗脱结合的抗体。将抗体中和且透析到PBS中。(Dieder Moechars等人J Biol Chem 274:6483 - 6492(1999);Ausubel,F.M.等人编辑,Short Protocols In Molecular Biology(第4版1999)John Wiley & Sons,NY.(ISBN 0-471-32938-X);Lu和Weiner编辑,Cloning and Expression Vectors for Gene Function Analysis(2001)BioTechniques Press. Westborough,MA. 第298页(ISBN 1-881299-21-X);Kontermann和Dubel编辑,Antibody Engineering(2001)Springer-Verlag. New York. 第790页(ISBN 3-540-41354-5);Old,R.W. & S.B. Primrose,Principles of Gene Manipulation:An Introduction To Genetic Engineering(第3版1985)Blackwell Scientific Publications,Boston. Studies in Microbiology;第2卷:第409页(ISBN 0-632-01318-4);Sambrook,J.等人编辑,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(第2版1989)Cold Spring Harbor Laboratory Press,NY.第1-3卷.(ISBN 0-87969-309-6);Winnacker,E.L. From Genes To Clones:Introduction To Gene Technology(1987)VCH Publishers,NY(由Horst Ibelgaufts翻译). 第634页(ISBN 0-89573-614-4);所有这些整体通过引用并入本文)。

[0386] 尽管上文已描述许多实施方案和特征,但本领域技术人员应当理解可以作出所述实施方案和特征的修饰和改变,而不背离如附加权利要求中定义的本发明的公开内容。

[0387] 实施例3:经由斑点印迹的抗体选择性分析

[0388] 为了表征单克隆抗AB(20-42)球聚体抗体的选择性,测试它们与不同AB形式的结合。为此,制备范围为100 pmol/μl - 0.00001 pmol/μl的个别AB(1-42)形式在补充有0.2 mg/ml BSA的PBS中的系列稀释物。将1 μl每种稀释物点到硝酸纤维素膜上。通过与相应抗

体 (0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 一起孵育,随后为使用过氧化物酶缀合的抗小鼠 IgG 和染色试剂 BM Blue POD Substrate (Roche) 的免疫染色进行检测。

[0389] 用于斑点印迹的 A $\beta$  标准:

[0390] 1. A $\beta$  (1-42) 单体, 0.1%  $\text{NH}_4\text{OH}$

[0391] 将 1 mg A $\beta$  (1-42) (Bachem Inc., 目录号 H-1368) 溶解于 0.5 ml 0.1%  $\text{NH}_4\text{OH}$  的  $\text{H}_2\text{O}$  溶液中 (新鲜制备的) (= 2 mg/ml), 并且立即在室温振荡 30 秒, 以获得澄清溶液。将样品贮存于  $-20^\circ\text{C}$  直至使用时。

[0392] 2. A $\beta$  (1-40) 单体, 0.1%  $\text{NH}_4\text{OH}$

[0393] 将 1 mg A $\beta$  (1-40) (Bachem Inc., 目录号 H-1368) 溶解于 0.5 ml 0.1%  $\text{NH}_4\text{OH}$  的  $\text{H}_2\text{O}$  溶液中 (新鲜制备的) (= 2 mg/ml), 并且立即在室温振荡 30 秒, 以获得澄清溶液。将样品贮存于  $-20^\circ\text{C}$  直至使用时。

[0394] 3. A $\beta$  (1-42) 单体, 0.1%  $\text{NaOH}$

[0395] 将 2.5 mg A $\beta$  (1-42) (Bachem Inc., 目录号 H-1368) 溶解于 0.5 ml 0.1%  $\text{NaOH}$  的  $\text{H}_2\text{O}$  溶液中 (新鲜制备的) (= 5 mg/ml), 并且立即在室温振荡 30 秒, 以获得澄清溶液。将样品贮存于  $-20^\circ\text{C}$  直至使用时。

[0396] 4. A $\beta$  (1-40) 单体, 0.1%  $\text{NaOH}$

[0397] 将 2.5 mg A $\beta$  (1-40) (Bachem Inc., 目录号 H-1368) 溶解于 0.5 ml 0.1%  $\text{NaOH}$  的  $\text{H}_2\text{O}$  溶液中 (新鲜制备的) (= 5 mg/ml), 并且立即在室温振荡 30 秒, 以获得澄清溶液。将样品贮存于  $-20^\circ\text{C}$  直至使用时。

[0398] 5. A $\beta$  (1-42) 球聚体

[0399] A $\beta$  (1-42) 球聚体如实施例 1a 中所述制备 (通过透析更换缓冲液)。

[0400] 6. A $\beta$  (12-42) 球聚体

[0401] A $\beta$  (12-42) 球聚体如实施例 1c 中所述制备。

[0402] 7. A $\beta$  (20-42) 球聚体

[0403] A $\beta$  (20-42) 球聚体如实施例 1b 中所述制备。

[0404] 8. A $\beta$  (1-42) 纤丝

[0405] 将 1 mg A $\beta$  (1-42) (Bachem Inc. 目录号: H-1368) 溶解于 500  $\mu\text{l}$  含水 0.1%  $\text{NH}_4\text{OH}$  (Eppendorf 管) 中, 并且在室温搅拌 1 分钟。用 300  $\mu\text{l}$  20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 140 mM  $\text{NaCl}$ , pH 7.4 将 100  $\mu\text{l}$  这种新鲜制备的 A $\beta$  (1-42) 溶液中和。用 1%  $\text{HCl}$  将 pH 调整至 pH 7.4。将样品在  $37^\circ\text{C}$  孵育 24 小时并且离心 (以 10000g 10 分钟)。弃去上清液, 并且通过涡旋 1 分钟用 400  $\mu\text{l}$  20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 140 mM  $\text{NaCl}$ , pH 7.4 重悬浮纤丝沉淀。

[0406] 9. sAPP $\alpha$

[0407] 通过 Sigma (目录号 S9564; 在 20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 140 mM  $\text{NaCl}$ ; pH 7.4 中 25  $\mu\text{g}$ ) 供应。用 20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 140 mM  $\text{NaCl}$  pH 7.4、0.2 mg/ml BSA 将 sAPP $\alpha$  稀释至 0.1 mg/ml (= 1 pmol/ $\mu\text{l}$ )。

[0408] 用于斑点印迹的材料:

[0409] A $\beta$  标准 (参见上文 1. 至 9.) 在 20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 140 mM  $\text{NaCl}$ , pH 7.4 + 0.2 mg/ml BSA 中系列稀释, 以获得下述浓度: 100 pmol/ $\mu\text{l}$ 、10 pmol/ $\mu\text{l}$ 、1 pmol/ $\mu\text{l}$ 、0.1 pmol/ $\mu\text{l}$ 、0.01 pmol/ $\mu\text{l}$ 、0.001 pmol/ $\mu\text{l}$ 、0.0001 pmol/ $\mu\text{l}$  和 0.00001 pmol/ $\mu\text{l}$ 。



- [0410] 硝酸纤维素:反式斑点转移介质,纯硝酸纤维素膜(0.45  $\mu\text{m}$ );BIO-RAD
- [0411] 抗-小鼠-POD: 目录号: 715-035-150 (Jackson Immuno Research)
- [0412] 检测试剂:BM Blue POD Substrate,沉淀,目录号:11442066001 (Roche)
- [0413] 牛血清白蛋白, (BSA):目录号:11926 (Serva)
- [0414] 封闭试剂:5%低脂乳的TBS溶液
- [0415] 缓冲溶液:
- [0416] TBS:25 mM Tris / HCl缓冲液pH 7.5 + 150 mM NaCl
- [0417] TTBS:25 mM Tris / HCl - 缓冲液pH 7.5 + 150 mM NaCl + 0.05%Tween 20
- [0418] PBS + 0.2 mg/ml BSA:20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 缓冲液pH 7.4 + 140 mM NaCl + 0.2 mg/ml BSA
- [0419] 抗体溶液I:溶于20 ml 1%低脂乳的TBS溶液中的0.2  $\mu\text{g/ml}$ 抗体
- [0420] 抗体:
- [0421] - 抗-A $\beta$ 单克隆抗体克隆6E10;浓度:1mg/ml;目录号: SIG-39320 (Covance);贮存于-80°C
- [0422] - 抗-A $\beta$ 单克隆抗体克隆m4C9;1.66 mg/ml OD 280 nm;贮存于-80°C
- [0423] - 抗-A $\beta$ 单克隆抗体克隆m10B3;1.66 mg/ml OD 280 nm;贮存于-80°C
- [0424] 抗体溶液II:抗小鼠-POD在1%低脂乳的TBS溶液中的1:5000稀释物。
- [0425] 斑点印迹程序:
- [0426] 1) 将各1  $\mu\text{l}$ 的8个浓度的不同A $\beta$ 标准(通过系列稀释获得)以彼此约1 cm的距离点在硝酸纤维素膜上。
- [0427] 2) 允许A $\beta$ 标准的斑点在硝酸纤维素膜上在空气中在室温(RT)干燥至少10分钟。(=斑点印迹)。
- [0428] 3) 封闭:
- [0429] 使斑点印迹与30 ml 5%低脂乳的TBS溶液一起在RT孵育1.5小时。
- [0430] 4) 洗涤:
- [0431] 弃去封闭液,并且使斑点印迹与20 ml TTBS一起在振荡下在RT孵育10分钟。
- [0432] 5) 抗体溶液I:
- [0433] 弃去洗涤缓冲液,并且使斑点印迹与抗体溶液I一起在RT孵育2小时。
- [0434] 6) 洗涤:
- [0435] 弃去抗体溶液I,并且使斑点印迹与20 ml TTBS一起在振荡下在RT孵育10分钟。弃去洗涤液,并且使斑点印迹与20 ml TTBS一起在振荡下在RT孵育10分钟。弃去洗涤液,并且使斑点印迹与20 ml TBS一起在振荡下在RT孵育10分钟。
- [0436] 7: 抗体溶液II:
- [0437] 弃去洗涤缓冲液,并且使斑点印迹与抗体溶液II一起在RT孵育1小时。
- [0438] 8) 洗涤:
- [0439] 弃去抗体溶液II,并且使斑点印迹与20 ml TTBS一起在振荡下在RT孵育10分钟。弃去洗涤液,并且使斑点印迹与20 ml TTBS一起在振荡下在RT孵育10分钟。弃去洗涤液,并且使斑点印迹与20 ml TBS一起在振荡下在RT孵育10分钟。
- [0440] 9) 显色:

[0441] 弃去洗涤液。用7.5 ml BM Blue POD Substrate使斑点印迹显色10分钟。通过用H<sub>2</sub>O强烈洗涤斑点印迹来终止显色。基于斑点强度的密度计分析(GS800密度计(BioRad)和软件包Quantity one,版本4.5.0(BioRad))完成定量评价。仅评价具有大于最后一个光学明确鉴定的A $\beta$ (20-42)球聚体斑点的相对密度20%的相对密度的斑点。对于每个斑点印迹独立地测定这个阈值。计算的值指示对于给定抗体在A $\beta$ (20-42)球聚体和各自A $\beta$ 形式的识别之间的关系。

