



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119954947 A

(43) 申请公布日 2025.05.09

(21) 申请号 202510128272.8

(22) 申请日 2020.02.07

(30) 优先权数据

62/803.334 2019.02.08 US

62/813,124 2019.03.03 US

62/855.434 2019.05.31 US

(62) 分案原申请数据

202080018281.7 2020.02.07

(71) 申请人 普罗塞纳生物科学有限公司

地址 爱尔兰都柏林

(72)发明人 菲利普·詹姆斯·多兰三世

塔洛陈·S·尼扎

斯维特拉娜·亚历山大

罗宾·巴伯尔

斯蒂芬·杰德·塔姆

(74) 专利代理机构 广州三环专利商标代理有限公司

公司 44202

专利代理师 郝传鑫

(51) Int.Cl.

C07K 16/18 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

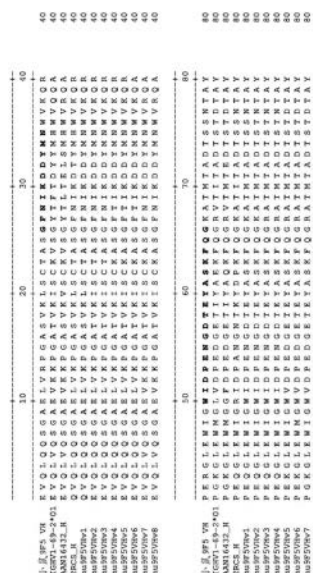
权利要求书8页 说明书276页
序列表(电子公布) 附图33页

(54) 发明名称

识别Tau的抗体

(57) 摘要

本发明提供了特异性结合tau的抗体。所述抗体抑制或延迟与tau相关联的病理和相关联的症状恶化。



1. 一种分离的单克隆抗体,所述分离的单克隆抗体与抗体9F5竞争结合人tau。
2. 如权利要求1所述的抗体,其中重链CDR-H3具有包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。
3. 如权利要求1所述的抗体,其中重链CDR-H1具有包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。
4. 如权利要求2所述的抗体,其中轻链CDR CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3分别具有包含SEQ ID NO:12、13和14的氨基酸序列)。
5. 如权利要求4所述的抗体,其中重链CDR-H1具有包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。
6. 如权利要求1所述的抗体,所述抗体与9F5结合人tau上的相同表位。
7. 如权利要求1所述的抗体,所述抗体包含单克隆抗体9F5的三个轻链CDR和三个重链CDR,其中9F5是特征在于具有包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变区和具有包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链可变区的小鼠抗体。
8. 如权利要求7所述的抗体,其中所述三个重链CDR CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3如由Kabat/Chothia复合物所定义(分别为SEQ ID NO:8、9和10),不同的是位置H28可被N或T占据,位置H51可被I或V占据,位置H54可被N或D占据且位置H56可被D或E占据;并且所述三个轻链CDR CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3如由Kabat/Chothia复合物所定义(分别为SEQ ID NO:12、13和14),不同的是位置L27b被L、D、T或Q占据,位置L27c被L、D、G、S、E、T、N、A、P或I占据,位置L30可被I、Y、E、K、G或Q占据,位置L31可被T、N或G占据,位置L33被L、N、T、S、R或G占据,位置L51可被M、G、E、D、K或I占据,位置L54可被L、R、G或T占据,位置L89被A或G占据,位置L92被L、D、E、G、Q、T或I占据且位置L93被E或G占据。
9. 如权利要求8所述的抗体,其中CDR-H1具有包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列。
10. 如权利要求8所述的抗体,其中CDR-H2具有包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列。
11. 如权利要求8所述的抗体,其中CDR-H2具有包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列。
12. 如权利要求8所述的抗体,其中CDR-L1具有包含SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54和SEQ ID NO:172-193中任一者的氨基酸序列。
13. 如权利要求8所述的抗体,其中CDR-L2具有包含SEQ ID NO:55和SEQ ID NO:194-205中任一者的氨基酸序列。
14. 如权利要求8所述的抗体,其中CDR-L3具有包含SEQ ID NO:206-213中任一者的氨基酸序列。
15. 如权利要求8所述的抗体,其中CDR-H1具有包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列,并且CDR-H2具有包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列。
16. 如权利要求8所述的抗体,其中CDR-L1具有包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列,并且CDR-L2具有包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列。
17. 如权利要求8所述的抗体,其中CDR-L1具有包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列,并且CDR-L2具有包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列。
18. 如前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述抗体是人源化抗体。
19. 如权利要求18所述的人源化抗体,其中所述人源化成熟重链可变区包含9F5的三个Kabat重链CDR(SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10),并且所述人源化成熟轻链可变区包含9F5的三个Kabat轻链CDR(SEQ ID NO:12-14)。
20. 如权利要求1-19中任一项所述的人源化抗体,所述人源化抗体包含具有与SEQ ID NO:15-22和SEQ ID NO:109-129中任一者至少90%同一的氨基酸序列的人源化成熟重链可

变区和具有与SEQ ID NO:23-29、SEQ ID NO:61-108和SEQ ID NO:130-171中任一者至少90%同一的氨基酸序列的人源化成熟轻链可变区。

21. 如权利要求20所述的人源化抗体,其中VH区中的以下位置中的至少一者被指定的氨基酸占据:H1被Q或E占据,H5被Q或V占据,H11被L或V占据,H12被V或K占据,H17被S或T占据,H20被L或I占据,H23被T或K占据,H28被N或T占据,H38被K、R或Q占据,H40被R或A占据,H42被E或G占据,H43被Q或K占据,H48被I或M占据,H51被I或V占据,H54被N或D占据,H56被D或E占据,H66被K或R占据,H69被I或M占据,H75被S或T占据,H76被N或D占据,H79被Y、Q、D、N或G占据,H80被L、M、P、D、G或E占据,H81被Q或E占据,H82被L、P、K、R、E或N占据,H82a被S或G占据,H82c被L、G、D或S占据,H83被T或R占据,H93被A或T占据,H94被S或T占据,H108被T或L占据,H109被L或V占据。

22. 如权利要求21所述的人源化抗体,其条件是所述VH区中的位置H1、H5、H11、H12、H17、H20、H23、H38、H42、H43、H66、H69、H75、H80、H81、H83、H93、H94、H108和H109分别被E、V、V、K、T、I、K、Q、G、K、R、M、T、M、E、R、T、T、L和V占据。

23. 如权利要求22所述的人源化抗体,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:127的氨基酸序列。

24. 如权利要求21所述的人源化抗体,其条件是VH区中的位置H1、H5、H11、H12、H17、H20、H23、H38、H42、H43、H66、H69、H75、H80、H81、H83、H93、H94、H108和H109分别被E、V、V、K、T、I、K、K、E、K、R、M、T、M、E、R、T、T、L和V占据。

25. 如权利要求24所述的人源化抗体,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:128的氨基酸序列。

26. 如权利要求20所述的人源化抗体,其中VL区中的以下位置中的至少一者被指定的氨基酸占据:L3被V或Q占据,L7被A或S占据,L8被A或P占据,L9被F或L占据,L11被N或L占据,L15被L或P占据,L17被T或E占据,L18被S或P占据,L27b被L、D、T或Q占据,L27c被L、D、G、S、E、T、N、A、P或I占据,L30被I、Y、E、K、G占据,L31被T、N或G占据,L33被L、N、T、S、R或G占据,L37被L、Q、G或I占据,L39被R或K占据,L51被M、G、E、D、K或I占据,L54被R、G或T占据,L60被N或D占据,L64被G或S占据,L66被E或G占据,L73被L、P或G占据,L74被R或K占据,L75被I、D、P、Q或G占据,L76被S、P或G占据,L77被R或D占据,L78被V、R、D、E、P、K、G或Q占据,L85被V或G占据,L86被Y或T占据,L89被A或G占据,L92被L、D、E、G、Q、T或I占据,L93被E或G占据,L100被G或Q占据。

27. 如权利要求21所述的人源化抗体,其条件是所述VL区中的位置L3Q、L27c、L37、L51、L54和L92被Q、S、Q、G、R和I占据。

28. 如权利要求21所述的人源化抗体,其条件是所述VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、S、Q、G、T和I占据。

29. 如权利要求21所述的人源化抗体,其条件是所述VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、G、Q、G、R和I占据。

30. 如权利要求21所述的人源化抗体,其条件是所述VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、D、Q、G、R和I占据。

31. 如权利要求21所述的人源化抗体,其条件是所述VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、D、Q、K、R和I占据。

32. 如权利要求21所述的人源化抗体,其条件是所述VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、G、Q、K、R和I占据。

33. 如权利要求21所述的人源化抗体,其条件是所述VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、G、G、G、R和I占据。

34. 如权利要求21所述的人源化抗体,其条件是所述VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、G、G、G、R和G占据。

35. 如权利要求21所述的人源化抗体,其条件是所述VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92被Q、G、G、G、T和I占据。

36. 如权利要求21所述的人源化抗体,其条件是所述VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、S、G、G、T和I占据。

37. 如权利要求21所述的人源化抗体,其条件是所述VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、D、G、G、R和I占据。

38. 如权利要求21所述的人源化抗体,其条件是所述VL区中的位置L3、L37、L51、L54和L92分别被Q、Q、G、R和I占据。

39. 如权利要求21所述的人源化抗体,其条件是所述VL区中的位置L3、L27c、L51、L54和L92分别被Q、S、G、R和I占据。

40. 如权利要求21所述的人源化抗体,其条件是所述VL区中的位置L3、L27c、L37、L54和L92分别被Q、S、Q、R和I占据。

41. 如权利要求21所述的人源化抗体,其条件是所述VL区中的位置L3、L27c、L37、L51和L92分别被Q、S、Q、G和I占据。

42. 如权利要求21所述的人源化抗体,其条件是所述VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、G、G、G、R和I占据。

43. 如权利要求20所述的人源化抗体,其中所述成熟重链可变区具有SEQ ID NO:15-22和SEQ ID NO:109-129中任一者的氨基酸序列,并且所述成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:23-29、SEQ ID NO:61-108和SEQ ID NO:130-171中任一者的氨基酸序列。

44. 如权利要求43所述的人源化抗体,其中所述成熟重链可变区具有SEQ ID NO:127的氨基酸序列,并且所述成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:149的氨基酸序列。

45. 如权利要求43所述的人源化抗体,其中所述成熟重链可变区具有SEQ ID NO:127的氨基酸序列,并且所述成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:142的氨基酸序列。

46. 如权利要求43所述的人源化抗体,其中所述成熟重链可变区具有SEQ ID NO:127的氨基酸序列,并且所述成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:159的氨基酸序列。

47. 如权利要求43所述的人源化抗体,其中所述成熟重链可变区具有SEQ ID NO:127的氨基酸序列,并且所述成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:148的氨基酸序列。

48. 如权利要求43所述的人源化抗体,其中所述成熟重链可变区具有SEQ ID NO:127的氨基酸序列,并且所述成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:137的氨基酸序列。

49. 如权利要求43所述的人源化抗体,其中所述成熟重链可变区具有SEQ ID NO:127的氨基酸序列,并且所述成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:145的氨基酸序列。

50. 如权利要求43所述的人源化抗体,其中所述成熟重链可变区具有SEQ ID NO:127的氨基酸序列,并且所述成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:136的氨基酸序列。

51. 如权利要求43所述的人源化抗体,其中所述成熟重链可变区具有SEQ ID NO:127的氨基酸序列,并且所述成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:138的氨基酸序列。

52. 如权利要求44所述的人源化抗体,其中所述成熟重链可变区具有SEQ ID NO:127的氨基酸序列,并且所述成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:158的氨基酸序列。

53. 如权利要求43所述的人源化抗体,其中所述成熟重链可变区具有SEQ ID NO:127的氨基酸序列,并且所述成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:143的氨基酸序列。

54. 如权利要求43所述的人源化抗体,其中所述成熟重链可变区具有SEQ ID NO:127的氨基酸序列,并且所述成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:144的氨基酸序列。

55. 如权利要求43所述的人源化抗体,其中所述成熟重链可变区具有SEQ ID NO:127的氨基酸序列,并且所述成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:133的氨基酸序列。

56. 如权利要求43所述的人源化抗体,其中所述成熟重链可变区具有SEQ ID NO:127的氨基酸序列,并且所述成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:160的氨基酸序列。

57. 如权利要求43所述的人源化抗体,其中所述成熟重链可变区具有SEQ ID NO:127的氨基酸序列,并且所述成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:161的氨基酸序列。

58. 如权利要求43所述的人源化抗体,其中所述成熟重链可变区具有SEQ ID NO:127的氨基酸序列,并且所述成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:139的氨基酸序列。

59. 如权利要求43所述的人源化抗体,其中所述成熟重链可变区具有SEQ ID NO:128的氨基酸序列,并且所述成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:168的氨基酸序列。

60. 如权利要求1所述的抗体,所述抗体包含单克隆抗体10C12的三个轻链CDR和三个重链CDR,其中10C12是特征在于具有包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变区和具有包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链可变区的小鼠抗体。

61. 如权利要求60所述的抗体,其中所述抗体是人源化抗体。

62. 如权利要求61所述的人源化抗体,其中所述人源化成熟重链可变区包含10C12的三个Kabat重链CDR(SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10),并且所述人源化成熟轻链可变区包含10C12的三个Kabat轻链CDR(SEQ ID NO:12-14)。

63. 如权利要求60-62中任一项所述的人源化抗体,所述人源化抗体包含具有与SEQ ID NO:214-215中任一者至少90%同一的氨基酸序列的人源化成熟重链可变区和具有与SEQ ID NO:216-217中任一者至少90%同一的氨基酸序列的人源化成熟轻链可变区。

64. 如权利要求63所述的人源化抗体,其中所述VH区中的以下位置中的至少一者被指定的氨基酸占据:H1被Q或E占据,H24被A占据,H48被I占据,H67被A占据,H69被M占据,H93被T占据,H94被T占据。

65. 如权利要求64所述的人源化抗体,其条件是位置H1、H24、H48、H67、H69、H93和H94分别被E、A、I、A、M、T和T占据。

66. 如权利要求63所述的人源化抗体,其中所述VL区中的以下位置中的至少一者被指定的氨基酸占据:L64被S占据,L104被V或L占据。

67. 如权利要求66所述的人源化抗体,所述VL区中的位置L64和L104分别被S和L占据。

68. 如权利要求63所述的人源化抗体,其中所述成熟重链可变区具有SEQ ID NO:214-215中任一者的氨基酸序列,并且所述成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:216-217中任一者的氨基酸序列。

69. 如权利要求5所述的抗体,所述抗体包含单克隆抗体12C4的三个轻链CDR和三个重链CDR,其中12C4是特征在于具有包含SEQ ID NO:219的氨基酸序列的重链可变区和具有包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链可变区的小鼠抗体。

70. 如权利要求69所述的抗体,其中所述抗体是人源化抗体。

71. 如权利要求70所述的人源化抗体,其中所述人源化成熟重链可变区包含12C4的三个Kabat重链CDR(SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:220和SEQ ID NO:10),并且所述人源化成熟轻链可变区包含12C4的三个Kabat轻链CDR(SEQ ID NO:12-14)。

72. 如权利要求69-71中任一项所述的人源化抗体,所述人源化抗体包含具有与SEQ ID NO:221-222中任一者至少90%同一的氨基酸序列的人源化成熟重链可变区和具有与SEQ ID NO:223-224中任一者至少90%同一的氨基酸序列的人源化成熟轻链可变区。

73. 如权利要求72所述的人源化抗体,其中所述VH区中的以下位置中的至少一者被指定的氨基酸占据:H1被Q或E占据,H48被M或I占据,H93被A或T占据,H94被R或T占据。

74. 如权利要求73所述的人源化抗体,其条件是所述VH区中的位置H1、H48、H93和H94分别被E、I、T和T占据。

75. 如权利要求72所述的人源化抗体,其中所述VL区中的位置被指定的氨基酸占据:L64被G或S占据,L104被V或L占据。

76. 如权利要求75所述的人源化抗体,其条件是所述VL区中的位置L64和L104分别被S和L占据。

77. 如权利要求72所述的人源化抗体,其中所述成熟重链可变区具有SEQ ID NO:221-222中任一者的氨基酸序列,并且所述成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:223-224中任一者的氨基酸序列。

78. 如权利要求2所述的抗体,所述抗体包含单克隆抗体17C12的三个轻链CDR和三个重链CDR,其中17C12是特征在于具有包含SEQ ID NO:225的氨基酸序列的重链可变区和具有包含SEQ ID NO:228的氨基酸序列的轻链可变区的小鼠抗体。

79. 如权利要求78所述的抗体,其中所述抗体是人源化抗体。

80. 如权利要求79所述的人源化抗体,其中所述人源化成熟重链可变区包含17C12的三个Kabat重链CDR(SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:227和SEQ ID NO:10),并且所述人源化成熟轻链可变区包含17C12的三个Kabat轻链CDR(SEQ ID NO:229-231)。

81. 如权利要求78-80中任一项所述的人源化抗体,所述人源化抗体包含具有与SEQ ID NO:232-233中任一者至少90%同一的氨基酸序列的人源化成熟重链可变区和具有与SEQ ID NO:234-235中任一者至少90%同一的氨基酸序列的人源化成熟轻链可变区。

82. 如权利要求81所述的人源化抗体,其中所述VH区中的以下位置中的至少一者被指定的氨基酸占据:H1被Q或E占据,H2被I占据,H24被A占据,H48被I占据,H67被A占据,H69被M占据,H93被T占据,H94被T占据,H108被T或L占据,H113被R或S占据。

83. 如权利要求82所述的人源化抗体,其条件是所述VH区中的位置H1、H2、H24、H48、H67、H69、H93、H94、H108和H113分别被E、I、A、I、A、M、T、T、L和S占据。

84. 如权利要求81所述的人源化抗体,其中所述VL区中的以下位置中的至少一者被指定的氨基酸占据:L2被V占据,L36被L占据,L43被P或S占据。

85. 如权利要求84所述的人源化抗体,其条件是所述VL区中的位置L2、L36和L43分别被

V、L和S占据。

86. 如权利要求81所述的人源化抗体,其中所述成熟重链可变区具有SEQ ID NO:232-233中任一者的氨基酸序列,并且所述成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:234-235中任一者的氨基酸序列。

87. 如权利要求1所述的抗体,所述抗体包含单克隆抗体14H3的三个轻链CDR和三个重链CDR,其中14H3是特征在于具有包含SEQ ID NO:240的氨基酸序列的重链可变区和具有包含SEQ ID NO:244的氨基酸序列的轻链可变区的小鼠抗体。

88. 如权利要求87所述的抗体,其中所述三个重链CDR CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3如由Kabat/Chothia复合物所定义(分别为SEQ ID NO:241、242和243),不同的是位置H35B可被G或S占据,并且所述三个轻链CDR CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3如由Kabat/Chothia复合物所定义(分别为SEQ ID NO:245、246和247)。

89. 如权利要求88所述的抗体,其中CDR-H1具有包含SEQ ID NO:277的氨基酸序列。

90. 如权利要求87-89中任一项所述的抗体,其中所述抗体是人源化抗体。

91. 如权利要求90所述的人源化抗体,其中所述人源化成熟重链可变区包含14H3的三个Kabat重链CDR(SEQ ID NO:265、SEQ ID NO:242和SEQ ID NO:243),并且所述人源化成熟轻链可变区包含14H3的三个Kabat轻链CDR(SEQ ID NO:245-247)。

92. 如权利要求87-91中任一项所述的人源化抗体,所述人源化抗体包含具有与SEQ ID NO:248-249中任一者至少90%同一的氨基酸序列的人源化成熟重链可变区和具有与SEQ ID NO:250-251中任一者至少90%同一的氨基酸序列的人源化成熟轻链可变区。

93. 如权利要求92所述的人源化抗体,其中所述VH区中的以下位置中的至少一者被指定的氨基酸占据:H35B被S占据,H108被M或L占据,H113被L或S占据。

94. 如权利要求93所述的人源化抗体,其条件是所述VH区中的位置H35B、H108和H113分别被S、L和S占据。

95. 如权利要求92所述的人源化抗体,其中所述VL区中的以下位置中的至少一者被指定的氨基酸占据:L2被V占据,L7被T或S占据,L37被L或Q占据,L87被F占据,L100被G或Q占据,L104被V或L占据。

96. 如权利要求95所述的人源化抗体,其条件是所述VL区中的位置L2、L7、L37、L87、L100和L104分别被V、S、Q、F、Q和L占据。

97. 如权利要求92所述的人源化抗体,其中所述成熟重链可变区具有SEQ ID NO:248-249中任一者的氨基酸序列,并且所述成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:250-251中任一者的氨基酸序列。

98. 如权利要求1-97中任一项所述的抗体,所述抗体是完整抗体。

99. 如权利要求1-97中任一项所述的抗体,所述抗体是结合片段。

100. 如前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述同种型是人IgG1。

101. 如权利要求18-59、61-68、70-77、79-86和90-100中任一项所述的人源化抗体,其中所述成熟轻链可变区与轻链恒定区融合并且所述成熟重链可变区与重链恒定区融合。

102. 如权利要求101所述的人源化抗体,其中所述重链恒定区是天然人重链恒定区的突变形式,相对于所述天然人重链恒定区,所述天然人重链恒定区的突变形式与Fc γ 受体的结合减少。

103. 如权利要求1-99和101-102中任一项所述的抗体,其中所述同种型属于人IgG2或IgG4同种型。

104. 一种药物组合物,所述药物组合物包含如权利要求1-103中任一项所限定的抗体和药学上可接受的载体。

105. 一种核酸,所述核酸编码如权利要求1-104中任一项所述的抗体的重链和/或轻链。

106. 一种将小鼠抗体人源化的方法,所述方法包括:

(a) 选择一种或多种受体抗体;

(b) 鉴定所述小鼠抗体的待保留的氨基酸残基;

(c) 合成编码包含小鼠抗体重链的CDR的人源化重链的核酸和编码包含小鼠抗体轻链的CDR的人源化轻链的核酸;以及

(d) 在宿主细胞中表达所述核酸以产生人源化抗体;

其中所述小鼠抗体是9F5,其中9F5的特征在于SEQ ID NO:7的成熟重链可变区和SEQ ID NO:11的成熟轻链可变区,

其中所述小鼠抗体是10C12,其中10C12的特征在于SEQ ID NO:7的成熟重链可变区和SEQ ID NO:11的成熟轻链可变区,

其中所述小鼠抗体是2D11,其中2D11的特征在于SEQ ID NO:7的成熟重链可变区和SEQ ID NO:11的成熟轻链可变区,

其中所述小鼠抗体是12C4,其中12C4的特征在于SEQ ID NO:219的成熟重链可变区和SEQ ID NO:11的成熟轻链可变区,

其中所述小鼠抗体是17C12,其中17C12的特征在于SEQ ID NO:225的成熟重链可变区和SEQ ID NO:228的成熟轻链可变区,

其中所述小鼠抗体是14H3,其中14H3的特征在于SEQ ID NO:240的成熟重链可变区和SEQ ID NO:244的成熟轻链可变区。

107. 一种抑制或减少患有tau介导的淀粉样变性或有发展tau介导的淀粉样变性风险的受试者中的tau聚集的方法,所述方法包括向所述受试者施用如权利要求1-104中任一项所述的抗体的有效方案,从而抑制或减少所述受试者中的tau聚集。

108. 一种在受试者中治疗tau相关疾病或实现tau相关疾病的预防的方法,所述方法包括施用如权利要求1-104中任一项所限定的抗体的有效方案,并由此治疗所述疾病或实现所述疾病的预防。

109. 如权利要求108所述的方法,其中所述tau相关疾病是阿尔茨海默病、唐氏综合征、轻度认知障碍、原发性年龄相关性tau蛋白病、脑炎后帕金森病、创伤后痴呆或拳击员痴呆、皮克氏病、C型尼曼-皮克病、核上性麻痹、额颞叶痴呆、额颞叶变性、嗜银颗粒病、球状神经胶质性tau蛋白病、关岛肌萎缩性侧索硬化/帕金森痴呆复征、皮质基底节变性(CBD)、路易体痴呆、阿尔茨海默病的路易体变异(LBVAD)、慢性创伤性脑病变(CTE)、球状神经胶质性tau蛋白病(GGT)、帕金森病或进行性核上性麻痹(PSP)。

110. 如权利要求109所述的方法,其中所述tau相关疾病是阿尔茨海默病。

111. 一种在患有与tau聚集或沉积相关联的疾病或有患与tau聚集或沉积相关联的疾病风险的受试者中检测tau蛋白沉积物的方法,所述方法包括向受试者施用如权利要求1-

104中任一项所限定的抗体,以及在所述受试者中检测与tau结合的抗体。

112.一种分离的单克隆抗体,所述分离的单克隆抗体与由残基(Q/E) IVYK(S/P) (SEQ ID NO:56)组成的肽特异性结合。

113.一种分离的单克隆抗体,所述分离的单克隆抗体与由残基QIVYKP (SEQ ID NO:57)组成的肽特异性结合。

114.一种分离的单克隆抗体,所述分离的单克隆抗体与由残基EIVYKSP (SEQ ID NO:58)组成的肽特异性结合。

115.一种分离的单克隆抗体,所述分离的单克隆抗体与由残基EIVYKS (SEQ ID NO:277)组成的肽特异性结合。

116.一种在受试者中治疗tau相关疾病或实现tau相关疾病的预防的方法,所述方法包括施用免疫原,所述免疫原包含与抗体9F5、10C12、2D11、12C4、17C12或14H3特异性结合的SEQ ID NO:1的多至20个连续氨基酸的tau肽,其中所述肽在所述受试者中诱导与tau特异性结合的抗体的形成。

识别Tau的抗体

[0001] 分案申请说明

[0002] 本申请是申请日为2020年02月07日,申请号为202080018281.7,发明名称为“识别Tau的抗体”的发明专利申请的分案申请。

[0003] 相关申请的交叉引用

[0004] 本申请根据35USC 119(e)要求2019年2月8日提交的美国临时申请第62/803,334号、2019年3月3日提交的美国临时申请第62/813,124号和2019年5月31日提交的美国临时申请第62/855,434号的权益,出于所有目的所述临时申请各自以引用方式整体并入。

[0005] 序列表的引用

[0006] 文件50887-0029CN2_SL_ST26.xml中写入的序列表为276千字节,创建于2025年1月25日(实际序列内容创建于2020年02月07日),并且据此以引用方式并入。

背景技术

[0007] Tau是可以磷酸化形式存在的众所周知的人蛋白(参见,例如,Goedert, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.85:4051-4055(1988);Goedert,EMBO J.8:393-399(1989);Lee,Neuron 2:1615-1624(1989);Goedert,Neuron 3:519-526(1989);Andreadis, Biochemistry31:10626-10633(1992)。据报道,Tau在稳定微管方面、尤其是在中枢神经系统中发挥作用。总tau(t-tau,即磷酸化和非磷酸化形式)和磷酸化-tau(p-tau,即磷酸化tau)由大脑响应于神经元损伤和神经变性而释放,并且据报道,相对于普通人群其在阿尔茨海默病患者的CSF中的水平升高(Jack等人,Lancet Neurol 9:119-28(2010))。

[0008] Tau是神经原纤维缠结的主要成分,其与斑块一起是阿尔茨海默病的标志性特征。缠结构成直径测量为10nm的异常原纤维,其成对出现,以螺旋方式缠绕,具有80nm的规则周期性。神经原纤维缠结内的tau被异常磷酸化(过度磷酸化),其中磷酸酯基团附接于分子上的特定位置。在阿尔茨海默病中的内嗅皮质的II层神经元、海马的CA1和钩回下区、杏仁核以及新皮质的深层(III层、V层和表层VI)中观察到神经原纤维缠结的严重受累。另外已有报道,过度磷酸化的tau干扰微管组装,这可能加速神经元网络的破坏。

[0009] Tau包涵体是几种神经变性疾病的决定性神经病理学的一部分,所述疾病包括阿尔茨海默病、额颞叶变性、进行性核上性麻痹和匹克氏病(Pick's disease)。

发明内容

[0010] 在一个方面,本发明提供了一种分离的单克隆抗体,其与抗体9F5竞争结合人tau。在一些此类抗体中,重链CDR-H3具有包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。在一些此类抗体中,重链CDR-H1具有包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在一些此类抗体中,轻链CDR L1、CDR-L2和CDR-L3分别具有包含SEQ ID NO:12、13和14的氨基酸序列。在一些此类抗体中,重链CDR-H1具有包含SEQ IDNO:8的氨基酸序列。一些此类抗体与9F5结合人tau上的相同表位。

[0011] 一些此类抗体包含单克隆抗体9F5的三个轻链CDR和三个重链CDR,其中9F5是特征

在于具有包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变区和具有包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链可变区的小鼠抗体。

[0012] 在一些此类抗体中,三个重链CDR CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3如由Kabat/Chothia复合物所定义(分别为SEQ ID NO:8、9和10),不同的是位置H28可被N或T占据,位置H51可被I或V占据,位置H54可被N或D占据且位置H56可被D或E占据;并且三个轻链CDR CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3如由Kabat/Chothia复合物所定义(分别为SEQ ID NO:12、13和14),不同的是位置L27b被L、D、T或Q占据,位置L27c被L、D、G、S、E、T、N、A、P或I占据,位置L30可被I、Y、E、K、G或Q占据,位置L31可被T、N或G占据,位置L33被L、N、T、S、R或G占据,位置L51可被M、G、E、D、K或I占据,位置L54可被L、R、G或T占据,位置L89被A或G占据,位置L92被L、D、E、G、Q、T或I占据且位置L93被E或G占据。

[0013] 在一些抗体中,CDR-H1具有包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列。在一些抗体中,CDR-H2具有包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列。在一些抗体中,CDR-H2具有包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列。在一些抗体中,CDR-L1具有包含SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54和SEQ ID NO:172-193中任一者的氨基酸序列。在一些抗体中,CDR-L2具有包含SEQ ID NO:55和SEQ ID NO:194-205中任一者的氨基酸序列。在一些抗体中,CDR-L3具有包含SEQ ID NO:206-213中任一者的氨基酸序列。在一些抗体中,CDR-H1具有包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列,并且CDR-H2具有包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列。在一些抗体中,CDR-L1具有包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列,并且CDR-L2具有包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列。在一些抗体中,CDR-L1具有包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列,并且CDR-L2具有包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列。

[0014] 一些抗体是9F5或其嵌合、饰面或人源化形式。在一些抗体中,可变重链与人序列具有 $\geq 85\%$ 的同一性。在一些抗体中,可变轻链与人序列具有 $\geq 85\%$ 的同一性。在一些抗体中,可变重链和可变轻链中的每一者与人种系序列具有 $\geq 85\%$ 的同一性。一些抗体是人源化抗体。

[0015] 一些抗体是与人tau特异性结合的人源化或嵌合9F5抗体,其中9F5是特征在于SEQ ID NO:7的成熟重链可变区和SEQ ID NO:11的成熟轻链可变区的小鼠抗体。一些抗体包括包含9F5的三个重链CDR的人源化成熟重链可变区和包含9F5的三个轻链CDR的人源化成熟轻链可变区。在一些抗体中,CDR的定义选自Kabat、Chothia、Kabat/Chothia复合物、AbM和Contact的组。

[0016] 在一些抗体中,人源化成熟重链可变区包含9F5的三个Kabat/Chothia复合物重链CDR (SEQ ID NO:8-10),并且人源化成熟轻链可变区包含9F5的三个Kabat/Chothia复合物轻链CDR (SEQ ID NO:12-14)。在一些抗体中,人源化成熟重链可变区包含9F5的三个Kabat重链CDR (SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10),并且人源化成熟轻链可变区包含9F5的三个Kabat轻链CDR (SEQ ID NO:12-14)。在一些抗体中,人源化成熟重链可变区包含9F5的三个Chothia重链CDR (SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42和SEQ ID NO:10),并且人源化成熟轻链可变区包含9F5的三个Chothia轻链CDR (SEQ ID NO:12-14)。在一些抗体中,人源化成熟重链可变区包含9F5的三个AbM重链CDR (SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:43和SEQ ID NO:10),并且人源化成熟轻链可变区包含9F5的三个AbM轻链CDR (SEQ ID NO:12-14)。在一些抗体中,人源化成熟重链可变区包含9F5的三个Contact重链CDR (SEQ ID NO:44-46),并且人源化成熟轻链可变区包含9F5的三个Contact轻链CDR (SEQ ID NO:47-49)。

[0017] 举例来说,抗体可以是人源化抗体、饰面抗体或嵌合抗体。

[0018] 一些此类抗体包含具有与SEQ ID NO:15-22和SEQ IDNO:109-129中任一者至少90%同一的氨基酸序列的人源化成熟重链可变区和具有与SEQ ID NO:23-29、SEQ ID NO:61-108和SEQ IDNO:130-171中任一者至少90%同一的氨基酸序列的人源化成熟轻链可变区。

[0019] 在一些抗体中,VH区中的以下位置中的至少一者被指定的氨基酸占据:H1被E占据,H17被T占据,H20被I占据,H69被M占据,H75被T占据,H93被T占据,H94被T占据,并且H109被V占据。在一些抗体中,位置H1、H17、H20、H69、H75、H94和H109分别被E、T、I、M、T、T和V占据。

[0020] 在一些抗体中,VH区中的以下位置中的至少一者被指定的氨基酸占据:H66被R占据,并且H81被E占据。在一些抗体中,位置H66和H81分别被R和E占据。

[0021] 在一些抗体中,VH区中的以下位置中的至少一者被指定的氨基酸占据:H23被I占据,并且H83被R占据。在一些抗体中,位置H23和H83分别被K和R占据。

[0022] 在一些抗体中,VH区中的以下位置中的至少一者被指定的氨基酸占据:H43被K占据,H51被V占据,H76被D占据,M80被M占据,并且H108被L占据。在一些抗体中,位置H43、H51、H76、H80和H108分别被K、V、D、M和L占据。

[0023] 在一些抗体中,VH区的位置H28被T占据。

[0024] 在一些抗体中,VH区中的以下位置中的至少一者被指定的氨基酸占据:H54被D占据,并且H56被E占据。在一些抗体中,位置H54和H56分别被D和E占据。

[0025] 在一些抗体中,VH区的位置H40被A占据。

[0026] 在一些抗体中,VH区中的以下位置中的至少一者被指定的氨基酸占据:H5被V占据,H11被V占据,H12被K占据,H38被R占据,并且H42被G占据。在一些抗体中,位置H5、H11、H12、H38和H42分别被V、V、K、R和G占据。

[0027] 在一些抗体中,VH区中的以下位置中的至少一者被指定的氨基酸占据:H1被Q或E占据,H5被Q或V占据,H11被L或V占据,H12被V或K占据,H17被S或T占据,H20被L或I占据,H23被T或K占据,H28被N或T占据,H38被K、R或Q占据,H40被R或A占据,H42被E或G占据,H43被Q或K占据,H48被I或M占据,H51被I或V占据,H54被N或D占据,H56被D或E占据,H66被K或R占据,H69被I或M占据,H75被S或T占据,H76被N或D占据,H79被Y、Q、D、N或G占据,H80被L、M、P、D、G或E占据,H81被Q或E占据,H82被L、P、K、R、E或N占据,H82a被S或G占据,H82c被L、G、D或S占据,H83被T或R占据,H93被A或T占据,H94被S或T占据,H108被T或L占据,H109被L或V占据。

[0028] 在一些抗体中,VH区的位置H1、H17、H20、H69、H75、H93、H94和H109分别被E、T、I、M、T、T、T和V占据。在一些抗体中,VH区的位置H1、H17、H20、H66、H69、H75、H81、H93、H94和H109分别被E、T、I、R、M、T、E、T、T和V占据。在一些抗体中,VH区中的位置H1、H17、H20、H23、H28、H43、H51、H54、H56、H66、H69、H75、H76、H80、H81、H83、H93、H94、H108和H109分别被E、T、I、K、T、K、V、D、E、R、M、T、D、M、E、R、T、T、L和V占据。在一些抗体中,VH区中的位置H1、H17、H20、H23、H28、H40、H43、H48、H51、H54、H56、H66、H69、H75、H76、H80、H81、H83、H93、H94、H108和H109分别被E、T、I、K、T、A、K、M、V、D、E、R、M、T、D、M、E、R、T、T、L和V占据。在一些抗体中,VH区中的位置H1、H5、H11、H12、H17、H20、H23、H38、H40、

H42、H43、H51、H54、H56、H66、H69、H75、H76、H80、H81、H83、H93、H94、H108和H109分别被E、V、V、K、T、I、K、R、A、G、K、V、D、E、R、M、T、D、M、E、R、T、T、L和V占据。在一些抗体中，VH区中的H1、H5、H11、H12、H17、H20、H23、H38、H40、H42、H43、H51、H66、H69、H75、H76、H80、H81、H83、H93、H94、H108和H109分别被E、V、V、K、T、I、K、R、A、G、K、V、R、M、T、D、M、E、R、T、T、L和V占据。

[0029] 在一些抗体中，VH区中的位置H1、H5、H11、H12、H17、H20、H23、H38、H42、H43、H66、H69、H75、H80、H81、H83、H93、H94、H108和H109分别被E、V、V、K、T、I、K、Q、G、K、R、M、T、M、E、R、T、T、L和V占据。在一些抗体中，重链可变区包含SEQ ID NO:127的氨基酸序列。

[0030] 在一些抗体中，VH区中的位置H1、H5、H11、H12、H17、H20、H23、H38、H42、H43、H66、H69、H75、H80、H81、H83、H93、H94、H108和H109分别被E、V、V、K、T、I、K、K、E、K、R、M、T、M、E、R、T、T、L和V占据。在一些抗体中，重链可变区包含SEQ ID NO:128的氨基酸序列。

[0031] 在一些抗体中，VH区中的位置H1、H5、H11、H12、H17、H20、H23、H38、H42、H43、H66、H69、H75、H80、H81、H82c、H83、H93、H94、H108和H109分别被E、V、V、K、T、I、K、K、E、K、R、M、T、M、E、G、R、T、T、L和V占据。

[0032] 在一些抗体中，VH区中的位置H80被P占据。在一些抗体中，VH区中的位置H80被D占据。在一些抗体中，VH区中的位置H82c被G占据。在一些抗体中，VH区中的位置H82c被D占据。在一些抗体中，VH区中的位置H82被P占据。在一些抗体中，VH区中的位置H80被G占据。在一些抗体中，VH区中的位置H82被K占据。在一些抗体中，VH区中的位置H82被R占据。在一些抗体中，VH区中的位置H82被E占据。在一些抗体中，VH区中的位置H82被N占据。

[0033] 在一些抗体中，VH区中的位置H79被D占据。在一些抗体中，VH区中的位置H79被N占据。在一些抗体中，VH区中的位置H79被G占据。在一些抗体中，VH区中的位置H80被E占据。在一些抗体中，VH区中的位置H80被G占据。在一些抗体中，VH区中的位置H82c被S占据。在一些抗体中，VH区中的位置H79被Q占据。在一些抗体中，VH区中的位置H82a被G占据。

[0034] 在一些抗体中，VL区中的以下位置中的至少一者被指定的氨基酸占据：L7被S占据，L8被P占据，L15被P占据，并且L100被Q占据。在一些抗体中，位置L7、L8、L15和L100分别被S、P、P和Q占据。

[0035] 在一些抗体中，VL区中的位置L66被G占据。在一些抗体中，VL区的位置L64被S占据。

[0036] 在一些抗体中，VL区的位置L17被E占据。在一些抗体中，VL区中的以下位置中的至少一者被指定的氨基酸占据：L11被L占据，L51被G占据，并且L54被R占据。

[0037] 在一些抗体中，位置L11、L51和L54分别被L、G和R占据。在一些抗体中，VL区中的位置L30被Y占据。

[0038] 在一些抗体中，VL区中的以下位置中的至少一者被指定的氨基酸占据：L3被V或Q占据，L7被A或S占据，L8被A或P占据，L9被F或L占据，L11被N或L占据，L15被L或P占据，L17被T或E占据，L18被S或P占据，L27b被L、D、T或Q占据，L27c被L、D、G、S、E、T、N、A、P或I占据，L30被I、Y、E、K、G占据，L31被T、N或G占据，L33被L、N、T、S、R或G占据，L37被L、Q、G或I占据，L39被R或K占据，L51被M、G、E、D、K或I占据，L54被R、G或T占据，L60被N或D占据，L64被G或S占据，L66被E或G占据，L73被L、P或G占据，L74被R或K占据，L75被I、D、P、Q或G占据，L76被S、P或G占据，L77被R或D占据，L78被V、R、D、E、P、K、G或Q占据，L85被V或G占据，L86被Y或T占据，L89被A或G占据，L92被L、D、E、G、Q、T或I占据，L93被E或G占据，L100被G或Q占据。

[0039] 在一些抗体中,VL区中的位置L64和L66分别被S和G占据。在一些抗体中,VL区中的位置L7、L8、L15、L64、L66和L100分别被S、P、P、S、G和Q占据。在一些抗体中,VL区中的位置L7、L8、L15、L17、L66和L100分别被S、P、P、E、G和Q占据。在一些抗体中,VL区中的位置L7、L8、L11、L15、L17、L51、L54、L66和L100分别被S、P、L、P、E、G、R、G和Q占据。

[0040] 在一些抗体中,轻链可变区包含SEQ ID NO:133、135-137、142-144、149、158、159和168中任一者的氨基酸序列。在一些抗体中,轻链可变区包含SEQ ID NO:133的氨基酸序列。在一些抗体中,轻链可变区包含SEQ ID NO:137的氨基酸序列。在一些抗体中,轻链可变区包含SEQ ID NO:149的氨基酸序列。在一些抗体中,轻链可变区包含SEQ ID NO:159的氨基酸序列。

[0041] 在一些抗体中,VL区中的位置L7、L8、L11、L15、L17、L30、L51、L54、L66和L100分别被S、P、L、P、E、Y、G、R、G和Q占据。在一些抗体中,VL区中的位置L7、L8、L11、L15、L17、L30、L51、L54和L100分别被S、P、L、P、E、Y、G、R和Q占据。在一些抗体中,VL区中的位置L7、L8、L9、L11、L15、L17、L18、L31、L39、L51、L54、L60、L66、L74和L100分别被S、P、L、L、P、E、P、N、K、G、R、D、G、K和Q占据。

[0042] 在一些抗体中,VL区中的位置L7、L8、L11、L15、L17、L39、L60、L64、L66、L74和L100分别被S、P、L、P、E、K、N、S、G、K和Q占据。在一些抗体中,VL区中的位置L3被Q占据。在一些抗体中,VL区中的位置L27c被D、G、I、L或S占据,VL区中的位置L37被G、I、L或Q占据,VL区中的位置L51被E、G、I、K或M占据,VL区中的位置L54被G、L、R或T占据,并且VL区中的位置L92被G、I或L占据。在一些抗体中,VL区中的位置L27c被D或S占据,VL区中的位置L37被G、L或Q占据,VL区中的位置L51被G或K占据,VL区中的位置L54被R占据,并且VL区中的位置L92被I占据。

[0043] 在一些抗体中,VL区中的位置L27c被D占据,VL区中的位置L37被G占据,并且VL区中的位置L51被G占据。在一些抗体中,重链可变区具有包含SEQ ID NO:127的氨基酸序列,并且轻链可变区具有包含SEQ ID NO:149的氨基酸序列。

[0044] 在一些抗体中,VL区中的位置L27c被D占据,VL区中的位置L37被Q占据,并且VL区中的位置L51被G占据。在一些抗体中,重链可变区具有包含SEQ ID NO:127的氨基酸序列,并且轻链可变区具有包含SEQ ID NO:137的氨基酸序列。

[0045] 在一些抗体中,VL区中的位置L27c被S占据,VL区中的位置L37被L占据,并且VL区中的位置L51被G占据。在一些抗体中,重链可变区具有包含SEQ ID NO:127的氨基酸序列,并且轻链可变区具有包含SEQ ID NO:159的氨基酸序列。

[0046] 在一些抗体中,VL区中的位置L27c被D占据,VL区中的位置L37被Q占据,并且VL区中的位置L51被K占据。在一些抗体中,重链可变区具有包含SEQ ID NO:127的氨基酸序列,并且轻链可变区具有包含SEQ ID NO:138的氨基酸序列。

[0047] 在一些抗体中,VL区中的位置L27c被S占据,VL区中的位置L37被Q占据,并且VL区中的位置L51被G占据。在一些抗体中,重链可变区具有包含SEQ ID NO:127的氨基酸序列,并且轻链可变区具有包含SEQ ID NO:133的氨基酸序列。

[0048] 在一些抗体中,VL区中的位置L7、L8、L11、L15、L17、L39、L60、L64、L66、L74和L100分别被S、P、L、P、E、K、D、S、G、K和Q占据。在一些抗体中,VL区中的位置L3被Q占据。在一些抗体中,VL区中的位置L27c被G或S占据,VL区中的位置L37被G、I或Q占据,VL区中的位置L51被G、I或K占据,VL区中的位置L54被G或R占据,并且VL区中的位置L92被G、I或L占据。

[0049] 在一些抗体中,VL区中的位置L27c被G占据,VL区中的位置L37被G占据,VL区中的位置L51被G占据,并且VL区中的位置L54被R占据。在一些抗体中,VL区中的位置L92被I占据。在一些抗体中,重链可变区具有包含SEQ ID NO:129的氨基酸序列,并且轻链可变区具有包含SEQ ID NO:168的氨基酸序列。

[0050] 在一些抗体中,VL区中的位置L51被E占据。在一些抗体中,VL区中的位置L51被D占据。在一些抗体中,VL区中的位置L27c被D占据。在一些抗体中,VL区中的位置L27c被G占据。在一些抗体中,VL区中的位置L27c被S占据。在一些抗体中,VL区中的位置L27c被E占据。在一些抗体中,VL区中的位置L30被E占据。在一些抗体中,VL区中的位置L30被K占据。在一些抗体中,VL区中的位置L27c被T占据。

[0051] 在一些抗体中,VL区中的位置L27c被N占据。在一些抗体中,VL区中的位置L27b被D占据。在一些抗体中,VL区中的位置L30被G占据。在一些抗体中,条件是VL区中的位置L33被N占据。在一些抗体中,VL区中的位置L27c被A占据。在一些抗体中,VL区中的位置L33被T占据。在一些抗体中,VL区中的位置L33被S占据。在一些抗体中,VL区中的位置L33被R占据。在一些抗体中,VL区中的位置L30被Q占据。在一些抗体中,VL区中的位置L27b被T占据。

[0052] 在一些抗体中,VL区中的位置L31被G占据。在一些抗体中,VL区中的位置L27b被Q占据。在一些抗体中,VL区中的位置L33被G占据。在一些抗体中,VL区中的位置L27c被P占据。在一些抗体中,VL区中的位置L78被R占据。在一些抗体中,VL区中的位置L75被D占据。在一些抗体中,VL区中的位置L78被D占据。在一些抗体中,VL区中的位置L78被E占据。在一些抗体中,VL区中的位置L78被P占据。在一些抗体中,VL区中的位置L78被K占据。

[0053] 在一些抗体中,VL区中的位置L77被D占据。在一些抗体中,VL区中的位置L78被G占据。在一些抗体中,VL区中的位置L76被P占据。在一些抗体中,VL区中的位置L75被P占据。在一些抗体中,条件是VL区中的位置L75被Q占据。在一些抗体中,VL区中的位置L75被G占据。在一些抗体中,VL区中的位置L73被P占据。在一些抗体中,VL区中的位置L73被G占据。在一些抗体中,VL区中的位置L78被Q占据。在一些抗体中,VL区中的位置L76被G占据。

[0054] 在一些抗体中,VL区中的位置L92被D占据。在一些抗体中,VL区中的位置L86被T占据。在一些抗体中,VL区中的位置L92被E占据。在一些抗体中,VL区中的位置L92被G占据。在一些抗体中,VL区中的位置L92被Q占据。在一些抗体中,VL区中的位置L93被G占据。在一些抗体中,条件是VL区中的位置L85被G占据。在一些抗体中,VL区中的位置L92被T占据。在一些抗体中,VL区中的位置L89被G占据。

[0055] 在一些抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、S、Q、G、G和I占据。在一些抗体中,VL区中的位置L3Q、L27c、L37、L51、L54和L92被Q、S、Q、G、R和I占据。在一些抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、S、Q、G、T和I占据。在一些抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、S、Q、G、R和G占据。在一些抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、G、Q、G、R和I占据。

[0056] 在一些抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、D、Q、G、R和I占据。在一些抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、D、Q、K、R和I占据。在一些抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、G、Q、K、R和I占据。在一些抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、G、Q、K、G和I占据。在一些抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、S、Q、K、G和I占据。

[0057] 在一些抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、G、G、G、R和I占据。在一些抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、G、G、G、R和G占据。在一些抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51和L54分别被Q、G、G、G和R占据。在一些抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92被Q、G、G、G、T和I占据。在一些抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、G、G、G、T和G占据。

[0058] 在一些抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51和L54分别被Q、G、G、G和T占据。在一些抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、S、G、G、T和I占据。在一些抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、D、G、G、R和I占据。在一些抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、S、I、I、R和I占据。在一些抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、S、Q、I、G和I占据。

[0059] 在一些抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51和L54分别被Q、S、Q、I和G占据。在一些抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、S、Q、E、R和I占据。在一些抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、G、Q、E、G和I占据。在一些抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92L分别被Q、G、I、E、R和I占据。在一些抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、G、I、E、R和G占据。

[0060] 在一些抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51和L54分别被Q、I、I、E和R占据。在一些抗体中,VL区中的位置L3、L37、L51、L54和L92分别被Q、Q、G、R和I占据。在一些抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L51、L54和L92分别被Q、S、G、R和I占据。在一些抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L54和L92分别被Q、S、Q、R和I占据。在一些抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51和L92分别被Q、S、Q、G和I占据。

[0061] 在一些抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92被Q、S、Q、G、G和I占据。在一些抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、S、Q、G、R和I占据。在一些抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、S、Q、G、R和G占据。在一些抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、G、Q、G、R和I占据。在一些抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、G、Q、K、R和I占据。

[0062] 在一些抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、S、Q、K、G和I占据。在一些抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、G、G、G、R和I占据。在一些抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51和L54分别被Q、G、G、G和R占据。在一些抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92被Q、S、I、I、R和I占据。在一些抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、S、Q、I、G和I占据。

[0063] 一些抗体包含具有与SEQ ID NO:15-22和SEQ ID NO:109-129中任一者至少95%同一的氨基酸序列的成熟重链可变区和具有与SEQ ID NO:23-29、SEQ ID NO:61-108和SEQ ID NO:130-171中任一者至少95%同一的氨基酸序列的成熟轻链可变区。一些抗体包含具有与SEQ ID NO:15-22和SEQ ID NO:109-129中任一者至少98%同一的氨基酸序列的成熟重链可变区和具有与SEQ ID NO:23-29、SEQ ID NO:61-108和SEQ ID NO:130-171中任一者至少98%同一的氨基酸序列的成熟轻链可变区。在一些抗体中,成熟重链可变区具有SEQ ID NO:15-22和SEQ ID NO:109-129中任一者的氨基酸序列,并且成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:23-29、SEQ ID NO:61-108和SEQ ID NO:130-171中任一者的氨基酸序列。

[0064] 在一些抗体中,成熟重链可变区具有SEQ ID NO:15的氨基酸序列,并且成熟轻链

链可变区具有SEQ ID NO:29的氨基酸序列。

[0072] 在一些抗体中,成熟重链可变区具有SEQ ID NO:127的氨基酸序列,并且成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:149的氨基酸序列。在一些抗体中,成熟重链可变区具有SEQ ID NO:127的氨基酸序列,并且成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:142的氨基酸序列。在一些抗体中,成熟重链可变区具有SEQ ID NO:127的氨基酸序列,并且成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:159的氨基酸序列。在一些抗体中,成熟重链可变区具有SEQ ID NO:127的氨基酸序列,并且成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:148的氨基酸序列。

[0073] 在一些抗体中,成熟重链可变区具有SEQ ID NO:127的氨基酸序列,并且成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:137的氨基酸序列。在一些抗体中,成熟重链可变区具有SEQ ID NO:127的氨基酸序列,并且成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:145的氨基酸序列。在一些抗体中,成熟重链可变区具有SEQ ID NO:127的氨基酸序列,并且成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:136的氨基酸序列。在一些抗体中,成熟重链可变区具有SEQ ID NO:127的氨基酸序列,并且成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:138的氨基酸序列。

[0074] 在一些抗体中,成熟重链可变区具有SEQ ID NO:127的氨基酸序列,并且成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:158的氨基酸序列。在一些抗体中,成熟重链可变区具有SEQ ID NO:127的氨基酸序列,并且成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:143的氨基酸序列。在一些抗体中,成熟重链可变区具有SEQ ID NO:127的氨基酸序列,并且成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:144的氨基酸序列。在一些抗体中,成熟重链可变区具有SEQ ID NO:127的氨基酸序列,并且成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:133的氨基酸序列。

[0075] 在一些抗体中,成熟重链可变区具有SEQ ID NO:127的氨基酸序列,并且成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:160的氨基酸序列。在一些抗体中,成熟重链可变区具有SEQ ID NO:127的氨基酸序列,并且成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:161的氨基酸序列。在一些抗体中,成熟重链可变区具有SEQ ID NO:127的氨基酸序列,并且成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:139的氨基酸序列。在一些抗体中,成熟重链可变区具有SEQ ID NO:128的氨基酸序列,并且成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:168的氨基酸序列。

[0076] 一些此类抗体包含单克隆抗体10C12的三个轻链CDR和三个重链CDR,其中10C12是特征在于具有包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变区和具有包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链可变区的小鼠抗体。

[0077] 在一些此类抗体中,三个重链CDR CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3如由Kabat/Chothia复合物所定义(分别为SEQ ID NO:8、9和10),并且三个轻链CDR CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3如由Kabat/Chothia复合物所定义(分别为SEQ ID NO:12、13和14)。

[0078] 一些抗体是10C12或其嵌合、饰面或人源化形式。在一些抗体中,可变重链与人序列具有 $\geq 85\%$ 的同一性。在一些抗体中,可变轻链与人序列具有 $\geq 85\%$ 的同一性。在一些抗体中,可变重链和可变轻链中的每一者与人种系序列具有 $\geq 85\%$ 的同一性。一些抗体是人源化抗体。

[0079] 一些抗体是与人tau特异性结合的人源化或嵌合10C12抗体,其中10C12是特征在于SEQ ID NO:7的成熟重链可变区和SEQ ID NO:11的成熟轻链可变区的小鼠抗体。一些抗体包括包含10C12的三个重链CDR的人源化成熟重链可变区和包含10C12的三个轻链CDR的人源化成熟轻链可变区。在一些抗体中,CDR的定义选自Kabat、Chothia、Kabat/Chothia复合

物、AbM和Contact的组。

[0080] 在一些抗体中,人源化成熟重链可变区包含10C12的三个Kabat/Chothia复合物重链CDR (SEQ ID NO:8-10),并且人源化成熟轻链可变区包含10C12的三个Kabat/Chothia复合物轻链CDR (SEQ ID NO:12-14)。在一些抗体中,人源化成熟重链可变区包含10C12的三个Kabat重链CDR (SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10),并且人源化成熟轻链可变区包含10C12的三个Kabat轻链CDR (SEQ ID NO:12-14)。在一些抗体中,人源化成熟重链可变区包含10C12的三个Chothia重链CDR (SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42和SEQ ID NO:10),并且人源化成熟轻链可变区包含10C12的三个Chothia轻链CDR (SEQ ID NO:12-14)。在一些抗体中,人源化成熟重链可变区包含10C12的三个AbM重链CDR (SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:43和SEQ ID NO:10),并且人源化成熟轻链可变区包含10C12的三个AbM轻链CDR (SEQ ID NO:12-14)。在一些抗体中,人源化成熟重链可变区包含10C12的三个Contact重链CDR (SEQ ID NO:44-46),并且人源化成熟轻链可变区包含10C12的三个Contact轻链CDR (SEQ ID NO:47-49)。

[0081] 举例来说,抗体可以是人源化抗体、饰面抗体或嵌合抗体。

[0082] 一些此类抗体包含具有与SEQ ID NO:214-215中任一者至少90%同一的氨基酸序列的人源化成熟重链可变区和具有与SEQ ID NO:216-217中任一者至少90%同一的氨基酸序列的人源化成熟轻链可变区。

[0083] 在一些抗体中,VH区中的以下位置中的至少一者被指定的氨基酸占据:H24被A占据,H48被I占据,H67被A占据,H69被M占据,H93被T占据,并且H94被T占据。在一些抗体中,位置H24、H48、H67、H69、H93和H94分别被A、I、A、M、T和T占据。

[0084] 在一些抗体中,VH区中的以下位置中的至少一者被指定的氨基酸占据:H1被Q或E占据,H24被A占据,H48被I占据,H67被A占据,H69被M占据,H93被T占据,H94被T占据。

[0085] 在一些抗体中,位置H24、H48、H67、H69、H93和H94分别被A、I、A、M、T和T占据。在一些抗体中,位置H1、H24、H48、H67、H69、H93和H94分别被E、A、I、A、M、T和T占据。

[0086] 在一些抗体中,VL区中的位置L64被S占据。

[0087] 在一些抗体中,VL区中的以下位置中的至少一者被指定的氨基酸占据:L64被S占据,L104被V或L占据。在一些抗体中,位置L64被S占据。在一些抗体中,VL区中的位置L64和L104分别被S和L占据。

[0088] 一些抗体包含具有与SEQ ID NO:214-215中任一者至少95%同一的氨基酸序列的成熟重链可变区和具有与SEQ ID NO:216-217中任一者至少95%同一的氨基酸序列的成熟轻链可变区。一些抗体包含具有与SEQ ID NO:214-215中任一者至少98%同一的氨基酸序列的成熟重链可变区和具有与SEQ ID NO:216-217中任一者至少98%同一的氨基酸序列的成熟轻链可变区。在一些抗体中,成熟重链可变区具有SEQ ID NO:214-215中任一者的氨基酸序列,并且成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:216-217中任一者的氨基酸序列。

[0089] 在一些抗体中,成熟重链可变区具有SEQ ID NO:214的氨基酸序列,并且成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:216的氨基酸序列。在一些抗体中,成熟重链可变区具有SEQ ID NO:214的氨基酸序列,并且成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:217的氨基酸序列。在一些抗体中,成熟重链可变区具有SEQ ID NO:215的氨基酸序列,并且成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:216的氨基酸序列。在一些抗体中,成熟重链可变区具有SEQ ID NO:215的氨基酸序列,并且成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:217的氨基酸序列。

[0090] 一些此类抗体包含单克隆抗体12C4的三个轻链CDR和三个重链CDR,其中12C4是特征在于具有包含SEQ ID NO:219的氨基酸序列的重链可变区和具有包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链可变区的小鼠抗体。

[0091] 在一些此类抗体中,三个重链CDR CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3如由Kabat/Chothia复合物所定义(分别为SEQ ID NO:8、220和10),并且三个轻链CDR CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3如由Kabat/Chothia复合物所定义(分别为SEQ ID NO:12、13和14)。

[0092] 一些抗体是12C4或其嵌合、饰面或人源化形式。在一些抗体中,可变重链与人序列具有 $\geq 85\%$ 的同一性。在一些抗体中,可变轻链与人序列具有 $\geq 85\%$ 的同一性。在一些抗体中,可变重链和可变轻链中的每一者与人种系序列具有 $\geq 85\%$ 的同一性。一些抗体是人源化抗体。

[0093] 一些抗体是与人tau特异性结合的人源化或嵌合12C4抗体,其中12C4是特征在于SEQ ID NO:219的成熟重链可变区和SEQ ID NO:11的成熟轻链可变区的小鼠抗体。一些抗体包括包含12C4的三个重链CDR的人源化成熟重链可变区和包含12C4的三个轻链CDR的人源化成熟轻链可变区。在一些抗体中,CDR的定义选自Kabat、Chothia、Kabat/Chothia复合物、AbM和Contact的组。

[0094] 在一些抗体中,人源化成熟重链可变区包含12C4的三个Kabat/Chothia复合物重链CDR (SEQ ID NO:8、220和10),并且人源化成熟轻链可变区包含12C4的三个Kabat/Chothia复合物轻链CDR (SEQ ID NO:12-14)。在一些抗体中,人源化成熟重链可变区包含12C4的三个Kabat重链CDR (SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:220和SEQ ID NO:10),并且人源化成熟轻链可变区包含12C4的三个Kabat轻链CDR (SEQ ID NO:12-14)。在一些抗体中,人源化成熟重链可变区包含12C4的三个Chothia重链CDR (SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42和SEQ ID NO:10),并且人源化成熟轻链可变区包含12C4的三个Chothia轻链CDR (SEQ ID NO:12-14)。在一些抗体中,人源化成熟重链可变区包含12C4的三个AbM重链CDR (SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:257和SEQ ID NO:10),并且人源化成熟轻链可变区包含12C4的三个AbM轻链CDR (SEQ ID NO:12-14)。在一些抗体中,人源化成熟重链可变区包含12C4的三个Contact重链CDR (SEQ ID NO:44、258和46),并且人源化成熟轻链可变区包含12C4的三个Contact轻链CDR (SEQ ID NO:47-49)。

[0095] 举例来说,抗体可以是人源化抗体、饰面抗体或嵌合抗体。

[0096] 一些此类抗体包含具有与SEQ ID NO:221-222中任一者至少90%同一的氨基酸序列的人源化成熟重链可变区和具有与SEQ ID NO:223-224中任一者至少90%同一的氨基酸序列的人源化成熟轻链可变区。

[0097] 在一些抗体中,VH区中的以下位置中的至少一者被指定的氨基酸占据:H1被Q或E占据,H48被M或I占据,H93被A或T占据,H94被R或T占据。在一些抗体中,VH区中的位置H1、H48、H93和H94分别被E、I、T和T占据。

[0098] 在一些抗体中,VL区中的位置被指定的氨基酸占据:L64被G或S占据,L104被V或L占据。在一些抗体中,VL区中的位置L64和L104分别被S和L占据。

[0099] 一些抗体包含具有与SEQ ID NO:221-222中任一者至少95%同一的氨基酸序列的成熟重链可变区和具有与SEQ ID NO:223-224中任一者至少95%同一的氨基酸序列的成熟轻链可变区。一些抗体包含具有与SEQ ID NO:221-222中任一者至少98%同一的氨基酸序

列的成熟重链可变区和具有与SEQ ID NO:223-224中任一者至少98%同一的氨基酸序列的成熟轻链可变区。在一些抗体中,成熟重链可变区具有SEQ ID NO:221-222中任一者的氨基酸序列,并且成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:223-224中任一者的氨基酸序列。

[0100] 在一些抗体中,成熟重链可变区具有SEQ ID NO:221的氨基酸序列,并且成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:223的氨基酸序列。在一些抗体中,成熟重链可变区具有SEQ ID NO:221的氨基酸序列,并且成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:224的氨基酸序列。在一些抗体中,成熟重链可变区具有SEQ ID NO:222的氨基酸序列,并且成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:223的氨基酸序列。在一些抗体中,成熟重链可变区具有SEQ ID NO:222的氨基酸序列,并且成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:224的氨基酸序列。

[0101] 一些此类抗体包含单克隆抗体17C12的三个轻链CDR和三个重链CDR,其中17C12是特征在于具有包含SEQ ID NO:225的氨基酸序列的重链可变区和具有包含SEQ ID NO:228的氨基酸序列的轻链可变区的小鼠抗体。

[0102] 在一些此类抗体中,三个重链CDR CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3如由Kabat/Chothia复合物所定义(分别为SEQ ID NO:226、227和10),并且三个轻链CDR CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3如由Kabat/Chothia复合物所定义(分别为SEQ ID NO:229、230和231)。

[0103] 一些抗体是17C12或其嵌合、饰面或人源化形式。在一些抗体中,可变重链与人序列具有 $\geq 85\%$ 的同一性。在一些抗体中,可变轻链与人序列具有 $\geq 85\%$ 的同一性。在一些抗体中,可变重链和可变轻链中的每一者与人种系序列具有 $\geq 85\%$ 的同一性。一些抗体是人源化抗体。

[0104] 一些抗体是与人tau特异性结合的人源化或嵌合17C12抗体,其中17C12是特征在于SEQ ID NO:225的成熟重链可变区和SEQ ID NO:228的成熟轻链可变区的小鼠抗体。一些抗体包括包含17C12的三个重链CDR的人源化成熟重链可变区和包含17C12的三个轻链CDR的人源化成熟轻链可变区。在一些抗体中,CDR的定义选自Kabat、Chothia、Kabat/Chothia复合物、AbM和Contact的组。

[0105] 在一些抗体中,人源化成熟重链可变区包含17C12的三个Kabat/Chothia复合物重链CDR (SEQ ID NO:226、227和10),并且人源化成熟轻链可变区包含17C12的三个Kabat/Chothia复合物轻链CDR (SEQ ID NO:229-231)。在一些抗体中,人源化成熟重链可变区包含17C12的三个Kabat重链CDR (SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:227和SEQ ID NO:10),并且人源化成熟轻链可变区包含17C12的三个Kabat轻链CDR (SEQ ID NO:229-231)。在一些抗体中,人源化成熟重链可变区包含17C12的三个Chothia重链CDR (SEQ ID NO:259、SEQ ID NO:42和SEQ ID NO:10),并且人源化成熟轻链可变区包含17C12的三个Chothia轻链CDR (SEQ ID NO:229-231)。在一些抗体中,人源化成熟重链可变区包含17C12的三个AbM重链CDR (SEQ ID NO:226、SEQ ID NO:260和SEQ ID NO:10),并且人源化成熟轻链可变区包含17C12的三个AbM轻链CDR (SEQ ID NO:229-231)。在一些抗体中,人源化成熟重链可变区包含17C12的三个Contact重链CDR (SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:261和SEQ ID NO:46),并且人源化成熟轻链可变区包含17C12的三个Contact轻链CDR (SEQ ID NO:262-264)。

[0106] 举例来说,抗体可以是人源化抗体、饰面抗体或嵌合抗体。

[0107] 一些此类抗体包含具有与SEQ ID NO:232-233中任一者至少90%同一的氨基酸序列的人源化成熟重链可变区和具有与SEQ ID NO:234-235中任一者至少90%同一的氨基酸

序列的人源化成熟轻链可变区。

[0108] 在一些抗体中,VH区中的以下位置中的至少一者被指定的氨基酸占据:H2被I占据,H24被A占据,H48被I占据,H67被A占据,H69被M占据,H93被T占据,并且H94被T占据。在一些抗体中,位置H2、H24、H48、H67、H69、H93和H94分别被E、A、I、A、M、T和T占据。

[0109] 在一些抗体中,VH区中的以下位置中的至少一者被指定的氨基酸占据:H1被Q或E占据,H2被占据被I占据,H24被A占据,H48被I占据,H67被A占据,H69被M占据,H93被T占据,H94被T占据,H108被T或L占据,H113被R或S占据。在一些抗体中,VH区中的位置H2、H24、H48、H67、H69、H93和H94分别被E、A、I、A、M、T和T占据。在一些抗体中,VH区中的位置H1、H2、H24、H48、H67、H69、H93、H94、H108和H113分别被E、I、A、I、A、M、T、T、L和S占据。

[0110] 在一些抗体中,VL区中的以下位置中的至少一者被指定的氨基酸占据:L2被V占据,并且L36被L占据。在一些抗体中,位置L2和L36分别被V和L占据。

[0111] 在一些抗体中,VL区中的以下位置中的至少一者被指定的氨基酸占据:L2被V占据,L36被L占据,L43被P或S占据。在一些抗体中,VL区中的位置L2和L36分别被V和L占据。在一些抗体中,VL区中的位置L2、L36和L43分别被V、L和S占据。

[0112] 一些抗体包含具有与SEQ ID NO:232-233中任一者至少95%同一的氨基酸序列的成熟重链可变区和具有与SEQ ID NO:234-235中任一者至少95%同一的氨基酸序列的成熟轻链可变区。一些抗体包含具有与SEQ ID NO:232-233中任一者至少98%同一的氨基酸序列的成熟重链可变区和具有与SEQ ID NO:234-235中任一者至少98%同一的氨基酸序列的成熟轻链可变区。在一些抗体中,成熟重链可变区具有SEQ ID NO:232-233中任一者的氨基酸序列,并且成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:234-235中任一者的氨基酸序列。

[0113] 在一些抗体中,成熟重链可变区具有SEQ ID NO:232的氨基酸序列,并且成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:234的氨基酸序列。在一些抗体中,成熟重链可变区具有SEQ ID NO:232的氨基酸序列,并且成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:235的氨基酸序列。在一些抗体中,成熟重链可变区具有SEQ ID NO:233的氨基酸序列,并且成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:234的氨基酸序列。在一些抗体中,成熟重链可变区具有SEQ ID NO:233的氨基酸序列,并且成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:235的氨基酸序列。

[0114] 一些此类抗体包含单克隆抗体14H3的三个轻链CDR和三个重链CDR,其中14H3是特征在于具有包含SEQ ID NO:240的氨基酸序列的重链可变区和具有包含SEQ ID NO:244的氨基酸序列的轻链可变区的小鼠抗体。

[0115] 在一些此类抗体中,三个重链CDR CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3如由Kabat/Chothia复合物所定义(分别为SEQ ID NO:241、242和243),不同的是位置H35B可被G或S占据,并且三个轻链CDR CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3如由Kabat/Chothia复合物所定义(分别为SEQ ID NO:245、246和247)。在一些抗体中,CDR-H1具有包含SEQ ID NO:277的氨基酸序列。

[0116] 一些抗体是14H3或其嵌合、饰面或人源化形式。在一些抗体中,可变重链与人序列具有 $\geq 85\%$ 的同一性。在一些抗体中,可变轻链与人序列具有 $\geq 85\%$ 的同一性。在一些抗体中,可变重链和可变轻链中的每一者与人种系序列具有 $\geq 85\%$ 的同一性。一些抗体是人源化抗体。

[0117] 一些抗体是与人tau特异性结合的人源化或嵌合14H3抗体,其中14H3是特征在于SEQ ID NO:240的成熟重链可变区和SEQ ID NO:244的成熟轻链可变区的小鼠抗体。一些抗

体包括包含14H3的三个重链CDR的人源化成熟重链可变区和包含14H3的三个轻链CDR的人源化成熟轻链可变区。在一些抗体中,CDR的定义选自Kabat、Chothia、Kabat/Chothia复合物、AbM和Contact的组。

[0118] 在一些抗体中,其中人源化成熟重链可变区包含14H3的三个Kabat/Chothia复合物重链CDR (SEQ ID NO:241-243),并且人源化成熟轻链可变区包含14H3的三个Kabat/Chothia复合物轻链CDR (SEQ ID NO:245-247)。在一些抗体中,人源化成熟重链可变区包含14H3的三个Kabat重链CDR (SEQ ID NO:265、SEQ ID NO:242和SEQ ID NO:243),并且人源化成熟轻链可变区包含14H3的三个Kabat轻链CDR (SEQ ID NO:245-247)。在一些抗体中,人源化成熟重链可变区包含14H3的三个Chothia重链CDR (SEQ ID NO:266、SEQ ID NO:267和SEQ ID NO:243),并且人源化成熟轻链可变区包含14H3的三个Chothia轻链CDR (SEQ ID NO:245-247)。在一些抗体中,人源化成熟重链可变区包含14H3的三个AbM重链CDR (SEQ ID NO:241、SEQ ID NO:268和SEQ ID NO:243),并且人源化成熟轻链可变区包含14H3的三个AbM轻链CDR (SEQ ID NO:245-247)。在一些抗体中,人源化成熟重链可变区包含14H3的三个Contact重链CDR (SEQ ID NO:269-271),并且人源化成熟轻链可变区包含14H3的三个Contact轻链CDR (SEQ ID NO:272-274)。

[0119] 举例来说,抗体可以是人源化抗体、饰面抗体或嵌合抗体。

[0120] 一些此类抗体包含具有与SEQ ID NO:248-249中任一者至少90%同一的氨基酸序列的人源化成熟重链可变区和具有与SEQ ID NO:250-251中任一者至少90%同一的氨基酸序列的人源化成熟轻链可变区。

[0121] 在一些抗体中,VH区中的位置H35B被S占据。

[0122] 在一些抗体中,VH区中的以下位置中的至少一者被指定的氨基酸占据:H35B被S占据,H108被M或L占据,H113被L或S占据。在一些抗体中,VH区中的位置H35B被S占据。在一些抗体中,VH区中的位置H35B、H108和H113分别被S、L和S占据。

[0123] 在一些抗体中,VL区中的以下位置中的至少一者被指定的氨基酸占据:L2被V占据,并且L87被F占据。在一些抗体中,位置L2和L87分别被V和F占据。

[0124] 在一些抗体中,VL区中的以下位置中的至少一者被指定的氨基酸占据:L2被V占据,L7被T或S占据,L37被L或Q占据,L87被F占据,L100被G或Q占据,L104被V或L占据。在一些抗体中,VL区中的位置L2和L87分别被V和F占据。在一些抗体中,VL区中的位置L2、L7、L37、L87、L100和L104分别被V、S、Q、F、Q和L占据。

[0125] 一些抗体包含具有与SEQ ID NO:248-249中任一者至少95%同一的氨基酸序列的成熟重链可变区和具有与SEQ ID NO:250-251中任一者至少95%同一的氨基酸序列的成熟轻链可变区。一些抗体包含具有与SEQ ID NO:248-249中任一者至少98%同一的氨基酸序列的成熟重链可变区和具有与SEQ ID NO:250-251中任一者至少98%同一的氨基酸序列的成熟轻链可变区。在一些抗体中,成熟重链可变区具有SEQ ID NO:248-249中任一者的氨基酸序列,并且成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:250-251中任一者的氨基酸序列。

[0126] 在一些抗体中,成熟重链可变区具有SEQ ID NO:248的氨基酸序列,并且成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:250的氨基酸序列。在一些抗体中,成熟重链可变区具有SEQ ID NO:248的氨基酸序列,并且成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:251的氨基酸序列。在一些抗体中,成熟重链可变区具有SEQ ID NO:249的氨基酸序列,并且成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:

250的氨基酸序列。在一些抗体中,成熟重链可变区具有SEQ ID NO:249的氨基酸序列,并且成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:251的氨基酸序列。

[0127] 举例来说,抗体可以是嵌合抗体。举例来说,抗体可以是饰面抗体。

[0128] 抗体可以是完整抗体。抗体可以是结合片段。在一个实施方案中,结合片段是单链抗体、Fab或Fab'2片段。抗体可以是Fab片段或单链Fv。一些抗体具有人IgG1同种型,而其他抗体可具有人IgG2或IgG4同种型。一些抗体具有与轻链恒定区融合的成熟轻链可变区和与重链恒定区融合的成熟重链可变区。一些抗体的重链恒定区是天然人重链恒定区的突变形式,相对于天然人重链恒定区,所述天然人重链恒定区的突变形式与Fc γ 受体的结合减少。在一些抗体中,重链恒定区属于IgG1同种型。

[0129] 一些抗体可在恒定区中具有至少一个突变,诸如通过恒定区减少补体固定或活化的突变,例如,在EU编号的位置241、264、265、270、296、297、318、320、322、329和331中的一个或多个处的突变。一些抗体在位置318、320和322处具有丙氨酸。一些抗体可以是至少95%w/w纯的。抗体可缀合于治疗剂、细胞毒性剂、细胞生长抑制剂、神经营养剂或神经保护剂。

[0130] 在另一方面,本发明提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含本文所公开的任何抗体和药学上可接受的载体。

[0131] 在另一方面,本发明提供了一种编码本文所公开的任何抗体的重链和/或轻链的核酸,一种包含所述核酸的重组表达载体以及一种用所述重组表达载体转化的宿主细胞。一些核酸具有包含SEQ IDNO:38-39中任一者的序列。

[0132] 在另一方面,本发明提供了一种包含编码成熟重链可变区和成熟轻链可变区的核酸的载体,所述核酸与一个或多个调控序列可操作地连接以实现本文所公开的任何抗体在哺乳动物细胞中的表达,一种包含所述核酸的重组表达载体,一种用所述重组表达载体转化的宿主细胞以及一种用所述核酸转化的宿主细胞。一些核酸进一步编码与成熟重链可变区融合的重链恒定区和与成熟轻链可变区融合的轻链恒定区。在一些载体中,抗体是scFv。在一些载体中,抗体是Fab片段。在一些载体中,一个或多个调控序列包括一个或多个启动子、增强子、核糖体结合位点和转录终止信号。在一些载体中,核酸进一步编码与成熟重链和轻链可变区融合的信号肽。在一些载体中,核酸经密码子优化以在宿主细胞中表达。在一些载体中,一个或多个调控序列包括真核启动子。在一些载体中,核酸进一步编码选择基因。

[0133] 在另一方面,本发明提供了在哺乳动物细胞中表达抗体的方法,所述方法包括将本文所公开的核酸掺入转基因动物的基因组中,由此表达所述抗体。

[0134] 在另一方面,本发明提供了分别包含编码成熟重链可变区和成熟轻链可变区的核酸的第一载体和第二载体,所述核酸各自与一个或多个调控序列可操作地连接以实现本文所公开的任何抗体在哺乳动物细胞中的表达:以及包含所述核酸的宿主细胞。在一些第一载体和第二载体中,核酸分别进一步编码与成熟重链可变区融合的重链恒定区和与成熟轻链可变区融合的轻链恒定区。

[0135] 在另一方面,本发明提供了在哺乳动物细胞中表达抗体的方法,所述方法包括将本文所公开的任何核酸掺入转基因动物的基因组中,由此表达所述抗体。

[0136] 在另一方面,本发明提供了将本文所述的任何非人抗体人源化的方法,所述非人

抗体例如小鼠抗体9F5,其中9F5的特征在于SEQ ID NO:7的成熟重链可变区和SEQ ID NO:11的成熟轻链可变区;例如小鼠抗体10C12,其中10C12的特征在于SEQ ID NO:7的成熟重链可变区和SEQ ID NO:11的成熟轻链可变区;例如小鼠抗体是2D11,其中2D11的特征在于SEQ ID NO:7的成熟重链可变区和SEQ ID NO:11的成熟轻链可变区;例如小鼠抗体12C4,其中12C4的特征在于SEQ ID NO:219的成熟重链可变区和SEQ ID NO:11的成熟轻链可变区;例如小鼠抗体17C12,其中17C12的特征在于SEQ ID NO:225的成熟重链可变区和SEQ ID NO:228的成熟轻链可变区;例如小鼠抗体14H3,其中14H3的特征在于SEQ ID NO:240的成熟重链可变区和SEQ ID NO:244的成熟轻链可变区。此类方法可包括选择一种或多种受体抗体,鉴定待保留的小鼠抗体的氨基酸残基;合成编码包含小鼠抗体重链CDR的人源化重链的核酸和编码包含小鼠抗体轻链CDR的人源化轻链的核酸,以及在宿主细胞中表达所述核酸以产生人源化抗体。

[0137] 还提供了产生抗体的方法,所述抗体诸如人源化、嵌合或饰面抗体,例如9F5、10C12、2D11、12C4、17C12或14H3的人源化、嵌合或饰面形式。在此类方法中,对用编码抗体的重链和轻链的核酸转化的细胞进行培养,以使细胞分泌抗体。然后可从细胞培养基中纯化抗体。

[0138] 产生本文所公开的任何抗体的细胞系可以通过以下方式产生:将编码抗体的重链和轻链以及选择标记物的载体引入细胞中,使细胞在用以选择具有增加拷贝数的载体的细胞的条件下增殖,从所选细胞中分离单细胞;并且将由基于抗体的产量选择的单细胞克隆的细胞建库。

[0139] 一些细胞可以在选择性条件下增殖,并筛选天然表达和分泌至少100mg/L/ 10^6 个细胞/24小时的细胞系。可从所选细胞中分离单细胞。然后可将由单细胞克隆的细胞建库。可基于期望特性,诸如抗体的产量选择单细胞。示例性细胞系是表达9F5、10C12、2D11、12C4、17C12或14H3的细胞系。

[0140] 本发明还提供了抑制或减少患有tau介导的淀粉样变性或有发展tau介导的淀粉样变性风险的受试者中的tau聚集的方法,所述方法包括向所述受试者施用本文所公开的抗体的有效方案,从而抑制或减少受试者中的tau聚集。示例性抗体包括9F5、10C12、2D11、12C4、17C12或14H3的人源化型式。

[0141] 还提供了在受试者中治疗tau相关疾病或实现tau相关疾病的预防的方法,所述方法包括施用本文所公开的抗体的有效方案并且从而治疗疾病或实现疾病的预防。这种疾病的实例是阿尔茨海默病、唐氏综合征、轻度认知障碍、原发性年龄相关性tau蛋白病(tauopathy)、脑炎后帕金森症、创伤后痴呆或拳击员痴呆、皮克氏病、C型尼曼-皮克病(type C Niemann-Pick disease)、核上性麻痹、额颞叶痴呆、额颞叶变性、嗜银颗粒病、球状神经胶质性tau蛋白病、关岛肌萎缩性侧索硬化/帕金森痴呆复征(amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism dementia complex of Guam)、皮质基底节变性(CBD)、路易体痴呆(dementia with Lewy bodies)、阿尔茨海默病的路易体变异(LBVAD)、慢性创伤性脑病变(CTE)、球状神经胶质性tau蛋白病(GGT)、帕金森病或进行性核上性麻痹(PSP)。在一些方法中,tau相关疾病是阿尔茨海默病。在一些方法中,患者是ApoE4携带者。

[0142] 还提供了减少tau的异常传播的方法,所述方法包括施用本文所公开的抗体的有效方案并且从而减少tau的传播。

[0143] 还提供了诱导tau的吞噬的方法,所述方法包括施用本文所公开的抗体的有效方案并且从而诱导tau的吞噬。

[0144] 还提供了抑制tau聚集或沉积的方法,所述方法包括施用本文所公开的抗体的有效方案,从而抑制tau聚集或沉积。

[0145] 还提供了抑制tau缠结形成的方法,所述方法包括施用本文所公开的抗体的有效方案。

[0146] 本发明还提供了一种在患有与tau聚集或沉积相关联的疾病或有患所述疾病风险的受试者中检测tau蛋白沉积物的方法,所述方法包括向受试者施用本文所公开的抗体,以及检测受试者中与tau结合的抗体。这种疾病的实例是阿尔茨海默病、唐氏综合征、轻度认知障碍、原发性年龄相关性tau蛋白病、脑炎后帕金森症、创伤后痴呆或拳击员痴呆、皮克氏病、C型尼曼-皮克病、核上性麻痹、额颞叶痴呆、额颞叶变性、嗜银颗粒病、球状神经胶质性tau蛋白病、关岛肌萎缩性侧索硬化/帕金森痴呆复征、皮质基底节变性(CBD)、路易体痴呆、阿尔茨海默病的路易体变异(LBVAD)、慢性创伤性脑病变(CTE)、球状神经胶质性tau蛋白病(GGT)、帕金森病或进行性核上性麻痹(PSP)。在一些实施方案中,通过静脉内注射将抗体施用到受试者体内。在一些实施方案中,通过颅内注射或通过钻取穿透受试者的颅骨的孔来将抗体直接施用于受试者的脑部。在一些实施方案中,对抗体进行标记。在一些实施方案中,对抗体用荧光标记、顺磁性标记或放射性标记进行标记。在一些实施方案中,使用正电子发射断层摄影术(PET)或单光子发射计算机断层摄影术(SPECT)检测放射性标记。

[0147] 本发明还提供了一种在被治疗与tau聚集或沉积相关联的疾病的受试者中测量治疗的功效的方法,所述方法包括在通过向受试者施用本文所公开的抗体进行治疗之前测量受试者中tau蛋白沉积物的第一水平,并且检测受试者中与tau结合的抗体的第一量;向受试者施用治疗;在通过向受试者施用抗体进行治疗之后测量受试者中tau蛋白沉积物的第二水平,并且检测受试者中与tau结合的抗体;其中tau蛋白沉积物水平的降低表明对治疗的阳性应答。

[0148] 本发明还提供了一种在被治疗与tau聚集或沉积相关联的疾病的受试者中测量治疗的功效的方法,所述方法包括在通过向受试者施用本文所公开的抗体进行治疗之前测量受试者中tau蛋白沉积物的第一水平,并且检测受试者中与tau结合的抗体的第一量;向受试者施用治疗;在通过向受试者施用抗体进行治疗之后测量受试者中tau蛋白沉积物的第二水平,并且检测受试者中与tau结合的抗体的第二量;其中tau蛋白沉积物的水平没有变化或tau蛋白沉积物的少量增加表明对治疗的阳性应答。

[0149] 本发明还提供了一种与由残基(Q/E)IVYK(S/P)(SEQ ID NO:56)组成的肽特异性结合的分离的单克隆抗体。本发明还提供了一种与由残基QIVYKP(SEQ ID NO:57)组成的肽特异性结合的分离的单克隆抗体。本发明还提供了一种与由残基EIVYKSP(SEQ ID NO:58)组成的肽特异性结合的分离的单克隆抗体。本发明还提供了一种与由残基EIVYKS(SEQ ID NO:277)组成的肽特异性结合的分离的单克隆抗体。

[0150] 本发明还提供了一种在包括SEQ ID NO:1的307-312内的至少一个残基在内的表位处与SEQ ID NO:1的多肽特异性结合的分离的单克隆抗体。一些此类抗体与SEQ ID NO:1的残基307-312内的表位结合。本发明还提供了一种在包括SEQ ID NO:1的残基391-397内的至少一个残基在内的表位处与SEQ ID NO:1的多肽特异性结合的分离的单克隆抗体。一

些此类抗体与SEQ ID NO:1的残基391-397内的表位结合。本发明还提供了一种在包括SEQ ID NO:1的残基391-396内的至少一个残基在内的表位处与SEQ ID NO:1的多肽特异性结合的分离的单克隆抗体。一些此类抗体与SEQ ID NO:1的残基391-396内的表位结合。本发明还提供了一种在包括来自SEQ ID NO:1的残基307-312内的至少一个残基和来自SEQ ID NO:1的残基391-397内的至少一个残基在内的表位处与SEQ ID NO:1的多肽特异性结合的分离的单克隆抗体。本发明还提供了一种在包括来自SEQ ID NO:1的残基307-312内的至少一个残基和来自SEQ ID NO:1的残基391-396内的至少一个残基在内的表位处与SEQ ID NO:1的多肽特异性结合的分离的单克隆抗体。

[0151] 本发明还提供了一种在受试者中治疗tau相关疾病或实现tau相关疾病的预防的方法,所述方法包括施用免疫原,所述免疫原包含抗体9F5、10C12、2D11、12C4、17C12或14H3所特异性结合的SEQ ID NO:1的多至20个连续氨基酸的tau肽,其中所述肽在受试者中诱导与tau特异性结合的抗体的形成。在一些此类方法中,tau肽由来自SEQ ID NO:1的残基307-312或来自SEQ ID NO:1的残基391-397或来自SEQ ID NO:1的残基391-396的4-7个连续氨基酸组成。在一些此类方法中,tau肽由残基(Q/E)IVYK(S/P)(SEQ ID NO:56)组成。在一些此类方法中,tau肽由残基QIVYKP(SEQ ID NO:57)组成。在一些此类方法中,tau肽由残基EIVYKSP(SEQ ID NO:58)组成。在一些此类方法中,tau肽由残基EIVYKS(SEQ ID NO:277)组成。在一些此类方法中,tau肽附接于异源缀合物分子。

[0152] 本发明还提供了一种产生与包含(Q/E)IVYK(S/P)(SEQ ID NO:56)的表位特异性结合的抗体的方法,所述方法包括用tau或其片段对动物进行免疫,以及筛选与表位特异性结合的抗体。在一些此类方法中,用383氨基酸人tau(4R0N)对动物进行免疫。在一些此类方法中,人tau含有P301S突变。在一些此类方法中,人tau是重组的带有N末端His标签的。

[0153] 在一些此类方法中,针对包含QIVYKP(SEQ ID NO:57)、EIVYKSP(SEQ ID NO:58)、EIVYKS(SEQ ID NO:277)的15个氨基酸肽或由(Q/E)IVYK(S/P)(SEQ ID NO:56)表示的任何其他共有基序进行筛选。在一些此类方法中,肽包含QIVYKP(SEQ ID NO:57)或EIVYKSP(SEQ ID NO:58)或EIVYKS(SEQ ID NO:277)。

[0154] 在一些此类方法中,用连接于载体的包含由(Q/E)IVYK(S/P)(SEQ ID NO:56)表示的肽的tau片段对动物进行免疫。在一些此类方法中,肽是QIVYKP(SEQ ID NO:57)或EIVYKSP(SEQ ID NO:58)或EIVYKS(SEQ ID NO:277)。

附图说明

[0155] 图1A和图1B描绘了小鼠9F5抗体的重链可变区(SEQ ID NO:7)和9F5抗体的人源化型式的重链可变区(hu9F5VHv1、hu9F5VHv2、hu9F5VHv3、hu9F5VHv4、hu9F5VHv5、hu9F5VHv6、hu9F5VHv7和hu9F5VHv8)与人种系重链可变区序列IGHV1-69-2*01(SEQ ID NO:33)、人受体重链可变区序列AAN16432-VH_huFrwk(AAN16432_H;SEQ ID NO:31)以及人受体重链可变区序列2RCS-VH_huFrwk(2RCS_H;SEQ ID NO:32)的比对。hu9F5VHv1是SEQ ID NO:15, hu9F5VHv2是SEQ ID NO:16, hu9F5VHv3是SEQ ID NO:17, hu9F5VHv4是SEQ ID NO:18, hu9F5VHv5是SEQ ID NO:19, hu9F5VHv6是SEQ ID NO:20, 且hu9F5VHv7是SEQ ID NO:21, 并且hu9F5VHv8是SEQ ID NO:22。如由Kabat/Chothia复合物所定义的小鼠9F5VH的CDR以粗体显示。

[0156] 图2A和图2B描绘了小鼠9F5抗体的轻链可变区(SEQ ID NO:11)和9F5抗体的人源化型式的轻链可变区(hu9F5VLv1、hu9F5VLv2、hu9F5VLv3、hu9F5VLv4、hu9F5VLv5、hu9F5VLv6和hu9F5VLv7)与人种系轻链可变区序列IGKV2-28*01&_IGKJ2*01(IGKV2-28*01_IGKJ2*01;SEQ ID NO:37)、人受体CAB51297-VL_huFrwk(CAB51297_L;SEQ ID NO:35)以及人受体1911357B-VL_huFrwk(1911357B_L;SEQ ID NO:36)的比对。hu9F5VLv1是SEQ ID NO:23, hu9F5VLv2是SEQ ID NO:24, hu9F5VLv3是SEQ ID NO:25, hu9F5VLv4是SEQ ID NO:26, hu9F5VLv5是SEQ ID NO:27, hu9F5VLv6是SEQ ID NO:28, 并且hu9F5VLv7是SEQ ID NO:29。如由Kabat定义的小鼠9F5VL的CDR以粗体显示。

[0157] 图3描绘了显示小鼠9F5抗体阻断tau的神经元内化的测定的结果。

[0158] 图4A和图4B描绘了小鼠9F5抗体的重链可变区(SEQ ID NO:7)和9F5抗体的人源化型式的重链可变区(hu9F5VHv1、hu9F5VHv2、hu9F5VHv3、hu9F5VHv4、hu9F5VHv5、hu9F5VHv6、hu9F5VHv7、hu9F5VHv8、hu9F5VHv9和hu9F5VHv10)与人种系重链可变区序列IGHV1-69-2*01(SEQ ID NO:33)、人受体重链可变区序列AAN16432-VH_huFrwk(AAN16432_H;SEQ ID NO:31)以及人受体重链可变区序列2RCS-VH_huFrwk(2RCS_H;SEQ ID NO:32)的比对。hu9F5VHv1是SEQ ID NO:15, hu9F5VHv2是SEQ ID NO:16, hu9F5VHv3是SEQ ID NO:17, hu9F5VHv4是SEQ ID NO:18, hu9F5VHv5是SEQ ID NO:19, hu9F5VHv6是SEQ ID NO:20, 且hu9F5VHv7是SEQ ID NO:21, hu9F5VHv8是SEQ ID NO:22, hu9F5VHv9是SEQ ID NO:127, 并且hu9F5VHv10是SEQ ID NO:128。如由Kabat/Chothia复合物所定义的小鼠9F5VH的CDR以粗体显示。与小鼠9F5VH的残基同一的残基用“.”表示。

[0159] 图5A和图5B描绘了小鼠9F5抗体的轻链可变区(SEQ ID NO:11)和9F5抗体的人源化型式的轻链可变区(hu9F5VLv1、hu9F5VLv2、hu9F5VLv3、hu9F5VLv4、hu9F5VLv5、hu9F5VLv6、hu9F5VLv7、hu9F5VLv8和hu9F5VLv9)与人种系轻链可变区序列IGKV2-28*01&_IGKJ2*01(IGKV2-28*01_IGKJ2*01;SEQ ID NO:37)、人受体CAB51297-VL_huFrwk(CAB51297_L;SEQ ID NO:35)以及人受体1911357B-VL_huFrwk(1911357B_L;SEQ ID NO:36)的比对。hu9F5VLv1是SEQ ID NO:23, hu9F5VLv2是SEQ ID NO:24, hu9F5VLv3是SEQ ID NO:25, hu9F5VLv4是SEQ ID NO:26, hu9F5VLv5是SEQ ID NO:27, hu9F5VLv6是SEQ ID NO:28, hu9F5VLv7是SEQ ID NO:2, hu9F5VLv8是SEQ ID NO:130, 并且hu9F5VLv9是SEQ ID NO:131。如由Kabat定义的小鼠9F5VL的CDR以粗体显示。与小鼠9F5VL的残基同一的残基用“.”表示。

[0160] 图6A、图6B和图6C描绘了hu9F5VLv8的轻链可变区与9F5抗体的人源化型式的轻链可变区的比对: hu9F5VLv8_DIM1(SEQ ID NO:132)、hu9F5VLv8_DIM2(SEQ ID NO:133)、hu9F5VLv8_DIM3(SEQ ID NO:134)、hu9F5VLv8_DIM4(SEQ ID NO:135)、hu9F5VLv8_DIM5(SEQ ID NO:136)、hu9F5VLv8_DIM6(SEQ ID NO:137)、hu9F5VLv8_DIM7(SEQ ID NO:138)、hu9F5VLv8_DIM8(SEQ ID NO:139)、hu9F5VLv8_DIM9(SEQ ID NO:140)、hu9F5VLv8_DIM10(SEQ ID NO:141)、hu9F5VLv8_DIM11(SEQ ID NO:142)、hu9F5VLv8_DIM12(SEQ ID NO:143)、hu9F5VLv8_DIM13(SEQ ID NO:144)、hu9F5VLv8_DIM14(SEQ ID NO:145)、hu9F5VLv8_DIM15(SEQ ID NO:146)、hu9F5VLv8_DIM16(SEQ ID NO:147)、hu9F5VLv8_DIM17(SEQ ID NO:148)、hu9F5VLv8_DIM18(SEQ ID NO:149)、hu9F5VLv8_DIM19(SEQ ID NO:150)、hu9F5VLv8_DIM20(SEQ ID NO:151)、hu9F5VLv8_DIM21(SEQ ID NO:152)、hu9F5VLv8_DIM22(SEQ ID NO:153)、

hu9F5VLv8_DIM23 (SEQ ID NO:154)、hu9F5VLv8_DIM24 (SEQ ID NO:155)、hu9F5VLv8_DIM25 (SEQ ID NO:156)、hu9F5VLv8_DIM26 (SEQ ID NO:157)、hu9F5VLv9_DIM1 (SEQ ID NO:162)、hu9F5VLv9_DIM2 (SEQ ID NO:163)、hu9F5VLv9_DIM4 (SEQ ID NO:164)、hu9F5VLv9_DIM5 (SEQ ID NO:165)、hu9F5VLv9_DIM8 (SEQ ID NO:166)、hu9F5VLv9_DIM 10 (SEQ ID NO:167)、hu9F5VLv9_DIM11 (SEQ ID NO:168)、hu9F5VLv9_DIM13 (SEQ ID NO:169)、hu9F5VLv9_DIM19 (SEQ ID NO:170)、hu9F5VLv9_DIM20 (SEQ ID NO:171)、hu9F5VLv8_DIM27 (SEQ ID NO:158)、hu9F5VLv8_DIM28 (SEQ ID NO:159)、hu9F5VLv8_DIM29 (SEQ ID NO:160)、hu9F5VLv8_DIM30 (SEQ ID NO:161)。如由Kabat定义的hu9F5VLv8的CDR以粗体显示。

[0161] 图7描绘了小鼠10C12抗体的重链可变区 (SEQ ID NO:7,图7中标记为m10C12VH) 和10C12抗体的人源化型式的重链可变区 (hu10C12VHv1和hu10C12VHv2) 与人种系重链可变区序列IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33) 以及人受体重链可变区序列CAC20421VH (SEQ ID NO:218) 的比对。hu10C12VHv1是SEQ ID NO:214并且hu10C12VHv2是SEQ ID NO:215。如由Kabat/Chothia复合物所定义的小鼠10C12VH的CDR以粗体显示。

[0162] 图8描绘了小鼠10C12的轻链可变区 (SEQ ID NO:11) 和10C12抗体的人源化型式的轻链可变区 (hu10C12VLv1和hu10C12VLv2) 与人种系轻链可变区序列IGKV2-28*01&_IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37) 以及人受体CAB51297-VL_huFrwk (SEQ ID NO:35) 的比对。hu10C12VLv1是SEQ ID NO:216并且hu10C12VLv2是SEQ ID NO:217。如由Kabat定义的小鼠10C12VL的CDR以粗体显示。

[0163] 图9描绘了小鼠12C4抗体的重链可变区 (SEQ ID NO:219) 和12C4抗体的人源化型式的重链可变区 (hu12C4VHv1和hu12C4VHv2) 与人种系重链可变区序列IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33) 以及人受体重链可变区序列CAC20421VH (SEQ ID NO:218) 的比对。hu12C4VHv1是SEQ ID NO:221并且hu12C4VHv2是SEQ ID NO:222。如由Kabat/Chothia复合物所定义的小鼠12C4VH的CDR以粗体显示。

[0164] 图10描绘了小鼠12C4抗体的轻链可变区 (SEQ ID NO:11) 和12C4抗体的人源化型式的轻链可变区 (hu12C4VLv1和hu12C4VLv2) 与人种系轻链可变区序列IGKV2-28*01&_IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37) 以及人受体CAB51297 (SEQ ID NO:35) 的比对。hu12C4VLv1是SEQ ID NO:223并且hu12C4VLv2是SEQ ID NO:224。如由Kabat定义的小鼠12C4VL的CDR以粗体显示。

[0165] 图11描绘了小鼠17C12抗体的重链可变区 (SEQ ID NO:225) 和17C12抗体的人源化型式的重链可变区 (hu17C12VHv1和hu17C12VHv2) 与人种系重链可变区序列IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33) 以及人受体重链可变区序列CAC20421VH (SEQ ID NO:218) 的比对。hu17C12VHv1是SEQ ID NO:232并且hu17C12VHv2是SEQ ID NO:233。如由Kabat/Chothia复合物所定义的小鼠17C12VH的CDR以粗体显示。

