



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105348387 A

(43) 申请公布日 2016. 02. 24

(21) 申请号 201510802344. 9	<i>A61P 17/04</i> (2006. 01)
(22) 申请日 2011. 08. 12	<i>A61P 25/00</i> (2006. 01)
(30) 优先权数据	<i>A61P 25/20</i> (2006. 01)
61/373824 2010. 08. 14 US	<i>A61P 25/14</i> (2006. 01)
(62) 分案原申请数据	<i>A61P 21/00</i> (2006. 01)
201180045820. 7 2011. 08. 12	<i>A61P 25/28</i> (2006. 01)
(71) 申请人 ABBVIE 公司	<i>A61P 7/06</i> (2006. 01)
地址 美国伊利诺伊州	<i>A61P 7/04</i> (2006. 01)
申请人 雅培股份有限两合公司	<i>A61P 25/16</i> (2006. 01)
(72) 发明人 S. 巴格霍恩 H. 希伦	<i>A61P 13/08</i> (2006. 01)
A. 施特里宾格 S. 吉艾西	<i>A61P 9/00</i> (2006. 01)
U. 埃伯特 谢仲明	<i>A61P 35/00</i> (2006. 01)
(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司	<i>A61P 3/10</i> (2006. 01)
司 72001	
代理人 权陆军 徐厚才	

(51) Int. Cl.

*C07K 16/18*(2006. 01)

*C12N 15/13*(2006. 01)

*A61K 39/395*(2006. 01)

*A61K 45/00*(2006. 01)

*A61K 39/39*(2006. 01)

*A61P 43/00*(2006. 01)

*A61P 7/10*(2006. 01)

*A61P 7/02*(2006. 01)

权利要求书3页 说明书69页  
序列表27页 附图14页

(54) 发明名称  
β 淀粉样蛋白结合蛋白

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

1. 结合蛋白,包含六种氨基酸序列,所述氨基酸序列与形成序列组的序列至少 75% 相同,所述序列组选自序列组 SEQ ID NO:17、18、19、20、21 和 22 ;和序列组 SEQ ID NO:33、34、35、36、37 和 38。

2. 根据权利要求 1 所述的结合蛋白,其中所述六种氨基酸序列形成序列组,所述序列组选自序列组 SEQ ID NO:17、18、19、20、21 和 22 ;和序列组 SEQ ID NO:33、34、35、36、37 和 38。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的结合蛋白,包含与氨基酸序列至少 90% 相同的第一种氨基酸序列,所述氨基酸序列选自 SEQ ID NO:1、3、4、6、7、8、9、10、11、12 和 13。

4. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的结合蛋白,包含与氨基酸序列至少 90% 相同的第二种氨基酸序列,所述氨基酸序列选自 SEQ ID NO:2、5、14、15 和 16。

5. 根据权利要求 3 或 4 所述的结合蛋白,其中所述第一种氨基酸序列选自 SEQ ID NO:1、3、4、6、7、8、9、10、11、12 和 13。

6. 根据权利要求 4 或 5 中任一项所述的结合蛋白,其中所述第二种氨基酸序列选自 SEQ ID NO:2、5、14、15 和 16。

7. 根据权利要求 1 或 2 所述的结合蛋白,包含与氨基酸序列至少 90% 相同的第一种氨基酸序列,所述氨基酸序列选自 SEQ ID NO:25、27、29 和 30。

8. 根据权利要求 1、2 和 7 中任一项所述的结合蛋白,包含与氨基酸序列至少 90% 相同的第二种氨基酸序列,所述氨基酸序列选自 SEQ ID NO:26、28、31 和 32。

9. 根据权利要求 7 或 8 所述的结合蛋白,其中所述第一种氨基酸序列选自 SEQ ID NO:25、27、29 和 30。

10. 根据权利要求 8 或 9 中任一项所述的结合蛋白,其中所述第二种氨基酸序列选自 SEQ ID NO:26、28、31 和 32。

11. 权利要求 1-10 中任一项的结合蛋白,其中所述结合蛋白是抗体。

12. 权利要求 11 的结合蛋白,其中所述抗体选自:免疫球蛋白分子、二硫键合的 Fv、单克隆抗体、scFv、嵌合抗体、单结构域抗体、CDR 嫁接的抗体、双抗体、人源化抗体、多特异性抗体、Fab、双重特异性抗体、DVD、Fab'、双特异性抗体、F(ab')<sub>2</sub> 和 Fv。

13. 权利要求 11 或 12 的结合蛋白,其中所述抗体包含重链免疫球蛋白恒定结构域,所述重链免疫球蛋白恒定结构域选自:人 IgM 恒定结构域、人 IgG4 恒定结构域、人 IgG1 恒定结构域、人 IgE 恒定结构域、人 IgG2 恒定结构域、人 IgG3 恒定结构域和人 IgA 恒定结构域。

14. 权利要求 1-13 中任一项的结合蛋白,进一步包含具有 SEQ ID NO:41 或 SEQ ID NO:42 的氨基酸序列的免疫球蛋白重链恒定区。

15. 权利要求 1-14 中任一项的结合蛋白,进一步包含具有选自 SEQ ID NO:43 和 SEQ ID NO:44 的氨基酸序列的免疫球蛋白轻链恒定区。

16. 根据权利要求 1-15 中任一项所述的结合蛋白,其中所述结合蛋白进一步包含选自如下的试剂:免疫粘附分子;显像剂和治疗剂。

17. 根据权利要求 16 所述的结合蛋白,其中所述显像剂选自放射性标记、酶、荧光标记、发光标记、生物发光标记、磁性标记和生物素。

18. 根据权利要求 16 所述的结合蛋白,其中所述显像剂是放射性标记,所述放射性标记选自:<sup>3</sup>H、<sup>14</sup>C、<sup>35</sup>S、<sup>90</sup>Y、<sup>99</sup>Tc、<sup>111</sup>In、<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I、<sup>177</sup>Lu、<sup>166</sup>Ho 和 <sup>153</sup>Sm。

19. 根据权利要求 1-18 中任一项所述的结合蛋白,其中所述结合蛋白具有人糖基化模式。

20. 根据权利要求 1-19 中任一项所述的结合蛋白,其中所述结合蛋白结合  $\beta$  淀粉样蛋白 (20-42) 球聚体。

21. 根据权利要求 1-20 中任一项所述的结合蛋白,其中当通过夹心 ELISA 和 / 或通过比对夹心 ELISA 用人和 / 或食蟹猴血浆测定时,所述结合蛋白显示比参考抗 PF-4 抗体至少两倍的与血小板因子 4 (PF-4) 的交叉反应。

22. 根据权利要求 1-21 中任一项所述的结合蛋白,其中所述结合蛋白能够调节  $\beta$  淀粉样蛋白 (20-42) 球聚体的生物学功能。

23. 根据权利要求 1-22 中任一项所述的结合蛋白,其中所述结合蛋白能够中和  $\beta$  淀粉样蛋白 (20-42) 球聚体活性。

24. 根据权利要求 1-23 中任一项所述的结合蛋白,其中所述结合蛋白是结晶结合蛋白。

25. 根据权利要求 24 所述的结合蛋白,其中所述结晶结合蛋白是无载体的药学控制释放的晶体结合蛋白。

26. 根据权利要求 24 或 25 所述的结合蛋白,其中所述结晶结合蛋白具有比所述结合蛋白的可溶性配对物更长的体内半衰期。

27. 根据权利要求 24-26 中任一项所述的结合蛋白,其中所述结晶结合蛋白保留生物学活性。

28. 分离的核酸,编码权利要求 1-27 中任一项的结合蛋白。

29. 载体,包含权利要求 28 的分离的核酸。

30. 权利要求 29 的载体,其中所述载体选自 pcDNA、pTT、pTT3、pEFBOS、pBV、pJV 和 pBJ。

31. 宿主细胞,包含权利要求 29 或 30 的载体。

32. 根据权利要求 31 所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞是原核细胞。

33. 根据权利要求 32 所述的宿主细胞,其中所述原核细胞是大肠杆菌。

34. 根据权利要求 31 所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞是真核细胞。

35. 根据权利要求 34 所述的宿主细胞,其中所述真核细胞选自原生生物细胞、动物细胞、植物细胞和真菌细胞。

36. 根据权利要求 35 所述的宿主细胞,其中所述真核细胞是动物细胞,所述动物细胞选自哺乳动物细胞、禽类细胞和昆虫细胞。

37. 根据权利要求 35 所述的宿主细胞,其中所述真核细胞是 CHO 细胞。

38. 根据权利要求 35 所述的宿主细胞,其中所述真核细胞是 COS 细胞。

39. 根据权利要求 35 所述的宿主细胞,其中所述真核细胞是酵母细胞。

40. 根据权利要求 39 所述的宿主细胞,其中所述酵母细胞是酿酒酵母。

41. 根据权利要求 35 所述的宿主细胞,其中所述真核细胞是昆虫 Sf9 细胞。

42. 生产结合蛋白的方法,包括在足以生产所述结合蛋白的条件下,在培养基中培养权利要求 31-41 中任一项的宿主细胞。

43. 根据权利要求 42 的方法生产的结合蛋白。

44. 药物组合物,包含权利要求 1-27 或 43 中任一项的结合蛋白和药学可接受的载体。

45. 权利要求 44 的药物组合物,其中所述药学可接受的载体用作佐剂,所述佐剂用于增加所述结合蛋白的吸收或分散。

46. 权利要求 45 的药物组合物,其中所述佐剂是透明质酸酶。

47. 权利要求 44-46 中任一项的药物组合物,进一步包含至少一种另外的治疗剂。

48. 用于释放结合蛋白的组合物,所述组合物包含:

- (a) 制剂,其中所述制剂包含权利要求 24-27 中任一项的结晶结合蛋白,和成分;以及
- (b) 至少一种聚合载体。

49. 根据权利要求 48 所述的组合物,其中所述聚合载体是选自下述的一种或多种的聚合物:聚(丙烯酸)、聚(氰基丙烯酸酯)、聚(氨基酸)、聚(酞)、聚(缩酚肽)、聚(酯)、聚(乳酸)、乳酸乙醇酸共聚物或 PLGA、聚( $\beta$ -羟基丁酸酯)、聚(己内酯)、聚(二氧环己酮);聚(乙二醇)、聚((羟丙基)甲基丙烯酰胺)、聚((有机)膦腈)、聚(原酸酯)、聚(乙烯醇)、聚(乙烯吡咯烷酮)、马来酸酐-烷基乙烯醚共聚物、复合多元醇、白蛋白、海藻酸盐、纤维素和纤维素衍生物、胶原、纤维蛋白、明胶、透明质酸、寡糖、糖胺聚糖、硫酸化多糖、其掺和物和共聚物。

50. 根据权利要求 48 所述的组合物,其中所述成分选自白蛋白、蔗糖、海藻糖、拉克替醇、明胶、羟丙基- $\beta$ -环糊精、甲氧基聚乙二醇和聚乙二醇。

51. 用于降低 A $\beta$  形式的活性的方法,所述 A $\beta$  形式包含权利要求 1-27 或 43 中任一项的结合蛋白与之反应的球聚体表位,所述方法包括将所述 A $\beta$  形式与权利要求 1-27 或 43 中任一项的结合蛋白接触,从而使得所述 A $\beta$  形式的活性被降低。

52. 用于治疗受试者的疾病或病症的方法,在所述疾病或病症中,A $\beta$  形式的活性是有害的,所述 A $\beta$  形式包含权利要求 1-27 或 43 中任一项的结合蛋白与之反应的球聚体表位,所述方法通过将权利要求 1-27 或 43 中任一项的结合蛋白施用于人受试者,从而使得实现治疗。

53. 用于治疗受试者的疾病或病症的方法,所述疾病或病症选自  $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶缺乏、C1-抑制剂缺乏血管性水肿、抗凝血酶缺乏血栓栓塞性疾病、库鲁病、克雅二氏病/羊瘙痒症、牛海绵状脑病、Gerstmann-Straussler-Scheinker 病、家族致命性失眠症、亨廷顿氏病、脊髓小脑性共济失调、Machado-Joseph 萎缩、齿状红核苍白球肌萎缩症、额颞痴呆、镰状细胞性贫血、不稳定性血红蛋白包涵体溶血、药物诱导的包涵体溶血、帕金森氏病、全身性 AL 型淀粉样变性、结节性 AL 型淀粉样变性、全身性 AA 型淀粉样变性、前列腺淀粉样变性、血液透析淀粉样变性、遗传性(冰岛)脑血管病、亨廷顿氏病、家族性内脏淀粉样变性、家族性内脏多神经病、家族性内脏淀粉样变性、老年性全身性淀粉样变性、家族性淀粉样蛋白神经病、家族性心脏淀粉样变性、阿尔茨海默氏病、唐氏综合症、甲状腺髓样癌和 2 型糖尿病(T2DM),所述方法通过将权利要求 1-27 或 43 中任一项的结合蛋白施用于受试者,从而使得实现治疗。

54. 根据权利要求 52 或 53 的方法,其中所述施用于受试者是通过选自下述的至少一种模式:肠胃外、皮下、肌内、静脉内、关节内、支气管内、腹内、囊内、软骨内、腔内、体腔内、小脑内、脑室内、结肠内、颈管内、胃内、肝内、心肌内、骨内、骨盆内、心包内、腹膜内、胸膜内、前列腺内、肺内、直肠内、肾内、视网膜内、脊柱内、滑膜内、胸内、子宫内、膀胱内、推注、阴道、直肠、颊、舌下、鼻内和经皮。



## β 淀粉样蛋白结合蛋白

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

### [0002] 序列表

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

### 技术领域

[0003] 本发明涉及 β 淀粉样蛋白 (Aβ) 结合蛋白,编码所述蛋白的核酸,产生所述蛋白的方法,包含所述蛋白的组合物和所述蛋白在状况例如淀粉样变性例如阿尔茨海默氏病的诊断、治疗和预防中的用途。

### 背景技术

#### [0004]

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

[0005] Aβ 肽起于通过蛋白酶解加工的淀粉样蛋白前体蛋白 (APP)。这种加工通过命名为 α-、β- 和 γ- 分泌酶的几种蛋白酶的合作活性实现,并且导致不同长度的许多特异性片段。淀粉样蛋白沉积物主要由长度为 40 或 42 个氨基酸 (Aβ 40, Aβ 42) 的肽组成。除了人变体外,这还包括存在于除人外的生物特别是其他哺乳动物尤其是大鼠中的淀粉样蛋白 β (1-42) 蛋白的同种型。在水环境中趋于聚合的这种蛋白可以以非常不同的分子形式存在。不溶性蛋白的沉积与痴呆病症例如阿尔茨海默氏病的出现或进展的简单关联已证明是不可信的 (Terry 等人, Ann. Neurol. 30 :572 - 580,1991 ;Dickson 等人, Neurobiol. Aging 16 :285 - 298,1995)。相比之下,突触和认知感知的丧失看起来与可溶形式的 Aβ (1-42) 更好地关联 (Lue 等人, Am. J. Pathol. 155 :853-862,1999 ;McLean 等人, Ann. Neurol. 46 :860-866,1999)。

[0006] 在过去已针对单体 Aβ (1-42) 产生的多克隆和单克隆抗体无一证明产生所需疗效,也不在动物和 / 或人中引起严重副作用。例如,来自在非常老的 APP23 小鼠中的临床前研究的被动免疫接种结果指示治疗上相关的副作用,所述小鼠每周接受一次针对 N 末端的抗 Aβ (1-42) 抗体,共 5 个月。特别地,与盐水处理的小鼠相比较,这些小鼠显示微出血数目和严重性中的增加 (Pfeifer 等人, Science 298 :1379,2002)。在出血中的相似增加

也对于非常老的 (>24 个月) Tg2576 和 PDAPP 小鼠描述 (Wilcock 等人, J Neuroscience 23 :3745-51, 2003 ;Racke 等人, J Neuroscience 25 :629-636, 2005)。在两个品系中, 抗 A $\beta$  (1-42) 的注射导致微出血的显著增加。

[0007] WO 2004/067561 涉及 A $\beta$  (1-42) 肽的球形寡聚体 (“球聚体 (globulomers)”) 和用于制备其的方法。WO 2006/094724 涉及不可扩散的球形 A $\beta$  (X - 38 .. 43) 寡聚物, 其中 X 选自数目 1 .. 24。WO 2004/067561 和 WO 2006/094724 进一步描述球聚体的限制性蛋白酶解获得所述球聚体的截短形式, 例如 A $\beta$  (20 - 42) 或 A $\beta$  (12 - 42) 球聚体。WO 2007/064917 描述了重组形式的淀粉样蛋白  $\beta$  肽 (下文称为 N-Met A $\beta$  (1-42)) 及其球聚体形式的克隆、表达和分离。数据暗示存在 A $\beta$  折叠且装配成 A $\beta$  球聚体的淀粉样蛋白纤维独立途径, 所述 A $\beta$  球聚体显示一种或多种独特表位 (下文称为球聚体表位)。因为球聚体表位在 AD 患者和 APP 转基因小鼠的脑中检测出, 并且球聚体与神经元特异性结合且阻断 LTP, 所以球聚体代表病理学相关的 A $\beta$  构象子。已发现可溶性 A $\beta$  球聚体基本上通过与 P/Q 型突触前钙通道相互作用发挥其有害作用, 并且这种相互作用的抑制剂因此对于淀粉样变性例如阿尔茨海默氏病的治疗是有用的 (WO 2008/104385)。

[0008] 与 A $\beta$  的此类球聚体形式选择性结合的抗体已在 WO 2007/064972、WO 2007/062852、WO 2008067464、WO 2008/150946 和 WO 2008/150949 中描述。例如, 由 WO 2007/062852 和 WO 2008/150949 已知的几种单克隆抗体特异性识别 A $\beta$  (20-42) 球聚体。

[0009] 存在关于开发生物制品例如 A $\beta$  结合蛋白的巨大的、未满足的治疗需要, 所述 A $\beta$  结合蛋白阻止或减慢疾病的进展而不诱导对人体的负面和潜在致死的作用。考虑到一般人群渐增的寿命, 和随着这种增加每年诊断有阿尔茨海默氏病或相关病症的患者数目中的相关增加, 此类需要是特别显而易见的。进一步地, 此类 A $\beta$  结合蛋白将允许正确诊断在经历其症状的患者中的阿尔茨海默氏病, 这是目前仅可在验尸后证实的诊断。另外, A $\beta$  结合蛋白允许阐明负责这种衰竭性疾病的蛋白和其他生物因子的生物学性质。

## 发明内容

### [0010]

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

[0011] 在一个方面, 本发明提供了包含下述的结合蛋白: 与形成由下述组成的组的氨基酸序列至少 75%、至少 85%、至少 90% 或 100% 相同的 6 种氨基酸序列

SEQ ID NO:17: SYWMH,  
 SEQ ID NO:18: RIDPKSGDTKYTEKFKS,  
 SEQ ID NO:19: MSKLSGTHAWFAY,  
 SEQ ID NO:20: KASQDINSYLT,  
 SEQ ID NO:21: RANRLVD, 和  
 SEQ ID NO:22: LQYDEFPLT。

[0012] 此类结合蛋白在本文用术语“4C9-型”指定。

[0013] 在本发明的另一个方面,上文描述的 4C9-型结合蛋白包含下述:与选自下述的氨基酸序列至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%或 100%相同的第一种氨基酸序列

SEQ ID NO:1:  
 QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKAPGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGRIDP-  
 KSGDTKYTEKFKSKATLTVDKPSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTTMSKLSGTHAW-  
 FAYWGQGTLVTVSA;

SEQ ID NO:3:  
 X<sup>1</sup>VQLVQSGAEVKKPGX<sup>16</sup>SVKVSCKASGX<sup>27</sup>TFX<sup>30</sup>SYWMHWVVRQAPGQGLEW  
 X<sup>48</sup>GRIDPKSGDTKYTEKFKSRX<sup>68</sup>TX<sup>70</sup>TX<sup>72</sup>DKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCX<sup>97</sup>X<sup>98</sup>  
 MSKLSGTHAWFAYWGQGTLVTVSS,

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

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

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

SEQ ID NO:6:  
 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYWMHWVVRQAPGQGLEWMGRIDP-  
 KSGDTKYTEKFKSRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARMSKLSGTHAW-  
 FAYWGQGTLVTVSS;

SEQ ID NO:7:  
 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYWMHWVVRQAPGQGLEWMGRIDP-  
 KSGDTKYTEKFKSRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARMSKLSGTHAW-  
 FAYWGQGTLVTVSS;

SEQ ID NO:8:

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWIGRIDP-  
KSGDTKYTEKFKSRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTTMSKLSGTHAW-  
FAYWGQGTLVTVSS;

SEQ ID NO:9:

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGRIDP-  
KSGDTKYTEKFKSRVTITVVKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCATMSKLSGTHAW-  
FAYWGQGTLVTVSS;

SEQ ID NO:10:

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGRIDP-  
KSGDTKYTEKFKSRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARMSKLSGTHAW-  
FAYWGQGTLVTVSS;

SEQ ID NO:11:

EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGRIDP-  
KSGDTKYTEKFKSRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARMSKLSGTHAW-  
FAYWGQGTLVTVSS;

SEQ ID NO:12:

EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWIGRIDP-  
KSGDTKYTEKFKSRAVLSVDKSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCTTMSKLSGTHAW-  
FAYWGQGTLVTVSS; 和

SEQ ID NO:13:

EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGRIDP-  
KSGDTKYTEKFKSRFVFSVDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCATMSKLSGTHAW-  
FAYWGQGTLVTVSS;

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

SEQ ID NO:2:

DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRANRL-  
VDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSEYEDMGIYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELK;

SEQ ID NO:5:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWFQQKPG-  
KAPKX<sup>46</sup>LIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTDX<sup>71</sup>TLTISSLQPEDFATYYCLQYDEFPLT  
FGQGKLEIK,

其中 X<sup>46</sup> 是 S 或 L 或 T, 并且 X<sup>71</sup> 是 F 或 Y;

SEQ ID NO:14:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKSLIYRANRL-  
VDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQYDEFPLTFGQGTKLEIK;

SEQ ID NO:15:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKLLIYRANRL-  
VDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQYDEFPLTFGQGTKLEIK; 和

SEQ ID NO:16:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKTLIYRANRL-  
VDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYCLQYDEFPLTFGQGTKLEIK。

[0014] 在本发明的另一个方面,上文描述的 4C9- 型结合蛋白包含如上文定义的第一种和第二种氨基酸序列。

[0015] 在一个方面,本文描述的 4C9- 型结合蛋白是抗体。这种抗体可以是例如免疫球蛋白分子、二硫键合的 Fv、单克隆抗体 (mab)、单链 Fv (scFv)、鼠抗体、嵌合抗体、人源化抗体、单结构域抗体、CDR 嫁接的抗体、双抗体、多特异性抗体、Fab、双重特异性抗体、双重可变结构域 (DVD) 结合分子、Fab'、双特异性抗体、F(ab')<sub>2</sub> 或 Fv。抗体序列可以对应人或鼠抗体序列。

[0016] 当本文描述的 4C9- 型结合蛋白是抗体时,它包含对应于如上文定义的序列组的一组 6 个互补性决定区 (CDR)。例如,本发明的 4C9- 型抗体包含至少六个 CDR,所述至少六个 CDR 与形成由 SEQ ID NO: 17、18、19、20、21 和 22 组成的 CDR 组的序列至少 75%、至少 85%、至少 90% 或 100% 相同。

[0017] 在本发明的另一个方面,抗体包含对应于如上定义的第一种氨基酸序列的至少一条可变重链,和对应于如上定义的第二种氨基酸序列的至少一条可变轻链。例如,本发明的 4C9- 型抗体包含 (i) 包含与选自 SEQ ID NO: 1、3、4、6、7、8、9、10、11、12 和 13 的氨基酸序列至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列的至少一条可变重链;和 (ii) 包含与选自 SEQ ID NO: 2、5、14、15 和 16 的氨基酸序列至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列的至少一条可变轻链。

[0018] 本发明进一步提供了包含下述的结合蛋白:与形成由下述组成的组的氨基酸序列至少 65%、至少 75%、至少 85%、至少 90% 或 100% 相同的 6 种氨基酸序列

SEQ ID NO:33: DYEMV,

SEQ ID NO:34: YISSGSRTIHYADTVKG,

SEQ ID NO:35: TLLRLHFDY,

SEQ ID NO:36: KSSQSLLYSGNQKNFLA,

SEQ ID NO:37: WASTRES, 和

SEQ ID NO:38: QQYYSYPWT。

[0019] 此类结合蛋白在本文用术语“10B3- 型”指定。

[0020] 在本发明的进一步方面,上文描述的 10B3- 型结合蛋白包含下述:与选自下述的

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

SEQ ID NO:25:

EVKLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFSDYEMVWVRQAPGEGLEWVA YISSGS-  
RTIHYADTVKGRFTISRDNPKNTLFLQMSSLRSEDAMYYCARTLLRLHFDYW-  
GQGTLTVSS,

SEQ ID NO:27:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYEMVWVRQAPGK-  
GLEWVX<sup>49</sup>YISSGSRTIHYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR  
TLLRLHFDYWGQGTLVTVSS,

其中 X<sup>49</sup> 是 S 或 A,

SEQ ID NO:29:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYEMVWVRQAPGKGLEWVSYISSGS-  
RTIHYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTLLRLHFDYW-  
GQGTLVTVSS, 和

SEQ ID NO:30:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYEMVWVRQAPGKGLEWVA YISSGS-  
RTIHYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTLLRLHFDYW-  
GQGTLVTVSS;

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

SEQ ID NO:26:

DIVMSQSPSSLA VSVGEKVTMSCKSSQSLLYSGNQKNFLAWYQQKPGQSPKLLIY-  
WASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISLVKAEDLAVYYCQQYYSPWTFGGDTK-  
LEIK,

SEQ ID NO:28:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSGNQKNFLAWYQQK-  
GQX<sup>49</sup>PKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYSPW-  
TFGGGTKVEIK,

其中 X<sup>49</sup> 是 P 或 S,

SEQ ID NO:31:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSGNQKNFLAWYQQKPGQPPKLLIY-  
WASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYSPWTFGGGT-  
KVEIK, 和

**SEQ ID NO:32:**

**DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSGNQKNFLAWYQQKPGQSPKLLIY-  
WASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYSPWTFGGGT-**

**KVEIK。**

[0021] 在本发明的另一个方面,上文描述的 10B3- 型结合蛋白包含如上文定义的第一种和第二种氨基酸序列。

[0022] 在一个方面,本文描述的 10B3- 型结合蛋白是抗体。这种抗体可以是例如免疫球蛋白分子、二硫键合的 Fv、单克隆抗体 (mab)、单链 Fv (scFv)、鼠抗体、嵌合抗体、人源化抗体、单结构域抗体、CDR 嫁接的抗体、双抗体、多特异性抗体、Fab、双重特异性抗体、双重可变结构域 (DVD) 结合分子、Fab'、双特异性抗体、F(ab')<sub>2</sub> 或 Fv。抗体序列可以对应人或鼠抗体序列。

[0023] 当本文描述的 10B3- 型结合蛋白是抗体时,它包含对应于如上文定义的序列组的一组 6 个互补性决定区 (CDR)。例如,本发明的 10B3- 型抗体包含至少六个 CDR,所述至少六个 CDR 与形成由 SEQ ID NO: 33、34、35、36、37 和 38 组成的 CDR 组的序列至少 75%、至少 85%、至少 90% 或 100% 相同。

[0024] 在本发明的另一个方面,抗体包含对应于如上定义的第一种氨基酸序列的至少一条可变重链,和对应于如上定义的第二种氨基酸序列的至少一条可变轻链。例如,本发明的 10B3- 型抗体包含 (i) 包含与选自 SEQ ID NO:25、27、29 和 30 的氨基酸序列至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列的至少一条可变重链,和 (ii) 包含与选自 SEQ ID NO:26、28、31 和 32 的氨基酸序列至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列的至少一条可变轻链。

[0025] 本文描述的结合蛋白可以进一步 (除了第一种和第二种氨基酸序列外) 包含另一个部分,其可以是另一种氨基酸序列或其他化学部分。例如,本发明的抗体可以包含重链免疫球蛋白恒定结构域。所述重链免疫球蛋白恒定结构域可以选自人 IgM 恒定结构域、人 IgG4 恒定结构域、人 IgG1 恒定结构域、人 IgE 恒定结构域、人 IgG2 恒定结构域、人 IgG3 恒定结构域、和人 IgA 恒定结构域。在另一个方面,本发明的结合蛋白进一步包含具有选自 SEQ ID NO:41 和 SEQ ID NO:42 的氨基酸序列的重链恒定区,另外具有选自 SEQ ID NO:43 和 SEQ ID NO:44 的氨基酸序列的轻链恒定区。

[0026] 本文描述的结合蛋白例如抗体可以进一步包含治疗剂、显像剂、能够促进形成免疫粘附分子的残基和 / 或另一种功能分子 (例如另一种肽或蛋白)。显像剂可以是放射性标记包括但不限于 <sup>3</sup>H、<sup>14</sup>C、<sup>35</sup>S、<sup>90</sup>Y、<sup>99</sup>Tc、<sup>111</sup>In、<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I、<sup>177</sup>Lu、<sup>166</sup>Ho 和 <sup>153</sup>Sm; 酶、荧光标记、发光标记、生物发光标记、磁性标记或生物素。

[0027] 本发明的结合蛋白可以是糖基化的。根据本发明的一个方面,糖基化模式是人糖基化模式。

[0028] 在本发明的一个方面,上述结合蛋白结合包含球聚体表位的 Aβ 形式,鼠单克隆抗体 m4C9 或 m10B3 与所述球聚体表位是反应的 (即靶向 Aβ 形式)。特别地,上述结合蛋白结合如本文描述的 β 淀粉样蛋白 (20-42) 球聚体。

[0029] 在本发明的一个方面,本文描述的结合蛋白能够调节 Aβ (20-42) 球聚体的生物

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

[0030] 本发明的结合蛋白可以作为晶体存在。在一个方面,晶体是无载体的药学控制释放的晶体。在另一个方面,结晶结合蛋白具有比其可溶性配对物更长的体内半衰期。在另一个方面,结晶结合蛋白在结晶后保留生物学活性。

[0031] 本发明还提供了编码本文公开的任何一种结合蛋白的分离的核酸。进一步的实施方案提供包含所述核酸的载体。所述载体可以选自 pcDNA、pTT (Durocher 等人, *Nucleic Acids Research* 30(2), 2002)、pTT3 (具有另外的多克隆位点的 pTT)、pEFBOS (Mizushima 和 Nagata, *Nucleic acids Research* 18(17), 1990)、pBV、pJV 和 pBJ。

[0032] 在本发明的另一个方面,用上文公开的载体转化宿主细胞。根据一个实施方案,宿主细胞是原核细胞,包括但不限于大肠杆菌。在相关实施方案中,宿主细胞是真核细胞,选自原生生物细胞、动物细胞、植物细胞和真菌细胞。动物细胞可以选自哺乳动物细胞、禽类细胞和昆虫细胞。根据本发明的一个方面,所述哺乳动物细胞选自 CHO 和 COS,所述真菌细胞是酵母细胞例如酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*),并且所述昆虫细胞是昆虫 Sf9 细胞。

[0033] 进一步地,本发明提供了产生如本文公开的结合蛋白的方法,其包括在适合于产生所述结合蛋白的条件和时间下在培养基中培养本文公开的任何一种宿主细胞。另一个实施方案提供了根据本文公开的方法产生的本发明的结合蛋白。在另一个实施方案中,本发明提供了根据上文公开的方法产生的结合蛋白。

[0034] 本发明还提供了包含如本文公开的结合蛋白例如抗体和药学可接受的载体的药物组合物。

[0035] 本发明的一个实施方案提供了用于释放本文描述的结合蛋白的组合物,其中所述组合物包含制剂,所述制剂又包含如上公开的结晶结合蛋白,例如结晶抗体,和成分;和至少一种聚合载体。在一个方面,聚合载体是选自下述中的一种或多种的聚合物:聚(丙烯酸)、聚(氰基丙烯酸酯)、聚(氨基酸)、聚(酐)、聚(缩酚肽)、聚(酯)、聚(乳酸)、乳酸乙醇酸共聚物或 PLGA、聚( $\beta$ -羟基丁酸酯)、聚(己内酯)、聚(二氧环己酮);聚(乙二醇)、聚((羟丙基)甲基丙烯酰胺)、聚((有机)膦腈)、聚(原酸酯)、聚(乙烯醇)、聚(乙烯吡咯烷酮)、马来酸酐-烷基乙烯醚共聚物、复合多元醇(pluronic polyol)、白蛋白、海藻酸盐、纤维素和纤维素衍生物、胶原、纤维蛋白、明胶、透明质酸、寡糖、糖胺聚糖、硫酸化多糖、其掺和物和共聚物。在另一个方面,所述成分选自:白蛋白、蔗糖、海藻糖、拉克替醇、明胶、羟丙基- $\beta$ -环糊精、甲氧基聚乙二醇和聚乙二醇。

