

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
A61K 39/395 (2006.01)



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680039263.7

[43] 公开日 2008 年 10 月 22 日

[11] 公开号 CN 101291692A

[22] 申请日 2006.10.17

[21] 申请号 200680039263.7

[30] 优先权

[32] 2005.10.21 [33] US [31] PCT/US2005/381125

[86] 国际申请 PCT/US2006/040508 2006.10.17

[87] 国际公布 WO2007/050359 英 2007.5.3

[85] 进入国家阶段日期 2008.4.21

[71] 申请人 默克制药公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 吉恩·金尼 威廉·R·斯特罗尔  
安志强

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责  
任公司

代理人 杨 青 樊卫民

权利要求书 2 页 说明书 43 页 序列表 86 页  
附图 16 页

[54] 发明名称

抗 ADDL 单克隆抗体及其应用

[57] 摘要

本发明涉及差异性识别被称为 ADDL 的  $A\beta$  衍生的可扩散配体的多维构象的抗体。本发明的抗体能够区分阿茨海默氏病和对照的人脑提取物，可用于检测 ADDL 和诊断阿茨海默氏病的方法中。本抗体也阻断 ADDL 与神经元的结合、ADDL 的组装、以及  $\tau$  磷酸化，可用于预防和治疗与淀粉样肽  $\beta 1-42$  的可溶性寡聚体有关的疾病的方法中。

1. 分离抗体或其片段，能够差异性识别一种或多种 A $\beta$  衍生的可扩散配体的多维构象，其中所述抗体包含互补决定区（CDR）Arg-Xaa<sub>1</sub>-Leu-Xaa<sub>2</sub>-Xaa<sub>3</sub>-Xaa<sub>4</sub>-Xaa<sub>5</sub>-Xaa<sub>6</sub>-Asp-Ala-Met-Asp-Tyr（SEQ ID NO:9），其中 Xaa<sub>1</sub> 是 Gln 或 Ala，Xaa<sub>2</sub> 是 Ser 或 Gly，Xaa<sub>3</sub> 是 Pro、Ala、Lys、Arg 或 Thr，Xaa<sub>4</sub> 是 Lys 或 Arg，Xaa<sub>5</sub> 是 Gly、Ser 或 Lys，Xaa<sub>6</sub> 是 Val、Thr、Ile 或 Arg。

2. 权利要求 1 中的分离抗体，其中所述抗体的重链和轻链可变区分别包含在 SEQ ID NO: 108 和 SEQ ID NO: 112 中显示的氨基酸序列。

3. 权利要求 1 中的分离抗体，其中所述抗体的重链和轻链分别包含在 SEQ ID NO: 138 和 SEQ ID NO:140 中显示的氨基酸序列。

4. 药物组合物，包含与可药用载体混合的权利要求 1 的分离抗体或其片段，所述分离抗体或其片段能够差异性识别一种或多种 A $\beta$  衍生的可扩散配体的多维构象。

5. 阻止 A $\beta$  衍生的可扩散配体与神经元结合的方法，包括将神经元与权利要求 1 的抗体相接触，使得 A $\beta$  衍生的可扩散配体与神经元的结合被阻止。

6. 抑制 A $\beta$  衍生的可扩散配体的组装的方法，包括将含有淀粉样  $\beta$  1-42 肽的样品与权利要求 1 的抗体相接触，从而抑制 A $\beta$  衍生的可扩散配体的组装。

7. 阻断  $\tau$  蛋白在 Ser202/Thr205 位磷酸化的方法，包括将含有  $\tau$  蛋白的样品与权利要求 1 的抗体相接触，从而阻断  $\tau$  蛋白在 Ser202/Thr205 位的磷酸化。

8. 预防性或治疗性治疗与 A $\beta$  衍生的可扩散配体有关的疾病的方法，包括施用有效量的权利要求 4 的药物组合物。

9. 鉴别阻止 A $\beta$  衍生的可扩散配体与神经元结合的治疗药剂的方法，包括在药剂存在下将神经元与 A $\beta$  衍生的可扩散配体相接触，并在药剂存在下使用权利要求 1 的抗体确定 A $\beta$  衍生的可扩散配体与神经元的结合。

10. 检测样品中 A $\beta$  衍生的可扩散配体的方法，包括将样品与权利要求 1 的抗体相接触，以便检测 A $\beta$  衍生的可扩散配体。

11. 诊断与 A $\beta$  衍生的可扩散配体有关的疾病的方法，包括将样品与权利要求 1 的抗体相接触，以便诊断与 A $\beta$  衍生的可扩散配体有关的疾病。

12. 检测 A $\beta$  衍生的可扩散配体的试剂盒，包含权利要求 1 的分离抗体或其片段。

## 抗 ADDL 单克隆抗体及其应用

### 介绍

本申请是 2005 年 10 月 21 日提交的 PCT 申请 No. PCT/US2005/0038125 的部分延续。

### 发明背景

阿茨海默氏病是一种进行性和退化性的痴呆 (Terry, 等 (1991) *Ann. Neurol.* 30:572-580; Coyle (1987) 《神经科学全编》(Encyclopedia of Neuroscience), Adelman 主编, Birkhauser, Boston-Basel-Stuttgart, pp 29-31)。在其早期阶段, 阿茨海默氏病主要表现为形成新记忆的深度不能 (Selkoe (2002) *Science* 298:789-791), 据报道这是由于来自淀粉样肽  $\beta$  ( $A\beta$ ) 的神经毒素。 $A\beta$  是两亲性的肽, 其丰度通过与阿茨海默氏病有关的突变和风险因子而增加。从  $A\beta$  形成的纤丝构成了淀粉样斑块的核心, 这是阿茨海默氏病脑的标志。体外产生的类似的纤丝对于培养的脑神经元是致命的。这些发现表明记忆的丧失是由纤维状  $A\beta$  引起的神经元死亡的后果。

尽管对于纤维状  $A\beta$  和记忆丧失的有力实验支持, 但在痴呆和淀粉样斑块负荷之间存在的关联性差 (Katzman (1988) *Ann. Neurol.* 23:138-144)。此外, 发展出年龄依赖性淀粉样斑块、以及最重要的是年龄依赖性记忆功能障碍的转基因 hAPP 小鼠 (Dodart, 等 (2002) *Nat. Neurosci.* 5:452-457; Kotilinek, 等 (2002) *J. Neurosci.* 22:6331-6335), 显示出在接种抗  $A\beta$  单克隆抗体后 24 小时内, 记忆丧失可以被逆转, 而斑块的水平不变。这种发现与记忆丧失取决于淀粉样纤丝引起的神经元死亡的机制不相符合。

此外, 已经提出了  $A\beta$  自身组装形成的神经活性分子。这些分子

包括可溶性 A $\beta$  寡聚体, 也被称为 A $\beta$  衍生的可扩散配体或 ADDL。寡聚体是亚稳定的, 在低浓度 A $\beta$ 1-42 下形成 (Lambert, 等 (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:6448-6453)。A $\beta$  寡聚体快速抑制长期增强 (LTP), 这是记忆和突触可塑性的经典实验范例。这样, 记忆丧失源自神经元死亡之前的突触故障, 而突触故障由 A $\beta$  寡聚体引起, 而不是纤丝 (Hardy & Selkoe (2002) Science 297:353-356)。在脑组织中已经发现了可溶性寡聚体, 它在阿茨海默氏病中 (Kayed, 等 (2003) Science 300:486-489; Gong, 等 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:10417-10422) 和 hAPP 转基因小鼠阿茨海默氏病模型中 (Kotilinek, 等 (2002) J. Neurosci. 22:6331-6335; Chang, 等 (2003) J. Mol. Neurosci. 20:305-313) 升高得惊人。

已经建议了多种阿茨海默氏病治疗选择。疫苗临床试验已经揭示, 对疫苗具有强烈免疫反应的人表现出了认知益处 (Hock, 等 (2003) Neuron 38:547-554); 但是 CNS 炎症的频发导致了部分试验的早期终止 (Birmingham & Frantz (2002) Nat. Med. 8:199-200)。作为疫苗的一种替代方法, 已经建议了针对 ADDL 而不结合单体或纤丝的治疗性抗体 (Klein (2002) Neurochem. Int. 41:345-352)。ADDL 具有高度抗原性, 在大约 50 $\mu$ g/mL 的浓度下在兔中产生寡聚体选择性的多克隆抗体 (Lambert, 等 (2001) J. Neurochem. 79:595-605)。从转基因小鼠模型获得的结果也表明抗体可以成功地逆转记忆衰退 (Dodart, 等 (2002) Nat. Neurosci. 5:452-457; 美国专利申请序号 No. 11/194,989)。因此, 在本技术领域内存在着对于预防和治疗阿茨海默氏病的 ADDL 选择性治疗抗体的需求。本发明满足了这种需求。

## 发明简述

本发明是一种分离的抗体或其片段, 能够差异性识别一种或多种 A $\beta$  衍生的可扩散配体的多维构象。具体来说, 本发明的抗体具有的互补决定区 (CDR) 为 Arg-Xaa<sub>1</sub>-Leu-Xaa<sub>2</sub>-Xaa<sub>3</sub>-Xaa<sub>4</sub>-Xaa<sub>5</sub>-Xaa<sub>6</sub>-Asp-Ala-Met-Asp-Tyr (SEQ ID

NO: 9), 其中 Xaa<sub>1</sub> 是 Gln 或 Ala, Xaa<sub>2</sub> 是 Ser 或 Gly, Xaa<sub>3</sub> 是 Pro、Ala、Lys、Arg 或 Thr, Xaa<sub>4</sub> 是 Lys 或 Arg, Xaa<sub>5</sub> 是 Gly、Ser 或 Lys, Xaa<sub>6</sub> 是 Val、Thr、Ile 或 Arg。在具体实施方案中, 本发明的抗体与可药用的载体相混合。在其它实施方案中, 本发明的抗体在试剂盒中。在另外的实施方案中, 包含了具有 SEQ ID NO: 108 和 SEQ ID NO: 112 中所显示的重链和轻链可变区序列的抗体。也提供了具有 SEQ ID NO: 138 和 SEQ ID NO: 140 中所显示的重链和轻链序列的抗体。

还提供了利用与一种或多种 A $\beta$  衍生的可扩散配体的多维构象结合的抗体或抗体片段, 防止 A $\beta$  衍生的可扩散配体与神经元结合以及抑制 A $\beta$  衍生的可扩散配体的组装的方法。

本发明还包括了使用本发明的抗体, 预防性或治疗性治疗与 A $\beta$  衍生的可扩散配体有关的疾病的方法。施用本发明的抗体可以阻止 A $\beta$  衍生的可扩散配体与神经元的结合, 从而防止或治疗与 A $\beta$  衍生的可扩散配体有关的疾病。

本发明也是鉴别阻止 A $\beta$  衍生的可扩散配体与神经元结合的治疗方法。本发明的该方法包括在存在药剂的情况下, 将神经元与 A $\beta$  衍生的可扩散的配体相接触, 以及在存在药剂的情况下, 使用本发明的抗体确定 A $\beta$  衍生的可扩散配体与神经元的结合。

本发明还包括了在样品中检测 A $\beta$  衍生的可扩散配体的方法以及与 A $\beta$  衍生的可扩散配体有关的疾病的诊断方法。这样的方法包括将样品与本发明的抗体相接触, 以便可以检测 A $\beta$  衍生的可扩散配体, 并可以诊断与 A $\beta$  衍生的可扩散配体有关的疾病。

#### 附图简述

图 1 显示了鼠抗 ADDL 抗体 20C2 的重链(图 1A)和轻链(图 1B)可变区的核酸序列。小写字母表示抗体的前导序列, 大写字母表示抗

体可变区序列。为编码互补决定区（CDR）的核苷酸有下划线。

图 2 显示了鼠抗体 20C2 以及人源化抗体 Hu20C2（CDR 嫁接）和 Hu20C2A3（嵌饰，veneered）的重链（图 2A）和轻链（图 2B）可变区氨基酸序列的比较。序列被显示为 20C2 小鼠序列、最同源的人类基因组序列和人源化序列之间的比较。鼠 20C2 和人源化 Hu20C2A3 之间在框架区中的序列差异为粗体。人源化 Hu20C2A3 和鼠 20C2 之间在下划线的 CDR 区中的序列差别显示为粗体，并用\*表示。CDR 有下划线。

图 3 显示了人源化抗 ADDL 抗体 Hu20C2（CDR 嫁接）的重链（图 3A 和 3B）和轻链（图 3C）可变区（分别为 HCVR 和 LCVR）的核酸序列。产生了两个 Hu20C2 重链的人源化版本（HCVRA 和 HCVRB），它们在 24 位上有一个氨基酸的差别。在 Hu20C2 HCVRA 中使用了人类的氨基酸，而在 Hu20C2 HCVRB 中使用了小鼠的氨基酸。可变区序列被克隆到完整重链和轻链抗体表达载体中。

图 4 显示了在 Fab 噬菌体展示载体 pFab4 中标注的 Hu20C2 人源化抗体的氨基酸序列和核苷酸序列。如图所示，在 Fab 噬菌体展示载体 pFab4 中，Hu20C2 人源化抗体的重链 A 版本（图 4A）、重链 B 版本（图 4B）和轻链（图 4C）的氨基酸序列位于斜体和下划线的区域中。pFab4 载体中与 Hu20C2 的轻链融合的重链 A 版本的核苷酸序列显示在图 4D-4E 中，其中编码 Hu20C2 抗体序列的序列显示为小写字母。

图 5 描绘了在分别用于产生亲和性成熟的 Hu20C2 轻链和重链 CDR3 的两个轻链 CDR3 文库，即 LC3-1 和 LC3-2（图 5A），以及 3 个重链 CDR3 文库，即 20C2B-39HC<sub>3</sub>-1、20C2B-39HC<sub>3</sub>-2 以及 20C2B-39HC<sub>3</sub>-3（图 5B）的制备中使用的设计和引物。用于克隆的限制性内切酶识别位点用斜体表示。大写字母表示编码抗体可变区序列的核酸。编码 CDR 的核酸被下划线。指出了生物素标记的引物。

图 6 显示了人类抗体恒定区的氨基酸序列与 IgG2m4 的序列的比较。星号表示 Asn297 位的糖基化位点。FcRn 结合的区域被指出。IgG2m4 与 IgG2 不同的序列被下划线。

图 7 显示了抗 ADDL 抗体 Hu20C2A3 的全长 IgG2m4 人源化重链（图 7A 和 7B）和人源化  $\kappa$  轻链（图 7C 和 7D）的氨基酸（图 7A 和

7C) 和核苷酸 (图 7B 和 7D) 序列。下划线表示的是可变区序列。剩余的序列是恒定区序列。

图 8 显示了用 ELISA 测定的 A $\beta$ 40 单体或 ADDL 与两种不同系统 CHO (图 8A) 或毕赤氏酵母 (Pichia) (图 8B) 产生的 Hu20C2A3 的相互作用。

图 9 显示了 Hu20C2A3 对 bADDL 与初级海马神经元结合的抑制。

图 10 显示了 Hu20C2A3 的荧光热熔分析。

图 11 显示了 APP-YAC 小鼠在静脉注射 Hu20C2A3、无关的对照或介质之后, 血浆的 A $\beta$ x-40 水平 (pM)。Hu20C2A3 通过 CHO 细胞或毕赤氏酵母 (Pichia) 的稳定转染制备。A $\beta$ x-40 使用 4G8/G2-10 ELISA 测定。\*\*\*, 通过 Tukey- Kramer HSD post-hoc 检验,  $p < 0.001$ 。误差棒 = SEM; N=6/组。

## 发明详述

差异性识别 A $\beta$  衍生的可扩散配体 (即 ADDL) 的多维构象的单克隆抗体现在已经产生。本发明的抗体衍生自鼠单克隆抗体 20C2。本领域中已知鼠 20C2 表现出以下特征。鼠 20C2 是一种 IgG1 抗体, 能够与结合在培养的海马细胞上的合成的和内源的 ADDL 结合。此外, 该抗体可以阻断内源的和合成的 ADDL 与培养细胞的结合、降低生物素化的 ADDL (bADDL) 与神经元的结合、以及阻止  $\tau$  磷酸化。20C2 的核心线性表位是 Glu- Phe-Arg-His-Asp-Ser (SEQ ID N0:1), 对应于 A $\beta$  1-42 的 3-8 位氨基酸残基, 具有依赖于 A $\beta$  的 17-42 位残基中的元件的构象表位, 但是只有在组装时才具有。

本抗体被人源化, 并且在某些实施方案中是鼠 20C2 的亲性和成熟的衍生物。与鼠 20C2 抗体相似, 本文公开的抗体表现出对于 ADDL 的多维构象的高度选择性, 对单体 A $\beta$  肽具有最小的检测能力。有利的是, 本抗体能够鉴别阿茨海默氏病脑切片中的内源性寡聚体并抑制 bADDL 与神经元的结合。此外, 本抗体显著并强有力地增加了血浆 A $\beta$  x-40 的水平, 这种增加已知与脑中 A $\beta$  的远程降低有关。因此, 本发明

的抗体在阻止 ADDL 与神经元的结合和 ADDL 的组装、以及与 ADDL 有关的疾病包括阿茨海默氏病的治疗中发现应用。

因此，本发明是差异性识别 ADDL 的一种或多种多维构象的分离的抗体。本发明的抗体，当它基本上没有其它同样类型的生物大分子存在时，被说成是分离的。因此，“分离的抗体”是指基本上不含其它抗体的抗体；但是，分子可以包括一些额外的不会有害影响抗体基本性质（例如结合特异性、中和活性等）的试剂或实体。

能够特异性结合 ADDL 的一种或多种多维构象的抗体，结合从 A $\beta$  1-42 的寡聚化得到的特定 ADDL，但是象鼠 20C2 一样，不与其它的 A $\beta$  肽，即 A $\beta$  1-12、A $\beta$  1-28、A $\beta$  1-40 和 A $\beta$  12-28 交叉反应，正如通过 western 印迹分析所确定的那样；并且倾向于结合溶液中的 ADDL。两个实体之间的特异性结合一般是指至少  $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$  或  $10^{10} \text{ M}^{-1}$  的亲和性。大于  $10^8 \text{ M}^{-1}$  的亲和性预期是实现特异性结合所需的。

在特定的实施方案中，能够特异性结合一种或多种 ADDL 的多维构象的抗体也是针对 ADDL 的多维构象产生的（即用其免疫动物）。在其它实施方案中，能够特异性结合一种或多种 ADDL 的多维构象的抗体是针对低的 n 元形成（n-mer-forming）肽例如 A $\beta$  1-42 [Nle35-Dpro37]而产生的。

术语“表位”是指与 B 和/或 T 细胞反应的抗原上的位点，或者抗体将针对其产生和/或抗体将与其结合的分子上的位点。例如，表位可以被规定该表位的抗体所识别。

线性表位是其中氨基酸的一级序列包含了被识别的表位的表位。线性表位典型包括至少 3 个、更通常至少 5 个、例如大约 6 个到大约 10 个独特序列的氨基酸。

与线性表位相反，构象表位是其中包含表位的氨基酸的一级序列不是被识别的表位的唯一决定成分的表位（例如其中氨基酸的一级序列不必需被规定表位的抗体所识别的表位）。典型情况下，相对于线性表位来说，构象表位包括了更大数量的氨基酸。至于构象表位的识别，抗体识别肽或蛋白的三维结构。例如，当蛋白分子折叠形成三维结构时，形成构象表位的某些氨基酸和/或多肽骨架变得并置在一起，使得抗体能够识别表位。确定表位的构象的方法包括但不限于例如 X-射线晶体学、二维核磁共振光谱学和位置定向自旋标记以及电子顺磁共振光谱学。参见例如 Morris 主编的《分子生物学方法》（1996 年）第 66 卷（Methods in Molecular Biology(1996) vol.66）中的《表位作图规程》（Epitope Mapping Protocols）。

A $\beta$  衍生的可扩散的配体或 ADDL 是指淀粉样肽  $\beta$ 1-42 的可溶性寡聚物，预期由少于 8 个或 9 个淀粉样肽  $\beta$ 1-42 的聚集物构成，被发现与阿茨海默氏病有关。它与高分子聚集的中间体相反，后者形成导致纤维形成的胶束刺毛。

正如本文所列举的那样，本抗体结合或识别 ADDL 的至少一种多维构象。在特定的实施方案中，本抗体结合 ADDL 的至少 2 种、至少 3 种或至少 4 种多维构象。ADDL 的多维构象旨在包含二聚体、三聚体、四聚体、五聚体、六聚体、七聚体、八聚体、九聚体、十聚体等，正如通过 SDS-PAGE 分析所确定的那样。由于三聚体、四聚体等的名称能够随着所使用的分析方法而不同（参见例如 Bitan, 等 (2005) Amyloid 12:88-95），本文中使用的三聚体、四聚体等的定义是按照 SDS-PAGE 分析做出的。因而，本发明的抗体具有寡聚体特异性的性质。在特定的实施方案中，ADDL 的多维构象与特定的多肽结构相关，所述多肽结构产生被本发明的抗体识别的构象表位。在其它实施方案中，本发明的抗体特异性结合大小范围大约为三聚体或四聚体、分子量超过 50 kDa 的多维构象 ADDL。

在某些实施方案中，除了与多维构象结合之外，本抗体还与淀粉样肽  $\beta$  1-42 的选定的线性表位结合。ADDL 的线性表位意指位于淀粉样肽  $\beta$  1-42 的 N-末端 10、11、12、15 或 20 个氨基酸残基中的 4、5、6 或更多个氨基酸残基肽。在特定的实施方案中，本发明的抗体与淀粉样肽  $\beta$  1-42 的 1-10、1-8、3-10 或 3-8 位残基内的线性表位特异性结合。被本发明的人源化抗体结合的示例性淀粉样肽  $\beta$  1-42 的线性表位是氨基酸残基 Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser (SEQ ID NO:1)。

尽管本发明的抗体可能具有相似的线性表位，但这些线性表位并不能完全指示本发明抗体的结合性质（即阻断 ADDL 与神经元结合、防止  $\tau$  磷酸化和抑制 ADDL 组装的能力），这是因为正如本领域的专业技术人员所熟知的那样，线性表位可能仅仅相当于抗原表位的一部分（参见例如 Breitling 和 Dubel (1999) 《重组抗体》 (Recombinant Antibodies), John Wiley & Sons, Inc., NY, 115 页)。例如，鼠 20C2 已知结合电荷反转的、截短的 A $\beta$ 7-42 肽的组装体，该组装体缺少 20C2 的线性表位（即 3-8 位的氨基酸残基），并含有非常不同的对应于 A $\beta$  的 7-16 位残基的序列。因此，20C2 及其人源化衍生物，与依赖于来自 A $\beta$  的 17-42 位残基内元件的构象表位结合，但是只是在多维构象中时才结合。本发明的抗体与现有工艺中的抗体的区别在于能够差异识别多维 ADDL，因此能够差异阻断 ADDL 与神经元的结合、差异阻止  $\tau$  磷酸化和差异抑制 ADDL 组装。

合乎本发明使用的抗体包括但不限于单克隆抗体、及其嵌合、人类（例如从 B 细胞中分离）、人源化、中和、双特异性或单链抗体。在一个实施方案中，本发明的抗体是单克隆抗体。为了生产抗体，可以通过用合成的或天然的 ADDL 注射来免疫各种宿主，包括山羊、兔、鸡、大鼠、小鼠、人类等。生产抗体的方法在本领域中是众所周知的。参见例如 Kohler 和 Milstein ((1975) Nature 256:495-497) 和 Harlow 和 Lane 的 (《抗体：实验室手册》Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1988)))。

根据宿主的种类，可以使用各种佐剂来增强免疫应答。合乎本发明使用的佐剂应该增强对 ADDL 的内在应答，而不在免疫原中引起影响应答的定性形式的构象变化。特别适合的佐剂包括 3-脱氧酰化的单磷酸脂 A (MPL™; RIBI ImmunoChem Research Inc., Hamilton, MT; 参见 GB 2220211) 和水包油乳液，例如鲨烯或花生油，任选与免疫刺激剂组合，例如单磷酸脂 A (参见 Stoute, 等 (1997) N. Engl. J. Med. 336:86-91)、胞壁酰基肽 (例如，N-乙酰胞壁酰-L-苏氨酸-D-异谷氨酰胺 (thr-MDP)、N-乙酰-去甲胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酰胺 (nor-MDP)、N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酰胺基-L-丙氨酸-2-(1'-2'-二棕榈酰-sn-甘油基-3-羟基磷酸氧基)-乙胺 (E-PE)、N-乙酰葡萄糖胺基-N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酰胺-L-丙氨酸-二棕榈酰氧基丙胺 (DTP-DPP))，或其它细菌细胞壁组分。水包油乳液的具体例子包括 MF59 (WO 90/14837)，含有 5% 鲨烯、0.5% TWEEN™ 80 和 0.5% SPAN 85 (任选包含不同量的 MTP-PE)，使用微射流纳米均质机 (microfluidizer) 例如 110Y 型微射流纳米均质机 (Microfluidics, Newton, MA) 配制成亚微米颗粒; SAF, 含有 10% 鲨烯、0.4% TWEEN™ 80、5% PLURONIC® 阻断的聚合物 L121 和 thr-MDP，或者微射流纳米均质成亚微米乳液或涡旋振荡产生较大粒度的乳液; 以及 RIBI™ 佐剂系统 (RAS) (Ribi ImmunoChem, Hamilton, MT)，含有 2% 鲨烯、0.2% TWEEN™ 80 以及一种或多种细菌细胞壁组分，例如单磷酸脂 A、海藻糖二霉菌酸酯 (TDM) 以及细胞壁骨架 (CWS)。