[0442] 用不同的鼠单克隆抗A $\beta$ 抗体(m6E10、m10B3和m4C9)进行斑点印迹分析。通过用A $\beta$ (20-42)球聚体主动免疫小鼠并且随后选择融合的杂交瘤细胞而获得m10B3和m4C9。将个别A $\beta$ 形式以系列稀释物应用,且与各自抗体一起孵育用于免疫反应(1 = A $\beta$ (1-42)单体,0.1% NH<sub>4</sub>OH;2 = A $\beta$ (1-40)单体,0.1% NH<sub>4</sub>OH;3 = A $\beta$ (1-42)单体,0.1% NaOH;4 = A $\beta$ (1-40)单体,0.1% NaOH;5 = A $\beta$ (1-42)球聚体;6 = A $\beta$ (12-42)球聚体;7 = A $\beta$ (20-42)球聚体;8 = A $\beta$ (1-42)纤丝制备物;9 = sAPP $\alpha$  (Sigma);(首次斑点:1pmol))。结果显示于图30 和表6中。

[0443] 表6 : 斑点印迹定量数据

	抗原	抗体		
		m10B3	m4C9	m6E10
[0444]	A $\beta$ (1-42) 单体的 0.1% NH <sub>4</sub> OH 溶液	>100000	36000	10
	A $\beta$ (1-40) 单体的 0.1% NH <sub>4</sub> OH 溶液	110500	27300	3
	A $\beta$ (1-42) 单体的 0.1% NaOH 溶液	>100000	39500	10
	A $\beta$ (1-40) 单体的 0.1% NaOH 溶液	>100000	110000	20
	A $\beta$ (1-42) 球聚体	57000	30000	0.09
	A $\beta$ (12-42) 球聚体	41000	60000	6
	A $\beta$ (20-42) 球聚体	1	1	1
	A $\beta$ (1-42) 纤丝	>100000	32600	29
	sAPP $\alpha$	>1000	>1000	0.2

[0445] 实施例4:血小板因子4交叉反应的测定

[0446] 实施例4.1:经由夹心ELISA在食蟹猴血浆中与血小板因子4的交叉反应的测定

[0447] 试剂列表:

[0448] F96 Cert. Maxisorp NUNC-Immuno Plate目录号 439454

[0449] 结合抗体:

[0450] - 抗HPF4单克隆抗体;4.2 mg/ml OD 280 nm;Abcam目录号 ab49735;贮存于-30℃(用作阳性对照)

[0451] - 抗A $\beta$ 单克隆抗体克隆m1G5;1.70 mg/ml OD 280 nm;贮存于-80℃

[0452] - 抗A $\beta$ 单克隆抗体克隆m4C9;1.66 mg/ml OD 280 nm;贮存于-80℃

[0453] - 抗A $\beta$ 单克隆抗体克隆m10B3;1.66 mg/ml OD 280 nm;贮存于-80℃

[0454] - 单克隆抗体克隆mIgG2a;7.89 mg/ml OD 280 nm;贮存于-80℃(用作阴性对照)

[0455] 包被缓冲液:100 mM碳酸氢钠;pH 9.6

[0456] 用于ELISA的封闭试剂;Roche Diagnostics GmbH目录号:1112589

[0457] PBST缓冲液:20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>;140 mM NaCl;0.05% Tween 20;pH 7.4

[0458] PBST + 0.5% BSA缓冲液:20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>;140 mM NaCl;0.05% Tween 20;pH 7.4 + 0.5% BSA;Serva目录号11926

[0459] 食蟹猴血浆:来自13个不同供体的食蟹猴EDTA血浆合并物;贮存于-30℃

[0460] 胰蛋白酶抑制剂:Sigma目录号T7902

[0461] 一抗:pRAb-HPF4;0.5mg/ml;Abcam目录号ab9561

[0462] 标记试剂:抗兔-POD缀合物;Jackson ImmunoResearch Ltd.目录号:111-036-045

[0463] 染色液:42 mM TMB (Roche Diagnostics GmbH目录号:92817060) 的DMSO溶液;3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的水溶液;100 mM乙酸钠,pH 4.9

[0464] 终止液:2 M硫酸

[0465] 在试剂制备中使用的方法:

[0466] 结合抗体:

[0467] 将结合抗体在包被缓冲液中稀释至10 µg/ml。

[0468] 封闭液:

[0469] 将封闭试剂溶解于100 ml水中,以制备封闭原液,并且将10 ml的等分试样贮存于-20℃。将3ml封闭原液用27 ml水稀释用于封闭每块板。

[0470] 食蟹猴(cynomolgus) (食蟹猴(Macaca fascicularis)) 血浆原液的制备:

[0471] 将2 ml食蟹猴血浆合并物以10,000 g离心10分钟。取出1.58 ml上清液且用3.42 ml PBST + 0.5% BSA缓冲液稀释(= 1:3.16稀释度)。随后加入50 µl 10 mg/ml胰蛋白酶抑制剂的H<sub>2</sub>O溶液。在室温孵育10分钟后,将样品通过0.22 µm滤器(Millipore目录号SLGS0250S)过滤。

[0472] 食蟹猴血浆原液的稀释系列:

编号	食蟹猴血浆稀释物的	PBST + 0.5% BSA	食蟹猴血浆的
	体积	缓冲液的体积	最终稀释度
1	250µl 原液	0 ml	1:3.16
2	79µl (1)	171µl	1:10
[0473] 3	79µl (2)	171µl	1:31.6
4	79µl (3)	171µl	1:100
5	79µl (4)	171µl	1:316
6	79µl (5)	171µl	1:1000
7	79µl (6)	171µl	1:3160
8	0 µl	250 µl	仅缓冲液

[0474] 一抗溶液:

[0475] 将一抗在PBST + 0.5% BSA缓冲液中稀释至1µg/ml。稀释因子是1:500。抗体溶液立即使用。

[0476] 标记试剂:

[0477] 在0.5 ml水中重构抗兔-POD缀合物冻干产物。加入500 µl甘油,并且将100 µl的等分试样贮存于-20℃用于进一步使用。将浓缩的标记试剂在PBST缓冲液中稀释。稀释因子是1:10000。该试剂立即使用。

[0478] TMB溶液:

[0479] 将20 ml 100 mM乙酸钠,pH 4.9与200  $\mu$ l的TMB原液和29.5  $\mu$ l 3%过氧化物溶液混合。该溶液立即使用。

[0480] 标准板设置。食蟹猴血浆的稀释度。注意每种样品一式两份地运行。

[0481]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	阳性对照 抗HPF4		mAb m1G5		mAb m4C9		mAb m10B3		阴性对照 mIgG2a			
A	1:3.16	1:3.16	1:3.16	1:3.16	1:3.16	1:3.16	1:3.16	1:3.16	1:3.16	1:3.16	无	无
B	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	无	无
C	1:31.6	1:31.6	1:31.6	1:31.6	1:31.6	1:31.6	1:31.6	1:31.6	1:31.6	1:31.6	无	无
D	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	无	无
E	1:316	1:316	1:316	1:316	1:316	1:316	1:316	1:316	1:316	1:316	无	无
F	1:1000	1:1000	1:1000	1:1000	1:1000	1:1000	1:1000	1:1000	1:1000	1:1000	无	无
G	1:3160	1:3160	1:3160	1:3160	1:3160	1:3160	1:3160	1:3160	1:3160	1:3160	无	无
H	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	无	无

[0482] 使用的程序:

[0483] 1. 应用100  $\mu$ l结合抗体溶液/孔,且在4℃孵育过夜。

[0484] 2. 弃去抗体溶液,并且将孔用250  $\mu$ l PBST缓冲液洗涤三次。

[0485] 3. 加入265  $\mu$ l封闭液/孔,并且在室温孵育1.5小时。

[0486] 4. 弃去封闭液,并且将孔用250  $\mu$ l PBST缓冲液洗涤三次。

[0487] 5. 在食蟹猴血浆的稀释系列制备后,将100  $\mu$ l/孔的这些稀释物应用于板。将板在室温孵育2小时。

[0488] 6. 弃去食蟹猴血浆稀释物,并且将孔用250  $\mu$ l PBST缓冲液洗涤三次。

[0489] 7. 加入100  $\mu$ l一抗溶液/孔,并且在室温孵育1小时。

[0490] 8. 弃去一抗溶液,并且将孔用250  $\mu$ l PBST缓冲液洗涤三次。

[0491] 9. 加入200  $\mu$ l标记溶液/孔,并且在室温孵育1小时。

[0492] 10. 弃去标记溶液,并且将孔用250  $\mu$ l PBST缓冲液洗涤三次。

[0493] 11. 将100 $\mu$ l TMB溶液加入每个孔中。

[0494] 12. 在显色过程中(在环境温度5 - 15分钟)监控板颜色,并且当合适颜色已显现时,通过加入50  $\mu$ l/孔的终止液终止反应。

[0495] 13. 在450 nm处读出吸光度。

[0496] 数据分析:

[0497] 使用下述等式将血浆稀释因子(X值)对数转化: $X=\log(X)$ 。使用在X轴上表示为血浆稀释度(1:X)的对数转化的X值标绘数据。从行A - G中每列的血浆稀释系列的值中扣除在行H中各自PBST空白对照的OD<sub>450nm</sub>值。在Y轴上标绘所得到的本底校正的OD<sub>450nm</sub>值。使用数据分析软件包GraphPadPrism(版本5.03;GraphPad Software Inc.),使用非线性回归“四参数逻辑方程”与“最小平方(普通)拟合”拟合法(其等于拟合法“S形剂量应答(可变斜率)”),通过曲线拟合由这些数据点计算稀释效应曲线。为了数据显现的唯一目的进行曲线拟合,但不作为用于任何进一步计算的基础,即曲线下面积计算。基于在测量范围中(约1:3.16到约1:3160的最终血浆稀释度)的非曲线拟合的数据、对数转化的X值和OD<sub>450nm</sub>值,测定曲线下面积(AUC,或峰总面积)。下述计算设置在数据分析软件包GraphPadPrism(版本5.03;GraphPad Software Inc.)中使用:

[0498] - 基线设为Y=0.0。

[0499] - 最低峰高:忽视小于从最小值到最大值的距离Y的10%的峰。

[0500] - 峰方向:通过定义,所有峰都必须超过基线。

[0501] 对于每种个别抗体,使用商购可得的抗HPF4抗体(Abcam目录号:ab49735)作为用于PF4识别的参考抗体来计算PF4甄别因子,其中

$$[0502] \quad [\text{PF4 甄别因子}] = \frac{[\text{抗 HPF4 抗体 ab49735 的峰总面积}]}{[\text{待测定抗体的峰总面积}]}$$

[0503] 结果显示于图31A和表7中。

[0504] 实施例4.2:经由夹心ELISA在人血浆中与血小板因子4的交叉反应的测定

[0505] 使用与用于实施例4.1相同的试剂和用于试剂制备的程序,除了:

[0506] 使用由人PF4(7.3 mg/ml;Molecular Innovation目录号 HPF4;贮存于-30℃)掺料的人血浆(来自4个不同供体的人EDTA血浆合并物;贮存于-30℃),代替食蟹猴血浆。HPF4掺料的人血浆原液如下制备。

[0507] A) 人血浆稀释物的制备:

[0508] 将2 ml人血浆合并物以10000 g离心10分钟。取出1.58 ml上清液且用3.42 ml PBST + 0.5% BSA稀释(= 1:3.16稀释度)。随后加入50 μl 10 mg/ml胰蛋白酶抑制剂的H<sub>2</sub>O溶液。在室温孵育10分钟后,将样品通过0.22 μm滤器(Millipore目录号 SLGS0250S)过滤。

[0509] B) HPF4原液的制备:

[0510] 将1 μl HPF4加入99 μl PBST + 0.5% BSA缓冲液中= 73 μg/ml。

[0511] C) 由10 ng/ml HPF4掺料的人血浆原液的制备:

[0512] 将0.69 μl 73 μg/ml HPF4原液加入5 ml 1:3.16稀释的人血浆中,导致人血浆原液的10ng/ml HPF4掺料。

[0513] 关于用HPF4掺料的人血浆的夹心ELISA的稀释系列制备、标准板设置、实验程序 and 数据分析类似于实施例4.1中对于用食蟹猴血浆的夹心ELISA描述的那些。

[0514] 结果显示于图31B 和表7中。

[0515] 表7: 在图31A和31B中描述的由对数转化数据计算的AUC(或峰总面积)

		阳性对照 抗HPF4	mAb m1G5 <sup>1</sup>	mAb 4C9	mAb 10B3	阴性对照 mIgG2a
[0516]	食蟹猴血浆	曲线下面积 <sup>2</sup>	2.681	0.861	0.067	0.103
	(数据来自	比				
	图 31A)	HPF4 / αAβ 抗体	1	3	40	26
						517
	人血浆	曲线下面积 <sup>2</sup>	1.986	0.311	0.047	0.079
	(数据来自	比				
	图 31B)	HPF4 / αAβ 抗体	1	6	43	25
						331

[0517] <sup>1</sup> 1G5是如WO 07/062852 A2中所述的鼠单克隆抗体,所述鼠单克隆抗体对于Aβ(20-42)球聚体具有的结合亲和力大于该抗体与两种Aβ(1-42)球聚体的结合亲和力。

[0518] <sup>2</sup> 曲线下面积如实施例4.1中所述计算。

[0519] 实施例4.3:经由比对夹心ELISA在食蟹猴血浆中与血小板因子4的交叉反应的测定

[0520] 使用实施例4.1中所述的试剂和比对抗体抗小鼠IgG (Fc特异性;山羊中生产的;Sigma目录号:M3534;2.3 mg/ml;贮存于-20℃)。

[0521] 在试剂的制备中使用的方法:

[0522] 封闭液、一抗和TMB溶液如实施例4.1中所述制备。

[0523] 将比对抗体在包被缓冲液中稀释至50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0524] 每种结合抗体用PBST + 0.5% BSA缓冲液稀释至10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (原液),并且稀释系列如下制备:

编号	PBST + 0.5% BSA		
	抗体溶液的体积	缓冲液的体积	最终抗体浓度
1	250 $\mu\text{l}$ 原液	0 ml	10000 ng/ml
2	79 $\mu\text{l}$ (1)	171 $\mu\text{l}$	3160 ng/ml
3	79 $\mu\text{l}$ (2)	171 $\mu\text{l}$	1000 ng/ml
4	79 $\mu\text{l}$ (3)	171 $\mu\text{l}$	316 ng/ml
5	79 $\mu\text{l}$ (4)	171 $\mu\text{l}$	100 ng/ml
6	79 $\mu\text{l}$ (5)	171 $\mu\text{l}$	31.6 ng/ml
7	79 $\mu\text{l}$ (6)	171 $\mu\text{l}$	10 ng/ml
8	0 $\mu\text{l}$	250 $\mu\text{l}$	仅缓冲液

[0526] 食蟹猴血浆:

[0527] 将100 $\mu\text{l}$ 食蟹猴血浆合并物以10000 g离心10分钟。取出316  $\mu\text{l}$ 上清液且用684  $\mu\text{l}$  PBST + 0.5% BSA稀释 (= 1:3.16稀释度)。随后加入10  $\mu\text{l}$  10 mg/ml胰蛋白酶抑制剂的H<sub>2</sub>O溶液。在室温孵育10分钟后,将样品通过0.22  $\mu\text{m}$ 滤器(Millipore目录号SLGS0250S)过滤。然后用15.3 ml PBST + 0.5 % BSA缓冲液将500  $\mu\text{l}$ 这种1:3.16稀释的血浆样品再次1:31.6稀释,导致1:100的总稀释度。

[0528] 标记试剂:

[0529] 在0.5 ml水中重构抗兔-POD缀合物冻干产物。加入500  $\mu\text{l}$ 甘油,并且将100  $\mu\text{l}$ 的等分试样贮存于-20℃用于进一步使用。将浓缩的标记试剂在PBST缓冲液中稀释。稀释因子是1:5000。该试剂立即使用。

[0530] 结合抗体板设置。结合抗体的稀释度。注意每种结合抗体的每个浓度一式两份地运行。

[0531]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	阳性对照 抗 HPF4		mAb m1G5		mAb m4C9		mAb m10B3		阴性对照 mIgG2a			
A	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	无	无
B	3160	3160	3160	3160	3160	3160	3160	3160	3160	3160	无	无
C	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	无	无
D	316	316	316	316	316	316	316	316	316	316	无	无
E	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	无	无
F	31.6	31.6	31.6	31.6	31.6	31.6	31.6	31.6	31.6	31.6	无	无
G	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	无	无
H	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	无	无

[0532] 使用的程序:

[0533] 1. 应用100  $\mu$ l比对抗体溶液/孔,且在4℃孵育过夜。[0534] 2. 弃去抗体溶液,并且将孔用250  $\mu$ l PBST缓冲液洗涤三次。[0535] 3. 加入265  $\mu$ l封闭液/孔,并且在室温孵育2小时。[0536] 4. 弃去封闭液,并且将孔用250  $\mu$ l PBST缓冲液洗涤三次。[0537] 5. 在每种结合抗体的稀释系列制备后,将100  $\mu$ l/孔的这些抗体稀释物应用于板。将板在室温孵育2小时。[0538] 6. 弃去抗体溶液,并且将孔用250  $\mu$ l PBST缓冲液洗涤三次。[0539] 7. 加入100 $\mu$ l食蟹猴血浆的1:100稀释物/孔,并且在室温孵育2小时。[0540] 8. 弃去血浆溶液,并且将孔用250  $\mu$ l PBST缓冲液洗涤三次。[0541] 9. 加入100  $\mu$ l一抗溶液/孔,并且在室温孵育1小时。[0542] 10. 弃去一抗溶液,并且将孔用250  $\mu$ l PBST缓冲液洗涤三次。[0543] 11. 加入200  $\mu$ l标记试剂/孔,并且在室温孵育1小时。[0544] 12. 弃去标记试剂,并且将孔用250  $\mu$ l PBST缓冲液洗涤三次。[0545] 13. 将100 $\mu$ l TMB溶液加入每个孔中。[0546] 14. 在显色过程中(在环境温度5 - 15分钟)监控板颜色,并且当合适颜色已显现时,通过加入50  $\mu$ l/孔的终止液终止反应。

[0547] 15. 在450 nm处读出吸光度。

[0548] 数据分析如实施例4.1中对于用食蟹猴血浆的夹心ELISA所述的进行,除了不是血浆稀释因子而是抗体的量(以ng/ml表示)用作X值,并且因此计算浓度效应曲线。相应地,基于在测量范围中(10 ng/ml - 10000 ng/ml的最终抗体浓度)的非曲线拟合的数据、对数转化的X值和OD450nm值,测定曲线下面积。

[0549] 结果显示于图32A 和表8中。

[0550] 实施例4.4:经由比对抗体ELISA在人血浆中与血小板因子4的交叉反应的测定

[0551] 使用与用于实施例4.3相同的试剂和用于试剂制备的程序,除了:

[0552] 比对抗体在包被缓冲液中稀释至50  $\mu$ g /ml。

[0553] 使用由人PF4(7.3 mg/ml;Molecular Innovation目录号 HPF4;贮存于-30℃)掺料的人血浆(来自4个不同供体的人EDTA血浆合并物;贮存于-30℃),代替食蟹猴血浆。PF4掺料的人血浆原液如下制备。

[0554] A) 人血浆稀释物的制备:

[0555] 将4 ml人血浆合并物以10000 g离心10分钟。取出3.16 ml上清液且用6.84 ml PBST + 0.5 % BSA稀释(= 1:3.16稀释度)。随后加入100  $\mu$ l 10 mg/ml胰蛋白酶抑制剂的H<sub>2</sub>O溶液。在室温孵育10分钟后,将样品通过0.22  $\mu$ m滤器(Millipore目录号 SLGS0250S)过滤。然后用10.8 ml PBST + 0.5 % BSA缓冲液将5 ml这种1:3.16稀释的血浆样品再次1:3.16稀释,导致1:10的总稀释度。

[0556] B) HPF4原液的制备:

[0557] 将1  $\mu$ l HPF4加入99  $\mu$ l PBST + 0.5% BSA缓冲液中= 73  $\mu$ g/ml。

[0558] C) 由10 ng/ml HPF4掺料的人血浆原液的制备:

[0559] 将1.64  $\mu$ l 73  $\mu$ g/ml HPF4原液加入12 ml 1:10稀释的人血浆中,导致人血浆原液稀释物的10ng/ml HPF4掺料。

[0560] 结合抗体的稀释系列制备;结合抗体板设置;封闭液、一抗、标记试剂和TMB溶液的制备与实施例4.3中相同。

[0561] 关于用HPF4掺料的人血浆的比对夹心ELISA的实验程序(但使用步骤7中1:10的稀释的人血浆)和数据分析类似于实施例4.3中对于用食蟹猴血浆的比对夹心ELISA描述的那种。

[0562] 结果显示于图32B 和表8中。

[0563] 表8 : 在图32A和32B中描述的由对数转化数据计算的AUC (或峰总面积)

		阳性对照 抗HPF4	mAb m1G5 <sup>1</sup>	mAb 4C9	mAb 10B3	阴性对照 mIgG2a
[0564]	食蟹猴血浆	曲线下面积 <sup>2</sup>	4.781	0.277	0.027	0.054
	(数据来自 图 32A)	比	1	17	179	89
		HPF4 / aA $\beta$ 抗体				
[0564]	人血浆	曲线下面积 <sup>2</sup>	3.844	0.165	0.018	0.053
	(数据来自 图32B)	比	1	23	212	72
		HPF4 / aA $\beta$ 抗体				

[0565] <sup>1</sup> 1G5是如W0 07/062852 A2中所述的鼠单克隆抗体,所述鼠单克隆抗体对于A $\beta$  (20-42) 球聚体具有的结合亲和力大于该抗体与两种A $\beta$  (1-42) 球聚体的结合亲和力。

[0566] <sup>2</sup> 曲线下面积如实施例4.3中所述计算。



[0001]	序列表																
[0002]	<110>	Abbott GmbH & Co. KG															
[0003]		Abbott Laboratories															
[0004]	<120>	β淀粉样蛋白结合蛋白															
[0005]	<130>	10478USL1															
[0006]	<160>	66															
[0007]	<170>	PatentIn version 3.5															
[0008]	<210>	1															
[0009]	<211>	122															
[0010]	<212>	PRT															
[0011]	<213>	小家鼠															
[0012]	<400>	1															
[0013]	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Pro	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	
[0014]	1				5					10					15		
[0015]	Ser	Val	Lys	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Pro	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr	
[0016]				20					25					30			
[0017]	Trp	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	
[0018]			35					40					45				
[0019]	Gly	Arg	Ile	Asp	Pro	Lys	Ser	Gly	Asp	Thr	Lys	Tyr	Thr	Glu	Lys	Phe	
[0020]		50					55					60					
[0021]	Lys	Ser	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Pro	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	
[0022]	65					70					75					80	
[0023]	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
[0024]					85					90					95		
[0025]	Thr	Thr	Met	Ser	Lys	Leu	Ser	Gly	Thr	His	Ala	Trp	Phe	Ala	Tyr	Trp	
[0026]				100					105					110			
[0027]	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala							
[0028]			115					120									
[0029]	<210>	2															
[0030]	<211>	107															
[0031]	<212>	PRT															
[0032]	<213>	小家鼠															
[0033]	<400>	2															
[0034]	Asp	Ile	Lys	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Met	Tyr	Ala	Ser	Leu	Gly	
[0035]	1			5						10					15		
[0036]	Glu	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Asn	Ser	Tyr	
[0037]				20					25					30			
[0038]	Leu	Thr	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ser	Pro	Lys	Thr	Leu	Ile	