[0036] 本发明还涉及抑制(即,减少)A $\beta$  (20-42) 球聚体(或任何其他靶向 A $\beta$  形式)的活性的方法,其包含使所述靶向 A $\beta$  形式与本发明的一种或多种结合蛋白接触,从而使所述靶向 A $\beta$  形式的活性被抑制(即,减少)。在特定实施方案中,所述活性在体外被抑制。这种方法可以包括将本发明的结合蛋白加入含有或怀疑含有靶向 A $\beta$  形式的样品或细胞培养物中,所述样品例如衍生自受试者的样品(例如全血、脑脊液、血清、组织等),以便抑制(即,减少)样品中的 A $\beta$  形式的活性。可替代地,所述靶向 A $\beta$  形式的活性可以在受试者体内被抑制(即,减少)。因此,本发明进一步涉及用于在抑制(即,减少)受试者中的靶向 A $\beta$  形式的活性中使用的本文描述的结合蛋白,其包括使所述 A $\beta$  形式与本发明的一种或多种结合蛋白接触,从而使所述 A $\beta$  形式的活性被抑制(即,减少)。



[0037] 在相关方面,本发明提供了用于抑制(即,减少)患有其中所述A $\beta$ 形式的活性是有害的疾病或病症的受试者中靶向A $\beta$ 形式的活性的方法。在一个实施方案中,所述方法包括给受试者施用本文公开的至少一种结合蛋白,从而使得受试者中靶向A $\beta$ 形式的活性被抑制(即,减少)。因此,本发明提供了用于在抑制(即,减少)患有如本文描述的疾病或病症的受试者中的靶向A $\beta$ 形式中使用的本文描述的A $\beta$ 结合蛋白,其中本文公开的至少一种结合蛋白这样施用于受试者,从而使得受试者中所述A $\beta$ 形式的活性被抑制(即,减少)。

[0038] 在相关方面,本发明提供了用于治疗(例如治愈、抑制、改善、延迟选自下述的疾病或病症或预防选自下述的疾病或病症发作,或预防选自下述的疾病或病症重现或复发)或预防选自下述的疾病或病症的方法: $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶缺乏、C1-抑制剂缺乏血管性水肿、抗凝血酶缺乏血栓栓塞性疾病、库鲁病、克雅二氏(Creutzfeldt-Jacob)病/羊瘙痒症、牛海绵状脑病、Gerstmann-Straussler-Scheinker病、家族致命性失眠症、亨廷顿氏病、脊髓小脑性共济失调、Machado-Joseph萎缩、齿状红核苍白球肌萎缩症、额颞痴呆、镰状细胞性贫血、不稳定性血红蛋白包涵体溶血、药物诱导的包涵体溶血、帕金森氏病、全身性AL型淀粉样变性、结节性AL型淀粉样变性、全身性AA型淀粉样变性、前列腺淀粉样变性、血液透析淀粉样变性、遗传性(冰岛)脑血管病、亨廷顿氏病、家族性内脏淀粉样变性、家族性内脏多神经病、家族性内脏淀粉样变性、老年性全身性淀粉样变性、家族性淀粉样蛋白神经病、家族性心脏淀粉样变性、阿尔茨海默氏病、唐氏综合症、甲状腺髓样癌和2型糖尿病(T2DM)。在特定实施方案中,所述疾病或病症是淀粉样变性例如阿尔茨海默氏病或唐氏综合症。在一个实施方案中,所述方法包括施用本文公开的任何一种A $\beta$ 结合蛋白的步骤,从而使得实现治疗。在另一个实施方案中,本发明提供了治疗患有选自本文公开的疾病或病症的受试者的方法,其包括与一种或多种另外的治疗剂施用同时或之后施用本文公开的任何一种A $\beta$ 结合蛋白的步骤。因此,本发明提供了用于在治疗患有本文公开的疾病或病症的受试者中使用的本文公开的A $\beta$ 结合蛋白,其包括与一种或多种另外的治疗剂施用同时或之后施用本文公开的任何一种结合蛋白的步骤。例如,另外的治疗剂选自本文列出的治疗剂。

[0039] 本文公开的结合蛋白和包含所述结合蛋白的药物组合物通过选自下述的至少一种模式施用于受试者:肠胃外、皮下、肌内、静脉内、关节内、支气管内、腹内、囊内、软骨内、腔内、体腔内、小脑内、脑室内、结肠内、颈管内、胃内、肝内、心肌内、骨内、骨盆内、心包内(intrapericardiac)、腹膜内、胸膜内、前列腺内、肺内、直肠内、肾内、视网膜内、脊柱内、滑膜内、胸内、子宫内、膀胱内、推注、阴道、直肠、颊、舌下、鼻内和经皮。

[0040] 在另一个实施方案中,本发明提供了用于检测样品中的靶向A $\beta$ 形式的方法,其包括(i)使所述样品与本发明的一种或多种结合蛋白接触,和(ii)检测在一种或多种所述结合蛋白和所述样品的元件之间的复合物的形成,其中相对于对照样品,在样品中复合物的形成或增加的形成指示样品中所述A $\beta$ 形式的存在。样品可以是得自怀疑具有如本文公开的疾病或病症的受试者的生物学样品(例如全血、脑脊液、血清、组织等)或含有或怀疑含有所述A $\beta$ 形式的细胞培养物。对照样品不含所述A $\beta$ 形式或得自不具有如上所述的疾病的患者。在一种或多种所述结合蛋白和得自怀疑具有阿尔茨海默氏病的患者的样品元件之间的复合物的存在指示所述患者中这种疾病的诊断。

[0041] 在可替代的实施方案中,靶向A $\beta$ 形式的检测可以例如通过受试者中的体内成像

在体内进行。为了这个目的,本发明的一种或多种结合蛋白可以在允许一种或多种所述蛋白与靶向 A $\beta$  形式的结合的条件下施用于受试者或对照受试者,且检测在一种或多种所述结合蛋白和所述 A $\beta$  形式之间的复合物的形成,其中相对于对照受试者,在受试者中复合物的形成或增加的形成指示受试者中所述 A $\beta$  形式的存在。受试者可以是已知或怀疑患有其中靶向 A $\beta$  形式的活性是有害的病症或疾病的受试者。

## 附图说明

[0042]

图 1 举例说明鼠抗体 m4C9 (m4C9\_VH) 的可变重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO:1)。所有 CDR 区都是有下划线的。

[0043] 图 2 举例说明鼠抗体 m4C9 (m4C9\_VL) 的可变轻链的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2)。所有 CDR 区都是有下划线的。

[0044] 图 3 举例说明包含人 VH1-69 和 JH4 构架区的人源化 4C9- 型抗体的可变重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO:3)。所有 CDR 区都是有下划线的。

[0045] 图 4 举例说明包含人 VH7-4.1 和 JH4 构架区的人源化 4C9- 型抗体的可变重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO:4)。所有 CDR 区都是有下划线的。

[0046] 图 5 举例说明包含人 1-16/L1 和 Jk2 构架区的人源化 4C9- 型抗体的可变轻链的氨基酸序列 (SEQ ID NO:5)。所有 CDR 区都是有下划线的。

[0047] 图 6 举例说明包含人 VH1-69 和 JH4 构架区的人源化 4C9- 型抗体的可变重链 (4C9hum\_VH.1z) 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:6)。所有 CDR 区都是有下划线的。

[0048] 图 7 举例说明包含人 VH1-69 和 JH4 构架区的人源化 4C9- 型抗体的可变重链 (4C9hum\_VH.1) 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:7),所述构架区具有防止 N 末端焦谷氨酸形成的 Q1E 变化以及共有变化 S16A、G27Y 和 S30T。所有 CDR 区都是有下划线的。

[0049] 图 8 举例说明包含人 VH1-69 和 JH4 构架区的人源化 4C9- 型抗体的可变重链 (4C9hum\_VH.1a) 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:8),所述构架区具有防止 N 末端焦谷氨酸形成的 Q1E 变化、共有变化 S16A、G27Y 和 S30T 以及构架回复突变 M48I、V68A、I70L、A72V、A97T 和 R98T。所有 CDR 区都是有下划线的。

[0050] 图 9 举例说明包含人 VH1-69 和 JH4 构架区的人源化 4C9- 型抗体的可变重链 (4C9hum\_VH.1b) 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:9),所述构架区具有防止 N 末端焦谷氨酸形成的 Q1E 变化、共有变化 S16A、G27Y 和 S30T 以及构架回复突变 A72V 和 R98T。所有 CDR 区都是有下划线的。

[0051] 图 10 举例说明包含人 VH7-4.1 和 JH4 构架区的人源化 4C9- 型抗体的可变重链 (4C9hum\_VH.2z) 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:10)。所有 CDR 区都是有下划线的。

[0052] 图 11 举例说明包含人 VH7-4.1 和 JH4 构架区的人源化 4C9- 型抗体的可变重链 (4C9hum\_VH.2) 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:11),所述构架区具有防止 N 末端焦谷氨酸形成的 Q1E 变化。所有 CDR 区都是有下划线的。

[0053] 图 12 举例说明包含人 VH7-4.1 和 JH4 构架区的人源化 4C9- 型抗体的可变重链 (4C9hum\_VH.2a) 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:12),所述构架区具有防止 N 末端焦谷氨酸形成的 Q1E 变化以及构架回复突变 M48I、F68A、F70L、L72V、T74K、A97T 和 R98T。所有 CDR 区都

是有下划线的。

[0054] 图 13 举例说明包含人 VH7-4.1 和 JH4 构架区的人源化 4C9- 型抗体的可变重链 (4C9hum\_VH. 2b) 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:13), 所述构架区具有防止 N 末端焦谷氨酸形成的 Q1E 变化以及构架回复突变 L72V 和 R98T。所有 CDR 区都是有下划线的。

[0055] 图 14 举例说明包含人 1-16/L1 和 Jk2 构架区的人源化 4C9- 型抗体的可变轻链 (4C9hum\_VL. 1z) 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:14)。所有 CDR 区都是有下划线的。

[0056] 图 15 举例说明包含人 1-16/L1 和 Jk2 构架区的人源化 4C9- 型抗体的可变轻链 (4C9hum\_VL. 1) 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:15), 所述构架区具有共有变化 S46L。所有 CDR 区都是有下划线的。

[0057] 图 16 举例说明包含人 1-16/L1 和 Jk2 构架区的人源化 4C9- 型抗体的可变轻链 (4C9hum\_VL. 1a) 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:16), 所述构架区具有构架回复突变 L46T 和 F71Y。所有 CDR 区都是有下划线的。

[0058] 图 17 举例说明包含人 VH1-69 和 JH4 构架区的鼠单克隆抗体 4C9 (m4C9) 和人源化 4C9- 型抗体 (4C9hum) 的可变重链的氨基酸序列比对。所有 CDR 区都以粗体字母印刷。在位置 1 的 X 是 Q 或 E; 在位置 16 的 X 是 S 或 A; 在位置 27 的 X 是 G 或 Y; 在位置 30 的 X 是 S 或 T; 在位置 48 的 X 是 M 或 I; 在位置 68 的 X 是 V 或 A; 在位置 70 的 X 是 I 或 L; 在位置 72 的 X 是 A 或 V; 在位置 97 的 X 是 A 或 T; 以及在位置 98 的 X 是 R 或 T。

[0059] 图 18 举例说明包含人 VH7-4.1 和 JH4 构架区的鼠单克隆抗体 4C9 (m4C9) 和人源化 4C9- 型抗体 (4C9hum) 的可变重链的氨基酸序列比对。所有 CDR 区都以粗体字母印刷。在位置 1 的 X 是 Q 或 E; 在位置 48 的 X 是 M 或 I; 在位置 68 的 X 是 F 或 A; 在位置 70 的 X 是 F 或 L; 在位置 72 的 X 是 L 或 V; 在位置 74 的 X 是 T 或 K; 在位置 97 的 X 是 A 或 T; 以及在位置 98 的 X 是 R 或 T。

[0060] 图 19 举例说明包含人 1-16/L1 和 Jk2 构架区的鼠单克隆抗体 4C9 (m4C9) 和人源化 4C9- 型抗体 (4C9hum) 的可变轻链的氨基酸序列比对。所有 CDR 区都以粗体字母印刷。在位置 46 的 X 是 S、L 或 T; 以及在位置 71 的 X 是 F 或 Y。

[0061] 图 20 举例说明鼠抗体 m10B3 的可变重链 (m10B3\_VH) 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:25)。所有 CDR 区都是有下划线的。

[0062] 图 21 举例说明鼠抗体 m10B3 的可变轻链 (m10B3\_VL) 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:26)。所有 CDR 区都是有下划线的。

[0063] 图 22 举例说明包含人 VH3-48 和 JH4 构架区的人源化 10B3- 型抗体的可变重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO:27)。所有 CDR 区都是有下划线的。

[0064] 图 23 举例说明包含人 4-1/B3 和 Jk4 构架区的人源化 10B3- 型抗体的可变轻链的氨基酸序列 (SEQ ID NO:28)。所有 CDR 区都是有下划线的。

[0065] 图 24 举例说明包含人 VH3-48 和 JH4 构架区的人源化 10B3- 型抗体的可变重链 (10B3hum\_VH. 1) 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:29)。所有 CDR 区都是有下划线的。

[0066] 图 25 举例说明包含人 VH3-48 和 JH4 构架区的人源化 10B3- 型抗体的可变重链 (10B3hum\_VH. 1a) 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:30), 所述构架区具有构架回复突变 S49A。所有 CDR 区都是有下划线的。

[0067] 图 26 举例说明包含人 4-1/B3 和 Jk4 构架区的人源化 10B3- 型抗体的可变轻链

(10B3hum\_VL. 1) 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:31)。所有 CDR 区都是有下划线的。

[0068] 图 27 举例说明包含人 4-1/B3 和 Jk4 构架区的人源化 10B3- 型抗体的可变轻链 (10B3hum\_VL. 1a) 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:32), 所述构架区具有构架回复突变 P49S。所有 CDR 区都是有下划线的。

[0069] 图 28 举例说明包含人 VH3-48 和 JH4 构架区的鼠单克隆抗体 10B3 (m10B3) 和人源化 10B3- 型抗体 (10B3hum) 的可变重链的氨基酸序列比对。所有 CDR 区都以粗体字母印刷。在位置 49 的 X 是 S 或 A。

[0070] 图 29 举例说明包含人 4-1/B3 和 Jk4 构架区的鼠单克隆抗体 10B3 (m10B3) 和人源化 10B3- 型抗体 (10B3hum) 的可变轻链的氨基酸序列比对。所有 CDR 区都以粗体字母印刷。在位置 49 的 X 是 P 或 S。X。

[0071] 图 30 显示不同的鼠抗 -A $\beta$  抗体 m4C9、m10B3 和 m6E10 针对不同形式的 A $\beta$  的特异性的斑点印迹分析。检测抗 -A $\beta$  抗体与固定化 A $\beta$  的结合。

[0072] 1 = A $\beta$  (1-42) 单体, 0.1% NH<sub>4</sub>OH

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

3 = A $\beta$  (1-42) 单体, 0.1% NaOH

4 = A $\beta$  (1-40) 单体, 0.1% NaOH

5 = A $\beta$  (1-42) 球聚体

6 = A $\beta$  (12-42) 球聚体

7 = A $\beta$  (20-42) 球聚体

8 = A $\beta$  (1-42) 纤丝制剂

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

[0073] 图 31A 和 31B 显示如通过夹心 ELISA 测定的, 在 (A) 食蟹猴血浆和 (B) 人血浆中的鼠单克隆抗体 m4C9、m10B3 和 m1G5、抗人 PF-4 抗体 (阳性对照) 和 IgG2a (阴性对照) 的血小板因子 4 (PF-4) 交叉反应。检测到 PF-4 与固定的抗体的结合。

[0074] 图 32A 和 32B 显示如通过比对夹心 ELISA 测定的, 在 (A) 食蟹猴血浆和 (B) 人血浆中的鼠单克隆抗体 m4C9、m10B3 和 m1G5、抗人 PF-4 抗体 (阳性对照) 和 IgG2a (阴性对照) 的血小板因子 4 (PF-4) 交叉反应。抗体通过固定的抗小鼠 IgG 在板上捕获。检测到 PF-4 与捕获的抗体的结合。

## 具体实施方式

[0075]

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

[0076] 一般地, 与本文描述的细胞和组织培养、分子生物学、免疫学、微生物学、遗传学、

蛋白和核酸化学以及杂交结合使用的命名法及其技术是本领域众所周知和通常使用的那些。本发明的方法和技术一般根据本领域众所周知的常规方法并且如本说明书自始至终引用且讨论的多种一般和更具体的参考文献中所述进行,除非另有说明。酶促反应和纯化技术根据制造商的说明书进行,如本领域通常实现的或如本文描述的。与本文描述的分析化学、合成有机化学、以及医学和药物化学结合使用的命名法以及其实验室程序和技术是本领域众所周知和通常使用的那些。标准技术用于化学合成、化学分析、药物制备、制剂和递送以及患者的治疗。

[0077] 本发明涉及 A $\beta$  结合蛋白,特别是抗 A $\beta$  抗体或其 A $\beta$  结合部分,特别是与 A $\beta$  (20-42) 球聚体结合的那些。这些 A $\beta$  结合蛋白不仅能够甄别其他形式的 A $\beta$  肽,特别是单体和纤丝 (fibrils),还能够甄别非截短形式的 A $\beta$  球聚体。因此,本发明涉及具有与 A $\beta$  (20-42) 球聚体结合亲和力的 A $\beta$  结合蛋白,所述结合亲和力大于这种 A $\beta$  结合蛋白与 A $\beta$  (1-42) 球聚体的结合亲和力。

[0078] 如本文使用的术语“A $\beta$  (X-Y)”指从人淀粉样蛋白  $\beta$  (A $\beta$ ) 蛋白的氨基酸位置 X 到氨基酸位置 Y 的氨基酸序列,包括 X 和 Y,特别指氨基酸序列 DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF AEDVGSNKGAI IGLMVGGVV IAT (SEQ ID NO:45) (对应于氨基酸位置 1 - 43) 的从氨基酸位置 X 到氨基酸位置 Y 的氨基酸序列或任何其天然存在的变体,特别是具有选自下述的至少一个突变的那些:A2T、H6R、D7N、A21G (“佛兰芒 (Flemish)”)、E22G (“北极 (Arctic)”)、E22Q (“荷兰 (Dutch)”)、E22K (“意大利 (Italian)”)、D23N (“爱荷华州 (Iowa)”)、A42T 和 A42V,其中编号相对于 A $\beta$  肽的起始,包括位置 X 和位置 Y 或具有最高达三个另外的氨基酸置换的序列,所述氨基酸置换无一可以阻止球聚体形成。根据一个方面,在从氨基酸 12 或 X (无论哪一个数目更高) 到氨基酸 42 或 Y (无论哪一个数目更低) 的部分中不存在另外的氨基酸置换。根据另一个方面,在从氨基酸 20 或 X (无论哪一个数目更高) 到氨基酸 42 或 Y (无论哪一个数目更低) 的部分中不存在另外的氨基酸置换。根据另一个方面,在从氨基酸 20 或 X (无论哪一个数目更高) 到氨基酸 40 或 Y (无论哪一个数目更低) 的部分中不存在另外的氨基酸置换。本文“另外的”氨基酸置换是在自然界中未发现的来自规范序列的任何偏差。

[0079] 更具体而言,如本文使用的术语“A $\beta$  (1-42)”指从人 A $\beta$  蛋白的氨基酸位置 1 到氨基酸位置 42 的氨基酸序列,包括 1 和 42,特别指氨基酸序列 DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF AEDVGSNKGAI IGLMVGGVV IA (SEQ ID NO:46) 或任何其天然存在的变体,特别是具有选自下述的至少一个突变的那些:A2T、H6R、D7N、A21G (“佛兰芒”)、E22G (“北极”)、E22Q (“荷兰”)、E22K (“意大利”)、D23N (“爱荷华州”)、A42T 和 A42V,其中编号相对于 A $\beta$  肽的起始,包括 1 和 42 或具有最高达三个另外的氨基酸置换的序列,所述氨基酸置换无一可以阻止球聚体形成。根据一个方面,在从氨基酸 20 到氨基酸 42 的部分中不存在另外的氨基酸置换。同样地,如本文使用的术语“A $\beta$  (1-40)”指从人 A $\beta$  蛋白的氨基酸位置 1 到氨基酸位置 40 的氨基酸序列,包括 1 和 40,特别指氨基酸序列 DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF AEDVGSNKGAI IGLMVGGVV (SEQ ID NO:47) 或任何其天然存在的变体,特别是具有选自下述的至少一个突变的那些:A2T、H6R、D7N、A21G (“佛兰芒”)、E22G (“北极”)、E22Q (“荷兰”)、E22K (“意大利”) 和 D23N (“爱荷华州”),其中编号相对于 A $\beta$  肽的起始,包括 1 和 40 或具有最高达三个另外的氨基酸置换的序列,所述氨基酸置换无一可以阻止球聚体形成。根据一个方面,在

从氨基酸 20 到氨基酸 40 的部分中不存在另外的氨基酸置换。

[0080] 更具体而言,如本文使用的术语“ $A\beta$  (12-42)”指从人  $A\beta$  蛋白的氨基酸位置 12 到氨基酸位置 42 的氨基酸序列,包括 12 和 42,特别指氨基酸序列 VHHQKLVFF AEDVGSNKGAIIGLMVGGVV IA (SEQ ID NO:48) 或任何其天然存在的变体,特别是具有选自下述的至少一个突变的那些: $A21G$ (“佛兰芒”)、 $E22G$ (“北极”)、 $E22Q$ (“荷兰”)、 $E22K$ (“意大利”)、 $D23N$ (“爱荷华州”)、 $A42T$  和  $A42V$ ,其中编号相对于  $A\beta$  肽的起始,包括 12 和 42 或具有最高达三个另外的氨基酸置换的序列,所述氨基酸置换无一可以阻止球聚体形成。根据一个方面,在从氨基酸 20 到氨基酸 42 的部分中不存在另外的氨基酸置换。同样地,如本文使用的术语“ $A\beta$  (20-42)”指从人淀粉样蛋白  $\beta$  蛋白的氨基酸位置 20 到氨基酸位置 42 的氨基酸序列,包括 20 和 42,特别指氨基酸序列 F AEDVGSNKGAIIGLMVGGVV IA (SEQ ID NO:49) 或任何其天然存在的变体,特别是具有选自下述的至少一个突变的那些: $A21G$ (“佛兰芒”)、 $E22G$ (“北极”)、 $E22Q$ (“荷兰”)、 $E22K$ (“意大利”)、 $D23N$ (“爱荷华州”)、 $A42T$  和  $A42V$ ,其中编号相对于  $A\beta$  肽的起始,包括 20 和 42 或具有最高达三个另外的氨基酸置换的序列,所述氨基酸置换无一可以阻止球聚体形成。根据一个方面,不存在任何另外的氨基酸置换。

[0081] 如本文使用的术语“ $A\beta$  (X-Y) 球聚体”(  $A\beta$  (X-Y) 球状寡聚物)指如上定义的  $A\beta$  (X-Y) 肽的可溶性、球状、非共价结合,具有同质性和独特的物理特征。根据一个方面,  $A\beta$  (X-Y) 球聚体是  $A\beta$  (X-Y) 肽的稳定、非纤维状、寡聚装配,其可通过与阴离子型去污剂一起孵育而获得。与单体和纤维形成对比,这些球聚体的特征在于亚单位的限定装配数目(例如,具有 4-6 个亚单位的早期装配形式,“寡聚物 A”;和具有 12-14 个亚单位的晚期装配形式,“寡聚物 B”;如 W02004/067561 中所述)。球聚体具有三维球形结构(“熔球”,参见 Barghorn 等人, *J Neurochem* 95 :834-847, 2005)。它们的特征可以进一步在于下述特点中的一个或多个:

- N 末端氨基酸 X-23 用混杂蛋白酶的可切割性(例如嗜热菌蛋白酶或胞内蛋白酶 GluC),获得截短形式的球聚体;
- C 末端氨基酸 24-Y 对于混杂蛋白酶和抗体的不易接近性;
- 截短形式的这些球聚体维持所述球聚体的三维核心结构,核心表位  $A\beta$  (20-Y) 以其球聚体构型具有更佳接近性。

[0082] 根据本发明且特别是为了评估本发明的  $A\beta$  结合蛋白的结合亲和力的目的,术语“ $A\beta$  (X-Y) 球聚体”在此处特别指可通过如通过引用并入本文的 W02004/067561 中所述的方法获得的产物。所述方法包含使天然、重组或合成  $A\beta$  (X-Y) 肽或其衍生物解折叠;使至少部分解折叠的  $A\beta$  (X-Y) 肽或其衍生物暴露于去污剂,减少去污作用且继续孵育。

[0083] 为了使肽解折叠的目的,可以允许氢键破坏试剂例如六氟异丙醇 (HFIP) 作用于蛋白。当作用温度是约 20 - 50°C,并且特别是约 35 - 40°C 时,数分钟例如约 10 - 60 分钟的作用时间是足够的。例如以浓缩形式在与含水缓冲液例如二甲亚砜 (DMSO) 能混溶的合适有机溶剂中蒸发至干燥的残渣的后续溶解导致至少部分解折叠的肽或其衍生物的悬液,其可以随后使用。需要时,原悬液可以贮存于低温例如在约 20°C 用于中间时期。可替代地,肽或其衍生物可以吸收在微酸性例如水溶液例如约 10 mM HCl 水溶液中。在通常数分钟的孵育时间后,通过离心去除不溶性组分。在 10,000 g 数分钟是有利的。这些方法步骤可以在室温即在 20 - 30°C 的温度进行。在离心后获得的上清液含有  $A\beta$  (X-Y) 肽或其衍

生物,并且可以贮存于低温例如在约 $-20^{\circ}\text{C}$ 用于中间时期。后续暴露于去污剂涉及肽或其衍生物的寡聚化,以给出中间类型的寡聚物(在WO 2004/067561中称为寡聚物A)。为了这个目的,允许去污剂作用于至少部分解折叠的肽或其衍生物,直至已产生足够的中间寡聚物。使用离子型去污剂特别是阴离子型去污剂是优先的。

[0084] 根据特定实施方案,使用下式(I)的去污剂:

R-X,

其中基团R是具有6 - 20、例如10 - 14个碳原子的未分支或分支的烷基,或具有6 - 20、例如10 - 14个碳原子的未分支或分支的烯基,基团X是酸性基团或其盐,其中X选自例如 $-\text{COO}-\text{M}^+$ 、 $-\text{SO}_3-\text{M}^+$ 等且尤其是 $-\text{OSO}_3-\text{M}^+$ ,并且 $\text{M}^+$ 是氢阳离子,或选自例如碱金属和碱土金属阳离子和铵阳离子的无机或有机阳离子。有利的是其中R是未分支的烷基的式(I)的去污剂,其中必须特别提及烷-1-基基团。例如,可以有利地使用十二烷基硫酸钠(SDS)、月桂酸、去污剂月桂基肌酸钠盐(也称为肌氨酰NL-30或Gardol®)和油酸。去污作用的时间特别依赖于实施寡聚化的肽或其衍生物是否已解折叠(并且如果是,则至何种程度)。如果根据解折叠步骤,肽或其衍生物已预先用氢键破坏试剂即特别用六氟异丙醇处理,则当作用温度是约 $20 - 50^{\circ}\text{C}$ ,并且特别是约 $35 - 40^{\circ}\text{C}$ 时,在数小时的范围中有利地约1 - 20且特别是约2 - 10小时的作用时间是足够的。如果较少解折叠或基本上未解折叠的肽或其衍生物是起始点,则相应更长的作用时间是有利的。如果肽或其衍生物已例如根据上述程序作为HFIP处理的替代方案预处理,或直接对所述肽或其衍生物实施寡聚化,则当作用温度是约 $20 - 50^{\circ}\text{C}$ ,并且特别是约 $35 - 40^{\circ}\text{C}$ 时,在约5 - 30小时且特别是约10 - 20小时范围中的作用时间是足够的。在孵育后,有利地通过离心去除不溶性组分。在10,000 g数分钟是有利的。待选择的去污剂浓度取决于使用的去污剂。如果使用SDS,则在按重量计0.01 - 1%范围中,例如按重量计0.05 - 0.5%,例如按重量计约0.2%的浓度证明是有利的。如果使用月桂酸或油酸,则略微更高的浓度是有利的,例如在按重量计0.05 - 2%范围中,例如按重量计0.1 - 0.5%,例如按重量计约0.5%。去污剂作用应在大致在生理学范围中的盐浓度时发生。因此,特别在50 - 500 mM范围中,例如100 - 200 mM或在约140 mM的NaCl浓度是有利的。去污剂作用的后续减少和孵育的继续涉及进一步的寡聚化,以给出本发明的 $\text{A}\beta(\text{X}-\text{Y})$ 球聚体(在WO2004/067561中称为球聚体B)。因为得自先前步骤的组合物通常含有去污剂和生理学范围中的盐浓度,所以随后减少去污剂作用以及盐浓度是有利的。这可以通过减少去污剂和盐的浓度来进行,例如通过方便地用水或更低盐浓度的缓冲液例如Tris-HCl, pH 7.3稀释。在约2 - 10范围中、有效地在约3 - 8范围中且特别是约4的稀释因子已证明是合适的。去污剂作用中的减少也可以通过加入可以中和所述去污剂作用的物质实现。这些的例子包括能够络合去污剂的物质,如在纯化和提取措施的过程中能够稳定细胞的物质,例如特别是E0/P0嵌段共聚物,特别是在商标名Pluronic® F 68下的嵌段共聚物。同样地可以使用在特定临界微团浓度周围或其上的浓度范围中的烷基化且特别是乙氧基化烷基酚例如Triton® X系列的乙氧基化叔辛基酚,特别是Triton® X100, 3-(3-胆酰胺丙基二甲氨基)-1-丙磺酸酯(CHAPS®),或烷氧基化且特别是乙氧基化脱水山梨糖醇脂肪酯例如Tween®系列的那些,特别是Tween® 20。随后,将溶液孵育直至已产生足够的本发明的 $\text{A}\beta(\text{X}-\text{Y})$ 球聚体。当作用温度是约 $20 - 50^{\circ}\text{C}$ ,并且特别是约 $35 - 40^{\circ}\text{C}$ 时,在数小时的范围中例如在约10 - 30小时的范围中或在约15

- 25 小时的范围中的作用时间是足够的。随后可以将溶液浓缩并且可以通过离心去除可能的残渣。此处再次,在 10,000 *g* 数分钟证明是有利的。在离心后获得的上清液含有本发明的 A $\beta$  (X-Y) 球聚体。本发明的 A $\beta$  (X-Y) 球聚体可以最后以本身已知的方式回收,例如通过超滤、透析、沉淀或离心。例如, A $\beta$  (X-Y) 球聚体在变性条件下例如通过 SDS-PAGE 的电泳分离可以产生双重带(例如对于 A $\beta$  (1-42) 具有 38/48 kDa 的表观分子量),并且在分离前在球聚体的戊二醛处理后,这两个带可以合并成一个。球聚体的大小排阻层析可以分别导致单一峰(例如对应于对于 A $\beta$  (1-42) 球聚体约 100 kDa 的分子量或对于戊二醛交联的 A $\beta$  (1-42) 球聚体约 60 kDa 的分子量)。从 A $\beta$  (1-42) 肽、A $\beta$  (12-42) 肽和 A $\beta$  (20-42) 肽开始,所述方法特别适合于获得 A $\beta$  (1-42) 球聚体、A $\beta$  (12-42) 球聚体和 A $\beta$  (20-42) 球聚体。