另一类佐剂是皂苷佐剂，包括 ISCOM (免疫刺激复合物) 和 ISCOMATRIX® (CSL Ltd., Parkville, Australia)。其它适合的佐剂包括弗氏完全佐剂 (CFA)、弗氏不完全佐剂 (IFA)、矿物凝胶例如氢氧化铝、以及表面活性物质例如溶血卵磷脂、PLURONIC® 多元醇、聚阴离子、肽、CpG (WO 98/40100)、匙孔血蓝蛋白、二硝基苯酚和细胞因子例如白介素 (IL-1、IL-2 和 IL-12)、巨噬细胞集落刺激因子 (M-CSF) 和肿瘤坏死因子 (TNF)。在用于人类的佐剂中，BCG (卡介苗) 和短

小棒状杆菌（*Corynebacterium parvum*）是特别适合的。

针对多维构象 ADDL 的抗体是通过用 ADDL 免疫动物来产生的。一般来说，ADDL 可以合成产生，或通过重组体片段表达和纯化来产生。合成的 ADDL 可以按照本文公开的或依照美国专利 No. 6,218,506 或共同待决的申请美国序号 60/621,776、60/652,538、60/695,528 和 60/695,526 中公开的方法来制备。此外，ADDL 可以与另一个蛋白例如匙孔血蓝蛋白融合，以产生针对嵌合分子的抗体。ADDL 可以在构象上受约束，以形成本文描述的有用的表位，此外可以与表面相连，例如物理连接或化学键合于表面，其方式使得允许产生被本发明的抗体识别的构象。

针对 ADDL 的多维构象的单克隆抗体，可以使用提供用来通过培养连续细胞系生产抗体分子的任何技术来制备。这些技术包括但不限于杂交瘤技术、人类 B-细胞杂交瘤技术和 EBV-杂交瘤技术（Kohler, 等 (1975) *Nature* 256:495-497; Kozbor, 等 (1985) *J. Immunol. Methods* 81:31-42; Cote, 等 (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80:2026-2030; Cole, 等 (1984) *Mol. Cell Biol.* 62:109-120）。

在特定的实施方案中，本发明的抗体被人源化。人源化的或嵌合的抗体可以通过将小鼠的抗体基因与人类抗体基因进行剪接、以获得具有适合的抗原特异性和生物学活性的分子来生产（参见 Morrison, 等 (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 6851-6855; Neuberger, 等 (1984) *Nature* 312:604-608; Takeda, 等 (1985) *Nature* 314:452-454; Queen, 等 (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:10029-10033; WO 90/07861）。例如，小鼠的抗体在噬菌体选择载体中被表达为 Fv 或 Fab 片段。轻链的基因（在平行实验中用重链的基因）与人类抗体基因的文库进行交换。然后鉴定出仍然结合抗原的噬菌体抗体。这种方法，通常被称为链改组，提供了人源化的抗体，该抗体将与它所起源的小鼠抗体一样，结合同样的表位（Jespers, 等 (1994) *Biotechnology NY* 12:899-903）。作

为一种替代，链改组可以在蛋白质水平上进行（参见 Figini, 等 (1994) J. Mol. Biol. 239:68-78）。

人类抗体也可以使用噬菌体展示方法来获得。参见例如 WO 91/17271 和 WO 92/01047。在这些方法中，噬菌体文库产生，其中的成员在它们的外表面上展示不同的抗体。抗体通常被展示为 Fv 或 Fab 片段。具有所需特异性的噬菌体展示抗体通过对 ADDL 的亲性和富集来筛选。针对 ADDL 的人类抗体也可以从非人类的转基因动物来生产，该动物具有编码人类免疫球蛋白基因座的至少一个片段和失活的内源免疫球蛋白基因座的转基因。参见例如 WO 93/12227 和 WO 91/10741。人类抗体可以通过竞争性结合实验或者其它方式来筛选，以具有与特定的小鼠抗体相同的表位特异性。这样的抗体一般保留了小鼠抗体的有用的功能性质。也可以提供血清形式的人类多克隆抗体，来自用免疫原性剂免疫的人类。任选，这样的多克隆抗体可以通过亲和纯化，使用 ADDL 作为亲和试剂，进行浓缩。

正如本文所例举，人源化的抗体也可以通过对鼠抗体进行嵌饰或表面重建来产生。嵌饰包括只将小鼠重链和轻链可变区中的表面固定区氨基酸用同源人类抗体序列的相应区域中的氨基酸替代。小鼠表面氨基酸用来自同源人类序列同样位置中的人类残基来替换，已经显示出降低了小鼠抗体的免疫原性，同时保持了其配体结合。替换外部的残基一般对内部结构域或结构域间的接触仅有很小的影响或没有影响。（参见例如美国专利 No. 6,797,492）。

人类或人源化抗体可以被设计为具有 IgG、IgD、IgA、IgM 或 IgE 恒定区，和任何同种型，包括 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4。在特定的实施方案中，本发明的抗体是 IgG 或 IgM 或其组合。本发明的其它实施方案包含了通过将人类 IgG4 序列选择性整合到标准的人类 IgG2 恒定区中而形成的恒定区。示例的突变体 IgG2 Fc 是 IgG2m4，在本文中显示为 SEQ ID NO: 140。抗体可以被表达为含有两条轻链和两条重链

的四聚体、分离的重链和轻链、或其中的重链和轻链可变结构域通过间隔区连接的单链抗体。生产单链抗体的技术在本领域中是众所周知的。

示例的鼠 20C2 单克隆抗体的人源化抗体衍生物在本文中通过 CDR 嫁接和嵌饰来提供。IgG2M4 重链可变区、以及通过嵌饰产生的人源化 20C2 (即 Hu20C2A3) 的  $\kappa$  轻链可变区的氨基酸序列显示在图 7A 和 7C 中, 在本文中显示为 SEQ ID NO: 141 和 SEQ ID NO: 143。

也考虑到了双抗体。双抗体是指工程化的抗体构建体, 通过分离结合抗体的结合结构域(重链和轻链的)、并提供连接基团以连接或操作地连接同一条多肽链上的重链和轻链从而保留了结合功能来制备(参见 Holliger 等 (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444; Poljak (1994) *Structure* 2:1121-1123)。这在本质上来说形成了彻底简化的抗体, 仅仅具有结合抗原所必需的可变结构域。通过使用短得不允许同样链上的两个结构域之间配对的接头, 迫使结构域与另一条链上的互补结构域配对并产生两个抗原结合位点。这些二聚体抗体片段、或双抗体, 是双价的和双特异性的。专业技术人员将会认识到可以使用任何产生双抗体的方法。适合的方法由 Holliger 等 (1993)(同上)、Poljak (1994)(同上)、Zhu 等 (1996) *Biotechnology* 14:192-196 和美国专利 No. 6,492,123 描述, 在此合并引为参考。

本发明的分离的抗体的片段也明确地被本发明所包含。片段意指包含 Fab 片段、 $F(ab')_2$  片段、 $F(ab')$  片段、双特异性 scFv 片段、Fd 片段和通过 Fab 表达文库产生的片段、以及肽适配体。例如  $F(ab')_2$  片段是通过用胃蛋白酶消化本发明的抗体分子而产生的, 而 Fab 片段是通过还原  $F(ab')_2$  片段的二硫桥而产生的。或者, 可以构建 Fab 表达文库, 以允许按照快速而容易地鉴定具有所需特异性的单克隆 Fab 片段(参见 Huse 等 (1989) *Science* 254:1275-1281)。在特定的实施方案中, 本发明的抗体片段是保留了其可变区结合位点的中和抗体的片段。例子

有 F(ab')<sub>2</sub> 片段、F(ab') 片段和 Fab 片段。总的来说参见《免疫学基本方法》(Immunology: Basic Processes) (1985) (第二版), J. Bellanti 主编, 95-97 页。

差异识别 ADDL 的多维构象的肽适配体可以在适配体文库(例如 Aptanomics SA, Lyon, France 所提供的)中被合理地设计或筛选。一般来说, 肽适配体是根据抗体结构设计的合成的识别分子。肽适配体由可变的肽环构成, 所述肽环在两端与蛋白支架相连。这种双重结构约束将肽适配体的结合亲和性极大地提高到了可以与抗体相比的水平(纳摩尔范围)。

为用于生产本发明的抗体和抗体片段的重链和轻链可变区编码的示例性核酸序列在本文中分别公开在图 7B 和 7D 中(即 SEQ ID NO: 142 和 144)。正如专业技术人员所体会的那样, 本文公开的重链可变区可以与任何一个本文公开的轻链可变区相结合, 以产生具有修改的亲和性、解离常数、表位等的抗体。

本发明的抗体或抗体片段可以具有与其连接的其它基团。例如, 如美国专利 No. 4,493,825 所述, 微球或微粒可以连接到抗体或抗体片段上, 该专利的公开内容在此合并引为参考。

此外, 特定的实施方案包括了抗体或抗体片段, 其为了增加的抗原亲和性、中和活性(即阻断 ADDL 与神经元细胞结合的能力或阻断 ADDL 组装的能力)、或改变的解离常数进行突变并筛选。大肠杆菌(E.coli)突变菌株(Low, 等(1996) J. Mol. Biol. 260 :359-368)、链改组(Figini, 等(1994) 同上)和 PCR 突变发生是已确定的用于编码抗体的核酸分子突变的方法。作为说明, 可以通过将大量噬菌体抗体与少量生物素化抗原相接触以便抗体竞争结合, 从而筛选增加的亲和性。在这种情况下, 抗原分子的数量应超过噬菌体抗体的数量, 但是抗原的浓度应该稍微低于解离常数。因此, 主要的亲和性增加的突变噬菌

体抗体与生物素化抗原结合，而较大部分的弱亲和性噬菌体抗体保持不结合。然后链亲和素能够帮助从混合物中富集具有较高亲和性的突变噬菌体抗体（Schier, 等 (1996) J. Mol. Biol. 255:28-43）。示例性亲和成熟的轻链 CDR3 氨基酸序列在本文中公开（参见表 6 和 7），在特定的实施方案中包含轻链 CDR3 氨基酸序列 Xaa<sub>1</sub>-Gln-Xaa<sub>2</sub>-Thr-Arg-Val-Pro-Leu-Thr (SEQ ID NO: 2)，其中 Xaa<sub>1</sub> 是 Phe 或 Leu, Xaa<sub>2</sub> 是 Ala 或 Thr。本文中也提供了亲和成熟的重链 CDR3 氨基酸序列。示例性重链 CDR3 氨基酸序列在本文中显示为 Arg-Gln-Leu-Gly-Thr-Arg-Gly-Thr-Asp-Ala-Met-Asp-Tyr (SEQ ID NO: 3)。本发明还包含了这种 CDR3 的衍生物，例如 Arg-Ala-Leu-Ser-Pro-Arg-Ser-Ile-Asp-Ala- Met-Asp-Tyr (SEQ ID NO:4)、Arg-Gln-Leu-Gly-Ala-Arg-Lys-Thr- Asp-Ala-Met-Asp-Tyr (SEQ ID NO: 5)、Arg-Gln-Leu-Gly-Pro-Arg- Lys-Arg-Asp-Ala-Met-Asp-Tyr (SEQ ID NO: 6)、Arg-Gln-Leu-Gly- Lys-Leu-Lys-Thr-Asp-Ala-Met-Asp-Tyr (SEQ ID NO:7) 或 Arg-Gln-Leu-Gly-Arg-Arg-Ser-Val-Asp-Ala-Met-Asp-Tyr (SEQ ID NO: 8)，其中与 Hu20C2A3 重链 CDR3 的差别被下划线。就此，本发明特别包含了抗 ADDL 抗体，它具有 CDR3 氨基酸序列 Arg-Xaa<sub>1</sub>-Leu-Xaa<sub>2</sub>-Xaa<sub>3</sub>-Xaa<sub>4</sub>-Xaa<sub>5</sub>-Xaa<sub>6</sub>- Asp-Ala-Met-Asp-Tyr (SEQ ID NO: 9)，其中 Xaa<sub>1</sub> 是 Gln 或 Ala, Xaa<sub>2</sub> 是 Ser 或 Gly, Xaa<sub>3</sub> 是 Pro、Ala、Lys、Arg 或 Thr, Xaa<sub>4</sub> 是 Lys 或 Arg, Xaa<sub>5</sub> 是 Gly、Ser 或 Lys, Xaa<sub>6</sub> 是 Val、Thr、Ile 或 Arg。

其它涵盖在本发明范围内的抗体衍生物包括任何除了在轻链框架区中具有一个氨基酸残基的差异之外与 Hu20C2A3 的可变区完全相同的人源化抗体（例如 Leu-Pro-Val-Thr-Pro-Gly- Glu-Pro-Ala-Ser, SEQ ID NO:10）。

对于某些治疗应用来说，可能希望降低抗体从抗原上的解离。为了达到这种目的，将噬菌体抗体结合到生物素化抗原上，并加入过量的未生物素化抗原。经过一段时间之后，可以用链亲和素主要收集具

有较低解离常数的噬菌体抗体（Hawkins, 等（1992）J. Mol. Biol. 226:889-96）。

可以使用各种免疫分析方法，包括在本文中公开的方法，来筛选以鉴定对 ADDL 的多维构象具有所需特异性的抗体或其片段。使用多克隆或单克隆抗体或其片段，进行竞争性结合（例如 ELISA）、乳胶凝集分析、免疫放射分析、动力学（例如 BIACORE™ 分析）的众多方案在本领域中是公知的。这样的免疫分析典型地包括测定特定抗体与其关联抗原之间的复合物的形成。利用与两个互不干扰的表位进行反应的单克隆抗体进行的双位点、基于单克隆抗体的免疫分析方法是适合的，但是竞争性结合分析也可以使用。这样的分析也可以用于检测样品中 ADDL 的多维构象。

抗体或抗体片段也可以经历其它的生物活性分析，例如 ADDL 与神经元或培养的海马细胞结合的置换或阻断 ADDL 的组装，以便评估其中和或药理活性及其作为预防性或治疗性药剂的潜在效能。这样的分析在本文中描述，并且在本领域内是众所周知的。

抗体和抗体片段可以以杂交瘤生产和维持，或者在任何成熟的表达系统中通过重组生产，这些表达系统包括但不限于大肠杆菌、酵母（例如酵母菌和毕赤氏酵母菌）、杆状病毒、哺乳动物细胞（例如骨髓瘤、CHO、COS）、植物、或转基因动物（Breitling 和 Dubel (1999) 《重组抗体》，Recombinant Antibodies, John Wiley & Sons, Inc., NY, 119-132 页）。抗体和抗体片段可以使用任何适合的方法来分离，包括但不限于亲和层析、免疫球蛋白结合分子（例如蛋白 A、L、G 或 H）、与抗体或抗体片段可操作地连接的标签（例如 His-标签、FLAG®-标签、Strep 标签、c-myc 标签）等。参见 Breitling 和 Dubel (1999)，同上。

本发明的抗体和抗体片段具有各种用途，包括诊断与 ADDL 蓄积有关的疾病、阻断或抑制 ADDL 与神经元细胞的结合、阻断 ADDL 的

组装、预防性或治疗性治疗与 ADDL 有关的疾病、鉴定阻止 ADDL 与神经元结合的治疗剂、和阻止  $\tau$  蛋白在 Ser202/Thr205 的磷酸化。

本发明的抗体和抗体片段也可用于阻断或抑制 ADDL 与神经元细胞结合的方法中。本发明的这种方法是通过在体外或体内将神经元与本发明的抗体或抗体片段相结合、使得 ADDL 与神经元的结合被阻断来进行的。在特定的实施方案中，本发明的抗体或抗体片段使 ADDL 的结合与不存在抗体或抗体片段的情况下 ADDL 的结合相比，降低了至少 15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95% 或 97%。抗体可以阻断 ADDL 与神经元结合的程度可以依照本文公开的方法来确定，即免疫细胞化学或基于细胞的碱性磷酸酶分析或任何其它适合的分析。对于降低 ADDL 与神经元细胞的结合特别有用的抗体包括具有 SEQ ID NO: 9 中描述的 CDR3 氨基酸序列的抗 ADDL 抗体，及其衍生物和片段。

本发明的抗体和抗体片段还可用于阻断或抑制 ADDL 组装的方法中。该方法包括将含有淀粉样  $\beta$  1-42 肽的样品与本发明的抗体或抗体片段相接触，使得 ADDL 的组装被抑制。抗体能够阻断 ADDL 组装的程度可以依照本文公开的方法来确定，即 FRET 或荧光偏振或任何其它适合的分析。对于阻断 ADDL 的组装特别有用的抗体包括具有 SEQ ID NO: 9 中描述的 CDR3 氨基酸序列的抗 ADDL 抗体，及其衍生物和片段。

本文公开的抗体也可用于阻止  $\tau$  蛋白在 Ser202/Thr205 位磷酸化的方法中。该方法包括将含有  $\tau$  蛋白的样品与本发明的抗体或抗体片段相接触，使得 ADDL 与神经元的结合被阻断，从而阻止  $\tau$  蛋白的磷酸化。抗体可以阻止  $\tau$  蛋白在 Ser202/Thr205 位磷酸化的程度可以按照本文公开的方法或任何其它适合的分析来确定。

阻断或降低 ADDL 与神经元的结合、抑制 ADDL 的组装、以及阻

止  $\tau$  蛋白在 Ser202/Thr205 位上的磷酸化，都在预防性或治疗性治疗与 ADDL 的蓄积相关的疾病的方法中发现了应用。因此，本发明也包含了本发明的抗体或抗体片段预防或治疗与 ADDL 蓄积有关的疾病的应用（例如阿茨海默氏病或类似的与记忆有关的病症）。本领域中的证据表明， $A\beta$  水平升高、而不必是聚集的斑块，是与阿茨海默氏病有关的痴呆和随后的  $\tau$  异常的原因。 $A\beta$  衍生的可扩散配体直接涉及了与阿茨海默氏病有关的神经毒性。本领域指出，在转基因小鼠和阿茨海默氏病患者中，ADDL 升高了，并在动物模型中调节了与记忆过程有关的功能活性。因此，除去这种形式的  $A\beta$  可以减轻与阿茨海默氏病有关的神经毒性。同样地，使用降低中枢神经系统 ADDL 负荷的本发明抗体进行治疗，可以被证明对于阿茨海默氏病的治疗是有效的。顺应治疗的患者包括具有疾病的风险但是没有表现出症状的个体，以及目前已经表现出症状的患者。在阿茨海默氏病的情况下，如果他或她活得足够长的话，实际上任何人都处于罹患阿茨海默氏病的风险之中。因此，本发明的抗体或抗体片段可以给普通人群进行预防性给药，而不需要对目标患者的任何风险评估。本方法对于已知具有阿茨海默氏病遗传风险的个体来说是特别有用的。这样的个体包括那些有亲属已经被诊断出疾病的个体，以及其风险通过遗传或生物化学标记物分析被确定的个体。阿茨海默氏病风险的遗传标记物包括 APP 基因中的突变，特别是 717 位以及 670 和 671 位的突变，它们分别被称为 Hardy 突变和 Swedish 突变。其它的风险标记物是早老蛋白基因 PS1 和 PS2 以及 ApoE4 中的突变，阿茨海默氏病家族史，高胆固醇血症或动脉粥样硬化。目前罹患阿茨海默氏病的个体可以从特征性痴呆以及存在上述风险因素来识别。此外，已经有多种诊断检验可用于鉴定患有阿茨海默氏病的个体。这些包括测量 CSF  $\tau$  和  $A\beta$  1-42 的水平。罹患阿茨海默氏病的个体也可以通过 ADRDA 标准或本文公开的方法来诊断。

在无症状的患者中，治疗可以在任何年龄时开始（例如 10、20、30 岁）。但是，通常在病人达到 40、50、60 或 70 岁之前，不一定开始治疗。治疗一般需要在一段时间内使用多个剂量。治疗可以通过分

析 ADDL 随时间的存在来监测。

在治疗性应用中，含有本发明的抗体或抗体片段的药物组合物或药物，施用于怀疑、或已经罹患这样的与 ADDL 蓄积有关的疾病的患者，其量足够治愈或至少部分阻止疾病的症状（生物化学、组织学和/或行为），包括其在疾病发展过程中的并发症和中间病理表现型。在预防性应用中，含有本发明的抗体或抗体片段的药物组合物或药物，施用于易感与 ADDL 蓄积有关的疾病或者处于其风险下的患者，其量足够在患者中实现被动免疫，从而消除或降低疾病的风险、减轻疾病的严重性、或延迟疾病的发作，包括疾病的生物化学、组织学和/或行为症状，疾病发展过程中出现的其并发症和中间病理表现型。在某些方法中，药剂的施用降低或消除了还没有发展出特征性阿茨海默氏病理的患者的记忆认知（myocognitive）损伤。在特定的实施方案中，本发明的抗体或抗体片段的有效量，是在患者中实现 ADDL 与神经元的结合与不治疗情况下 ADDL 的结合相比，降低了至少 15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或 97% 的量。同样地，对长期增强/记忆形成的损伤也被降低了。

用于治疗上述病症的本发明组合物的有效剂量依赖许多不同的因素而变化，包括给药方式、患者的生理状态、患者是人类还是动物、施用的其它药物、以及治疗是预防性的还是治疗性的。通常下，患者是人类，但是非人类的哺乳动物例如狗或转基因哺乳动物也可以治疗。

治疗剂量一般被渐增到最优安全性和效能。对于使用抗体或抗体片段的被动免疫来说，适合的剂量范围是从大约 0.0001 到 100 mg/kg 宿主体重，更通常为 0.01 到 5 mg/kg 宿主体重。例如，剂量可以是 1 mg/kg 体重或 10 mg/kg 体重或在 1-10 mg/kg 范围内。在某些方法中，同时施用两种或多种具有不同结合特异性的本发明的抗体，在这种情况下，每种施用的抗体的剂量处于所指示的范围内。抗体通常需要多次施用，单剂之间的时间间隔可以以周、月或年计。示例的治疗方案

需要两周或每月皮下用药一次。有利的是，已经发现皮下用药减少了与静脉输注有关的类似流感的症状（Lundin, 等 (2002) Blood 100:768-773）。时间间隔也可以是不规则的，按照测量患者血液中针对 ADDL 的抗体水平的指示。在某些方法中，剂量被调整到使血浆抗体浓度达到 1-1000  $\mu\text{g/mL}$ ，在某些方法中为 25-300  $\mu\text{g/mL}$ 。或者，抗体或抗体片段可以作为缓释制剂给药，在这种情况下，需要的给药频率较少。剂量和频率根据患者中抗体的半衰期而变化。一般来说，人类或人源化抗体比嵌合抗体和非人类抗体具有更长的半衰期。正如上面指明的那样，用药的剂量和频率可以根据治疗是预防性的还是治疗性的而变化。在预防性应用中，可以在长时期中以相对不频繁的时间间隔施用相对低的剂量。某些患者在他们的余生中持续接受治疗。在治疗性应用中，有时需要以相对短的时间间隔使用相对高的剂量，直到疾病的发展被减缓或终止，并优选直到患者显示出疾病症状的部分或完全缓解。然后，患者可以按照预防性方案用药。

本发明的抗体和抗体片段可以作为药物组合物或药物的成分给药。药物组合物或药物一般含有活性治疗剂和各种其它的可药用的成分。参见的《雷氏药物科学与实践》（Remington: The Science and Practice of Pharmacy），Alfonso R. Gennaro 主编，第二十版，Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 2000。其优选的形式依赖于目标给药方式和治疗应用。根据所需的制剂，药物组合物可以包含可药用的、无毒载体或稀释剂，它们被定义为通常用于配制为动物或人类给药的药物组合物的介质。选择稀释剂使得不影响组合的生物学活性。这样的稀释剂的例子是蒸馏水、生理磷酸盐缓冲盐水、Ringer's 溶液、右旋糖溶液和 Hank's 溶液。

药物组合物也可以含有大的、缓慢代谢的大分子，例如蛋白、多糖如壳聚糖、聚乳酸、聚羟基乙酸和共聚物（例如乳胶官能化的 SEPHAROSE<sup>TM</sup>、琼脂糖、纤维素等）、聚合的氨基酸、氨基酸共聚物和脂类聚集体（例如油滴或脂质体）。

本发明的药物组合物或药物的给药可以通过各种途径进行，包括但不限于口、局部、肺、直肠、皮下、真皮内、鼻内、颅内、肌肉内、眼内或关节内注射等。最典型的给药途径是静脉内，然后是皮下，尽管其它途径能够同样有效。也可以在臂或腿的肌肉内进行肌肉注射。在某些方法中，药剂被直接注射到沉淀物蓄积的特定组织中，例如颅内注射。在某些实施方案中，抗体或抗体片段被直接注射到颅内。在其它的实施方案中，抗体或抗体片段作为缓释组合物或装置给药，例如 MEDIPAD™ 装置。

对于肠胃外给药来说，本发明的抗体或抗体片段可以以可注射剂，该药剂是物质在含有药用载体的生理可接受的稀释剂中的溶液或悬浮液，该药用载体可以是无菌液体，例如水、油、盐水、甘油或乙醇。或者，辅助性物质，例如增湿剂或乳化剂、表面活性剂、pH 缓冲物质等可以在组合物中存在。其它药物组合物的成分是石油、动物、植物或合成来源的成分，例如花生油、大豆油和矿物油。一般来说，二元醇例如丙二醇或聚乙二醇是适合的液体载体，特别是对可注射的溶液来说。抗体能够以长效注射或植入制备物的形式给药，它们配制的方式允许活性成分的持续释放。