[0166] 图12描绘了小鼠17C12抗体的轻链可变区 (SEQ ID NO:228) 和17C12抗体的人源化型式的轻链可变区 (hu17C12VLv1和hu17C12VLv2) 与人种系轻链可变区序列IGKV2-29*02&_IGKJ4*01 (SEQ ID NO:239) 以及人受体QD016713VL (SEQ ID NO:238) 的比对。hu17C12VLv1是SEQ ID NO:234并且hu17C12VLv2是SEQ ID NO:235。如由Kabat定义的小鼠17C12VL的CDR以粗体显示。

[0167] 图13描绘了小鼠14H3抗体的重链可变区 (SEQ ID NO:240) 和14H3抗体的人源化型式的重链可变区 (hu14H3VHv1和hu14H3VHv2) 与人种系重链可变区序列IGHV2-70*04&

IGHJ4*01 (SEQ ID NO:254) 以及人受体重链可变区序列QDJ57937VH hFrwk (SEQ ID NO:253) 的比对。hu14H3VHv1是SEQ ID NO:248并且hu14H3VHv2是SEQ ID NO:249。如由Kabat/Chothia复合物所定义的小鼠14H3VH的CDR以粗体显示。

[0168] 图14描绘了小鼠14H3抗体的轻链可变区 (SEQ ID NO:244) 和14H3抗体的人源化型式的轻链可变区 (hu14H3VLv1和hu14H3VLv2) 与人种系轻链可变区序列IGKV2-28*01&_IGKJ2*01 (IGKV2-28*01_IGKJ2*01; SEQ ID NO:37) 以及人受体ABC66914VL_hFwrk (SEQ ID NO:256) 的比对。hu14H3VLv1是SEQ ID NO:250并且hu14H3VLv2是SEQ ID NO:251。如由Kabat定义的小鼠14H3VL的CDR以粗体显示。

[0169] 图15描绘了显示小鼠10C12、小鼠12C4、小鼠2D11、小鼠17C12、小鼠14H3和小鼠9F5抗体阻断tau的神经元内化的测定的结果。

[0170] 图16描绘了显示小鼠10C12、小鼠12C4、小鼠2D11和小鼠9F5抗体防止原代神经元中的tau毒性的测定 (神经元活力) 的结果。

[0171] 图17描绘了显示小鼠10C12、小鼠12C4、小鼠2D11和小鼠9F5抗体防止原代神经元中的tau毒性的测定 (LDH释放) 的结果。

[0172] 图18描绘了显示小鼠10C12、小鼠12C4、小鼠2D11、小鼠17C12、小鼠14H3和小鼠9F5抗体检测来自阿尔茨海默病患者脑部的样品中的tau的蛋白质印迹测定的结果。

[0173] 图19描绘了使用小鼠10C12、小鼠12C4、小鼠2D11、小鼠17C12、小鼠14H3和小鼠9F5抗体和来自阿尔茨海默病患者脑部的样品的免疫沉淀测定的结果。

[0174] 图20描绘了测量9F5人源化变体耐受由搅动应力诱导的聚集的能力的测定的结果。

[0175] 图21描绘了测量9F5人源化变体耐受低pH暴露的能力的测定的结果。

[0176] 图22描绘了测量9F5人源化变体在模拟高浓度条件下聚集的能力的测定的结果。

[0177] 图23A至图23F描绘了使用对照、小鼠2D11、小鼠9F5、小鼠12C4、小鼠14H3和小鼠17C12的免疫组织化学测定的结果。

[0178] 图24描绘了小鼠9F5抗体 (SEQ ID NO:7)、小鼠10C12抗体 (SEQ ID NO:7)、小鼠2D11抗体 (SEQ ID NO:7)、小鼠12C4抗体 (SEQ ID NO:219)、小鼠14H3抗体 (SEQ ID NO:240) 和小鼠17C12抗体 (SEQ ID NO:225) 的重链可变区的比对。如由Kabat/Chothia复合物所定义的小鼠9F5VH的CDR以粗体显示。

[0179] 图25描绘了小鼠9F5抗体 (SEQ ID NO:11)、小鼠10C12抗体 (SEQ ID NO:11)、小鼠2D11抗体 (SEQ ID NO:11)、小鼠12C4抗体 (SEQ ID NO:11)、小鼠14H3抗体 (SEQ ID NO:244) 和小鼠17C12抗体 (SEQ ID NO:228) 的轻链可变区的比对。如由Kabat定义的小鼠9F5VL的CDR以粗体显示。

[0180] 序列简述

[0181] SEQ ID NO:1列出了人tau的同种型的氨基酸序列 (Swiss-Prot P10636-8)。

[0182] SEQ ID NO:2列出了人tau的同种型的氨基酸序列 (Swiss-Prot P10636-7)。

[0183] SEQ ID NO:3列出了人tau的同种型的氨基酸序列 (Swiss-Prot P10636-6) (4R0N人tau)。

[0184] SEQ ID NO:4列出了人tau的同种型的氨基酸序列 (Swiss-Prot P10636-5)。

[0185] SEQ ID NO:5列出了人tau的同种型的氨基酸序列 (Swiss-Prot P10636-4)。

- [0186] SEQ ID NO:6列出了人tau的同种型的氨基酸序列(Swiss-Prot P10636-2)。
- [0187] SEQ ID NO:7列出了小鼠9F5抗体的重链可变区的氨基酸序列。
- [0188] SEQ ID NO:8列出了小鼠9F5抗体的Kabat/Chothia复合物CDR-H1的氨基酸序列。
- [0189] SEQ ID NO:9列出了小鼠9F5抗体的Kabat CDR-H2的氨基酸序列。
- [0190] SEQ ID NO:10列出了小鼠9F5抗体的Kabat CDR-H3的氨基酸序列。
- [0191] SEQ ID NO:11列出了小鼠9F5抗体的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0192] SEQ ID NO:12列出了小鼠9F5抗体的Kabat CDR-L1的氨基酸序列。
- [0193] SEQ ID NO:13列出了小鼠9F5抗体的Kabat CDR-L2的氨基酸序列。
- [0194] SEQ ID NO:14列出了小鼠9F5抗体的Kabat CDR-L3的氨基酸序列。
- [0195] SEQ ID NO:15列出了人源化重链可变区hu9F5VHv1的氨基酸序列。
- [0196] SEQ ID NO:16列出了人源化重链可变区hu9F5VHv2的氨基酸序列。
- [0197] SEQ ID NO:17列出了人源化重链可变区hu9F5VHv3的氨基酸序列。
- [0198] SEQ ID NO:18列出了人源化重链可变区hu9F5VHv4的氨基酸序列。
- [0199] SEQ ID NO:19列出了人源化重链可变区hu9F5VHv5的氨基酸序列：
- [0200] SEQ ID NO:20列出了人源化重链可变区hu9F5VHv6的氨基酸序列。
- [0201] SEQ ID NO:21列出了人源化重链可变区hu9F5VHv7的氨基酸序列。
- [0202] SEQ ID NO:22列出了人源化重链可变区hu9F5VHv8的氨基酸序列。
- [0203] SEQ ID NO:23列出了人源化轻链可变区hu9F5VLv1的氨基酸序列。
- [0204] SEQ ID NO:24列出了人源化轻链可变区hu9F5VLv2的氨基酸序列。
- [0205] SEQ ID NO:25列出了人源化轻链可变区hu9F5VLv3的氨基酸序列。
- [0206] SEQ ID NO:26列出了人源化轻链可变区hu9F5VLv4的氨基酸序列。
- [0207] SEQ ID NO:27列出了人源化9F5抗体hu9F5VLv5的人源化轻链可变区的氨基酸序列。
- [0208] SEQ ID NO:28列出了人源化轻链可变区hu9F5VLv6的氨基酸序列。
- [0209] SEQ ID NO:29列出了人源化轻链可变区hu9F5VLv7的氨基酸序列。
- [0210] SEQ ID NO:30列出了重链可变区结构模型PDB.#50BF-VH_mSt的氨基酸序列。
- [0211] SEQ ID NO:31列出了重链可变区受体GenBank登录号AAN16432-VH_huFrwk的氨基酸序列。
- [0212] SEQ ID NO:32列出了重链可变区受体PDB#2RCS-VH_huFrwk的氨基酸序列。
- [0213] SEQ ID NO:33列出了重链可变区种系序列IMGT#IGHV1-69-2*01的氨基酸序列。
- [0214] SEQ ID NO:34列出了轻链可变区结构模型PDB#50BF-VL_mSt的氨基酸序列。
- [0215] SEQ ID NO:35列出了轻链可变区受体GenBank登录号CAB51297-VL_huFrwk的氨基酸序列。
- [0216] SEQ ID NO:36列出了轻链可变区受体GenBank登录号1911357B-VL_huFrwk的氨基酸序列。
- [0217] SEQ ID NO:37列出了轻链可变区种系序列IMGT#IGKV2-28*01&IGKJ2*01的氨基酸序列。
- [0218] SEQ ID NO:38列出了编码小鼠9F5抗体的重链可变区的核酸序列。
- [0219] SEQ ID NO:39列出了编码小鼠9F5抗体的轻链可变区的核酸序列。

- [0220] SEQ ID NO:40列出了小鼠9F5抗体的Kabat CDR-H1的氨基酸序列。
- [0221] SEQ ID NO:41列出了小鼠9F5抗体的Chothia CDR-H1的氨基酸序列。
- [0222] SEQ ID NO:42列出了小鼠9F5抗体的Chothia CDR-H2的氨基酸序列。
- [0223] SEQ ID NO:43列出了小鼠9F5抗体的AbM CDR-H2的氨基酸序列。
- [0224] SEQ ID NO:44列出了小鼠9F5抗体的Contact CDR-H1的氨基酸序列。
- [0225] SEQ ID NO:45列出了小鼠9F5抗体的Contact CDR-H2的氨基酸序列。
- [0226] SEQ ID NO:46列出了小鼠9F5抗体的Contact CDR-H3的氨基酸序列。
- [0227] SEQ ID NO:47列出了小鼠9F5抗体的Contact CDR-L1的氨基酸序列。
- [0228] SEQ ID NO:48列出了小鼠9F5抗体的Contact CDR-L2的氨基酸序列。
- [0229] SEQ ID NO:49列出了小鼠9F5抗体的Contact CDR-L3的氨基酸序列。
- [0230] SEQ ID NO:50列出了人源化9F5抗体的另选的Kabat-Chothia复合物CDR-H1 (存在于hu9F5VHv4、hu9F5VHv5和hu9F5VHv6中) 的氨基酸序列。
- [0231] SEQ ID NO:51列出了人源化9F5抗体的另选的Kabat CDR-H2 (存在于hu9F5VHv5、hu9F5VHv6和hu9F5VHv7中) 的氨基酸序列。
- [0232] SEQ ID NO:52列出了人源化9F5抗体的另选的Kabat CDR-H2 (存在于hu9F5VHv8中) 的氨基酸序列。
- [0233] SEQ ID NO:53列出了人源化9F5抗体的另选的Kabat CDR-L1 (存在于hu9F5VLv5和hu9F5VLv6中) 的氨基酸序列。
- [0234] SEQ ID NO:54列出了人源化9F5抗体的另选的Kabat CDR-L1 (存在于hu9F5VLv7中) 的氨基酸序列。
- [0235] SEQ ID NO:55列出了人源化9F5抗体的另选的Kabat CDR-L2 (存在于hu9F5VLv4、hu9F5VLv5、hu9F5VLv6、hu9F5VLv7、hu9F5VLv8_DIM2、hu9F5VLv8_DIM4、hu9F5VLv8_DIM5、hu9F5VLv8_DIM6、hu9F5VLv8_DIM11、hu9F5VLv8_DIM12、hu9F5VLv8_DIM13、hu9F5VLv8_DIM18、hu9F5VLv8_DIM27、hu9F5VLv8_DIM28、hu9F5VLv9_DIM2、hu9F5VLv9_DIM4、hu9F5VLv9_DIM5、hu9F5VLv9_DIM11和hu9F5VLv9_DIM13中) 的氨基酸序列。
- [0236] SEQ ID NO:56列出了抗体9F5的表位的氨基酸序列。
- [0237] SEQ ID NO:57列出了由抗体9F5结合的肽的共有基序的氨基酸序列。
- [0238] SEQ ID NO:58列出了由抗体9F5结合的肽的共有基序的氨基酸序列。
- [0239] SEQ ID NO:59列出了接头的氨基酸序列。
- [0240] SEQ ID NO:60列出了HA对照肽的氨基酸序列。
- [0241] SEQ ID NO:61列出了hu9F5VLv2轻链可变区的变体 (也称为hu9F5VLv2_M51E) 的氨基酸序列。
- [0242] SEQ ID NO:62列出了hu9F5VLv2轻链可变区的变体 (也称为hu9F5VLv2_M51D) 的氨基酸序列。
- [0243] SEQ ID NO:63列出了hu9F5VLv2轻链可变区的变体 (也称为hu9F5VLv2_L27cD) 的氨基酸序列。
- [0244] SEQ ID NO:64列出了hu9F5VLv2轻链可变区的变体 (也称为hu9F5VLv2_L27cG) 的氨基酸序列。
- [0245] SEQ ID NO:65列出了hu9F5VLv2轻链可变区的变体 (也称为hu9F5VLv2_L27cS) 的

氨基酸序列。

[0246] SEQ ID NO:66列出了hu9F5VLv2轻链可变区的变体(也称为hu9F5VLv2_L27cE)的氨基酸序列。

[0247] SEQ ID NO:67列出了hu9F5VLv2轻链可变区的变体(也称为hu9F5VLv2_I30E)的氨基酸序列。

[0248] SEQ ID NO:68列出了hu9F5VLv2轻链可变区的变体(也称为hu9F5VLv2_I30K)的氨基酸序列。

[0249] SEQ ID NO:69列出了hu9F5VLv2轻链可变区的变体(也称为hu9F5VLv2_L27cT)的氨基酸序列。

[0250] SEQ ID NO:70列出了hu9F5VLv2轻链可变区的变体(也称为hu9F5VLv2_L27cN)的氨基酸序列。

[0251] SEQ ID NO:71列出了hu9F5VLv2轻链可变区的变体(也称为hu9F5VLv2_L27bD)的氨基酸序列。

[0252] SEQ ID NO:72列出了hu9F5VLv2轻链可变区的变体(也称为hu9F5VLv2_I30G)的氨基酸序列。

[0253] SEQ ID NO:73列出了hu9F5VLv2轻链可变区的变体(也称为hu9F5VLv2_L33N)的氨基酸序列。

[0254] SEQ ID NO:74列出了hu9F5VLv2轻链可变区的变体(也称为hu9F5VLv2_L27cA)的氨基酸序列。

[0255] SEQ ID NO:75列出了hu9F5VLv2轻链可变区的变体(也称为hu9F5VLv2_L33T)的氨基酸序列。

[0256] SEQ ID NO:76列出了hu9F5VLv2轻链可变区的变体(也称为hu9F5VLv2_L33S)的氨基酸序列。

[0257] SEQ ID NO:77列出了hu9F5VLv2轻链可变区的变体(也称为hu9F5VLv2_L33R)的氨基酸序列。

[0258] SEQ ID NO:78列出了hu9F5VLv2轻链可变区的变体(也称为hu9F5VLv2_I30Q)的氨基酸序列。

[0259] SEQ ID NO:79列出了hu9F5VLv2轻链可变区的变体(也称为hu9F5VLv2_L27bT)的氨基酸序列。

[0260] SEQ ID NO:80列出了hu9F5VLv2轻链可变区的变体(也称为hu9F5VLv2_T31G)的氨基酸序列。

[0261] SEQ ID NO:81列出了hu9F5VLv2轻链可变区的变体(也称为hu9F5VLv2_L27bQ)的氨基酸序列。

[0262] SEQ ID NO:82列出了hu9F5VLv2轻链可变区的变体(也称为hu9F5VLv2_L33G)的氨基酸序列。

[0263] SEQ ID NO:83列出了hu9F5VLv2轻链可变区的变体(也称为hu9F5VLv2_L27cP)的氨基酸序列。

[0264] SEQ ID NO:84列出了hu9F5VLv2轻链可变区的变体(也称为hu9F5VLv2_V78R)的氨基酸序列。

[0265] SEQ ID NO:85列出了hu9F5VLv2轻链可变区的变体(也称为hu9F5VLv2_I75D)的氨基酸序列。

[0266] SEQ ID NO:86列出了hu9F5VLv2轻链可变区的变体(也称为hu9F5VLv2_V78D)的氨基酸序列。

[0267] SEQ ID NO:87列出了hu9F5VLv2轻链可变区的变体(也称为hu9F5VLv2_V78E)的氨基酸序列。

[0268] SEQ ID NO:88列出了hu9F5VLv2轻链可变区的变体(也称为hu9F5VLv2_V78P)的氨基酸序列。

[0269] SEQ ID NO:89列出了hu9F5VLv2轻链可变区的变体(也称为hu9F5VLv2_V78K)的氨基酸序列。

[0270] SEQ ID NO:90列出了hu9F5VLv2轻链可变区的变体(也称为hu9F5VLv2_R77D)的氨基酸序列。

[0271] SEQ ID NO:91列出了hu9F5VLv2轻链可变区的变体(也称为hu9F5VLv2_V78G)的氨基酸序列。

[0272] SEQ ID NO:92列出了hu9F5VLv2轻链可变区的变体(也称为hu9F5VLv2_S76P)的氨基酸序列。

[0273] SEQ ID NO:93列出了hu9F5VLv2轻链可变区的变体(也称为hu9F5VLv2_I75P)的氨基酸序列。

[0274] SEQ ID NO:94列出了hu9F5VLv2轻链可变区的变体(也称为hu9F5VLv2_I75Q)的氨基酸序列。

[0275] SEQ ID NO:95列出了hu9F5VLv2轻链可变区的变体(也称为hu9F5VLv2_I75G)的氨基酸序列。

[0276] SEQ ID NO:96列出了hu9F5VLv2轻链可变区的变体(也称为hu9F5VLv2_L73P)的氨基酸序列。

[0277] SEQ ID NO:97列出了hu9F5VLv2轻链可变区的变体(也称为hu9F5VLv2_L73G)的氨基酸序列。

[0278] SEQ ID NO:98列出了hu9F5VLv2轻链可变区的变体(也称为hu9F5VLv2_V78Q)的氨基酸序列。

[0279] SEQ ID NO:99列出了hu9F5VLv2轻链可变区的变体(也称为hu9F5VLv2_S76G)的氨基酸序列。

[0280] SEQ ID NO:100列出了hu9F5VLv2轻链可变区的变体(也称为hu9F5VLv2_L92D)的氨基酸序列。

[0281] SEQ ID NO:101列出了hu9F5VLv2轻链可变区的变体(也称为hu9F5VLv2_Y86T)的氨基酸序列。

[0282] SEQ ID NO:102列出了hu9F5VLv2轻链可变区的变体(也称为hu9F5VLv2_L92E)的氨基酸序列。

[0283] SEQ ID NO:103列出了hu9F5VLv2轻链可变区的变体(也称为hu9F5VLv2_L92G)的氨基酸序列。

[0284] SEQ ID NO:104列出了hu9F5VLv2轻链可变区的变体(也称为hu9F5VLv2_L92Q)的

氨基酸序列。

[0285] SEQ ID NO:105列出了hu9F5VLv2轻链可变区的变体(也称为hu9F5VLv2_L93G)的氨基酸序列。

[0286] SEQ ID NO:106列出了hu9F5VLv2轻链可变区的变体(也称为hu9F5VLv2_V85G)的氨基酸序列。

[0287] SEQ ID NO:107列出了hu9F5VLv2轻链可变区的变体(也称为hu9F5VLv2_L92T)的氨基酸序列。

[0288] SEQ ID NO:108列出了hu9F5VLv2轻链可变区的变体(也称为hu9F5VLv2_A89G)的氨基酸序列。

[0289] SEQ ID NO:109列出了hu9F5VHv4重链可变区的变体(也称为hu9F5VHv4_L80P)的氨基酸序列。

[0290] SEQ ID NO:110列出了hu9F5VHv4重链可变区的变体(也称为hu9F5VHv4_L80D)的氨基酸序列。

[0291] SEQ ID NO:111列出了hu9F5VHv4重链可变区的变体(也称为hu9F5VHv4_L82cG)的氨基酸序列。

[0292] SEQ ID NO:112列出了hu9F5VHv4重链可变区的变体(也称为hu9F5VHv4_L82cD)的氨基酸序列。

[0293] SEQ ID NO:113列出了hu9F5VHv4重链可变区的变体(也称为hu9F5VHv4_L82P)的氨基酸序列。

[0294] SEQ ID NO:114列出了hu9F5VHv4重链可变区的变体(也称为hu9F5VHv4_L80G)的氨基酸序列。

[0295] SEQ ID NO:115列出了hu9F5VHv4重链可变区的变体(也称为hu9F5VHv4_L82K)的氨基酸序列。

[0296] SEQ ID NO:116列出了hu9F5VHv4重链可变区的变体(也称为hu9F5VHv4_L82R)的氨基酸序列。

[0297] SEQ ID NO:117列出了hu9F5VHv4重链可变区的变体(也称为hu9F5VHv4_L82E)的氨基酸序列。

[0298] SEQ ID NO:118列出了hu9F5VHv4重链可变区的变体(也称为hu9F5VHv4_L82N)的氨基酸序列。

[0299] SEQ ID NO:119列出了hu9F5VHv4重链可变区的变体(也称为hu9F5VHv4_Y79D)的氨基酸序列。

[0300] SEQ ID NO:120列出了hu9F5VHv4重链可变区的变体(也称为hu9F5VHv4_Y79N)的氨基酸序列。

[0301] SEQ ID NO:121列出了hu9F5VHv4重链可变区的变体(也称为hu9F5VHv4_Y79G)的氨基酸序列。

[0302] SEQ ID NO:122列出了hu9F5VHv5重链可变区的变体(也称为hu9F5VHv5_M80E)的氨基酸序列。

[0303] SEQ ID NO:123列出了hu9F5VHv5重链可变区的变体(也称为hu9F5VHv5_M80G)的氨基酸序列。

[0304] SEQ ID NO:124列出了hu9F5VHv4重链可变区的变体(也称为hu9F5VHv4_L82cS)的氨基酸序列。

[0305] SEQ ID NO:125列出了hu9F5VHv4重链可变区的变体(也称为hu9F5VHv4_Y79Q)的氨基酸序列。

[0306] SEQ ID NO:126列出了hu9F5VHv4重链可变区的变体(也称为hu9F5VHv4_S82aG)的氨基酸序列。

[0307] SEQ ID NO:127列出了重链可变区hu9F5VHv9的氨基酸序列。

[0308] SEQ ID NO:128列出了重链可变区hu9F5VHv10(也称为hu9F5VHv9_Q38K_G42E)的氨基酸序列。

[0309] SEQ ID NO:129列出了重链可变区hu9F5VHv10_L82cG的氨基酸序列。

[0310] SEQ ID NO:130列出了轻链可变区hu9F5VLv8的氨基酸序列。

[0311] SEQ ID NO:131列出了轻链可变区hu9F5VLv9(也称为hu9F5VLv8_N60D)的氨基酸序列。

[0312] SEQ ID NO:132列出了hu9F5VLv8轻链可变区的变体(hu9F5VLv8_V3Q、L27cS、L37Q、M51G、L54G、L92I,也称为hu9F5VLv8_DIM1)的氨基酸序列。

[0313] SEQ ID NO:133列出了hu9F5VLv8轻链可变区的变体(hu9F5VLv8_V3Q、L27cS、L37Q、M51G、L54R、L92I,也称为hu9F5VLv8_DIM2)的氨基酸序列。

[0314] SEQ ID NO:134列出了hu9F5VLv8轻链可变区的变体(hu9F5VLv8_V3Q、L27cS、L37Q、M51G、L54T、L92I,也称为hu9F5VLv8_DIM3)的氨基酸序列。

[0315] SEQ ID NO:135列出了hu9F5VLv8轻链可变区的变体(hu9F5VLv8_V3Q、L27cS、L37Q、M51G、L54R、L92G,也称为hu9F5VLv8_DIM4)的氨基酸序列。

[0316] SEQ ID NO:136列出了hu9F5VLv8轻链可变区的变体(hu9F5VLv8_V3Q、L27cG、L37Q、M51G、L54R、L92I,也称为hu9F5VLv8_DIM5)的氨基酸序列。

[0317] SEQ ID NO:137列出了hu9F5VLv8轻链可变区的变体(hu9F5VLv8_V3Q、L27cD、L37Q、M51G、L54R、L92I,也称为hu9F5VLv8_DIM6)的氨基酸序列。

[0318] SEQ ID NO:138列出了hu9F5VLv8轻链可变区的变体(hu9F5VLv8_V3Q、L27cD、L37Q、M51K、L54R、L92I,也称为hu9F5VLv8_DIM7)的氨基酸序列。

[0319] SEQ ID NO:139列出了hu9F5VLv8轻链可变区的变体(hu9F5VLv8_V3Q、L27cG、L37Q、M51K、L54R、L92I,也称为hu9F5VLv8_DIM8)的氨基酸序列。

[0320] SEQ ID NO:140列出了hu9F5VLv8轻链可变区的变体(hu9F5VLv8_V3Q、L27cG、L37Q、M51K、L54G、L92I,也称为hu9F5VLv8_DIM9)的氨基酸序列。

[0321] SEQ ID NO:141列出了hu9F5VLv8轻链可变区的变体(hu9F5VLv8_V3Q、L27cS、L37Q、M51K、L54G、L92I,也称为hu9F5VLv8_DIM10)的氨基酸序列。

[0322] SEQ ID NO:142列出了hu9F5VLv8轻链可变区的变体(hu9F5VLv8_V3Q、L27cG、L37G、M51G、L54R、L92I,也称为hu9F5VLv8_DIM11)的氨基酸序列。

[0323] SEQ ID NO:143列出了hu9F5VLv8轻链可变区的变体(hu9F5VLv8_V3Q、L27cG、L37G、M51G、L54R、L92G,也称为hu9F5VLv8_DIM12)的氨基酸序列。

[0324] SEQ ID NO:144列出了hu9F5VLv8轻链可变区的变体(hu9F5VLv8_V3Q、L27cG、L37G、M51G、L54R,也称为hu9F5VLv8_DIM13)的氨基酸序列。

- [0325] SEQ ID NO:145列出了hu9F5VLv8轻链可变区的变体(hu9F5VLv8_V3Q、L27cG、L37G、M51G、L54T、L92I,也称为hu9F5VLv8_DIM14)的氨基酸序列。
- [0326] SEQ ID NO:146列出了hu9F5VLv8轻链可变区的变体(hu9F5VLv8_V3Q、L27cG、L37G、M51G、L54T、L92G,也称为hu9F5VLv8_DIM15)的氨基酸序列。
- [0327] SEQ ID NO:147列出了hu9F5VLv8轻链可变区的变体(hu9F5VLv8_V3Q、L27cG、L37G、M51G、L54T,也称为hu9F5VLv8_DIM16)的氨基酸序列。
- [0328] SEQ ID NO:148列出了hu9F5VLv8轻链可变区的变体(hu9F5VLv8_V3Q、L27cS、L37G、M51G、L54T、L92I,也称为hu9F5VLv8_DIM17)的氨基酸序列。
- [0329] SEQ ID NO:149列出了hu9F5VLv8轻链可变区的变体(hu9F5VLv8_V3Q、L27cD、L37G、M51G、L54R、L92I,也称为hu9F5VLv8_DIM18)的氨基酸序列。
- [0330] SEQ ID NO:150列出了hu9F5VLv8轻链可变区的变体(hu9F5VLv8_V3Q、L27cS、L37I、M51I、L54R、L92I,也称为hu9F5VLv8_DIM19)的氨基酸序列。
- [0331] SEQ ID NO:151列出了hu9F5VLv8轻链可变区的变体(hu9F5VLv8_V3Q、L27cS、L37Q、M51I、L54G、L92I,也称为hu9F5VLv8_DIM20)的氨基酸序列。
- [0332] SEQ ID NO:152列出了hu9F5VLv8轻链可变区的变体(hu9F5VLv8_V3Q、L27cS、L37Q、M51I、L54G,也称为hu9F5VLv8_DIM21)的氨基酸序列。
- [0333] SEQ ID NO:153列出了hu9F5VLv8轻链可变区的变体(hu9F5VLv8_V3Q、L27cS、L37Q、M51E、L54R、L92I,也称为hu9F5VLv8_DIM22)的氨基酸序列。
- [0334] SEQ ID NO:154列出了hu9F5VLv8轻链可变区的变体(hu9F5VLv8_V3Q、L27cG、L37Q、M51E、L54G、L92I,也称为hu9F5VLv8_DIM23)。
- [0335] SEQ ID NO:155列出了hu9F5VLv8轻链可变区的变体(hu9F5VLv8_V3Q、L27cG、L37I、M51E、L54R、L92I,也称为hu9F5VLv8_DIM24)的氨基酸序列。
- [0336] SEQ ID NO:156列出了hu9F5VLv8轻链可变区的变体(hu9F5VLv8_V3Q、L27cG、L37I、M51E、L54R、L92G,也称为hu9F5VLv8_DIM25)的氨基酸序列。
- [0337] SEQ ID NO:157列出了hu9F5VLv8轻链可变区的变体(hu9F5VLv8_V3Q、L27cI、L37I、M51E、L54R,也称为hu9F5VLv8_DIM26)的氨基酸序列。
- [0338] SEQ ID NO:158列出了hu9F5VLv8轻链可变区的变体(hu9F5VLv8_V3Q、L37Q、M51G、L54R、L92I,也称为hu9F5VLv8_DIM27)的氨基酸序列。
- [0339] SEQ ID NO:159列出了hu9F5VLv8轻链可变区的变体(hu9F5VLv8_V3Q、L27cS、M51G、L54R、L92I,也称为hu9F5VLv8_DIM28)的氨基酸序列。
- [0340] SEQ ID NO:160列出了hu9F5VLv8轻链可变区的变体(hu9F5VLv8_V3Q、L27cS、L37Q、L54R、L92I,也称为hu9F5VLv8_DIM29)的氨基酸序列。
- [0341] SEQ ID NO:161列出了hu9F5VLv8轻链可变区的变体(hu9F5VLv8_V3Q、L27cS、L37Q、M51G、L92I,也称为hu9F5VLv8_DIM30)的氨基酸序列。
- [0342] SEQ ID NO:162列出了hu9F5VLv9轻链可变区的变体(hu9F5VLv9_V3Q、L27cS、L37Q、M51G、L54G、L92I,也称为hu9F5VLv9_DIM1)的氨基酸序列。
- [0343] SEQ ID NO:163列出了hu9F5VLv9轻链可变区的变体(hu9F5VLv9_V3Q、L27cS、L37Q、M51G、L54R、L92I,也称为hu9F5VLv9_DIM2)的氨基酸序列。
- [0344] SEQ ID NO:164列出了hu9F5VLv9轻链可变区的变体(hu9F5VLv9_V3Q、L27cS、

L37Q、M51G、L54R、L92G,也称为hu9F5VLv9_DIM4)的氨基酸序列。

[0345] SEQ ID NO:165列出了hu9F5VLv9轻链可变区的变体(hu9F5VLv9_V3Q、L27cG、L37Q、M51G、L54R、L92I,也称为hu9F5VLv9_DIM5)的氨基酸序列。

[0346] SEQ ID NO:166列出了hu9F5VLv9轻链可变区的变体(hu9F5VLv9_V3Q、L27cG、L37Q、M51K、L54R、L92I,也称为hu9F5VLv9_DIM8)的氨基酸序列。

[0347] SEQ ID NO:167列出了hu9F5VLv9轻链可变区的变体(hu9F5VLv9_V3Q、L27cS、L37Q、M51K、L54G、L92I,也称为hu9F5VLv9_DIM10)的氨基酸序列。

[0348] SEQ ID NO:168列出了hu9F5VLv9轻链可变区的变体(hu9F5VLv9_V3Q、L27cG、L37G、M51G、L54R、L92I,也称为hu9F5VLv9_DIM11)的氨基酸序列。

[0349] SEQ ID NO:169列出了hu9F5VLv9轻链可变区的变体(hu9F5VLv9_V3Q、L27cG、L37G、M51G、L54R,也称为hu9F5VLv9_DIM13)的氨基酸序列。

[0350] SEQ ID NO:170列出了hu9F5VLv9轻链可变区的变体(hu9F5VLv9_V3Q、L27cS、L37I、M51I、L54R、L92I,也称为hu9F5VLv9_DIM19)的氨基酸序列。

[0351] SEQ ID NO:171列出了hu9F5VLv9轻链可变区的变体(hu9F5VLv9_V3Q、L27cS、L37Q、M51I、L54G、L92I,也称为hu9F5VLv9_DIM20)的氨基酸序列。

[0352] SEQ ID NO:172列出了人源化9F5抗体的另选的Kabat CDR-L1(存在于hu9F5VLv2_L27bD中)的氨基酸序列。

[0353] SEQ ID NO:173列出了人源化9F5抗体的另选的Kabat CDR-L1(存在于hu9F5VLv2_L27bT中)的氨基酸序列。

[0354] SEQ ID NO:174列出了人源化9F5抗体的另选的Kabat CDR-L1(存在于hu9F5VLv2_L27bQ中)的氨基酸序列。

[0355] SEQ ID NO:175列出了人源化9F5抗体的另选的Kabat CDR-L1(存在于hu9F5VLv2_L27cD、hu9F5VLv8_DIM6、hu9F5VLv8_DIM7和hu9F5VLv8_DIM18中)的氨基酸序列。

[0356] SEQ ID NO:176列出了人源化9F5抗体的另选的Kabat CDR-L1(存在于hu9F5VLv2_L27cG、hu9F5VLv8_DIM5、hu9F5VLv8_DIM8、hu9F5VLv8_DIM9、hu9F5VLv8_DIM11、hu9F5VLv8_DIM12、hu9F5VLv8_DIM13、hu9F5VLv8_DIM14、hu9F5VLv8_DIM15、hu9F5VLv8_DIM16、hu9F5VLv8_DIM23、hu9F5VLv8_DIM24、hu9F5VLv8_DIM25、hu9F5VLv9_DIM5、hu9F5VLv9_DIM8、hu9F5VLv9_DIM11和hu9F5VLv9_DIM13中)的氨基酸序列。

[0357] SEQ ID NO:177列出了人源化9F5抗体的另选的Kabat CDR-L1(存在于hu9F5VLv2_L27cS、hu9F5VLv8_DIM1、hu9F5VLv8_DIM2、hu9F5VLv8_DIM19、hu9F5VLv8_DIM20、hu9F5VLv8_DIM21、hu9F5VLv8_DIM22、hu9F5VLv8_DIM28、hu9F5VLv8_DIM29、hu9F5VLv8_DIM30、hu9F5VLv9_DIM1、hu9F5VLv9_DIM2、hu9F5VLv9_DIM4、hu9F5VLv9_DIM10、hu9F5VLv9_DIM19和hu9F5VLv9_DIM20中)的氨基酸序列。

[0358] SEQ ID NO:178列出了人源化9F5抗体的另选的Kabat CDR-L1(存在于hu9F5VLv2_L27cE中)的氨基酸序列。

[0359] SEQ ID NO:179列出了人源化9F5抗体的另选的Kabat CDR-L1(存在于hu9F5VLv2_L27cT中)的氨基酸序列。

[0360] SEQ ID NO:180列出了人源化9F5抗体的另选的Kabat CDR-L1(存在于hu9F5VLv2_L27cN中)的氨基酸序列。

- [0361] SEQ ID NO:181列出了人源化9F5抗体的另选的Kabat CDR-L1 (存在于hu9F5VLv2_L27cA中)的氨基酸序列。
- [0362] SEQ ID NO:182列出了人源化9F5抗体的另选的Kabat CDR-L1 (存在于hu9F5VLv2_L27cP中)的氨基酸序列。
- [0363] SEQ ID NO:183列出了人源化9F5抗体的另选的Kabat CDR-L1 (存在于hu9F5VLv8_DIM26中)的氨基酸序列。
- [0364] SEQ ID NO:184列出了人源化9F5抗体的另选的Kabat CDR-L1 (存在于hu9F5VLv2_I30E中)的氨基酸序列。
- [0365] SEQ ID NO:185列出了人源化9F5抗体的另选的Kabat CDR-L1 (存在于hu9F5VLv2_I30K中)的氨基酸序列。
- [0366] SEQ ID NO:186列出了人源化9F5抗体的另选的Kabat CDR-L1 (存在于hu9F5VLv2_I30G中)的氨基酸序列。
- [0367] SEQ ID NO:187列出了人源化9F5抗体的另选的Kabat CDR-L1 (存在于hu9F5VLv2_I30Q中)的氨基酸序列。
- [0368] SEQ ID NO:188列出了人源化9F5抗体的另选的Kabat CDR-L1 (存在于hu9F5VLv2_T31G中)的氨基酸序列。
- [0369] SEQ ID NO:189列出了人源化9F5抗体的另选的Kabat CDR-L1 (存在于hu9F5VLv2_L33N中)的氨基酸序列。
- [0370] SEQ ID NO:190列出了人源化9F5抗体的另选的Kabat CDR-L1 (存在于hu9F5VLv2_L33T中)的氨基酸序列。
- [0371] SEQ ID NO:191列出了人源化9F5抗体的另选的Kabat CDR-L1 (存在于hu9F5VLv2_L33S中)的氨基酸序列。
- [0372] SEQ ID NO:192列出了人源化9F5抗体的另选的Kabat CDR-L1 (存在于hu9F5VLv2_L33R中)的氨基酸序列。
- [0373] SEQ ID NO:193列出了人源化9F5抗体的另选的Kabat CDR-L1 (存在于hu9F5VLv2_L33G中)的氨基酸序列。
- [0374] SEQ ID NO:194列出了人源化9F5抗体的另选的Kabat CDR-L2 (存在于hu9F5VLv2_M51E中)的氨基酸序列。
- [0375] SEQ ID NO:195列出了人源化9F5抗体的另选的Kabat CDR-L2 (存在于hu9F5VLv2_M51D中)的氨基酸序列。
- [0376] SEQ ID NO:196列出了人源化9F5抗体的另选的Kabat CDR-L2 (存在于hu9F5VLv8_DIM30中)的氨基酸序列。
- [0377] SEQ ID NO:197列出了人源化9F5抗体的另选的Kabat CDR-L2 (存在于hu9F5VLv8_DIM29中)的氨基酸序列。
- [0378] SEQ ID NO:198列出了人源化9F5抗体的另选的Kabat CDR-L2 (存在于hu9F5VLv8_DIM1和hu9F5VLv9_DIM1中)的氨基酸序列。
- [0379] SEQ ID NO:199列出了人源化9F5抗体的另选的Kabat CDR-L2 (存在于hu9F5VLv8_DIM3、hu9F5VLv8_DIM14、hu9F5VLv8_DIM15、hu9F5VLv8_DIM16和hu9F5VLv8_DIM17中)的氨基酸序列。

[0380] SEQ ID NO:200列出了人源化9F5抗体的另选的Kabat CDR-L2 (存在于hu9F5VLv8_DIM7、hu9F5VLv8_DIM8和hu9F5VLv9_DIM8中)的氨基酸序列。

[0381] SEQ ID NO:201列出了人源化9F5抗体的另选的Kabat CDR-L2 (存在于hu9F5VLv8_DIM9、hu9F5VLv8_DIM10和hu9F5VLv9_DIM10中)的氨基酸序列。

[0382] SEQ ID NO:202列出了人源化9F5抗体的另选的Kabat CDR-L2 (存在于hu9F5VLv8_DIM19和hu9F5VLv9_DIM19中)的氨基酸序列。

[0383] SEQ ID NO:203列出了人源化9F5抗体的另选的Kabat CDR-L2 (存在于hu9F5VLv8_DIM20、hu9F5VLv8_DIM21和hu9F5VLv9_DIM20中)的氨基酸序列。

[0384] SEQ ID NO:204列出了人源化9F5抗体的另选的Kabat CDR-L2 (存在于hu9F5VLv8_DIM22、hu9F5VLv8_DIM24、hu9F5VLv8_DIM25和hu9F5VLv8_DIM26中)的氨基酸序列。

[0385] SEQ ID NO:205列出了人源化9F5抗体的另选的Kabat CDR-L2 (存在于hu9F5VLv8_DIM23中)的氨基酸序列。

[0386] SEQ ID NO:206列出了人源化9F5抗体的另选的Kabat CDR-L3 (存在于hu9F5VLv2_A89G中)的氨基酸序列。

[0387] SEQ ID NO:207列出了人源化9F5抗体的另选的Kabat CDR-L3 (存在于hu9F5VLv2_L92D中)的氨基酸序列。

[0388] SEQ ID NO:208列出了人源化9F5抗体的另选的Kabat CDR-L3 (存在于hu9F5VLv2_L92E中)的氨基酸序列。

[0389] SEQ ID NO:209列出了人源化9F5抗体的另选的Kabat CDR-L3 (存在于hu9F5VLv8_DIM4、hu9F5VLv8_DIM12、hu9F5VLv8_DIM15、hu9F5VLv8_DIM25和hu9F5VLv9_DIM4中)的氨基酸序列。

[0390] SEQ ID NO:210列出了人源化9F5抗体的另选的Kabat CDR-L3 (存在于hu9F5VLv2_L92Q中)的氨基酸序列。

[0391] SEQ ID NO:211列出了人源化9F5抗体的另选的Kabat CDR-L3 (存在于hu9F5VLv2_L92T中)的氨基酸序列。

[0392] SEQ ID NO:212列出了人源化9F5抗体的另选的Kabat CDR-L3 (存在于hu9F5VLv8_DIM1、hu9F5VLv8_DIM2、hu9F5VLv8_DIM3、hu9F5VLv8_DIM5、hu9F5VLv8_DIM6、hu9F5VLv8_DIM7、hu9F5VLv8_DIM8、hu9F5VLv8_DIM9、hu9F5VLv8_DIM10、hu9F5VLv8_DIM11、hu9F5VLv8_DIM14、hu9F5VLv8_DIM17、hu9F5VLv8_DIM18、hu9F5VLv8_DIM19、hu9F5VLv8_DIM20、hu9F5VLv8_DIM22、hu9F5VLv8_DIM23、hu9F5VLv8_DIM24、hu9F5VLv8_DIM27、hu9F5VLv8_DIM28、hu9F5VLv8_DIM29、hu9F5VLv8_DIM30、hu9F5VLv9_DIM1、hu9F5VLv9_DIM2、hu9F5VLv9_DIM5、hu9F5VLv9_DIM8、hu9F5VLv9_DIM10、hu9F5VLv9_DIM11、hu9F5VLv9_DIM19和hu9F5VLv9_DIM20中)的氨基酸序列。

[0393] SEQ ID NO:213列出了人源化9F5抗体的另选的Kabat CDR-L3 (存在于hu9F5VLv2_L93G中)的氨基酸序列。

[0394] SEQ ID NO:214列出了人源化重链可变区hu10C12VHv1的氨基酸序列。

[0395] SEQ ID NO:215列出了人源化重链可变区hu10C12VHv2的氨基酸序列。

[0396] SEQ ID NO:216列出了人源化轻链可变区hu10C12VLv1的氨基酸序列。

[0397] SEQ ID NO:217列出了人源化轻链可变区hu10C12VLv2的氨基酸序列。

- [0398] SEQ ID NO:218列出了重链可变区受体CAC20421-VH_huFrwk的氨基酸序列。
- [0399] SEQ ID NO:219列出了小鼠12C4抗体的重链可变区的氨基酸序列。
- [0400] SEQ ID NO:220列出了小鼠12C4抗体的Kabat CDR-H2的氨基酸序列。
- [0401] SEQ ID NO:221列出了人源化重链可变区hu12C4VHv1的氨基酸序列。
- [0402] SEQ ID NO:222列出了人源化重链可变区hu12C4VHv2的氨基酸序列。
- [0403] SEQ ID NO:223列出了人源化轻链可变区hu12C4VLv1的氨基酸序列。
- [0404] SEQ ID NO:224列出了人源化轻链可变区hu12C4VLv2的氨基酸序列。
- [0405] SEQ ID NO:225列出了小鼠17C12抗体的重链可变区的氨基酸序列。
- [0406] SEQ ID NO:226列出了小鼠17C12抗体的Kabat-Chothia复合物CDR H1的氨基酸序列。
- [0407] SEQ ID NO:227列出了小鼠17C12抗体的Kabat CDR H2的氨基酸序列。
- [0408] SEQ ID NO:228列出了小鼠17C12抗体的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0409] SEQ ID NO:229列出了小鼠17C12抗体的Kabat CDR-L1的氨基酸序列。
- [0410] SEQ ID NO:230列出了小鼠17C12抗体的Kabat CDR-L2的氨基酸序列。
- [0411] SEQ ID NO:231列出了小鼠17C12抗体的Kabat CDR-L3的氨基酸序列。
- [0412] SEQ ID NO:232列出了人源化重链可变区hu17C12VHv1的氨基酸序列。
- [0413] SEQ ID NO:233列出了人源化重链可变区hu17C12VHv2的氨基酸序列。
- [0414] SEQ ID NO:234列出了人源化轻链可变区hu17C12VLv1的氨基酸序列。
- [0415] SEQ ID NO:235列出了人源化轻链可变区hu17C12VLv2的氨基酸序列。
- [0416] SEQ ID NO:236列出了重链可变区结构模型3PP3-VH_mSt的氨基酸序列。
- [0417] SEQ ID NO:237列出了轻链可变区结构模型3PP3-VL_mSt的氨基酸序列。
- [0418] SEQ ID NO:238列出了轻链可变区受体QD016713-VL_huFrwk的氨基酸序列。
- [0419] SEQ ID NO:239列出了轻链可变区种系序列IGKV2-29*02&IGKJ4*01的氨基酸序列。
- [0420] SEQ ID NO:240列出了小鼠14H3抗体的重链可变区的氨基酸序列。
- [0421] SEQ ID NO:241列出了小鼠14H3抗体的Kabat-Chothia复合物CDR H1的氨基酸序列。
- [0422] SEQ ID NO:242列出了小鼠14H3抗体的Kabat CDR H2的氨基酸序列。
- [0423] SEQ ID NO:243列出了小鼠14H3抗体的Kabat CDR H3的氨基酸序列。
- [0424] SEQ ID NO:244列出了小鼠14H3抗体的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0425] SEQ ID NO:245列出了小鼠14H3抗体的Kabat CDR L1的氨基酸序列。
- [0426] SEQ ID NO:246列出了小鼠14H3抗体的Kabat CDR L2的氨基酸序列。
- [0427] SEQ ID NO:247列出了小鼠14H3抗体的Kabat CDR L3的氨基酸序列。
- [0428] SEQ ID NO:248列出了人源化重链可变区hu14H3VHv1的氨基酸序列。
- [0429] SEQ ID NO:249列出了人源化重链可变区hu14H3VHv2的氨基酸序列。
- [0430] SEQ ID NO:250列出了人源化轻链可变区hu14H3VLv1的氨基酸序列。
- [0431] SEQ ID NO:251列出了人源化轻链可变区hu14H3VLv2的氨基酸序列。
- [0432] SEQ ID NO:252列出了重链可变区结构模型2VQ1-VH_mSt的氨基酸序列。
- [0433] SEQ ID NO:253列出了重链可变区受体QDJ57937-VH_huFrwk的氨基酸序列。

- [0434] SEQ ID NO:254列出了重链可变区种系序列IGHV1-70*04&IGHJ4*01的氨基酸序列。
- [0435] SEQ ID NO:255列出了轻链可变区结构模型2VQ1-VL_mSt的氨基酸序列。
- [0436] SEQ ID NO:256列出了轻链可变区受体ABC66914-VL_huFrwk的氨基酸序列。
- [0437] SEQ ID NO:257列出了小鼠12C4抗体的AbM CDR-H2的氨基酸序列。
- [0438] SEQ ID NO:258列出了小鼠12C4抗体的Contact CDR-H2的氨基酸序列。
- [0439] SEQ ID NO:259列出了小鼠17C12抗体的Chothia CDR-H1的氨基酸序列。
- [0440] SEQ ID NO:260列出了小鼠17C12抗体的AbM CDR-H2的氨基酸序列。
- [0441] SEQ ID NO:261列出了小鼠17C12抗体的Contact CDR-H2的氨基酸序列。
- [0442] SEQ ID NO:262列出了小鼠17C12抗体的Contact CDR-L1的氨基酸序列。
- [0443] SEQ ID NO:263列出了小鼠17C12抗体的Contact CDR-L2的氨基酸序列。
- [0444] SEQ ID NO:264列出了小鼠17C12抗体的Contact CDR-L3的氨基酸序列。
- [0445] SEQ ID NO:265列出了小鼠14H3抗体的Kabat CDR-H1的氨基酸序列。
- [0446] SEQ ID NO:266列出了小鼠14H3抗体的Chothia CDR-H1的氨基酸序列。
- [0447] SEQ ID NO:267列出了小鼠14H3抗体的Chothia CDR-H2的氨基酸序列。
- [0448] SEQ ID NO:268列出了小鼠14H3抗体的AbM CDR-H2的氨基酸序列。
- [0449] SEQ ID NO:269列出了小鼠14H3抗体的Contact CDR-H1的氨基酸序列。
- [0450] SEQ ID NO:270列出了小鼠14H3抗体的Contact CDR-H2的氨基酸序列。
- [0451] SEQ ID NO:271列出了小鼠14H3抗体的Contact CDR-H3的氨基酸序列。
- [0452] SEQ ID NO:272列出了小鼠14H3抗体的Contact CDR-L1的氨基酸序列。
- [0453] SEQ ID NO:273列出了小鼠14H3抗体的Contact CDR-L2的氨基酸序列。
- [0454] SEQ ID NO:274列出了小鼠14H3抗体的Contact CDR-L3的氨基酸序列。
- [0455] SEQ ID NO:275列出了人源化14H3抗体的另选的Kabat-Chothia复合物CDR H1 (存在于hu14H3VHv1和hu14H3VHv2中)的氨基酸序列。
- [0456] SEQ ID NO:276列出了由抗体9F5、10C12、2D11、12C4、17C12和14H3结合的肽的共有基序的氨基酸序列。
- [0457] SEQ ID NO:277列出了由抗体2D11结合的肽的共有基序的氨基酸序列。
- [0458] 定义
- [0459] 单克隆抗体或其他生物学实体通常以分离形式提供。这意味着抗体或其他生物学实体通常至少50%w/w不含由其生产或纯化产生的干扰性蛋白质和其他污染物,但不排除单克隆抗体与过量的一种或多种药学上可接受的载体或旨在便于其使用的其他媒介物组合的可能性。有时单克隆抗体至少60%、70%、80%、90%、95%或99%w/w不含由其生产或纯化产生的干扰性蛋白质和污染物。通常,分离的单克隆抗体或其他生物学实体是其纯化后剩余的主要大分子物质。
- [0460] 抗体与其靶抗原的特异性结合意指至少 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 或 $10^{12}M^{-1}$ 的亲力和/或亲合力。特异性结合的量级可检测地更高,并且可区别于对至少一种不相关的靶标发生的非特异性结合。特异性结合可以是特定官能团之间形成键或特定空间配合(例如,锁钥型)的结果,而非特异性结合通常是范德华力的结果。然而,特异性结合不一定意味着抗体仅仅结合一个靶标。

[0461] 基本抗体结构单元是亚基的四聚体。每个四聚体包括两对同一的多肽链,每对具有一条“轻”链(约25kDa)和一条“重”链(约50-70kDa)。每条链的氨基末端部分包括主要负责抗原识别的约100至110或更多个氨基酸的可变区。此可变区最初被表达为与可切割的信号肽连接。没有信号肽的可变区有时被称为成熟可变区。因此,例如,轻链成熟可变区意指没有轻链信号肽的轻链可变区。每条链的羧基末端部分限定主要负责效应子功能的恒定区。

[0462] 轻链分为 κ 或 λ 。重链分为 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ ,并将抗体的同种型分别定义为IgG、IgM、IgA、IgD和IgE。在轻链和重链内,可变区和恒定区通过约12或更多个氨基酸的“J”区连接,其中重链还包括约10或更多个氨基酸的“D”区。大致参见Fundamental Immunology, Paul, W. 编辑,第2版Raven Press, N.Y., 1989,第7章(出于所有目的以引用方式整体并入)。

[0463] 免疫球蛋白轻链或重链可变区(在本文中也分别称为“轻链可变结构域”(“VL结构域”)或“重链可变结构域”(“VH结构域”))由被三个“互补决定区”或“CDR”间隔开的“框架”区组成。框架区用于对齐CDR,以用于与抗原的表位特异性结合。CDR包括主要负责抗原结合的抗体的氨基酸残基。从氨基末端到羧基末端,VL和VH结构域均包含以下框架(FR)和CDR区:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。VL结构域的CDR 1、2和3在本文中也分别称为CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3;VH结构域的CDR 1、2和3在本文中也分别称为CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3。当本申请公开了以R作为C末端残基的VL序列时,R也可被认为是轻链恒定区的N末端残基。因此,本申请也应当理解为公开了没有C末端R的VL序列。

[0464] 每个VL和VH结构域的氨基酸的分配与CDR的任何常规定义一致。常规定义包括Kabat定义(Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987和1991)、Chothia定义(Chothia&Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917, 1987; Chothia等人, Nature 342:878-883, 1989); Chothia Kabat CDR的复合物,其中CDR-H1是Chothia和Kabat CDR的复合物;Oxford Molecular的抗体建模软件使用的AbM定义;以及Martin等人的contact定义(bioinfo.org.uk/abs)(参见表1)。Kabat提供了广泛使用的编号惯例(Kabat编号),其中不同重链之间或不同轻链之间的对应残基被指定相同的编号。当通过CDR的某一定义(例如,Kabat)说抗体包含CDR时,该定义指明抗体中存在的CDR残基(即Kabat CDR)的最小数目。这不排除同时存在属于另一常规CDR定义但在指定定义之外的其他残基。举例来说,除其他可能性之外,包含由Kabat定义的CDR的抗体包括其中CDR含有Kabat CDR残基且不含有其他CDR残基的抗体,以及其中CDR H1是复合物Chothia-Kabat CDR H1并且其他CDR含有Kabat CDR残基且不含有基于其他定义的另外的CDR残基的抗体。

[0465] 表1使用Kabat编号的CDR的常规定义

环	Kabat	Chothia	Chothia&Kabat 的复合物	AbM	Contact
L1	L24--L34	L24--L34	L24--L34	L24--L34	L30--L36
L2	L50--L56	L50--L56	L50--L56	L50--L56	L46--L55
L3	L89--L97	L89--L97	L89--L97	L89--L97	L89--L96
H1	H31--H35B	H26--H32..H34*	H26--H35B*	H26--H35B	H30--H35B

[0467] 表1使用Kabat编号的CDR的常规定义

环	Kabat	Chothia	Chothia&Kabat 的复合物	AbM	Contact
H2	H50--H65	H52--H56	H50--H65	H50--H58	H47--H58
H3	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H93--H101

[0469] *根据Chothia的CDR-H1可以在H32、H33或H34处结束(取决于环的长度)。这是因为Kabat编号方案在35A和35B处布置额外残基的插入,而Chothia编号将它们布置在31A和31B处。如果既不存在H35A也不存在H35B(Kabat编号),那么Chothia CDR-H1环在H32处结束。如果仅存在H35A,那么它在H33处结束。如果H35A和H35B都存在,那么它在H34处结束。

[0470] 术语“抗体”包括完整抗体及其结合片段。通常,片段与衍生它们的完整抗体竞争与靶标的特异性结合,包括单独的重链、轻链Fab、Fab'、F(ab')₂、F(ab)c、Dab、纳米抗体和Fv。片段可以通过重组DNA技术产生,或通过完整免疫球蛋白的酶促或化学分离产生。术语“抗体”还包括双特异性抗体和/或人源化抗体。双特异性或双功能抗体是具有两个不同的重/轻链对和两个不同结合位点的人工杂交抗体(参见,例如,Songsivilai and Lachmann, Clin. Exp. Immunol., 79:315-321 (1990); Kostelny等人, J. Immunol., 148:1547-53 (1992))。在一些双特异性抗体中,两个不同的重链/轻链对包括人源化9F5、10C12、2D11、12C4、17C12或14H3重链/轻链对和对于tau上不同于9F5、10C12、2D11、12C4、17C12或14H3所结合的表位的表位具有特异性的重链/轻链对。

[0471] 在一些双特异性抗体中,一个重链/轻链对是如下文进一步公开的人源化9F5抗体、人源化10C12抗体、人源化2D11抗体、人源化12C4抗体、人源化17C12抗体或人源化14H3抗体,并且另一个重链/轻链对来自与在血脑屏障上表达的受体结合的抗体,所述受体诸如胰岛素受体、胰岛素样生长因子(IGF)受体、瘦素受体或脂蛋白受体或转铁蛋白受体(Friden等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4771-4775, 1991; Friden等人, Science 259:373-377, 1993)。这种双特异性抗体可以通过受体介导的胞转穿过血脑屏障转移。可通过工程化双特异性抗体以减小其与血脑屏障受体的亲和力来进一步增强双特异性抗体的脑部摄取。对受体的亲和力降低导致在脑部中更广泛的分布(参见,例如, Atwal等人,

Sci. Trans. Med. 3, 84ra43, 2011; Yu等人, Sci. Trans. Med. 3, 84ra44, 2011)。

[0472] 示例性双特异性抗体还可以是：(1) 双可变结构域抗体 (DVD-Ig)，其中每条轻链和重链含有两个通过短肽键串联的可变结构域 (Wu等人, Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-IgTM) Molecule, Antibody Engineering, Springer Berlin Heidelberg (2010))；(2) Tandab, 其为两个单链双抗体的融合体，从而得到四价双特异性抗体，其对于每种靶抗原具有两个结合位点；(3) 柔性体 (flexibody)，其为 scFv 与双抗体的组合，从而得到多价分子；(4) 所谓的“对接并锁定 (dock and lock)”分子，其基于蛋白激酶 A 中的“二聚化和对接结构域”，当应用于 Fab 时，可以得到由连接于不同的 Fab 片段的两个同一的 Fab 片段组成的三价双特异性结合蛋白；或 (5) 所谓的 Scorpion 分子，其包含例如融合至人 Fc 区的两个末端的两个 scFv。可用于制备双特异性抗体的平台的实例包括 BiTE (Micromet)、DART (MacroGenics)、Fcab and Mab2 (F-star)、Fc 工程化 IgG1 (Xencor) 或 DuoBody (基于 Fab 臂交换, Genmab)。

[0473] 术语“表位”是指抗原上与抗体结合的位点。表位可由连续氨基酸或通过一个或多个蛋白质的三级折叠而并置的非连续氨基酸形成。由连续氨基酸形成的表位 (也称为线性表位) 通常在暴露于变性溶剂时保留，而通过三级折叠形成的表位 (也称为构象表位) 通常在用变性溶剂处理时丢失。表位通常包括处于独特空间构象的至少 3 个、且更通常至少 5 或 8-10 个氨基酸。确定表位的空间构象的方法包括，例如，x 射线晶体学和 2 维核磁共振。参见，例如，Epitope Mapping Protocols, 在 Methods in Molecular Biology 中，第 66 卷，Glenn E. Morris 编辑 (1996)。

[0474] 识别相同或重叠表位的抗体可以在显示出一种抗体与另一种抗体竞争结合靶抗原的能力的简单的免疫测定中鉴定。抗体的表位还可以通过与其抗原结合以鉴定接触残基的抗体的 X 射线晶体学来定义。或者，如果抗原中减少或消除一种抗体的结合的所有氨基酸突变减少或消除另一种抗体的结合，那么两种抗体具有相同的表位。如果减少或消除一种抗体的结合的一些氨基酸突变减少或消除另一种抗体的结合，那么两种抗体具有重叠表位。

[0475] 抗体之间的竞争通过测定来确定，在所述测定中，待测抗体抑制参考抗体与共同抗原的特异性结合 (参见，例如，Junghans 等人, Cancer Res. 50:1495, 1990)。如果过量的测试抗体 (例如，至少 2x、5x、10x、20x 或 100x) 抑制至少 50% 的参考抗体的结合 (如在竞争性结合测定中所测量的)，那么测试抗体与参考抗体竞争。一些测试抗体抑制至少 75%、90% 或 99% 的参考抗体的结合。通过竞争测定鉴定的抗体 (竞争性抗体) 包括与参考抗体结合相同表位的抗体和结合至与参考抗体结合的表位充分接近以产生位阻的相邻表位的抗体。

[0476] 术语“药学上可接受的”是指载体、稀释剂、赋形剂或辅助剂与制剂的其他成分相容并且对其接受者基本上无害。

[0477] 术语“患者”包括接受预防性或治疗性治疗的人和其他哺乳动物受试者。

[0478] 如果受试者具有至少一个已知的风险因素 (例如，遗传、生化、家族史和情境暴露)，从而将具有所述风险因素的个体置于与没有该风险因素的个体相比在统计学上显著更大的发展该疾病的风险中，那么个体患病风险增加。

[0479] 术语“生物样品”是指生物来源 (例如人或哺乳动物受试者) 内或可从其获得的生物材料的样品。此类样品可以是器官、细胞器、组织、组织切片、体液、外周血、血浆、血清、细

胞、分子(诸如蛋白质和肽)以及由其衍生的任何部分或组合。术语生物样品还可包括通过处理样品衍生的任何材料。衍生材料可包括细胞或其后代。生物样品的处理可包括过滤、蒸馏、提取、浓缩、固定、干扰组分的失活等中的一者或多者。

[0480] 术语“对照样品”是指未被已知或怀疑包括tau相关疾病影响区域的生物样品,或至少未被已知或怀疑包括给定类型的患病区域的生物样品。对照样品可以从未患有tau相关疾病的个体获得。或者,对照样品可以从患有tau相关疾病的患者获得。此类样品可以与被认为包含tau相关疾病的生物样品同时获得或在不同场合获得。生物样品和对照样品都可以从相同的组织获得。优选地,对照样品基本上或完全由正常的健康区域组成,并且可用于与被认为包含tau相关疾病影响区域的生物样品的比较。优选地,对照样品中的组织与生物样品中的组织是相同类型。优选地,被认为在生物样品中的tau相关疾病影响细胞来自与对照样品中的细胞类型相同的细胞类型(例如,神经元或神经胶质)。

[0481] 术语“疾病”是指损害生理功能的任何异常疾患。该术语广泛用于涵盖生理功能受损的任何病症、病痛、异常、病理、不适、疾患或综合征,而不论病因的性质如何。

[0482] 术语“症状”是指受试者感知的疾病的主观证据,诸如步态改变。“体征”是指医生观察到的疾病的客观证据。

[0483] 术语“对治疗的阳性应答”是指相对于未接受治疗的对照群体中的平均应答,个体患者中更有利的应答或患者群体中的平均应答。

[0484] 为了将氨基酸取代分为保守或非保守取代,将氨基酸分组如下:第I组(疏水性侧链):met、ala、val、leu、ile;第II组(中性亲水性侧链):cys、ser、thr;第III组(酸性侧链):asp、glu;第IV组(碱性侧链):asn、gln、his、lys、arg;第V组(影响链取向的残基):gly、pro;以及第VI组(芳香族侧链):trp、tyr、phe。保守取代包括相同类别的氨基酸之间的取代。非保守取代包括将这些类别中的一个的成员交换为另一个类别的成员。

[0485] 用通过Kabat编号惯例最大限度地对齐的抗体序列确定序列同一性百分比。比对后,如果将受试者抗体区域(例如,重链或轻链的整个成熟可变区)与参考抗体的相同区域进行比较,受试者抗体区域与参考抗体区域之间的序列同一性百分比是在受试者抗体区域和参考抗体区域中相同氨基酸占据的位置的数目除以两个区域的对齐位置的总数,其中空位不计数,乘以100以转换为百分比。

[0486] “包含”或“包括”一种或多种所列举的元素的组合物或方法可包括未具体列举的其他元素。举例来说,“包含”或“包括”抗体的组合物可含有单独或与其他成分组合的抗体。

[0487] 值的范围的指定包括该范围内或限定该范围的所有整数,以及通过该范围内的整数限定的所有子范围。

[0488] 除非从上下文中另外显而易见,否则术语“约”涵盖非实质性变型,诸如在指定值的测量误差(例如,SEM)的标准容限之内的值。

[0489] 统计显著性意指 $p \leq 0.05$ 。

[0490] 除非上下文另外明确规定,否则冠词“一个”、“一种”和“该”的单数形式包括多个指代物。举例来说,术语“化合物”或“至少一种化合物”可包括多种化合物,包括其混合物。

具体实施方式

[0491] I. 总则

[0492] 本发明提供了与tau结合的抗体。一些抗体与(Q/E) IVYK(S/P) (SEQ ID NO:56) 内的表位特异性结合。一些抗体与包含氨基酸序列QIVYKP (SEQ ID NO:57, 对应于SEQ ID NO:1的tau同种型的残基307-312) 的肽特异性结合。一些抗体与包含氨基酸序列EIVYKSP (SEQ ID NO:58, 对应于SEQ ID NO:1的tau同种型的残基391-397) 的肽特异性结合。这些抗体与3D6和其他特征为与人tau的微管结合区(MTBR) 结合的抗体的不同之处在于在tau的C末端附近具有额外的表位。表位的额外C末端特异性为抗体结合增加数量的与病理相关联的tau的构象形式提供了基础。一些抗体与包含氨基酸序列EIVYKS (SEQ ID NO:277, 对应于SEQ ID NO:1的tau同种型的残基391-396) 的肽特异性结合。本发明的示例性抗体是9F5、10C12、2D11、12C4、17C12和14H3。本发明的一些抗体用于抑制或延迟与tau相关联的病理和相关联的症状恶化。尽管本发明的实践不要求理解机制, 但是由于抗体诱导tau的吞噬、抑制tau的分子间或分子内聚集或与其他分子的结合, 通过稳定非毒性构象、通过抑制致病性tau形式的细胞间或细胞内传播、通过阻断tau磷酸化、通过阻止tau与细胞结合或通过诱导tau的蛋白水解切割等机制可发生毒性的降低。本发明的一些抗体可用于增加tau的聚集, 通过增加某些聚集的tau物质的分子量来降低毒性/细胞摄取和/或增加清除。tau分子的大聚集体可减少被神经元细胞摄取。本发明的一些抗体, 通过与tau二价结合, 使分离的tau分子更接近, 促使聚集成大的tau聚集体而无法被神经元细胞摄取。此外, Fc介导的吞噬需要若干tau结合抗体非常接近。tau分子的大聚集体可能结合有许多抗tau抗体, 并提供巨噬细胞的Fc介导的吞噬所需的簇。本发明的抗体或诱导此类抗体的剂可用于治疗阿尔茨海默病和与tau相关联的其他疾病或实现所述疾病的预防的方法中。

[0493] II. 靶分子

[0494] 除非从上下文中另外显而易见, 否则对tau的提及意指tau的天然人形式, 包括所有同种型, 而不管是否存在翻译后修饰(例如, 磷酸化、糖化或乙酰化)。在人脑中存在六种主要的tau同种型(剪接变体)。这些变体中最长的具有441个氨基酸, 其中起始met残基被切割。根据441同种型对残基编号。因此, 例如, 对位置404处的磷酸化的提及意指441同种型的位置404, 或当与441同种型最大限度地对齐时任何其他同种型的对应位置。同种型的氨基酸序列和Swiss-Prot编号如下文所指示。

P10636-8 (SEQ ID NO:1)

```

      10      20      30      40      50      60
MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG
      70      80      90     100     110     120
SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHTIPEG TTAEAEAGIGD TPSLEDEAAG
     130     140     150     160     170     180
HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK IATPRGAAPP GQKGQANATR IPAKTPPAPK

```

```

     190     200     210     220     230     240
TPPSSGEPPK SGDRSGYSSP GSPGTPGSRP RTPSLPTPPT REPKKVAVVR TPPKSPSSAK
     250     260     270     280     290     300
SRLQTAPVPM PDLKNVSKSI GSTENLKHQP GGGKVQIINK KLDLSNVQSK CGSKDNIKHV
     310     320     330     340     350     360
PGGGSVQIVY KPVDSLKVTS KCGSLGNIHH KPGGGQVEVK SEKLDFKDRV QSKIGSLDNI
     370     380     390     400     410     420
THVPGGGNKK IETHKLTFRE NAKAKTDHGA EIVYKSPVVS GDTSPRHLSN VSSTGSIDMV
     430     440
DSPQLATLAD EVSASLAKQG L

```

[0495]

P10636-7 (SEQ ID NO:2)

```

      10      20      30      40      50      60
MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG
      70      80      90     100     110     120
SETSDAKSTP TAEAEAEAGIG DTPTSLEDEAA GHVTQARMVS KSKDGTGSDD KKAKGADGKT
     130     140     150     160     170     180
KIATPRGAAP PGQKGQANAT RIPAKTPPAP KTPPSSGEPP KSGDRSGYSS PGSPGTPGSR
     190     200     210     220     230     240
SRTPSLPTPP TREPKKVAVV RTPPKSPSSA KSRLQTAPVP MPDLKNVSK IGSTENLKHQ
     250     260     270     280     290     300
PGGGKVQIIN KKLDLSNVQS KCGSKDNIKH VPGGGSVQIV YKPVDSLKVT SKCGSLGNIH
     310     320     330     340     350     360
HKPGGGQVEV KSEKLDFKDR VQSKIGSLDN ITHVPGGGNK KIETHKLTFR ENAKAKTDHG
     370     380     390     400     410
AEIVYKSPVV SGDTSPRHLS NVSSTGSIDM VDSPQLATLA DEVSASLAKQ GL

```

[0496] P10636-6(4R0N人tau) (SEQ ID NO:3)

```

      10      20      30      40      50      60
MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKAE EAGI GDTPSLEDEA
      70      80      90      100     110     120
AGHVTQARMV SKSKDGTGSD DKKAKGADGK TKIATPRGAA PPGQKGQANA TRIPAKTPPA
      130     140     150     160     170     180
PKTPSSGEP PKSGDRSGYS SPGSPGTPGS RSRTPSLPTP PTREP KKVAV VRTPPKSPSS
      190     200     210     220     230     240
AKSRLQTAPV PMPDLKNVKS KIGSTENLKH QPGGGKVQII NKKLDLSNVQ SKCGSKDNIK
      250     260     270     280     290     300
HVPGGGVQI VYKPVDSLKV TSKCGSLGNI HHKPGGGQVE VKSEKLD FDK RVQSKIGSLD
      310     320     330     340     350     360
NITHVPGGGN KKIETHKLTF RENAKAKTDH GAEIVYKSPV VSGDTSRHL SNVSTGSID
      370     380
MVDSPQLATL ADEV SASLAK QGL

```

P10636-5 (SEQ ID NO:4)

```

      10      20      30      40      50      60
MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG
      70      80      90      100     110     120
SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGQAA AQPHTIPEG TTAEEAGIGD TPSLEDEAAG
      130     140     150     160     170     180
HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK IATPRGAAPP GQKGQANATR IPAKTPPAK
      190     200     210     220     230     240
TPPSSGEPK SGDRSGYSSP GSPGTPGSR RTPSLPTPEP REP KKVAVR TPPKSPSSAK
      250     260     270     280     290     300

```

```

SRLQTAPVPM PDLKNVSKSI GSTENLKHQP GGGKVQIVYK PVDLSKVTSK CGSLGNIHHK
      310     320     330     340     350     360
PGGGQVEVKS EKLD FDKRVQ SKIGSLDNIT HVPGGGNKKI ETHKLTFREN AKAKTDHGA E
      370     380     390     400     410
IVYKSPVSG DTSRHL SNV SSTGSIDMVD SPQLATLADE VSASLAKQGL

```

P10636-4 (SEQ ID NO:5)

```

      10      20      30      40      50      60
MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG
      70      80      90      100     110     120
SETSDAKSTP TAAEEAGIG DTPSLEDEAA GHVTQARMVS KSKDGTGSD DKKAKGADGKT
      130     140     150     160     170     180
KIATPRGAAP PGQKGQANAT RIPAKTPPAP KTPPSSGEP KSGDRSGYSS PGSPGTPGSR
      190     200     210     220     230     240
SRTPSLPTP TREPKKVVAV RTPPKSPSSA KSRLQTAPVP MPDLKNVSK IGSTENLKHQ
      250     260     270     280     290     300
PGGGKVQIVY KPVDSLKVTS KCGSLGNIH KPGGGQVEV SEKLD FDKRV QSKIGSLDNI
      310     320     330     340     350     360
THVPGGNKK IETHKLTFRE NAKAKTDHGA EIVYKSPVVS GDTSPRHL SNVSTGSIDMV
      370     380
DSPQLATLAD EVSASLAKQGL

```

P10636-2 (SEQ ID NO:6)

```

      10      20      30      40      50      60
MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKAE EAGI GDTPSLEDEA
      70      80      90      100     110     120
AGHVTQARMV SKSKDGTGSD DKKAKGADGK TKIATPRGAA PPGQKGQANA TRIPAKTPPA
      130     140     150     160     170     180
PKTPSSGEP PKSGDRSGYS SPGSPGTPGS RSRTPSLPTP PTREP KKVAV VRTPPKSPSS
      190     200     210     220     230     240
AKSRLQTAPV PMPDLKNVKS KIGSTENLKH QPGGGKVQIV YKPVDSLKV TSKCGSLGNIH
      250     260     270     280     290     300
HKPGGGQVEV KSEKLD FDKR VQSKIGSLDN ITHVPGGNK KIETHKLTFR ENAKAKTDHG
      310     320     330     340     350
AEIVYKSPVV SGDTSPRHL NVSSTGSIDM VDSPQLATLA DEVSASLAKQGL

```

[0497]

[0498] 对tau的提及包括已知的自然变型,其中约30种列于Swiss-Prot数据库及其排列中,以及与tau病理相关联的突变,所述病理诸如痴呆、皮克氏病、核上性麻痹等(参见,例

如,Swiss-Prot数据库和Poorkaj等人,Ann Neurol.43:815-825(1998))。通过441同种型编号的tau突变的一些实例为氨基酸残基257处的赖氨酸至苏氨酸突变(K257T);氨基酸位置260处的异亮氨酸至缬氨酸突变(I260V);氨基酸位置272处的甘氨酸至缬氨酸突变(G272V);氨基酸位置279处的天冬酰胺至赖氨酸突变(N279K);氨基酸位置296处的天冬酰胺至组氨酸突变(N296H);氨基酸位置301处的脯氨酸至丝氨酸突变(P301S);氨基酸301处的脯氨酸至亮氨酸突变(P301L);氨基酸位置303处的甘氨酸至缬氨酸突变(G303V);位置305处的丝氨酸至天冬酰胺突变(S305N);氨基酸位置335处的甘氨酸至丝氨酸突变(G335S);位置337处的缬氨酸至甲硫氨酸突变(V337M);位置342处的谷氨酸至缬氨酸突变(E342V);氨基酸位置369处的赖氨酸至异亮氨酸突变(K369I);氨基酸位置389处的甘氨酸至精氨酸突变(G389R);以及氨基酸位置406处的精氨酸至色氨酸突变(R406W)。

[0499] Tau可以在一个或多个氨基酸残基处被磷酸化,所述氨基酸残基包括氨基酸位置18、29、97、310和394处的酪氨酸;氨基酸位置184、185、198、199、202、208、214、235、237、238、262、293、324、356、396、400、404、409、412、413和422处的丝氨酸;以及氨基酸位置175、181、205、212、217、231和403处的苏氨酸。

[0500] 除非从上下文另外显而易见,否则对tau或其片段的提及包括天然人氨基酸序列,包括其同种型、突变体和等位基因变体。

[0501] III. 抗体

[0502] A. 结合特异性和功能特性

[0503] 本发明提供了与tau特异性结合的抗体。一些抗体在由来自tau的具有IVYK(SEQ ID NO:276)共同核心基序的两个区域中的一个或两个区域的氨基酸形成的表位处与tau特异性结合。这些区域分别由SEQ ID NO:1的残基307-312和391-397或391-396限定。因此,具有一个tau结合位点的抗体诸如scFv可在由这些区域中的任一个区域内的氨基酸单独形成的表位处与tau特异性结合或与由来自这两个区域的氨基酸形成的杂合表位结合。具有两个tau结合位点的抗体也可从其两个结合位点同时结合307-312和391-397内或391-396内的表位。表位可位于相同或不同的tau分子上。本发明的一些抗体与由tau的残基307-312,即残基QIVYKP(SEQ ID NO:57)组成的肽特异性结合。本发明的一些抗体与由tau的残基391-397,即EIVYKSP(SEQ ID NO:58)组成的肽特异性结合。本发明的一些抗体与由tau的残基391-396,即EIVYKS(SEQ ID NO:277)组成的肽特异性结合。本发明的一些抗体与由共有基序(Q/E)IVYK(S/P)(SEQ ID NO:56)组成的肽特异性结合。这些抗体可通过用从天然来源纯化或重组表达的tau多肽免疫来获得。可以筛选结合处于非磷酸化形式以及其中易于磷酸化的一个或多个残基被磷酸化的形式的tau的抗体。本发明还提供了与任何前述抗体结合相同表位,例如9F5、10C12、2D11、12C4、17C12或14H3的表位的抗体。还包括与任何前述抗体竞争结合tau的抗体,例如与9F5、10C12、2D11、12C4、17C12或14H3竞争。在一个实施方案中,与参考抗体(例如9F5)结合相同表位或与参考抗体竞争的抗体共享其一个或多个功能特性,诸如抑制tau内化进入神经元细胞的能力。任选地,这种特性在实验误差内具有相同程度,或大于参考抗体的特性。

[0504] 本发明提供了一种与9F5竞争结合tau并降低tau诱导的神经元毒性的抗体。本发明提供了一种与9F5竞争结合tau并具有增强的搅动应力抗性的抗体。与9F5竞争结合tau并具有增强的搅动应力抗性的示例性9F5人源化抗体是L27cS/L37Q/M51G/L54R(DIM2)(也称

为hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM2SEQ ID NO:127/SEQ ID NO:133)、L27cG/L37G/M51G/L54T (DIM14) (也称为hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM14SEQ ID NO:127/SEQ ID NO:145)和L27cG/L37G/M51G/L54R (DIM13) (也称为hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM13SEQ ID NO:127/SEQ ID NO:144)。本发明提供了一种与9F5竞争结合tau并具有增强的低pH应力抗性的抗体。与9F5竞争结合tau并具有增强的低pH应力抗性的示例性9F5人源化抗体是L27cS/L37Q/M51G/L54R (DIM2) (也称为hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM2SEQ ID NO:127/SEQ ID NO:133)、L27cD/L37Q/M51G/L54R (DIM6) (也称为hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM6,SEQ ID NO:127/SEQ ID NO:137)和L27cG/L37G/M51G/L54R (DIM13) (也称为hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM13SEQ ID NO:127/SEQ ID NO:144)。与9F5竞争结合tau并具有增强的搅动应激抗性且具有增强的低pH应激抗性的示例性9F5人源化抗体是DIM 2[hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM2SEQ ID NO:127/SEQ ID NO:133]、DIM6[hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM6SEQ ID NO:127/SEQ ID NO:137]、DIM7[hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM7SEQ ID NO:127/SEQ ID NO:138]、DIM8[hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM8SEQ ID NO:127/SEQ ID NO:139]、DIM13[hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM13SEQ ID NO:127/SEQ ID NO:144]、DIM18[hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM18SEQ ID NO:127/SEQ ID NO:149]、DIM28[hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM28SEQ ID NO:127/SEQ ID NO:159]和DIM30[hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM30SEQ ID NO:127/SEQ ID NO:161]。

[0505] 本发明提供了一种与9F5竞争结合tau并在高浓度条件下具有降低的聚集倾向的抗体。与9F5竞争结合tau并在高浓度条件下具有降低的聚集倾向的示例性抗体是L37Q/M51G/L54R与位置L27c处的原始亮氨酸的组合 (DIM27),也称为hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM27SEQ ID NO:127/SEQ ID NO:158。

[0506] 上述抗体可通过用包含氨基酸序列QIVYKP (SEQ ID NO:57) 或由其组成,包含氨基酸序列EIVYKSP (SEQ ID NO:58),包含氨基酸序列EIVYKS (SEQ ID NO:277) 或包含氨基酸序列(Q/E) IVYK (S/P) (SEQ ID NO:56) 或由其组成的tau多肽进行免疫或通过用全长tau多肽或其包含此类残基的片段进行免疫,并针对与包括此类残基的肽的特异性结合进行筛选来重新生成。此类tau肽优选附接于有助于引发对肽的抗体应答的异源缀合物分子。附接可以是直接的或通过间隔肽或氨基酸进行。使用半胱氨酸作为间隔氨基酸,因为其游离SH基团有利于载体分子的附接。还可使用在甘氨酸与肽之间具有或不具有半胱氨酸残基的聚甘氨酸接头(例如,2-6个甘氨酸)。载体分子用于提供T细胞表位,其有助于引发针对肽的抗体应答。通常使用几种载体,具体为匙孔虫血蓝蛋白(KLH)、卵清蛋白和牛血清白蛋白(BSA)。肽间隔物可以作为固相肽合成的一部分添加到肽免疫原中。载体通常通过化学交联添加。可使用的化学交联剂的一些实例包括交联-N-马来酰亚胺基-6-氨基己酰基酯或间马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯(MBS)(参见例如,Harlow,E.等人,Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor, N.Y.1988;Sinigaglia等人,Nature,336:778-780(1988);Chicz等人,J.Exp.Med.,178:27-47(1993);Hammer等人,Cell 74:197-203(1993);Falk K.等人,Immunogenetics,39:230-242(1994);WO 98/23635;以及Southwood等人J.Immunology,160:3363-3373(1998))。如果存在,载体和间隔物可附接于免疫原的任一端。

[0507] 具有任选间隔物和载体的肽可用于对实验室动物或B细胞进行免疫,如下文更详细描述。可测试杂交瘤上清液结合以下项的能力:包含氨基酸序列QIVYKP (SEQ ID NO:

57) 或由其组成的tau肽, 包含氨基酸序列EIVYKSP (SEQ ID NO:58) 或由其组成的肽, 包含氨基酸序列EIVYKS (SEQ ID NO:277) 或由其组成的肽, 或包含氨基酸序列 (Q/E) IVYK (S/P) (SEQ ID NO:56) 或由其组成的肽和/或tau的磷酸化和非磷酸化形式, 例如具有处于磷酸化形式的位置404的tau的全长同种型。可将肽附接于载体或其他标签以有利于筛选测定。在这种情况下, 载体或标签优先不同于用于免疫的间隔物和载体分子的组合, 以消除对间隔物或载体而不是tau肽具有特异性的抗体。可使用任何tau同种型。

[0508] 被命名为9F5的抗体是与tau特异性结合的示例性抗体。除非从上下文中另外显而易见, 否则对9F5的提及应理解为是指该抗体的小鼠、嵌合、饰面和人源化形式中的任一者。抗体已经以[保藏号]被保藏。该抗体特异性结合包含氨基酸序列QIVYKP (SEQ ID NO:57) 或由其组成的肽, 包含氨基酸序列EIVYKSP (SEQ ID NO:58) 或由其组成的肽, 或包含氨基酸序列 (Q/E) IVYK (S/P) (SEQ ID NO:56) 或由其组成的肽。9F5的重链的Kabat/Chothia复合物CDR分别被命名为SEQ IDNO:8、9和10, 并且9F5的轻链的Kabat CDR分别被命名为SEQ IDNO:12、13和14。

[0509] 与9F5竞争结合tau和/或与9F5结合相同或重叠的表位的其他抗体已被分离, 命名为10C12、2D11、12C4、17C12和14H3, 并由相同名称的杂交瘤产生。10C12具有成熟的可变重区和轻区(在信号肽切割后), 其特征分别为SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:11。除非从上下文中另外显而易见, 否则对10C12的提及应理解为是指该抗体的小鼠、嵌合、饰面和人源化形式中的任一者。10C12已经以[保藏号]被保藏。10C12的特征进一步在于其结合tau的非病理和病理形式和构象以及tau的错误折叠/聚集形式的的能力。10C12结合结构特征, 诸如阿尔茨海默病组织中的tau缠结和营养不良性神经突, 并从阿尔茨海默病提取物中沉淀单体和聚集的tau。

[0510] 2D11具有成熟的可变重区和轻区(在信号肽切割后), 其特征分别为SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:11。除非从上下文中另外显而易见, 否则对2D11的提及应理解为是指该抗体的小鼠、嵌合、饰面和人源化形式中的任一者。2D11已经以[保藏号]被保藏。2D11的特征进一步在于其结合tau的非病理和病理形式和构象以及tau的错误折叠/聚集形式的的能力。2D11结合结构特征, 诸如阿尔茨海默病组织中的tau缠结和营养不良性神经突, 并从阿尔茨海默病提取物中沉淀单体和聚集的tau。

[0511] 12C4具有成熟的可变重区和轻区(在信号肽切割后), 其特征分别为SEQ ID NO:219和SEQ ID NO:11。除非从上下文中另外显而易见, 否则对12C4的提及应理解为是指该抗体的小鼠、嵌合、饰面和人源化形式中的任一者。12C4已经以[保藏号]被保藏。12C4的特征进一步在于其结合tau的非病理和病理形式和构象以及tau的错误折叠/聚集形式的的能力。12C4结合结构特征, 诸如阿尔茨海默病组织中的tau缠结和营养不良性神经突, 并从阿尔茨海默病提取物中沉淀单体和聚集的tau。

[0512] 17C12具有成熟的可变重区和轻区(在信号肽切割后), 其特征分别为SEQ ID NO:225和SEQ ID NO:228。除非从上下文中另外显而易见, 否则对17C12的提及应理解为是指该抗体的小鼠、嵌合、饰面和人源化形式中的任一者。17C12已经以[保藏号]被保藏。17C12的特征进一步在于其结合tau的非病理和病理形式和构象以及tau的错误折叠/聚集形式的的能力。

[0513] 14H3具有成熟的可变重区和轻区(在信号肽切割后), 其特征分别为SEQ ID NO:

240和SEQ ID NO:244。除非从上下文中另外显而易见,否则对14H3的提及应理解为是指该抗体的小鼠、嵌合、饰面和人源化形式中的任一者。14H3已经以[保藏号]被保藏。14H3的特征进一步在于其结合tau的非病理和病理形式和构象以及tau的错误折叠/聚集形式的的能力。14H3结合结构特征,诸如阿尔茨海默病组织中的tau缠结和营养不良性神经突。

[0514] 小鼠9F5、10C12、2D11、12C4、14H3和17C12抗体的成熟重链可变区的比对描绘于图24中,并且小鼠9F5、10C12、2D11、12C4、14H3和17C12抗体的成熟轻链可变区的比对描绘于图25中。小鼠10C12抗体的成熟重链可变区的氨基酸序列与小鼠9F5抗体的成熟重链可变区的氨基酸序列具有100%的序列同一性,小鼠10C12抗体的成熟轻链可变区与小鼠9F5抗体的成熟轻链可变区具有100%的序列同一性。小鼠2D11抗体的成熟重链可变区的氨基酸序列与小鼠9F5抗体的成熟重链可变区的氨基酸序列具有100%的序列同一性,小鼠2D11抗体的成熟轻链可变区与小鼠9F5抗体的成熟轻链可变区具有100%的序列同一性。小鼠12C4抗体的成熟重链可变区的氨基酸序列与小鼠9F5抗体的成熟重链可变区的氨基酸序列具有96.6%的序列同一性,小鼠12C4抗体的成熟轻链可变区与小鼠9F5抗体的成熟轻链可变区具有100%的序列同一性。小鼠17C12抗体的成熟重链可变区的氨基酸序列与小鼠9F5抗体的成熟重链可变区的氨基酸序列具有95.9%的序列同一性,小鼠17C12抗体的成熟轻链可变区与小鼠9F5抗体的成熟轻链可变区具有70.5%的序列同一性。小鼠14H3抗体的成熟重链可变区的氨基酸序列与小鼠9F5抗体的成熟重链可变区的氨基酸序列具有35.0%的序列同一性,小鼠14H3抗体的成熟轻链可变区与小鼠9F5抗体的成熟轻链可变区具有73.2%的序列同一性。

[0515] 任选地,本发明的抗体不包括10C12抗体。任选地,本发明的抗体不包括2D11抗体。任选地,本发明的抗体不包括12C4抗体。任选地,本发明的抗体不包括17C12抗体。任选地,本发明的抗体不包括14H3抗体。

[0516] 本发明的一些抗体与被命名为9F5、10C12、2D11、12C4、17C12或14H3的抗体结合相同或重叠的表位。该9F5的重链和轻链成熟可变区的序列分别被命名为SEQ ID NO:7和11。10C12的重链和轻链成熟可变区的序列分别被命名为SEQ ID NO:7和11。2D11的重链和轻链成熟可变区的序列分别被命名为SEQ ID NO:7和11。12C4的重链和轻链成熟可变区的序列分别被命名为SEQ ID NO:219和11。17C12的重链和轻链成熟可变区的序列分别被命名为SEQ ID NO:225和228。14H3的重链和轻链成熟可变区的序列分别被命名为SEQ ID NO:240和244。具有这种结合特异性的其他抗体可通过以下方式产生:用tau或其包括所需表位的部分(例如包含氨基酸序列QIVYKP (SEQ ID NO:57) 或由其组成的tau肽,包含氨基酸序列EIVYKSP (SEQ ID NO:58) 或由其组成的tau肽,包含氨基酸序列EIVYKS (SEQ ID NO:277) 或由其组成的tau肽,或包含氨基酸序列(Q/E) IVYK (S/P) (SEQ ID NO:56) 或由其组成的tau肽) 对小鼠进行免疫并且针对任选地与具有小鼠9F5 (IgG1/ κ)、10C12 (IgG2a/ κ)、2D11 (IgG2a/ κ)、12C4 (IgG2a/ κ)、17C12 (IgG2a/ κ) 或14H3 (IgG2a/ κ) 的可变区的抗体竞争结合tau而对所得抗体进行筛选。包括所需表位的tau片段可以与有助于引发对片段的抗体应答的载体连接和/或与有助于引发这种应答的佐剂组合。与特定残基的突变体相比,可以针对与tau或其片段的差异结合对此类抗体进行筛选。针对此类突变体的筛选更精确地定义了结合特异性,以允许鉴定其结合受到特定残基的诱变的抑制并且可能共享其他所例示抗体的功能特性的抗体。突变可以是在整个靶标或已知表位驻留在其中的整个区段中用丙氨酸(或丝氨

酸,如果丙氨酸已经存在的话)进行系统性替换取代,一次一个残基,或间隔更宽的间隔。如果同一组突变显著降低两种抗体的结合,那么这两种抗体结合相同的表位。

[0517] 具有所选鼠抗体(例如,9F5、10C12、2D11、12C4、17C12或14H3)的结合特异性的抗体也可使用噬菌体展示方法的变体产生。参见Winter,WO 92/20791。该方法尤其适用于产生人抗体。在该方法中,使用所选鼠抗体的重链或轻链可变区作为起始材料。如果例如选择轻链可变区作为起始材料,构建噬菌体文库,其中成员展示出相同的轻链可变区(即,鼠起始材料)和不同的重链可变区。重链可变区可以例如由重排的人重链可变区的文库获得。选择对于tau或其片段显示出强特异性结合(例如,至少 10^8 且优选地至少 $10^9 M^{-1}$)的噬菌体。然后来自该噬菌体的重链可变区用作构建另一噬菌体文库的起始材料。在该文库中,每个噬菌体展示出相同的重链可变区(即,从第一展示文库中鉴定的区域)和不同的轻链可变区。轻链可变区可以例如由重排的人可变轻链区的文库获得。再一次,选择对于tau或其片段显示出强特异性结合的噬菌体。所得抗体通常具有与鼠起始材料相同或相似的表位特异性。

[0518] 9F5的重链的Kabat/Chothia复合物CDR分别被命名为SEQ IDN0:8-10,并且9F5的轻链的Kabat CDR分别被命名为SEQ IDN0:12-14。

[0519] 10C12的重链的Kabat/Chothia复合物CDR分别被命名为SEQ IDN0:8-10,并且10C12的轻链的Kabat CDR分别被命名为SEQ IDN0:12-14。

[0520] 2D11的重链的Kabat/Chothia复合物CDR分别被命名为SEQ IDN0:8-10,并且2D11的轻链的Kabat CDR分别被命名为SEQ IDN0:12-14。

[0521] 表2指出如由Kabat、Chothia、Chothia和Kabat的复合物(在本文中也称为“Kabat/Chothia复合物”)、AbM和Contact所定义的9F5、10C12和2D11CDR。

[0522] 表2:如由Kabat、Chothia、Chothia和Kabat的复合物、AbM和Contact所定义的9F5、10C12和2D11CDR

环	Kabat	Chothia	Chothia& Kabat 的复合物	AbM	Contact
L1	L24--L34 SEQ ID NO:12	L24--L34 SEQ ID NO:12	L24--L34 SEQ ID NO:12	L24--L34 SEQ ID NO:12	L30--L36 SEQ ID NO:47
L2	L50--L56 SEQ ID NO:13	L50--L56 SEQ ID NO:13	L50--L56 SEQ ID NO:13	L50--L56 SEQ ID NO:13	L46--L55 SEQ ID NO:48
L3	L89--L97 SEQ ID NO:14	L89--L97 SEQ ID NO:14	L89--L97 SEQ ID NO:14	L89--L97 SEQ ID NO:14	L89--L96 SEQ ID NO:49
H1	H31--H35B SEQ ID NO:40	H26--H32 SEQ ID NO:41	H26--H35B SEQ ID NO:8	H26--H35B SEQ ID NO:8	H30--H35B SEQ ID NO:44
H2	H50--H65 SEQ ID NO:9	H52--H56 SEQ ID NO:42	H50--H65 SEQ ID NO:9	H50--H58 SEQ ID NO:43	H47--H58 SEQ ID NO:45
H3	H95--H102 SEQ ID NO:10	H95--H102 SEQ ID NO:10	H95--H102 SEQ ID NO:10	H95--H102 SEQ ID NO:10	H93--H101 SEQ ID NO:46

[0524] 12C4的重链的Kabat/Chothia复合物CDR分别被命名为SEQ IDN0:8、220和10,并且12C4的轻链的Kabat CDR分别被命名为SEQ ID NO:12-14。

[0525] 表3指出如由Kabat、Chothia、Chothia和Kabat的复合物(在本文中也称为“Kabat/Chothia复合物”)、AbM和Contact所定义的12C4CDR。

[0526] 表3: 如由Kabat、Chothia、Chothia和Kabat的复合物、AbM和Contact所定义的12C4CDR

[0527]

环	Kabat	Chothia	Chothia& Kabat 的复合物	AbM	Contact
L1	L24--L34 SEQ ID NO:12	L24--L34 SEQ ID NO:12	L24--L34 SEQ ID NO:12	L24--L34 SEQ ID NO:12	L30--L36 SEQ ID NO:47
L2	L50--L56 SEQ ID NO:13	L50--L56 SEQ ID NO:13	L50--L56 SEQ ID NO:13	L50--L56 SEQ ID NO:13	L46--L55 SEQ ID NO:48
L3	L89--L97 SEQ ID NO:14	L89--L97 SEQ ID NO:14	L89--L97 SEQ ID NO:14	L89--L97 SEQ ID NO:14	L89--L96 SEQ ID NO:49
H1	H31--H35B SEQ ID NO:40	H26--H32 SEQ ID NO:41	H26--H35B SEQ ID NO:8	H26--H35B SEQ ID NO:8	H30--H35B SEQ ID NO:44
H2	H50--H65 SEQ ID NO:220	H52--H56 SEQ ID NO:42	H50--H65 SEQ ID NO:220	H50--H58 SEQ ID NO:257	H47--H58 SEQ ID NO:258
H3	H95--H102 SEQ ID NO:10	H95--H102 SEQ ID NO:10	H95--H102 SEQ ID NO:10	H95--H102 SEQ ID NO:10	H93--H101 SEQ ID NO:46

[0528] 17C12的重链的Kabat/Chothia复合物CDR分别被命名为SEQ ID NO:226、227和10, 并且17C12的轻链的Kabat CDR分别被命名为SEQ ID NO:229-231。

[0529] 表4指出如由Kabat、Chothia、Chothia和Kabat的复合物(在本文中也称为“Kabat/Chothia复合物”)、AbM和Contact所定义的17C12CDR。

[0530] 表4: 如由Kabat、Chothia、Chothia和Kabat的复合物、AbM和Contact所定义的17C12CDR

[0531]

环	Kabat	Chothia	Chothia& Kabat 的复合物	AbM	Contact
L1	L24--L34 SEQ ID NO:229	L24--L34 SEQ ID NO:229	L24--L34 SEQ ID NO:229	L24--L34 SEQ ID NO:229	L30--L36 SEQ ID NO:262
L2	L50--L56 SEQ ID NO:230	L50--L56 SEQ ID NO:230	L50--L56 SEQ ID NO:230	L50--L56 SEQ ID NO:230	L46--L55 SEQ ID NO:263
L3	L89--L97 SEQ ID NO:231	L89--L97 SEQ ID NO:231	L89--L97 SEQ ID NO:231	L89--L97 SEQ ID NO:231	L89--L96 SEQ ID NO:264
H1	H31--H35B SEQ ID NO:40	H26--H32 SEQ ID NO:259	H26--H35B SEQ ID NO:226	H26--H35B SEQ ID NO:226	H30--H35B SEQ ID NO:44
H2	H50--H65 SEQ ID NO:227	H52--H56 SEQ ID NO:42	H50--H65 SEQ ID NO:227	H50--H58 SEQ ID NO:260	H47--H58 SEQ ID NO:261
H3	H95--H102 SEQ ID NO:10	H95--H102 SEQ ID NO:10	H95--H102 SEQ ID NO:10	H95--H102 SEQ ID NO:10	H93--H101 SEQ ID NO:46

[0532] 14H3的重链的Kabat/Chothia复合物CDR分别被命名为SEQ IDNO:241-243,并且14H3的轻链的Kabat CDR分别被命名为SEQ IDNO:245-247。

[0533] 表5指出如由Kabat、Chothia、Chothia和Kabat的复合物(在本文中也称为“Kabat/Chothia复合物”)、AbM和Contact所定义的14H3CDR。

[0534] 表5: 如由Kabat、Chothia、Chothia和Kabat的复合物、AbM和Contact所定义的14H3CDR

[0535]

环	Kabat	Chothia	Chothia& Kabat 的复合物	AbM	Contact
L1	L24--L34 SEQ ID NO:245	L24--L34 SEQ ID NO:245	L24--L34 SEQ ID NO:245	L24--L34 SEQ ID NO:245	L30--L36 SEQ ID NO:272
L2	L50--L56 SEQ ID NO:246	L50--L56 SEQ ID NO:246	L50--L56 SEQ ID NO:246	L50--L56 SEQ ID NO:246	L46--L55 SEQ ID NO:273
L3	L89--L97 SEQ ID NO:247	L89--L97 SEQ ID NO:247	L89--L97 SEQ ID NO:247	L89--L97 SEQ ID NO:247	L89--L96 SEQ ID NO:274

[0536] 表5: 如由Kabat、Chothia、Chothia和Kabat的复合物、AbM和Contact所定义的14H3CDR

[0537]

环	Kabat	Chothia	Chothia& Kabat 的复合物	AbM	Contact
H1	H31--H35B SEQ ID NO:265	H26--H32 SEQ ID NO:266	H26--H35B SEQ ID NO:241	H26--H35B SEQ ID NO:241	H30--H35B SEQ ID NO:269
H2	H50--H65 SEQ ID NO:242	H52--H56 SEQ ID NO:267	H50--H65 SEQ ID NO:242	H50--H58 SEQ ID NO:268	H47--H58 SEQ ID NO:270
H3	H95--H102 SEQ ID NO:243	H95--H102 SEQ ID NO:243	H95--H102 SEQ ID NO:243	H95--H102 SEQ ID NO:243	H93--H101 SEQ ID NO:271

