



# (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111315213 B

(45) 授权公告日 2023. 09. 12

(21) 申请号 201880071788.1  
 (22) 申请日 2018.10.05  
 (65) 同一申请的已公布的文献号  
 申请公布号 CN 111315213 A  
 (43) 申请公布日 2020.06.19  
 (30) 优先权数据  
 62/569,436 2017.10.06 US  
 62/598,965 2017.12.14 US  
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日  
 2020.05.06  
 (86) PCT国际申请的申请数据  
 PCT/US2018/054720 2018.10.05  
 (87) PCT国际申请的公布数据  
 W02019/071205 EN 2019.04.11  
 (73) 专利权人 普罗塞纳生物科学有限公司  
 地址 爱尔兰,都柏林  
 (72) 发明人 J·R·萨尔曼 S·亚历山大  
 R·巴布尔 J·N·海加凯  
 塔洛陈·S·尼扎

(74) 专利代理机构 北京市铸成律师事务所  
 11313  
 专利代理师 郗名悦 刘文娜

(51) Int.Cl.  
 A61K 49/00 (2006.01)

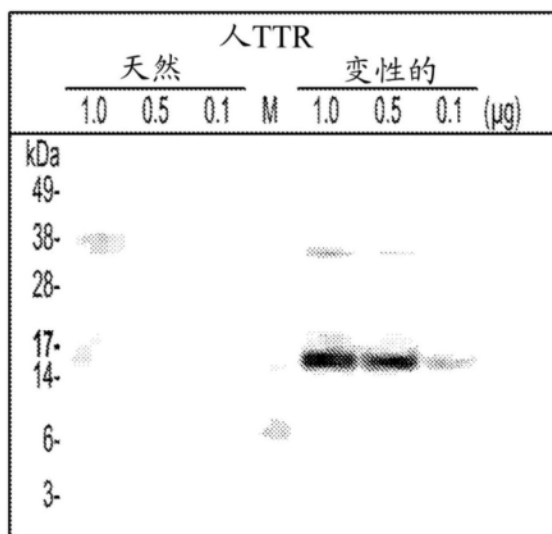
(56) 对比文件  
 WO 2016120809 A1,2016.08.04  
 WO 2008005455 A2,2008.01.10  
 EP 2044443 A2,2009.04.08  
 WO 2014142334 A1,2014.09.18  
 WO 2015092077 A1,2015.06.25  
 US 2014056904 A1,2014.02.27  
 TW 201636371 A,2016.10.16  
 CN 103492882 A,2014.01.01  
 WO 2006108234 A1,2006.10.19  
 CN 106255702 A,2016.12.21  
 Jeffrey N. Higaki等.Novel  
 conformation-specific monoclonal  
 antibodies against amyloidogenic forms of  
 transthyretin.《Amyloid》.pubmed,2016,第23  
 卷(第2期),

审查员 蒋超

权利要求书3页 说明书73页  
 序列表39页 附图3页

(54) 发明名称  
 抗甲状腺素运载蛋白抗体

(57) 摘要  
 本发明提供特异性结合到甲状腺素运载蛋白(TTR)的抗体。所述抗体可用于治疗或实现预防与TTR积累或TTR沉积物积累相关的疾病或病症(例如,TTR淀粉样变性)。除了其他应用之外,所述抗体还可用于诊断TTR淀粉样变性以及抑制或减少TTR的聚集,以及用于监测TTR疗法的功效。



1. 一种结合人甲状腺素运载蛋白 (TTR) 的抗体, 其包含成熟重链可变区, 所述成熟重链可变区包含三个Kabat重链CDR, SEQ ID NO:93的CDR-H1、SEQ ID NO:7的CDR-H2和SEQ ID NO:9的CDR-H3; 和成熟轻链可变区, 所述成熟轻链可变区包含三个Kabat轻链CDR, SEQ ID NO:11的CDR-L1、SEQ ID NO:13的CDR-L2和SEQ ID NO:15的CDR-L3。

2. 如权利要求1所述的抗体, 其中成熟重链可变区包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列和成熟轻链可变区包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列。

3. 如权利要求1所述的抗体, 其为嵌合抗体、人源化抗体或贴面化抗体。

4. 如权利要求3所述的抗体, 其中所述抗体为人源化抗体。

5. 如权利要求1所述的抗体, 其具有人IgG1同种型。

6. 如权利要求1所述的抗体, 其具有人IgG2或IgG4同种型。

7. 如权利要求4所述的抗体, 其包含具有与SEQ ID NO:85-86中的任一个的至少90%同一性的氨基酸序列的人源化成熟重链可变区和具有与SEQ ID NO:91-92中的任一个的至少90%同一性的氨基酸序列的人源化成熟轻链可变区。

8. 如权利要求7所述的抗体, 其中以下位置中的至少一个被指定的氨基酸占据: H37被V或A占据、H45被L或Q占据、H47被L或W占据、H48被V或I占据、H49被A或G占据并且H94被S或R占据, 其中位置根据Kabat定义编号。

9. 如权利要求8所述的抗体, 其中所述VH区中的位置H37、H45、H47、H48、H49和H94分别被A、Q、W、I、G和R占据, 其中位置根据Kabat定义编号。

10. 如权利要求7所述的抗体, 其中以下位置中的至少一个被指定的氨基酸占据: L2被I或V占据并且L45被Q或R占据, 其中位置根据Kabat定义编号。

11. 如权利要求10所述的抗体, 其中所述VL区中的位置L2和L45分别被V和R占据, 其中位置根据Kabat定义编号。

12. 如权利要求7所述的抗体, 其包含具有与SEQ ID NO:85-86中的任一个的至少95%同一性的氨基酸序列的成熟重链可变区和具有与SEQ ID NO:91-92中的任一个的至少95%同一性的氨基酸序列的成熟轻链可变区。

13. 如权利要求12所述的抗体, 其包含具有与SEQ ID NO:85-86中的任一个的至少98%同一性的氨基酸序列的成熟重链可变区和具有与SEQ ID NO:91-92中的任一个的至少98%同一性的氨基酸序列的成熟轻链可变区。

14. 如权利要求13所述的抗体, 其中所述成熟重链可变区具有SEQ ID NO:85-86中的任一个的氨基酸序列, 并且所述成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:91-92中的任一个的氨基酸序列。

15. 如权利要求14所述的抗体, 其中所述成熟重链可变区具有SEQ ID NO:85的氨基酸序列, 并且所述成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:91的氨基酸序列。

16. 如权利要求14所述的抗体, 其中所述成熟重链可变区具有SEQ ID NO:85的氨基酸序列, 并且所述成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:92的氨基酸序列。

17. 如权利要求14所述的抗体, 其中所述成熟重链可变区具有SEQ ID NO:86的氨基酸序列, 并且所述成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:91的氨基酸序列。

18. 如权利要求14所述的抗体, 其中所述成熟重链可变区具有SEQ ID NO:86的氨基酸序列, 并且所述成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:92的氨基酸序列。