示例性组合物包含配制成无菌透明液体的本抗体或抗体片段，浓度为至少 10 mg/ml，在等渗的缓冲盐水中（10 mM 组氨酸，150 mM 氯化钠，0.01% (w/v) POLYSORBATE 80，pH 6.0）。示例性的抗体制剂按单剂装入，0.6 ml 的玻璃注射小瓶中，每瓶装有 3.3 ml 溶液。每个小瓶用涂有特氟隆的塞子塞住，并用铝帽密封。

通常，组合物被制备成注射剂，或是液体溶液或是悬浮液；也可以制备适合于在注射前溶解或悬浮在液体介质中的固体形式。制备物也可以被乳化或包裹在脂质体或微粒中，例如聚丙交酯、聚乙交酯或共聚物中，以增强输送。

对于栓剂来说，粘合剂和载体包括例如聚亚烷基二醇或甘油三酯；这样的栓剂可以从含有范围在 0.5%到 10%、更适宜 1%-2%的活性成分的混合物来形成。

口服制剂包括赋形剂，例如药品级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素和碳酸镁。这些组合物采取溶液、悬浮液、片剂、丸剂、胶囊、缓释制剂或粉末的形式，含有 10%- 95%的活性成分，或更适合的是 25%-70%。

局部应用可以导致透皮或真皮内的输送。局部应用可以通过将药剂与霍乱毒素或其脱毒的衍生物或亚单位或其它类似的细菌毒素共同给药来易化。（参见 Glenn, 等 (1998) *Nature* 391:851）。共同用药可以通过使用成分作为混合物或作为通过化学交联或表达为融合蛋白而获得的连接分子来实现。

或者，透皮输送可以使用皮肤途径或使用转运体（transfersome）来实现（Paul, 等 (1995) *Eur. J. Immunol.* 25:3521-24; Cevc, 等(1998) *Biochem. Biophys. Acta* 1368:201-15）。

本发明的抗体或抗体片段可以任选与在治疗促淀粉样变疾病中至少部分有效的其它药剂组合使用。例如，本抗体可以与现有的阿茨海默氏病的舒缓剂治疗一起施用，例如乙酰胆碱酯酶抑制剂如 ARICEPT™、EXELON™ 和 REMINYL™，以及 NMDA 拮抗剂，NAMENDA™。除了这些被批准的疗法之外，本抗体可以用于为目前在治疗阿茨海默氏病的开发中的几种方法的任何一种提供协同的/附加的好处，这包括但不限于 A $\beta$  生产和聚集抑制剂。

本发明的抗体和抗体片段在鉴别阻止 ADDL 与神经元（例如海马细胞）的结合、从而阻止由 ADDL 引起的下游事件的治疗剂中，也发

现了应用。这样的分析是通过在药剂的存在下将神经元与 ADDL 接触、并使用本发明的抗体或抗体片段测定在药剂的存在下 ADDL 与神经元的结合来进行的。正如本领域的专业技术人员所体会的那样，阻断 ADDL 与神经元结合的药剂，与没有接触药剂时的神经元相比，将减少与神经元结合的 ADDL 的量；这种量在使用本发明的抗体或抗体片段的免疫分析中是可以检测到的。适合用于检测与神经元结合的 ADDL 的免疫分析在本文中被公开。

可以使用本文提供的方法来筛选的药剂包含了大量的化学类别，尽管它们通常为有机分子，优选为分子量大于 100 而小于大约 2,500 道尔顿的小有机化合物。药剂包含了与蛋白发生结构相互作用所必需的官能团，特别是氢键，并通常包括至少胺、羰基、羟基或羧基基团，优选至少两种官能化学基团。药剂经常含有被一个或多个上述官能团取代的环状碳或杂环结构和/或芳香或多芳香结构。药剂也可以是生物分子，包括肽、抗体、糖类、脂肪酸、类固醇、嘌呤、嘧啶、衍生物、结构类似物或其组合。药剂从广泛的各种来源获得，包括天然的或合成的化合物文库。

各种其它的试剂例如盐和中性蛋白可以被包含在筛选分析中。此外，可以提高分析效率的试剂例如蛋白酶抑制剂、核酸酶抑制剂、抗微生物剂等也可以以任何顺序加入，提供必需的结合。

通过本发明的筛选分析鉴定的药剂对于促淀粉样变的疾病和/或  $\tau$  蛋白病的治疗将是有益的。此外，也考虑到了用于示范这些概念的实验系统也代表了研究工具，用于评估、鉴定和筛选与  $\tau$  磷酸化的  $\beta$  淀粉样肽诱导有关的新药物靶。

本发明还提供了使用本发明的抗体或抗体片段检测 ADDL 和诊断与 ADDL 蓄积有关的疾病的方法。与 ADDL 蓄积有关的疾病旨在包括了其中 ADDL 蓄积导致长期增强/记忆形成的生理性损伤的任何疾病。

这种类型的疾病包括但不限于阿茨海默氏病和类似的与记忆相关的病症。

按照这些方法，将来自患者的样品与本发明的抗体或抗体片段相接触，抗体或抗体片段与样品的结合表明了样品中 ADDL 的存在。当在本发明的背景中使用时，样品是指顺应使用免疫分析进行的分析的任何体液或组织。可以按照本发明的方法进行分析的适合的样品包括但不限于来自患者（例如哺乳动物，如人类）脑的活组织检查样品和流体样品。对于体外目的来说（例如在监测寡聚物形成的分析中），样品可以是神经元细胞系或组织样品。对于诊断目的来说，考虑样品可以来自被怀疑患有与 ADDL 蓄积相关的疾病的个体，或来自处于患与 ADDL 蓄积相关的疾病风险下的个体，例如具有使个体易患与 ADDL 蓄积相关的疾病的家族史的个体。

检测抗体或抗体片段与样品中 ADDL 的结合的可以使用任何标准的免疫分析（例如本文公开的）来进行，或者当抗体片段是例如肽适配体时，可以通过例如与适配体融合的可检测的标记蛋白（例如  $\beta$ -半乳糖苷酶、GFP 或荧光素酶）来直接检测结合。然后，ADDL-抗体复合物的存在或不存在分别与样品中 ADDL 的存在或不存在、进而分别和与 ADDL 蓄积相关的疾病的存在或不存在相关联。考虑到了本发明的一种或多种抗体或抗体片段可以与当前基于免疫的无创成像技术结合使用，以极大地提高与 ADDL 蓄积有关的疾病的检测和早期诊断。

为了便于诊断，本发明也提供了含有本发明的抗体或抗体片段的试剂盒。试剂盒包括了容纳一种或多种识别 ADDL 多维构象的抗体或抗体片段的容器，以及使用抗体用于结合 ADDL 以形成抗体-抗原复合物、并检测抗体-抗原复合物的形成使得抗体-抗原复合物的存在或不存在与样品中 ADDL 的存在或不存在相关联的说明书。容器的例子包括允许同时检测多个样品中的 ADDL 的多孔板。

在下面的非限制性的实施例中，本发明将得到更详细的描述。

#### 实施例 1：总体材料和方法

ADDL 制备物：在 F12 培养基（Biosource, Camarillo, CA）中的 ADDL 按照已建立的方法（Lambert 等（2001），同上）从 A $\beta$  1-42 制备。简单来说，将 A $\beta$  1-42 肽（American Peptide Co., Sunnyvale, CA 或 California Peptide Research, Inc., Napa, CA）称重，并放置在能够容纳足够量的 HFIP（1,1,1,3,3,3-六氟-2-丙醇）的玻璃小瓶中，使肽浓度达到 10 mg/mL。将 HFIP 加入到干的肽中，将小瓶盖上帽，轻轻地涡旋混合，将肽/HFIP 溶液储存在室温至少 1 小时。将肽溶液的等分试样（50 或 100  $\mu$ L，分别为 0.5 或 1.0 mg）分配到一系列 1.5 mL 的锥形离心管中。将离心管放置在 SPEEDVAC<sup>®</sup>中过夜以除去 HFIP。将含有干燥的肽膜的管盖上盖，在 -70 $^{\circ}$ C 储存在有干燥剂的密封容器。

使用前，将 A $\beta$  1-42 肽膜从 -70 $^{\circ}$ C 储存处取出，使其回暖至室温。加入新鲜的 DMSO（44  $\mu$ L/mg 肽膜；5 mM），将肽/DMSO 混合物在振荡混合器上以可能的最低速度孵育 10 分钟。将 F12 培养基（2 mL/mg 肽）分配到每个 DMSO/肽管中，将管盖上盖，颠倒混合。将 100  $\mu$ M 制备物在 2-8 $^{\circ}$ C 储存 18 到 24 小时。将样品以 14,000 x g 在 2-8 $^{\circ}$ C 离心 10 分钟。将上清液转移到新的管中，储存在 2-8 $^{\circ}$ C 直到使用。

生物素化 ADDL 制备物（bADDL）按照与上述用于 ADDL 制备物相同的方式进行制备，使用 100% N-末端生物素化的  $\beta$  淀粉样肽（American Peptide Company, Sunnyvale, CA）。

单体制备： $\beta$ (1-40)淀粉样肽 肽（A $\beta$  1-40）的 HFIP 干燥制备物按照制备 A $\beta$  1-42 肽的概述制备。将肽膜溶解在每毫克肽 2 mL 25 mM 的硼酸盐缓冲液中（pH 8.5），分成等份，在 -70 $^{\circ}$ C 冷冻直到使用。

初级神经元：从冷冻的、分离的新生大鼠海马细胞（Cambrex, Corp.,

East Rutherford, NJ ) 制备初级海马细胞培养物, 所述新生大鼠海马细胞被化冻并以每孔 20,000 个细胞的浓度在 96 孔 COSTAR® 板铺板。将细胞维持在不含 L-谷氨酰胺的 NEUROBASAL™ 培养基中 (GIBCO-BRL™, Gaithersburg, MD), 并补充两个星期的 B27 (GIBCO-BRL™, Gaithersburg, MD), 然后用于结合研究。

免疫细胞化学: 免疫细胞化学按照已建立的方法进行 (Lambert, 等 (2001), 同上), 只是将第二抗体与 ALEXAFLUOR® 588 (Molecular Probes, Eugene, OR) 结合。将抗体和 ADDL 以抗体:ADDL 为 1:4 的摩尔比率在室温预孵育 1 小时, 然后应用于 21 天的海马细胞培养。对于内源 ADDL 来说, 将人类脑蛋白 (制备按照 Lambert 等 (2001), 同上) 与细胞孵育 1 小时, 然后如上所述将细胞进行清洗、固定和可视化。

将来自阿茨海默氏病和对照海马的轻微固定的冷冻切片 (4%多聚甲醛在 4°C 30 小时, 和在 40μM 蔗糖中低温保护) 与抗体 (在磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中 1:1000) 在 4°C 孵育过夜。在除去抗体之后, 将切片用 PBS 清洗 3 次, 然后与第二抗体在室温下孵育。然后用 DAB (SIGMA™, St. Louis, MO) 令结合可视化。然后将切片用苏木精复染、固定, 在装备有 SPOT™ INSIGHT™ 数字摄像机 (v. 3.2) 的 NIKON® ECLIPSE® E600 光学显微镜下成像。

ELISA: 将多克隆抗 ADDL IgG (M90/1; Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, TX) 以 0.25mg/孔室温下铺于 IMMULON™ 3 REMOVAWELL™ 条 (Dynatech Labs, Chantilly, VA) 上 2 小时, 用溶于 TBS 的 2% BSA 封闭孔。在孔中加入用含有 1% BSA 的 F12 稀释的样品, 令在 4°C 结合 2 小时, 用 BSA/TBS 在室温清洗 3 次。将在 BSA/TBS 中稀释的单克隆抗体在室温孵育 90 分钟, 用针对小鼠 IgG 的 VECTASTAIN® ABC 试剂盒检测。HRP 标记用 BIO-RAD® 过氧化物酶底物进行可视化, 在 Dynex MRX-TC 微孔板读板器上于 405 nm 读数。

## 实施例 2：小鼠抗体可变区序列的分离

使用特别设计的与小鼠恒定区 5'-末端和 V 区上游的鼠前导序列杂交的引物，通过聚合酶链反应（PCR）克隆和测序了为 20C2 小鼠抗体的可变区结构域编码的 cDNA。这确保了所得的小鼠可变区序列是完整和准确的。简而言之，使用 QIAGEN® OLIGOTEX® 直接 mRNA 小型试剂盒，从小鼠杂交瘤细胞系提取了 mRNA，然后使用第一条链 cDNA 合成试剂盒转化为 cDNA。然后在 PCR 反应中使用 cDNA 作为模板，以获得抗体可变区序列。

为了获得轻链可变区序列，使用 11 个轻链 5' PCR 引物（MKV-1 到 MKV-11）中的每一个和 3' PCR 引物 MKC-1（表 1），建立了 11 个独立的 PCR 反应。

表 1

| 5'引物   | 序列                                                             | SEQ ID<br>NO: |
|--------|----------------------------------------------------------------|---------------|
| MKV-1  | GAT <u>CTC TAG ATG</u> AAG ATT GCC TGT TAG GCT GTT GGT GCT G   | 11            |
| MKV-2  | GAT <u>CTC TAG ATG</u> GAG WCA GAC ACA CTC CTG YTA TGG GTG     | 12            |
| MKV-3  | GAT <u>CTC TAG ATG</u> AGT GTG CTC ACT CAG GTC CTG GSG TTG     | 13            |
| MKV-4  | GAT <u>CTC TAG ATG</u> AGG RCC CCT GCT CAG WTT YTT GGM WTC TTG | 14            |
| MKV-5  | GAT <u>CTC TAG ATG</u> GAT TTW CAG GTG CAG ATT WTC AGC TTC     | 15            |
| MKV-6  | GAT <u>CTC TAG ATG</u> AGG TKC YYT GYT SAY CTY CTC TGR GG      | 16            |
| MKV-7  | GAT <u>CTC TAG ATG</u> GGC WTC AAA GAT GGA GTC ACA KWy YCW GG  | 17            |
| MKV-8  | GAT <u>CTC TAG ATG</u> TGG GGA YCT KTT TYC MMT TTT TCA ATG     | 18            |
| MKV-9  | GAT <u>CTC TAG ATG</u> GTR TCC WCA SCT CAG TTC CTT G           | 19            |
| MKV-10 | GAT <u>CTC TAG ATG</u> TAT ATA TGT TTG TTG TCT ATT TCT         | 20            |
| MKV-11 | GAT <u>CTC TAG ATG</u> GAA GCC CCA GCT CAG CTT CTC TTC C       | 21            |
| 3'引物   | 序列                                                             | SEQ ID<br>NO: |
| MKC-1  | GAT <u>CGA GCT CAC</u> TGG ATG GTG GGA AGA TGG                 | 22            |

下划线和斜体的序列分别表示 Xba I 和 Sac I 限制性位点。W = A 或 T, M = A 或 C, K = G 或 T, Y = C 或 T, R = A 或 G。

为了获得重链可变区序列, 使用 12 个重链 5' PCR 引物 (MHV -1 到 MHV -12) 中的每一个和适合的同种型特异 3'引物 (MHCG-1、MHCG-2A、MHCG-2B、MHCG-3) (表 2), 建立了 12 个独立的 PCR 反应。

表 2

| 5'引物    | 序列                                                            | SEQ ID<br>NO: |
|---------|---------------------------------------------------------------|---------------|
| MHV-1   | GAT <u>CTC TAG</u> ATG AAA TGC AGC TGG GGC ATS TTC TTC        | 23            |
| MHV-2   | GAT <u>CTC TAG</u> ATG GGA TGG AGC TRT ATC ATS YTC TT         | 24            |
| MHV-3   | GAT <u>CTC TAG</u> ATG AAG W TG TGG TTA AAC TGG GTT TTT       | 25            |
| MHV-4   | GAT <u>CTC TAG</u> ATG RAC TTT GGG YTC AGC TTG RTT T          | 26            |
| MHV-5   | GAT <u>CTC TAG</u> ATG GGA CTC CAG GCT TCA ATT TAG TTT TCC TT | 27            |
| MHV-6   | GAT <u>CTC TAG</u> ATG GCT TGT CYT TRG SGC TRC TCT TCT GC     | 28            |
| MHV-7   | GAT <u>CTC TAG</u> ATG GRA TGG AGC KGG RGT CTT TMT CTT        | 29            |
| MHV-8   | GAT <u>CTC TAG</u> ATG AGA GTG CTG ATT CTT TTG TG             | 30            |
| MHV-9   | GAT <u>CTC TAG</u> ATG GMT TGG GTG TGG AMC TTG CTT ATT CCT G  | 31            |
| MHV-10  | GAT <u>CTC TAG</u> ATG GGC AGA CTT ACC ATT CTC ATT CCT G      | 32            |
| MHV-11  | GAT <u>CTC TAG</u> ATG GAT TTT GGG CTG ATT TTT TTT ATT G      | 33            |
| MHV-12  | GAT <u>CTC TAG</u> ATG ATG GTG TTA AGT CTT CTG TAC CTG        | 34            |
| 3'引物    | 序列                                                            | SEQ ID<br>NO: |
| MHCG-1  | GCATC GAG CTC CAG TGG ATA GAC AGA TGG GGG                     | 35            |
| MHCG-2A | GCATC GAG CTC CAG TGG ATA GAC CGA TGG GGG                     | 36            |
| MHCG-2B | GCATC GAG CTC CAG TGG ATG AGC TGA TGG GGG                     | 37            |
| MHCG-3  | GCATC GAG CTC CAA GGG ATA GAC AGA TGG GGC                     | 38            |

下划线和斜体的序列分别表示 Xba I 和 Sac I 限制性位点。W = A 或 T, M = A 或 C, K = G 或 T, Y = C 或 T, R = A 或 G。

每个轻链 PCR 反应含有 46  $\mu\text{L}$  INVITROGEN<sup>TM</sup> PLATINUM<sup>®</sup> PCR Super 混合物、1.0 $\mu\text{L}$  100  $\mu\text{M}$  5' 引物 (MKV-1 到 MKV-11) 中的一种、1.0 $\mu\text{L}$  100  $\mu\text{M}$  3' 引物 (MKC-1), 以及 2.0 $\mu\text{L}$  杂交瘤 cDNA。使用类似的 PCR 反应以克隆小鼠重链可变区序列。将反应放置在 DNA 热循环仪中, 在经过 97 $^{\circ}\text{C}$  2 分钟的起始变性步骤后, 进行 30 个下列的循环: 95 $^{\circ}\text{C}$  30 秒, 55 $^{\circ}\text{C}$  45 秒, 和 72 $^{\circ}\text{C}$  90 秒。在最后一个循环之后, 采用 72 $^{\circ}\text{C}$  10 分钟的最后的延伸步骤。为了确定哪个 PCR 反应产生了产物, 来自每个反应的 5 $\mu\text{L}$  等分试样在含有 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  溴化乙锭的 1.5% (w/v) 琼脂糖/1X TAE 缓冲液凝胶上分离。然后来自产生具有预期大小 (420 到 500bp) 的片段的反应中的 PCR 产物进行凝胶纯化, 用 Xba I 和 Sac I 消化, 连接到质粒 pNEB193 (New England Biolabs, Beverly, MA) 的多克隆区中的 Xba I 和 Sac I 位点中。或者, 使用 INVITROGEN<sup>TM</sup> TA CLONING<sup>®</sup> 试剂盒, PCR 产物直接连接到质粒 pCR<sup>®</sup>2.1 中。然后将连接产物转化到 XL-1 细胞中, 将转化的大肠杆菌的等分试样铺于含有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$  氨苄青霉素的 LB 琼脂平板上, 并覆盖 40 $\mu\text{L}$  X-Gal 储液 (50mg/mL) 和 40 $\mu\text{L}$  IPTG (100 mM) 溶液, 以进行蓝/白筛选。将平板在 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, 潜在的克隆作为白色菌落被鉴别。使用用于 pNEB193 和 pCR<sup>®</sup>2.1 的通用正向和反向引物, 对来自每个 PCR 产物的至少 24 个独立克隆的 DNA 进行两条链测序。然后将获得的序列组装成毗连序列群, 以产生每个抗体轻链和重链可变区的契合序列。使用这种方法, 对杂交瘤 20C2 的轻链和重链抗体可变区测定了序列 (图 1A-1B)。在图 1A-1B 中, 形成了与抗原互补的结构 6 个互补决定区 (CDR) 被下划线。

### 实施例 3: 小鼠抗 ADDL 抗体可变区序列的人源化

使用 CDR 嫁接方法, 对从小鼠杂交瘤细胞系 20C2 获得的小鼠抗

体重链和轻链可变结构域核酸进行人源化。本领域的专业人员将会认识到，小鼠抗体序列的人源化可以通过提高其血浆半衰期和 Fc 效应器功能，从而降低抗球蛋白反应，来最大化抗体的治疗效能。

通过 CDR 嫁接的人源化是通过从 NCBI 蛋白数据库中选择与小鼠可变结构域最同源的人类轻链和重链可变区来进行的。使用蛋白-蛋白基本局部比对搜索工具 (BLAST)，将小鼠可变区序列与数据库中的所有人类可变区序列进行比较。然后，将小鼠的 CDR 连接到人类的框架区中，并分析初步的氨基酸序列。评估框架区中小鼠和人类序列之间的所有差别，特别是如果它们是环结构的典范序列的一部分、或是位于 VL/VH 界面处的残基 (O'Brien 和 Jones (2001) 《抗体工程》 (Antibody Engineering)，Kontermann 和 Dubel 主编，Springer Laboratory Manuals)。还扫描框架区以寻找与人类亚类的契合序列相比不常见或稀有的氨基酸以及潜在的糖基化位点。其中在小鼠和人类框架区序列之间存在的氨基酸序列差异没有被发现包含在典型序列中、或位于 VL/VH 界面时，则选择在该位置上的人类残基。其中在关键残基上存在差别时，产生两个版本的可变区序列以供评估。CDR 嫁接策略使得对人类框架区的改变数量最小，致使达到良好的抗原结合，同时维持人类框架区与来自天然人类抗体的序列严密匹配。通过鼠 20C2 的 CDR 嫁接产生的获得的人源化抗体的重链和轻链可变区氨基酸序列被分别显示在图 2A 和 2B 中。该抗体在本文中被命名为 Hu20C2。

还使用嵌饰策略设计了 20C2 的人源化序列 (参见例如美国专利 No. 6,797,492)。人源化是通过从 NCBI 蛋白数据库中选择与小鼠可变结构域以及最接近的人类抗体种系家族具有最高同源性的人类轻链和重链可变区来进行的 (参见 Kabat 等 (1991) 《免疫学重要的蛋白序列》，第五版，美国卫生与人类服务部 (Sequence of proteins of immunological interest, 5<sup>th</sup> ed., U.S. Dept. Health and Human Services), NIH, Washington DC)。使用蛋白-蛋白 BLAST，将小鼠可变区序列与数据库中的所有人类可变区序列进行比较。将鼠可变序列和它们最接近的人类同源物

模拟成最接近的结晶的人类抗体，正如通过本领域中实施的计算机模拟所确定的那样。根据鼠 VH 和 VL 序列的模型，构建了表面区图谱，它标明了小鼠重链和轻链可变区中氨基酸的溶剂可及性。为了证实该模型，将这些暴露的残基与已知的表面可及残基（参见例如 Padlan (1994) *Mol. Immunol.* 31 (3) :169-211）逐个位置进行比较。按照已建立的方法（参见美国专利 No. 6,797,492，在此以其全文引为参考），对序列中的每个残基打分，将其指定为暴露、大部分暴露、部分包埋、大部分包埋和包埋。被打分为暴露的或大部分暴露并且与同源的人类序列不同的小鼠框架残基，在该位置上被改变为人类残基。被设计的嵌饰序列保留了小鼠的 CDR、CDR 附近的残基、已知包括在典范序列中的残基、位于 VL/VH 界面的残基、以及在小鼠重链和轻链 N-末端序列中的残基。N-末端序列已知与 CDR 表面邻接，并可能参与了配体结合。一旦嵌饰序列被完成，它们被重新模拟以寻找任何潜在的明显的结构问题。在重链和轻链框架中分别改变了总共 12 个和 9 个氨基酸残基。通过鼠 20C2 的嵌饰产生的获得的人源化抗体的重链和轻链可变区氨基酸序列被分别显示在图 2A 和 2B 中。该抗体在本文中被命名为 Hu20C2A3。

与 20C2 相比，可以注意到产生 Hu20C2A3 的轻链取代而不是重链取代，与 Hu20C2 相同（图 2）。具体来说，重链可变区 CDR3 对于 Hu20C2A3 是独有的。

一旦人源化氨基酸序列被选定，将序列进行反向翻译，以获得相应的 DNA 序列。使用本领域已建立的方法（Lathe (1985) *J. Mol. Biol.* 183(1) :1-12），对 DNA 序列进行密码子优化，并在两侧设计了用于克隆到人类抗体表达载体中的限制性酶位点。为 Hu20C2 的轻链可变区和两个版本的重链可变区编码的核苷酸序列显示在图 3A-3C 中。两个重链可变区版本在 24 位上有一个氨基酸取代的不同；Hu20C2 版本 A 的重链可变区在 24 位上是 Phe，而 Hu20C2 版本 B 的重链可变区在 24 位上是 Leu。