[0538] 其他抗体可以通过编码示例性抗体 (诸如9F5、10C12、2D11、12C4、17C12或14H3) 的重链和轻链的cDNA的诱变获得。在成熟重链和/或轻链可变区的氨基酸序列中与9F5、10C12、2D11、12C4、17C12或14H3至少70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一且维持其功能特性,和/或与相应抗体的差别在于少量功能上不重要的氨基酸取代 (例如,保守取代)、缺失或插入的单克隆抗体也包括在本发明中。还包括具有至少一个或所有六个CDR的单克隆抗体,所述CDR如由任何常规定义所定义,但优选Kabat,其与9F5、10C12、2D11、12C4、17C12或14H3的对应CDR具有90%、95%、99%或100%的同一性。

[0539] 本发明还提供了具有完全或基本上来自9F5、10C12、2D11、12C4、17C12或14H3的一些或全部 (例如,3、4、5和6个) CDR的抗体。此类抗体可包括重链可变区,其具有完全或基本上来自9F5、10C12、2D11、12C4、17C12或14H3的重链可变区的至少两个且通常全部三个CDR;和/或轻链可变区,其具有完全或基本上来自9F5、10C12、2D11、12C4、17C12或14H3的轻链可变区的至少两个且通常全部三个CDR。抗体可包括重链和轻链。当CDR包含不超过4、3、2或1个取代、插入或缺失时,所述CDR基本上来自对应的9F5CDR,不同的是CDR-H2 (当由Kabat定义时) 可具有不超过6、5、4、3、2或1个取代、插入或缺失。此类抗体可在成熟重链和/或轻链可变区的氨基酸序列中与9F5、10C12、2D11、12C4、17C12或14H3具有至少70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性且维持其功能特性,和/或与9F5、10C12、2D11、12C4、17C12或14H3的差别在于少量功能上不重要的氨基酸取代 (例如,保守取代)、缺失或插入。

[0540] 通过此类测定鉴定的一些抗体可与tau的单体、错误折叠、聚集、磷酸化或非磷酸化形式或其他形式结合。同样,一些抗体对tau的非病理和病理形式和构象具有免疫反应性。

[0541] 本发明还提供了一种用于与由残基(Q/E) IVYK(S/P) (SEQ ID NO:56)、残基QIVYKP (SEQ ID NO:57)、残基EIVYKSP (SEQ ID NO:58) 或残基EIVYKS (SEQ ID NO:277) 组成的肽特异性结合的手段。示例性手段是包含SEQ ID NO:8-10的重链CDR和SEQ ID NO:12-14的轻链CDR的抗体。示例性手段是包含SEQ ID NO:8、220和10的重链CDR和SEQ ID NO:12-14的轻链CDR的抗体。示例性手段是包含SEQ ID NO:226、227和10的重链CDR和SEQ ID NO:229-231的轻链CDR的抗体。示例性手段是包含SEQ ID NO:241-243的重链CDR和SEQ ID NO:245-247的轻链CDR的抗体。

[0542] B. 非人抗体

[0543] 针对tau或其片段 (例如,包含QIVYKP (SEQ ID NO:57)、EIVYKSP (SEQ ID NO:58)、EIVYKS (SEQ ID NO:277) 或(Q/E) IVYK(S/P) (SEQ ID NO:56) 的氨基酸序列的肽) 的其他非

人抗体(例如鼠、豚鼠、灵长类动物、兔或大鼠)的产生可以通过例如用tau或其片段对动物进行免疫来实现。参见Harlow&Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (CSHP NY, 1988) (出于所有目的以引用方式并入)。任选地,免疫原可以是383氨基酸人tau(4RON)。任选地,免疫原可以是含有P301S突变的人tau。任选地,免疫原可以是人tau,其中人tau是重组的带有N末端His标签的。任选地,用连接于载体的包含由(Q/E) IVYK(S/P) (SEQ ID NO:56)表示的肽的tau片段对动物进行免疫。任选地,肽是QIVYKP(SEQ ID NO:57)、EIVYKSP(SEQ ID NO:58)或EIVYKS(SEQ ID NO:277)。这种免疫原可以从天然来源、通过肽合成或通过重组表达获得。任选地,免疫原可以与载体蛋白融合或以其他方式复合进行施用。任选地,免疫原可以与佐剂一起施用。可以如下所述使用几种类型的佐剂。对于实验室动物的免疫,可使用完全弗氏佐剂,然后是不完全佐剂。兔或豚鼠通常用于制备多克隆抗体。小鼠通常用于制备单克隆抗体。针对与tau或tau内表位(例如,QIVYKP(SEQ ID NO:57)、EIVYKSP(SEQ ID NO:58)、EIVYKS(SEQ ID NO:277)或(Q/E) IVYK(S/P) (SEQ ID NO:56))的特异性结合对抗体进行筛选。任选地,可针对包含QIVYKP(SEQ ID NO:57)、EIVYKSP(SEQ ID NO:58)、EIVYKS(SEQ ID NO:277)的15氨基酸肽或由(Q/E) IVYK(S/P) (SEQ ID NO:56)表示的任何其他共有基序进行筛选。任选地,肽包含QIVYKP(SEQ ID NO:57)、EIVYKSP(SEQ ID NO:58)、EIVYKS(SEQ ID NO:277)。这种筛选可以通过以下方式实现:确定抗体与tau变体的集合的结合,所述tau变体诸如包含SEQ ID NO:1的氨基酸残基307-312或391-397或391-396或由其组成或这些残基内的突变的tau变体;并且确定哪些tau变体与抗体结合。可以例如通过蛋白质印迹、FACS或ELISA评估结合。

[0544] C. 人源化抗体

[0545] 人源化抗体是遗传工程化的抗体,其中将来自非人“供体”抗体的CDR接枝到人“受体”抗体序列中(参见,例如,Queen, US 5,530,101和5,585,089; Winter, US 5,225,539; Carter, US 6,407,213; Adair, US 5,859,205; 以及 Foote, US 6,881,557)。受体抗体序列可以是,例如,成熟人抗体序列、此类序列的复合物、人抗体序列的共有序列或种系区序列。因此,人源化抗体是具有完全或基本上来自供体抗体的至少三个、四个、五个或全部CDR,以及完全或基本上来自人抗体序列的可变区框架序列和恒定区(如果存在的话)的抗体。类似地,人源化重链具有完全或基本上来自供体抗体重链的至少一个、两个且通常全部三个CDR,以及基本上来自人重链可变区框架和恒定区序列的重链可变区框架序列和重链恒定区(如果存在的话)。类似地,人源化轻链具有完全或基本上来自供体抗体轻链的至少一个、两个且通常全部三个CDR,以及基本上来自人轻链可变区框架和恒定区序列的轻链可变区框架序列和轻链恒定区(如果存在的话)。除纳米抗体和dAb之外,人源化抗体包括人源化重链和人源化轻链。当相应CDR之间至少85%、90%、95%或100%的对应残基(如由任何常规定义所定义,但优选地由Kabat定义)同一时,人源化抗体中的CDR基本上来自非人抗体中的对应CDR。当至少85%、90%、95%或100%的由Kabat定义的对应该残基同一时,抗体链的可变区框架序列或抗体链的恒定区分别基本上来自人可变区框架序列或人恒定区。为了根据2014年世界卫生组织(WHO)国际非专有名称(INN)对人源化抗体的定义被归为人源化的,抗体必须与人种系抗体序列(即,在体细胞高频突变(somatic hypermutation)之前)具有至少85%的同一性。混合抗体是一条抗体链(例如,重链)满足阈值但另一条链(例如,轻链)不满足阈值的抗体。如果任一条链都不满足阈值,那么抗体被归为嵌合体,即使两条链的可变

框架区是基本上人的,具有一些鼠回复突变。参见Jones等人(2016)The INNs and outs of antibody nonproprietary names,mAbs8:1,1-9,DOI:10.1080/19420862.2015.1114320。还可参见“WHO-INN:International nonproprietary names (INN)for biological and biotechnological substances(a review)”(互联网)2014。可获自:<http://www.who.int/medicines/services/inn/BioRev2014.pdf>),其以引用方式并入本文。为避免疑义,如本文所用的术语“人源化”不旨在限制人源化抗体的2014WHO INN定义。本文所提供的一些人源化抗体与人种系序列具有至少85%的序列同一性,并且本文所提供的一些人源化抗体与人种系序列具有小于85%的序列同一性。本文所提供的人源化抗体的一些重链与人种系序列具有约60%至100%的序列同一性,例如,在约60%至69%、70%至79%、80%至84%或85%至89%的范围内。一些重链不满足2014WHO INN定义,并且与人种系序列具有,例如,约64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%或82%、83%或84%的序列同一性,而其他重链满足2014WHO INN定义并且与人种系序列具有约85%、86%、87%、88%、89%或更高的序列同一性。本文所提供的人源化抗体的一些轻链与人种系序列具有约60%至100%的序列同一性,例如,在约80%至84%或85%至89%的范围内。一些轻链不满足2014WHO INN定义,并且与人种系序列具有,例如,约81%、82%、83%或84%的序列同一性,而其他轻链满足2014WHO INN定义并且与人种系序列具有约85%、86%、87%、88%、89%或更高的序列同一性。根据2014WHO INN定义为“嵌合”的本文所提供的一些人源化抗体具有与人种系序列具有小于85%同一性的重链,所述重链和与人种系序列具有小于85%同一性的轻链配对。根据2014WHO INN定义为“混合”的本文所提供的一些人源化抗体,例如,具有与人种系序列具有至少85%序列同一性的重链,所述重链和与人种系序列具有小于85%序列同一性的轻链配对,或反之亦然。本文所提供的一些人源化抗体满足2014WHO INN“人源化”定义并且具有与人种系序列具有至少85%序列同一性的重链,所述重链和与人种系序列具有至少85%序列同一性的轻链配对。符合2014WHO INN“人源化”定义的示例性12C4抗体包括如下抗体:其拥有具有SEQ ID NO:221或SEQ ID NO:222的氨基酸序列的成熟重链,所述成熟重链与具有SEQ ID NO:223或SEQ ID NO:224的氨基酸序列的成熟轻链序列配对。符合2014WHO INN“人源化”定义的示例性14H3抗体包括如下抗体:其拥有具有SEQ ID NO:248或SEQ ID NO:249的氨基酸序列的成熟重链,所述成熟重链与具有SEQ ID NO:251或SEQ ID NO:252的氨基酸序列的成熟轻链序列配对。本文所提供的一些人源化抗体符合2014WHO INN“混合”定义。符合2014WHO INN“混合”定义的示例性9F5抗体包括如下抗体:其拥有具有SEQ ID NO:15-22和SEQ ID NO:127-128中任一者的氨基酸序列的成熟重链,所述成熟重链与具有SEQ ID NO:26-29和SEQ ID NO:130-131中任一者的氨基酸序列的成熟轻链序列配对。符合2014WHO INN“人源化”定义的示例性10C12抗体包括如下抗体:其拥有具有SEQ ID NO:214或SEQ ID NO:215的氨基酸序列的成熟重链,所述成熟重链与具有SEQ ID NO:216或SEQ ID NO:217的氨基酸序列的成熟轻链序列配对。符合2014WHO INN“人源化”定义的示例性17C12抗体包括如下抗体:其拥有具有SEQ ID NO:232或SEQ ID NO:233的氨基酸序列的成熟重链,所述成熟重链与具有SEQ ID NO:235的氨基酸序列的成熟轻链序列配对。本发明的另外的人源化9F5抗体包括如下抗体,其拥有具有SEQ ID NO:15-22和SEQ ID NO:127-128中任一者的氨基酸序列的成熟重链,所述成熟重链与具有SEQ ID NO:23-25中任一者的氨基酸序列的成熟轻链配对。本发明的另

外的人源化17C12抗体包括如下抗体,其拥有具有SEQ ID NO:232或SEQ ID NO:233的氨基酸序列的成熟重链,所述成熟重链与具有SEQ ID NO:234的氨基酸序列的成熟轻链配对。

[0546] 尽管人源化抗体通常掺入来自小鼠抗体的全部六个CDR(由任何常规定义所定义,但优选由Kabat定义),但它们也可以用少于来自小鼠抗体的全部CDR(例如,至少3个、4个或5个CDR)制备(例如,Pascalis等人,J.Immunol.169:3076,2002;Vajdos等人,J.of Mol.Biol.,320:415-428,2002;Iwahashi等人,Mol.Immunol.36:1079-1091,1999;Tamura等人,J.Immunol.,164:1432-1441,2000)。

[0547] 在一些抗体中,仅需要部分CDR,即结合所需的CDR残基的子集,称为SDR,保持结合在人源化抗体中。可以基于先前的研究(例如,通常不需要CDR H2中的残基H60-H65)从位于Chothia高变环外的Kabat CDR区域(Chothia,J.Mol.Biol.196:901,1987)中,通过分子建模和/或经验性地,或如Gonzales等人,Mol.Immunol.41:863,2004中所述鉴定不接触抗原且不在SDR中的CDR残基。在此类人源化抗体中,在一个或多个供体CDR残基不存在或省略了整个供体CDR的位置处,占据该位置的氨基酸可以是占据受体抗体序列中的对应位置(通过Kabat编号)的氨基酸。CDR中将包括的受体对供体氨基酸的此类取代的数量反映了竞争考虑的平衡。此类取代可能有利于减少人源化抗体中小鼠氨基酸的数量,并且因此降低潜在的免疫原性和/或满足WHO INN“人源化”定义。然而,取代还可引起亲和力的改变,并且优选避免亲和力的显著降低。CDR内用于取代的位置和用于取代的氨基酸也可经验性地选择。

[0548] 人受体抗体序列可任选地选自许多已知的人抗体序列,以在人受体序列可变区框架与供体抗体链的对应的可变区框架之间提供高度的序列同一性(例如,65%-85%的同一性)。

[0549] 一些人源化和嵌合抗体具有相同(在实验误差范围内)或改进的功能特性,例如,对人tau的结合亲和力,如实施例中所描述如同衍生它们的鼠抗体抑制tau内化到神经元中。例如,一些人源化和嵌合抗体的结合亲和力是衍生它们的鼠抗体的3、2或1倍,或者亲和力在实验误差内不可区分。一些人源化和嵌合抗体抑制tau内化到神经元中,其抑制程度如实施例中所描述是衍生它们的鼠抗体的3、2或1倍,或者其抑制程度在实验误差范围内与衍生它们的小鼠抗体相同。

[0550] 9F5重链的受体序列的实例是具有PDB登录代码2RCS-VH_huFrwk的人源化48G7Fab的人成熟重链可变区(SEQ ID NO:32)。9F5重链的受体序列的实例是人成熟重链GenBank AAN16432-VH_huFrwk(SEQ ID NO:31)。9F5和48G7Fab的可变结构域的CDR-H1、H2环也共享相同的长度。9F5重链的受体序列的实例是人成熟重链可变区IMGT#IGHV1-69-2*01(SEQ ID NO:33)。IMGT#IGHV1-69-2*01(SEQ ID NO:33)的Chothia CDR-H1是规范类别1,而Chothia CDR-H2是规范类别2。IMGT#IGHV1-69-2*01(SEQ ID NO:33)属于人重链第1亚组。9F5轻链的受体序列的实例是人成熟轻链可变区1911357B-VL_huFrwk(SEQ ID NO:36)。9F5轻链的受体序列的实例是人成熟轻链可变区CAB51297-VL_huFrwk(SEQ ID NO:35)。9F5和CAB51297&1911357B抗体的轻链可变结构域的CDR-L1、L2和L3环共享相同的长度。9F5轻链的受体序列的实例是人成熟轻链可变区IGKV2-28*01&IGKJ2*01(SEQ ID NO:37)。IGKV2-28*01&IGKJ2*01(SEQ ID NO:37)的Chothia CDR-L1是规范类别4。IGKV2-28*01&IGKJ2*01(SEQ ID NO:37)的Chothia CDR-L2是规范类别1。IGKV2-28*01&IGKJ2*01(SEQ ID NO:37)的Chothia CDR-L3是规范类别1。IGKV2-28*01&IGKJ2*01(SEQ ID NO:37)属于人κ第2亚组。

[0551] 10C12重链的受体序列的实例是人成熟CAC20421 (SEQ ID NO:218)。10C12的可变结构域和CAC20421VH的CDR-H1、H2环也共享相同的长度。10C12重链的受体序列的实例是人成熟重链可变区IMGT#IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)。IMGT#IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)的Chothia CDR-H1是规范类别1,而Chothia CDR-H2是规范类别2。IMGT#IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)属于人重链第1亚组。10C12轻链的受体序列的实例是人成熟轻链可变区CAB51297-VL_huFrwk (SEQ ID NO:35)。10C12的轻链可变结构域和CAB51297VL的CDR-L1、L2和L3环共享相同的长度。10C12轻链的受体序列的实例是人成熟轻链可变区IGKV2-28*01&IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)。IGKV2-28*01&IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)的Chothia CDR-L1是规范类别4。IGKV2-28*01&IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)的Chothia CDR-L2是规范类别1。IGKV2-28*01&IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)的Chothia CDR-L3是规范类别1。IGKV2-28*01&IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)属于人κ第2亚组。

[0552] 12C4重链的受体序列的实例是人成熟重链可变区CAC20421-VH_huFrwk (SEQ ID NO:218)。12C4的可变结构域和CAC20421VH的CDR-H1、H2环也共享相同的长度。12C4重链的受体序列的实例是人成熟重链可变区IMGT#IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)。IMGT#IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)的Chothia CDR-H1是规范类别1,而Chothia CDR-H2是规范类别2。IMGT#IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)属于人重链第1亚组。12C4轻链的受体序列的实例是人成熟轻链可变区CAB51297-VL_huFrwk (SEQ ID NO:35)。12C4的轻链可变结构域和CAB51297VL的CDR-L1、L2和L3环共享相同的长度。12C4轻链的受体序列的实例是人成熟轻链可变区IGKV2-28*01&IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)。IGKV2-28*01&IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)的Chothia CDR-L1是规范类别4。IGKV2-28*01&IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)的Chothia CDR-L2是规范类别1。IGKV2-28*01&IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)的Chothia CDR-L3是规范类别1。IGKV2-28*01&IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)属于人κ第2亚组。

[0553] 17C12重链的受体序列的实例是人成熟重链可变区CAC20421-VH_huFrwk (SEQ ID NO:218)。17C12和CAC20421的重链可变结构域的CDR-H1、H2环也共享相同的长度。17C12重链的受体序列的实例是人成熟重链可变区IMGT#IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)。IMGT#IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)的Chothia CDR-H1是规范类别1,而Chothia CDR-H2是规范类别2。IMGT#IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)属于人重链第1亚组。17C12轻链的受体序列的实例是人成熟轻链可变区QD016713-VL_huFrwk (SEQ ID NO:238)。17C12和QD016713抗体的轻链可变结构域的CDR-L1、L2和L3环也共享相同的长度。17C12轻链的受体序列的实例是人成熟轻链可变区IGKV2-29*02&IGKJ4*01 (SEQ ID NO:239)。

[0554] 14H3重链的受体序列的实例是人成熟重链可变区QDJ57937-VH_huFrwk (SEQ ID NO:253)。14H3的可变结构域和QDJ57937VH的CDR-H1、H2环也共享相同的长度。14H3重链的受体序列的实例是人成熟重链可变区IGHV1-70*04&IGHJ4*01 (SEQ ID NO:254)。14H3轻链的受体序列的实例是人成熟轻链可变区ABC66914-VL_huFrwk (SEQ ID NO:256)。14H3的轻链可变结构域和ABC66914VL的CDR-L1、L2和L3环共享相同的长度。14H3轻链的受体序列的实例是人成熟轻链可变区IGKV2-28*01&IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)。IGKV2-28*01&IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)的Chothia CDR-L1是规范类别4。IGKV2-28*01&IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)的Chothia CDR-L2是规范类别1。IGKV2-28*01&IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)的Chothia CDR-L3是规范类别1。IGKV2-28*01&IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)属于人κ第2亚组。

[0555] 如果选择多于一种人受体抗体序列,那么可使用那些受体的复合物或杂交体,并且在人源化轻链和重链可变区中的不同位置使用的氨基酸可以取自所用的任何人受体抗体序列。举例来说,使用AAN16432-VH_huFrwk (SEQ ID NO:31) 和具有PDB登录代码2RCS-VH_huFrwk的人源化48G7Fab (SEQ ID NO:32) 的人成熟重链可变区作为用于9F5成熟重链可变区的人源化的受体序列。其中这两个受体不相同的位置的实例包括位置H1 (E或Q)、H5 (V或Q)、H11 (V或L)、H12 (K或V)、H20 (V或L)、H23 (K或T)、H28 (T或N)、H38 (R或K)、H40 (A或R)、H42 (G或E)、H43 (K或Q)、H48 (M或I)、H54 (D或N)、H66 (R或K)、H69 (M或I)、H75 (T或S)、H76 (D或N)、H80 (M或L)、H81 (E或Q)、H83 (R或T)、H108 (L或T) 或H109 (V或L)。9F5重链可变区的人源化型式可以在这些位置中的任一处包括任一氨基酸。还使用人种系序列IMGT#IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:25) 作为用于9F5成熟重链可变区的人源化的受体序列。举例来说,使用CAB51297-VL_huFrwk (SEQ ID NO:35) 和1911357B-VL_huFrwk (SEQ ID NO:36) 的人成熟轻链可变区作为用于9F5成熟轻链可变区的人源化的受体序列。其中这两个受体不相同的位置的实例包括位置L7 (S或A)、L8 (P或A)、L9 (L或F)、L11 (L或N)、L15 (P或L)、L17 (E或T)、L18 (P或S)、L30 (Y或I)、L31 (N或T)、L54 (R或L)、L60 (D或N)、L66 (G或E) 或L74 (K或R)。9F5轻链可变区的人源化型式可以在这些位置中的任一处包括任一氨基酸。还使用人种系序列IGKV2-28*01&IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37) 作为用于9F5成熟轻链可变区的人源化的受体序列。

[0556] 可以基于来自人可变区框架残基的某些氨基酸对CDR构象和/或与抗原的结合的可能影响来选择它们用于取代。对此类可能影响的研究通过建模、检查特定位置处的氨基酸的特征,或经验观察特定氨基酸的取代或诱变的作用来实现。

[0557] 举例来说,当鼠可变区框架残基与选定的人可变区框架残基之间的氨基酸不同时,当合理地预期氨基酸有以下特征时人框架氨基酸可以被来自小鼠抗体的等效框架氨基酸取代:

[0558] (1) 直接非共价结合抗原;

[0559] (2) 与CDR区相邻或在由Chothia但不是Kabat所定义的CDR内;

[0560] (3) 或者与CDR区相互作用(例如,在CDR区的约6 Å内), (例如,通过对同源已知免疫球蛋白链的解析结构上的轻链或重链进行建模来鉴定);或

[0561] (4) 是参与VL-VH界面的残基。

[0562] 在一个实施方案中,使用两阶段PCR方案生成人源化序列,其允许使用QuikChange定点诱变引入多个突变、缺失和插入[Wang, W.和Malcolm, B.A. (1999) BioTechniques 26: 680-682]。

[0563] 来自Queen, US 5,530,101定义的类别(1)至(3)的框架残基有时另选地被称为规范残基和微调残基(vernier residue)。有助于限定CDR环的构象的框架残基有时被称为规范残基(Chothia&Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); Thornton&Martin, J. Mol. Biol. 263:800-815 (1996))。支持抗原结合环构象并在精细调节抗体与抗原的配合中发挥作用的框架残基有时被称为微调残基(Foote&Winter, J. Mol. Biol. 224:487-499 (1992))。

[0564] 作为取代候选的其他框架残基是产生潜在糖基化位点的残基。其他取代候选是受体人框架氨基酸,其在该位置对于人免疫球蛋白不常见。这些氨基酸可以被来自小鼠供体抗体的等同位置或来自更典型的人免疫球蛋白的等同位置的氨基酸取代。

[0565] 作为取代候选的其他框架残基是N末端谷氨酰胺残基(Q),其可以替换为谷氨酸(E)以最小化焦谷氨酸转化的可能性[Y.Diana Liu等人,2011,J.Biol.Chem.,286:11211-11217]。谷氨酸(E)至焦谷氨酸(pE)的转化比从谷氨酰胺(Q)转化更慢地发生。由于在谷氨酰胺至pE转化中失去伯胺,因此抗体变得具有更大酸性。不完全转化产生抗体的异质性,这使用基于电荷的分析方法可以观察为多个峰。异质性差异可能表明缺乏过程控制。具有N末端谷氨酰胺至谷氨酸取代的示例性9F5人源化重链可变区是SEQ ID NO:16(hu9F5VHv2)、SEQ ID NO:17(hu9F5VHv3)、SEQ ID NO:18(hu9F5VHv4)、SEQ ID NO:19(hu9F5VHv5)、SEQ ID NO:20(hu9F5VHv6)、SEQ ID NO:21(hu9F5VHv7)、SEQ ID NO:22(hu9F5VHv8)、SEQ ID NO:109(hu9F5VHv4_L80P)、SEQ ID NO:110(hu9F5VHv4_L80D)、SEQ ID NO:111(hu9F5VHv4_L82cG)、SEQ ID NO:112(hu9F5VHv4_L82cD)、SEQ ID NO:113(hu9F5VHv4_L82P)、SEQ ID NO:114(hu9F5VHv4_L80G)、SEQ ID NO:115(hu9F5VHv4_L82K)、SEQ ID NO:116(hu9F5VHv4_L82R)、SEQ ID NO:117(hu9F5VHv4_L82E)、SEQ ID NO:118(hu9F5VHv4_L82N)、SEQ ID NO:119(hu9F5VHv4_Y79D)、SEQ ID NO:120(hu9F5VHv4_Y79N)、SEQ ID NO:121(hu9F5VHv4_Y79G)、SEQ ID NO:122(hu9F5VHv5_M80E)、SEQ ID NO:123(hu9F5VHv5_M80G)、SEQ ID NO:124(hu9F5VHv4_L82cS)、SEQ ID NO:125(hu9F5VHv4_Y79Q)、SEQ ID NO:126(hu9F5VHv4_S82aG)、SEQ ID NO:127(hu9F5VHv9)、SEQ ID NO:128(hu9F5VHv10)、SEQ ID NO:129(hu9F5VHv10_L82cG)。具有N末端谷氨酰胺至谷氨酸取代的示例性10C12人源化重链可变区是SEQ ID NO:215(hu10C12VHv2)。具有N末端谷氨酰胺至谷氨酸取代的示例性12C4人源化重链可变区是SEQ ID NO:222(hu12C4VHv2)。具有N末端谷氨酰胺至谷氨酸取代的示例性17C12人源化重链可变区是SEQ ID NO:233(hu17C12VHv2)。

[0566] 示例性人源化抗体包括小鼠9F5的人源化形式,命名为Hu9F5。

[0567] 小鼠抗体9F5包括成熟的重链和轻链可变区,所述成熟的重链和轻链可变区分别具有包含SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:11的氨基酸序列。本发明提供了29个所例示的人源化成熟重链可变区:hu9F5VHv1(SEQ ID NO:15)、hu9F5VHv2(SEQ ID NO:16)、hu9F5VHv3(SEQ ID NO:17)、hu9F5VHv4(SEQ ID NO:18)、hu9F5VHv5(SEQ ID NO:19)、hu9F5VHv6(SEQ ID NO:20)、hu9F5VHv7(SEQ ID NO:21)、hu9F5VHv8(SEQ ID NO:22)、hu9F5VHv4_L80P(SEQ ID NO:109)、hu9F5VHv4_L80D(SEQ ID NO:110)、hu9F5VHv4_L82cG(SEQ ID NO:111)、hu9F5VHv4_L82cD(SEQ ID NO:112)、hu9F5VHv4_L82P(SEQ ID NO:113)、hu9F5VHv4_L80G(SEQ ID NO:114)、hu9F5VHv4_L82K(SEQ ID NO:115)、hu9F5VHv4_L82R(SEQ ID NO:116)、hu9F5VHv4_L82E(SEQ ID NO:117)、hu9F5VHv4_L82N(SEQ ID NO:118)、hu9F5VHv4_Y79D(SEQ ID NO:119)、hu9F5VHv4_Y79N(SEQ ID NO:120)、hu9F5VHv4_Y79G(SEQ ID NO:121)、hu9F5VHv5_M80E(SEQ ID NO:122)、hu9F5VHv5_M80G(SEQ ID NO:123)、hu9F5VHv4_L82cS(SEQ ID NO:124)、hu9F5VHv4_Y79Q(SEQ ID NO:125)、hu9F5VHv4_S82aG(SEQ ID NO:126)、hu9F5VHv9(SEQ ID NO:127)、hu9F5VHv10(SEQ ID NO:128)和hu9F5VHv10_L82cG(SEQ ID NO:129)。本发明还提供了95个所例示的成熟轻链可变区:hu9F5VLv1(SEQ ID NO:23)、hu9F5VLv2(SEQ ID NO:24)、hu9F5VLv3(SEQ ID NO:25)、hu9F5VLv4(SEQ ID NO:26)、hu9F5VLv5(SEQ ID NO:27)、hu9F5VLv6(SEQ ID NO:28)、hu9F5VLv7(SEQ ID NO:29)、hu9F5VLv8(SEQ ID NO:130)、hu9F5VLv9(SEQ ID NO:131)、hu9F5VLv2_M51E(SEQ ID NO:61)、hu9F5VLv2_M51D(SEQ ID NO:62)、hu9F5VLv2_L27cD(SEQ ID NO:63)、hu9F5VLv2_L27cG(SEQ ID NO:64)、

hu9F5VLv2_L27cS (SEQ ID NO:65)、hu9F5VLv2_L27cE (SEQ ID NO:66)、hu9F5VLv2_I30E (SEQ ID NO:67)、hu9F5VLv2_I30K (SEQ ID NO:68)、hu9F5VLv2_L27cT (SEQ ID NO:69)、hu9F5VLv2_L27cN (SEQ ID NO:70)、hu9F5VLv2_L27bD (SEQ ID NO:71)、hu9F5VLv2_I30G (SEQ ID NO:72)、hu9F5VLv2_L33N (SEQ ID NO:73)、hu9F5VLv2_L27cA (SEQ ID NO:74)、hu9F5VLv2_L33T (SEQ ID NO:75)、hu9F5VLv2_L33S (SEQ ID NO:76)、hu9F5VLv2_L33R (SEQ ID NO:77)、hu9F5VLv2_I30Q (SEQ ID NO:78)、hu9F5VLv2_L27bT (SEQ ID NO:79)、hu9F5VLv2_T31G (SEQ ID NO:80)、hu9F5VLv2_L27bQ (SEQ ID NO:81)、hu9F5VLv2_L33G (SEQ ID NO:82)、hu9F5VLv2_L27cP (SEQ ID NO:83)、hu9F5VLv2_V78R (SEQ ID NO:84)、hu9F5VLv2_I75D (SEQ ID NO:85)、hu9F5VLv2_V78D (SEQ ID NO:86)、hu9F5VLv2_V78E (SEQ ID NO:87)、hu9F5VLv2_V78P (SEQ ID NO:88)、hu9F5VLv2_V78K (SEQ ID NO:89)、hu9F5VLv2_R77D (SEQ ID NO:90)、hu9F5VLv2_V78G (SEQ ID NO:91)、hu9F5VLv2_S76P (SEQ ID NO:92)、hu9F5VLv2_I75P (SEQ ID NO:93)、hu9F5VLv2_I75Q (SEQ ID NO:94)、hu9F5VLv2_I75G (SEQ ID NO:95)、hu9F5VLv2_L73P (SEQ ID NO:96)、hu9F5VLv2_L73G (SEQ ID NO:97)、hu9F5VLv2_V78Q (SEQ ID NO:98)、hu9F5VLv2_S76G (SEQ ID NO:99)、hu9F5VLv2_L92D (SEQ ID NO:100)、hu9F5VLv2_Y86T (SEQ ID NO:101)、hu9F5VLv2_L92E (SEQ ID NO:102)、hu9F5VLv2_L92G (SEQ ID NO:103)、hu9F5VLv2_L92Q (SEQ ID NO:104)、hu9F5VLv2_L93G (SEQ ID NO:105)、hu9F5VLv2_V85G (SEQ ID NO:106)、hu9F5VLv2_L92T (SEQ ID NO:107)、hu9F5VLv2_A89G (SEQ ID NO:108)、hu9F5VLv8_DIM1 (SEQ ID NO:132)、hu9F5VLv8_DIM2 (SEQ ID NO:133)、hu9F5VLv8_DIM3 (SEQ ID NO:134)、hu9F5VLv8_DIM4 (SEQ ID NO:135)、hu9F5VLv8_DIM5 (SEQ ID NO:136)、hu9F5VLv8_DIM6 (SEQ ID NO:137)、hu9F5VLv8_DIM7 (SEQ ID NO:138)、hu9F5VLv8_DIM8 (SEQ ID NO:139)、hu9F5VLv8_DIM9 (SEQ ID NO:140)、hu9F5VLv8_DIM10 (SEQ ID NO:141)、hu9F5VLv8_DIM11 (SEQ ID NO:142)、hu9F5VLv8_DIM12 (SEQ ID NO:143)、hu9F5VLv8_DIM13 (SEQ ID NO:144)、hu9F5VLv8_DIM14 (SEQ ID NO:145)、hu9F5VLv8_DIM15 (SEQ ID NO:146)、hu9F5VLv8_DIM16 (SEQ ID NO:147)、hu9F5VLv8_DIM17 (SEQ ID NO:148)、hu9F5VLv8_DIM18 (SEQ ID NO:149)、hu9F5VLv8_DIM19 (SEQ ID NO:150)、hu9F5VLv8_DIM20 (SEQ ID NO:151)、hu9F5VLv8_DIM21 (SEQ ID NO:152)、hu9F5VLv8_DIM22 (SEQ ID NO:153)、hu9F5VLv8_DIM23 (SEQ ID NO:154)、hu9F5VLv8_DIM24 (SEQ ID NO:155)、hu9F5VLv8_DIM25 (SEQ ID NO:156)、hu9F5VLv8_DIM26 (SEQ ID NO:157)、hu9F5VLv8_DIM27 (SEQ ID NO:158)、hu9F5VLv8_DIM28 (SEQ ID NO:159)、hu9F5VLv8_DIM29 (SEQ ID NO:160)、hu9F5VLv8_DIM30 (SEQ ID NO:161)、hu9F5VLv9_DIM1 (SEQ ID NO:162)、hu9F5VLv9_DIM2 (SEQ ID NO:163)、hu9F5VLv9_DIM4 (SEQ ID NO:164)、hu9F5VLv9_DIM5 (SEQ ID NO:165)、hu9F5VLv9_DIM8 (SEQ ID NO:166)、hu9F5VLv9_DIM10 (SEQ ID NO:167)、hu9F5VLv9_DIM11 (SEQ ID NO:168)、(hu9F5VLv9_DIM13 (SEQ ID NO:169)、hu9F5VLv9_DIM19 (SEQ ID NO:170) 和 hu9F5VLv9_DIM20 (SEQ ID NO:171))。图1A至图1B和图4A至4B示出鼠9F5和各种人源化抗体的重链可变区的比对。图2A至图2B和图5A至图5B示出鼠9F5和各种人源化抗体的轻链可变区的比对。图6A至图6C示出人源化变体hu9F5VLv8和各种人源化抗体的轻链可变区的比对。

[0568] 出于诸如可能影响CDR构象和/或与抗原的结合、介导重链与轻链之间的相互作用、与恒定区的相互作用、是期望或不期望的翻译后修饰的位点、是其在人可变区序列中的位置的不常见残基且因此潜在地具有免疫原性、降低聚集潜力以及其他原因之类的原因，

以下48个可变区框架位置被认为是用于95个所例示的人成熟轻链可变区和29个所例示的人成熟重链可变区中的取代候选,如实施例进一步指定的:L3 (V3Q)、L7 (A7S)、L8 (A8P)、L9 (F9L)、L11 (N11L)、L15 (L15P)、L17 (T17E)、L18 (S18P)、L37 (L37Q、L37G、L37I)、L39 (R39K)、L60 (N60D)、L64 (G64S)、L66 (E66G)、L73 (L73P、L73G)、L74 (R74K)、L75 (I75D、I75P、I75Q、I75G)、L76 (S76P、S76G)、L77 (R77D)、L78 (V78R、V78D、V78E、V78P、V78K、V78G、V78Q)、L85 (V85G)、L86 (Y86T)、L100 (G100Q)、H1 (Q1E)、H5 (Q5V)、H11 (L11V)、H12 (V12K)、H17 (S17T)、H20 (L20I)、H23 (T23K)、H38 (K38R、K38Q)、H40 (R40A)、H42 (E42G)、H43 (Q43K)、H48 (I48M)、H66 (K66R)、H69 (I69M)、H75 (S75T)、H76 (N76D)、H79 (Y79Q、Y79D、Y79N、Y79G)、H80 (L80M、L80P、L80D、L80G、L80E)、H81 (Q81E)、H82 (L82P、L82K、L82R、L82R、L82E、L82N)、H82a (S82aG)、H82c (L82cG、L82cD、L82cS)、H83 (T83R)、H93 (A93T)、H94 (S94T)、H108 (T108L) 和 H109 (L109V)。以下14个可变区CDR位置被认为是用于95个所例示的人成熟轻链可变区和29个所例示的人成熟重链可变区中的取代候选,如实施例进一步指定的:L27b (L27bD、L27bT、L27bQ)、L27c (L27cD、L27cG、L27cS、L27cE、L27cT、L27cN、L27cA、L27cP、L27cI)、L30 (I30Y、I30E、I30K、I30G、I30Q)、L31 (T31N、T31G)、L33 (L33N、L33T、L33S、L33R、L33G)、L51 (M51G、M51E、M51D、M51K、M51I)、L54 (L54R、L54G、L54T)、L89 (A89G)、L92 (L92D、L92E、L92G、L92Q、L92T、L92I)、L93 (E93G)、H28 (N28T)、H51 (I48M)、H54 (N54D) 和 H56 (D56E)。在一些人源化9F5抗体中,Kabat-Chothia复合物CDR-H1具有包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列。在一些人源化9F5抗体中,Kabat-Chothia复合物CDR-H1具有包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列,并且Kabat CDR-H2具有包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列。在一些人源化9F5抗体中,Kabat CDR-H2具有包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列。在一些人源化9F5抗体中,Kabat CDR-H2具有包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列。在一些人源化9F5抗体中,Kabat CDR-L2具有包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列。在一些人源化9F5抗体中,Kabat CDR-L1具有包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列,并且Kabat CDR-L2具有包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列。在一些人源化9F5抗体中,Kabat CDR-L1具有包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列,并且Kabat CDR-L2具有包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列。在一些人源化9F5抗体中,Kabat CDR-L1具有包含选自SEQ ID NO:172-193组成的组的序列的氨基酸序列。在一些人源化9F5抗体中,Kabat CDR-L2具有包含选自SEQ ID NO:194-205组成的组的序列的氨基酸序列。在一些人源化9F5抗体中,Kabat CDR-L3具有包含选自SEQ ID NO:206-213组成的组的序列的氨基酸序列。

[0569] 此处,与其他地方一样,第一个提到的残基是通过将Kabat CDR或复合物Chothia-Kabat CDR (在CDR-H1的情况下) 接枝到人受体框架中而形成的人源化抗体的残基,并且第二个提到的残基是考虑替换这一残基的残基。因此,在可变区框架内,第一个提到的残基是人,并且在CDR内,第一个提到的残基是小鼠。

[0570] 所例示的抗体包括所例示的成熟重链和轻链可变区的任何排列或组合: hu9F5VHv1/hu9F5VLv1、hu9F5VHv1/hu9F5VLv2、hu9F5VHv1/hu9F5VLv3、hu9F5VHv1/hu9F5VLv4、hu9F5VLv1/hu9F5VLv5、hu9F5VHv1/hu9F5VLv6、hu9F5VHv1/hu9F5VLv7、hu9F5VHv2/hu9F5VLv1、hu9F5VHv2/hu9F5VLv2、hu9F5VHv2/hu9F5VLv3、hu9F5VHv2/hu9F5VLv4、hu9F5VLv2/hu9F5VLv5、hu9F5VHv2/hu9F5VLv6、hu9F5VHv2/hu9F5VLv7、hu9F5VHv3/hu9F5VLv1、hu9F5VHv3/hu9F5VLv2、hu9F5VHv3/hu9F5VLv3、hu9F5VHv3/hu9F5VLv4、hu9F5VLv3/hu9F5VLv5、hu9F5VHv3/hu9F5VLv6、hu9F5VHv3/hu9F5VLv7、

hu9F5VHv4/hu9F5VLv1、hu9F5VHv4/hu9F5VLv2、hu9F5VHv4/hu9F5VLv3、hu9F5VHv4/hu9F5VLv4、hu9F5VHv4/hu9F5VLv5、hu9F5VHv4/hu9F5VLv6、hu9F5VHv4/hu9F5VLv7、hu9F5VHv5/hu9F5VLv1、hu9F5VHv5/hu9F5VLv2、hu9F5VHv5/hu9F5VLv3、hu9F5VHv5/hu9F5VLv4、hu9F5VHv5/hu9F5VLv5、hu9F5VHv5/hu9F5VLv6、hu9F5VHv5/hu9F5VLv7、hu9F5VHv6/hu9F5VLv1、hu9F5VHv6/hu9F5VLv2、hu9F5VHv6/hu9F5VLv3、hu9F5VHv6/hu9F5VLv4、hu9F5VHv6/hu9F5VLv5、hu9F5VHv6/hu9F5VLv6、hu9F5VHv6/hu9F5VLv7、hu9F5VHv7/hu9F5VLv1、hu9F5VHv7/hu9F5VLv2、hu9F5VHv7/hu9F5VLv3、hu9F5VHv7/hu9F5VLv4、hu9F5VHv7/hu9F5VLv5、hu9F5VHv7/hu9F5VLv6、hu9F5VHv7/hu9F5VLv7、hu9F5VHv8/hu9F5VLv1、hu9F5VHv8/hu9F5VLv2、hu9F5VHv8/hu9F5VLv3、hu9F5VHv8/hu9F5VLv4、hu9F5VHv8/hu9F5VLv5、hu9F5VHv8/hu9F5VLv6、hu9F5VHv8/hu9F5VLv7。

[0571] 所例示的抗体包括所例示的成熟重链可变区hu9F5VHv1 (SEQ ID NO:15)、hu9F5VHv2 (SEQ ID NO:16)、hu9F5VHv3 (SEQ ID NO:17)、hu9F5VHv4 (SEQ ID NO:18)、hu9F5VHv5 (SEQ ID NO:19)、hu9F5VHv6 (SEQ ID NO:20)、hu9F5VHv7 (SEQ ID NO:21)、hu9F5VHv8 (SEQ ID NO:22)、hu9F5VHv9 (SEQ ID NO:127)、hu9F5VHv10 (SEQ ID NO:128)、hu9F5VHv10_L82cG (SEQ ID NO:129)、hu9F5VHv4_L80P (SEQ ID NO:109)、hu9F5VHv4_L80D (SEQ ID NO:110)、hu9F5VHv4_L82cG (SEQ ID NO:111)、hu9F5VHv4_L82cD (SEQ ID NO:112)、hu9F5VHv4_L82P (SEQ ID NO:113)、hu9F5VHv4_L80G (SEQ ID NO:114)、hu9F5VHv4_L82K (SEQ ID NO:115)、hu9F5VHv4_L82R (SEQ ID NO:116)、hu9F5VHv4_L82E (SEQ ID NO:117)、hu9F5VHv4_L82N (SEQ ID NO:118)、hu9F5VHv4_Y79D (SEQ ID NO:119)、hu9F5VHv4_Y79N (SEQ ID NO:120)、hu9F5VHv4_Y79G (SEQ ID NO:121)、hu9F5VHv5_M80E (SEQ ID NO:122)、hu9F5VHv5_M80G (SEQ ID NO:123)、hu9F5VHv4_L82Cs (SEQ ID NO:124)、hu9F5VHv4_Y79Q (SEQ ID NO:125)和hu9F5VHv4_S82aG (SEQ ID NO:126)与所例示的成熟轻链可变区hu9F5VLv1 (SEQ ID NO:23)、hu9F5VLv2 (SEQ ID NO:24)、hu9F5VLv3 (SEQ ID NO:25)、hu9F5VLv4 (SEQ ID NO:26)、hu9F5VLv5 (SEQ ID NO:27)、hu9F5VLv6 (SEQ ID NO:28)、hu9F5VLv7 (SEQ ID NO:29)、hu9F5VLv8 (SEQ ID NO:130)、hu9F5VLv9 (SEQ ID NO:131)、hu9F5VLv2_M51E (SEQ ID NO:61)、hu9F5VLv2_M51D (SEQ ID NO:62)、hu9F5VLv2_L27cD (SEQ ID NO:63)、hu9F5VLv2_L27cG (SEQ ID NO:64)、hu9F5VLv2_L27cS (SEQ ID NO:65)、hu9F5VLv2_L27cE (SEQ ID NO:66)、hu9F5VLv2_I30E (SEQ ID NO:67)、hu9F5VLv2_I30K (SEQ ID NO:68)、hu9F5VLv2_L27cT (SEQ ID NO:69)、hu9F5VLv2_L27cN (SEQ ID NO:70)、hu9F5VLv2_L27bD (SEQ ID NO:71)、hu9F5VLv2_I30G、(SEQ ID NO:72)、hu9F5VLv2_L33N (SEQ ID NO:73)、hu9F5VLv2_L27cA (SEQ ID NO:74)、hu9F5VLv2_L33T (SEQ ID NO:75)、hu9F5VLv2_L33S (SEQ ID NO:76)、hu9F5VLv2_L33R (SEQ ID NO:77)、hu9F5VLv2_I30Q (SEQ ID NO:78)、hu9F5VLv2_L27bT (SEQ ID NO:79)、hu9F5VLv2_T31G (SEQ ID NO:80)、hu9F5VLv2_L27bQ (SEQ ID NO:81)、hu9F5VLv2_L33G (SEQ ID NO:82)、hu9F5VLv2_L27cP (SEQ ID NO:83)、hu9F5VLv2_V78R (SEQ ID NO:84)、hu9F5VLv2_I75D (SEQ ID NO:85)、hu9F5VLv2_V78D (SEQ ID NO:86)、hu9F5VLv2_V78E (SEQ ID NO:87)、hu9F5VLv2_V78P (SEQ ID NO:88)、hu9F5VLv2_V78K (SEQ ID NO:89)、hu9F5VLv2_R77D (SEQ ID NO:90)、hu9F5VLv2_V78G (SEQ ID NO:91)、hu9F5VLv2_S76P (SEQ ID NO:92)、hu9F5VLv2_I75P (SEQ ID NO:93)、hu9F5VLv2_I75Q (SEQ ID NO:94)、hu9F5VLv2_I75G (SEQ ID NO:95)、hu9F5VLv2_L73P (SEQ

ID NO:96)、hu9F5VLv2_L73G (SEQ ID NO:97)、hu9F5VLv2_V78Q (SEQ ID NO:98)、hu9F5VLv2_S76G (SEQ ID NO:99)、hu9F5VLv2_L92D (SEQ ID NO:100)、hu9F5VLv2_Y86T (SEQ ID NO:101)、hu9F5VLv2_L92E (SEQ ID NO:102)、hu9F5VLv2_L92G (SEQ ID NO:103)、hu9F5VLv2_L92Q (SEQ ID NO:104)、hu9F5VLv2_L93G (SEQ ID NO:105)、hu9F5VLv2_V85G (SEQ ID NO:106)、hu9F5VLv2_L92T (SEQ ID NO:107)、hu9F5VLv2_A89G (SEQ ID NO:108)、hu9F5VLv8_DIM1 (SEQ ID NO:132)、hu9F5VLv8_DIM2 (SEQ ID NO:133)、hu9F5VLv8_DIM3 (SEQ ID NO:134)、hu9F5VLv8_DIM4 (SEQ ID NO:135)、hu9F5VLv8_DIM5 (SEQ ID NO:136)、hu9F5VLv8_DIM6 (SEQ ID NO:137)、hu9F5VLv8_DIM7 (SEQ ID NO:138)、hu9F5VLv8_DIM8 (SEQ ID NO:139)、hu9F5VLv8_DIM9 (SEQ ID NO:140)、hu9F5VLv8_DIM10 (SEQ ID NO:141)、hu9F5VLv8_DIM11 (SEQ ID NO:142)、hu9F5VLv8_DIM12 (SEQ ID NO:143)、hu9F5VLv8_DIM13 (SEQ ID NO:144)、hu9F5VLv8_DIM14 (SEQ ID NO:145)、hu9F5VLv8_DIM15 (SEQ ID NO:146)、hu9F5VLv8_DIM16 (SEQ ID NO:147)、hu9F5VLv8_DIM17 (SEQ ID NO:148)、hu9F5VLv8_DIM18 (SEQ ID NO:149)、hu9F5VLv8_DIM19 (SEQ ID NO:150)、hu9F5VLv8_DIM20 (SEQ ID NO:151)、hu9F5VLv8_DIM21 (SEQ ID NO:152)、hu9F5VLv8_DIM22 (SEQ ID NO:153)、hu9F5VLv8_DIM23 (SEQ ID NO:154)、hu9F5VLv8_DIM24 (SEQ ID NO:155)、hu9F5VLv8_DIM25 (SEQ ID NO:156)、hu9F5VLv8_DIM26 (SEQ ID NO:157)、hu9F5VLv8_DIM27 (SEQ ID NO:158)、hu9F5VLv8_DIM28 (SEQ ID NO:159)、hu9F5VLv8_DIM29 (SEQ ID NO:160)、hu9F5VLv8_DIM30 (SEQ ID NO:161)、hu9F5VLv9_DIM1 (SEQ ID NO:162)、hu9F5VLv9_DIM2 (SEQ ID NO:163)、hu9F5VLv9_DIM4 (SEQ ID NO:164)、hu9F5VLv9_DIM5 (SEQ ID NO:165)、hu9F5VLv9_DIM8 (SEQ ID NO:166)、hu9F5VLv9_DIM10 (SEQ ID NO:167)、hu9F5VLv9_DIM11 (SEQ ID NO:168)、hu9F5VLv9_DIM13 (SEQ ID NO:169)、hu9F5VLv9_DIM19 (SEQ ID NO:170) 和 hu9F5VLv9_DIM20 (SEQ ID NO:171) 中任一者的任何排列或组合。

[0572] 本发明提供了一种抗体,其中人源化重链可变区hu9F5VHv9 (SEQ ID NO:127) 与人源化轻链可变区hu9F5VLv8_DIM18 (也称为hu9F5VLv8_V3Q、L27cD、L37G、M51G、L54R、L92I, SEQ ID NO:149) 组合。本发明提供了一种抗体,其中人源化重链可变区hu9F5VHv9 (SEQ ID NO:127) 与人源化轻链可变区hu9F5VLv8_DIM11 (也称为hu9F5VLv8_V3Q、L27cG、L37G、M51G、L54R、L92I, SEQ ID NO:142) 组合。本发明提供了一种抗体,其中人源化重链可变区hu9F5VHv9 (SEQ ID NO:127) 与人源化轻链可变区hu9F5VLv8_DIM28 (也称为hu9F5VLv8_V3Q、L27cS、M51G、L54R、L92I, SEQ ID NO:159) 组合。本发明提供了一种抗体,其中人源化重链可变区hu9F5VHv9 (SEQ ID NO:127) 与人源化轻链可变区hu9F5VLv8_DIM17 (也称为hu9F5VLv8_V3Q、L27cS、L37G、M51G、L54T、L92I, SEQ ID NO:148) 组合。

[0573] 本发明提供了一种抗体,其中人源化重链可变区hu9F5VHv9 (SEQ ID NO:127) 与人源化轻链可变区/hu9F5VLv8_DIM6 (也称为hu9F5VLv8_V3Q、L27cD、L37Q、M51G、L54R、L92I, SEQ ID NO:137) 组合。本发明提供了一种抗体,其中人源化重链可变区hu9F5VHv9 (SEQ ID NO:127) 与人源化轻链可变区hu9F5VLv8_DIM14 (也称为hu9F5VLv8_V3Q、L27cG、L37G、M51G、L54T、L92I, SEQ ID NO:145) 组合。本发明提供了一种抗体,其中人源化重链可变区hu9F5VHv9 (SEQ ID NO:127) 与人源化轻链可变区hu9F5VLv8_DIM5 (也称为hu9F5VLv8_V3Q、L27cG、L37Q、M51G、L54R、L92I, SEQ ID NO:136) 组合。本发明提供了一种抗体,其中人源化重链可变区hu9F5VHv9 (SEQ ID NO:127) 与人源化轻链可变区hu9F5VLv8_DIM7 (也称为

hu9F5VLv8_V3Q、L27cD、L37Q、M51K、L54R、L92I,SEQ ID NO:138)组合。

[0574] 本发明提供了一种抗体,其中人源化重链可变区hu9F5VHv9(SEQ ID NO:127)与人源化轻链可变区hu9F5VLv8_DIM27(也称为hu9F5VLv8_V3Q、L37Q、M51G、L54R、L92I,SEQ ID NO:158)组合。本发明提供了一种抗体,其中人源化重链可变区hu9F5VHv9(SEQ ID NO:127)与人源化轻链可变区hu9F5VLv8_DIM12(也称为hu9F5VLv8_V3Q、L27cG、L37G、M51G、L54R、L92G,SEQ ID NO:143)组合。本发明提供了一种抗体,其中人源化重链可变区hu9F5VHv9(SEQ ID NO:127)与人源化轻链可变区hu9F5VLv8_DIM13(也称为hu9F5VLv8_V3Q、L27cG、L37G、M51G、L54R,SEQ ID NO:144)组合。本发明提供了一种抗体,其中人源化重链可变区hu9F5VHv9(SEQ ID NO:127)与人源化轻链可变区hu9F5VLv8_DIM2(也称为hu9F5VLv8_V3Q、L27cS、L37Q、M51G、L54R、L92I,SEQ ID NO:133)组合。

[0575] 本发明提供了一种抗体,其中人源化重链可变区hu9F5VHv9(SEQ ID NO:127)与人源化轻链可变区hu9F5VLv8_DIM29(也称为hu9F5VLv8_V3Q、L27cS、L37Q、L54R、L92I,SEQ ID NO:160)组合。本发明提供了一种抗体,其中人源化重链可变区hu9F5VHv9(SEQ ID NO:127)与人源化轻链可变区/hu9F5VLv8_DIM30(也称为hu9F5VLv8_V3Q、L27cS、L37Q、M51G、L92I,SEQ ID NO:161)组合。本发明提供了一种抗体,其中人源化重链可变区hu9F5VHv9(SEQ ID NO:127)与人源化轻链可变区hu9F5VLv8_DIM8(也称为hu9F5VLv8_V3Q、L27cG、L37Q、M51K、L54R、L92I,SEQ ID NO:139)组合。

[0576] 本发明提供了一种抗体,其中人源化重链可变区hu9F5VHv10(SEQ ID NO:128)与人源化轻链可变区hu9F5VLv9_DIM11(也称为hu9F5VLv9_V3Q、L27cG、L37G、M51G、L54R、L92I,SEQ ID NO:168)组合。

[0577] 本发明提供了9F5人源化抗体的变体,其中人源化成熟重链可变区显示出与hu9F5VHv1(SEQ ID NO:15)、hu9F5VHv2(SEQ ID NO:16)、hu9F5VHv3(SEQ ID NO:17)、hu9F5VHv4(SEQ ID NO:18)、hu9F5VHv5(SEQ ID NO:19)、hu9F5VHv6(SEQ ID NO:20)、hu9F5VHv7(SEQ ID NO:21)、hu9F5VHv8(SEQ ID NO:22)、hu9F5VHv9(SEQ ID NO:127)、hu9F5VHv10(SEQ ID NO:128)、hu9F5VHv10_L82cG(SEQ ID NO:129)、hu9F5VHv4_L80P(SEQ ID NO:109)、hu9F5VHv4_L80D(SEQ ID NO:110)、hu9F5VHv4_L82cG(SEQ ID NO:111)、hu9F5VHv4_L82cD(SEQ ID NO:112)、hu9F5VHv4_L82P(SEQ ID NO:113)、hu9F5VHv4_L80G(SEQ ID NO:114)、hu9F5VHv4_L82K(SEQ ID NO:115)、hu9F5VHv4_L82R(SEQ ID NO:116)、hu9F5VHv4_L82E(SEQ ID NO:117)、hu9F5VHv4_L82N(SEQ ID NO:118)、hu9F5VHv4_Y79D(SEQ ID NO:119)、hu9F5VHv4_Y79N(SEQ ID NO:120)、hu9F5VHv4_Y79G(SEQ ID NO:121)、hu9F5VHv5_M80E(SEQ ID NO:122)、hu9F5VHv5_M80G(SEQ ID NO:123)、hu9F5VHv4_L82Cs(SEQ ID NO:124)、hu9F5VHv4_Y79Q(SEQ ID NO:125)或hu9F5VHv4_S82aG(SEQ ID NO:126)至少90%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性,并且人源化成熟轻链可变区显示出与hu9F5VLv1(SEQ ID NO:23)、hu9F5VLv2(SEQ ID NO:24)、hu9F5VLv3(SEQ ID NO:25)、hu9F5VLv4(SEQ ID NO:26)、hu9F5VLv5(SEQ ID NO:27)、hu9F5VLv6(SEQ ID NO:28)、hu9F5VLv7(SEQ ID NO:29)、hu9F5VLv8(SEQ ID NO:130)、hu9F5VLv9(SEQ ID NO:131)、hu9F5VLv2_M51E(SEQ ID NO:61)、hu9F5VLv2_M51D(SEQ ID NO:62)、hu9F5VLv2_L27cD(SEQ ID NO:63)、hu9F5VLv2_L27cG(SEQ ID NO:64)、hu9F5VLv2_L27cS(SEQ ID NO:65)、hu9F5VLv2_L27cE(SEQ ID NO:66)、hu9F5VLv2_I30E(SEQ ID NO:67)、hu9F5VLv2_I30K(SEQ

ID NO:68)、hu9F5VLv2_L27cT (SEQ ID NO:69)、hu9F5VLv2_L27cN (SEQ ID NO:70)、hu9F5VLv2_L27bD (SEQ ID NO:71)、hu9F5VLv2_I30G、(SEQ ID NO:72)、hu9F5VLv2_L33N (SEQ ID NO:73)、hu9F5VLv2_L27cA (SEQ ID NO:74)、hu9F5VLv2_L33T (SEQ ID NO:75)、hu9F5VLv2_L33S (SEQ ID NO:76)、hu9F5VLv2_L33R (SEQ ID NO:77)、hu9F5VLv2_I30Q (SEQ ID NO:78)、hu9F5VLv2_L27bT (SEQ ID NO:79)、hu9F5VLv2_T31G (SEQ ID NO:80)、hu9F5VLv2_L27bQ (SEQ ID NO:81)、hu9F5VLv2_L33G (SEQ ID NO:82)、hu9F5VLv2_L27cP (SEQ ID NO:83)、hu9F5VLv2_V78R (SEQ ID NO:84)、hu9F5VLv2_I75D (SEQ ID NO:85)、hu9F5VLv2_V78D (SEQ ID NO:86)、hu9F5VLv2_V78E (SEQ ID NO:87)、hu9F5VLv2_V78P (SEQ ID NO:88)、hu9F5VLv2_V78K (SEQ ID NO:89)、hu9F5VLv2_R77D (SEQ ID NO:90)、hu9F5VLv2_V78G (SEQ ID NO:91)、hu9F5VLv2_S76P (SEQ ID NO:92)、hu9F5VLv2_I75P (SEQ ID NO:93)、hu9F5VLv2_I75Q (SEQ ID NO:94)、hu9F5VLv2_I75G (SEQ ID NO:95)、hu9F5VLv2_L73P (SEQ ID NO:96)、hu9F5VLv2_L73G (SEQ ID NO:97)、hu9F5VLv2_V78Q (SEQ ID NO:98)、hu9F5VLv2_S76G (SEQ ID NO:99)、hu9F5VLv2_L92D (SEQ ID NO:100)、hu9F5VLv2_Y86T (SEQ ID NO:101)、hu9F5VLv2_L92E (SEQ ID NO:102)、hu9F5VLv2_L92G (SEQ ID NO:103)、hu9F5VLv2_L92Q (SEQ ID NO:104)、hu9F5VLv2_L93G (SEQ ID NO:105)、hu9F5VLv2_V85G (SEQ ID NO:106)、hu9F5VLv2_L92T (SEQ ID NO:107)、hu9F5VLv2_A89G (SEQ ID NO:108)、hu9F5VLv8_DIM1 (SEQ ID NO:132)、hu9F5VLv8_DIM2 (SEQ ID NO:133)、hu9F5VLv8_DIM3 (SEQ ID NO:134)、hu9F5VLv8_DIM4 (SEQ ID NO:135)、hu9F5VLv8_DIM5 (SEQ ID NO:136)、hu9F5VLv8_DIM6 (SEQ ID NO:137)、hu9F5VLv8_DIM7 (SEQ ID NO:138)、hu9F5VLv8_DIM8 (SEQ ID NO:139)、hu9F5VLv8_DIM9 (SEQ ID NO:140)、hu9F5VLv8_DIM10 (SEQ ID NO:141)、hu9F5VLv8_DIM11 (SEQ ID NO:142)、hu9F5VLv8_DIM12 (SEQ ID NO:143)、hu9F5VLv8_DIM13 (SEQ ID NO:144)、hu9F5VLv8_DIM14 (SEQ ID NO:145)、hu9F5VLv8_DIM15 (SEQ ID NO:146)、hu9F5VLv8_DIM16 (SEQ ID NO:147)、hu9F5VLv8_DIM17 (SEQ ID NO:148)、hu9F5VLv8_DIM18 (SEQ ID NO:149)、hu9F5VLv8_DIM19 (SEQ ID NO:150)、hu9F5VLv8_DIM20 (SEQ ID NO:151)、hu9F5VLv8_DIM21 (SEQ ID NO:152)、hu9F5VLv8_DIM22 (SEQ ID NO:153)、hu9F5VLv8_DIM23 (SEQ ID NO:154)、hu9F5VLv8_DIM24 (SEQ ID NO:155)、hu9F5VLv8_DIM25 (SEQ ID NO:156)、hu9F5VLv8_DIM26 (SEQ ID NO:157)、hu9F5VLv8_DIM27 (SEQ ID NO:158)、hu9F5VLv8_DIM28 (SEQ ID NO:159)、hu9F5VLv8_DIM29 (SEQ ID NO:160)、hu9F5VLv8_DIM30 (SEQ ID NO:161)、hu9F5VLv9_DIM1 (SEQ ID NO:162)、hu9F5VLv9_DIM2 (SEQ ID NO:163)、hu9F5VLv9_DIM4 (SEQ ID NO:164)、hu9F5VLv9_DIM5 (SEQ ID NO:165)、hu9F5VLv9_DIM8 (SEQ ID NO:166)、hu9F5VLv9_DIM10 (SEQ ID NO:167)、hu9F5VLv9_DIM11 (SEQ ID NO:168)、hu9F5VLv9_DIM13 (SEQ ID NO:169)、hu9F5VLv9_DIM19 (SEQ ID NO:170)或hu9F5VLv9_DIM20 (SEQ ID NO:171)至少90%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。在一些此类抗体中,SEQ ID NO:15-22、109-129、SEQ ID NO:23-29、SEQ ID NO:61-108和SEQ ID NO:130-171中的至少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、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或全部62个经受回复突变或其他突变的位置以其他方式回复突变或以其他方式突变。

[0578] 在一些人源化9F5抗体中,VH区中的以下位置中的至少一者被指定的氨基酸占据:

H1被E占据,H17被T占据,H20被I占据,H69被M占据,H75被T占据,H93被T占据,H94被T占据,并且H109被V占据。在一些人源化9F5抗体中,位置H1、H17、H20、H69、H75、H94和H109分别被E、T、I、M、T、T和V占据。

[0579] 在一些人源化9F5抗体中,VH区中的以下位置中的至少一者被指定的氨基酸占据:H66被R占据,并且H81被E占据。在一些人源化9F5抗体中,位置H66和H81分别被R和E占据。

[0580] 在一些人源化9F5抗体中,VH区中的以下位置中的至少一者被指定的氨基酸占据:H23被I占据,并且H83被R占据。在一些人源化9F5抗体中,位置H23和H83分别被K和R占据。

[0581] 在一些人源化9F5抗体中,VH区中的以下位置中的至少一者被指定的氨基酸占据:H43被K占据,H51被V占据,H76被D占据,M80被M占据,并且H108被L占据。在一些人源化9F5抗体中,位置H43、H51、H76、H80和H108分别被K、V、D、M和L占据。

[0582] 在一些人源化9F5抗体中,VH区的位置H28被T占据。

[0583] 在一些人源化9F5抗体中,VH区中的以下位置中的至少一者被指定的氨基酸占据:H54被D占据,并且H56被E占据。在一些人源化9F5抗体中,位置H54和H56分别被D和E占据。

[0584] 在一些人源化9F5抗体中,VH区中的位置H40被A占据。在一些人源化9F5抗体中,VH区中的以下位置中的至少一者被指定的氨基酸占据:H5被V占据,H11被V占据,H12被K占据,H38被R占据,并且H42被G占据。

[0585] 在一些人源化9F5抗体中,位置H5、H11、H12、H38和H42分别被V、V、K、R和G占据。

[0586] 在一些人源化9F5抗体中,VH区中的以下位置中的至少一者被指定的氨基酸占据:H1被Q或E占据,H5被Q或V占据,H11被L或V占据,H12被V或K占据,H17被S或T占据,H20被L或I占据,H23被T或K占据,H28被N或T占据,H38被K、R或Q占据,H40被R或A占据,H42被E或G占据,H43被Q或K占据,H48被I或M占据,H51被I或V占据,H54被N或D占据,H56被D或E占据,H66被K或R占据,H69被I或M占据,H75被S或T占据,H76被N或D占据,H79被Y、Q、D、N或G占据,H80被L、M、P、D、G或E占据,H81被Q或E占据,H82被L、P、K、R、E或N占据,H82a被S或G占据,H82c被L、G、D或S占据,H83被T或R占据,H93被A或T占据,H94被S或T占据,H108被T或L占据,H109被L或V占据。

[0587] 在一些人源化9F5抗体中,VH区中的位置H1、H17、H20、H69、H75、H93、H94和H109分别被E、T、I、M、T、T和V占据,如在hu9F5VHv2中。在一些人源化9F5抗体中,VH区的位置H1、H17、H20、H66、H69、H75、H81、H93、H94和H109分别被E、T、I、R、M、T、E、T、T和V占据,如在hu9F5VHv3中。在一些人源化9F5抗体中,VH区中的位置H1、H17、H20、H23、H28、H66、H69、H75、H81、H83、H93、H94和H109分别被E、T、I、K、T、R、M、T、E、R、T、T和V占据,如在hu9F5VHv4中。在一些人源化9F5抗体中,VH区中的位置H1、H17、H20、H23、H28、H43、H51、H54、H56、H66、H69、H75、H76、H80、H81、H83、H93、H94、H108和H109分别被E、T、I、K、T、K、V、D、E、R、M、T、D、M、E、R、T、T、L和V占据,如在hu9F5VHv5中。在一些人源化9F5抗体中,VH区中的位置H1、H17、H20、H23、H28、H40、H43、H48、H51、H54、H56、H66、H69、H75、H76、H80、H81、H83、H93、H94、H108和H109分别被E、T、I、K、T、A、K、M、V、D、E、R、M、T、D、M、E、R、T、T、L和V占据,如在hu9F5VHv6中。在一些人源化9F5抗体中,VH区中的位置H1、H5、H11、H12、H17、H20、H23、H38、H40、H42、H43、H51、H54、H56、H66、H69、H75、H76、H80、H81、H83、H93、H94、H108和H109分别被E、V、V、K、T、I、K、R、A、G、K、V、D、E、R、M、T、D、M、E、R、T、T、L和V占据,如在hu9F5VHv7中。在一些人源化9F5抗体中,VH区中的位置H1、H5、H11、H12、H17、H20、H23、H38、H40、H42、H43、H51、H66、H69、H75、

H76、H80、H81、H83、H93、H94、H108和H109分别被E、V、V、K、T、I、K、R、A、G、K、V、R、M、T、D、M、E、R、T、T、L和V占据,如在hu9F5VHv8中。在一些人源化9F5抗体中,VH区中的位置H1、H5、H11、H12、H17、H20、H23、H38、H42、H43、H66、H69、H75、H80、H81、H83、H93、H94、H108和H109分别被E、V、V、K、T、I、K、Q、G、K、R、M、T、M、E、R、T、T、L和V占据,如在hu9F5VHv9中。在一些人源化9F5抗体中,重链可变区包含SEQ ID NO:127的氨基酸序列。

[0588] 在一些人源化9F5抗体中,VH区中的位置H1、H5、H11、H12、H17、H20、H23、H38、H42、H43、H66、H69、H75、H80、H81、H83、H93、H94、H108和H109分别被E、V、V、K、T、I、K、K、E、K、R、M、T、M、E、R、T、T、L和V占据,如在hu9F5VHv10中。在一些人源化9F5抗体中,重链可变区包含SEQ ID NO:128的氨基酸序列。

[0589] 在一些人源化9F5抗体中,VH区中的位置H1、H5、H11、H12、H17、H20、H23、H38、H42、H43、H66、H69、H75、H80、H81、H82c、H83、H93、H94、H108和H109分别被E、V、V、K、T、I、K、K、E、K、R、M、T、M、E、G、R、T、T、L和V占据,如在hu9F5VHv10_L82cG中。

[0590] 在一些人源化9F5抗体中,VL区中的以下位置中的至少一者被指定的氨基酸占据:L7被S占据,L8被P占据,L15被P占据,并且L100被Q占据。在一些人源化9F5抗体中,在一些人源化9F5抗体中,位置L7、L8、L15和L100分别被S、P、P和Q占据。

[0591] 在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L66被G占据。在一些人源化9F5抗体中,VL区的位置L64被S占据。

[0592] 在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L17被E占据。

[0593] 在一些人源化9F5抗体中,VL区中的以下位置中的至少一者被指定的氨基酸占据:L11被L占据,L51被G占据,并且L54被R占据。在一些人源化9F5抗体,位置L11、L51和L54分别被L、G和R占据。

[0594] 在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L30被Y占据。

[0595] 在一些人源化9F5抗体中,VL区中的以下位置中的至少一者被指定的氨基酸占据:L3被V或Q占据,L7被A或S占据,L8被A或P占据,L9被F或L占据,L11被N或L占据,L15被L或P占据,L17被T或E占据,L18被S或P占据,L27b被L、D、T或Q占据,L27c被L、D、G、S、E、T、N、A、P或I占据,L30被I、Y、E、K、G或Q占据,L31被T、N或G占据,L33被L、N、T、S、R或G占据,L37被L、Q、G或I占据,L39被R或K占据,L51被M、G、E、D、K或I占据,L54被L、R、G或T占据,L60被N或D占据,L64被G或S占据,L66被E或G占据,L73被L、P或G占据,L74被R或K占据,L75被I、D、P、Q或G占据,L76被S、P或G占据,L77被SEQ ID NO:146或D占据,L78被V、R、D、E、P、K、G或Q占据,L85被V或G占据,L86被Y或T占据,L89被A或G占据,L92被L、D、E、G、Q、T或I占据,L93被E或G占据,L100被G或Q占据。

[0596] 在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L64和L66分别被S和G占据,如在hu9F5VLv1中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L7、L8、L15、L64、L66和L100分别被S、P、P、S、G和Q占据,如在hu9F5VLv2中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L7、L8、L15、L17、L66和L100分别被S、P、P、E、G和Q占据,如在hu9F5VLv3中。

[0597] 在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L7、L8、L11、L15、L17、L51、L54、L66和L100分别被S、P、L、P、E、G、R、G和Q占据,如在hu9F5VLv4中。在一些人源化9F5抗体中,轻链可变区包含SEQ ID NO:133、135-137、142-144、149、158、159和168中任一者的氨基酸序列。在一些人源化9F5抗体中,轻链可变区包含SEQ ID NO:133的氨基酸序列。在一些人源化9F5抗体

中,轻链可变区包含SEQ ID NO:137的氨基酸序列。在一些人源化9F5抗体中,轻链可变区包含SEQ ID NO:149的氨基酸序列。在一些人源化9F5抗体中,轻链可变区包含SEQ ID NO:159的氨基酸序列。

[0598] 在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L7、L8、L11、L15、L17、L30、L51、L54、L66和L100分别被S、P、L、P、E、Y、G、R、G和Q占据,如在hu9F5VLv5中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L7、L8、L11、L15、L17、L30、L51、L54和L100分别被S、P、L、P、E、Y、G、R和Q占据,如在hu9F5VLv6中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L7、L8、L9、L11、L15、L17、L18、L31、L39、L51、L54、L60、L66、L74和L100分别被S、P、L、L、P、E、P、N、K、G、R、D、G、K和Q占据,如在hu9F5VLv7中。

[0599] 在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L7、L8、L11、L15、L17、L39、L64、L66、L74和L100分别被S、P、L、P、E、K、S、G、K和Q占据,如在hu9F5VLv8中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L3被Q占据。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L27c被D、G、I、L或S占据,VL区中的位置L37被G、I、L或Q占据,VL区中的位置L51被E、G、I、K或M占据,VL区中的位置L54被G、L、R或T占据,并且VL区中的位置L92被G、I或L占据。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L27c被D或S占据,VL区中的位置L37被G、L或Q占据,VL区中的位置L51被G或K占据,VL区中的位置L54被R占据,并且VL区中的位置L92被I占据。

[0600] 在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L27c被D占据,VL区中的位置L37被G占据,并且VL区中的位置L51被G占据。在一些人源化9F5抗体中,重链可变区具有包含SEQ ID NO:127的氨基酸序列,并且轻链可变区具有包含SEQ ID NO:149的氨基酸序列。

[0601] 在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L27c被D占据,VL区中的位置L37被Q占据,并且VL区中的位置L51被G占据。在一些人源化9F5抗体中,重链可变区具有包含SEQ ID NO:127的氨基酸序列,并且轻链可变区具有包含SEQ ID NO:137的氨基酸序列。

[0602] 在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L27c被S占据,VL区中的位置L37被L占据,并且VL区中的位置L51被G占据。在一些人源化9F5抗体中,重链可变区具有包含SEQ ID NO:127的氨基酸序列,并且轻链可变区具有包含SEQ ID NO:159的氨基酸序列。

[0603] 在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L27c被D占据,VL区中的位置L37被Q占据,并且VL区中的位置L51被K占据。在一些人源化9F5抗体中,重链可变区具有包含SEQ ID NO:127的氨基酸序列,并且轻链可变区具有包含SEQ ID NO:138的氨基酸序列。

[0604] 在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L27c被S占据,VL区中的位置L37被Q占据,并且VL区中的位置L51被G占据。在一些人源化9F5抗体中,重链可变区具有包含SEQ ID NO:127的氨基酸序列,并且轻链可变区具有包含SEQ ID NO:133的氨基酸序列。

[0605] 在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L7、L8、L11、L15、L17、L39、L60、L64、L66、L74和L100分别被S、P、L、P、E、K、D、S、G、K和Q占据,如在hu9F5VLv9中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L3被Q占据。

[0606] 在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L27c被G或S占据,VL区中的位置L37被G、I或Q占据,VL区中的位置L51被G、I或K占据,VL区中的位置L54被G或R占据,并且VL区中的位置L92位被G、I或L占据。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L27c被G占据,VL区中的位置L37被G占据,VL区中的位置L51被G占据,并且VL区中的位置L54被R占据。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L92被I占据。在一些人源化9F5抗体中,重链可变区具有包含SEQ

ID NO:129的氨基酸序列,并且轻链可变区具有包含SEQ ID NO:168的氨基酸序列。

[0607] 可对上文提及的任何抗体的轻链可变区进行修饰以进一步降低免疫原性。例如,在一些人源化抗体中,VL区中的L27b位置被D、T或Q占据;VL区中的L27c位置被D、G、S、E、T、N、A、I或P占据;VL区中的L30位置被E、K、G或Q占据;VL区中的位置L31被G占据;VL区中的位置L33被N、T、S、R或G占据;VL区中的位置L37被Q、G或I占据;VL区中的位置L51被E、D、G、K或I占据;VL区中的位置L54被G、R或T占据;VL区中的位置L60被D占据;VL区中的位置L73被P或G占据;VL区中的位置L75被D、P、Q或G占据;VL区中的位置L76被P或G占据;VL区中的位置L77被D占据;VL区中的位置L78被R、D、E、P、K、G或Q占据;VL区中的位置L85被G占据;VL区中的位置L86被T占据;VL区中的位置L89被G占据;VL区中的位置L92被D、E、G、Q、I、或T占据;和/或VL区中的L93位置被G占据(Kabat编号)。

[0608] 在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L51被E占据,如在hu9F5VLv2_M51E中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L51被D占据,如在hu9F5VLv2_M51D中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L27c被D占据,如在hu9F5VLv2_L27cD中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L27c被G占据,如在hu9F5VLv2_L27cG中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L27c被S占据,如在hu9F5VLv2_L27cS中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L27c被E占据,如在hu9F5VLv2_L27cE中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L30被E占据,如在hu9F5VLv2_I30E中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L30被K占据,如在hu9F5VLv2_I30K中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L27c被T占据,如在hu9F5VLv2_L27cT中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L27c被N占据,如在hu9F5VLv2_L27cN中。

[0609] 在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L27b被D占据,如在hu9F5VLv2_L27bD中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L30被G占据,如在hu9F5VLv2_I30G中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L33被N占据,如在hu9F5VLv2_L33N中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L27c被A占据,如在hu9F5VLv2_L27cA中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L33被T占据,如在hu9F5VLv2_L33T中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L33被S占据,如在hu9F5VLv2_L33S中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L33被R占据,如在hu9F5VLv2_L33R中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L30被Q占据,如在hu9F5VLv2_I30Q中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L27b被T占据,如在hu9F5VLv2_L27bT中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L31被G占据,如在hu9F5VLv2_T31G中。

[0610] 在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L27b被Q占据,如在hu9F5VLv2_L27bQ中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L33被G占据,如在hu9F5VLv2_L33G中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L27c被P占据,如在hu9F5VLv2_L27cP中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L78被R占据,如在hu9F5VLv2_V78R中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L75被D占据,如在hu9F5VLv2_I75D中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L78被D占据,如在hu9F5VLv2_V78D中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L78被E占据,如在hu9F5VLv2_V78E中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L78被P占据,如在hu9F5VLv2_V78P中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L78被K占据,如在hu9F5VLv2_V78K中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L77被D占据,如在hu9F5VLv2_R77D中。

[0611] 在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L78被G占据,如在hu9F5VLv2_V78G中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L76被P占据,如在hu9F5VLv2_S76P中。在一些人源化

9F5抗体中,VL区中的位置L75被P占据,如在hu9F5VLv2_I75P中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L75被Q占据,如在hu9F5VLv2_I75Q中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L75被G占据,如在hu9F5VLv2_I75G中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L73被P占据,如在hu9F5VLv2_L73P中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L73被G占据,如在hu9F5VLv2_L73G中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L78被Q占据,如在hu9F5VLv2_V78Q中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L76被G占据,如在hu9F5VLv2_S76G中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L92被D占据,如在hu9F5VLv2_L92D中。

[0612] 在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L86被T占据,如在hu9F5VLv2_Y86T中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L92被E占据,如在hu9F5VLv2_L92E中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L92被G占据,如在hu9F5VLv2_L92G中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L92被Q占据,如在hu9F5VLv2_L92Q中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L93被G占据,如在hu9F5VLv2_L93G中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L85被G占据,如在hu9F5VLv2_V85G中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L92被T占据,如在hu9F5VLv2_L92T中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L89被G占据,如在hu9F5VLv2_A89G中。

[0613] 在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、S、Q、G、G和I占据,如在hu9F5VLv8_V3Q、L27cS、L37Q、M51G、L54G、L92I(也称为hu9F5VLv8_DIM1)中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92被Q、S、Q、G、R和I占据,hu9F5VLv8_V3Q、L27cS、L37Q、M51G、L54R、L92I(也称为hu9F5VLv8_DIM2)。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、S、Q、G、T和I占据,如在hu9F5VLv8_V3Q、L27cS、L37Q、M51G、L54T、L92I(也称为hu9F5VLv8_DIM3)中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、S、Q、G、R和G占据,如在hu9F5VLv8_V3Q、L27cS、L37Q、M51G、L54R、L92G(也称为hu9F5VLv8_DIM4)中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、G、Q、G、R和I占据,如在hu9F5VLv8_V3Q、L27cG、L37Q、M51G、L54R、L92I(也称为hu9F5VLv8_DIM5)中。

[0614] 在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、D、Q、G、R和I占据,如在hu9F5VLv8_V3Q、L27cD、L37Q、M51G、L54R、L92I(也称为hu9F5VLv8_DIM6)中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、D、Q、K、R和I占据,如在hu9F5VLv8_V3Q、L27cD、L37Q、M51K、L54R、L92I(也称为hu9F5VLv8_DIM7)中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、G、Q、K、R和I占据,如在hu9F5VLv8_V3Q、L27cG、L37Q、M51K、L54R、L92I(也称为hu9F5VLv8_DIM8)中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、G、Q、K、G和I占据,如在hu9F5VLv8_V3Q、L27cG、L37Q、M51K、L54G、L92I(也称为hu9F5VLv8_DIM9)中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、S、Q、K、G和I占据,如在hu9F5VLv8_V3Q、L27cS、L37Q、M51K、L54G、L92I(也称为hu9F5VLv8_DIM10)中。

[0615] 在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、G、G、G、R和I占据,如在hu9F5VLv8_V3Q、L27cG、L37G、M51G、L54R、L92I(也称为hu9F5VLv8_DIM11)中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、G、

G、G、R和G占据,如在hu9F5VLv8_V3Q、L27cG、L37G、M51G、L54R、L92G(也称为hu9F5VLv8_DIM12)中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51和L54分别被Q、G、G、G和R占据,如在hu9F5VLv8_V3Q、L27cG、L37G、M51G、L54R(也称为hu9F5VLv8_DIM13)中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、G、G、G、T和I占据,如在hu9F5VLv8_V3Q、L27cG、L37G、M51G、L54T、L92I(也称为hu9F5VLv8_DIM14)中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、G、G、G、T和G占据,如在hu9F5VLv8_V3Q、L27cG、L37G、M51G、L54T、L92G(也称为hu9F5VLv8_DIM15)中。

[0616] 在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51和L54分别被Q、G、G、G和T占据,如在hu9F5VLv8_V3Q、L27cG、L37G、M51G、L54T(也称为hu9F5VLv8_DIM16)中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、S、G、G、T和I占据,如在hu9F5VLv8_V3Q、L27cS、L37G、M51G、L54T、L92I(也称为hu9F5VLv8_DIM17)中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、D、G、G、R和I占据,如在hu9F5VLv8_V3Q、L27cD、L37G、M51G、L54R、L92I(也称为hu9F5VLv8_DIM18)中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、S、I、I、R和I占据,如在hu9F5VLv8_V3Q、L27cS、L37I、M51I、L54R、L92I(也称为hu9F5VLv8_DIM19)中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、S、Q、I、G和I占据,如在hu9F5VLv8_V3Q、L27cS、L37Q、M51I、L54G、L92I(也称为hu9F5VLv8_DIM20)中。

[0617] 在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51和L54分别被Q、S、Q、I和G占据,如在hu9F5VLv8_V3Q、L27cS、L37Q、M51I、L54G(也称为hu9F5VLv8_DIM21)中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、S、Q、E、R和I占据,如在hu9F5VLv8_V3Q、L27cS、L37Q、M51E、L54R、L92I(也称为hu9F5VLv8_DIM22)中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、G、Q、E、G和I占据,如在hu9F5VLv8_V3Q、L27cG、L37Q、M51E、L54G、L92I(也称为hu9F5VLv8_DIM23)中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92L分别被Q、G、I、E、R和I占据,如在hu9F5VLv8_V3Q、L27cG、L37I、M51E、L54R、L92I(也称为hu9F5VLv8_DIM24)中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、G、I、E、R和G占据,如在hu9F5VLv8_V3Q、L27cG、L37I、M51E、L54R、L92G(也称为hu9F5VLv8_DIM25)中。

[0618] 在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51和L54分别被Q、I、I、E和R占据,如在hu9F5VLv8_V3Q、L27cI、L37I、M51E、L54R(也称为hu9F5VLv8_DIM26)中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L3、L37、L51、L54和L92分别被Q、Q、G、R和I占据,如在hu9F5VLv8_V3Q、L37Q、M51G、L54R、L92I(也称为hu9F5VLv8_DIM27)中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L51、L54和L92分别被Q、S、G、R和I占据,如在hu9F5VLv8_V3Q、L27cS、M51G、L54R、L92I(也称为hu9F5VLv8_DIM28)中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L54和L92分别被Q、S、Q、R和I占据,如在hu9F5VLv8_V3Q、L27cS、L37Q、L54R、L92I(也称为hu9F5VLv8_DIM29)中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51和L92分别被Q、S、Q、G和I占据,如在hu9F5VLv8_V3Q、L27cS、L37Q、M51G、L92I(也称为hu9F5VLv8_DIM30)中。

[0619] 在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、S、Q、G、G和I占据,如在hu9F5VLv9_V3Q、L27cS、L37Q、M51G、L54G、L92I(也称为hu9F5VLv9_

DIM1) 中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、S、Q、G、R和I占据,如在hu9F5VLv9_V3Q、L27cS、L37Q、M51G、L54R、L92I(也称为hu9F5VLv9_DIM2)中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、S、Q、G、R和G占据,如在hu9F5VLv9_V3Q、L27cS、L37Q、M51G、L54R、L92G(也称为hu9F5VLv9_DIM4)中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、G、Q、G、R和I占据,如在hu9F5VLv9_V3Q、L27cG、L37Q、M51G、L54R、L92I(也称为hu9F5VLv9_DIM5)中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、G、Q、K、R和I占据,如在hu9F5VLv9_V3Q、L27cG、L37Q、M51K、L54R、L92I(也称为hu9F5VLv9_DIM8)中。

[0620] 在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、S、Q、K、G和I占据,如在hu9F5VLv9_V3Q、L27cS、L37Q、M51K、L54G、L92I(也称为hu9F5VLv9_DIM10)中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、G、G、G、R和I占据,如在hu9F5VLv9_V3Q、L27cG、L37G、M51G、L54R、L92I(也称为hu9F5VLv9_DIM11)中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51和L54分别被Q、G、G、G和R占据,如在hu9F5VLv9_V3Q、L27cG、L37G、M51G、L54R(也称为hu9F5VLv9_DIM13)中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、S、I、I、R和I占据,如在hu9F5VLv9_V3Q、L27cS、L37I、M51I、L54R、L92I(也称为hu9F5VLv9_DIM19)中。在一些人源化9F5抗体中,VL区中的位置L3、L27c、L37、L51、L54和L92分别被Q、S、Q、I、G和I占据,如在hu9F5VLv9_V3Q、L27cS、L37Q、M51I、L54G、L92I(也称为hu9F5VLv9_DIM20)中。

[0621] 还可对上文提及的任何抗体的重链可变区进行修饰以进一步降低免疫原性。举例来说,在一些人源化抗体中,位置H79被D、N、G或Q占据;位置H80被P、D、E或G占据;位置H82被P、K、R、E或N占据;位置H82a被G占据;和/或位置H82c被G、D或S占据。

[0622] 在一些人源化9F5抗体中,位置H80被P占据,如在hu9F5VHv4_L80P中。在一些人源化9F5抗体中,位置H80被D占据,如在hu9F5VHv4_L80D中。在一些人源化9F5抗体中,位置H82c被G占据,如在hu9F5VHv4_L82cG和hu9F5VHv10_L82cG中。在一些人源化9F5抗体中,位置H82c被D占据,如在hu9F5VHv4_L82cD中。在一些人源化9F5抗体中,位置H82被P占据,如在hu9F5VHv4_L82P中。在一些人源化9F5抗体中,位置H80被G占据,如在hu9F5VHv4_L80G中。在一些人源化9F5抗体中,位置H82被K占据,如在hu9F5VHv4_L82K中。在一些人源化9F5抗体中,位置H82被R占据,如在hu9F5VHv4_L82R中。在一些人源化9F5抗体中,位置H82被E占据,如在hu9F5VHv4_L82E中。在一些人源化9F5抗体中,位置H82被N占据,如在hu9F5VHv4_L82N中。

[0623] 在一些人源化9F5抗体中,位置H79被D占据,如在hu9F5VHv4_Y79D中。在一些人源化9F5抗体中,位置H79被N占据,如在hu9F5VHv4_Y79N中。在一些人源化9F5抗体中,位置H79被G占据,如在hu9F5VHv4_Y79G中。在一些人源化9F5抗体中,位置H80被E占据,如在hu9F5VHv5_M80E中。在一些人源化9F5抗体中,位置H80被G占据,如在hu9F5VHv5_M80G中。在一些人源化9F5抗体中,位置H82c被S占据,如在hu9F5VHv4_L82cS中。在一些人源化9F5抗体中,位置H79被Q占据,如在hu9F5VHv4_Y79Q中。在一些人源化9F5抗体中,位置H82a被G占据,如在hu9F5VHv4_S82aG中。

[0624] 在一些人源化9F5抗体中,可变重链与人序列具有 $\geq 85\%$ 的同一性。在一些人源化

9F5抗体中,可变轻链与人序列具有 $\geq 85\%$ 的同一性。在一些人源化9F5抗体中,可变重链和可变轻链中的每一者与人种系序列具有 $\geq 85\%$ 的同一性。在一些人源化9F5抗体中,三个重链CDR如由Kabat/Chothia复合物所定义(SEQ ID NO:8、9和10),并且三个轻链CDR如由Kabat/Chothia复合物所定义(SEQ ID NO:12、13和14);条件是位置H28被N或T占据;位置H51被I或V占据;位置H54被N或D占据;位置H56被D或E占据;位置L27b被L、D、T或Q占据;位置L27c被L、D、G、S、E、T、N、A、P或I占据;位置L30被I、Y、E、K、G或Q占据;位置L31被T、N或G占据;位置L33被L、N、T、S、R或G占据;位置L51被M、G、E、D、K或I占据;位置L54被L、R、G或T占据;位置L89被A或G占据;位置L92被L、D、E、G、Q、T或I占据,并且位置L93被E或G占据。

[0625] 在一些人源化9F5抗体中,Kabat-Chothia复合物CDR-H1具有包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列。在一些人源化9F5抗体中,Kabat CDR-H2具有包含SEQ ID NO:51或SEQ ID NO:52的氨基酸序列。在一些人源化9F5抗体中,Kabat CDR-L1具有包含SEQ ID NO:53或SEQ ID NO:54的氨基酸序列。在一些人源化9F5抗体中,Kabat CDR-L2具有包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列。在一些人源化9F5抗体中,Kabat CDR-L1具有选自由SEQ ID NO:172-193组成的组的氨基酸序列。在一些人源化9F5抗体中,Kabat CDR-L2具有选自由SEQ ID NO:194-205组成的组的氨基酸序列。在一些人源化9F5抗体中,Kabat CDR-L3具有选自由SEQ ID NO:206-213组成的组的氨基酸序列。

[0626] 示例性人源化抗体包括小鼠10C12的人源化形式,命名为Hu10C12。

[0627] 小鼠抗体10C12包括成熟的重链和轻链可变区,所述成熟的重链和轻链可变区分别具有包含SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:11的氨基酸序列。本发明提供了2个所例示的人源化成熟重链可变区:hu10C12VHv1和hu10C12VHv2。本发明还提供了2个所例示的成熟轻链可变区:hu10C12VLv1和hu10C12VLv2。图7和图8分别示出鼠10C12和各种人源化抗体的重链可变区和轻链可变区的比对。

[0628] 出于诸如可能影响CDR构象和/或与抗原的结合、介导重链与轻链之间的相互作用、与恒定区的相互作用、是期望或不期望的翻译后修饰的位点、是其在人可变区序列中的位置的不常见残基且因此潜在地具有免疫原性、降低聚集潜力以及其他原因之类的原因,以下9个可变区框架位置被认为是用于2个所例示的人成熟轻链可变区和2个所例示的人成熟重链可变区中的取代候选,如实施例中进一步指定的:L64(G64S)、L104(V104L)、H1(Q1E)、H24(V24A)、H48(M48I)、H67(V67A)、H69(I69M)、H93(A93T)和H94(R94T)。

[0629] 此处,与其他地方一样,第一个提到的残基是通过将Kabat CDR或复合物Chothia-Kabat CDR(在CDR-H1的情况下)接枝到人受体框架中而形成的人源化抗体的残基,并且第二个提到的残基是考虑替换这一残基的残基。因此,在可变区框架内,第一个提到的残基是人,并且在CDR内,第一个提到的残基是小鼠。

[0630] 所例示的抗体包括所例示的成熟重链和轻链可变区的任何排列或组合:hu10C12VHv1/hu10C12VLv1、hu10C12VHv1/hu10C12VLv2、hu10C12VHv2/hu10C12VLv1、hu10C12VHv2/hu10C12VLv2。

[0631] 所例示的抗体包括所例示的成熟重链可变区hu10C12VHv1(SEQ ID NO:214)和hu10C12VHv2(SEQ ID NO:215)与所例示的成熟轻链可变区hu10C12VLv1(SEQ ID NO:216)和hu10C12VLv2(SEQ ID NO:217)中任一者的任何排列或组合。

[0632] 本发明提供了10C12人源化抗体的变体,其中人源化成熟重链可变区显示出与

hu10C12VHv1 (SEQ ID NO:214) 或 hu10C12VHv2 (SEQ ID NO:215) 至少 90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的同一性, 并且人源化成熟轻链可变区显示出与 hu10C12VLv1 (SEQ ID NO:216) 或 hu10C12VLv2 (SEQ ID NO:217) 至少 90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的同一性。在一些此类抗体中, 保留了 SEQ ID NO:214-215 和 SEQ ID NO:216-217) 中的至少 1、2、3、4、5、6、7、8 或全部 9 个回复突变或其他突变。

[0633] 在一些人源化 10C12 抗体中, VH 区中的以下位置中的至少一者被指定的氨基酸占据: H24 被 A 占据, H48 被 I 占据, H67 被 A 占据, H69 被 M 占据, H93 被 T 占据, 并且 H94 被 T 占据。在一些人源化 10C12 抗体中, 位置 H24、H48、H67、H69、H93 和 H94 分别被 A、I、A、M、T 和 T 占据。

[0634] 在一些人源化 10C12 抗体中, VH 区中的以下位置中的至少一者被指定的氨基酸占据: H1 被 Q 或 E 占据, H24 被 A 占据, H48 被 I 占据, H67 被 A 占据, H69 被 M 占据, H93 被 T 占据, H94 被 T 占据。

[0635] 在一些人源化 10C12 抗体中, 位置 H24、H48、H67、H69、H93 和 H94 分别被 A、I、A、M、T 和 T 取代, 如在 hu10C12VHv1 中。在一些人源化 10C12 抗体中, 位置 H1、H24、H48、H67、H69、H93 和 H94 分别被 E、A、I、A、M、T 和 T 取代, 如在 hu10C12VHv2 中。

[0636] 在一些人源化 10C12 抗体中, VL 区中的位置 L64 被 S 占据。

[0637] 在一些人源化 10C12 抗体中, VL 区中的以下位置中的至少一者被指定的氨基酸占据: L64 被 S 占据, L104 被 V 或 L 占据。

[0638] 在一些人源化 10C12 抗体中, VL 区中的位置 L64 和 L104 被 S 占据, 如在 hu10C12VLv1 中。在一些人源化 10C12 抗体中, VL 区中的位置 L64 和 L104 分别被 S 和 L 占据, 如在 hu10C12VLv2 中。

[0639] 在一些人源化 10C12 抗体中, 可变重链与人序列具有 $\geq 85\%$ 的同一性。在一些人源化 10C12 抗体中, 可变轻链与人序列具有 $\geq 85\%$ 的同一性。在一些人源化 10C12 抗体中, 可变重链和可变轻链中的每一者与人种系序列具有 $\geq 85\%$ 的同一性。在一些人源化 10C12 抗体中, 三个重链 CDR 如由 Kabat/Chothia 复合物所定义 (SEQ ID NO:8、9 和 10), 并且三个轻链 CDR 如由 Kabat/Chothia 复合物所定义 (SEQ ID NO:12、13 和 14)。

[0640] 示例性人源化抗体包括小鼠 12C4 的人源化形式, 命名为 Hu12C4。

[0641] 小鼠抗体 12C4 包括成熟的重链和轻链可变区, 所述成熟的重链和轻链可变区分别具有包含 SEQ ID NO:219 和 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列。本发明提供了 2 个所例示的人源化成熟重链可变区: hu12C4VHv1 和 hu12C4VHv2。本发明还提供了 2 个所例示的成熟轻链可变区: hu12C4VLv1 和 hu12C4VLv2。图 9 和图 10 分别示出鼠 12C4 和各种人源化抗体的重链可变区和轻链可变区的比对。

[0642] 出于诸如可能影响 CDR 构象和/或与抗原的结合、介导重链与轻链之间的相互作用、与恒定区的相互作用、是期望或不期望的翻译后修饰的位点、是其在人可变区序列中的位置的不常见残基且因此潜在地具有免疫原性、获得聚集潜力以及其他原因之类的原因, 以下 6 个可变区框架位置被认为是用于 2 个所例示的人成熟轻链可变区和 2 个所例示的人成熟重链可变区中的取代候选, 如实施例进一步指定的: L64 (G64S)、L104 (V104L)、H1 (Q1E)、H48 (M48I)、H93 (A93T) 和 H94 (R94T)。

[0643] 此处, 与其他地方一样, 第一个提到的残基是通过将 Kabat CDR 或复合物 Chothia-Kabat CDR (在 CDR-H1 的情况下) 接枝到人受体框架中而形成的人源化抗体的残基, 并且第

二个提到的残基是考虑替换这一残基的残基。因此,在可变区框架内,第一个提到的残基是人,并且在CDR内,第一个提到的残基是小鼠。

[0644] 所例示的抗体包括所例示的成熟重链和轻链可变区的任何排列或组合: hu12C4VHv1/hu12C4VLv1、hu12C4VHv1/hu12C4VLv2、hu12C4VHv2/hu12C4VLv1、hu12C4VHv2/hu12C4VLv2。

[0645] 所例示的抗体包括所例示的成熟重链可变区hu12C4VHv1 (SEQ ID NO:221) 和 hu12C4VHv2 (SEQ ID NO:222) 与所例示的成熟轻链可变区hu12C4VLv1 (SEQ ID NO:223) 和 hu12C4VLv2 (SEQ ID NO:224) 中任一者的任何排列或组合。

[0646] 本发明提供了12C4人源化抗体的变体,其中人源化成熟重链可变区显示出与 hu12C4VHv1 (SEQ ID NO:221) 或hu12C4VHv2 (SEQ ID NO:222) 至少90%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性,并且人源化成熟轻链可变区显示出与hu12C4VLv1 (SEQ ID NO:223) 或hu12C4VLv2 (SEQ ID NO:224) 至少90%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。在一些此类抗体中,保留了SEQ ID NO:221-222和SEQ ID NO:223-224) 中的至少1、2、3、4、5或全部6个回复突变或其他突变。