[0085] 在本发明的特定实施方案中,其中 X 选自数目 2 .. 24 并且 Y 如上定义的 A $\beta$  (X-Y) 球聚体是可通过将 A $\beta$  (1-Y) 球聚体截短成较短形式的那些,其中 X 选自数目 2 .. 24,例如 X 是 20 或 12,并且 Y 如上定义,这可以通过用合适的蛋白酶处理来实现。例如, A $\beta$  (20-42) 球聚体可以通过对 A $\beta$  (1-42) 球聚体实施嗜热菌蛋白酶蛋白酶解来获得,并且 A $\beta$  (12-42) 球聚体可以通过对 A $\beta$  (1-42) 球聚体实施胞内蛋白酶 GluC 蛋白酶解来获得。当达到所需蛋白酶解程度时,蛋白酶以一般已知的方式进行灭活。所得到的球聚体随后可以根据本文已描述的程序进行分离,并且需要时,通过进一步的操作(work-up)和纯化步骤进行进一步加工。所述方法的详细描述公开于通过引用并入本文的 WO 2004/067561 中。

[0086] 为了本发明的目的, A $\beta$  (1-42) 球聚体特别是如下文实施例 1a 中所述的 A $\beta$  (1-42) 球聚体; A $\beta$  (20-42) 球聚体特别是如下文实施例 1b 中所述的 A $\beta$  (20-42) 球聚体,并且 A $\beta$  (12-42) 球聚体特别是如下文实施例 1c 中所述的 A $\beta$  (12-42) 球聚体。根据本发明的一个方面,球聚体显示与神经元细胞的亲和力和/或显示出神经调节作用。

[0087] 根据本发明的另一个方面,球聚体由 11 - 16 例如 12- 14 个 A $\beta$  (X-Y) 肽组成。根据本发明的另一个方面,术语“A $\beta$  (X-Y) 球聚体”在本文中基本上由 A $\beta$  (X-Y) 亚单位组成的球聚体,其中例如平均 12 个亚单位中的至少 11 个是 A $\beta$  (X-Y) 类型的,或小于 10% 的球聚体包含任何非 A $\beta$  (X-Y) 肽,或非 A $\beta$  (X-Y) 肽的含量低于检测阈值。更具体而言,术语“A $\beta$  (1-42) 球聚体”在本文中基本上由如上定义的 A $\beta$  (1-42) 单位组成的球聚体;术语“A $\beta$  (12-42) 球聚体”在本文中基本上由如上定义的 A $\beta$  (12-42) 单位组成的球聚体;并且术语“A $\beta$  (20-42) 球聚体”在本文中基本上由如上定义的 A $\beta$  (20-42) 单位组成的球聚体。

[0088] 术语“交联的 A $\beta$  (X-Y) 球聚体”在本文中可通过球聚体的组成成分单位的交联得自如上所述的 A $\beta$  (X-Y) 球聚体的分子,所述交联例如化学交联、醛交联、戊二醛交联。在本发明的另一个方面,交联的球聚体基本上是其单位至少部分通过共价键连接而不是仅通过非共价相互作用结合在一起的球聚体。为了本发明的目的,交联的 A $\beta$  (1-42) 球聚体特别是如下文实施例 1d 中所述的交联的 A $\beta$  (1-42) 球聚体。

[0089] 术语“A $\beta$  (X-Y) 球聚体衍生物”在本文中特别指通过共价连接至促进检测的基团进行标记的球聚体,所述基团例如荧光团,例如异硫氰酸荧光素、藻红蛋白、维多利亚水母 (*Aequorea victoria*) 荧光蛋白、网罟 (*Dictyosoma*) 荧光蛋白、或其任何组合或荧光活性衍生物;生色团;化学发光体例如萤光素酶,特别是北美萤火虫 (*Photinus pyralis*) 萤光



素酶、费氏弧菌 (*Vibrio fischeri*) 萤光素酶、或其任何组合或化学发光活性衍生物；酶促活性基团例如过氧化物酶，例如辣根过氧化物酶、或其任何酶促活性衍生物；电子致密基团例如含重金属基团，例如含金基团；半抗原，例如酚衍生的半抗原；强抗原性结构，例如预测为抗原性例如通过 Kolaskar 和 Tongaonkar 的算法预测为抗原性的肽序列；关于另一种分子的适配体；螯合基团，例如六组氨酰 (SEQ ID NO: 71)；介导进一步的特异性蛋白-蛋白相互作用的天然或天然衍生的蛋白结构，例如 fos/jun 对的成员；磁性基团，例如磁性铁基团；或放射性基团例如包含  $^1\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$  或  $^{125}\text{I}$  的基团或其任何组合；或通过共价或非共价高亲和力相互作用连接至基团进行标志的球聚体，所述基团促进失活、隔离、降解和 / 或沉淀，例如用促进体内降解的基团例如泛素进行标志，这种标志的寡聚物例如在体内装配；或通过上述的任何组合修饰的球聚体。此类标记和标志基团和用于将其结合至蛋白的方法是本领域已知的。标记和 / 或标志可以在球聚体化之前、过程中或之后进行。在本发明的另一个方面，球聚体衍生物是可通过标记和 / 或标志反应得自球聚体的分子。相应地，术语“ $\text{A}\beta$  (X-Y) 单体衍生物”在此处特别指如对于球聚体所述进行标记或标志的  $\text{A}\beta$  单体。

[0090] 在本发明的进一步方面，本文描述的结合蛋白以高亲和力与  $\text{A}\beta$  (20-42) 球聚体结合，例如具有至多约  $10^6 \text{ M}$ ；至多约  $10^7 \text{ M}$ ；至多约  $10^8 \text{ M}$ ；至多约  $10^9 \text{ M}$ ；至多约  $10^{10} \text{ M}$ ；至多约  $10^{11} \text{ M}$ ；至多约  $10^{12} \text{ M}$ ；和至多  $10^{13} \text{ M}$  的解离常数 ( $K_D$ )。在一个方面，如通过表面等离子体测量的，本文描述的结合蛋白与  $\text{A}\beta$  (20-42) 球聚体的结合速率常数 ( $k_{on}$ ) 选自：至少约  $10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ；至少约  $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ；至少约  $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ；至少约  $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ；和至少约  $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 。在另一个方面，如通过表面等离子体测量的，结合蛋白具有选自下述的与  $\text{A}\beta$  (20-42) 球聚体的解离速率常数 ( $k_{off}$ )：至多约  $10^3 \text{ s}^{-1}$ ；至多约  $10^4 \text{ s}^{-1}$ ；至多约  $10^5 \text{ s}^{-1}$ ；和至多约  $10^6 \text{ s}^{-1}$ 。

[0091] 在本发明的另一个方面，本文描述的结合蛋白与  $\text{A}\beta$  (20-42) 球聚体的结合亲和力大于与  $\text{A}\beta$  (1-42) 球聚体的结合亲和力。

[0092] 术语“更大的亲和力”在本文中一方面指未结合的  $\text{A}\beta$  结合蛋白和未结合的  $\text{A}\beta$  球聚体以及另一方面  $\text{A}\beta$  结合蛋白-球聚体复合物之间的平衡进一步有利于  $\text{A}\beta$  结合蛋白-球聚体复合物时的相互作用程度。同样地，术语“更小的亲和力”在此处指一方面未结合的  $\text{A}\beta$  结合蛋白和未结合的  $\text{A}\beta$  球聚体以及另一方面  $\text{A}\beta$  结合蛋白-球聚体复合物之间的平衡进一步有利于未结合的  $\text{A}\beta$  结合蛋白和未结合的  $\text{A}\beta$  球聚体时的相互作用程度。术语“更大的亲和力”与术语“更高的亲和力”是同义的，并且术语“更小的亲和力”与术语“更低的亲和力”是同义的。

[0093] 在本发明的相关方面，本文描述的结合蛋白与  $\text{A}\beta$  (20-42) 球聚体的结合亲和力是结合蛋白与  $\text{A}\beta$  (1-42) 球聚体的结合亲和力的至少 2 倍（例如至少 3 或至少 5 倍）、至少 10 倍（例如至少 20 倍、至少 30 倍或至少 50 倍）、至少 100 倍（例如至少 200 倍、至少 300 倍或至少 500 倍）和至少 1,000 倍（例如至少 2,000 倍、至少 3,000 倍或至少 5000 倍）、至少 10,000 倍（例如至少 20,000 倍、至少 30,000 倍或至少 50,000 倍）、或至少 100,000 倍高。

[0094] 在本发明的另一个方面，本文描述的结合蛋白与  $\text{A}\beta$  (20-42) 球聚体的结合亲和力大于与  $\text{A}\beta$  (12-42) 球聚体的结合亲和力。

[0095] 在本发明的相关方面,本文描述的结合蛋白与 A $\beta$  (20-42) 球聚体的结合亲和力是结合蛋白与 A $\beta$  (12-42) 球聚体的结合亲和力的至少 2 倍(例如至少 3 或至少 5 倍)、至少 10 倍(例如至少 20 倍、至少 30 倍或至少 50 倍)、至少 100 倍(例如至少 200 倍、至少 300 倍或至少 500 倍)和至少 1,000 倍(例如至少 2,000 倍、至少 3,000 倍或至少 5000 倍)、至少 10,000 倍(例如至少 20,000 倍、至少 30,000 倍或至少 50,000 倍)、或至少 100,000 倍高。

[0096] 根据一个特定实施方案,本发明因此涉及与 A $\beta$  (20-42) 球聚体具有的结合亲和力大于抗体与 A $\beta$  (1-40) 球聚体和 A $\beta$  (1-42) 球聚体的结合亲和力的结合蛋白。

[0097] 根据一个方面,本发明的 A $\beta$  结合蛋白与如上定义的至少一种 A $\beta$  球聚体结合,并且对于至少一种非球聚体形式的 A $\beta$  具有比较小的亲和力。对于至少一种非球聚体形式的 A $\beta$  具有比对于至少一种 A $\beta$  球聚体比较小的亲和力的本发明 A $\beta$  结合蛋白包括对于 A $\beta$  (20-42) 球聚体具有大于与 A $\beta$  (1-42) 单体的结合亲和力的 A $\beta$  结合蛋白。根据本发明的可替代或另外的方面, A $\beta$  结合蛋白与 A $\beta$  (20-42) 球聚体的结合亲和力大于与 A $\beta$  (1-40) 单体的亲和力。特别地, A $\beta$  结合蛋白与 A $\beta$  (20-42) 球聚体的亲和力大于其与 A $\beta$  (1-40) 和 A $\beta$  (1-42) 单体的亲和力。

[0098] 如本文使用的术语“A $\beta$  (X-Y) 单体”指分离形式的 A $\beta$  (X-Y) 肽,特别是基本上不参加与其他 A $\beta$  肽的非共价相互作用的 A $\beta$  (X-Y) 肽形式。实际上, A $\beta$  (X-Y) 单体通常以水溶液的形式提供。在本发明的特定实施方案中,单体水溶液含有 0.05% - 0.2%,例如约 0.1% NH<sub>4</sub>OH。在本发明的另一个特定实施方案中,单体水溶液含有 0.05% - 0.2%,例如约 0.1% NaOH。当使用时(例如用于测定本发明的 A $\beta$  结合蛋白的结合亲和力时),以合适方式稀释所述溶液可以是有利的。进一步地,在其制备后 2 小时内,特别是在 1 小时内且尤其是在 30 分钟内使用所述溶液通常是有利的。

[0099] 更具体而言,术语“A $\beta$  (1-40) 单体”在此处指如本文描述的 A $\beta$  (1-40) 单体制剂,并且术语“A $\beta$  (1-42) 单体”在此处指如本文描述的 A $\beta$  (1-42) 制剂。

[0100] 有利地,本发明的 A $\beta$  结合蛋白以低亲和力与一种或两种单体结合,例如具有  $1 \times 10^{-8}$  M 的  $K_D$  或更小的亲和力,例如具有  $3 \times 10^{-8}$  M 的  $K_D$  或更小的亲和力,具有  $1 \times 10^{-7}$  M 的  $K_D$  或更小的亲和力,例如具有  $3 \times 10^{-7}$  M 的  $K_D$  或更小的亲和力,或具有  $1 \times 10^{-6}$  M 的  $K_D$  或更小的亲和力,例如具有  $3 \times 10^{-5}$  M 的  $K_D$  或更小的亲和力,或具有  $1 \times 10^{-5}$  M 的  $K_D$  或更小的亲和力。

[0101] 根据本发明的一个方面,本发明的 A $\beta$  结合蛋白与 A $\beta$  (20-42) 球聚体的结合亲和力是 A $\beta$  结合蛋白与一种或两种单体的结合亲和力的至少 2 倍,例如至少 3 倍或至少 5 倍、至少 10 倍,例如至少 20 倍、至少 30 倍或至少 50 倍、至少 100 倍,例如至少 200 倍、至少 300 倍或至少 500 倍、至少 1,000 倍,例如至少 2,000 倍、至少 3,000 倍或至少 5,000 倍、至少 10,000 倍,例如至少 20,000 倍、至少 30,000 或至少 50,000 倍,或至少 100,000 倍高。

[0102] 对于至少一种非球聚体形式的 A $\beta$  具有比对于至少一种 A $\beta$  球聚体比较小的亲和力的本发明的 A $\beta$  结合蛋白进一步包括对于 A $\beta$  (20-42) 球聚体具有大于与 A $\beta$  (1-42) 纤维的结合亲和力的 A $\beta$  结合蛋白。根据本发明的可替代或另外的方面, A $\beta$  结合蛋白与 A $\beta$  (20-42) 球聚体的结合亲和力大于与 A $\beta$  (1-40) 纤维的亲和力。根据一个特定实施方案,本发明涉及与 A $\beta$  (20-42) 球聚体具有的结合亲和力大于其与 A $\beta$  (1-40) 和 A $\beta$  (1-42) 纤维的结合亲和力的 A $\beta$  结合蛋白。

[0103] 术语“纤丝”在本文中指包含非共价结合的个别 A $\beta$  (X-Y) 肽的装配的分子结构,其在电子显微镜中显示纤丝结构,其结合刚果红且随后在偏振光下显示出双折射,并且其 X 射线衍射图样是十字形  $\beta$  结构。在本发明的另一个方面,纤丝是可通过此类过程获得的分子结构,所述过程包含合适的 A $\beta$  肽在不存在去污剂的情况下例如在 0.1 M HCl 中自诱导的聚合聚集,导致超过 24 或超过 100 个单位的聚集物形成。这个过程是本领域众所周知的。有利地,A $\beta$  (X-Y) 纤丝以水溶液的形式使用。在本发明的特定实施方案中,纤丝水溶液通过下述进行制备:将 A $\beta$  肽溶解于 0.1% NH<sub>4</sub>OH 中,将其用 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 140 mM NaCl, pH 7.4 稀释 1:4, 随后将 pH 再调整至 7.4, 并且将溶液在 37°C 孵育 20 小时,随后以 10,000 g 离心 10 分钟,并且重悬浮于 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 140 mM NaCl, pH 7.4。术语“A $\beta$  (X-Y) 纤丝”在本文中还包括包含 A $\beta$  (X-Y) 亚单位的纤丝,其中例如平均至少 90% 的亚单位具有 A $\beta$  (X-Y) 类型,至少 98% 的亚单位具有 A $\beta$  (X-Y) 类型,或非 A $\beta$  (X-Y) 肽的含量低于检测阈值。更具体而言,术语“A $\beta$  (1-42) 纤丝”在本文中指如实施例 3 中所述的 A $\beta$  (1-42) 纤丝制剂。

[0104] 有利地,本发明的 A $\beta$  结合蛋白以低亲和力与一种或两种纤丝结合,例如具有  $1 \times 10^{-8}$  M 的 K<sub>d</sub> 或更小的亲和力,例如具有  $3 \times 10^{-8}$  M 的 K<sub>d</sub> 或更小的亲和力,具有  $1 \times 10^{-7}$  M 的 K<sub>d</sub> 或更小的亲和力,例如具有  $3 \times 10^{-7}$  M 的 K<sub>d</sub> 或更小的亲和力,或具有  $1 \times 10^{-6}$  M 的 K<sub>d</sub> 或更小的亲和力,例如具有  $3 \times 10^{-5}$  M 的 K<sub>d</sub> 或更小的亲和力,或具有  $1 \times 10^{-5}$  M 的 K<sub>d</sub> 或更小的亲和力。

[0105] 根据本发明的一个方面,本发明的 A $\beta$  结合蛋白与 A $\beta$  (20-42) 球聚体的结合亲和力是 A $\beta$  结合蛋白与一种或两种纤丝的结合亲和力的至少 2 倍,例如至少 3 倍或至少 5 倍、至少 10 倍,例如至少 20 倍、至少 30 倍或至少 50 倍、至少 100 倍,例如至少 200 倍、至少 300 倍或至少 500 倍、至少 1,000 倍,例如至少 2,000 倍、至少 3,000 倍或至少 5,000 倍、至少 10,000 倍,例如至少 20,000 倍、至少 30,000 或至少 50,000 倍,或至少 100,000 倍高。

[0106] 根据特定实施方案,本发明涉及对于单体和纤丝形式的 A $\beta$  具有对于至少一种 A $\beta$  球聚体特别是 A $\beta$  (20-42) 球聚体比较小的亲和力的 A $\beta$  结合蛋白。这些 A $\beta$  结合蛋白有时称为球聚体特异性 A $\beta$  结合蛋白。

[0107] 本发明的结合蛋白包括与例如竞争抗体例如 m266 和 3D6 相比较,占优势地识别 A $\beta$  (20-42) 球聚体形式而不是 A $\beta$  (1-40) 单体、A $\beta$  (1-42) 单体、A $\beta$  纤丝或 sAPP (即,不溶性 A $\beta$  前体) 的标准制剂的球聚体特异性结合蛋白。对于球聚体的此类特异性是重要的,因为用本发明的结合蛋白特异性靶向球聚体形式的 A $\beta$  将:1) 避免靶向不溶性淀粉样蛋白沉淀物,与该沉淀物的结合将解释在用不溶性 A $\beta$  的免疫接种过程中观察到的炎症副作用;2) 据报道具有识别前 (precognitive) 生理功能的多余 A $\beta$  单体和 APP (Plan 等人, J Neurosci 23 :5531-5535, 2003 ;和 3) 增加抗体的生物利用度,因为它通过与不溶性沉淀物的广泛结合将是不被遮蔽或无法接近的。

[0108] PF-4 是属于 CXC 趋化因子家族的小的、70 氨基酸细胞因子,并且也称为趋化因子 (C-X-C 基序) 配体 4 (CXCL4)。PF-4 在血小板聚集过程中从活化血小板的  $\alpha$ -颗粒中释放,并且通过调节肝素样分子的效应促进血液凝固。由于这些功能,预测它涉及伤口修复和炎症 (Eismann 等人, Blood 76 (2) :336 - 44, 1990)。PF-4 通常在具有蛋白聚糖的复合物中发现,并且可以与抗凝剂肝素形成复合物,其作为血栓形成的药理学治疗使用。它在肝素诱导的血小板减少症 (HIT) 中具有充分描述的病理学功能,所述 HIT 是对于抗凝剂肝素施用的特异性自身免疫反应 (Warkentin, N. Engl. J. Med. 356 (9) :891 - 3, 2007), 其中肝素:

PF4 复合物是抗原。PF4 自身抗体也已在患者中发现,所述患者具有血栓形成并且特征类似 HIT 但无肝素的先前施用 (Warkentin 等人, *Am. J. Med.* 121(7):632-6, 2008)。肝素诱导的血小板减少症的特征在于血小板减少症的发展(低血小板计数),并且另外 HIT 倾向于血栓形成。考虑到 PF-4 在病理过程中的这些功能和牵涉,可以得出结论施用显示与受试者中存在的 PF-4 的结合(例如交叉反应性)的结合蛋白(例如抗体)可以影响所述 PF-4 功能,且从而导致不良(副)作用。此类不良作用的程度和性质可以取决于参数而改变,例如在 PF-4 上的表位的定位和大小、各自的结合蛋白的结合强度和性质。

[0109] 根据本发明的一个方面,本发明的结合蛋白未显示与血小板因子 4(PF-4) 的结合或显示低结合。与 PF-4 的所述交叉反应可以通过使用标准化体外免疫测定例如 ELISA、斑点印迹或 BIAcore 分析进行评价。

[0110] 根据特定实施方案,本文定义的结合蛋白与 PF-4 的交叉反应指通过下述获得的关于所述结合蛋白和参考抗 PF-4 抗体的值的比:(i) 用约 1:3.16 到约 1:3160(最终血浆稀释度)的人或食蟹猴血浆的 ~1:3 稀释系列进行夹心 ELISA(例如如实施例 4.1 和 4.2 中所述),(ii) 针对对数转化的血浆稀释度(x 轴)标绘检测到的信号(y 轴),和(iii) 由在测量范围中(约 1:3.16 到约 1:3160 的最终血浆稀释度)的这些非曲线拟合的数据测定曲线下面积(AUC,或总峰面积)。根据本发明的特定实施方案,通过夹心 ELISA 测定与 PF-4 的交叉反应包括下述:特定量的在研究下的结合蛋白或参考抗 PF-4 抗体或方便地其合适稀释物,例如 100  $\mu$ l 溶于 100 mM 碳酸氢钠 pH 9.6 中的 10  $\mu$ g/ml 结合蛋白或抗体溶液用于包被蛋白吸收微量滴定板的孔;随后将板洗涤,封闭且再次洗涤;随后与约 1:3.16 到约 1:3160(最终血浆稀释度)的食蟹猴或人血浆,例如用人 PF-4 掺料的人血浆的 ~1:3 稀释系列接触,随后为例如借助于 PF-4 特异性一抗、酶缀合的二抗和比色反应,检测与每个孔结合的 PF-4。

[0111] 如本文使用的,“参考抗 PF-4 抗体”是与 PF-4 特别是人(HPF4) 特异性反应的抗体,特别是单克隆抗体。此类抗体可通过下述获得:提供包含人 PF-4 的抗原,例如具有氨基酸序列 EAEEDGDLQCLCVKTTTSQVRPRHITSLEVIKAGPHCPTAQLIATLKNRKKICLDLQAPLYKKI IKKLLLES (SEQ ID NO:70) 的人 PF-4,使抗体储库暴露于所述抗原且从所述抗原储库中选择与人 PF-4 特异性结合的抗体。抗体可以任选是使用免疫原(人 PF-4) 亲和力纯化的。此类参考抗 PF4 抗体是商购可得的,例如单克隆抗 HPF4 抗体,Abcam 目录号:ab49735。

[0112] 根据另一个特定实施方案,本文定义的结合蛋白与 PF-4 的交叉反应指通过下述获得的关于所述结合蛋白和参考抗 PF-4 抗体的 AUC 值的比:(i) 用人或食蟹猴血浆以及约 10 ng/ml 到约 10000 ng/ml(终浓度)的结合蛋白和参考抗 PF-4 抗体的 ~1:3 稀释系列进行比对夹心 ELISA(例如如实施例 4.3 和 4.4 中所述),(ii) 针对对数转化的结合蛋白或参考抗 PF-4 抗体浓度(x 轴)标绘检测到的信号(y 轴),和(iii) 由在测量范围中(约 10 ng/ml 到约 10000 ng/ml 的结合蛋白或参考抗 -PF-4 抗体浓度)的这些非曲线拟合的数据测定曲线下面积(AUC,或峰总面积)。根据本发明的特定实施方案,通过比对夹心 ELISA 测定与 PF-4 的交叉反应包括下述:用特定量的适合于捕获在研究下的结合蛋白和参考抗 PF-4 抗体的比对抗体,例如 100  $\mu$ l/ 孔的 50  $\mu$ g/ml Fc 特异性抗小鼠 IgG, Sigma 目录号:M3534 的 100 mM 碳酸氢钠 pH 9.6 溶液)包被蛋白吸收微量滴定板的孔;随后将板洗涤,封闭且再次洗涤;随后与约 10 ng/ml 到约 10000 ng/ml(终浓度)的在研究下的结合蛋白或参考抗

PF-4 抗体的 ~1:3 稀释系列接触 ;在另一个洗涤步骤后,使板与例如 1:10 稀释的人或食蟹猴血浆,例如用人 PF-4 掺料的人血浆接触,随后为例如借助于 PF-4 特异性一抗、酶缀合的二抗和比色反应,检测与板结合的 PF-4。

[0113] 根据本发明的一个方面,当如本文描述的经由夹心 ELISA 用食蟹猴血浆分析时,本发明的 4C9- 型结合蛋白如本文描述与 PF-4 的交叉反应小于参考抗 PF-4 抗体的相应交叉反应,例如小至少 2 倍、至少 5 倍、至少 10 倍、至少 15 倍、至少 20 倍、至少 30 倍或至少 40 倍 ;和 / 或当如本文描述的经由夹心 ELISA 用人血浆分析时,小于参考抗 PF-4 抗体的相应交叉反应,例如小至少 2 倍、至少 5 倍、至少 10 倍、至少 15 倍、至少 20 倍、至少 30 倍或至少 40 倍。

[0114] 根据本发明的一个进一步方面,当如本文描述的经由比对夹心 ELISA 用食蟹猴血浆分析时,本发明的 4C9- 型结合蛋白如本文描述与 PF-4 的交叉反应小于参考抗 PF-4 抗体的相应交叉反应,例如小至少 2 倍、至少 5 倍、至少 10 倍、至少 20 倍、至少 50 倍、至少 80 倍、至少 120 倍或至少 160 倍 ;和 / 或当如本文描述的经由比对夹心 ELISA 用人血浆分析时,小于参考抗 PF-4 抗体的相应交叉反应,例如小至少 2 倍、至少 10 倍、至少 50 倍、至少 100 倍或至少 200 倍。

[0115] 根据本发明的另一个方面,当如本文描述的经由夹心 ELISA 和比对夹心 ELISA 用食蟹猴血浆分析时,本发明的 4C9- 型结合蛋白如本文描述与 PF-4 的交叉反应小于参考抗 PF-4 抗体的相应交叉反应,例如小至少 2 倍、至少 5 倍、至少 10 倍、至少 15 倍、至少 20 倍、至少 30 倍或至少 40 倍。

[0116] 根据本发明的另一个方面,当如本文描述的经由夹心 ELISA 和比对夹心 ELISA 用人血浆分析时,本发明的 4C9- 型结合蛋白如本文描述与 PF-4 的交叉反应小于参考抗 PF-4 抗体的相应交叉反应,例如小至少 2 倍、至少 5 倍、至少 10 倍、至少 15 倍、至少 20 倍、至少 30 倍或至少 40 倍。

[0117] 根据本发明的另一个方面,当如本文描述的经由夹心 ELISA 和比对夹心 ELISA 用食蟹猴和人血浆分析时,本发明的 4C9- 型结合蛋白如本文描述与 PF-4 的交叉反应小于参考抗 PF-4 抗体的相应交叉反应,例如小至少 2 倍、至少 5 倍、至少 10 倍、至少 15 倍、至少 20 倍、至少 30 倍或至少 40 倍。

[0118] 根据本发明的一个方面,当如本文描述的经由夹心 ELISA 用食蟹猴血浆分析时,本发明的 10B3- 型结合蛋白如本文描述与 PF-4 的交叉反应小于参考抗 PF-4 抗体的相应交叉反应,例如小至少 2 倍、至少 5 倍、至少 10 倍、至少 15 倍、至少 20 倍或至少 25 倍 ;和 / 或当经由夹心 ELISA 用人血浆分析时,小于参考抗 PF-4 抗体的相应交叉反应,例如小至少 2 倍、至少 5 倍、至少 15 倍、至少 20 倍或至少 25 倍。

[0119] 根据本发明的一个进一步方面,当如本文描述的经由比对夹心 ELISA 用食蟹猴血浆分析时,本发明的 10B3- 型结合蛋白如本文描述与 PF-4 的交叉反应小于参考抗 PF-4 抗体的相应交叉反应,例如小至少 2 倍、至少 4 倍、至少 6 倍、至少 8 倍、至少 10 倍、至少 20 倍、至少 40 倍或至少 80 倍 ;和 / 或当如本文描述的经由比对夹心 ELISA 用人血浆分析时,小于参考抗 PF-4 抗体的相应交叉反应,例如小至少 2 倍、至少 10 倍、至少 20 倍、至少 40 倍或至少 70 倍。

[0120] 根据本发明的另一个方面,当如本文描述的经由夹心 ELISA 和比对夹心 ELISA 用

食蟹猴血浆分析时,本发明的 10B3- 型结合蛋白如本文描述与 PF-4 的交叉反应小于参考抗 PF-4 抗体的相应交叉反应,例如小至少 2 倍、至少 4 倍、至少 5 倍、至少 6 倍、至少 8 倍或至少 10 倍。

[0121] 根据本发明的另一个方面,当如本文描述的经由夹心 ELISA 和比对夹心 ELISA 用人血浆分析时,本发明的 10B3- 型结合蛋白如本文描述与 PF-4 的交叉反应小于参考抗 PF-4 抗体的相应交叉反应,例如小至少 2 倍、至少 5 倍、至少 10 倍、至少 15 倍、至少 20 倍或至少 25 倍。

[0122] 根据本发明的另一个方面,当如本文描述的经由夹心 ELISA 和比对夹心 ELISA 用食蟹猴和人血浆分析时,本发明的 10B3- 型结合蛋白如本文描述与 PF-4 的交叉反应小于参考抗 PF-4 抗体的相应交叉反应,例如小至少 2 倍、至少 4 倍、至少 5 倍、至少 6 倍、至少 8 倍或至少 10 倍。

[0123] 如本文使用的术语“多肽”指氨基酸的任何聚合链。术语“肽”和“蛋白”与术语多肽可互换使用,并且也指氨基酸的聚合链。术语“多肽”包含天然或人工蛋白、蛋白片段和蛋白序列的多肽类似物。多肽可以是单体或聚合的。

[0124] 术语“分离的蛋白”或“分离的多肽”是此类蛋白或多肽,由于其起源或衍生来源,不与在其自然状态伴随其的天然结合的组分结合;基本上不含来自相同物种的其他蛋白;通过来自不同物种的细胞表达;或在自然界中不出现。因此,化学合成或在不同于它天然源于其的细胞的细胞系统中合成的多肽是与其天然结合的组分“分离的”。蛋白还可以使用本领域众所周知的蛋白纯化技术,通过分离致使基本上不含天然结合的组分。

[0125] 如本文使用的,术语“回收”指例如使用本领域众所周知的蛋白纯化技术,通过分离致使化学种类例如多肽基本上不含天然结合的组分的过程。

[0126] 如本文使用的,提及抗体、蛋白或肽与第二种化学种类的相互作用中的术语“特异性结合”意指该相互作用取决于在化学种类上特定结构(例如抗原决定簇或表位)的存在;例如抗体识别且结合特异性蛋白结构而不是一般的蛋白。如果抗体对于表位“A”是特异性的,那么在含有标记的“A”和抗体的反应中含有表位 A(或游离的、未标记的 A)的分子的存在将减少与抗体结合的标记的 A 的量。

[0127] 如本文使用的,术语“抗体”泛指由四条多肽链(两条重(H)链和两条轻(L)链)组成的任何免疫球蛋白(Ig)分子,或其任何功能片段、突变体、变体或衍生物,其保留 Ig 分子的基本表位结合特征。此类功能片段、突变体、变体或衍生抗体形式是本领域已知的。其非限制性实施方案在下文讨论。如本文使用的,“全长抗体”指包含四条多肽链(两条重链和两条轻链)的 Ig 分子。链通常经由二硫键彼此连接。每条重链包含重链可变区(在本文中缩写为 HCVR 或 VH)和重链恒定区。重链恒定区包含三个结构域:CH1、CH2 和 CH3。每条轻链包含轻链可变区(在本文中缩写为 LCVR 或 VL)和轻链恒定区。轻链恒定区包含一个结构域:CL。VH 和 VL 区可以进一步再分成称为互补性决定区(CDR)的高变区,由称为构架区(FR)的更保守区域点缀。每个 VH 和 VL 由三个 CDRs 和四个 FRs 组成,从氨基末端到羧基末端以下述次序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。免疫球蛋白分子可以具有任何类型(例如 IgG、IgE、IgM、IgD、IgA 和 IgY)、类别(例如 IgG 1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2)或亚类。

[0128] 如本文使用的,术语抗体的“抗原结合部分”(或简单地“抗体部分”)、抗体的“抗

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

[0129] 如本文使用的,术语“抗体”还包含抗体构建体。如本文使用的术语“抗体构建体”指包含与接头多肽或免疫球蛋白恒定结构域连接的本发明的一个或多个抗原结合部分。接头多肽包含通过肽键连接的两个或更多个氨基酸残基,并且用于连接一个或多个抗原结合部分。此类接头多肽是本领域众所周知的(参见例如,Holliger等人,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448,1993;Poljak等人,Structure 2:1121-1123,1994)。

[0130] 免疫球蛋白恒定结构域指重或轻链恒定结构域。人IgG重链和轻链恒定结构域氨基酸序列是本领域已知的并且在表1中表示。

[0131] 表1:人IgG重链恒定结构域和轻链恒定结构域的序列

蛋白	序列标识符	序列
		123456789012345678901234567890
IgY-1 恒定区	SEQ ID NO:41	ASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
IgY-1 恒定区 突变体	SEQ ID NO:42	ASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Ig X 恒定区	SEQ ID NO:43	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
Ig A 恒定区	SEQ ID NO:44	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLIS DFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQ SNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTH EGSTVEKTVAPTECS

[0132] 再进一步地,本发明的结合蛋白(例如抗体)可以通过本发明的结合蛋白与一种或多种其他蛋白或肽的共价或非共价结合形成的较大免疫粘附分子的部分。此类免疫粘附分子的例子包括链霉抗生物素蛋白核心区的使用,以制备四聚 scFv 分子(Kipriyanov 等人, Human Antibodies and Hybridomas 6 :93-101, 1995),以及半胱氨酸残基、标记肽和 C 末端多组氨酸标签的使用,以制备二价和生物素化的 scFv 分子(Kipriyanov 等人, Mol.