#### 实施例 4：亲和性成熟

在 Hu20C2 抗体上进行了亲和性成熟。只编码人源化 Hu20C2 版本 A 和 B 可变区重链、只编码轻链或一起编码重链版本 A 和轻链的核酸分子被克隆到 Fab 噬菌体展示载体 pFab4 中。核酸序列分析证实了 pFab4 中的序列和取向。在 pFab4 中标注的 Hu20C2 Fab 序列被显示在图 4A-4C 中，在本文中重链版本 A 显示为 SEQ ID NO: 116，重链版本 B 为 SEQ ID NO: 117，轻链为 SEQ ID NO: 118。图 4D-4E 中显示了 pFab4 载体中重链版本 A 和轻链在一起的核苷酸序列。使用本技术领域已建立的噬菌体展示 Fab 文库方法，这些构建体被用于 Hu20C2 的成熟程序中

轻链成熟：设计了两个文库以突变 Hu20C2 轻链 ( $\kappa$ ) 的 CDR3 的 9 个野生型氨基酸（即 Phe-Gln-Gly-Ser-Leu-Val-Pro-Leu-Thr, SEQ ID NO: 39）。这些文库被命名为 LC3-1 和 LC3-2，分别代表轻链 CDR3 序列 Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Val-Pro-Leu-Thr (SEQ ID NO: 40) 和 Phe-Gln-Gly-Ser-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa (SEQ ID NO: 41)。生物素化的反向引物 20C2LC3-1 (SEQ ID NO:123) 和 20C2LC3-2 (SEQ ID NO:126)，与正向引物 20C2LC3F (SEQ ID NO: 120) 组合使用，用于产生 LC3-1 和 LC3-2 文库（参见图 5A）。引物通过聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化，而载体 DNA 通过凝胶电泳和电洗脱纯化。两个轻链文库被设计为随机突变。三个 10G5H6 LC<sub>3</sub> 文库的最终多样性分别为  $4.76 \times 10^8$  和  $7.45 \times 10^8$ （表 3）。对来自文库的大约 100 个克隆的序列分析显示出，在设计的氨基酸位置上具有 100% 的突变克隆多样性。

表 3

| 性质     | 轻链文库                                              |                                                   |
|--------|---------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
|        | LC3-1                                             | LC3-2                                             |
| 载体     | Fab3d20C2HS                                       | Fab3d20C2HS                                       |
| 转化体的数量 | $4.76 \times 10^8$                                | $7.45 \times 10^8$                                |
| 文库多样性  | $4.76 \times 10^8 \times 0.89 = 4.24 \times 10^8$ | $7.45 \times 10^8 \times 0.90 = 6.71 \times 10^8$ |
| 初级文库体积 | 2 mL                                              | 2 mL                                              |
| 初级文库滴度 | $2.13 \times 10^{11}$                             | $*9.3 \times 10^{10}$                             |

\*通过浓缩或噬菌体拯救（phage rescue）可以获得更高的滴度。

完成了两个轻链文库对高分子量 bADDL 的可溶淘选。简单来说，使用生物素化的高分子量 ADDL（bADDL）进行了四轮淘选。前三轮使用大约  $1.5 \mu\text{M}$  的抗原浓度来进行（输入 =  $1 \times 10^{10}$  到  $1 \times 10^{11}$ ）。在第三轮完成之后，将两个文库的输出合并，分成三个组，用 10 nM、100nM 和大约  $1.5 \mu\text{M}$  抗原进行分析以增加淘选的严谨性。这样，总共 58 个输出平板在噬菌体 ELISA 分析中被测试，即，第一轮中每个文库两个平板（总共四个平板），第二轮中每个文库 6 个平板（总共 12 个平板），第三轮中 LC3-1 文库 8 个平板和 LC3-2 文库 10 个平板（总共 18 个平板），第四轮中每个抗原浓度 8 个平板（总共 24 个平板）。

淘选产生了 1000 个击中（hit），其中 436 个被测序（表 4）。

表 4

| 轮              | 抗原          | 输入                    | 输出                 | *%回收率                 | ELISA 筛选*        | 测序  |
|----------------|-------------|-----------------------|--------------------|-----------------------|------------------|-----|
| 1 <sup>a</sup> | 1.6 $\mu$ M | $2.13 \times 10^{10}$ | $7.3 \times 10^4$  | $3.42 \times 10^{-6}$ | 0<br>(0/176)     | 0   |
| 2 <sup>a</sup> | 2.0 $\mu$ M | $1.55 \times 10^{11}$ | $1.88 \times 10^5$ | $1.21 \times 10^{-6}$ | 1.5%<br>(8/528)  | 8   |
| 3 <sup>a</sup> | 1.1 $\mu$ M | $1.80 \times 10^{10}$ | $7.8 \times 10^4$  | $4.3 \times 10^{-6}$  | 5.8%<br>(41/704) | 41  |
| 1 <sup>b</sup> | 1.6 $\mu$ M | $9.30 \times 10^9$    | $5.7 \times 10^4$  | $6.13 \times 10^{-6}$ | 2.3%<br>(7/176)  | 4   |
| 2 <sup>b</sup> | 2.0 $\mu$ M | $1.23 \times 10^{11}$ | $1.07 \times 10^5$ | $8.7 \times 10^{-7}$  | 4.5%<br>(24/528) | 24  |
| 3 <sup>b</sup> | 1.1 $\mu$ M | $1.37 \times 10^{10}$ | $3.32 \times 10^5$ | $2.42 \times 10^{-5}$ | 15%<br>(134/880) | 134 |
| 4 <sup>c</sup> | 1.1 $\mu$ M | $3.0 \times 10^{11}$  | $1.37 \times 10^5$ | $4.6 \times 10^{-7}$  | 39%<br>(274/704) | -   |
| 4 <sup>c</sup> | 100 nM      | $3.0 \times 10^{11}$  | $3.88 \times 10^5$ | $1.29 \times 10^{-6}$ | 41%<br>(290/704) | -   |
| 4 <sup>c</sup> | 10 nM       | $3.0 \times 10^{11}$  | $1.6 \times 10^5$  | $5.3 \times 10^{-7}$  | 32%<br>(225/704) | 225 |
|                |             |                       |                    | 总计                    | 1000/5104        | 436 |

<sup>a</sup>20C2 LC3-1 对高分子量 10% bADDL。

<sup>b</sup>20C2 LC3-2 对高分子量 10% bADDL。

<sup>c</sup>20C2 LC3-1 + 20C2 LC3-2 对高分子量 10% bADDL。

\*每个菌落总数的击中数。

高度富集的克隆的序列和频率显示在表 5 中。

表 5

| 克隆名称      | LC CDR3    | SEQ ID NO: | 第二轮 | 第三轮 | 第四轮 | 总计 |
|-----------|------------|------------|-----|-----|-----|----|
| Hu20C2LC  | FQGS LVPLT | 39         | 6   | 15  | 14  | 35 |
| SJ-p1-31  | ADTTHVPLT  | 42         |     | 1   | 2   | 3  |
| SJ-p1-14  | AHSTFVPLT  | 43         | 1   | 1   | 2   | 4  |
| 4P2-12-E3 | AQASFVPLT  | 44         |     |     | 2   | 2  |
| SJ-p1-38  | AQATKVPLT  | 45         |     | 1   | 1   | 2  |
| 4P3-59    | AQSSKVPLT  | 46         |     |     | 2   | 2  |
| SJ-p2-14  | AQSTLVPLT  | 47         |     | 1   | 2   | 3  |
| 4P3-11    | FAASSVPLT  | 48         |     |     | 2   | 2  |
| 4P3-1     | FESTYVPLT  | 49         |     |     | 2   | 2  |
| SJ-p2-10  | FESSRVPLT  | 50         |     | 1   | 1   | 2  |
| SJ-p2-11  | FNATWVPLT  | 51         |     | 2   |     | 2  |
| SJ-p2-60  | FQASRVPLT  | 52         |     | 1   | 5   | 6  |
| SJ-p1-18  | FQATRVPLT  | 53         |     | 1   | 5   | 6  |
| SJ-p3-51  | FQGSFIGLS  | 54         | 1   |     | 1   | 2  |
| SJ-p3-16  | FQGSFIPGT  | 55         |     | 2   | 3   | 5  |
| SJ-p8-8F  | FQGSFLPPS  | 56         |     | 1   | 1   | 2  |
| SJ-p3-26  | FQGSFLPQL  | 57         | 1   | 2   |     | 3  |
| SJ-p3-15  | FQGSFPPV   | 58         | 1   | 2   |     | 3  |
| SJ-p2-70  | FQGSFSPS   | 59         | 1   | 5   |     | 6  |
| SJ-p3-24  | FQGS RIPIS | 60         |     | 1   | 1   | 2  |
| SJ-p3-33  | FQGSRLPVS  | 61         |     | 2   | 3   | 5  |
| SJ-p3-14  | FQGS RVPLV | 62         |     | 2   | 1   | 3  |
| SJ-p2-1F  | FQSSFVPLT  | 63         |     | 6   | 8   | 14 |
| 4P1-22    | FQSSRVPLT  | 64         |     |     | 15  | 15 |
| SJ-p2-44  | GQTTLVPLT  | 65         |     | 1   | 3   | 4  |
| SJ-p1-56  | HESTLVPLT  | 66         |     | 2   | 1   | 3  |
| 4P1-40    | HQSSKVPLT  | 67         |     |     | 4   | 4  |
| SJ-p2-20  | IQTSLVPLT  | 68         |     | 2   |     | 2  |
| SJ-p1-41  | IQAALVPLT  | 69         |     | 1   | 1   | 2  |
| SJ-p2-13  | LQSSFVPLT  | 70         | 1   | 4   |     | 5  |
| 4P1-26    | LETSRVPLT  | 71         |     |     | 3   | 3  |
| SJ-p1-33  | LASSHVPLT  | 72         |     | 2   | 1   | 3  |
| SJ-p2-27  | LNSTTVPLT  | 73         |     | 2   | 4   | 6  |
| SJ-p2-62  | LQSKSVPLT  | 74         |     | 2   |     | 2  |
| 4P2-26-E5 | LQSVRVPLT  | 75         |     |     | 3   | 3  |
| 4P1-32    | LQSSLVPLT  | 76         |     |     | 5   | 5  |
| SJ-p2-37  | LQTGRVPLT  | 77         |     | 2   | 2   | 4  |
| SJ-p2-64  | LQTSFVPLT  | 78         |     | 3   |     | 3  |
| 4P1-20    | LQTSNVPLT  | 79         |     |     | 5   | 5  |
| SJ-p2-39  | LQTTRVPLT  | 80         |     | 2   | 6   | 8  |
| SJ-p2-52  | LSSTFVPLT  | 81         |     | 3   | 1   | 4  |
| SJ-p2-6L  | LSSTHVPLT  | 82         |     | 2   | 1   | 3  |
| 4P1-77    | LTSSAVPLT  | 83         |     |     | 2   | 2  |
| SJ-p1-59  | LVSSLVPLT  | 84         |     | 2   |     | 2  |
| SJ-p2-23  | METANVPLT  | 85         |     | 2   |     | 2  |
| SJ-p1-9M  | MQSSFVPLT  | 86         |     | 1   | 3   | 4  |
| SJ-p2-28  | MQSSLVPLT  | 87         |     | 1   | 2   | 3  |
| SJ-p1-21  | MQTSKVPLT  | 88         |     | 1   | 1   | 2  |
| 4P1-17    | SQARMVPLT  | 89         |     |     | 3   | 3  |
| SJ-p2-66  | SQASRVPLT  | 90         |     | 1   | 2   | 3  |
| SJ-p1-49  | TQSTQVPLT  | 91         |     | 2   | 1   | 3  |
| SJ-p2-24  | VCATFVPLT  | 92         |     | 1   | 1   | 2  |
| 4P1-41    | VQSSAVPLT  | 93         |     |     | 2   | 2  |
| SJ-p2-51  | VQTSLVPLT  | 94         |     | 12  | 31  | 43 |
| 4P1-64    | VQTSV VPLT | 95         |     |     | 3   | 3  |
| SJ-p2-55  | VQTTAVPLT  | 96         |     | 2   |     | 2  |
| SJ-p1-25  | LQTARVPLT  | 97         |     | 1   | 3   | 4  |

制备了根据富集频率前 10 位的克隆的 Fab 片段, 总共 15 个克隆被转变为 IgG1 人源化 A 版本, 2 个克隆 20C2-6 和 20C2-8 被转变为 IgG1 人源化 B 版本。使用生物素-A $\beta$  1-20 (表 6) 和 bADDL (表 7) 作为抗原, 通过 BIACORE™ 测量了这些克隆的  $K_D$  值。与亲代人源化 20C2A 和 20C2B 以及小鼠 20C2 抗体相比较, 观察到了亲和性的急剧升高。具体来说, 使用轻链 CDR3 序列 Xaa<sub>1</sub>-Gln-Xaa<sub>2</sub>-Thr-Arg-Val-Pro-Leu-Thr (SEQ ID NO: 2) 获得了低纳摩尔到亚皮摩尔的  $K_D$ , 其中 Xaa<sub>1</sub> 是 Phe 或 Leu, Xaa<sub>2</sub> 是 Ala 或 Thr。此外, 使用生物素-A $\beta$  1-20 和 bADDL, 通过 BIACORE™ 获得的  $K_D$  值之间的比较, 进一步证实了抗 ADDL 抗体例如 Hu20C2 优先结合 ADDL 的多维构象, 而不是单体的 A $\beta$  肽。

表 6

| 名称          | 克隆       | LC-CDR3   | SEQ ID NO: | $K_D$ (生物素-A $\beta$ 1-20) |        |        |
|-------------|----------|-----------|------------|----------------------------|--------|--------|
|             |          |           |            | Fab                        | IgG1#1 | IgG1#2 |
| 20C2-1A     | SJ-p2-60 | FQASRVPLT | 52         | 91 nM                      | 1.2 nM | --     |
| 20C2-2A     | SJ-p1-18 | FQATRVPLT | 53         | 28 nM                      | 686 pM | 2 nM   |
| 20C2-3A     | SJ-p3-16 | FQGSFIPGT | 55         | --                         | 1.7 nM | --     |
| 20C2-5A     | SJ-p2-1F | FQSSFVPLT | 63         | 41 nM                      | 912 pM | 1.5 nM |
| 20C2-6A     | 4P1-22   | FQSSRVPLT | 64         | 18 nM                      | 544 pM | 714 pM |
| 20C2-6B     | 4P1-22   | FQSSRVPLT | 64         | --                         | 53 pM  | --     |
| 20C2-7A     | SJ-p2-27 | LNSTTVPLT | 73         | 128 nM                     | --     | --     |
| 20C2-8A     | SJ-p2-39 | LQTTRVPLT | 80         | 14 nM                      | 140 pM | 376 pM |
| 20C2-8B     | SJ-p2-39 | LQTTRVPLT | 80         | --                         | 46 pM  | 64 pM  |
| 20C2-9A     | SJ-p2-51 | VQTSLVPLT | 94         | 36 nM                      | 241 pM | 420 pM |
| 20C2-10A    | SJ-p3-33 | FQGSRLPVS | 61         | --                         | 84 nM  | --     |
| 20C2-11A    | SJ-p3-6  | FQGSLPLS  | 98         | --                         | --     | --     |
| 20C2-12A    | 4P1-32   | LQSSLVPLT | 76         | 617 nM                     | 1.5 nM | --     |
| 20C2-13A    | 4p1-20   | LQTSNVPLT | 79         | 94 nM                      | 3 nM   | --     |
| 20C2-18A    | SJ-p1-9M | MQSSFVPLT | 86         | 126 nM                     | 1.8 nM | --     |
| 20C2-20A    | SJ-p3-15 | FQGSLFPPV | 58         |                            | 21 nM  |        |
| 20C2-22A    | SJ-p2-66 | SQASRVPLT | 90         |                            | 2.3 nM |        |
| 20C2-23A    | 4P1-40   | HQSSKVPLT | 67         |                            | 649 pM | 1.5 nM |
| 20C2-24A    | SJ-p2-44 | GQTTLVPLT | 65         |                            | 1.9 nM |        |
| 20C2A       |          | FQGSLVPLT | 39         |                            | 27 nM  |        |
| 20C2B       |          | FQGSLVPLT | 39         |                            | 5.4 nM |        |
| 小鼠<br>-20C2 |          | FQGSLVPLT | 39         | 83 nM                      | 3.4 nM |        |

表 7

| 名称       | 克隆       | LC-CDR3   | SEQ ID NO: | K <sub>D</sub> (bADDL) |        |        |
|----------|----------|-----------|------------|------------------------|--------|--------|
|          |          |           |            | Fab                    | IgG1#1 | IgG1#2 |
| 20C2-1A  | SJ-p2-60 | FQASRVPLT | 52         | 85 nM                  | 75 pM  | --     |
| 20C2-2A  | SJ-p1-18 | FQATRVPLT | 53         | 28 nM                  | 15 pM  | 0.3 pM |
| 20C2-3A  | SJ-p3-16 | FQGSFIPGT | 55         | --                     | 3.7 nM | --     |
| 20C2-5A  | SJ-p2-1F | FQSSFVPLT | 63         | 41 nM                  | 317 pM | 68 pM  |
| 20C2-6A  | 4P1-22   | FQSSRVPLT | 64         | 42 nM                  | 4.3 pM | 24 pM  |
| 20C2-6B  | 4P1-22   | FQSSRVPLT | 64         | --                     | 53 pM  | --     |
| 20C2-7A  | SJ-p2-27 | LNSTTVPLT | 73         | 435 nM                 | --     | --     |
| 20C2-8A  | SJ-p2-39 | LQTTRVPLT | 80         | 13 nM                  | 3 pM   | 0.7 pM |
| 20C2-8B  | SJ-p2-39 | LQTTRVPLT | 80         | --                     | 13 pM  | 0.8 pM |
| 20C2-9A  | SJ-p2-51 | VQTSLVPLT | 94         | 40 nM                  | --     | 2 pM   |
| 20C2-10A | SJ-p3-33 | FQGSRLPVS | 61         | --                     | 7.7 nM |        |
| 20C2-11A | SJ-p3-6  | FQGSLPLS  | 98         | --                     | --     | --     |
| 20C2-12A | 4P1-32   | LQSSLVPLT | 76         | 238 nM                 | 15 pM  | --     |
| 20C2-13A | 4p1-20   | LQTSNVPLT | 79         | 567 nM                 | 764 pM |        |
| 20C2-18A | SJ-p1-9M | MQSSFVPLT | 86         | 85 nM                  | 149 pM |        |
| 20C2-20A | SJ-p3-15 | FQGSFPV   | 58         |                        | 6.9 nM |        |
| 20C2-22A | SJ-p2-66 | SQASRVPLT | 90         |                        | 198 pM |        |
| 20C2-23A | 4P1-40   | HQSSKVPLT | 67         |                        | 85 pM  | 66 pM  |
| 20C2-24A | SJ-p2-44 | GQTTLVPLT | 65         |                        | 114 pM |        |
| 20C2A    |          | FQGSLVPLT | 39         |                        |        |        |
| 20C2B    |          | FQGSLVPLT | 39         |                        |        |        |
| 小鼠-20C2  |          | FQGSLVPLT | 39         | 62 nM                  | 4.1 nM |        |

重链成熟：Hu20C2 的重链也通过产生 3 个覆盖重链 CDR3 (RQLGLRSIDAMDY; SEQ ID NO: 99) 的文库进行了优化。这些文库被命名为 20C2B-39HC<sub>3</sub>-1、20C2B-39HC<sub>3</sub>-2 和 20C2B-39HC<sub>3</sub>-3, 分别代表了重链 CDR3 序列 XXXXXRSIDAMDY (SEQ ID NO: 100) 和

RQLGLRSIXXXXX (SEQ ID NO: 101) 和 RQLGXXXXXAMDY (SEQ ID NO:102)。生物素化的反向引物 20C2HC3-1 (SEQ ID NO:130)、20C2HC3-2 (SEQ ID NO: 133) 和 20C2HC3-3 (SEQ ID NO: 136) 被用来与正向引物 20C2HC3F (SEQ ID NO: 127) 组合，产生 3 个文库（参见图 5B）。文库包含了>10<sup>8</sup>的功能多样性，覆盖了每个组中每个随机的位点上氨基酸的所有组合（参见表 8）。

表 8

| 单克隆抗体                      | 多样性                    | 序列            | SEQ ID NO: |
|----------------------------|------------------------|---------------|------------|
| Hu20C2                     |                        | RQLGLRSIDAMDY | 99         |
| 20C2B-39HC <sub>3</sub> -1 | 5.78 x 10 <sup>8</sup> | XXXXXRSIDAMDY | 100        |
| 20C2B-39HC <sub>3</sub> -2 | 6.16 x 10 <sup>8</sup> | RQLGLRSIXXXXX | 101        |
| 20C2B-39HC <sub>3</sub> -3 | 3.99 x 10 <sup>8</sup> | RQLGXXXXXAMDY | 102        |

在噬菌体 ELISA 分析中总共测试了 4 轮淘选的 18 个输出平板。共发现了 1235 个击中，其中 704 个被测序。根据针对生物素化的 Aβ 1-20 和生物素化的 ADDL(bADDL)抗原的 Fab 片段的 BIACORE™ K<sub>D</sub> 值以及单点 BIACORE™ 3000 分析（表 9），使用 CDR 嫁接或嵌饰人源化技术，将总共 6 个 Fab 克隆转变成了 IgG1 和 IgG2m4。这 6 个 Fab 中的一个，被命名为 4a-A3，是从文库 20C2B-39HC<sub>3</sub>-3 中分离出的，并在重链的中间部分带有 3 个氨基酸取代(RQLGTRGTAMDY; SEQ ID NO: 3)。正如图 2B 所证实的那样，该重链 CDR3 序列是 Hu20C2A3 的序列。

表 9

| 克隆     | bADDL 结合 $K_D$ (M) | A $\beta$ 1-20 结合 $K_D$ (M) | BIACORE™<br>3000 排除比率 (off-rate) | 序列            | SEQ ID<br>NO: |
|--------|--------------------|-----------------------------|----------------------------------|---------------|---------------|
| 4a-A3  | 8.23E-11           | 8.49E-10                    | 6.65E-05                         | RQLGTRGTDAMDY | 3             |
| 4b-A7  | 3.76E-10           | 1.72E-09                    | 1.23E-04                         | RQLGKLALDAMDY | 142           |
| 4b-H11 | 1.05E-09           | 1.33E-09                    | 1.32E-04                         | RQLGRRSVDAMDY | 8             |
| 20C28B | 1.10E-09           | 1.10E-09                    | 8.76E-05                         | RQLGLRSIDAMDY | 143           |
| 4a-F5  | 1.39E-09           | 1.33E-09                    | 1.17E-04                         | RQLGKLKTDAMDY | 7             |
| 4a-B2  | 1.92E-09           | 1.29E-09                    | 1.13E-04                         | RQLGARKTDAMDY | 5             |
| 4b-D8  | 2.23E-09           | 1.69E-09                    | 1.45E-04                         | RALSPRSIDAMDY | 4             |
| 4a-A4  | 2.67E-09           | 1.58E-09                    | 1.20E-04                         | RALSPRSIDAMDY | 4             |
| 4b-A1  | 2.87E-09           | 2.85E-09                    | 1.23E-04                         | RQLGPRKRDAMDY | 6             |
| 4a-A7  | 3.24E-09           | 2.21E-09                    | 1.55E-04                         | RQLGQRQTDAMDY | 144           |
| 4a-B9  | 3.44E-09           | 3.54E-09                    | 1.94E-04                         | RAIQPRSIDAMDY | 145           |
| 4a-B3  | 4.17E-09           | 3.64E-09                    | 1.59E-04                         | RQLGLRSIDAHTR | 146           |
| 4a-G10 | 4.52E-09           | 2.72E-09                    | 1.78E-04                         | RQLGQPSVDAMDY | 147           |
| 4a-E11 | 4.93E-09           | 3.48E-09                    | 1.65E-04                         | RQLGFQSTDAMDY | 148           |
| 4a-C9  | 8.43E-09           | 2.46E-09                    | 1.75E-04                         | RQLGQAGHDAMDY | 149           |
| 4a-D5  | 1.17E-09           | 3.91E-09                    | 1.74E-04                         | RQLGDNVADAMDY | 150           |
| 4a-E10 | 1.85E-08           | 3.60E-09                    | 1.39E-04                         | RQLGFQSTDAMDY | 148           |
| 4b-D4  | 1.86E-08           | 4.87E-09                    | 1.89E-04                         | RQLGMATPDAMDY | 151           |
| 4b-B10 | 6.28E-08           | 7.43E-09                    | 1.81E-04                         | RQLGAHWLDAMDY | 152           |
| 4b-A12 | 1.54E-07           | 1.01E-08                    | 1.69E-04                         | RQLGPEPQDAMDY | 153           |

### 实施例 5: IgG2m4 抗体的产生

制备了 IgG2m4 抗体衍生物以降低 Fc 受体衔接、C1q 结合、不想要的细胞毒性或免疫复合物的形成，同时维持典型的人类抗体的长半衰期和药代动力学性质。IgG2m4 的基本抗体格式是 IgG2 的格式，它在实验模型中已经显示出具有出色的半衰期（Zuckier, 等 (1994)

Cancer Suppl. 73:794-799)。通过选择性掺入 IgG4 序列，将 IgG2 的结构进行了修改，以消除 C1q 结合，同时维持了典型的低水平 FcγR 结合（Canfield 和 Morrison (1991) J. Exp. Med. 173:1483-1491）。这是通过使用其中 IgG2 和 IgG4 的序列是相同的交叉点来实现的，从而产生了含有天然 Fc 序列而不是任何人工突变序列的抗体。使用该表现出最小的效应器相关活性的 IgG2m4 抗体的优点是可以与 Wilcock 等 ((2006) J. Neurosci. 26:5340-6) 公开的去糖基化的抗体相比较。

IgG2m4 形式的人类抗体恒定区是通过将人类 IgG4 序列选择性地掺入标准的人类 IgG2 恒定区中而形成的，如图 6 所示。从概念上讲，IgG2m4 是如图 6 显示的 CH2 结构域内的一对链交换的结果。相应于 IgG4 的序列发生了 4 个单一突变。在 IgG2 中突变的 Fc 残基包括 His268Gln、Val309Leu、Ala330Ser 和 Pro331Ser，这最小化了新表位的可能性。表 10 中显示了位于 IgG2 恒定区中的特异性 IgG4 氨基酸残基，以及基本结构的其它选择。

表 10

| 残基<br>(Kabat<br>计数) | IgG2<br>中的残<br>基 | IgG4<br>中的残<br>基 | IgG2m4<br>中的残<br>基 | IgG2m4 中可<br>选择的残基 | 说明                                                                                         |
|---------------------|------------------|------------------|--------------------|--------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| 189                 | Pro 或<br>Thr*    | Pro              | Thr                | Pro                | IgG2 的关键多态性；Pro 残基出现在 IGHG*01 同种异型中，Thr 残基出现在 IGHG*02 同种异型中 <sup>a,b</sup>                 |
| 268                 | His              | Gln              | Gln                | --                 | 在 B/C 环中的变化已知参与了 FcγRII 结合 <sup>c</sup>                                                    |
| 309                 | Val              | Leu 或<br>Val     | Leu                | Val                | FcRn 结合结构域                                                                                 |
| 330                 | Ala              | Ser              | Ser                | --                 | C1q 结合的关键残基 <sup>d</sup> ；也可能参与了结合 FcγRII 和 FcγRIII <sup>e</sup>                           |
| 331                 | Pro              | Ser              | Ser                | --                 | C1q 结合 <sup>d,f</sup> 和 FcγRI 结合 <sup>g</sup> 的关键残基；也可能参与了结合 FcγRII 和 FcγRIII <sup>e</sup> |
| 397                 | Met 或<br>Val*    | Val              | Met                | Val                | Val 残基出现在 IGHG*01 同种异型中，Met 残基出现在 IGHG*02 同种异型中 <sup>a</sup>                               |

\*星号标注的位置进行了等位基因变异。

<sup>a</sup>Hougs, 等 (2001) Immunogenetics 52 (3-4) : 242-8.