[0039]	35	40	45
[0040]	Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
[0041]	50	55	60
[0042]	Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Tyr		
[0043]	65	70	75
[0044]	Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu		
[0045]	85	90	95
[0046]	Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys		
[0047]	100	105	
[0048]	<210> 3		
[0049]	<211> 122		
[0050]	<212> PRT		
[0051]	<213> 合成的		
[0052]	<220>		
[0053]	<221> misc_feature		
[0054]	<222> (1) .. (1)		
[0055]	<223> Xaa可以是Gln或Glu		
[0056]	<220>		
[0057]	<221> misc_feature		
[0058]	<222> (16) .. (16)		
[0059]	<223> Xaa可以是Ser或Ala		
[0060]	<220>		
[0061]	<221> misc_feature		
[0062]	<222> (27) .. (27)		
[0063]	<223> Xaa可以是Gly或Tyr		
[0064]	<220>		
[0065]	<221> misc_feature		
[0066]	<222> (30) .. (30)		
[0067]	<223> Xaa可以是Ser或Thr		
[0068]	<220>		
[0069]	<221> misc_feature		
[0070]	<222> (48) .. (48)		
[0071]	<223> Xaa可以是Met或Ile		
[0072]	<220>		
[0073]	<221> misc_feature		
[0074]	<222> (68) .. (68)		
[0075]	<223> Xaa可以是Val或Ala		
[0076]	<220>		
[0077]	<221> misc_feature		

[0078] <222> (70) .. (70)  
 [0079] <223> Xaa可以是Ile或Leu  
 [0080] <220>  
 [0081] <221> misc\_feature  
 [0082] <222> (72) .. (72)  
 [0083] <223> Xaa可以是Ala或Val  
 [0084] <220>  
 [0085] <221> misc\_feature  
 [0086] <222> (97) .. (97)  
 [0087] <223> Xaa可以是Ala或Thr  
 [0088] <220>  
 [0089] <221> misc\_feature  
 [0090] <222> (98) .. (98)  
 [0091] <223> Xaa可以是Arg或Thr  
 [0092] <400> 3  
 [0093] Xaa Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Xaa  
 [0094] 1 5 10 15  
 [0095] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Xaa Thr Phe Xaa Ser Tyr  
 [0096] 20 25 30  
 [0097] Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Xaa  
 [0098] 35 40 45  
 [0099] Gly Arg Ile Asp Pro Lys Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Thr Glu Lys Phe  
 [0100] 50 55 60  
 [0101] Lys Ser Arg Xaa Thr Xaa Thr Xaa Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 [0102] 65 70 75 80  
 [0103] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 [0104] 85 90 95  
 [0105] Xaa Xaa Met Ser Lys Leu Ser Gly Thr His Ala Trp Phe Ala Tyr Trp  
 [0106] 100 105 110  
 [0107] Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 [0108] 115 120  
 [0109] <210> 4  
 [0110] <211> 122  
 [0111] <212> PRT  
 [0112] <213> 合成的  
 [0113] <220>  
 [0114] <221> misc\_feature  
 [0115] <222> (1) .. (1)  
 [0116] <223> Xaa可以是Gln或Glu

[0117]	<220>	
[0118]	<221>	misc_feature
[0119]	<222>	(48) .. (48)
[0120]	<223>	Xaa可以是Met或Ile
[0121]	<220>	
[0122]	<221>	misc_feature
[0123]	<222>	(68) .. (68)
[0124]	<223>	Xaa可以是Phe或Ala
[0125]	<220>	
[0126]	<221>	misc_feature
[0127]	<222>	(70) .. (70)
[0128]	<223>	Xaa可以是Phe或Leu
[0129]	<220>	
[0130]	<221>	misc_feature
[0131]	<222>	(72) .. (72)
[0132]	<223>	Xaa可以是Leu或Val
[0133]	<220>	
[0134]	<221>	misc_feature
[0135]	<222>	(74) .. (74)
[0136]	<223>	Xaa可以是Thr或Lys
[0137]	<220>	
[0138]	<221>	misc_feature
[0139]	<222>	(97) .. (97)
[0140]	<223>	Xaa可以是Ala或Thr
[0141]	<220>	
[0142]	<221>	misc_feature
[0143]	<222>	(98) .. (98)
[0144]	<223>	Xaa可以是Arg或Thr
[0145]	<400>	4
[0146]	Xaa Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala	
[0147]	1 5 10 15	
[0148]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr	
[0149]	20 25 30	
[0150]	Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Xaa	
[0151]	35 40 45	
[0152]	Gly Arg Ile Asp Pro Lys Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Thr Glu Lys Phe	
[0153]	50 55 60	
[0154]	Lys Ser Arg Xaa Val Xaa Ser Xaa Asp Xaa Ser Val Ser Thr Ala Tyr	
[0155]	65 70 75 80	

[0156] Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 [0157] 85 90 95  
 [0158] Xaa Xaa Met Ser Lys Leu Ser Gly Thr His Ala Trp Phe Ala Tyr Trp  
 [0159] 100 105 110  
 [0160] Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 [0161] 115 120  
 [0162] <210> 5  
 [0163] <211> 107  
 [0164] <212> PRT  
 [0165] <213> 合成的  
 [0166] <220>  
 [0167] <221> misc\_feature  
 [0168] <222> (46) .. (46)  
 [0169] <223> Xaa可以是Ser, Leu或Thr  
 [0170] <220>  
 [0171] <221> misc\_feature  
 [0172] <222> (71) .. (71)  
 [0173] <223> Xaa可以是Phe或Tyr  
 [0174] <400> 5  
 [0175] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 [0176] 1 5 10 15  
 [0177] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr  
 [0178] 20 25 30  
 [0179] Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Xaa Leu Ile  
 [0180] 35 40 45  
 [0181] Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 [0182] 50 55 60  
 [0183] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Xaa Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 [0184] 65 70 75 80  
 [0185] Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu  
 [0186] 85 90 95  
 [0187] Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 [0188] 100 105  
 [0189] <210> 6  
 [0190] <211> 122  
 [0191] <212> PRT  
 [0192] <213> 合成的  
 [0193] <400> 6  
 [0194] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

[0195]	1	5	10	15
[0196]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr			
[0197]	20	25	30	
[0198]	Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met			
[0199]	35	40	45	
[0200]	Gly Arg Ile Asp Pro Lys Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Thr Glu Lys Phe			
[0201]	50	55	60	
[0202]	Lys Ser Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr			
[0203]	65	70	75	80
[0204]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
[0205]	85	90	95	
[0206]	Ala Arg Met Ser Lys Leu Ser Gly Thr His Ala Trp Phe Ala Tyr Trp			
[0207]	100	105	110	
[0208]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
[0209]	115	120		
[0210]	<210> 7			
[0211]	<211> 122			
[0212]	<212> PRT			
[0213]	<213> 合成的			
[0214]	<400> 7			
[0215]	Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala			
[0216]	1	5	10	15
[0217]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr			
[0218]	20	25	30	
[0219]	Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met			
[0220]	35	40	45	
[0221]	Gly Arg Ile Asp Pro Lys Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Thr Glu Lys Phe			
[0222]	50	55	60	
[0223]	Lys Ser Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr			
[0224]	65	70	75	80
[0225]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
[0226]	85	90	95	
[0227]	Ala Arg Met Ser Lys Leu Ser Gly Thr His Ala Trp Phe Ala Tyr Trp			
[0228]	100	105	110	
[0229]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
[0230]	115	120		
[0231]	<210> 8			
[0232]	<211> 122			
[0233]	<212> PRT			

[0234]	<213>	合成的
[0235]	<400>	8
[0236]	Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala	
[0237]	1	5 10 15
[0238]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr	
[0239]	20	25 30
[0240]	Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile	
[0241]	35	40 45
[0242]	Gly Arg Ile Asp Pro Lys Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Thr Glu Lys Phe	
[0243]	50	55 60
[0244]	Lys Ser Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr	
[0245]	65	70 75 80
[0246]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
[0247]	85	90 95
[0248]	Thr Thr Met Ser Lys Leu Ser Gly Thr His Ala Trp Phe Ala Tyr Trp	
[0249]	100	105 110
[0250]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
[0251]	115	120
[0252]	<210>	9
[0253]	<211>	122
[0254]	<212>	PRT
[0255]	<213>	合成的
[0256]	<400>	9
[0257]	Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala	
[0258]	1	5 10 15
[0259]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr	
[0260]	20	25 30
[0261]	Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met	
[0262]	35	40 45
[0263]	Gly Arg Ile Asp Pro Lys Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Thr Glu Lys Phe	
[0264]	50	55 60
[0265]	Lys Ser Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr	
[0266]	65	70 75 80
[0267]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
[0268]	85	90 95
[0269]	Ala Thr Met Ser Lys Leu Ser Gly Thr His Ala Trp Phe Ala Tyr Trp	
[0270]	100	105 110
[0271]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
[0272]	115	120

[0273]	<210>	10															
[0274]	<211>	122															
[0275]	<212>	PRT															
[0276]	<213>	合成的															
[0277]	<400>	10															
[0278]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala																
[0279]	1	5	10	15													
[0280]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr																
[0281]	20	25	30														
[0282]	Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met																
[0283]	35	40	45														
[0284]	Gly Arg Ile Asp Pro Lys Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Thr Glu Lys Phe																
[0285]	50	55	60														
[0286]	Lys Ser Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr																
[0287]	65	70	75	80													
[0288]	Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys																
[0289]	85	90	95														
[0290]	Ala Arg Met Ser Lys Leu Ser Gly Thr His Ala Trp Phe Ala Tyr Trp																
[0291]	100	105	110														
[0292]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser																
[0293]	115	120															
[0294]	<210>	11															
[0295]	<211>	122															
[0296]	<212>	PRT															
[0297]	<213>	合成的															
[0298]	<400>	11															
[0299]	Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala																
[0300]	1	5	10	15													
[0301]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr																
[0302]	20	25	30														
[0303]	Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met																
[0304]	35	40	45														
[0305]	Gly Arg Ile Asp Pro Lys Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Thr Glu Lys Phe																
[0306]	50	55	60														
[0307]	Lys Ser Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr																
[0308]	65	70	75	80													
[0309]	Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys																
[0310]	85	90	95														
[0311]	Ala Arg Met Ser Lys Leu Ser Gly Thr His Ala Trp Phe Ala Tyr Trp																