[0647] 在一些人源化12C4抗体中,VH区中的以下位置中的至少一者被指定的氨基酸占据:H1被Q或E占据,H48被M或I占据,H93被A或T占据,H94被R或T占据。

[0648] 在一些人源化12C4抗体中,VH区中的位置H1、H48、H93和H94分别被E、I、T和T占据,如在hu12C4VHv2中。

[0649] 在一些人源化12C4抗体中,VL区中的以下位置中的至少一者被指定的氨基酸占据:L64被G或S占据,L104被V或L占据。

[0650] 在一些人源化12C4抗体中,VL区中的位置L64和L104分别被S和L占据,如在 hu12C4VLv2中。

[0651] 在一些人源化12C4抗体中,可变重链与人序列具有 $\geq 85\%$ 的同一性。在一些人源化12C4抗体中,可变轻链与人序列具有 $\geq 85\%$ 的同一性。在一些人源化12C4抗体中,可变重链和可变轻链中的每一者与人种系序列具有 $\geq 85\%$ 的同一性。在一些人源化12C4抗体中,三个重链CDR如由Kabat/Chothia复合物所定义 (SEQ ID NO:8、220和10),并且三个轻链CDR如由Kabat/Chothia复合物所定义 (SEQ ID NO:12、13和14)。

[0652] 示例性人源化抗体是小鼠17C12的人源化形式,命名为Hu17C12。

[0653] 小鼠抗体17C12包括成熟的重链和轻链可变区,所述成熟的重链和轻链可变区分别具有包含SEQ ID NO:225和SEQ ID NO:228的氨基酸序列。本发明提供了2个所例示的人源化成熟重链可变区:hu17C12VHv和hu17C12VHv2。本发明还提供了2个所例示的成熟轻链可变区:hu17C12VLv1和hu17C12VLv2。图11和图12分别示出鼠17C12和各种人源化抗体的重链可变区和轻链可变区的比对。

[0654] 出于诸如可能影响CDR构象和/或与抗原的结合、介导重链与轻链之间的相互作用、与恒定区的相互作用、是期望或不期望的翻译后修饰的位点、是其在人可变区序列中的位置的不常见残基且因此潜在地具有免疫原性、获得聚集潜力以及其他原因之类的原因,以下13个可变区框架位置被认为是用于2个所例示的人成熟轻链可变区和2个所例示的人成熟重链可变区中的取代候选,如实施例进一步指定的:L2 (I2V)、L36 (Y36L)、L43 (P43S)、H1 (Q1E)、H2 (V2I)、H24 (V24A)、H48 (M48I)、H67 (V67A)、H69 (I69M)、H93 (A93T)、H94

(R94T)、H108(T108L)和H113(R113S)。

[0655] 此处,与其他地方一样,第一个提到的残基是通过将Kabat CDR或复合物Chothia-Kabat CDR(在CDR-H1的情况下)接枝到人受体框架中而形成的人源化抗体的残基,并且第二个提到的残基是考虑替换这一残基的残基。因此,在可变区框架内,第一个提到的残基是人,并且在CDR内,第一个提到的残基是小鼠。

[0656] 所例示的抗体包括所例示的成熟重链和轻链可变区的任何排列或组合: hu17C12VHv1/hu17C12VLv1、hu17C12VHv1/hu17C12VLv2、hu17C12VHv2/hu17C12VLv1、hu17C12VHv2/hu17C12VLv2。

[0657] 所例示的抗体包括所例示的成熟重链可变区hu17C12VHv1(SEQ ID NO:232)和hu17C12VHv2(SEQ ID NO:233)与所例示的成熟轻链可变区hu17C12VLv1(SEQ ID NO:234)和hu17C12VLv2(SEQ ID NO:235)中任一者的任何排列或组合。

[0658] 本发明提供了17C12人源化抗体的变体,其中人源化成熟重链可变区显示出与hu17C12VHv1(SEQ ID NO:232)或hu17C12VHv2(SEQ ID NO:233)至少90%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性,并且人源化成熟轻链可变区显示出与hu17C12VLv1(SEQ ID NO:234)或hu17C12VLv2(SEQ ID NO:235)至少90%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。在一些此类抗体中,保留了SEQ ID NO:232-233和SEQ ID NO:234-235中的至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或全部13个回复突变或其他突变。

[0659] 在一些人源化17C12抗体中,VH区中的以下位置中的至少一者被指定的氨基酸占据:H2被I占据,H24被A占据,H48被I占据,H67被A占据,H69被M占据,H93被T占据,并且H94被T占据。在一些人源化17C12抗体中,位置H2、H24、H48、H67、H69、H93和H94分别被E、A、I、A、M、T和T占据。

[0660] 在一些人源化17C12抗体中,VH区中的以下位置中的至少一者被指定的氨基酸占据:H1被Q或E占据,H2被I占据,H24被A占据,H48被I占据,H67被A占据,H69被M占据,H93被T占据,H94被T占据,H108被T或L占据,H113被R或S占据。

[0661] 在一些人源化17C12抗体中,VH区中的位置H2、H24、H48、H67、H69、H93和H94分别被E、A、I、A、M、T和T占据,如在hu17C12VHv1中。在一些人源化17C12抗体中,VH区中的位置H1、H2、H24、H48、H67、H69、H93、H94、H108和H113分别被E、I、A、I、A、M、T、T、L和S占据,如在hu17C12VHv2中。

[0662] 在一些人源化17C12抗体中,VL区中的以下位置中的至少一者被指定的氨基酸占据:L2被V占据,并且L36被L占据。在一些人源化17C12抗体中,位置L2和L36分别被V和L占据。

[0663] 在一些人源化17C12抗体中,VL区中的以下位置中的至少一者被指定的氨基酸占据:L2被V占据,L36被L占据,L43被P或S占据。

[0664] 在一些人源化17C12抗体中,VL区中的位置L2和L36分别被V和L占据,如在hu17C12VLv1中。在一些人源化17C12抗体中,VL区中的位置L2、L36和L43分别被V、L和S占据,如在hu17C12VLv2中。

[0665] 在一些人源化17C12抗体中,可变重链与人序列具有 $\geq 85\%$ 的同一性。在一些人源化17C12抗体中,可变轻链与人序列具有 $\geq 85\%$ 的同一性。在一些人源化17C12抗体中,可变重链和可变轻链中的每一者与人种系序列具有 $\geq 85\%$ 的同一性。在一些人源化9F5抗体中,

三个重链CDR如由Kabat/Chothia复合物所定义 (SEQ ID NO:226、227和10), 并且三个轻链CDR如由Kabat/Chothia复合物所定义 (SEQ ID NO:229-231)。

[0666] 示例性人源化抗体是小鼠14H3的人源化形式, 命名为Hu14H3。

[0667] 小鼠抗体14H3包括成熟的重链和轻链可变区, 所述成熟的重链和轻链可变区分别具有包含SEQ ID NO:240和SEQ ID NO:244的氨基酸序列。本发明提供了2个所例示的人源化成熟重链可变区: hu14H3VHv1和hu14H3VHv2。本发明还提供了2个所例示的成熟轻链可变区: hu14H3VLv1和hu14H3VLv2。图13和图14分别示出鼠14H3和各种人源化抗体的重链可变区和轻链可变区的比对。

[0668] 出于诸如可能影响CDR构象和/或与抗原的结合、介导重链与轻链之间的相互作用、与恒定区的相互作用、是期望或不期望的翻译后修饰的位点、是其在人可变区序列中的位置的不常见残基且因此潜在地具有免疫原性、获得聚集潜力以及其他原因之类的原因, 以下8个可变区框架位置被认为是用于2个所例示的人成熟轻链可变区和2个所例示的人成熟重链可变区中的取代候选, 如实施例进一步指定的: L2 (I2V)、L7 (T7S)、L37 (L37Q)、L87 (Y87F)、L100 (G100Q)、L104 (V104L)、H108 (M108L) 和H113 (L113S)。以下可变区CDR位置被认为是用于2个所例示的人成熟轻链可变区中的取代候选, 如实施例进一步指定的: H35B (G35BS)。在一些人源化14H3抗体中, Kabat-Chothia复合物CDR-H1具有包含SEQ ID NO:275的氨基酸序列。

[0669] 此处, 与其他地方一样, 第一个提到的残基是通过将Kabat CDR或复合物Chothia-Kabat CDR (在CDR-H1的情况下) 接枝到人受体框架中而形成的人源化抗体的残基, 并且第二个提到的残基是考虑替换这一残基的残基。因此, 在可变区框架内, 第一个提到的残基是人, 并且在CDR内, 第一个提到的残基是小鼠。

[0670] 所例示的抗体包括所例示的成熟重链和轻链可变区的任何排列或组合: hu14H3VHv1/hu14H3VLv1、hu14H3VHv1/hu14H3VLv2、hu14H3VHv2/hu14H3VLv1、hu14H3VHv2/hu14H3VLv2。

[0671] 所例示的抗体包括所例示的成熟重链可变区hu14H3VHv1 (SEQ ID NO:248) 和hu14H3VHv2 (SEQ ID NO:249) 与所例示的成熟轻链可变区hu14H3VLv1 (SEQ ID NO:250) 和hu14H3VLv2 (SEQ ID NO:251) 中任一者的任何排列或组合。

[0672] 本发明提供了14H3人源化抗体的变体, 其中人源化成熟重链可变区显示出与hu14H3VHv1 (SEQ ID NO:249) 或hu14H3VHv2 (SEQ ID NO:250) 至少90%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性, 并且人源化成熟轻链可变区显示出与hu14H3VLv1 (SEQ ID NO:251) 或hu14H3VLv2 (SEQ ID NO:252) 至少90%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。在一些此类抗体中, 保留了SEQ ID NO:249-250和SEQ ID NO:251-252中的至少1、2、3、4、5、6、7、8或全部9个回复突变或其他突变。

[0673] 在一些人源化14H3抗体中, VH区中的位置H35B被S占据。

[0674] 在一些人源化14H3抗体中, VH区中的以下位置中的至少一者被指定的氨基酸占据: H35B被S占据, H108被M或L占据, H113被L或S占据。

[0675] 在一些人源化14H3抗体中, VH区中的位置H35B被S占据, 如在hu14H3VHv1中。在一些人源化14H3抗体中, VH区中的位置H35B、H108和H113分别被S、L和S占据, 如在hu14H3VHv2中。

[0676] 在一些人源化14H3抗体中,VL区中的以下位置中的至少一者被指定的氨基酸占据:L2被V占据并且L87被F占据。在一些人源化14H3抗体中,位置L2和L87分别被V和F占据。

[0677] 在一些人源化14H3抗体中,VL区中的以下位置中的至少一者被指定的氨基酸占据:L2被V占据,L7被T或S占据,L37被L或Q占据,L87被F占据,L100被G或Q占据,L104被V或L占据。

[0678] 在一些人源化14H3抗体中,VL区中的位置L2和L87分别被V和F占据,如在hu14H3VLv1中。在一些人源化14H3抗体中,VL区中的位置L2、L7、L37、L87、L100和L104分别被V、S、Q、F、Q和L占据,如在hu14H3VLv2中。

[0679] 在一些人源化14H3抗体中,可变重链与人序列具有 $\geq 85\%$ 的同一性。在一些人源化14H3抗体中,可变轻链与人序列具有 $\geq 85\%$ 的同一性。在一些人源化14H3抗体中,可变重链和可变轻链中的每一者与人种系序列具有 $\geq 85\%$ 的同一性。在一些人源化14H3抗体中,三个重链CDR如由Kabat/Chothia复合物所定义(SEQ ID NO:241-243),条件是位置H35B被G或S占据;并且三个轻链CDR如由Kabat/Chothia复合物所定义(SEQ ID NO:245-247)。

[0680] 在一些人源化14H3抗体中,Kabat-Chothia复合物CDR-H1具有包含SEQ ID NO:275的氨基酸序列。

[0681] 此类人源化9F5、10C12、2D11、12C4、17C12和14H3抗体的CDR区可与9F5、10C12、2D11、12C4、17C12或14H3的CDR区同一或基本同一。CDR区可由任何常规定义(例如,Chothia,或Chothia和Kabat的复合物)来定义,但优选如由Kabat所定义。

[0682] 除非另行指出,否则可变区框架位置符合Kabat编号。其他此类变体通常与所例示的Hu9F5、Hu10C12、Hu12C4、Hu17C12或Hu14H3重链和轻链的序列相差少量的(例如,通常不超过1、2、3、5、10或15个)替换、缺失或插入。此类差异通常在框架中,但也可存在于CDR中。

[0683] 人源化9F5、10C12、2D11、12C4、17C12和14H3变体的另外变异的可能性是可变区框架中的另外的回复突变。人源化mAb中不与CDR接触的许多框架残基可以适应来自供体小鼠mAb或其他小鼠或人抗体的对应位置的氨基酸的取代,并且甚至许多潜在的CDR接触残基也允许取代。甚至CDR内的氨基酸也可以被改变,例如,使用在用于提供可变区框架的人受体序列的对应位置处发现的残基。另外,可使用另选的人受体序列,例如,用于重链和/或轻链。如果使用不同的受体序列,那么可以不进行上文推荐的一种或多种回复突变,因为在没有回复突变的情况下对应的供体和受体残基已经相同。

[0684] 优选地,人源化9F5、10C12、2D11、12C4、17C12和14H3变体中的替换或回复突变(无论是否保守)对人源化mAb的结合亲和力或效力,即其与tau结合的能力没有实质影响。

[0685] 人源化9F5抗体通过它们结合磷酸化和未磷酸化tau两者以及tau的错误折叠/聚集形式的能力进一步表征。

[0686] D. 嵌合和饰面抗体

[0687] 本发明还提供了非人抗体,具体为实例的9F5、10C12、2D11、12C4、17C12或14H3抗体的嵌合和饰面形式。

[0688] 嵌合抗体是其中非人抗体(例如,小鼠)的轻链和重链的成熟可变区与人轻链和重链恒定区组合的抗体。此类抗体基本上或完全保留小鼠抗体的结合特异性,并且是约三分之二的人序列。

[0689] 饰面抗体是一种类型的人源化抗体,其保留非人抗体的一些且通常所有CDR和一

些非人可变区框架残基,但将可有助于B或T细胞表位的其他可变区框架残基,例如暴露残基(Padlan, Mol. Immunol. 28:489, 1991)替换为来自人抗体序列的对应位置的残基。结果是其中CDR完全或基本上来自非人抗体,并且非人抗体的可变区框架通过取代而变得更像人的抗体。9F5、10C12、2D11、12C4、17C12和14H3抗体的饰面形式包括在本发明中。

[0690] E. 人抗体

[0691] 与tau或其片段(例如,包含QIVYKP (SEQ ID NO:57)、EIVYKSP (SEQ ID NO:58)、EIVYKS (SEQ ID NO:277)或(Q/E) IVYK (S/P) (SEQ ID NO:56)的氨基酸序列或由其组成的肽)特异性结合的人抗体通过下文所述的多种技术提供。通过竞争性结合实验,通过Winter的噬菌体展示方法(上文)或以其他方式选择一些人抗体,以具有与特定小鼠抗体(诸如实例中所述的小鼠单克隆抗体中的一个)相同的表位特异性。还可以通过仅使用tau的片段,诸如包含QIVYKP (SEQ ID NO:57)、EIVYKSP (SEQ ID NO:58)、EIVYKS (SEQ ID NO:277)或(Q/E) IVYK (S/P) (SEQ ID NO:56)的氨基酸序列或由其组成的tau片段作为靶抗原,和/或通过针对tau变体的集合,诸如在SEQ ID NO:1的氨基酸残基307-312或391-397或391-396内含有各种突变的tau变体筛选抗体来针对特定表位特异性对人抗体进行筛选。

[0692] 用于产生人抗体的方法包括Oestberg等人,Hybridoma 2:361-367(1983); Oestberg,美国专利4,634,664;和Engleman等人,美国专利4,634,666的三体杂交瘤法;使用包括人免疫球蛋白基因的转基因小鼠(参见,例如,Lonberg等人,W093/12227(1993);US 5,877,397;US 5,874,299;US 5,814,318;US 5,789,650;US 5,770,429;US 5,661,016;US 5,633,425;US 5,625,126;US 5,569,825;US 5,545,806;Neuberger, Nat. Biotechnol. 14: 826(1996);和Kucherlapati, W091/10741(1991));噬菌体展示方法(参见,例如,Dower等人,W091/17271;McCafferty等人,W0 92/01047;US 5,877,218;US 5,871,907;US 5,858,657;US 5,837,242;US 5,733,743;和US 5,565,332);以及W0 2008/081008中描述的方法(例如,将从人分离的记忆B细胞永生,例如用EBV,针对期望特性进行筛选,并且克隆和表达重组形式)。

[0693] F. 恒定区的选择

[0694] 嵌合、饰面或人源化抗体的重链和轻链可变区可以与人恒定区的至少一部分连接。恒定区的选择部分取决于是否需要抗体依赖性细胞介导的细胞毒性、抗体依赖性细胞吞噬和/或补体依赖性细胞毒性。举例来说,人同种型IgG1和IgG3具有补体依赖性细胞毒性,而人同种型IgG2和IgG4则没有。人IgG1和IgG3还诱导比人IgG2和IgG4更强的细胞介导的效应子功能。轻链恒定区可以是 λ 或 κ 。恒定区的编号惯例包括EU编号(Edelman, G.M.等人, Proc. Natl. Acad. USA, 63, 78-85(1969))、Kabat编号(Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991)、IMGT唯一编号(Lefranc M.-P.等人, IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor constant domains and Ig superfamily C-like domains, Dev. Comp. Immunol., 29, 185-203(2005))以及IMGT外显子编号(Lefranc, 同上)。

[0695] 轻链和/或重链的氨基或羧基末端的一个或几个氨基酸,诸如重链的C末端赖氨酸,可在一部分或全分子中缺失或衍生。可在恒定区中进行取代以减少或增加效应子功能,诸如补体介导的细胞毒性或ADCC(参见,例如,Winter等人,美国专利号5,624,821;Tso等人,美国专利号5,834,597;以及Lazar等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:4005, 2006),

或延长在人中的半衰期(参见,例如,Hinton等人,J.Biol.Chem.279:6213,2004)。示例性取代包括位置250处的Gln和/或位置428处的Leu(EU编号在该段中用于恒定区)以用于增加抗体的半衰期。位置234、235、236和/或237中的任一个或所有位置处的取代降低了对Fc γ 受体,尤其是Fc γ RI受体的亲和力(参见,例如,US 6,624,821)。人IgG1的位置234、235和237处的丙氨酸取代可用于减小效应子功能。一些抗体具有在人IgG1的位置234、235和237处的丙氨酸取代,以用于减小效应子功能。任选地,人IgG2中的位置234、236和/或237被丙氨酸取代,并且位置235被谷氨酰胺取代(参见,例如,US 5,624,821)。在一些抗体中,使用人IgG1的位置241、264、265、270、296、297、322、329和331(EU编号)中的一个或多个位置处的突变。在一些抗体中,使用人IgG1的位置318、320和322(EU编号)中的一个或多个位置处的突变。在一些抗体中,位置234和/或235被丙氨酸取代和/或位置329被甘氨酸取代。在一些抗体中,位置234和235被丙氨酸取代。在一些抗体中,同种型是人IgG2或IgG4。

[0696] 抗体可以被表达为含有两条轻链和两条重链的四聚体、单独的重链、轻链、Fab、Fab'、F(ab')₂以及Fv,或其中重链和轻链成熟可变结构域通过间隔物连接的单链抗体。

[0697] 人恒定区显示出不同个体之间的同种异型变异和同族同种异型变异,即在一个或多个多态性位置,恒定区在不同个体中可以不同。同族同种异型与同种异型的区别在于,识别同族同种异型的血清结合至一个或多个其他同种型的非多态性区域。因此,例如,另一个重链恒定区属于具有或不具有C末端赖氨酸的IgG1G1m3。对人恒定区的提及包括具有任何天然同种异型或占据天然同种异型中的位置的残基的任何排列的恒定区。

[0698] G. 重组抗体的表达

[0699] 已知许多方法用于使用抗体表达细胞系(例如,杂交瘤)产生嵌合和人源化的抗体。举例来说,可使用众所周知的方法对抗体的免疫球蛋白可变区进行克隆和测序。在一种方法中,使用由杂交瘤细胞制备的mRNA通过RT-PCR克隆重链可变VH区。将通用引物作为5'引物和g2b恒定区特异性3'引物用于包括翻译起始密码子的VH区前导肽。示例性引物描述于Schenk等人的美国专利公布US2005/0009150中(下文称为“Schenk”)。可以比较来自多个独立衍生克隆的序列,以确保在扩增过程中不引入任何变化。还可以通过对通过5'RACE RT-PCR方法和3'g2b特异性引物获得的VH片段进行测序来确定或确认VH区的序列。

[0700] 可以以类似的方式克隆轻链可变VL区。在一种方法中,使用被设计成与包括翻译起始密码子的VL区杂交的5'引物和对于与V-J接合区下游的Ck区具有特异性的3'引物来设计用于VL区的扩增的通用引物组。在第二种方法中,采用5'RACE RT-PCR方法克隆VL编码cDNA。示例性引物描述于Schenk,同上中。然后将克隆的序列与编码人(或其他非人物种)恒定区的序列组合。

[0701] 在一种方法中,将重链和轻链可变区重新工程化为编码相应VDJ或VJ接合处下游的剪接供体序列,并克隆到哺乳动物表达载体中,诸如用于重链的pCMV-h γ 1和用于轻链的pCMV-Mc1。这些载体将人 γ 1和Ck恒定区编码为插入的可变区盒下游的外显子片段。在序列验证后,可以将重链和轻链表达载体共转染到CHO细胞中以产生嵌合抗体。转染后48小时收集条件培养基,并通过蛋白质印迹分析评估抗体产量或通过ELISA评估抗原结合。如上所述将嵌合抗体人源化。

[0702] 嵌合、饰面、人源化和人抗体通常通过重组表达产生。重组多核苷酸构建体通常包括可操作地连接于抗体链的编码序列的表达控制序列,包括天然相关联的或异源的表达控

制元件,诸如启动子。表达控制序列可以是能够转化或转染真核或原核宿主细胞的载体中的启动子系统。一旦已经将载体掺入适当的宿主中,即将宿主维持在适于核苷酸序列的高水平表达和交叉反应性抗体的收集和纯化的条件下。

[0703] 这些表达载体通常可作为附加体或作为宿主染色体DNA的整合部分在宿主生物中复制。通常,表达载体含有选择标记物,例如,氨苄青霉素抗性或潮霉素抗性,以允许检测用期望的DNA序列转化的那些细胞。

[0704] 大肠杆菌是可用于表达抗体,尤其是抗体片段的一种原核宿主。诸如酵母的微生物也可用于表达。酵母属(*Saccharomyces*)是根据需要带有具有表达控制序列、复制起点、终止序列等的合适载体的酵母宿主。典型的启动子包括3-磷酸甘油酸激酶和其他糖酵解酶。诱导型酵母启动子尤其包括来自醇脱氢酶、异细胞色素C以及负责麦芽糖和半乳糖利用的酶的启动子。

[0705] 哺乳动物细胞可用于表达编码免疫球蛋白或其片段的核苷酸区段。参见Winnacker, *From Genes to Clones*, (VCH Publishers, NY, 1987)。已经开发出许多能够分泌完整的异源蛋白质的合适的宿主细胞系,并且包括CHO细胞系、各种COS细胞系、HeLa细胞、HEK293细胞、L细胞,以及非抗体产生性骨髓瘤,包括Sp2/0和NS0。细胞可以是非人的。这些细胞的表达载体可包括表达控制序列,诸如复制起点、启动子、增强子(Queen等人, *Immunol. Rev.* 89:49 (1986)),和必要的加工信息位点诸如核糖体结合位点、RNA剪接位点、多腺苷酸化位点以及转录终止子序列。表达控制序列可包括衍生自内源基因、巨细胞病毒、SV40、腺病毒、牛乳头瘤病毒等的启动子。参见Co等人, *J. Immunol.* 148:1149 (1992)。

[0706] 或者,可以将抗体编码序列掺入转基因中以用于引入转基因动物的基因组中并随后在转基因动物的乳汁中表达(参见,例如,美国专利号5,741,957;美国专利号5,304,489;以及美国专利号5,849,992)。合适的转基因包括与来自乳腺特异性基因(诸如酪蛋白或 β 乳球蛋白)的启动子和增强子可操作地连接的轻链和/或重链的编码序列。

[0707] 含有目标DNA区段的载体可以通过取决于细胞宿主类型的方法转移到宿主细胞中。举例来说,对于原核细胞,通常利用氯化钙转染,而对于其他细胞宿主,可使用磷酸钙处理、电穿孔、脂质转染、基因枪法或基于病毒的转染。用于转化哺乳动物细胞的其他方法包括使用聚凝胺、原生质体融合、脂质体、电穿孔和显微注射。为了产生转基因动物,可以将转基因显微注射到受精卵母细胞中或可以将其掺入胚胎干细胞或诱导型多能干细胞(iPSC)的基因组中,并将此类细胞的细胞核转移到去核卵母细胞中。

[0708] 已经将编码抗体重链和轻链的一种或多种载体引入细胞培养物中,可以在无血清培养基中针对生长率和产品质量对细胞库进行筛选。最佳产量的细胞库随后可进行基于FACS的单细胞克隆以产生单克隆系。可使用每个细胞每天50pg或100pg以上的比生产率,其对应于大于7.5g/L培养物的产物滴度。由单细胞克隆产生的抗体还可以进行浊度、过滤特性、PAGE、IEF、UV扫描、HP-SEC、碳水化合物-寡糖映射、质谱以及结合测定(诸如ELISA或Biacore)的测试。选定的克隆可随后存储在多个小瓶中并且冷冻储存,以备后用。

[0709] 一旦被表达,抗体可根据本领域的标准程序进行纯化,包括蛋白A捕获、HPLC纯化、柱色谱法、凝胶电泳等(通常参见,Scopes, *Protein Purification* (Springer-Verlag, NY, 1982))。

[0710] 可使用商业生产抗体的方法,包括密码子优化、启动子的选择、转录元件的选择、

终止子的选择、无血清单细胞克隆、细胞建库、使用用于拷贝数扩增的选择标记物、CHO终止子,或改善蛋白质滴度(参见,例如,US 5,786,464;US 6,114,148;US 6,063,598;US 7,569,339;W02004/050884;W02008/012142;W02008/012142;W02005/019442;W02008/107388;W02009/027471;和US 5,888,809)。

[0711] IV. 活性免疫原

[0712] 用于主动免疫的剂用于在患者中诱导与结合以上被动免疫所描述的抗体相同类型的抗体。用于主动免疫的剂可以是用于在实验室动物中生成单克隆抗体的相同类型的免疫原,例如,来自tau的对应于SEQ ID NO:1的残基307-312或391-397或391-396的区域的3-15或3-12或5-12或5-8个连续氨基酸的肽(例如像包括SEQ ID NO:1的残基307-312或391-397或391-396或由其组成的tau肽),或包含氨基酸序列QIVYKP (SEQ ID NO:57) 或由其组成的tau肽,包含氨基酸序列EIVYKSP (SEQ ID NO:58) 或由其组成的tau肽,包含氨基酸序列EIVYKS (SEQ ID NO:277) 或由其组成的tau肽,或包含氨基酸序列(Q/E) IVYK (S/P) (SEQ ID NO:56) 或由其组成的tau肽。为了诱导与9F5、10C12、2D11、12C4、17C12或14H3结合相同或重叠表位的抗体,可以对这些抗体的表位特异性作图(例如,通过测试与跨越tau的一系列重叠肽的结合)。然后可使用由该表位组成或包括该表位或与该表位重叠的tau的片段作为免疫原。此类片段通常以非磷酸化的形式使用。

[0713] 如果使用的话,异源载体和佐剂可以与用于生成单克隆抗体的相同,但也可以针对在人体中使用的更好的药物适用性进行选择。合适的载体包括血清白蛋白、钥孔虫凝集素、免疫球蛋白分子、甲状腺球蛋白、卵清蛋白、破伤风类毒素或来自其他致病细菌(诸如白喉(例如,CRM197)、大肠杆菌、霍乱或幽门螺杆菌)的类毒素或减毒的毒素衍生物。T细胞表位也是合适的载体分子。一些缀合物可以通过将本发明的剂连接于免疫刺激性聚合物分子(例如,三棕榈酰基-S-甘油半胱氨酸(Pam₃Cys)、甘露聚糖(甘露糖聚合物)或葡聚糖(β 1 $\rightarrow$ 2聚合物))、细胞因子(例如,IL-1、IL-1 α 和 β 肽、IL-2、 γ -INF、IL-10、GM-CSF)和趋化因子(例如,MIP1- α 和 β 以及RANTES)来形成。免疫原可以连接于载体,并且具有或不具有间隔氨基酸(例如,gly-gly)。另外的载体包括病毒样颗粒。病毒样颗粒(VLP),也称为假型病毒或病毒衍生颗粒,代表由能够在体内自组装成具有限定的球形对称性的VLP的病毒衣壳和/或包膜蛋白质的多个拷贝组成的亚单位结构。(Powilleit等人,(2007) PLoS ONE 2 (5): e415)。或者,肽免疫原可以连接于至少一个人工T细胞表位,所述表位能够结合大部分的MHC II类分子,诸如pan DR表位("PADRE")。PADRE描述于US 5,736,142、WO 95/07707以及Alexander J等人,Immunity,1:751-761(1994)中。活性免疫原可以多聚体形式存在,其中免疫原和/或其载体的多个拷贝作为单个共价分子存在。

[0714] 片段通常与药学上可接受的佐剂一起施用。相对于单独使用肽的情况,佐剂增加诱导抗体的滴度和/或诱导抗体的结合亲和力。多种佐剂可与tau的免疫原性片段组合使用以引发免疫应答。一些佐剂增强对免疫原的固有应答,而不导致影响应答的定性形式的免疫原构象变化。一些佐剂包括铝盐(诸如氢氧化铝和磷酸铝)、3De-O-酰化的单磷酰基脂质A (MPLTM) (参见GB 2220211 (RIBI ImmunoChem Research Inc., Hamilton, Montana, 现为Corixa的一部分))。StimulonTM QS-21是从在南美洲发现的皂皮树(Quillaja Saponaria Molina)的树皮中分离的三萜糖苷或皂草苷(参见Kensil等人,Vaccine Design:The Subunit and Adjuvant Approach (Powell&Newman编辑,Plenum Press,NY,1995);US 5,

057,540), (Aquila BioPharmaceuticals, Framingham, MA; 现为 Antigenics, Inc., New York, NY)。其他佐剂是水包油乳剂(诸如角鲨烯或花生油), 任选地组合免疫刺激剂, 诸如单磷酸基脂质A(参见Stoute等人, N. Engl. J. Med. 336, 86-91(1997))、普罗尼克(pluronic)聚合物以及杀死的分枝杆菌。Ribi佐剂是水包油乳液。Ribi含有用含有吐温80的盐水乳化的可代谢油(角鲨烯)。Ribi还含有充当免疫刺激剂的精制的分枝杆菌产品和细菌单磷酸基脂质A。另一种佐剂是CpG(WO 98/40100)。佐剂可以作为治疗组合物的组分与活性剂一起施用, 或者可以在施用治疗剂之前、同时或之后单独施用。

[0715] 还可使用诱导针对tau的抗体的tau的天然片段的类似物。举例来说, 一种或多种或所有的L-氨基酸可以被此类肽中的D-氨基酸取代。氨基酸的顺序也可以逆转(逆向肽(retro peptide))。任选地, 肽包括相反顺序的所有D-氨基酸(反转-倒位肽(retro-inverso peptide))。肽和其他化合物不一定与tau肽具有显著的氨基酸序列相似性, 但仍然充当tau肽的模拟物并诱导相似的免疫应答。还可使用针对如上所述的tau的单克隆抗体的抗独特型抗体。此类抗Id抗体模拟抗原并且产生针对所述抗原的免疫应答(参见Essential Immunology, Roit编辑, Blackwell Scientific Publications, Palo Alto, CA 第6版, 第181页)。

[0716] 肽(和任选地与肽融合的载体)也可以以编码肽的核酸的形式施用并且在患者中原位表达。编码免疫原的核酸区段通常连接于调控元件, 诸如启动子和增强子, 其允许DNA区段在患者的预期靶细胞中表达。为了在血细胞中表达, 如免疫应答的诱导所希望的, 来自轻链或重链免疫球蛋白基因或CMV主要立即早期启动子和增强子的启动子和增强子元件适于指导表达。通常将连接的调控元件和编码序列克隆到载体中。抗体也可以以编码抗体重链和/或轻链的核酸的形式施用。如果重链和轻链均存在, 那么链优选作为单链抗体连接。用于被动施用的抗体也可以例如通过亲和色谱从用肽免疫原处理的患者的血清中制备。

[0717] DNA可以以裸露的形式(即, 没有胶体或包封材料)递送。或者, 可使用许多病毒载体系统, 包括逆转录病毒系统(参见, 例如, Lawrie and Tumin, Cur. Opin. Genet. Develop. 3, 102-109(1993)), 包括逆转录病毒衍生载体, 诸如MMLV、HIV-1和ALV; 腺病毒载体{参见, 例如, Bett等人, J. Virol. 67, 591-596(1993)}; 腺相关病毒载体{参见, 例如, Zhou等人, J. Exp. Med. 179, 1867(1994)}; 慢病毒载体, 诸如基于HIV或FIV gag序列的那些; 来自痘科的病毒载体, 包括牛痘病毒和禽痘病毒; 来自 α 病毒属的病毒载体, 诸如衍生自以下病毒的那些: 新堡斯病毒(Sindbis Virus)和塞姆利基森林病毒(Semliki Forest Virus)(参见, 例如Dubensky等人, J. Virol. 70, 508-519(1996))、委内瑞拉马脑炎病毒(参见US 5,643,576), 以及弹状病毒诸如水疱性口炎病毒(参见WO 96/34625)和乳头瘤病毒(Ohe等人, Human Gene Therapy 6, 325-333(1995); Woo等人, WO 94/12629 and Xiao&Brandsma, Nucleic Acids. Res. 24, 2630-2622(1996))。

[0718] 编码免疫原或编码抗体重链和/或轻链的DNA或含有其的载体可包装到脂质体中。合适的脂质和相关类似物由US 5,208,036、US 5,264,618、US 5,279,833和US 5,283,185描述。编码免疫原或编码抗体重链和/或轻链的载体和DNA还可以被吸附至微粒载体或与其相关联, 其实例包括聚甲基丙烯酸甲酯聚合物和聚乳酸以及聚(丙交酯-乙交酯共聚物), (参见, 例如, McGee等人, J. Micro Encap. 1996)。

[0719] 编码抗体重链和/或轻链的载体或其区段可掺入离体细胞, 例如从个体患者移植

的细胞(例如,淋巴细胞、骨髓穿刺液、组织活检)或普通供体造血干细胞中,随后将细胞重新植入患者体内,通常在选择已掺入转基因的细胞之后进行。(参见,例如,WO 2017/091512)。示例性的来源于患者的细胞包括来源于患者的诱导型多能干细胞(iPSC)或其他类型的干细胞(胚胎干细胞、造血干细胞、神经干细胞或间充质干细胞)。

[0720] 编码抗体重链和/或轻链的载体或其区段可引入离体细胞中的任何目标区域,诸如白蛋白基因或其他安全港基因。掺入载体的细胞可在有或没有预先分化的情况下植入。细胞可植入特定组织(诸如分泌组织或病理部位)中,或全身性地,诸如通过注入到血液中来植入。举例来说,可将细胞植入患者的分泌组织诸如肝脏中,任性地预先分化为该组织中存在的细胞,诸如在肝脏的情况下为肝细胞。抗体在肝脏中的表达导致抗体分泌到血液中。

[0721] H. 抗体筛选测定

[0722] 可以如上所述针对预期结合特异性对抗体进行初始筛选。同样可以针对诱导具有这种结合特异性的抗体的能力对活性免疫原进行筛选。在这种情况下,使用活性免疫原对实验室动物进行免疫,并针对适当的结合特异性对所得血清进行测试。

[0723] 然后可以在细胞和动物模型中测试具有期望的结合特异性的抗体。用于这种筛选的细胞优先为神经元细胞。已经报道了tau病理的细胞模型,其中用任性地具有与tau病理相关联的突变的tau的四重复结构域转染神经母细胞瘤细胞(例如, δ K280,参见Khlistunova,Current Alzheimer Research 4,544-546(2007))。在另一模型中,通过添加强力霉素在神经母细胞瘤N2a细胞系中诱导tau。细胞模型使得能够研究在可溶或聚集状态中tau对细胞的毒性,开启tau基因表达后tau聚集体的出现,再次关闭基因表达后tau聚集体的溶解,以及抗体在抑制tau聚集体的形成或使其解聚方面的功效。

[0724] 还可以在与tau相关联的疾病的转基因动物模型中筛选抗体或活性免疫原。此类转基因动物可包括tau转基因(例如,人同种型中的任一种)和任选的尤其人APP转基因,诸如磷酸化tau、ApoE、早老素或 α 突触核蛋白的激酶。此类转基因动物被设置用于发展与tau相关联的疾病的至少一种体征或症状。

[0725] 示例性的转基因动物是K3系小鼠(Itner等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 105(41):15997-6002(2008))。这些小鼠具有人tau转基因,所述人tau转基因具有K 369I突变(该突变与皮克氏病相关联)和Thy1.2启动子。该模型显示出快速的神经变性、运动缺陷以及传入纤维和小脑粒细胞的变性的过程。另一种示例性动物是JNPL3系小鼠。这些小鼠具有人tau转基因,所述人tau转基因具有P301L突变(该突变与额颞叶痴呆相关联)和Thy 1.2启动子(Taconic,Germantown,N.Y.,Lewis等人,Nat Genet.25:402-405(2000))。这些小鼠具有更渐进的神经变性过程。小鼠在几个脑区域和脊髓中发展神经原纤维缠结,其据此以引用方式整体并入)。这是研究缠结发展的后果以及可抑制这些聚集体产生的筛选疗法的优秀模型。这些动物的另一个优点是病理的相对早发。在纯合系中,至少早在3个月就可以观察到与tau病理相关联的行为异常,但动物至少在8月龄之前都保持相对健康。换句话说,在8个月时,动物走动、给自己喂食,并且可以充分良好地执行行为任务以允许监测治疗效果。使用-AI wI KLH-PHF-1对这些小鼠进行6-13个月的主动免疫产生约1,000的滴度,并且相对于未处理的对照小鼠显示出较少的神经原纤维缠结、较少的pSer422以及减少的体重减轻。

[0726] 抗体或活性剂的活性可通过各种标准评估,包括总tau或磷酸化tau的量的减少,

其他病理特征诸如A β 的淀粉样蛋白沉积物的减少,以及抑制或延迟或行为缺陷。还可以针对血清中抗体的诱导对活性免疫原进行测试。可以针对抗体穿过血脑屏障进入转基因动物的脑中对被动和主动免疫原进行测试。还可以在天然地或通过诱导发展以tau为特征的疾病的症状的非人灵长类动物中测试抗体或诱导抗体的片段。对抗体或活性剂的测试通常与对照结合执行,其中进行平行实验,不同的是不存在抗体或活性剂(例如,通过媒介物替换)。然后可以相对于对照评估可归因于待测的抗体或活性剂的疾病体征或症状的减少、延迟或抑制。

[0727] V. 适合治疗的患者

[0728] 已经在几种疾病中发现了神经原纤维缠结的存在,包括阿尔茨海默病、唐氏综合征、轻度认知障碍、原发性年龄相关性tau蛋白病、脑炎后帕金森症、创伤后痴呆或拳击员痴呆、皮克氏病、C型尼曼-皮克病、核上性麻痹、额颞叶痴呆、额颞叶变性、嗜银颗粒病、球状神经胶质性tau蛋白病、关岛肌萎缩性侧索硬化/帕金森痴呆复征、皮质基底节变性(CBD)、路易体痴呆、阿尔茨海默病的路易体变异(LBVAD)、慢性创伤性脑病变(CTE)、球状神经胶质性tau蛋白病(GGT)、帕金森病和进行性核上性麻痹(PSP)。本发明的方案也可用于治疗或预防这些疾病中的任一种。由于神经疾病和疾患与tau之间的广泛关联,本发明的方案可用于治疗或预防与未患有神经疾病的个体中的平均值相比显示出升高水平的tau或磷酸化tau(例如,在CSF中)的任何受试者。本发明的方案还可用于治疗或预防在与神经疾病相关联的tau中具有突变的个体的神经疾病。本发明的方法特别适用于治疗或预防阿尔茨海默病,尤其是在患者中。

[0729] 适合治疗的患者包括有患病风险但未显示出症状的个体,以及目前显示出症状的患者。有患病风险的患者包括具有已知的疾病遗传风险的那些。此类个体包括有经历过该疾病的亲属的那些个体,以及通过遗传或生化标记物分析确定其风险的那些个体。风险的遗传标记物包括tau中的突变,诸如上面讨论的那些,以及与神经疾病相关联的其他基因中的突变。举例来说,杂合和甚至尤其纯合形式中的ApoE4等位基因与阿尔茨海默病的风险相关联。阿尔茨海默病风险的其他标记物包括APP基因中的突变,具体是位置717以及位置670和671处的突变(分别称为Hardy和Swedish突变)、早老素基因PS1和PS2中的突变、AD的家族史、高胆固醇血症或动脉粥样硬化。目前患有阿尔茨海默病的个体可以通过PET成像、由特征性的痴呆以及如上所述的风险因素的存在来识别。此外,许多诊断测试可用于鉴定患有AD的个体。这些包括CSF tau或磷酸化-tau以及A β 42水平的测量。升高的tau或磷酸化-tau和降低的A β 42水平意味着AD的存在。一些突变与帕金森病相关联。Ala30Pro或Ala53或与帕金森病相关联的其他基因诸如富含亮氨酸重复片段的激酶PARK8中的突变。根据DSM IV TR的标准,个体也可以被诊断患有上文提及的任何神经疾病。

[0730] 在无症状患者中,治疗可以在任何年龄开始(例如,10、20、30)。然而,通常,在患者达到40、50、60或70岁之前不必开始治疗。通常需要在一段时间内进行多剂量的治疗。可以通过测定随时间推移的抗体水平对治疗进行监测。如果应答下降,表明需要加强剂量。在潜在的唐氏综合征患者的情况下,可以通过向母亲施用治疗剂在出生前开始治疗或在出生后不久开始治疗。

[0731] I. 核酸

[0732] 本发明还提供了编码上述重链和轻链中任一者的核酸(例如,SEQ ID NO:7、SEQ

ID NO:11、SEQ ID NO:15-22、SEQ ID NO:23-29、61-108、109-129、130-171、214-217、219、221-224、225、228、232-235、240、244和248-251)。任选地,此类核酸进一步编码信号肽,并且可以被表达为具有连接于恒定区的信号肽。核酸的编码序列可以与调控序列可操作地连接以确保编码序列的表达,调控序列诸如启动子、增强子、核糖体结合位点、转录终止信号等。调控序列可包括启动子,例如原核启动子或真核启动子。可对编码重链或轻链的核酸进行密码子优化以在宿主细胞中表达。编码重链和轻链的核酸可编码选择基因。编码重链和轻链的核酸可以以分离形式存在或可以克隆到一种或多种载体中。核酸可以通过例如固态合成或重叠寡核苷酸的PCR来合成。编码重链和轻链的核酸可以作为一个连续核酸接合在例如表达载体内,或可以是分开的,例如,各自克隆到其自身的表达载体中。

[0733] J. 缀合抗体

[0734] 与抗原诸如tau特异性结合的缀合抗体,可用于检测tau的存在;监测和评价治疗剂用于治疗被诊断患有以下疾病的患者的功效:阿尔茨海默病、唐氏综合征、轻度认知障碍、原发性年龄相关性tau蛋白病、脑炎后帕金森症、创伤后痴呆或拳击员痴呆、皮克氏病、C型尼曼-皮克病、核上性麻痹、额颞叶痴呆、额颞叶变性、嗜银颗粒病、球状神经胶质性tau蛋白病、关岛肌萎缩性侧索硬化/帕金森痴呆复征、皮质基底节变性(CBD)、路易体痴呆、阿尔茨海默病的路易体变异(LBVAD)、慢性创伤性脑病变(CTE)、球状神经胶质性tau蛋白病(GGT)、帕金森病或进行性核上性麻痹(PSP);抑制或减少tau的聚集;抑制或减少tau原纤维形成;减少或清除tau沉积物;稳定tau的无毒构象;或在患者中治疗以下疾病或实现所述疾病的预防:阿尔茨海默病、唐氏综合征、轻度认知障碍、原发性年龄相关性tau蛋白病、脑炎后帕金森症、创伤后痴呆或拳击员痴呆、皮克氏病、C型尼曼-皮克病、核上性麻痹、额颞叶痴呆、额颞叶变性、嗜银颗粒病、球状神经胶质性tau蛋白病、关岛肌萎缩性侧索硬化/帕金森痴呆复征、皮质基底节变性(CBD)、路易体痴呆、阿尔茨海默病的路易体变异(LBVAD)、慢性创伤性脑病变(CTE)、球状神经胶质性tau蛋白病(GGT)、帕金森病或进行性核上性麻痹(PSP)。举例来说,此类抗体可以与其他治疗性部分、其他蛋白质、其他抗体和/或可检测标记缀合。参见WO 03/057838;US 8,455,622。此类治疗性部分可以是可用于在患者中治疗、抗击、缓解、预防或改善不想要的疾患或疾病的任何剂,所述疾患或疾病诸如阿尔茨海默病、唐氏综合征、轻度认知障碍、原发性年龄相关性tau蛋白病、脑炎后帕金森症、创伤后痴呆或拳击员痴呆、皮克氏病、C型尼曼-皮克病、核上性麻痹、额颞叶痴呆、额颞叶变性、嗜银颗粒病、球状神经胶质性tau蛋白病、关岛肌萎缩性侧索硬化/帕金森痴呆复征、皮质基底节变性(CBD)、路易体痴呆、阿尔茨海默病的路易体变异(LBVAD)、慢性创伤性脑病变(CTE)、球状神经胶质性tau蛋白病(GGT)、帕金森病或进行性核上性麻痹(PSP)。

[0735] 缀合的治疗性部分可包括细胞毒性剂、细胞生长抑制剂、神经营养剂、神经保护剂、放射治疗剂、放射性(放射性药物)、荧光、顺磁性示踪剂、超声造影剂、免疫调节剂,或促进或增强抗体活性,或改变生物利用率以及在体内或器官内的分布的任何生物活性剂。细胞毒性剂可以是对细胞有毒性的任何剂。细胞生长抑制剂可以是抑制细胞增殖的任何剂。神经营养剂可以是促进神经元维持、生长或分化的任何剂,包括化学剂或蛋白质剂。神经保护剂可以是保护神经元免于急性侵害或退化过程的剂,包括化学剂或蛋白质剂。免疫调节剂可以是刺激或抑制免疫应答的发展或维持的任何剂。放射治疗剂可以是发射辐射的任何分子或化合物。如果此类治疗性部分偶联于tau特异性抗体,诸如本文所述的抗体,那么偶

联的治疗性部分将相对于正常细胞对tau相关疾病影响的细胞具有特异性亲和力。因此,缀合抗体的施用直接靶向癌细胞,而对周围的正常健康组织具有最小的伤害。这对于毒性太大而不能单独施用的治疗性部分可以是特别有用的。此外,可使用较少量的治疗性部分。

[0736] 一些此类抗体可以被修饰以充当免疫毒素。参见,例如,美国专利号5,194,594。举例来说,通过使用用于抗体的双功能试剂S-乙酰基巯基琥珀酸酐和用于蓖麻毒素的3-(2-吡啶基二硫代)丙酸琥珀酰亚胺酯,可以将来源于植物的细胞毒素蓖麻毒素偶联于抗体。参见Pietersz等人,Cancer Res.48(16):4469-4476(1998)。偶联导致蓖麻毒素的B链结合活性丧失,同时既不损害蓖麻毒素的A链的毒性潜力,也不损害抗体的活性。类似地,核糖体组装的抑制剂皂草素可通过化学插入的巯基(sulfhydryl)基团之间的二硫键偶联于抗体。参见Polito等人,Leukemia 18:1215-1222(2004)。

[0737] 一些此类抗体可连接于放射性同位素。放射性同位素的实例包括,例如,钇⁹⁰(⁹⁰Y)、铟¹¹¹(¹¹¹In)、¹³¹I、^{99m}Tc、放射性银-111、放射性银-199和铋²¹³。放射性同位素与抗体的连接可以用常规的双功能螯合物进行。对于放射性银-111和放射性银-199连接,可使用巯基接头。参见Hazra等人,Cell Biophys.24-25:1-7(1994)。银放射性同位素的连接可涉及用抗坏血酸还原免疫球蛋白。对于诸如¹¹¹In和⁹⁰Y的放射性同位素,可使用替伊莫单抗并且将使其与此类同位素反应以分别形成¹¹¹In-替伊莫单抗和⁹⁰Y-替伊莫单抗。参见Witzig,Cancer Chemother.Pharmacol.,48增刊1:S91-S95(2001)。

[0738] 一些此类抗体可以连接于其他治疗性部分。此类治疗性部分可以具有例如细胞毒性、细胞生长抑制性、神经营养性或神经保护性。举例来说,抗体可以与毒性化学治疗药物诸如美登素(maytansine)、格尔德霉素(geldanamycin)、微管蛋白抑制剂诸如微管蛋白结合剂(例如,奥瑞斯他汀(auristatin))或小沟结合剂诸如卡里奇霉素(calicheamicin)缀合。其他代表性的治疗性部分包括已知可用于以下疾病的治疗、处理或改善的剂:阿尔茨海默病、唐氏综合征、轻度认知障碍、原发性年龄相关性tau蛋白病(tauopathy)、脑炎后帕金森症、创伤后痴呆或拳击员痴呆、皮克氏病、C型尼曼-皮克病(type C Niemann-Pick disease)、核上性麻痹、额颞叶痴呆、额颞叶变性、嗜银颗粒病、球状神经胶质性tau蛋白病、关岛肌萎缩性侧索硬化/帕金森痴呆复征(amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism dementia complex of Guam)、皮质基底节变性(CBD)、路易体痴呆(dementia with Lewy bodies)、阿尔茨海默病的路易体变异(LBVAD)、慢性创伤性脑病变(CTE)、球状神经胶质性tau蛋白病(GGT)、帕金森病或进行性核上性麻痹(PSP)。

[0739] 抗体还可与其他蛋白质偶联。举例来说,抗体可与Fynomer偶联。Fynomer是衍生自人Fyn SH3结构域的小结合蛋白(例如,7kDa)。它们可以是稳定且可溶的,并且它们可缺乏半胱氨酸残基和二硫键。可将Fynomer工程化以与抗体相同的亲和力和特异性结合靶分子。它们适用于基于抗体产生多特异性融合蛋白。举例来说,Fynomer可以融合至抗体的N末端和/或C末端,以产生具有不同架构的双特异性和三特异性FynomAb。可使用Fynomer文库,通过筛选技术,使用FACS、Biacore以及允许有效选择具有最佳特性的Fynomer的基于细胞的测定选择Fynomer。Fynomer的实例公开于Grabulovski等人等人,J.Biol.Chem.282:3196-3204(2007);Bertschinger等人,Protein Eng.Des.Sel.20:57-68(2007);Schlatter等人,MAbs.4:497-508(2011);Banner等人,Acta.Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.69(Pt6):1124-1137(2013);以及Brack等人,Mol.Cancer Ther.13:2030-2039(2014)。

[0740] 本文所公开的抗体还可与一种或多种其他抗体偶联或缀合(例如,以形成抗体异源缀合物)。此类其他抗体可与tau内的不同表位结合或可与不同的靶抗原结合。

[0741] 抗体还可与可检测的标记偶联。此类抗体可用于例如诊断阿尔茨海默病、唐氏综合征、轻度认知障碍、原发性年龄相关性tau蛋白病(tauopathy)、脑炎后帕金森症、创伤后痴呆或拳击员痴呆、皮克氏病、C型尼曼-皮克病(type C Niemann-Pick disease)、核上性麻痹、额颞叶痴呆、额颞叶变性、嗜银颗粒病、球状神经胶质性tau蛋白病、关岛肌萎缩性侧索硬化/帕金森痴呆复征(amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism dementia complex of Guam)、皮质基底节变性(CBD)、路易体痴呆(dementia with Lewy bodies)、阿尔茨海默病的路易体变异(LBVAD)、慢性创伤性脑病变(CTE)、球状神经胶质性tau蛋白病(GGT)、帕金森病或进行性核上性麻痹(PSP),和/或用于评估治疗的功效。此类抗体尤其适用于在患有或易患以下疾病的受试者中:阿尔茨海默病、唐氏综合征、轻度认知障碍、原发性年龄相关性tau蛋白病、脑炎后帕金森症、创伤后痴呆或拳击员痴呆、皮克氏病、C型尼曼-皮克病、核上性麻痹、额颞叶痴呆、额颞叶变性、嗜银颗粒病、球状神经胶质性tau蛋白病、关岛肌萎缩性侧索硬化/帕金森痴呆复征、皮质基底节变性(CBD)、路易体痴呆、阿尔茨海默病的路易体变异(LBVAD)、慢性创伤性脑病变(CTE)、球状神经胶质性tau蛋白病(GGT)、帕金森病或进行性核上性麻痹(PSP),或在从此类患者获得的适当生物样品中执行此类测定。可以与抗体偶联或连接的代表性可检测标记包括各种酶,诸如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;辅基,诸如链霉抗生物素蛋白/生物素和抗生物素蛋白/生物素;荧光材料,诸如伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪胺荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白;发光材料,诸如鲁米诺;生物发光材料,诸如萤光素酶、萤光素和水母发光蛋白;放射性材料,诸如放射性银-111、放射性银-199、铋²¹³、碘(¹³¹I、¹²⁵I、¹²³I、¹²¹I)、碳(¹⁴C)、硫(³⁵S)、氚(³H)、铟(¹¹⁵In、¹¹³In、¹¹²In、¹¹¹In)、锝(⁹⁹Tc)、钽(²⁰¹Ti)、镓(⁶⁸Ga、⁶⁷Ga)、钯(¹⁰³Pd)、钼(⁹⁹Mo)、氙(¹³³Xe)、氟(¹⁸F)、¹⁵³Sm、¹⁷⁷Lu、¹⁵⁹Gd、¹⁴⁹Pm、¹⁴⁰La、¹⁷⁵Yb、¹⁶⁶Ho、⁹⁰Y、⁴⁷Sc、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、¹⁴²Pr、¹⁰⁵Rh、⁹⁷Ru、⁶⁸Ge、⁵⁷Co、⁶⁵Zn、⁸⁵Sr、³²P、¹⁵³Gd、¹⁶⁹Yb、⁵¹Cr、⁵⁴Mn、⁷⁵Se、¹¹³Sn和¹¹⁷Ti;正电子发射金属,使用各种正电子发射断层摄影术;非放射性顺磁性金属离子;以及放射性标记的或缀合于特定放射性同位素的分子。

[0742] 放射性同位素与抗体的连接可以用常规的双功能螯合物进行。对于放射性银-111和放射性银-199连接,可使用巯基接头。参见Hazra等人,Cell Biophys.24-25:1-7(1994)。银放射性同位素的连接可涉及用抗坏血酸还原免疫球蛋白。对于诸如¹¹¹In和⁹⁰Y的放射性同位素,可使用替伊莫单抗并且将使其与此类同位素反应以分别形成¹¹¹In-替伊莫单抗和⁹⁰Y-替伊莫单抗。参见Witzig,Cancer Chemother.Pharmacol.,48增刊1:S91-S95(2001)。

[0743] 治疗性部分、其他蛋白质、其他抗体和/或可检测标记可以直接或通过中间体(例如,接头)间接与本发明的抗体偶联或缀合。参见例如,Arnon等人,“Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy,”Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy,Reisfeld等人(编辑),第243-56页(Alan R.Liss, Inc.1985);Hellstrom等人,“Antibodies For Drug Delivery,”Controlled Drug Delivery(第2版),Robinson等人(编辑),第623-53页(Marcel Dekker, Inc.1987);Thorpe, “Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy:A Review,”Monoclonal Antibodies 84:Biological And Clinical Applications,Pinchera等人(编辑),第475-

506页(1985);“Analysis,Results,And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy,”Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy,Baldwin等人(编辑),第303-16页(Academic Press 1985);以及Thorpe等人,Immunol.Rev.,62:119-58(1982)。合适的接头包括,例如,可切割和不可切割的接头。可采用在酸性或还原条件下,在暴露于特定蛋白酶时或在其他限定条件下释放所偶联的治疗性部分、蛋白质、抗体和/或可检测标记的不同接头。

[0744] VI. 药物组合物和使用方法

[0745] 在预防性应用中,抗体或用于诱导抗体的剂或其药物组合物以有效降低风险、减轻严重性,或延迟疾病(例如,阿尔茨海默病)的至少一个体征或症状的发作的方案(剂量、频率和施用途径)施用至易患该疾病或有患病风险的患者。具体地讲,该方案优选地有效抑制或延迟脑中的tau或磷酸化-tau和由其形成的成对丝,和/或抑制或延迟其毒性作用和/或抑制/或延迟行为缺陷的发展。在治疗性应用中,抗体或诱导抗体的剂以有效改善或至少抑制疾病(例如,阿尔茨海默病)的至少一个体征或症状的进一步恶化的方案(剂量、频率和施用途径)施用至疑似患有或已经患有该疾病的患者。具体地讲,该方案优选地有效减少或至少抑制与毒性和/或行为缺陷相关联的tau、磷酸化tau或由其形成的成对丝的水平的一步增加。

[0746] 如果个别经治疗的患者达到的结果比不通过本发明的方法治疗的对比患者的对照群体中的平均结果更有利,或如果经治疗患者的结果相对于对照临床试验(例如,II期、II/III期或III期试验)中的对照患者被证明更有利,在 $p < 0.05$ 或 0.01 或甚至 0.001 的水平,那么方案被认为是治疗或预防有效的。

[0747] 有效剂量随许多不同的因素而变化,所述因素诸如施用方式、靶位点、患者的生理状态、患者是否为ApoE携带者、患者是人还是动物、施用的其他药物以及治疗是预防性的还是治疗性的。

[0748] 抗体的示例性剂量范围为约 0.01 至 60mg/kg ,或约 0.1 至 3mg/kg 或 0.15 - 2mg/kg 或 0.15 - 1.5mg/kg 患者体重。抗体可以每天、隔日、每周、每两周、每月、每季度或根据通过实证分析决定的任何其他时间表施用此类剂量。示例性的治疗需要长期施用多种剂量,例如至少六个月。另外的示例性治疗方案需要每两周施用一次或一月施用一次或每3至6个月施用一次。

[0749] 对于人施用,用于主动施用的剂的量在每个患者 0.1 - $500\mu\text{g}$,且更通常在每次注射 1 - 100 或 1 - $10\mu\text{g}$ 变化。注射的时间可以从一天一次至一年一次至十年一次显著变化。典型的方案由免疫,然后以诸如6周间隔或两个月的时间间隔进行加强注射组成。另一种方案由免疫,然后在1、2和12个月后进行加强注射组成。另一种方案需要两月一次终身注射。或者,加强注射可以如通过免疫应答的监测所指示的不规律地进行。

[0750] 抗体或用于诱导抗体的剂优选通过外部途径(即,施用的或诱导的抗体穿过血脑屏障到达脑部中的预期部位的途径)施用。施用途径包括局部、静脉内、口服、皮下、动脉内、颅内、鞘内、腹膜内、鼻内、眼内或肌内。抗体施用的一些途径是静脉内和皮下。主动免疫的一些途径是皮下和肌内。这种类型的注射最通常在手臂或腿部肌肉中进行。在一些方法中,将剂直接注射到积聚沉积物的特定组织中,例如颅内注射。

[0751] 用于肠胃外施用的药物组合物优选是无菌且基本上等渗并在GMP条件下制造的。

药物组合物可以单位剂型(即,用于单次施用的剂量)提供。可使用一种或多种生理上可接受的载体、稀释剂、赋形剂或助剂配制药物组合物。配方取决于所选择的施用途径。对于注射,抗体可在水溶液,优选在生理相容的缓冲液诸如汉克氏溶液(Hank's solution)、林格氏溶液(Ringer's solution)或生理盐水或乙酸盐缓冲液中(以减少注射部位的不适)中配制。溶液可含有配制剂,诸如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。或者,抗体可以是冻干形式,以在使用前用合适的媒介物(例如,无菌的无热原水)复原。

[0752] 本发明的方案可以与有效治疗或预防正在治疗的疾病的另一种剂组合施用。举例来说,在阿尔茨海默病的情况下,本发明的方案可以与针对A β 的免疫疗法(WO/2000/072880)、胆碱酯酶抑制剂或美金刚组合,或在帕金森病的情况下,本发明的方案可以与针对 α 突触核蛋白的免疫疗法WO/2008/103472、左旋多巴、多巴胺激动剂、COMT抑制剂、MAO-B抑制剂、金刚烷胺或抗胆碱能剂组合。

[0753] 抗体以有效方案施用,所述有效方案意指延迟发作、降低严重性、抑制进一步恶化和/或改善正在治疗的病症的至少一种体征或症状的剂量、施用途径和施用频率。如果患者已经患有病症,那么可以将该方案称为治疗有效方案。如果患者相对于普通群体患有该病症的风险高但尚未出现症状,那么将该方案称为预防有效方案。在一些情况下,相对于历史对照或同一患者的过去经历,可以在个别患者中观察到治疗或预防功效。在其他情况下,相对于未治疗患者的对照群体,可以在经治疗患者的群体的临床前或临床试验中证明治疗或预防功效。

[0754] 抗体的示例性剂量为0.1-60mg/kg(例如,0.5、3、10、30或60mg/kg)或0.5-5mg/kg体重(例如,0.5、1、2、3、4或5mg/kg)或作为固定剂量的10-4000mg或10-1500mg。剂量取决于患者的状况和对先前治疗的应答(如果有的话)、治疗是预防性的还是治疗性的以及该病症是急性的还是慢性的以及其他因素。

[0755] 施用可以是肠胃外、静脉内、口服、皮下、动脉内、颅内、鞘内、腹膜内、局部、鼻内或肌内。可以通过静脉内或皮下施用将一些抗体施用到体循环中。静脉内施用可以,例如,通过在诸如30-90min的时间内输注。

[0756] 施用频率取决于循环中抗体的半衰期、患者的状况和施用途径以及其他因素。频率可以是响应于患者状况的改变或正在治疗的病症的进展每天、每周、每月、每季度或不定期地。静脉内施用的示例性频率是在连续治疗过程内的每周与每季度之间,但也可以更频繁或更不频繁地给药。对于皮下施用,示例性给药频率是每天至每月,但也可以更频繁或更不频繁地给药。

[0757] 施用的剂量数取决于该病症是急性的还是慢性的以及该病症对治疗的应答。对于急性病症或慢性病症的急性加重,1与10剂量之间通常是足够的。有时单次推注剂量,任选地以分开形式,足以用于急性病症或慢性病症的急性加重。治疗可以重复用于急性病症或急性加重的复发。对于慢性病症,可以定期,例如,每周、每两周、每月、每季度、每六个月施用抗体至少1年、5年或10年,或患者终生。

[0758] A. 诊断和监测方法

[0759] 体内成像、诊断方法和优化免疫疗法

[0760] 本发明提供了在患者体内对tau蛋白沉积物(例如,神经原纤维缠结和tau包涵体)成像的方法。该方法通过向患者施用试剂诸如结合tau的抗体(例如,小鼠、人源化、嵌合或

饰面的9F5、10C12、2D11、12C4、17C12或14H3抗体),然后在其结合后检测该剂来工作。可使用在氨基酸残基QIVYKP (SEQ ID NO:57)、EIVYKSP (SEQ ID NO:58)、EIVYKS (SEQ ID NO:277) 或 (Q/E) IVYK (S/P) (SEQ ID NO:56) 内的表位处与tau特异性结合的抗体。在一些方法中,抗体与由氨基酸残基QIVYKP (SEQ ID NO:57)、EIVYKSP (SEQ ID NO:58)、EIVYKS (SEQ ID NO:277) 或 (Q/E) IVYK (S/P) (SEQ ID NO:56) 内的表位组成的肽结合。通过使用缺乏全长恒定区的抗体片段诸如Fab可以避免或减少对所施用抗体的清除应答。在一些方法中,相同的抗体可以用作治疗和诊断试剂两者。

[0761] 诊断试剂可以通过静脉内注射施用到患者体内,或通过颅内注射或通过颅骨上钻孔直接施用到脑部中。试剂的剂量应在与用于治疗方法相同的范围内。通常,对试剂进行标记,但在一些方法中,对tau具有亲和力的主要试剂未标记并且第二标记剂用于与主要试剂结合。标记的选择取决于检测手段。举例来说,荧光标记适用于光学检测。顺磁性标记的使用适用于无需外科手术干预的断层摄影检测。还可使用正电子发射断层摄影术 (PET) 或单光子发射计算机断层摄影术 (SPECT) 检测放射性标记。

[0762] tau蛋白沉积物的体内成像方法可用于诊断tau蛋白病 (诸如阿尔茨海默病、额颞叶变性、进行性核上性麻痹和皮克氏病) 或确认其诊断或对这种疾病的易感性。举例来说,该方法可用于表现出痴呆症状的患者。如果患者具有异常的神经原纤维缠结,那么患者可能患有阿尔茨海默病。或者,如果患者具有异常的tau包涵体,那么取决于内含物的位置,患者可能患有额颞叶变性。该方法还可用于无症状患者。异常tau蛋白沉积物的存在表明对未来症状性疾病的易感性。该方法还可用于在先前已被诊断患有tau相关疾病的患者中监测疾病进展和/或对治疗的应答。

[0763] 可以通过将标记基因座的数量、大小和/或强度与对应的基线值相比较来进行诊断。基线值可代表未患病个体的群体的平均水平。基线值还可代表在同一患者中确定的先前水平。举例来说,可以在开始tau免疫疗法治疗之前在患者中确定基线值,然后将测量值与基线值进行比较。相对于基线的值的减小传达了对治疗的阳性应答的信号。

[0764] 在一些患者中,可以通过进行PET扫描来辅助tau蛋白病的诊断。可使用例如常规的PET成像器和辅助设备来进行PET扫描。扫描通常包括通常已知与tau蛋白沉积物相关联的一个或多个脑部区域以及其中通常存在很少 (如果有的话) 沉积物以用作对照的一个或多个区域。

[0765] 在PET扫描中检测到的信号可以表示为多维图像。多维图像可以是表示穿过脑部的横截面的二维、表示三维脑部的三维或表示三维脑部随时间的变化的四维。可使用具有不同颜色的色标,从而指示不同的标记量并且推测性地指示所检测到的tau蛋白沉积物。扫描结果还可以利用与检测到的标记量以及因此检测到的tau蛋白沉积物的量相关的数字以数字方式呈现。存在于已知与特定tau蛋白病 (例如,阿尔茨海默病) 的沉积物相关联的脑部区域中的标记可与存在于已知与沉积物无关的区域中的标记进行比较,以提供指示前一个区域内的沉积物程度的比率。对于相同的放射性标记的配体,此类比例提供了不同患者之间的tau蛋白沉积物及其变化的可比较的度量。

[0766] 在一些方法中,PET扫描与MRI或CAT扫描同时或同一次患者就诊时进行。MRI或CAT扫描提供比PET扫描更多的脑部解剖细节。然而,来自PET扫描的图像可以叠加在MRI或CAT扫描图像上,从而更精确地指示相对于脑部的解剖结构PET配体的位置并由此推出tau

沉积物的位置。一些机器可以执行PET扫描和MRI或CAT扫描,而无需患者在扫描之间改变位置,从而有利于图像的叠加。

[0767] 合适的PET配体包括本发明的放射性标记的抗体(例如,小鼠、人源化、嵌合或饰面的9F5、10C12、2D11、12C4、17C12或14H3抗体)。所使用的放射性同位素可以是,例如, C^{11} 、 N^{13} 、 O^{15} 、 F^{18} 或 I^{123} 。施用PET配体与进行扫描之间的间隔可取决于PET配体,且具体地是其在脑部的摄取和清除速率,以及其放射性标记的半衰期。

[0768] PET扫描还可以作为预防措施在无症状患者中或在有轻度认知障碍症状但尚未被诊断患有tau蛋白病但发展tau蛋白病的风险高的患者中进行。对于无症状患者,扫描尤其适用于由于家族史、遗传或生化风险因素或中老年而被认为患tau蛋白病的风险高的个体。例如在45与75岁之间的患者年龄就可以开始预防性扫描。在一些患者中,在50岁时进行第一次扫描。

[0769] 预防性扫描可以以例如介于六个月与十年,优选地介于1至5年的间隔进行。在一些患者中,一年一次进行预防性扫描。如果作为预防措施进行的PET扫描指示异常高的tau蛋白沉积物水平,那么可以开始免疫疗法并且随后进行PET扫描,就像在被诊断患有tau蛋白病的患者中那样。如果作为预防措施进行的PET扫描指示tau蛋白沉积物的水平在正常水平内,那么可以像之前一样以介于六个月与10年之间、且优选地1至5年的间隔,或响应于tau蛋白病或轻度认知障碍的体征或症状的出现而进行另外的PET扫描。如果且当检测到高于正常水平的tau蛋白沉积物时,通过将预防性扫描与tau定向免疫疗法的施用组合,可以将tau蛋白沉积物的水平降低至或接近正常水平,或至少抑制进一步增加,并且与没有接受预防性扫描和tau定向免疫疗法相比,患者可以保持更长时间不患tau蛋白病(例如,至少5年、10年、15年或20年,或患者的余生)。

[0770] tau蛋白沉积物的正常水平可以通过未被诊断患有特定tau蛋白病(例如,阿尔茨海默氏病)且不被认为处于发展这种疾病的高风险的普通群体中的个体的代表性样品(例如,50岁以下无疾病个体的代表性样品)的脑部神经原纤维缠结或tau包涵体的量来确定。或者,如果已知其中发展了tau蛋白沉积物的脑部区域中的根据本方法的PET信号不同于(在测量的准确度内)来自其中已知此类沉积物通常不发展的脑部区域中的信号,那么可以在个体患者中识别正常水平。通过与正常水平(例如,外部平均值和标准偏差的方差)进行比较,或者仅仅由与不被已知与沉积物相关联的区域相比与tau蛋白沉积物相关联的脑部区域中超出实验误差的升高的信号,可以识别个体中的升高水平。为了比较个体和群体中tau蛋白沉积物的水平,tau蛋白沉积物应优选在脑部的一个或多个相同区域中确定,这些区域包括已知形成与特定的tau蛋白病(例如,阿尔兹海默病)相关联的tau蛋白沉积物的至少一个区域。具有升高水平的tau蛋白沉积物的患者是开始免疫疗法的候选者。

[0771] 在开始免疫疗法后,可首先将tau蛋白沉积物水平的降低视为治疗具有期望效果的指示。观察到的降低可以是,例如,在基线值的1%-100%、1%-50%或1%-25%的范围内。此类效果可以在已知沉积物在其中形成的脑部的一个或多个区域中测量,或可以由此类区域的平均值测量。治疗的总效果可以通过将相对于基线的减少百分比与平均未治疗患者中将可能存在的tau蛋白沉积物的增加相加来近似计算。

[0772] tau蛋白沉积物在大约恒定水平的维持或甚至tau蛋白沉积物的少量增加也可以指示对治疗的应答,尽管是非最佳应答。可以将此类应答与未接受治疗的患有特定tau蛋白

病(例如,阿尔茨海默病)的患者中的tau蛋白沉积物水平的时间过程进行比较,以确定免疫疗法是否具有抑制tau蛋白沉积物进一步增加的作用。

[0773] tau蛋白沉积物的变化的监测允许响应于治疗调整免疫疗法或其他治疗方案。PET监测提供了对治疗的应答的性质和程度的指示。然后,可以确定是否调整治疗,并且如果需要,可以响应于PET监测来调整治疗。因此,PET监测允许在其他生物标记物、MRI或认知测量已经可检测地响应之前调整tau蛋白定向免疫疗法或其他治疗方案。显著变化意指治疗后的参数值相对于基线的比较提供了治疗已经或尚未产生有益效果的一些证据。在一些情况下,患者自身中参数值的变化提供了治疗已经或尚未产生有益效果的证据。在其他情况下,将患者中的值的变化(如果有的话)与未进行免疫疗法的患者的代表性对照群体中的值的变化(如果有的话)进行比较。特定患者的应答与对照患者的正常应答的差异(例如,平均值加标准偏差的方差)也可以提供免疫疗法方案在患者中实现或未实现有益效果的证据。

[0774] 在一些患者中,监测指示了tau蛋白沉积物的可检测下降,但是tau蛋白沉积物的水平仍保持高于正常水平。在此类患者中,如果没有不可接受的副作用,那么治疗方案可以按原样继续,或甚至增加施用频率和/或剂量(如果尚未达到最大推荐剂量的话)。

[0775] 如果监测指示患者中tau蛋白沉积物的水平已经降低至tau蛋白沉积物的正常或接近正常水平,那么免疫治疗方案可以从诱导的方案(即,降低tau蛋白沉积物的水平)调整为维持的方案(即,将tau蛋白沉积物维持在大致恒定的水平)。这种方案可通过减少施用免疫疗法的剂量和/或频率实现。

[0776] 在其他患者中,监测可指示免疫疗法具有一些有益效果但是非最佳效果。最佳效果可以定义为在开始疗法后在给定时间点进行免疫疗法的tau蛋白病患者的代表性样品所经历的tau蛋白沉积物的变化的上半部分或四分点之内的tau蛋白沉积物水平的百分比减少(在整个脑部或已知tau蛋白沉积物在其中形成的其代表性区域中测量或计算)。经历较小降低的患者或其tau蛋白沉积物保持恒定或甚至增加但程度小于在不存在免疫疗法的情况下所预期的程度(例如,如从不施用免疫疗法的患者的对照组所推断的那样)的患者可被归类为经历阳性但非最佳的应答。此类患者可以任选地进行方案调整,其中增加了剂的剂量和或施用频率。

[0777] 在一些患者中,tau蛋白沉积物可以与不接受免疫疗法的患者中的tau沉积物质似或更大的方式增加。如果此类增加持续一段时间,诸如18个月或2年,甚至在剂的频率或剂量的任何增加之后,那么可以根据需要停止免疫疗法,以有利于其他治疗。

[0778] 诊断、监测和调整tau蛋白病的治疗的以上描述主要集中在使用PET扫描。然而,可使用用于可视化和/或测量适于本发明的tau抗体(例如,小鼠、人源化、嵌合或饰面的9F5、10C12、2D11、12C4、17C12或14H3抗体)的使用的tau蛋白沉积物的任何其他技术代替PET扫描来执行此类方法。

[0779] 还提供了在患有或易患与tau相关联的疾病的患者中检测针对tau的免疫应答的方法。所述方法可用于监测使用本文所提供的剂的治疗性和预防性治疗的过程。被动免疫后的抗体谱通常显示出抗体浓度的立即峰值,然后是指数衰减。在没有再次给药的情况下,衰变取决于所施用的抗体的半衰期在数天至数月的时间段内接近治疗前水平。举例来说,一些人抗体的半衰期为约20天。

[0780] 在一些方法中,在施用之前进行受试者中针对tau的抗体的基线测量,之后不久进

行第二次测量以确定峰值抗体水平,并且间隔地进行一次或多次进一步测量以监测抗体水平的衰减。当抗体水平已经下降至基线或低于基线的峰值(peak less baseline)的预定百分比(例如,50%、25%或10%)时,施用另一剂量抗体的施用。在一些方法中,将低于背景的峰值或随后测定的水平与先前测定的参考水平进行比较以在其他受试者中构建有益的预防性或治疗性治疗方案。如果测量的抗体水平显著小于参考水平(例如,小于由治疗受益的受试者群体中的参考值的平均值减一个或优选地,两个标准偏差),指示施用附加剂量的抗体。

[0781] 还提供了检测受试者中的tau的方法,例如,通过测量来自受试者的样品中的tau或通过受试者中的tau的体内成像。此类方法可用于诊断或确认与tau相关联的疾病的诊断或其易感性。所述方法还可用于无症状受试者。tau的存在指示对未来症状性疾病的易感性。所述方法还可用于监测先前已经被诊断患有以下疾病的受试者中的疾病进展和/或对治疗的应答:阿尔茨海默病、唐氏综合征、轻度认知障碍、原发性年龄相关性tau蛋白病(tauopathy)、脑炎后帕金森症、创伤后痴呆或拳击员痴呆、皮克氏病、C型尼曼-皮克病(type C Niemann-Pick disease)、核上性麻痹、额颞叶痴呆、额颞叶变性、嗜银颗粒病、球状神经胶质性tau蛋白病、关岛肌萎缩性侧索硬化/帕金森痴呆复征(amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism dementia complex of Guam)、皮质基底节变性(CBD)、路易体痴呆(dementia with Lewy bodies)、阿尔茨海默病的路易体变异(LBVAD)、慢性创伤性脑病变(CTE)、球状神经胶质性tau蛋白病(GGT)、帕金森病或进行性核上性麻痹(PSP)。

[0782] 可以使从患有以下疾病、疑似患有所述疾病或有患所述疾病风险的受试者获得的生物样品与本文所公开的抗体接触以评估tau的存在:阿尔茨海默病、唐氏综合征、轻度认知障碍、原发性年龄相关性tau蛋白病、脑炎后帕金森症、创伤后痴呆或拳击员痴呆、皮克氏病、C型尼曼-皮克病、核上性麻痹、额颞叶痴呆、额颞叶变性、嗜银颗粒病、球状神经胶质性tau蛋白病、关岛肌萎缩性侧索硬化/帕金森痴呆复征、皮质基底节变性(CBD)、路易体痴呆、阿尔茨海默病的路易体变异(LBVAD)、慢性创伤性脑病变(CTE)、球状神经胶质性tau蛋白病(GGT)、帕金森病或进行性核上性麻痹(PSP)。举例来说,可以将此类受试者中的tau水平与健康受试者中存在的那些水平进行比较。或者,可以将接受对该疾病的治疗的此类受试者中的tau水平与没有针对以下疾病进行治疗的受试者的那些tau水平相比较:阿尔茨海默病、唐氏综合征、轻度认知障碍、原发性年龄相关性tau蛋白病(tauopathy)、脑炎后帕金森症、创伤后痴呆或拳击员痴呆、皮克氏病、C型尼曼-皮克病(type C Niemann-Pick disease)、核上性麻痹、额颞叶痴呆、额颞叶变性、嗜银颗粒病、球状神经胶质性tau蛋白病、关岛肌萎缩性侧索硬化/帕金森痴呆复征(amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism dementia complex of Guam)、皮质基底节变性(CBD)、路易体痴呆(dementia with Lewy bodies)、阿尔茨海默病的路易体变异(LBVAD)、慢性创伤性脑病变(CTE)、球状神经胶质性tau蛋白病(GGT)、帕金森病或进行性核上性麻痹(PSP)。一些此类测试涉及从此类受试者中获得的组织活检。ELISA测定也可以是有用的方法,例如,用于评估流体样品中的tau。

[0783] VII. 药盒

[0784] 本发明还提供了包括本文所公开的抗体和相关材料诸如使用说明书(例如,包装插页)的药盒(例如,容器)。使用说明书可包含例如施用抗体和任选的一种或多种另外剂的

说明书。抗体的容器可以是单位剂量、散装(例如,多剂量包装)或亚单位剂量。

[0785] 包装插页是指治疗性产品的商业包装中通常包括的说明书,其包含关于适应症、用法、剂量、施用、禁忌症和/或关于此类治疗产品的使用的警告的信息。

[0786] 药盒还可包括第二容器,所述第二容器包括药学上可接受的缓冲液,诸如抑菌性注射用水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液和右旋糖溶液。它还可以包括从商业和用户角度所需的其他材料,包括其他缓冲剂、稀释剂、过滤器、针头和注射器。

[0787] VIII.其他应用

[0788] 抗体可用于在临床诊断或治疗或研究的情况下检测tau或其片段。举例来说,抗体可用于检测生物样品中tau的存在,作为生物样品包括tau沉积物的指示。可以将抗体与生物样品的结合同抗体与对照样品的结合进行比较。对照样品和生物样品可包括相同组织来源的细胞。对照样品和生物样品可以从相同的个体或不同的个体并且可以在相同的场合或在不同的场合获得。如果需要,在多个场合评价多个生物样品和多个对照样品,以对抗与样品之间的差异无关的随机变化。然后可以在一个或多个生物样品和一个或多个对照样品之间进行直接比较,以确定相对于抗体与一个或多个对照样品的结合而言,抗体与一个或多个生物样品的结合(即,tau的存在)增加、减少还是相同。相对于一个或多个对照样品,抗体与一个或多个生物样品的结合的增加表明一个或多个生物样品中存在tau。在一些情况下,增加的抗体结合在统计学上是显著的。任选地,抗体与生物样品的结合是抗体与对照样品的结合的至少1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍或100倍。

[0789] 此外,抗体可用于检测生物样品中tau的存在,以监测和评价用于治疗被诊断患有以下疾病的患者的治疗剂的功效:阿尔茨海默病、唐氏综合征、轻度认知障碍、原发性年龄相关性tau蛋白病、脑炎后帕金森症、创伤后痴呆或拳击员痴呆、皮克氏病、C型尼曼-皮克病、核上性麻痹、额颞叶痴呆、额颞叶变性、嗜银颗粒病、球状神经胶质性tau蛋白病、关岛肌萎缩性侧索硬化/帕金森痴呆复征、皮质基底节变性(CBD)、路易体痴呆、阿尔茨海默病的路易体变异(LBVAD)、慢性创伤性脑病变(CTE)、球状神经胶质性tau蛋白病(GGT)、帕金森病或进行性核上性麻痹(PSP)。对来自被诊断患有阿尔茨海默病、唐氏综合征、轻度认知障碍、原发性年龄相关性tau蛋白病、脑炎后帕金森症、创伤后痴呆或拳击员痴呆、皮克氏病、C型尼曼-皮克病、核上性麻痹、额颞叶痴呆、额颞叶变性、嗜银颗粒病、球状神经胶质性tau蛋白病、关岛肌萎缩性侧索硬化/帕金森痴呆复征、皮质基底节变性(CBD)、路易体痴呆、阿尔茨海默病的路易体变异(LBVAD)、慢性创伤性脑病变(CTE)、球状神经胶质性tau蛋白病(GGT)、帕金森病或进行性核上性麻痹(PSP)的患者的生物样品进行评价,以建立在用治疗剂开始疗法之前抗体与样品的结合的基线(即,样品中存在tau的基线)。在一些情况下,在多个场合评价来自患者的多个生物样品,以建立基线和与治疗无关的随机变化的量度。然后以一个方案施用治疗剂。该方案可包括在一段时间内多次施用剂。任选地,在多个场合在来自患者的多个生物样品中评价抗体的结合(即,tau的存在),以建立随机变化的量度并显示出响应于免疫疗法的趋势。然后比较抗体与生物样品的结合的各种评估。如果仅进行两次评估,那么可以在这两次评估之间进行直接比较,以确定抗体结合(即,tau的存在)在两次评估之间是否增加、减少或保持相同。如果进行了多于两次的测量,那么可以将测量分析为在用治疗剂治疗之前开始且在整个疗程中前进的时间过程。在抗体与生物样品的结合(即,tau的存在)减少的患者中,可以推断出治疗剂有效治疗患者中的以下疾病:阿尔茨海默病、唐氏

综合征、轻度认知障碍、原发性年龄相关性tau蛋白病、脑炎后帕金森症、创伤后痴呆或拳击员痴呆、皮克氏病、C型尼曼-皮克病、核上性麻痹、额颞叶痴呆、额颞叶变性、嗜银颗粒病、球状神经胶质性tau蛋白病、关岛肌萎缩性侧索硬化/帕金森痴呆复征、皮质基底节变性(CBD)、路易体痴呆、阿尔茨海默病的路易体变异(LBVAD)、慢性创伤性脑病变(CTE)、球状神经胶质性tau蛋白病(GGT)、帕金森病或进行性核上性麻痹(PSP)。抗体结合的减少在统计学上可以是显著的。任选地,结合减少至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。抗体结合的评估可以与评估以下疾病的其他体征和症状结合进行:阿尔茨海默病、唐氏综合征、轻度认知障碍、原发性年龄相关性tau蛋白病、脑炎后帕金森症、创伤后痴呆或拳击员痴呆、皮克氏病、C型尼曼-皮克病、核上性麻痹、额颞叶痴呆、额颞叶变性、嗜银颗粒病、球状神经胶质性tau蛋白病、关岛肌萎缩性侧索硬化/帕金森痴呆复征、皮质基底节变性(CBD)、路易体痴呆、阿尔茨海默病的路易体变异(LBVAD)、慢性创伤性脑病变(CTE)、球状神经胶质性tau蛋白病(GGT)、帕金森病或进行性核上性麻痹(PSP)。

[0790] 抗体还可以用作检测tau或其片段的实验室研究的研究试剂。在此类用途中,抗体可以用荧光分子、自旋标记分子、酶或放射性同位素标记,并且可以以具有用以执行检测测定的所有必需试剂的试剂盒的形式提供。抗体还可用于例如通过亲和色谱纯化tau或tau的结合配偶体。

[0791] 上文或下文引用的所有专利文件、网站、其他出版物、登录号等出于所有目的全文以引用方式并入,其程度如同每一个单独的项被特定且单独地指明以引用方式如此并入一样。如果一个序列的不同版本在不同的时间与一个登录号相关联,那么在本申请的有效申请日期与登录号相关联的版本是有意义的。有效申请日期意指早于实际申请日期或涉及到登录号的优先权申请的申请日期(如果适用的话)。同样,如果出版物、网站等的不同版本在不同的时间公布,那么在本申请的有效申请日期最近出版的版本是有意义的,除非另外指明。除非另外具体指明,否则本发明的任何特征、步骤、要素、实施方案或方面可以与任何其他组合使用。虽然出于清楚和理解的目的,已经通过说明和举例的方式对本发明进行了相当详细的描述,但很显然,可在所附权利要求的范围内实践某些变化和修改。

[0792] 实施例

[0793] 实施例1.tau单克隆抗体的鉴定和筛选

[0794] 用含有P301S突变的重组的带有N末端His标签的383a.a.人tau(4R0N)[免疫原A]或含有P301S突变、缺乏N末端His标签的重组的383a.a.人tau(4R0N)[免疫原B]执行免疫。将免疫原在RIBI佐剂中乳化。

[0795] 在第0天,用25μg免疫原A对五周龄的雌性A/J小鼠进行腹膜内免疫,并且在第7、14、21、27、34、48和55天各用10μg免疫原A进行腹膜内免疫。对于抗体10C12,在第43天将小鼠取血并针对免疫原A进行滴定。在第54天,将具有最高滴度的动物用50μg免疫原A的终末免疫(terminal immunization)加强,所述免疫原1/2腹膜内递送且1/2静脉内递送。

[0796] 对于抗体9F5、17C12、2D11、14H3和12C4,在第62天用额外的10μg免疫原A对动物进行免疫,并在第76天和第90天用10μg免疫原B对动物进行免疫。在第43天和第98天,将小鼠取血并针对免疫原A进行滴定。在第101天,将具有最高滴度的动物用50μg免疫原B的终末免疫加强,所述免疫原1/2腹膜内递送且1/2静脉内递送。对于所有抗体,通过针对两种免疫原

的ELISA对融合的杂交瘤进行筛选。

[0797] 进行采用荧光激活细胞分选(FACS)的内化测定,以评价各种抗体阻断tau神经元内化的能力。阻断内化的抗体可能会阻断tau的传播。将pHrodo标记的tau P301L可溶性寡聚体(1.5 μ g/ml最终浓度)与抗tau抗体(剂量滴定:80 μ g/ml起始浓度,然后是4倍连续稀释)在室温下在细胞培养基中预孵育30min。然后将TAU/抗体混合物以500,000个细胞/毫升最终浓度添加到B103神经母细胞瘤细胞系中并在37 $^{\circ}$ C下在组织培养孵育器(5%CO₂)中孵育3-4小时。然后用培养基将细胞洗涤3次,随后在培养基中孵育10分钟,并用FACS缓冲液(PBS中的1%FBS)洗涤2次。将细胞重悬于100 μ l FACS缓冲液中,通过FACS LSR II测量德克萨斯红(Texas Red)平均荧光强度。来自pHrodo的德克萨斯红荧光由在内化时与内容物区室相关联的低pH值激活。因为FACS检测到细胞,而pHrodo仅在内化时发出荧光,因此只检测到由细胞内化的tau。平均荧光强度越低,内化tau的量越少,表明所测试抗体的阻断活性更高。如表55和图3所示,小鼠3D6(W02017/191560)和小鼠9F5抗体对神经元内化的阻断程度显著高于其他测试抗体。小鼠9F5基于其新表位和pHrodo测定结果进行选择。

[0798] 表55:小鼠抗体9F5、3D6、5G8、16G7和16B5的内化测定结果

所有值都是与未处理细胞相比的最大信号%						
	对照	3D6	9F5	5G8	16G7	16B5
抗体浓度 (μ g/mL)						
62.5	87.7 $\pm$ 4.8	14.2 $\pm$ 1.7	18.1 $\pm$ 5	77.7 $\pm$ 3.2	33.9 $\pm$ 1.3	61.9 $\pm$ 5.7
15.625	86.2 $\pm$ 2.6	31 $\pm$ 1.6	24.2 $\pm$ 3.9	88.1 $\pm$ 7.6	51.4 $\pm$ 0.8	72.8 $\pm$ 6.2
3.9	81.2 $\pm$ 5.3	41.2 $\pm$ 2.2	35.9 $\pm$ 4.2	94.3 $\pm$ 5.3	62.2 $\pm$ 6.5	80.1 $\pm$ 3.1
0.98	75.4 $\pm$ 4.8	64.3 $\pm$ 0.6	71 $\pm$ 6.0	78.8 $\pm$ 3.7	56 $\pm$ 4.3	88.1 $\pm$ 9.1
0.244	82.9 $\pm$ 1.5	82.2 $\pm$ 9.2	71.7 $\pm$ 6.5	86 $\pm$ 4.6	74.6 $\pm$ 7.6	85.9 $\pm$ 1.6
0.061	84.5 $\pm$ 4.9	78.4 $\pm$ 9.2	78.1 $\pm$ 8.6	86.3 $\pm$ 4.1	85.3 $\pm$ 6.7	88.2 $\pm$ 1.3
0	93.3 $\pm$ 0.2	93.3 $\pm$ 0.2	93.3 $\pm$ 0.2	93.3 $\pm$ 0.2	93.3 $\pm$ 0.2	93.3 $\pm$ 0.2

[0800] 如表56和图15所示,小鼠10C12、小鼠12C4、小鼠2D11、小鼠17C12和小鼠14H3以与9F5抗体相似的程度阻断神经元内化。tau向神经元中内化是tau扩散和发病机制的重要初始步骤,阻断这一过程的抗体可能共享共同特征。基于pHrodo测定的结果选择小鼠10C12、小鼠12C4、小鼠2D11、小鼠17C12和小鼠14H3。

[0801] 表56:小鼠抗体9F5、10C12、17C12、2D11、14H3和12C4的内化测定结果

所有值都是与未处理细胞相比的最大信号%							
	对照	9F5	10C12	17C12	2D11	14H3	12C4
抗体浓度 (μ g/mL)							
62.5	87.7 $\pm$ 4.8	18.1 $\pm$ 5	34.5 $\pm$ 3.7	30.6 $\pm$ 1.8	28.4 $\pm$ 3.6	48.4 $\pm$ 3.5	37.3 $\pm$ 3.5
15.625	86.2 $\pm$ 2.6	24.2 $\pm$ 3.9	38.9 $\pm$ 1.5	32.4 $\pm$ 4.8	28.6 $\pm$ 2.9	53.2 $\pm$ 3.2	36.6 $\pm$ 1.9
3.9	81.2 $\pm$ 5.3	35.9 $\pm$ 4.2	55.2 $\pm$ 1.7	36.8 $\pm$ 2.5	43 $\pm$ 3.3	63.1 $\pm$ 9.9	42.6 $\pm$ 3.2
0.98	75.4 $\pm$ 4.8	71 $\pm$ 6.0	90.5 $\pm$ 3.6	63.9 $\pm$ 4.2	62.7 $\pm$ 4.8	67.8 $\pm$ 9.7	69.7 $\pm$ 7.0
0.244	82.9 $\pm$ 1.5	71.7 $\pm$ 6.5	9.09 $\pm$ 4.9	78.6 $\pm$ 0.8	79.5 $\pm$ 8.2	66 $\pm$ 5.6	78.6 $\pm$ 5.1
0.061	84.5 $\pm$ 4.9	78.1 $\pm$ 8.6	86.7 $\pm$ 4.0	79.8 $\pm$ 4.7	71.5 $\pm$ 6.4	79.7 $\pm$ 6.8	78.2 $\pm$ 7.1
0	93.3 $\pm$ 0.2	93.3 $\pm$ 0.2	93.3 $\pm$ 0.19	93.7 $\pm$ 0.7	93.3 $\pm$ 0.2	93.3 $\pm$ 0.2	93.7 $\pm$ 0.7

[0804] 实施例2.通过ELISA分析对小鼠抗体9F5、2D11、10C12、17C12、12C4和14H3的表位

作图

[0805] 对于ELISA作图,使用跨越整个tau蛋白长度的肽。肽含有15个氨基酸,有5个氨基酸重叠。为了能够结合至链霉抗生物素蛋白表面,肽还含有N末端生物素。将肽在链霉抗生物素蛋白包被的平板上孵育,并且将平板用1x PBS中的1%BSA封闭。洗涤后,将抗体在平板上于室温下孵育1小时并洗涤。然后用山羊抗小鼠辣根过氧化物酶(HRP)包被平板,并洗涤。平板用OPD显影,并在490nm处读取吸光度。

[0806] ELISA数据表明,小鼠9F5、小鼠10C12、小鼠2D11、小鼠17C12、小鼠12C4和小鼠14H3均与含有tau的最长CNS同种型(441aa,Uniprot ID P10636-8;SEQ ID NO:1)的残基302-316以及残基383-397的肽强烈结合。肽302-316和383-397两者含有“IVYK”(SEQ ID NO:276)重复序列,其已被证明对tau聚集和自缔合很重要,并且形成tau聚集体的 β 折叠核;此外,它已被证明是tau接种的重要位点。与结合MTBR中的区域的其他抗体相比,这可能允许小鼠9F5、小鼠10C12、小鼠2D11、小鼠17C12、小鼠12C4和小鼠14H3结合一系列聚集的构象异构体。此外,“IVYK”(SEQ ID NO:276)重复序列已被证明是tau接种的重要位点,这表明抗体与该区域的结合可中断tau病理的进展,或可用于检测种子感受态物质的诊断能力中。

[0807] 实施例3.通过肽微阵列分析对小鼠抗体9F5、2D11、10C12和17C12的表位作图

[0808] 方法

[0809] 通过肽微阵列分析对9F5、2D11、10C12和17C12进行表位分析。将全长人tau(441个氨基酸)的序列在C末端和N末端用中性GSGSGSG(SEQ ID NO:59)接头连接并延长以避免截短的肽。将连接并延长的抗原序列翻译成15个氨基酸的肽,有14个氨基酸的肽-肽重叠。所得肽微阵列含有441个不同的肽,这些肽以一式两份打印(882个肽点),并由额外的HA(YPYDVDPYAG,SEQ ID NO:60,82个点)对照肽框住。

[0810] 合成后,封闭微阵列以防止非特异性结合(Rockland目录号MB-070)。然后将鼠9F5(1 μ g/mL浓度)连同阳性对照小鼠单克隆抗HA(12CA5)DyLight800(0.5 μ g/ml)在4 $^{\circ}$ C下施加到微阵列持续16h,并以140rpm振荡。洗涤微阵列,在室温下施加二抗(山羊抗小鼠IgG(H+L)DyLight680(0.2 μ g/ml))持续45分钟。进一步洗涤后,使用Licor Odyssey成像系统对微阵列进行成像。

[0811] 点强度和肽注释的定量是基于扫描强度为7/7的16位灰度tiff文件,其表现出比24位彩色tiff文件更高的动态范围;使用PepSlide[®]分析器进行微阵列图像分析。软件算法将每个点的荧光强度分为原始、前景和背景信号,并计算平均中值前景强度和点重复点到点的偏差(参见“原始数据”选项卡)。基于平均中值前景强度,生成强度图,肽图中的相互作用由强度颜色突出显示,其中红色代表高点强度,白色代表低点强度。允许的最大点到点偏差为40%,否则将对应的强度值调为零。

[0812] 结果

[0813] 对于小鼠9F5、小鼠10C12和小鼠17C12,观察到非常强烈的针对由具有非常相似的共有基序QIVYKP(SEQ ID NO:57)和EIVYKSP(SEQ ID NO:58)(分别对应于tau最长CNS同种型(441aa,Uniprot ID P10636-8;SEQ ID NO:1)的氨基酸序列307-312和391-397)的相邻肽形成的两个表位样点型式的单克隆抗体应答。这指示用于小鼠9F5、小鼠10C12和小鼠17C12的表位(Q/E)IVYK(S/P)(SEQ ID NO:56)。

[0814] 对于小鼠2D11,观察到非常强烈的针对由具有非常相似的共有基序QIVYKP(SEQ

ID NO:57)和EIVYKS(SEQ ID NO:277) (分别对应于tau最长CNS同种型(441aa,Uniprot ID P10636-8;SEQ ID NO:1)的氨基酸序列307-312和391-396)的相邻肽形成的两个表位样点型式的单克隆抗体应答。这指示用于小鼠2D11的表位(Q/E)IVYK(S/P)(SEQ ID NO:56)。

[0815] 实施例4.人源化9F5抗体的设计

[0816] 人源化的起点或供体抗体是小鼠抗体9F5。成熟m9F5的重链可变氨基酸序列作为SEQ ID NO:7提供。成熟m9F5的轻链可变氨基酸序列作为SEQ ID NO:11提供。重链Kabat/Chothia复合物CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列分别作为SEQ ID NO:8-10提供。轻链Kabat CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列分别作为SEQ ID NO 12-14提供。始终使用Kabat编号。

[0817] 9F5的可变κ(Vk)属于小鼠Kabat第2亚组,其对应于人Kabat第2亚组,并且可变重链(Vh)属于小鼠Kabat第2c亚组,其对应于人Kabat第1亚组[Kabat E.A.等人,(1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版.NIH出版号91-3242]。16残基Chothia CDR-L1类似于Chothia规范类别4,7残基Chothia CDR-L2属于Chothia规范类别1,9残基Chothia CDR-L3类似于Chothia规范类别1[Martin ACR.(2010)Protein sequence and structure analysis of antibody variable domains.Kontermann R and Dübel S (编辑).Antibody Engineering.Heidelberg,Germany:Springer International PublishingAG..[Martin,2010]。10残基Chothia CDR-H1类似于Chothia规范类别1,17残基Chothia CDR-H2类似于Chothia规范类别2[Martin,2010]。3残基CDR-H3没有规范类别。对PDB数据库中的蛋白质序列进行了搜索[Deshpande N等人,(2005)Nucleic Acids Res.33:D233-7],以寻找将提供9F5的粗略结构模型的结构。抗体fab pdb代码50BF[Vicentini等人,2017,未公布]的晶体结构用于Vh和Vk结构,因为它具有良好的分辨率(1.92Å)和与9F5Vh和Vk的整体序列相似性,保留了相同的环规范结构。