<sup>b</sup>W0 97/11971.

<sup>c</sup>Medgyesi, 等 (2004) Eur. J. Immunol. 34:1127-1135.

<sup>d</sup>Tao, 等 (1991) J. Exp. Med. 173:1025-1028.

<sup>e</sup>Armour, 等 (1999) Eur. J. Immunol. 29:2613.

<sup>f</sup>Xu, 等 (1994) J. Biol. Chem. 269:3469-3474.

<sup>g</sup>Canfield 和 Morrison (1991) J. Exp. Med. 173:1483.

构建了人源化 Hu20C2 和 Hu20C2A3 抗体的人类 IgG1/ $\kappa$  和 IgG2m4/ $\kappa$  版本。Hu20C2A3 IgG2m4 抗体的轻链和重链的完整的氨基酸序列被显示在图 7A 和 7C 中。

#### 实施例 6：人源化抗 ADDL 抗体的结合亲和性和特异性

进行了亲和性成熟以增加亲和性并改进与 ADDL 的优先结合。为了评估人源化抗体的 ADDL 结合亲和性，按照本文的公开进行了 BIACORE™ 和滴定 ELISA。简单来说，用 10%生物素化的 ADDL 抗原（1  $\mu$ M）包被用链亲和素包被的 96 孔微孔板（Sigma, St. Louis, MO）。将一系列从 500 ng/mL 开始 2 倍稀释的纯化的抗体加入到 ADDL 捕获板中，将板在 25℃ 孵育 2 小时。在用洗板机（Bio-Tek, Winooski, VA）使用 PBS 溶液清洗 5 次后，加入在 3%脱脂奶阻断剂中 1/2000 稀释的多克隆山羊抗人  $\kappa$  轻链抗体（Biomed, Foster City, CA），在室温孵育 1 小时。然后加入用阻断溶液 1/2000 稀释的兔抗山羊 IgG (H+L) HRP-结合的检测抗体（Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, TX），在室温孵育 1 小时。在用 PBS 清洗后，加入 HRP 底物 3, 3', 5',5-四甲基联苯胺（即用的 TMB; Sigma, St. Louis, MO），在 10 分钟后用 0.5 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应。在读板器中（VICTOR V 型；Perkin Elmer, Boston, MA）读取 450 nm 波长处的吸光度，使用 EXCEL® 工作表处理数据。估计板之间的分析偏差在 20%以内。

用 BIACORE™ 测量，Fab 克隆 A3 的 K<sub>D</sub> 针对生物素化 A $\beta$  1-20 来说是 849 pM。同样的 Fab 克隆的 K<sub>D</sub> 针对 bADDL 来说是 82 pM，表明 A3 Fab 被证明是优先与 ADDL 结合的。当克隆通过嵌饰被人源化，并转变为完整的 IgG1 分子或完整的 IgG2m4 分子（即 Hu20C2A3）时，针对 A $\beta$  1-20 和 ADDL 的 K<sub>D</sub> 值低于 BIACORE™ 仪器的可靠检测限，这表明与 Hu20C2 相比，Hu20C2A3 针对 A $\beta$ 1-20 和 ADDL 的结合平衡常数的明显提高。

Hu20C2A3，是具有 IgG2m4 同种型的克隆 A3 的嵌饰版本，被表

达在 CHO 和毕赤氏酵母中。通过 ELISA 评估了两种来源的 Hu20C2A3 与 A $\beta$  单体和 ADDL 相互作用的能力。如图 8 所示, 在 CHO (图 8A) 或毕赤氏酵母 (图 8B) 中产生的 Hu20C2A3 表现出 ADDL 结合优先于 A $\beta$ 40 单体结合 (6 倍)。从这些曲线确定的结合常数 ( $IgGk_{50}$  值), 产生的值对于毕赤氏酵母中产生的 Hu20C2A3 来说, 对 ADDL 和 A $\beta$  单体分别为 64 pM 和 376 pM, 对于 CHO 细胞中产生的 Hu20C2A3 来说, 对 ADDL 和 A $\beta$  单体分别为 58 pM 和 361 pM。

实施例 7: 使用人源化抗 ADDL 抗体抑制 ADDL 与神经元的结合

使用本文公开的方法, 进一步评估了人源化抗 ADDL 抗体阻断 ADDL 与初级海马神经元结合的能力。将 Hu20C2A3 抗体, 或 PBS 作为对照, 以不同的摩尔比率与 bADDL 混合, 在慢速旋转器上在 37°C 孵育 1 小时。在预孵育后, 将抗体/ bADDL 制备物加入到初级神经元培养物中, 在 37°C 再孵育 1 小时。在孵育期结束时, 取出 bADDL/抗体混合物, 用培养基将板洗 6 次。然后将细胞在 4%多聚甲醛中在室温固定 10 分钟, 除去溶液, 加入新鲜的固定剂, 然后将细胞再固定 10 分钟。然后用含有 0.1% TRITON™ X-100 的 4%多聚甲醛使细胞通透化 (2 次, 每次在室温进行 10 分钟), 在 PBS 中洗 6 次, 然后用含有 10%BSA 的 PBS 在 37°C 处理 1 小时。然后在细胞中加入连接有碱性磷酸酶的链亲和素 (在 1%BSA 中 1:1,500; Molecular Probes, Eugene, OR), 室温 1 小时。细胞用 PBS 清洗 6 次, 将碱性磷酸酶底物 (带有 SAPPHIRE-II™ 的 CDP-STAR®; Biosystems 供应, Foster City, CA) 加入到细胞中, 孵育 30 分钟, 然后在 LJI 光度计 (Analyst AD; LJI Biosystems, Sunnyvale, CA) 上测定发光。在该分析中, 发现了 Hu20C2A3 以亚化学计量的抗体/肽比率有效地抑制了 bADDL 与神经元的结合 ( $EC_{50} = 0.16$ ; 图 9)。

抑制 bADDL 结合表明 Hu20C2A3 以生物学相关的方式与 ADDL 相互作用。为了证实 Hu20C2A3 与 ADDL 的相互作用与人类阿茨海默氏病病症有关, 评估了生物素化 Hu20C2A3 对人类阿茨海默氏病脑组

织中含有 A $\beta$  的斑块的免疫标记能力。免疫组化定位显示出在人类阿茨海默氏病脑组织中，在致密核心和弥散斑块中都有 A $\beta$  的显著标记。在与增加的 ADDL：抗体量进行预孵育后，免疫反应性降低了，这证实了这种结合的特异性。与 Hu20C2 相似，Hu20C2A3 也有效地标记了致密核心和弥散的 A $\beta$  沉积物。

#### 实施例 8：Hu20C2A3 的热稳定性

使用 SEG-HPLC、荧光热熔分析和粒度分析评估了 Hu20C2A3 的蛋白稳定性评价。荧光热熔分析表明 Fc 和 Fab 的非折叠转换分别发生在大约 70°C 和 80°C，这与可接受的内在蛋白稳定性相一致（图 10）。

#### 实施例 9：体外药效动力学和效能分析

现有技术指出，全身性注射单克隆抗 A $\beta$  抗体能够急剧增加血浆的 A $\beta$  水平，而脑 A $\beta$  的可测量降低需要长期用药。已经建议用可测量的 A $\beta$  在物种中进行被动免疫导致血浆 A $\beta$  的升高，这是由于脑和外周室之间 A $\beta$  平衡的变化引起的。这种“外周吸入”最终导致了脑 A $\beta$  的降低。但是在动物中，在急性抗体给药后，在脑 A $\beta$  明显变化之前，观察到了认知的改善，表明脑 A $\beta$  的变化可以以某种形式，在这些变化可以用现有技术测量到的时间点之前发生。或者，血浆 A $\beta$  的升高也可以用抗体给药后外周 A $\beta$  的稳定化来解释。无论如何解释，在动物模型中已经确立，早期的血浆水平升高是随后脑 A $\beta$  降低的先决条件。因此，Hu20C2A3 抗体对血浆 A $\beta$  升高的影响被用作靶衔接的指标。在静脉输注剂量为 30、100 和 300  $\mu$ g/小鼠的 Hu20C2A3 后，相对于无关抗体（8B4）对照组来说，注射后 4 小时观察到了明显和强烈的血浆 A $\beta$ <sub>x-40</sub> 的增加（图 11）。对于 CHO 来源的材料来说，观察到的血浆 A $\beta$ <sub>x-40</sub> 的增加是 8B4 水平的 491%（30  $\mu$ g,  $p > 0.001$ ）、826%（100  $\mu$ g,  $p < 0.001$ ）和 755%（300  $\mu$ g,  $p < 0.001$ ）。类似地，对于毕赤氏酵母来源的材料来说，血浆 A $\beta$ <sub>x-40</sub> 的增加是 8B4 水平的 395%（30  $\mu$ g,  $p > 0.001$ ）、729%（100  $\mu$ g,  $p < 0.001$ ）和 838%（300  $\mu$ g,  $p < 0.001$ ）。

<110> 默克制药公司(MERCK & CO., INC.)

<120> 抗 ADDL 单克隆抗体及其应用(ANTI-ADDL MONOCLONAL ANTIBODY AND USE THEREOF)