19. 如权利要求1所述的抗体,其为完整抗体。
20. 如权利要求1所述的抗体,其为结合片段。
21. 如权利要求20所述的抗体,其中所述结合片段为单链抗体、Fab或F(ab')<sub>2</sub>片段。
22. 如权利要求19所述的抗体,其中所述成熟轻链可变区与轻链恒定区融合,并且所述成熟重链可变区与重链恒定区融合。
23. 如权利要求22所述的抗体,其中所述重链恒定区为天然人重链恒定区的突变形式,所述突变形式与Fc $\gamma$ 受体的结合相对于所述天然人重链恒定区减少。
24. 如权利要求22或23所述的抗体,其中所述重链恒定区具有IgG1同种型。
25. 如权利要求22所述的抗体,其中所述成熟重链可变区与具有含或不含C端赖氨酸的SEQ ID NO:22的序列的重链恒定区融合,并且/或者所述成熟轻链可变区与具有SEQ ID NO:24的序列的轻链恒定区融合。
26. 一种药物组合物,其包含第一抗体和第二抗体以及药学上可接受的载剂,其中第一抗体是如权利要求1所述的抗体,并且其中第二抗体选自由包含SEQ ID NO:75-77的三个重链CDR和SEQ ID NO:78-80的三个轻链CDR的抗体、ATCC保存号PTA-124079的14G8或其嵌合版本或人源化版本、ATCC保存号PTA-124080的5A1或其嵌合版本或人源化版本、包含SEQ ID NO:52-54的三个重链CDR和SEQ ID NO:55-57的三个轻链CDR的抗体、包含SEQ ID NO:58的重链可变区和SEQ ID NO:59的轻链可变区的抗体、包含SEQ ID NO:60-62的三个重链CDR和SEQ ID NO:63-65的三个轻链CDR的抗体、和包含SEQ ID NO:66-68的三个重链CDR和SEQ ID NO:69-71的三个轻链CDR的抗体组成的组。
27. 一种双特异性抗体,其包含第一抗原结合区和第二抗原结合区,其中第一抗原结合结构域包含成熟重链可变区,所述成熟重链可变区包含三个Kabat重链CDR,SEQ ID NO:93的CDR-H1、SEQ ID NO:7的CDR-H2和SEQ ID NO:9的CDR-H3;和成熟轻链可变区,所述成熟轻链可变区包含三个Kabat轻链CDR,SEQ ID NO:11的CDR-L1、SEQ ID NO:13的CDR-L2和SEQ ID NO:15的CDR-L3;并且其中第二抗原结合结构域选自由包含SEQ ID NO:75-77的三个重链CDR和SEQ ID NO:78-80的三个轻链CDR的抗原结合结构域、ATCC保存号PTA-124079的14G8或其嵌合版本或人源化版本、ATCC保存号PTA-124080的5A1或其嵌合版本或人源化版本、包含SEQ ID NO:52-54的三个重链CDR和SEQ ID NO:55-57的三个轻链CDR的抗原结合结构域、包含SEQ ID NO:58的重链可变区和SEQ ID NO:59的轻链可变区的抗原结合结构域、包含SEQ ID NO:60-62的三个重链CDR和SEQ ID NO:63-65的三个轻链CDR的抗原结合结构域、和包含SEQ ID NO:66-68的三个重链CDR和SEQ ID NO:69-71的三个轻链CDR的抗原结合结构域组成的组。
28. 一种药物组合物,其包含如权利要求1至25中任一项所述的抗体或如权利要求27所述的双特异性抗体和药学上可接受的载剂。
29. 一种核酸,其编码如权利要求1至25中任一项所述的抗体或如权利要求27所述的双特异性抗体的重链和轻链。
30. 核酸,其分别编码如权利要求1至25中任一项所述的抗体或如权利要求27所述的双特异性抗体的重链和轻链。
31. 一种重组表达载体,其包含如权利要求29所述的核酸。
32. 一种宿主细胞,其用如权利要求31所述的重组表达载体转化。

33. 一种使小鼠抗体人源化的方法,所述方法包括:

(a) 选择一个或多个受体抗体序列;

(b) 鉴定待保留的小鼠抗体的氨基酸残基;

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

(d) 在宿主细胞中表达所述核酸以产生人源化抗体;

其中所述小鼠抗体包含具有SEQ ID NO:81的氨基酸序列的成熟重链可变区和具有SEQ ID NO:87的氨基酸序列的成熟轻链可变区。

34. 一种生产人源化、嵌合或贴面化抗体的方法,所述方法包括:

(a) 培养用编码所述抗体的重链和轻链的核酸转化的细胞,使得所述细胞分泌所述抗体;以及

(b) 从细胞培养基中纯化所述抗体;

其中所述抗体为小鼠抗体的人源化、嵌合或贴面化形式,小鼠抗体其特征在于具有包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列的成熟重链可变区和具有包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列的成熟轻链可变区。

35. 一种生产细胞系的方法,所述细胞系产生人源化、嵌合或贴面化抗体,所述方法包括:

(a) 将编码抗体的重链和轻链和可选择标记的载体引入细胞中;

(b) 在选择所述载体的拷贝数增加的细胞的条件下使所述细胞增殖;

(c) 从所选细胞中分离单细胞;以及

(d) 将由基于抗体产量选择的单细胞克隆的细胞入库;

其中所述抗体为小鼠抗体的人源化、嵌合或贴面化形式,小鼠抗体其特征在于具有包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列的成熟重链可变区和具有包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列的成熟轻链可变区。

36. 如权利要求35所述的方法,其还包括在选择性条件下使所述细胞增殖,以及筛选天然表达并分泌至少100mg/L/10<sup>6</sup>个细胞/24h的细胞系。

## 抗甲状腺素运载蛋白抗体

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请根据35 USC 119(e)要求于2017年10月6日提交的美国临时申请号62/569,436和2017年12月14日提交的美国临时申请号62/598,965的权益,所述临时申请各自出于所有目的以引用方式整体并入。

[0003] 序列表引用

[0004] 以文件516711SEQLIST.txt编写的序列表是59.6千字节,在2018年9月20日创建,并且在此以引用方式并入。

### 背景技术

[0005] 许多疾病被认为是由疾病特异性蛋白质的异常折叠和聚集引起的。这些蛋白质可以积累成被称为淀粉样蛋白的病理诊断性积累物,其通过某些组织染色来可视化。淀粉样蛋白被认为引发炎症应答,并对所涉及的组织具有多重负面后果。此外,较小的异常折叠蛋白质聚集体可能存在,并且发挥细胞毒作用。

[0006] 甲状腺素运载蛋白(TTR)是已知错误折叠并聚集(例如,经历淀粉样蛋白生成)的许多蛋白质之一。甲状腺素运载蛋白介导的淀粉样变性(ATTR)涵盖两种疾病形式:由突变或变体TTR错误折叠引起的家族性疾病,以及由野生型TTR的错误折叠和聚集引起的散发性非遗传性疾病。TTR淀粉样蛋白生成的过程可能引起神经系统和/或心脏以及其他组织的病理。

### 发明内容

[0007] 在一方面,本发明提供了分离的单克隆抗体,其特异性结合到错误折叠的TTR而不结合到蛋白质的天然形式。此类抗体的实例结合到SEQ ID NO:26的成熟区的氨基酸残基101-109内的表位。

[0008] 一些此类抗体与抗体18C5竞争结合到错误折叠的人TTR。一些此类抗体与18C5结合到人甲状腺素运载蛋白上相同的表位。

[0009] 一些此类抗体包含单克隆抗体18C5的三个轻链CDR和三个重链CDR,其中18C5为小鼠抗体,其特征在于具有包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列的成熟重链可变区和具有包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列的成熟轻链可变区。

[0010] 一些此类抗体包含由Kabat/Chothia复合物定义的三个重链CDR(SEQ ID NO:5、7和9)和由Kabat/Chothia复合物定义的三个轻链CDR(SEQ ID NO:11、13和15)。

[0011] 一些此类抗体为18C5或其嵌合、贴面化(veneered)或人源化形式。一些此类抗体结合到SEQ ID NO:26的成熟区中的位置101-109内的表位。一些此类抗体为单克隆抗体。一些此类抗体为嵌合、人源化、贴面化或人抗体。在一些此类抗体中,成熟重链可变区具有与人序列 $\geq 85\%$ 的同一性。在一些此类抗体中,成熟轻链可变区具有与人序列 $\geq 85\%$ 的同一性。在一些此类抗体中,成熟重链和轻链可变区中的每一者具有与人种系序列 $\geq 85\%$ 的同一性。