[0818] 9F5VH的框架与由Wedemayer,G.J.等人(1997,Science 276:1665-1669)设计的人源化48G7Fab PDB:2RCS和由McElhiney,J.等人(2002,Appl.Environ.Microbiol.68(11), 5288-5295)克隆的重链AAN16432的对应区域共享高度的序列相似性。9F5和AAN16432&48G7fab的可变结构域的CDR-H1、H2环也共享相同的长度。类似地,9F5VL的框架与分别由Capello等人(GenBank参考号CAB51297,1999年7月20日提交,未公布)和Cooper L.J等人(1993,J.Immunol.150(6),2231-2242)克隆的人抗体CAB51297VL和1911357B VL的对应区域具有高度的序列相似性。9F5和CAB51297&1911357B抗体的轻链可变结构域的CDR-L1、L2和L3环共享相同的长度。因此,选择AAN16432VH&48G7VH(2RCS-VH)和CAB51297VL&1911357B VL的框架区作为9F5的CDR的杂合受体序列。构建了接枝到VH和VL的相应人框架上的9F5CDR模型,并将其用作进一步回复突变的指导。

[0819] 使用IMGT Domain GapAlign工具将由抗体人源化过程产生的重链和轻链变体序列与人种系序列进一步比对,以评估重链和轻链的人源性(humanness),如WHO INN委员会准则所概述的。(WHO-INN:International nonproprietary names(INN)for biological and biotechnological substances(a review)(互联网)2014。可获自:<http://www.who.int/medicines/services/inn/BioRev2014.pdf>) 在可能的情况下,改变残基以与对应的人种系序列对齐,以增强人源性并降低潜在免疫原性。对于人源化VLv2、VLv3、VLv4、VLv5、VLv6、VLv7、VLv8和VLv9变体,引入突变以使序列更类似于人种系基因IGKV2-28*01&IGKJ2*01(SEQ ID NO:37)。对于人源化VHv2、VHv3、VHv4、VHv5、VHv6、VHv7、VHv8、VHv9和

VHv10变体,引入突变以使序列更类似于人种系基因IGHV1-69-2*01(SEQ IDN0:33)。

[0820] hu9F5-VH和hu9F5-VL的其他型式被设计成使得能够评估各种框架残基对抗原结合、热稳定性和免疫原性的贡献,以及脱氨基、氧化、N-糖基化、蛋白水解和聚集的优化。考虑进行突变的位置包括如下那些…考虑进行突变的位置包括如下那些…

[0821] -限定规范的CDR构象(概述于Martin,A.C.R.(2010)Protein sequence and structure analysis of antibody variable domains.Kontermann R and Dübél S(编辑).Antibody Engineering.Heidelberg,Germany:Springer International Publishing AG.),

[0822] -位于微调区内(Foote J和Winter G.(1992)Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops.J Mol Biol.224(2):487-99.),

[0823] -定位到VH/VL结构域界面(概述于Léger OJP和Saldanha J.(2000)Preparation of recombinant antibodies from immune rodent spleens and the design of their humanisation by CDR grafting.Shepherd P and Dean C(编辑).Monoclonal Antibodies:a Practical Approach.Oxford,UK:Oxford University Press.),

[0824] -易进行翻译后修饰,诸如糖基化或焦谷氨酰胺化,

[0825] 根据接枝到VH和VL框架上的9F5CDR模型,被经预测与CDR冲突的残基占据,或者

[0826] -被于测序的人抗体中罕见的残基占据,其中亲本小鼠9F5残基或一些其他残基在人抗体库中更为普遍。

[0827] 对鼠9F5和各种人源化抗体的比对示出轻链可变区(表7和图2A至图2B、图5A至图5B、图6A至图6C)和重链可变区(表6和图1A至图1B、图4A至图4B)。

[0828] 构建了10个人源化重链可变区变体和9个人源化轻链可变区变体,其包含不同的取代排列:hu9F5VHv1、hu9F5VHv2、hu9F5VHv3、hu9F5VHv4、hu9F5VHv5、hu9F5VHv6、hu9F5VHv7、hu9F5VHv8、hu9F5VHv9或9F5VHv10(分别为SEQ ID N0:15-22、SEQ IDN0:127-128);和hu9F5VLv1、hu9F5VLv2、hu9F5VLv3、hu9F5VLv4、hu9F5VLv5、hu9F5VLv6、hu9F5VLv7、hu9F5VLv8或hu9F5VLv9(分别为SEQ ID N0:23-29、SEQ ID N0:130-131)(表6和表7)。具有基于所选人框架的回复突变和其他突变的示例性人源化Vk和Vh设计分别在表6和表7中示出。表6和表7中的粗体显示区域表示由Kabat/Chothia复合物定义的CDR。表6和表7的列中的“-”表示在指示位置处没有残基。SEQ ID N0:15-22和SEQ ID N0:127-128,以及SEQ ID N0:23-29和SEQ ID N0:130-131含有如表8所示的回复突变和其他突变。hu9F5VHv1、hu9F5VHv2、hu9F5VHv3、hu9F5VHv4、hu9F5VHv5、hu9F5VHv6、hu9F5VHv7、hu9F5VHv8、hu9F5VHv9和hu9F5VHv10中各位置处的氨基酸在表9中列出。hu9F5VLv1、hu9F5VLv2、hu9F5VLv3、hu9F5VLv4、hu9F5VLv5、hu9F5VLv6、hu9F5VLv7、hu9F5VLv8和hu9F5VLv9中各位置处的氨基酸在表10中列出。具有取代N60D的Hu9F5VLv8也称为hu9F5VLv9。

[0829] 人源化VH链hu9F5VHv1、hu9F5VHv2、hu9F5VHv3、hu9F5VHv4、hu9F5VHv5、hu9F5VHv6、hu9F5VHv7、hu9F5VLv8、hu9F5VHv9和hu9F5VHv10(分别为SEQ ID N0:15-22和SEQ IDN0:127-128)相对于最相似的人种系基因IGHV1-69-2*01(SEQ IDN0:33)的人源性百分比,以及人源化VL链hu9F5VLv1、hu9F5VLv2、hu9F5VLv3、hu9F5VLv4、hu9F5VLv5、hu9F5VLv6、hu9F5VLv7、hu9F5VLv8和hu9F5VLv9(分别为SEQ ID N0:23-29和SEQ IDN0:130-

131) 相对于最相似的人种系基因IGKV2-28*01&IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37) 的人源性百分比在表11中示出。

[0830] 表6

[0831]

Kabat 残基号	线性残基号	FR 或 CDR	小鼠 9F5 VH (SEQ ID NO:7)	IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)	AAN16432-VH_huFrwk (SEQ ID NO:31)	2RCS-VH_huFrwk (SEQ ID NO:32)	Hu9F5VHv1 (SEQ ID NO:15)	Hu9F5VHv2 (SEQ ID NO:16)	Hu9F5VHv3 (SEQ ID NO:17)	Hu9F5VHv4 (SEQ ID NO:18)	Hu9F5VHv5 (SEQ ID NO:19)	Hu9F5VHv6 (SEQ ID NO:20)	Hu9F5VHv7 (SEQ ID NO:21)	Hu9F5VHv8 (SEQ ID NO:22)	Hu9F5VHv9 (SEQ ID NO:127)	Hu9F5VHv10 (SEQ ID NO:128)
1	1	Fr1	E	E	E	Q	Q	E	E	E	E	E	E	E	E	E
2	2	Fr1	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
3	3	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
4	4	Fr1	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
5	5	Fr1	Q	V	V	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	V	V	V	V
6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
7	7	Fr1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
8	8	Fr1	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
9	9	Fr1	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
10	10	Fr1	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
11	11	Fr1	L	V	V	L	L	L	L	L	L	L	V	V	V	V
12	12	Fr1	V	K	K	V	V	V	V	V	V	V	K	K	K	K
13	13	Fr1	R	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
14	14	Fr1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
15	15	Fr1	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
16	16	Fr1	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
17	17	Fr1	S	T	S	S	S	T	T	T	T	T	T	T	T	T
18	18	Fr1	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
19	19	Fr1	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
20	20	Fr1	L	I	V	L	L	I	I	I	I	I	I	I	I	I
21	21	Fr1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
22	22	Fr1	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
23	23	Fr1	T	K	K	T	T	T	T	K	K	K	K	K	K	K
24	24	Fr1	A	V	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

[0832]

Kabat 残基号	线性残基号	FR 或 CDR	小鼠 9F5 VH (SEQ ID NO:7)	IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)	AAN16432-VH_huFrwk (SEQ ID NO:31)	2RCS-VH_huFrwk (SEQ ID NO:32)	Hu9F5VHv1 (SEQ ID NO:15)	Hu9F5VHv2 (SEQ ID NO:16)	Hu9F5VHv3 (SEQ ID NO:17)	Hu9F5VHv4 (SEQ ID NO:18)	Hu9F5VHv5 (SEQ ID NO:19)	Hu9F5VHv6 (SEQ ID NO:20)	Hu9F5VHv7 (SEQ ID NO:21)	Hu9F5VHv8 (SEQ ID NO:22)	Hu9F5VHv9 (SEQ ID NO:127)	Hu9F5VHv10 (SEQ ID NO:128)
25	25	Fr1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
26	26	CDR-H1	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
27	27	CDR-H1	F	Y	Y	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
28	28	CDR-H1	N	T	T	N	N	N	N	T	T	T	N	N	N	N
29	29	CDR-H1	I	F	L	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
30	30	CDR-H1	K	T	T	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
31	31	CDR-H1	D	D	E	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
32	32	CDR-H1	D	Y	L	T	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
33	33	CDR-H1	Y	Y	S	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
34	34	CDR-H1	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
35	35	CDR-H1	N	H	H	H	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
35A		CDR-H1	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
35B		CDR-H1	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
36	36	Fr2	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
37	37	Fr2	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
38	38	Fr2	K	Q	R	K	K	K	K	K	K	K	R	R	Q	K
39	39	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
40	40	Fr2	R	A	A	R	R	R	R	R	R	A	A	A	R	R
41	41	Fr2	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
42	42	Fr2	E	G	G	E	E	E	E	E	E	E	G	G	G	E
43	43	Fr2	R	K	K	Q	Q	Q	Q	Q	K	K	K	K	K	K

[0833]

Kabat 残基号	线性残基号	FR 或 CDR	小鼠 9F5 VH (SEQ ID NO:7)	IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)	AA N16432-VH_huFrwk (SEQ ID NO:31)	2RCS-VH_huFrwk (SEQ ID NO:32)	Hu9F5VHv1 (SEQ ID NO:15)	Hu9F5VHv2 (SEQ ID NO:16)	Hu9F5VHv3 (SEQ ID NO:17)	Hu9F5VHv4 (SEQ ID NO:18)	Hu9F5VHv5 (SEQ ID NO:19)	Hu9F5VHv6 (SEQ ID NO:20)	Hu9F5VHv7 (SEQ ID NO:21)	Hu9F5VHv8 (SEQ ID NO:22)	Hu9F5VHv9 (SEQ ID NO:127)	Hu9F5VHv10 (SEQ ID NO:128)
44	44	Fr2	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
45	45	Fr2	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
46	46	Fr2	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
47	47	Fr2	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
48	48	Fr2	I	M	M	I	I	I	I	I	I	M	I	I	I	I
49	49	Fr2	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
50	50	CDR-H2	W	L	G	R	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
51	51	CDR-H2	I	V	F	I	I	I	I	I	V	V	V	V	I	I
52	52	CDR-H2	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
52A	53	CDR-H2	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
52B		CDR-H2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
52C		CDR-H2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
53	54	CDR-H2	E	E	E	A	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
54	55	CDR-H2	N	D	D	N	N	N	N	N	D	D	D	N	N	N
55	56	CDR-H2	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
56	57	CDR-H2	D	E	E	N	D	D	D	D	E	E	E	D	D	D
57	58	CDR-H2	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
58	59	CDR-H2	E	I	I	K	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
59	60	CDR-H2	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
60	61	CDR-H2	A	A	A	D	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
61	62	CDR-H2	S	E	Q	P	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

[0834]

Kabat 残基号	线性残基号	FR 或 CDR	小鼠 9F5 VH (SEQ ID NO:7)	IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)	AAN16432-VH_huFrwk (SEQ ID NO:31)	2RCS-VH_huFrwk (SEQ ID NO:32)	Hu9F5VHv1 (SEQ ID NO:15)	Hu9F5VHv2 (SEQ ID NO:16)	Hu9F5VHv3 (SEQ ID NO:17)	Hu9F5VHv4 (SEQ ID NO:18)	Hu9F5VHv5 (SEQ ID NO:19)	Hu9F5VHv6 (SEQ ID NO:20)	Hu9F5VHv7 (SEQ ID NO:21)	Hu9F5VHv8 (SEQ ID NO:22)	Hu9F5VHv9 (SEQ ID NO:127)	Hu9F5VHv10 (SEQ ID NO:128)
62	63	CDR-H2	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
63	64	CDR-H2	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
64	65	CDR-H2	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
65	66	CDR-H2	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
66	67	Fr3	K	R	R	K	K	K	R	R	R	R	R	R	R	R
67	68	Fr3	A	V	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
68	69	Fr3	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
69	70	Fr3	M	I	M	I	I	M	M	M	M	M	M	M	M	M
70	71	Fr3	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
71	72	Fr3	A	A	E	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
72	73	Fr3	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
73	74	Fr3	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
74	75	Fr3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
75	76	Fr3	S	T	T	S	S	T	T	T	T	T	T	T	T	T
76	77	Fr3	N	D	D	N	N	N	N	N	D	D	D	D	N	N
77	78	Fr3	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
78	79	Fr3	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
79	80	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
80	81	Fr3	L	M	M	L	L	L	L	L	M	M	M	M	M	M
81	82	Fr3	Q	E	E	Q	Q	Q	E	E	E	E	E	E	E	E
82	83	Fr3	F	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
82A	84	Fr3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
82B	85	Fr3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

[0835]

Kabat 残基号	线性残基号	FR 或 CDR	小鼠 9F5 VH (SEQ ID NO:7)	IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)	AANI6432-VH_huFrwk (SEQ ID NO:31)	2RCS-VH_huFrwk (SEQ ID NO:32)	Hu9F5VHv1 (SEQ ID NO:15)	Hu9F5VHv2 (SEQ ID NO:16)	Hu9F5VHv3 (SEQ ID NO:17)	Hu9F5VHv4 (SEQ ID NO:18)	Hu9F5VHv5 (SEQ ID NO:19)	Hu9F5VHv6 (SEQ ID NO:20)	Hu9F5VHv7 (SEQ ID NO:21)	Hu9F5VHv8 (SEQ ID NO:22)	Hu9F5VHv9 (SEQ ID NO:127)	Hu9F5VHv10 (SEQ ID NO:128)
82C	86	Fr3	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
83	87	Fr3	T	R	R	T	T	T	T	R	R	R	R	R	R	R
84	88	Fr3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
85	89	Fr3	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
86	90	Fr3	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
87	91	Fr3	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
88	92	Fr3	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
89	93	Fr3	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
90	94	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
91	95	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
92	96	Fr3	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
93	97	Fr3	T	A	A	A	A	T	T	T	T	T	T	T	T	T
94	98	Fr3	T	T	G	S	S	T	T	T	T	T	T	T	T	T
95	99	CDR-H3	S	-	Y	Y	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
96		CDR-H3	-	-	R	Y	-	-	-	-	-	-	-	-		
97		CDR-H3	-	-	S	G	-	-	-	-	-	-	-	-		
98		CDR-H3	-	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
99		CDR-H3	-	-	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
100		CDR-H3	-	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
100 A		CDR-H3	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
100 B		CDR-H3	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
100 C		CDR-H3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

[0836]

Kabat 残基号	线性残基号	FR 或 CDR	小鼠 9F5 VH (SEQ ID NO:7)	IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)	AA16432-VH_huFrwk (SEQ ID NO:31)	2RCS-VH_huFrwk (SEQ ID NO:32)	Hu9F5VHv1 (SEQ ID NO:15)	Hu9F5VHv2 (SEQ ID NO:16)	Hu9F5VHv3 (SEQ ID NO:17)	Hu9F5VHv4 (SEQ ID NO:18)	Hu9F5VHv5 (SEQ ID NO:19)	Hu9F5VHv6 (SEQ ID NO:20)	Hu9F5VHv7 (SEQ ID NO:21)	Hu9F5VHv8 (SEQ ID NO:22)	Hu9F5VHv9 (SEQ ID NO:127)	Hu9F5VHv10 (SEQ ID NO:128)
100 D		CDR-H3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
100 E		CDR-H3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
100 F		CDR-H3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
100 G		CDR-H3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
100 H		CDR-H3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
100 I		CDR-H3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
100 J		CDR-H3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
100 K		CDR-H3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
101	100	CDR-H3	N	Q	N	I	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
102	101	CDR-H3	G	H	K	Y	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
103	102	Fr4	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
104	103	Fr4	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
105	104	Fr4	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
106	105	Fr4	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
107	106	Fr4	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
108	107	Fr4	L	L	L	T	T	T	T	T	L	L	L	L	L	L
109	108	Fr4	V	V	V	L	L	V	V	V	V	V	V	V	V	V
110	109	Fr4	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
111	110	Fr4	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
112	111	Fr4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
113	112	Fr4	T	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

[0837] 表7

[0838]

Kabat 残基号	线性残基号	FR 或 CDR	小鼠 9F5 VL (SEQ ID NO:11) IGKV2-28*01 & IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37) CAB51297-VL_huFrwk (SEQ ID NO:35) 1911357B-VL_huFrwk (SEQ ID NO:36) Hu9F5VLv1 (SEQ ID NO:23) Hu9F5VLv2 (SEQ ID NO:24) Hu9F5VLv3 (SEQ ID NO:25) Hu9F5VLvv4 (SEQ ID NO:26) Hu9F5VLv5 (SEQ ID NO:27) Hu9F5VLv6 (SEQ ID NO:28) Hu9F5VLv7 (SEQ ID NO:29) Hu9F5VLv8 (SEQ ID NO:130) Hu9F5VLv9 (SEQ ID NO:131)												
1	1	Fr1	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
2	2	Fr1	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
3	3	Fr1	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
4	4	Fr1	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
5	5	Fr1	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
7	7	Fr1	A	S	S	A	A	S	S	S	S	S	S	S	S
8	8	Fr1	A	P	P	A	A	P	P	P	P	P	P	P	P
9	9	Fr1	F	L	L	F	F	F	F	F	F	F	L	F	F
10	10	Fr1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
11	11	Fr1	N	L	L	N	N	N	N	L	L	L	L	L	L
12	12	Fr1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
13	13	Fr1	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
14	14	Fr1	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
15	15	Fr1	L	P	P	L	L	P	P	P	P	P	P	P	P
16	16	Fr1	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
17	17	Fr1	T	E	E	T	T	T	E	E	E	E	E	E	E
18	18	Fr1	S	P	P	S	S	S	S	S	S	S	P	S	S
19	19	Fr1	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
20	20	Fr1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
21	21	Fr1	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
22	22	Fr1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

[0839]

Kabat 残基号	线性残基号	FR 或 CDR	小鼠 9F5 VL (SEQ ID NO:11)	IGKV2-28*01 & IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)	CAB51297-VL_huFrwk (SEQ ID NO:35)	1911357B-VL_huFrwk (SEQ ID NO:36)	Hu9F5VLv1 (SEQ ID NO:23)	Hu9F5VLv2 (SEQ ID NO:24)	Hu9F5VLv3 (SEQ ID NO:25)	Hu9F5VLv4 (SEQ ID NO:26)	Hu9F5VLv5 (SEQ ID NO:27)	Hu9F5VLv6 (SEQ ID NO:28)	Hu9F5VLv7 (SEQ ID NO:29)	Hu9F5VLv8 (SEQ ID NO:130)	Hu9F5VLv9 (SEQ ID NO:131)
23	23	Fr1	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
24	24	CDR-L1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
25	25	CDR-L1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
26	26	CDR-L1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
27	27	CDR-L1	K	Q	Q	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
27A	28	CDR-L1	S	S	S	N	S	S	S	S	S	S	S	S	S
27B	29	CDR-L1	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
27C	30	CDR-L1	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
27D	31	CDR-L1	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
27E	32	CDR-L1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
27F		CDR-L1	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-		
28	33	CDR-L1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
29	34	CDR-L1	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
30	35	CDR-L1	I	Y	Y	I	I	I	I	I	Y	Y	I	I	I
31	36	CDR-L1	T	N	N	T	T	T	T	T	T	T	N	T	T
32	37	CDR-L1	Y	Y	Y	F	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
33	38	CDR-L1	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
34	39	CDR-L1	Y	D	D	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
35	40	Fr2	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
36	41	Fr2	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y

[0840]

Kabat 残基号	线性残基号	FR 或 CDR	小鼠 9F5 VL (SEQ ID NO:11)	IGKV2-28*01 & IGHJ2*01 (SEQ ID NO:37)	CAB51297-VL_huFrwk (SEQ ID NO:35)	1911357B-VL_huFrwk (SEQ ID NO:36)	Hu9F5VLv1 (SEQ ID NO:23)	Hu9F5VLv2 (SEQ ID NO:24)	Hu9F5VLv3 (SEQ ID NO:25)	Hu9F5VLv4 (SEQ ID NO:26)	Hu9F5VLv5 (SEQ ID NO:27)	Hu9F5VLv6 (SEQ ID NO:28)	Hu9F5VLv7 (SEQ ID NO:29)	Hu9F5VLv8 (SEQ ID NO:130)	Hu9F5VLv9 (SEQ ID NO:131)
37	42	Fr2	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
38	43	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
39	44	Fr2	K	K	K	R	R	R	R	R	R	R	K	K	K
40	45	Fr2	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
41	46	Fr2	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
42	47	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
43	48	Fr2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
44	49	Fr2	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
45	50	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
46	51	Fr2	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
47	52	Fr2	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
48	53	Fr2	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
49	54	Fr2	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
50	55	CDR-L2	Q	L	L	R	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
51	56	CDR-L2	M	G	G	V	M	M	M	G	G	G	G	M	M
52	57	CDR-L2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
53	58	CDR-L2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
54	59	CDR-L2	L	R	R	L	L	L	L	R	R	R	R	L	L
55	60	CDR-L2	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
56	61	CDR-L2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
57	62	Fr3	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
58	63	Fr3	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V

[0841]

Kabat 残基号	线性残基号	FR 或 CDR	小鼠 9F5 VL (SEQ ID NO:11)		IGKV2-28*01 & IGHJ2*01 (SEQ ID NO:37)	CAB51297-VL_huFrwk (SEQ ID NO:35)	1911357B-VL_huFrwk (SEQ ID NO:36)	Hu9F5VLv1 (SEQ ID NO:23)	Hu9F5VLv2 (SEQ ID NO:24)	Hu9F5VLv3 (SEQ ID NO:25)	Hu9F5VLv4 (SEQ ID NO:26)	Hu9F5VLv5 (SEQ ID NO:27)	Hu9F5VLv6 (SEQ ID NO:28)	Hu9F5VLv7 (SEQ ID NO:29)	Hu9F5VLv8 (SEQ ID NO:130)	Hu9F5VLv9 (SEQ ID NO:131)
59	64	Fr3	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
60	65	Fr3	D	D	D	N	N	N	N	N	N	N	N	D	N	D
61	66	Fr3	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
62	67	Fr3	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
63	68	Fr3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
64	69	Fr3	S	G	G	G	S	S	G	G	G	G	G	G	S	S
65	70	Fr3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
66	71	Fr3	G	G	G	E	G	G	G	G	G	G	E	G	G	G
67	72	Fr3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
68	73	Fr3	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
69	74	Fr3	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
70	75	Fr3	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
71	76	Fr3	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
72	77	Fr3	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
73	78	Fr3	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
74	79	Fr3	R	K	K	R	R	R	R	R	R	R	R	K	K	K
75	80	Fr3	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
76	81	Fr3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
77	82	Fr3	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
78	83	Fr3	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
79	84	Fr3	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
80	85	Fr3	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
81	86	Fr3	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
82	87	Fr3	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D

[0842]

Kabat 残基号	线性残基号	FR 或 CDR	小鼠 9F5 VL (SEQ ID NO:11)	IGKV2-28*01 & IGHJ2*01 (SEQ ID NO:37)	CAB51297-VL_huFwvk (SEQ ID NO:35)	1911357B-VL_huFwvk (SEQ ID NO:36)	Hu9F5VLv1 (SEQ ID NO:23)	Hu9F5VLv2 (SEQ ID NO:24)	Hu9F5VLv3 (SEQ ID NO:25)	Hu9F5VLv4 (SEQ ID NO:26)	Hu9F5VLv5 (SEQ ID NO:27)	Hu9F5VLv6 (SEQ ID NO:28)	Hu9F5VLv7 (SEQ ID NO:29)	Hu9F5VLv8 (SEQ ID NO:130)	Hu9F5VLv9 (SEQ ID NO:131)
83	88	Fr3	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
84	89	Fr3	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
85	90	Fr3	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
86	91	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
87	92	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
88	93	Fr3	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
89	94	CDR-L3	A	M	M	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
90	95	CDR-L3	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
91	96	CDR-L3	N	A	A	L	N	N	N	N	N	N	N	N	N
92	97	CDR-L3	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
93	98	CDR-L3	E	Q	Q	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
94	99	CDR-L3	L	T	T	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
95	100	CDR-L3	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
95A		CDR-L3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
95B		CDR-L3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
95C		CDR-L3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
95D		CDR-L3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
95E		CDR-L3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
95F		CDR-L3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
96	101	CDR-L3	L	Y	L	Y	L	L	L	L	L	L	L	L	L

[0843]

Kabat 残基号	线性残基号	FR 或 CDR	小鼠 9F5 VL (SEQ ID NO:11)													IGKV2-28*01 & IGHJ2*01 (SEQ ID NO:37)		CAB51297-VL_huFrwk (SEQ ID NO:35)		1911357B-VL_huFrwk (SEQ ID NO:36)		Hu9F5VLv1 (SEQ ID NO:23)		Hu9F5VLv2 (SEQ ID NO:24)		Hu9F5VLv3 (SEQ ID NO:25)		Hu9F5VLvv4 (SEQ ID NO:26)		Hu9F5VLv5 (SEQ ID NO:27)		Hu9F5VLv6 (SEQ ID NO:28)		Hu9F5VLv7 (SEQ ID NO:29)		Hu9F5VLv8 (SEQ ID NO:130)		Hu9F5VLv9 (SEQ ID NO:131)																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
97	102	CDR-L3	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T

表 8: 人源化 9F5 的 V_H、V_L 回复突变和其他突变

V _H 或 V _L 变体	V _H 或 V _L 外显子受体序列	受体框架(或 CDR)残基的变化(基于 Kabat/Chothia 复合物 CDR)
Hu9F5VHv1 (SEQ ID NO:15)	GenBank 登录号 AAN16432-VH_huFrwk (SEQ ID NO:31) PDB ID 2RCS-VH_huFrwk (SEQ ID NO:32)	无
Hu9F5VHv2 (SEQ ID NO:16)	GenBank 登录号 AAN16432-VH_huFrwk (SEQ ID NO:31) PDB ID 2RCS-VH_huFrwk (SEQ ID NO:32) IMGT # IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)	H1、H17、H20、H69、H75、 H93、H94、H109
Hu9F5VHv3 (SEQ ID NO:17)	GenBank 登录号 AAN16432-VH_huFrwk (SEQ ID NO:31) PDB ID 2RCS-VH_huFrwk (SEQ ID NO:32) IMGT # IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)	H1、H17、H20、H66、H69、 H75、H81、H93、H94、 H109
Hu9F5VHv4 (SEQ ID NO:18)	GenBank 登录号 AAN16432-VH_huFrwk (SEQ ID NO:31) PDB ID 2RCS-VH_huFrwk (SEQ ID NO:32) IMGT # IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)	H1、H17、H20、H23、H28、 H66、H69、H75、H81、 H83、H93、H94、H109
Hu9F5VHv5 (SEQ ID NO:19)	GenBank 登录号 AAN16432-VH_huFrwk (SEQ ID NO:31) PDB ID 2RCS-VH_huFrwk (SEQ ID NO:32) IMGT # IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)	H1、H17、H20、H23、H28、 H43、H51、H54、H56、 H66、H69、H75、H76、 H80、H81、H83、H93、 H94、H109、H109
Hu9F5VHv6 (SEQ ID NO:20)	GenBank 登录号 AAN16432-VH_huFrwk (SEQ ID NO:31) PDB ID 2RCS-VH_huFrwk (SEQ ID NO:32) IMGT # IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)	H1、H17、H20、H23、H28、 H40、H43、H48、H51、 H54、H56、H66、H69、 H75、H76、H80、H81、 H83、H93、H94、H108、 H109
Hu9F5VHv7 (SEQ ID NO:21)	GenBank 登录号 AAN16432-VH_huFrwk (SEQ ID NO:31) PDB ID 2RCS-VH_huFrwk (SEQ ID NO:32) IMGT # IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)	H1、H5、H11、H12、H17、 H20、H23、H38、H40、 H42、H43、H51、H54、 H56、H66、H69、H75、 H76、H80、H81、H83、 H93、H94、H108、H109

[0844]

表 8: 人源化 9F5 的 V_H、V_L 回复突变和其他突变

V _H 或 V _L 变体	V _H 或 V _L 外显子受体序列	受体框架(或 CDR)残基的变化(基于 Kabat/Chothia 复合物 CDR)
Hu9F5VHv8 (SEQ ID NO:22)	GenBank 登录号 AAN16432-VH_huFrwk (SEQ ID NO:31) PDB ID 2RCS-VH_huFrwk (SEQ ID NO:32) IMGT # IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)	H1、H5、H11、H12、H17、H20、H23、H38、H40、H42、H43、H51、H66、H69、H75、H76、H80、H81、H83、H93、H94、H108、H109
Hu9F5VHv9 (SEQ ID NO:127)	GenBank 登录号 AAN16432-VH_huFrwk (SEQ ID NO:31) PDB ID 2RCS-VH_huFrwk (SEQ ID NO:32) IMGT # IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)	H1、H5、H11、H12、H17、H20、H23、H38、H42、H43、H66、H69、H75、H80、H81、H83、H93、H94、H108、H109
Hu9F5VHv10 (SEQ ID NO:128)	GenBank 登录号 AAN16432-VH_huFrwk (SEQ ID NO:31) PDB ID 2RCS-VH_huFrwk (SEQ ID NO:32) IMGT # IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)	H1、H5、H11、H12、H17、H20、H23、H43、H66、H69、H75、H80、H81、H83、H93、H94、H108、H109;
Hu9F5VLv1 (SEQ ID NO:23)	GenBank 登录号 CAB51297-VL_huFrwk (SEQ ID NO:35) GenBank 登录号 1911357B-VL_huFrwk (SEQ ID NO:36) IMGT # IGKV2-28*01 & IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)	L64、L66
Hu9F5VLv2 (SEQ ID NO:24)	GenBank 登录号 CAB51297-VL_huFrwk (SEQ ID NO:35) GenBank 登录号 1911357B-VL_huFrwk (SEQ ID NO:36) IMGT # IGKV2-28*01 & IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)	L7、L8、L15、L64、L66、L100
Hu9F5VLv3 (SEQ ID NO:25)	GenBank 登录号 CAB51297-VL_huFrwk (SEQ ID NO:35) GenBank 登录号 1911357B-VL_huFrwk (SEQ ID NO:36) IMGT # IGKV2-28*01 & IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)	L7、L8、L15、L17、L66、L100
Hu9F5VLv4 (SEQ ID NO:26)	GenBank 登录号 CAB51297-VL_huFrwk (SEQ ID NO:35) GenBank 登录号 1911357B-VL_huFrwk (SEQ ID NO:36) IMGT # IGKV2-28*01 & IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)	L7、L8、L11、L15、L17、L51、L54、L66、L100

[0845]

[0846]

表 8: 人源化 9F5 的 V _H 、V _L 回复突变和其他突变		
V _H 或 V _L 变体	V _H 或 V _L 外显子受体序列	受体框架(或 CDR)残基的变化(基于 Kabat/Chothia 复合物 CDR)
Hu9F5VLv5 (SEQ ID NO:27)	GenBank 登录号 CAB51297-VL_huFrwk (SEQ ID NO:35) GenBank 登录号 1911357B-VL_huFrwk (SEQ ID NO:36) IMGT # IGKV2-28*01 & IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)	L7、L8、L11、L15、L17、L30、L51、L54、L66、L100
Hu9F5VLv6 (SEQ ID NO:28)	GenBank 登录号 CAB51297-VL_huFrwk (SEQ ID NO:35) GenBank 登录号 1911357B-VL_huFrwk (SEQ ID NO:36) IMGT # IGKV2-28*01 & IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)	L7、L8、L11、L15、L17、L30、L51、L54、L100
Hu9F5VLv7 (SEQ ID NO:29)	GenBank 登录号 CAB51297-VL_huFrwk (SEQ ID NO:35) GenBank 登录号 1911357B-VL_huFrwk (SEQ ID NO:36) IMGT # IGKV2-28*01 & IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)	L7、L8、L9、L11、L15、L17、L18、L31、L39、L51、L54、L60、L66、L74、L100
Hu9F5VLv8 (SEQ ID NO:130)	GenBank 登录号 CAB51297-VL_huFrwk (SEQ ID NO:35) GenBank 登录号 1911357B-VL_huFrwk (SEQ ID NO:36) IMGT # IGKV2-28*01 & IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)	L7、L8、L11、L15、L17、L39、L64、L66、L74、L100
Hu9F5VLv9 (SEQ ID NO:131)	GenBank 登录号 CAB51297-VL_huFrwk (SEQ ID NO:35) GenBank 登录号 1911357B-VL_huFrwk (SEQ ID NO:36) IMGT # IGKV2-28*01 & IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)	L7、L8、L11、L15、L17、L39、L60、L64、L66、L74、L100

[0847] 表9:人源化9F5抗体的重链中的回复突变和其他突变的框架(或CDR)残基(基于Kabat/Chothia复合物CDR)的Kabat编号

[0848]

残基	AAN16432-VH_huFrwk (SEQ ID NO:31) 2RCS-VH_huFrwk (SEQ ID NO:32) IMG1# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33) 小鼠 9F5 VH (SEQ ID NO:7) Hu9F5VHv1 (SEQ ID NO:15) Hu9F5VHv2 (SEQ ID NO:16) Hu9F5VHv3 (SEQ ID NO:17) Hu9F5VHv4 (SEQ ID NO:18) Hu9F5VHv5 (SEQ ID NO:19) Hu9F5VHv6 (SEQ ID NO:20) Hu9F5VHv7 (SEQ ID NO:21) Hu9F5VHv8 (SEQ ID NO:22) Hu9F5VHv9 (SEQ ID NO:127) Hu9F5VHv10 (SEQ ID NO:128)													
H1	E	Q	E	E	Q	E	E	E	E	E	E	E	E	E
H5	V	Q	V	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	V	V	V	V
H11	V	L	V	L	L	L	L	L	L	L	V	V	V	V
H12	K	V	K	V	V	V	V	V	V	V	K	K	K	K
H17	S	S	T	S	S	T	T	T	T	T	T	T	T	T
H20	V	L	I	L	L	I	I	I	I	I	I	I	I	I
H23	K	T	K	T	T	T	T	K	K	K	K	K	K	K
H28	T	N	T	N	N	N	N	T	T	T	N	N	N	N
H38	R	K	Q	K	K	K	K	K	K	K	R	R	Q	K
H40	A	R	A	R	R	R	R	R	R	A	A	A	R	R
H42	G	E	G	E	E	E	E	E	E	E	G	G	G	E
H43	K	Q	K	R	Q	Q	Q	Q	K	K	K	K	K	K
H48	M	I	M	I	I	I	I	I	I	M	I	I	I	I
H51	F	I	V	I	I	I	I	I	V	V	V	V	I	I
H54	D	N	D	N	N	N	N	N	D	D	D	N	N	N
H56	E	N	E	D	D	D	D	D	E	E	E	D	D	D

[0849]

残基	AAN16432-VH_huFrwk (SEQ ID NO:31) 2RCS-VH_huFrwk (SEQ ID NO:32) IMGTV# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33) 小鼠 9F5 VH (SEQ ID NO:7) Hu9F5VHv1 (SEQ ID NO:15) Hu9F5VHv2 (SEQ ID NO:16) Hu9F5VHv3 (SEQ ID NO:17) Hu9F5VHvv4 (SEQ ID NO:18) Hu9F5VHvv5 (SEQ ID NO:19) Hu9F5VHv6 (SEQ ID NO:20) Hu9F5VHv7 (SEQ ID NO:21) Hu9F5VHv8 (SEQ ID NO:22) Hu9F5VHv9 (SEQ ID NO:127) Hu9F5VHv10 (SEQ ID NO:128)													
H66	R	K	R	K	K	K	R	R	R	R	R	R	R	R
H69	M	I	I	M	I	M	M	M	M	M	M	M	M	M
H75	T	S	T	S	S	T	T	T	T	T	T	T	T	T
H76	D	N	D	N	N	N	N	N	D	D	D	D	N	N
H80	M	L	M	L	L	L	L	L	M	M	M	M	M	M
H81	E	Q	E	Q	Q	Q	E	E	E	E	E	E	E	E
H83	R	T	R	T	T	T	T	R	R	R	R	R	R	R
H93	A	A	A	T	A	T	T	T	T	T	T	T	T	T
H94	G	S	T	T	S	T	T	T	T	T	T	T	T	T
H108	L	T	L	L	T	T	T	T	L	L	L	L	L	L
H109	V	L	V	V	L	V	V	V	V	V	V	V	V	V

[0850] 表10:人源化9F5抗体的轻链中的回复突变和其他突变的框架残基(基于Kabat/Chothia复合物CDR)的Kabat编号

[0851]

残基	CAB51297-VL_huFrwk (SEQ ID NO:35)	1911357B-VL_huFrwk (SEQ ID NO:36)	IGKV2-28*01 & IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)	小鼠 9F5 VL (SEQ ID NO:11)	Hu9F5VLv1 (SEQ ID NO:23)	Hu9F5VLv2 (SEQ ID NO:24)	Hu9F5VLv3 (SEQ ID NO:25)	Hu9F5VLv4 (SEQ ID NO:26)	Hu9F5VLv5 (SEQ ID NO:27)	Hu9F5VLv6 (SEQ ID NO:28)	Hu9F5VLv7 (SEQ ID NO:29)	Hu9F5VLv8 (SEQ ID NO:130)	Hu9F5VLv9 (SEQ ID NO:131)
L7	S	A	S	A	A	S	S	S	S	S	S	S	S
L8	P	A	P	A	A	P	P	P	P	P	P	P	P
L9	L	F	L	F	F	F	F	F	F	F	L	F	F
L11	L	N	L	N	N	N	N	L	L	L	L	L	L
L15	P	L	P	L	L	P	P	P	P	P	P	P	P
L17	E	T	E	T	T	T	E	E	E	E	E	E	E
L18	P	S	P	S	S	S	S	S	S	S	P	S	S
L30	Y	I	Y	I	I	I	I	I	Y	Y	I	I	I
L31	N	T	N	T	T	T	T	T	T	T	N	T	T
L39	K	R	K	K	R	R	R	R	R	R	K	K	K
L51	G	V	G	M	M	M	M	G	G	G	G	M	M
L54	R	L	R	L	L	L	L	R	R	R	R	L	L
L60	D	N	D	D	N	N	N	N	N	N	D	N	D
L64	G	G	G	S	S	S	G	G	G	G	G	S	S
L66	G	E	G	G	G	G	G	G	G	E	G	G	G
L74	K	R	K	R	R	R	R	R	R	R	K	K	K
L100	G	G	Q	A	G	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q

[0852] 表11人源化9F5抗体的重链和轻链的人源性百分比

[0853]

V _H 或V _L 变体	人源性%
Hu9F5VHv1 (SEQ ID NO:15)	66.3%
Hu9F5VHv2 (SEQ ID NO:16)	69.4%
Hu9F5VHv3 (SEQ ID NO:17)	71.4%
Hu9F5VHv4 (SEQ ID NO:18)	74.5%

Hu9F5VHv5 (SEQ ID NO:19)	80.6%
Hu9F5VHv6 (SEQ ID NO:20)	82.7%
Hu9F5VHv7 (SEQ ID NO:21)	84.7%
Hu9F5VHv8 (SEQ ID NO:22)	82.7%
Hu9F5VHv9 (SEQ ID NO:127)	80.6%
Hu9F5VHv10 (SEQ ID NO:128)	78.6%
Hu9F5VLv1 (SEQ ID NO:23)	78.0%
Hu9F5VLv2 (SEQ ID NO:24)	81.0%
Hu9F5VLv3 (SEQ ID NO:25)	83.0%
Hu9F5VLv4 (SEQ ID NO:26)	86.0%
Hu9F5VLv5 (SEQ ID NO:27)	87.0%
Hu9F5VLv6 (SEQ ID NO:28)	86.0%
Hu9F5VLv7 (SEQ ID NO:29)	92.0%
Hu9F5VLv8 (SEQ ID NO:130)	85%
Hu9F5VLv9 (SEQ ID NO:131)	86%

[0854] 在小鼠与人受体序列之间规范、微调或界面残基不同的位置是取代候选。规范/CDR相互作用残基的实例包括表6中的Kabat残基H54和H94。微调残基的实例包括表6中的Kabat残基H28、H48、H69、H93和H94以及表7中的L64和L66。界面/堆积 (VH+VL) 残基的实例包括表6中的Kabat残基H93。

[0855] 选择重链可变区中表6所示位置作为取代候选的理由如下。

[0856] 重链可变区

[0857] hu9F5VHv1

[0858] -由接枝到AAN16432_VH&RCS-VH的框架上的9F5-VH的CDR-H1、H2和H3环组成。

[0859] hu9F5VHv2

[0860] -在定义Chothia规范类别的关键位置处恢复所有框架取代,是微调区的一部分,或定位到VH/VL结构域界面或有助于结构稳定性。hu9F5VHv2在下文列出的各个位置处掺入回复突变或取代,以评估这些位置对抗原结合亲和力和免疫原性的贡献。

[0861] hu9F5VHv3、hu9F5VHv4、hu9F5VHv5、hu9F5VHv6、hu9F5VHv7、hu9F5VHv8、hu9F5VHv9和hu9F5VHv10,

[0862] -由进一步的取代组成,或者增加抗体稳定性和/或优化脱氨基、氧化、N-糖基化、蛋白水解和聚集

[0863] Q1E:是增强稳定性的突变,用以减轻焦谷氨酸形成的潜力,以降低N末端异质性(Liu,同上)。

[0864] Q5V:是种系对齐突变(germ-line aligning mutation)。Val位于人种系基因IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)的此位置处。

[0865] L11V:是种系对齐突变。Val位于人种系基因IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)的此位置处。

[0866] V12K:是种系对齐突变。Lys位于人种系基因IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)的此位置处。

[0867] S17T:是种系对齐突变。Thr位于人种系基因IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)的此位置处。在此位置,Thr取代相对于Ser可增强稳定性。

[0868] L20I:是种系对齐突变。Ile位于人种系基因IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)的此位置处。

[0869] T23K:是基于频率的种系对齐突变。Lys位于人种系基因IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)的此位置处。

[0870] N28T:这是对Thr的CDR-H1残基取代,并且是种系对齐突变。Thr位于人种系基因IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)的此位置处。

[0871] K38R:Arg位于AAN16432-VH_huFrwk (SEQ ID NO:31)的此位置处,并且在此位置可相对于Lys增强稳定性。

[0872] K38Q:K38Q是种系对齐突变。Gln位于人种系基因IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)的此位置处。这种取代使抗体成为更像人的序列,同时保留了抗体功能。

[0873] R40A:是基于频率的种系对齐突变。Ala位于人种系基因IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)的此位置处。

[0874] E42G:是种系对齐突变。Gly位于人种系基因IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)的此位置处。

[0875] Q43K:是基于频率的种系对齐突变。Lys位于人种系基因IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)的此位置处。在此位置Lys可增强稳定性。

[0876] I48M:是微调区残基的基于频率的种系对齐突变。Met位于人种系基因IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)的此位置处。

[0877] I51V:这是对Val的CDR-H2残基取代。根据同源性模型,预测此位置为非抗原接触位置。这是种系对齐突变。Val位于人种系基因IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)的此位置处。

[0878] N54D和D56E:这些是CDR-H2残基取代,并且根据同源性模型预测为非抗原接触位置。预测N54D和D56E取代可稳定抗体结构。

[0879] K66R:预测此位置的Arg与Ser 82a&Thr 83形成H键,除此之外与Asp 86形成H键和盐桥。

[0880] I69M是微调区残基的回复突变。

[0881] S75T:预测此位置的Ser与Asp 72和Tyr 76形成H键。预测此位置的Thr也会进行这些接触,但表面暴露的残基Thr可能会增强抗体稳定性。S75T是种系对齐突变。Thr位于人种系基因IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)的此位置处。Thr位于受体序列AAN16432-VH_huFrwk的此位置处。

[0882] N76D:是种系对齐突变。Asp位于人种系基因IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)的此位置处。此位置的Asp可降低N-糖基化潜力。

[0883] L80M:是种系对齐突变。Met位于人种系基因IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)的此位置处。

[0884] Q81E:预测Glu与Lys19形成H键加盐桥,因此此位置的Glu可增强抗体稳定性。

[0885] T83R:是基于频率的种系对齐突变。Arg位于人种系基因IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)的此位置处。

[0886] A93T:位置H93是重链/轻链界面残基。在此位置对鼠残基Thr的回复突变保留了该

界面。A93T也是种系对齐突变。Thr位于人种系基因IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)的此位置处。此位置的A93T使抗体更像人。

[0887] S94T:是Chothia定义的规范结构残基和微调残基的回复突变。S94T也是种系对齐突变。Thr位于人种系基因IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)的此位置处。

[0888] T108L:是种系对齐突变。Leu位于人种系基因IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)的此位置处。

[0889] L109V:是基于频率的种系对齐突变。Val在此位置最常见。Val位于人种系基因IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)的此位置处。

[0890] 选择轻链可变区中表7所示位置作为取代候选的理由如下。

[0891] k轻链可变区

[0892] hu9F5VLv1

[0893] -由接枝到CAB51297VL&1911357B VL的框架上的9F5-VL的CDR-L1、L2和L3环组成,并在定义Chothia规范类别的关键位置处恢复所有框架取代,是微调区的一部分,或定位到VH/VL结构域界面。

[0894] hu9F5VLv2、hu9F5VLv3、hu9F5VLv4、hu9F5VLv5、hu9F5VLv6、hu9F5VLv7、hu9F5VLv8和hu9F5VLv9还包括有助于结构稳定性抗原结合亲和力和免疫原性的取代。下文列出的是在这些型式中进行的取代。

[0895] A7S:是种系对齐突变。Ser位于人种系基因IGKV2-28*01&IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)的此位置处。Ser取代可增强稳定性,因为Ser侧链与Phe9的主链形成H键,从而使环更稳定。

[0896] A8P:是基于频率的种系对齐突变。Pro位于人种系基因IGKV2-28*01&IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)的此位置处。

[0897] F9L:是种系对齐突变。Leu位于人种系基因IGKV2-28*01&IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)的此位置处。

[0898] N11L:是基于频率的种系对齐突变。Leu位于人种系基因IGKV2-28*01&IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)的此位置处。

[0899] L15P:是基于频率的种系对齐突变。Pro位于人种系基因IGKV2-28*01&IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)的此位置处。此位置的Pro可能更适合支撑此位置的蛋白质支架。

[0900] T17E:是基于频率的突变。Glu在此位置频繁出现,预测此位置的Glu会与T14形成H键并与Lys 107形成盐桥(两者均为轻链残基),并增强抗体稳定性。

[0901] S18P:是种系对齐突变。Pro位于人种系基因IGKV2-28*01&IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)的此位置处。

[0902] I30Y:这是预测处于抗原接触区中的对CDR-L1残基的取代。在此位置的Tyr使pie与Tyr32和His27D堆叠从而增强稳定性。由于Ile和Tyr都是疏水性的,因此可很好地耐受Tyr取代。

[0903] T31N:这是对CDR-L1残基的取代。Asn位于人种系基因IGKV2-28*01&IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)的此位置处。

[0904] R39K:是种系对齐突变。Lys位于人种系基因IGKV2-28*01&IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)的此位置处。Lys可提供与Arg等同的结构支持。

[0905] M51G:这是对CDR-L2残基的取代,预测背离抗原界面。Gly也是种系对齐突变。Gly位于人种系基因IGKV2-28*01&IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)的此位置处。预测此位置是表面暴露的。此位置的Gly是中性的,降低了Met氧化的潜力。

[0906] L54R:这是对CDR-L2残基的取代,预测背离抗原界面。Arg也是种系对齐突变。Arg位于人种系基因IGKV2-28*01&IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)的此位置处。预测Arg会与Asn60和Phe62链形成氢键;增加链间环的稳定性。

[0907] N60D:是种系对齐突变。Asp位于人种系基因IGKV2-28*01&IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)的此位置处。

[0908] G64S:是微调区残基的回复突变。G64S回复突变保留了CDR构象。

[0909] E66G:是微调区残基的回复突变。E66G回复突变保留了CDR构象。E66G是种系对齐突变。Gly位于人种系基因IGKV2-28*01&IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)的此位置处。

[0910] R74K:是种系对齐突变。Lys位于人种系基因IGKV2-28*01&IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)的此位置处。

[0911] G100Q:是基于频率的种系对齐突变。Gln位于人种系基因IGKV2-28*01&IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)的此位置处。该残基预测是表面暴露的,因此,此位置的Gln可能更适于抗体溶解度,因为它是亲水性中性的。此位置的Gln可增强稳定性。

[0912] 基于这些人框架的设计是:

[0913] 重链可变区

> hu9F5VHv1 (SEQ ID NO:15)

QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDDYMNWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDT
EYASKFQGKATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDYAVYYCASSNGWGQGTTTLTVSS

> hu9F5VHv2 (SEQ ID NO:16)

EVQLQQSGAELVKPGATVKISCTASGFNIKDDYMNWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDT
EYASKFQGKATMTADTSTNTAYLQLSSLTSEDYAVYYCTTSNGWGQGTTTVTVSS

> hu9F5VHv3 (SEQ ID NO:17)

EVQLQQSGAELVKPGATVKISCTASGFNIKDDYMNWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDT
EYASKFQGRATMTADTSTNTAYLELSSLTSEDYAVYYCTTSNGWGQGTTTVTVSS

[0914]

> hu9F5VHv4 (SEQ ID NO:18)

EVQLQQSGAELVKPGATVKISCKASGFTIKDDYMNWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDT
EYASKFQGRATMTADTSTNTAYLELSSLRSEDYAVYYCTTSNGWGQGTTTVTVSS

> hu9F5VHv5 (SEQ ID NO:19)

EVQLQQSGAELVKPGATVKISCKASGFTIKDDYMNWVKQRPEKGLEWIGWVDPEDGET
EYASKFQGRATMTADTSTDYAYMELSSLRSEDYAVYYCTTSNGWGQGTLTVTVSS

> hu9F5VHv6 (SEQ ID NO:20)

EVQLQQSGAELVKPGATVKISCKASGFTIKDDYMNWVKQAPEKGLEWMGWVDPEDGE
TEYASKFQGRATMTADTSTDYAYMELSSLRSEDYAVYYCTTSNGWGQGTLTVTVSS

> hu9F5VHv7 (SEQ ID NO:21)
EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGFNIKDDYMNWVRQAPGKGLEWIGWVDPEDGE
TEYASKFQGRATMTADTSTDATAYMELSSLRSEDTAVYYCTTSNGWGQGTLVTVSS

> hu9F5VHv8 (SEQ ID NO:22)
EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGFNIKDDYMNWVRQAPGKGLEWIGWVDPENG
TEYASKFQGRATMTADTSTDATAYMELSSLRSEDTAVYYCTTSNGWGQGTLVTVSS

> hu9F5VHv9 (SEQ ID NO:127)
EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGFNIKDDYMNWVQRPQKGLEWIGWIDPENG
DTEYASKFQGRATMTADTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCTTSNGWGQGTLVTVSS

> hu9F5VHv10 (SEQ ID NO:128), (也称为hu9F5VHv9_Q38K_G42E)
EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGFNIKDDYMNWVKRPEKGLEWIGWIDPENG
DTEYASKFQGRATMTADTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCTTSNGWGQGTLVTVSS

k轻链可变区

> hu9F5VLv1 (SEQ ID NO:23)
DIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQRPQGSPQLLIYQMSNLA
SGVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGGGKLEIK

> hu9F5VLv2 (SEQ ID NO:24)
DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQRPQGSPQLLIYQMSNLA
SGVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

[0915] > hu9F5VLv3 (SEQ ID NO:25)
DIVMTQSPFSNPVTPGESASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQRPQGSPQLLIYQMSNLA
SGVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

> hu9F5VLv4 (SEQ ID NO:26)
DIVMTQSPFSLPVTGTSASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQRPQGSPQLLIYQGSNRA
SGVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

> hu9F5VLv5 (SEQ ID NO:27)
DIVMTQSPFSLPVTGTSASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQRPQGSPQLLIYQGSNRA
SGVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

> hu9F5VLv6 (SEQ ID NO:28)
DIVMTQSPFSLPVTGTSASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQRPQGSPQLLIYQGSNRA
SGVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

> hu9F5VLv7 (SEQ ID NO:29)
DIVMTQSPSLPVTGEPASISCRSSKSLHNSGINLYWYLQKPGQSPQLLIYQGSNRA
SGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

> hu9F5VLv8 (SEQ ID NO:130)
DIVMTQSPFSLPVTGTSASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLA
SGVPNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

> hu9F5VLv9 (SEQ ID NO:131), 也称为hu9F5VLv8_N60D
DIVMTQSPFSLPVTGTSASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLA
SGVDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

[0916] 使用两阶段PCR方案生成人源化序列,其允许使用QuikChange定点诱变引入多个突变、缺失和插入[Wang,W.和Malcolm,B.A.(1999)BioTechniques 26:680-682]。

[0917] 实施例5.hu9F5VHv4/hu9F5VLv2的免疫原性

[0918] hu9F5VHv4/hu9F5VLv2的重链可变区(SEQ ID NO:18)和轻链可变区(SEQ ID NO:24)的氨基酸序列使用iedb.org去免疫化工具(iedb.org Deimmunization Tool) (Dhanda 等人, Immunology. 2018年1月;153(1):118-132) 来分析。表12示出了可选择用于hu9F5VLv2去免疫化的肽,即,表明可进行进一步取代以降低潜在免疫原性的区域。

[0919] 表12. 鉴定hu9F5VLv2内用于去免疫化的潜在肽的免疫原性分析结果

[0920]	起始位置(线性)	终止位置(线性)	中位数百分等级	肽
	51	65	9.895	LLIQMSNLA SGV PN
	46	60	15.18	GQSPQLLIQMSNLA
	26	40	16.055	SKSLLHSNGITYLYW
	76	90	18.23	FTLRISRVEAEDVGV
	36	50	19.455	TYLYWYLQRPQGSPQ
	86	100	19.535	EDVGVYYCAQNLELP

[0921] 基于表12所示的分析结果,设计了靶向表13中粗体显示的氨基酸残基的hu9F5VLv2轻链可变区的变体。如表14所示,每个变体都掺入了以下氨基酸取代之一。

[0922] 表13. 被靶向用于取代的氨基酸残基。

[0923]	hu9F5VLv2 轻链可变区的靶向残基	原始 SEQ ID NO
	DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSS SKSLL HSNGITYLYWYLQRPQGSPQLLIQMSNLA SGV PNRFSSSGSGTDFTLR ISR VEAEDVGV YYCAQNLEL PLTFGQGTKLEIK	24

[0924] 表14. 在hu9F5VLv2轻链可变区中进行的用以降低免疫原性的氨基酸取代

[0925]

线性编号	Kabat 编号	所得轻链可变区的 SEQ ID NO
M56E	M51E	SEQ ID NO:61
M56D	M51D	SEQ ID NO:62
L30D	L27cD	SEQ ID NO:63
L30G	L27cG	SEQ ID NO:64
L30S	L27cS	SEQ ID NO:65
L30E	L27cE	SEQ ID NO:66
I35E	I30E	SEQ ID NO:67
I35K	I30K	SEQ ID NO:68
L30T	L27cT	SEQ ID NO:69
L30N	L27cN	SEQ ID NO:70
L29D	L27bD	SEQ ID NO:71
I35G	I30G	SEQ ID NO:72
L38N	L33N	SEQ ID NO:73
L30A	L27cA	SEQ ID NO:74
L38T	L33T	SEQ ID NO:75
L38S	L33S	SEQ ID NO:76
L38R	L33R	SEQ ID NO:77
I35Q	I30Q	SEQ ID NO:78
L29T	L27bT	SEQ ID NO:79
T36G	T31G	SEQ ID NO:80
L29Q	L27bQ	SEQ ID NO:81
L38G	L33G	SEQ ID NO:82
L30P	L27cP	SEQ ID NO:83
V83R	V78R	SEQ ID NO:84
I80D	I75D	SEQ ID NO:85
V83D	V78D	SEQ ID NO:86
V83E	V78E	SEQ ID NO:87
V83P	V78P	SEQ ID NO:88
V83K	V78K	SEQ ID NO:89
R82D	R77D	SEQ ID NO:90
V83G	V78G	SEQ ID NO:91
S81P	S76P	SEQ ID NO:92
I80P	I75P	SEQ ID NO:93
I80Q	I75Q	SEQ ID NO:94
I80G	I75G	SEQ ID NO:95
L78P	L73P	SEQ ID NO:96
L78G	L73G	SEQ ID NO:97
V83Q	V78Q	SEQ ID NO:98
S81G	S76G	SEQ ID NO:99
L97D	L92D	SEQ ID NO:100
Y91T	Y86T	SEQ ID NO:101
L97E	L92E	SEQ ID NO:102

[0926]	线性编号	Kabat 编号	所得轻链可变区的 SEQ ID NO
	L97G	L92G	SEQ ID NO:103
	L97Q	L92Q	SEQ ID NO:104
	L99G	L93G	SEQ ID NO:105
	V90G	V85G	SEQ ID NO:106
	L97T	L92T	SEQ ID NO:107
	A94G	A89G	SEQ ID NO:108

[0927] 类似地,分析了hu9F5VHv4的潜在免疫原性,并且表15示出了经鉴定用于潜在去免疫化的肽。

[0928] 表15. 鉴定hu9F5VHv4内用于去免疫化的潜在肽的免疫原性分析结果

[0929]	起始位置 (线性)	终止位置 (线性)	中位数百分等级	肽
	76	90	11.925	TNTAYLELSSLRSED

[0930] 基于这些结果,设计了靶向表16中粗体显示的氨基酸残基的hu9F5VHv4重链可变区和hu9F5VHv5重链可变区的变体。如表17所示,每个变体都掺入了以下氨基酸取代之一。

[0931] 表16. 被靶向用于取代的氨基酸残基。

[0932]	重链可变区的靶向残基	原 始 SEQ ID NO
	hu9F5VHv4 EVQLQQSGAELVKPGATVKISCKASGFTIK DDYMNWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDT ASKFQGRATMTADTSTNTAYLELSSLRSED TAVYYCTTSNGWGQGTTVTVSS	18
	hu9F5VHv5 EVQLQQSGAELVKPGATVKISCKASGFTIK DDYMNWVKQRPEKGLEWIGWVDPEDGETEY ASKFQGRATMTADTSTDYAYMELSSLRSED TAVYYCTTSNGWGQGTTLTVSS	19

[0933] 表17. 在hu9F5VHv4或v5所指定重链可变区中进行的用以降低免疫原性的氨基酸取代

[0934]	线性编号	Kabat 编号	进行取代的 9F5 变体	所得重链可变区的 SEQ ID NO
	L81P	L80P	hu9F5VHv4	SEQ ID NO:109
	L81D	L80D	hu9F5VHv4	SEQ ID NO:110
	L86G	L82cG	hu9F5VHv4	SEQ ID NO:111
	L86D	L82cD	hu9F5VHv4	SEQ ID NO:112
	L83P	L82P	hu9F5VHv4	SEQ ID NO:113
	L81G	L80G	hu9F5VHv4	SEQ ID NO:114
	L83K	L82K	hu9F5VHv4	SEQ ID NO:115
	L83R	L82R	hu9F5VHv4	SEQ ID NO:116
	L83E	L82E	hu9F5VHv4	SEQ ID NO:117
	L83N	L82N	hu9F5VHv4	SEQ ID NO:118
	Y80D	Y79D	hu9F5VHv4	SEQ ID NO:119
	Y80N	Y79N	hu9F5VHv4	SEQ ID NO:120
	Y80G	Y79G	hu9F5VHv4	SEQ ID NO:121
	M81E	M80E	hu9F5VHv5	SEQ ID NO:122
	M81G	M80G	hu9F5VHv5	SEQ ID NO:123
	L86S	L82cS	hu9F5VHv4	SEQ ID NO:124
	Y80Q	Y79Q	hu9F5VHv4	SEQ ID NO:125
	S84G	S82aG	hu9F5VHv4	SEQ ID NO:126

[0935] 实施例6hu9F5VLv8和hu9F5VHv10的免疫原性

[0936] hu9F5VHv10/hu9F5VLv8的重链可变区 (SEQ ID NO:128) 和轻链可变区 (SEQ ID NO:130) 的氨基酸序列使用iedb.org去免疫化工具分析 (Dhanda等人, Immunology. 2018年1月;153(1):118-132)。表18示出了可选择用于hu9F5VLv8去免疫化的肽, 即, 表明可进行进一步取代以降低潜在免疫原性的区域。

[0937] 表18. 鉴定hu9F5VLv8内用于去免疫化的潜在肽的免疫原性分析结果

[0938]	起始位置(线性)	终止位置(线性)	中位数百分等级	肽
	51	65	9.895	LLIYQMSNLASGVPN
	46	60	15.18	GQSPQLLIYQMSNLA
	26	40	16.055	SKSLLHSNGITYLYW
	1	15	17.995	DIVMTQSPFSLPVT
	86	100	19.535	EDVGVYYCAQNLELP
	36	50	19.84	TYLYWYLQKPGQSPQ

[0939] 基于表19所示的分析结果, 设计了靶向表19中粗体显示的氨基酸残基的hu9F5VLv8轻链可变区的变体。如表20至表21所示, 每个变体在表19的粗体显示残基处掺入了一个或多个氨基酸取代。具有取代N60D的Hu9F5VLv8也称为hu9F5VLv9。

[0940] 表19. 被靶向用于取代的氨基酸残基。

	hu9F5VLv8 轻链可变区的靶向残基	hu9F5VLv8 的 SEQ ID NO
[0941]	DIVMTQSPFSLPVTTPGESASISCRSSKSL HSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLA SGVPNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK	130

[0942] 表20. 在hu9F5VLv8轻链可变区中进行的用以降低免疫原性的氨基酸取代

	变体名称	旨在降低免疫原性的 hu9F5VLv8 中其他变体中的取代(指示一个或多个突变的 Kabat 编号)	所得轻链可变区的 SEQ ID NO:
	hu9F5VLv8_DIM1	V3Q、L27cS、L37Q、M51G、L54G、L92I	SEQ ID NO:132
	hu9F5VLv8_DIM2	V3Q、L27cS、L37Q、M51G、L54R、L92I	SEQ ID NO:133
	hu9F5VLv8_DIM3	V3Q、L27cS、L37Q、M51G、L54T、L92I	SEQ ID NO:134
	hu9F5VLv8_DIM4	V3Q、L27cS、L37Q、M51G、L54R、L92G	SEQ ID NO:135
	hu9F5VLv8_DIM5	V3Q、L27cG、L37Q、M51G、L54R、L92I	SEQ ID NO:136
[0943]	hu9F5VLv8_DIM6	V3Q、L27cD、L37Q、M51G、L54R、L92I	SEQ ID NO:137
	hu9F5VLv8_DIM7	V3Q、L27cD、L37Q、M51K、L54R、L92I	SEQ ID NO:138
	hu9F5VLv8_DIM8	V3Q、L27cG、L37Q、M51K、L54R、L92I	SEQ ID NO:139
	hu9F5VLv8_DIM9	V3Q、L27cG、L37Q、M51K、L54G、L92I	SEQ ID NO:140
	hu9F5VLv8_DIM10	V3Q、L27cS、L37Q、M51K、L54G、L92I	SEQ ID NO:141
	hu9F5VLv8_DIM11	V3Q、L27cG、L37G、M51G、L54R、L92I	SEQ ID NO:142
	hu9F5VLv8_DIM12	V3Q、L27cG、L37G、M51G、L54R、L92G	SEQ ID NO:143

[0944]

变体名称	旨在降低免疫原性的 hu9F5VLv8 中其他变体中的取代(指示一个或多个突变的 Kabat 编号)	所得轻链可变区的 SEQ ID NO:
hu9F5VLv8_DIM13	V3Q、L27cG、L37G、M51G、L54R	SEQ ID NO:144
hu9F5VLv8_DIM14	V3Q、L27cG、L37G、M51G、L54T、L92I	SEQ ID NO:145
hu9F5VLv8_DIM15	V3Q、L27cG、L37G、M51G、L54T、L92G	SEQ ID NO:146
hu9F5VLv8_DIM16	V3Q、L27cG、L37G、M51G、L54T	SEQ ID NO:147
hu9F5VLv8_DIM17	V3Q、L27cS、L37G、M51G、L54T、L92I	SEQ ID NO:148
hu9F5VLv8_DIM18	V3Q、L27cD、L37G、M51G、L54R、L92I	SEQ ID NO:149
hu9F5VLv8_DIM19	V3Q、L27cS、L37I、M51I、L54R、L92I	SEQ ID NO:150
hu9F5VLv8_DIM20	V3Q、L27cS、L37Q、M51I、L54G、L92I	SEQ ID NO:151
hu9F5VLv8_DIM21	V3Q、L27cS、L37Q、M51I、L54G	SEQ ID NO:152
hu9F5VLv8_DIM22	V3Q、L27cS、L37Q、M51E、L54R、L92I	SEQ ID NO:153
hu9F5VLv8_DIM23	V3Q、L27cG、L37Q、M51E、L54G、L92I	SEQ ID NO:154
hu9F5VLv8_DIM24	V3Q、L27cG、L37I、M51E、L54R、L92I	SEQ ID NO:155
hu9F5VLv8_DIM25	V3Q、L27cG、L37I、M51E、L54R、L92G	SEQ ID NO:156
hu9F5VLv8_DIM26	V3Q、L27cI、L37I、M51E、L54R	SEQ ID NO:157
hu9F5VLv8_DIM27	V3Q、L37Q、M51G、L54R、L92I	SEQ ID NO:158
hu9F5VLv8_DIM28	V3Q、L27cS、M51G、L54R、L92I	SEQ ID NO:159
hu9F5VLv8_DIM29	V3Q、L27cS、L37Q、L54R、L92I	SEQ ID NO:160
hu9F5VLv8_DIM30	V3Q、L27cS、L37Q、M51G、L92I	SEQ ID NO:161

[0945] 表21在hu9F5VLv9轻链可变区中进行的用以降低免疫原性的氨基酸取代

[0946]

变体名称	旨在降低免疫原性的 hu9F5VLv9 中其他变体中的取代(指示一个或多个突变的 Kabat 编号)	所得轻链可变区的 SEQ ID NO:
hu9F5VLv9_DIM1	V3Q、L27cS、L37Q、M51G、L54G、L92I	SEQ ID NO:162
hu9F5VLv9_DIM2	V3Q、L27cS、L37Q、M51G、L54R、L92I	SEQ ID NO:163
hu9F5VLv9_DIM4	V3Q、L27cS、L37Q、M51G、L54R、L92G	SEQ ID NO:164

[0947]	hu9F5VLv9_DIM5	V3Q、L27cG、L37Q、M51G、L54R、L92I	SEQ ID NO:165
	hu9F5VLv9_DIM8	V3Q、L27cG、L37Q、M51K、L54R、L92I	SEQ ID NO:166
	hu9F5VLv9_DIM10	V3Q、L27cS、L37Q、M51K、L54G、L92I	SEQ ID NO:167
	hu9F5VLv9_DIM11	V3Q、L27cG、L37G、M51G、L54R、L92I	SEQ ID NO:168
	hu9F5VLv9_DIM13	V3Q、L27cG、L37G、M51G、L54R	SEQ ID NO:169
	hu9F5VLv9_DIM19	V3Q、L27cS、L37I、M51I、L54R、L92I	SEQ ID NO:170
	hu9F5VLv9_DIM20	V3Q、L27cS、L37Q、M51I、L54G、L92I	SEQ ID NO:171

[0948] 选择轻链可变区中表20和表21所示位置作为取代候选的理由如下。

[0949] V3Q处的突变是基于去免疫化分析的指导而设计的。位置3处的Gln是人序列中此位置第二常见的,因此,V3Q取代被设计成降低免疫原性并保持该序列更像人序列。对hu9F5VLv8_V3Q取代的免疫原性预测显示N末端1-15肽的消除。

[0950] 以下突变是基于去免疫化分析的指导并考虑给定残基在同源性模型中的位置而设计的。突变还被设计成通过保持经取代残基的大小和电荷/极性来保留抗体功能。如果残基恰好与人种系中的残基相同,则优先考虑该残基。

[0951] L27cI、L27cS、L27cD、L27cG:降低免疫源性

[0952] L37Q、L37G、L37I:降低免疫源性

[0953] M51G、M51K、M51I、M51E:降低免疫源性

[0954] M51G:这是对CDR-L2残基的取代,预测背离抗原界面。Gly也是种系对齐突变。Gly位于人种系基因IGKV2-28*01&IGKJ2*01(SEQ ID NO:37)的此位置处。预测此位置是表面暴露的。此位置的Gly是中性的,降低了Met氧化的潜力。

[0955] L54G、L54R、L54T:降低免疫源性

[0956] L54R:这是对CDR-L2残基的取代,预测背离抗原界面。Arg也是种系对齐突变。Arg位于人种系基因IGKV2-28*01&IGKJ2*01(SEQ ID NO:37)的此位置处。预测Arg会与Asn60和Phe62链形成氢键;增加链间环的稳定性。

[0957] N60D:降低免疫原性。N60D:也是种系对齐突变。Asp位于人种系基因IGKV2-28*01&IGKJ2*01(SEQ ID NO:37)的此位置处。

[0958] L92I、L92G:降低免疫原性

[0959] 表22. 鉴定hu9F5VHv10内用于去免疫化的潜在肽的免疫原性分析结果

[0960]	起始位置(线性)	终止位置(线性)	中位数百分等级	肽
	76	90	12.72	TNTAYMELSSLRSED

[0961] 表22示出了可选择用于hu9F5VHv10去免疫化的肽,即,表明可进行进一步取代以降低潜在免疫原性的区域。

[0962] 基于这些结果,设计了靶向表23中粗体显示的氨基酸残基H82c的hu9F5VHv10重链

可变区的变体。如表24所示,变体hu9F5VHv10_L82cG掺入了取代L82cG。

[0963] 表23.被靶向用于取代的氨基酸残基。

	重链可变区的靶向残基	原始 SEQ ID NO
[0964]	>hu9F5VHv10 EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGFNIKDDYMNWVKQ RPEKGLEWIGWIDPENGDTSEYASKFQGRATMTADTSTNTA YMESSLRSEDTAVYYCTTSNGWGQGTLLTVSS	128

[0965] 表24.在hu9F5VHv10重链可变区进行的用以降低免疫原性的氨基酸取代

	变体名称	旨在降低免疫原性的 hu9F5VHv10 中其他变体中的取代 (指示一个或多个突变的 Kabat 编号)	所得重 链可变区的 SEQ ID NO:
[0966]	hu9F5VHv10_L82cG	L82cG	SEQ ID NO:129

[0967] 实施例7人源化9F5变体的分析

[0968] 分析了具有预测的去免疫化取代的人源化9F5变体的几个特征,包括靶标结合亲和力、基于细胞的测定中的活性、热稳定性、表达特征和取代数量。在所有情况下,将结果与亲本序列hu9F5VHv9/hu9F5VLv8进行比较,以确定是否记录到任何活性或稳定性的损失。

[0969] 使用Biacore T200进行靶标结合分析,以比较人源化9F5变体与重组人4R0N tau的结合亲和力。将抗人Fc抗体通过胺偶联固定在传感器芯片CM3上,并且将人源化9F5变体捕获至等同水平。将各种浓度的重组4R0N人tau(范围从0.02nM至12.5nM)在运行缓冲液(HBS+0.05%P-20,1mg/mL BSA)中以50μL/min经过捕获的抗体,以180秒缔合/420秒解离为单个循环。将数据减去不含抗体的不相关传感器和0nM分析物浓度的空白。利用Biacore Evaluation软件使用全局1:1拟合进行分析。

[0970] 亲和力测定揭示了许多保留亲本的亲和力的去免疫化变体,这是通过比较每个抗体的 K_D 来确定的。在这种情况下,确定抗体的 K_D 的可比性在hu9F5VHv9/hu9F5VLv8(表25)的3倍以内,包括hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM2、hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM5、hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM6、hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM7、hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM8、hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM11、hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM12、hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM13、hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM14、hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM17、hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM18、hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM27、hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM28、hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM29、hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM30和hu9F5VHv10/hu9F5VLv9_DIM11。

[0971] 表25.9F5人源化变体的亲和力

[0972]

9F5 人源化 变体和 SEQ ID NO:	相对于 hu9F5VH v9 的 VH 中的取代(一个或多 个突变的 Kabat 编 号)	相对于 hu9F5VLv8 的 VL 中的 取代(一个或 多个突变的 Kabat 编号)	K_a (1/M s)	K_d (1/s)	K_D (M)
hu9F5VHv9/ hu9F5VLv8 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:130			1716666.6 67	0.000429 333	2.69333 E-10
hu9F5VHv9/ hu9F5VLv8_ DIM1 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:132		V3Q、L27cS 、L37Q、 M51G、L54G 、L92I	6620000	0.00559	8.44E-10
hu9F5VHv9/ hu9F5VLv8_ DIM2 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:133		V3Q、L27cS 、L37Q、 M51G、L54R 、L92I	1960000	0.000586	2.99E-10
hu9F5VHv9/ hu9F5VLv8_ DIM3 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:134		V3Q、L27cS 、L37Q、 M51G、L54T 、L92I	1130000	0.00068	6E-10

[0973]

9F5 人源化 变体和 SEQ ID NO:	相对于 hu9F5VH v9 的 VH 中的取代(一个或多 个突变的 Kabat 编 号)	相对于 hu9F5VLv8 的 VL 中的 取代(一个或 多个突变的 Kabat 编号)	K_a (1/M s)	K_d (1/s)	K_D (M)
hu9F5VHv9/ hu9F5VLv8_ DIM4 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:135		V3Q、L27cS 、L37Q、 M51G、L54R 、L92G	542000	0.00143	2.63E-09
hu9F5VHv9/ hu9F5VLv8_ DIM5 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:136		V3Q、L27cG 、L37Q、 M51G、L54R 、L92I	1750000	0.000295	1.69E-10
hu9F5VHv9/ hu9F5VLv8_ DIM6 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:137		V3Q、L27cD 、L37Q、 M51G、L54R 、L92I	1530000	0.000272	1.78E-10
hu9F5VHv9/ hu9F5VLv8_ DIM7 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:138		V3Q、L27cD 、L37Q、 M51K、L54R 、L92I	2360000	0.000424	1.8E-10
hu9F5VHv9/ hu9F5VLv8_ DIM8 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:139		V3Q、L27cG 、L37Q、 M51K、L54R 、L92I	1320000	0.000576	4.35E-10

[0974]

9F5 人源化 变体和 SEQ ID NO:	相对于 hu9F5VH v9 的 VH 中的取代(一个或多 个突变的 Kabat 编 号)	相对于 hu9F5VLv8 的 VL 中的 取代(一个或 多个突变的 Kabat 编号)	K_a (1/M s)	K_d (1/s)	K_D (M)
hu9F5VHv9/ hu9F5VLv8_ DIM9 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:140		V3Q、L27cG 、L37Q、 M51K、L54G 、L92I	2290000	0.0116	5.07E-09
hu9F5VHv9/ hu9F5VLv8_ DIM10 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:141		V3Q、L27cS 、L37Q、 M51K、L54G 、L92I	18900000	0.0741	3.92E-09
hu9F5VHv9/ hu9F5VLv8_ DIM11 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:142		V3Q、L27cG 、L37G、 M51G、L54R 、L92I	1420000	0.00011	7.72E-11
hu9F5VHv9/ hu9F5VLv8_ DIM12 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:143		V3Q、L27cG 、L37G、 M51G、L54R 、L92G	1940000	0.000429	2.21E-10
hu9F5VHv9/ hu9F5VLv8_ DIM13 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:144		V3Q、L27cG 、L37G、 M51G、L54R	1650000	0.000439	2.66E-10

[0975]

9F5 人源化 变体和 SEQ ID NO:	相对于 hu9F5VH v9 的 VH 中的取代(一个或多 个突变的 Kabat 编 号)	相对于 hu9F5VLv8 的 VL 中的 取代(一个或 多个突变的 Kabat 编号)	K_a (1/M s)	K_d (1/s)	K_D (M)
hu9F5VHv9/ hu9F5VLv8_ DIM14 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:145		V3Q、L27cG 、L37G、 M51G、L54T 、L92I	1330000	0.000188	1.42E-10
hu9F5VHv9/ hu9F5VLv8_ DIM15 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:146		V3Q、L27cG 、L37G、 M51G、L54T 、L92G	839000	0.000732	8.73E-10
hu9F5VHv9/ hu9F5VLv8_ DIM16 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:147		V3Q、L27cG 、L37G、 M51G、L54T	2270000	0.000808	3.55E-10
hu9F5VHv9/ hu9F5VLv8_ DIM17 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:148		V3Q、L27cS 、L37G、 M51G、L54T 、L92I	2540000	0.000326	1.28E-10
hu9F5VHv9/ hu9F5VLv8_ DIM18 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:149		V3Q、L27cD 、L37G、 M51G、L54R 、L92I	2100000	0.000093 9	4.47E-11

[0976]

9F5 人源化 变体和 SEQ ID NO:	相对于 hu9F5VH v9 的 VH 中的取代(一个或多 个突变的 Kabat 编 号)	相对于 hu9F5VLv8 的 VL 中的 取代(一个或 多个突变的 Kabat 编号)	K_a (1/M s)	K_d (1/s)	K_D (M)
hu9F5VHv9/ hu9F5VLv8_ DIM19 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:150		V3Q、L27cS 、L37I、M51I 、L54R、L92I	3610000	0.00215	5.97E-10
hu9F5VHv9/ hu9F5VLv8_ DIM20 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:151		V3Q、L27cS 、L37Q、M51I 、L54G、L92I	5640000	0.0694	1.23E-08
hu9F5VHv9/ hu9F5VLv8_ DIM21 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:152		V3Q、L27cS 、L37Q、M51I 、L54G	1310000	1.12	0.000000 858
hu9F5VHv9/ hu9F5VLv8_ DIM22 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:153		V3Q、L27cS 、L37Q、 M51E、L54R 、L92I	2250000	0.000878	3.9E-10
hu9F5VHv9/ hu9F5VLv8_ DIM23 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:154		V3Q、L27cG 、L37Q、 M51E、L54G 、L92I	66900000	0.0832	1.24E-09

[0977]

9F5 人源化 变体和 SEQ ID NO:	相对于 hu9F5VH v9 的 VH 中的取代(一个或多 个突变的 Kabat 编 号)	相对于 hu9F5VLv8 的 VL 中的 取代(一个或 多个突变的 Kabat 编号)	K_a (1/M s)	K_d (1/s)	K_D (M)
hu9F5VHv9/ hu9F5VLv8_ DIM24 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:155		V3Q、L27cG 、L37I、M51E 、L54R、L92I	2190000	0.000993	4.54E-10
hu9F5VHv9/ hu9F5VLv8_ DIM25 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:156		V3Q、L27cG 、L37I、M51E 、L54R、 L92G	13000000	0.0409	3.15E-09
hu9F5VHv9/ hu9F5VLv8_ DIM26 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:157		V3Q、L27cI 、L37I、M51E 、L54R	3840000	0.004	1.04E-09
hu9F5VHv9/ hu9F5VLv8_ DIM27 SEQ ID NO:127 SEQ ID NO:158		V3Q、L37Q 、M51G、 L54R、L92I	2410000	0.000385	1.6E-10
hu9F5VHv9/ hu9F5VLv8_ DIM28 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:159		V3Q、L27cS 、M51G、 L54R、L92I	3130000	0.000217	6.92E-11
hu9F5VHv9/ hu9F5VLv8_ DIM29 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:160		V3Q、L27cS 、L37Q、 L54R、L92I	1980000	0.000534	2.7E-10

[0978]

9F5 人源化 变体和 SEQ ID NO:	相对于 hu9F5VH v9 的 VH 中的取代(一个或多 个突变的 Kabat 编 号)	相对于 hu9F5VLv8 的 VL 中的 取代(一个或 多个突变的 Kabat 编号)	K_a (1/M s)	K_d (1/s)	K_D (M)
hu9F5VHv9/ hu9F5VLv8_ DIM30 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:161		V3Q、L27cS 、L37Q、 M51G、L92I	1020000	0.000447	4.38E-10
hu9F5VHv10 /hu9F5VLv9_ DIM1 SEQ ID NO:128/ SEQ ID NO:162	Q38K、 G42E	V3Q、L27cS 、L37Q、 M51G、L54G 、N60D、L92I	2690000	0.00395	1.47E-09
hu9F5VHv10 /hu9F5VLv9_ DIM2 SEQ ID NO:128/ SEQ ID NO:163	Q38K、 G42E	V3Q、L27cS 、L37Q、 M51G、L54R 、N60D、L92I	2720000	0.00184	6.79E-10
hu9F5VHv10 /hu9F5VLv9_ DIM4 SEQ ID NO:128/ SEQ ID NO:164	Q38K、 G42E	V3Q、L27cS 、L37Q、 M51G、L54R 、N60D、 L92G	2530000	0.00439	1.74E-09
hu9F5VHv10 /hu9F5VLv9_ DIM5 SEQ ID NO:128/ SEQ ID NO:165	Q38K、 G42E	V3Q、 L27cG、 L37Q、 M51G、 L54R、 N60D、L92I	1700000	0.000919	5.42E-10

[0979]

9F5 人源化 变体和 SEQ ID NO:	相对于 hu9F5VH v9 的 VH 中的取代(一个或多 个突变的 Kabat 编 号)	相对于 hu9F5VLv8 的 VL 中的 取代(一个或 多个突变的 Kabat 编号)	K_a (1/M s)	K_d (1/s)	K_D (M)
hu9F5VHv10 /hu9F5VLv9 _DIM8 _SEQ ID NO:128/ _SEQ ID NO:166	Q38K、 G42E	V3Q、 L27cG、 L37Q、 M51K、 L54R、 N60D、L92I	2710000	0.00232	8.59E-10
hu9F5VHv10 /hu9F5VLv9 _DIM10 _SEQ ID NO:/ _SEQ ID NO:167	Q38K、 G42E	V3Q、L27cS、 L37Q、 M51K、 L54G、 N60D、L92I	6890000	0.026	3.77E-09
hu9F5VHv10 /hu9F5VLv9 _DIM11 _SEQ ID NO:128/ _SEQ ID NO:168	Q38K、 G42E	V3Q、 L27cG、 L37G、 M51G、 L54R、 N60D、L92I	1760000	0.000287	1.63E-10
hu9F5VHv10 /hu9F5VLv9 _DIM13 _SEQ ID NO:128/ _SEQ ID NO:169	Q38K、 G42E	V3Q、 L27cG、 L37G、 M51G、 L54R、 N60D、	2280000	0.00116	5.08E-10
hu9F5VHv10 /hu9F5VLv9 _DIM19 _SEQ ID NO:128/ _SEQ ID NO:170	Q38K、 G42E	V3Q、L27cS、 L37I、M51I、 L54R、 N60D、L92I	3490000	0.00688	1.97E-09
hu9F5VHv10 /hu9F5VLv9 _DIM20 _SEQ ID NO:128/ _SEQ ID NO:171	Q38K、 G42E	V3Q、L27cS、 L37Q、M51I、 L54G、 N60D、L92I	3470000	0.0334	9.62E-09

[0980] 此外,作为次要特征,针对所有去免疫化变体分析热稳定性和滴度。基于亲和力测量,比较与Hu9F5VHv9/Hu9F5VLv8相当的抗体的热稳定性和滴度水平,并在表26中基于

Hu9F5VHv9/Hu9F5VLv8的 T_m 的方差按顺序列出各抗体。

[0981] 使用差示扫描量热法 (DSC) 确定热稳定性值。所有DSC扫描均使用VP-Capillary DSC系统 (Malvern) 进行。所有样品均在1xPBS中制备为0.5mg/mL, 并与1xPBS进行参照。将大约0.5mL的蛋白质溶液和缓冲液引入样品和参照细胞中。在恒压下以60°C/小时的扫描速率从25°C到110°C进行量热扫描速率。使用origin软件进行分析。报告的值是记录到Fab峰的最大热容量时的温度。

[0982] 如下测定滴度。在293悬浮细胞中表达后, 利用标准方法使用蛋白A色谱法纯化抗体。纯化后, 将抗体交换到1xPBS中, 并通过280nm处的吸光度确定蛋白质浓度。通过将纯化蛋白质的最终产量除以表达培养物的起始体积来计算滴度, 并以mg/L报告。

[0983] 表26 9F5人源化变体的热稳定性和滴度

[0984]

9F5 人源化变体	相对于 hu9F5VH v9 的 VH 中的取代(一个或多个 突变的 Kabat 编 号)	相对于 hu9F5VLv8 的 VL 中的取代(一个或多个突 变的 Kabat 编 号)	T_m (°C)— 来自 hu9F5VH v9/hu9F5 VLv8 的 Fab 峰的 方差	滴度 (mg/L)
hu9F5VHv9/hu9F5VL v8 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:130			0	491.6
hu9F5VHv9/hu9F5VL v8_DIM18 SEQ ID NO:127 / SEQ ID NO:149		V3Q、L27cD、 L37G、M51G、 L54R、L92I	-1.55	579.60
hu9F5VHv9/hu9F5VL v8_DIM11 SEQ ID NO:127 / SEQ ID NO:142		V3Q、L27cG、 L37G、M51G、 L54R、L92I	-3.06	446.40

[0985]

9F5 人源化变体	相对于 hu9F5VH v9 的 VH 中的取代(一个或多个 突变的 Kabat 编 号)	相对于 hu9F5VLv8 的 VL 中的取代(一个或多个突 变的 Kabat 编 号)	T _m (°C)— 来自 hu9F5VH v9/hu9F5 VLv8 的 Fab 峰的 方差	滴度 (mg/L)
hu9F5VHv9/hu9F5VL v8_DIM28 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:159		V3Q、L27cS、 M51G、L54R、 L92I	-0.27	348.70
hu9F5VHv9/hu9F5VL v8_DIM17 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:148		V3Q、L27cS、 L37G、M51G、 L54T、L92I	-3.83	423.80
hu9F5VHv9/hu9F5VL v8_DIM6 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:137		V3Q、L27cD、 L37Q、M51G、 L54R、L92I	-0.77	569.80
hu9F5VHv9/hu9F5VL v8_DIM14 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:145		V3Q、L27cG、 L37G、M51G、 L54T、L92I	-5.65	282.40
hu9F5VHv9/hu9F5VL v8_DIM5 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:136		V3Q、L27cG、 L37Q、M51G、 L54R、L92I	-1.83	287.30
hu9F5VHv9/hu9F5VL v8_DIM7 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:138		V3Q、L27cD、 L37Q、M51K、 L54R、L92I	-2.05	636.60
hu9F5VHv9/hu9F5VL v8_DIM27 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:158		V3Q、L37Q、 M51G、L54R、 L92I	-0.16	351.20
hu9F5VHv9/hu9F5VL v8_DIM12 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:143		V3Q、L27cG、 L37G、M51G、 L54R、L92G	-6.38	369.40
hu9F5VHv9/hu9F5VL v8_DIM13 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:144		V3Q、L27cG、 L37G、M51G、 L54R	-1.7	595.80
hu9F5VHv9/hu9F5VL v8_DIM2 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:133		V3Q、L27cS、 L37Q、M51G、 L54R、L92I	-0.3	474.30

[0986]	9F5 人源化变体	相对于 hu9F5VH v9 的 VH 中的取代(一个或多个 突变的 Kabat 编 号)	相对于 hu9F5VLv8 的 VL 中的取代(一个或多个 突变的 Kabat 编 号)	T _m (°C)— 来自 hu9F5VH v9/hu9F5 VLv8 的 Fab 峰的 方差	滴度 (mg/L)
	hu9F5VHv9/hu9F5VL v8_DIM29 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:160		V3Q、L27cS、 L37Q、L54R、 L92I	-1.83	327.50
	hu9F5VHv9/hu9F5VL v8_DIM30 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:161		V3Q、L27cS、 L37Q、M51G、 L92I	-0.92	372.50
	hu9F5VHv9/hu9F5VL v8_DIM8 SEQ ID NO:127/ SEQ ID NO:139		V3Q、L27cG、 L37Q、M51K、 L54R、L92I	-4.89	451.50
	hu9F5VHv10/hu9F5V Lv9_DIM11 SEQ ID NO:128/ SEQ ID NO:168	Q38K、 G42E	V3Q、L27cG、 L37G、M51G、 L54R、N60D、 L92I	-11.94	244.60

[0987] 实施例8人源化9F5变体的中和活性

[0988] 在基于细胞的tau内化模型中分析人源化9F5变体的中和活性。进行采用荧光激活细胞分选(FACS)的内化测定,以评价抗体阻断tau神经元内化的能力。阻断内化的抗体可能会阻止tau的传输。将pHrodo标记的4R0N人tau P301L可溶性寡聚体(1.5μg/ml最终浓度)与抗tau抗体(剂量滴定:80μg/ml起始浓度,然后是4倍连续稀释)在室温下在细胞培养基中预孵育30min。然后将Tau/抗体混合物以500,000个细胞/毫升最终浓度添加到B103神经母细胞瘤细胞系中并在37°C下在组织培养孵育器(5%CO₂)中孵育3-4小时。然后用培养基将细胞洗涤3次,随后在培养基中孵育10分钟,并用FACS缓冲液(PBS中的1%FBS)洗涤2次。将细胞重悬于100μl FACS缓冲液中,通过FACS LSR II测量德克萨斯红(Texas Red)平均荧光强度。来自pHrodo的德克萨斯红荧光由在内化时与内溶酶体区室相关联的低pH值激活。因为FACS检测到细胞,而pHrodo仅在内化时发出荧光,因此只检测到由细胞内化的tau。平均荧光强度越低,内化tau的量越少,表明所测试抗体的阻断活性更高。

[0989] 实施例9.人源化10C12抗体的设计

[0990] 人源化的起点或供体抗体是小鼠抗体10C12。成熟m10C12的重链可变氨基酸序列作为SEQ ID NO:7提供。成熟m10C12的轻链可变氨基酸序列作为SEQ ID NO:11提供。重链Kabat/Chothia复合物CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列分别作为SEQ ID NO:8-10提供。轻链Kabat CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列分别作为SEQ IDNO:12-14提供。始终使用Kabat编号。

[0991] 10C12的可变κ(Vk)属于小鼠Vk第2亚组,其对应于人Vk第2亚组,并且可变重链

(Vh) 属于小鼠Vh第2c亚组,其对应于人Vh第1亚组[Kabat E.A.等人,(1991),Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版.NIH出版号91-3242]。16残基Chothia CDR-L1类似于Chothia规范类别4,7残基Chothia CDR-L2属于Chothia规范类别1,9残基Chothia CDR-L3类似于Chothia规范类别1[Martin ACR.(2010)Protein sequence and structure analysis of antibody variable domains.Kontermann R and Dübel S(编辑).Antibody Engineering.Heidelberg,Germany:Springer International Publishing AG..[Martin,2010]。10残基Chothia CDR-H1类似于Chothia规范类别1,17残基Chothia CDR-H2类似于Chothia规范类别2[Martin,2010]。3残基CDR-H3没有规范类别。对PDB数据库中的蛋白质序列进行了搜索[Deshpande N等人,(2005)Nucleic Acids Res.33:D233-7],以寻找将提供10C12的粗略结构模型的结构。抗体fab pdb代码50BF[Vicentini等人,2017,未公布]的晶体结构用于Vh和Vk结构,因为它具有良好的分辨率(1.92Å)和与10C12Vh和Vk的整体序列相似性,保留了相同的环规范结构。

[0992] 10C12VH的框架与由Arnold-Schild等人[Cancer Res.60(15),4175-4178(2000)]克隆的免疫球蛋白重链可变区[智人]CAC20421的对应区域共享高度的序列相似性。10C12的可变结构域和CAC20421VH的CDR-H1、H2环也共享相同的长度。类似地,10C12VL的框架与由Capello等人[Identification of three subgroups of B-cell chronic lymphocytic leukemia based upon mutations of BCL-6and IGV genes.未公布(直接提交至GenBank)]克隆的人抗体CAB51297的对应区域具有高度的序列相似性。10C12的轻链可变结构域和CAB51297VL的CDR-L1、L2和L3环共享相同的长度。因此,选择CAC20421VH和CAB51297VL的框架区作为10C12的CDR的受体序列。构建了接枝到VH和VL的相应人框架上的10C12CDR模型,并将其用作进一步回复突变的指导。

[0993] 使用IMGT Domain GapAlign工具将由抗体人源化过程产生的重链和轻链变体序列与人种系序列进一步比对,以评估重链和轻链的人源性,如WHO INN委员会准则所概述的。(WHO-INN:International nonproprietary names (INN) for biological and biotechnological substances(a review)(互联网)2014。可获自:<http://www.who.int/medicines/services/inn/BioRev2014.pdf>) 在可能的情况下,改变残基以与对应的人种系序列对齐,以增强人源性并降低潜在免疫原性。对于人源化VLv1和VLv2变体,引入突变以使序列更类似于人种系基因IGKV2-28*01&IGKJ2*01(SEQ ID NO:37)。对于人源化VHv1和VHv2变体,引入突变以使序列更类似于人种系基因IGHV1-69-2*01(SEQ ID NO:33)。

[0994] hu10C12-VH和hu10C12-VL的其他型式被设计成使得能够评估各种框架残基对抗原结合、热稳定性和免疫原性的贡献,以及脱氨基、氧化、N-糖基化、蛋白水解和聚集的优化。考虑进行突变的位置包括如下那些:

[0995] -限定规范的CDR构象(概述于Martin,A.C.R.(2010)Protein sequence and structure analysis of antibody variable domains.Kontermann R and Dübel S(编辑).Antibody Engineering.Heidelberg,Germany:Springer International Publishing AG.),

[0996] -位于微调区内(Foote J和Winter G.(1992)Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops.J Mol Biol.224(2):487-99.),

[0997] -定位到VH/VL结构域界面(概述于Léger OJP和Saldanha J. (2000) Preparation of recombinant antibodies from immune rodent spleens and the design of their humanisation by CDR grafting. Shepherd P and Dean C (编辑). Monoclonal Antibodies: a Practical Approach. Oxford, UK: Oxford University Press.),

[0998] -易进行翻译后修饰, 诸如糖基化或焦谷氨酰胺化,

[0999] -根据接枝到VH和VL框架上的10C12CDR模型, 被经预测与CDR冲突的残基占据, 或者

[1000] -被于测序的人抗体中罕见的残基占据, 其中亲本小鼠10C12残基或一些其他残基在人抗体库中更为普遍。

[1001] 对鼠10C12和各种人源化抗体的比对示出轻链可变区(表28和图8)和重链可变区(表27和图7)。

[1002] 构建了包含不同取代排列的2个人源化重链可变区变体和2个人源化轻链可变区变体: hu10C12VHv1或hu10C12VHv2(分别为SEQ ID NO: 214-215); 和hu10C12VLv1或hu10C12VLv2(分别为SEQ ID NO: 216-217)(表27和表28)。具有基于所选人框架的回复突变和其他突变的示例性人源化Vk和Vh设计分别在表27和表28中示出。表27和表28中的粗体显示区域表示由Kabat/Chothia复合物定义的CDR。表27和表28的列中的“-”表示在指示位置处没有残基。SEQ ID NO: 214-215和SEQ ID NO: 216-217含有如表29所示的回复突变和其他突变。hu10C12VHv1和hu10C12VHv2中各位置处的氨基酸在表30中列出。hu10C12VLv1和hu10C12VLv2中各位置处的氨基酸在表31中列出。

[1003] 人源化VH链hu10C12VHv1和hu10C12VHv2(分别为SEQ ID NO: 214-215)相对于最相似的人种系基因IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 33) 的人源性百分比, 以及人源化VL链hu10C12VLv1和hu10C12VLv2(分别为SEQ ID NO: 216-217)相对于最相似的人种系基因IGKV2-28*01&IGKJ2*01 (SEQ ID NO: 37) 的人源性百分比在表32中示出。

[1004] 表27

[1005]

Kabat 残基号	线性残基号	FR 或 CDR	小鼠 10C12 VH (SEQ ID NO:7)	IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)	CAC20421-VH_huFrwk (SEQ ID NO:218)	Hu10C12VHv1 (SEQ ID NO:214)	Hu10C12VHv2 (SEQ ID NO:215)
1	1	Fr1	E	E	Q	Q	E
2	2	Fr1	V	V	V	V	V
3	3	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q
4	4	Fr1	L	L	L	L	L
5	5	Fr1	Q	V	V	V	V
6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q
7	7	Fr1	S	S	S	S	S
8	8	Fr1	G	G	G	G	G
9	9	Fr1	A	A	A	A	A
10	10	Fr1	E	E	E	E	E
11	11	Fr1	L	V	V	V	V
12	12	Fr1	V	K	K	K	K
13	13	Fr1	R	K	K	K	K
14	14	Fr1	P	P	P	P	P
15	15	Fr1	G	G	G	G	G
16	16	Fr1	A	A	A	A	A
17	17	Fr1	S	T	T	T	T
18	18	Fr1	V	V	V	V	V
19	19	Fr1	K	K	K	K	K
20	20	Fr1	L	I	I	I	I
21	21	Fr1	S	S	S	S	S
22	22	Fr1	C	C	C	C	C
23	23	Fr1	T	K	K	K	K
24	24	Fr1	A	V	V	A	A
25	25	Fr1	S	S	S	S	S
26	26	CDR-H1	G	G	G	G	G
27	27	CDR-H1	F	Y	Y	F	F
28	28	CDR-H1	N	T	T	N	N
29	29	CDR-H1	I	F	F	I	I
30	30	CDR-H1	K	T	T	K	K
31	31	CDR-H1	D	D	D	D	D
32	32	CDR-H1	D	Y	Y	D	D

[1006]