[0312]	100							105				110					
[0313]	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
[0314]	115							120									
[0315]	<210>	12															
[0316]	<211>	122															
[0317]	<212>	PRT															
[0318]	<213>	合成的															
[0319]	<400>	12															
[0320]	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ser	Glu	Leu	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	
[0321]	1				5				10				15				
[0322]	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr	
[0323]					20					25					30		
[0324]	Trp	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	
[0325]				35					40				45				
[0326]	Gly	Arg	Ile	Asp	Pro	Lys	Ser	Gly	Asp	Thr	Lys	Tyr	Thr	Glu	Lys	Phe	
[0327]				50					55				60				
[0328]	Lys	Ser	Arg	Ala	Val	Leu	Ser	Val	Asp	Lys	Ser	Val	Ser	Thr	Ala	Tyr	
[0329]	65				70				75				80				
[0330]	Leu	Gln	Ile	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
[0331]					85					90				95			
[0332]	Thr	Thr	Met	Ser	Lys	Leu	Ser	Gly	Thr	His	Ala	Trp	Phe	Ala	Tyr	Trp	
[0333]					100					105				110			
[0334]	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
[0335]				115					120								
[0336]	<210>	13															
[0337]	<211>	122															
[0338]	<212>	PRT															
[0339]	<213>	合成的															
[0340]	<400>	13															
[0341]	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ser	Glu	Leu	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	
[0342]	1				5				10				15				
[0343]	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr	
[0344]					20					25					30		
[0345]	Trp	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
[0346]				35					40				45				
[0347]	Gly	Arg	Ile	Asp	Pro	Lys	Ser	Gly	Asp	Thr	Lys	Tyr	Thr	Glu	Lys	Phe	
[0348]				50					55				60				
[0349]	Lys	Ser	Arg	Phe	Val	Phe	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Val	Ser	Thr	Ala	Tyr	
[0350]	65				70				75				80				

[0351]	Leu	Gln	Ile	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
[0352]						85				90						95
[0353]	Ala	Thr	Met	Ser	Lys	Leu	Ser	Gly	Thr	His	Ala	Trp	Phe	Ala	Tyr	Trp
[0354]						100				105						110
[0355]	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser						
[0356]						115				120						
[0357]	<210>	14														
[0358]	<211>	107														
[0359]	<212>	PRT														
[0360]	<213>	合成的														
[0361]	<400>	14														
[0362]	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
[0363]	1				5					10					15	
[0364]	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Asn	Ser	Tyr
[0365]					20					25					30	
[0366]	Leu	Thr	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Ser	Leu	Ile
[0367]					35					40					45	
[0368]	Tyr	Arg	Ala	Asn	Arg	Leu	Val	Asp	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
[0369]					50					55					60	
[0370]	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
[0371]	65					70					75					80
[0372]	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Gln	Tyr	Asp	Glu	Phe	Pro	Leu
[0373]						85					90					95
[0374]	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys					
[0375]						100					105					
[0376]	<210>	15														
[0377]	<211>	107														
[0378]	<212>	PRT														
[0379]	<213>	合成的														
[0380]	<400>	15														
[0381]	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
[0382]	1				5					10					15	
[0383]	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Asn	Ser	Tyr
[0384]					20					25					30	
[0385]	Leu	Thr	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
[0386]					35					40					45	
[0387]	Tyr	Arg	Ala	Asn	Arg	Leu	Val	Asp	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
[0388]					50					55					60	
[0389]	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro

[0390]	65	70	75	80
[0391]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu			
[0392]	85	90	95	
[0393]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
[0394]	100	105		
[0395]	<210> 16			
[0396]	<211> 107			
[0397]	<212> PRT			
[0398]	<213> 合成的			
[0399]	<400> 16			
[0400]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
[0401]	1	5	10	15
[0402]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr			
[0403]	20	25	30	
[0404]	Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Thr Leu Ile			
[0405]	35	40	45	
[0406]	Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
[0407]	50	55	60	
[0408]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
[0409]	65	70	75	80
[0410]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu			
[0411]	85	90	95	
[0412]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
[0413]	100	105		
[0414]	<210> 17			
[0415]	<211> 5			
[0416]	<212> PRT			
[0417]	<213> 小家鼠			
[0418]	<400> 17			
[0419]	Ser Tyr Trp Met His			
[0420]	1	5		
[0421]	<210> 18			
[0422]	<211> 17			
[0423]	<212> PRT			
[0424]	<213> 小家鼠			
[0425]	<400> 18			
[0426]	Arg Ile Asp Pro Lys Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Thr Glu Lys Phe Lys			
[0427]	1	5	10	15
[0428]	Ser			

[0429]	<210>	19
[0430]	<211>	13
[0431]	<212>	PRT
[0432]	<213>	小家鼠
[0433]	<400>	19
[0434]	Met Ser Lys Leu Ser Gly Thr His Ala Trp Phe Ala Tyr	
[0435]	1	5 10
[0436]	<210>	20
[0437]	<211>	11
[0438]	<212>	PRT
[0439]	<213>	小家鼠
[0440]	<400>	20
[0441]	Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr Leu Thr	
[0442]	1	5 10
[0443]	<210>	21
[0444]	<211>	7
[0445]	<212>	PRT
[0446]	<213>	小家鼠
[0447]	<400>	21
[0448]	Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp	
[0449]	1	5
[0450]	<210>	22
[0451]	<211>	9
[0452]	<212>	PRT
[0453]	<213>	小家鼠
[0454]	<400>	22
[0455]	Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu Thr	
[0456]	1	5
[0457]	<210>	25
[0458]	<211>	118
[0459]	<212>	PRT
[0460]	<213>	小家鼠
[0461]	<400>	25
[0462]	Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
[0463]	1	5 10 15
[0464]	Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr	
[0465]		20 25 30
[0466]	Glu Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Val	
[0467]		35 40 45

[0468] Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Arg Thr Ile His Tyr Ala Asp Thr Val  
 [0469] 50 55 60  
 [0470] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Pro Lys Asn Thr Leu Phe  
 [0471] 65 70 75 80  
 [0472] Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 [0473] 85 90 95  
 [0474] Ala Arg Thr Leu Leu Arg Leu His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 [0475] 100 105 110  
 [0476] Ile Leu Thr Val Ser Ser  
 [0477] 115  
 [0478] <210> 26  
 [0479] <211> 113  
 [0480] <212> PRT  
 [0481] <213> 小家鼠  
 [0482] <400> 26  
 [0483] Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Val Gly  
 [0484] 1 5 10 15  
 [0485] Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser  
 [0486] 20 25 30  
 [0487] Gly Asn Gln Lys Asn Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
 [0488] 35 40 45  
 [0489] Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
 [0490] 50 55 60  
 [0491] Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 [0492] 65 70 75 80  
 [0493] Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln  
 [0494] 85 90 95  
 [0495] Tyr Tyr Ser Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Asp Thr Lys Leu Glu Ile  
 [0496] 100 105 110  
 [0497] Lys  
 [0498] <210> 27  
 [0499] <211> 118  
 [0500] <212> PRT  
 [0501] <213> 合成的  
 [0502] <220>  
 [0503] <221> misc\_feature  
 [0504] <222> (49) .. (49)  
 [0505] <223> Xaa可以是Ser或Ala  
 [0506] <400> 27

[0507]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0508]	1 5 10 15
[0509]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
[0510]	20 25 30
[0511]	Glu Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[0512]	35 40 45
[0513]	Xaa Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Arg Thr Ile His Tyr Ala Asp Thr Val
[0514]	50 55 60
[0515]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
[0516]	65 70 75 80
[0517]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0518]	85 90 95
[0519]	Ala Arg Thr Leu Leu Arg Leu His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
[0520]	100 105 110
[0521]	Leu Val Thr Val Ser Ser
[0522]	115
[0523]	<210> 28
[0524]	<211> 113
[0525]	<212> PRT
[0526]	<213> 合成的
[0527]	<220>
[0528]	<221> misc_feature
[0529]	<222> (49) .. (49)
[0530]	<223> Xaa可以是Pro或Ser
[0531]	<400> 28
[0532]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
[0533]	1 5 10 15
[0534]	Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
[0535]	20 25 30
[0536]	Gly Asn Gln Lys Asn Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
[0537]	35 40 45
[0538]	Xaa Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
[0539]	50 55 60
[0540]	Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
[0541]	65 70 75 80
[0542]	Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
[0543]	85 90 95
[0544]	Tyr Tyr Ser Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
[0545]	100 105 110

[0546]	Lys
[0547]	<210> 29
[0548]	<211> 118
[0549]	<212> PRT
[0550]	<213> 合成的
[0551]	<400> 29
[0552]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0553]	1 5 10 15
[0554]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
[0555]	20 25 30
[0556]	Glu Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[0557]	35 40 45
[0558]	Ser Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Arg Thr Ile His Tyr Ala Asp Thr Val
[0559]	50 55 60
[0560]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
[0561]	65 70 75 80
[0562]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0563]	85 90 95
[0564]	Ala Arg Thr Leu Leu Arg Leu His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
[0565]	100 105 110
[0566]	Leu Val Thr Val Ser Ser
[0567]	115
[0568]	<210> 30
[0569]	<211> 118
[0570]	<212> PRT
[0571]	<213> 合成的
[0572]	<400> 30
[0573]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0574]	1 5 10 15
[0575]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
[0576]	20 25 30
[0577]	Glu Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[0578]	35 40 45
[0579]	Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Arg Thr Ile His Tyr Ala Asp Thr Val
[0580]	50 55 60
[0581]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
[0582]	65 70 75 80
[0583]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0584]	85 90 95

[0585]	Ala Arg Thr Leu Leu Arg Leu His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
[0586]	100 105 110
[0587]	Leu Val Thr Val Ser Ser
[0588]	115
[0589]	<210> 31
[0590]	<211> 113
[0591]	<212> PRT
[0592]	<213> 合成的
[0593]	<400> 31
[0594]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
[0595]	1 5 10 15
[0596]	Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
[0597]	20 25 30
[0598]	Gly Asn Gln Lys Asn Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
[0599]	35 40 45
[0600]	Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
[0601]	50 55 60
[0602]	Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
[0603]	65 70 75 80
[0604]	Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
[0605]	85 90 95
[0606]	Tyr Tyr Ser Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
[0607]	100 105 110
[0608]	Lys
[0609]	<210> 32
[0610]	<211> 113
[0611]	<212> PRT
[0612]	<213> 合成的
[0613]	<400> 32
[0614]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
[0615]	1 5 10 15
[0616]	Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
[0617]	20 25 30
[0618]	Gly Asn Gln Lys Asn Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
[0619]	35 40 45
[0620]	Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
[0621]	50 55 60
[0622]	Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
[0623]	65 70 75 80



[0624] Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln  
 [0625] 85 90 95  
 [0626] Tyr Tyr Ser Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile  
 [0627] 100 105 110  
 [0628] Lys  
 [0629] <210> 33  
 [0630] <211> 5  
 [0631] <212> PRT  
 [0632] <213> 小家鼠  
 [0633] <400> 33  
 [0634] Asp Tyr Glu Met Val  
 [0635] 1 5  
 [0636] <210> 34  
 [0637] <211> 17  
 [0638] <212> PRT  
 [0639] <213> 小家鼠  
 [0640] <400> 34  
 [0641] Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Arg Thr Ile His Tyr Ala Asp Thr Val Lys  
 [0642] 1 5 10 15  
 [0643] Gly  
 [0644] <210> 35  
 [0645] <211> 9  
 [0646] <212> PRT  
 [0647] <213> 小家鼠  
 [0648] <400> 35  
 [0649] Thr Leu Leu Arg Leu His Phe Asp Tyr  
 [0650] 1 5  
 [0651] <210> 36  
 [0652] <211> 17  
 [0653] <212> PRT  
 [0654] <213> 小家鼠  
 [0655] <400> 36  
 [0656] Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Gly Asn Gln Lys Asn Phe Leu  
 [0657] 1 5 10 15  
 [0658] Ala  
 [0659] <210> 37  
 [0660] <211> 7  
 [0661] <212> PRT  
 [0662] <213> 小家鼠