Immunol. 31:1047-1058, 1994)。抗体部分例如 Fab 和 F(ab')<sub>2</sub> 片段可以使用常规技术由完整抗体制备, 例如完整抗体分别的木瓜蛋白酶或胃蛋白酶消化。此外, 抗体、抗体部分和免疫粘附分子可以如本文描述的使用标准重组 DNA 技术获得。

[0133] 如本文使用的, “分离抗体” 意指基本上不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体。然而, 特异性结合 A $\beta$  (20-42) 球聚体的分离抗体可以具有与其他抗原例如 A $\beta$  球聚体例如 A $\beta$  (12-42) 球聚体或其他 A $\beta$  形式的交叉反应性。此外, 分离抗体可以基本上不含其他细胞材料和 / 或化学制品和 / 或任何其他靶向 A $\beta$  形式。

[0134] 本发明的分离的抗体包括单克隆抗体。如本文使用的, “单克隆抗体” 意指抗体分子的制备物, 与含有不同氨基酸序列的抗体混合物的 “多克隆” 抗体制备物相比, 所述抗体享有共同的重链和共同的轻链氨基酸序列。单克隆抗体可以通过几种新技术, 如噬菌体、细菌、酵母或核糖体展示, 以及通过由源自杂交瘤的抗体 (例如由通过杂交瘤技术, 如标准的 Kohler 和 Milstein 杂交瘤方法 ((1975) Nature 256:495-497) 制备的杂交瘤分泌的抗体) 所例证的经典方法来生成。因此, 具有相同序列的非源自杂交瘤的抗体在本文仍然称为单克隆抗体, 尽管它可能已通过非经典方法获得, 术语 “单克隆” 不限于源自杂交瘤的抗体, 但用来指所有源自一种核酸克隆的抗体。

[0135] 因此, 本发明的单克隆抗体包括重组抗体。术语 “重组” 在本文中是指例如通过化学合成或通过基因工程技术操作分离的核酸区段的两个否则分离的序列区段的任何人工组合。具体而言, 术语 “重组抗体” 是指通过重组方法生产、表达、生成或分离的抗体, 如使用转染进宿主细胞中的重组表达载体表达的抗体; 从重组组合抗体文库分离的抗体; 从由于人免疫球蛋白基因导致的转基因动物 (例如小鼠) 中分离的抗体 (参见, 例如, Taylor, L. D., 等人. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295); 或以任何其他方式 (其中将特定免疫球蛋白基因序列 (如人免疫球蛋白基因序列) 与其他 DNA 序列装配在一起) 生产、表达、生成或分离的抗体。重组抗体包括, 例如, 嵌合抗体, CDR 嫁接抗体和人源化抗体。本领域技术人员将意识到, 常规源自杂交瘤的单克隆抗体在异源系统中的表达将需要生成重组抗体, 即使获得的抗体蛋白的氨基酸序列没有改变或没有意欲改变。

[0136] 如本文使用的, 术语 “鼠抗体” 预期包括具有衍生自鼠种系免疫球蛋白序列的可变和恒定区的抗体。本发明的鼠抗体可以包括例如在 CDRs 且特别是 CDR3 中, 不由鼠种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基 (例如, 在体外通过随机或定点诱变或在体内通过体细胞突变引入的突变)。

[0137] 如本文使用的, 术语 “人抗体” 预期包括具有衍生自人种系免疫球蛋白序列的可变和恒定区的抗体。本发明的人抗体可以包括例如在 CDRs 且特别是 CDR3 中, 不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基 (例如, 在体外通过随机或定点诱变或在体内通过体细胞突变引入的突变)。然而, 如本文使用的, 术语 “人抗体” 不预期包括其中衍生自另一个哺乳动物物种例如小鼠的种系的 CDR 序列已嫁接到人构架序列上的抗体。

[0138] 如本文使用的, 术语 “重组人抗体” 预期包括通过重组方法制备、表达、产生或分离的所有人抗体, 例如使用转染到宿主细胞内的重组表达载体表达的抗体 (在下文章节 B 中进一步描述), 从重组、组合人抗体文库中分离的抗体 (Hoogenboom, TIB Tech. 15: 62-70, 1997; Azzazy 和 Highsmith, Clin. Biochem. 35:425-445, 2002; Gavalondo J. V. 和 Larrick J. W. (2002) BioTechniques 29:128-145; Hoogenboom H. 和 Chames P. (2000)

Immunology Today 21:371-378), 从对于人免疫球蛋白基因是转基因的动物 (例如小鼠) 中分离的抗体 (参见例如 Taylor, L. D. 等人 (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295; Kellermann S-A. 和 Green L.L. (2002) Current Opinion in Biotechnology 13:593-597; Little M. 等人 (2000) Immunology Today 21:364-370), 或通过涉及使人免疫球蛋白基因序列与其他 DNA 序列剪接的任何其他方法制备、表达、产生或分离的抗体。此类重组人抗体具有衍生自人种系免疫球蛋白序列的可变和恒定区。然而, 在某些实施方案中, 对此类重组人抗体实施体外诱变 (或, 当使用对于人 Ig 序列转基因的动物时, 体内体细胞诱变), 且因此重组抗体的 VH 和 VL 区的氨基酸序列是此类序列, 其尽管衍生自人种系 VH 和 VL 序列且与人种系 VH 和 VL 序列相关, 但可能在体内的人抗体种系谱内并非天然存在。

[0139] 术语“嵌合抗体”指包含来自一个物种的重和轻链可变区序列以及来自另一个物种的恒定区序列的抗体, 例如具有与人恒定区连接的鼠重和轻链可变区的抗体。

[0140] 术语“CDR 嫁接的抗体”指包含来自一个物种的重和轻链可变区序列的抗体, 但其中 VH 和 / 或 VL 的一个或多个 CDR 区域的序列用另一个物种的 CDR 序列替换, 例如具有鼠 CDRs (例如 CDR3) 的抗体, 其中一个或多个鼠可变重和轻链区已用人可变重和轻链序列替换。

[0141] 术语“Kabat 编号”、“Kabat 定义”和“Kabat 标记”在本文中可互换使用。本领域公认的这些术语指氨基酸残基编号系统, 所述氨基酸残基比抗体或其抗原结合部分的重和轻链可变区中的其他氨基酸残基更可变 (即高变) (Kabat 等人 (1971) Ann. NY Acad. Sci. 190:382-391 和 Kabat, E. A. 等人 (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, U. S. Department of Health and Human Services, NIH 公开号 91-3242)。对于重链可变区, 高变区对于 CDR1 为氨基酸位置 31 - 35, 对于 CDR2 为氨基酸位置 50 - 65, 且对于 CDR3 为氨基酸位置 95 - 102。对于轻链可变区, 高变区对于 CDR1 为氨基酸位置 24 - 34, 对于 CDR2 为氨基酸位置 50 - 56, 且对于 CDR3 为氨基酸位置 89 - 97。

[0142] 如本文使用的, 术语“受体 (acceptor)”和“受体抗体”指提供或编码一个或多个构架区的至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 98% 或 100% 氨基酸序列的抗体或核酸序列。在一些实施方案中, 术语“受体”指提供或编码一个或多个恒定区的抗体氨基酸或核酸序列。在另外一个实施方案中, 术语“受体”指提供或编码一个或多个构架区和一个或多个恒定区的抗体氨基酸或核酸序列。在特定实施方案中, 术语“受体”指提供或编码一个或多个构架区的至少 80%, 例如至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 98% 或 100% 氨基酸序列的人抗体氨基酸或核酸序列。根据这个实施方案, 受体可以含有至少 1、至少 2、至少 3、至少 4、至少 5 或至少 10 个氨基酸残基, 其在人抗体的一个或多个特异性位置上不出现。受体构架区和 / 或一个或多个受体恒定区可以例如衍生自或得自种系抗体基因、成熟抗体基因、功能抗体 (例如本领域众所周知的抗体、在开发中的抗体或商购可得的抗体)。

[0143] 如本文使用的, 术语“CDR”指在抗体可变序列内的互补性决定区。在重链和轻链的每个可变区中存在三个 CDRs, 所述 CDRs 对于每个可变区命名为 CDR1、CDR2 和 CDR3。如本文使用的, 术语“CDR 组”指在能够结合抗原的单一可变区中出现的三个 CDRs 的组。这些 CDRs 的确切边界已根据不同系统不同地限定。由 Kabat (Kabat 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987)

和 (1991)) 描述的系统, 不仅提供了可应用于抗体的任何可变区的明确残基编号系统, 还提供了限定三个 CDRs 的精确残基边界。这些 CDRs 可以被称为 Kabat CDRs。Chothia 和同事 (Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917(1987) 和 Chothia 等人, *Nature* 342:877-883(1989)) 发现 Kabat CDRs 内的某些亚部分采取几乎相同的肽主链构象, 尽管在氨基酸序列水平上具有大的多样性。这些亚部分命名为 L1、L2 和 L3 或 H1、H2 和 H3, 其中“L”和“H”分别指轻链和重链区域。这些区域可以被称为 Chothia CDRs, 所述 Chothia CDRs 具有与 Kabat CDRs 重叠的边界。与 Kabat CDRs 重叠的限定 CDRs 的其他边界已由 Padlan (*FASEB J.* 9:133-139(1995)) 和 MacCallum (*J Mol Biol* 262(5):732-45(1996)) 描述。再其他的 CDR 边界定义可能不严格地遵循上述系统之一, 但仍将与 Kabat CDRs 重叠, 尽管按照特定残基或残基组或甚至整个 CDRs 并不显著影响抗原结合的预测或实验发现, 它们可以缩短或加长。本文使用的方法可以利用根据这些系统中的任何一种限定的 CDRs, 特定实施方案使用 Kabat 或 Chothia 限定的 CDRs。

[0144] 如本文使用的, 术语“规范”残基指在 CDR 或构架中限定特定规范 CDR 结构的残基, 如通过 Chothia 等人 (*J. Mol. Biol.* 196:901-907(1987); Chothia 等人, *J. Mol. Biol.* 227:799(1992), 两者都通过引用并入本文) 限定的。根据 Chothia 等人, 许多抗体的 CDRs 的关键部分具有几乎相同的肽主链构象, 尽管在氨基酸序列水平上的极大多样性。每个规范结构主要为形成环的氨基酸残基的邻接区段限定了一组肽主链扭转角。

[0145] 如本文使用的, 术语“供体”和“供体抗体”指提供一个或多个 CDRs 的抗体。在一个实施方案中, 供体抗体是来自与由其获得或衍生构架区的抗体不同的物种的抗体。在人源化抗体的背景中, 术语“供体抗体”指提供一个或多个 CDRs 的非人抗体。

[0146] 如本文使用的, 术语“构架”或“构架序列”指减去 CDRs 的可变区的剩余序列。因为 CDR 序列的确切定义可以由不同系统来决定, 所以对构架序列的含义进行相应不同的解释。六个 CDRs (轻链的 CDR-L1、-L2 和 -L3, 以及重链的 CDR-H1、-H2 和 -H3) 也将轻链和重链上的构架区分成在每条链上的四个亚区 (FR1、FR2、FR3 和 FR4), 其中 CDR1 位于 FR1 和 FR2 之间, CDR2 位于 FR2 和 FR3 之间, 且 CDR3 位于 FR3 和 FR4 之间。不将特定亚区指定为 FR1、FR2、FR3 或 FR4, 如其他人提及的, 构架区代表单条天然存在的免疫球蛋白链可变区内的组合 FR's。如本文使用的, FR 代表四个亚区之一, 且 FRs 代表构成构架区的四个亚区中的两个或更多。

[0147] 人重链和轻链受体序列是本领域已知的。在本发明的一个实施方案中, 人重链和轻链受体序列选自与表 2A 和表 2B 中所述的序列至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或至少相同的序列。

[0148] 表 2A: 对于 4C9- 型的重链和轻链受体序列

SEQ ID NO	蛋白区域	序列
		123456789012345678901234567890
50	VH1_69/JH4 FR1	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFS
51	VH1_69/JH4 FR2	WVRQAPGQGLEWMG
52	VH1_69/JH4 FR3	RVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYC AR
53	VH1_69/JH4 FR4	WGQGTLVTVSS
54	VH7_4.1/JH4 FR1	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFT
55	VH7_4.1/JH4 FR2	WVRQAPGQGLEWMG
56	VH7_4.1/JH4 FR3	RFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDVAVYYC AR
57	VH7_4.1/JH4 FR4	WGQGTLVTVSS
58	I-16/L1/JK2 FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC
59	I-16/L1/JK2 FR2	WFQQKPGKAPKSLIY
60	I-16/L1/JK2 FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY YC
61	I-16/L1/JK2 FR4	FGQGTKLEIK

[0149] 表 2B: 对于 10B3- 型的重链和轻链受体序列

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

[0150] 如本文使用的,术语“种系抗体基因”或“基因片段”指由非淋巴样细胞编码的免疫球蛋白序列,所述非淋巴样细胞尚未经历成熟过程,所述成熟过程导致用于表达特定免疫球蛋白的遗传重排和突变(参见例如,Shapiro 等人, Crit. Rev. Immunol. 22(3): 183-200(2002); Marchalonis 等人, Adv Exp Med Biol. 484:13-30(2001))。由本发明的各种实施方案提供的优点之一源于下述认识:种系抗体基因比成熟抗体基因更可能保存物种中个体特有的基本氨基酸序列结构,因此当在那个物种中治疗上使用,被识别为来自外来来源的可能性更低。

[0151] 如本文使用的,术语“关键”残基指在可变区内对抗体特别是人源化抗体的结合特异性和/或亲和力具有更多影响的某些残基。关键残基包括但不限于下述中的一个或多个:与 CDR 接近的残基、潜在糖基化位点(可以是 N 或 O-糖基化位点)、稀有残基、能够与抗原相互作用的残基、能够与 CDR 相互作用的残基、规范残基、在重链可变区和轻链可变区之间的接触残基、在 Vernier 区内的残基、和在可变重链 CDR1 的 Chothia 定义和第一个重链构架的 Kabat 定义之间重叠的区域中的残基。

[0152] 如本文使用的,术语“人源化抗体”是抗体或其变体、衍生物、类似物或部分,其与目的抗原免疫特异性结合,且包含基本上具有人抗体的氨基酸序列的构架(FR)区、和基本

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

[0153] 人源化抗体可以选自任何种类的免疫球蛋白,包括 IgM、IgG、IgD、IgA 和 IgE,和任何同种型,包括但不限于 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4。人源化抗体可以包括来自超过一个种类或同种型的序列,并且可以使用本领域众所周知的技术选择特定恒定结构域,以最佳化所需效应子功能。

[0154] 人源化抗体的构架和 CDR 区无需精确对应于亲本序列,例如供体抗体 CDR,或共有构架可以通过至少一个氨基酸残基的取代、插入和 / 或缺失进行诱变,从而使得在那个位点上的 CDR 或构架残基不对应于供体抗体或共有构架。然而,在一个实施方案中,此类突变将不是广泛的。通常,至少 90%、至少 95%、至少 98% 或至少 99% 的人源化抗体残基将对应于亲本 FR 和 CDR 序列的那些。如本文使用的,术语“共有构架”指在共有免疫球蛋白序列中的构架区。如本文使用的,术语“共有免疫球蛋白序列”指由相关免疫球蛋白序列家族中最频繁出现的氨基酸(或核苷酸)形成的序列(参见例如,Winnaker, From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, 德国 1987))。在免疫球蛋白家族中,共有序列中的每个位置由家族中在那个位置上最频繁出现的氨基酸占据。如果两个氨基酸同样频繁出现,那么任一个可以包括在共有序列中。

[0155] 如本文使用的,“Vernier”区指可以调整 CDR 结构且精调与抗原的配合 (fit) 的构架残基的亚群,如通过 Foote 和 Winter 描述的 (1992, J. Mol. Biol. 224:487-499, 其通过引用并入本文)。Vernier 区残基形成 CDRs 基础层,并且可以影响 CDRs 的结构和抗体的亲和力。

[0156] 如本文使用的,术语“抗体”还包含多价结合蛋白。术语“多价结合蛋白”在本说明书中用于指示包含两个或更多抗原结合位点的结合蛋白。多价结合蛋白经工程改造为具有三个或更多抗原结合位点,且一般不是天然存在的抗体。术语“多特异性结合蛋白”指能够结合两种或更多相关或无关靶的结合蛋白。如本文使用的双重可变结构域 (DVD) 结合蛋白是此类结合蛋白,其包含两个或更多抗原结合位点,且是四价或多价结合蛋白。此类 DVDs 可以是单特异性的,即能够结合一种抗原,或多特异性的,即能够结合两种或更多抗原。包含两条重链 DVD 多肽和两条轻链 DVD 多肽的 DVD 结合蛋白称为 DVD-Ig。每一半 DVD-Ig 包含重链 DVD 多肽,和轻链 DVD 多肽,和两个抗原结合位点。每个结合位点包含重链可变结构域和轻链可变结构域,其中每个抗原结合位点总共 6 个与抗原结合有关的 CDRs。DVD 结合蛋白和制备 DVD 结合蛋白的方法公开于美国专利申请号 11/507,050 中且通过引用并入本文。

[0157] 术语“表位”包括能够与免疫球蛋白或 T 细胞受体特异性结合的任何多肽决定簇。在某些实施方案中,表位决定簇包括分子例如氨基酸、糖侧链、磷酸基、或磺酰基的化学活性表面定组 (grouping),且在某些实施方案中,可以具有特定三维结构特征、和 / 或特定电荷特征。表位是由结合蛋白特别是抗体结合的抗原区域。在某些实施方案中,当结合蛋白或抗体在蛋白和 / 或大分子复杂混合物中优先识别其靶抗原时,其被说成特异性结合抗原。

[0158] 本发明的抗体的结合亲和力可以通过使用标准化体外免疫测定进行评估,例如 ELISA、斑点印迹或 BIAcore 分析 (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, NJ)。关于进一步描述,参见 Jönsson, U., 等人 (1993) Ann. Biol. Clin. 51:19-26 ; Jönsson, U., 等人 (1991) Biotechniques 11:620-627 ; Johnson, B., 等人 (1995) J. Mol. Recognit. 8:125-131 ; 和 Johnson, B., 等人 (1991) Anal. Biochem. 198:268-277。

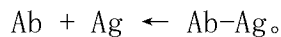
[0159] 根据一个特定实施方案,本文定义的亲和力指通过进行斑点印迹且通过密度测定法评估其而获得的值。根据本发明的一个特定实施方案,通过斑点印迹测定结合亲和力包括下述:将特定量的抗原(例如如上定义的 A $\beta$  (X-Y) 球聚体、A $\beta$  (X-Y) 单体或 A $\beta$  (X-Y) 纤丝),或方便地,其例如在 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、140 mM NaCl、pH 7.4、0.2 mg/ml BSA 中至例如 100 pmol/ $\mu$ l、10 pmol/ $\mu$ l、1 pmol/ $\mu$ l、0.1 pmol/ $\mu$ l 和 0.01 pmol/ $\mu$ l 的抗原浓度的合适稀释物,点在硝酸纤维素膜上,随后用乳封闭膜以阻止非特异性结合,并且洗涤,随后与目的抗体接触,随后借助于酶缀合的二抗和比色反应检测后者;在限定抗原浓度下,结合的抗体量允许亲和力测定。因此,2 种不同抗体与 1 种靶或 1 种抗体与 2 种不同靶的相对亲和力,在此处定义为在其他方面相同的斑点印迹条件下用 2 种抗体-靶组合观察到的靶结合抗体的分别量的关系。与基于蛋白印迹的相似方法不同,斑点印迹方法将测定在给定靶的天然构型中抗体对于给定靶的亲和力;与 ELISA 方法不同,斑点印迹方法不具有在不同靶和基质之间的亲和力中的差异,从而允许在不同靶之间的更精确比较。

[0160] 如本文使用的,术语“表面等离子共振”指通过检测生物传感器基质内的蛋白浓度改变,例如使用 BIAcore 系统 (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, 瑞典和 Piscataway, NJ),允许分析实时生物特异性相互作用的光学现象。关于进一步的描述,参见 Jönsson, U., 等人 (1993) Ann. Biol. Clin. , 51 : 19-26 ; Jönsson 等人, (1991) BioTechniques, 11 : 620-627 ; Johnson 等人, (1995) J. Mol. Recognit. , 8 : 125-131 ; 和 Johnson 等人 (1991) Anal. Biochem. , 198 : 268-277。

[0161] 如本领域已知的,如本文使用的术语“k<sub>on</sub>”(同样地,“Kon”、“kon”、“K<sub>on</sub>”)意指结合蛋白(例如抗体)与抗原结合以形成结合复合物例如抗体/抗原复合物的结合速率常数。也将“k<sub>on</sub>”称为术语“结合速率常数”或“ka”,如此处可互换使用的。该值指示结合蛋白(例如抗体)与其靶抗原的结合速率、或结合蛋白(例如抗体)与抗原之间的复合物形成速率,如由下列等式表示:



[0162] 如本领域已知的,如本文使用的术语“k<sub>off</sub>”(同样地,“Koff”、“koff”、“K<sub>off</sub>”)意指结合蛋白(例如抗体)从结合复合物(例如抗体/抗原复合物)中解离的解离速率常数或“解离速率常数”。该值指示结合蛋白(例如抗体)从其靶抗原的解离速率、或 Ab-Ag 复合物随时间过去分离为游离抗体和抗原的解离速率,其表示为下列等式:



[0163] 如本文使用的术语“ $K_D$ ”（同样地，“ $K_d$ ”或“ $KD$ ”）意指“平衡解离常数”，并指在滴定测量中在平衡时、或者通过将解离速率常数 ( $k_{off}$ ) 除以结合速率常数 ( $k_{on}$ ) 所获得的值。使用结合速率常数 ( $k_{on}$ )、解离速率常数 ( $k_{off}$ ) 和平衡解离常数 ( $K_D$ ) 表示结合蛋白（例如抗体）对抗原的结合亲和力。确定结合和解离速率常数的方法是本领域众所周知的。使用基于荧光的技术提供了高灵敏度以及在生理缓冲液中在平衡时检查样品的能力。可以使用其他实验方法和仪器例如 BIAcore®（生物分子相互作用分析）测定（例如，可以从 BIAcore International AB, a GE Healthcare company, Uppsala, 瑞典获得的仪器）。另外，也可以使用可以从 Sapidyne Instruments (Boise, Idaho) 获得的 KinExA®（动态排阻测定 (Kinetic Exclusion Assay)）测定。

[0164] 如本文使用的术语“标记的结合蛋白”指具有标记掺入的结合蛋白，所述标记为结合蛋白提供鉴定。同样地，如本文使用的术语“标记的抗体”指具有标记掺入的抗体，所述标记为抗体提供鉴定。在一个方面，标记是可检测标记，例如，掺入放射性标记的氨基酸或使生物素化 (biotinyl) 部分与多肽结合，所述生物素化部分可以通过标记的抗生物素蛋白（例如包含可以通过光学或比色法检测的荧光标记或酶促活性的链霉抗生物素蛋白）进行检测。关于多肽的标记例子包括但不限于下述：放射性同位素或放射性核素（例如， $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{99}\text{Tc}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{166}\text{Ho}$  或  $^{153}\text{Sm}$ ）；荧光标记（例如，FITC、罗丹明、镧系磷光体）；酶促标记（例如，辣根过氧化物酶、萤光素酶、碱性磷酸酶）；化学发光标记；生物素化基团；由次级报道分子识别的预定多肽表位（例如，亮氨酸拉链对序列、关于二抗的结合位点、金属结合结构域、表位标签）；和磁性试剂例如钆螯合物。

[0165] 如本文使用的，术语“抗体”还包含抗体缀合物。术语“抗体缀合物”指与第二种化学部分例如治疗剂化学连接的结合蛋白例如抗体。

[0166] 术语“治疗剂”在本文中用于指示化学化合物、化学化合物的混合物、生物大分子、或由其为“认知增强药物”的生物学材料制备的提取物，所述认知增强药物是改善受损的人脑认知能力（即思考、学习和记忆）的药物。认知增强药物通过改变神经化学物质（例如神经递质、酶和激素）的可用度、改善供氧、刺激神经生长或抑制神经损害来起作用。认知增强药物的例子包括增加乙酰胆碱的活性的化合物，例如但不限于乙酰胆碱受体激动剂（例如烟碱  $\alpha$ -7 受体激动剂或变构调节剂、 $\alpha$ 4 $\beta$ 2 烟碱受体激动剂或变构调节剂）、乙酰胆碱酯酶抑制剂（例如多奈哌齐、利斯的明和加兰他敏）、丁酰胆碱酯酶抑制剂、N-甲基-D-天冬氨酸 (NMDA) 受体拮抗剂（例如美金刚）、活性依赖性神经保护蛋白 (ADNP) 激动剂、血清素 5-HT<sub>1A</sub> 受体激动剂（例如扎利罗登）、5-HT<sub>4</sub> 受体激动剂、5-HT<sub>6</sub> 受体拮抗剂、血清素 1A 受体拮抗剂、组胺 H<sub>3</sub> 受体拮抗剂、钙蛋白酶抑制剂、血管内皮生长因子 (VEGF) 蛋白或激动剂、营养生长因子、抗细胞凋亡化合物、AMPA 型谷氨酸受体激活物、L 型或 N 型钙通道阻滞剂或调节剂、钾通道阻滞剂、缺氧诱导因子 (HIF) 激活物、HIF 脯氨酰 4-羟化酶抑制剂、抗炎剂、淀粉样蛋白 A $\beta$  肽或淀粉样蛋白斑的抑制剂、 $\tau$  高磷酸化抑制剂、磷酸二酯酶 5 抑制剂（例如他达拉非、西地那非）、磷酸二酯酶 4 抑制剂、单胺氧化酶抑制剂或其药学可接受的盐。此类认知增强药物的具体例子包括但不限于胆碱酯酶抑制剂例如多奈哌齐 (Aricept®)、利斯的明 (Exelon®)、加兰他敏 (Reminyl®)、N-甲基-D-天冬氨酸拮抗剂例如美金刚 (Namenda®)。

[0167] 如本文使用的，术语“晶体”和“结晶的”指以晶体形式存在的结合蛋白（例如抗

体或其抗原结合部分)。晶体是物质固态的一种形式,它不同于其他形式例如无定形固态或液晶态。晶体由规则、重复、三维排列的原子、离子、分子(例如,蛋白例如抗体)、或分子装配(例如,抗原/抗体复合物)组成。这些三维排列根据本领域充分了解的特定数学关系排列。晶体中重复的基本单位或构件被称为不对称单位。符合给定、明确的晶体学对称性的排列中的不对称单位重复提供了晶体的“晶胞(unit cell)”。通过在所有3个维度中规则平移的晶胞重复提供了晶体。参见 Giege, R. 和 Ducruix, A. Barrett, *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach*, 第2版, 第20 1-16 页, Oxford University Press, New York, New York, (1999).”。

[0168] 如本文使用的,术语“中和”指当结合蛋白特异性结合所述A $\beta$ 形式时,靶向A $\beta$ 形式的生物学活性的中和。例如,中和结合蛋白是其与球聚体的A $\beta$ (20-42)氨基酸区域(和/或任何其他靶向A $\beta$ 形式)的结合导致球聚体的生物学活性抑制的中和抗体。根据本发明的一个方面,中和结合蛋白与球聚体的A $\beta$ (20-42)区域(和/或任何其他靶向A $\beta$ 形式)结合,且使靶向A $\beta$ 形式的生物学活性减少至少约20%、40%、60%、80%、85%或更多。靶向A $\beta$ 形式的生物学活性通过中和结合蛋白的抑制可以通过测量本领域众所周知的靶向A $\beta$ 形式生物学活性的一种或多种指示剂进行评估,例如靶向A $\beta$ 形式与P/Q型电压门控的突触前钙通道的相互作用(例如结合)、P/Q型电压门控的突触前钙通道活性的抑制、通过P/Q型电压门控的突触前钙通道的Ca<sup>++</sup>流量、局部(例如细胞内)Ca<sup>++</sup>浓度、突触活性。

[0169] 术语“活性”包括活性例如结合蛋白特别是抗体对于抗原例如A $\beta$ (20-42)球聚体(和任何其他靶向A $\beta$ 形式)的结合特异性/亲和力;和/或抗体例如如其与靶向A $\beta$ 形式的结合抑制靶向A $\beta$ 形式的生物学活性的抗体的中和效力。所述靶向A $\beta$ 形式的生物学活性包含A $\beta$ 形式与P/Q型电压门控的突触前钙通道的相互作用,这导致所述钙通道活性的抑制。

[0170] 本发明还提供了编码本发明的结合蛋白的分离核苷酸序列。本发明提供了具有此类序列的那些核苷酸序列(或其片段),所述序列包含与这些编码核苷酸序列至少约70%(例如70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%或79%)、至少约80%(例如80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%或89%)、或至少约90%(例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性、与其对应、相同、可杂交或互补。(在70%和100%之间且包括70%和100%的所有整数(及其部分)就同一性百分比而言视为在本发明的范围内)。此类序列可以衍生自任何来源(例如从天然来源中分离、经由半合成途径产生或重新合成)。特别地,此类序列可以从除了实施例所述以外的来源(例如细菌、真菌、藻类、小鼠或人)分离或衍生。

[0171] 为了本发明的目的,核苷酸序列的“片段”定义为对应于指定核苷酸序列的区域,大约至少6个、例如至少约8、至少约10个核苷酸或至少约15个核苷酸的邻接序列。

[0172] 术语“同一性”指经过特定比较窗或区段在逐个核苷酸的基础上两个序列的关联性。因此,同一性定义为在两个DNA区段(或两个氨基酸序列)的相同链(有义或反义)之间的相同、对应或等价程度。“序列同一性百分比”通过下述计算:经过特定区域比较两个最佳比对的序列,测定在其上相同碱基或氨基酸在两个序列中出现的位置数目,以便获得匹配位置数目,将此类位置数目除以待比较的区段中的位置总数目,并且将结果乘以100。序列的最佳比对可以通过下述进行:Smith & Waterman, *Appl. Math.* 2:482, 1981



的算法, Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443, 1970 的算法, Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85:2444, 1988 的方法, 和执行有关算法的计算机程序 (例如 Clustal Macaw Pileup (<http://cmgm.stanford.edu/biochem218/11Multiple.pdf>; Higgins 等人, CABIOS. 5L151-153, 1989)、FASTDB (Intelligenetics)、BLAST (National Center for Biomedical Information; Altschul 等人, Nucleic Acids Research 25:3389-3402, 1997)、PILEUP (Genetics Computer Group, Madison, WI) 或 GAP、BESTFIT、FASTA 和 TFASTA (Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, Madison, WI))。(参见美国专利号 5,912,120)。