Kabat 残基号	线性残基号	FR 或 CDR	小鼠 10C12 VH (SEQ ID NO:7)	IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)	CAC20421-VH_huFrwk (SEQ ID NO:218)	Hu10C12VHv1 (SEQ ID NO:214)	Hu10C12VHv2 (SEQ ID NO:215)
33	33	CDR-H1	Y	Y	Y	Y	Y
34	34	CDR-H1	M	M	M	M	M
35	35	CDR-H1	N	H	H	N	N
35A		CDR-H1	-	-	-	-	-
35B		CDR-H1	-	-	-	-	-
36	36	Fr2	W	W	W	W	W
37	37	Fr2	V	V	V	V	V
38	38	Fr2	K	Q	Q	Q	Q
39	39	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
40	40	Fr2	R	A	A	A	A
41	41	Fr2	P	P	P	P	P
42	42	Fr2	E	G	G	G	G
43	43	Fr2	R	K	K	K	K
44	44	Fr2	G	G	G	G	G
45	45	Fr2	L	L	L	L	L
46	46	Fr2	E	E	E	E	E
47	47	Fr2	W	W	W	W	W
48	48	Fr2	I	M	M	I	I
49	49	Fr2	G	G	G	G	G
50	50	CDR-H2	W	L	L	W	W
51	51	CDR-H2	I	V	V	I	I
52	52	CDR-H2	D	D	D	D	D
52A	53	CDR-H2	P	P	P	P	P
52B		CDR-H2	-	-	-	-	-
52C		CDR-H2	-	-	-	-	-
53	54	CDR-H2	E	E	E	E	E
54	55	CDR-H2	N	D	D	N	N
55	56	CDR-H2	G	G	G	G	G
56	57	CDR-H2	D	E	E	D	D
57	58	CDR-H2	T	T	T	T	T
58	59	CDR-H2	E	I	I	E	E
59	60	CDR-H2	Y	Y	Y	Y	Y
60	61	CDR-H2	A	A	A	A	A
61	62	CDR-H2	S	E	E	S	S
62	63	CDR-H2	K	K	K	K	K

[1007]

Kabat 残基号	线性残基号	FR 或 CDR	小鼠 10C12 VH (SEQ ID NO:7)	IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)	CAC20421-VH_huFrwk (SEQ ID NO:218)	Hu10C12VHv1 (SEQ ID NO:214)	Hu10C12VHv2 (SEQ ID NO:215)
63	64	CDR-H2	F	F	F	F	F
64	65	CDR-H2	Q	Q	Q	Q	Q
65	66	CDR-H2	G	G	G	G	G
66	67	Fr3	K	R	R	R	R
67	68	Fr3	A	V	V	A	A
68	69	Fr3	T	T	T	T	T
69	70	Fr3	M	I	I	M	M
70	71	Fr3	T	T	T	T	T
71	72	Fr3	A	A	A	A	A
72	73	Fr3	D	D	D	D	D
73	74	Fr3	T	T	T	T	T
74	75	Fr3	S	S	S	S	S
75	76	Fr3	S	T	T	T	T
76	77	Fr3	N	D	D	D	D
77	78	Fr3	T	T	T	T	T
78	79	Fr3	A	A	A	A	A
79	80	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
80	81	Fr3	L	M	M	M	M
81	82	Fr3	Q	E	E	E	E
82	83	Fr3	F	L	L	L	L
82A	84	Fr3	S	S	S	S	S
82B	85	Fr3	S	S	S	S	S
82C	86	Fr3	L	L	L	L	L
83	87	Fr3	T	R	R	R	R
84	88	Fr3	S	S	S	S	S
85	89	Fr3	E	E	E	E	E
86	90	Fr3	D	D	D	D	D
87	91	Fr3	T	T	T	T	T
88	92	Fr3	A	A	A	A	A
89	93	Fr3	V	V	V	V	V
90	94	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
91	95	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
92	96	Fr3	C	C	C	C	C
93	97	Fr3	T	A	A	T	T
94	98	Fr3	T	T	R	T	T

[1008]

Kabat 残基号	线性残基号	FR 或 CDR	小鼠 10C12 VH (SEQ ID NO:7)	IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)	CAC20421-VH_huFrwk (SEQ ID NO:218)	Hu10C12VHv1 (SEQ ID NO:214)	Hu10C12VHv2 (SEQ ID NO:215)
95	99	CDR-H3	S	-	I	S	S
96		CDR-H3	-	-	P	-	-
97		CDR-H3	-	-	L	-	-
98		CDR-H3	-	-	F	-	-
99		CDR-H3	-	-	G	-	-
100		CDR-H3	-	-	R	-	-
100 A		CDR-H3	-	-	-	-	-
100 B		CDR-H3	-	-	-	-	-
100 C		CDR-H3	-	-	-	-	-
100 D		CDR-H3	-	-	-	-	-
100 E		CDR-H3	-	-	-	-	-
100 F		CDR-H3	-	-	-	-	-
100 G		CDR-H3	-	-	-	-	-
100 H		CDR-H3	-	-	-	-	-
100 I		CDR-H3	-	-	-	-	-
100 J		CDR-H3	-	-	-	-	-
100 K		CDR-H3	-	-	-	-	-
101	100	CDR-H3	N	Q	D	N	N
102	101	CDR-H3	G	H	H	G	G
103	102	Fr4	W	W	W	W	W
104	103	Fr4	G	G	G	G	G
105	104	Fr4	Q	Q	Q	Q	Q
106	105	Fr4	G	G	G	G	G
107	106	Fr4	T	T	T	T	T
108	107	Fr4	L	L	L	L	L

[1009]

Kabat 残基号	线性残基号	FR 或 CDR	小鼠 10C12 VH (SEQ ID NO:7)	IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)	CAC20421-VH_huFrwk (SEQ ID NO:218)	Hu10C12VHv1 (SEQ ID NO:214)	Hu10C12VHv2 (SEQ ID NO:215)
109	108	Fr4	V	V	V	V	V
110	109	Fr4	T	T	T	T	T
111	110	Fr4	V	V	V	V	V
112	111	Fr4	S	S	S	S	S
113	112	Fr4	T	S	S	S	S

[1010] 表28

Kabat 残基号	线性残基号	FR 或 CDR	小鼠 10C12 VL (SEQ ID NO:11)	IGKV2-28*01 & IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)	CAB51297-VL_huFrwk (SEQ ID NO:35)	Hu10C12VLv1 (SEQ ID NO:216)	Hu10C12VLv2 (SEQ ID NO:217)
1	1	Fr1	D	D	D	D	D
2	2	Fr1	I	I	I	I	I
3	3	Fr1	V	V	V	V	V
4	4	Fr1	M	M	M	M	M
5	5	Fr1	T	T	T	T	T
6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q
7	7	Fr1	A	S	S	S	S
8	8	Fr1	A	P	P	P	P

[1011]

[1012]

Kabat 残基号	线性残基号	FR 或 CDR	小鼠 10C12 VL (SEQ ID NO:11)	IGKV2-28*01 & IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)	CAB51297-VL_huFrwk (SEQ ID NO:35)	Hu10C12VLv1 (SEQ ID NO:216)	Hu10C12VLv2 (SEQ ID NO:217)
9	9	Fr1	F	L	L	L	L
10	10	Fr1	S	S	S	S	S
11	11	Fr1	N	L	L	L	L
12	12	Fr1	P	P	P	P	P
13	13	Fr1	V	V	V	V	V
14	14	Fr1	T	T	T	T	T
15	15	Fr1	L	P	P	P	P
16	16	Fr1	G	G	G	G	G
17	17	Fr1	T	E	E	E	E
18	18	Fr1	S	P	P	P	P
19	19	Fr1	A	A	A	A	A
20	20	Fr1	S	S	S	S	S
21	21	Fr1	I	I	I	I	I
22	22	Fr1	S	S	S	S	S
23	23	Fr1	C	C	C	C	C
24	24	CDR-L1	R	R	R	R	R
25	25	CDR-L1	S	S	S	S	S
26	26	CDR-L1	S	S	S	S	S
27	27	CDR-L1	K	Q	Q	K	K
27A	28	CDR-L1	S	S	S	S	S
27B	29	CDR-L1	L	L	L	L	L
27C	30	CDR-L1	L	L	L	L	L
27D	31	CDR-L1	H	H	H	H	H
27E	32	CDR-L1	S	S	S	S	S

[1013]

Kabat 残基号	线性残基号	FR 或 CDR	小鼠 10C12 VL (SEQ ID NO:11)	IGKV2-28*01 & IGHKJ2*01 (SEQ ID NO:37)	CAB51297-VL_huFrwk (SEQ ID NO:35)	Hu10C12VLv1 (SEQ ID NO:216)	Hu10C12VLv2 (SEQ ID NO:217)
27F		CDR-L1	-	-		-	-
28	33	CDR-L1	N	N	N	N	N
29	34	CDR-L1	G	G	G	G	G
30	35	CDR-L1	I	Y	Y	I	I
31	36	CDR-L1	T	N	N	T	T
32	37	CDR-L1	Y	Y	Y	Y	Y
33	38	CDR-L1	L	L	L	L	L
34	39	CDR-L1	Y	D	D	Y	Y
35	40	Fr2	W	W	W	W	W
36	41	Fr2	Y	Y	Y	Y	Y
37	42	Fr2	L	L	L	L	L
38	43	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
39	44	Fr2	K	K	K	K	K
40	45	Fr2	P	P	P	P	P
41	46	Fr2	G	G	G	G	G
42	47	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
43	48	Fr2	S	S	S	S	S
44	49	Fr2	P	P	P	P	P
45	50	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
46	51	Fr2	L	L	L	L	L
47	52	Fr2	L	L	L	L	L
48	53	Fr2	I	I	I	I	I
49	54	Fr2	Y	Y	Y	Y	Y
50	55	CDR-L2	Q	L	L	Q	Q

[1014]

Kabat 残基号	线性残基号	FR 或 CDR	小鼠 10C12 VL (SEQ ID NO:11)	IGKV2-28*01 & IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)	CAB51297-VL_huFrwk (SEQ ID NO:35)	Hu10C12VLv1 (SEQ ID NO:216)	Hu10C12VLv2 (SEQ ID NO:217)
51	56	CDR-L2	M	G	G	M	M
52	57	CDR-L2	S	S	S	S	S
53	58	CDR-L2	N	N	N	N	N
54	59	CDR-L2	L	R	R	L	L
55	60	CDR-L2	A	A	A	A	A
56	61	CDR-L2	S	S	S	S	S
57	62	Fr3	G	G	G	G	G
58	63	Fr3	V	V	V	V	V
59	64	Fr3	P	P	P	P	P
60	65	Fr3	D	D	D	D	D
61	66	Fr3	R	R	R	R	R
62	67	Fr3	F	F	F	F	F
63	68	Fr3	S	S	S	S	S
64	69	Fr3	S	G	G	S	S
65	70	Fr3	S	S	S	S	S
66	71	Fr3	G	G	G	G	G
67	72	Fr3	S	S	S	S	S
68	73	Fr3	G	G	G	G	G
69	74	Fr3	T	T	T	T	T
70	75	Fr3	D	D	D	D	D
71	76	Fr3	F	F	F	F	F
72	77	Fr3	T	T	T	T	T
73	78	Fr3	L	L	L	L	L
74	79	Fr3	R	K	K	K	K

[1015]

Kabat 残基号	线性残基号	FR 或 CDR	小鼠 10C12 VL (SEQ ID NO:11)	IGKV2-28*01 & IGHKJ2*01 (SEQ ID NO:37)	CAB51297-VL_huFrwk (SEQ ID NO:35)	Hu10C12VLv1 (SEQ ID NO:216)	Hu10C12VLv2 (SEQ ID NO:217)
75	80	Fr3	I	I	I	I	I
76	81	Fr3	S	S	S	S	S
77	82	Fr3	R	R	R	R	R
78	83	Fr3	V	V	V	V	V
79	84	Fr3	E	E	E	E	E
80	85	Fr3	A	A	A	A	A
81	86	Fr3	E	E	E	E	E
82	87	Fr3	D	D	D	D	D
83	88	Fr3	V	V	V	V	V
84	89	Fr3	G	G	G	G	G
85	90	Fr3	V	V	V	V	V
86	91	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
87	92	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
88	93	Fr3	C	C	C	C	C
89	94	CDR-L3	A	M	M	A	A
90	95	CDR-L3	Q	Q	Q	Q	Q
91	96	CDR-L3	N	A	A	N	N
92	97	CDR-L3	L	L	L	L	L
93	98	CDR-L3	E	Q	Q	E	E
94	99	CDR-L3	L	T	T	L	L
95	100	CDR-L3	P	P	P	P	P
95A		CDR-L3	-	-	-	-	-
95B		CDR-L3	-	-	-	-	-
95C		CDR-L3	-	-	-	-	-

[1016]

Kabat 残基号	线性残基号	FR 或 CDR	小鼠 10C12 VL (SEQ ID NO:11)	IGKV2-28*01 & IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)	CAB51297-VL_huFrwk (SEQ ID NO:35)	Hu10C12VLv1 (SEQ ID NO:216)	Hu10C12VLv2 (SEQ ID NO:217)
95D		CDR-L3	-	-	-	-	-
95E		CDR-L3	-	-	-	-	-
95F		CDR-L3	-	-	-	-	-
96	101	CDR-L3	L	Y	L	L	L
97	102	CDR-L3	T	T	T	T	T
98	103	Fr4	F	F	F	F	F
99	104	Fr4	G	G	G	G	G
100	105	Fr4	A	Q	G	G	G
101	106	Fr4	G	G	G	G	G
102	107	Fr4	T	T	T	T	T
103	108	Fr4	K	K	K	K	K
104	109	Fr4	L	L	V	V	L
105	110	Fr4	E	E	E	E	E
106	111	Fr4	L	I	I	I	I
106 A		Fr4	-	-	-	-	-
107	112	Fr4	K	K	K	K	K

表 29: 人源化 10C12 的 V_H、V_L 回复突变和其他突变

V _H 或 V _L 变体	V _H 或 V _L 外显子受体序列	受体框架(或 CDR) 残基的变化(基于 Kabat/Chothia 复合物 CDR)
Hu10C12VHv1 (SEQ ID NO:214)	GenBank 登录号 CAC20421-VH_huFrwk (SEQ ID NO:218) IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)	H24、H48、H67、H69、H93、H94
Hu10C12VHv2 (SEQ ID NO:215)	GenBank 登录号 CAC20421-VH_huFrwk (SEQ ID NO:218) IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)	H1、H24、H48、H67、H69、H93、H94
Hu10C12VLv1 (SEQ ID NO:216)	GenBank 登录号 CAB51297-VL_huFrwk (SEQ ID NO:35)	L64
Hu10C12VLv2 (SEQ ID NO:217)	GenBank 登录号 CAB51297-VL_huFrwk (SEQ ID NO:35) IGKV2-28*01 & IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)	L64、L104

[1017] 表30: 人源化10C12抗体的重链中的回复突变和其他突变的框架(或CDR)残基(基于Kabat/Chothia复合物CDR)的Kabat编号

残基	CAC20421-VH_huFrwk (SEQ ID NO:218)	IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)	小鼠 10C12 VH (SEQ ID NO:7)	Hu10C12VHv1 (SEQ ID NO:214)	Hu10C12VHv2 (SEQ ID NO:215)
H1	Q	E	E	Q	E
H24	V	V	A	A	A
H48	M	M	I	I	I
H67	V	V	A	A	A
H69	I	I	M	M	M
H93	A	A	T	T	T
H94	R	T	T	T	T

[1019] 表31: 人源化10C12抗体的轻链中的回复突变和其他突变的框架残基(基于Kabat/Chothia复合物CDR)的Kabat编号

[1021]

残基	CAB51297-VL_huFrwk (SEQ ID NO:35)	IGKV2-28*01 & IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)	小鼠 10C12 VL (SEQ ID NO:11)	Hu10C12VLv1 (SEQ ID NO:216)	Hu10C12VLv2 (SEQ ID NO:217)
L64	G	G	S	S	S
L104	V	L	L	V	L

[1022] 表32人源化10C12抗体的重链和轻链的人源性百分比

[1023]

V _H 或V _L 变体	人源性 %
Hu10C12VHv1 (SEQ ID NO:214)	81.6 %
Hu10C12VHv2 (SEQ ID NO:215)	82.7 %
Hu10C12VLv1 (SEQ ID NO:216)	88.0 %
Hu10C12VLv2 (SEQ ID NO:217)	88.0 %

[1024] 在小鼠与人受体序列之间规范、微调或界面残基不同的位置是取代候选。规范/CDR相互作用残基的实例包括表27中的Kabat残基H24和H94。微调残基的实例包括表27中的Kabat残基H48、H67、H69、H93和H94以及表28中的L64。界面/堆积 (VH+VL) 残基的实例包括表27中的Kabat残基H93。

[1025] 选择重链可变区中表27所示位置作为取代候选的理由如下。

[1026] 重链可变区

[1027] hu10C12VHv1

[1028] -由接枝到CAC20421-VH的框架上的10C12-VH的CDR-H1、H2和H3环组成。另外，hu10C12VHv1还在定义Chothia规范类别的关键位置处恢复所有框架取代，是微调区的一部分，或定位到VH/VL结构域界面，有助于结构稳定性。

[1029] V24A:是微调区残基的回复突变。

[1030] M48I:是微调区残基的回复突变。

[1031] V67A:是微调区残基的回复突变并且进行回复突变以保留CDR构象。

[1032] I69M:是微调区残基的回复突变并且进行回复突变以保持CDR堆积完整。

[1033] A93T:位置H93是VH/VL界面残基，并且为了抗体界面的完整性而回复突变为Thr。

[1034] R94T:是Chothia规范结构残基的回复突变。R94T也是种系对齐突变。Thr位于人种系基因IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33) 的此位置处。

[1035] hu10C12VHv2

[1036] -10C12VHv2在定义Chothia规范类别的关键位置处保留所有恢复的框架取代，是

微调区的一部分,或定位到VH/VL域界面,有助于结构稳定性。另外,hu10C12VHv2掺入了用在给定位置最常见的残基进行的且用于优化脱氨基、氧化、N-糖基化、蛋白水解和聚集的回复突变或取代。未包含在hu10C12VHv1中的VHv2中的突变是:

[1037] Q1E:是增强稳定性的突变,用以减轻焦谷氨酸形成的潜力,以降低N末端异质性(Liu,同上)。

[1038] 选择轻链可变区中表28所示位置作为取代候选的理由如下。

[1039] k轻链可变区

[1040] hu10C12VLv1

[1041] -由接枝到CAB51297-VL的框架上的10C12-VL的CDR-L1、L2和L3环组成。另外,hu10C12VLv1还在定义Chothia规范类别的关键位置处恢复所有框架取代,是微调区的一部分,或定位到VH/VL结构域界面,有助于结构稳定性。

[1042] G64S:是微调区残基的回复突变。G64S回复突变保留CDR堆积。

[1043] hu10C12VLv2

[1044] -在定义Chothia规范类别的关键位置处保留所有恢复的框架取代,是微调区的一部分,或定位到VH/VL域界面,有助于结构稳定性。另外,hu10C12VLv2掺入了用在给定位置最常见的残基进行的且用于优化脱氨基、氧化、N-糖基化、蛋白水解和聚集的回复突变或取代。未包含在hu10C12VLv1中的VLv2中的突变是:

[1045] V104L:是种系对齐突变。Leu位于人种系基因IGKV2-28*01&IGKJ2*01 (SEQ ID NO: 37)的此位置处。

[1046] 基于这些人框架的设计是:

[1047] 重链可变区

>hu10C12VHv1 (SEQ ID NO:214)

QVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGFNIKDDYMNWVQQAPGKGLEWIGWIDPENG
TEYASKFQGRATMTADTSTDATYMESSLRSEDTAVYYCTTSNGWGQGLVTVSS

[1048]

>hu10C12VHv2 (SEQ ID NO:215)

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGFNIKDDYMNWVQQAPGKGLEWIGWIDPENG
TEYASKFQGRATMTADTSTDATYMESSLRSEDTAVYYCTTSNGWGQGLVTVSS

[1049] k轻链可变区

>hu10C12VLv1 (SEQ ID NO:216)

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLAS
GVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGGGTKVEIK

[1050]

>hu10C12VLv2 (SEQ ID NO:217)

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLAS
GVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGGGTKLEIK

[1051] 使用两阶段PCR方案生成人源化序列,其允许使用QuikChange定点诱变引入多个突变、缺失和插入[Wang,W.和Malcolm,B.A. (1999)BioTechniques 26:680-682)。

[1052] 实施例10.人源化12C4抗体的设计

[1053] 人源化的起点或供体抗体是小鼠抗体12C4。成熟m12C4的重链可变氨基酸序列作为SEQ ID NO:219提供。成熟m12C4的轻链可变氨基酸序列作为SEQ ID NO:11提供。重链Kabat/Chothia复合物CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列分别作为SEQ ID NO:8、220和10提供。轻链Kabat CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列分别作为SEQ ID NO:12-14提供。始终使用Kabat

编号。

[1054] 12C4的可变κ(Vk)属于小鼠Vk第2亚组,其对应于人Vk第2亚组,并且可变重链(Vh)属于小鼠Vh第2c亚组,其对应于人Vh第1亚组[Kabat E.A.等人,(1991),Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版.NIH出版号91-3242]。16残基Chothia CDR-L1类似于Chothia规范类别4,7残基Chothia CDR-L2属于Chothia规范类别1,9残基Chothia CDR-L3类似于Chothia规范类别1[Martin ACR.(2010)Protein sequence and structure analysis of antibody variable domains.Kontermann R and Dübel S(编辑).Antibody Engineering.Heidelberg,Germany:Springer International Publishing AG..[Martin,2010]。10残基Chothia CDR-H1类似于Chothia规范类别1,17残基Chothia CDR-H2类似于Chothia规范类别2[Martin,2010]。3残基CDR-H3没有规范类别。对PDB数据库中的蛋白质序列进行了搜索[Deshpande N等人,(2005)Nucleic Acids Res.33:D233-7],以寻找将提供12C4的粗略结构模型的结构。抗体fab pdb代码50BF[Vicentini等人,2017,未公布]的晶体结构用于Vh和Vk结构,因为它具有良好的分辨率(1.92Å)和与12C4Vh和Vk的整体序列相似性,保留了相同的环规范结构。

[1055] 12C4VH的框架与由Arnold-Schild等人[Cancer Res.60(15),4175-4178(2000)]克隆的免疫球蛋白重链可变区[智人]CAC20421的对应区域共享高度的序列相似性。类似地,12C4VL的框架与由Capello等人(GenBank参考号CAB51297,1999年7月20日提交,未公布)克隆的人抗体CAB51297VL的对应区域共享高度的序列相似性。12C4的轻链可变结构域和CAB51297VL的CDR-L1、L2和L3环共享相同的长度。因此,选择CAC20421VH和CAB51297VL的框架区作为12C4VL的CDR的受体序列。构建了接枝到VH和VL的相应人框架上的12C4CDR模型,并将其用作进一步回复突变的指导。

[1056] 使用IMGT Domain GapAlign工具将由抗体人源化过程产生的重链和轻链变体序列与人种系序列进一步比对,以评估重链和轻链的人源性,如WHO INN委员会准则所概述的。(WHO-INN:International nonproprietary names (INN) for biological and biotechnological substances (a review) (互联网)2014。可获自:<http://www.who.int/medicines/services/inn/BioRev2014.pdf>) 在可能的情况下,改变残基以与对应的人种系序列对齐,以增强人源性并降低潜在免疫原性。对于人源化VLv1和VLv2变体,引入突变以使序列更类似于人种系基因IGKV2-28*01&IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)。对于人源化VHv1和VHv2变体,引入突变以使序列更类似于人种系基因IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)。

[1057] hu12C4-VH和hu12C4-VL的其他型式被设计成使得能够评估各种框架残基对抗原结合、热稳定性和免疫原性的贡献,以及脱氨基、氧化、N-糖基化、蛋白水解和聚集的优化。考虑进行突变的位置包括如下那些:

[1058] -限定规范的CDR构象(概述于Martin,A.C.R.(2010)Protein sequence and structure analysis of antibody variable domains.Kontermann R and Dübel S(编辑).Antibody Engineering.Heidelberg,Germany:Springer International Publishing AG.),

[1059] -位于微调区内(Foote J和Winter G.(1992)Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops.J Mol Biol.224(2):487-99.),

[1060] -定位到VH/VL结构域界面(概述于Léger OJP和Saldanha J. (2000) Preparation of recombinant antibodies from immune rodent spleens and the design of their humanisation by CDR grafting. Shepherd P and Dean C (编辑). Monoclonal Antibodies: a Practical Approach. Oxford, UK: Oxford University Press.),

[1061] -易进行翻译后修饰, 诸如糖基化或焦谷氨酰胺化,

[1062] -根据接枝到VH和VL框架上的12C4CDR模型, 被经预测与CDR冲突的残基占据, 或者

[1063] -被于测序的人抗体中罕见的残基占据, 其中亲本小鼠12C4残基或一些其他残基在人抗体库中更为普遍。

[1064] 对鼠12C4和各种人源化抗体的比对示出轻链可变区(表34和图10)和重链可变区(表33和图9)。

[1065] 构建了包含不同取代排列的2个人源化重链可变区变体和2个人源化轻链可变区变体: hu12C4VHv1或hu12C4VHv2(分别为SEQ IDN0:221-222); 和hu12C4VLv1或hu12C4VLv2(分别为SEQ IDN0:223-224)(表33和表34)。具有基于所选人框架的回复突变和其他突变的示例性人源化Vk和Vh设计分别在表33和表34中示出。表33和表34中的粗体显示区域表示由Kabat/Chothia复合物定义的CDR。表33和表34的列中的“-”表示在指示位置处没有残基。SEQ IDN0:221-222和SEQ ID N0:223-224含有如表35所示的回复突变和其他突变。hu12C4VHv1和hu12C4VHv2中各位置处的氨基酸在表36中列出。hu12C4VLv1和hu12C4VLv2中各位置处的氨基酸在表37中列出。

[1066] 人源化VH链hu12C4VHv1和hu12C4VHv2(分别为SEQ IDN0:221-222)相对于最相似的人种系基因IGHV1-69-2*01(SEQ IDN0:33)的人源性百分比, 以及人源化VL链hu12C4VLv1和hu12C4VLv2(分别为SEQ ID N0:223-224)相对于最相似的人种系基因IGKV2-28*01&IGKJ2*01(SEQ ID N0:37)的人源性百分比在表38中示出。

[1067] 表33

[1068]

Kabat 残基号	线性残基号	FR 或 CDR	小鼠 12C4 VH (SEQ ID NO:219)	IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)	CAC20421 VH (SEQ ID NO:218)	Hu12C4VHv1 (SEQ ID NO:221)	Hu12C4VHv2 (SEQ ID NO:222)
1	1	Fr1	E	E	Q	Q	E
2	2	Fr1	V	V	V	V	V
3	3	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q
4	4	Fr1	L	L	L	L	L
5	5	Fr1	Q	V	V	V	V
6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q
7	7	Fr1	S	S	S	S	S
8	8	Fr1	G	G	G	G	G
9	9	Fr1	A	A	A	A	A
10	10	Fr1	E	E	E	E	E
11	11	Fr1	L	V	V	V	V
12	12	Fr1	V	K	K	K	K
13	13	Fr1	R	K	K	K	K
14	14	Fr1	P	P	P	P	P
15	15	Fr1	G	G	G	G	G
16	16	Fr1	A	A	A	A	A
17	17	Fr1	S	T	T	T	T
18	18	Fr1	V	V	V	V	V
19	19	Fr1	K	K	K	K	K
20	20	Fr1	L	I	I	I	I
21	21	Fr1	S	S	S	S	S
22	22	Fr1	C	C	C	C	C
23	23	Fr1	T	K	K	K	K
24	24	Fr1	A	V	V	V	V
25	25	Fr1	S	S	S	S	S
26	26	CDR-H1	G	G	G	G	G
27	27	CDR-H1	F	Y	Y	F	F
28	28	CDR-H1	N	T	T	N	N

[1069]

Kabat 残基号	线性残基号	FR 或 CDR	小鼠 12C4 VH (SEQ ID NO:219)	IMG1# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)	CAC20421 VH (SEQ ID NO:218)	Hu12C4VHv1 (SEQ ID NO:221)	Hu12C4VHv2 (SEQ ID NO:222)
29	29	CDR-H1	I	F	F	I	I
30	30	CDR-H1	K	T	T	K	K
31	31	CDR-H1	D	D	D	D	D
32	32	CDR-H1	D	Y	Y	D	D
33	33	CDR-H1	Y	Y	Y	Y	Y
34	34	CDR-H1	M	M	M	M	M
35	35	CDR-H1	N	H	H	N	N
35A		CDR-H1	-	-	-	-	-
35B		CDR-H1	-	-	-	-	-
36	36	Fr2	W	W	W	W	W
37	37	Fr2	V	V	V	V	V
38	38	Fr2	R	Q	Q	Q	Q
39	39	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
40	40	Fr2	R	A	A	A	A
41	41	Fr2	P	P	P	P	P
42	42	Fr2	E	G	G	G	G
43	43	Fr2	R	K	K	K	K
44	44	Fr2	G	G	G	G	G
45	45	Fr2	L	L	L	L	L
46	46	Fr2	E	E	E	E	E
47	47	Fr2	W	W	W	W	W
48	48	Fr2	I	M	M	M	I
49	49	Fr2	G	G	G	G	G
50	50	CDR-H2	W	L	L	W	W
51	51	CDR-H2	I	V	V	I	I
52	52	CDR-H2	D	D	D	D	D
52A	53	CDR-H2	P	P	P	P	P
52B		CDR-H2	-	-	-	-	-
52C		CDR-H2	-	-	-	-	-
53	54	CDR-H2	E	E	E	E	E
54	55	CDR-H2	N	D	D	N	N

[1070]

Kabat 残基号	线性残基号	FR 或 CDR	小鼠 12C4 VH (SEQ ID NO:219)	IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)	CAC20421 VH (SEQ ID NO:218)	Hu12C4VHv1 (SEQ ID NO:221)	Hu12C4VHv2 (SEQ ID NO:222)
55	56	CDR-H2	G	G	G	G	G
56	57	CDR-H2	D	E	E	D	D
57	58	CDR-H2	T	T	T	T	T
58	59	CDR-H2	A	I	I	A	A
59	60	CDR-H2	Y	Y	Y	Y	Y
60	61	CDR-H2	A	A	A	A	A
61	62	CDR-H2	S	E	E	S	S
62	63	CDR-H2	K	K	K	K	K
63	64	CDR-H2	F	F	F	F	F
64	65	CDR-H2	Q	Q	Q	Q	Q
65	66	CDR-H2	G	G	G	G	G
66	67	Fr3	K	R	R	R	R
67	68	Fr3	A	V	V	V	V
68	69	Fr3	T	T	T	T	T
69	70	Fr3	M	I	I	I	I
70	71	Fr3	T	T	T	T	T
71	72	Fr3	A	A	A	A	A
72	73	Fr3	D	D	D	D	D
73	74	Fr3	T	T	T	T	T
74	75	Fr3	S	S	S	S	S
75	76	Fr3	S	T	T	T	T
76	77	Fr3	N	D	D	D	D
77	78	Fr3	T	T	T	T	T
78	79	Fr3	A	A	A	A	A
79	80	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
80	81	Fr3	L	M	M	M	M
81	82	Fr3	Q	E	E	E	E
82	83	Fr3	F	L	L	L	L
82A	84	Fr3	S	S	S	S	S
82B	85	Fr3	S	S	S	S	S
82C	86	Fr3	L	L	L	L	L

[1071]

Kabat 残基号	线性残基号	FR 或 CDR	小鼠 12C4 VH (SEQ ID NO:219)	IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)	CAC20421 VH (SEQ ID NO:218)	Hu12C4VHv1 (SEQ ID NO:221)	Hu12C4VHv2 (SEQ ID NO:222)
83	87	Fr3	T	R	R	R	R
84	88	Fr3	S	S	S	S	S
85	89	Fr3	E	E	E	E	E
86	90	Fr3	D	D	D	D	D
87	91	Fr3	S	T	T	T	T
88	92	Fr3	A	A	A	A	A
89	93	Fr3	V	V	V	V	V
90	94	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
91	95	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
92	96	Fr3	C	C	C	C	C
93	97	Fr3	T	A	A	A	T
94	98	Fr3	T	T	R	R	T
95	99	CDR-H3	S	-	I	S	S
96		CDR-H3	-	-	P	-	-
97		CDR-H3	-	-	L	-	-
98		CDR-H3	-	-	F	-	-
99		CDR-H3	-	-	G	-	-
100		CDR-H3	-	-	R	-	-
100A		CDR-H3	-	-	-	-	-
100B		CDR-H3	-	-	-	-	-
100C		CDR-H3	-	-	-	-	-
100D		CDR-H3	-	-	-	-	-
100E		CDR-H3	-	-	-	-	-
100F		CDR-H3	-	-	-	-	-
100G		CDR-H3	-	-	-	-	-
100H		CDR-H3	-	-	-	-	-
100I		CDR-H3	-	-	-	-	-
100J		CDR-H3	-	-	-	-	-
100K		CDR-H3	-	-	-	-	-
101	100	CDR-H3	N	Q	D	N	N
102	101	CDR-H3	G	H	H	G	G

[1072]

Kabat 残基号	线性残基号	FR 或 CDR	小鼠 12C4 VH (SEQ ID NO:219)	IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)	CAC20421 VH (SEQ ID NO:218)	Hu12C4VHv1 (SEQ ID NO:221)	Hu12C4VHv2 (SEQ ID NO:222)
103	102	Fr4	W	W	W	W	W
104	103	Fr4	G	G	G	G	G
105	104	Fr4	Q	Q	Q	Q	Q
106	105	Fr4	G	G	G	G	G
107	106	Fr4	T	T	T	T	T
108	107	Fr4	L	L	L	L	L
109	108	Fr4	V	V	V	V	V
110	109	Fr4	T	T	T	T	T
111	110	Fr4	V	V	V	V	V
112	111	Fr4	S	S	S	S	S
113	112	Fr4	A	S	S	S	S

[1073] 表34

Kabat 残基号	线性残基号	FR 或 CDR	小鼠 12C4 VL (SEQ ID NO:11)	IGKV2-28*01 & IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)	CAB51297 VL (SEQ ID NO:35)	Hu12C4VLv1 (SEQ ID NO:223)	Hu12C4VLv2 (SEQ ID NO:224)

[1074]

[1075]

Kabat 残基号	线性残基号	FR 或 CDR	小鼠 12C4 VL (SEQ ID NO:11)	IGKV2-28*01 & IGHJ2*01 (SEQ ID NO:37)	CAB51297 VL (SEQ ID NO:35)	Hu12C4VLv1 (SEQ ID NO:223)	Hu12C4VLv2 (SEQ ID NO:224)
1	1	Fr1	D	D	D	D	D
2	2	Fr1	I	I	I	I	I
3	3	Fr1	V	V	V	V	V
4	4	Fr1	M	M	M	M	M
5	5	Fr1	T	T	T	T	T
6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q
7	7	Fr1	A	S	S	S	S
8	8	Fr1	A	P	P	P	P
9	9	Fr1	F	L	L	L	L
10	10	Fr1	S	S	S	S	S
11	11	Fr1	N	L	L	L	L
12	12	Fr1	P	P	P	P	P
13	13	Fr1	V	V	V	V	V
14	14	Fr1	T	T	T	T	T
15	15	Fr1	L	P	P	P	P
16	16	Fr1	G	G	G	G	G
17	17	Fr1	T	E	E	E	E
18	18	Fr1	S	P	P	P	P
19	19	Fr1	A	A	A	A	A
20	20	Fr1	S	S	S	S	S

[1076]

Kabat 残基号	线性残基号	FR 或 CDR	小鼠 12C4 VL (SEQ ID NO:11)	IGKV2-28*01 & IGHJ2*01 (SEQ ID NO:37)	CAB51297 VL (SEQ ID NO:35)	Hu12C4VLv1 (SEQ ID NO:223)	Hu12C4VLv2 (SEQ ID NO:224)
21	21	Fr1	I	I	I	I	I
22	22	Fr1	S	S	S	S	S
23	23	Fr1	C	C	C	C	C
24	24	CDR-L1	R	R	R	R	R
25	25	CDR-L1	S	S	S	S	S
26	26	CDR-L1	S	S	S	S	S
27	27	CDR-L1	K	Q	Q	K	K
27A	28	CDR-L1	S	S	S	S	S
27B	29	CDR-L1	L	L	L	L	L
27C	30	CDR-L1	L	L	L	L	L
27D	31	CDR-L1	H	H	H	H	H
27E	32	CDR-L1	S	S	S	S	S
27F		CDR-L1	-	-	-	-	-
28	33	CDR-L1	N	N	N	N	N
29	34	CDR-L1	G	G	G	G	G
30	35	CDR-L1	I	Y	Y	I	I
31	36	CDR-L1	T	N	N	T	T
32	37	CDR-L1	Y	Y	Y	Y	Y
33	38	CDR-L1	L	L	L	L	L
34	39	CDR-L1	Y	D	D	Y	Y

[1077]

Kabat 残基号	线性残基号	FR 或 CDR	小鼠 12C4 VL (SEQ ID NO:11)	IGKV2-28*01 & IGHJ2*01 (SEQ ID NO:37)	CAB51297 VL (SEQ ID NO:35)	Hu12C4VLv1 (SEQ ID NO:223)	Hu12C4VLv2 (SEQ ID NO:224)
35	40	Fr2	W	W	W	W	W
36	41	Fr2	Y	Y	Y	Y	Y
37	42	Fr2	L	L	L	L	L
38	43	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
39	44	Fr2	K	K	K	K	K
40	45	Fr2	P	P	P	P	P
41	46	Fr2	G	G	G	G	G
42	47	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
43	48	Fr2	S	S	S	S	S
44	49	Fr2	P	P	P	P	P
45	50	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
46	51	Fr2	L	L	L	L	L
47	52	Fr2	L	L	L	L	L
48	53	Fr2	I	I	I	I	I
49	54	Fr2	Y	Y	Y	Y	Y
50	55	CDR-L2	Q	L	L	Q	Q
51	56	CDR-L2	M	G	G	M	M
52	57	CDR-L2	S	S	S	S	S
53	58	CDR-L2	N	N	N	N	N
54	59	CDR-L2	L	R	R	L	L

[1078]

Kabat 残基号	线性残基号	FR 或 CDR	小鼠 12C4 VL (SEQ ID NO:11)	IGKV2-28*01 & IGHJ2*01 (SEQ ID NO:37)	CAB51297 VL (SEQ ID NO:35)	Hu12C4VLv1 (SEQ ID NO:223)	Hu12C4VLv2 (SEQ ID NO:224)
55	60	CDR-L2	A	A	A	A	A
56	61	CDR-L2	S	S	S	S	S
57	62	Fr3	G	G	G	G	G
58	63	Fr3	V	V	V	V	V
59	64	Fr3	P	P	P	P	P
60	65	Fr3	D	D	D	D	D
61	66	Fr3	R	R	R	R	R
62	67	Fr3	F	F	F	F	F
63	68	Fr3	S	S	S	S	S
64	69	Fr3	S	G	G	G	S
65	70	Fr3	S	S	S	S	S
66	71	Fr3	G	G	G	G	G
67	72	Fr3	S	S	S	S	S
68	73	Fr3	G	G	G	G	G
69	74	Fr3	T	T	T	T	T
70	75	Fr3	D	D	D	D	D
71	76	Fr3	F	F	F	F	F
72	77	Fr3	T	T	T	T	T
73	78	Fr3	L	L	L	L	L
74	79	Fr3	R	K	K	K	K

[1079]

Kabat 残基号	线性残基号	FR 或 CDR	小鼠 12C4 VL (SEQ ID NO:11)	IGKV2-28*01 & IGHJ2*01 (SEQ ID NO:37)	CAB51297 VL (SEQ ID NO:35)	Hu12C4VLv1 (SEQ ID NO:223)	Hu12C4VLv2 (SEQ ID NO:224)
75	80	Fr3	I	I	I	I	I
76	81	Fr3	S	S	S	S	S
77	82	Fr3	R	R	R	R	R
78	83	Fr3	V	V	V	V	V
79	84	Fr3	E	E	E	E	E
80	85	Fr3	A	A	A	A	A
81	86	Fr3	E	E	E	E	E
82	87	Fr3	D	D	D	D	D
83	88	Fr3	V	V	V	V	V
84	89	Fr3	G	G	G	G	G
85	90	Fr3	V	V	V	V	V
86	91	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
87	92	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
88	93	Fr3	C	C	C	C	C
89	94	CDR-L3	A	M	M	A	A
90	95	CDR-L3	Q	Q	Q	Q	Q
91	96	CDR-L3	N	A	A	N	N
92	97	CDR-L3	L	L	L	L	L
93	98	CDR-L3	E	Q	Q	E	E
94	99	CDR-L3	L	T	T	L	L

[1080]

Kabat 残基号	线性残基号	FR 或 CDR	小鼠 12C4 VL (SEQ ID NO:11)	IGKV2-28*01 & IGHJ2*01 (SEQ ID NO:37)	CAB51297 VL (SEQ ID NO:35)	Hu12C4VLv1 (SEQ ID NO:223)	Hu12C4VLv2 (SEQ ID NO:224)
95	100	CDR-L3	P	P	P	P	P
95A		CDR-L3	-	-	-	-	-
95B		CDR-L3	-	-	-	-	-
95C		CDR-L3	-	-	-	-	-
95D		CDR-L3	-	-	-	-	-
95E		CDR-L3	-	-	-	-	-
95F		CDR-L3	-	-	-	-	-
96	101	CDR-L3	L	Y	L	L	L
97	102	CDR-L3	T	T	T	T	T
98	103	Fr4	F	F	F	F	F
99	104	Fr4	G	G	G	G	G
100	105	Fr4	A	Q	G	G	G
101	106	Fr4	G	G	G	G	G
102	107	Fr4	T	T	T	T	T
103	108	Fr4	K	K	K	K	K
104	109	Fr4	L	L	V	V	L
105	110	Fr4	E	E	E	E	E
106	111	Fr4	L	I	I	I	I
106A		Fr4	-	-	-	-	-
107	112	Fr4	K	K	K	K	K

表 35:人源化 12C4 的 V_H、V_L 回复突变和其他突变

V _H 或 V _L 变体	V _H 或 V _L 外显子受体序列	受体框架(或 CDR)残基的变化(基于 Kabat/Chothia 复合物 CDR)
Hu12C4VHv1 (SEQ ID NO:221)	GenBank 登录号 CAC20421 VH (SEQ ID NO:218)	无
Hu12C4VHv2 (SEQ ID NO:222)	GenBank 登录号 CAC20421 VH (SEQ ID NO:218) IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)	H1、H48、H93 、H94
Hu12C4VLv1 (SEQ ID NO:223)	GenBank 登录号 CAB51297 VL (SEQ ID NO:35)	无
Hu12C4VLv2 (SEQ ID NO:224)	GenBank 登录号 CAB51297 VL (SEQ ID NO:35) IGKV2-28*01 & IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)	L64、L104

[1082] 表36:人源化12C4抗体的重链中的回复突变和其他突变的框架(或CDR)残基(基于Kabat/Chothia复合物CDR)的Kabat编号

残基	CAC20421 VH (SEQ ID NO:218)	IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)	小鼠 12C4 VH (SEQ ID NO:219)	Hu12C4VHv1 (SEQ ID NO:221)	Hu12C4VHv2 (SEQ ID NO:222)
H1	Q	E	E	Q	E
H48	M	M	I	M	I
H93	A	A	T	A	T

[1084]

残基	CAC20421 VH (SEQ ID NO:218)	IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)	小鼠 12C4 VH (SEQ ID NO:219)	Hu12C4VHv1 (SEQ ID NO:221)	Hu12C4VHv2 (SEQ ID NO:222)
H94	R	T	T	R	T

[1085] 表37:人源化12C4抗体的轻链中的回复突变和其他突变的框架残基(基于Kabat/Chothia复合物CDR)的Kabat编号

[1086]

残基	CAB51297 VL (SEQ ID NO:35)	IGKV2-28*01 & IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)	小鼠 12C4 VL (SEQ ID NO:11)	Hu12C4VLv1 (SEQ ID NO:223)	Hu12C4VLv2 (SEQ ID NO:224)
L64	G	G	S	G	S
L104	V	L	L	V	L

[1087] 表38人源化12C4抗体的重链和轻链的人源性百分比

[1088]

V _H 或V _L 变体	人源性%
Hu12C4VHv1 (SEQ ID NO:221)	86.6%
Hu12C4VHv2 (SEQ ID NO:222)	85.7%
Hu12C4VLv1 (SEQ ID NO:223)	89.0%
Hu12C4VLv2 (SEQ ID NO:224)	88.0%

[1089] 在小鼠与人受体序列之间规范、微调或界面残基不同的位置是取代候选。规范/CDR相互作用残基的实例包括表33中的Kabat残基H94。微调残基的实例包括表33中的Kabat

残基H48、H93和H94以及表34中的L64。界面/堆积 (VH+VL) 残基的实例包括表33中的Kabat残基H93。

[1090] 选择重链可变区中表33所示位置作为取代候选的理由如下。

[1091] 重链可变区

[1092] hu12C4VHv1

[1093] -由接枝到CAC20421的框架上的12C4-VH的CDR-H1、H2和H3环组成。

[1094] hu12C4VHv2

[1095] -在定义Chothia规范类别的关键位置处保留所有恢复的框架取代,是微调区的一部分,或定位到VH/VL域界面或有助于结构稳定性。12C4-VH_v2掺入了用在给定位置最常见的残基进行的回复突变或取代。

[1096] Q1E:是增强稳定性的突变,用以减轻焦谷氨酸形成的潜力,以降低N末端异质性(Liu,同上)。

[1097] M48I:是微调区残基的回复突变。

[1098] A93T:是VH/VL界面残基的回复突变,并进行回复突变以保留界面。

[1099] R94T:是微调区残基的回复突变。R94T也是种系对齐突变。Thr位于人种系基因IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)的此位置处。

[1100] 选择轻链可变区中表34所示位置作为取代候选的理由如下。

[1101] k轻链可变区

[1102] hu12C4VLv1

[1103] -由接枝到CAB51297VL的框架上的12C4-VL的CDR-L1、L2和L3环组成,并在定义Chothia规范类别的关键位置处恢复所有框架取代,是微调区的一部分,或定位到VH/VL结构域界面。对于hu12C4VLv1,除了G64之外没有其他位置符合这个标准,因此没有进行回复突变。基于同源性模型分析,位置64处的Gly可能是可耐受的,因此没有对12C4VLv1中的位置64进行变化,在hu12C4VLv2中尝试用Ser进行取代。

[1104] Hu12C4VLv2

[1105] -hu12C4VLv2包括有助于结构稳定性或增加抗体人源性的取代。

[1106] G64S:是微调区残基的回复突变。G64S回复突变保留CDR堆积。

[1107] V104L:是种系对齐突变。Leu位于人种系基因IGKV2-28*01&IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)的此位置处。

[1108] 基于这些人框架的设计是:

[1109] 重链可变区

>hu12C4VHv1 (SEQ ID NO:221)

QVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNKDDYMNWVQQAPGKGLEWMGWIDPENG
DTAYASKFQGRVTITADTSTDYAMELSSLRSEDYAVYYCARSNGWGQGTLLTVSS

[1110]

>hu12C4VHv2 (SEQ ID NO:222)

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNKDDYMNWVQQAPGKGLEWIGWIDPENGD
TAYASKFQGRVTITADTSTDYAMELSSLRSEDYAVYYCTTSNGWGQGTLLTVSS

[1111] k轻链可变区

>hu12C4VLv1 (SEQ ID NO:223)
DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLHLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLAS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGGGGTKVEIK

[1112]

>hu12C4VLv2 (SEQ ID NO:224)
DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLHLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLAS
GVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGGGGTKLEIK

[1113] 使用两阶段PCR方案生成人源化序列,其允许使用QuikChange定点诱变引入多个突变、缺失和插入[Wang,W.和Malcolm,B.A.(1999)BioTechniques 26:680-682)。

[1114] 实施例11.人源化17C12抗体的设计

[1115] 人源化的起点或供体抗体是小鼠抗体17C12。成熟m17C12的重链可变氨基酸序列作为SEQ ID NO:225提供。成熟m17C12的轻链可变氨基酸序列作为SEQ ID NO:228提供。重链Kabat/Chothia复合物CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列分别作为SEQ ID NO:226、227和10提供。轻链Kabat CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列分别作为SEQ ID NO:229-231提供。始终使用Kabat编号。

[1116] 17C12的可变κ(Vk)属于小鼠Vk第2亚组,其对应于人Vk第3亚组,并且可变重链(Vh)属于小鼠Vh第2c亚组,其对应于人Vh第1亚组[Kabat E.A.等人,(1991),Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版.NIH出版号91-3242]。16残基Chothia CDR-L1类似于Chothia规范类别4,7残基Chothia CDR-L2属于Chothia规范类别1,9残基Chothia CDR-L3类似于Chothia规范类别1[Martin ACR.(2010)Protein sequence and structure analysis of antibody variable domains.Kontermann R and Dübel S(编辑).Antibody Engineering.Heidelberg,Germany:Springer International Publishing AG..[Martin,2010]。10残基Chothia CDR-H1类似于Chothia规范类别1,17残基Chothia CDR-H2类似于Chothia规范类别2[Martin,2010]。3残基CDR-H3没有规范类别。对PDB数据库中的蛋白质序列进行了搜索[Deshpande N等人,(2005)Nucleic Acids Res.33:D233-7],以寻找将提供17C12的粗略结构模型的结构。抗体fab pdb代码3PP3[Niederfellner等人,2011,.Blood 118:358-367]的晶体结构用于Vh和Vk结构,因为它具有良好的分辨率(2.51Å°)和与17C12Vh和Vk的整体序列相似性,保留了相同的环规范结构。

[1117] 17C12VH的框架与由Arnold-Schild等人[Cancer Res.60(15),4175-4178(2000)]克隆的人抗体CAC20421的对应区域共享高度的序列相似性。17C12和CAC20421的重链可变结构域的CDR-H1、H2环也共享相同的长度。类似地,17C12VL的框架与由Cho等人[Cell Rep 28(4),909-922.e6(2019)]克隆的人抗体QD016713VL的对应区域共享高度的序列相似性。17C12和QD016713抗体的轻链可变结构域的CDR-L1、L2和L3环也共享相同的长度。因此,选择CAC20421VH和QD016713VL的框架区作为17C12的CDR的受体序列。构建了接枝到VH和VL的相应人框架上的17C12CDR模型,并将其用作进一步回复突变的指导。

[1118] 使用IMGT Domain GapAlign工具将由抗体人源化过程产生的重链和轻链变体序列与人种系序列进一步比对,以评估重链和轻链的人源性,如WHO INN委员会准则所概述的。(WHO-INN:International nonproprietary names(INN)for biological and biotechnological substances(a review)(互联网)2014.可获自:<http://www.who.int/medicines/services/inn/BioRev2014.pdf>) 在可能的情况下,改变残基以与对应的人种系

序列对齐,以增强人源性并降低潜在免疫原性。对于人源化VLv2和VLv2变体,引入突变以使序列更类似于人种系IGKV2-29*02&IGKJ4*01 (SEQ ID NO:239)。对于人源化VHv1和VHv变体,引入突变以使序列更类似于人种系基因IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)。

[1119] hu17C12-VH和hu17C12-VL的其他型式被设计成使得能够评估各种框架残基对抗原结合、热稳定性和免疫原性的贡献,以及脱氨基、氧化、N-糖基化、蛋白水解和聚集的优化。考虑进行突变的位置包括如下那些:

[1120] -限定规范的CDR构象(概述于Martin,A.C.R.(2010) Protein sequence and structure analysis of antibody variable domains.Kontermann R and Dübel S(编辑).Antibody Engineering.Heidelberg,Germany:Springer International Publishing AG.),

[1121] -位于微调区内(Foote J和Winter G.(1992) Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops.J Mol Biol.224(2):487-99.),

[1122] -定位到VH/VL结构域界面(概述于Léger OJP和Saldanha J.(2000) Preparation of recombinant antibodies from immune rodent spleens and the design of their humanisation by CDR grafting.Shepherd P and Dean C(编辑).Monoclonal Antibodies:a Practical Approach.Oxford,UK:Oxford University Press.),

[1123] -易进行翻译后修饰,诸如糖基化或焦谷氨酰胺化,

[1124] -根据接枝到VH和VL框架上的17C12CDR模型,被经预测与CDR冲突的残基占据,或者

[1125] -被于测序的人抗体中罕见的残基占据,其中亲本小鼠17C12残基或一些其他残基在人抗体库中更为普遍。

[1126] 对鼠17C12和各种人源化抗体的比对示出轻链可变区(表40和图12)和重链可变区(表39和图11)。

[1127] 构建了包含不同取代排列的2个人源化重链可变区变体和2个人源化轻链可变区变体:hu17C12VHv1或hu17C12VHv2(分别为SEQ ID NO:232-233);和hu17C12VLv1或hu17C12VLv2(分别为SEQ ID NO:234-235)(表39和表40)。具有基于所选人框架的回复突变和其他突变的示例性人源化Vk和Vh设计分别在表39和表40中示出。表39和表40中的粗体显示区域表示由Kabat/Chothia复合物定义的CDR。表39和表40的列中的“-”表示在指示位置处没有残基。SEQ ID NO:232-233和SEQ ID NO:234-235含有如表41所示的回复突变和其他突变。hu17C12VHv1和hu17C12VHv2中各位置处的氨基酸在表42中列出。hu17C12VLv1和hu17C12VLv2中各位置处的氨基酸在表43中列出。

[1128] 人源化VH链hu17C12VHv1和hu17C12VHv2(分别为SEQ ID NO:232-233)相对于最相似的人种系基因IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)的人源性百分比,以及人源化VL链hu17C12VLv1和hu17C12VLv2(分别为SEQ ID NO:234-235)相对于最相似的人种系基因IGKV2-29*02&IGKJ4*01 (SEQ ID NO:239)的人源性百分比在表44中示出。

[1129] 表39

[1130]

Kabat 残基号	线性残基号	FR 或 CDR	小鼠 17C12 VH (SEQ ID NO:225)	IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)	CAC20421-VH_huFrwk (SEQ ID:218)	Hu17C12VHv1 (SEQ ID NO:232)	Hu17C12VHv2 (SEQ ID NO:233)
1	1	Fr1	K	E	Q	Q	E
2	2	Fr1	I	V	V	I	I
3	3	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q
4	4	Fr1	L	L	L	L	L
5	5	Fr1	Q	V	V	V	V
6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q
7	7	Fr1	S	S	S	S	S
8	8	Fr1	G	G	G	G	G
9	9	Fr1	A	A	A	A	A
10	10	Fr1	E	E	E	E	E
11	11	Fr1	L	V	V	V	V
12	12	Fr1	V	K	K	K	K
13	13	Fr1	R	K	K	K	K
14	14	Fr1	P	P	P	P	P
15	15	Fr1	G	G	G	G	G
16	16	Fr1	A	A	A	A	A
17	17	Fr1	S	T	T	T	T
18	18	Fr1	V	V	V	V	V
19	19	Fr1	K	K	K	K	K
20	20	Fr1	L	I	I	I	I
21	21	Fr1	S	S	S	S	S
22	22	Fr1	C	C	C	C	C
23	23	Fr1	T	K	K	K	K
24	24	Fr1	A	V	V	A	A
25	25	Fr1	S	S	S	S	S
26	26	CDR-H1	A	G	G	A	A
27	27	CDR-H1	F	Y	Y	F	F

[1131]

Kabat 残基号	线性残基号	FR 或 CDR	小鼠 17C12 VH (SEQ ID NO:225)	IMG# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)	CAC20421-VH_huFrwk (SEQ ID:218)	Hu17C12VHv1 (SEQ ID NO:232)	Hu17C12VHv2 (SEQ ID NO:233)
28	28	CDR-H1	N	T	T	N	N
29	29	CDR-H1	I		F	I	I
30	30	CDR-H1	K	T	T	K	K
31	31	CDR-H1	D	D	D	D	D
32	32	CDR-H1	D	Y	Y	D	D
33	33	CDR-H1	Y	Y	Y	Y	Y
34	34	CDR-H1	M	M	M	M	M
35	35	CDR-H1	N	H	H	N	N
35A		CDR-H1	-	-	-	-	-
35B		CDR-H1	-	-	-	-	-
36	36	Fr2	W	W	W	W	W
37	37	Fr2	V	V	V	V	V
38	38	Fr2	K	Q	Q	Q	Q
39	39	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
40	40	Fr2	R	A	A	A	A
41	41	Fr2	P	P	P	P	P
42	42	Fr2	E	G	G	G	G
43	43	Fr2	R	K	K	K	K
44	44	Fr2	G	G	G	G	G
45	45	Fr2	L	L	L	L	L
46	46	Fr2	E	E	E	E	E
47	47	Fr2	W	W	W	W	W
48	48	Fr2	I	M	M	I	I
49	49	Fr2	G	G	G	G	G
50	50	CDR-H2	W	L	L	W	W
51	51	CDR-H2	I	V	V	I	I
52	52	CDR-H2	D	D	D	D	D
52A	53	CDR-H2	P	P	P	P	P
52B		CDR-H2	-	-	-	-	-

[1132]

Kabat 残基号	线性残基号	FR 或 CDR	小鼠 17C12 VH (SEQ ID NO:225)	IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)	CAC20421-VH_huFrwk (SEQ ID:218)	Hu17C12VHv1 (SEQ ID NO:232)	Hu17C12VHv2 (SEQ ID NO:233)
52C		CDR-H2	-	-	-	-	-
53	54	CDR-H2	E	E	E	E	E
54	55	CDR-H2	N	D	D	N	N
55	56	CDR-H2	G	G	G	G	G
56	57	CDR-H2	D	E	E	D	D
57	58	CDR-H2	T	T	T	T	T
58	59	CDR-H2	K	I	I	K	K
59	60	CDR-H2	Y	Y	Y	Y	Y
60	61	CDR-H2	A	A	A	A	A
61	62	CDR-H2	S	E	E	S	S
62	63	CDR-H2	K	K	K	K	K
63	64	CDR-H2	F	F	F	F	F
64	65	CDR-H2	Q	Q	Q	Q	Q
65	66	CDR-H2	G	G	G	G	G
66	67	Fr3	K	R	R	R	R
67	68	Fr3	A	V	V	A	A
68	69	Fr3	T	T	T	T	T
69	70	Fr3	M	I	I	M	M
70	71	Fr3	T	T	T	T	T
71	72	Fr3	A	A	A	A	A
72	73	Fr3	D	D	D	D	D
73	74	Fr3	T	T	T	T	T
74	75	Fr3	S	S	S	S	S
75	76	Fr3	S	T	T	T	T
76	77	Fr3	N	D	D	D	D
77	78	Fr3	T	T	T	T	T
78	79	Fr3	A	A	A	A	A
79	80	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
80	81	Fr3	L	M	M	M	M

[1133]

Kabat 残基号	线性残基号	FR 或 CDR	小鼠 17C12 VH (SEQ ID NO:225)	IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)	CAC20421-VH_huFrwk (SEQ ID:218)	Hu17C12VHV1 (SEQ ID NO:232)	Hu17C12VHV2 (SEQ ID NO:233)
81	82	Fr3	Q	E	E	E	E
82	83	Fr3	L	L	L	L	L
82A	84	Fr3	S	S	S	S	S
82B	85	Fr3	S	S	S	S	S
82C	86	Fr3	L	L	L	L	L
83	87	Fr3	T	R	R	R	R
84	88	Fr3	S	S	S	S	S
85	89	Fr3	E	E	E	E	E
86	90	Fr3	D	D	D	D	D
87	91	Fr3	T	T	T	T	T
88	92	Fr3	A	A	A	A	A
89	93	Fr3	V	V	V	V	V
90	94	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
91	95	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
92	96	Fr3	C	C	C	C	C
93	97	Fr3	T	A	A	T	T
94	98	Fr3	T	T	R	T	T
95	99	CDR-H3	S		I	S	S
96		CDR-H3	-	-	P	-	-
97		CDR-H3	-	-	L	-	-
98		CDR-H3	-	-	F	-	-
99		CDR-H3	-	-	G	-	-
100		CDR-H3	-	-	R	-	-
100 A		CDR-H3	-	-	-	-	-
100 B		CDR-H3	-	-	-	-	-
100 C		CDR-H3	-	-	-	-	-

[1134]

Kabat 残基号	线性残基号	FR 或 CDR	小鼠 17C12 VH (SEQ ID NO:225)	IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)	CAC20421-VH_huFrwk (SEQ ID:218)	Hu17C12VHv1 (SEQ ID NO:232)	Hu17C12VHv2 (SEQ ID NO:233)
100 D		CDR-H3	-	-	-	-	-
100 E		CDR-H3	-	-	-	-	-
100 F		CDR-H3	-	-	-	-	-
100 G		CDR-H3	-	-	-	-	-
100 H		CDR-H3	-	-	-	-	-
100I		CDR-H3	-	-	-	-	-
100J		CDR-H3	-	-	-	-	-
100 K		CDR-H3	-	-	-	-	-
101	100	CDR-H3	N	Q	D	N	N
102	101	CDR-H3	G	H	H	G	G
103	102	Fr4	W	W	W	W	W
104	103	Fr4	G	G	G	G	G
105	104	Fr4	Q	Q	Q	Q	Q
106	105	Fr4	G	G	G	G	G
107	106	Fr4	T	T	T	T	T
108	107	Fr4	L	L	T	T	L
109	108	Fr4	V	V	V	V	V
110	109	Fr4	T	T	T	T	T
111	110	Fr4	V	V	V	V	V
112	111	Fr4	S	S	S	S	S
113	112	Fr4	A	S	R	R	S

[1135] 表40

[1136]

Kabat 残基号	线性残基号	FR 或 CDR	小鼠 17C12 VL (SEQ ID NO:228)	IGKV2-29*02 & IGKJ4*01 (SEQ ID NO:239)	QDO16713-VL_huFrwk (SEQ ID NO:238)	Hu17C12VLv1 (SEQ ID NO:234)	Hu17C12VLv2 (SEQ ID NO:235)
1	1	Fr1	D	D	D	D	D
2	2	Fr1	V	I	I	V	V
3	3	Fr1	V	V	V	V	V
4	4	Fr1	M	M	M	M	M
5	5	Fr1	T	T	T	T	T
6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q
7	7	Fr1	T	T	T	T	T
8	8	Fr1	P	P	P	P	P
9	9	Fr1	L	L	L	L	L
10	10	Fr1	T	S	S	S	S
11	11	Fr1	L	L	L	L	L
12	12	Fr1	S	S	S	S	S
13	13	Fr1	V	V	V	V	V
14	14	Fr1	T	T	T	T	T
15	15	Fr1	I	P	P	P	P
16	16	Fr1	G	G	G	G	G
17	17	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q
18	18	Fr1	P	P	P	P	P
19	19	Fr1	A	A	A	A	A

[1137]

Kabat 残基号	线性残基号	FR 或 CDR	小鼠 17C12 VL (SEQ ID NO:228)	IGKV2-29*02 & IGKJ4*01 (SEQ ID NO:239)	QDO16713-VL_huFrwk (SEQ ID NO:238)	Hu17C12VLv1 (SEQ ID NO:234)	Hu17C12VLv2 (SEQ ID NO:235)
20	20	Fr1	S	S	S	S	S
21	21	Fr1	I	I	I	I	I
22	22	Fr1	S	S	S	S	S
23	23	Fr1	C	C	C	C	C
24	24	CDR-L1	T	K	K	T	T
25	25	CDR-L1	S	S	S	S	S
26	26	CDR-L1	S	S	S	S	S
27	27	CDR-L1	Q	Q	Q	Q	Q
27A	28	CDR-L1	S	S	S	S	S
27B	29	CDR-L1	L	L	L	L	L
27C	30	CDR-L1	L	L	L	L	L
27D	31	CDR-L1	H	H	H	H	H
27E	32	CDR-L1	S	S	S	S	S
27F		CDR-L1	-	-	-	-	-
28	33	CDR-L1	N	D	D	N	N
29	34	CDR-L1	R	G	G	R	R
30	35	CDR-L1	K	K	K	K	K
31	36	CDR-L1	T	T	T	T	T
32	37	CDR-L1	Y	Y	Y	Y	Y
33	38	CDR-L1	L	L	L	L	L
34	39	CDR-L1	H	Y	Y	H	H

[1138]

Kabat 残基号	线性残基号	FR 或 CDR	小鼠 17C12 VL (SEQ ID NO:228)	IGKV2-29*02 & IGKJ4*01 (SEQ ID NO:239)	QDO16713-VL_huFrwk (SEQ ID NO:238)	Hu17C12VLv1 (SEQ ID NO:234)	Hu17C12VLv2 (SEQ ID NO:235)
35	40	Fr2	W	W	W	W	W
36	41	Fr2	L	Y	Y	L	L
37	42	Fr2	L	L	L	L	L
38	43	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
39	44	Fr2	R	K	K	K	K
40	45	Fr2	P	P	P	P	P
41	46	Fr2	G	G	G	G	G
42	47	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
43	48	Fr2	S	S	P	P	S
44	49	Fr2	P	P	P	P	P
45	50	Fr2	K	Q	Q	Q	Q
46	51	Fr2	L	L	L	L	L
47	52	Fr2	L	L	L	L	L
48	53	Fr2	I	I	I	I	I
49	54	Fr2	Y	Y	Y	Y	Y
50	55	CDR-L2	L	E	E	L	L
51	56	CDR-L2	V	V	V	V	V
52	57	CDR-L2	S	S	S	S	S
53	58	CDR-L2	K	S	N	K	K
54	59	CDR-L2	L	R	R	L	L
55	60	CDR-L2	E	F	F	E	E

[1139]

Kabat 残基号	线性残基号	FR 或 CDR	小鼠 17C12 VL (SEQ ID NO:228)	IGKV2-29*02 & IGKJ4*01 (SEQ ID NO:239)	QDO16713-VL_huFrwk (SEQ ID NO:238)	Hu17C12VLv1 (SEQ ID NO:234)	Hu17C12VLv2 (SEQ ID NO:235)
56	61	CDR-L2	S	S	S	S	S
57	62	Fr3	G	G	G	G	G
58	63	Fr3	V	V	V	V	V
59	64	Fr3	P	P	P	P	P
60	65	Fr3	D	D	D	D	D
61	66	Fr3	R	R	R	R	R
62	67	Fr3	F	F	F	F	F
63	68	Fr3	S	S	S	S	S
64	69	Fr3	G	G	G	G	G
65	70	Fr3	S	S	S	S	S
66	71	Fr3	G	G	G	G	G
67	72	Fr3	S	S	S	S	S
68	73	Fr3	G	G	G	G	G
69	74	Fr3	T	T	T	T	T
70	75	Fr3	D	D	D	D	D
71	76	Fr3	F	F	F	F	F
72	77	Fr3	T	T	T	T	T
73	78	Fr3	L	L	L	L	L
74	79	Fr3	K	K	K	K	K
75	80	Fr3	I	I	I	I	I
76	81	Fr3	S	S	S	S	S

[1140]

Kabat 残基号	线性残基号	FR 或 CDR	小鼠 17C12 VL (SEQ ID NO:228)	IGKV2-29*02 & IGKJ4*01 (SEQ ID NO:239)	QDO16713-VL_huFrwk (SEQ ID NO:238)	Hu17C12VLv1 (SEQ ID NO:234)	Hu17C12VLv2 (SEQ ID NO:235)
77	82	Fr3	R	R	R	R	R
78	83	Fr3	V	V	V	V	V
79	84	Fr3	E	E	E	E	E
80	85	Fr3	A	A	A	A	A
81	86	Fr3	E	E	E	E	E
82	87	Fr3	D	D	D	D	D
83	88	Fr3	L	V	V	V	V
84	89	Fr3	G	G	G	G	G
85	90	Fr3	V	V	V	V	V
86	91	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
87	92	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
88	93	Fr3	C	C	C	C	C
89	94	CDR-L3	L	M	M	L	L
90	95	CDR-L3	Q	Q	Q	Q	Q
91	96	CDR-L3	T	G	S	T	T
92	97	CDR-L3	T	I	I	T	T
93	98	CDR-L3	H	H	Q	H	H
94	99	CDR-L3	F	L	L	F	F
95	100	CDR-L3	P	P	P	P	P
95A		CDR-L3	-	-	-	-	-
95B		CDR-L3	-	-	-	-	-

[1141]

Kabat 残基号	线性残基号	FR 或 CDR	小鼠 17C12 VL (SEQ ID NO:228)	IGKV2-29*02 & IGKJ4*01 (SEQ ID NO:239)	QDO16713-VL_huFrwk (SEQ ID NO:238)	Hu17C12VLv1 (SEQ ID NO:234)	Hu17C12VLv2 (SEQ ID NO:235)
95C		CDR-L3	-	-	-	-	-
95D		CDR-L3	-	-	-	-	-
95E		CDR-L3	-	-	-	-	-
95F		CDR-L3	-	-	-	-	-
96	101	CDR-L3	R	L	P	R	R
97	102	CDR-L3	T	T	T	T	T
98	103	Fr4	F	F	F	F	F
99	104	Fr4	G	G	G	G	G
100	105	Fr4	G	G	G	G	G
101	106	Fr4	G	G	G	G	G
102	107	Fr4	T	T	T	T	T
103	108	Fr4	K	K	K	K	K
104	109	Fr4	L	V	V	V	V
105	110	Fr4	E	E	E	E	E
106	111	Fr4	I	I	I	I	I
106A		Fr4	-	-	-	-	-
107	112	Fr4	K	K	K	K	K

表 41: 人源化 17C12 的 V_H、V_L 回复突变和其他突变

V _H 或 V _L 变体	V _H 或 V _L 外显子受体序列	受体框架(或 CDR) 残基的变化(基于 Kabat/Chothia 复合物 CDR)
Hu17C12VHv1 (SEQ ID NO:232)	GenBank 登录号 CAC20421-VH_huFrwk (SEQ ID NO:218) IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)	H2、H24、H48、H67、 H69、H93、H94
Hu17C12VHv2 (SEQ ID NO:232)	GenBank 登录号 CAC20421-VH_huFrwk (SEQ ID NO:218) IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)	H1、H2、H24、H48、 H67、H69、H93、 H94、H108、H113
Hu17C12VLv1 (SEQ ID NO:233)	GenBank 登录号 QDO16713-VL_huFrwk (SEQ ID NO:238)	L2、L36
Hu17C12VLv2 (SEQ ID NO:234)	GenBank 登录号 QDO16713-VL_huFrwk (SEQ ID NO:238) IGKV2-29*02 & IGKJ4*01 (SEQ ID NO:239)	L2、L36、L43

[1143] 表42:人源化17C12抗体的重链中的回复突变和其他突变的框架(或CDR)残基(基于Kabat/Chothia复合物CDR)的Kabat编号

残基	CAC20421-VH_huFrwk (SEQ ID NO:218)	IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)	小鼠 17C12 VH (SEQ ID NO:225)	Hu17C12VHv1 (SEQ ID NO:232)	Hu17C12VHv2 (SEQ ID NO:233)
H1	Q	E	K	Q	E
H2	V	V	I	I	I
H24	V	V	A	A	A
H48	M	M	I	I	I
H67	V	V	A	A	A
H69	I	I	M	M	M

[1145]

残基	CAC20421-VH_huFrwk (SEQ ID NO:218)	IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)	小鼠 17C12 VH (SEQ ID NO:225)	Hu17C12VHv1 (SEQ ID NO:232)	Hu17C12VHv2 (SEQ ID NO:233)
H93	A	A	T	T	T
H94	R	T	T	T	T
H108	T	L	L	T	L
H113	R	S	A	R	S

[1146] 表43:人源化17C12抗体的轻链中的回复突变和其他突变的框架残基(基于Kabat/Chothia复合物CDR)的Kabat编号

[1147]

残基	QDO16713-VL_huFrwk (SEQ ID NO:238)	IGKV2-29*02 & IGKJ4*01 (SEQ ID NO:239)	小鼠 17C12 VL (SEQ ID NO:228)	Hu17C12VLv1 (SEQ ID NO:234)	Hu17C12VLv2 (SEQ ID NO:235)
L2	I	I	V	V	V
L36	Y	Y	L	L	L
L43	P	S	S	P	S

[1148] 表44人源化17C12抗体的重链和轻链的人源性百分比

[1149]

V _H 或V _L 变体	人源性%
Hu17C12VHv1 (SEQ ID NO:232)	79.6%

Hu17C12VHv2 (SEQ ID NO:233)	80.6%
Hu17C12VLv1 (SEQ ID NO:234)	85.0%
Hu17C12VLv2 (SEQ ID NO:235)	86.0%

[1150] 在小鼠与人受体序列之间规范、微调或界面残基不同的位置是取代候选。规范/CDR相互作用残基的实例包括表39中的Kabat残基H94以及表40中的L2。微调残基的实例包括表39中的Kabat残基H2、H24、H48、H67、H69、H93和H94以及表40中的L2和L36。界面/堆积(VH+VL)残基的实例包括表39中的Kabat残基H93和表40中的L36。

[1151] 选择重链可变区中表39所示位置作为取代候选的理由如下。

[1152] 重链可变区

[1153] hu17C12VHv1

[1154] -由接枝到CAC20421的框架上的17C12-VH的CDR-H1、H2和H3环组成。另外, hu17C12VHv1还在定义Chothia规范类别的关键位置处恢复所有框架取代,是微调区的一部分,或定位到VH/VL结构域界面,有助于结构稳定性。

[1155] V2I:是微调区残基的回复突变以保留微调区。

[1156] V24A:是Chothia规范结构残基的回复突变,并且回复突变可增强稳定性。

[1157] M48I:是微调区残基的回复突变。

[1158] V67A:是微调区残基的回复突变并且进行回复突变以保留CDR构象。

[1159] I69M:是微调区残基的回复突变并且进行回复突变以保持CDR堆积完整。

[1160] A93T:是VH/VL界面残基的回复突变,并且为了抗体界面的完整性而进行回复突变。

[1161] R94T:是Chothia规范结构残基的回复突变。R94T也是种系对齐突变。Thr位于人种系基因IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)的此位置处。

[1162] hu17C12VHv2

[1163] -hu17C12VHv2还在定义Chothia规范类别的关键位置处保留所有恢复的框架取代,是微调区的一部分,或定位到VH/VL域界面,有助于结构稳定性。另外, hu17C12VHv2掺入了用在给定位置最常见的残基进行的且用于优化脱氨基、氧化、N-糖基化、蛋白水解和聚集的回复突变或取代。未包含在hu17C12VHv1中的hu17C12VHv2中的突变是:

[1164] Q1E:是增强稳定性的突变,用以减轻焦谷氨酸形成的潜力,以降低N末端异质性(Liu,同上)。

[1165] T108L:是种系对齐突变。Leu位于人种系基因IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)的此位置处。

[1166] R113S:是基于频率的种系对齐突变。Arg在此位置很罕见,而Ser位于人种系基因IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:33)的此位置处,并且是此位置最常见的残基。

[1167] 选择轻链可变区中表40所示位置作为取代候选的理由如下。

[1168] k轻链可变区

[1169] hu17C12VLv1

[1170] -由接枝到QD016713VL的框架上的17C12-VL的CDR-L1、L2和L3环组成,并在定义Chothia规范类别的关键位置处恢复所有框架取代,是微调区的一部分,或定位到VH/VL结构域界面。

- [1171] I2V:是微调区残基的回复突变,并且回复突变保留了CDR堆积构象。
- [1172] Y36L:是VH/VL界面和微调区残基的回复突变,并且进行回复突变以保持界面完整。
- [1173] hu17C12VLv2
- [1174] -hu17C12VLv2包括有助于结构稳定性或增加抗体人源性的取代。
- [1175] P43S:是基于频率的种系对齐突变。Pro在此位置很罕见,被Ser取代,Ser位于人种系基因IGKV2-29*02&IGKJ4*01 (SEQ ID NO:239)的此位置处。
- [1176] 基于这些人框架的设计是:
- [1177] 重链可变区
- >hu17C12VHv1

QIQLVQSGAEVKKPGATVKISKASAFNIKDDYMNWVQQAPGKGLEWIGWIDPENGDT
KYASKFQGRATMTADTSTDTAYMELSSLRSEDVAVYYCTTSNGWGQGTTTVTSR

[1178]

>hu17C12VHv2

EVQLQQSGAELVKPGATVKISCTASGFNIKDDYMNWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDT
EYASKFQGKATMTADTSTNTAYLQLSSLTSEDVAVYYCTTSNGWGQGTTTVTVSS

[1179]

k轻链可变区

>hu17C12VLv1

DVVMTQTPLSLSVTPGQPASISCTSSQSLLSNRKTYLHWLLQKPGQPPQLLIYLVSKLE
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLQTTHFPRTFGGGTKVEIK

[1180]

>hu17C12VLv2

DVVMTQTPLSLSVTPGQPASISCTSSQSLLSNRKTYLHWLLQKPGQSPQLLIYLVSKLE
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLQTTHFPRTFGGGTKVEIK

[1181] 使用两阶段PCR方案生成人源化序列,其允许使用QuikChange定点诱变引入多个突变、缺失和插入[Wang,W.和Malcolm,B.A.(1999)BioTechniques 26:680-682)。

[1182] 实施例12.人源化14H3抗体的设计

[1183] 人源化的起点或供体抗体是小鼠抗体14H3。成熟m14H3的重链可变氨基酸序列作为SEQ ID NO:240提供。成熟m14H3的轻链可变氨基酸序列作为SEQ ID NO:244提供。重链Kabat/Chothia复合物CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列分别作为SEQ ID NO:241-243提供。轻链Kabat CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列分别作为SEQ IDNO:245-247提供。始终使用Kabat编号。

[1184] 14H3的可变κ(Vk)属于小鼠Vk第2亚组,其对应于人Vk第2亚组,并且可变重链(Vh)属于小鼠Vh第1b亚组,其对应于人Vh第2亚组[Kabat E.A.等人,(1991),Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版.NIH出版号91-3242]。16残基Chothia CDR-L1类似于Chothia规范类别4,7残基Chothia CDR-L2属于Chothia规范类别1,并且9残基Chothia CDR-L3类似于Chothia规范类别1[Martin ACR.(2010)Protein sequence and structure analysis of antibody variable domains.Kontermann R and Dübel S(编

辑).Antibody Engineering.Heidelberg,Germany:Springer International Publishing AG..[Martin,2010]。12残基Chothia CDR-H1类似于Chothia规范类别3,16残基Chothia CDR-H2类似于Chothia规范类别1[Martin,2010],并且4残基CDR-H3没有规范类别。对PDB数据库中的蛋白质序列进行了搜索[Deshpande N等人,(2005)Nucleic Acids Res.33:D233-7],以寻找将提供14H3的粗略结构模型的结构。抗体fab pdb代码2VQ1[De Geus,D.C.等人 Proteins 76:439;(2009)]的晶体结构用于Vh和Vk结构,因为它具有良好的分辨率(2.5Å°)和与14H3Vh和Vk的整体序列相似性,保留了相同的环规范结构。

[1185] 14H3VH的框架与由Cassotta等人[(2009)Cassotta,A.,Mikol,V.,Bertrand,T.等人A single T cell epitope drives the neutralizing anti-idiotypic antibody response to natalizumab in patients with multiple sclerosis,未公布(直接提交至GenBank (2019))]克隆的免疫球蛋白重链可变区[智人]QDJ57937的对应区域共享高度的序列相似性。14H3的可变结构域和QDJ57937VH的CDR-H1、H2环也共享相同的长度。类似地,14H3VL的框架与由Shriner等人[Vaccine 24(49-50),7159-7166(2006)]克隆的人抗体ABC66914的对应区域共享高度的序列相似性。14H3的轻链可变结构域和ABC66914VL的CDR-L1、L2和L3环共享相同的长度。因此,选择QDJ57937VH和ABC66914VL的框架区作为14H3的CDR的受体序列。构建了接枝到VH和VL的相应人框架上的14H3CDR模型,并将其用作进一步回复突变的指导。

[1186] 使用IMGT Domain GapAlign工具将由抗体人源化过程产生的重链和轻链变体序列与人种系序列进一步比对,以评估重链和轻链的人源性,如WHO INN委员会准则所概述的。(WHO-INN:International nonproprietary names (INN) for biological and biotechnological substances(a review) (互联网)2014。可获自:<http://www.who.int/medicines/services/inn/BioRev2014.pdf>) 在可能的情况下,改变残基以与对应的人种系序列对齐,以增强人源性并降低潜在免疫原性。对于人源化VLv1和VLv2变体,引入突变以使序列更类似于人种系基因IGKV2-28*01&IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)。对于人源化VHv1和VHv2变体,引入突变以使序列更类似于人种系基因IGHV1-70*04&IGHJ4*01 (SEQ ID NO:254)。

[1187] hu14H3-VH和hu14H3-VL的其他型式被设计成使得能够评估各种框架残基对抗原结合、热稳定性和免疫原性的贡献,以及脱氨基、氧化、N-糖基化、蛋白水解和聚集的优化。考虑进行突变的位置包括如下那些:

[1188] -限定规范的CDR构象(概述于Martin,A.C.R.(2010)Protein sequence and structure analysis of antibody variable domains.Kontermann R and Dübel S(编辑).Antibody Engineering.Heidelberg,Germany:Springer International Publishing AG.),

[1189] -位于微调区内(Foote J和Winter G.(1992)Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops.J Mol Biol.224(2):487-99.),

[1190] -定位到VH/VL结构域界面(概述于Léger OJP和Saldanha J.(2000)Preparation of recombinant antibodies from immune rodent spleens and the design of their humanisation by CDR grafting.Shepherd P and Dean C(编辑).Monoclonal Antibodies:a Practical Approach.Oxford,UK:Oxford University Press.),

[1191] -易进行翻译后修饰,诸如糖基化或焦谷氨酰胺化,

[1192] -根据接枝到VH和VL框架上的14H3CDR模型,被经预测与CDR冲突的残基占据,或者

[1193] -被于测序的人抗体中罕见的残基占据,其中亲本小鼠14H3残基或一些其他残基在人抗体库中更为普遍。

[1194] 对鼠14H3和各种人源化抗体的比对示出轻链可变区(表46和图14)和重链可变区(表45和图13)。

[1195] 构建了包含不同取代排列的2个人源化重链可变区变体和2个人源化轻链可变区变体:hu14H3VHv1或hu14H3VHv2(分别为SEQ IDN0:248-249);和hu14H3VLv1或hu14H3VLv2(分别为SEQ IDN0:250-251)(表45和表46)。具有基于所选人框架的回复突变和其他突变的示例性人源化Vk和Vh设计分别在表45和表46中示出。表45和表46中的粗体显示区域表示由Kabat/Chothia复合物定义的CDR。表45和表46的列中的“-”表示在指示位置处没有残基。SEQ IDN0:248-249和SEQ ID N0:250-251含有如表47所示的回复突变和其他突变。hu14H3VHv1和hu14H3VHv2中各位置处的氨基酸在表48中列出。hu14H3VLv1和hu14H3VLv2中各位置处的氨基酸在表49中列出。

[1196] 人源化VH链hu14H3VHv1和hu14H3VHv2(分别为SEQ IDN0:248-249)相对于最相似的人种系基因IGHV1-70*04&IGHJ4*01(SEQ ID N0:254)的人源性百分比,以及人源化VL链hu14H3VLv1和hu14H3VLv2(分别为SEQ ID N0:250-251)相对于最相似的人种系基因IGKV2-28*01&IGKJ2*01(SEQ ID N0:37)的人源性百分比在表50中示出。

[1197] 表45

[1198]

Kabat 残基号	线性残基号	FR 或 CDR	小鼠 14H3 VH (SEQ ID NO:240)	IGHV2-70*04 & IGHJ4*01 (SEQ ID NO:254)	QDJ57937VH hFrwk (SEQ ID NO:x253)	Hu4H3VHv1 (SEQ ID NO:248)	Hu14H3VHv2 (SEQ ID NO:249)
1	1	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q
2	2	Fr1	V	V	V	V	V
3	3	Fr1	T	T	T	T	T
4	4	Fr1	L	L	L	L	L
5	5	Fr1	K	K	K	K	K
6	6	Fr1	E	E	E	E	E
7	7	Fr1	S	S	S	S	S
8	8	Fr1	G	G	G	G	G
9	9	Fr1	P	P	P	P	P
10	10	Fr1	G	A	A	A	A
11	11	Fr1	I	L	L	L	L
12	12	Fr1	L	V	V	V	V
13	13	Fr1	Q	K	K	K	K
14	14	Fr1	P	P	P	P	P
15	15	Fr1	S	T	T	T	T
16	16	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q
17	17	Fr1	T	T	T	T	T
18	18	Fr1	L	L	L	L	L
19	19	Fr1	S	T	T	T	T
20	20	Fr1	L	L	L	L	L
21	21	Fr1	T	T	T	T	T
22	22	Fr1	C	C	C	C	C
23	23	Fr1	S	T	T	T	T
24	24	Fr1	F	F	F	F	F
25	25	Fr1	S	S	S	S	S
26	26	CDR-H1	G	G	G	G	G

[1199]

Kabat 残基号	线性残基号	FR 或 CDR	小鼠 14H3 VH (SEQ ID NO:240)	IGHV2-70*04 & IGHJ4*01 (SEQ ID NO:254)	QDJ57937VH hFrwk (SEQ ID NO:x253)	Hu4H3VHv1 (SEQ ID NO:248)	Hu14H3VHv2 (SEQ ID NO:249)
27	27	CDR-H1	F	F	F	F	F
28	28	CDR-H1	S	S	S	S	S
29	29	CDR-H1	L	L	L	L	L
30	30	CDR-H1	S	S	S	S	S
31	31	CDR-H1	T	T	T	T	T
32	32	CDR-H1	Y	S	S	Y	Y
33	33	CDR-H1	G	G	G	G	G
34	34	CDR-H1	M	M	M	M	M
35	35	CDR-H1	G	R	R	G	G
35 A	36	CDR-H1	V	V	V	V	V
35 B	37	CDR-H1	G	S	S	S	S
36	38	Fr2	W	W	W	W	W
37	39	Fr2	I	I	I	I	I
38	40	Fr2	R	R	R	R	R
39	41	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
40	42	Fr2	P	P	P	P	P
41	43	Fr2	S	P	P	P	P
42	44	Fr2	G	G	G	G	G
43	45	Fr2	K	K	K	K	K
44	46	Fr2	G	A	A	A	A
45	47	Fr2	L	L	L	L	L
46	48	Fr2	E	E	E	E	E
47	49	Fr2	W	W	W	W	W
48	50	Fr2	L	L	L	L	L
49	51	Fr2	A	A	A	A	A
50	52	CDR-H2	N	R	R	N	N

[1200]

Kabat 残基号	线性残基号	FR 或 CDR	小鼠 14H3 VH (SEQ ID NO:240)	IGHV2-70*04 & IGHJ4*01 (SEQ ID NO:254)	QDJ57937VH hFrwk (SEQ ID NO:x253)	Hu4H3VHv1 (SEQ ID NO:248)	Hu14H3VHv2 (SEQ ID NO:249)
51	53	CDR-H2	I	I	I	I	I
52	54	CDR-H2	W	D	D	W	W
52 A		CDR-H2	-	-	-	-	-
52 B		CDR-H2	-	-	-	-	-
52 C		CDR-H2	-	-	-	-	-
53	55	CDR-H2	W	W	W	W	W
54	56	CDR-H2	D	D	D	D	D
55	57	CDR-H2	D	D	D	D	D
56	58	CDR-H2	I	D	D	I	I
57	59	CDR-H2	K	K	K	K	K
58	60	CDR-H2	Y	F	F	Y	Y
59	61	CDR-H2	Y	Y	Y	Y	Y
60	62	CDR-H2	N	S	S	N	N
61	63	CDR-H2	A	T	T	A	A
62	64	CDR-H2	A	S	S	A	A
63	65	CDR-H2	L	L	L	L	L
64	66	CDR-H2	K	K	K	K	K
65	67	CDR-H2	S	T	T	S	S
66	68	Fr3	R	R	R	R	R
67	69	Fr3	L	L	L	L	L
68	70	Fr3	T	T	T	T	T
69	71	Fr3	I	I	I	I	I
70	72	Fr3	S	S	S	S	S
71	73	Fr3	K	K	K	K	K
72	74	Fr3	D	D	D	D	D
73	75	Fr3	T	T	T	T	T

[1201]

Kabat 残基号	线性残基号	FR 或 CDR	小鼠 14H3 VH (SEQ ID NO:240)	IGHV2-70*04 & IGHJ4*01 (SEQ ID NO:254)	QDJ57937VH hFrwk (SEQ ID NO:x253)	Hu4H3VHv1 (SEQ ID NO:248)	Hu14H3VHv2 (SEQ ID NO:249)
74	76	Fr3	S	S	S	S	S
75	77	Fr3	K	K	K	K	K
76	78	Fr3	N	N	N	N	N
77	79	Fr3	Q	Q	Q	Q	Q
78	80	Fr3	V	V	V	V	V
79	81	Fr3	F	V	V	V	V
80	82	Fr3	L	L	L	L	L
81	83	Fr3	K	T	T	T	T
82	84	Fr3	I	M	M	M	M
82 A	85	Fr3	A	T	T	T	T
82 B	86	Fr3	S	N	N	N	N
82 C	87	Fr3	V	M	M	M	M
83	88	Fr3	D	D	D	D	D
84	89	Fr3	T	P	P	P	P
85	90	Fr3	A	V	V	V	V
86	91	Fr3	D	D	D	D	D
87	92	Fr3	T	T	T	T	T
88	93	Fr3	A	A	A	A	A
89	94	Fr3	T	T	T	T	T
90	95	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
91	96	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
92	97	Fr3	C	C	C	C	C
93	98	Fr3	A	A	A	A	A
94	99	Fr3	R	R	R	R	R
95	100	CDR-H3	N	N	L	N	N
96	101	CDR-H3	V	V	A	V	V

[1202]

Kabat 残基号	线性残基号	FR 或 CDR	小鼠 14H3 VH (SEQ ID NO:240)	IGHV2-70*04 & IGHJ4*01 (SEQ ID NO:254)	QDJ57937VH hFrwk (SEQ ID NO:x253)	Hu4H3VHv1 (SEQ ID NO:248)	Hu14H3VHv2 (SEQ ID NO:249)
97		CDR-H3	-	-	V	-	-
98		CDR-H3	-	-	A	-	-
99		CDR-H3	-	-	D	-	-
100		CDR-H3	-	-	A	-	-
100 A		CDR-H3	-	-	F	-	-
100 B		CDR-H3	-	-	-	-	-
100 C		CDR-H3	-	-	-	-	-
100 D		CDR-H3	-	-	-	-	-
100 E		CDR-H3	-	-	-	-	-
100 F		CDR-H3	-	-	-	-	-
100 G		CDR-H3	-	-	-	-	-
100 H		CDR-H3	-	-	-	-	-
100 I		CDR-H3	-	-	-	-	-
100 J		CDR-H3	-	-	-	-	-
100 K		CDR-H3	-	-	-	-	-
101	102	CDR-H3	D	D	D	D	D
102	103	CDR-H3	Y	Y	I	Y	Y
103	104	Fr4	W	W	W	W	W

[1203]

Kabat 残基号	线性残基号	FR 或 CDR	小鼠 14H3 VH (SEQ ID NO:240)	IGHV2-70*04 & IGHJ4*01 (SEQ ID NO:254)	QDJ57937VH hFrwk (SEQ ID NO:x253	Hu4H3VHv1 (SEQ ID NO:248)	Hu14H3VHv2 (SEQ ID NO:249)
104	105	Fr4	G	G	G	G	G
105	106	Fr4	Q	Q	Q	Q	Q
106	107	Fr4	G	G	G	G	G
107	108	Fr4	T	T	T	T	T
108	109	Fr4	T	L	M	M	L
109	110	Fr4	L	V	V	V	V
110	111	Fr4	T	T	T	T	T
111	112	Fr4	V	V	V	V	V
112	113	Fr4	S	S	S	S	S
113	114	Fr4	S	S	L	L	S

[1204] 表46

[1205]

Kabat 残基号	线性残基号	FR 或 CDR	小鼠 14H3 VL (SEQ ID NO:244)	IGKV2-28*01 & IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)	ABC66914VL_hFwrk (SEQ ID NO:256)	Hu14H3VLv1 (SEQ ID NO:250)	Hu14H3VLv2 (SEQ ID NO:251)
1	1	Fr1	D	D	D	D	D
2	2	Fr1	V	I	I	V	V
3	3	Fr1	V	V	V	V	V
4	4	Fr1	M	M	M	M	M
5	5	Fr1	T	T	T	T	T
6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q
7	7	Fr1	T	S	T	T	S
8	8	Fr1	P	P	P	P	P
9	9	Fr1	L	L	L	L	L
10	10	Fr1	S	S	S	S	S
11	11	Fr1	L	L	L	L	L
12	12	Fr1	P	P	P	P	P
13	13	Fr1	V	V	V	V	V
14	14	Fr1	S	T	T	T	T
15	15	Fr1	L	P	P	P	P
16	16	Fr1	G	G	G	G	G
17	17	Fr1	D	E	E	E	E
18	18	Fr1	Q	P	P	P	P

[1206]

Kabat 残基号	线性残基号	FR 或 CDR	小鼠 14H3 VL (SEQ ID NO:244)	IGKV2-28*01 & IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)	ABC66914VL_hFwrk (SEQ ID NO:256)	Hu14H3VLv1 (SEQ ID NO:250)	Hu14H3VLv2 (SEQ ID NO:251)
19	19	Fr1	A	A	A	A	A
20	20	Fr1	S	S	S	S	S
21	21	Fr1	I	I	I	I	I
22	22	Fr1	S	S	S	S	S
23	23	Fr1	C	C	C	C	C
24	24	CDR-L1	R	R	R	R	R
25	25	CDR-L1	S	S	S	S	S
26	26	CDR-L1	S	S	S	S	S
27	27	CDR-L1	Q	Q	Q	Q	Q
27A	28	CDR-L1	S	S	S	S	S
27B	29	CDR-L1	L	L	L	L	L
27C	30	CDR-L1	V	L	L	V	V
27D	31	CDR-L1	H	H	H	H	H
27E	32	CDR-L1	S	S	S	S	S
27F		CDR-L1	-	-	-	-	-
28	33	CDR-L1	N	N	N	N	N
29	34	CDR-L1	G	G	G	G	G
30	35	CDR-L1	N	Y	Y	N	N
31	36	CDR-L1	T	N	N	T	T
32	37	CDR-L1	F	Y	Y	F	F

[1207]

Kabat 残基号	线性残基号	FR 或 CDR	小鼠 14H3 VL (SEQ ID NO:244)	IGKV2-28*01 & IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)	ABC66914VL_hFwrk (SEQ ID NO:256)	Hu14H3VLv1 (SEQ ID NO:250)	Hu14H3VLv2 (SEQ ID NO:251)
33	38	CDR-L1	L	L	L	L	L
34	39	CDR-L1	H	D	D	H	H
35	40	Fr2	W	W	W	W	W
36	41	Fr2	Y	Y	Y	Y	Y
37	42	Fr2	L	L	L	L	Q
38	43	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
39	44	Fr2	K	K	K	K	K
40	45	Fr2	P	P	P	P	P
41	46	Fr2	G	G	G	G	G
42	47	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
43	48	Fr2	S	S	S	S	S
44	49	Fr2	P	P	P	P	P
45	50	Fr2	K	Q	Q	Q	Q
46	51	Fr2	L	L	L	L	L
47	52	Fr2	L	L	L	L	L
48	53	Fr2	I	I	I	I	I
49	54	Fr2	Y	Y	Y	Y	Y
50	55	CDR-L2	K	L	L	K	K
51	56	CDR-L2	V	G	G	V	V
52	57	CDR-L2	S	S	S	S	S

[1208]

Kabat 残基号	线性残基号	FR 或 CDR	小鼠 14H3 VL (SEQ ID NO:244)	IGKV2-28*01 & IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)	ABC66914VL_hFwrk (SEQ ID NO:256)	Hu14H3VLv1 (SEQ ID NO:250)	Hu14H3VLv2 (SEQ ID NO:251)
53	58	CDR-L2	N	N	N	N	N
54	59	CDR-L2	R	R	R	R	R
55	60	CDR-L2	F	A	A	F	F
56	61	CDR-L2	S	S	S	S	S
57	62	Fr3	G	G	G	G	G
58	63	Fr3	V	V	V	V	V
59	64	Fr3	P	P	P	P	P
60	65	Fr3	D	D	D	D	D
61	66	Fr3	R	R	R	R	R
62	67	Fr3	F	F	F	F	F
63	68	Fr3	S	S	S	S	S
64	69	Fr3	G	G	G	G	G
65	70	Fr3	S	S	S	S	S
66	71	Fr3	G	G	G	G	G
67	72	Fr3	S	S	S	S	S
68	73	Fr3	G	G	G	G	G
69	74	Fr3	T	T	T	T	T
70	75	Fr3	D	D	D	D	D
71	76	Fr3	F	F	F	F	F
72	77	Fr3	T	T	T	T	T

[1209]

Kabat 残基号	线性残基号	FR 或 CDR	小鼠 14H3 VL (SEQ ID NO:244)	IGKV2-28*01 & IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)	ABC66914VL_hFwrk (SEQ ID NO:256)	Hu14H3VLv1 (SEQ ID NO:250)	Hu14H3VLv2 (SEQ ID NO:251)
73	78	Fr3	L	L	L	L	L
74	79	Fr3	K	K	K	K	K
75	80	Fr3	I	I	I	I	I
76	81	Fr3	S	S	S	S	S
77	82	Fr3	R	R	R	R	R
78	83	Fr3	V	V	V	V	V
79	84	Fr3	E	E	E	E	E
80	85	Fr3	A	A	A	A	A
81	86	Fr3	E	E	E	E	E
82	87	Fr3	D	D	D	D	D
83	88	Fr3	L	V	V	V	V
84	89	Fr3	G	G	G	G	G
85	90	Fr3	V	V	V	V	V
86	91	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
87	92	Fr3	F	Y	Y	F	F
88	93	Fr3	C	C	C	C	C
89	94	CDR-L3	S	M	M	S	S
90	95	CDR-L3	Q	Q	Q	Q	Q
91	96	CDR-L3	S	A	A	S	S
92	97	CDR-L3	T	L	L	T	T

[1210]

Kabat 残基号	线性残基号	FR 或 CDR	小鼠 14H3 VL (SEQ ID NO:244)	IGKV2-28*01 & IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)	ABC66914VL_hFwrk (SEQ ID NO:256)	Hu14H3VLv1 (SEQ ID NO:250)	Hu14H3VLv2 (SEQ ID NO:251)
93	98	CDR-L3	L	Q	Q	L	L
94	99	CDR-L3	V	T	T	V	V
95	100	CDR-L3	P	P	P	P	P
95A		CDR-L3	-	-	L	-	-
95B		CDR-L3	-	-	T	-	-
95C		CDR-L3	-	-	-	-	-
95D		CDR-L3	-	-	-	-	-
95E		CDR-L3	-	-	-	-	-
95F		CDR-L3	-	-	-	-	-
96	101	CDR-L3	W	Y	L	W	W
97	102	CDR-L3	T	T	T	T	T
98	103	Fr4	F	F	F	F	F
99	104	Fr4	G	G	G	G	G
100	105	Fr4	G	Q	G	G	Q
101	106	Fr4	G	G	G	G	G
102	107	Fr4	T	T	T	T	T
103	108	Fr4	K	K	K	K	K
104	109	Fr4	L	L	V	V	L
105	110	Fr4	E	E	E	E	E
106	111	Fr4	I	I	I	I	I

[1211]

Kabat 残基号	线性残基号	FR 或 CDR	小鼠 14H3 VL (SEQ ID NO:244)	IGKV2-28*01 & IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)	ABC66914VL_hFwrk (SEQ ID NO:256)	Hu14H3VLv1 (SEQ ID NO:250)	Hu14H3VLv2 (SEQ ID NO:251)
106 A		Fr4	-	-	-	-	-
107	112	Fr4	K	K	K	K	K

[1212]

表 47: 人源化 14H3 的 V _H 、V _L 回复突变和其他突变		
V _H 或 V _L 变体	V _H 或 V _L 外显子受体序列	受体框架(或 CDR)残基的变化(基于 Kabat/Chothia 复合物 CDR)
Hu14H3VHv1 (SEQ ID NO:248)	GenBank 登录号 QDJ57937VH hFrwk (SEQ ID NO:253) IGHV2-70*04 & IGHJ4*01 (SEQ ID NO:254)	H35B
Hu14H3VHv2 (SEQ ID NO:249)	GenBank 登录号 QDJ57937VH hFrwk (SEQ ID NO:253) IGHV2-70*04 & IGHJ4*01 (SEQ ID NO:254)	H35B、H108、H113
Hu14H3VLv1 (SEQ ID NO:250)	GenBank 登录号 ABC66914VL_hFwrk (SEQ ID NO:256)	L2、L87
Hu14H3VLv2 (SEQ ID NO:251)	GenBank 登录号 ABC66914VL_hFwrk (SEQ ID NO:256) IGKV2-28*01 & IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)	L2、L7、L37、L87、L100、L104

[1213] 表48:人源化14H3抗体的重链中的回复突变和其他突变的框架(或CDR)残基(基于Kabat/Chothia复合物CDR)的Kabat编号

[1214]

残基					
	QDJ57937VH hFrwk (SEQ ID NO:253)				
	IGHV2-70*04 & IGHJ4*01 (SEQ ID NO:254)				
	小鼠 14H3 VH (SEQ ID NO:240)				
	Hu14H3VHv1 (SEQ ID NO:248)				
	Hu14H3VHv2 (SEQ ID NO:249)				
H35B	S	S	G	S	S
H108	M	L	T	M	L
H113	L	S	S	L	S

[1215] 表49:人源化14H3抗体的轻链中的回复突变和其他突变的框架残基(基于Kabat/Chothia复合物CDR)的Kabat编号

[1216]

残基					
	ABC66914VL_hFrwk (SEQ ID NO:256)				
	IGKV2-28*01 & IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)				
	小鼠 14H3 VL (SEQ ID NO:x244)				
	Hu14H3VLv1 (SEQ ID NO:250)				
	Hu14H3VLv2 (SEQ ID NO:251)				
L2	I	I	V	V	V
L7	T	S	T	T	S
L37	L	L	L	L	Q
L87	Y	Y	F	F	F

[1217]

残基	ABC66914VL_hFwrk (SEQ ID NO:256)	IGKV2-28*01 & IGKJ2*01 (SEQ ID NO:37)	小鼠 14H3 VL (SEQ ID NO:x244)	Hu14H3VLv1 (SEQ ID NO:250)	Hu14H3VLv2 (SEQ ID NO:251)
L100	G	Q	G	G	Q
L104	V	L	L	V	L

[1218] 表50人源化14H3抗体的重链和轻链的人源性百分比

[1219]

V _H 或V _L 变体	人源性%
Hu14H3VHv1 (SEQ ID NO:248)	89.9%
Hu14H3VHv2 (SEQ ID NO:249)	89.9%
Hu14H3VLv1 (SEQ ID NO:250)	85.0%
Hu14H3VLv2 (SEQ ID NO:251)	85.0%

[1220] 在小鼠与人受体序列之间规范、微调或界面残基不同的位置是取代候选。规范/CDR相互作用残基的实例包括表46中的Kabat残基L2。微调残基的实例包括表46中的Kabat残基L2。界面/堆积 (VH+VL) 残基的实例包括表46中的Kabat残基L87。

[1221] 选择重链可变区中表45所示位置作为取代候选的理由如下。

[1222] 重链可变区

[1223] hu14H3VHv1

[1224] -由接枝到QDJ57937-VH的框架上的14H3-VH的CDR-H1、H2和H3环组成。另外,在CDR-H1中含有取代G35bS。

[1225] G35bS:是CDR残基的突变。基于该模型,预测H35b位置处的残基不会与抗原直接接触。人种系基因IGHV1-70*04&IGHJ4*01 (SEQ ID NO:254) 在此位置处具有Ser。L35bS是种系对齐突变。

[1226] hu14H3VHv2

[1227] -在定义Chothia规范类别的关键位置处恢复所有框架取代,是微调区的一部分,或定位到VH/VL结构域界面或有助于结构稳定性。hu14H3VHv2在下文列出的各个位置处掺入回复突变或取代,以评估这些位置对抗原结合亲和力和免疫原性的贡献。

[1228] -在定义Chothia规范类别的关键位置处恢复所有框架取代,是微调区的一部分,或定位到VH/VL结构域界面或有助于结构稳定性。hu14H3VHv2在下文列出的各个位置处掺入回复突变或取代,以评估这些位置对抗原结合亲和力和免疫原性的贡献。而且,掺入了用在给定位置最常见的残基进行的回复突变或取代。

[1229] M108L:是种系对齐突变。Leu位于人种系基因IGHV1-70*04&IGHJ4*01 (SEQ ID NO: 254)的此位置处。

[1230] L113S:是种系对齐突变。Ser位于人种系基因IGHV1-70*04&IGHJ4*01 (SEQ ID NO: 254)的此位置处。

[1231] 选择轻链可变区中表46所示位置作为取代候选的理由如下。

[1232] k轻链可变区

[1233] hu14H3VLv1

[1234] -由接枝到ABC66914VL的框架上的14H3-VL的CDR-L1、L2和L3环组成。另外, hu14H3VLv1还在定义Chothia规范类别的关键位置处恢复所有框架取代,是微调区的一部分,或定位到VH/VL结构域界面,有助于结构稳定性。

[1235] I2V:是Chothia规范结构残基的回复突变,以便保留规范结构。

[1236] Y87F:是VH/VL界面残基的回复突变,以便保留重链:轻链界面。

[1237] hu14H3VLv2

[1238] -在定义Chothia规范类别的关键位置处保留所有恢复的框架取代,是微调区的一部分,或定位到VH/VL域界面。另外, hu14H3VLv2掺入了用在给定位置最常见的残基进行的且增强抗体可开发性的回复突变或取代。未包含在hu14H3VLv1中的hu14H3VLv2中的突变是:

[1239] T7S:是种系对齐突变。Ser位于人种系基因IGKV2-28*01&IGKJ2*01 (SEQ ID NO: 37)的此位置处。

[1240] L37Q:此位置处的Leu具有免疫原性,因此将其替换为Gln以降低免疫原性。L37Q也是基于频率的突变。Gln是此位置最常见的残基。

[1241] G100Q:是种系对齐突变。Gln位于人种系基因IGKV2-28*01&IGKJ2*01 (SEQ ID NO: 37)的此位置处。

[1242] V104L:是种系对齐突变。Leu位于人种系基因IGKV2-28*01&IGKJ2*01 (SEQ ID NO: 37)的此位置处。

[1243] 基于这些人框架的设计是:

[1244] 重链可变区

```
>hu14H3VHv1
QVTLKESGPALVKPTQTLTLCTFSGFSLSTYGMGVSWIRQPPGKALEWLANIWWDDIK
YYNAALKSRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARNVDYWGQGTMVTVSL
```

[1245]

```
>hu14H3VHv2
QVTLKESGPALVKPTQTLTLCTFSGFSLSTYGMGVSWIRQPPGKALEWLANIWWDDIK
YYNAALKSRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARNVDYWGQGLTVTVSS
```

[1246] k轻链可变区

```
>hu14H3VL v1
DVVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHSNGNTFLHWYLQKPGQSPQLLIYKVS NRF
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCSQSTLVPWTFGGGTKVEIK
```

[1247]

```
>hu14H3VLv2
DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHSNGNTFLHWYQQKPGQSPQLLIYKVS NRF
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCSQSTLVPWTFGGGTKLEIK
```

[1248] 使用两阶段PCR方案生成人源化序列,其允许使用QuikChange定点诱变引入多个

突变、缺失和插入[Wang,W.和Malcolm,B.A. (1999) BioTechniques 26:680-682)。

[1249] 实施例13.小鼠9F5、小鼠10C12、小鼠12C4和小鼠2D11可防止原代神经元中的tau毒性

[1250] 如Pillot等人,1999;Kriem等人,2005;和Garcia等人,2010所述,来自胚胎第16-17天的皮质神经元自C57Bl6/J小鼠胎仔制备。简而言之,将解离的皮质细胞铺板(50,000个细胞/孔)在预先包被有1.5 μ g/mL聚鸟氨酸(Sigma)的48孔板中。将细胞在不含血清且补充有激素、蛋白质和盐的化学定义的达尔伯克氏改良伊格尔/F12培养基(Dulbecco's-modified Eagle's/F12medium)中培养。将培养物保持在35 $^{\circ}$ C的潮湿的6%CO₂气氛中。

[1251] 所有处理在第6至7天在体外(DIV)一式三份进行。将神经元与媒介物抑或人tau寡聚体(基于单体的最终浓度为1 μ M)在5个递增浓度的指定抗体存在下孵育24小时,最终体积为每孔140 μ L。

[1252] 孵育后,使用3-(4,5-二甲基-2-噻唑基)-2,5-二苯基-2H-溴化四唑(MTT),使用公布的方案(例如Mosmann等人,1983)测量神经元活力。将细胞在35 $^{\circ}$ C下与MTT孵育1h。为此,将MTT溶解在PBS中,浓度为5mg/mL。每孔添加14 μ L MTT溶液。孵育后,去除培养基,并用150 μ L DMSO裂解细胞10分钟并避光。甲瓚产物完全溶解后,在570nm处测定吸光度。将媒介物对照的活力定义为100%。数据表示为媒介物对照的活力的%。结果在表57和图16中示出。

[1253] 表57:使用9F5、10C12、2D11和12C4的MTT测定

所有值都是细胞活力(未用 tau 寡聚体处理的细胞对照的%) $\pm$ SD				
	9F5	10C12	2D11	12C4
抗体量(摩尔当量)				
[1254] 5	93.1 $\pm$ 1.5	86.8 $\pm$ 1.7	92.2 $\pm$ 1.1	81.1 $\pm$ 4.5
3	92.6 $\pm$ 3.4	69.2 $\pm$ 3	64 $\pm$ 3.6	78.7 $\pm$ 2.1
1	64.9 $\pm$ 4.5	56.4 $\pm$ 2.6	50.9 $\pm$ 2.4	62.3 $\pm$ 2.9
0.33	58 $\pm$ 2.6	51.3 $\pm$ 2.4	59.5 $\pm$ 2.3	53.2 $\pm$ 4.5
0.2	47.4 $\pm$ 1.6	47.1 $\pm$ 2.1	52.8 $\pm$ 1.1	48.6 $\pm$ 2.1
0	48.9 $\pm$ 2.8	48.9 $\pm$ 1.9	50.9 $\pm$ 2.6	50.9 $\pm$ 3.4

[1255] 所有四种抗体都展示出保护神经元免受tau诱导毒性的能力。注意到9F5展示出更高的效力,在相比其他抗体能够在更低的浓度下完全抑制毒性的能力。

[1256] 乳酸脱氢酶(LDH)释放是细胞死亡的指标。LDH减少表明细胞死亡减少,这是由tau内化减少引起的。为了测量乳酸脱氢酶(LDH)释放,将每个孔的培养基(110 μ L)转移到1.5mL Eppendorf管中,并替换为新鲜培养基用于MTT测定。将收集的培养基以800g离心5分钟,将上清液(100 μ L无细胞培养基)转移到48孔板中,储存在4 $^{\circ}$ C下并避光用于进一步分析。根据制造商的建议(细胞毒性检测试剂盒[LDH],Roche参考号11 644 793 001)对培养基中的LDH进行定量。结果在表58和图17中示出。

[1257] 表58:使用9F5、10C12、2D11和12C4的LDH测定

所有值都是释放的 LDH (未用 tau 寡聚体处理的细胞对照的%) ± SD				
	9F5	10C12	2D11	12C4
抗体量(摩尔当量)				
[1258] 5	91.4±5.1	95.1±3.9	115.4±4.5	108.2±5.2
3	95.9±2.9	101.1±5.8	109±3.8	109.9±8.2
1	116.0±2.6	109±1.1	131.1±3.3	123.7±7.5
0.33	151.5±5.9	128.6±7.6	147.7±5.3	151.9±7.1
0.2	155.4±3.8	140±2.7	177±3.0	153.4±10.3
0	158.1±4.5	145.1±3.9	159.4±7.8	160.1±4.1

[1259] 所有四种抗体都展示出保护神经元免受tau诱导毒性的能力。注意到9F5展示出更高的效力,在相比其他抗体能够在更低的浓度下完全抑制毒性的能力,甚至在最高添加浓度下将LDH释放降低至基线以下。

[1260] 参考文献

[1261] Pillot,T.,Drouet,B.,Queillé,S.,et al.,The nonfibrillar amyloid beta-peptide induces apoptotic neuronal cell death:involvement of its C-terminal fusogenic domain.J Neurochem.73(4):1626-34(1999) .