[0012] 一些此类抗体为人源化抗体。一些此类抗体具有人IgG1同种型。一些此类抗体具有人IgG2或IgG4同种型。

[0013] 一些此类抗体为特异性结合到甲状腺素运载蛋白的人源化或嵌合18C5抗体,其中18C5为小鼠抗体,其特征在于SEQ ID NO:81的成熟重链可变区和SEQ ID NO:87的成熟轻链可变区。在一些抗体中,人源化成熟重链可变区包含18C5的三个重链CDR,并且人源化成熟轻链可变区包含18C5的三个轻链CDR。

[0014] 在一些抗体中,CDR的定义选自以下的组:Kabat、Chothia、Kabat/Chothia复合物、AbM和Contact。在一些抗体中,人源化成熟重链可变区包含18C5的三个Kabat/Chothia复合物重链CDR (SEQ ID NO:5、7和9),并且人源化成熟轻链可变区包含18C5的三个Kabat/Chothia复合物轻链CDR (SEQ ID NO:11、13和15)。在一些抗体中,人源化成熟重链可变区包含18C5的三个Kabat重链CDR (SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:9),并且人源化成熟轻链可变区包含18C5的三个Kabat轻链CDR (SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:15)。在一些抗体中,人源化成熟重链可变区包含18C5的三个Chothia重链CDR (SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:96和SEQ ID NO:9),并且人源化成熟轻链可变区包含18C5的三个Chothia轻链CDR (SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:15)。在一些抗体中,人源化成熟重链可变区包含18C5的三个AbM重链CDR (SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:97和SEQ ID NO:9),并且人源化成熟轻链可变区包含18C5的三个AbM轻链CDR (SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:15)。在一些抗体中,人源化成熟重链可变区包含18C5的三个Contact重链CDR (SEQ ID NO 100-102),并且人源化成熟轻链可变区包含18C5的三个Contact轻链CDR (SEQ ID NO:95、SEQ ID NO:98和SEQ ID NO:99)。

[0015] 一些抗体包含具有与SEQ ID NO:85-86中的任一个的至少90%同一性的氨基酸序列的人源化成熟重链可变区和具有与SEQ ID NO:91-92中的任一个的至少90%同一性的氨基酸序列的人源化成熟轻链可变区。

[0016] 在一些抗体中,以下位置中的至少一个被指定的氨基酸占据:H37被V或A占据、H45被L或Q占据、H47被L或W占据、H48被L或I占据、H49被A或G占据并且H94被S或R占据。在一些抗体中,VH区中的位置H37、H45、H47、H48、H49和H94分别被A、Q、W、I、G和R占据。

[0017] 在一些抗体中,以下位置中的至少一个被指定的氨基酸占据:L2被I或V占据并且L45被Q或R占据。在一些抗体中,VL区中的位置L2和L45分别被V和R占据。

[0018] 一些抗体包含具有与SEQ ID NO:85-86中的任一个的至少95%同一性的氨基酸序列的成熟重链可变区和具有与SEQ ID NO:91-92中的任一个的至少95%同一性的氨基酸序列的成熟轻链可变区。一些抗体包含具有与SEQ ID NO:85-86中的任一个的至少98%同一性的氨基酸序列的成熟重链可变区和具有与SEQ ID NO:91-92中的任一个的至少98%同一性的氨基酸序列的成熟轻链可变区。

[0019] 在一些抗体中,成熟重链可变区具有SEQ ID NO:85-86中的任一个的氨基酸序列,并且成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:91-92中的任一个的氨基酸序列。

[0020] 在一些抗体中,成熟重链可变区具有SEQ ID NO:85的氨基酸序列,并且成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:91的氨基酸序列。在一些抗体中,成熟重链可变区具有SEQ ID NO:85的氨基酸序列,并且成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:92的氨基酸序列。在一些抗体中,成熟重链可变区具有SEQ ID NO:86的氨基酸序列,并且成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:91的

氨基酸序列。在一些抗体中,成熟重链可变区具有SEQ ID NO:86的氨基酸序列,并且成熟轻链可变区具有SEQ ID NO:92的氨基酸序列。

[0021] 在一些抗体中,抗体为完整抗体。在一些抗体中,抗体为结合片段。在一些此类抗体中,结合片段为单链抗体、Fab或Fab'2片段。

[0022] 在一些抗体中,成熟轻链可变区与轻链恒定区融合,并且成熟重链可变区与重链恒定区融合。在一些此类抗体中,重链恒定区为天然人重链恒定区的突变形式,所述突变形式与Fc $\gamma$ 受体的结合相对于天然人重链恒定区减少。在一些此类抗体中,重链恒定区为IgG1同种型。在一些此类抗体中,成熟重链可变区与具有SEQ ID NO:22的序列的重链恒定区融合,并且/或者成熟轻链可变区与具有SEQ ID NO:24的序列的轻链恒定区融合。

[0023] 在另一方面,本发明提供了一种药物组合物,其包含如前述权利要求中任一项所述的第一抗体、结合由18C5结合的表位不同的TTR的表位的第二抗体以及药学上可接受的载剂。在一些此类药物组合物中,第二抗体为9D5、14G8、5A1、6C1、AD7F6、RT24、NI-301.35G11、MFD101、MDF102、MFD103、MFD105、MFD107、MFD108、MFD109、MFD111、MFD114或其嵌合版本或人源化版本。在一些此类药物组合物中,第二抗体为结合在TTR的残基89-97、118-122、115-124、53-63、54-61、36-49、49-61、109-121、30-66、70-127、80-127、90-127、100-127、110-127或115-127内的抗体。

[0024] 在另一方面,本发明提供了一种双特异性抗体,其包含两个抗原结合区、特异性结合在TTR的101-109内的第一抗原结合结构域以及特异性结合TTR的另一区的第二抗原结合结构域。在一些此类双特异性抗体中,第二抗原结合结构域为来自以下的抗原结合结构域:9D5、14G8、5A1、6C1、AD7F6、RT24、NI-301.35G11、MFD101、MDF102、MFD103、MFD105、MFD107、MFD108、MFD109、MFD111、MFD114或其嵌合版本或人源化版本。在一些此类双特异性抗体中,第二抗原结合结构域结合在TTR的残基89-97、118-122、115-124、53-63、54-61、36-49、49-61、109-121、30-66、70-127、80-127、90-127、100-127、110-127或115-127内。

[0025] 在另一方面,本发明提供了一种药物组合物,其包含上述新型抗体中的任一种和药学上可接受的载剂。

[0026] 在另一方面,本发明提供了一种核酸,其编码上述抗体中的任一种的重链和/或轻链。在另一方面,本发明提供了重组表达载体,其包含此种核酸。在另一方面,本发明提供了宿主细胞,其用此种重组表达载体转化。

[0027] 在另一方面,本发明提供了一种抗体人源化的方法,所述方法包括:

[0028] (a) 选择人受体抗体;

[0029] (b) 鉴定待保留的小鼠抗体的氨基酸残基;

[0030] (c) 合成编码包含小鼠抗体重链CDR的人源化重链的核酸,和编码包含小鼠抗体轻链CDR的人源化轻链的核酸;以及

[0031] (d) 在宿主细胞中表达核酸以产生人源化抗体;

[0032] 其中小鼠抗体包含具有SEQ ID NO:81的氨基酸序列的成熟重链可变区和具有SEQ ID NO:87的氨基酸序列的成熟轻链可变区。

[0033] 在另一方面,本发明提供了一种生产人源化、嵌合或贴面化抗体的方法,所述方法包括:

[0034] (a) 培养用编码抗体的重链和轻链的核酸转化的细胞,使得细胞分泌抗体;以及

[0035] (b)从细胞培养基中纯化抗体；

[0036] 其中抗体为18C5的人源化、嵌合或贴面化形式。

[0037] 在另一方面，本发明提供了一种生产细胞系的方法，所述细胞系产生人源化、嵌合或贴面化抗体，所述方法包括：

[0038] (a)将编码抗体的重链和轻链和可选择标记的载体引入细胞中；

[0039] (b)在选择载体的拷贝数增加的细胞的条件下使细胞增殖；

[0040] (c)从所选细胞中分离单细胞；以及

[0041] (d)将由基于抗体产量选择的单细胞克隆的细胞入库；

[0042] 其中抗体为18C5的人源化、嵌合或贴面化形式。

[0043] 一些此类方法还包括在选择性条件下使细胞繁殖，以及筛选天然表达并分泌至少100mg/L/10<sup>6</sup>个细胞/24h的细胞系。

[0044] 在另一方面，本发明提供了一种抑制或减少受试者中的甲状腺素运载蛋白聚集的方法，所述受试者患有甲状腺素运载蛋白介导的淀粉样变性或处于发展甲状腺素运载蛋白介导的淀粉样变性的风险中，所述方法包括向受试者施用上述新型抗体中的任一种的有效方案，从而抑制或减少受试者中的甲状腺素运载蛋白聚集。

[0045] 在另一方面，本发明提供了一种抑制或减少受试者中的甲状腺素运载蛋白原纤维形成的方法，所述受试者患有甲状腺素运载蛋白介导的淀粉样变性或处于发展甲状腺素运载蛋白介导的淀粉样变性的风险中，所述方法包括向受试者施用上述新型抗体中的任一种的有效方案，从而抑制或减少受试者中的甲状腺素运载蛋白原纤维形成。

[0046] 在另一方面，本发明提供了一种减少受试者中的甲状腺素运载蛋白沉积物和聚集体的方法，所述受试者患有甲状腺素运载蛋白介导的淀粉样变性或处于发展甲状腺素运载蛋白介导的淀粉样变性的风险中，所述方法包括向受试者施用上述新型抗体中的任一种的有效方案，从而减少受试者中的甲状腺素运载蛋白沉积物。

[0047] 在另一方面，本发明提供了一种清除受试者中的甲状腺素运载蛋白淀粉样蛋白的方法，所述受试者患有甲状腺素运载蛋白介导的淀粉样变性或处于发展甲状腺素运载蛋白介导的淀粉样变性的风险中，所述方法包括向受试者施用上述新型抗体中的任一种的抗体的有效方案，从而相对于未接受抗体的患有甲状腺素运载蛋白介导的淀粉样变性或处于发展甲状腺素运载蛋白介导的淀粉样变性的风险中的受试者，将甲状腺素运载蛋白淀粉样蛋白从受试者中清除。

[0048] 在另一方面，本发明提供了一种治疗或实现预防受试者中的甲状腺素运载蛋白介导的淀粉样变性的方法，所述方法包括向受试者施用上述新型抗体中的任一种的有效方案。

[0049] 在另一方面，本发明提供了一种延迟受试者中的甲状腺素运载蛋白介导的淀粉样变性的发作的方法，所述方法包括向受试者施用上述新型抗体中的任一种的有效方案。

[0050] 在一些此类方法中，甲状腺素运载蛋白介导的淀粉样变性与选自以下中的任一种的病状相关：心肌病或肥大、家族性淀粉样多发性神经病、中枢神经系统选择性淀粉样变性(CNSA)、老年全身性淀粉样变性、老年心脏淀粉样变性、椎管狭窄、骨关节炎、类风湿性关节炎、幼年特发性关节炎、年龄相关性黄斑变性以及韧带或肌腱病症。

[0051] 在另一方面，本发明提供了一种治疗受试者的方法，所述受试者患有以下中的任



一种或处于以下中的任一种的风险中：心肌病或肥大、家族性淀粉样多发性神经病、中枢神经系统选择性淀粉样变性 (CNSA)、老年全身性淀粉样变性、老年心脏淀粉样变性、椎管狭窄、骨关节炎、类风湿性关节炎、幼年特发性关节炎、年龄相关性黄斑变性以及韧带或肌腱病症，所述方法包括向受试者施用上述新型抗体中的任一种的抗体的有效方案。

[0052] 在一些此类方法中，抗体与结合由18C5结合的表位不同的TTR的表位的第二抗体组合施用。在一些此类方法中，第二抗体为9D5、14G8、5A1、6C1、AD7F6、RT24、NI-301、35G11、MFD101、MDF102、MFD103、MFD105、MFD107、MFD108、MFD109、MFD111、MFD114或其嵌合形式或人源化形式。在一些此类方法中，第二抗体结合在TTR的残基89-97、118-122、115-124、53-63、54-61、36-49、49-61、109-121、30-66、70-127、80-127、90-127、100-127、110-127或115-127内。

[0053] 在另一方面，抗体作为单一疗法施用。

[0054] 在另一方面，本发明提供了一种诊断受试者中的甲状腺素运载蛋白介导的淀粉样变性的方法，其包括使来自受试者的生物样品与有效量的上述新型抗体中的任一种接触。一些此类方法还包括使来自受试者的生物样品与有效量的第二抗体接触，所述第二抗体结合由18C5结合的表位不同的TTR的表位。在一些此类方法中，第二抗体为9D5、14G8、5A1、6C1、8C3、7G7、AD7F6、RT24、NI-301、35G11、MFD101、MDF102、MFD103、MFD105、MFD107、MFD108、MFD109、MFD111、MFD114或其嵌合形式或人源化形式。在一些此类方法中，第二抗体结合在TTR的残基89-97、118-122、115-124、53-63、54-61、36-49、49-61、109-121、30-66、70-127、80-127、90-127、100-127、110-127或115-127内。

[0055] 一些此类方法还包括检测抗体与甲状腺素运载蛋白的结合，其中结合抗体的存在指示受试者患有甲状腺素运载蛋白介导的淀粉样变性。

[0056] 一些此类方法还包括将抗体与生物样品的结合与抗体与对照样品的结合进行比较，由此抗体与生物样品的结合相对于对照样品的增加指示受试者患有甲状腺素运载蛋白介导的淀粉样变性。

[0057] 在一些此类方法中，生物样品和对照样品包含相同组织来源的细胞。在一些此类方法中，生物样品和/或对照样品为血液、血清、血浆或实体组织。在一些此类方法中，实体组织来自心脏、周围神经系统、自主神经系统、肾、眼睛、腹部脂肪或胃肠道。

[0058] 在一些此类方法中，甲状腺素运载蛋白介导的淀粉样变性为家族性甲状腺素运载蛋白淀粉样变性或散发性甲状腺素运载蛋白淀粉样变性。在一些此类方法中，家族性甲状腺素运载蛋白淀粉样变性为家族性淀粉样心肌病 (FAC)、家族性淀粉样多发性神经病 (FAP) 或中枢神经系统选择性淀粉样变性 (CNSA)。在一些此类方法中，散发性甲状腺素运载蛋白淀粉样变性为老年全身性淀粉样变性 (SSA) 或老年心脏淀粉样变性 (SCA)。

[0059] 在一些此类方法中，甲状腺素运载蛋白介导的淀粉样变性与受试者的心脏、周围神经系统、自主神经系统、肾、眼睛、腹部脂肪或胃肠道中的淀粉样蛋白积累相关。

[0060] 在另一方面，本发明提供了一种检测受试者中的甲状腺素运载蛋白沉积物的存在或不存在的方法，其包括使来自疑似包含淀粉样蛋白积累的受试者的生物样品与有效量的上述新型抗体中的任一种接触。

[0061] 一些此类方法还包括检测抗体与甲状腺素运载蛋白的结合，其中检测到结合抗体指示甲状腺素运载蛋白沉积物的存在。

[0062] 一些此类方法还包括将抗体与生物样品的结合与抗体与对照样品的结合进行比较,由此抗体与生物样品的结合相对于对照样品的增加指示受试者患有甲状腺素运载蛋白介导的淀粉样变性。