[0173] 为了本发明的目的,“互补性”定义为在两个 DNA 区段之间的关联性程度。它通过在合适条件下测量一个 DNA 区段的有义链与另一个 DNA 区段的反义链杂交以形成双螺旋的能力进行测定。“互补体”定义为基于规范碱基配对规则其与给定序列配对的序列。例如,在一条核苷酸链中的序列 A-G-T 与另一条链中的 T-C-A 是“互补的”。在双螺旋中,腺嘌呤在一条链中出现,胸腺嘧啶在另一条链中出现。类似地,无论何时在一条链中发现鸟嘌呤,在另一条链中发现胞嘧啶。两个 DNA 区段的核苷酸序列之间的关联性越大,在两个 DNA 区段的链之间形成杂交双链体的能力越大。

[0174] 在两个氨基酸序列之间的“相似性”定义为在两个序列中一系列相同以及保守氨基酸残基的存在。在两个氨基酸序列之间的相似性程度越高,两个序列的对应、相同或等价性越高。(“在两个氨基酸序列之间的同一性”定义为在两个序列中一系列确切相同或不改变的氨基酸残基的存在。)“互补性”、“同一性”和“相似性”的定义是本领域普通技术人员众所周知的。

[0175] “由……编码”指编码多肽序列的核酸序列,其中所述多肽序列或其部分含有来自自由核酸序列编码的多肽的至少 3 个氨基酸,例如至少 8 个氨基酸或至少 15 个氨基酸的氨基酸序列。

[0176] 如本文提及的,术语“多核苷酸”意指两个或更多核苷酸的聚合形式,所述核苷酸为核糖核苷酸或脱氧核苷酸 (deoxynucleotides),或任一类型核苷酸的修饰形式。该术语包括单和双链形式的 DNA,但优选是双链 DNA。

[0177] 如本文使用的,术语“分离的多核苷酸”应意指下述多核苷酸 (例如,基因组的、cDNA、或合成来源的,或其某一组合),由于其来源,“分离的多核苷酸”:不与在自然界中发现“分离的多核苷酸”与之结合的全部或部分多核苷酸结合;与在自然界中它不与之连接的多核苷酸可操作地连接;或在自然界中不作为较大序列的部分存在。

[0178] 如本文使用的,术语“载体”意指能够运输它已与之连接的另一种核酸的核酸分子。一种类型的载体是“质粒”,它指另外的 DNA 区段可以连接到其内的环状双链 DNA 环。另一种类型的载体是病毒载体,其中另外的 DNA 区段可以连接到病毒基因组内。某些载体能够在它们已引入其内的宿主细胞中自主复制 (例如,具有细菌复制起点的细菌载体和游离型哺乳动物载体)。其他载体 (例如非游离型哺乳动物载体) 在引入宿主细胞内后可以整合到宿主细胞基因组内,且因此连同宿主基因组一起进行复制。此外,某些载体能够指导它们与之可操作地连接的基因表达。此类载体在本文中被称作“重组表达载体” (或简单地,“表达载体”)。一般而言,在重组 DNA 技术中使用的表达载体通常为质粒的形式。在本说明书中,“质粒”和“载体”可以互换使用,因为质粒是最常用的载体形式。然而,本发明预

期包括此类其他形式的表达载体,例如提供等价功能的病毒载体(例如复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒)。

[0179] 术语“可操作地连接的”指其中所述组分处于允许它们以其预期方式起作用的关系中的并列。与编码序列“可操作地连接的”控制序列以此类方式连接,从而使得编码序列的表达在与控制序列相容的条件下完成。“可操作地连接的”序列包括与目的基因邻接的表达控制序列,和反式或在远处起作用以控制目的基因的表达控制序列。如本文使用的,术语“表达控制序列”指实现它们与之连接的编码序列表达和加工所必需的多核苷酸序列。表达控制序列包括合适的转录起始、终止、启动子和增强子序列;有效的 RNA 加工信号例如剪接和多腺苷酸化信号;稳定细胞质 mRNA 的序列;增强翻译效率的序列(即, Kozak 共有序列);增强蛋白稳定性的序列;和需要时,增强蛋白分泌的序列。此类控制序列的性质依赖于宿主生物而不同;在原核生物中,此类控制序列一般包括启动子,核糖体结合位点,和转录终止序列;在真核生物中,此类控制序列一般包括启动子和转录终止序列。术语“控制序列”预期包括其存在是表达和加工必需的组分,且还可以包括其存在是有利的另外组分,例如前导序列和融合配偶体序列。

[0180] 如本文定义的,“转化”指外源 DNA 通过其进入宿主细胞的任何方法。转化可以使用本领域众所周知的各种方法在天然或人工条件下发生。转化可以依赖于用于将外来核酸序列插入原核或真核宿主细胞内的任何已知方法。该方法基于待转化的宿主细胞进行选择,且可以包括但不限于,病毒感染、电穿孔、脂质转染、和粒子轰击。此类“转化的”细胞包括其中插入的 DNA 能够作为自主复制质粒或作为宿主染色体部分复制的稳定转化的细胞。它们还包括瞬时表达插入的 DNA 或 RNA 有限时间段的细胞。

[0181] 如本文使用的,术语“重组宿主细胞”(或简单地“宿主细胞”)意指其中已引入外源 DNA 的细胞。应当理解此类术语不仅意指特定的受试细胞,还意指此类细胞的后代。因为由于突变或环境影响可能在随后世代中出现某些修饰,所以此类后代实际上可能不同于亲本细胞,但仍包括在如本文使用的术语“宿主细胞”的范围内。在一个方面,宿主细胞包括选自任何生物界的原核和真核细胞。真核细胞包括原生生物、真菌、植物和动物细胞。在另一个方面,宿主细胞包括但不限于原核细胞系大肠杆菌;哺乳动物细胞系 CHO、HEK 293 和 COS;昆虫细胞系 Sf9;和真菌细胞酿酒酵母。

[0182] 标准技术可以用于重组 DNA、寡核苷酸合成、以及组织培养和转化(例如,电穿孔、脂质转染)。酶促反应和纯化技术可以根据制造商的说明书或如本领域通常完成的或如本文所述的来进行。前述技术和程序一般可以根据本领域众所周知以及如各种一般和更具体的参考文献中所述的常规方法来进行,所述参考文献在本说明书自始至终引用和讨论。参见例如,为了任何目的通过引用并入本文的 Sambrook 等人 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (第 2 版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989))。

[0183] 如本领域已知的和如本文使用的,“转基因生物”指具有包含转基因的细胞的生物,其中引入生物(或生物祖先)内的转基因表达在该生物中非天然表达的多肽。“转基因”是 DNA 构建体,所述 DNA 构建体稳定且可操作地整合到转基因生物由其发育的细胞的基因组内,从而指导编码的基因产物在转基因生物的一种或多种细胞类型或组织中表达。

[0184] 术语“调整”和“调节”可互换使用,且如本文使用的,指目的分子活性(例如,靶向

A $\beta$  形式的生物学活性) 中的变化或改变。调节可以是目的分子的某些活性或功能量级中的增加或减少。分子的示例性活性和功能包括但不限于, 结合特征、酶促活性、细胞受体激活、和信号转导。

[0185] 相应地, 如本文使用的, 术语“调节剂”是能够改造或改变目的分子活性或功能(例如, 靶向 A $\beta$  形式的生物学活性) 的化合物。例如, 与在不存在调节剂的情况下观察到的活性或功能量级相比较, 调节剂可以引起分子某些活性或功能量级中的增加或减少。在某些实施方案中, 调节剂是减少分子至少一种活性或功能量级的抑制剂。

[0186] 如本文使用的, 术语“激动剂”指当与目的分子接触时, 与在不存在激动剂的情况下观察到的活性或功能量级相比较, 引起分子某些活性或功能量级中的增加的调节剂。

[0187] 如本文使用的, 术语“拮抗剂”或“抑制剂”指当与目的分子接触时, 与在不存在拮抗剂的情况下观察到的活性或功能量级相比较, 引起分子某些活性或功能量级中的减少的调节剂。具体目的拮抗剂包括阻断或调节靶向 A $\beta$  形式的生物学活性的那些。靶向 A $\beta$  形式的拮抗剂和抑制剂可以包括但不限于本发明的结合蛋白, 其与 A $\beta$  (20-42) 球聚体和任何其他靶向 A $\beta$  形式结合。靶向 A $\beta$  形式的拮抗剂或抑制剂可以例如减少所述 A $\beta$  形式对 P/Q 型电压门控的突触前钙通道活性的抑制作用。

[0188] 如本文使用的, 术语“有效量”指疗法的量, 其足以减少或改善病症或其一种或多种症状的严重性和 / 或持续时间, 预防病症进展, 引起病症消退, 预防与病症相关的一种或多种症状复发、发展、发作或进展, 检测病症, 或增强或改善另一种疗法(例如, 预防或治疗剂) 的一种或多种预防或治疗作用。

[0189] 如本文使用的, 术语“样品”以其最广泛的含义使用。如本文使用的, “生物样品”包括但不限于, 来自生物(living thing) 或从前生物的任何量的物质。此类生物包括但不限于, 人、小鼠、大鼠、猴、狗、兔和其他动物。此类物质包括但不限于, 血液、血清、尿、滑液、细胞、器官、组织、骨髓、淋巴结和脾。

[0190] I. 本发明的抗体

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

[0191] A. 重组 A $\beta$  (20-42) 球聚体抗体的产生

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

分泌正确折叠和免疫学活性的抗体。

[0192] 根据一个方面,用于表达本发明的重组抗体的哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢(CHO细胞)(包括在 Urlaub 和 Chasin, (1980)Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4216-4220 中描述,与 DHFR 选择标记一起使用的 dhfr-CHO 细胞,例如,如 R. J. Kaufman 和 P. A. Sharp(1982)Mol. Biol., 159:601-621 中描述的)、NS0 骨髓瘤细胞、COS 细胞和 SP2 细胞。当编码抗体基因的重组表达载体被引入哺乳动物宿主细胞内时,抗体通过将宿主细胞培养足够时间段来生产,以允许抗体在宿主细胞中表达,或抗体分泌到其中宿主细胞生长的培养基内。抗体可以使用标准蛋白纯化法从培养基中回收。

[0193] 宿主细胞也可以用于产生功能抗体片段,例如 Fab 片段或 scFv 分子。将理解关于上述程序的变化在本发明的范围内。例如,可以希望用编码本发明抗体的轻链和 / 或重链的功能片段的 DNA 转染宿主细胞。重组 DNA 技术还可以用于去除对于与目的抗原的结合不是必需的编码轻和重链中任一个或两者的一些或全部 DNA。由此类截短的 DNA 分子表达的分子也由本发明的抗体包含。此外,通过经由标准化学交联法使本发明的抗体与第二种抗体交联可以产生双功能抗体,其中一条重链和一条轻链是本发明的抗体,并且另一条重链和轻链对于除目的抗原外的抗原是特异性的。

[0194] 在用于重组表达本发明的抗体或其抗原结合部分的特定系统中,编码抗体重链和抗体轻链的重组表达载体通过磷酸钙介导的转染引入 dhfr-CHO 细胞内。在重组表达载体内,抗体重和轻链基因各自与 CMV 增强子 / AdMLP 启动子调节元件可操作地连接,以驱动基因的高水平转录。重组表达载体还携带 DHFR 基因,所述 DHFR 基因允许使用氨甲蝶呤选择 / 扩增选择已用载体转染的 CHO 细胞。培养所选转化体宿主细胞以允许表达抗体重和轻链,且从培养基中回收完整的抗体。使用标准分子生物学技术以制备重组表达载体、转染宿主细胞、选择转化体、培养宿主细胞和从培养基中回收抗体。更进一步地,本发明提供了合成本发明的重组抗体的方法,其通过在合适的培养基中培养本发明的宿主细胞直至本发明的重组抗体被合成。该方法可以进一步包括从培养基中分离重组抗体。

[0195] 识别特异性表位的抗体片段可以通过已知技术生成。例如,本发明的 Fab 和 F(ab')<sub>2</sub> 片段可以通过免疫球蛋白分子的蛋白酶切割产生,其中使用酶例如木瓜蛋白酶(以产生 Fab 片段)或胃蛋白酶(以产生 F(ab')<sub>2</sub> 片段)。F(ab')<sub>2</sub> 片段包含可变区、轻链恒定区和重链的 CH1 结构域。

[0196] 1. 抗 A $\beta$  (20-42) 球聚体鼠抗体

表 3A 是鼠单克隆抗体 m4C9 的 VH 和 VL 区的氨基酸序列列表。

[0197] 表 3A: m4C9 的 VH 和 VL 区的氨基酸序列列表

蛋白区域	SEQ ID NO	序列
		123456789012345678901234567890
m4C9_VH	1	QVQLQQPGAELVKFGASVKLSCKAF- GYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWI- GRIDPKSGDTKYTEKFKSKATLTVDKPSST AYMQLSSLTSEDSAVYYCTTMSKLSGTHAW- FAYWGQGTLVTVSA
4C9_CDR-H1	SEQ ID NO: 17 SEQ ID NO: 1 的残基31-34	SYWMH
4C9_CDR-H2	SEQ ID NO: 18 SEQ ID NO: 1 的残基50-56	RIDPKSGDTKYTERFKS
4C9_CDR-H3	SEQ ID NO: 19 SEQ ID NO: 1 的残基99-111	MSKLSGTHAWFAY
m4C9_VL	2	DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDIN- SYLTWFQQKPGKSPKTLIY- RANRLVDGVPSPRFRSGSGSGQDYSLTISSE YEDMGIYYCLQYDEFPLTFFGAGTKLELK
4C9_CDR-L1	SEQ ID NO: 20 SEQ ID NO: 2 的残基24-34	KASQDINSYLF
4C9_CDR-L2	SEQ ID NO: 21 SEQ ID NO: 2 的残基50-56	RANRLVD
4C9_CDR-L3	SEQ ID NO: 22 SEQ ID NO: 2 的残基89-97	LQYDEFPLT

\*CDR 是鼠轻和重链中有下划线的。

[0198] 表 3B 是鼠单克隆抗体 m10B3 的 VH 和 VL 区的氨基酸序列列表。

[0199] 表 3B: m10B3 的 VH 和 VL 区的氨基酸序列列表

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

\*CDR 是鼠轻和重链中有下划线的。

[0200] 2. 抗 Aβ (20-42) 球聚体嵌合抗体

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

[0201] 在一个实施方案中,本发明的嵌合抗体通过用人 IgG1 恒定区替换本文所述的鼠单克隆抗 Aβ (20-42) 球聚体抗体的重链恒定区产生。

[0202] 3. 抗 Aβ (20-42) 球聚体 CDR 嫁接的抗体

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

[0203] 下表 4A 举例说明本发明的 CDR 嫁接的 4D10- 型抗体和其中含有的 CDRs 的序列。

[0204] 表 4A :CDR 嫁接的 4C9- 型抗体的 VH 和 VL 区的氨基酸序列列表

蛋白区域	SEQ ID NO	序列
		123456789012345678901234567890
4C9hum_VH.1z	SEQ ID NO: 6	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFS SYWMHWVRQAP- GGGLEWMGRIDPKSGDTKYTEKFKSRVTI- TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYY- CARMSKLSGTHAWFAYWGQGTLLVTVSS
4C9hum_VH.2z	SEQ ID NO: 10	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKAS- GYFTSYWMHWVRQAP- GGGLEWMGRIDPKSGDTKYTEKFKSRFVFS LDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYY- CARMSKLSGTHAWFAYWGQGTLLVTVSS
4C9_CDR-H1	SEQ ID NO: 17 SEQ ID NOs: 6, 10 的残基26-34	SYWMH
4C9_CDR-H2	SEQ ID NO: 18 SEQ ID NOs: 6, 10 的残基50-66	RIDPKSGDTKYTEKFKS
4C9_CDR-H3	SEQ ID NO: 19 SEQ ID NOs: 6, 10 的残基98-111	MSKLSGTHAWFAY
4C9hum_VL.1z	SEQ ID NO: 14	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDIN SYLTWFQQKPGKAPKSLIYRANRLVDGVPS RFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQ YDEFPLTFGQGTKLEIK
4C9_CDR-L1	SEQ ID NO: 20 SEQ ID NO: 14 的残基24-34	KASQDINSYLT
4C9_CDR-L2	SEQ ID NO: 21 SEQ ID NO: 14 的残基50-56	RANRLVD
4C9_CDR-L3	SEQ ID NO: 22 SEQ ID NO: 14 的残基89-97	LQYDEFPLT

\*CDRs 是人源化轻和重链中有下划线的。

[0205] 下表 4B 举例说明本发明的 CDR 嫁接的 4D10- 型抗体和其中含有的 CDRs 的序列。

[0206] 表 4B :CDR 嫁接的 10B3- 型抗体的 VH 和 VL 区的氨基酸序列列表

蛋白区域	SEQ ID NO	序列
		123456789012345678901234567890
10B3hum_VH.1	SEQ ID NO: 29	EVQL- VESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDY- EMVWRQAPGKGLEWVSYISSGSRTIHY- ADTVKGRFTISRDNAKN- SLYLQMNSLRAEDTAVYY- CARTLLRLHFDYWGQGTLVTVSS
10B3_CDR-H1	SEQ ID NO:33 SEQ ID NOs: 29 的残基31-35	DYEMV
10B3_CDR-H2	SEQ ID NO:34 SEQ ID NOs: 29 的残基50-56	YISSGSRTIHYADTVKG
10B3_CDR-H3	SEQ ID NO:35 SEQ ID NOs: 29 的残基99-107	TLLRLHFDY
10B3hum_VL.1	SEQ ID NO: 31	DIVMTQSPFDSLAVSLGERAT- INCKSSQSLLYSGNQKNFLAWYQOKPGQPP KLLIYWAS- TRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAED VAVYYCQYYSPWTFGGGTKVEIK
10B3_CDR-L1	SEQ ID NO:36 SEQ ID NOs: 31 的残基24-40	KSSQSLLYSGNQKNFLA
10B3_CDR-L2	SEQ ID NO:37 SEQ ID NOs: 31 的残基56-62	WASTRES
10B3_CDR-L3	SEQ ID NO:38 SEQ ID NOs: 31 的残基95-103	QYYSPWT

\*CDRs 是人源化轻和重链中有下划线的。

[0207] 4. 抗 AB (20-42) 球聚体人源化抗体

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

[0208] 已知的人 Ig 序列在例如下述中公开, [www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez-/query.fcgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez-/query.fcgi):



[www.atcc.org/phage/hdb.html](http://www.atcc.org/phage/hdb.html); [www.sciquest.com/](http://www.sciquest.com/); [www.abcam.com/](http://www.abcam.com/);  
[www.antibodyresource.com/onlinecomp.html](http://www.antibodyresource.com/onlinecomp.html);  
[www.public.iastate.edu/about.pedro/research\\_tools.html](http://www.public.iastate.edu/about.pedro/research_tools.html); [www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/IT/IT.html](http://www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/IT/IT.html); [www.whfreeman.com/immunology/CH-05/kuby05.htm](http://www.whfreeman.com/immunology/CH-05/kuby05.htm);  
[www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html](http://www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html);  
[www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/](http://www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/); [www.path.cam.ac.uk/about.mrc7/m-ikei-images.html](http://www.path.cam.ac.uk/about.mrc7/m-ikei-images.html); [www.antibodyresource.com/](http://www.antibodyresource.com/); [mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html](http://mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html). [www.immunologylink.com/](http://www.immunologylink.com/); [pathbox.wustl.edu/about.hcenter/index.-.html](http://pathbox.wustl.edu/about.hcenter/index.-.html);  
[www.biotech.ufl.edu/about.hcl/](http://www.biotech.ufl.edu/about.hcl/); [www.pebio.com/pa/340913/340913.html](http://www.pebio.com/pa/340913/340913.html);  
[www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/](http://www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/); [www.m.chime-u.ac.jp/about.yasuhito-/Elisa.html](http://www.m.chime-u.ac.jp/about.yasuhito-/Elisa.html);  
[www.biodesign.com/table.asp](http://www.biodesign.com/table.asp); [www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.html](http://www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.html);  
[www.biotech.ufl.edu/about.fccl/protocol.html](http://www.biotech.ufl.edu/about.fccl/protocol.html); [www.isac-net.org/sites\\_geo.html](http://www.isac-net.org/sites_geo.html);  
[aximfl.imt.uni-marburg.de/about.rek/AEP-Start.html](http://aximfl.imt.uni-marburg.de/about.rek/AEP-Start.html);  
[baserv.uci.kun.nl/about.jraats/linksl.html](http://baserv.uci.kun.nl/about.jraats/linksl.html); [www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/](http://www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/);  
[www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html](http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html); [www.ibt.unam.mx/vir/V\\_mice.html](http://www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html);  
[imgt.cnusc.fr:8104/](http://imgt.cnusc.fr:8104/); [www.biochem.ucl.ac.uk/about.martin/abs/index.html](http://www.biochem.ucl.ac.uk/about.martin/abs/index.html); [antibody.bath.ac.uk/](http://antibody.bath.ac.uk/); [abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html](http://abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html);  
[www.unizh.ch/about.honegger/AHOseminar/Slide01.html](http://www.unizh.ch/about.honegger/AHOseminar/Slide01.html);  
[www.cryst.bbk.ac.uk/about.ubcg07s/](http://www.cryst.bbk.ac.uk/about.ubcg07s/); [www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.htm](http://www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.htm);  
[www.path.cam.ac.uk/about.mrc7/h-umanisation/TAHHP.html](http://www.path.cam.ac.uk/about.mrc7/h-umanisation/TAHHP.html);  
[www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat\\_aim.html](http://www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html); [www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html](http://www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html);  
[www.cryst.bioc.cam.ac.uk/about.fmolina/Web-pages/Pept/spottech.html](http://www.cryst.bioc.cam.ac.uk/about.fmolina/Web-pages/Pept/spottech.html); [www.jerini.de/frroducts.htm](http://www.jerini.de/frroducts.htm); [www.patents.ibm.com/ibm.html](http://www.patents.ibm.com/ibm.html). Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health (1983), 各自整体通过引用并入本文。如本领域已知的, 此类输入的序列可以用于减少免疫原性, 或减少、增强或修饰结合、亲和力、结合速率、解离速率、抗体亲抗原性、特异性、半衰期、或任何其他合适的特征。

[0209] 人构架区中的构架残基可以用来自 CDR 供体抗体的相应残基取代, 以改变优选改善抗原结合。这些构架取代通过本领域众所周知的方法鉴定, 例如通过对 CDR 和构架残基的相互作用建模以鉴定对抗原结合重要的构架残基, 和序列比较以鉴定在特定位置上的罕见构架残基。(参见例如, Queen 等人, 美国专利号 5, 585, 089; Riechmann 等人, Nature, 332:323 (1988), 在此将其整体通过引用并入本文)。三维免疫球蛋白模型通常是可获得的且是本领域技术人员熟悉的。举例说明且展示所选候选免疫球蛋白序列的可能三维构象结构的计算机程序是可获得的。这些展示的检查允许分析残基在候选免疫球蛋白序列功能发挥中的可能作用, 即分析影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基。以这种方式, 可以选择 FR 残基且从共有和输入序列组合, 从而使得达到所需抗体特征, 例如对一种或多种靶抗原的亲和力增加。一般而言, CDR 残基直接且最重要地与影响抗原结合有关。

抗体可以使用本领域已知的多种技术进行人源化,例如但不限于下述参考文献中描述的那些:Jones 等人, Nature 321:522(1986);Verhoeyen 等人, Science 239:1534(1988), Sims 等人, J. Immunol. 151:2296(1993);Chothia 和 Lesk, J. Mol. Biol. 196:901(1987), Carter 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89:4285(1992);Presta 等人, J. Immunol. 151:2623(1993), Padlan, Molecular Immunology 28(4/5):489-498(1991);Studnicka 等人, Protein Engineering 7(6):805-814(1994);Roguska. 等人, PNAS 91:969-973(1994); PCT 公 开 WO 91/09967、PCT/ :US98/16280、US96/18978、US91/09630、US91/05939、US94/01234、GB89/01334、GB91/01134、GB92/01755 ;W090/14443、W090/14424、W090/14430、EP 229246、EP 592, 106 ;EP 519, 596、EP 239, 400、美国专利号 5, 565, 332、5, 723, 323、5, 976, 862、5, 824, 514、5, 817, 483、5814476、5763192、5723323、5, 766886、5, 714, 352、6, 204, 023、6, 180, 370、5, 693, 762、5, 530, 101、5, 585, 089、5, 225, 539 ;4, 816, 567, 各自整体通过引用并入本文,包括其中引用的参考文献。

[0210] 下表 5A 举例说明本发明的人源化 4C9- 型抗体和其中含有的 CDRs 的序列。

[0211] 表 5A :人源化 4C9- 型抗体的 VH 和 VL 区的氨基酸序列列表

蛋白区域	SEQ ID NO	序列
4C9hum_VH.1	SEQ ID NO: 7	123456789012345678901234567890 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKAS- GYTFISYWMHWVRQAP- GQGLEWMGRIDPKSGDTKYTEKFKSRVTI- TADKSTSTAYMELSSLRSEDYAVYY- CARMSKLSGTHANFAYWGQGLVTVSS

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

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

\*CDRs 是人源化轻和重链中有下划线的。

[0212] 下表 5B 举例说明本发明的人源化 10B3- 型抗体和其中含有的 CDRs 的序列。

[0213] 表 5B :人源化 10B3- 型抗体的 VH 和 VL 区的氨基酸序列列表

蛋白区域	SEQ ID NO	序列
		123456789012345678901234567890
10B3hum_VH.1a	SEQ ID NO: 30	EVQL- VESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDY- <u>EMVWVRQAPGKGLEWVAYISSGSRTIHY-</u> <u>ADTVKGRFTISRDNAKN-</u> SLYLQMNSLRAEDTAVYY- CARTLLRLHFDYWGQGTLVTVSS
10B3_CDR-H1	SEQ ID NO:33 SEQ ID NOs: 30 的残基31-35	DYEMV
10B3_CDR-H2	SEQ ID NO:34 SEQ ID NOs: 30 的残基50-66	YISSGSRTIHYADTVKG
10B3_CDR-H3	SEQ ID NO:35 SEQ ID NOs: 30 的残基99-107	TLLRLHFDY
10B3hum_VL.1a	SEQ ID NO: 32	DIWMTQSPDSLAIVSLGERAT- INCKSSQSLLYSGNQKNFLAWYQQKPGQSP KLLTYWAS- TRESGVPRFSGSGSGTDFTLT <del>Y</del> ISSLQAED VAVYYCQQYYSYPWTFGGGKVEIK
10B3_CDR-L1	SEQ ID NO:36 SEQ ID NOs: 32 的残基24-40	KSSQSLLYSGNQKNFLA
10B3_CDR-L2	SEQ ID NO:37 SEQ ID NOs: 32 的残基58-62	WASTRES
10B3_CDR-L3	SEQ ID NO:38 SEQ ID NOs: 32 的残基95-103	QQYYSYPWT

[0214] B. 抗体和抗体生产细胞系

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

[0215] 在特定实施方案中,抗体包含重链恒定区,例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM 或 IgD 恒定区。根据一个方面,重链恒定区是 IgG1 重链恒定区或 IgG4 重链恒定区。根据进一步方面,抗体包含轻链恒定区、κ 轻链恒定区或 λ 轻链恒定区。根据一个方面,抗体包含 κ 轻链恒定区。抗体部分可以是例如 Fab 片段或单链 Fv 片段。

[0216] Fc 部分中改变抗体效应子功能的氨基酸残基替换是本领域已知的 (Winter 等人,

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

[0217] 一个实施方案提供了标记的抗体,其中本发明的抗体与另一种功能分子(例如,另一种肽或蛋白)衍生化或连接。例如,本发明的标记的抗体可以通过使本发明的抗体与一种或多种其他分子实体功能性连接(通过化学偶联、遗传融合、非共价结合或其他方式)来衍生,所述其他分子实体例如另一种抗体(例如,双特异性抗体或双抗体)、可检测试剂、药学试剂、和/或可以介导抗体与另一种分子(例如链霉抗生物素蛋白核心区或聚组氨酸标签)结合的蛋白或肽。

[0218] 本发明的抗体可以由之衍生化的有用的可检测试剂包括荧光化合物。示例性荧光可检测试剂包括荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、5-二甲胺-1-萘磺酰氯、藻红蛋白等。抗体也可以用可检测酶衍生化,例如碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、葡糖氧化酶等。当抗体用可检测酶衍生化时,它通过添加酶用于生产可检测反应产物的另外的试剂进行检测。例如,当可检测试剂辣根过氧化物酶存在时,添加过氧化氢和二氨基联苯胺导致可检测的有色反应产物。抗体也可以用生物素衍生化,且通过抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白结合的间接测量进行检测。

[0219] 本发明的另一个实施方案提供了结晶抗体。根据一个方面,本发明涉及如本文公开的完整抗 A $\beta$  (20-42) 球聚体抗体及其片段的晶体,以及包含此类晶体的制剂和组合物。根据进一步方面,结晶抗体具有比抗体的可溶性配对物更长的体内半衰期。根据进一步方面,抗体在结晶后保留生物学活性。

[0220] 本发明的结晶抗体可以根据本领域已知的和如通过引用并入本文的 W002/072636 中公开的方法来生产。

[0221] 本发明的另一个实施方案提供了糖基化的抗体,其中抗体包含一个或多个碳水化合物残基。新生体内蛋白生产可以经历称为翻译后修饰的进一步加工。特别地,糖(糖基)残基可以酶促添加,这个过程称为糖基化。所得到的具有共价连接的寡糖侧链的蛋白被称为糖基化蛋白或糖蛋白。

[0222] 抗体是在 Fc 结构域以及可变结构域中具有一个或多个碳水化合物残基的糖蛋白。Fc 结构域中的碳水化合物残基对 Fc 结构域的效应子功能有重要作用,对抗体的抗原结合或半衰期有最低的作用 (R. Jefferis, *Biotechnol. Prog.* 21 (2005), 第 11-16 页)。相比之下,可变结构域的糖基化可能对抗体的抗原结合活性有作用。可变结构域中的糖基化可能对抗体结合亲和力具有负面作用,可能是由于空间位阻 (Co, M. S., 等人, *Mol. Immunol.* (1993) 30:1361-1367), 或导致对抗原的亲和力增加 (Wallick, S. C., 等人, *Exp. Med.* (1988) 168:1099-1109; Wright, A., 等人, *EMBO J.* (1991) 10:2717-2723)。

[0223] 本发明的一个方面涉及生成糖基化位点突变体,其中抗体的 O 或 N 糖基化位点已进行突变。本领域技术人员可以使用标准的众所周知的技术来生成此类突变体。保留生

物学活性但具有增加或减少的结合活性的糖基化位点突变体的产生是本发明的另一个目的。

[0224] 在另外一个实施方案中,本发明的抗体的糖基化得到修饰。例如,可以制备无糖基化 (aglycosylated) 抗体 (即该抗体缺乏糖基化)。糖基化可以进行改变,以例如增加抗体对抗原的亲合力。此类碳水化合物修饰可以通过例如改变抗体序列内的一个或多个糖基化位点来完成。例如,可以制备导致一个或多个可变区糖基化位点消除的一个或多个氨基酸取代,从而消除那个位点上的糖基化。此类无糖基化可以增加抗体对抗原的亲合力。此类方法在国际申请公开号 W003/016466A2 以及美国专利号 5,714,350 和 6,350,861 中进一步详细描述,它们各自整体通过引用并入本文。

[0225] 此外或可替代地,可以制备具有改变的糖基化类型的修饰的本发明的抗体,例如具有减少量的岩藻糖基残基的岩藻糖基化不足 (hypofucosylated) 抗体,或具有增加的等分 GlcNAc 结构的抗体。此类改变的糖基化模式已显示增加抗体的 ADCC 能力。此类碳水化合物修饰可以通过例如在具有改变的糖基化机构的宿主细胞中表达抗体来完成。具有改变的糖基化机构的细胞已在本领域得到描述,且可以用作在其中表达本发明的重组抗体的宿主细胞,以从而生产具有改变的糖基化的抗体。参见例如, Shields, R. L. 等人 (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740 ;Umana 等人 (1999) *Nat. Biotech.* 17:176-1, 以及欧洲专利号 :EP1,176,195 ;国际申请公开号 W003/035835 和 W099/54342 80, 它们各自整体通过引用并入本文。