[1262] Kriem,B.,Sponne,I.,Fifre,A.,et al.,Cytosolic phospholipase A2 mediates neuronal apoptosis induced by soluble oligomers of the amyloid-beta peptide.FASEB J.19(1):85-7(2005) .

[1263] Garcia,P.,Youssef,I.,Utvik,J.K.,et al,Ciliary neurotrophic factor cell-based delivery prevents synaptic impairment and improves memory in mouse models of Alzheimer's disease.J Neurosci.30(22):7516-27(2010) .

[1264] Mosmann,T.,Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.J.Immunol.Methods.,65, 55-63(1983) .

[1265] 实施例14.小鼠9F5、小鼠10C12、小鼠14H3、小鼠17C12、小鼠2D11和小鼠12C4的表面等离子共振 (SPR) 分析

[1266] 通过将抗小鼠 (GE Lifesciences) 抗体固定在具有EDC/NHS的CM3芯片上,使用Biacore进行表面等离子共振 (SPR) 分析。然后将抗体捕获到抗小鼠表面上,达到等同水平。通过2次30秒注射10mM甘氨酸pH 1.7进行再生。在150秒的缔合阶段和300秒的解离阶段,使以3倍稀释的500至0.122nM范围内的各种浓度的重组人4R0N tau流过传感器。将数据减去不含测试抗体的不相关传感器以解释与制备的传感器表面的不相关结合,并减去流动相媒介物以解释测试抗体与抗小鼠捕获物的解离。然后使用全局1:1拟合利用机载评价软件分析数据。结果在表51中示出。所有抗体都展现出相似的结合动力学,彼此Kd值在200pM以内;动力学曲线以快速缔合和缓慢解离阶段为特征。

[1267] 表51:小鼠9F5、小鼠10C12、小鼠14H3、小鼠17C12、小鼠2D11和小鼠12C4的动力学参数

[1268]	抗体	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_d (M)
	9F5	6.39e+6	2.24e-3	3.50e-10

10C12	6.53e+6	2.45e-3	3.75e-10
14H3	7.60e+6	1.53e-3	2.02e-10
17C12	4.03e+6	1.94e-3	4.82e-10
2D11	6.93e+6	2.21e-3	3.18e-10
12C4	5.69e+6	2.06e-3	3.63e-10

[1269] 实施例15.小鼠9F5、小鼠10C12、小鼠14H3、小鼠17C12、小鼠2D11和小鼠12C4检测阿尔茨海默病患者样品中的tau:蛋白质印迹分析

[1270] 从一名健康对照(HC)和四名阿尔茨海默病(AD)患者的脑部获得新鲜冷冻的额叶皮质样品。将样品在10体积的含有蛋白酶抑制剂的RIPA缓冲液中均质化,并在4℃下以16,000x g离心15分钟。去除上清液以产生可溶性级分。将团块重悬于含有1%肌氨酸的1xPBS中并均质化。将肌氨酸匀浆在4℃下以100,000x g离心60分钟,并分离上清液和团块。将团块重悬于一体积的2%SDS中以产生不溶性级分。所得的可溶性和不溶性级分通过SDS-PAGE进行解析,并用0.5ug/mL的指定抗体进行免疫印迹,洗涤,并用与IRDye-800(LiCor)缀合的山羊抗小鼠二抗进行探测。洗涤后,使用LiCor扫描仪扫描印迹。结果在图18中示出。所有抗体都特异性地检测到AD患者的不溶性级分中所含的tau,并在可溶性级分中不同程度地检测到tau。

[1271] 实施例16.使用小鼠9F5、小鼠10C12、小鼠14H3、小鼠17C12、小鼠2D11和小鼠12C4对来自阿尔茨海默病患者的不溶性提取物进行免疫沉淀分析

[1272] 为了测试抗体捕获tau聚集体的能力,将来自一名阿尔茨海默病(AD)患者和一名正常对照的肌氨酸不溶性级分与指定的抗体一起孵育。然后将与山羊抗小鼠抗体(Life Technologies)缀合的磁珠添加到提取物/抗体混合物中以允许捕获抗体/抗原复合体。彻底洗涤磁珠,在含有DTT的SDS-PAGE运行缓冲液中煮沸,然后去除磁珠。所得级分通过SDS-PAGE解析,并用多克隆抗体K9JA进行免疫印迹以检测所有免疫捕获的tau物质。结果在图19中示出。交替泳道是来自正常和AD组织提取物的免疫沉淀物。分子量标记物在左侧指示。所有抗体都不同程度地捕获到来自AD患者的不溶性tau,并证明了捕获大的不溶性高质量聚集体的能力。在测试的抗体中,9F5、2D11、17C12、10C12和12C4展现出相似的特征,在50-60kDa范围内以及积层凝胶中具有很强的免疫反应性。14H3捕获也导致了相似的但数量较少的tau物质。这些数据指示所有测试的抗体都能够结合相似的tau形式阵列。

[1273] 实施例17.人源化9F5变体承受搅动应力的能力

[1274] 测试了9F5人源化变体的可开发性特征,以确定它们承受由搅动应力诱导的聚集的能力。将抗体的缓冲液交换为1mg/mL的组氨酸缓冲液(25mM组氨酸,pH 6),并在室温下以1500rpm搅动48h。在0、24和48h取出样品,通过0.22微米过滤器过滤并通过分析尺寸排阻色谱(SEC)进行分析。对于每一抗体,将每个时间点的主峰总面积针对t=0h时的主峰面积归一化,并且基于抗体随时间聚集所致的损失对抗体进行排序。结果在图20和表52中示出。图20中使用的9F5人源化变体的名称缩写如表52的第二列中所述。虽然不能将单点突变归因于引起对搅动应力的敏感性,但某些突变组合会导致缺乏抗性。值得注意的是,组合L27cG/L37G/M51G/L54R/L92I(DIM11)、L27cS/L37G/M51GL54T(DIM17)和L27cG/L37Q/M51G/L54R(DIM5)导致对搅动的敏感性增加,而组合(例如)L27cS/L37Q/M51G/L54R(DIM2)、L27cG/L37G/M51G/L54T(DIM14)和L27cG/L37G/M51G/L54R(DIM13)导致对搅动应力的抗性。这些结

果表明,在人源化变体中产生的特定残基组合将特别有可能经受住制造、处理和运输的严苛考验。

[1275] 表52:人源化9F5变体承受搅动应力的能力

[1276]

排序	9F5 人源化变体	单体 24 h 振荡 (%) t=0)	单体 48 h 振荡 (%) t=0)
1	DIM2 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM2 SEQ ID NO: 127/ SEQ ID NO: 133]	100.6	103.3
2	DIM14 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM14 SEQ ID NO: 127/ SEQ ID NO: 145]	100.1	107.1
3	DIM13 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM13 SEQ ID NO: 127/ SEQ ID NO: 144]	105.8	105.2
4	DIM7 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM7 SEQ ID NO: 127/ SEQ ID NO: 138]	102.3	105
5	DIM6 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM6 SEQ ID NO: 127/ SEQ ID NO:137]	98.8	104.6
6	DIM12 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM12 SEQ ID NO: 127/ SEQ ID NO: 143]	98.2	103.8

[1277]

7	DIM18 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM18 SEQ ID NO: 127 / SEQ ID NO: 149]	100.3	101.3
8	DIM30 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM30 SEQ ID NO: 127/ SEQ ID NO: 161]	100	101.2
9	DIM8 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM8 SEQ ID NO: 127/ SEQ ID NO: 139]	98.8	100.1
10	DIM28 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM28 SEQ ID NO: 127/ SEQ ID NO: 159]	97.1	99.5
11	DIM29 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM29 SEQ ID NO: 127/ SEQ ID NO:160]	97.2	98.2
12	DIM27 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM27 SEQ ID NO: 127/ SEQ ID NO: 158]	97.1	95.2
13	DIM5 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM5 SEQ ID NO: 127/ SEQ ID NO:136]	93.1	93.9
14	DIM17 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM17 SEQ ID NO: 127/ SEQ ID NO: 148]	97.1	91.6
15	H10L9-DIM11 [hu9F5VHv10/hu9F5VLv9_DIM11 SEQ ID NO: 128/ SEQ ID NO: 168]	96.6	85.8
16	DIM11 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM11 SEQ ID NO: 127 / SEQ ID NO: 142]	97.4	82.4

[1278] 实施例18. 人源化9F5变体承受低pH应力的能力

[1279] 测试了9F5人源化变体的可开发性特征,以确定它们承受低pH暴露的能力,这在制造的病毒灭活步骤中会遇到。将抗体的缓冲液交换为1mg/mL的醋酸盐缓冲液(10mM醋酸盐, pH 3)中,并在室温下孵育6h。在0、2和6h取出样品,通过0.22微米过滤器过滤并通过分析尺寸排阻色谱(SEC)进行分析。对于每一抗体,将每个时间点的主峰总面积针对t=0h时的主峰面积归一化,并且基于抗体随时间聚集所致的损失对抗体进行排序。结果在图21和表53中示出。图21中使用的9F5人源化变体的名称缩写如表53的第二列中所述。组合L27cG/L37G/M51G/L54R/L92I (DIM11)、L27cG/L37Q/M51G/L54R (DIM5) 和L27cG/L37G/M51G/L54T (DIM14) 导致对低pH应力的敏感性增加,如6h时的单体峰减少>5%单体峰所证实的,而组合(例如)L27cS/L37Q/M51G/L54R (DIM2)、L27cD/L37Q/M51G/L54R (DIM6) 和L27cG/L37G/M51G/L54R (DIM13) 导致对低pH应力的抗性。值得注意的是,包含突变L27cD导致低pH抗性变体

DIM18、DIM6和DIM7。这些结果表明,在人源化变体中产生的特定残基组合将特别有可能经受住制造的严苛考验,尤其是在纯化过程中通常包括的低pH孵育。

[1280] 表53:人源化9F5变体承受低pH暴露的能力

[1281]

排序	h9F5 变体	单体 2h pH 3 (% t=0)	单体 6h pH 3 (% t=0)
1	DIM6 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM6 SEQ ID NO: 127/ SEQ ID NO:137]	100.8	100.6
2	DIM2 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM2 SEQ ID NO: 127/ SEQ ID NO: 133]	100.6	99.6
3	DIM13 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_D]IM13 SEQ ID NO: 127/ SEQ ID NO: 144	97.4	99.3
4	DIM8 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM8 SEQ ID NO: 127/ SEQ ID NO: 139]	99.2	99.2
5	DIM7 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM7 SEQ ID NO: 127/ SEQ ID NO: 138]	99.6	98.9
6	DIM28 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM28 SEQ ID NO: 127/ SEQ ID NO: 159]	99.1	98.9
7	DIM17 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM17 SEQ ID NO: 127/ SEQ ID NO: 148]	96.5	97
8	DIM18 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM18 SEQ ID NO: 127 / SEQ ID NO: 149]	97.2	96.5

[1282]

9	DIM30 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM30 SEQ ID NO: 127/ SEQ ID NO: 161]	96.5	96.3
10	DIM11 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM11 SEQ ID NO: 127 / SEQ ID NO: 142]	93.6	94.5
11	DIM29 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM29 SEQ ID NO: 127/ SEQ ID NO:160]	94.0	93.6
12	DIM12 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM12 SEQ ID NO: 127/ SEQ ID NO: 143]	93.9	93.3
13	DIM14 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM14 SEQ ID NO: 127/ SEQ ID NO: 145]	93.5	89.6
14	DIM5 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM5 SEQ ID NO: 127/ SEQ ID NO:136]	93.6	89.2
15	H10L9-DIM11 [hu9F5VHv10/hu9F5VLv9_DIM11 SEQ ID NO: 128/ SEQ ID NO: 168]	93.2	83.3
16	DIM27 [hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM27 SEQ ID NO: 127/ SEQ ID NO: 158]	91.3	68.4

[1283] 实施例19.使用9F5变体进行PEG沉淀

[1284] 利用PEG沉淀确定不同的人源化9F5变体在模拟高浓度条件下聚集的相对倾向。将抗体的缓冲液交换为组氨酸缓冲液(25mM组氨酸,pH 6),并添加到含有指定量的PEG6000的微孔板中至最终蛋白质浓度为1mg/mL,并在室温下孵育1h。孵育后,在350nm的吸光度下测量浊度。结果在表59-60和图22中示出。

[1285] 表59 9F5变体DIM2、DIM13、DIM7、DIM6、DIM18、DIM8、DIM17和DIM28的PEG沉淀

[1286]

PEG6000%	DIM2	DIM13	DIM7	DIM6	DIM18	DIM8	DIM17	DIM28
25	0.7784	0.7944	0.8912	0.7688	0.901	0.8085	0.811	0.733
20	0.7904	0.8737	0.7454	0.8063	0.8743	0.9733	1.001	0.842
15	0.4729	0.5612	0.3895	0.5658	0.6362	0.6438	0.7885	0.4952
12	0.1578	0.1952	0.1563	0.2206	0.2022	0.1592	0.3472	0.1586

[1287]

10	0.1554	0.1582	0.1512	0.1541	0.1541	0.1538	0.1582	0.1583
8	0.1607	0.1546	0.15	0.15	0.1508	0.1506	0.1556	0.1591
6	0.1538	0.1519	0.1486	0.1564	0.1494	0.1502	0.1541	0.157
4	0.1526	0.1516	0.1526	0.1479	0.1462	0.1504	0.1513	0.1587
2	0.1495	0.1511	0.1523	0.148	0.1467	0.1478	0.1497	0.1518
0	0.1464	0.1481	0.1501	0.1458	0.1451	0.1471	0.1477	0.1496

[1288] 表60 9F5变体DIM29、DIM14、DIM30、DIM27、DIM11、H10L9DIM11、DIM5和DIM12的PEG沉淀

[1289]

PEG 6000 %	DIM29	DIM14	DIM30	DIM27	DIM11	H10L 9DIM 11	DIM5	DIM12
25	0.7422	0.8867	0.7759	0.8138	0.8785	0.7122	0.7042	0.7078
20	0.8623	1.0284	0.8549	0.732	0.8999	0.8663	0.8869	0.8767
15	0.4642	1.0377	0.598	0.1843	0.6288	0.5383	0.5228	0.6414
12	0.1564	0.8123	0.1752	0.1536	0.1802	0.1755	0.1652	0.2092
10	0.1539	0.3975	0.1545	0.1525	0.1522	0.1575	0.1548	0.159
8	0.1542	0.1564	0.1475	0.1532	0.1514	0.1535	0.1549	0.1572
6	0.1518	0.1505	0.1492	0.1497	0.1486	0.1503	0.157	0.1559
4	0.1494	0.1496	0.1483	0.1469	0.1484	0.149	0.1523	0.153
2	0.1475	0.1485	0.1473	0.1469	0.1485	0.1482	0.1507	0.1526
0	0.1482	0.1537	0.1499	0.148	0.1484	0.1465	0.1487	0.149

[1290] 表59-60和图22中使用的9F5人源化变体的名称缩写如表53的第二列中所述。按照诱导浊度发生的PEG6000浓度对抗体进行定性排序。DIM14[hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM14; SEQ ID NO:127/SEQ ID NO:145]和DIM17[hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM17; SEQ ID NO:127/SEQ ID NO:148]与大多数抗体相比,在较低PEG6000浓度下显示聚集,而DIM27[hu9F5VHv9/hu9F5VLv8_DIM27; SEQ ID NO:127/SEQ ID NO:158]与大多数抗体相比,在较高PEG6000浓度下显示聚集。组合L27cG/L37G/M51G/L54T/L92I (DIM14) 和L27cS/L37G/M51G/L54T (DIM17) 在递增浓度的PEG6000存在下导致溶解度降低,如浊度早期发生所证实的那样。相比之下,组合L37Q/M51G/L54R与位置L27c处原始亮氨酸的结合 (DIM27), 导致在递增量的PEG6000存在下溶解度增加。这些结果表明,在人源化变体中产生的特定残基组合将特别有可能经受住在临床使用通常所需的高浓度抗体下配制的考验。

[1291] 实施例20. 使用对照、小鼠2D11、小鼠9F5、小鼠12C4、小鼠14H3和小鼠17C12对人脑样品进行免疫组织化学分析。

[1292] 将新鲜冷冻的人脑样品嵌入OCT中,并使用低温恒温器切割以生成10 μ m切片。将切片在4 $^{\circ}$ C下使用10%中性缓冲福尔马林固定在载玻片上10分钟,并用葡萄糖氧化酶处理以阻断内源过氧化物酶。使用含有DAB色原(chromagen)和苏木精复染剂的BOND聚合物精制检测系统(Leica)利用指定的一抗对切片进行染色。然后将切片在一系列递增的乙醇浓度和二甲苯中脱水,之后加盖玻片。结果在图23A至图23F中示出。正如预期的那样,在两种测试浓度下,非免疫对照抗体与正常对照或阿尔茨海默病样品几乎没有结合。相比之下,抗MTBR抗体展示出与阿尔茨海默病中存在的病理特征(包括营养不良的神经突和神经原纤维缠结)的丰富结合。这种结合展现出剂量依赖性,抗体浓度越高,较强结合越明显。一部分抗体与正常对照切片几乎没有结合,特别是9F5、12C4和17C12。14H3和2D11展现出与正常对照组织的结合,指示出对这些样品中存在的tau的特异性的细微差异。对于14H3,与对照样品相比,对AD的选择性降低反映了免疫沉淀实验中检测到的免疫反应性差异,表明该抗体与正常形式的tau结合的程度大于2D11、9F5、12C4和17C12。

[1293] 实施例21. 示例性CDR

[1294] 本发明的抗体的示例性CDR在表54中。

[1295] 表54: 示例性CDR

[1296]

CDR 和定义	CDR 氨基酸序列	SEQ ID NO:	CDR 所在的示例性 VH 或 VL
Kabat/Chothia 复合物 CDR-H1	GFNIKDDYMN	8	小鼠 9F5 VH
Kabat CDR-H2	WIDPENGDTHEYASKFQG	9	小鼠 9F5 VH
Kabat CDR-H3	SNG	10	小鼠 9F5 VH

[1297]

CDR 和定义	CDR 氨基酸序列	SEQ ID NO:	CDR 所在的示例性 VH 或 VL
Kabat CDR-L1	RSSKSLHLSNGITYLY	12	小鼠 9F5 VL
Kabat CDR-L2	QMSNLAS	13	小鼠 9F5 VL
Kabat CDR-L3	AQNLELPLT	14	小鼠 9F5 VL
Kabat CDR-H1	DDYMN	40	小鼠 9F5 VH
Chothia CDR-H1	GFNIKDD	41	小鼠 9F5 VH
Chothia CDR-H2	DPENG	42	小鼠 9F5 VH
AbM CDR-H2	WIDPENGDT	43	小鼠 9F5 VH
Contact CDR-H1	KDDYMN	44	小鼠 9F5 VH
Contact CDR-H2	WIGWIDPENGDT	45	小鼠 9F5 VH
Contact CDR-H3	TTSN	46	小鼠 9F5 VH
Contact CDR-L1	ITYLYWY	47	小鼠 9F5 VL
Contact CDR-L2	LLIQMSNLA	48	小鼠 9F5 VL
Contact CDR-L3	AQNLELPL	49	小鼠 9F5 VL
Kabat-Chothia 复合物 CDR-H1	GFTIKDDYMN	50	hu9F5VHv4、 hu9F5VHv5 和 hu9F5VHv6
Kabat CDR-H2	WVDPEDGETEYASKFQG	51	hu9F5VHv5、 hu9F5VHv6 和 hu9F5VHv7
Kabat CDR-H2	WVDPENGDT EYASKFQG	52	hu9F5VHv8
Kabat CDR-L1	RSSKSLHLSNGITYLY	53	hu9F5VLv5 和 hu9F5VLv6
Kabat CDR-L1	RSSKSLHLSNGINYLY	54	hu9F5VLv7
Kabat CDR-L2	QGSNRAS	55	hu9F5VLv4、hu9F5VLv5、 hu9F5VLv6、 hu9F5VLv7，SEQ ID NO:133、135、136、137 、142、143、144、149 、158、159、163、164 、165、168、169

[1298]

CDR 和定义	CDR 氨基酸序列	SEQ ID NO:	CDR 所在的示例性 VH 或 VL
Kabat CDR-L1	RSSKSDLHSNGITYLY	172	hu9F5VLv2_L27bD , SEQ ID NO:71
Kabat CDR-L1	RSSKSTLHSNGITYLY	173	hu9F5VLv2_L27bT , SEQ ID NO:79
Kabat CDR-L1	RSSKSQLHSNGITYLY	174	hu9F5VLv2_L27bQ , SEQ ID NO:81
Kabat CDR-L1	RSSKSLDHSNGITYLY	175	hu9F5VLv2_L27cD , SEQ ID NO:63 ; hu9F5VLv8_DIM6, SEQ ID NO:137 ; hu9F5VLv8_DIM7, SEQ ID NO:138 ; 和 hu9F5VLv8_DIM18 , SEQ ID NO:149

[1299]

CDR 和定义	CDR 氨基酸序列	SEQ ID NO:	CDR 所在的示例性 VH 或 VL
Kabat CDR-L1	RSSKSLGHSNGITYLY	176	hu9F5VLv2_L27cG , SEQ ID NO:64 ; hu9F5VLv8_DIM5, SEQ ID NO:136 ; hu9F5VLv8_DIM8, SEQ ID NO:139 ; hu9F5VLv8_DIM9, SEQ ID NO:140 ; hu9F5VLv8_DIM11 , SEQ ID NO:142 ; hu9F5VLv8_DIM12 , SEQ ID NO:143 ; hu9F5VLv8_DIM13 , SEQ ID NO:144 ; hu9F5VLv8_DIM14 , SEQ ID NO:145 ; hu9F5VLv8_DIM15 , SEQ ID NO:146 ; hu9F5VLv8_DIM16 , SEQ ID NO:147 ; hu9F5VLv8_DIM23 , SEQ ID NO:154 ; hu9F5VLv8_DIM24 , SEQ ID NO:155 ; hu9F5VLv8_DIM25 , SEQ ID NO:156 ; hu9F5VLv9_DIM5, SEQ ID NO:165 ; hu9F5VLv9_DIM8, SEQ ID NO:166 ; hu9F5VLv9_DIM11 , SEQ ID NO:168 ; 和 hu9F5VLv9_DIM13 , SEQ ID NO:169

[1300]

CDR 和定义	CDR 氨基酸序列	SEQ ID NO:	CDR 所在的示例性 VH 或 VL
Kabat CDR-L1	RSSKSLSHSNGITYLY	177	hu9F5VLv2_L27cS , SEQ ID NO:65 ; hu9F5VLv8_DIM1, SEQ ID NO:132 ; hu9F5VLv8_DIM2, SEQ ID NO:133 ; hu9F5VLv8_DIM3, SEQ ID NO:134 ; hu9F5VLv8_DIM4, SEQ ID NO:135 ; hu9F5VLv8_DIM10 , SEQ ID NO:141 ; hu9F5VLv8_DIM17 , SEQ ID NO:148 ; hu9F5VLv8_DIM19 , SEQ ID NO:150 ; hu9F5VLv8_DIM20 , SEQ ID NO:151 ; hu9F5VLv8_DIM21 , SEQ ID NO:152 ; hu9F5VLv8_DIM22 , SEQ ID NO:153 ; hu9F5VLv8_DIM28 , SEQ ID NO:159 ; hu9F5VLv8_DIM29 , SEQ ID NO:160 ; hu9F5VLv8_DIM30 , SEQ I NO:161 ; hu9F5VLv9_DIM1, SEQ ID NO:162 ; hu9F5VLv9_DIM2, SEQ ID NO:163 ; hu9F5VLv9_DIM4, SEQ ID NO:164 ; hu9F5VLv9_DIM10 , SEQ ID NO:167 ; hu9F5VLv9_DIM19 , SEQ ID NO:170 ; 和 hu9F5VLv9_DIM20 , SEQ ID NO:171
Kabat CDR-L1	RSSKSLEHSNGITYLY	178	hu9F5VLv2_L27cE , SEQ ID NO:66

[1301]

CDR 和定义	CDR 氨基酸序列	SEQ ID NO:	CDR 所在的示例性 VH 或 VL
Kabat CDR-L1	RSSKSLTHSNGITYLY	179	hu9F5VLv2_L27cT , SEQ ID NO:69
Kabat CDR-L1	RSSKSLNHSNGITYLY	180	hu9F5VLv2_L27cN , SEQ ID NO:70
Kabat CDR-L1	RSSKSLAHSNGITYLY	181	hu9F5VLv2_L27cA , SEQ ID NO:74
Kabat CDR-L1	RSSKSLPHSNGITYLY	182	hu9F5VLv2_L27cP , SEQ ID NO:83
Kabat CDR-L1	RSSKSLIHSNGITYLY	183	hu9F5VLv8_DIM26 , SEQ ID NO:157
Kabat CDR-L1	RSSKSLLSHNGETYLY	184	hu9F5VLv2_I30E, SEQ ID NO:67
Kabat CDR-L1	RSSKSLLSHNGKTYLY	185	hu9F5VLv2_I30K, SEQ ID NO:68
Kabat CDR-L1	RSSKSLLSHNGGTYLY	186	hu9F5VLv2_I30G, SEQ ID NO:72
Kabat CDR-L1	RSSKSLLSHNGQTYLY	187	hu9F5VLv2_I30Q, SEQ ID NO:78
Kabat CDR-L1	RSSKSLLSHNGIGYLY	188	hu9F5VLv2_T31G, SEQ ID NO:80
Kabat CDR-L1	RSSKSLLSHNGITYNY	189	hu9F5VLv2_L33N, SEQ ID NO:73
Kabat CDR-L1	RSSKSLLSHNGITYTY	190	hu9F5VLv2_L33T, SEQ ID NO:75
Kabat CDR-L1	RSSKSLLSHNGITYSY	191	hu9F5VLv2_L33S, SEQ ID NO:76
Kabat CDR-L1	RSSKSLLSHNGITYRY	192	hu9F5VLv2_L33R, SEQ ID NO:77
Kabat CDR-L1	RSSKSLLSHNGITYGY	193	hu9F5VLv2_L33G, SEQ ID NO:82
Kabat CDR-L2	QESNLAS	194	hu9F5VLv2_M51E, SEQ ID NO:61
Kabat CDR-L2	QDSNLAS	195	hu9F5VLv2_M51D , SEQ ID NO:62
Kabat CDR-L2	QGSNLAS	196	hu9F5VLv8_DIM30 , SEQ ID NO:161
Kabat CDR-L2	QMSNRAS	197	hu9F5VLv8_DIM29 , SEQ ID NO:160
Kabat CDR-L2	QGSNGAS	198	hu9F5VLv8_DIM1, SEQ ID NO:132 ; 和 hu9F5VLv9_DIM1, SEQ ID NO:162

[1302]

CDR 和定义	CDR 氨基酸序列	SEQ ID NO:	CDR 所在的示例性 VH 或 VL
Kabat CDR-L2	QGSNTAS	199	hu9F5VLv8_DIM3, SEQ ID NO:134 ; hu9F5VLv8_DIM14 , SEQ ID NO:145 ; hu9F5VLv8_DIM15 , SEQ ID NO:146 ; hu9F5VLv8_DIM16 , SEQ ID NO:147 ; 和 hu9F5VLv8_DIM17 , SEQ ID NO:148
Kabat CDR-L2	QKSNRAS	200	hu9F5VLv8_DIM7, SEQ ID NO:138 ; hu9F5VLv8_DIM8, SEQ ID NO:139 ; 和 hu9F5VLv9_DIM8, SEQ ID NO:166
Kabat CDR-L2	QKSNGAS	201	hu9F5VLv8_DIM9, SEQ ID NO:140 ; hu9F5VLv8_DIM10 , SEQ ID NO:141 ; 和 hu9F5VLv9_DIM10 , SEQ ID NO:167
Kabat CDR-L2	QISNRAS	202	hu9F5VLv8_DIM19 , SEQ ID NO:150 ; 和 hu9F5VLv9_DIM19 , SEQ ID NO:170
Kabat CDR-L2	QISNGAS	203	hu9F5VLv8_DIM20 , SEQ ID NO:151 ; hu9F5VLv8_DIM21 , SEQ ID NO:152 ; 和 hu9F5VLv9_DIM20 , SEQ ID NO:171
Kabat CDR-L2	QESNRAS	204	hu9F5VLv8_DIM22 , SEQ ID NO:153 ; hu9F5VLv8_DIM24 , SEQ ID NO:155 ; hu9F5VLv8_DIM25 , SEQ ID NO:156 ; 和 hu9F5VLv8_DIM26 , SEQ ID NO:157
Kabat CDR-L2	QESNGAS	205	hu9F5VLv8_DIM23 , SEQ ID NO:154

[1303]

CDR 和定义	CDR 氨基酸序列	SEQ ID NO:	CDR 所在的示例性 VH 或 VL
Kabat CDR-L3	GQNLELPLT	206	hu9F5VLv2_A89G, SEQ ID NO:108
Kabat CDR-L3	AQNDELPLT	207	hu9F5VLv2_L92D, SEQ ID NO:100
Kabat CDR-L3	AQNEELPLT	208	hu9F5VLv2_L92E, SEQ ID NO:102
Kabat CDR-L3	AQNGELPLT	209	hu9F5VLv2_L92G, SEQ ID NO:103 ; hu9F5VLv8_DIM4, SEQ ID NO:135 ; hu9F5VLv8_DIM12 , SEQ ID NO:143 ; hu9F5VLv8_DIM15 , SEQ ID NO:146 ; hu9F5VLv8_DIM25 , SEQ ID NO:156 ; 和 hu9F5VLv9_DIM4, SEQ ID NO:164
Kabat CDR-L3	AQNQELPLT	210	hu9F5VLv2_L92Q, SEQ ID NO:104
Kabat CDR-L3	AQNTELPLT	211	hu9F5VLv2_L92T, SEQ ID NO:107

[1304]

CDR 和定义	CDR 氨基酸序列	SEQ ID NO:	CDR 所在的示例性 VH 或 VL
Kabat CDR-L3	AQNIELPLT	212	hu9F5VLv8_DIM1, SEQ ID NO:132 ; hu9F5VLv8_DIM2, SEQ ID NO:133 ; hu9F5VLv8_DIM3, SEQ ID NO:134 ; hu9F5VLv8_DIM5, SEQ ID NO:136 ; hu9F5VLv8_DIM6, SEQ ID NO:137 ; hu9F5VLv8_DIM7, SEQ ID NO:138 ; hu9F5VLv8_DIM8, SEQ ID NO:139 ; hu9F5VLv8_DIM9, SEQ ID NO 140 ; hu9F5VLv8_DIM10 , SEQ ID NO:141 ; hu9F5VLv8_DIM11 , SEQ ID NO:142 ; hu9F5VLv8_DIM14 , SEQ ID NO:145 ; hu9F5VLv8_DIM17 , SEQ ID NO:148 ; hu9F5VLv8_DIM18 , SEQ ID NO:149 ; hu9F5VLv8_DIM19 , SEQ ID NO:150 ; hu9F5VLv8_DIM20 , SEQ ID NO:151 ; hu9F5VLv8_DIM22 , SEQ ID NO:153 ; hu9F5VLv8_DIM23 , SEQ ID NO:154 ; hu9F5VLv8_DIM24 , SEQ ID NO:155 ; hu9F5VLv8_DIM27 , SEQ ID NO:158 ; hu9F5VLv8_DIM28 , SEQ ID NO:159 ; hu9F5VLv8_DIM29 , SEQ ID NO:160 ; hu9F5VLv8_DIM30 , SEQ ID NO:161 ; hu9F5VLv9_DIM1, SEQ ID NO:162 ; hu9F5VLv9_DIM2, SEO

324

[1305]

CDR 和定义	CDR 氨基酸序列	SEQ ID NO:	CDR 所在的示例性 VH 或 VL
Kabat CDR-L3	AQNLGLPLT	213	hu9F5VLv2_L93G, SEQ ID NO:105
Kabat CDR-H2	WIDPENGDTAYASKFQG	220	小鼠 12C4 VH
Kabat-Chothia 复合物 CDR-H1	AFNIKDDYMN	226	小鼠 17C12 VH
Kabat CDR-H2	WIDPENGDTKYASKFQG	227	小鼠 17C12 VH
Kabat CDR-L1	TSSQSLLHSNRKTYLH	229	小鼠 17C12 VL
Kabat CDR-L2	LVSKELES	230	小鼠 17C12 VL y
Kabat CDR-L3	LQTTHFPRT	231	小鼠 17C12 VL
Kabat-Chothia 复合物 CDR-H1	GFSLSTYGMGVG	241	小鼠 14H3 VH
Kabat CDR-H2	NIWWDDIKYYNAALKS	242	小鼠 14H3 VH
Kabat CDR-H3	NVDY	243	小鼠 14H3 VH
Kabat CDR-L1	RSSQSLVHSNGNTFLH	245	小鼠 14H3 VL
Kabat CDR-L2	KVSNRFS	246	小鼠 14H3 VL
Kabat CDR-L3	SQSTLVPWT	247	小鼠 14H3 VL
Contact CDR-H2	WIGWIDPENGDTA	258	小鼠 12C4 VH
Chothia CDR-H1	AFNIKDD	259	小鼠 17C12 VH
AbM CDR-H2	WIDPENGDTK	260	小鼠 17C12 VH
Contact CDR-H2	WIGWIDPENGDTK	261	小鼠 17C12 VH
Contact CDR-L1	KTYLHWL	262	小鼠 17C12 VL
Contact CDR-L2	LLIYLVSKLE	263	小鼠 17C12 VL
Contact CDR-L3	LQTTHFPR	264	小鼠 17C12 VL
Kabat CDR-H1	TYGMGVG	265	小鼠 14H3 VH
Chothia CDR-H1	GFSLSTYGM	266	小鼠 14H3 VH

[1306]

CDR 和定义	CDR 氨基酸序列	SEQ ID NO:	CDR 所在的示例性 VH 或 VL
Chothia CDR-H2	WWDDI	267	小鼠 14H3 VH
AbM CDR-H2	NIWWDDIKY	268	小鼠 14H3 VH
Contact CDR-H1	STYGMGVG	269	小鼠 14H3 VH
Contact CDR-H2	WLANIWWDDIKY	270	小鼠 14H3 VH
Contact CDR-H3	ARNVD	271	小鼠 14H3 VH
Contact CDR-L1	NTFLHWY	272	小鼠 14H3 VL
Contact CDR-L2	LLIYKVS NRF	273	小鼠 14H3 VL y
Contact CDR-L3	SQSTLVPW	274	小鼠 14H3 VL
Kabat-Chothia 复合物 CDR-H1	GFSLSTYGMGVS	275	hu14H3VHv1 和 hu14H3VHv2

序列表

P10636-8 (SEQ ID NO:1)

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPLQTP TEDGSE
EPGSETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAQPHTEIPEGTTAEEAGIGDTPSLEDE
AAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDK KAKGADGKTKIATPRGAAPP GQKGQANATRI PAK
TPPAPKTPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREP KKVAVVRTPPKSP
SSAKSRLQTAPVMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKD
NIKHVPGGGSVQIVYKPV DLSKVT SKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKI
GSLDNITHVPGGGNKKIETHK LTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGDTS PRHLSNV SST
GSIDMVDSPQLATLADEV SASLAKQGL

P10636-7 (SEQ ID NO:2)

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPLQTP TEDGSE
EPGSETSDAKSTPTAE AEEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDK KAKG
ADGKTKIATPRGAAPP GQKGQANATRI PAKTPPAPKTPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPG
TPGSRSRTPSLPTPPTREP KKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVMPDLKNVSKIGSTEN
LKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPV DLSKVT SKCGS
LNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHK LTFRENAK
AKTDHGAEIVYKSPVVSGDTS PRHLSNV SSTGSIDMVDSPQLATLADEV SASLAKQGL

[1307] P10636-6 (4RON 人 tau) (SEQ ID NO:3)

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLK AEEAGIGDTPSLE
DEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDK KAKGADGKTKIATPRGAAPP GQKGQANATRI PA
AKTPPAPKTPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREP KKVAVVRTPPK
SPSSAKSRLQTAPVMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGS
KDNIKHVPGGGSVQIVYKPV DLSKVT SKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQ
SKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHK LTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGDTS PRHLSNV
SSTGSIDMVDSPQLATLADEV SASLAKQGL

P10636-5 (SEQ ID NO:4)

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPLQTP TEDGSE
EPGSETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAQPHTEIPEGTTAEEAGIGDTPSLEDE
AAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDK KAKGADGKTKIATPRGAAPP GQKGQANATRI PAK
TPPAPKTPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREP KKVAVVRTPPKSP
SSAKSRLQTAPVMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIVYKPV DLSKVT SKCGSLG
NIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHK LTFRENAKAK
TDHGAEIVYKSPVVSGDTS PRHLSNV SSTGSIDMVDSPQLATLADEV SASLAKQGL

P10636-4 (SEQ ID NO:5)

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPLQTP TEDGSE
EPGSETSDAKSTPTAE AEEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDK KAKG
ADGKTKIATPRGAAPP GQKGQANATRI PAKTPPAPKTPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPG

TPGSRSRTPSLPTPPTREPCKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMPLDKNVSKIGSTEN
LKHQPGGGKVQIVYKPVLDLKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKI
GSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSAGDTSPRHLSNVSS
GSIDMVDSPLATLADEVSAASLAKQGL

P10636-2 (SEQ ID NO:6)

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKAEAEAGIGDTPSLE
DEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPQKGQANATRIP
AKTPPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREPCKVAVVRTPPK
SPSSAKSRLQTAPVPMPLDKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIVYKPVLDLKVTSKCGS
LGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAK
AKTDHGAEIVYKSPVVSAGDTSPRHLSNVSSGIDMVDSPLATLADEVSAASLAKQGL

SEQ ID NO:7:小鼠 9F5 抗体的重链可变区

>m9F5VH

EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDDYMNWVKQRP
ERGLEWIGWIDPENGDTHEYASKFQGKATMTADTSSNTAYLQFSSLT
SEDTAVYYCTTSNGWGQGTLLVTVST

[1308]

SEQ ID NO:8:小鼠 9F5 抗体的 Kabat/Chothia 复合物 CDR-H1

GFNIKDDYMN

SEQ ID NO:9:小鼠 9F5 抗体的 Kabat CDR-H2

WIDPENGDTHEYASKFQG

SEQ ID NO:10:小鼠 9F5 抗体的 Kabat CDR-H3

SNG

SEQ ID NO:11:小鼠 9F5 抗体的轻链可变区

>m9F5VL

DIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQ
KPGQSPQLLIYQMSNLASGVPRDFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVG

VYYCAQNLELPLTFGAGTKLELK

SEQ ID NO:12:小鼠 9F5 抗体的 Kabat CDR-L1

RSSKSLLHSNGITYLY

SEQ ID NO:13:小鼠 9F5 抗体的 Kabat CDR-L2

QMSNLAS

SEQ ID NO:14:小鼠 9F5 抗体的 Kabat CDR-L3

AQNLELPLT

SEQ ID NO:15:重链可变区 hu9F5VHv1

[1309] QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDDYMNWVKQRP
EQGLEWIGWIDPENGDEYASKFQGKATITADTSSNTAYLQLSSLT
SEDTAVYYCASSNGWGQGTTTLTVSS

SEQ ID NO:16:重链可变区 hu9F5VHv2

EVQLQQSGAELVKPGATVKISCTASGFNIKDDYMNWVKQRP
EQGLEWIGWIDPENGDEYASKFQGKATMTADTSTNTAYLQLSSL
TSEDTAVYYCTTSNGWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:17:重链可变区 hu9F5VHv3

EVQLQQSGAELVKPGATVKISCTASGFNIKDDYMNWVKQRP
EQGLEWIGWIDPENGDEYASKFQGRATMTADTSTNTAYLELSSLT
SEDTAVYYCTTSNGWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:18:重链可变区 hu9F5VHv4

EVQLQQSGAELVKPGATVKISCKASGFTIKDDYMNWVKQRP

EQGLEWIGWIDPENGDEYASKFQGRATMTADTSTNTAYLELSSL
RSEDTAVYYCTTSNGWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:19:重链可变区 hu9F5VHv5

EVQLQQSGAELVKPGATVKISCKASGFTIKDDYMNWVKQRP
EKGLEWIGWVDPEDGETEYASKFQGRATMTADTSTDYAYMELSS
LRSEDTAVYYCTTSNGWGQGTTLVTVSS

SEQ ID NO:20:重链可变区 hu9F5VHv6

EVQLQQSGAELVKPGATVKISCKASGFTIKDDYMNWVKQAP
EKGLEWMGWVDPEDGETEYASKFQGRATMTADTSTDYAYMELSS
LRSEDTAVYYCTTSNGWGQGTTLVTVSS

SEQ ID NO:21:重链可变区 hu9F5VHv7

[1310]

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGFNIKDDYMNWVRQAP
GKGLEWIGWVDPEDGETEYASKFQGRATMTADTSTDYAYMELSS
LRSEDTAVYYCTTSNGWGQGTTLVTVSS

SEQ ID NO:22:重链可变区 hu9F5VHv8

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGFNIKDDYMNWVRQAP
GKGLEWIGWVDPENGDEYASKFQGRATMTADTSTDYAYMELSS
LRSEDTAVYYCTTSNGWGQGTTLVTVSS

SEQ ID NO:23:轻链可变区 hu9F5VLv1

DIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQ
RPGQSPQLLIYQMSNLAGVPSNRFSSTGSGTDFTLRISRVEAEDVG
VYYCAQNLELPLTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO:24:轻链可变区 hu9F5VLv2

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHLSNGITYLYWYLQR
PGQSPQLLIYQMSNLA SGVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGV
YYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:25:轻链可变区 hu9F5VLv3

DIVMTQSPFSNPVTPGESASISCRSSKSLHLSNGITYLYWYLQR
PGQSPQLLIYQMSNLA SGVPNRFSGSGTDFTLRISRVEAEDVGV
YYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:26:轻链可变区 hu9F5VLv4

DIVMTQSPFSLPVTPGESASISCRSSKSLHLSNGITYLYWYLQR
PGQSPQLLIYQGSNRA SGVPNRFSGSGTDFTLRISRVEAEDVGV
YYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

[1311] SEQ ID NO:27:轻链可变区 hu9F5VLv5

DIVMTQSPFSLPVTPGESASISCRSSKSLHLSNGYTYLYWYLQ
RPGQSPQLLIYQGSNRA SGVPNRFSGSGTDFTLRISRVEAEDVG
VYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:28:轻链可变区 hu9F5VLv6

DIVMTQSPFSLPVTPGESASISCRSSKSLHLSNGYTYLYWYLQ
RPGQSPQLLIYQGSNRA SGVPNRFSGSESGTDFTLRISRVEAEDVG
VYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:29:轻链可变区 hu9F5VLv7

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLHLSNGINYLYWYLQ
KPGQSPQLLIYQGSNRA SGVPDRFSGSGTDFTLKISRVEAEDVG
VYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:30:重链可变区结构模型 PDB.# 5OBF-VH_mSt

EVQLQQSGAELVEPGASVKLSCTGSGFNIVYYVHWLKQLT
EQGLEWIGRIDPENGETIYTPKFQDKATLTVDTSNTAYLQLSSLTS
EDAAVYYCVSSGYWGQGTTTLTVSS

SEQ ID NO:31: 重链可变区受体 GenBank 登录号
AAN16432-VH_huFrwk

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAP
GKGLEWMGGFDPEDGETIYAQKFQGRVTMTEDTSTDYMEISS
LRSEDTAVYYCAGYRSPMPTANKWGQGTLTVSS

SEQ ID NO:32:重链可变区受体 PDB # 2RCS-VH_huFrwk

[1312] QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDTYMHVVKQRP
EQGLEWIGRIDPANGNTKYDPKFQGKATITADTSNTAYLQLSSLT
SEDTAVYYCASYGIIYWGQGTTTLTVSS

SEQ ID NO:33:重链可变区种系序列 IMGT#IGHV1-69-2*01

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYMHVWVQQA
PGKGLEWMGLVPEDGETIYAEKFQGRVTITADTSTDYMEISS
LRSEDTAVYYCAT-Q--HWGQGTLTVSS

SEQ ID NO:34:轻链可变区结构模型 PDB # 5OBF-VL_mSt

DIVMTQSAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLHRNGITYLYWYLQ
KPGQPPQLLIYQMSNLASGVPDRFTSSGSGTDFTLKISRVEAEDVQ
VYYCAQNLELWTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO:35: 轻链可变区受体 GenBank 登录号
CAB51297-VL_huFrwk

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLSNGYNYLDWYLQ
KPGQSPQLLIYLGSNRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG
VYYCMQALQTPITFGGGTKVEIK

SEQ ID NO:36: 轻链可变区受体 GenBank 登录号
1911357B-VL_huFrwk

DIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSSKNLLHSNGITFLYWYLQ
RPGQSPQLLIYRVSNLASGVPNRFSGSESGTDFTLRISRVEAEDVG
VYYCAQLLELPYITFGGGTKLEIK

SEQ ID NO:37:轻链可变区种系序列 IMGT# IGKV2-28*01 &
IGKJ2*01

[1313] DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLSNGYNYLDWYLQ
KPGQSPQLLIYLGSNRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG
VYYCMQALQTPYITFGQGKLEIK

SEQ ID NO:38:编码小鼠 9F5 抗体的重链可变区的核酸序列

ATGAAATGCAGCTGGGTCATCTTCTCCTGATGGCAGTGGT
TATAGGGGTCAATTCAGAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCT
GAACTTGTGAGGCCAGGGGCCTCAGTCAAGTTGTCCTGCACAG
CTTCTGGCTTTAACATTAAAGACGACTATATGAACTGGGTGAAA
CAGAGACCTGAACGGGGCCTGGAGTGGATTGGATTGGATTGATC
CTGAGAATGGTGATACTGAATATGCCTCGAAGTTCCAGGGAAAG
GCCACTATGACTGCAGACACATCCTCCAACACAGCCTACCTGCA
GTTTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTACTGTA
CTACAAGTAACGGCTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTC
TACA

SEQ ID NO:39:编码小鼠 9F5 抗体的轻链可变区的核酸序列

ATGAGGTTCTCTGCTCAGCTTCTGGGGCTGCTTGTGCTCTG
GATCCCTGGATCCATTGCAGATATTGTGATGACGCAGGCTGCATT
CTCCAATCCAGTCACTCTTGGAACATCAGCTTCCATCTCCTGCA
GGTCTAGTAAGAGTCTCCTACATAGTAATGGCATCACTTATTTGT
ATTGGTATCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCTCAGCTCCTGATT
TATCAGATGTCCAACCTTGCCTCAGGAGTCCCAGACAGGTTTCAG
TAGCAGTGGGTCAGGAACTGATTTCACACTGAGAATCAGCAGA
GTGGAGGCTGAGGATGTGGGTGTTTATTACTGTGCTCAAAATCT
AGAACTTCCGCTCACGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTG
AAA

SEQ ID NO:40:小鼠 9F5 抗体的 Kabat CDR-H1

DDYMN

[1314]

SEQ ID NO:41:小鼠 9F5 抗体的 Chothia CDR-H1

GFNIKDD

SEQ ID NO:42:小鼠 9F5 抗体的 Chothia CDR-H2

DPENGD

SEQ ID NO:43:小鼠 9F5 抗体的 AbM CDR-H2

WIDPENGDTTE

SEQ ID NO:44:小鼠 9F5 抗体的 Contact CDR-H1

KDDYMN

SEQ ID NO:45:小鼠 9F5 抗体的 Contact CDR-H2

WIGWIDPENGDTTE

SEQ ID NO:46:小鼠 9F5 抗体的 Contact CDR-H3

TTSN

SEQ ID NO:47:小鼠 9F5 抗体的 Contact CDR-L1

ITYLYWY

SEQ ID NO:48:小鼠 9F5 抗体的 Contact CDR-L2

LLIQMSNLA

SEQ ID NO:49:小鼠 9F5 抗体的 Contact CDR-L3

AQNLELPL

[1315] SEQ ID NO:50:人源化 9F5 抗体的另选的 Kabat-Chothia 复合物
CDR-H1 (存在于 hu9F5VHv4、hu9F5VHv5 和 hu9F5VHv6 中)

GFTIKDDYMN

SEQ ID NO:51:人源化 9F5 抗体的另选的 Kabat CDR-H2 (存在于
hu9F5VHv5、hu9F5VHv6 和 hu9F5VHv7 中)

WVDPEDGETEYASKFQG

SEQ ID NO:52:人源化 9F5 抗体的另选的 Kabat CDR-H2 (存在于
hu9F5VHv8 中)

WVDPENGDT EYASKFQG

SEQ ID NO:53:人源化 9F5 抗体的另选的 Kabat CDR-L1 (存在于
hu9F5VLv5 和 hu9F5VLv6 中)

RSSKSLLHSNGYTYLY

SEQ ID NO:54:人源化 9F5 抗体的另选的 Kabat CDR-L1 (存在于 hu9F5VLv7 中)

RSSKSLHSHNGINYLY

SEQ ID NO:55:人源化 9F5 抗体的另选的 Kabat CDR-L2 (存在于 hu9F5VLv4、hu9F5VLv5、hu9F5VLv6、hu9F5VLv7, SEQ ID NO:133、135、136、137、142、143、144、149、158、159、163、164、165、168、169)中)

QGSNRAS

SEQ ID NO:56:抗体 9F5 的表位

(Q/E)IVYK(S/P)

[1316] SEQ ID NO:57:由抗体 9F5、10C12、2D11 和 17C12 结合的肽的共有基序

QIVYKP

SEQ ID NO:58:由抗体 9F5、10C12 和 17C12 结合的肽的共有基序

EIVYKSP

SEQ ID NO:59:接头

GSGSGSG

SEQ ID NO:60:HA 控制肽

YPYDVDPDYAG

SEQ ID NO:61:hu9F5VLv2 轻链可变区的变体(也称为

hu9F5VLv2_M51E)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHNSNGITYLYWYLQR
PGQSPQLLIYQESNLASGVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGV
YYCAQNLELPLTFGQGGTKLEIK

SEQ ID NO:62:hu9F5VLv2 轻链可变区的变体(也称为
hu9F5VLv2_M51D)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHNSNGITYLYWYLQ
RPGQSPQLLIYQDSNLASGVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVG
VYYCAQNLELPLTFGQGGTKLEIK

SEQ ID NO:63:hu9F5VLv2 轻链可变区的变体(也称为
hu9F5VLv2_L27cD)

[1317] DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLDHSNGITYLYWYLQ
RPGQSPQLLIYQMSNLASGVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVG
VYYCAQNLELPLTFGQGGTKLEIK

SEQ ID NO:64:hu9F5VLv2 轻链可变区的变体(也称为
hu9F5VLv2_L27cG)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLGHSNGITYLYWYLQ
RPGQSPQLLIYQMSNLASGVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVG
VYYCAQNLELPLTFGQGGTKLEIK

SEQ ID NO:65:hu9F5VLv2 轻链可变区的变体(也称为
hu9F5VLv2_L27cS)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLSHSNGITYLYWYLQ
RPGQSPQLLIYQMSNLASGVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVG
VYYCAQNLELPLTFGQGGTKLEIK

SEQ ID NO:66:hu9F5VLv2 轻链可变区的变体(也称为 hu9F5VLv2_L27cE)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLEHSNGITYLYWYLQ
RPGQSPQLLIYQMSNLAGVGNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVG
VYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:67:hu9F5VLv2 轻链可变区的变体(也称为 hu9F5VLv2_I30E)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHNSNGITYLYWYLQ
RPGQSPQLLIYQMSNLAGVGNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVG
VYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:68:hu9F5VLv2 轻链可变区的变体(也称为 hu9F5VLv2_I30K)

[1318]

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHNSNGKITYLYWYLQ
RPGQSPQLLIYQMSNLAGVGNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVG
VYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:69:hu9F5VLv2 轻链可变区的变体(也称为 hu9F5VLv2_L27cT)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLTHSNGITYLYWYLQ
RPGQSPQLLIYQMSNLAGVGNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVG
VYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:70:hu9F5VLv2 轻链可变区的变体(也称为 hu9F5VLv2_L27cN)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLNHSNGITYLYWYLQ
RPGQSPQLLIYQMSNLAGVGNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVG

VYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:71:hu9F5VLv2 轻链可变区的变体(也称为 hu9F5VLv2_L27bD)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSDLHSNGITYLYWYLQ
RPGQSPQLLIYQMSNLAGVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVG
VYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:72:hu9F5VLv2 轻链可变区的变体(也称为 hu9F5VLv2_I30G)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHSNGGTYLYWYLQ
RPGQSPQLLIYQMSNLAGVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVG
VYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

[1319] SEQ ID NO:73:hu9F5VLv2 轻链可变区的变体(也称为 hu9F5VLv2_L33N)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHSNGITYNYWYLQ
RPGQSPQLLIYQMSNLAGVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVG
VYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:74:hu9F5VLv2 轻链可变区的变体(也称为 hu9F5VLv2_L27cA)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLAHSNGITYLYWYLQ
RPGQSPQLLIYQMSNLAGVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVG
VYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:75:hu9F5VLv2 轻链可变区的变体(也称为 hu9F5VLv2_L33T)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHSNGITYTYWYLQ

RPGQSPQLLIYQMSNLAGVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVG
VYYCAQNLELPLTFGQGGTKLEIK

SEQ ID NO:76:hu9F5VLv2 轻链可变区的变体(也称为
hu9F5VLv2_L33S)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHSHNGITYSYWYLQ
RPGQSPQLLIYQMSNLAGVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVG
VYYCAQNLELPLTFGQGGTKLEIK

SEQ ID NO:77:hu9F5VLv2 轻链可变区的变体(也称为
hu9F5VLv2_L33R)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHSHNGITYRYWYLQ
RPGQSPQLLIYQMSNLAGVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVG
VYYCAQNLELPLTFGQGGTKLEIK

[1320]

SEQ ID NO:78:hu9F5VLv2 轻链可变区的变体(也称为
hu9F5VLv2_I30Q)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHSHNGQTYLYWYLQ
RPGQSPQLLIYQMSNLAGVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVG
VYYCAQNLELPLTFGQGGTKLEIK

SEQ ID NO:79:hu9F5VLv2 轻链可变区的变体(也称为
hu9F5VLv2_L27bT)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSTLHSHNGITYLYWYLQ
RPGQSPQLLIYQMSNLAGVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVG
VYYCAQNLELPLTFGQGGTKLEIK

SEQ ID NO:80:hu9F5VLv2 轻链可变区的变体(也称为
hu9F5VLv2_SEQ ID NO:146)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHNSNGIGYLYWYLQ
RPGQSPQLLIYQMSNLAGVVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVG
VYYCAQNLELPLTFGQGGTKLEIK

SEQ ID NO:81:hu9F5VLv2 轻链可变区的变体(也称为
hu9F5VLv2_L27bQ)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSQLHNSNGITYLYWYLQ
RPGQSPQLLIYQMSNLAGVVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVG
VYYCAQNLELPLTFGQGGTKLEIK

SEQ ID NO:82:hu9F5VLv2 轻链可变区的变体(也称为
hu9F5VLv2_L33G)

[1321] DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHNSNGITYGYWYLQ
RPGQSPQLLIYQMSNLAGVVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVG
VYYCAQNLELPLTFGQGGTKLEIK

SEQ ID NO:83:hu9F5VLv2 轻链可变区的变体(也称为
hu9F5VLv2_L27cP)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLPHSNGITYLYWYLQ
RPGQSPQLLIYQMSNLAGVVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVG
VYYCAQNLELPLTFGQGGTKLEIK

SEQ ID NO:84:hu9F5VLv2 轻链可变区的变体(也称为
hu9F5VLv2_V78R)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHNSNGITYLYWYLQ
RPGQSPQLLIYQMSNLAGVVPNRFSSSGSGTDFTLRISRREAEDVG
VYYCAQNLELPLTFGQGGTKLEIK

SEQ ID NO:85:hu9F5VLv2 轻链可变区的变体(也称为

hu9F5VLv2_I75D)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHNSNGITYLYWYLQ
RPGQSPQLLIYQMSNLAGVVPNRFSSSGSGTDFTLRDSRVEAEDV
GVYYCAQNLELPLTFGQGGTKLEIK

SEQ ID NO:86:hu9F5VLv2 轻链可变区的变体(也称为
hu9F5VLv2_V78D)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHNSNGITYLYWYLQ
RPGQSPQLLIYQMSNLAGVVPNRFSSSGSGTDFTLRISRDEAEDVG
VYYCAQNLELPLTFGQGGTKLEIK

SEQ ID NO:87:hu9F5VLv2 轻链可变区的变体(也称为
hu9F5VLv2_V78E)

[1322] DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHNSNGITYLYWYLQ
RPGQSPQLLIYQMSNLAGVVPNRFSSSGSGTDFTLRISREEAEDVG
VYYCAQNLELPLTFGQGGTKLEIK

SEQ ID NO:88:hu9F5VLv2 轻链可变区的变体(也称为
hu9F5VLv2_V78P)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHNSNGITYLYWYLQ
RPGQSPQLLIYQMSNLAGVVPNRFSSSGSGTDFTLRISRPEAEDVG
VYYCAQNLELPLTFGQGGTKLEIK

SEQ ID NO:89:hu9F5VLv2 轻链可变区的变体(也称为
hu9F5VLv2_V78K)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHNSNGITYLYWYLQ
RPGQSPQLLIYQMSNLAGVVPNRFSSSGSGTDFTLRISRKEAEDVG
VYYCAQNLELPLTFGQGGTKLEIK

SEQ ID NO:90:hu9F5VLv2 轻链可变区的变体(也称为 hu9F5VLv2_R77D)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHLSNGITYLYWYLQ
RPGQSPQLLIYQMSNLAGVGNRFSSSGSGTDFTLRISDVEAEDVG
VYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:91:hu9F5VLv2 轻链可变区的变体(也称为 hu9F5VLv2_V78G)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHLSNGITYLYWYLQ
RPGQSPQLLIYQMSNLAGVGNRFSSSGSGTDFTLRISRGEAEDVG
VYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:92:hu9F5VLv2 轻链可变区的变体(也称为 hu9F5VLv2_S76P)

[1323]

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHLSNGITYLYWYLQ
RPGQSPQLLIYQMSNLAGVGNRFSSSGSGTDFTLRIPRVEAEDVG
VYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:93:hu9F5VLv2 轻链可变区的变体(也称为 hu9F5VLv2_I75P)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHLSNGITYLYWYLQ
RPGQSPQLLIYQMSNLAGVGNRFSSSGSGTDFTLRPSRVEAEDVG
VYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:94:hu9F5VLv2 轻链可变区的变体(也称为 hu9F5VLv2_I75Q)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHLSNGITYLYWYLQR
PGQSPQLLIYQMSNLAGVGNRFSSSGSGTDFTLRQSRVEAEDVG

VYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:95:hu9F5VLv2 轻链可变区的变体(也称为 hu9F5VLv2_I75G)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHSHNGITYLYWYLQR
PGQSPQLLIYQMSNLAGVPSNRFSSTSGSGTDFTLRGSRVEAEDVG
VYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:96:hu9F5VLv2 轻链可变区的变体(也称为 hu9F5VLv2_L73P)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHSHNGITYLYWYLQR
PGQSPQLLIYQMSNLAGVPSNRFSSTSGSGTDFTLRISRVEAEDVGV
YYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

[1324] SEQ ID NO:97:hu9F5VLv2 轻链可变区的变体(也称为 hu9F5VLv2_L73G)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHSHNGITYLYWYLQR
PGQSPQLLIYQMSNLAGVPSNRFSSTSGSGTDFTGRISRVEAEDVGV
YYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:98:hu9F5VLv2 轻链可变区的变体(也称为 hu9F5VLv2_V78Q)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHSHNGITYLYWYLQ
RPGQSPQLLIYQMSNLAGVPSNRFSSTSGSGTDFTLRISRQEAEDVG
VYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:99:hu9F5VLv2 轻链可变区的变体(也称为 hu9F5VLv2_S76G)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHSHNGITYLYWYLQ

RPGQSPQLLIYQMSNLAGVPNRFSSSGSGTDFTLRIGRVEAEDVG
VYYCAQNLELPLTFGQGGTKLEIK

SEQ ID NO:100:hu9F5VLv2 轻链可变区的变体(也称为
hu9F5VLv2_L92D)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHSHNGITYLYWYLQR
PGQSPQLLIYQMSNLAGVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGV
YYCAQNDELPLTFGQGGTKLEIK

SEQ ID NO:101:hu9F5VLv2 轻链可变区的变体(也称为
hu9F5VLv2_Y86T)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHSHNGITYLYWYLQR
PGQSPQLLIYQMSNLAGVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGV
TYCAQNLELPLTFGQGGTKLEIK

[1325]

SEQ ID NO:102:hu9F5VLv2 轻链可变区的变体(也称为
hu9F5VLv2_L92E)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHSHNGITYLYWYLQR
PGQSPQLLIYQMSNLAGVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGV
YYCAQNEELPLTFGQGGTKLEIK

SEQ ID NO:103:hu9F5VLv2 轻链可变区的变体(也称为
hu9F5VLv2_L92G)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHSHNGITYLYWYLQR
PGQSPQLLIYQMSNLAGVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGV
YYCAQNGELPLTFGQGGTKLEIK

SEQ ID NO:104:hu9F5VLv2 轻链可变区的变体(也称为
hu9F5VLv2_L92Q)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQR
PGQSPQLLIYQMSNLA SGVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGV
YYCAQNQELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:105:hu9F5VLv2 轻链可变区的变体(也称为
hu9F5VLv2_L93G)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQR
PGQSPQLLIYQMSNLA SGVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGV
YYCAQNLEGPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:106:hu9F5VLv2 轻链可变区的变体(也称为
hu9F5VLv2_V85G)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQR
PGQSPQLLIYQMSNLA SGVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGG
YYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

[1326]

SEQ ID NO:107:hu9F5VLv2 轻链可变区的变体(也称为
hu9F5VLv2_L92T)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQR
PGQSPQLLIYQMSNLA SGVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGV
YYCAQNTELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:108:hu9F5VLv2 轻链可变区的变体(也称为
hu9F5VLv2_A89G)

DIVMTQSPFSNPVTPGTSASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQR
PGQSPQLLIYQMSNLA SGVPNRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGV
YYCGQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:109:hu9F5VHv4 重链可变区的变体(也称为

hu9F5VHv4_L80P)

EVQLQQSGAELVKPGATVKISCKASGFTIKDDYMNWVKQRP
EQGLEWIGWIDPENGDEYASKFQGRATMTADTSTNTAYPELSSL
RSED TAVYYCTTSNGWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:110:hu9F5VHv4 重链可变区的变体(也称为
hu9F5VHv4_L80D)

EVQLQQSGAELVKPGATVKISCKASGFTIKDDYMNWVKQRP
EQGLEWIGWIDPENGDEYASKFQGRATMTADTSTNTAYDELSS
LRSED TAVYYCTTSNGWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:111:hu9F5VHv4 重链可变区的变体(也称为
hu9F5VHv4_L82cG)

[1327]

EVQLQQSGAELVKPGATVKISCKASGFTIKDDYMNWVKQRP
EQGLEWIGWIDPENGDEYASKFQGRATMTADTSTNTAYLELSSG
RSED TAVYYCTTSNGWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:112:hu9F5VHv4 重链可变区的变体(也称为
hu9F5VHv4_L82cD)

EVQLQQSGAELVKPGATVKISCKASGFTIKDDYMNWVKQRP
EQGLEWIGWIDPENGDEYASKFQGRATMTADTSTNTAYLELSSD
RSED TAVYYCTTSNGWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:113:hu9F5VHv4 重链可变区的变体(也称为
hu9F5VHv4_L82P)

EVQLQQSGAELVKPGATVKISCKASGFTIKDDYMNWVKQRP
EQGLEWIGWIDPENGDEYASKFQGRATMTADTSTNTAYLEPSSL
RSED TAVYYCTTSNGWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:114:hu9F5VHv4 重链可变区的变体(也称为 hu9F5VHv4_L80G)

EVQLQQSGAELVKPGATVKISCKASGFTIKDDYMNWVKQRPEQG
LEWIGWIDPENGDTHEYASKFQGRATMTADTSTNTAYGELSSLRSE
DTAVYYCTTSNGWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:115:hu9F5VHv4 重链可变区的变体(也称为 hu9F5VHv4_L82K)

EVQLQQSGAELVKPGATVKISCKASGFTIKDDYMNWVKQRP
EQGLEWIGWIDPENGDTHEYASKFQGRATMTADTSTNTAYLEKSSL
RSED TAVYYCTTSNGWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:116:hu9F5VHv4 重链可变区的变体(也称为 hu9F5VHv4_L82R)

[1328] EVQLQQSGAELVKPGATVKISCKASGFTIKDDYMNWVKQRP
EQGLEWIGWIDPENGDTHEYASKFQGRATMTADTSTNTAYLERSSL
RSED TAVYYCTTSNGWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:117:hu9F5VHv4 重链可变区的变体(也称为 hu9F5VHv4_L82E)

EVQLQQSGAELVKPGATVKISCKASGFTIKDDYMNWVKQRP
EQGLEWIGWIDPENGDTHEYASKFQGRATMTADTSTNTAYLEESSL
RSED TAVYYCTTSNGWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:118:hu9F5VHv4 重链可变区的变体(也称为 hu9F5VHv4_L82N)

EVQLQQSGAELVKPGATVKISCKASGFTIKDDYMNWVKQRP
EQGLEWIGWIDPENGDTHEYASKFQGRATMTADTSTNTAYLENSL
RSED TAVYYCTTSNGWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:119:hu9F5VHv4 重链可变区的变体(也称为 hu9F5VHv4_Y79D)

EVQLQQSGAELVKPGATVKISCKASGFTIKDDYMNWVKQRP
EQGLEWIGWIDPENGDEYASKFQGRATMTADTSTNTADLELSSL
RSED TAVYYCTTSNGWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:120:hu9F5VHv4 重链可变区的变体(也称为 hu9F5VHv4_Y79N)

EVQLQQSGAELVKPGATVKISCKASGFTIKDDYMNWVKQRP
EQGLEWIGWIDPENGDEYASKFQGRATMTADTSTNTANLELSSL
RSED TAVYYCTTSNGWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:121:hu9F5VHv4 重链可变区的变体(也称为 hu9F5VHv4_Y79G)

[1329]

EVQLQQSGAELVKPGATVKISCKASGFTIKDDYMNWVKQRP
EQGLEWIGWIDPENGDEYASKFQGRATMTADTSTNTAGLELSSL
RSED TAVYYCTTSNGWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:122:hu9F5VHv5 重链可变区的变体(也称为 hu9F5VHv5_M80E)

EVQLQQSGAELVKPGATVKISCKASGFTIKDDYMNWVKQRP
EKGLEWIGWVDPEDGETEYASKFQGRATMTADTSTD TAYEELSS
LRSED TAVYYCTTSNGWGQGT LVTVSS

SEQ ID NO:123:hu9F5VHv4 重链可变区的变体(也称为 hu9F5VHv5_M80G)

EVQLQQSGAELVKPGATVKISCKASGFTIKDDYMNWVKQRP
EKGLEWIGWVDPEDGETEYASKFQGRATMTADTSTD TAYGELSS

LRSEDTAVYYCTTSNGWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:124:hu9F5VHv4 重链可变区的变体(也称为 hu9F5VHv4_L82cS)

EVQLQQSGAELVKPGATVKISCKASGFTIKDDYMNWVKQRP
EQGLEWIGWIDPENGDTHEYASKFQGRATMTADTSTNTAYLELSSS
RSEDTAVYYCTTSNGWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:125:hu9F5VHv4 重链可变区的变体(也称为 hu9F5VHv4_Y79Q)

EVQLQQSGAELVKPGATVKISCKASGFTIKDDYMNWVKQRP
EQGLEWIGWIDPENGDTHEYASKFQGRATMTADTSTNTAQLELSSL
RSEDTAVYYCTTSNGWGQGTTVTVSS

[1330]

SEQ ID NO:126:hu9F5VHv4 重链可变区的变体(也称为 hu9F5VHv4_S82aG)

EVQLQQSGAELVKPGATVKISCKASGFTIKDDYMNWVKQRP
EQGLEWIGWIDPENGDTHEYASKFQGRATMTADTSTNTAYLELGSL
RSEDTAVYYCTTSNGWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:127:重链可变区 hu9F5VHv9

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGFNIKDDYMNWVQQRP
GKGLEWIGWIDPENGDTHEYASKFQGRATMTADTSTNTAYMELSSL
RSEDTAVYYCTTSNGWGQGTTLVTVSS

SEQ ID NO:128:重链可变区 hu9F5VHv10 (也称为 hu9F5VHv9_Q38K_G42E)

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGFNIKDDYMNWVKQRP
EKGLEWIGWIDPENGDTHEYASKFQGRATMTADTSTNTAYMELSSL

RSEDTAVYYCTTSNGWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:129:重链可变区 hu9F5VHv10_L82cG

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGFNIKDDYMNWVKQRP
EKGLEWIGWIDPENGDTHEYASKFQGRATMTADTSTNTAYMELSSG
RSEDTAVYYCTTSNGWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:130:轻链可变区 hu9F5VLv8

DIVMTQSPFSLPVTPGESASISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQK
PGQSPQLLIYQMSNLAGVGNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV
YYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:131:轻链可变区 hu9F5VLv9 (也称为
hu9F5VLv8_N60D)

[1331] DIVMTQSPFSLPVTPGESASISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQK
PGQSPQLLIYQMSNLAGVGNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV
YYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:132:hu9F5VLv8 轻链可变区的变体
(hu9F5VLv8_V3Q、L27cS、L37Q、M51G、L54G、L92I, 也称为
hu9F5VLv8_DIM1)

DIQMTQSPFSLPVTPGESASISCRSSKSLSHSNGITYLYWYQQK
PGQSPQLLIYQGSNGASGVGNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV
YYCAQNIELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:133:hu9F5VLv8 轻链可变区的变体
(hu9F5VLv8_V3Q、L27cS、L37Q、M51G、L54R、L92I, 也称为
hu9F5VLv8_DIM2)

DIQMTQSPFSLPVTPGESASISCRSSKSLSHSNGITYLYWYQQK

PGQSPQLLIYQGSNRASGVPNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV
YYCAQNIELPLTFGQGKLEIK

SEQ ID NO:134:hu9F5VLv8 轻链可变区的变体
(hu9F5VLv8_V3Q、L27cS、L37Q、M51G、L54T、L92I, 也称为
hu9F5VLv8_DIM3)

DIQMTQSPFSLPVTPGESASISCRSSKSLSHSNGITYLYWYQQK
PGQSPQLLIYQGSNTASGVPNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV
YYCAQNIELPLTFGQGKLEIK

SEQ ID NO:135:hu9F5VLv8 轻链可变区的变体
(hu9F5VLv8_V3Q、L27cS、L37Q、M51G、L54R、L92G, 也称为
hu9F5VLv8_DIM4)

[1332] DIQMTQSPFSLPVTPGESASISCRSSKSLSHSNGITYLYWYQQK
PGQSPQLLIYQGSNRASGVPNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV
YYCAQNGELPLTFGQGKLEIK

SEQ ID NO:136:hu9F5VLv8 轻链可变区的变体
(hu9F5VLv8_V3Q、L27cG、L37Q、M51G、L54R、L92I, 也称为
hu9F5VLv8_DIM5)

DIQMTQSPFSLPVTPGESASISCRSSKSLGHSNGITYLYWYQQ
KPGQSPQLLIYQGSNRASGVPNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVG
VYYCAQNIELPLTFGQGKLEIK

SEQ ID NO:137:hu9F5VLv8 轻链可变区的变体
(hu9F5VLv8_V3Q、L27cD、L37Q、M51G、L54R、L92I, 也称为
hu9F5VLv8_DIM6)

DIQMTQSPFSLPVTPGESASISCRSSKSLDHSNGITYLYWYQQ
KPGQSPQLLIYQGSNRASGVPNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVG

VYYCAQNIELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:138:hu9F5VLv8 轻链可变区的变体
(hu9F5VLv8_V3Q、L27cD、L37Q、M51K、L54R、L92I, 也称为
hu9F5VLv8_DIM7)

DIQMTQSPFSLPVTPGESASISCRSSKSLDHSNGITYLYWYQQ
KPGQSPQLLIYQKSNRASGVNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVG
VYYCAQNIELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:139:hu9F5VLv8 轻链可变区的变体
(hu9F5VLv8_V3Q、L27cG、L37Q、M51K、L54R、L92I, 也称为
hu9F5VLv8_DIM8)

DIQMTQSPFSLPVTPGESASISCRSSKSLGHSNGITYLYWYQQ
KPGQSPQLLIYQKSNRASGVNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVG
VYYCAQNIELPLTFGQGTKLEIK

[1333]

SEQ ID NO:140:hu9F5VLv8 轻链可变区的变体
(hu9F5VLv8_V3Q、L27cG、L37Q、M51K、L54G、L92I, 也称为
hu9F5VLv8_DIM9)

DIQMTQSPFSLPVTPGESASISCRSSKSLGHSNGITYLYWYQQ
KPGQSPQLLIYQKSNGASGVNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVG
VYYCAQNIELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:141:hu9F5VLv8 轻链可变区的变体
(hu9F5VLv8_V3Q、L27cS、L37Q、M51K、L54G、L92I, 也称为
hu9F5VLv8_DIM10)

DIQMTQSPFSLPVTPGESASISCRSSKSLSHSNGITYLYWYQQK
PGQSPQLLIYQKSNGASGVNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV
YYCAQNIELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:142:hu9F5VLv8 轻链可变区的变体
(hu9F5VLv8_V3Q、L27cG、L37G、M51G、L54R、L92I, 也称为
hu9F5VLv8_DIM11)

DIQMTQSPFSLPVTPGESASISCRSSKSLGHSNGITYLYWYGQ
KPGQSPQLLIYQGSNRASGVPNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVG
VYYCAQNIELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:143:hu9F5VLv8 轻链可变区的变体
(hu9F5VLv8_V3Q、L27cG、L37G、M51G、L54R、L92G, 也称为
hu9F5VLv8_DIM12)

DIQMTQSPFSLPVTPGESASISCRSSKSLGHSNGITYLYWYGQ
KPGQSPQLLIYQGSNRASGVPNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVG
VYYCAQNGELPLTFGQGTKLEIK

[1334] SEQ ID NO:144:hu9F5VLv8 轻链可变区的变体
(hu9F5VLv8_V3Q、L27cG、L37G、M51G、L54R, 也称为
hu9F5VLv8_DIM13)

DIQMTQSPFSLPVTPGESASISCRSSKSLGHSNGITYLYWYGQ
KPGQSPQLLIYQGSNRASGVPNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVG
VYYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:145:hu9F5VLv8 轻链可变区的变体
(hu9F5VLv8_V3Q、L27cG、L37G、M51G、L54T、L92I, 也称为
hu9F5VLv8_DIM14)

DIQMTQSPFSLPVTPGESASISCRSSKSLGHSNGITYLYWYGQ
KPGQSPQLLIYQGSNTASGVPNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVG
VYYCAQNIELPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:146:hu9F5VLv8 轻链可变区的变体

(hu9F5VLv8_V3Q、L27cG、L37G、M51G、L54T、L92G，也称为 hu9F5VLv8_DIM15)

DIQMTQSPFSLPVTPGESASISCRSSKSLGHSNGITYLYWYGQ
KPGQSPQLLIYQGSNTASGVNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV
VYYCAQNGELPLTFGQGGTKLEIK

SEQ ID NO:147:hu9F5VLv8 轻链可变区的变体
(hu9F5VLv8_V3Q、L27cG、L37G、M51G、L54T，也称为 hu9F5VLv8_DIM16)

DIQMTQSPFSLPVTPGESASISCRSSKSLGHSNGITYLYWYGQ
KPGQSPQLLIYQGSNTASGVNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV
VYYCAQNLELPLTFGQGGTKLEIK

[1335] SEQ ID NO:148:hu9F5VLv8 轻链可变区的变体
(hu9F5VLv8_V3Q、L27cS、L37G、M51G、L54T、L92I，也称为 hu9F5VLv8_DIM17)

DIQMTQSPFSLPVTPGESASISCRSSKSLSHSNGITYLYWYGQK
PGQSPQLLIYQGSNTASGVNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV
YYCAQNIELPLTFGQGGTKLEIK

SEQ ID NO:149:hu9F5VLv8 轻链可变区的变体
(hu9F5VLv8_V3Q、L27cD、L37G、M51G、L54R、L92I，也称为 hu9F5VLv8_DIM18)

DIQMTQSPFSLPVTPGESASISCRSSKSLDHSNGITYLYWYGQ
KPGQSPQLLIYQGSNRASGVNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV
VYYCAQNIELPLTFGQGGTKLEIK

SEQ ID NO:150:hu9F5VLv8 轻链可变区的变体
(hu9F5VLv8_V3Q、L27cS、L37I、M51I、L54R、L92I，也称为

hu9F5VLv8_DIM19)

DIQMTQSPFSLPVTPGESASISCRSSKSLSHSNGITYLYWYIQK
PGQSPQLLIYQISNRASGVNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY
YCAQNIELPLTFGQGGTKLEIK

SEQ ID NO:151:hu9F5VLv8 轻链可变区的变体
(hu9F5VLv8_V3Q、L27cS、L37Q、M51I、L54G、L92I, 也称为
hu9F5VLv8_DIM20)

DIQMTQSPFSLPVTPGESASISCRSSKSLSHSNGITYLYWYQQK
PGQSPQLLIYQISNGASGVNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY
YCAQNIELPLTFGQGGTKLEIK

[1336] SEQ ID NO:152:hu9F5VLv8 轻链可变区的变体
(hu9F5VLv8_V3Q、L27cS、L37Q、M51I、L54G, 也称为
hu9F5VLv8_DIM21)

DIQMTQSPFSLPVTPGESASISCRSSKSLSHSNGITYLYWYQQK
PGQSPQLLIYQISNGASGVNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY
YCAQNLELPLTFGQGGTKLEIK

SEQ ID NO:153:hu9F5VLv8 轻链可变区的变体
(hu9F5VLv8_V3Q、L27cS、L37Q、M51E、L54R、L92I, 也称为
hu9F5VLv8_DIM22)

DIQMTQSPFSLPVTPGESASISCRSSKSLSHSNGITYLYWYQQK
PGQSPQLLIYQESNRASGVNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV
YYCAQNIELPLTFGQGGTKLEIK

SEQ ID NO:154:hu9F5VLv8 轻链可变区的变体
(hu9F5VLv8_V3Q、L27cG、L37Q、M51E、L54G、L92I, 也称为
hu9F5VLv8_DIM23)

DIQMTQSPFSLPVTPGESASISCRSSKSLGHSNGITYLYWYQQ
KPGQSPQLLIYQESNGASGVPNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVIG
VYYCAQNIELPLTFGQGGTKLEIK

SEQ ID NO:155:hu9F5VLv8 轻链可变区的变体
(hu9F5VLv8_V3Q、L27cG、L37I、M51E、L54R、L92I，也称为
hu9F5VLv8_DIM24)

DIQMTQSPFSLPVTPGESASISCRSSKSLGHSNGITYLYWYIQQ
PGQSPQLLIYQESNRASGVPNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV
YYCAQNIELPLTFGQGGTKLEIK

SEQ ID NO:156:hu9F5VLv8 轻链可变区的变体
(hu9F5VLv8_V3Q、L27cG、L37I、M51E、L54R、L92G，也称为
hu9F5VLv8_DIM25)

[1337] DIQMTQSPFSLPVTPGESASISCRSSKSLGHSNGITYLYWYIQQ
PGQSPQLLIYQESNRASGVPNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV
YYCAQNGELPLTFGQGGTKLEIK

SEQ ID NO:157:hu9F5VLv8 轻链可变区的变体
(hu9F5VLv8_V3Q、L27cI、L37I、M51E、L54R，也称为
hu9F5VLv8_DIM26)

DIQMTQSPFSLPVTPGESASISCRSSKSLIHSNGITYLYWYIQQP
GQSPQLLIYQESNRASGVPNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY
YCAQNLELPLTFGQGGTKLEIK

SEQ ID NO:158:hu9F5VLv8 轻链可变区的变体
(hu9F5VLv8_V3Q、L37Q、M51G、L54R、L92I，也称为
hu9F5VLv8_DIM27)

DIQMTQSPFSLPVTPGESASISCRSSKSLHHSNGITYLYWYQQ

KPGQSPQLLIYQGSNRASGVPNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV
VYYCAQNIELPLTFGQGKLEIK

SEQ ID NO:159:hu9F5VLv8 轻链可变区的变体
(hu9F5VLv8_V3Q、L27cS、M51G、L54R、L92I, 也称为
hu9F5VLv8_DIM28)

DIQMTQSPFSLPVTPGESASISCRSSKSLSHSNGITYLYWYLQK
PGQSPQLLIYQGSNRASGVPNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV
YYCAQNIELPLTFGQGKLEIK

SEQ ID NO:160:hu9F5VLv8 轻链可变区的变体
(hu9F5VLv8_V3Q、L27cS、L37Q、L54R、L92I, 也称为
hu9F5VLv8_DIM29)

[1338] DIQMTQSPFSLPVTPGESASISCRSSKSLSHSNGITYLYWYQQK
PGQSPQLLIYQMSNRASGVPNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV
YYCAQNIELPLTFGQGKLEIK

SEQ ID NO:161:hu9F5VLv8 轻链可变区的变体
(hu9F5VLv8_V3Q、L27cS、L37Q、M51G、L92I, 也称为
hu9F5VLv8_DIM30)

DIQMTQSPFSLPVTPGESASISCRSSKSLSHSNGITYLYWYQQK
PGQSPQLLIYQGSNLAGVPNRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV
YYCAQNIELPLTFGQGKLEIK

SEQ ID NO:162:hu9F5VLv9 轻链可变区的变体
(hu9F5VLv9_V3Q、L27cS、L37Q、M51G、L54G、L92I, 也称为
hu9F5VLv9_DIM1)

DIQMTQSPFSLPVTPGESASISCRSSKSLSHSNGITYLYWYQQK
PGQSPQLLIYQGSNGASGVNDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV

YYCAQNIELPLTFGQGKLEIK

SEQ ID NO:163:hu9F5VLv9 轻链可变区的变体
(hu9F5VLv9_V3Q、L27cS、L37Q、M51G、L54R、L92I, 也称为
hu9F5VLv9_DIM2)

DIQMTQSPFSLPVTPGESASISCRSSKSLSHSNGITYLYWYQQK
PGQSPQLLIYQGSNRASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV
YYCAQNIELPLTFGQGKLEIK

SEQ ID NO:164:hu9F5VLv9 轻链可变区的变体
(hu9F5VLv9_V3Q、L27cS、L37Q、M51G、L54R、L92G, 也称为
hu9F5VLv9_DIM4)

DIQMTQSPFSLPVTPGESASISCRSSKSLSHSNGITYLYWYQQK
PGQSPQLLIYQGSNRASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV
YYCAQNGELPLTFGQGKLEIK

[1339]

SEQ ID NO:165:hu9F5VLv9 轻链可变区的变体
(hu9F5VLv9_V3Q、L27cG、L37Q、M51G、L54R、L92I, 也称为
hu9F5VLv9_DIM5)

DIQMTQSPFSLPVTPGESASISCRSSKSLGHSNGITYLYWYQQ
KPGQSPQLLIYQGSNRASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVG
VYYCAQNIELPLTFGQGKLEIK

SEQ ID NO:166:hu9F5VLv9 轻链可变区的变体
(hu9F5VLv9_V3Q、L27cG、L37Q、M51K、L54R、L92I, 也称为
hu9F5VLv9_DIM8)

DIQMTQSPFSLPVTPGESASISCRSSKSLGHSNGITYLYWYQQ
KPGQSPQLLIYQKSNRASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVG
VYYCAQNIELPLTFGQGKLEIK

SEQ ID NO:167:hu9F5VLv9 轻链可变区的变体
(hu9F5VLv9_V3Q、L27cS、L37Q、M51K、L54G、L92I, 也称为
hu9F5VLv9_DIM10)

DIQMTQSPFSLPVTPGESASISCRSSKSLSHSNGITYLYWYQQK
PGQSPQLLIYQKSNGASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV
YYCAQNIELPLTFGQGGTKLEIK

SEQ ID NO:168:hu9F5VLv9 轻链可变区的变体
(hu9F5VLv9_V3Q、L27cG、L37G、M51G、L54R、L92I, 也称为
hu9F5VLv9_DIM11)

DIQMTQSPFSLPVTPGESASISCRSSKSLGHSNGITYLYWYGG
KPGQSPQLLIYQGSNRASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVG
VYYCAQNIELPLTFGQGGTKLEIK

[1340] SEQ ID NO:169:hu9F5VLv9 轻链可变区的变体
(hu9F5VLv9_V3Q、L27cG、L37G、M51G、L54R, 也称为
hu9F5VLv9_DIM13)

DIQMTQSPFSLPVTPGESASISCRSSKSLGHSNGITYLYWYGG
KPGQSPQLLIYQGSNRASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVG
VYYCAQNLELPLTFGQGGTKLEIK

SEQ ID NO:170:hu9F5VLv9 轻链可变区的变体
(hu9F5VLv9_V3Q、L27cS、L37I、M51I、L54R、L92I, 也称为
hu9F5VLv9_DIM19)

DIQMTQSPFSLPVTPGESASISCRSSKSLSHSNGITYLYWYIQK
PGQSPQLLIYQISNRASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY
YCAQNIELPLTFGQGGTKLEIK

SEQ ID NO:171:hu9F5VLv9 轻链可变区的变体

(hu9F5VLv9_V3Q、L27cS、L37Q、M51I、L54G、L92I，也称为 hu9F5VLv9_DIM20)

DIQMTQSPFSLPVTPGESASISCRSSKSLSHSNGITYLYWYQQK
PGQSPQLLIYQISNGASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY
YCAQNIELPLTFGQGGTKLEIK

SEQ ID NO:172 人源化 9F5 抗体的另选的 Kabat CDR-L1 (L27bD)
(存在于 hu9F5VLv2_L27bD，SEQ ID NO:71 中)

RSSKSDLHSNGITYLY

SEQ ID NO:173 人源化 9F5 抗体的另选的 Kabat CDR-L1 (L27bT)
(存在于 hu9F5VLv2_L27bT，SEQ ID NO:79 中)

RSSKSTLHSNGITYLY

[1341] SEQ ID NO:174 人源化 9F5 抗体的另选的 Kabat CDR-L1 (L27bQ)
(存在于 hu9F5VLv2_L27bQ，SEQ ID NO:81 中)