[0063] 在一些此类方法中,生物样品和对照样品包含相同组织来源的细胞。在一些此类方法中,其中生物样品和/或对照样品为血液、血清、血浆或实体组织。在一些此类方法中,其中实体组织来自心脏、周围神经系统、自主神经系统、肾、眼睛、腹部脂肪或胃肠道。

[0064] 在另一方面,本发明提供了一种测定受试者中的甲状腺素运载蛋白沉积物的水平的方法,其包括施用上述新型抗体中的任一种,以及检测受试者中的结合抗体的存在。在一些此类方法中,结合抗体的存在通过正电子发射断层摄影术(PET)来测定。

[0065] 在另一方面,本发明提供了一种治疗或实现预防受试者中的甲状腺素运载蛋白介导的淀粉样变性的方法,其包括施用TTR四聚体稳定剂、基于反义寡核苷酸的治疗、基于RNA干扰(RNAi)的治疗或强力霉素加牛磺熊去氧胆酸的有效方案,其中受试者先前已使用上述新型抗体中的任一种治疗。在一些此类方法中,受试者不再接受抗体的治疗。在一些此类方法中,TTR四聚体稳定剂为他发米帝司(tafamidis)或二氟尼柳(diflunisal)。在一些此类方法中,基于反义寡核苷酸的治疗为伊诺特森(inotersen)。在一些此类方法中,基于RNAi的治疗为帕替司兰(patisiran)或瑞维司兰(revusiran)。

[0066] 在一些方法中,抗体与以下组合施用:TTR四聚体稳定剂、基于反义寡核苷酸的治疗、基于RNA干扰(RNAi)的治疗或强力霉素加牛磺熊去氧胆酸。在一些此类方法中,TTR四聚体稳定剂为他发米帝司或二氟尼柳。在一些此类方法中,基于反义寡核苷酸的治疗为伊诺特森。在一些此类方法中,基于RNAi的治疗为帕替司兰或瑞维司兰。

[0067] 在一些方法中,抗体与以下同时施用:TTR四聚体稳定剂、基于反义寡核苷酸的治疗、基于RNA干扰(RNAi)的治疗或强力霉素加牛磺熊去氧胆酸。在一些此类方法中,TTR四聚体稳定剂为他发米帝司或二氟尼柳。在一些此类方法中,TTR四聚体稳定剂为二氟尼柳。在一些此类方法中,基于反义寡核苷酸的治疗为伊诺特森。在一些此类方法中,基于RNAi的治疗为帕替司兰或瑞维司兰。

[0068] 在另一方面,本发明提供了一种鉴定结合到TTR的残基101-109内的表位的抗体的方法,其包括:(a)用TTR或其片段使动物免疫;以及(b)筛选诱导抗体以鉴定结合在TTR的残基101-109内的抗体。在一些方法中,用不超过25个TTR的连续残基的片段进行免疫,所述片段包括TTR的残基101-109内的至少3个连续残基。在一些方法中,片段由任选地连接到载剂的TTR的残基101-109组成。在一些方法中,通过测定抗体与由TTR的残基101-109组成的TTR的片段的结合来进行筛选。

[0069] 在另一方面,本发明提供了一种鉴定结合到TTR的残基101-109内的表位的抗体的方法,其包括:提供抗体的展示文库;以及筛选展示文库以鉴定结合在TTR的残基101-109内的抗体。在一些方法中,展示文库将抗体展示为Fv片段。在一些方法中,展示文库为天然展示文库。在一些方法中,通过用TTR或其片段使啮齿动物免疫并将编码抗体的重链和轻链的核酸克隆到展示载体中来产生展示文库。在一些方法中,通过测定文库成员与由残基101-109组成的TTR的片段的结合来进行筛选。在一些方法中,通过在参考抗体的存在下测定文库成员与TTR的结合来进行筛选,所述参考抗体结合到TTR的残基101-109内的表位。在一些方法中,参考抗体为18C5。

[0070] 在另一方面,本发明提供了一种鉴定与抗体18C5竞争结合以结合到TTR的抗体的方法,所述方法包括在存在和不存在抗体18C5的情况下使TTR与抗体接触以及测定抗体与TTR的结合,其中在抗体18C5的存在下结合的减少指示抗体与抗体18C5竞争结合到TTR。

[0071] 在另一方面,本发明提供了一种鉴定与抗体18C5结合到TTR上相同的表位的抗体的方法,其包括:(a)测定由抗体18C5在TTR上结合的表位;(b)用TTR或其片段使动物免疫;以及(c)筛选诱导抗体以鉴定与抗体18C5结合到相同表位的抗体。在一些方法中,通过TTR诱变来测定由抗体18C5在TTR上结合的表位。在一些方法中,通过X射线晶体学来测定由抗体18C5在TTR上结合的表位。

[0072] 在另一方面,本发明提供了一种鉴定与抗体18C5结合到TTR上相同的表位的抗体的方法,其包括:(a)测定由抗体18C5在TTR上结合的表位;(b)提供抗体的展示文库;以及(c)筛选展示文库以鉴定与抗体18C5结合到相同表位的抗体。在一些方法中,通过TTR诱变来测定由抗体18C5在TTR上结合的表位。在一些方法中,通过X射线晶体学来测定由抗体18C5在TTR上结合的表位。在一些方法中,展示文库将抗体展示为Fv片段。在一些方法中,展示文库为天然展示文库。在一些方法中,通过用TTR或其片段使啮齿动物免疫并将编码抗体的重链和轻链的核酸克隆到展示载体中来产生展示文库。在一些方法中,通过测定文库成员与由残基101-109组成的TTR的片段的结合来进行筛选。在一些方法中,通过在参考抗体的存在下测定文库成员与TTR的结合来进行筛选,所述参考抗体结合到TTR的残基101-109内的表位。在一些方法中,参考抗体为18C5。在一些方法中,展示文库中的每个成员展示相同的轻链可变区和不同的重链可变区。在一些方法中,轻链可变区为抗体18C5的轻链可变区。在一些方法中,重链可变区获自重排的人重链可变区的文库。在一些方法中,展示文库中的每个成员展示相同的重链可变区和不同的轻链可变区。在一些方法中,重链可变区为抗体18C5的重链可变区。在一些方法中,轻链可变区获自重排的人可变轻链区的文库。

[0073] 在另一方面,本发明提供了一种治疗或实现预防受试者中的甲状腺素运载蛋白介导的淀粉样变性的方法,其包括施用包含TTR肽的免疫原,所述TTR肽具有抗体18C5特异性结合的TTR的至多20个连续氨基酸,其中肽单独和/或当连接到异源载剂时,在受试者中诱导特异性结合到TTR的抗体的形成。

[0074] 在一些方法中,免疫原包含抗体18C5特异性结合的表位。在一些方法中,免疫原包含具有来自TTR的残基87-127的至多20个连续氨基酸的TTR肽。在一些方法中,免疫原包含具有来自TTR的残基100-110的至多11个连续氨基酸的TTR肽。在一些方法中,免疫原包含具有来自TTR的残基101-109的至多9个连续氨基酸的TTR肽。

[0075] 在一些方法中,TTR肽表位由来自TTR的残基87-127的4-11个连续氨基酸组成。在一些方法中,TTR肽表位由来自TTR的残基100-110的4-11个连续氨基酸组成。在一些方法中,TTR肽表位由来自TTR的残基101-109的4-9个连续氨基酸组成。

[0076] 在另一方面,本发明提供了一种包含具有来自TTR的残基87-127的至多20个连续氨基酸的TTR肽的免疫原,所述TTR肽连接到有助于引发针对TTR肽的抗体的异源载剂。