[0226] 蛋白糖基化取决于目的蛋白的氨基酸序列,以及在其中表达蛋白的宿主细胞。不同生物可以产生不同的糖基化酶 (例如,糖基转移酶和糖苷酶),且具有不同的可用底物 (核苷酸糖)。由于此类因素,蛋白糖基化模式和糖基残基组成可以依赖于在其中表达特定蛋白的宿主系统而不同。在本发明中有用的糖基残基可以包括但不限于,葡萄糖、半乳糖、甘露糖、岩藻糖、n-乙酰葡萄糖胺和唾液酸。根据一个方面,糖基化的抗体包含糖基残基,从而使得糖基化模式是人的。

[0227] 不同的蛋白糖基化可以导致不同的蛋白特征,这是本领域技术人员已知的。例如,与哺乳动物细胞例如 CHO 细胞系中表达的同种蛋白的那种相比较,在微生物宿主例如酵母中生产,和利用酵母内源性途径糖基化的治疗性蛋白的功效可能是减少的。此类糖蛋白在人中也可以是免疫原性的,且在施用后显示减少的体内半衰期。人和其他动物中的特定受体可以识别特定糖基残基且促进蛋白从血流中快速清除。其他不利效应可以包括蛋白折叠、可溶性、对蛋白酶的易感性、运输、转运、区室化、分泌、由其他蛋白或因子识别、抗原性、或变应原性中的变化。因此,从业者可能更喜欢具有特定糖基化组成和模式的治疗性蛋白,例如等同于或至少类似于在人细胞或预期受试动物的物种特异性细胞中生产的那种的糖基化组成和模式。

[0228] 表达不同于宿主细胞那种的糖基化蛋白可以通过遗传修饰宿主细胞以表达异源糖基化酶来完成。使用本领域已知的技术,从业者可以生成显示人蛋白糖基化的抗体。例如,酵母菌株已进行遗传修饰以表达非天然存在的糖基化酶,从而使得在这些酵母菌株中生产的糖基化蛋白 (糖蛋白) 显示等同于动物细胞特别是人细胞那种的蛋白糖基化 (美国专利申请公开号 20040018590 和 20020137134 ;和 W005/100584)。

[0229] 另一个实施方案涉及对本发明的此类抗体特异性的抗独特型 (抗 Id) 抗体。抗 Id

抗体是识别独特决定簇的抗体,所述独特决定簇一般与另一种抗体的抗原结合区相关。抗 Id 可以通过用抗体或其含 CDR 区免疫接种动物来制备。免疫接种的动物将识别,且对免疫接种抗体的独特型决定簇应答且产生抗 Id 抗体。抗 Id 抗体也可以用作“免疫原”以在另外一种动物中诱导免疫应答,从而产生所谓的抗抗 Id 抗体。

[0230] 此外,本领域技术人员将认识到,目的蛋白可以使用宿主细胞文库来表达,所述宿主细胞进行基因工程改造以表达各种糖基化酶,从而使得文库的成员宿主细胞生产具有变体糖基化模式的目的蛋白。从业者随后可以选择并分离具有特定新糖基化模式的目的蛋白。根据进一步方面,具有特定选择的新糖基化模式的蛋白显示改善或改变的生物学性质。

#### [0231] C. 抗 A $\beta$ (20-42) 球聚体抗体的用途

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

[0232] 作为标记抗体的替代方案, A $\beta$  (20-42) 球聚体和 / 或任何其他靶向 A $\beta$  形式可以通过竞争免疫测定在生物学流体中进行测定,其中利用由可检测物质标记的 A $\beta$  (20-42) 球聚体标准和未标记的抗 A $\beta$  (20-42) 球聚体抗体。在这种测定中,组合生物样品、标记的 A $\beta$  (20-42) 球聚体标准和抗 A $\beta$  (20-42) 球聚体抗体,并且测定与未标记的抗体结合的标记的 A $\beta$  (20-42) 球聚体标准的量。在生物样品中 A $\beta$  (20-42) 球聚体和 / 或任何其他靶向 A $\beta$  形式的量与和抗 A $\beta$  (20-42) 球聚体抗体结合的标记的 A $\beta$  (20-42) 球聚体标准的量成反比。

[0233] 根据本发明的一个方面,本发明的抗体能够在体外和体内中和 A $\beta$  (20-42) 球聚体活性和 / 或任何其他靶向 A $\beta$  形式的活性。因此,本发明的此类抗体可以例如,在包含 A $\beta$  (20-42) 球聚体和 / 或任何其他靶向 A $\beta$  形式的细胞培养物中、在具有 A $\beta$  (20-42) 球聚体和 / 或本发明的抗体与其交叉反应的任何其他靶向 A $\beta$  形式的人受试者中或其他哺乳动物受试者中用于抑制 (即,减少) A $\beta$  (20-42) 球聚体活性和 / 或任何其他靶向 A $\beta$  形式的活性。在一个实施方案中,本发明提供了用于抑制 (即,减少) A $\beta$  (20-42) 球聚体活性和 / 或任何其他靶向 A $\beta$  形式的活性的方法,其包括使 A $\beta$  (20-42) 球聚体和 / 或任何其他靶向 A $\beta$  形式与本发明的抗体接触,从而使得 A $\beta$  (20-42) 球聚体活性和 / 或任何其他靶向 A $\beta$  形式的活性被抑制 (即,减少)。例如,在包含或怀疑包含 A $\beta$  (20-42) 球聚体和 / 或任何其



他靶向 A $\beta$  形式的细胞培养物中,本发明的抗体可以添加到培养基中,以抑制(即,减少)培养物中的 A $\beta$  (20-42) 球聚体活性和/或任何其他靶向 A $\beta$  形式的活性。

[0234] 在另一个实施方案中,本发明提供了用于抑制(即,减少)在有利地受试者中的靶向 A $\beta$  形式活性的方法,所述受试者患有其中所述 A $\beta$  形式活性是有害的疾病或病症或选自下述的疾病或病症或病症: $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶缺乏、C1-抑制剂缺乏血管性水肿、抗凝血酶缺乏血栓栓塞性疾病、库鲁病、克雅二氏病/羊瘙痒症、牛海绵状脑病、Gerstmann-Straussler-Scheinker 病、家族致命性失眠症、亨廷顿氏病、脊髓小脑性共济失调、Machado-Joseph 萎缩、齿状红核苍白球肌萎缩症、额颞痴呆、镰状细胞性贫血、不稳定性血红蛋白包涵体溶血、药物诱导的包涵体溶血、帕金森氏病、全身性 AL 型淀粉样变性、结节性 AL 型淀粉样变性、全身性 AA 型淀粉样变性、前列腺淀粉样变性、血液透析淀粉样变性、遗传性(冰岛)脑血管病、亨廷顿氏病、家族性内脏淀粉样变性、家族性内脏多神经病、家族性内脏淀粉样变性、老年性全身性淀粉样变性、家族性淀粉样蛋白神经病、家族性心脏淀粉样变性、阿尔茨海默氏病、唐氏综合症、甲状腺髓样癌和 2 型糖尿病 (T2DM)。

[0235] 本发明提供了用于抑制(即,减少)患有此类疾病或病症的受试者中的靶向 A $\beta$  形式活性的方法,所述方法包括给受试者施用本发明的抗体,从而使得受试者中的所述 A $\beta$  形式活性被抑制(即,减少)。在本发明的一个方面,所述靶向 A $\beta$  形式是人 A $\beta$  形式,并且受试者是人受试者。可替代地,受试者可以是表达 APP 或任何 A $\beta$  形式的非人哺乳动物,导致产生本发明的抗体能够与之结合的靶向 A $\beta$  形式。更进一步地,受试者可以是靶向 A $\beta$  形式已引入其内的非人哺乳动物(例如通过施用靶向 A $\beta$  形式或通过表达导致靶向 A $\beta$  形式产生的 APP 或任何其他 A $\beta$  形式。本发明的抗体可以施用于人受试者用于治疗目的。此外,本发明的抗体可以施用于非人哺乳动物,其中 APP 或任何 A $\beta$  形式的表达导致产生抗体能够与之结合的靶向 A $\beta$  形式,用于兽医学目的或作为人疾病的动物模型。关于后者,此类动物模型可以用于评价本发明的抗体的治疗功效(例如测试施用剂量和时程)。

[0236] 另一个实施方案是用于抑制(即,减少)患有淀粉样变性例如阿尔茨海默氏病或唐氏综合症的受试者中的靶向 A $\beta$  形式活性的方法。

[0237] 其中靶向 A $\beta$  形式的活性是有害的病症包括疾病和其他病症,其中患有该病症的受试者中靶向 A $\beta$  形式的存在已显示或怀疑负责病症的病理生理学或是或怀疑是促进病症恶化的因素。因此,其中靶向 A $\beta$  形式的活性是有害的病症是其中所述 A $\beta$  形式活性的抑制(即,减少)预期减轻病症的一些或所有症状和/或进展的病症。此类病症可以例如由患有该病症的受试者的生物学流体中靶向 A $\beta$  形式浓度中的增加(例如受试者血清、脑组织、血浆、脑脊液等中靶向 A $\beta$  形式浓度中的增加)来证实,这可以例如使用如上所述的抗 A $\beta$  (20-42) 球聚体抗体和/或针对任何其他靶向 A $\beta$  形式的抗体,或针对包含本发明的抗体与之反应的球聚体表位的任何 A $\beta$  形式的任何抗体进行检测。可以用本发明的抗体治疗的病症的非限制性例子包括本文公开的那些病症和下文关于本发明抗体的药物组合物部分中讨论的那些。

[0238] 在另外一个实施方案中,本发明涉及用于预防本文所述的疾病状况进展(例如恶化)的方法。该方法包括给有此治疗需要的受试者(例如哺乳动物,例如人)施用治疗有效量的如本文描述的任何结合蛋白或抗体。可替代地,该方法包括给受试者施用与治疗有效量的至少一种治疗剂组合的,治疗有效量的如本文描述的任何蛋白。



[0239] 在上文描述的用于预防本文所述病症发展或进展的方法中,本领域技术人员已知的一种或多种生物标记、诊断测试或生物标记和诊断测试的组合可以用于测定(1)受试者是否处于发展本文描述的一种或多种病症的危险中;或(2)先前诊断有一种或多种上述病症的受试者中本文所述病症是否正在进展(例如恶化)。

[0240] 本领域已知的一种或多种生物标记、诊断测试或生物标记和诊断测试的组合可以用于鉴定处于发展本文所述病症的危险中的受试者。同样地,本领域已知的一种或多种生物标记、诊断测试或生物标记和诊断测试的组合可以用于测定已鉴定为患有本文所述病症的受试者的疾病或状况的进展。例如,一种或多种生物标记、神经成像标记或者生物或神经成像标记(例如MRI等)的组合可以用于鉴定处于发展阿尔茨海默氏病的危险中的受试者,或对于鉴定为患有阿尔茨海默氏病的那些受试者,该疾病的进展。可以检查的生物标记包括但不限于 $\beta$ -淀粉样蛋白<sub>1-42</sub>、 $\tau$ 、磷酸化 $\tau$ (p $\tau$ )、血浆A $\beta$ 抗体、 $\alpha$ -抗胰凝乳蛋白酶、淀粉样蛋白前体蛋白、血小板中的APP同种型比、 $\beta$ -分泌酶(也称为BACE)、CD59、8-羟基-脱氧鸟嘌呤、谷氨酰胺合成酶、神经胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)、针对GFAP的抗体、白细胞介素-6受体复合物、血管舒缓素、黑素转铁蛋白、神经微丝蛋白、硝基酪氨酸、羟固醇、硫苷脂、突触标记、S100 $\beta$ 、NPS、血浆信号传导蛋白等,或其任何组合(参见Shaw, L., 等人, *Nature Reviews* 2007, 6, 295-303. Borroni, B., 等人, *Current Med. Chem.* 2007, 14, 1171-1178. Phillips, K., 等人, *Nature Reviews* 2006, 5, 463-469. Bouwman, F. H., 等人, *Neurology* 2007, 69, 1006-1011; Ray, S., 等人, *Nature Medicine* 2007, 13(11), 1359-1362. Cummings, J., 等人, *Neurology* 2007, 69, 1622-1634.)。

#### [0241] D. 药物组合物

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

[0242] 本发明的抗体可以掺入适合于给受试者施用的药物组合物内。一般地,药物组合物包含本发明的抗体和药学可接受的载体。如本文使用的,“药学可接受的载体”包括生理学相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂等。药学可接受的载体的例子包括下述一种或多种:水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、葡萄糖、甘油、乙醇等,及其组合。在许多情况下,将优选在组合物中包括等渗剂,例如糖、多元醇例如甘露糖醇、山梨糖醇、或氯化钠。药学可接受的载体可以进一步包含少量辅助物质,例如湿润剂或乳化剂、防腐剂或缓冲剂,所述辅助物质增强抗体的保存期限或效力。

[0243] 在进一步的实施方案中,药物组合物包含用于治疗如本文描述的病症的至少一种另外的治疗剂。

[0244] 各种递送系统是已知的,且可以用于施用本发明的一种或多种抗体或本发明的一种或多种抗体与预防剂或治疗剂的组合,所述预防剂或治疗剂用于预防、管理、治

疗或改善病症或其一种或多种症状,例如被囊化在脂质体中、微粒、微胶囊、能够表达抗体或抗体片段的重组细胞、受体介导的胞吞(参见例如,Wu和Wu, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432(1987))、作为逆转录病毒或其他载体等的部分的核酸构建。施用本发明的预防或治疗剂的方法包括但不限于,肠胃外施用(例如,皮内、肌内、腹膜内、静脉内和皮下),硬膜外(epidural)施用,瘤内施用和粘膜施用(例如,鼻内和经口途径)。此外,可以使用肺施用,例如利用吸入器或喷雾器,和含气溶胶化剂(aerosolizing agent)的制剂。参见例如,美国专利号6,019,968、5,985,320、5,985,309、5,934,272、5,874,064、5,855,913、5,290,540和4,880,078;以及PCT公开号WO 92/19244、W097/32572、W097/44013、W098/31346和W099/66903,其各自整体引入通过引用并入本文。在一个实施方案中,本发明的抗体、组合疗法、或本发明的组合物使用Alkermes AIR®肺药物递送技术(Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.)来施用。在特定实施方案中,本发明的预防或治疗剂肌内、静脉内、瘤内、经口、鼻内、肺、或皮下施用。预防或治疗剂可以通过任何方便的途径施用,例如通过输注或推注注射,通过经由上皮或粘膜皮肤衬里(例如,口腔粘膜、直肠和肠粘膜等)吸收,且可以连同其他生物学活性剂一起施用。施用可以是全身或局部的。

[0245] 在特定实施方案中,可能需要使本发明的抗体局部施用在需要治疗的区域;这可以通过例如但不限于局部输注、注射、或通过植入物来完成,所述植入物为多孔或无孔材料,包括膜和基质,例如硅橡胶(sialastic)膜、聚合物、纤维基质(例如, Tissuel®)、或胶原基质。在一个实施方案中,有效量的本发明的一种或多种抗体局部施用于受试者的受影响区域,以预防、治疗、管理、和/或改善病症或其症状。在另一个实施方案中,有效量的本发明的一种或多种抗体,与有效量的除本发明抗体外的一种或多种疗法(例如,一种或多种预防或治疗剂)组合,局部施用于受试者的受影响区域,以预防、治疗、管理、和/或改善病症或其一种或多种症状。

[0246] 在另一个实施方案中,抗体可以在控释或持续释放系统中递送。在一个实施方案中,可以使用泵以达到控释或持续释放(参见Langer,同上;Sefton,1987, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:20;Buchwald等人,1980, *Surgery* 88:507;Saudek等人,1989, *N. Engl. J. Med.* 321:574)。在另一个实施方案中,聚合材料可以用于达到本发明疗法的控释或持续释放(参见例如, *Medical Applications of Controlled Release*, Langer和Wise(编辑), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen和Ball(编辑), Wiley, New York(1984); Ranger和Peppas,1983, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61;还参见Levy等人,1985, *Science* 228:190;During等人,1989, *Ann. Neurol.* 25:351;Howard等人,1989, *J. Neurosurg.* 71:105);美国专利号5,679,377;美国专利号5,916,597;美国专利号5,912,015;美国专利号5,989,463;美国专利号5,128,326;PCT公开号W099/15154;和PCT公开号W099/20253。在持续释放制剂中使用的聚合物的例子包括但不限于,聚甲基丙烯酸2-羟乙酯、聚甲基丙烯酸甲酯、聚丙烯酸、乙烯-乙酸乙酯共聚物、聚甲基丙烯酸、聚乙醇酸交酯(PLG)、聚酞、聚N-乙烯吡咯烷酮、聚乙烯醇、聚丙烯酰胺、聚乙二醇、聚丙交酯(PLA)、丙交酯-乙醇酸交酯共聚物(PLGA)、和聚原酸酯。在特定实施方案中,持续释放制剂中使用的聚合物是惰性的、不含可沥滤杂质、贮藏稳定、无菌和生物可降解的。在另外一个实施方案中,控释或持续释放系统可以接近预防或治疗靶放置,从而只需要全身剂量的

部分（参见例如，Goodson, 在 *Medical Applications of Controlled Release*, 同上, 第 2 卷, 第 115-138 页 (1984)）。

[0247] 控释系统在 Langer (1990, *Science* 249:1527-1533) 的综述中讨论。本领域技术人员已知的任何技术都可以用于生产包含本发明的一种或多种抗体的持续释放制剂。参见例如, 美国专利号 4, 526, 938, PCT 公开 W091/05548, PCT 公开 W096/20698, Ning 等人, 1996, "Intratatumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel," *Radiotherapy & Oncology* 39:179-189, Song 等人, 1995, "Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions," *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 50:372-397, Cleek 等人, 1997, "Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application," *Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24:853-854, 和 Lam 等人, 1997, "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery," *Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24:759-760, 其各自整体通过引用并入本文。

[0248] 在特定实施方案中, 当本发明的组合物是编码抗体的核酸时, 核酸可以体内施用以促进其编码的抗体的表达, 这通过下述实现, 将其构建为合适的核酸表达载体的部分且施用它, 从而使得其成为细胞内的, 例如利用逆转录病毒载体 (参见美国专利号 4, 980, 286), 或直接注射, 或使用微粒轰击 (例如, 基因枪; Biolistic, Dupont), 或用脂质或细胞表面受体或转染剂包被, 或与已知进入核的同源异型框样肽连接施用它 (参见例如, Joliot 等人, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:1864-1868)。可替代地, 核酸可以细胞内引入且通过同源重组整合入宿主细胞 DNA 内用于表达。

[0249] 本发明的药物组合物配制为与其预期施用途径相容。施用途径的例子包括但不限于, 肠胃外, 例如, 静脉内、皮内、皮下、经口、鼻内 (例如, 吸入)、经皮 (例如, 局部)、跨粘膜、和直肠施用。在特定实施方案中, 组合物根据常规程序配制为药物组合物, 所述药物组合物适合于静脉内、皮下、肌内、经口、鼻内或局部施用于人类。一般地, 用于静脉内施用的组合物是在无菌等渗水性缓冲液中的溶液。必要时, 组合物还可以包括增溶剂和局部麻醉剂例如利诺卡因 (lignocaine), 以减轻注射部位处的疼痛。

[0250] 如果本发明的组合物将局部施用, 那么组合物可以配制为软膏、乳膏、经皮贴剂、洗剂、凝胶、洗发剂、喷雾剂、气溶胶、溶液、乳剂形式或本领域技术人员众所周知的其他形式。参见例如, *Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms*, 第 19 版, Mack Pub. Co., Easton, Pa. (1995)。对于不可喷雾的局部剂型, 一般采用包含与局部应用相容的载体或一种或多种赋形剂, 且具有大于水的动态粘度的粘性至半固体或固体形式。合适的制剂包括但不限于, 溶液、悬浮液、乳剂、乳膏、软膏、粉末、搽剂、油膏等, 必要时进行灭菌或与助剂 (例如防腐剂、稳定剂、湿润剂、缓冲剂或盐) 混合用于影响各种性质, 例如, 渗透压。其他合适的局部剂型包括可喷雾的气溶胶制剂, 其中活性成分, 例如与固体或液体惰性载体组合, 与加压挥发物 (例如, 气体推进剂, 例如氟利昂) 在混合物中包装或包装在挤压瓶中。需要时保湿剂 (moisturizer) 或湿润剂也可以加到药物组合物和剂型中。此类另外成分的例子是本领域众所周知的。

[0251] 如果本发明的方法包括组合物的鼻内施用, 那么组合物可以配制为气溶胶形式、

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

[0252] 如果本发明的方法包括经口施用,那么组合物可以配制为片剂、胶囊、扁囊剂、粒状胶囊(gelcaps)、溶液、悬浮液等经口形式。片剂或胶囊可以通过常规方法用药学可接受的赋形剂制备,所述赋形剂例如粘合剂(例如,预凝胶玉米淀粉、聚乙烯吡咯烷酮、或羟丙基甲基纤维素);填充剂(例如,乳糖、微晶纤维素、或磷酸氢钙);润滑剂(例如,硬脂酸镁、滑石粉或硅土);崩解剂(例如,马铃薯淀粉或羟基乙酸淀粉钠);或湿润剂(例如,十二烷基硫酸钠)。片剂可以通过本领域众所周知的方法进行包被。用于经口施用的液体制剂可以采取下述形式,但不限于下述形式,溶液、糖浆或悬浮液,或它们可以呈现为干燥产品,用于在使用前用水或其他合适的载体构建。此类液体制剂可以通过常规方法用药学可接受的添加剂制备,所述添加剂例如悬浮剂(例如,山梨糖醇糖浆、纤维素衍生物、或氢化可食用脂肪);乳化剂(例如,卵磷脂或阿拉伯胶);非水载体(例如,杏仁油、油酯、乙醇、或分馏植物油);和防腐剂(例如,对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯或山梨酸)。适当时制剂还可以包含缓冲盐、调味剂、着色剂和甜味剂。用于经口施用的制剂可以适当地配制,用于缓慢释放、控释、或持续释放一种或多种预防或治疗剂。

[0253] 本发明的方法可以包括用气溶胶化剂(aerosolizing agent)配制的组合物的肺施用,例如利用吸入器或喷雾器。参见例如,美国专利号6,019,968、5,985,320、5,985,309、5,934,272、5,874,064、5,855,913、5,290,540和4,880,078;以及PCT公开号WO 92/19244、WO 97/32572、WO 97/44013、WO 98/31346和WO 99/66903,其各自整体通过引用并入本文。在特定实施方案中,本发明的抗体、组合疗法、和/或本发明的组合物使用Alkermes AIR®肺药物递送技术(Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.)来施用。

[0254] 本发明的方法可以包括配制用于通过注射(例如通过推注注射或连续输注)肠胃外施用的组合物的施用。用于注射的制剂可以与添加的防腐剂一起以单位剂型(例如,在安瓿或多剂容器中)呈递。组合物可以采取此类形式,如在油性或水性载体中的悬浮液、溶液或乳剂,且可以包含配制试剂例如悬浮、稳定和/或分散剂。可替代地,活性成分可以为粉末形式用于在使用前用合适的载体(例如,无菌无致热原水)构建。本发明的方法可以另外包括配制为贮库(depot)制剂的组合物的施用。此类长效制剂可以通过植入(例如皮下或肌内)或通过肌内注射来施用。因此,例如,组合物可以用合适的聚合或疏水材料(例如,作为在可接受的油中的乳剂)或离子交换树脂配制,或配制为微溶衍生物(例如,作为微溶盐)。

[0255] 本发明的方法包括配制为中性或盐形式的组合物的施用。药学可接受的盐包括由阴离子形成的那些,例如来源于盐酸、磷酸、乙酸、草酸、酒石酸等的那些,以及由阳离子形成的那些,例如来源于钠、钾、铵、钙、铁氢氧化物,异丙胺,三乙胺,2-乙氨基乙醇,组氨酸,普鲁卡因等的那些。

[0256] 一般地,组合物的成分分开或混合在一起以单位剂型提供,例如,作为在指示活性剂的量的密封容器中的干冷冻干燥粉末或无水浓缩剂,所述密封容器例如安瓿或小药囊

(sachette)。当施用方式是输注时,组合物可以用包含无菌药物级别的水或盐水的输注瓶分配。当施用方式是注射时,可以提供无菌注射用水或盐水的安瓿,从而使得成分可以在施用前进行混合。

[0257] 特别地,本发明还提供了包装在密封容器中的本发明的一种或多种抗体或药物组合物,所述密封容器例如指示抗体的量的安瓿或小药囊。在一个实施方案中,本发明的一种或多种抗体或药物组合物,作为在密封容器中的干无菌冷冻干燥粉末或无水浓缩剂提供,且可以重构(例如,用水或盐水)至合适浓度以用于给受试者施用。在一个实施方案中,本发明的一种或多种抗体或药物组合物,作为在密封容器中的干无菌冷冻干燥粉末提供,其单位剂量为至少 5 mg,例如至少 10 mg、至少 15 mg、至少 25 mg、至少 35 mg、至少 45 mg、至少 50 mg、至少 75 mg、或至少 100 mg。冷冻干燥的本发明的抗体或药物组合物应在其原容器中贮存于 2°C - 8°C,并且本发明的抗体或药物组合物应在重构后 1 周内施用,例如重构后 5 天内、72 小时内、48 小时内、24 小时内、12 小时内、6 小时内、5 小时内、3 小时内、或 1 小时内。在可替代的实施方案中,本发明的一种或多种抗体或药物组合物,以液体形式在指示抗体的量和浓度的密封容器中提供。在进一步的实施方案中,液体形式的施用的组合物在密封容器中提供,其量为至少 0.25 mg/ml,例如至少 0.5 mg/ml、至少 1 mg/ml、至少 2.5 mg/ml、至少 5 mg/ml、至少 8 mg/ml、至少 10 mg/ml、至少 15 mg/kg、至少 25 mg/ml、至少 50 mg/ml、至少 75 mg/ml 或至少 100 mg/ml。液体形式应在其原容器中贮存于 2°C - 8°C。

[0258] 本发明的抗体可以掺入适用于肠胃外施用的药物组合物内。在一个方面,抗体将制备为包含 0.1 - 250 mg/ml 抗体的可注射溶液。可注射溶液可以由在燧石小瓶或琥珀色小瓶、安瓿或预装注射器中的液体或冷冻干燥剂型组成。缓冲剂可以是 L-组氨酸 (1 - 50 mM),最佳 5 - 10 mM, pH 5.0 - 7.0 (最佳 pH 6.0)。其他合适的缓冲剂包括但不限于,琥珀酸钠、柠檬酸钠、磷酸钠或磷酸钾。氯化钠可以用于修饰浓度 0 - 300 mM (对于液体剂型最佳 150 mM) 的溶液的毒性。对于冷冻干燥剂型可以包括冷冻保护剂,主要为 0 - 10% 蔗糖 (最佳 0.5 - 1.0%)。其他合适的冷冻保护剂包括海藻糖和乳糖。对于冷冻干燥剂型可以包括膨胀剂,主要为 1 - 10% 甘露糖醇 (最佳 2 - 4%)。稳定剂可以在液体和冷冻干燥剂型中使用,主要为 1 - 50 mM L-甲硫氨酸 (最佳 5 - 10 mM)。其他合适的膨胀剂包括甘氨酸、精氨酸,可以作为 0 - 0.05% 聚山梨醇酯 80 (最佳 0.005 - 0.01%) 包括。另外的表面活性剂包括但不限于,聚山梨醇酯 20 和 BRIJ 表面活性剂。制备为可注射溶液用于肠胃外施用、包含本发明的抗体的药物组合物可以进一步包含用作佐剂的试剂,例如用于增加抗体吸收、或分散的那些。特别有用的佐剂是透明质酸酶例如 Hylenex® (重组人透明质酸酶)。在可注射溶液中添加透明质酸酶改善肠胃外施用,特别是皮下施用后的人生物利用度。它还允许具有较少疼痛和不适的更大注射部位体积 (即大于 1 ml),和最低的注射部位反应发生率。(参见通过引用并入本文的国际申请公开号 WO 04/078140 和美国专利申请公开号 US2006104968)。

[0259] 本发明的组合物可以为多种形式。这些包括例如,液体、半固体和固体剂型,例如液体溶液 (例如,可注射和可输注溶液)、分散体或悬浮液、片剂、丸剂、粉末、脂质体和栓剂。优选形式取决于预期施用方式和治疗应用。组合物可以是可注射或可输注溶液形式,例如类似于由其他抗体被动免疫接种人使用的那些的组合物。在一个实施方案中,抗体通过静脉内输注或注射来施用。在另一个实施方案中,抗体通过肌肉或皮下注射来施用。

[0260] 治疗组合物一般必须是无菌且在制备和贮存条件下是稳定的。组合物可以配制为溶液、微乳剂、分散体、脂质体、或适合于高药物浓度的其他有序结构。无菌可注射溶液可以通过下述制备：将需要量的活性化合物（即，本发明的结合蛋白例如抗体）与上文列举的一种成分或成分组合一起掺入合适的溶剂中，需要时随后进行过滤灭菌。一般地，分散体通过将活性化合物掺入无菌载体内来制备，所述无菌载体包含基本分散介质和来自上文列举那些的所需的其他成分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌、冷冻干燥粉末的情况下，制备方法包括由其先前无菌过滤的溶液产生活性成分加任何另外所需成分的粉末的真空干燥和喷雾干燥。溶液的正确流动性可以通过下述来维持，例如利用包衣例如卵磷脂，在分散体的情况下维持所需颗粒大小和利用表面活性剂。可注射组合物的延长吸收可以通过在组合物中包括延迟吸收的试剂来引起，所述试剂例如单硬脂酸盐和明胶。

[0261] 本发明的抗体可以通过本领域已知的多种方法来施用。对于许多治疗应用，施用途径/模式可以是皮下注射、静脉内注射或输注。如技术人员将认识到的，施用途径和/或模式将依所需结果而变化。在某些实施方案中，活性化合物可以与载体一起制备，所述载体将保护化合物免于快速释放，例如控释制剂，包括植入物、经皮贴剂、和微囊化递送系统。可以使用生物可降解的、生物相容的聚合物，例如乙烯乙酸乙烯酯、聚酞、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。用于制备此类制剂的许多方法是获得专利保护的或是本领域技术人员一般已知的。参见例如，Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, 编辑, Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。

[0262] 在某些实施方案中，本发明的抗体可以例如，与惰性稀释剂或可同化食用载体一起经口施用。抗体（和若需要，其他成分）也可以装入硬或软壳明胶胶囊中，压缩成片剂，或直接掺入受试者的饮食内。对于经口治疗施用，抗体可以与赋形剂掺合，且以可摄食片剂、口腔含化片剂、锭剂、胶囊、酞剂、悬浮液、糖浆、薄片（wafer）等的形式使用。为了通过除肠胃外施用外施用本发明的抗体，可能必须用材料包被抗体、或将抗体与材料共施用，以防止其失活。

[0263] 补充性活性化合物也可以掺入组合物内。在某些实施方案中，本发明的抗体与一种或多种另外的治疗剂共配制和/或共施用，所述治疗剂用于治疗本文描述的病症或疾病。例如，本发明的抗 A B (20-42) 球聚体抗体可以与结合其他靶的一种或多种另外的抗体（例如，结合其他可溶性抗原或结合细胞表面分子的抗体）共配制和/或共施用。此外，本发明的一种或多种抗体可以与两种或更多前述治疗剂组合使用。此类组合疗法可以有利地利用较低剂量的施用的治疗剂，从而避免与各种单一疗法相关的可能毒性或并发症。

[0264] 在某些实施方案中，本发明的抗体与本领域已知的半衰期延长载体连接。此类载体包括但不限于，Fc 结构域、聚乙二醇、和葡聚糖。此类载体在例如美国申请系列号 09/428,082 和公开的 PCT 申请号 WO 99/25044 中描述，为了任何目的将其通过引用并入本文。

[0265] 在特定实施方案中，施用包含编码本发明的抗体的核苷酸序列的核酸序列，以经由基因疗法治疗、预防、管理、或改善病症或其一种或多种症状。基因疗法指通过给受试者施用表达的或可表达核酸来进行的疗法。在本发明的这个实施方案中，核酸生产介导预防或治疗作用的其编码的本发明抗体。