RSSKSQLHSNGITYLY

SEQ ID NO:175 人源化 9F5 抗体的另选的 Kabat CDR-L1 (L27cD)
(存在于 hu9F5VLv2_L27cD，SEQ ID NO:63 中；存在于 hu9F5VLv8_DIM6，SEQ ID NO:137 中；存在于 hu9F5VLv8_DIM7，SEQ ID NO:138 中，且存在于 hu9F5VLv8_DIM18，SEQ ID NO:149 中)

RSSKSLDHSNGITYLY

SEQ ID NO:176 人源化 9F5 抗体的另选的 Kabat CDR-L1 (L27cG)
(存在于 hu9F5VLv2_L27cG，SEQ ID NO:64 中；存在于 hu9F5VLv8_DIM5，SEQ ID NO:136 中；存在于 hu9F5VLv8_DIM8，SEQ ID NO:139 中；存在于 hu9F5VLv8_DIM9，SEQ ID NO:140 中；

存在于 hu9F5VLv8_DIM11, SEQ ID NO:142 中; 存在于 hu9F5VLv8_DIM12, SEQ ID NO:143 中; 存在于 hu9F5VLv8_DIM13, SEQ ID NO:144 中; 存在于 hu9F5VLv8_DIM14, SEQ ID NO:145 中; 存在于 hu9F5VLv8_DIM15, SEQ ID NO:146 中; 存在于 hu9F5VLv8_DIM16, SEQ ID NO:147 中; 存在于 hu9F5VLv8_DIM23, SEQ ID NO:154 中; 存在于 hu9F5VLv8_DIM24, SEQ ID NO:155 中; 存在于 hu9F5VLv8_DIM25, SEQ ID NO:156 中; 存在于 hu9F5VLv9_DIM5, SEQ ID NO:165 中; 存在于 hu9F5VLv9_DIM8, SEQ ID NO:166 中; 存在于 hu9F5VLv9_DIM11, SEQ ID NO:168 中; 且存在于 hu9F5VLv9_DIM13, SEQ ID NO:169 中)

RSSKSLGHSNGITYLY

[1342] SEQ ID NO:177 人源化 9F5 抗体的另选的 Kabat CDR-L1 (L27cS) (存在于 hu9F5VLv2_L27cS, SEQ ID NO:65 中; 存在于 hu9F5VLv8_DIM1, SEQ ID NO:132 中; 存在于 hu9F5VLv8_DIM2, SEQ ID NO:133 中; 存在于 hu9F5VLv8_DIM3, SEQ ID NO:134 中; 存在于 hu9F5VLv8_DIM4, SEQ ID NO:135 中; 存在于 hu9F5VLv8_DIM10, SEQ ID NO:141 中; 存在于 hu9F5VLv8_DIM17, SEQ ID NO:148 中; 存在于 hu9F5VLv8_DIM19, SEQ ID NO:150 中; 存在于 hu9F5VLv8_DIM20, SEQ ID NO:151 中; 存在于 hu9F5VLv8_DIM21, SEQ ID NO:152 中; 存在于 hu9F5VLv8_DIM22, SEQ ID NO:153 中; 存在于 hu9F5VLv8_DIM28, SEQ ID NO:159 中; 存在于 hu9F5VLv8_DIM29, SEQ ID NO:160 中; 存在于 hu9F5VLv8_DIM30, SEQ ID NO:161 中; 存在于 hu9F5VLv9_DIM1, SEQ ID NO:162 中; 存在于 hu9F5VLv9_DIM2, SEQ ID NO:163 中; 存在于 hu9F5VLv9_DIM4, SEQ ID NO:164 中; 存在于 hu9F5VLv9_DIM10, SEQ ID NO:167 中; 存在于 hu9F5VLv9_DIM19, SEQ ID NO:170 中, 且存在于 hu9F5VLv9_DIM20, SEQ ID NO:171 中)

RSSKSLSHSNGITYLY

SEQ ID NO:178 人源化 9F5 抗体的另选的 Kabat CDR-L1 (L27cE)
(存在于 hu9F5VLv2_L27cE, SEQ ID NO:66 中)

RSSKSLEHSNGITYLY

SEQ ID NO:179 人源化 9F5 抗体的另选的 Kabat CDR-L1 (L27cT)
(存在于 hu9F5VLv2_L27cT, SEQ ID NO:69 中)

RSSKSLTHSNGITYLY

SEQ ID NO:180 人源化 9F5 抗体的另选的 Kabat CDR-L1 (L27cN)
(存在于 hu9F5VLv2_L27cN, SEQ ID NO:70 中)

RSSKSLNHSNGITYLY

[1343] SEQ ID NO:181 人源化 9F5 抗体的另选的 Kabat CDR-L1 (L27cA)
(存在于 hu9F5VLv2_L27cA, SEQ ID NO:74 中)

RSSKSLAHSNGITYLY

SEQ ID NO:182 人源化 9F5 抗体的另选的 Kabat CDR-L1 (L27cP)
(存在于 hu9F5VLv2_L27cP, SEQ ID NO:83 中)

RSSKSLPHSNGITYLY

SEQ ID NO:183 人源化 9F5 抗体的另选的 Kabat CDR-L1 (L27cI)
(存在于 hu9F5VLv8_DIM26, SEQ ID NO:157 中)

RSSKSLIHSNGITYLY

SEQ ID NO:184 人源化 9F5 抗体的另选的 Kabat CDR-L1 (I30E)
(存在于 hu9F5VLv2_I30E, SEQ ID NO:67 中)

RSSKSLLHSNGETYLY

SEQ ID NO:185 人源化 9F5 抗体的另选的 Kabat CDR-L1 (I30K)
(存在于 hu9F5VLv2_I30K, SEQ ID NO:68 中)

RSSKSLLHSNGKTYLY

SEQ ID NO:186 人源化 9F5 抗体的另选的 Kabat CDR-L1 (I30G)
(存在于 hu9F5VLv2_I30G, SEQ ID NO:72 中)

RSSKSLLHSNGGTYLY

SEQ ID NO:187 人源化 9F5 抗体的另选的 Kabat CDR-L1 (I30Q)
(存在于 hu9F5VLv2_I30Q, SEQ ID NO:78 中)

RSSKSLLHSNGQTYLY

[1344] SEQ ID NO:188 人源化 9F5 抗体的另选的 Kabat CDR-L1 (T31G)
(存在于 hu9F5VLv2_T31G, SEQ ID NO:80 中)

RSSKSLLHSNGIGYLY

SEQ ID NO:189 人源化 9F5 抗体的另选的 Kabat CDR-L1 (L33N)
(存在于 hu9F5VLv2_L33N, SEQ ID NO:73 中)

RSSKSLLHSNGITYNY

SEQ ID NO:190 人源化 9F5 抗体的另选的 Kabat CDR-L1 (L33T)
(存在于 hu9F5VLv2_L33T, SEQ ID NO:75 中)

RSSKSLLHSNGITYTY

SEQ ID NO:191 人源化 9F5 抗体的另选的 Kabat CDR-L1 (L33S)
(存在于 hu9F5VLv2_L33S, SEQ ID NO:76 中)

RSSKSLLHSNGITYSY

SEQ ID NO:192 人源化 9F5 抗体的另选的 Kabat CDR-L1 (L33R)
(存在于 hu9F5VLv2_L33R, SEQ ID NO:77 中)

RSSKSLLHSNGITYRY

SEQ ID NO:193 人源化 9F5 抗体的另选的 Kabat CDR-L1 (L33G)
(存在于 hu9F5VLv2_L33G, SEQ ID NO:82 中)

RSSKSLLHSNGITYGY

SEQ ID NO:194 人源化 9F5 抗体的另选的 Kabat CDR-L2 (M51E)
(存在于 hu9F5VLv2_M51E, SEQ ID NO:61 中)

QESNLAS

[1345] SEQ ID NO:195 人源化 9F5 抗体的另选的 Kabat CDR-L2 (M51D)
(存在于 hu9F5VLv2_M51D, SEQ ID NO:62 中)

QDSNLAS

SEQ ID NO:196 人源化 9F5 抗体的另选的 Kabat CDR-L2 (M51G)
(存在于 hu9F5VLv8_DIM30, SEQ ID NO:161 中)

QGSNLAS

SEQ ID NO:197 人源化 9F5 抗体的另选的 Kabat CDR-L2 (L54R)
(存在于 hu9F5VLv8_DIM29, SEQ ID NO:160 中)

QMSNRAS

SEQ ID NO:198 人源化 9F5 抗体的另选的 Kabat CDR-L2 (M51G
L54G) (存在于 hu9F5VLv8_DIM1, SEQ ID NO:132 中, 且存在于
hu9F5VLv9_DIM1, SEQ ID NO:162 中)

QGSNGAS

SEQ ID NO:199 人源化 9F5 抗体的另选的 Kabat CDR-L2 (M51G L54T) (存在于 hu9F5VLv8_DIM3, SEQ ID NO:134 中; 存在于 hu9F5VLv8_DIM14, SEQ ID NO:145 中; 存在于 hu9F5VLv8_DIM15, SEQ ID NO:146 中; 存在于 hu9F5VLv8_DIM16, SEQ ID NO:147 中; 且存在于 hu9F5VLv8_DIM17, SEQ ID NO:148 中)

QGSNTAS

SEQ ID NO:200 人源化 9F5 抗体的另选的 Kabat CDR-L2 (M51K L54R) (存在于 hu9F5VLv8_DIM7, SEQ ID NO:138 中; 存在于 hu9F5VLv8_DIM8, SEQ ID NO:139 中; 且存在于 hu9F5VLv9_DIM8, SEQ ID NO:166 中)

QKSNRAS

[1346]

SEQ ID NO:201 人源化 9F5 抗体的另选的 Kabat CDR-L2 (M51K L54G) (存在于 hu9F5VLv8_DIM9, SEQ ID NO:140 中; 存在于 hu9F5VLv8_DIM10, SEQ ID NO:141 中; 且存在于 hu9F5VLv9_DIM10, SEQ ID NO:167 中)

QKSNGAS

SEQ ID NO:202 人源化 9F5 抗体的另选的 Kabat CDR-L2 (M51I L54R) (存在于 hu9F5VLv8_DIM19, SEQ ID NO:150 中, 且存在于 hu9F5VLv9_DIM19, SEQ ID NO:170 中)

QISNRAS

SEQ ID NO:203 人源化 9F5 抗体的另选的 Kabat CDR-L2 (M51I L54G) (存在于 hu9F5VLv8_DIM20, SEQ ID NO:151 中; 存在于 hu9F5VLv8_DIM21, SEQ ID NO:152 中; 且存在于

hu9F5VLv9_DIM20, SEQ ID NO:171 中)

QISNGAS

SEQ ID NO:204 人源化 9F5 抗体的另选的 Kabat CDR-L2 (M51E L54R) (存在于 hu9F5VLv8_DIM22, SEQ ID NO:153 中; 存在于 hu9F5VLv8_DIM24, SEQ ID NO:155 中; 存在于 hu9F5VLv8_DIM25, SEQ ID NO:156 中; 且存在于 hu9F5VLv8_DIM26, SEQ ID NO:157 中)

QESNRAS

SEQ ID NO:205 人源化 9F5 抗体的另选的 Kabat CDR-L2 (M51E L54G) (存在于 hu9F5VLv8_DIM23, SEQ ID NO:154 中)

QESNGAS

[1347] SEQ ID NO:206 人源化 9F5 抗体的另选的 Kabat CDR-L3 (A89G) (存在于 hu9F5VLv2_A89G, SEQ ID NO:108 中)

GQNLELPLT

SEQ ID NO:207 人源化 9F5 抗体的另选的 Kabat CDR-L3 (L92D) (存在于 hu9F5VLv2_L92D, SEQ ID NO:100 中)

AQNDELPLT

SEQ ID NO:208 人源化 9F5 抗体的另选的 Kabat CDR-L3 (L92E) (存在于 hu9F5VLv2_L92E, SEQ ID NO:102 中)

AQNEELPLT

SEQ ID NO:209 人源化 9F5 抗体的另选的 Kabat CDR-L3 (L92G) (存在于 hu9F5VLv2_L92G, SEQ ID NO:103 中; 存在于 hu9F5VLv8_DIM4, SEQ ID NO:135 中; 存在于 hu9F5VLv8_DIM12,

SEQ ID NO:143 中；存在于 hu9F5VLv8_DIM15，SEQ ID NO:146 中；存在于 hu9F5VLv8_DIM25，SEQ ID NO:156 中；且存在于 hu9F5VLv9_DIM4，SEQ ID NO:164 中)

AQNGELPLT

SEQ ID NO:210 人源化 9F5 抗体的另选的 Kabat CDR-L3 (L92Q) (存在于 hu9F5VLv2_L92Q，SEQ ID NO:104 中)

AQNQELPLT

SEQ ID NO:211 人源化 9F5 抗体的另选的 Kabat CDR-L3 (L92T) (存在于 hu9F5VLv2_L92T，SEQ ID NO:107 中)

AQNTLPLT

[1348] SEQ ID NO:212 人源化 9F5 抗体的另选的 Kabat CDR-L3 (L92I) (存在于 hu9F5VLv8_DIM1，SEQ ID NO:132 中；存在于 hu9F5VLv8_DIM2，SEQ ID NO:133 中；存在于 hu9F5VLv8_DIM3，SEQ ID NO:134 中；存在于 hu9F5VLv8_DIM5，SEQ ID NO:136 中；存在于 hu9F5VLv8_DIM6，SEQ ID NO:137 中；存在于 hu9F5VLv8_DIM7，SEQ ID NO:138 中；存在于 hu9F5VLv8_DIM8，SEQ ID NO:139 中；存在于 hu9F5VLv8_DIM9，SEQ ID NO 140；存在于 hu9F5VLv8_DIM10，SEQ ID NO:141 中；存在于 hu9F5VLv8_DIM11，SEQ ID NO:142 中；存在于 hu9F5VLv8_DIM14，SEQ ID NO:145 中；存在于 hu9F5VLv8_DIM17，SEQ ID NO:148 中；存在于 hu9F5VLv8_DIM18，SEQ ID NO:149 中；存在于 hu9F5VLv8_DIM19，SEQ ID NO:150 中；存在于 hu9F5VLv8_DIM20，SEQ ID NO:151 中；存在于 hu9F5VLv8_DIM22，SEQ ID NO:153 中；存在于 hu9F5VLv8_DIM23，SEQ ID NO:154 中；存在于 hu9F5VLv8_DIM24，SEQ ID NO:155 中；存在于 hu9F5VLv8_DIM27，SEQ ID NO:158 中；存在于 hu9F5VLv8_DIM28，SEQ ID NO:159 中；

存在于 hu9F5VLv8_DIM29, SEQ ID NO:160 中; 存在于 hu9F5VLv8_DIM30, SEQ ID NO:161 中; 存在于 hu9F5VLv9_DIM1, SEQ ID NO:162 中; 存在于 hu9F5VLv9_DIM2, SEQ ID NO:163 中; 存在于 hu9F5VLv9_DIM5, SEQ ID NO:165 中; 存在于 hu9F5VLv9_DIM8, SEQ ID NO:166 中; 存在于 hu9F5VLv9_DIM10, SEQ ID NO:167 中; 存在于 hu9F5VLv9_DIM11, SEQ ID NO:168 中; 存在于 hu9F5VLv9_DIM19, SEQ ID NO:170 中; 且存在于 hu9F5VLv9_DIM20, SEQ ID NO:171 中)

AQNIELPLT

SEQ ID NO:213 人源化 9F5 抗体的另选的 Kabat CDR-L3 (L93G) (存在于 hu9F5VLv2_L93G, SEQ ID NO:105 中)

AQNLGLPLT

[1349]

SEQ ID NO:214 重链可变区 hu10C12VHv1

QVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGFNIKDDYMNWVQQAP
GKGLEWIGWIDPENGDTHEYASKFQGRATMTADTSTD TAYMELSSL
RSED TAVYYCTTSNGWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:215 重链可变区 hu10C12VHv2

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGFNIKDDYMNWVQQAP
GKGLEWIGWIDPENGDTHEYASKFQGRATMTADTSTD TAYMELSSL
RSED TAVYYCTTSNGWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:216 轻链可变区 hu10C12VLv1

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQK
PGQSPQLLIYQMSNLA SGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV
YYCAQNLELPLTFGGG TKVEIK

SEQ ID NO:217 轻链可变区 hu10C12VLv2

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQK
PGQSPQLLIYQMSNLAGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV
YYCAQNLELPLTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO:218 重链可变区受体 CAC20421-VH_huFrwk

QVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYMHVWVQQA
PGKGLEWMGLVDPEDGETIYAEKFQGRVTITADTSTDYMEISS
LRSEDYAVYYCARIPFGRDHWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:219 小鼠 12C4 抗体的重链可变区

EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDDYMNWVRQRP
ERGLEWIGWIDPENGDTAYASKFQGKATMTADTSSNTAYLQFSSLT
SEDSAVYYCTTSNGWGQGTLVTVSA

[1350]

SEQ ID NO:220 小鼠 12C4 抗体的 Kabat CDR-H2

WIDPENGDTAYASKFQG

SEQ ID NO:221 重链可变区 hu12C4VHv1

QVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNKDDYMNWVQQAP
GKGLEWMGWIDPENGDTAYASKFQGRVTITADTSTDYMEISS
RSEDYAVYYCARSNGWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:222 重链可变区 hu12C4VHv2

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNKDDYMNWVQQAP
GKGLEWIGWIDPENGDTAYASKFQGRVTITADTSTDYMEISS
SEDYAVYYCTTSNGWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:223 轻链可变区 hu12C4VLv1

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQK
PGQSPQLLIYQMSNLA SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV
YYCAQNLELPLTFGGGGTKVEIK

SEQ ID NO:224 轻链可变区 hu12C4VLv2

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQK
PGQSPQLLIYQMSNLA SGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV
YYCAQNLELPLTFGGGGTKLEIK

SEQ ID NO:225 小鼠 17C12 抗体的重链可变区

KIQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASAFNIKDDYMNWVKQRP
ERGLEWIGWIDPENGDTKYASKFQGKATMTADTSSNTAYLQLSSL
TSED TAVYYCTTSNGWGQGT LTVSA

[1351] SEQ ID NO:226 小鼠 17C12 抗体的 Kabat/Chothia 复合物 CDR
H1

AFNIKDDYMN

SEQ ID NO:227 小鼠 17C12 抗体的 Kabat CDR H2

WIDPENGDTKYASKFQG

SEQ ID NO:228 小鼠 17C12 抗体的轻链可变区

DVVM TQTPLT LSVTIGQPASISCTSSQSLLHSNRKTYLHWLLQ
RPGQSPKLLIYLVSKLESGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGV
YYCLQTTHFPRTFGGGGTKLEIK

SEQ ID NO:229 小鼠 17C12 抗体的 Kabat CDR-L1

TSSQSLLHSNRKTYLH

SEQ ID NO:230 小鼠 17C12 抗体的 Kabat CDR-L2

LVSKLES

SEQ ID NO:231 小鼠 17C12 抗体的 Kabat CDR-L3

LQTTHFPRT

SEQ ID NO:232 重链可变区 hu17C12VHv1

QIQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASAFNIKDDYMNWVQQAP
GKGLEWIGWIDPENGDTKYASKFQGRATMTADTSTDYMEYSSLR
RSEDYAVYYCTTSNGWGQGTTVTVSR

SEQ ID NO:233 重链可变区 hu17C12VHv2

[1352] EVQLQQSGAELVKPGATVKISCTASGFNIKDDYMNWVKQRP
EQGLEWIGWIDPENGDTKEYASKFQGGKATMTADTSTNTAYLQLSSL
TSEDYAVYYCTTSNGWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:234 轻链可变区 hu17C12VLv1

DVVMQTQTPSLSVTPGQPASISCTSSQSLHLSNRKTYLHWLL
QKPGQPPQLLIYLVSKLESGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV
GVYYCLQTTHFPRTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO:235 轻链可变区 hu17C12VLv2

DVVMQTQTPSLSVTPGQPASISCTSSQSLHLSNRKTYLHWLL
QKPGQSPQLLIYLVSKLESGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV
GVYYCLQTTHFPRTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO:236 重链可变区结构模型 3PP3-VH_mSt

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYAFSYSWINWVRQAP

GQGLEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSL
RSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGT LVTVSS

SEQ ID NO:237 轻链可变区结构模型 3PP3-VL_mSt

DIVMTQTPLSLPVT PGEPASISCRSSKSL LHSNGITYLYWYLQK
PGQSPQLLIYQMSNLVSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV
YYCAQNLELPYTFGGG TKVEIK

SEQ ID NO:238 轻链可变区受体 QDO16713-VL_huFrwk

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLHSDGKTYLYWYLQ
KPGQPPQLLIYEVS NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG
VYYCMQSIQLPPTFGGG TKVEIK

SEQ ID NO:239 轻链可变区种系序列 IGKV2-29*02 & IGKJ4*01

[1353]

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLHSDGKTYLYWYLQ
KPGQSPQLLIYEVSSRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG
VYYCMQGIHLPLTFGGG TKVEIK

SEQ ID NO:240 小鼠 14H3 抗体的重链可变区

QVTLKESGPGILQPSQTL SLTCSFSGFSLSTYGMGVGWIRQPS
GKGLEWLANIWWDDIKYYNAALKSRLTISKDTSKNQVFLKIASV
DTADTATYYCARNVDYWGQGTT LTVSS

SEQ ID NO:241 小鼠 14H3 抗体的 Kabat/Chothia 复合物 CDR H1

GFSLSTYGMGVG

SEQ ID NO:242 小鼠 14H3 抗体的 Kabat CDR H2

NIWWDDIKYYNAALKS

SEQ ID NO:243 小鼠 14H3 抗体的 Kabat CDR H3

NVDY

SEQ ID NO:244 小鼠 m14H3 抗体的轻链可变区

DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTFLHWYL
QKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDL
GVYFCSQSTLVPWTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO:245 小鼠 14H3 抗体的 Kabat CDR L1

RSSQSLVHSNGNTFLH

SEQ ID NO:246 小鼠 14H3 抗体的 Kabat CDR L2

KVSNRFS

[1354]

SEQ ID NO:247 小鼠 14H3 抗体的 Kabat CDR L3

SQSTLVPWT

SEQ ID NO:248 重链可变区 hu14H3VHv1

QVTLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTYGMGVSWIRQPP
GKALEWLANIWWDDIKYYNAALKSRLTISKDTSKNQVVLTMNTN
MDPVDATATYYCARNVDYWGQGTMVTVSL

SEQ ID NO:249 重链可变区 hu14H3VHv2

QVTLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTYGMGVSWIRQPP
GKALEWLANIWWDDIKYYNAALKSRLTISKDTSKNQVVLTMNTN
MDPVDATATYYCARNVDYWGQGTLLTVSS

SEQ ID NO:250 轻链可变区 hu14H3VLv1

DVVMQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHSNGNTFLHWYLQ
KPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG
VYFCSQSTLVPWTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO:251 轻链可变区 hu14H3VLv2

DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHSNGNTFLHWYQ
QKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV
GVYFCSQSTLVPWTFGQGGTKLEIK

SEQ ID NO:252 重链可变区结构模型 2VQ1-VH_mSt

QITLEESGPGILQPSQTLTLTCSFSGFSLSSSAMSVDGQIRQPSG
KGLEWLAHIWWNDKYYNPALKSRLTVSKDSSDNQVFLKIASV
TADTATYYCARIPGFGFDYWGQGTTTLTVSS

[1355] SEQ ID NO:253 重链可变区受体 QDJ57937-VH_huFrwk

QVTLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMRVSWIRQPP
GKALEWLARIDWDDDKFYSTSLKTRLTISKDTSKNQVVLTMNTM
DPVDTATYYCARLAVADAFDIWGQGTMTVTVSL

SEQ ID NO:254 重链可变区种系序列 IGHV1-70*04 & IGHJ4*01

QVTLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMRVSWIRQPP
GKALEWLARIDWDDDKFYSTSLKTRLTISKDTSKNQVVLTMNTM
DPVDTATYYCARNDYWGQGTTLTVTVSS

SEQ ID NO:255 轻链可变区结构模型 2VQ1-VL_mSt

DVVMQTPLSLSVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTFLQWYL
QKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRMEAEDL
GIYFCSQTTHVPWTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO:256 轻链可变区受体 ABC66914-VL_huFrwk

DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQ
KPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG
VYYCMQALQTPLTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO:257 小鼠 12C4 抗体的 AbM CDR-H2

WIDPENGDTA

SEQ ID NO:258 小鼠 12C4 抗体的 Contact CDR-H2

WIGWIDPENGDTA

SEQ ID NO:259 小鼠 17C12 抗体的 Chothia CDR-H1

AFNIKDD

[1356]

SEQ ID NO:260 小鼠 17C12 抗体的 AbM CDR-H2

WIDPENGDTK

SEQ ID NO:261 小鼠 17C12 抗体的 Contact CDR-H2

WIGWIDPENGDTK

SEQ ID NO:262 小鼠 17C12 抗体的 Contact CDR-L1

KTYLHWL

SEQ ID NO:263 小鼠 17C12 抗体的 Contact CDR-L2

LLIYLVSKLE

SEQ ID NO:264 小鼠 17C12 抗体的 Contact CDR-L3

LQTTHFPR

SEQ ID NO:265 小鼠 14H3 抗体的 Kabat CDR-H1

TYGMGVG

SEQ ID NO:266 小鼠 14H3 抗体的 Chothia CDR-H1

GFSLSTYGM

SEQ ID NO:267 小鼠 14H3 抗体的 Chothia CDR-H2

WWDDI

SEQ ID NO:268 小鼠 14H3 抗体的 AbM CDR-H2

NIWWDDIKY

[1357] SEQ ID NO:269 小鼠 14H3 抗体的 Contact CDR-H1

STYGMGVG

SEQ ID NO:270 小鼠 14H3 抗体的 Contact CDR-H2

WLANIWWDDIKY

SEQ ID NO:271 小鼠 14H3 抗体的 Contact CDR-H3

ARNVD

SEQ ID NO:272 小鼠 14H3 抗体的 Contact CDR-L1

NTFLHWY

SEQ ID NO:273 小鼠 14H3 抗体的 Contact CDR-L2

LLIYKVS NRF

SEQ ID NO:274 小鼠 14H3 抗体的 Contact CDR-L3

SQSTLVPW

SEQ ID NO:275 另选的 Kabat-Chothia 复合物 CDR H1, 如在 hu14H3VHv1 和 hu14H3VHv2 中

GFSLSTYGMGVS

[1358]

SEQ ID NO:276 由抗体 9F5、10C12、2D11、12C4、17C12 和 14H3 结合的肽的共有基序

IVYK

SEQ ID NO:277 由抗体 2D11 结合的肽的共有基序

EIVYKS

小鼠9F5 VH	E V Q L Q Q S G A E L V R P G A S V K L S C T A S G F N I K D Y M N W V K Q R	40
IGHV1-69-2*01	E V Q L V Q S G A E V K K P G A T V K I S C K V S G Y T F T D Y Y M H W V Q Q A	40
AAN16432_H	E V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K V S G Y T L T E L S M H W V R Q A	40
2RCS_H	Q V Q L Q Q S G A E L V K P G A S V K L S C T A S G F N I K D T Y M H W V K Q R	40
hu9F5VHv1	Q V Q L Q Q S G A E L V K P G A S V K L S C T A S G F N I K D D Y M N W V K Q R	40
hu9F5VHv2	E V Q L Q Q S G A E L V K P G A T V K I S C T A S G F N I K D D Y M N W V K Q R	40
hu9F5VHv3	E V Q L Q Q S G A E L V K P G A T V K I S C T A S G F N I K D D Y M N W V K Q R	40
hu9F5VHv4	E V Q L Q Q S G A E L V K P G A T V K I S C T A S G F N I K D D Y M N W V K Q R	40
hu9F5VHv5	E V Q L Q Q S G A E L V K P G A T V K I S C K A S G F T I K D D Y M N W V K Q R	40
hu9F5VHv6	E V Q L Q Q S G A E L V K P G A T V K I S C K A S G F T I K D D Y M N W V K Q A	40
hu9F5VHv7	E V Q L V Q S G A E V K K P G A T V K I S C K A S G F N I K D D Y M N W V R Q A	40
hu9F5VHv8	E V Q L V Q S G A E V K K P G A T V K I S C K A S G F N I K D D Y M N W V R Q A	40
小鼠9F5 VH	P E R G L E W I G W I G W I D P E N G D T E Y A S K F Q G K A T M T A D T S S N T A Y	80
IGHV1-69-2*01	P G K G L E W M G L V D P E D G E T I Y A E K F Q G R V T I T A D T S T D T A Y	80
AAN16432_H	P G K G L E W M G G F D P E D G E T I Y A Q K F Q G R V T M T E D T S T D T A Y	80
2RCS_H	P E Q G L E W I G R I D P A N G N T K Y D P K F Q G K A T I T A D T S S N T A Y	80
hu9F5VHv1	P E Q G L E W I G W I D P E N G D T E Y A S K F Q G K A T M T A D T S S N T A Y	80
hu9F5VHv2	P E Q G L E W I G W I D P E N G D T E Y A S K F Q G K A T M T A D T S T N T A Y	80
hu9F5VHv3	P E Q G L E W I G W I D P E N G D T E Y A S K F Q G R A T M T A D T S T N T A Y	80
hu9F5VHv4	P E Q G L E W I G W I D P E N G D T E Y A S K F Q G R A T M T A D T S T N T A Y	80
hu9F5VHv5	P E K G L E W I G W V D P E D G E T E Y A S K F Q G R A T M T A D T S T D T A Y	80
hu9F5VHv6	P E K G L E W M G W V D P E D G E T E Y A S K F Q G R A T M T A D T S T D T A Y	80
hu9F5VHv7	P G K G L E W I G W V D P E D G E T E Y A S K F Q G R A T M T A D T S T D T A Y	80
hu9F5VHv8	P G K G L E W I G W V D P E N G D T E Y A S K F Q G R A T M T A D T S T D T A Y	80

图1A

	90	100	110	120
小鼠9F5 VH	L Q F S S L T S E D T A V Y Y C T - - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
IGHV1-69-2*01	M E L S S L R S E D T A V Y Y C A - - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
AAN16432_H	M E L S S L R S E D T A V Y Y C A G Y R S P M P	- - - - -	- - - - -	- - - - -
2RCS_H	L Q L S S L T S E D T A V Y Y C A - - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
hu9F5VHv1	L Q L S S L T S E D T A V Y Y C T - - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
hu9F5VHv2	L Q L S S L T S E D T A V Y Y C T - - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
hu9F5VHv3	L E L S S L T S E D T A V Y Y C T - - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
hu9F5VHv4	L E L S S L R S E D T A V Y Y C T - - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
hu9F5VHv5	M E L S S L R S E D T A V Y Y C T - - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
hu9F5VHv6	M E L S S L R S E D T A V Y Y C T - - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
hu9F5VHv7	M E L S S L R S E D T A V Y Y C T - - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
hu9F5VHv8	M E L S S L R S E D T A V Y Y C T - - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
小鼠9F5 VH	T			
IGHV1-69-2*01	S			
AAN16432_H	S			
2RCS_H	S			
hu9F5VHv1	S			
hu9F5VHv2	S			
hu9F5VHv3	S			
hu9F5VHv4	S			
hu9F5VHv5	S			
hu9F5VHv6	S			
hu9F5VHv7	S			
hu9F5VHv8	S			

图1B

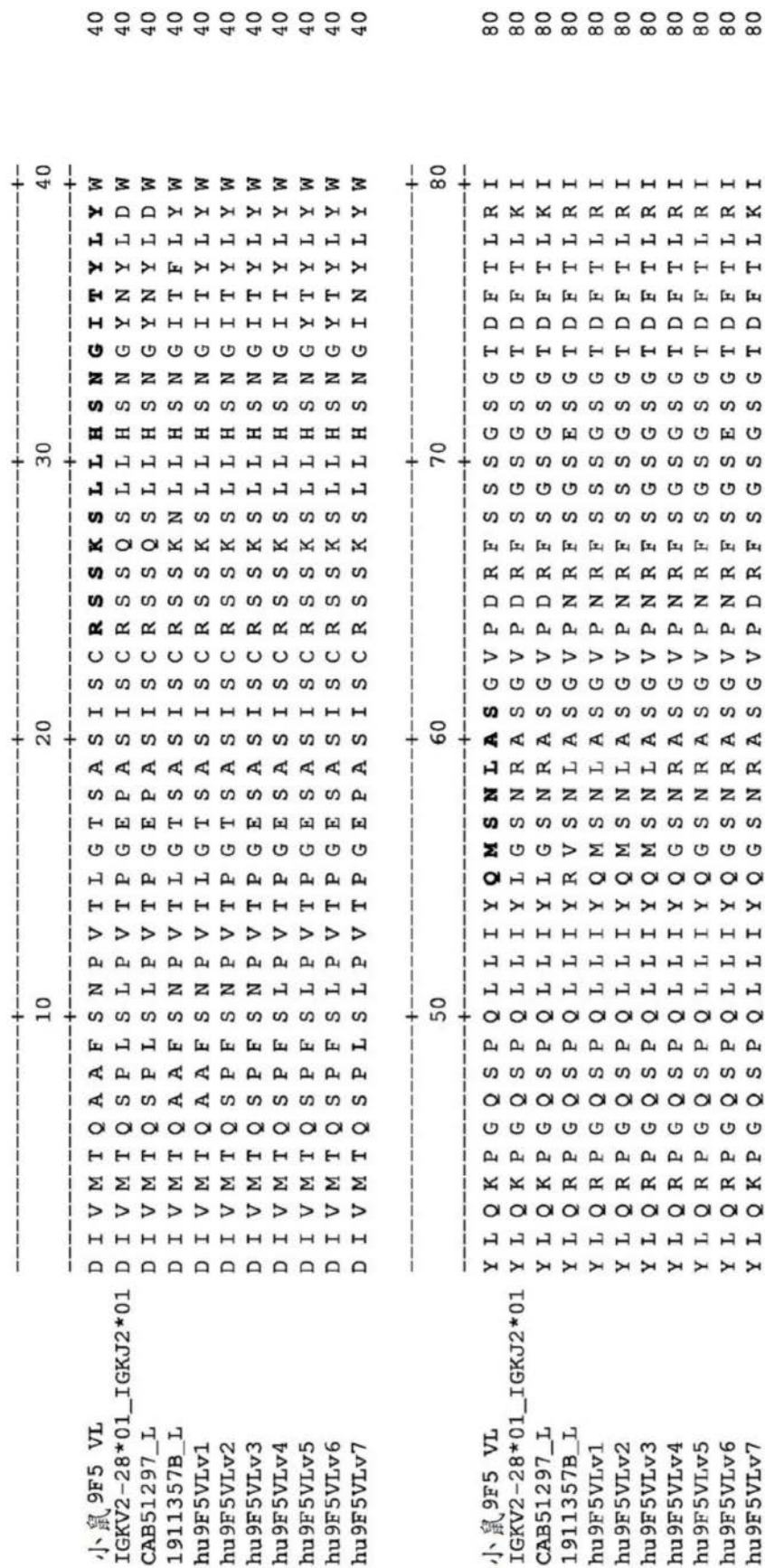


图2A

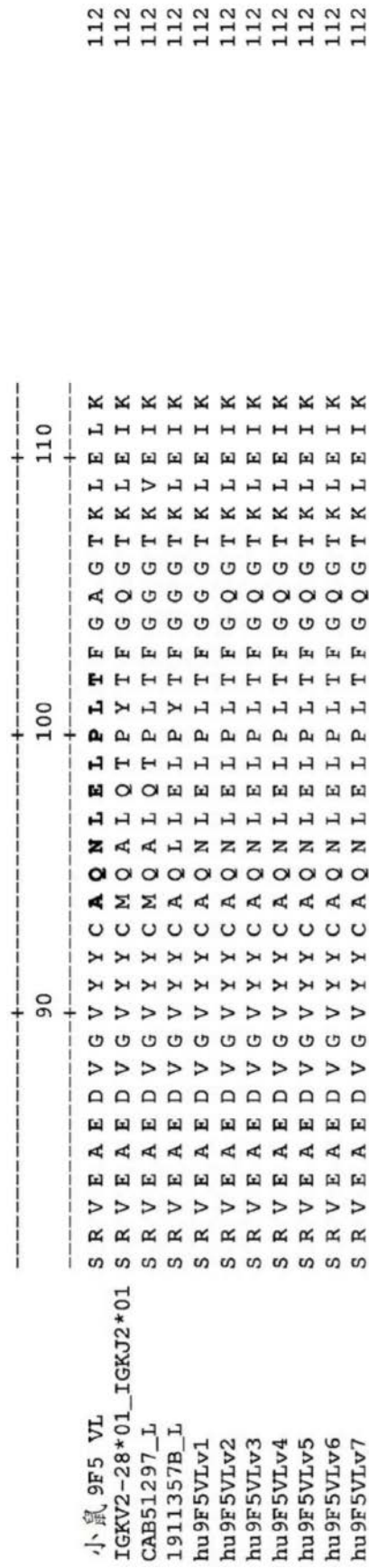


图2B

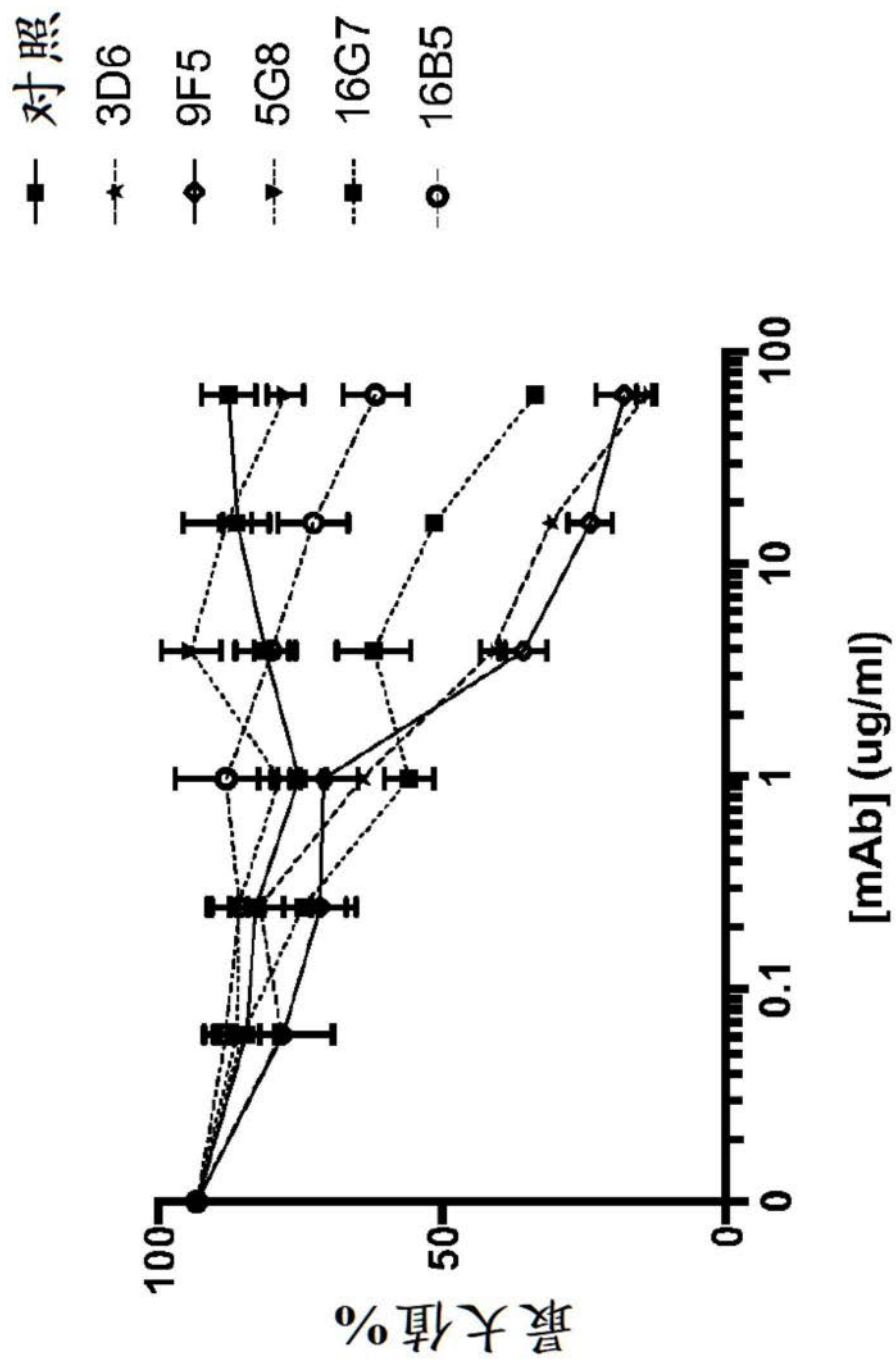


图3

	10	20	30	40
小鼠9F5_VH	E	V	Q	L
IGHV1-69-2*01	Q	Q	S	G
AAN16432_H	A	E	L	V
2RCS_H	R	P	P	G
hu9F5VHv1	A	S	V	K
hu9F5VHv2	L	S	C	T
hu9F5VHv3	V	K	I	K
hu9F5VHv4	K	V	N	I
hu9F5VHv5	K	V	G	F
hu9F5VHv6	K	V	T	A
hu9F5VHv7	K	V	S	C
hu9F5VHv8	K	V	T	K
hu9F5VHv9	K	V	T	K
hu9F5VHv10	K	V	T	K

	50	60	70	80
小鼠9F5_VH	P	E	R	G
IGHV1-69-2*01	L	E	W	I
AAN16432_H	M	L	V	.
2RCS_H	M	G	F	.
hu9F5VHv1	R	A	N	K
hu9F5VHv2	.	.	.	.
hu9F5VHv3	.	.	.	.
hu9F5VHv4	.	.	.	.
hu9F5VHv5	.	.	.	.
hu9F5VHv6	.	.	.	.
hu9F5VHv7	.	.	.	.
hu9F5VHv8	.	.	.	.
hu9F5VHv9	.	.	.	.
hu9F5VHv10	.	.	.	.

图4A

	90	100	110
小鼠 9F5_VH	L Q F S S L T S E D T A V Y C T	- - - - - T S N G - -	- - - - - W G Q G T L V T V S
IGHV1-69-2*01	M E L . . . R . . . A . . .	- - - - - T Q H - -	- - - - -
AAN16432_H	M E L . . . R . . . A G Y R S P M P	- - - - - A . K - -	- - - - -
2RCS_H	. . L	- - - - - S Y Y . I Y .	- - - - - . . . T L . .
hu9F5VHv1	. . L	- - - - - S	- - - - - . . . T L . .
hu9F5VHv2	. . L	- - - - -	- - - - - . . . T . . .
hu9F5VHv3	. . E L	- - - - -	- - - - - . . . T . . .
hu9F5VHv4	. . E L R	- - - - -	- - - - - . . . T . . .
hu9F5VHv5	M E L . . . R	- - - - -	- - - - -
hu9F5VHv6	M E L . . . R	- - - - -	- - - - -
hu9F5VHv7	M E L . . . R	- - - - -	- - - - -
hu9F5VHv8	M E L . . . R	- - - - -	- - - - -
hu9F5VHv9	M E L . . . R	- - - - -	- - - - -
hu9F5VHv10	M E L . . . R	- - - - -	- - - - -
小鼠 9F5_VH	T		
IGHV1-69-2*01	S		
AAN16432_H	S		
2RCS_H	S		
hu9F5VHv1	S		
hu9F5VHv2	S		
hu9F5VHv3	S		
hu9F5VHv4	S		
hu9F5VHv5	S		
hu9F5VHv6	S		
hu9F5VHv7	S		
hu9F5VHv8	S		
hu9F5VHv9	S		
hu9F5VHv10	S		

图4B

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

图5A

	90	100	110	
小鼠9F5 VL	S R V E A E D V G V Y Y C A Q N L E L P L T F G A G T K L E L K			112
IGKV2-28*01_IGKJ2*01	 M . A . Q T . Y Q I .			112
CAB51297_L	 M . A . Q T G V .			112
1911357B_L	 L Y G I .			112
hu9F5VLv1	 G I .			112
hu9F5VLv2	 Q I .			112
hu9F5VLv3	 Q I .			112
hu9F5VLv4	 Q I .			112
hu9F5VLv5	 Q I .			112
hu9F5VLv6	 Q I .			112
hu9F5VLv7	 Q I .			112
hu9F5VLv8	 Q I .			112
hu9F5VLv9	 Q I .			112

图5B

	10	20	30	40
hu9F5VLv8	D	I	V	M
hu9F5VLv8_DIM1	T	Q	S	P
hu9F5VLv8_DIM2	F	S	L	P
hu9F5VLv8_DIM3	V	T	P	G
hu9F5VLv8_DIM4	E	S	A	S
hu9F5VLv8_DIM5	I	S	C	R
hu9F5VLv8_DIM6	S	I	S	C
hu9F5VLv8_DIM7	L	P	V	T
hu9F5VLv8_DIM8	P	G	E	S
hu9F5VLv8_DIM9	A	S	I	S
hu9F5VLv8_DIM10	C	R	S	S
hu9F5VLv8_DIM11	K	S	L	L
hu9F5VLv8_DIM12	H	S	N	G
hu9F5VLv8_DIM13	I	T	Y	L
hu9F5VLv8_DIM14	Y	W		
hu9F5VLv8_DIM15				
hu9F5VLv8_DIM16				
hu9F5VLv8_DIM17				
hu9F5VLv8_DIM18				
hu9F5VLv8_DIM19				
hu9F5VLv8_DIM20				
hu9F5VLv8_DIM21				
hu9F5VLv8_DIM22				
hu9F5VLv8_DIM23				
hu9F5VLv8_DIM24				
hu9F5VLv8_DIM25				
hu9F5VLv8_DIM26				
hu9F5VLv9_DIM1				
hu9F5VLv9_DIM2				
hu9F5VLv9_DIM4				
hu9F5VLv9_DIM5				
hu9F5VLv9_DIM8				
hu9F5VLv9_DIM10				
hu9F5VLv9_DIM11				
hu9F5VLv9_DIM13				
hu9F5VLv9_DIM19				
hu9F5VLv9_DIM20				
hu9F5VLv8_DIM27				
hu9F5VLv8_DIM28				
hu9F5VLv8_DIM29				
hu9F5VLv8_DIM30				

图6A

hu9F5VLv8	Y	L	Q	K	P	G	Q	S	P	Q	L	L	I	Y	Q	M	S	N	L	A	S	G	V	P	N	R	F	S	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	80
hu9F5VLv8_DIM1	.	Q	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	80
hu9F5VLv8_DIM2	.	Q	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	80	
hu9F5VLv8_DIM3	.	Q	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	80	
hu9F5VLv8_DIM4	.	Q	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	80	
hu9F5VLv8_DIM5	.	Q	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	80	
hu9F5VLv8_DIM6	.	Q	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	80	
hu9F5VLv8_DIM7	.	Q	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	K	.	K	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	80	
hu9F5VLv8_DIM8	.	Q	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	K	.	K	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	80	
hu9F5VLv8_DIM9	.	Q	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	K	.	K	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	80	
hu9F5VLv8_DIM10	.	Q	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	K	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	80	
hu9F5VLv8_DIM11	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	80	
hu9F5VLv8_DIM12	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	80	
hu9F5VLv8_DIM13	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	80	
hu9F5VLv8_DIM14	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	80	
hu9F5VLv8_DIM15	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	80	
hu9F5VLv8_DIM16	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	80	
hu9F5VLv8_DIM17	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	80	
hu9F5VLv8_DIM18	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	80	
hu9F5VLv8_DIM19	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	80	
hu9F5VLv8_DIM20	.	Q	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	80	
hu9F5VLv8_DIM21	.	Q	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	80	
hu9F5VLv8_DIM22	.	Q	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	E	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	80	
hu9F5VLv8_DIM23	.	Q	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	E	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	80	
hu9F5VLv8_DIM24	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	E	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	80	
hu9F5VLv8_DIM25	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	E	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	80	
hu9F5VLv8_DIM26	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	E	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	80	
hu9F5VLv9_DIM1	.	Q	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	80	
hu9F5VLv9_DIM2	.	Q	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	80	
hu9F5VLv9_DIM4	.	Q	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	80	
hu9F5VLv9_DIM5	.	Q	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	80	
hu9F5VLv9_DIM8	.	Q	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	K	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	80	
hu9F5VLv9_DIM10	.	Q	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	K	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	80	
hu9F5VLv9_DIM11	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	80	
hu9F5VLv9_DIM13	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	80	
hu9F5VLv9_DIM19	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	80	
hu9F5VLv9_DIM20	.	Q	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	80	
hu9F5VLv8_DIM27	.	Q	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	80	
hu9F5VLv8_DIM28	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	80	
hu9F5VLv8_DIM29	.	Q	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	80	
hu9F5VLv8_DIM30	.	Q	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	80	

图6B

m10C12 VH	E	V	Q	L	Q	Q	S	G	A	E	L	V	R	P	G	A	S	V	K	L	S	C	T	A	S	G	F	N	I	K	D	Y	M	N	W	V	K	Q	R	40			
IGHV1-69-2*01	.	.	.	V	.	.	.	V	K	K	.	.	T	.	I	.	K	V	.	Y	T	F	T	.	Y	.	H	.	Q	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	40		
CAC20421 VH	Q	.	.	V	.	.	.	V	K	K	.	.	T	.	I	.	K	V	.	Y	T	F	T	.	Y	.	H	.	Q	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	40			
hu10C12VHv1	Q	.	.	V	.	.	.	V	K	K	.	.	T	.	I	.	K	V	.	Y	T	F	T	.	Y	.	H	.	Q	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	40			
hu10C12VHv2	.	.	.	V	.	.	.	V	K	K	.	.	T	.	I	.	K	V	.	Y	T	F	T	.	Y	.	H	.	Q	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	40			
m10C12 VH	P	E	R	G	L	E	W	I	G	W	I	D	P	E	N	G	D	T	E	Y	A	S	K	F	Q	G	K	A	T	M	T	A	D	T	S	S	N	T	A	Y	80		
IGHV1-69-2*01	.	G	K	.	.	M	.	L	V	.	.	D	E	.	I	.	E	.	E	.	E	.	.	.	.	.	R	V	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	T	D	.	.	80
CAC20421 VH	.	G	K	.	.	M	.	L	V	.	.	D	E	.	I	.	E	.	E	.	E	.	.	.	.	.	R	V	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	T	D	.	.	80
hu10C12VHv1	.	G	K	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	D	.	.	80
hu10C12VHv2	.	G	K	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	D	.	.	80
m10C12 VH	L	Q	F	S	S	L	T	S	E	D	T	A	V	Y	C	T	T	-	-	-	-	-	-	-	-	S	N	G	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	T	112			
IGHV1-69-2*01	M	E	L	.	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	-	-	-	-	-	-	-	-	T	Q	H	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	111			
CAC20421 VH	M	E	L	.	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	R	I	P	L	F	G	R	D	H	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	117			
hu10C12VHv1	M	E	L	.	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	112			
hu10C12VHv2	M	E	L	.	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	112			

图7

m10C12 VL	40
IGKV2-28*01&IGKJ2*01	40
CAB51297 VL	40
hu10C12VLv1	40
hu10C12VLv2	40

	10	20	30	40
D I V M T Q A A F S N P V T L G T S A S I S C R S S K S L L H S N G I T Y L Y W				
. . . . S P L . L . . P . E P Q Y N . . D .				
. . . . S P L . L . . P . E P Q Y N . . D .				
. . . . S P L . L . . P . E P				
. . . . S P L . L . . P . E P				

	50	60	70	80
Y L Q K P G Q S P Q L L I Y Q M S N L A S G V P D R F S S G S G T D F T L R I				
. L G . . R G K .				
CAB51297 VL				
hu10C12VLv1				
hu10C12VLv2				

	90	100	110
S R V E A E D V G V Y Y C A Q N L E L P L T F G A G T K L E L K			
. M . A . Q T . Y . . . Q I .			
CAB51297 VL			
hu10C12VLv1			
hu10C12VLv2			

图8

	10	20	30	40
ml2C4VH	E V Q L Q Q S G A E L V R P G A S V K L S C T A S G F N I K D D Y M N W V R Q R			40
IGHV1-69-2*01	. . . V . . . V K K . . . T . . . I . . . K V . . . Y T F T . . . Y . . . H . . . Q . . . A			40
CAC20421 VH	Q . . . V . . . V K K . . . T . . . I . . . K V . . . Y T F T . . . Y . . . H . . . Q . . . A			40
hu12C4VHv1	Q . . . V . . . V K K . . . T . . . I . . . K V . . . Y T F T . . . Y . . . H . . . Q . . . A			40
hu12C4VHv2	. . . V . . . V K K . . . T . . . I . . . K V . . . Y T F T . . . Y . . . H . . . Q . . . A			40
ml2C4VH	P E R G L E W I G W I D P E N G D T A Y A S K F Q G K A T M T A D T S S N T A Y			80
IGHV1-69-2*01	. G K . . . M . L V . . . D . E . I . . . E . . . R V . I T D . . .			80
CAC20421 VH	. G K . . . M . L V . . . D . E . I . . . E . . . R V . I T D . . .			80
hu12C4VHv1	. G K . . . M R V . I T D . . .			80
hu12C4VHv2	. G K . R V . I T D . . .			80
ml2C4VH	L Q F S S L T S E D S A V Y C T T - - - - S N G W G Q G T L V T V S A			112
IGHV1-69-2*01	M E L . . . R . . . T . . . A - - - - T Q H S			111
CAC20421 VH	M E L . . . R . . . T . . . A R I P L F G R D H S			117
hu12C4VHv1	M E L . . . R . . . T . . . A R - - - - - S			112
hu12C4VHv2	M E L . . . R . . . T . S			112

图9

m12C4VL	10	20	30	40	40
IGKV2-28*01&IGKJ2*01					40
CAB51297 VL					40
hu12C4VLv1					40
hu12C4VLv2					40
	50	60	70	80	
m12C4VL					80
IGKV2-28*01&IGKJ2*01					80
CAB51297 VL					80
hu12C4VLv1					80
hu12C4VLv2					80
	90	100	110		
m12C4VL					112
IGKV2-28*01&IGKJ2*01					112
CAB51297 VL					112
hu12C4VLv1					112
hu12C4VLv2					112

图10

m17C12VH	K I Q L Q S G A E L V R P G A S V K L S C T A S A F N I K D D Y M N W V K Q R	40
IGHV1-69-2*01	E V . . V . . . V K K . . T . . I . . K V . G Y T F T . Y . . H . . Q . A	40
CAC20421 VH	Q V . . V . . . V K K . . T . . I . . K V . G Y T F T . Y . . H . . Q . A	40
hu17C12VHv1	Q . . . V . . . V K K . . T . . I . . K Q . A	40
hu17C12VHv2	E . . . V . . . V K K . . T . . I . . K Q . A	40
m17C12VH	P E R G L E W I G W I D P E N G D T K Y A S K F Q G K A T M T A D T S S N T A Y	80
IGHV1-69-2*01	. G K . . . M . L V . . . D . E . I . . E . . . R V . I . . . T D . . .	80
CAC20421 VH	. G K . . . M . L V . . . D . E . I . . E . . . R V . I . . . T D . . .	80
hu17C12VHv1	. G K R T D	80
hu17C12VHv2	. G K R T D	80
m17C12VH	L Q L S S L T S E D T A V Y Y C T T - - - - - S N G W G Q G T L V T V S A	112
IGHV1-69-2*01	M E . . . R A - - - - - T Q H S	111
CAC20421 VH	M E . . . R A R I P L F G R D H R	117
hu17C12VHv1	M E . . . R - - - - - T R	112
hu17C12VHv2	M E . . . R - - - - - S	112

图11

ml17C12VL	10	20	30	40
IGKV2-29*02&IGKJ4*01	10	20	30	40
QDO16713 VL	10	20	30	40
hu17C12VLv1	10	20	30	40
hu17C12VLv2	10	20	30	40
ml17C12VL	50	60	70	80
IGKV2-29*02&IGKJ4*01	50	60	70	80
QDO16713 VL	50	60	70	80
hu17C12VLv1	50	60	70	80
hu17C12VLv2	50	60	70	80
ml17C12VL	90	100	110	
IGKV2-29*02&IGKJ4*01	90	100	110	
QDO16713 VL	90	100	110	
hu17C12VLv1	90	100	110	
hu17C12VLv2	90	100	110	

图12

[illegible]

图13

[illegible]

图14

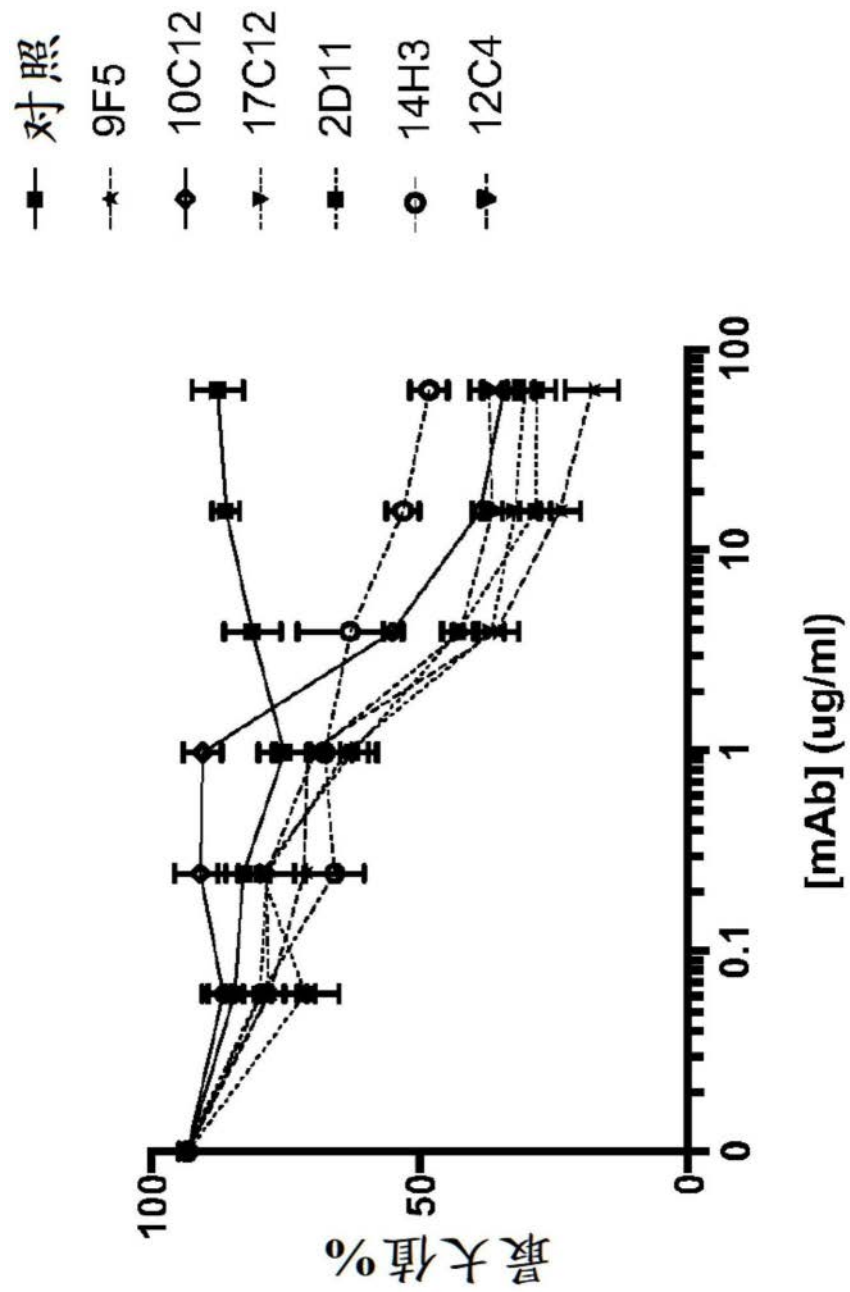


图15

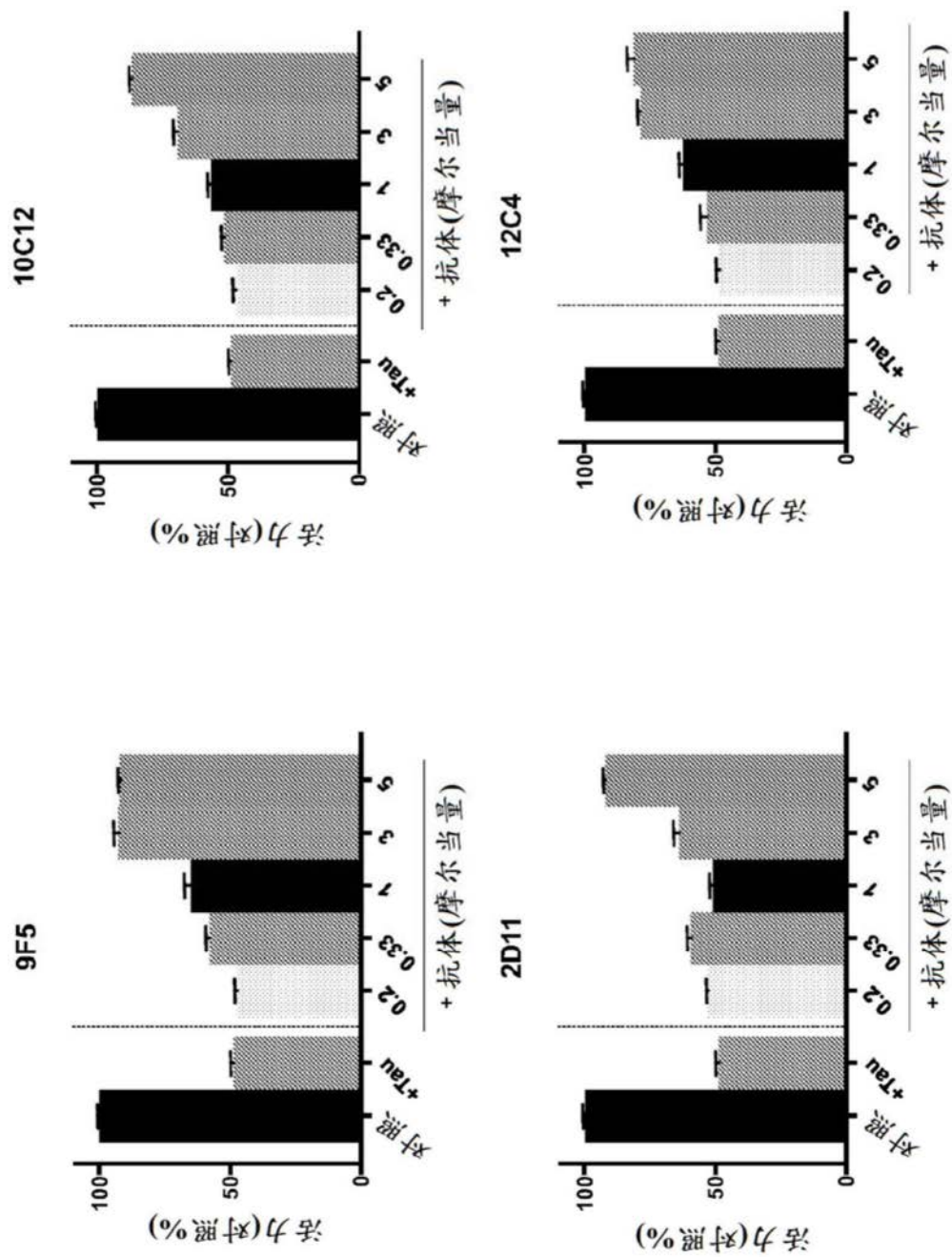


图16

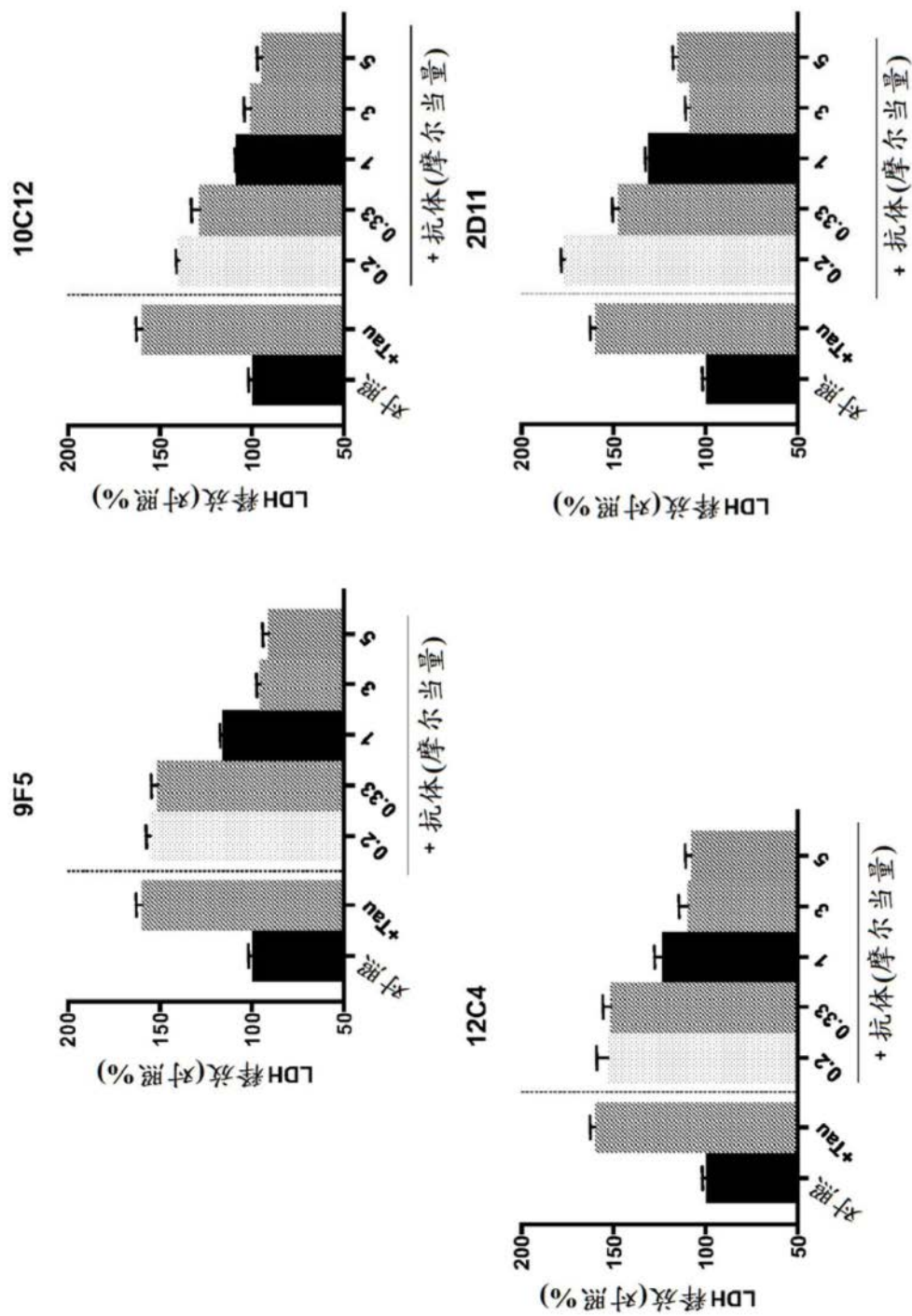


图17

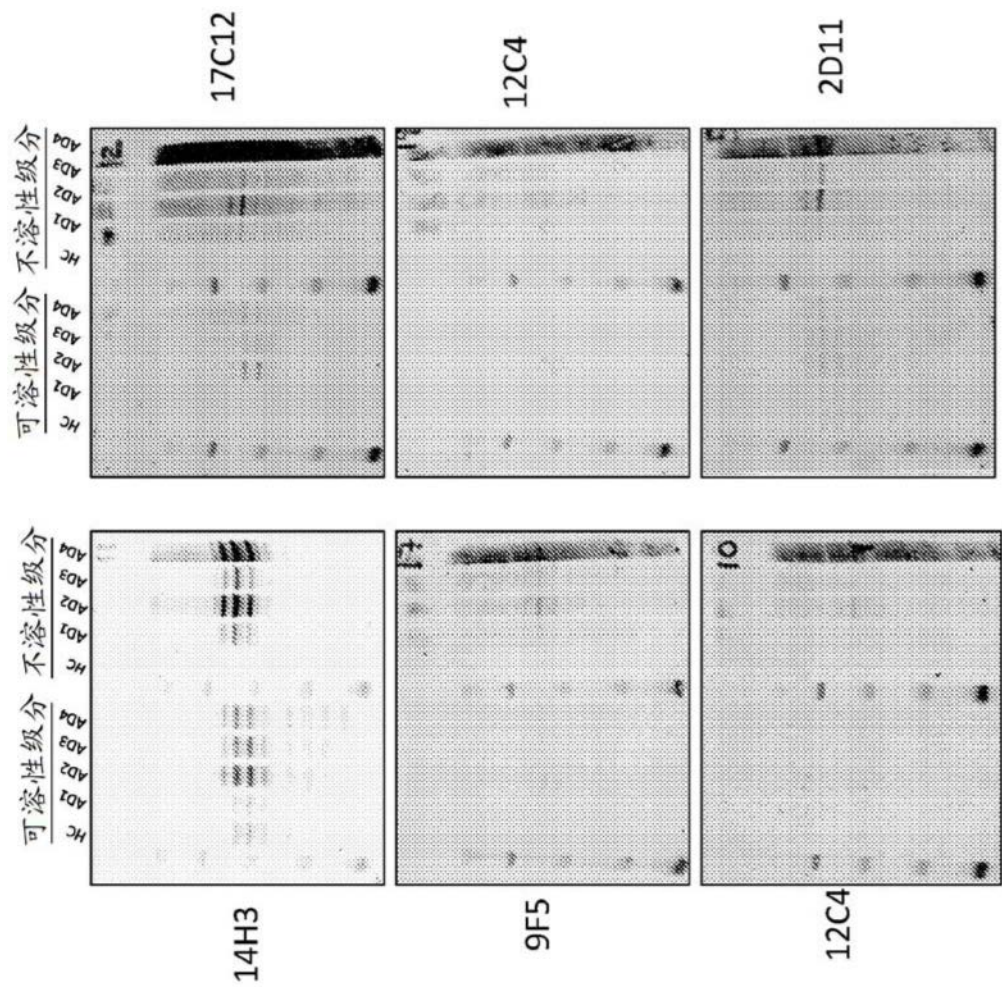


图18

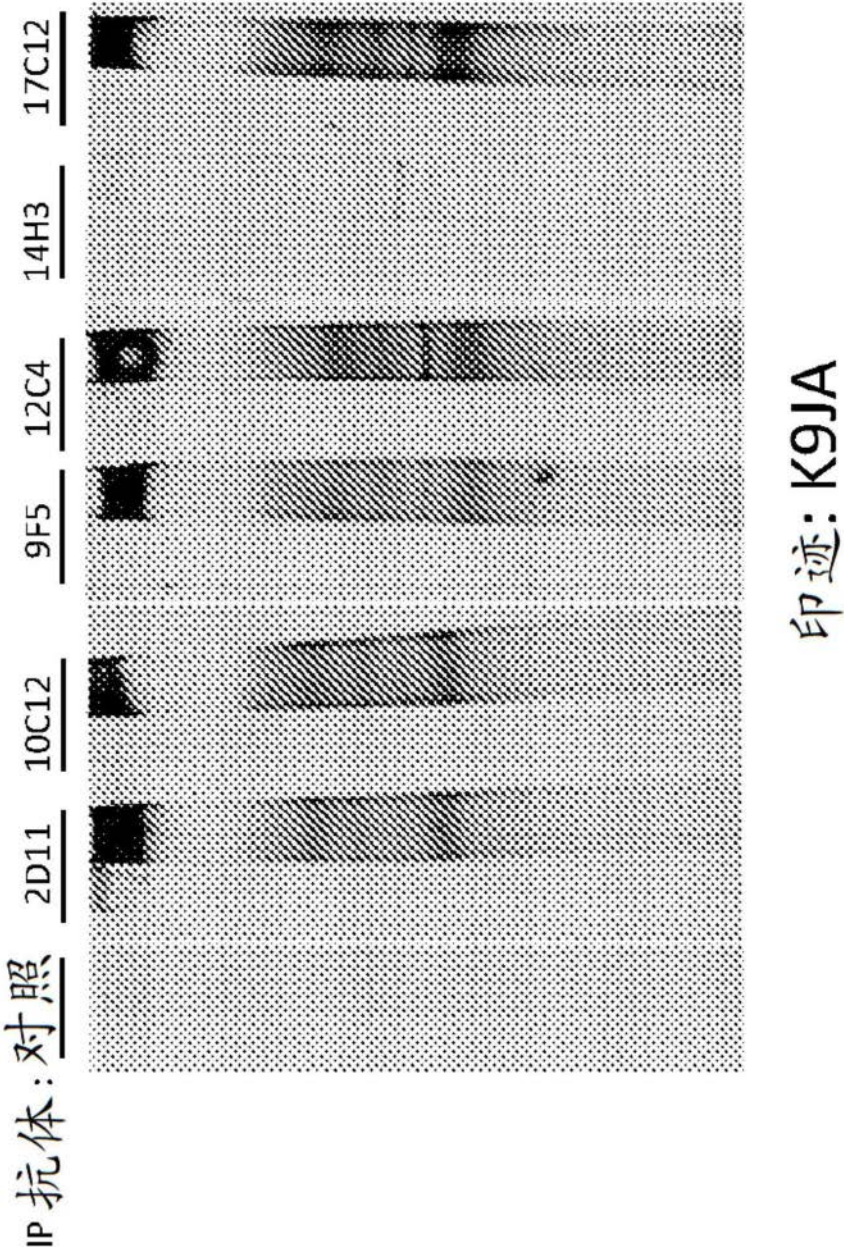


图19

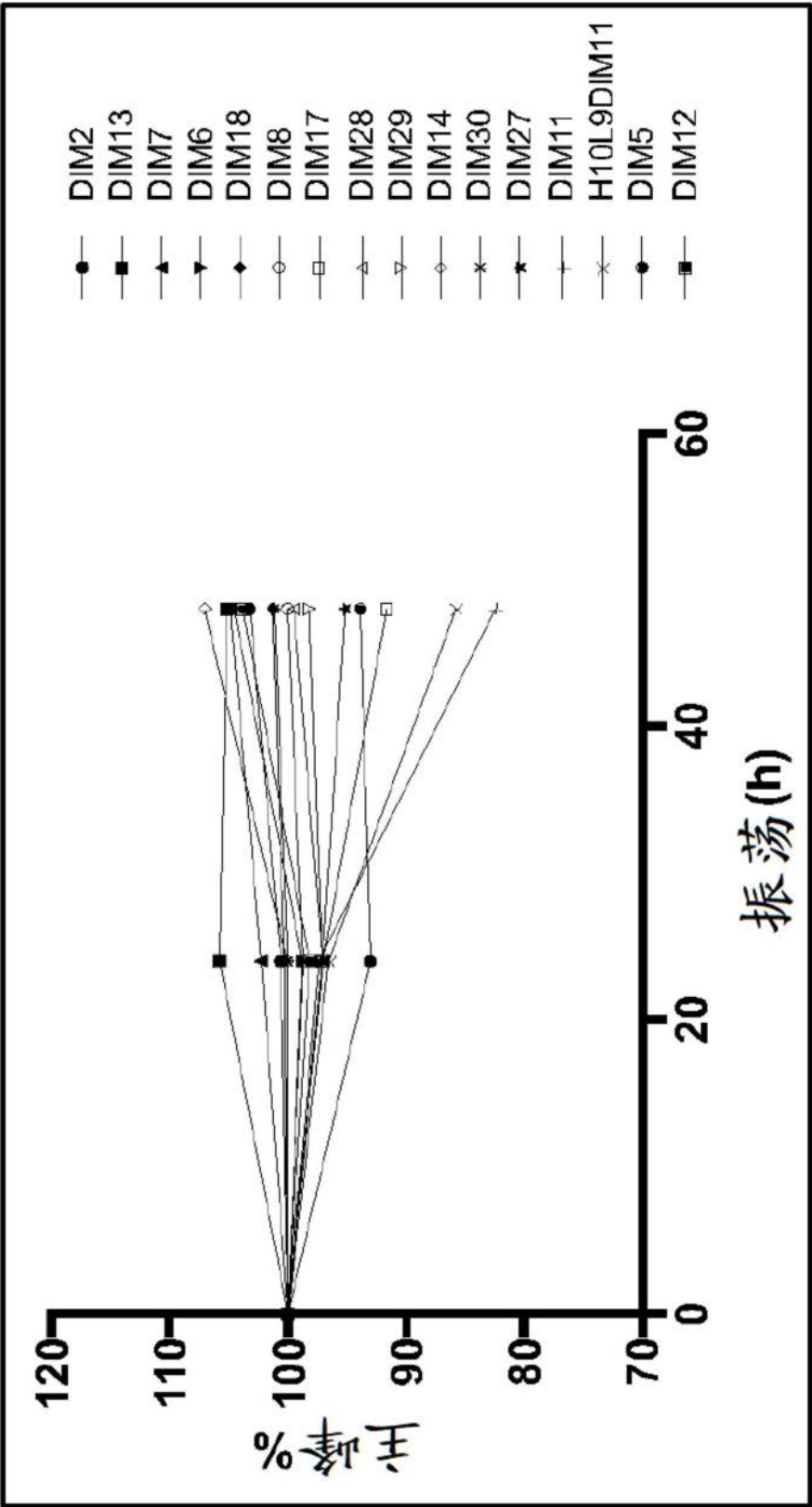


图20

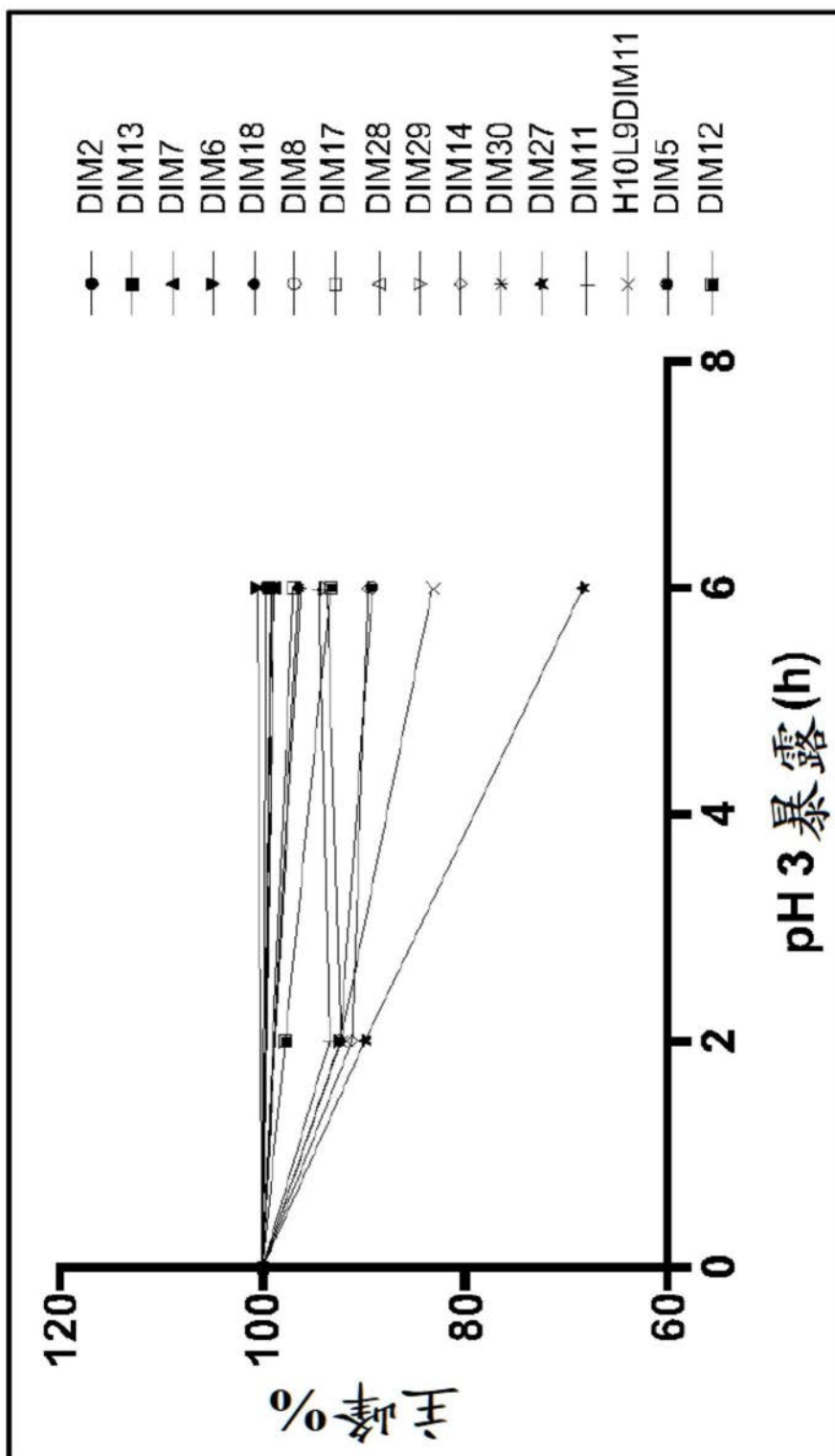


图21

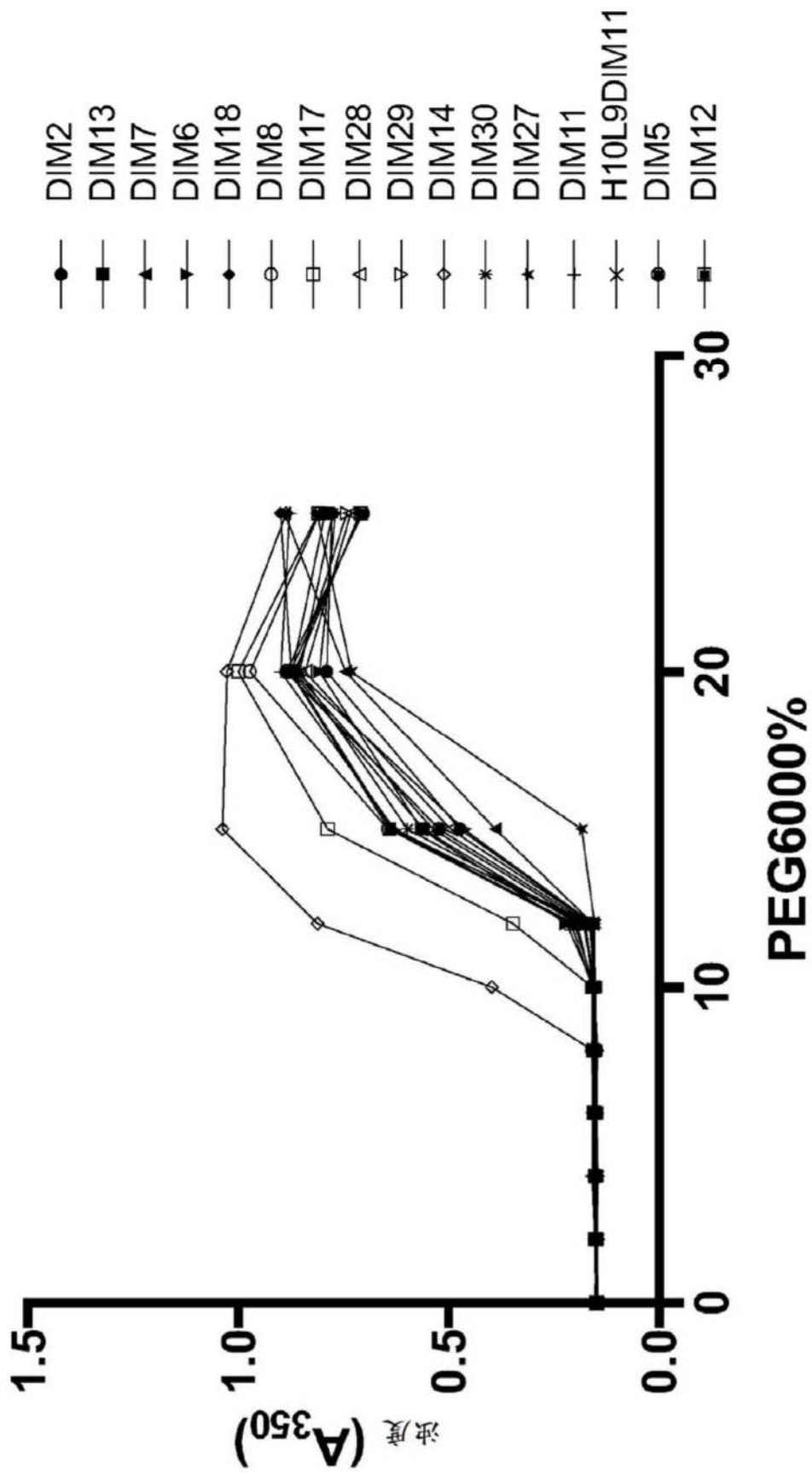


图22

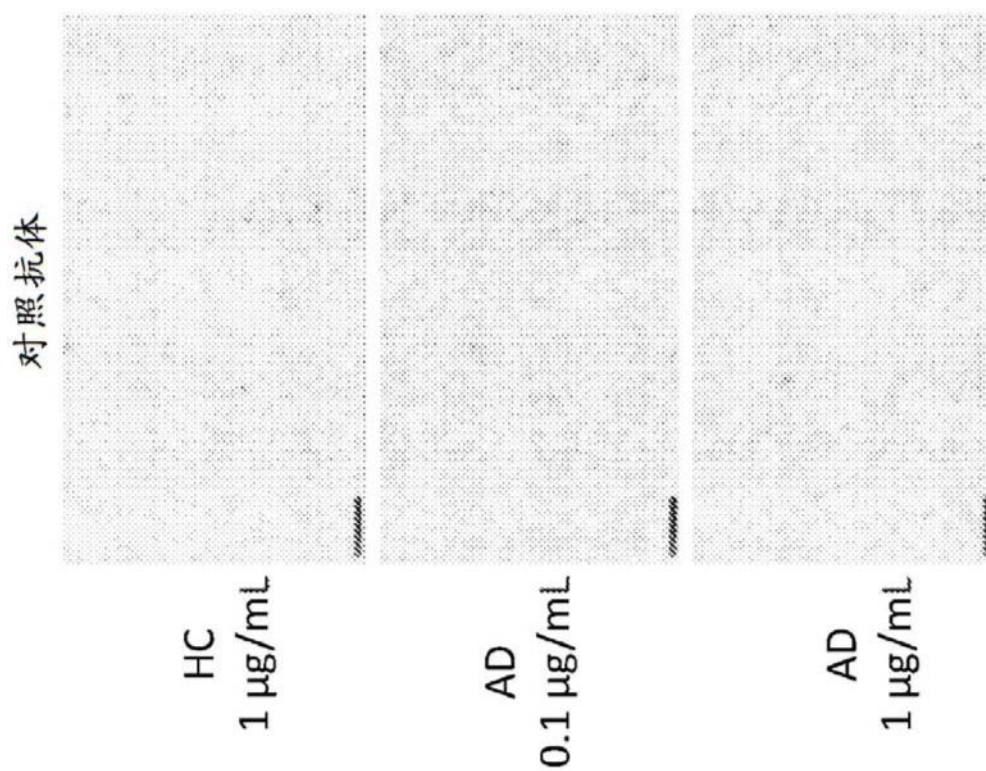


图23A

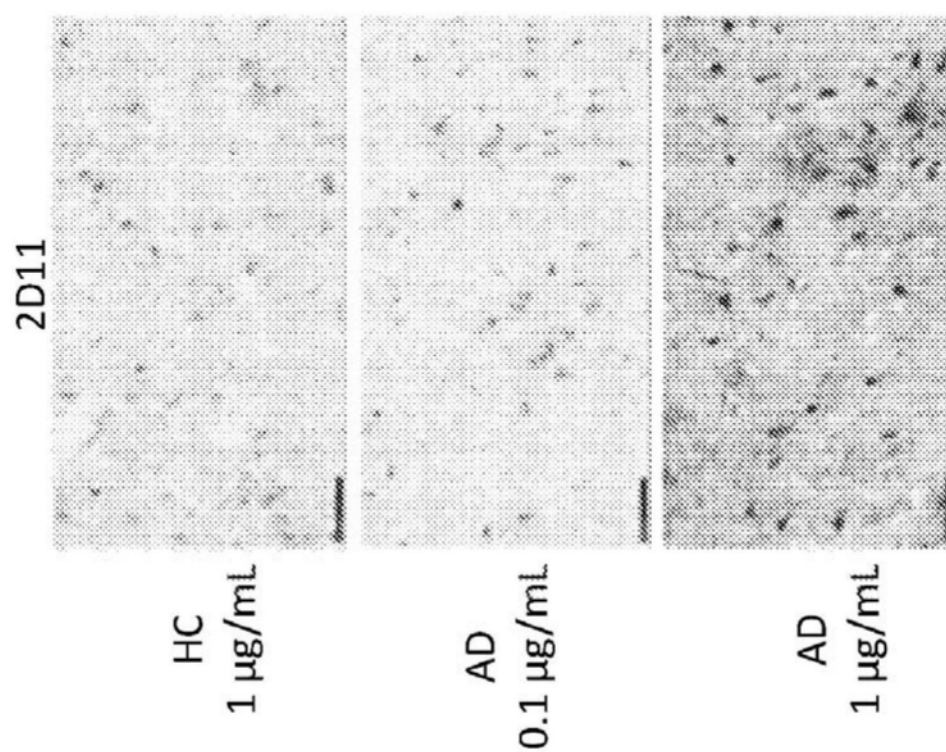


图23B

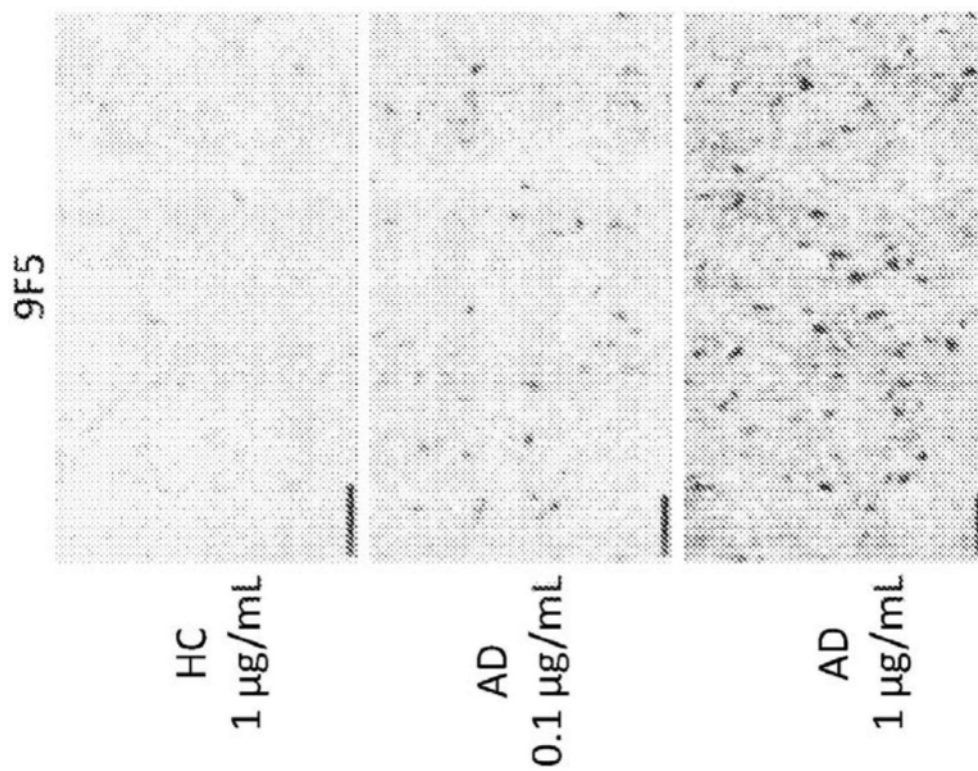


图23C

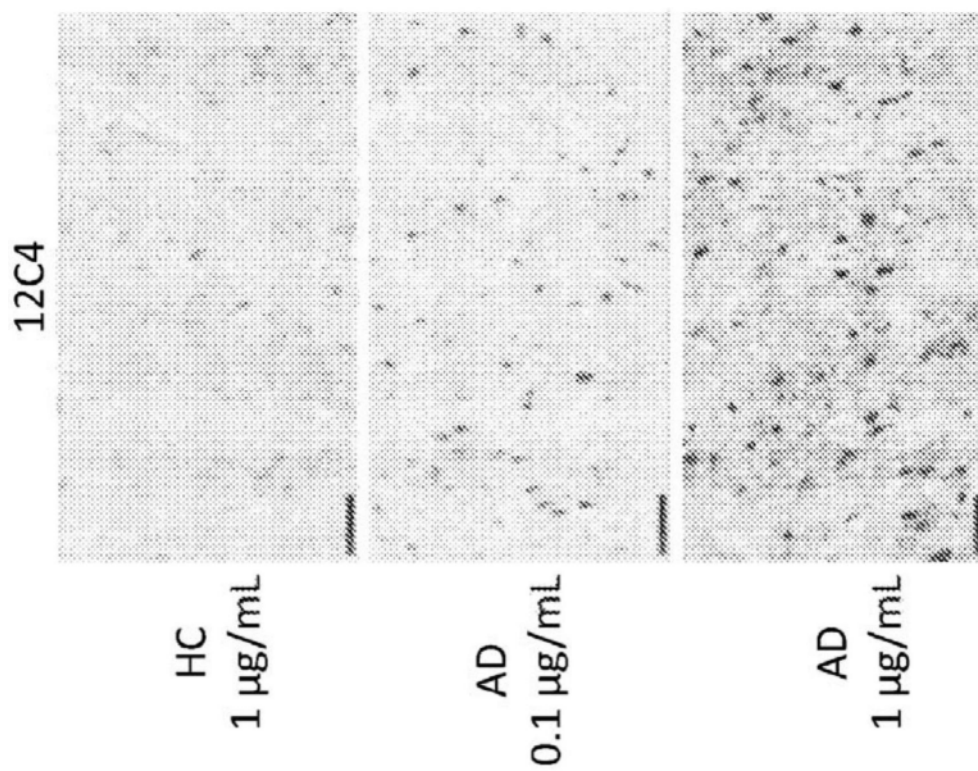


图23D

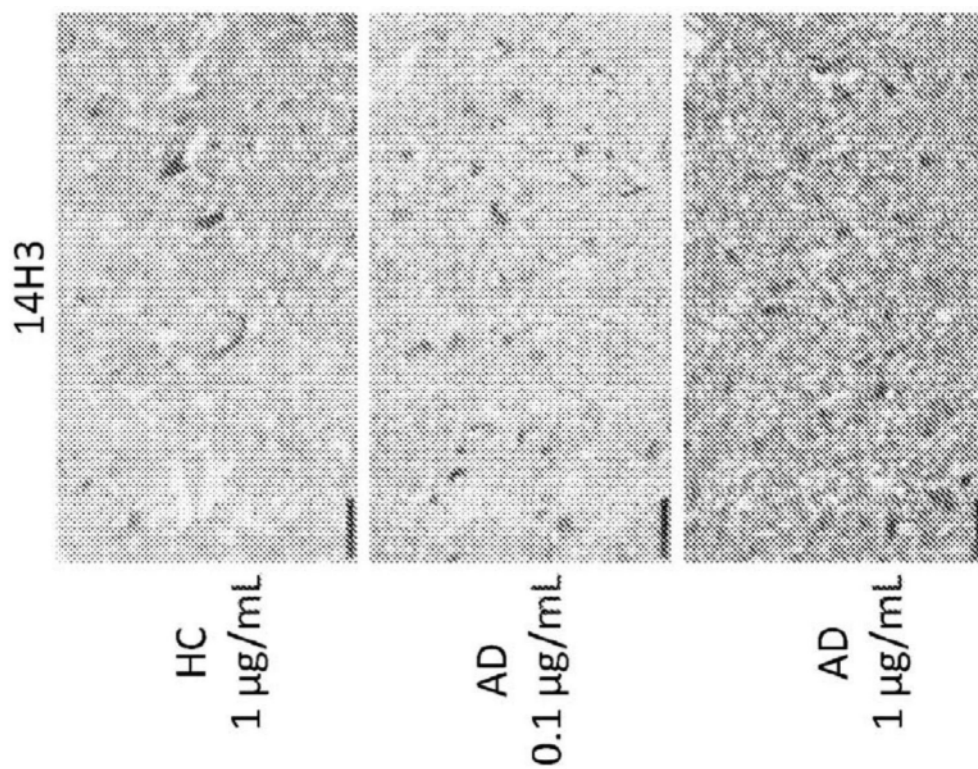


图23E

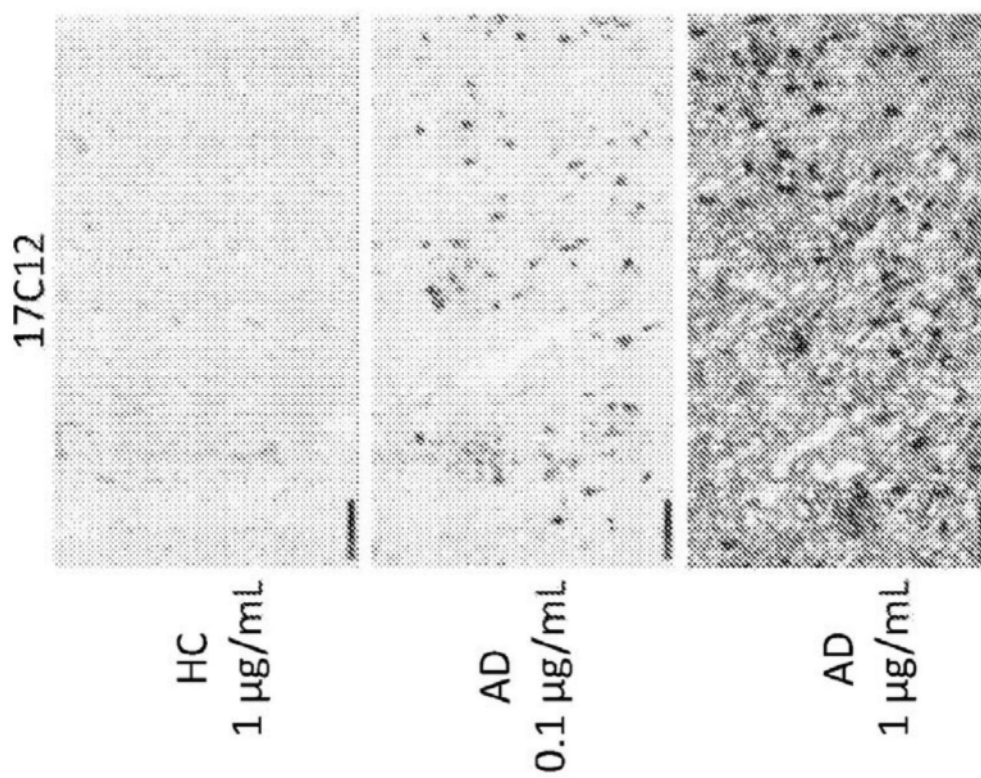


图23F

[illegible]

图24

[illegible]

图25