## 附图说明

[0077] 图1描绘了蛋白质印迹实验的结果,示出18C5具有对变性TTR单体的强反应性、对变性二聚体的轻微反应性以及天然TTR物种的极弱反应性。

[0078] 图2描绘了蛋白质印迹实验的结果,示出商业TTR抗体不能区分天然TTR和变性TTR,并且对单体以及二聚天然TTR和变性TTR显示出极强反应性。

[0079] 图3描绘了小鼠18C5抗体(SEQ ID NO:81)、人种系序列IGH V3-48\*01(SEQ ID NO:84)、人受体5VZY-VH\_huFrwk(Crenefab-VH)(SEQ ID NO:83)和18C5抗体的人源化版本(分别为hu18C5\_VH-v1和hu18C5\_VH-v2,SEQ ID NO:84和85)的重链可变区的对齐。根据Kabat/Chothia复合物定义的CDR在小鼠18C5的重链可变区序列中加粗。

[0080] 图4描绘了小鼠18C5抗体(SEQ ID NO:87)、人种系序列IGKV2-30\*02(SEQ ID NO:90)、人受体5VZY-VL\_huFrwk(Crenefab-VL)(SEQ ID NO:89)和18C5抗体的人源化版本(分别为hu18C5-VL-v1和hu18C5-VL-v2,SEQ ID NO:91和92)的轻链可变区的对齐。根据Kabat/Chothia复合物定义的CDR在小鼠18C5的轻链可变区序列中加粗。

[0081] 序列简要说明

[0082] SEQ ID NO:1列出具有信号肽的小鼠18C5抗体的重链可变区的氨基酸序列。

[0083] SEQ ID NO:2列出编码具有信号肽的小鼠18C5抗体的重链可变区的核酸序列。

[0084] SEQ ID NO:3列出具有信号肽的小鼠18C5抗体的轻链可变区的氨基酸序列。

[0085] SEQ ID NO:4列出编码具有信号肽的小鼠18C5抗体的轻链可变区的核酸序列。

[0086] SEQ ID NO:5列出小鼠18C5抗体的Kabat/Chothia复合物CDR-H1的氨基酸序列。

[0087] SEQ ID NO:6列出编码小鼠18C5抗体的Kabat/Chothia复合物CDR-H1的核酸序列。

[0088] SEQ ID NO:7列出小鼠18C5抗体的Kabat/Chothia复合物CDR-H2的氨基酸序列。

[0089] SEQ ID NO:8列出编码小鼠18C5抗体的Kabat/Chothia复合物CDR-H2的核酸序列。

[0090] SEQ ID NO:9列出小鼠18C5抗体的Kabat/Chothia复合物CDR-H3的氨基酸序列。

[0091] SEQ ID NO:10列出编码小鼠18C5抗体的Kabat/Chothia复合物CDR-H3的核酸序列。

[0092] SEQ ID NO:11列出小鼠18C5抗体的Kabat/Chothia复合物CDR-L1的氨基酸序列。

[0093] SEQ ID NO:12列出编码小鼠18C5抗体的Kabat/Chothia复合物CDR-L1的核酸序列。

[0094] SEQ ID NO:13列出小鼠18C5抗体的Kabat/Chothia复合物CDR-L2的氨基酸序列。

[0095] SEQ ID NO:14列出编码小鼠18C5抗体的Kabat/Chothia复合物CDR-L2的核酸序列。

[0096] SEQ ID NO:15列出小鼠18C5抗体的Kabat/Chothia复合物CDR-L3的氨基酸序列。

[0097] SEQ ID NO:16列出编码小鼠18C5抗体的Kabat/Chothia复合物CDR-L3的核酸序列。

[0098] SEQ ID NO:17列出嵌合18C5重链恒定区(人IgG1)的氨基酸序列。

[0099] SEQ ID NO:18列出编码嵌合18C5重链恒定区(人IgG1)的氨基酸序列的核酸序列。

[0100] SEQ ID NO:19列出嵌合18C5轻链恒定区(人 $\kappa$ )的氨基酸序列。

[0101] SEQ ID NO:20列出编码嵌合18C5轻链恒定区(人 $\kappa$ )的氨基酸序列的核酸序列。

[0102] SEQ ID NO:21列出示例性IgG1重链恒定区的氨基酸序列。

[0103] SEQ ID NO:22列出示例性IgG1 G1m3重链恒定区的氨基酸序列。

[0104] SEQ ID NO:23列出示例性IgG1 G1m3重链恒定区的氨基酸序列。

- [0105] SEQ ID NO:24列出具有N端精氨酸的示例性轻链恒定区的氨基酸序列。
- [0106] SEQ ID NO:25列出没有N端精氨酸的示例性轻链恒定区的氨基酸序列。
- [0107] SEQ ID NO:26列出登录号P02766.1(UniProt)中列出的人甲状腺素运载蛋白的氨基酸序列。
- [0108] SEQ ID NO:27列出登录号AAB35639.1(GenBank)中列出的人甲状腺素运载蛋白的氨基酸序列。
- [0109] SEQ ID NO:28列出登录号AAB35640.1(GenBank)中列出的人甲状腺素运载蛋白的氨基酸序列。
- [0110] SEQ ID NO:29列出登录号和ABI63351.1(GenBank)中列出的人甲状腺素运载蛋白的氨基酸序列。
- [0111] SEQ ID NO:30列出人甲状腺素运载蛋白的残基101-109的氨基酸序列。
- [0112] SEQ ID NO:31列出人甲状腺素运载蛋白的残基87-127的氨基酸序列。
- [0113] SEQ ID NO:32列出编码示例性IgG1 G1m3重链恒定区的核酸序列。
- [0114] SEQ ID NO:33列出编码具有N端精氨酸的示例性轻链恒定区的核酸序列。
- [0115] SEQ ID NO:34列出编码没有N端精氨酸的示例性轻链恒定区的核酸序列。
- [0116] SEQ ID NO:35列出重链恒定区信号肽的氨基酸序列。
- [0117] SEQ ID NO:36列出编码重链恒定区信号肽的核酸序列。
- [0118] SEQ ID NO:37列出轻链恒定区信号肽的氨基酸序列。
- [0119] SEQ ID NO:38列出编码轻链恒定区信号肽的核酸序列。
- [0120] SEQ ID NO:39列出抗体14G8的Kabat CDR-H1的氨基酸序列。
- [0121] SEQ ID NO:40列出抗体14G8的Kabat CDR-H2的氨基酸序列。
- [0122] SEQ ID NO:41列出抗体14G8的Kabat CDR-H3的氨基酸序列。
- [0123] SEQ ID NO:42列出抗体14G8的Kabat CDR-L1的氨基酸序列。
- [0124] SEQ ID NO:43列出抗体14G8的Kabat CDR-L2的氨基酸序列。
- [0125] SEQ ID NO:44列出抗体14G8的Kabat CDR-L3的氨基酸序列。
- [0126] SEQ ID NO:45列出抗体5A1的表位的氨基酸序列。
- [0127] SEQ ID NO:46列出抗体5A1的Kabat CDR-H1的氨基酸序列。
- [0128] SEQ ID NO:47列出抗体5A1的Kabat CDR-H2的氨基酸序列。
- [0129] SEQ ID NO:48列出抗体5A1的Kabat CDR-H3的氨基酸序列。
- [0130] SEQ ID NO:49列出抗体5A1的Kabat CDR-L1的氨基酸序列。
- [0131] SEQ ID NO:50列出抗体5A1的Kabat CDR-L2的氨基酸序列。
- [0132] SEQ ID NO:51列出抗体5A1的Kabat CDR-L3的氨基酸序列。
- [0133] SEQ ID NO:52列出抗体6C1的Kabat CDR-H1的氨基酸序列。
- [0134] SEQ ID NO:53列出抗体6C1的Kabat CDR-H2的氨基酸序列。
- [0135] SEQ ID NO:54列出抗体6C1的Kabat CDR-H3的氨基酸序列。
- [0136] SEQ ID NO:55列出抗体6C1的Kabat CDR-L1的氨基酸序列。
- [0137] SEQ ID NO:56列出抗体6C1的Kabat CDR-L2的氨基酸序列。
- [0138] SEQ ID NO:57列出抗体6C1的Kabat CDR-L3的氨基酸序列。
- [0139] SEQ ID NO:58列出抗体AD7F6的VH区的氨基酸序列。