[0266] 本领域可用的任何关于基因治疗的方法可以根据本发明使用。关于基因治疗方法

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

[0267] 本发明的抗体可以单独或组合用于治疗疾病例如阿尔茨海默氏病、唐氏综合症、痴呆、帕金森氏病或与  $\beta$  淀粉样蛋白在脑内的积累相关的任何其他疾病或状况。本发明的抗体可以用于治疗“构象疾病”。此类疾病起于组成成分蛋白内的二级至三级结构变化,伴随改变的蛋白的后续聚集(Hayden 等人, *JOP. J Pancreas* 2005 ;6(4):287-302)。特别地,本发明的抗体可以用于治疗下述构象疾病中的一种或多种: $\alpha$  1- 抗胰蛋白酶缺乏、C1- 抑制剂缺乏血管性水肿、抗凝血酶缺乏血栓栓塞性疾病、库鲁病、克雅二氏病 / 羊瘙痒症、牛海绵状脑病、Gerstmann-Straussler-Scheinker 病、家族致命性失眠症、亨廷顿氏病、脊髓小脑性共济失调、Machado-Joseph 萎缩、齿状红核苍白球肌萎缩症、额颞痴呆、镰状细胞性贫血、不稳定性血红蛋白包涵体溶血、药物诱导的包涵体溶血、帕金森氏病、全身性 AL 型淀粉样变性、结节性 AL 型淀粉样变性、全身性 AA 型淀粉样变性、前列腺淀粉样变性、血液透析淀粉样变性、遗传性(冰岛)脑血管病、亨廷顿氏病、家族性内脏淀粉样变性、家族性内脏多神经病、家族性内脏淀粉样变性、老年性全身性淀粉样变性、家族性淀粉样蛋白神经病、家族性心脏淀粉样变性、阿尔茨海默氏病、唐氏综合症、甲状腺髓样癌和 2 型糖尿病(T2DM)。优选地,本发明的抗体可以用于治疗淀粉样蛋白例如阿尔茨海默氏病和唐氏综合症。

[0268] 应当理解本发明的抗体可以单独或与一种或多种另外的试剂例如治疗剂(例如小分子或生物制品)组合使用,所述另外的试剂由技术人员根据其预期目的进行选择。例如,另外的治疗剂可以是“认知增强药物”,其是改善受损的人脑认知能力(即思考、学习和记忆)的药物。认知增强药物通过改变神经化学物质(例如神经递质、酶和激素)的可用度、改善供氧、刺激神经生长或抑制神经损害来起作用。认知增强药物的例子包括增加乙酰胆碱的活性的化合物,例如但不限于乙酰胆碱受体激动剂(例如烟碱  $\alpha$ -7 受体激动剂或变构调节剂、 $\alpha$  4  $\beta$  2 烟碱受体激动剂或变构调节剂)、乙酰胆碱酯酶抑制剂(例如多奈哌齐、利斯的明和加兰他敏)、丁酰胆碱酯酶抑制剂、N- 甲基 -D- 天冬氨酸(NMDA)受体拮抗剂(例如美金刚)、活性依赖性神经保护蛋白(ADNP)激动剂、血清素 5- HT<sub>1A</sub> 受体激动剂(例如扎利罗登)、5-HT<sub>4</sub>受体激动剂、5-HT<sub>6</sub>受体拮抗剂、血清素 1A 受体拮抗剂、组胺 H<sub>3</sub>受体拮抗剂、钙蛋白酶抑制剂、血管内皮生长因子(VEGF)蛋白或激动剂、营养生长因子、抗细胞凋亡化合物、AMPA 型谷氨酸受体激活物、L 型或 N 型钙通道阻滞剂或调节剂、钾通道阻滞剂、缺氧诱导因子(HIF)激活物、HIF 脯氨酰 4- 羟化酶抑制剂、抗炎剂、淀粉样蛋白 A  $\beta$  肽或淀粉样蛋白斑的抑制剂、 $\tau$  高磷酸化抑制剂、磷酸二酯酶 5 抑制剂(例如他达拉非、西地那非)、磷酸二酯酶 4 抑制剂、单胺氧化酶抑制剂或其药学可接受的盐。此类认知增强药物的具体例子包括但不限于胆碱酯酶抑制剂例如多奈哌齐(Aricept<sup>®</sup>)、利斯的明(Exelon<sup>®</sup>)、加兰他敏(Reminyl<sup>®</sup>)、N- 甲基 -D- 天冬氨酸拮抗剂例如美金刚(Namenda<sup>®</sup>)。至少一种认知增强药物

可以与本发明的抗体同时施用或与本发明的抗体序贯施用（并且以任何次序），包括目前公认或未来公认为治疗待通过本发明的抗体治疗的疾病或状况有用的那些试剂）。另外，认为当在上述治疗中使用时，本文描述的组合可以具有累加或协同作用。另外的试剂还可以是对治疗组合物赋予有利属性的试剂，例如影响组合物粘度的试剂。

[0269] 应进一步理解将包括在本发明内的组合是对其预期目的有用的那些组合。上文所述试剂是举例说明性目的的且不希望是限制性的。作为本发明部分的组合可以包含本发明的抗体和选自下列的至少一种另外的试剂。组合还可以包括超过一种另外的试剂，例如，二种或三种另外的试剂，如果组合是使得形成的组合物可以行使其预期功能的话。

[0270] 本发明的药物组合物可以包括“治疗有效量”或“预防有效量”的本发明的抗体。“治疗有效量”指在所需剂量和时间段有效达到所需治疗结果的量。抗体的治疗有效量可以由本领域技术人员来确定，且可以根据下述因素而变化，例如个体疾病状态、年龄、性别、和重量，以及抗体在个体中引起所需应答的能力。治疗有效量也是其中治疗有利作用大于抗体的任何毒性或有害作用的量。“预防有效量”指在所需剂量和时间段有效达到所需预防结果的量。一般地，因为预防剂量在疾病前或疾病早期时在受试者中使用，所以预防有效量将小于治疗有效量。

[0271] 剂量方案可以进行调整以提供最佳所需应答（例如，治疗或预防应答）。例如，可以施用单次推注，几个分份剂量可以随着时间过去而施用，或剂量可以如治疗情形的紧急状态所指示的按比例减少或增加。为了易于施用和剂量一致，以单位剂型配制肠胃外组合物是特别有利的。如本文使用的，单位剂型指适合作为单位剂量用于待治疗的哺乳动物受试者的物理上不连续单位；每个单位包含与所需药学载体结合的计算为产生所需疗效的预定量的活性化合物。关于本发明的单位剂型的详细说明由下述指示且直接取决于下述：(a) 活性化合物的独特特征和待达到的具体治疗或预防作用，和 (b) 配制这种用于治疗个体中敏感性的活性化合物的领域固有的局限性。

[0272] 关于本发明的抗体的治疗或预防有效量的示例性非限制性范围是 0.1-20 mg/kg，例如 1-10 mg/kg。应当指出剂量值可以依待减轻的状况类型和严重性而变化。应进一步理解对于任何特定受试者，根据个体需要和施用或监督组合物施用的人的专业判断，具体剂量方案应当随着时间过去进行调整，并且本文所述的剂量范围仅是示例性的，且不希望限制要求保护的组合物的范围或实践。

[0273] 对于本领域技术人员将显而易见的是，本文描述的本发明方法的其他合适修改和适应是显而易见的，且无需背离本发明或本文公开的实施方案的范围使用合适的相同方案即可进行。尽管本发明目前已得到详细描述，但通过参考下述实施例将更清楚地理解本发明，所述实施例被包括仅用于举例说明性目的的且不希望限制本发明。

## 实施例

[0274] 实施例 1：球聚体的制备

a) A $\beta$  (1-42) 球聚体：

将 A $\beta$  (1-42) 合成肽 (H-1368, Bachem, Bubendorf, 瑞士) 以 6 mg/ml 悬浮于 100% 1, 1, 3, 3, 3-六氟-2-丙醇 (HFIP) 中，并且在振荡下在 37°C 下孵育 1.5 小时用于完全溶解。HFIP 充当氢键破坏物，并且用于消除 A $\beta$  肽中预先存在的结构不均匀性。通过在



SpeedVac 中蒸发去除 HFIP, 并且使 A $\beta$  (1-42) 以 5 mM 的浓度重悬浮于二甲亚砜中, 并且超声处理 20 秒。将 HFIP 预处理的 A $\beta$  (1-42) 在磷酸盐缓冲盐水 (PBS) (20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、140 mM NaCl, pH 7.4) 中稀释至 400  $\mu$ M, 并且加入 1/10 体积 2% 十二烷基硫酸钠 (SDS) (H<sub>2</sub>O 溶液) (0.2% SDS 的终浓度)。在 37°C 孵育 6 小时导致 16/20-kDa A $\beta$  (1-42) 球聚体 (关于球形寡聚物的简单形式) 中间产物。通过用三体积 H<sub>2</sub>O 进一步稀释和在 37°C 下孵育 18 小时而生成 38/48-kDa A $\beta$  (1-42) 球聚体。以 3000 g 离心 20 分钟后, 将样品通过超滤 (30-kDa 截止) 浓缩, 针对 5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、35mM NaCl, pH 7.4 透析, 以 10,000 g 离心 10 分钟, 并且取出包含 38/48-kDa A $\beta$  (1-42) 球聚体的上清液。作为透析的替代方案, 38/48-kDa A $\beta$  (1-42) 球聚体还可以通过九倍过量 (v/v) 的冰冷的甲醇 / 乙酸溶液 (33% 甲醇、4% 乙酸) 在 4°C 沉淀 1 小时。随后将 38/48-kDa A $\beta$  (1-42) 球聚体沉淀 (以 16200 g 10 分钟), 重悬浮于 5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、35 mM NaCl, pH 7.4 中, 并且将 pH 调整至 7.4。

[0275] b) A $\beta$  (20-42) 球聚体:

将根据实施例 1a 制备的 1.59 ml A $\beta$  (1-42) 球聚体制备物与 38 ml 缓冲液 (50 mM MES/NaOH, pH 7.4) 和 200  $\mu$ l 的 1 mg/ml 嗜热菌蛋白酶 (Roche) 的水溶液混合。将反应混合物在 RT 搅拌 20 小时。随后, 加入 80  $\mu$ l 的 100 mM EDTA, pH 7.4 的水溶液, 并且另外用 400  $\mu$ l 的 1% 强度 SDS 溶液将混合物调整至 0.01% 的 SDS 含量。经由 15 ml 30 kDa Centriprep 管将反应混合物浓缩至约 1 ml。将浓缩物与 9 ml 缓冲液 (50 mM MES/NaOH、0.02% SDS, pH 7.4) 混合, 且再次浓缩至 1 ml。将浓缩物在 6°C 在透析管中针对 1 l 缓冲液 (5 mM 磷酸钠、35 mM NaCl) 透析 16 小时。用 2% 强度 SDS 的水溶液将透析液调整至 0.1% 的 SDS 含量。将样品以 10,000 g 离心 10 分钟, 并且取出 A $\beta$  (20-42) 球聚体上清液。

[0276] c) A $\beta$  (12-42) 球聚体:

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

[0277] d) 交联的 A $\beta$  (1-42) 球聚体:

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

A $\beta$  (1-42) 球聚体。现在通过与 1 mM 戊二醛一起在 21°C 室温孵育 2 小时随后为乙醇胺 (5 mM) 在室温处理 30 分钟进行 38/48-kDa A $\beta$  (1-42) 球聚体的交联。

#### [0278] 实施例 2 :人源化抗 A $\beta$ (20-42) 球聚体 4C9 抗体的生成和分离

##### 实施例 2.1 :人抗体构架的选择

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

#### [0279] 实施例 2.2 :鼠抗 A $\beta$ (20-42) 球聚体抗体的人源化

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

[0280] 4C9hum\_VH. 1 (SEQ ID NO:7) :将来自表 3a 中所述的鼠抗 A $\beta$  (20-42) 球聚体抗体 m4C9 的重链 CDR 序列嫁接到人 VH1-69 和 JH4 序列的受体构架内,所述受体构架包含防止 N 末端焦谷氨酸形成的 Q1E 变化以及共有变化 S16A、G27Y 和 S30T。

[0281] 4C9hum\_VH. 1a (SEQ ID NO:8) :将来自表 3a 中所述的鼠抗 A $\beta$  (20-42) 球聚体抗体 m4C9 的重链 CDR 序列嫁接到人 VH1-69 和 JH4 序列的受体构架内,所述受体构架包含防止 N 末端焦谷氨酸形成的 Q1E 变化、共有变化 S16A、G27Y 和 S30T 以及构架回复突变 M48I、V68A、I70L、A72V、A97T 和 R98T。

[0282] 4C9hum\_VH. 1b (SEQ ID NO:9) :将来自表 3a 中所述的鼠抗 A $\beta$  (20-42) 球聚体抗体 m4C9 的重链 CDR 序列嫁接到人 VH1-69 和 JH4 序列的受体构架内,所述受体构架包含防止 N 末端焦谷氨酸形成的 Q1E 变化、共有变化 S16A、G27Y 和 S30T 以及构架回复突变 A72V 和 R98T。

[0283] 4C9hum\_VH. 2z (SEQ ID NO:10) :将来自表 3a 中所述的鼠抗 A $\beta$  (20-42) 球聚体抗体 m4C9 的重链 CDR 序列嫁接到人 VH7-4. 1 和 JH4 序列的受体构架内。

[0284] 4C9hum\_VH. 2 (SEQ ID NO:11) :将来自表 3a 中所述的鼠抗 A $\beta$  (20-42) 球聚体抗体 m4C9 的重链 CDR 序列嫁接到人 VH7-4. 1 和 JH4 序列的受体构架内,所述受体构架包含防止 N 末端焦谷氨酸形成的 Q1E 变化。

[0285] 4C9hum\_VH. 2a (SEQ ID NO:12) :将来自表 3a 中所述的鼠抗 A $\beta$  (20-42) 球聚体抗体 m4C9 的重链 CDR 序列嫁接到人 VH7-4. 1 和 JH4 序列的受体构架内,所述受体构架包含防止 N 末端焦谷氨酸形成的 Q1E 变化以及构架回复突变 M48I、F68A、F70L、L72V、T74K、A97T 和 R98T。

[0286] 4C9hum\_VH. 2b (SEQ ID NO:13) :将来自表 3a 中所述的鼠抗 A $\beta$  (20-42) 球聚体抗体 m4C9 的重链 CDR 序列嫁接到人 VH7-4. 1 和 JH4 序列的受体构架内,所述受体构架包含防

止 N 末端焦谷氨酸形成的 Q1E 变化以及构架回复突变 L72V 和 R98T。

[0287] 4C9hum\_VL. 1z (SEQ ID NO:14):将来自表 3a 中所述的鼠抗 A $\beta$  (20-42) 球聚体抗体 m4C9 的轻链 CDR 序列嫁接到人 1-16/L1 和 Jk2 序列的受体构架内。

[0288] 4C9hum\_VL. 1 (SEQ ID NO:15):将来自表 3a 中所述的鼠抗 A $\beta$  (20-42) 球聚体抗体 m4C9 的轻链 CDR 序列嫁接到人 1-16/L1 和 Jk2 序列的受体构架内,所述受体构架包含共有变化 S46L。

[0289] 4C9hum\_VL. 1a (SEQ ID NO:16):将来自表 3a 中所述的鼠抗 A $\beta$  (20-42) 球聚体抗体 m4C9 的轻链 CDR 序列嫁接到人 1-16/L1 和 Jk2 序列的受体构架内,所述受体构架包含构架回复突变 L46T 和 F71Y。

[0290] 10B3hum\_VH. 1 (SEQ ID NO:29):将来自表 3a 中所述的鼠抗 A $\beta$  (20-42) 球聚体抗体 m10B3 的重链 CDR 序列嫁接到人 VH3-48 和 JH4 序列的受体构架内。

[0291] 10B3hum\_VH. 1a (SEQ ID NO:30):将来自表 3a 中所述的鼠抗 A $\beta$  (20-42) 球聚体抗体 m10B3 的重链 CDR 序列嫁接到人 VH3-48 和 JH4 序列的受体构架内,所述受体构架包含构架回复突变 S49A。

[0292] 10B3hum\_VL. 1 (SEQ ID NO:31):将来自表 3a 中所述的鼠抗 A $\beta$  (20-42) 球聚体抗体 m10B3 的轻链 CDR 序列嫁接到人 4-1/B3 和 Jk4 序列的受体构架内。

[0293] 10B3hum\_VL. 1a (SEQ ID NO:32):将来自表 3a 中所述的鼠抗 A $\beta$  (20-42) 球聚体抗体 m10B3 的轻链 CDR 序列嫁接到人 4-1/B3 和 Jk4 序列的受体构架内,所述受体构架包含构架回复突变 P49S。

[0294] 所述 VH 和 VL 回复突变、共有变化或 Q1E 突变中的一些可能在后续亲和力成熟过程中去除。

[0295] 实施例 2.3:人源化抗体的构建

使用寡核苷酸重新构建上文描述的在计算机芯片上构建的人源化抗体。对于每个可变区 cDNA,各 60-80 个核苷酸的 6 种寡核苷酸设计为在每种寡核苷酸的 5' 和 / 或 3' 末端上彼此重叠 20 个核苷酸。在退火反应中,将所有 6 种寡核苷酸合并,煮沸且在 dNTPs 的存在下退火。随后加入 DNA 聚合酶 I,大 (Klenow) 片段 (New England Biolabs #M0210, Beverley, MA.),以填充在重叠的寡核苷酸之间的约 40 bp 缺口。随后将使用含有与经修饰的 pBOS 载体中的多克隆位点互补的突出端序列的两种最外面的引物进行 PCR,以扩增整个可变区基因 (Mizushima, S. 和 Nagata, S., (1990) *Nucleic acids Research* 第 18 卷, No. 17))。衍生自每种 cDNA 装配的 PCR 产物在琼脂糖凝胶上分离,并且将切除且纯化对应于预测的可变区 cDNA 大小的带。通过在细菌中的同源重组,将可变重区符合读框地插入编码含有 2 个铰链区氨基酸突变的人 IgG1 恒定区的 cDNA 片段上。这些突变是在位置 234 (EU 编号) 的亮氨酸至丙氨酸的改变和在位置 235 的亮氨酸至丙氨酸的改变 (Lund 等人, 1991, *J. Immunol.*, 147:2657)。通过同源重组将可变轻链区与人  $\kappa$  恒定区一起符合读框地插入。分离细菌菌落且提取质粒 DNA;cDNA 插入片段将整体测序。将对应于每种抗体的正确的人源化重和轻链共转染到 COS 细胞内,以瞬时产生全长人源化抗 A $\beta$  球聚体抗体。通过 A 蛋白琼脂糖层析纯化含有重组嵌合抗体的细胞上清液,且通过添加酸缓冲液洗脱结合的抗体。将抗体中和且透析到 PBS 中。(Dieder Moechars 等人 *J Biol Chem* 274:6483 - 6492 (1999); Ausubel, F. M. 等人编辑, *Short Protocols In Molecular Biology* (第

4 版 1999) John Wiley & Sons, NY. (ISBN 0-471-32938-X); Lu 和 Weiner 编辑, Cloning and Expression Vectors for Gene Function Analysis (2001) BioTechniques Press, Westborough, MA. 第 298 页 (ISBN 1-881299-21-X); Kontermann 和 Dubel 编辑, Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag, New York. 第 790 页 (ISBN 3-540-41354-5); Old, R. W. & S. B. Primrose, Principles of Gene Manipulation: An Introduction To Genetic Engineering (第 3 版 1985) Blackwell Scientific Publications, Boston. Studies in Microbiology; 第 2 卷: 第 409 页 (ISBN 0-632-01318-4); Sambrook, J. 等人编辑, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第 2 版 1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. 第 1-3 卷. (ISBN 0-87969-309-6); Winnacker, E. L. From Genes To Clones: Introduction To Gene Technology (1987) VCH Publishers, NY (由 Horst Ibelgauf 翻译). 第 634 页 (ISBN 0-89573-614-4); 所有这些整体通过引用并入本文)。

[0296] 尽管上文已描述许多实施方案和特征, 但本领域技术人员应当理解可以作出所述实施方案和特征的修饰和改变, 而不背离如附加权利要求中定义的本发明的公开内容。

[0297] 实施例 3: 经由斑点印迹的抗体选择性分析

为了表征单克隆抗 A $\beta$  (20-42) 球聚体抗体的选择性, 测试它们与不同 A $\beta$  形式的结合。为此, 制备范围为 100 pmol/ $\mu$ l - 0.00001 pmol/ $\mu$ l 的个别 A $\beta$  (1-42) 形式在补充有 0.2 mg/ml BSA 的 PBS 中的系列稀释物。将 1  $\mu$ l 每种稀释物点到硝酸纤维素膜上。通过与相应抗体 (0.2  $\mu$ g/ml) 一起孵育, 随后为使用过氧化物酶缀合的抗小鼠 IgG 和染色试剂 BM Blue POD Substrate (Roche) 的免疫染色进行检测。

[0298] 用于斑点印迹的 A $\beta$  标准:

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

将 1 mg A $\beta$  (1-42) (Bachem Inc., 目录号 H-1368) 溶解于 0.5 ml 0.1% NH<sub>4</sub>OH 的 H<sub>2</sub>O 溶液中 (新鲜制备的) (= 2 mg/ml), 并且立即在室温振荡 30 秒, 以获得澄清溶液。将样品贮存于 -20°C 直至使用时。

[0299] 2. A $\beta$  (1-40) 单体, 0.1% NH<sub>4</sub>OH

将 1 mg A $\beta$  (1-40) (Bachem Inc., 目录号 H-1368) 溶解于 0.5 ml 0.1% NH<sub>4</sub>OH 的 H<sub>2</sub>O 溶液中 (新鲜制备的) (= 2 mg/ml), 并且立即在室温振荡 30 秒, 以获得澄清溶液。将样品贮存于 -20°C 直至使用时。

[0300] 3. A $\beta$  (1-42) 单体, 0.1% NaOH

将 2.5 mg A $\beta$  (1-42) (Bachem Inc., 目录号 H-1368) 溶解于 0.5 ml 0.1% NaOH 的 H<sub>2</sub>O 溶液中 (新鲜制备的) (= 5 mg/ml), 并且立即在室温振荡 30 秒, 以获得澄清溶液。将样品贮存于 -20°C 直至使用时。

[0301] 4. A $\beta$  (1-40) 单体, 0.1% NaOH

将 2.5 mg A $\beta$  (1-40) (Bachem Inc., 目录号 H-1368) 溶解于 0.5 ml 0.1% NaOH 的 H<sub>2</sub>O 溶液中 (新鲜制备的) (= 5 mg/ml), 并且立即在室温振荡 30 秒, 以获得澄清溶液。将样品贮存于 -20°C 直至使用时。

[0302] 5. A $\beta$  (1-42) 球聚体

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

[0303] 6. A $\beta$  (12-42) 球聚体

A $\beta$  (12-42) 球聚体如实施例 1c 中所述制备。

[0304] 7. A $\beta$  (20-42) 球聚体

A $\beta$  (20-42) 球聚体如实施例 1b 中所述制备。

[0305] 8. A $\beta$  (1-42) 纤丝

将 1 mg A $\beta$  (1-42) (Bachem Inc. 目录号:H-1368) 溶解于 500  $\mu$ l 含水 0.1% NH<sub>4</sub>OH(Eppendorf 管) 中, 并且在室温搅拌 1 分钟。用 300  $\mu$ l 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>;140 mM NaCl, pH 7.4 将 100  $\mu$ l 这种新鲜制备的 A $\beta$  (1-42) 溶液中和。用 1% HCl 将 pH 调整至 pH 7.4。将样品在 37 $^{\circ}$ C 孵育 24 小时并且离心 (以 10000g 10 分钟)。弃去上清液, 并且通过涡旋 1 分钟用 400  $\mu$ l 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>;140 mM NaCl, pH 7.4 重悬浮纤丝沉淀。

[0306] 9. sAPP $\alpha$

通过 Sigma (目录号 S9564 ;在 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>;140 mM NaCl ;pH 7.4 中 25  $\mu$ g) 供应。用 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>;140 mM NaCl pH 7.4、0.2 mg/ml BSA 将 sAPP $\alpha$  稀释至 0.1 mg/ml (= 1pmol/ $\mu$ l)。

[0307] 用于斑点印迹的材料:

A $\beta$  标准 (参见上文 1. 至 9.) 在 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>;140 mM NaCl, pH 7.4 + 0.2 mg/ml BSA 中系列稀释, 以获得下述浓度:100 pmol/ $\mu$ l、10 pmol/ $\mu$ l、1 pmol/ $\mu$ l、0.1 pmol/ $\mu$ l、0.01 pmol/ $\mu$ l、0.001 pmol/ $\mu$ l、0.0001 pmol/ $\mu$ l 和 0.00001 pmol/ $\mu$ l。

[0308] 硝酸纤维素:反式斑点转移介质,纯硝酸纤维素膜 (0.45  $\mu$ m);BIO-RAD

抗-小鼠-POD: 目录号: 715-035-150 (Jackson Immuno Research)

检测试剂:BM Blue POD Substrate,沉淀,目录号:11442066001 (Roche)

牛血清白蛋白, (BSA):目录号:11926 (Serva)

封闭试剂:5% 低脂乳的 TBS 溶液

缓冲溶液:

TBS:25 mM Tris / HCl 缓冲液 pH 7.5 + 150 mM NaCl

TTBS:25 mM Tris / HCl - 缓冲液 pH 7.5 + 150 mM NaCl + 0.05%Tween 20

PBS + 0.2 mg/ml BSA:20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 缓冲液 pH 7.4 + 140 mM NaCl + 0.2 mg/ml

BSA

抗体溶液 I:溶于 20 ml 1% 低脂乳的 TBS 溶液中的 0.2  $\mu$ g/ml 抗体

抗体:

- 抗-A $\beta$  单克隆抗体克隆 6E10 ;浓度:1mg/ml ;目录号: SIG-39320 (Covance) ;贮存于 -80 $^{\circ}$ C

- 抗-A $\beta$  单克隆抗体克隆 m4C9 ;1.66 mg/ml OD 280 nm ;贮存于 -80 $^{\circ}$ C

- 抗-A $\beta$  单克隆抗体克隆 m10B3 ;1.66 mg/ml OD 280 nm ;贮存于 -80 $^{\circ}$ C

抗体溶液 II:抗小鼠-POD 在 1% 低脂乳的 TBS 溶液中的 1:5000 稀释物。

[0309] 斑点印迹程序:

1) 将各 1  $\mu$ l 的 8 个浓度的不同 A $\beta$  标准 (通过系列稀释获得) 以彼此约 1 cm 的距离点在硝酸纤维素膜上。

[0310] 2) 允许 A $\beta$  标准的斑点在硝酸纤维素膜上在空气中在室温 (RT) 干燥至少 10 分钟。(= 斑点印迹)。

[0311] 3) 封闭：

使斑点印迹与 30 ml 5% 低脂乳的 TBS 溶液一起在 RT 孵育 1.5 小时。

[0312] 4) 洗涤：

弃去封闭液，并且使斑点印迹与 20 ml TTBS 一起在振荡下在 RT 孵育 10 分钟。

[0313] 5) 抗体溶液 I：

弃去洗涤缓冲液，并且使斑点印迹与抗体溶液 I 一起在 RT 孵育 2 小时。

[0314] 6) 洗涤：

弃去抗体溶液 I，并且使斑点印迹与 20 ml TTBS 一起在振荡下在 RT 孵育 10 分钟。弃去洗涤液，并且使斑点印迹与 20 ml TTBS 一起在振荡下在 RT 孵育 10 分钟。弃去洗涤液，并且使斑点印迹与 20 ml TBS 一起在振荡下在 RT 孵育 10 分钟。

[0315] 7) 抗体溶液 II：

弃去洗涤缓冲液，并且使斑点印迹与抗体溶液 II 一起在 RT 孵育 1 小时。

[0316] 8) 洗涤：

弃去抗体溶液 II，并且使斑点印迹与 20 ml TTBS 一起在振荡下在 RT 孵育 10 分钟。弃去洗涤液，并且使斑点印迹与 20 ml TTBS 一起在振荡下在 RT 孵育 10 分钟。弃去洗涤液，并且使斑点印迹与 20 ml TBS 一起在振荡下在 RT 孵育 10 分钟。

[0317] 9) 显色：

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

[0318] 用不同的鼠单克隆抗 A $\beta$  抗体 (m6E10、m10B3 和 m4C9) 进行斑点印迹分析。通过用 A $\beta$  (20-42) 球聚体主动免疫小鼠并且随后选择融合的杂交瘤细胞而获得 m10B3 和 m4C9。将个别 A $\beta$  形式以系列稀释物应用，且与各自抗体一起孵育用于免疫反应 (1 = A $\beta$  (1-42) 单体, 0.1% NH<sub>4</sub>OH; 2 = A $\beta$  (1-40) 单体, 0.1% NH<sub>4</sub>OH; 3 = A $\beta$  (1-42) 单体, 0.1% NaOH; 4 = A $\beta$  (1-40) 单体, 0.1% NaOH; 5 = A $\beta$  (1-42) 球聚体; 6 = A $\beta$  (12-42) 球聚体; 7 = A $\beta$  (20-42) 球聚体; 8 = A $\beta$  (1-42) 纤丝制备物; 9 = sAPP $\alpha$  (Sigma); (首次斑点: 1pmol))。结果显示于图 30 和表 6 中。

[0319] 表 6：斑点印迹定量数据

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

### [0320] 实施例 4:血小板因子 4 交叉反应的测定

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

F96 Cert. Maxisorp NUNC-Immuno Plate 目录号 439454

结合抗体:

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

- 抗 A $\beta$  单克隆抗体克隆 m1G5;1.70 mg/ml OD 280 nm;贮存于 -80°C

- 抗 A $\beta$  单克隆抗体克隆 m4C9;1.66 mg/ml OD 280 nm;贮存于 -80°C

- 抗 A $\beta$  单克隆抗体克隆 m10B3;1.66 mg/ml OD 280 nm;贮存于 -80°C

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

包被缓冲液:100 mM 碳酸氢钠;pH 9.6

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

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

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

食蟹猴血浆:来自 13 个不同供体的食蟹猴 EDTA 血浆合并物;贮存于 -30°C

胰蛋白酶抑制剂:Sigma 目录号 T7902

一抗:pRab-HPF4;0.5mg/ml;Abcam 目录号 ab9561

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

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

终止液:2 M 硫酸

在试剂制备中使用的方法:

结合抗体:

将结合抗体在包被缓冲液中稀释至 10  $\mu$ g/ml。

[0321] 封闭液:

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

[0322] 食蟹猴 (cynomolgus) (食蟹猴 (*Macaca fascicularis*)) 血浆原液的制备:

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

[0323] 食蟹猴血浆原液的稀释系列:

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

[0324] 一抗溶液:

将一抗在 PBST + 0.5% BSA 缓冲液中稀释至 1 $\mu$ g/ml。稀释因子是 1:500。抗体溶液立即使用。

[0325] 标记试剂:

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

[0326] TMB 溶液:

将 20 ml 100 mM 乙酸钠, pH4.9 与 200  $\mu$ l 的 TMB 原液和 29.5  $\mu$ l 3% 过氧化物溶液混合。该溶液立即使用。

[0327] 标准板设置。食蟹猴血浆的稀释度。注意每种样品一式两份地运行。



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

[0328] 使用的程序：

1. 应用 100  $\mu$ l 结合抗体溶液 / 孔, 且在 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。

[0329] 2. 弃去抗体溶液, 并且将孔用 250  $\mu$ l PBST 缓冲液洗涤三次。

[0330] 3. 加入 265  $\mu$ l 封闭液 / 孔, 并且在室温孵育 1.5 小时。

[0331] 4. 弃去封闭液, 并且将孔用 250  $\mu$ l PBST 缓冲液洗涤三次。

[0332] 5. 在食蟹猴血浆的稀释系列制备后, 将 100  $\mu$ l / 孔的这些稀释物应用于板。将板在室温孵育 2 小时。

[0333] 6. 弃去食蟹猴血浆稀释物, 并且将孔用 250  $\mu$ l PBST 缓冲液洗涤三次。

[0334] 7. 加入 100  $\mu$ l 一抗溶液 / 孔, 并且在室温孵育 1 小时。

[0335] 8. 弃去一抗溶液, 并且将孔用 250  $\mu$ l PBST 缓冲液洗涤三次。

[0336] 9. 加入 200  $\mu$ l 标记溶液 / 孔, 并且在室温孵育 1 小时。

[0337] 10. 弃去标记溶液, 并且将孔用 250  $\mu$ l PBST 缓冲液洗涤三次。

[0338] 11. 将 100 $\mu$ l TMB 溶液加入每个孔中。

[0339] 12. 在显色过程中 (在环境温度 5 - 15 分钟) 监控板颜色, 并且当合适颜色已显现时, 通过加入 50  $\mu$ l / 孔的终止液终止反应。