<130> SCT081434-00

<150> PCT/US2005/038125

<151> 2005-10-21

<160> 153

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Glu Phe Arg His Asp Ser

1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic CDR3 peptide

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa denotes Phe or Leu

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa denotes Ala or Thr

<400> 2

Xaa Gln Xaa Thr Arg Val Pro Leu Thr  
1 5

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic CDR3 peptide

<400> 3

Arg Gln Leu Gly Thr Arg Gly Thr Asp Ala Met Asp Tyr  
1 5 10

<210> 4

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic CDR3 peptide

<400> 4

Arg Ala Leu Ser Pro Arg Ser Ile Asp Ala Met Asp Tyr  
1 5 10

<210> 5

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic CDR3 peptide

<400> 5

Arg Gln Leu Gly Ala Arg Lys Thr Asp Ala Met Asp Tyr  
1 5 10

<210> 6

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic CDR3 peptide

<400> 6

Arg Gln Leu Gly Pro Arg Lys Arg Asp Ala Met Asp Tyr  
1 5 10

<210> 7

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic CDR3 peptide

<400> 7

Arg Gln Leu Gly Lys Leu Lys Thr Asp Ala Met Asp Tyr  
1 5 10

<210> 8

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic CDR3 peptide

<400> 8

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa denotes Val, Thr, Ile or Arg

```

<400> 9

Arg Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Ala Met Asp Tyr  
1 5 10

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 10

Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser  
1 5 10

<210> 11

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 11

gatctctaga tgaagattgc ctgtaggct gttgggtgctg 40

<210> 12

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 12

gatctctaga tggagwcaga cacactcctg ytatgggtg 39

---

|       |                                                |    |
|-------|------------------------------------------------|----|
| <210> | 13                                             |    |
| <211> | 39                                             |    |
| <212> | DNA                                            |    |
| <213> | Artificial Sequence                            |    |
| <220> |                                                |    |
| <223> | Synthetic oligonucleotide                      |    |
| <400> | 13                                             |    |
|       | gatctctaga tgagtgtgct cactcaggtc ctggsgttg     | 39 |
| <210> | 14                                             |    |
| <211> | 42                                             |    |
| <212> | DNA                                            |    |
| <213> | Artificial Sequence                            |    |
| <220> |                                                |    |
| <223> | Synthetic oligonucleotide                      |    |
| <400> | 14                                             |    |
|       | gatctctaga tgaggrcccc tgctcagwtt yttggmwttc tg | 42 |
| <210> | 15                                             |    |
| <211> | 39                                             |    |
| <212> | DNA                                            |    |
| <213> | Artificial Sequence                            |    |
| <220> |                                                |    |
| <223> | Synthetic oligonucleotide                      |    |
| <400> | 15                                             |    |
|       | gatctctaga tggatttwca ggtgcagatt wtcagcttc     | 39 |
| <210> | 16                                             |    |
| <211> | 38                                             |    |
| <212> | DNA                                            |    |
| <213> | Artificial Sequence                            |    |
| <220> |                                                |    |
| <223> | Synthetic oligonucleotide                      |    |

---

|                                               |    |
|-----------------------------------------------|----|
| <400> 16                                      |    |
| gatctctaga tgaggtkcyt tgytsaycty ctctgrgg     | 38 |
| <210> 17                                      |    |
| <211> 41                                      |    |
| <212> DNA                                     |    |
| <213> Artificial Sequence                     |    |
| <220>                                         |    |
| <223> Synthetic oligonucleotide               |    |
| <400> 17                                      |    |
| gatctctaga tgggcwtcaa agatggagtc acakwyycwg g | 41 |
| <210> 18                                      |    |
| <211> 39                                      |    |
| <212> DNA                                     |    |
| <213> Artificial Sequence                     |    |
| <220>                                         |    |
| <223> Synthetic oligonucleotide               |    |
| <400> 18                                      |    |
| gatctctaga tgtggggayc tktttymmt ttttcaatg     | 39 |
| <210> 19                                      |    |
| <211> 34                                      |    |
| <212> DNA                                     |    |
| <213> Artificial Sequence                     |    |
| <220>                                         |    |
| <223> Synthetic oligonucleotide               |    |
| <400> 19                                      |    |
| gatctctaga tggtrtccwc asctcagttc cttg         | 34 |
| <210> 20                                      |    |
| <211> 36                                      |    |
| <212> DNA                                     |    |
| <213> Artificial Sequence                     |    |

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 20

gatctctaga tgtatatatg tttgttgtct atttct

36

<210> 21

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 21

gatctctaga tggaagcccc agtcagctt ctcttcc

37

<210> 22

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 22

gatcgagctc actggatggt gggaagatgg

30

<210> 23

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 23

gatctctaga tgaaatgcag ctggggcats ttcttc

36

---

|       |                                         |    |
|-------|-----------------------------------------|----|
| <210> | 24                                      |    |
| <211> | 35                                      |    |
| <212> | DNA                                     |    |
| <213> | Artificial Sequence                     |    |
| <220> |                                         |    |
| <223> | Synthetic oligonucleotide               |    |
| <400> | 24                                      |    |
|       | gatctctaga tgggatggag cirtatcats ytctt  | 35 |
| <210> | 25                                      |    |
| <211> | 36                                      |    |
| <212> | DNA                                     |    |
| <213> | Artificial Sequence                     |    |
| <220> |                                         |    |
| <223> | Synthetic oligonucleotide               |    |
| <400> | 25                                      |    |
|       | gatctctaga tgaagwtgtg gttaaactgg gttttt | 36 |
| <210> | 26                                      |    |
| <211> | 34                                      |    |
| <212> | DNA                                     |    |
| <213> | Artificial Sequence                     |    |
| <220> |                                         |    |
| <223> | Synthetic oligonucleotide               |    |
| <400> | 26                                      |    |
|       | gatctctaga tgractttgg gytacagcttg rttt  | 34 |
| <210> | 27                                      |    |
| <211> | 41                                      |    |
| <212> | DNA                                     |    |
| <213> | Artificial Sequence                     |    |
| <220> |                                         |    |
| <223> | Synthetic oligonucleotide               |    |

---

|                                               |    |
|-----------------------------------------------|----|
| <400> 27                                      |    |
| gatctctaga tgggactcca ggcttcaatt tagttttcct t | 41 |
| <210> 28                                      |    |
| <211> 38                                      |    |
| <212> DNA                                     |    |
| <213> Artificial Sequence                     |    |
| <220>                                         |    |
| <223> Synthetic oligonucleotide               |    |
| <400> 28                                      |    |
| gatctctaga tggcttgcty ttrgsgctrc tcttctgc     | 38 |
| <210> 29                                      |    |
| <211> 36                                      |    |
| <212> DNA                                     |    |
| <213> Artificial Sequence                     |    |
| <220>                                         |    |
| <223> Synthetic oligonucleotide               |    |
| <400> 29                                      |    |
| gatctctaga tggratggag ckggrgtctt tmtctt       | 36 |
| <210> 30                                      |    |
| <211> 32                                      |    |
| <212> DNA                                     |    |
| <213> Artificial Sequence                     |    |
| <220>                                         |    |
| <223> Synthetic oligonucleotide               |    |
| <400> 30                                      |    |
| gatctctaga tgagagtgct gattcttttg tg           | 32 |
| <210> 31                                      |    |
| <211> 40                                      |    |
| <212> DNA                                     |    |
| <213> Artificial Sequence                     |    |

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 31

gatctctaga tggmttgggt gtggamcttg cttattcctg 40

<210> 32

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 32

gatctctaga tgggcagact taccattctc attcctg 37

<210> 33

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 33

gatctctaga tggattttgg gctgattttt tttattg 37

<210> 34

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 34

gatctctaga tgatggtgtt aagtcttctg tacctg 36

---

|       |                                     |    |
|-------|-------------------------------------|----|
| <210> | 35                                  |    |
| <211> | 32                                  |    |
| <212> | DNA                                 |    |
| <213> | Artificial Sequence                 |    |
| <220> |                                     |    |
| <223> | Synthetic oligonucleotide           |    |
| <400> | 35                                  |    |
|       | gcatcgagct ccagtggata gacagatggg gg | 32 |
| <210> | 36                                  |    |
| <211> | 32                                  |    |
| <212> | DNA                                 |    |
| <213> | Artificial Sequence                 |    |
| <220> |                                     |    |
| <223> | Synthetic oligonucleotide           |    |
| <400> | 36                                  |    |
|       | gcatcgagct ccagtggata gaccgatggg gg | 32 |
| <210> | 37                                  |    |
| <211> | 32                                  |    |
| <212> | DNA                                 |    |
| <213> | Artificial Sequence                 |    |
| <220> |                                     |    |
| <223> | Synthetic oligonucleotide           |    |
| <400> | 37                                  |    |
|       | gcatcgagct ccagtggatg agctgatggg gg | 32 |
| <210> | 38                                  |    |
| <211> | 32                                  |    |
| <212> | DNA                                 |    |
| <213> | Artificial Sequence                 |    |
| <220> |                                     |    |
| <223> | Synthetic oligonucleotide           |    |

---

<400> 38  
gcatcgagct ccaagggata gacagatggg gc 32

<210> 39  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic peptide

<400> 39  
  
Phe Gln Gly Ser Leu Val Pro Leu Thr  
1 5

<210> 40  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic peptide

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(5)  
<223> Xaa denotes any amino acid residue

<400> 40  
  
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Val Pro Leu Thr  
1 5

<210> 41  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>

---

<223> Synthetic peptide

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (5)..(9)

<223> Xaa denotes any amino acid residue

<400> 41

Phe Gln Gly Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 42

Ala Asp Thr Thr His Val Pro Leu Thr  
1 5

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 43

Ala His Ser Thr Phe Val Pro Leu Thr  
1 5

<210> 44

<211> 9

---

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 44

Ala Gln Ala Ser Phe Val Pro Leu Thr

1 5

<210> 45

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 45

Ala Gln Ala Thr Lys Val Pro Leu Thr

1 5

<210> 46

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 46

Ala Gln Ser Ser Lys Val Pro Leu Thr

1 5

<210> 47

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 47

Ala Gln Ser Thr Leu Val Pro Leu Thr

1 5

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 48

Phe Ala Ala Ser Ser Val Pro Leu Thr

1 5

<210> 49

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 49

Phe Glu Ser Thr Tyr Val Pro Leu Thr

1 5

<210> 50

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

---

<223> Synthetic peptide

<400> 50

Phe Glu Ser Ser Arg Val Pro Leu Thr  
1 5

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 51

Phe Asn Ala Thr Trp Val Pro Leu Thr  
1 5

<210> 52

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 52

Phe Gln Ala Ser Arg Val Pro Leu Thr  
1 5

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 53

Phe Gln Ala Thr Arg Val Pro Leu Thr  
1 5

<210> 54

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 54

Phe Gln Gly Ser Phe Ile Gly Leu Ser  
1 5

<210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 55

Phe Gln Gly Ser Phe Ile Pro Gly Thr  
1 5

<210> 56

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 56

---

Phe Gln Gly Ser Phe Leu Pro Pro Ser  
1 5

<210> 57

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 57

Phe Gln Gly Ser Phe Leu Pro Gln Leu  
1 5

<210> 58

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 58

Phe Gln Gly Ser Leu Phe Pro Pro Val  
1 5

<210> 59

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 59

Phe Gln Gly Ser Leu Phe Ser Pro Ser  
1 5

<210> 60  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic peptide

<400> 60

Phe Gln Gly Ser Arg Ile Pro Ile Ser  
1 5

<210> 61  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic peptide

<400> 61

Phe Gln Gly Ser Arg Leu Pro Val Ser  
1 5

<210> 62  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic peptide

<400> 62

Phe Gln Gly Ser Arg Val Pro Leu Val  
1 5

<210> 63  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic peptide

<400> 63

Phe Gln Ser Ser Phe Val Pro Leu Thr  
1 5

<210> 64  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic peptide

<400> 64

Phe Gln Ser Ser Arg Val Pro Leu Thr  
1 5

<210> 65  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic peptide

<400> 65

Gly Gln Thr Thr Leu Val Pro Leu Thr  
1 5

<210> 66  
<211> 9

---

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 66

His Glu Ser Thr Leu Val Pro Leu Thr

1 5

<210> 67

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 67

His Gln Ser Ser Lys Val Pro Leu Thr

1 5

<210> 68

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 68

Ile Gln Thr Ser Leu Val Pro Leu Thr

1 5

<210> 69

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 69

Ile Gln Ala Ala Leu Val Pro Leu Thr

1 5

<210> 70

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 70

Leu Gln Ser Ser Phe Val Pro Leu Thr

1 5

<210> 71

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 71

Leu Glu Thr Ser Arg Val Pro Leu Thr

1 5

<210> 72

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

---

<223> Synthetic peptide

<400> 72

Leu Ala Ser Ser His Val Pro Leu Thr  
1 5

<210> 73

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 73

Leu Asn Ser Thr Thr Val Pro Leu Thr  
1 5

<210> 74

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 74

Leu Gln Ser Lys Ser Val Pro Leu Thr  
1 5

<210> 75

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 75

Leu Gln Ser Val Arg Val Pro Leu Thr  
1 5

<210> 76

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 76

Leu Gln Ser Ser Leu Val Pro Leu Thr  
1 5

<210> 77

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 77

Leu Gln Thr Gly Arg Val Pro Leu Thr  
1 5

<210> 78

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 78

---

Leu Gln Thr Ser Phe Val Pro Leu Thr  
1 5

<210> 79  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic peptide

<400> 79

Leu Gln Thr Ser Asn Val Pro Leu Thr  
1 5

<210> 80  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic peptide

<400> 80

Leu Gln Thr Thr Arg Val Pro Leu Thr  
1 5

<210> 81  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic peptide

<400> 81

Leu Ser Ser Thr Phe Val Pro Leu Thr  
1 5

<210> 82  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic peptide

<400> 82

Leu Ser Ser Thr His Val Pro Leu Thr  
1 5

<210> 83  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic peptide

<400> 83

Leu Thr Ser Ser Ala Val Pro Leu Thr  
1 5

<210> 84  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic peptide

<400> 84

Leu Val Ser Ser Leu Val Pro Leu Thr  
1 5

---

<210> 85  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic peptide

<400> 85

Met Glu Thr Ala Asn Val Pro Leu Thr  
1 5

<210> 86  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic peptide

<400> 86

Met Gln Ser Ser Phe Val Pro Leu Thr  
1 5

<210> 87  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic peptide

<400> 87

Met Gln Ser Ser Leu Val Pro Leu Thr  
1 5

<210> 88  
<211> 9

---

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 88

Met Gln Thr Ser Lys Val Pro Leu Thr

1 5

<210> 89

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 89

Ser Gln Ala Arg Met Val Pro Leu Thr

1 5

<210> 90

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 90

Ser Gln Ala Ser Arg Val Pro Leu Thr

1 5

<210> 91

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 91

Thr Gln Ser Thr Gln Val Pro Leu Thr

1 5

<210> 92

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 92

Val Cys Ala Thr Phe Val Pro Leu Thr

1 5

<210> 93

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 93

Val Gln Ser Ser Ala Val Pro Leu Thr

1 5

<210> 94

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

---

<223> Synthetic peptide

<400> 94

Val Gln Thr Ser Leu Val Pro Leu Thr  
1 5

<210> 95

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 95

Val Gln Thr Ser Val Val Pro Leu Thr  
1 5

<210> 96

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 96

Val Gln Thr Thr Ala Val Pro Leu Thr  
1 5

<210> 97

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 97

Leu Gln Thr Ala Arg Val Pro Leu Thr  
1 5

<210> 98

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 98

Phe Gln Gly Ser Leu Leu Pro Leu Ser  
1 5

<210> 99

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 99

Arg Gln Leu Gly Leu Arg Ser Ile Asp Ala Met Asp Tyr  
1 5 10

<210> 100

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<220>

---

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(5)

<223> Xaa denotes any amino acid residue

<400> 100

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Ser Ile Asp Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 101

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (9)..(13)

<223> Xaa denotes any amino acid residue

<400> 101

Arg Gln Leu Gly Leu Arg Ser Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5 10

<210> 102

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (5)..(9)

<223> Xaa denotes any amino acid residue

<400> 102

Arg Gln Leu Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Met Asp Tyr  
1 5 10

<210> 103

<211> 459

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 103

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| tgggcagact taccattctc attcctgctg ctgattgtcc ctgcatatgt cttgtcccaa  | 60  |
| gttactctaa aagagtctgg ccctgggata ttgaagccct cacagaccct cagtctgact  | 120 |
| tgttctctct ctgggttttc actgagcact tctggtatgg gtgtaggctg gtttcgtcag  | 180 |
| ccttcaggga agggctctgga gtggctggca cacatttggt gggatgatga taagtcctat | 240 |
| aatccatccc tgaagagccg gtcacaatc tccaagtata cctctagaaa ccaggttttc   | 300 |
| ctcagatca ccagtgtgga cactgcagat actgccactt actattgtgc tcgaagacaa   | 360 |
| ctcggactaa gatcaattga tgctatggac tactggggtc aaggaacctc agtcaccgtc  | 420 |
| tcctcagcca aaacgacacc cccatctgtc tatccactg                         | 459 |

<210> 104

<211> 435

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 104

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| agattgcctg ttaggtgtt ggtgctgatg ttctggattc ctgcttcac cagtgatgtt    | 60  |
| ttgatgaccc aaactcctct ctccctgcct gtcagtcttg gagatcaagc ctccatctct  | 120 |
| tgcagatcta gtcagagcat tctacatagt aatggaaaca cctatctaga gtggtacctg  | 180 |
| cagaaaccag gccagtctcc aaagctcctg atctacaaag ttccaaccg attttctggg   | 240 |
| gtcccagaca gggttcagtgg cagtggatca gggacagatt tcacactcaa gatcagcaga | 300 |

gtggaggctg aggatctggg agtttattac tgttttcaag gttcacttgt tccgctcacg 360  
ttcggtgctg ggaccaagct ggagctgaaa cgggctgatg ctgcaccaac tgtatccatc 420  
ttcccaccat ccagt 435

<210> 105  
<211> 123  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
  
<400> 105

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Leu Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser  
20 25 30

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Ser Tyr Asn Pro Ser  
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Tyr Thr Ser Arg Asn Gln Val  
65 70 75 80

Phe Leu Thr Ile Thr Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
85 90 95

Cys Ala Arg Arg Gln Leu Gly Leu Arg Ser Ile Asp Ala Met Asp Tyr  
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| 115                                                             | 120 |
| <210> 106                                                       |     |
| <211> 120                                                       |     |
| <212> PRT                                                       |     |
| <213> Homo sapiens                                              |     |
| <400> 106                                                       |     |
| Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln |     |
| 1 5 10 15                                                       |     |
| Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser |     |
| 20 25 30                                                        |     |
| Gly Met Arg Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu |     |
| 35 40 45                                                        |     |
| Trp Leu Ala Arg Ile Asp Trp Asp Asp Asp Lys Phe Tyr Ser Thr Ser |     |
| 50 55 60                                                        |     |
| Leu Lys Thr Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val |     |
| 65 70 75 80                                                     |     |
| Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr |     |
| 85 90 95                                                        |     |
| Cys Ala Arg Ile Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln |     |
| 100 105 110                                                     |     |
| Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser                                 |     |
| 115 120                                                         |     |

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic antibody

<400> 107

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Leu Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser  
20 25 30

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Ser Tyr Asn Pro Ser  
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
85 90 95

Cys Ala Arg Arg Gln Leu Gly Leu Arg Ser Ile Asp Ala Met Asp Tyr  
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 108

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic antibody

&lt;400&gt; 108

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Leu Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser  
 20 25 30

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Ser Tyr Asn Pro Ser  
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
 65 70 75 80

Val Leu Thr Ile Thr Asn Val Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Arg Arg Gln Leu Gly Thr Arg Gly Thr Asp Ala Met Asp Tyr  
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

&lt;210&gt; 109

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 109

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Leu His Ser  
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

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

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

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

Ser Leu Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
100 105 110

<210> 110

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 110

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

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

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

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

Ile His Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 111

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic antibody

<400> 111

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Leu His Ser  
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

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

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

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

Thr Arg Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 112

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic antibody

<400> 112

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Leu His Ser  
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

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

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

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

Thr Arg Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 113  
<211> 369  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic nucleic acid molecule

<400> 113  
caggtgaccc tgaaggagtc tggccctgcc ctggtgaagc ccaccagac cctgaccctg 60  
acctgcacct tctctggctt cagcctgagc acctctggca tgggcgtggg ctggatccgg 120  
cagccccctg gcaaggccct ggagtggctg gcccacatct ggtgggacga cgacaagtcc 180  
tacaaccca gcctgaagag ccggctgacc atcagcaagg acaccagcaa gaaccagtg 240  
gtgctgacca tgaccaacat ggaccctgtg gacacagcca cctactactg tgcccggcgg 300  
cagctgggcc tgcggagcat tgatgccatg gactactggg gccagggcac cacagtgaca 360  
gtgtccagc 369

<210> 114  
<211> 369  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic nucleic acid molecule

<400> 114  
caggtgaccc tgaaggagtc tggccctgcc ctggtgaagc ccaccagac cctgaccctg 60  
acctgcaccc tgtctggctt cagcctgagc acctctggca tgggcgtggg ctggatccgg 120

---

cagccccctg gcaaggccct ggagtggctg gccacatct ggtgggacga cgacaagtcc 180  
 tacaaccca gcctgaagag ccggctgacc atcagcaagg acaccagcaa gaaccaggtg 240  
 gtgctgacca tgaccaacat ggacctgtg gacacagcca cctactactg tgcccggcgg 300  
 cagctgggccc tgcggagcat tgatgcatg gactactggg gccagggcac cacagtgaca 360  
 gtgtccagc 369

<210> 115  
 <211> 336  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Synthetic nucleic acid molecule

<400> 115  
 gatgtggtga tgaccagag cccctgtcc ctgcctgtga cccctggcga gcctgccagc 60  
 atctcctgcc ggagctccca gagcatcctg cactccaatg gcaacaccta cctggagtgg 120  
 tacctgcaga agcctggcca gagccccag ctgctgatct acaaggtgtc caaccggttc 180  
 tccggcgtgc ctgaccggtt cagcggctcc ggcagcggca cagacttcac cctgaagatc 240  
 agccgggtgg aggtgagga tgtgggcgtc tactactgct tccagggcag cctggtgccc 300  
 ctgaccttg gccagggcac caagctggag atcaag 336

<210> 116  
 <211> 482  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Synthetic polypeptide

<400> 116

---

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala  
1                      5                      10                      15

Thr Val Ala Gln Ala Ala Leu Glu Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly  
                    20                      25                      30

Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe  
                    35                      40                      45

Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg  
50                      55                      60

Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp  
65                      70                      75                      80

Asp Asp Lys Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser  
                    85                      90                      95

Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp  
                    100                      105                      110

Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Gln Leu Gly Leu  
                    115                      120                      125