- [0140] SEQ ID NO:59列出抗体AD7F6的VL区的氨基酸序列。
- [0141] SEQ ID NO:60列出抗体RT24的CDR-H1的氨基酸序列。
- [0142] SEQ ID NO:61列出抗体RT24的CDR-H2的氨基酸序列。
- [0143] SEQ ID NO:62列出抗体RT24的CDR-H3的氨基酸序列。
- [0144] SEQ ID NO:63列出抗体RT24的CDR-L1的氨基酸序列。
- [0145] SEQ ID NO:64列出抗体RT24的CDR-L2的氨基酸序列。
- [0146] SEQ ID NO:65列出抗体RT24的CDR-L3的氨基酸序列。
- [0147] SEQ ID NO:66列出抗体NI-301.35G11的CDR-H1的氨基酸序列。
- [0148] SEQ ID NO:67列出抗体NI-301.35G11的CDR-H2的氨基酸序列。
- [0149] SEQ ID NO:68列出抗体NI-301.35G11的CDR-H3的氨基酸序列。
- [0150] SEQ ID NO:69列出抗体NI-301.35G11的CDR-L1的氨基酸序列。
- [0151] SEQ ID NO:70列出抗体NI-301.35G11的CDR-L2的氨基酸序列。
- [0152] SEQ ID NO:71列出抗体NI-301.35G11的CDR-L3的氨基酸序列。
- [0153] SEQ ID NO:72列出抗体MFD101、MFD102、MFD103、MFD105的表位的氨基酸序列。
- [0154] SEQ ID NO:73列出抗体MFD107、MFD108、MFD109、MFD111的表位的氨基酸序列。
- [0155] SEQ ID NO:74列出抗体MFD114的表位的氨基酸序列。
- [0156] SEQ ID NO:75列出抗体9D5的Kabat CDR-H1的氨基酸序列。
- [0157] SEQ ID NO:76列出抗体9D5的Kabat CDR-H2的氨基酸序列。
- [0158] SEQ ID NO:77列出抗体9D5的Kabat CDR-H3的氨基酸序列。
- [0159] SEQ ID NO:78列出抗体9D5的Kabat CDR-L1的氨基酸序列。
- [0160] SEQ ID NO:79列出抗体9D5的Kabat CDR-L2的氨基酸序列。
- [0161] SEQ ID NO:80列出抗体9D5的Kabat CDR-L3的氨基酸序列。
- [0162] SEQ ID NO:81列出小鼠18C5抗体的成熟重链可变区的氨基酸序列。
- [0163] SEQ ID NO:82列出鼠抗焦谷氨酸Aβ抗体Fab c#17,GenBank登录号1212215935的重链可变区的氨基酸序列。
- [0164] SEQ ID NO:83列出人源化Crenezumab Fab(CreneFab) PDB:5VZY,GenBank登录号1229749875的重链可变区的氨基酸序列。
- [0165] SEQ ID NO:84列出人种系序列IGHV3-48\*01,GenBank登录号1FN550289.1的重链可变区的氨基酸序列。
- [0166] SEQ ID NO:85列出人源化18C5抗体hu18C5-VH\_1的重链可变区的氨基酸序列。
- [0167] SEQ ID NO:86列出人源化18C5抗体hu18C5-VH\_2的重链可变区的氨基酸序列。
- [0168] SEQ ID NO:87列出小鼠18C5抗体的成熟轻链可变区的氨基酸序列。
- [0169] SEQ ID NO:88列出鼠抗焦谷氨酸Aβ抗体Fab c#17,GenBank登录号1212215934的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0170] SEQ ID NO:89列出人源化Crenezumab Fab(CreneFab) PDB:5VZY,GenBank登录号1229749876的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0171] SEQ ID NO:90列出人种系序列IGKV2-30\*2,GenBank登录号CAA77315的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0172] SEQ ID NO:91列出人源化18C5抗体hu18C5-VL\_1的轻链可变区的氨基酸序列。

- [0173] SEQ ID NO:92列出人源化18C5抗体hu18C5-VL\_2的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0174] SEQ ID NO:93列出小鼠18C5抗体的Kabat CDR-H1的氨基酸序列。
- [0175] SEQ ID NO:94列出小鼠18C5抗体的Chothia CDR-H1的氨基酸序列。
- [0176] SEQ ID NO:95列出小鼠18C5抗体的Contact CDR-H1的氨基酸序列。
- [0177] SEQ ID NO:96列出小鼠18C5抗体的Chothia CDR-H2的氨基酸序列。
- [0178] SEQ ID NO:97列出小鼠18C5抗体的AbM CDR-H2的氨基酸序列。
- [0179] SEQ ID NO:98列出小鼠18C5抗体的Contact CDR-H2的氨基酸序列。
- [0180] SEQ ID NO:99列出小鼠18C5抗体的Contact CDR-H3的氨基酸序列。
- [0181] SEQ ID NO:100列出小鼠18C5抗体的Contact CDR-L1的氨基酸序列。
- [0182] SEQ ID NO:101列出小鼠18C5抗体的Contact CDR-L2的氨基酸序列。
- [0183] SEQ ID NO:102列出小鼠18C5抗体的Contact CDR-L3的氨基酸序列。
- [0184] 定义

[0185] 单克隆抗体或其他生物实体通常以分离的形式提供。这意味着抗体或其他生物实体的纯度通常为至少50%w/w,具有由其生产或纯化产生的干扰蛋白质和其他污染物,但不排除以下可能性:单克隆抗体与过量的药学上可接受的载剂或旨在促进其使用的其他媒介物组合。有时,单克隆抗体的纯度为至少60%、70%、80%、90%、95%或99%w/w,具有来自生产或纯化的干扰蛋白质和污染物。通常,分离的单克隆抗体或其他生物实体为其纯化后剩余的主要大分子物质。

[0186] 抗体与其靶抗原的特异性结合意指至少 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$ 或 $10^{10}M^{-1}$ 的亲合力。特异性结合的量级可检测到较高,并且可与对至少一个无关靶标发生的非特异性结合区分开来。特异性结合的原因可为特定官能团之间的键或特定空间配合(例如,锁和钥匙型)的形成,而非特异性结合的原因通常为范德瓦耳斯力。然而,特异性结合不一定暗示抗体结合一个且仅结合一个靶标。

[0187] 碱性抗体结构单元为亚基的四聚体。每个四聚体包括两对相同的多肽链,每一对具有一个“轻”(约25kDa)链和一个“重”链(约50-70kDa)。每条链的氨基端部分包括主要负责抗原识别的具有约100至110个或更多个氨基酸的可变区。此可变区最初表达连接到可切割信号肽。没有信号肽的可变区有时被称为成熟可变区。因此,例如,轻链成熟可变区意指没有轻链信号肽的轻链可变区。每条链的羧基端部分限定主要负责效应物功能的恒定区。

[0188] 轻链分类为 $\kappa$ 或 $\lambda$ 。重链分类为 $\gamma$ 、 $\mu$ 、 $\alpha$ 、 $\delta$ 或 $\epsilon$ ,并分别将抗体的同种型定义为IgG、IgM、IgA、IgD和IgE。在轻链和重链内,可变区和恒定区通过具有约12个或更多个氨基酸的“J”区连接,其中重链还包括具有约10个或更多个氨基酸的“D”区。大体上参见, *Fundamental Immunology*, Paul, W. 编, 第2版Raven Press, N.Y., 1989, 第7章(出于所有目的以引用的方式整体并入)。