[0340] 13. 在 450 nm 处读出吸光度。

[0341] 数据分析：

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

- 基线设为 Y=0.0。

- 最低峰高: 忽视小于从最小值到最大值的距离 Y 的 10% 的峰。

- 峰方向: 通过定义, 所有峰都必须超过基线。

[0342] 对于每种个别抗体,使用商购可得的抗 HPF4 抗体 (Abcam 目录号 :ab49735) 作为用于 PF4 识别的参考抗体来计算 PF4 甄别因子,其中

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

结果显示于图 31A 和表 7 中。

[0343] 实施例 4.2 :经由夹心 ELISA 在人血浆中与血小板因子 4 的交叉反应的测定使用与用于实施例 4.1 相同的试剂和用于试剂制备的程序,除了 :

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

[0344] A) 人血浆稀释物的制备 :

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

[0345] B) HPF4 原液的制备 :

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

[0346] C) 由 10 ng/ml HPF4 掺料的人血浆原液的制备 :

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

[0347] 关于用 HPF4 掺料的人血浆的夹心 ELISA 的稀释系列制备、标准板设置、实验程序 and 数据分析类似于实施例 4.1 中对于用食蟹猴血浆的夹心 ELISA 描述的那些。

[0348] 结果显示于图 31B 和表 7 中。

[0349] 表 7 : 在图 31A 和 31B 中描述的由对数转化数据计算的 AUC (或峰总面积)

		阳性对照 抗HPF4	mAb m1G5 <sup>1</sup>	mAb 4C9	mAb 10B3	阴性对照 mIgG2a
食蟹猴血浆 (数据来自 图 31A)	曲线下面积 <sup>2</sup>	2.681	0.861	0.067	0.103	0.005
	比 HPF4 / aAβ 抗体	1	3	40	26	517
人血浆 (数据来自 图 31B)	曲线下面积 <sup>2</sup>	1.986	0.311	0.047	0.079	0.006
	比 HPF4 / aAβ 抗体	1	6	43	25	331

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

<sup>2</sup>曲线下面积如实施例 4.1 中所述计算。

[0350] 实施例 4.3 :经由比对夹心 ELISA 在食蟹猴血浆中与血小板因子 4 的交叉反应的

## 测定

使用实施例 4.1 中所述的试剂和比对抗体抗小鼠 IgG(Fc 特异性;山羊中生产的; Sigma 目录号:M3534;2.3 mg/ml;贮存于  $-20^{\circ}\text{C}$ )。

[0351] 在试剂的制备中使用的方法:

封闭液、一抗和 TMB 溶液如实施例 4.1 中所述制备。

[0352] 将比对抗体在包被缓冲液中稀释至  $50\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0353] 每种结合抗体用 PBST + 0.5% BSA 缓冲液稀释至  $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$  (原液), 并且稀释系列如下制备:

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

[0354] 食蟹猴血浆:

将 100 $\mu\text{l}$  食蟹猴血浆合并物以 10000  $g$  离心 10 分钟。取出 316  $\mu\text{l}$  上清液且用 684  $\mu\text{l}$  PBST + 0.5% BSA 稀释 (= 1:3.16 稀释度)。随后加入 10  $\mu\text{l}$  10 mg/ml 胰蛋白酶抑制剂的  $\text{H}_2\text{O}$  溶液。在室温孵育 10 分钟后, 将样品通过 0.22  $\mu\text{m}$  滤器 (Millipore 目录号 SLGS0250S) 过滤。然后用 15.3 ml PBST + 0.5% BSA 缓冲液将 500  $\mu\text{l}$  这种 1:3.16 稀释的血浆样品再次 1:31.6 稀释, 导致 1:100 的总稀释度。

[0355] 标记试剂:

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

[0356] 结合抗体板设置。结合抗体的稀释度。注意每种结合抗体的每个浓度一式两份地运行。

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

[0357] 使用的程序：

1. 应用 100  $\mu$ l 比对抗体溶液 / 孔, 且在 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。
- [0358] 2. 弃去抗体溶液, 并且将孔用 250  $\mu$ l PBST 缓冲液洗涤三次。
- [0359] 3. 加入 265  $\mu$ l 封闭液 / 孔, 并且在室温孵育 2 小时。
- [0360] 4. 弃去封闭液, 并且将孔用 250  $\mu$ l PBST 缓冲液洗涤三次。
- [0361] 5. 在每种结合抗体的稀释系列制备后, 将 100  $\mu$ l / 孔的这些抗体稀释物应用于板。将板在室温孵育 2 小时。
- [0362] 6. 弃去抗体溶液, 并且将孔用 250  $\mu$ l PBST 缓冲液洗涤三次。
- [0363] 7. 加入 100 $\mu$ l 食蟹猴血浆的 1:100 稀释物 / 孔, 并且在室温孵育 2 小时。
- [0364] 8. 弃去血浆溶液, 并且将孔用 250  $\mu$ l PBST 缓冲液洗涤三次。
- [0365] 9. 加入 100  $\mu$ l 一抗溶液 / 孔, 并且在室温孵育 1 小时。
- [0366] 10. 弃去一抗溶液, 并且将孔用 250  $\mu$ l PBST 缓冲液洗涤三次。
- [0367] 11. 加入 200  $\mu$ l 标记试剂 / 孔, 并且在室温孵育 1 小时。
- [0368] 12. 弃去标记试剂, 并且将孔用 250  $\mu$ l PBST 缓冲液洗涤三次。
- [0369] 13. 将 100 $\mu$ l TMB 溶液加入每个孔中。
- [0370] 14. 在显色过程中 (在环境温度 5 - 15 分钟) 监控板颜色, 并且当合适颜色已显现时, 通过加入 50  $\mu$ l / 孔的终止液终止反应。
- [0371] 15. 在 450 nm 处读出吸光度。

[0372] 数据分析如实施例 4.1 中对于用食蟹猴血浆的夹心 ELISA 所述的进行, 除了不是血浆稀释因子而是抗体的量 (以 ng/ml 表示) 用作 X 值, 并且因此计算浓度效应曲线。相应地, 基于在测量范围中 (10 ng/ml - 10000 ng/ml 的最终抗体浓度) 的非曲线拟合的数据、对数转化的 X 值和 OD450nm 值, 测定曲线下面积。

[0373] 结果显示于图 32A 和表 8 中。

[0374] 实施例 4.4 : 经由比对夹心 ELISA 在人血浆中与血小板因子 4 的交叉反应的测定使用与用于实施例 4.3 相同的试剂和用于试剂制备的程序, 除了：

比对抗体在包被缓冲液中稀释至 50  $\mu$ g / ml。

[0375] 使用由人 PF4 (7.3 mg/ml ; Molecular Innovation 目录号 HPF4 ; 贮存于 -30 $^{\circ}$ C) 掺料的人血浆 (来自 4 个不同供体的人 EDTA 血浆合并物 ; 贮存于 -30 $^{\circ}$ C), 代替食蟹猴血浆。PF4 掺料的人血浆原液如下制备。

[0376] A) 人血浆稀释物的制备：

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

[0377] B)HPF4 原液的制备:

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

[0378] C) 由10 ng/ml HPF4 掺料的人血浆原液的制备:

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

[0379] 结合抗体的稀释系列制备;结合抗体板设置;封闭液、一抗、标记试剂和TMB溶液的制备与实施例4.3中相同。

[0380] 关于用HPF4 掺料的人血浆的比对夹心ELISA 的实验程序(但使用步骤7中1:10 的稀释的人血浆)和数据分析类似于实施例4.3中对于用食蟹猴血浆的比对夹心ELISA 描述的那种。

[0381] 结果显示于图32B 和表8中。

[0382] 表8: 在图32A 和32B 中描述的由对数转化数据计算的AUC(或峰总面积)

		阳性对照 抗HPF4	mAb m1G5 <sup>1</sup>	mAb 4C9	mAb 10B3	阳性对照 mIgG2a
食蟹猴血浆 (数据来自 图32A)	曲线下面积 <sup>2</sup>	4.781	0.277	0.027	0.054	0.015
	比 HPF4/aA $\beta$ 抗体	1	17	179	89	325
人血浆 (数据来自 图32B)	曲线下面积 <sup>2</sup>	3.844	0.165	0.018	0.053	0.033
	比 HPF4/aA $\beta$ 抗体	1	23	212	72	118

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

<sup>2</sup>)曲线下面积如实施例4.3中所述计算。





<222> (70).. (70)  
 <223> Xaa 可以是 Ile 或 Leu  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (72).. (72)  
 <223> Xaa 可以是 Ala 或 Val  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (97).. (97)  
 <223> Xaa 可以是 Ala 或 Thr  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (98).. (98)  
 <223> Xaa 可以是 Arg 或 Thr  
 <400> 3  
 Xaa Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Xaa  
 1                    5                    10                    15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Xaa Thr Phe Xaa Ser Tyr  
                   20                    25                    30  
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Xaa  
                   35                    40                    45  
 Gly Arg Ile Asp Pro Lys Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Thr Glu Lys Phe  
                   50                    55                    60  
 Lys Ser Arg Xaa Thr Xaa Thr Xaa Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65                    70                    75                    80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                   85                    90                    95  
 Xaa Xaa Met Ser Lys Leu Ser Gly Thr His Ala Trp Phe Ala Tyr Trp  
                   100                    105                    110  
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
                   115                    120  
 <210> 4  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> 合成的  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1).. (1)  
 <223> Xaa 可以是 Gln 或 Glu



<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (48).. (48)  
 <223> Xaa 可以是 Met 或 Ile  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (68).. (68)  
 <223> Xaa 可以是 Phe 或 Ala  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (70).. (70)  
 <223> Xaa 可以是 Phe 或 Leu  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (72).. (72)  
 <223> Xaa 可以是 Leu 或 Val  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (74).. (74)  
 <223> Xaa 可以是 Thr 或 Lys  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (97).. (97)  
 <223> Xaa 可以是 Ala 或 Thr  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (98).. (98)  
 <223> Xaa 可以是 Arg 或 Thr  
 <400> 4

Xaa	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ser	Glu	Leu	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5							10				15
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr
				20							25				30
Trp	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Xaa
				35							40				45
Gly	Arg	Ile	Asp	Pro	Lys	Ser	Gly	Asp	Thr	Lys	Tyr	Thr	Glu	Lys	Phe
				50							55				60
Lys	Ser	Arg	Xaa	Val	Xaa	Ser	Xaa	Asp	Xaa	Ser	Val	Ser	Thr	Ala	Tyr
65											70				75
															80



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

<210> 7

<211> 122

<212> PRT

<213> 合成的

<400> 7

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

<210> 8

<211> 122

<212> PRT

<213> 合成的

<400> 8

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

<210> 9

<211> 122

<212> PRT

<213> 合成的

<400> 9

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

<210> 10

<211> 122

<212> PRT

<213> 合成的

<400> 10

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

<210> 11

<211> 122

<212> PRT

<213> 合成的

<400> 11

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

	100		105		110										
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser						
	115		120												
<210>	12														
<211>	122														
<212>	PRT														
<213>	合成的														
<400>	12														
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ser	Glu	Leu	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1			5					10					15		
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr
	20						25						30		
Trp	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
	35					40						45			
Gly	Arg	Ile	Asp	Pro	Lys	Ser	Gly	Asp	Thr	Lys	Tyr	Thr	Glu	Lys	Phe
	50					55					60				
Lys	Ser	Arg	Ala	Val	Leu	Ser	Val	Asp	Lys	Ser	Val	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70				75					80	
Leu	Gln	Ile	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85					90					95		
Thr	Thr	Met	Ser	Lys	Leu	Ser	Gly	Thr	His	Ala	Trp	Phe	Ala	Tyr	Trp
	100						105						110		
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser						
	115						120								
<210>	13														
<211>	122														
<212>	PRT														
<213>	合成的														
<400>	13														
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ser	Glu	Leu	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1			5					10					15		
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr
	20						25						30		
Trp	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
	35					40						45			
Gly	Arg	Ile	Asp	Pro	Lys	Ser	Gly	Asp	Thr	Lys	Tyr	Thr	Glu	Lys	Phe
	50					55					60				
Lys	Ser	Arg	Phe	Val	Phe	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Val	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70				75					80	









Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Arg Thr Ile His Tyr Ala Asp Thr Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Pro Lys Asn Thr Leu Phe  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Thr Leu Leu Arg Leu His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110  
 Ile Leu Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 26

<211> 113

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 26

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

Lys

<210> 27

<211> 118

<212> PRT

<213> 合成的

<220>

<221> misc\_feature

<222> (49).. (49)

<223> Xaa 可以是 Ser 或 Ala

<400> 27

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

<210> 28

<211> 113

<212> PRT

<213> 合成的

<220>

<221> misc\_feature

<222> (49).. (49)

<223> Xaa 可以是 Pro 或 Ser

<400> 28

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

Lys

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 118

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 合成的

&lt;400&gt; 29

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Arg Thr Ile His Tyr Ala Asp Thr Val  
      50                   55                   60

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

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

Ala Arg Thr Leu Leu Arg Leu His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
          100                   105                   110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
          115

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 118

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 合成的

&lt;400&gt; 30

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

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

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

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Arg Thr Ile His Tyr Ala Asp Thr Val  
      50                   55                   60

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

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

Ala Arg Thr Leu Leu Arg Leu His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 31

<211> 113

<212> PRT

<213> 合成的

<400> 31

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser  
 20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
 35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln  
 85 90 95

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

Lys

<210> 32

<211> 113

<212> PRT

<213> 合成的

<400> 32

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser  
 20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
 35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 65 70 75 80



<400> 37

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 38

Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Trp Thr

1 5

<210> 41

<211> 330

<212> PRT

<213> 智人

<400> 41

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Phe 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 Val 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 Glu Glu  
 225 230 235 240  
 Met 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> 42

<211> 330

<212> PRT

<213> 合成的

<400> 42

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 Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 100 105 110  
 Pro Ala Pro Glu Ala Ala 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 Glu Glu  
 225 230 235 240  
 Met 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> 43

<211> 106

<212> PRT

<213> 智人

<400> 43

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
 1 5 10 15  
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr  
 20 25 30  
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser  
 35 40 45  
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
 50 55 60



<213> 合成的

<400> 46

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys

1                    5                    10                    15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile

                  20                    25                    30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala

                  35                    40

<210> 47

<211> 40

<212> PRT

<213> 合成的

<400> 47

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys

1                    5                    10                    15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile

                  20                    25                    30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val

                  35                    40

<210> 48

<211> 31

<212> PRT

<213> 合成的

<400> 48

Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn

1                    5                    10                    15

Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala

                  20                    25                    30

<210> 49

<211> 23

<212> PRT

<213> 合成的

<400> 49

Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met

1                    5                    10                    15

Val Gly Gly Val Val Ile Ala

                  20

<210> 50

<211> 30

<212> PRT

<213> 智人

<400> 50

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

1                   5                   10                   15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser

                  20                   25                   30

<210> 51

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人

<400> 51

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly

1                   5                   10

<210> 52

<211> 32

<212> PRT

<213> 智人

<400> 52

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu

1                   5                   10                   15

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

                  20                   25                   30

<210> 53

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

<400> 53

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1                   5                   10

<210> 54

<211> 30

<212> PRT

<213> 智人

<400> 54

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala

1                   5                   10                   15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr

                  20                   25                   30

<210> 55

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人

<400> 55

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly

1                    5                    10

<210> 56

<211> 32

<212> PRT

<213> 智人

<400> 56

Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr Leu Gln

1                    5                    10                    15

Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

                  20                    25                    30

<210> 57

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

<400> 57

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1                    5                    10

<210> 58

<211> 23

<212> PRT

<213> 智人

<400> 58

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1                    5                    10                    15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 59

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 59

Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr

1                    5                    10                    15

<210> 60

<211> 32

<212> PRT

<213> 智人

<400> 60

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 1                   5                   10                   15  
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys  
                   20                   25                   30

<210> 61

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人

<400> 61

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 1                   5                   10

<210> 62

<211> 30

<212> PRT

<213> 智人

<400> 62

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1                   5                   10                   15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser  
                   20                   25                   30

<210> 63

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人

<400> 63

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser  
 1                   5                   10

<210> 64

<211> 32

<212> PRT

<213> 智人

<400> 64

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln  
 1                   5                   10                   15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 20 25 30

<210> 65  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 65

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 1 5 10

<210> 66  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 66

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys  
 20

<210> 67  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 67

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
 1 5 10 15

<210> 68  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 68

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

<210> 69  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 69





SEQ ID NO:1

QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKAPGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGRIDP  
KSGDTKYTEKFKSKATLTVDKPSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTTMSKLSGTH  
AWFAYWGQGLTLTVSA

图 1

SEQ ID NO:2

DIKMTQSPSSMYASLGERTITCKASQDINSYLTWVQKPKGKSPKTLIYRANR  
LVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSLEYEDMGIYYCLQYDEFPLTFGAGTK-  
 LELK

图 2

SEQ ID NO:3

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

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

图 3

SEQ ID NO:4

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

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

图 4

## SEQ ID NO:5

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWFOQKPG-  
KAPKX<sup>46</sup>LIYRANRLVDGVPSTRFSGSGSGTDX<sup>71</sup>TLTISSLQPEDFATYYCLQYD  
EFPLTFGQGTKLEIK

X<sup>46</sup>是S或L或T.

X<sup>71</sup>是F或Y.

图 5

## SEQ ID NO:6

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYWMHWVRQAPGQGLEWMGRIDP  
KSGDTKYTEKFKSRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARMKLSGTH  
AWFAYWGQGTLLVTVSS

图 6

## SEQ ID NO:7

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSSYWMHWVRQAPGQGLEWMGRIDP  
KSGDTKYTEKFKSRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARMKLSGTH  
AWFAYWGQGTLLVTVSS

图 7

## SEQ ID NO:8

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSSYWMHWVRQAPGQGLEWIGRIDP  
KSGDTKYTEKFKSRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTTMSKLSGTH  
AWFAYWGQGTLLVTVSS

图 8

SEQ ID NO:9

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGGLEWMGRIDP  
KSGDTKYTEKFKSRVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCATMSKLSGTH  
AWFAYWGQGTLVTVSS

图 9

SEQ ID NO:10

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGGLEWMGRIDP  
KSGDTKYTEKFKSRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARMSKLSGTH  
AWFAYWGQGTLVTVSS

图 10

SEQ ID NO:11

EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGGLEWMGRIDP  
KSGDTKYTEKFKSRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARMSKLSGTH  
AWFAYWGQGTLVTVSS

图 11

SEQ ID NO:12

EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGGLEWIGRIDP  
KSGDTKYTEKFKSRVLSVDKSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCTTMSKLSGTH  
AWFAYWGQGTLVTVSS

图 12

SEQ ID NO:13

EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGGLEWMGRIDP  
KSGDTKYTEKFKSRFVFSVDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCATMSKLSGTH  
AWFAYWGQGTLVTVSS

图 13

SEQ ID NO:14

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKSLIYRANR  
LVDGVPSRFSSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQYDEFPLTFGQGTK-  
LEIK

图 14

SEQ ID NO:15

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKLLIYRANR  
LVDGVPSRFSSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQYDEFPLTFGQGTK-  
LEIK

图 15

SEQ ID NO:16

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKTLIYRANR  
LVDGVPSRFSSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCLQYDEFPLTFGQGTK-  
LEIK

图 16







SEQ ID NO:26

DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLYSGNQKNFLAWYQQKPGQSPKLL  
IYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYYCQQYYSPWTFGG  
DTKLEIK

图 21

SEQ ID NO:27

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYEMVWVRQAPGKGLEWVX<sup>49</sup>YIS  
SGSRTIHYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTLLRLHF  
DYWGQGTLLTVSS

X<sup>49</sup>是S或A.

图 22

SEQ ID NO:28

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSGNQKNFLAWYQQKPGQX<sup>49</sup>PKL  
LIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSPWTFG  
GGTKVEIK

X<sup>49</sup>是P或S.

图 23

SEQ ID NO:29

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYEMVWVRQAPGKGLEWVSYISS  
GSRTIHYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTLLRLHFD  
YWGQGTLLTVSS

图 24



SEQ ID NO:30

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYEMVWVRQAPGKGLEWVAYISS  
GSRTIHYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTLLRLHFD  
YWGQGTLLVTVSS

图 25

SEQ ID NO:31

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSGNQKNFLAWYQQKPGQPPKLL  
IYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYSYPWTFG-  
GGTKVEIK

图 26

SEQ ID NO:32

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSGNQKNFLAWYQQKPGQSPKLL  
IYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYSYPWTFG-  
GGTKVEIK

图 27





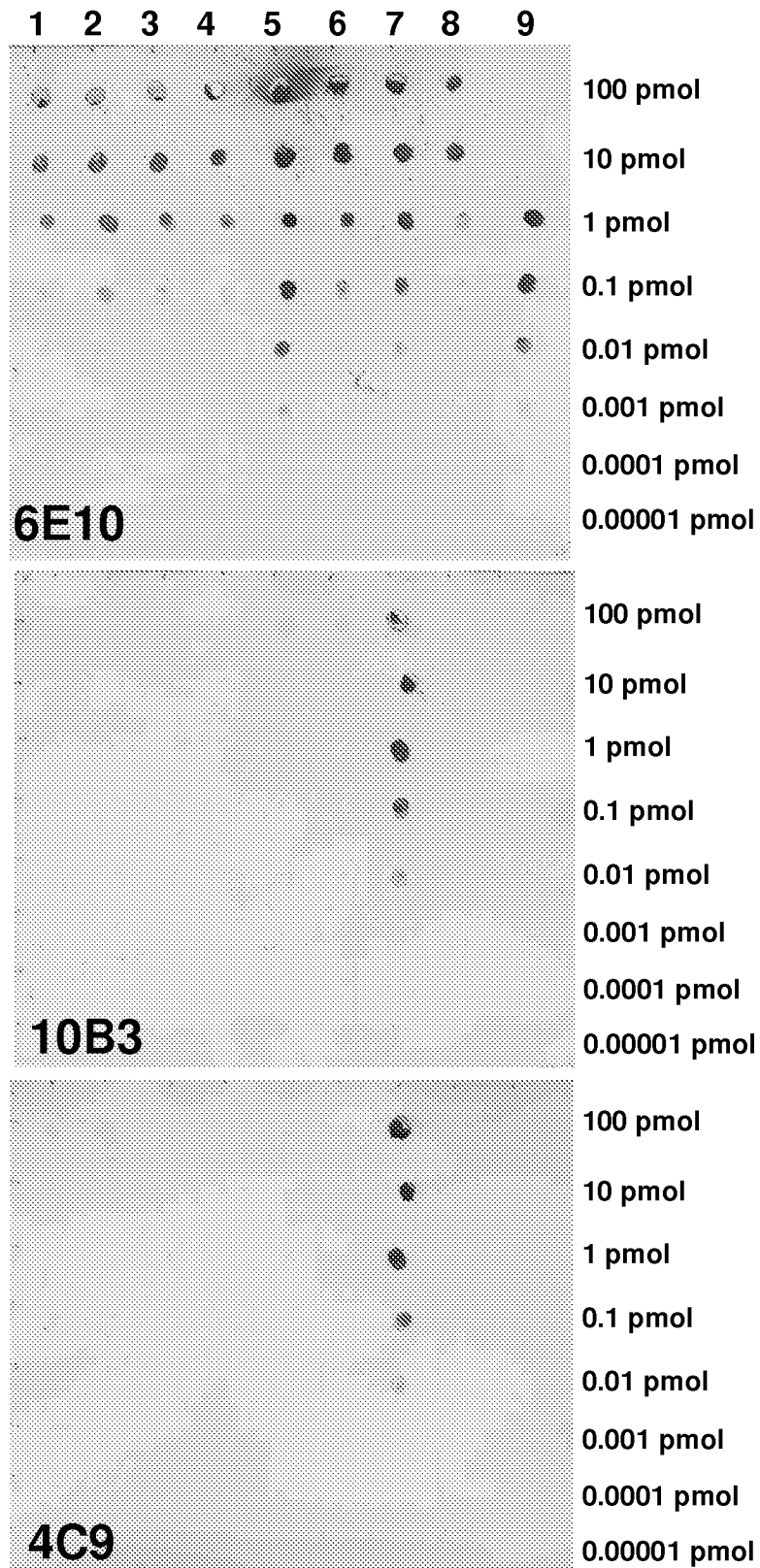
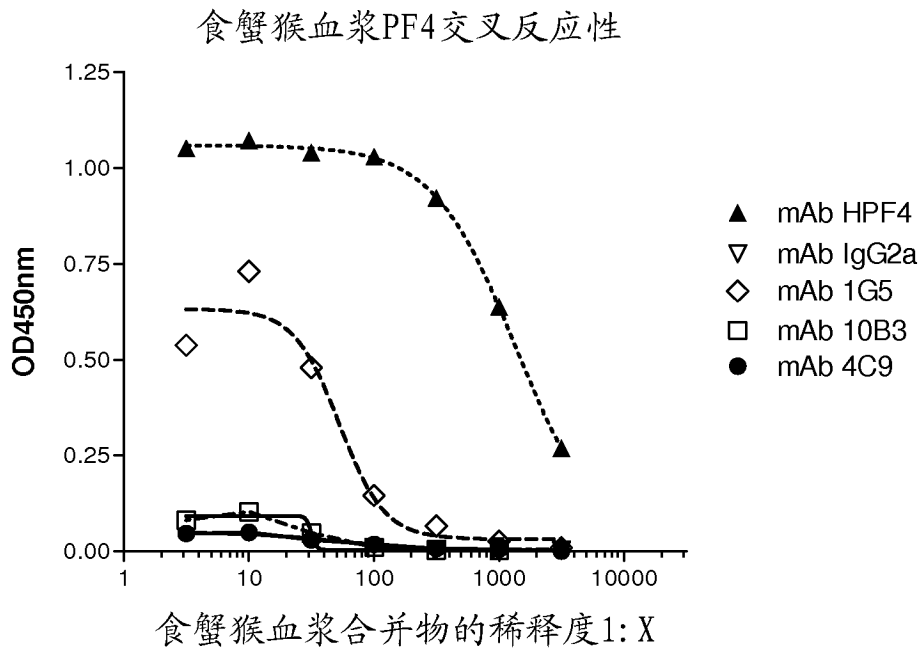
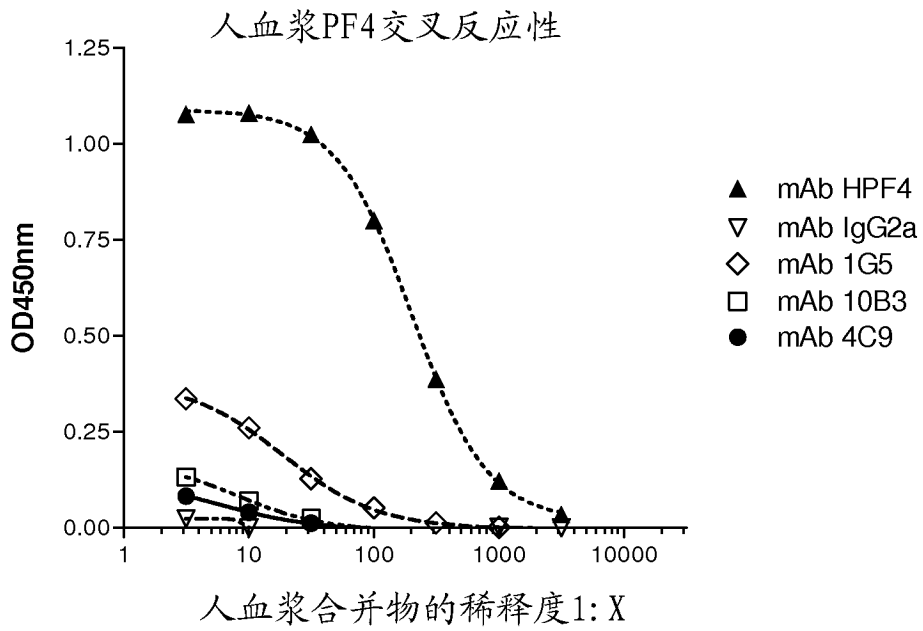


图 30



A



B

图 31

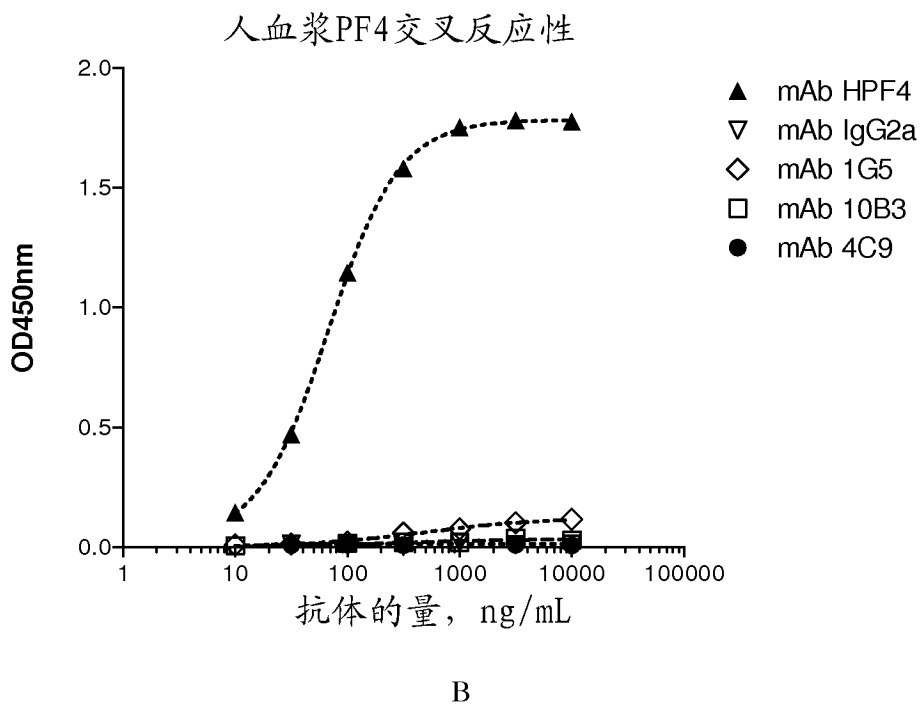
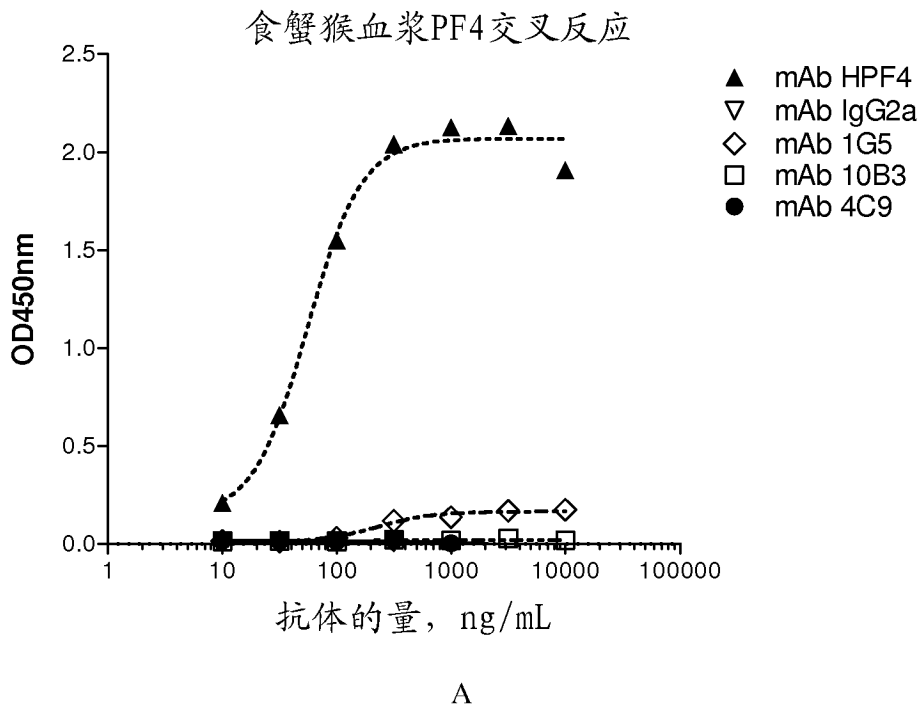


图 32