90

[0702]	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
[0703]			195					200					205			
[0704]	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
[0705]			210					215					220			
[0706]	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu
[0707]	225						230				235					240
[0708]	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
[0709]					245					250						255
[0710]	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
[0711]					260					265					270	
[0712]	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
[0713]					275					280				285		
[0714]	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
[0715]					290					295				300		
[0716]	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
[0717]	305						310					315				320
[0718]	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
[0719]						325						330				
[0720]	<210>	42														
[0721]	<211>	330														
[0722]	<212>	PRT														
[0723]	<213>	合成的														
[0724]	<400>	42														
[0725]	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
[0726]	1				5					10					15	
[0727]	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
[0728]					20					25					30	
[0729]	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
[0730]					35					40					45	
[0731]	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
[0732]					50					55				60		
[0733]	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
[0734]	65						70					75				80
[0735]	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
[0736]						85					90				95	
[0737]	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
[0738]						100					105				110	
[0739]	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
[0740]															115	

[0741]	Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
[0742]	130 135 140
[0743]	Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
[0744]	145 150 155 160
[0745]	Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
[0746]	165 170 175
[0747]	Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
[0748]	180 185 190
[0749]	His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
[0750]	195 200 205
[0751]	Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
[0752]	210 215 220
[0753]	Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
[0754]	225 230 235 240
[0755]	Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
[0756]	245 250 255
[0757]	Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
[0758]	260 265 270
[0759]	Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
[0760]	275 280 285
[0761]	Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
[0762]	290 295 300
[0763]	Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
[0764]	305 310 315 320
[0765]	Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
[0766]	325 330
[0767]	<210> 43
[0768]	<211> 106
[0769]	<212> PRT
[0770]	<213> 智人
[0771]	<400> 43
[0772]	Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
[0773]	1 5 10 15
[0774]	Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
[0775]	20 25 30
[0776]	Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
[0777]	35 40 45
[0778]	Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
[0779]	50 55 60

[0780]	Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
[0781]	65 70 75 80
[0782]	His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
[0783]	85 90 95
[0784]	Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[0785]	100 105
[0786]	<210> 44
[0787]	<211> 105
[0788]	<212> PRT
[0789]	<213> 智人
[0790]	<400> 44
[0791]	Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
[0792]	1 5 10 15
[0793]	Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
[0794]	20 25 30
[0795]	Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
[0796]	35 40 45
[0797]	Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
[0798]	50 55 60
[0799]	Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
[0800]	65 70 75 80
[0801]	His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
[0802]	85 90 95
[0803]	Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
[0804]	100 105
[0805]	<210> 45
[0806]	<211> 43
[0807]	<212> PRT
[0808]	<213> 合成的
[0809]	<400> 45
[0810]	Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
[0811]	1 5 10 15
[0812]	Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
[0813]	20 25 30
[0814]	Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr
[0815]	35 40
[0816]	<210> 46
[0817]	<211> 42
[0818]	<212> PRT

[0819]	<213>	合成的
[0820]	<400>	46
[0821]	Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys	
[0822]	1	5 10 15
[0823]	Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile	
[0824]	20	25 30
[0825]	Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala	
[0826]	35	40
[0827]	<210>	47
[0828]	<211>	40
[0829]	<212>	PRT
[0830]	<213>	合成的
[0831]	<400>	47
[0832]	Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys	
[0833]	1	5 10 15
[0834]	Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile	
[0835]	20	25 30
[0836]	Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val	
[0837]	35	40
[0838]	<210>	48
[0839]	<211>	31
[0840]	<212>	PRT
[0841]	<213>	合成的
[0842]	<400>	48
[0843]	Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn	
[0844]	1	5 10 15
[0845]	Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala	
[0846]	20	25 30
[0847]	<210>	49
[0848]	<211>	23
[0849]	<212>	PRT
[0850]	<213>	合成的
[0851]	<400>	49
[0852]	Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met	
[0853]	1	5 10 15
[0854]	Val Gly Gly Val Val Ile Ala	
[0855]	20	
[0856]	<210>	50
[0857]	<211>	30

[0858]	<212>	PRT
[0859]	<213>	智人
[0860]	<400>	50
[0861]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser	
[0862]	1	5 10 15
[0863]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser	
[0864]		20 25 30
[0865]	<210>	51
[0866]	<211>	14
[0867]	<212>	PRT
[0868]	<213>	智人
[0869]	<400>	51
[0870]	Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly	
[0871]	1	5 10
[0872]	<210>	52
[0873]	<211>	32
[0874]	<212>	PRT
[0875]	<213>	智人
[0876]	<400>	52
[0877]	Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu	
[0878]	1	5 10 15
[0879]	Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg	
[0880]		20 25 30
[0881]	<210>	53
[0882]	<211>	11
[0883]	<212>	PRT
[0884]	<213>	智人
[0885]	<400>	53
[0886]	Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
[0887]	1	5 10
[0888]	<210>	54
[0889]	<211>	30
[0890]	<212>	PRT
[0891]	<213>	智人
[0892]	<400>	54
[0893]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala	
[0894]	1	5 10 15
[0895]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr	
[0896]		20 25 30

[0897]	<210>	55																
[0898]	<211>	14																
[0899]	<212>	PRT																
[0900]	<213>	智人																
[0901]	<400>	55																
[0902]		Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	Gly			
[0903]		1				5					10							
[0904]	<210>	56																
[0905]	<211>	32																
[0906]	<212>	PRT																
[0907]	<213>	智人																
[0908]	<400>	56																
[0909]		Arg	Phe	Val	Phe	Ser	Leu	Asp	Thr	Ser	Val	Ser	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	
[0910]		1				5					10					15		
[0911]		Ile	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	
[0912]					20					25					30			
[0913]	<210>	57																
[0914]	<211>	11																
[0915]	<212>	PRT																
[0916]	<213>	智人																
[0917]	<400>	57																
[0918]		Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser						
[0919]		1				5					10							
[0920]	<210>	58																
[0921]	<211>	23																
[0922]	<212>	PRT																
[0923]	<213>	智人																
[0924]	<400>	58																
[0925]		Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	
[0926]		1				5					10					15		
[0927]		Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys										
[0928]					20													
[0929]	<210>	59																
[0930]	<211>	15																
[0931]	<212>	PRT																
[0932]	<213>	智人																
[0933]	<400>	59																
[0934]		Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Ser	Leu	Ile	Tyr		
[0935]		1				5					10					15		



97

[0975]	Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
[0976]	20 25 30
[0977]	<210> 65
[0978]	<211> 11
[0979]	<212> PRT
[0980]	<213> 智人
[0981]	<400> 65
[0982]	Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0983]	1 5 10
[0984]	<210> 66
[0985]	<211> 23
[0986]	<212> PRT
[0987]	<213> 智人
[0988]	<400> 66
[0989]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
[0990]	1 5 10 15
[0991]	Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys
[0992]	20
[0993]	<210> 67
[0994]	<211> 15
[0995]	<212> PRT
[0996]	<213> 智人
[0997]	<400> 67
[0998]	Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
[0999]	1 5 10 15
[1000]	<210> 68
[1001]	<211> 32
[1002]	<212> PRT
[1003]	<213> 智人
[1004]	<400> 68
[1005]	Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
[1006]	1 5 10 15
[1007]	Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
[1008]	20 25 30
[1009]	<210> 69
[1010]	<211> 10
[1011]	<212> PRT
[1012]	<213> 智人
[1013]	<400> 69

[1014] Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
[1015] 1 5 10  
[1016] <210> 70  
[1017] <211> 70  
[1018] <212> PRT  
[1019] <213> 智人  
[1020] <400> 70  
[1021] Glu Ala Glu Glu Asp Gly Asp Leu Gln Cys Leu Cys Val Lys Thr Thr  
[1022] 1 5 10 15  
[1023] Ser Gln Val Arg Pro Arg His Ile Thr Ser Leu Glu Val Ile Lys Ala  
[1024] 20 25 30  
[1025] Gly Pro His Cys Pro Thr Ala Gln Leu Ile Ala Thr Leu Lys Asn Gly  
[1026] 35 40 45  
[1027] Arg Lys Ile Cys Leu Asp Leu Gln Ala Pro Leu Tyr Lys Lys Ile Ile  
[1028] 50 55 60  
[1029] Lys Lys Leu Leu Glu Ser  
[1030] 65 70  
[1031] \*\*\*Privileged and Confidential Attorney-Client Information/  
Communication/Work Product\*\*\*

SEQ ID NO:1

QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKAPGYTFTSSYWMHWVKQRPGQGLEWIGRIDP  
KSGDTKYTEKFFSKATLTVDKPSSTAYMQLSSTLSEDSAVYYCTTMSKLSGTH  
AWFAYWGQGLTLTVSA

图 1

SEQ ID NO:2

DIKMTQSPSSMYASLGERTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRANR  
LVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSLEYEDMGIYYCLQYDEFPLTFGAGTK-  
LELK

图 2

SEQ ID NO:3

X<sup>1</sup>VQLVQSGAEVKKPGX<sup>16</sup>SVKVSCKASGX<sup>27</sup>TFX<sup>30</sup>SYWMHWVRQAPGQGLEW  
X<sup>48</sup>GRIDPKSGDTKYTEKFKSRX<sup>68</sup>TX<sup>70</sup>TX<sup>72</sup>DKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYY  
CX<sup>97</sup>X<sup>98</sup>MSKLSGTHAWFAYWGQGLTLTVSS

X<sup>1</sup>是Q或E.X<sup>48</sup>是M或I.X<sup>97</sup>是A或T.X<sup>16</sup>是S或A.X<sup>68</sup>是V或A.X<sup>98</sup>是R或T.X<sup>27</sup>是G或Y.X<sup>70</sup>是I或L.X<sup>30</sup>是S或T.25 X<sup>72</sup>是A或V.

图 3

SEQ ID NO:4

X<sup>1</sup>VQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSSYWMHWVRQAPGQGLEWX<sup>48</sup>GRI  
DPKSGDTKYTEKFKSRX<sup>68</sup>VX<sup>70</sup>SX<sup>72</sup>DX<sup>74</sup>SVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCX<sup>97</sup>  
X<sup>98</sup>MSKLSGTHAWFAYWGQGLTLTVSS

X<sup>1</sup>是Q或E.X<sup>70</sup>是F或L.40 X<sup>97</sup>是A或T.X<sup>48</sup>是M或I.X<sup>72</sup>是L或V.X<sup>98</sup>是R或T.X<sup>68</sup>是F或A.X<sup>74</sup>是T或K.

图 4

SEQ ID NO:5

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWFAQKPG-  
KAPKX<sup>46</sup>LIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTDX<sup>71</sup>TLTISSLQPEDFATYYCLOYD  
EFPLTFGQGTKLEIK  
X<sup>46</sup>是S或L或T.                      X<sup>71</sup>是F或Y.