Arg Ser Ile Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr  
130                      135                      140

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro  
145                      150                      155                      160

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val  
                    165                      170                      175

---

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala  
180 185 190

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly  
195 200 205

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly  
210 215 220

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys  
225 230 235 240

Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Thr Ser Gly His His His  
245 250 255

His His His Gly Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly  
260 265 270

Gly Pro Phe Val Cys Glu Tyr Gln Gly Gln Ser Ser Asp Leu Pro Gln  
275 280 285

Pro Pro Val Asn Ala Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
290 295 300

Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser  
305 310 315 320

Glu Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Asp Phe Asp Tyr  
325 330 335

Glu Lys Met Ala Asn Ala Asn Lys Gly Ala Met Thr Glu Asn Ala Asp  
340 345 350

Glu Asn Ala Leu Gln Ser Asp Ala Lys Gly Lys Leu Asp Ser Val Ala  
 355 360 365

Thr Asp Tyr Gly Ala Ala Ile Asp Gly Phe Ile Gly Asp Val Ser Gly  
 370 375 380

Leu Ala Asn Gly Asn Gly Ala Thr Gly Asp Phe Ala Gly Ser Asn Ser  
 385 390 395 400

Gln Met Ala Gln Val Gly Asp Gly Asp Asn Ser Pro Leu Met Asn Asn  
 405 410 415

Phe Arg Gln Tyr Leu Pro Ser Leu Pro Gln Ser Val Glu Cys Arg Pro  
 420 425 430

Tyr Val Phe Gly Ala Gly Lys Pro Tyr Glu Phe Ser Ile Asp Cys Asp  
 435 440 445

Lys Ile Asn Leu Phe Arg Gly Val Phe Ala Phe Leu Leu Tyr Val Ala  
 450 455 460

Thr Phe Met Tyr Val Phe Ser Thr Phe Ala Asn Ile Leu Arg Asn Lys  
 465 470 475 480

Glu Ser

<210> 117

<211> 481

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic polypeptide

&lt;400&gt; 117

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala  
1 5 10 15

Thr Val Ala Gln Ala Ala Leu Glu Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly  
20 25 30

Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Leu  
35 40 45

Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg  
50 55 60

Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp  
65 70 75 80

Asp Asp Lys Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser  
85 90 95

Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp  
100 105 110

Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Gln Leu Gly Leu  
115 120 125

Arg Ser Ile Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr  
130 135 140

Val Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser  
145 150 155 160

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys  
165 170 175

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu  
180 185 190

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu  
195 200 205

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr  
210 215 220

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val  
225 230 235 240

Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Thr Ser Gly His His His His  
245 250 255

His His Gly Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Gly  
260 265 270

Pro Phe Val Cys Glu Tyr Gln Gly Gln Ser Ser Asp Leu Pro Gln Pro  
275 280 285

Pro Val Asn Ala Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser  
290 295 300

Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu  
305 310 315 320

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Asp Phe Asp Tyr Glu  
325 330 335

Lys Met Ala Asn Ala Asn Lys Gly Ala Met Thr Glu Asn Ala Asp Glu  
340 345 350

Asn Ala Leu Gln Ser Asp Ala Lys Gly Lys Leu Asp Ser Val Ala Thr  
 355 360 365

Asp Tyr Gly Ala Ala Ile Asp Gly Phe Ile Gly Asp Val Ser Gly Leu  
 370 375 380

Ala Asn Gly Asn Gly Ala Thr Gly Asp Phe Ala Gly Ser Asn Ser Gln  
 385 390 395 400

Met Ala Gln Val Gly Asp Gly Asp Asn Ser Pro Leu Met Asn Asn Phe  
 405 410 415

Arg Gln Tyr Leu Pro Ser Leu Pro Gln Ser Val Glu Cys Arg Pro Tyr  
 420 425 430

Val Phe Gly Ala Gly Lys Pro Tyr Glu Phe Ser Ile Asp Cys Asp Lys  
 435 440 445

Ile Asn Leu Phe Arg Gly Val Phe Ala Phe Leu Leu Tyr Val Ala Thr  
 450 455 460

Phe Met Tyr Val Phe Ser Thr Phe Ala Asn Ile Leu Arg Asn Lys Glu  
 465 470 475 480

Ser

<210> 118

<211> 243

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic polypeptide

<400> 118

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala  
1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala Ser Arg Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro  
20 25 30

Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg  
35 40 45

Ser Ser Gln Ser Ile Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp  
50 55 60

Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val  
65 70 75 80

Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser  
85 90 95

Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val  
100 105 110

Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Leu Val Pro Leu Thr Phe Gly  
115 120 125

Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val  
130 135 140

Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser  
145 150 155 160

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln  
165 170 175

Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val  
180 185 190

Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu  
195 200 205

Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu  
210 215 220

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg  
225 230 235 240

Gly Glu Cys

- <210> 119
- <211> 5458
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> Synthetic nucleic acid molecule

<400> 119  
gcccaatacgc caaacgcct ctccccgcgc gttggccgat tcattaatgc agctggcacg 60  
acaggtttcc cgactggaaa gcgggcagtg agcgcaacgc aattaatgtg agttagctca 120  
ctcattaggc accccagget ttacacttta tgcttcgggc tcgtatgttg tgtggaattg 180  
tgagcggata acaatttcac acaagatcta gctattccag agattacgca aattctattt 240  
caaggagaca gtcataatga aatacctgct gccgactgca gctgctggtc tgctgctgct 300  
ggcggcccag ccggctatgg cttctagaga tgtggtgatg acccagagcc cctgtccct 360

---

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| gcctgtgacc cctggcgagc ctgccagcat ctccctgccgg agctcccaga gcatcctgca | 420  |
| ctccaatggc aacacctacc tggagtggta cctgcagaag cctggccaga gccccagct   | 480  |
| gctgatctac aagggtgtcca accggttctc cggcgtgcct gaccggttca gcggctccgg | 540  |
| cagcggcaca gacttcaccc tgaagatcag ccgggtggag gctgaggatg tgggcgtcta  | 600  |
| ctactgcttc cagggcagcc tgggtcccct gacctttggc cagggcacca agctggagat  | 660  |
| caagcgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttcccg ccatctgatg agcagttgaa  | 720  |
| atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc tatcccagag aggccaaagt  | 780  |
| acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggttaactcc caggagagtg tcacagagca | 840  |
| ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacctg acgctgagca aagcagacta   | 900  |
| cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag ggcctgagct cgcccgtcac   | 960  |
| aaagagcttc aacaggggag agtgtaaca attgctagaa ttgtgagcgg ataacaattt   | 1020 |
| cagcaggtcg agttcttgat aacgaggcgt aaaaaatgaa aaagacagct atcgcgattg  | 1080 |
| cagtggcact ggctggtttc gctaccgtgg ccagggcggc cctcgagcag gtgacctga   | 1140 |
| aggagtctgg ccctgccctg gtgaagccca ccagaccct gacctgacc tgcaccttct    | 1200 |
| ctggcttcag cctgagcacc tctggcatgg gcgtgggctg gatccggcag cccctggca   | 1260 |
| aggccctgga gtggctggcc cacatctggt gggacgacga caagtcctac aaccccagcc  | 1320 |
| tgaagagccg gctgaccatc agcaaggaca ccagcaagaa ccaggtgggtg ctgaccatga | 1380 |
| ccaacatgga ccctgtggac acagccacct actactgtgc ccggcggcag ctgggcctgc  | 1440 |
| ggagcattga tgccatggac tactggggcc agggcaccac agtgacagtg tccagcgct   | 1500 |
| ccaccaaggg cccatcggtc ttccccctgg caccctctc caagagcacc tctgggggca   | 1560 |
| cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga  | 1620 |
| actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca cttccccggc tgtcctacag tcctcaggac  | 1680 |

---

|                                                                   |      |
|-------------------------------------------------------------------|------|
| tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc cagacctaca | 1740 |
| tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtt gagcccaaat | 1800 |
| cttgtagctag tggccaccac caccatcacc atggcggtga aaaaaactc atctcagaag | 1860 |
| aggatctggg tggtagcca ttcgtttgtg aatatcaagg ccaatcgtct gacctgcctc  | 1920 |
| aacctcctgt caatgctggc ggcggctctg gtggtggttc tggtagcggc tctgagggtg | 1980 |
| gcggctctga gggtagcggt tctgagggtg gcggctctga gggtagcggt tccggtggcg | 2040 |
| gctccggttc cggtgatttt gattatgaaa aaatggcaaa cgctaataag ggggctatga | 2100 |
| ccgaaaatgc cgatgaaaac gcgtacagt ctgacgctaa aggcaaactt gattctgtcg  | 2160 |
| ctactgatta cggtgtgct atcgatggtt tcattggtga cgtttcggc cttgctaatag  | 2220 |
| gtaatggtgc tactggtgat tttgctggct ctaattccca aatggctcaa gtcggtgacg | 2280 |
| gtgataattc acctttaatg aataatttcc gtcaatattt accttctttg cctcagtcgg | 2340 |
| ttgaatgtcg cccttatgtc tttggcgctg gtaaaccata tgaattttct attgattgtg | 2400 |
| aaaaataaaa cttattccgt ggtgtctttg cgtttctttt atatgttgcc acctttatgt | 2460 |
| atgtattttc gacgtttgct aacatactgc gtaataagga gtcttaagct agctggccgt | 2520 |
| cgttttacaa cgtcgtgact gggaaaaccc tggcgttacc caacttaatc gccttgacgc | 2580 |
| acatccccct ttcgccagct ggcgtaatag cgaagaggcc cgcaccgatc gcccttccca | 2640 |
| acagttgcgc agcctgaatg gcgaatggcg attccgttgc aatggctggc ggtaatatg  | 2700 |
| ttctggatat taccagcaag gccgatagtt tgagttcttc tactcaggca agtgatgtta | 2760 |
| ttactaatca aagaagtatt gcgacaacgg ttaatttgcg tgatggacag actcttttac | 2820 |
| tcggtggcct cactgattat aaaaacactt ctcaggatc tggcgtagcg ttcctgtcta  | 2880 |
| aaatcccttt aatcggcctc ctgtttagct cccgctctga ttctaacgag gaaagcacgt | 2940 |
| tatacgtgct cgtcaaagca accatagtag gcgccctgta gcggcgcat aagcgcgcg   | 3000 |

---

|                                                                   |      |
|-------------------------------------------------------------------|------|
| ggtgtggtgg ttacgcgcag cgtgaccgct acacttgcca gcgccctagc gcccgctcct | 3060 |
| ttcgctttct tcccttcctt tctcgccacg ttcgccggct ttccccgtca agctctaaat | 3120 |
| cgggggctcc ctttagggtt ccgatttagt gctttacggc acctcgacce caaaaaactt | 3180 |
| gattagggtg atggttcacg tagtgggcca tcgccctgat agacggtttt tcgccctttg | 3240 |
| acgttgagat ccacgttctt taatagtgga ctcttgttcc aaactggaac aacactcaac | 3300 |
| cctatctcgg tctattcttt tgatttataa gggattttgc cgatttcggc ctattggta  | 3360 |
| aaaaatgagc tgatttaaca aaaatttaac gcgaatttta acaaaatatt aacgtttaca | 3420 |
| atttaaatat ttgcttatac aatcttcctg tttttggggc ttttctgatt atcaaccggg | 3480 |
| gtacatatga ttgacatgct agttttacga ttaccgttca tcgcaggtgg cacttttcgg | 3540 |
| ggaaatgtgc gcggaacccc tatttgitta tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg | 3600 |
| ctcatgagac aataaccctg ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt | 3660 |
| attcaacatt tccgtgtcgc cttattccc ttttttgcgg catittgcct tctgttttt   | 3720 |
| gtcaccag aaacgtggt gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg tgcacgagt     | 3780 |
| ggttacatcg aactggatct caacagcggg aagatccttg agagttttcg cccgaagaa  | 3840 |
| cgttttccaa tgatgagcac ttttaaagtt ctgctatgtg gcgcggtatt atcccgtatt | 3900 |
| gacgccgggc aagagcaact cggtcgccgc atacactatt ctcagaatga cttggttag  | 3960 |
| tactcaccag tcacagaaaa gcatcttacg gatggcatga caglaagaga attatgcagt | 4020 |
| gctgccataa ccatgagtga taacactgcg gccaaactac ttctgacaac gatcggagga | 4080 |
| ccgaaggagc taaccgcttt ttgcacaaac atgggggata atgtaactcg cttgatcgt  | 4140 |
| tggaaccgg agctgaatga agccatacca aacgacgagc gtgacaccac gatgcctgta  | 4200 |
| gcaatggcaa caacgttgcg caaactatta actggcgaa tacttactct agcttcccgg  | 4260 |
| caacaattaa tagactggat ggaggcggat aaagttgcag gaccacttct gcgctcgcc  | 4320 |

---

cttccggctg gctggtttat tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgcggt 4380  
 atcattgcag cactggggcc agatggtaag ccctcccgta tcgtagttat ctacacgacg 4440  
 gggagtcagg caactatgga tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg tgcctcactg 4500  
 attaagcatt ggtaactgtc agaccaagtt tactcatata tacttttagat tgatttaaaa 4560  
 cttcattttt aatttaaaag gatctaggtg aagatccttt ttgataatct catgaccaaa 4620  
 atcccttaac gtgagttttc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga 4680  
 tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg 4740  
 ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc gaaggttaact 4800  
 ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gtccttctag tgtagccgta gttaggccac 4860  
 cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgtc tgctaatect gttaccagtg 4920  
 gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg 4980  
 gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga 5040  
 acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc 5100  
 gaaggagaaa aggcggacag gtatccggta agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg 5160  
 agggagcttc cagggggaaa cgcttggtat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc 5220  
 tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc 5280  
 agcaacgcgg cttttttacg gttcctggcc ttttctggc cttttgctca catgttcttt 5340  
 cctgcgttat ccctgatc tgtggataac cgtattaccg ctttgagtg agctgatacc 5400  
 gctcgccgca gccgaacgac cgagcgcagc gagtcaatga gcgaggaagc ggaagagc 5458

<210> 120

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic oligonucleotide

&lt;400&gt; 120

ctatggcttc tagagatgtg gtgatg

26

&lt;210&gt; 121

&lt;211&gt; 398

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic nucleic acid molecule

&lt;400&gt; 121

agctgctggt ctgctgctgc tggcggccca gccggctatg gcttctagag atgtggtgat 60

gaccagagc cccctgtccc tgctgtgac ccctggcgag cctgccagca tctcctgccg 120

gagctcccag agcatcctgc actccaatgg caacacctac ctggagtggg acctgcagaa 180

gcctggccag agccccagc tgctgatcta caaggtgtcc aaccggttct ccggcgtgcc 240

tgaccggttc agcggctccg gcagcggcac agacttcacc ctgaagatca gccgggtgga 300

ggctgaggat gtgggcgtct actactgctt ccagggcagc ctggtgcccc tgacctttgg 360

ccagggcacc aagctggaga tcaagcgtac ggtggctg 398

&lt;210&gt; 122

&lt;211&gt; 398

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic nucleic acid molecule

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (329).. (330)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (332).. (333)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (335).. (336)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (338).. (339)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (341).. (342)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 122

agctgctggt ctgctgctgc tggcggccca gccggctatg gcttctagag atgtggtgat 60

gaccagagc cccctgtccc tgctgtgac ccctggcgag cctgccagca tctcctgccg 120

gagctcccag agcatcctgc actccaatgg caacacctac ctggagtggg acctgcagaa 180

gcctggccag agccccagc tgctgatcta caaggtgtcc aaccggttct ccggcgtgcc 240

tgaccggttc agcggctccg gcagcggcac agacttcacc ctgaagatca gccgggtgga 300

ggctgaggat gtgggcgtct actactgcnn knnknknknk nnkgtgcccc tgacctttgg 360

ccagggcacc aagctggaga tcaagcgtac ggtggctg 398

<210> 123

<211> 82

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<220>

<221> misc\_feature

<222> (57)..(58)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (60)..(61)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (63)..(64)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (66)..(67)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (69)..(70)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 123

cagccaccgt acgcttgatc tccagcttgg tgccttgcc aaaggtcagg ggcacmnnmn 60

nmnnmnnmnn gcagtagtag ac 82

<210> 124

<211> 398

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic nucleic acid molecule

<220>

<221> misc\_feature  
 <222> (341)..(342)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (344)..(345)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (347)..(348)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (350)..(351)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (353)..(354)  
 <223> n is a, c, g, or t

<400> 124  
 agctgctggt ctgctgctgc tggcggccca gccggctatg gcttctagag atgtggtgat 60  
 gaccagagc ccctgtccc tgctgtgac ccctggcgag cctgccagca tctctgccg 120  
 gagtcccag agcatcctgc actccaatgg caacacctac ctggagtggg acctgcagaa 180  
 gcctggccag agccccagc tgctgatcta caagggtgtc aaccggttct ccggcgtgcc 240  
 tgaccggttc agcggctccg gcagcggcac agacttcacc ctgaagatca gccgggtgga 300  
 ggctgaggat gtgggcgtct actactgctt ccagggcagc nnknnknnkn nknnktttgg 360  
 ccagggcacc aagctggaga tcaagcgta ggtggctg 398

<210> 125  
 <211> 82  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<220>

<221> misc\_feature

<222> (45)..(46)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (48)..(49)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (51)..(52)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (54)..(55)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (57)..(58)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 125

cagccaccgt acgcttgatc tccagcttgg tgccctggcc aaamnnmnnm nnnnnmnnngc 60

tgccctggaa gcagtagtag ac 82

<210> 126

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

---

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| <400> 126                                                          |     |
| gtttatctcg agcaggtgac cctgaag                                      | 27  |
| <210> 127                                                          |     |
| <211> 399                                                          |     |
| <212> DNA                                                          |     |
| <213> Artificial Sequence                                          |     |
| <220>                                                              |     |
| <223> Synthetic nucleic acid molecule                              |     |
| <400> 127                                                          |     |
| ccgtggccca ggcgccctc gagcaggtga ccctgaagga gtctggccct gccctggtga   | 60  |
| agcccacca gaccctgacc ctgacctgca ctttctctgg cttcagcctg agcacctctg   | 120 |
| gcatgggctt gggtctggatc cggcagcccc ctggcaaggc cctggagtgg ctggcccaca | 180 |
| tctggtggga cgacgacaag tctacaacc ccagcctgaa gagccggctg accatcagca   | 240 |
| aggacaccag caagaaccag gtggtgctga ccatgaccaa catggaccct gtggacagt   | 300 |
| cccggcggca gctgggcctg cggagcattg atgcatgga ctactggggc cagggcacca   | 360 |
| cagtgacagt gtccagcgcc tccaccaagg gcccacgg                          | 399 |
| <210> 128                                                          |     |
| <211> 399                                                          |     |
| <212> DNA                                                          |     |
| <213> Artificial Sequence                                          |     |
| <220>                                                              |     |
| <223> Synthetic nucleic acid molecule                              |     |
| <220>                                                              |     |
| <221> misc_feature                                                 |     |
| <222> (306)..(307)                                                 |     |
| <223> n is a, c, g, or t                                           |     |
| <220>                                                              |     |
| <221> misc_feature                                                 |     |

<222> (309).. (310)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (312).. (313)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (315).. (316)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (318).. (319)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 128

ccgtggccca ggcggccctc gagcaggtga ccctgaagga gtctggccct gccctggtga 60

agcccaacca gaccctgacc ctgacctgca cttctcttgg cttcagcctg agcacctctg 120

gcatggggcgt gggctggatc cggcagcccc ctggcaaggc cctggagtgg ctggcccaca 180

tctggtggga cgacgacaag tcctacaacc ccagcctgaa gagccggctg accatcagca 240

aggacaccag caagaaccag gtggtgctga ccatgaccaa catggaccct gtggacagt 300

cccggnnknn knnknknknk cggagcattg atgccatgga ctactggggc cagggcacca 360

cagtgcacagt gtccagcgcc tccaccaagg gcccatcgg 399

<210> 129

<211> 102

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<220>

<221> misc\_feature  
 <222> (81)..(82)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (84)..(85)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (87)..(88)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (90)..(91)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (93)..(94)  
 <223> n is a, c, g, or t

<400> 129  
 ccgatgggcc cttggtggag gcgctggaca ctgtcactgt ggtgccctgg cccagtagt 60  
 ccatggcatc aatgctccgm nnnnnnnnnm nmnnccgggc ac 102

<210> 130  
 <211> 399  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Synthetic nucleic acid molecule

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (330)..(331)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (333)..(334)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (336)..(337)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (339)..(340)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (342)..(343)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 130

ccgtggccca ggcggccctc gagcaggtga ccctgaagga gtctggccct gccctggtga 60

agcccacca gaccctgacc ctgacctgca ctttctctgg cttcagcctg agcacctctg 120

gcatgggcgt gggctggatc cggcagcccc ctggcaaggc cctggagtgg ctggcccaca 180

tctggtggga cgacgacaag tctacaacc ccagcctgaa gagccggctg accatcagca 240

aggacaccag caagaaccag gtggtgctga ccatgaccaa catggaccct gtggacagtg 300

cccggcggca gctgggcctg cggagcattn nknnknnknn knnktggggc cagggcacca 360

cagtgcagct gtccagcgcc tccaccaagg gcccacgg 399

<210> 131

<211> 91

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<220>

<221> misc\_feature

<222> (57)..(58)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (60)..(61)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (63)..(64)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (66)..(67)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (69)..(70)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 131

ccgatgggcc cttggtggag gcgctggaca ctgtcactgt ggtgccctgg ccccamnnmn 60

nmnnmnnmnn aatgctccgc aggcccagct g 91

<210> 132

<211> 399

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic nucleic acid molecule

<220>

<221> misc\_feature

<222> (318)..(319)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (321)..(322)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (324)..(325)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (327)..(328)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (330)..(331)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 132

ccgtggccca ggcgccctc gagcaggtga ccctgaagga gtctggccct gccctggtga 60

agcccacca gaccctgacc ctgacctgca ccttctcttg cttcagcctg agcacctctg 120

gcatgggcgt gggctggatc cggcagcccc ctggcaaggc cctggagtgg ctggcccaca 180

tctggtggga cgacgacaag tcctacaacc ccagcctgaa gagccggctg accatcagca 240

aggacaccag caagaaccag gtggtgctga ccatgaccaa catggaccct gtggacagtg 300

cccggcggca gctgggcnk nnknnknnk nkgccatgga ctactggggc cagggcacca 360

cagtgcagt gtccagcgcc tccaccaagg gcccatcgg 399

<210> 133

<211> 91

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<220>

<221> misc\_feature

<222> (69)..(70)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (72)..(73)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (75)..(76)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (78)..(79)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (81)..(82)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 133

ccgatgggcc cttggtggag gcgctggaca ctgtcactgt ggtgccctgg cccagtagt 60

ccatggcmnn mnnmnnmnnm nngcccagct g 91

<210> 134

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 134

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95

Lys Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu  
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
325 330

<210> 135

<211> 326

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 135

---

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg  
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Thr Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr  
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
130 135 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn  
165 170 175

---

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp  
 180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro  
 195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
 210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn  
 225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
 245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
 260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
 275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
 290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
 305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325

<210> 136

<211> 327

<212> PRT

<213> Homo sapiens

&lt;400&gt; 136

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg  
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr  
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro  
100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe

| 165                                                             | 170 | 175     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|---------|
| Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp |     |         |
| 180                                                             | 185 | 190     |
| Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu |     |         |
| 195                                                             | 200 | 205     |
| Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg |     |         |
| 210                                                             | 215 | 220     |
| Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys |     |         |
| 225                                                             | 230 | 235 240 |
| Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp |     |         |
| 245                                                             | 250 | 255     |
| Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys |     |         |
| 260                                                             | 265 | 270     |
| Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser |     |         |
| 275                                                             | 280 | 285     |
| Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser |     |         |
| 290                                                             | 295 | 300     |
| Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser |     |         |
| 305                                                             | 310 | 315 320 |
| Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys                                     |     |         |
| 325                                                             |     |         |

<210> 137

&lt;211&gt; 326

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic polypeptide

&lt;400&gt; 137

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg  
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Thr Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr  
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
130 135 140

Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn  
165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp  
180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro  
195 200 205

Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn  
225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
325

<210> 138  
<211> 449  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic polypeptide

<400> 138

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Leu Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser  
20 25 30

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Ser Tyr Asn Pro Ser  
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
65 70 75 80

Val Leu Thr Ile Thr Asn Val Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
85 90 95

Cys Ala Arg Arg Gln Leu Gly Thr Arg Gly Thr Asp Ala Met Asp Tyr  
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly

---

| 115                                                                    | 120 | 125     |
|------------------------------------------------------------------------|-----|---------|
| Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser<br>130 | 135 | 140     |
| Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val<br>145 | 150 | 155 160 |
| Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe<br>165 | 170 | 175     |
| Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val<br>180 | 185 | 190     |
| Thr Val Thr Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val<br>195 | 200 | 205     |
| Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys<br>210 | 215 | 220     |
| Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro<br>225 | 230 | 235 240 |
| Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser<br>245 | 250 | 255     |
| Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp<br>260 | 265 | 270     |
| Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn<br>275 | 280 | 285     |
| Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val        |     |         |

---

| 290                                                             | 295                                         | 300 |     |
|-----------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|-----|-----|
| Val Ser Val Leu Thr                                             | Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu |     |     |
| 305                                                             | 310                                         | 315 | 320 |
| Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys |                                             |     |     |
|                                                                 | 325                                         | 330 | 335 |
| Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr |                                             |     |     |
|                                                                 | 340                                         | 345 | 350 |
| Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr |                                             |     |     |
|                                                                 | 355                                         | 360 | 365 |
| Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu |                                             |     |     |
|                                                                 | 370                                         | 375 | 380 |
| Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu |                                             |     |     |
| 385                                                             | 390                                         | 395 | 400 |
| Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys |                                             |     |     |
|                                                                 | 405                                         | 410 | 415 |
| Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu |                                             |     |     |
|                                                                 | 420                                         | 425 | 430 |
| Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly |                                             |     |     |
|                                                                 | 435                                         | 440 | 445 |
| Lys                                                             |                                             |     |     |
| <210>                                                           | 139                                         |     |     |

&lt;211&gt; 1407

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic nucleic acid molecule

&lt;400&gt; 139

|                                                                   |      |
|-------------------------------------------------------------------|------|
| atggaatgga gctgggtctt tctcttcttc ctgtcagtaa ctacaggtgt ccactcgag  | 60   |
| gtgacctga aggagtctgg ccctggcctg ctgaagccca cccagaccct gaccctgacc  | 120  |
| tgcacctgt ctggcttcag cctgagcacc tctggcatgg gcgtgggctg gttccggcag  | 180  |
| ccccctggca agggcctgga gtggctggcc cacatctggt gggacgacga caagtctac  | 240  |
| aacccagcc tgaagagccg gctgaccatc agcaaggaca ccagcaagaa ccaggtggtg  | 300  |
| ctgaccatca ccaacgtgga ccctgtggac acagccacct actactgtgc ccggcggcag | 360  |
| ctgggcacta gggggacgga tgccatggac tactggggcc agggcaccac agtgacagt  | 420  |
| tccagcgcac ccaccaaggg cccatccgtc ttccccctgg cgcctgctc caggagcacc  | 480  |
| tccgagagca cagccgccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg | 540  |
| gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggctgcaca ccttcccggc tgcctacag   | 600  |
| tctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtga cctccagcaa ctttggcacg  | 660  |
| cagacctaca cctgcaacgt agatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagacagtt | 720  |
| gagcggaaat gctgcgtgga gtgcccacca tgcccagcac ctccagtggc cggaccatca | 780  |
| gtcttctgt tcccccaaa acccaaggac actctcatga tctccggac ccctgaggtc    | 840  |
| acgtgcgtgg tggtagcgt gagccaggaa gacccgagg tccagttcaa ctggtacgtg   | 900  |
| gatggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgctgg aggagcagtt caacagcacg | 960  |
| ttccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac | 1020 |
| aagtgaagg tctccaacaa aggcctcccg tctccatcg agaaaaccat ctccaaaacc   | 1080 |

aaagggcagc cccgagagcc acaggtgtac accctgcccc catcccggga ggagatgacc 1140  
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct accccagcga catcgccgtg 1200  
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc catgctggac 1260  
tccgacggct ctttcttcct ctacagcaag ctaaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1320  
gggaatgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacacagaag 1380  
agcctctccc tgtctcctgg taaatga 1407

<210> 140  
<211> 219  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic polypeptide

<400> 140

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Leu His Ser  
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Thr

| 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |     |     |     |     |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| Thr | Arg | Val | Pro | Leu | Thr | Phe | Gly | Gln | Gly | Thr | Lys | Leu | Glu | Ile | Lys |  |
| 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |     |     |     |  |
| Arg | Thr | Val | Ala | Ala | Pro | Ser | Val | Phe | Ile | Phe | Pro | Pro | Ser | Asp | Glu |  |
| 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |     |     |  |
| Gln | Leu | Lys | Ser | Gly | Thr | Ala | Ser | Val | Val | Cys | Leu | Leu | Asn | Asn | Phe |  |
| 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |     |  |
| Tyr | Pro | Arg | Glu | Ala | Lys | Val | Gln | Trp | Lys | Val | Asp | Asn | Ala | Leu | Gln |  |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |  |
| Ser | Gly | Asn | Ser | Gln | Glu | Ser | Val | Thr | Glu | Gln | Asp | Ser | Lys | Asp | Ser |  |
| 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |     |     |     |     |  |
| Thr | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Thr | Leu | Thr | Leu | Ser | Lys | Ala | Asp | Tyr | Glu |  |
| 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |     |     |     |  |
| Lys | His | Lys | Val | Tyr | Ala | Cys | Glu | Val | Thr | His | Gln | Gly | Leu | Ser | Ser |  |
| 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |     |     |  |
| Pro | Val | Thr | Lys | Ser | Phe | Asn | Arg | Gly | Glu | Cys |     |     |     |     |     |  |
| 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |

- <210> 141
- <211> 720
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220>
- <223> Synthetic oligonucleotide
- <400> 141

atgagtgtgc ccaactcaggt cctggggttg ctgctgctgt ggcttacaga tgccagatgc 60  
gatgtggtga tgaccagac cccctgtcc ctgcctgtga cccctggcca gcctgccagc 120  
atctcctgcc ggagctccca gagcatcctg cactccaatg gcaacaccta cctggagtgg 180  
tacctgcaga agcctggcca gagccccag ctgctgatct acaaggtgtc caaccggttc 240  
tccggcgtgc ctgaccggtt cagcggctcc ggcagcggca cagacttcac cctgaagatc 300  
agccgggtgg aggctgagga tgtgggcgtc tactactgcc ttcagactac tcgtgtgccc 360  
ctgaccttig gccaggcac caagctggag atcaagcgta cggtggtgc accatctgtc 420  
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 480  
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 540  
tcgggtaact ccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 600  
agcagcacc tgacgtgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 660  
gtcacccatc agggcctgag ctgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttag 720

<210> 142  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic peptide

<400> 142

Arg Gln Leu Gly Lys Leu Ala Leu Asp Ala Met Asp Tyr  
1 5 10

<210> 143  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

---

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 143

Arg Gln Leu Gly Leu Arg Ser Ile Asp Ala Met Asp Tyr

1                      5                      10

<210> 144

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 144

Arg Gln Leu Gly Gln Arg Gln Thr Asp Ala Met Asp Tyr

1                      5                      10

<210> 145

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 145

Arg Ala Ile Gln Pro Arg Ser Ile Asp Ala Met Asp Tyr

1                      5                      10

<210> 146

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 146

Arg Gln Leu Gly Leu Arg Ser Ile Asp Ala His Thr Arg  
1 5 10

<210> 147

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 147

Arg Gln Leu Gly Gln Pro Ser Val Asp Ala Met Asp Tyr  
1 5 10

<210> 148

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 148

Arg Gln Leu Gly Phe Gln Ser Thr Asp Ala Met Asp Tyr  
1 5 10

<210> 149

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 149

Arg Gln Leu Gly Gln Ala Gly His Asp Ala Met Asp Tyr  
1 5 10

<210> 150  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic peptide

<400> 150

Arg Gln Leu Gly Asp Asn Val Ala Asp Ala Met Asp Tyr  
1 5 10

<210> 151  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic peptide

<400> 151

Arg Gln Leu Gly Met Ala Thr Pro Asp Ala Met Asp Tyr  
1 5 10

<210> 152  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic peptide

<400> 152

Arg Gln Leu Gly Ala His Trp Leu Asp Ala Met Asp Tyr

---

|   |   |    |
|---|---|----|
| 1 | 5 | 10 |
|---|---|----|

<210> 153  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic peptide

<400> 153

Arg Gln Leu Gly Pro Glu Pro Gln Asp Ala Met Asp Tyr  
1                      5                      10

**20C2-重链可变区序列**

tgggcagacttaccattctcattcctgctgctgattgtccctgcatatg  
tcttgtccCAAGTTACTCTAAAAGAGTCTGGCCCTGGGATATTGAAGCC  
CTCACAGACCCTCAGTCTGACTTGTTCTCTCTCTGGGTTTTCACTGAGC  
ACTTCTGGTATGGGTGTAGGCTGGTTTCGTCAGCCTTCAGGGAAGGGTC  
TGGAGTGGCTGGCACACATTTGGTGGGATGATGATAAGTCCTATAATCC  
ATCCCTGAAGAGCCGGCTCACAATCTCCAAGTATACCTCTAGAAACCAG  
GTTTTCTTCACGATCACCAGTGTGGACACTGCAGATACTGCCACTTACT  
ATTGTGCTCGAAGACAACCTCGGACTAAGATCAATTGATGCTATGGACTA  
CTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCC  
CCATCTGTCTATCCACTG (SEQ ID NO:103)

**图1A****20C2-轻链可变区序列**

agattgcctgttaggctggttggtgctgatggttctggattcctgcttcca  
ccagtGATGTTTTGATGACCCAACTCCTCTCTCCCTGCCTGTCAGTCT  
TGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCGAGATCTAGTCAGAGCATTCTACAT  
AGTAATGGAAACACCTATTTAGAGTGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGT  
CTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCC  
AGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATC  
AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGTTTTCAAGGTT  
CACTTGTTCCGCTCACGTTGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACG  
GGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCACCATCCAGT  
(SEQ ID NO:104)

**图1B**

20C2 QVTLKESGPG **ILKP****S**QTL**SL** TC**S**LSGFSLS TSGMGVGVWFR QP**S**GKGLEWL  
VH2 3-1 2-70 QVTLKESGPA LVKPTQTLTL TCTFSGFSLS TSGMRVSWIR QPPGKALEWL  
Hu20C QVTLKESGPA LVKPTQTLTL TCTLSGFSLS TSGMGVGVWIR QPPGKALEWL  
Hu20C2A3 QVTLKESGPG **LLKP****T**QTL**TL** TC**T**LSGFSLS TSGMGVGVWFR QP**P**GKGLEWL  
HCDR1

20C2 AHIWWDDDKS YNPSLKSRLT ISKY**T**SRNQV **FL**TI**T**SVD**T**A DTATYYCARR  
VH2 3-1 2-70 ARIDWDDDKF YSTSLKTRLT ISKDTSKNQV VLTMTNMDPV DTATYYCARI  
Hu20C2 AHIWWDDDKS YNPSLKSRLT ISKDTSKNQV VLTMTNMDPV DTATYYCARR  
Hu20C2A3 AHIWWDDDKS YNPSLKSRLT ISKDT**S**KNQV **V**LTI**T**NVD**P**V DTATYYCARR  
HCDR2

\* \* \*  
20C2 QLGLRSIDAMDYW GQGT**S**VTVSS (SEQ ID NO:105)  
(JH6) YYYYYGMDVW GQGTTVTVSS (SEQ ID NO:106)  
Hu20C2 QLGLRSIDAMDYW GQGTTVTVSS (SEQ ID NO:107)  
Hu20C2A3 QLGT**R**G**T**DAMDYW GQGT**T**VTVSS (SEQ ID NO:108)  
HCDR3

2A

20C2

VKII 4-1-(1)A18

Hu20C2

Hu20C2A3

DV

DM

TM

QT

PLS

LPV

SL

GD

QAS

ISCR

SS

QS

SIL

HSNG

NT

YLEW

YLQ

KPG

QSP

K

20C2

VKII 4-1-(1)A18

Hu20C2

Hu20C2A3

DI

VM

TM

QT

PLS

LSV

TP

GQ

PAS

ISCK

SS

QS

SLL

HSDG

KTY

LYW

YLQ

KPG

QSP

Q

20C2

VKII 4-1-(1)A18

Hu20C2

Hu20C2A3

DV

MT

QS

PLS

LPV

TP

GE

PAS

ISCR

SS

QS

SIL

HSNG

NT

YLEW

YLQ

KPG

QSP

Q

20C2

VKII 4-1-(1)A18

Hu20C2

Hu20C2A3

DV

MT

QT

PLS

LPV

TP

GQ

PAS

ISCR

SS

QS

SIL

HSNG

NT

YLEW

YLQ

KPG

QSP

Q

LCDR1

20C2

VKII 4-1-(1)A18

Hu20C2

Hu20C2A3

LLIY

KV

SN

RF

SGV

PD

RF

SGS

GS

GT

DF

TL

KI

SR

VE

AE

D

L

GV

YYC

F

Q

G

S

L

V

P

20C2

VKII 4-1-(1)A18

Hu20C2

Hu20C2A3

LLIY

EV

SS

RF

SGV

PD

RF

SGS

GS

GT

DF

TL

KI

SR

VE

AE

D

V

GV

YYC

M

Q

G

I

H

L

P

20C2

VKII 4-1-(1)A18

Hu20C2

Hu20C2A3

LLIY

KV

SN

RF

SGV

PD

RF

SGS

GS

GT

DF

TL

KI

SR

VE

AE

D

V

GV

YYC

L

Q

T

T

R

V

P

20C2

VKII 4-1-(1)A18

Hu20C2

Hu20C2A3

LLIY

KV

SN

RF

SGV

PD

RF

SGS

GS

GT

DF

TL

KI

SR

VE

AE

D

V

GV

YYC

L

Q

T

T

R

V

P

LCDR2

101

20C2

VKII 4-1-(1)A18

Hu20C2

Hu20C2A3

LT

FG

AG

TK

LE

LK

(SEQ ID NO:109)

(JK2)

Y

T

F

G

Q

G

T

K

L

E

IK

(SEQ ID NO:110)

Hu20C2

LT

FG

Q

G

T

K

L

E

IK

(SEQ ID NO:111)

Hu20C2A3

LT

FG

Q

G

T

K

L

E

IK

(SEQ ID NO:112)

图2B

**人源化Hu20C2 (CDR嫁接) -HCVRA**

cagggtgaccctgaaggagtctggccctgccctggtgaagcccacccaga  
ccctgaccctgacctgcaccttctctggcttcagcctgagcacctctgg  
catgggctgctgggctggatccggcagccccctggcaaggccctggagtgg  
ctggcccacatctggtgggacgacgacaagtccacaaccccagcctga  
agagccggctgaccatcagcaaggacaccagcaagaaccagggtggtgct  
gaccatgaccaacatggaccctgtggacacagccacctactactgtgcc  
cggcggcagctgggcctgcgaggcattgatgccatggactactggggcc  
agggcaccacagtgcagtgtccagc (SEQ ID NO:113)

**图3A****人源化Hu20C2 (CDR嫁接) -HCVRB**

cagggtgaccctgaaggagtctggccctgccctggtgaagcccacccaga  
ccctgaccctgacctgcacccctgtctggcttcagcctgagcacctctgg  
catgggctgctgggctggatccggcagccccctggcaaggccctggagtgg  
ctggcccacatctggtgggacgacgacaagtccacaaccccagcctga  
agagccggctgaccatcagcaaggacaccagcaagaaccagggtggtgct  
gaccatgaccaacatggaccctgtggacacagccacctactactgtgcc  
cggcggcagctgggcctgcgaggcattgatgccatggactactggggcc  
agggcaccacagtgcagtgtccagc (SEQ ID NO:114)

**图3B****人源化Hu20C2 (CDR嫁接) -LCVR**

gatgtggtgatgacccagagccccctgtccctgcctgtgacccctggcg  
agcctgccagcatctcctgccggagctcccagagcatcctgcactccaa  
tggcaacacctacctggagtggtaacctgcagaagcctggccagagcccc  
cagctgctgatctacaagggtgtccaaccggttctccggcgtgcctgacc  
ggttcagcggctccggcagcggcacagacttcaccctgaagatcagccg  
ggtggaggctgaggatgtgggctgtactactgcttccagggcagcctg  
gtgccctgacctttggccagggcaccaagctggagatcaag (SEQ  
ID NO:115)

**图3C**

**pFab4 Hu20C2重链版本A**

MKKTALIAIAVALAGFATVAQAALEQVTLKESGPALVKPTQTLTLTCTFS

ompA分泌信号

Hu20C2

GFSLSTSGMGVGWIRQPPGKALEWLAHIWWDDDKSYNPSLKSRLTISKD

CDR1

CDR2

TSKNQVVLTMTNMDPVDTATYYCARROLGLRSIDAMDYWGQGTTVTVSS

CDR3

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG

VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV

EPKSCTSGHHHHHHGGEQKLISEEDLGG\*PFVCEYQGQSSDLPQPPVNA

hCH1 HIS-TAG MYC-TAG ?Amb

GGGSGGGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGSGSGDFDYEKMANA

pIII 残余部分

NKGAMTENADENALQSDAKGKLDSVATDYGAAIDGFIGDVSGLANGNGA

TGDFAGSNSQMAQVGDDNSPLMNNFRQYLPSLPQSVCECRPYVFGAGKP

YEFSIDCDKINLFRGVFAFLLYVATFMYVFSTFANILRNKES\* (SEQ

ID NO:116)

**图4A**

**pFab4 Hu20C2重链版本B**MKKTAIAIAVALAGFATVAQAALEQVTLKESGPALVKPTQTTLTCTLS

ompA分泌信号

Hu20C2

GFSLSTSGMGVGWIRQPPGKALEWLAHIWWDDDKSYNPSLKSRLTISKD

CDR1

CDR2

TSKNQVVLMTNMDPVDTATYYCARRQLGLRSIDAMDYWGQGTTVTVSA

CDR3

STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCTSGHHHHHHGGEQKLISEEDLGG\*PFVCEYQGQSSDLPQPPVNAG

hCH1 HIS-TAG MYC-TAG ?Amb

GGSGGGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGSGSGDFDYKMANAN

pIII 残余部分

KGAMTENADENALQSDAKGKLDSVATDYGAIDGFIGDVSGLANGNGAT

GDFAGSNSQMAQVGDGDN SPLMNNFRQYLPSLPQSVECRPYVFGAGKPY

EFSIDCDKINLFRGVFAFLLYVATFMYVFSTFANILRNKES\* (SEQ

ID NO:117)

**图4B****pFab4 Hu20C2轻链**MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMASRDVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRS

Pe1分泌信号

Hu20C2

SQSILHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGT

CDR1

CDR2

DFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSLVPLTFQGGTKLEIKRTVAAPSVFIF

CDR3

PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

hCK

(SEQ ID NO:118)

**图4C**

**pFab4 Hu20C2重链版本A/轻链**

GCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCAATTAATGCAGCTGGC  
 ACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTT  
 AGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGT  
 GTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAAGATCTAGCTATTCAGAGATTACG  
 CAAATTCATTTCAAGGAGACAGTCATAATGAAATACCTGCTGCCGACTGCAGCTGC  
 TGGTCTGCTGCTGCTGGCGGCCAGCCGGCTATGGCTTCTAGAGatgtggtgatgac  
 ccagagccccctgtccctgcctgtgacccctggcgagcctgccagcatctcctgccg  
 gagctcccagagcatcctgcactccaatggcaacacctacctggagtggtagcctgca  
 gaagcctggccagagccccagctgctgatctacaaggtgtccaaccggttctccgg  
 cgtgcctgaccggttcagcggctccggcagcggcacagacttcaccctgaagatcag  
 ccgggtggaggctgaggatgtggcgctctactactgcttccagggcagcctggtgcc  
 cctgacctttggccaggggcaccagctggagatcaagCGTACGGTGGCTGCACCATC  
 TGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGT  
 GTGCCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAA  
 CGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAG  
 CACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAA  
 AGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTT  
 CAACAGGGGAGAGTGTTAACAATTGCTAGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACAGCAG  
 GTCGAGTTCTTGATAACGAGGCGTAAAAAATGAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAG  
 TGGCACTGGCTGGTTTCGCTACCGTGGCCCAGGCGGCCCTCGAGcaggtgacctga  
 aggagtctggccctgccctggtgaagcccaccagacctgacctgacctgcacct  
 tctctggcttcagcctgagcacctctggcatggcgctgggctggatccggcagcccc  
 ctggcaaggccctggagtggctggccacatctggtgggacgacgacaagtctaca  
 accccagcctgaagagccggctgacctcagcaaggacaccagcaagaaccaggtgg  
 tgctgacctgaccaacatggacctgtggacacagccacctactactgtgccggc  
 ggcagctgggcctgaggagcattgatgccatggactactggggccaggggcaccacag  
 tgacagtgtccagcGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCT  
 CCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCC  
 CCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCT  
 TCCCGGCTGTCCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGC  
 CCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCA  
 ACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTACTAGTGGCCACCACCACC  
 ATCACCATGGCGGTGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGGGTGGTAGCCAT  
 TCGTTTGTGAATATCAAGGCCAATCGTCTGACCTGCCTCAACCTCCTGTCAATGCTG  
 GCGCGGGCTCTGGTGGTGGTCTGGTGGCGGCTCTGAGGGTGGCGGCTCTGAGGGTG  
 GCGGTTCTGAGGGTGGCGGCTCTGAGGGTGGCGGTTCGGTGGCGGCTCCGGTCCG  
 GTGATTTTGATTATGAAAAATGGCAAACGCTAATAAGGGGGCTATGACCGAAAATG  
 CCGATGAAAACGCGCTACAGTCTGACGCTAAAGGCCAACTTGATTCTGTCGCTACTG  
 ATTACGGTGCTGCTATCGATGGTTTTATTGGTGACGTTTCCGGCCTTGCTAATGGTA  
 ATGGTGCTACTGGTGATTTTCTGGCTCTAATTCCCAAATGGCTCAAGTCGGTGACG  
 GTGATAATTACCTTTAATGAATAATTTCCGTCAATATTTACCTTCTTTGCCTCAGT  
 CGGTTGAATGTGCCCTTATGTCTTTGGCGCTGGTAAACCATATGAATTTTCTATTG  
 ATTTGTGACAAAATAAACTTATTCGGTGGTGTCTTTGCGTTTCTTTTATATGTTGCCA  
 CCTTTATGTATGTATTTTCGACGTTTGCTAACATACTGCGTAATAAGGAGTCTAAG  
 CTAGCTGGCCGTGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACT  
 TAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCG  
 CACCGATCGCCCTTECCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGATTCCGTTG

**图4D**

CAATGGCTGGCGGTAATATTGTTCTGGATATTACCAGCAAGGCCGATAGTTTGAGTT  
CTTCTACTCAGGCAAGTGATGTTATTACTAATCAAAGAAGTATTGCGACAACGGTTA  
ATTTGCGTGATGGACAGACTCTTTTACTCGGTGGCTCACTGATTATAAAAACACTT  
CTCAGGATTCTGGCGTACCGTTCCTGTCTAAAATCCCTTTAATCGGCCTCCTGTTA  
GCTCCCGCTCTGATTCTAACGAGGAAAGCACGTTATACGTGCTCGTCAAAGCAACCA  
TAGTACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAGCGCGGGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGC  
GTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTCTTCCCTTCC  
TTTCTCGCCACGTTGCGCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTA  
GGGTTCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGAT  
GGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAG  
TCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCTATC  
TCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAA  
AATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTACA  
ATTTAAATATTTGCTTATACAATCTTCCTGTTTTTGGGGCTTTTCTGATTATCAACC  
GGGGTACATATGATTGACATGCTAGTTTTACGATTACCGTTCATCGCAGGTGGCACT  
TTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTTATTTTTCTAAATACATTCAAAT  
ATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGG  
AAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTTCGGGCATTT  
TGCCTTCCTGTTTTTGCTCAGCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGAT  
CAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAAGATCCTT  
GAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTCTGCTA  
TGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATA  
CACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACG  
GATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACT  
GCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTG  
CACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAA  
GCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTG  
CGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGAC  
TGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGC  
TGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCA  
GCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGT  
CAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATT  
AAGCATTTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAA  
CTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTGATAATCTCATGACC  
AAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATC  
AAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAA  
AAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTT  
CCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCTTCTAGTGTAG  
CCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTG  
CTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTG  
GACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTG  
TGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGT  
GAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTA  
AGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGG  
TATCTTTATAGTCCTGTGCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGA  
TGCTCGTCAGGGGGGGGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGG  
TTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCTGAT  
TCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGA  
ACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGC (SEQ ID  
NO: 119)

图4E





|--- CH1从此开始 C144  
 IgG1 /// ASTK GPSVFPLAP<sup>S</sup> SKSTSGGTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG  
 IgG2 /// ASTK GPSVFPLAP<sup>C</sup> SRSTSESTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG  
 IgG4 /// ASTK GPSVFPLAP<sup>C</sup> SRSTSESTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG  
 IgG2M4 /// **ASTK GPSVFPLAP<sup>C</sup> SRSTSESTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG**  
 (VH-C1 接头)

**C200**

IgG1 ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS LSSVVTVPSS SLGTQTYICN VNHKPSNTKV  
 IgG2 ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS LSSVVTVPSS NFGTQTYTCN VDHKPSNTKV  
 IgG4 ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS LSSVVTVPSS SLGTKTYTCN VDHKPSNTKV  
 IgG2M4 **ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS LSSVVTVPSS NFGTQTYTCN VDHKPSNTKV**

- 铰链区 --||---CH2-> P238 M252 C261  
 IgG1 DKKAEPKSCD KTHTCPPCPA PELLGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC  
 IgG2 DKTVERKCC- --VECP<sup>C</sup>CPA PP-VAGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC  
 IgG4 DKRVESKYGP ---PCP<sup>S</sup>CPA PEFLGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC  
 IgG2M4 **DKTVERKCC- --VECP<sup>C</sup>CPA PP-VAGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC**  
 (下铰链) FcRn- 结合

Q268 N297\* L309  
 IgG1 VVVDVSHEDP EVQFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQFNSTYR VVSVLTVLHQ  
 IgG2 VVVDVSHEDP EVQFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQFNSTFR VVSVLTVVHQ  
 IgG4 VVVDVSEQEDP EVQFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQFNSTYR VVSVLTVLHQ  
 IgG2M4 **VVVDVSEQEDP EVQFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQFNSTFR VVSVLTVLHQ**  
 B/C 环 C'E 环 FcRn- 结合

**P331**

C321 A330 |---CH3->  
 IgG1 DWLNGKEYKC KVSNAKLPAP<sup>I</sup> EKTISKAKG QPREPQVYTL PPSRDELTKN  
 IgG2 DWLNGKEYKC KVSNAKGLPAP<sup>I</sup> EKTISKTKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN  
 IgG4 DWLNGKEYKC KVSNAKGLPSS<sup>I</sup> EKTISKAKG QPREPQVYTL PPSQEEMTKN  
 IgG2M4 **DWLNGKEYKC KVSNAKGLPSS<sup>I</sup> EKTISKTKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN**  
 F/G 环

IgG1 QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTPEVLDSD GSFFLYSKLT  
 IgG2 QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTPEMLDSD GSFFLYSKLT  
 IgG4 QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTPEVLDSD GSFFLYSRLT  
 IgG2M4 **QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTPEMLDSD GSFFLYSKLT**

**M428L H433**

IgG1 VDKSRWQQGN VFSCSV<sup>M</sup>HEA LHNHYTQKSL SLSPGK\* (SEQ ID NO:134)  
 IgG2 VDKSRWQQGN VFSCSV<sup>M</sup>HEA LHNHYTQKSL SLSPGK\* (SEQ ID NO:135)  
 IgG4 VDKSRWQEGN VFSCSV<sup>M</sup>HEA LHNHYTQKSL SLSLGK\* (SEQ ID NO:136)  
 IgG2M4 **VDKSRWQQGN VFSCSV<sup>M</sup>HEA LHNHYTQKSL SLSPGK\* (SEQ ID NO:137)**  
 FcRn- 结合

图6

## 人源化Hu20C2A3 IgG2M4-重链

1 QVTLKESGPG LLKPTQTLTL TCTLSEGSLS TSGMGVGNFR QPPGKGLEWL  
 51 AHIWDDDKS YNPSLKSRLT ISKDTSKNOV VLTITNVDPV DTATYYCARR  
 101 QLGTRGTDAM DYNQGQTTVT VSSASTKGPS VFPLAPCSRS TSESTAALGC  
 151 LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVTSSNFG  
 201 TQTYTCNVDH KPSNTKV DKT VERKCCVECP PCPAPPVAGP SVELEFPKPK  
 251 DTLMISRTP E VTCVVVDVSQ EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFNS  
 301 TFRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKGL PSSIEKTISK TKGQPREPQV  
 351 YTLPPSREEM TKNQVSLTCL VKGEYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPEML  
 401 DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFCSSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK  
 (SEQ ID NO:138)

图7A

## 人源化Hu20C2A3 IgG2M4-重链

ATGGAATGGAGCTGGGTCTTTCTCTTCTTCCTGTCAGTAACTACAGGTGT  
 CCACTCGCAGGTGACCCTGAAGGAGTCTGGCCCTGGCCTGCTGAAGCCCA  
 CCCAGACCCTGACCCTGACCCTGCACCCTGTCTGGCTTCAGCCTGAGCACC  
 TCTGGCATGGGCGTGGGCTGGTTCCGGCAGCCCCCTGGCAAGGGCCTGGA  
 GTGGCTGGCCACATCTGGTGGGACGACGACAAGTCCTACAACCCAGCC  
 TGAAGAGCCGGCTGACCATCAGCAAGGACACCAGCAAGAACCAGGTGGTG  
 CTGACCATCACCAACGTGGACCCTGTGGACACAGCCACCTACTACTGTGC  
 CCGGCGGCAGCTGGGCACTAGGGGGACGGATGCCATGGACTACTGGGGCC  
 AGGGCACCCACAGTGACAGTGTCCAGCGCATCCACCAAGGGGCCATCCGTC  
 TTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCT  
 GGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGA  
 ACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTTACAG  
 TCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGACCTCCAGCAA  
 CTTTGGCAGCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACA  
 CCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGGAAATGCTGCGTGGAGTGCCACCA  
 TGCCCAGCACCTCCAGTGCGCGGACCATCAGTCTTCTGTTCCCCCCTAAA  
 ACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACAGTGCGTGG  
 TGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTG  
 GATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTT  
 CAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACT  
 GGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCG  
 TCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAGGGCAGCCCCGAGAGCC  
 ACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGG  
 TCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTG  
 GAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCC  
 CATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTAACCGTGG  
 ACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT  
 GAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCTGG  
 TAAATGA (SEQ ID NO:139)

图7B

## 人源化Hu20C2A3 -轻链

1 DVVMTQTPLS LPVTPGQPAS ISCRSSQSIL HSNQNTYLEW YLQKPGQSPQ  
51 LLIYKVSQNR SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCLQTRVP  
101 LTFGQGKLE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK  
151 VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE  
201 VTHQGLSSPV TKSFNRGEC (SEQ ID NO:140)

## 图7C

## 人源化Hu20C2A3 -轻链

ATGAGTGTGCCCCTCAGGTCCTGGGGTTGCTGCTGCTGTGGCTTACAGA  
TGCCAGATGCGATGTGGTGATGACCCAGACCCCCCTGTCCCTGCCTGTGA  
CCCCTGGCCAGCCTGCCAGCATCTCCTGCCGGAGCTCCCAGAGCATCCTG  
CACTCCAATGGCAACACCTACCTGGAGTGGTACCTGCAGAAGCCTGGCCA  
GAGCCCCCAGCTGCTGATCTACAAGGTGTCCAACCGGTTCTCCGGCGTGC  
CTGACCGGTTTCAGCGGCTCCGGCAGCGGCACAGACTTCACCCTGAAGATC  
AGCCGGGTGGAGGCTGAGGATGTGGGCGTCTACTACTGCCTTCAGACTAC  
TCGTGTGCCCCTGACCTTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGCGTA  
CGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTG  
AAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAG  
AGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACT  
CCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTC  
AGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTA  
CGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCT  
TCAACAGGGGAGAGTGTTAG (SEQ ID NO:141)

## 图7D

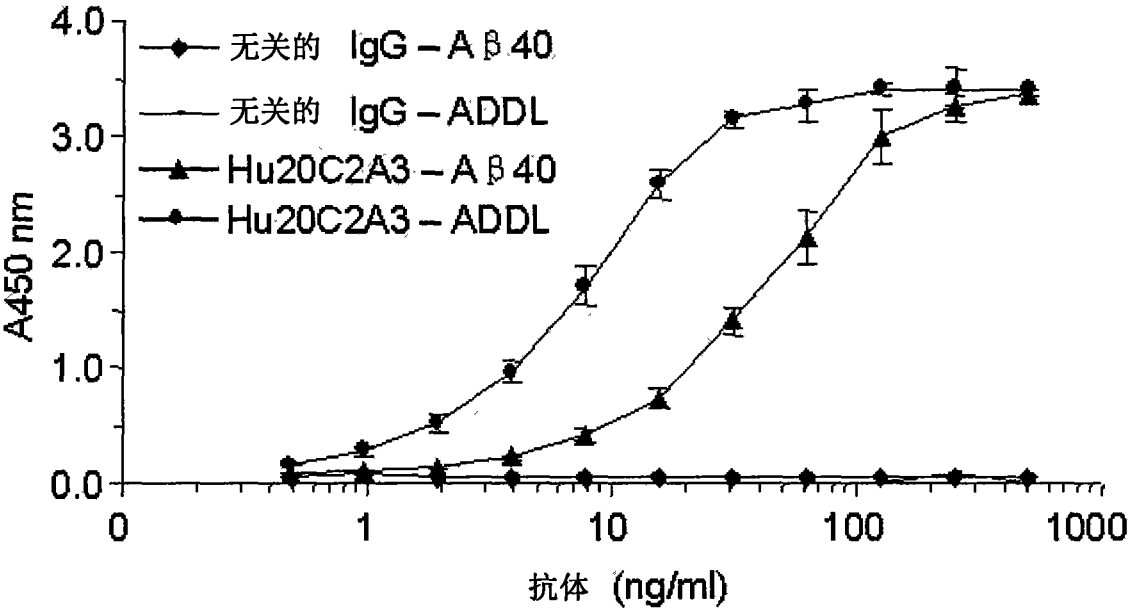


图8A

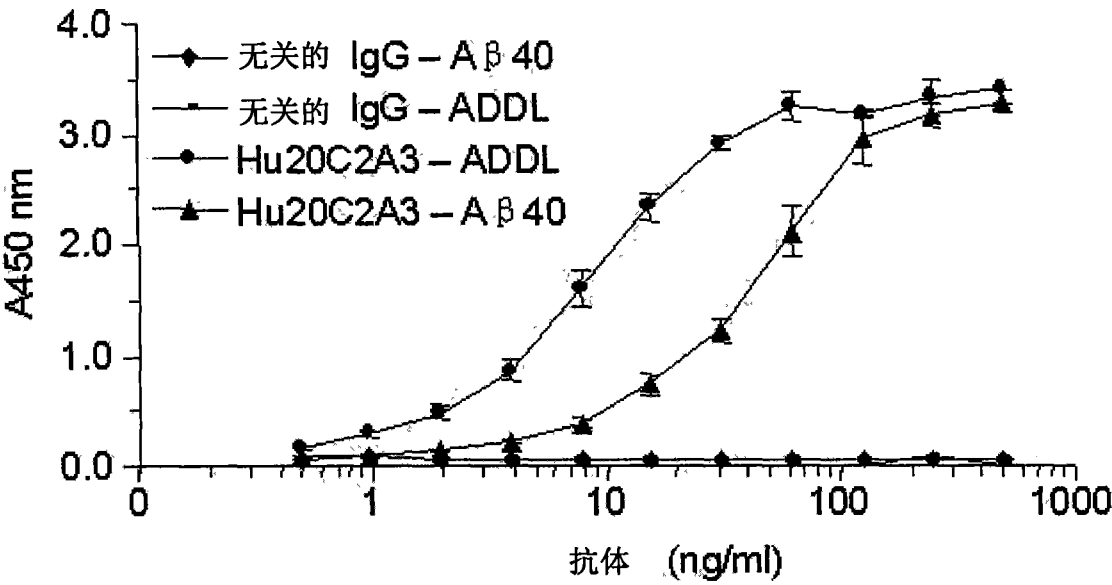


图8B

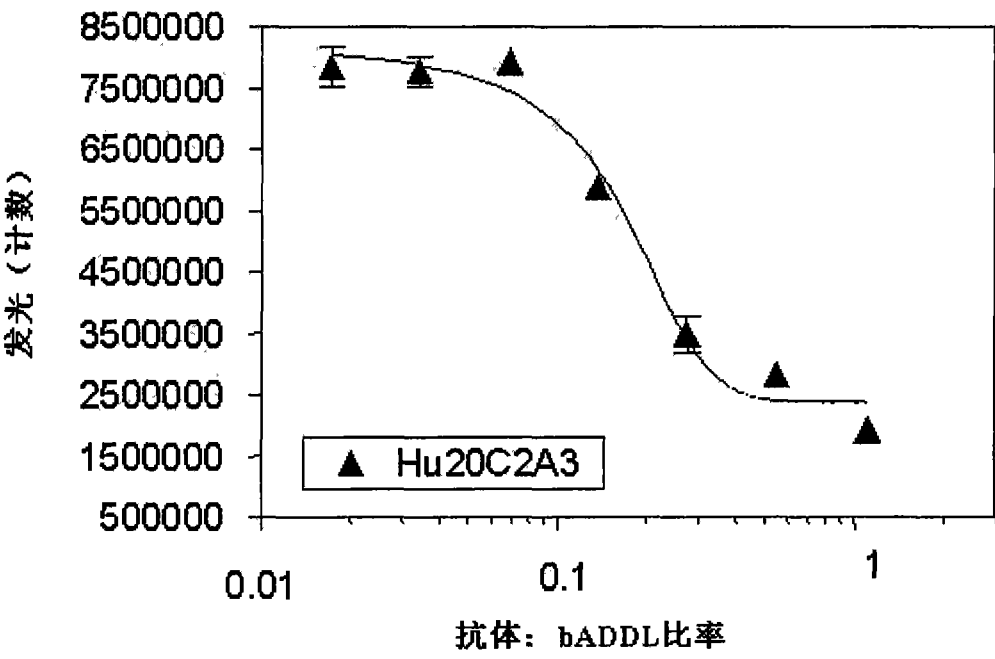


图9

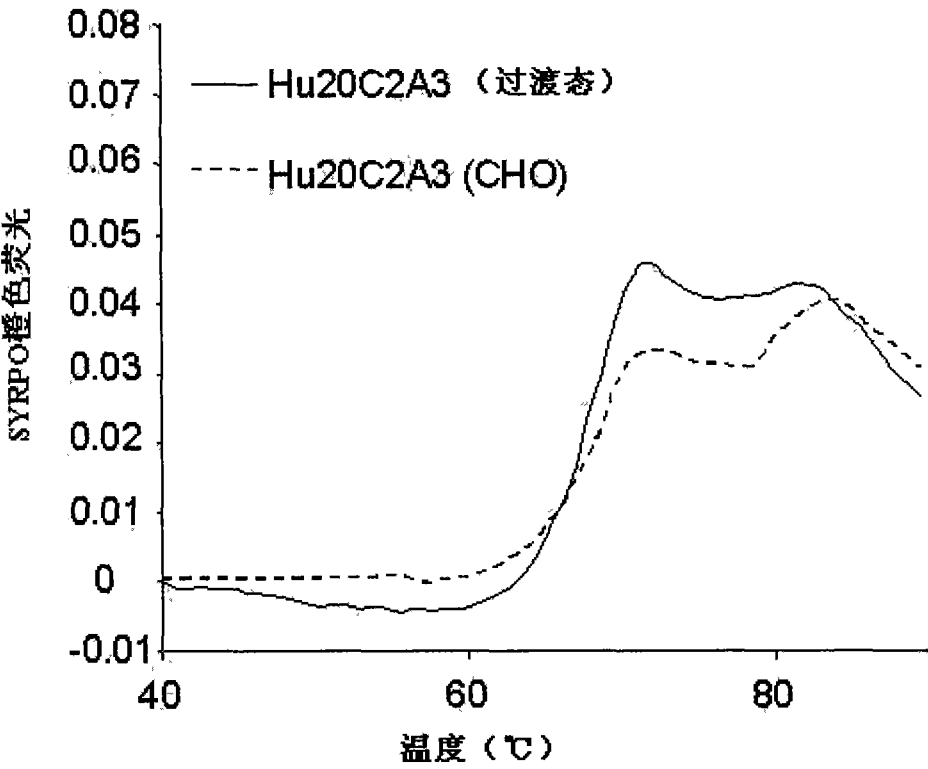


图10

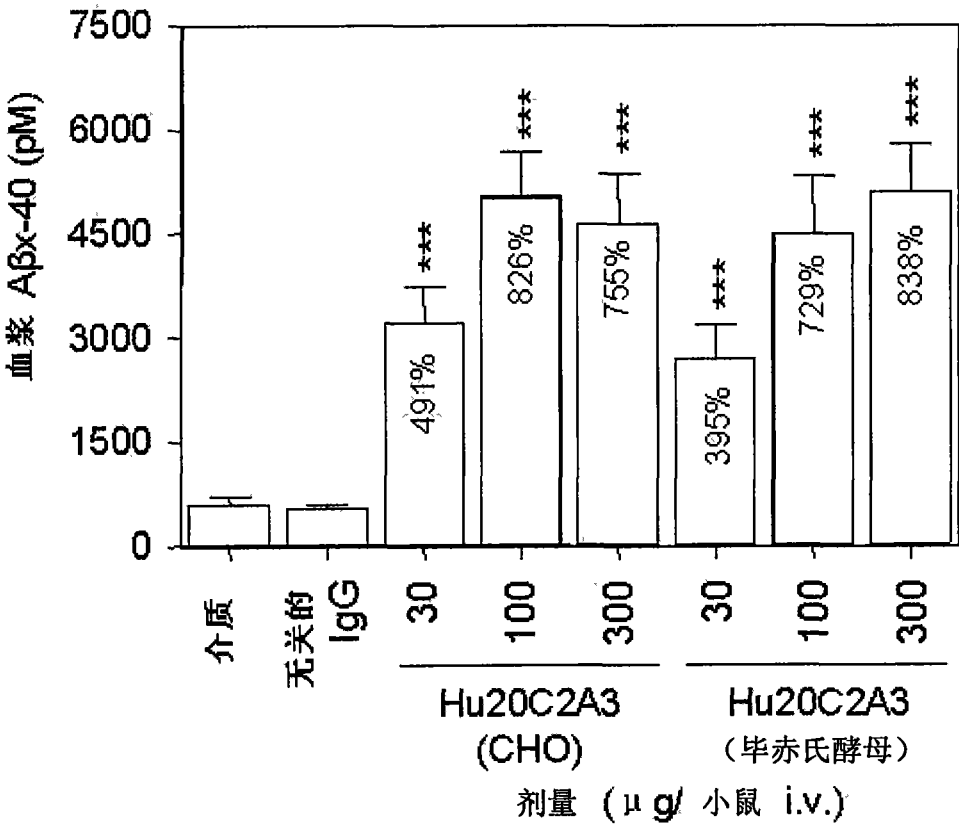


图11