图 5

SEQ ID NO:6

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYWMHWVRQAPGGGLEWMGRIDP  
KSGDTKYTEKF<sup>46</sup>SRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED<sup>71</sup>TAVYYCARMSKLSGTH  
AWFAYWGQGTLVTVSS

图 6

SEQ ID NO:7

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSSYWMHWVRQAPGGGLEWMGRIDP  
KSGDTKYTEKF<sup>46</sup>SRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED<sup>71</sup>TAVYYCARMSKLSGTH  
AWFAYWGQGTLVTVSS

图 7

SEQ ID NO:8

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSSYWMHWVRQAPGGGLEWIGRIDP  
KSGDTKYTEKF<sup>46</sup>SRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSED<sup>71</sup>TAVYYCTTMSKLSGTH  
AWFAYWGQGTLVTVSS

图 8

SEQ ID NO:9

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGGGLEWMGRIDP  
KSGDTKYTEKF~~KSRVTITVDKSTSTAYMELSSLR~~SEDTAVYYCATMSKLSGTH  
AWFAYWGQGTLVTVSS

图 9

SEQ ID NO:10

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGGGLEWMGRIDP  
KSGDTKYTEKF~~KSRFVFS~~LDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARMSKLSGTH  
AWFAYWGQGTLVTVSS

图 10

SEQ ID NO:11

EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGGGLEWMGRIDP  
KSGDTKYTEKF~~KSRFVFS~~LDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARMSKLSGTH  
AWFAYWGQGTLVTVSS

图 11

SEQ ID NO:12

EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGGGLEWIGRIDP  
KSGDTKYTEKF~~KSRVLSVDKSV~~STAYLQISSLKAEDTAVYYCTTMSKLSGTH  
AWFAYWGQGTLVTVSS

图 12

SEQ ID NO:13

EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGGGLEWMGRIDP  
KSGDTKYTEKF~~KSRFVFSVD~~TSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCATMSKLSGTH  
AWFAYWGQGTLVTVSS

图 13

SEQ ID NO:14

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWFFQQKPGKAPKSLIYRANR  
LVDGVPSRFSSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQYDEFPLTFGQGTK-  
LEIK

图 14

SEQ ID NO:15

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWFFQQKPGKAPKLLIYRANR  
LVDGVPSRFSSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQYDEFPLTFGQGTK-  
LEIK

图 15

SEQ ID NO:16

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWFFQQKPGKAPKTLLIYRANR  
LVDGVPSRFSSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCLQYDEFPLTFGQGTK-  
LEIK

图 16

SEQIDNO:		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
	m4C9_VH	Q	V	Q	L	Q	Q	P	G	A	E	L	V	K	P	G	A	S	V	K	L	S	C	K	A	P	G	Y	T	F	T	S	Y	W	M	H
6	4C9hum_VH.1z	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	S	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	G	T	F	S	S	Y	W	M	H
7	4C9hum_VH.1	E	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	S	Y	W	M	H
8	4C9hum_VH.1a	E	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	S	Y	W	M	H
9	4C9hum_VH.1b	E	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	S	Y	W	M	H
3	4C9hum_VH1 共有	X	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	X	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	X	T	F	X	S	Y	W	M	H

SEQIDNO:		36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75
	1	W	V	K	Q	R	P	G	Q	G	L	E	W	I	G	R	I	D	P	K	S	G	D	T	K	Y	T	E	K	F	K	S	K	A	T	L	T	V	D	K	P
6	W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	M	G	R	I	D	P	K	S	G	D	T	K	Y	T	E	K	F	K	S	R	V	T	I	T	A	D	K	S	
7	W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	M	G	R	I	D	P	K	S	G	D	T	K	Y	T	E	K	F	K	S	R	V	T	I	T	A	D	K	S	
8	W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	I	G	R	I	D	P	K	S	G	D	T	K	Y	T	E	K	F	K	S	R	A	T	L	T	V	D	K	S	
9	W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	M	G	R	I	D	P	K	S	G	D	T	K	Y	T	E	K	F	K	S	R	V	T	I	T	V	D	K	S	
3	W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	X	G	R	I	D	P	K	S	G	D	T	K	Y	T	E	K	F	K	S	R	X	T	X	T	X	D	K	S	

SEQIDNO:		76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115
	1	S	S	T	A	Y	M	Q	L	S	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	T	T	M	S	K	L	S	G	T	H	A	W	F	A	Y	W	G	Q	G
6	T	S	T	A	Y	M	E	L	S	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	M	S	K	L	S	G	T	H	A	W	F	A	Y	W	G	Q	G	
7	T	S	T	A	Y	M	E	L	S	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	M	S	K	L	S	G	T	H	A	W	F	A	Y	W	G	Q	G	
8	T	S	T	A	Y	M	E	L	S	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	T	T	M	S	K	L	S	G	T	H	A	W	F	A	Y	W	G	Q	G	
9	T	S	T	A	Y	M	E	L	S	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	T	M	S	K	L	S	G	T	H	A	W	F	A	Y	W	G	Q	G	
3	T	S	T	A	Y	M	E	L	S	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	X	X	M	S	K	L	S	G	T	H	A	W	F	A	Y	W	G	Q	G	

SEQIDNO:		116	117	118	119	120	121																																
	1	T	L	V	T	V	S	A																															
6	T	L	V	T	V	S	S																																
7	T	L	V	T	V	S	S																																
8	T	L	V	T	V	S	S																																
9	T	L	V	T	V	S	S																																

图 17



[illegible]

13	T	L	V	T	V	S	S
4	T	L	V	T	V	S	S

SEQ ID NO:		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
1	m4C9_VL	D	I	K	M	T	Q	S	P	S	S	M	Y	A	S	L	G	E	R	V	T	I	T	C	K	A	S	Q	D	I	N	S	Y	L	T	W
14	4C9hum_VL.1z	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	K	A	S	Q	D	I	N	S	Y	L	T	W
15	4C9hum_VL.1	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	K	A	S	Q	D	I	N	S	Y	L	T	W
16	4C9hum_VL.1a	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	K	A	S	Q	D	I	N	S	Y	L	T	W
5	4C9hum_VL 共有	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	K	A	S	Q	D	I	N	S	Y	L	T	W

SEQ ID NO:		36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75
1	F	Q	Q	K	P	G	K	S	P	K	T	L	I	Y	R	A	N	R	L	V	D	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	Q	D	Y	S	L	T	I	
14	F	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	S	L	I	Y	R	A	N	R	L	V	D	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	
15	F	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	R	A	N	R	L	V	D	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	
16	F	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	T	L	I	Y	R	A	N	R	L	V	D	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	Y	T	L	T	I	
5	F	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	X	L	I	Y	R	A	N	R	L	V	D	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	X	T	L	T	I	

SEQ ID NO:		76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107					
1	S	S	L	E	Y	E	D	M	G	I	Y	Y	C	L	Q	Y	D	E	F	P	L	T	F	G	A	G	T	K	L	E	L	K						
14	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	L	Q	Y	D	E	F	P	L	T	F	G	Q	G	T	K	L	E	I	K						
15	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	L	Q	Y	D	E	F	P	L	T	F	G	Q	G	T	K	L	E	I	K						
16	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	L	Q	Y	D	E	F	P	L	T	F	G	Q	G	T	K	L	E	I	K						
5	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	L	Q	Y	D	E	F	P	L	T	F	G	Q	G	T	K	L	E	I	K						

图 19

SEQ ID NO:25

EVKLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFSSDYEMVWVRQAPGEGLEWVAYISS  
GSRTIHYADTVKGRFTISRDNPKNTLFLQMSSLRSEDTAMYYCARTLLRLHFD  
YWGQGTILTVSS

图 20

SEQ ID NO:26

DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLYSGNQKNFLAWYQQKPGQSPKLL  
IYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYYCQQYYSPWTFGG  
DTKLEIK

图 21

SEQ ID NO:27

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYEMVWVRQAPGKGLEWVX<sup>49</sup>YIS  
SGSRTIHYADTVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTLLRLHF  
DYWGQGTILVTVSS  
X<sup>49</sup>是S或A.

图 22

SEQ ID NO:28

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSGNQKNFLAWYQQKPGQX<sup>49</sup>PKL  
LIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYSPWTFG  
GGTKVEIK  
X<sup>49</sup>是P或S.

图 23

SEQ ID NO:29

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYEMVWVRQAPGKGLEWVSYISS  
GSRTIHYADTVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTLLRLHFD  
YWGQGTILVTVSS

图 24

SEQ ID NO:30

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYEMVWVRQAPGKGLEWVAYISS  
GSRTIHYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTLLRLHFD  
YWGQGTLLTVSS

图 25

SEQ ID NO:31

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSGNQKNFLAWYQQKPGQPPKLL  
IYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSPWTFG-  
GGTKVEIK

图 26

SEQ ID NO:32

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSGNQKNFLAWYQQKPGQSPKLL  
IYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSPWTFG-  
GGTKVEIK

图 27

SEQIDNO:		35	34	33	32	31	30	29	28	27	26	25	24	23	22	21	20	19	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
25	m10B3_VH	E	V	K	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	R	K	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	D	Y	E	M	V
29	10B3hum_VH.1	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	D	Y	E	M	V
30	10B3hum_VH.1a	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	D	Y	E	M	V
27	10B3hum_VH3 共有	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	D	Y	E	M	V

SEQIDNO:		75	74	73	72	71	70	69	68	67	66	65	64	63	62	61	60	59	58	57	56	55	54	53	52	51	50	49	48	47	46	45	44	43	42	41	40	39	38	37	36
25	W	V	R	Q	A	P	G	E	G	L	E	W	V	A	Y	I	S	S	G	S	R	T	I	H	Y	A	D	T	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	P	
29	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S	Y	I	S	S	G	S	R	T	I	H	Y	A	D	T	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	A	
30	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	A	Y	I	S	S	G	S	R	T	I	H	Y	A	D	T	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	A	
27	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	X	Y	I	S	S	G	S	R	T	I	H	Y	A	D	T	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	A	

SEQIDNO:		115	114	113	112	111	110	109	108	107	106	105	104	103	102	101	100	99	98	97	96	95	94	93	92	91	90	89	88	87	86	85	84	83	82	81	80	79	78	77	76
25	K	N	T	L	F	L	Q	M	S	S	L	R	S	E	D	T	A	M	Y	Y	C	A	R	T	L	L	R	L	H	F	D	Y	W	G	Q	G	T	I	L	T	
29	K	N	S	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	T	L	L	R	L	H	F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	
30	K	N	S	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	T	L	L	R	L	H	F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	
27	K	N	S	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	T	L	L	R	L	H	F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	

SEQIDNO:		118	117	116
25	V	S	S	
29	V	S	S	
30	V	S	S	
27	V	S	S	

图 28

SEQ ID NO:		26	m10B3_VL	D	I	V	M	S	Q	S	P	S	S	L	A	V	S	V	G	E	K	V	T	M	S	C	K	S	S	Q	S	L	L	Y	S	G	N	Q
31	10B3hum_VL.1	D	I	V	M	T	Q	S	P	D	S	L	A	V	S	L	G	E	R	A	T	I	N	C	K	S	S	Q	S	L	L	Y	S	G	N	Q		
32	10B3hum_VL.1a	D	I	V	M	T	Q	S	P	D	S	L	A	V	S	L	G	E	R	A	T	I	N	C	K	S	S	Q	S	L	L	Y	S	G	N	Q		
28	10B3hum_VL 共有	D	I	V	M	T	Q	S	P	D	S	L	A	V	S	L	G	E	R	A	T	I	N	C	K	S	S	Q	S	L	L	Y	S	G	N	Q		

SEQ ID NO:		26	K	N	F	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	S	P	K	L	L	I	Y	W	A	S	T	R	E	S	G	V	P	D	R	F	T	G	S	G	S	G	T
31	K	N	F	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	P	P	K	L	L	I	Y	W	A	S	T	R	E	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T		
32	K	N	F	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	S	P	K	L	L	I	Y	W	A	S	T	R	E	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T		
28	K	N	F	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	X	P	K	L	L	I	Y	W	A	S	T	R	E	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T		

SEQ ID NO:		26	D	F	T	L	T	I	S	S	V	K	A	E	D	L	A	V	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	S	Y	P	W	T	F	G	G	D	T	K	L	E	I	K
31	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	A	E	D	V	A	V	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	S	Y	P	W	T	F	G	G	G	T	K	V	E	I	K		
32	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	A	E	D	V	A	V	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	S	Y	P	W	T	F	G	G	G	T	K	V	E	I	K		
28	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	A	E	D	V	A	V	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	S	Y	P	W	T	F	G	G	G	T	K	V	E	I	K		

图 29

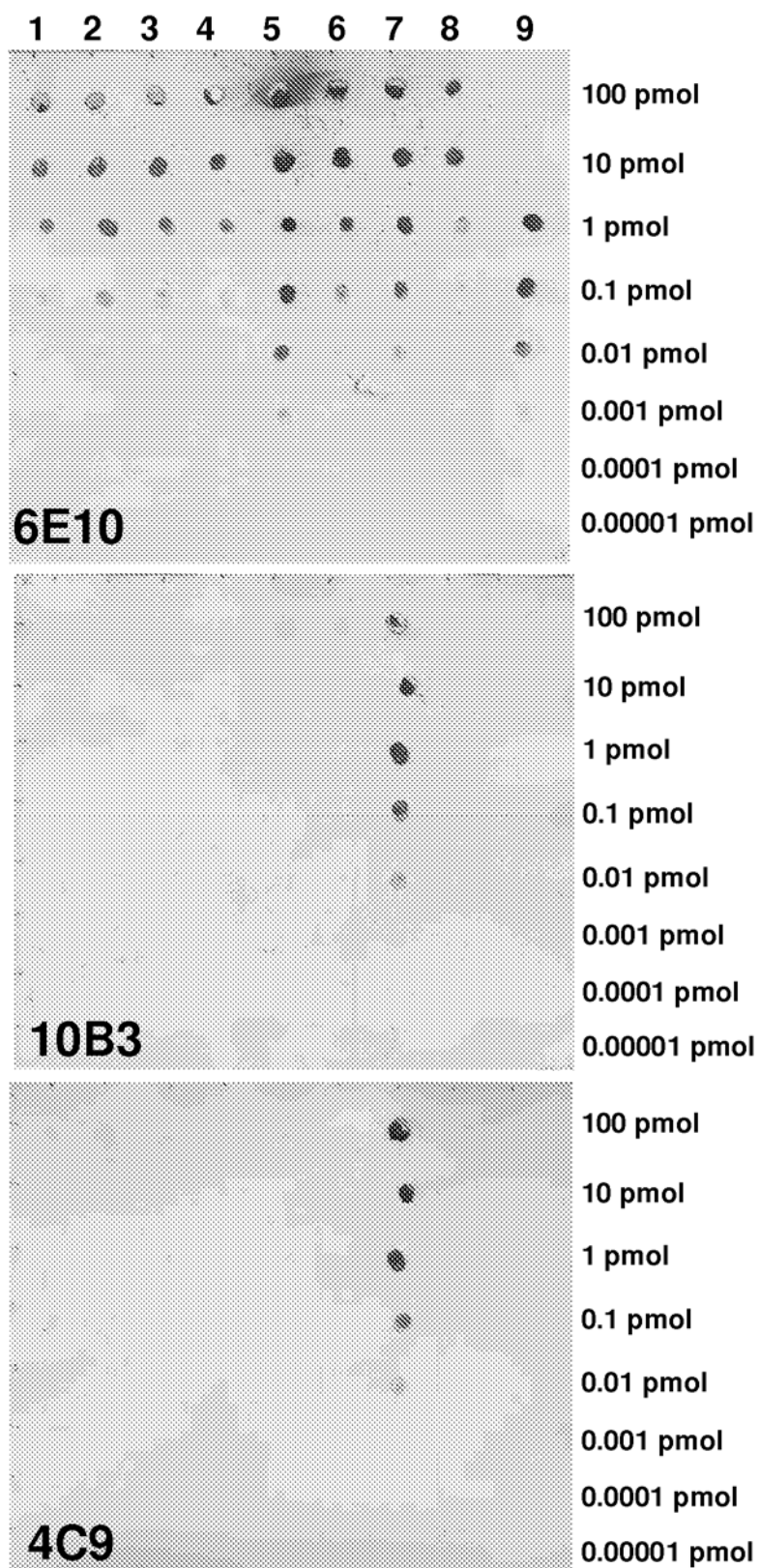
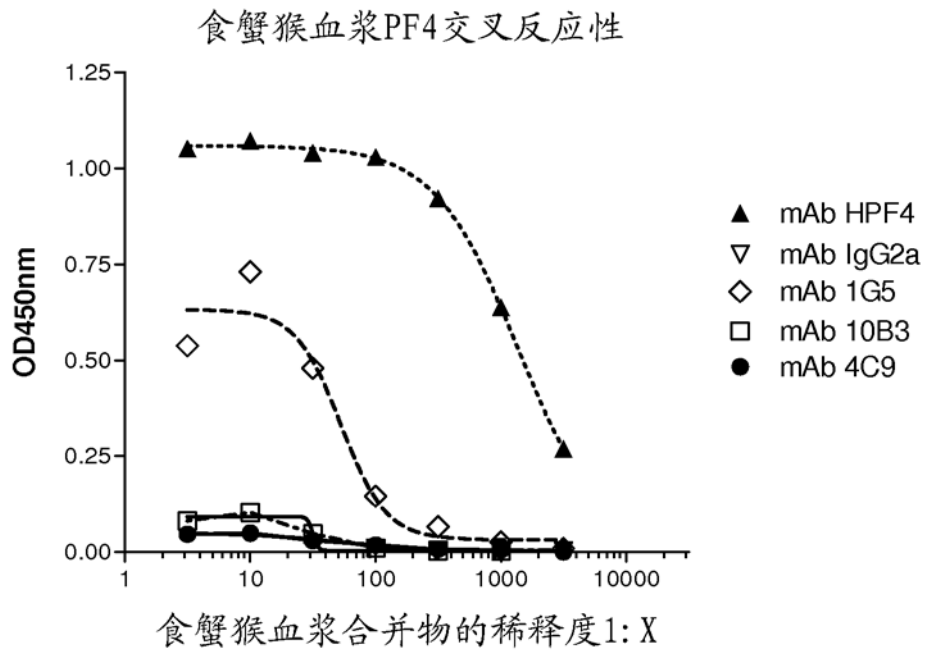
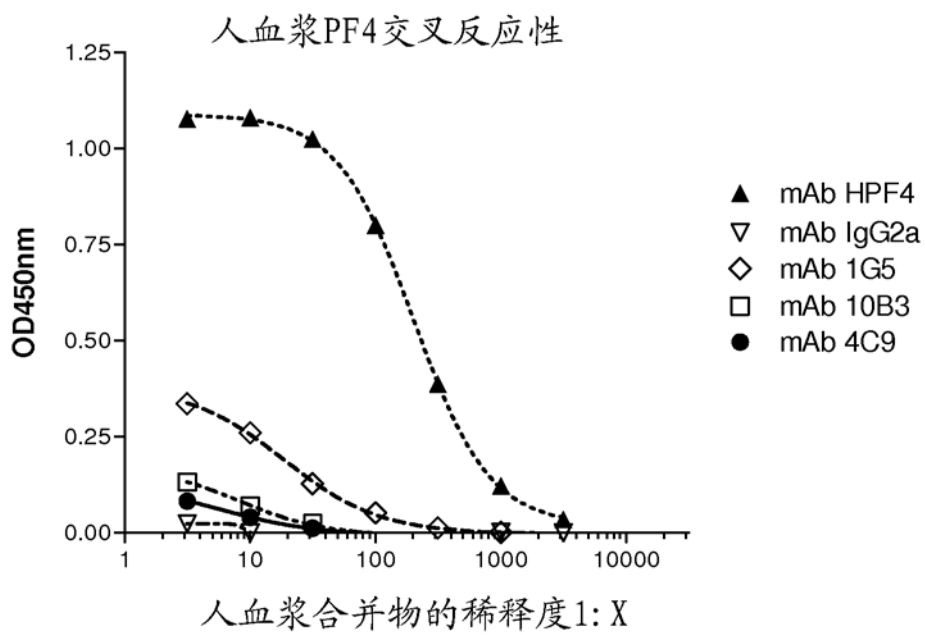


图 30



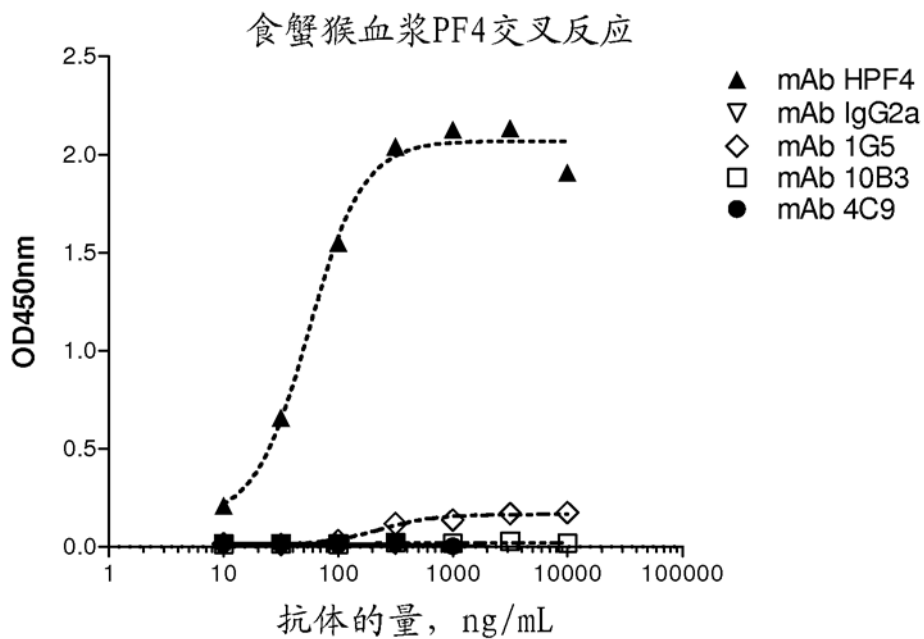
A



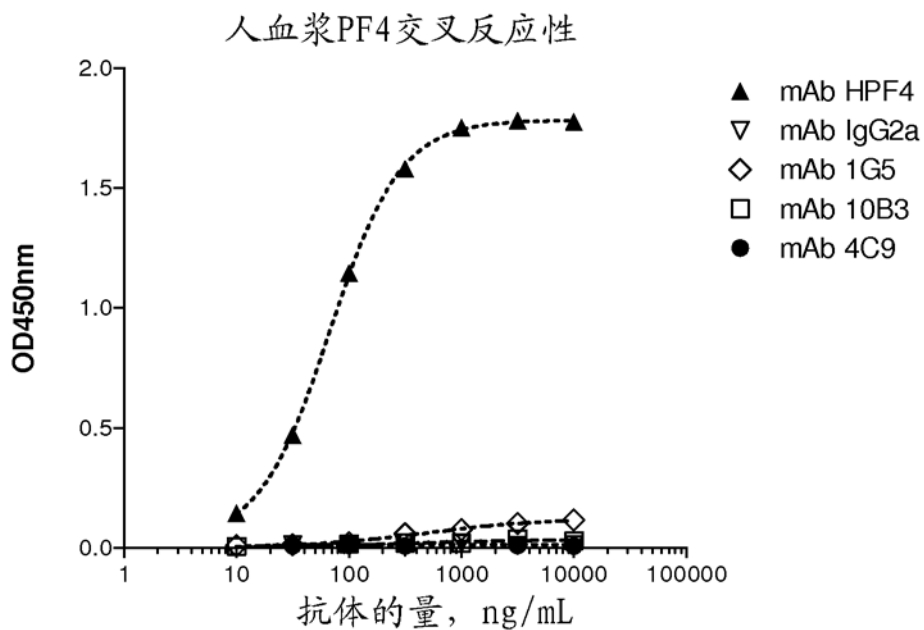
B

图 31





A



B

图 32