[0189] 免疫球蛋白轻链或重链可变区(本文中分别被称为“轻链可变结构域”(“VL结构域”)或“重链可变结构域”(“VH结构域”))由被三个“互补决定区”或“CDR”中断的“框架”区组成。框架区用于排列用于与抗原的表位特异性结合的CDR。CDR包含主要负责抗原结合的抗体的氨基酸残基。从氨基端至羧基端,VL和VH结构域均包含以下框架(FR)和CDR区:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。VL结构域的CDR1、2和3在本文中分别被称为CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3;VH结构域的CDR 1、2和3在本文中分别被称为CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3。

[0190] 氨基酸至每个VL和VH结构域的分配符合CDR的任何常规定义。常规定义包括Kabat定义(Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987和1991)、Chothia定义(Chothia和Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917, 1987; Chothia等, Nature 342:878-883, 1989); CDR-H1为Chothia和Kabat CDR的复合物的Chothia Kabat CDR复合物; 牛津分子抗体建模软件所用的AbM定义; 以及Martin等(bioinfo.org.uk/abs)的contact定义(参见表1)。Kabat提供广泛使用的编号惯例(Kabat编号), 在所述编号惯例中不同重链之间或不同轻链之间的相应残基被分配相同的数字。当据称抗体包括某种CDR定义(例如Kabat)的CDR时, 所述定义指定抗体中存在的CDR残基(即, Kabat CDR)的最小数目。不排除也存在处于另一常规CDR定义内但处于指定定义之外的其他残基。例如, 除了其他可能性之外, 包含由Kabat定义的CDR的抗体包括: CDR含有Kabat CDR残基且不含其他CDR残基的抗体, 以及CDR H1为复合Chothia-Kabat CDR H1并且其他CDR含有Kabat CDR残基且不含基于其他定义的另外CDR残基的抗体。

[0191] 表1

[0192] 使用Kabat编号的CDR的常规定义

环	Kabat	Chothia	Chothia 和 Kabat 的复合物	AbM	Contact
L1	L24--L34	L24--L34	L24--L34	L24--L34	L30--L36
L2	L50--L56	L50--L56	L50--L56	L50--L56	L46--L55
L3	L89--L97	L89--L97	L89--L97	L89--L97	L89--L96
H1	H31--H35B	H26--H32..H34*	H26--H35B*	H26--H35B	H30--H35B
H2	H50--H65	H52--H56	H50--H65	H50--H58	H47--H58
H3	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H93--H101

[0194] \*Chothia的CDR-H1可在H32、H33或H34处结束(取决于环的长度)。这是因为Kabat编号方案将额外残基置于35A和35B插入处, 而Chothia编号将它们置于31A和31B处。如果H35A和H35B(Kabat编号)均不存在, 则Chothia CDR-H1环在H32处结束。如果仅存在H35A, 则在H33处结束。如果H35A和H35B均存在, 则在H34处结束。

[0195] 术语“抗体”包括完整抗体及其结合片段。通常, 片段与其所来源的完整抗体竞争与靶标的特异性结合, 所述靶标包括单独重链、轻链Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、F(ab)<sub>c</sub>、Dab、纳米抗体和Fv。片段可通过重组DNA技术或通过完整免疫球蛋白的酶促或化学分离来产生。术语“抗体”还包括双特异性抗体和/或人源化抗体。双特异性或双功能抗体是具有两对不同重链/轻链和两个不同结合位点的人工杂交抗体(参见, 例如, Songsivilai和Lachmann, Clin. Exp. Immunol., 79:315-321 (1990); Kostelny等, J. Immunol., 148:1547-53 (1992))。在一些双特异性抗体中, 两个不同的重/轻链对包括人源化18C5重链/轻链对和对被18C5所结合的甲状腺素运载蛋白的不同表位特异性的重链/轻链对。



[0196] 在一些双特异性抗体中,一个重链/轻链对是如以下所进一步公开的人源化18C5抗体,并且另一个重链/轻链对来自结合到血脑屏障上表达的受体的抗体,所述受体诸如胰岛素受体、胰岛素样生长因子(IGF)受体、瘦蛋白受体或脂蛋白受体或转铁蛋白受体(Friden等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:4771-4775,1991;Friden等,Science 259:373-377,1993)。这种双特异性抗体可通过受体介导的转胞吞作用来转移穿过血脑屏障。双特异性抗体的脑摄取可通过工程化双特异性抗体以降低其与血脑屏障受体的亲和力来进一步增强。对受体的亲和力降低导致在大脑中的分布更广(参见,例如,Atwal等,Sci.Trans.Med.3,84ra43,2011;Yu等,Sci.Trans.Med.3,84ra44,2011)。

[0197] 示例性双特异性抗体还可为:(1)双重可变结构域抗体(DVD-Ig),其中每个轻链和重链含有通过短肽键串联的两个可变结构域(Antibody Engineering,Springer Berlin Heidelberg(2010)中:Wu等,Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin(DVD-Ig<sup>TM</sup>)Molecule);(2)Tandab,其为两个单链双抗体的融合物,产生具有每个靶抗原的两个结合位点的四价双特异性抗体;(3)柔性抗体(flexibody),其为scFv与产生多价分子的双抗体的组合;(4)基于蛋白激酶A中的“二聚化和停靠结构域”的所谓“停靠和锁定”分子,其在应用于Fab时可产生三价双特异性结合蛋白,所述三价双特异性结合蛋白由连接到不同Fab片段的两个相同Fab片段组成;或(5)所谓的蝎子分子,其包含例如,与人Fc区两端融合的两个scFv。用于制备双特异性抗体的平台的实例包括BiTE(Micromet)、DART(MacroGenics)、Fcab和Mab2(F-star)、Fc工程化IgG1(Xencor)或DuoBody(基于Fab臂交换,Genmab)。

[0198] 术语“表位”是指抗原上抗体所结合的位点。表位可由通过一种多种蛋白质的三级折叠来并置的连续氨基酸或不连续氨基酸来形成。由连续氨基酸形成的表位(也称为线性表位)通常在暴露于变性溶剂时得以保持,而通过三级折叠形成的表位(也称为构象表位)通常在用变性溶剂处理时失去。表位通常包括以独特空间构象的至少3个并且更通常至少5个或8-10个氨基酸。确定表位的空间构象的方法包括例如X射线晶体学和二维核磁共振。参见,例如,Methods in Molecular Biology,第66卷,Glenn E.Morris编(1996)中的Epitope Mapping Protocols。表位可为线性的,诸如例如来自SEQ ID NO:26的2-5、3-5、3-9或5-9连续氨基酸的表位,包括例如SEQ ID NO:26的成熟区的残基101-109内的两个或更多个连续氨基酸。表位也可为构象表位,包括例如SEQ ID NO:26的成熟区的残基101-109内的两个或多个非连续的氨基酸区段。如果据称抗体结合到甲状腺素运载蛋白(TTR)(SEQ ID NO:26的成熟区)的氨基酸残基101-109内的表位,例如,意指表位处于所列举的氨基酸范围内,包括定义范围外部界限的那些范围。不一定意指范围内的每个氨基酸构成表位的一部分。因此,例如,除了SEQ ID NO:30的其他线性区段之外,或在构象表位的情况下,除了SEQ ID NO:30的其他非连续氨基酸区段之外,TTR的氨基酸残基101-109内的表位还可以由SEQ ID NO:26的氨基酸101-109、101-108、102-109、101-107、102-108、103-109、101-106、102-107、103-108、104-109、101-105、102-106、103-107、104-108、105-109、101-104、102-105、103-106、104-107、105-108、106-109、101-103、102-104、103-105、104-106、105-107、106-108、107-109、101-102、102-103、103-104、104-105、105-106、106-107、107-108或108-109组成。

[0199] 识别相同表位或重叠表位的抗体可以在简单的免疫测定来鉴定,所述免疫测定示出一种抗体与另一种抗体竞争结合到靶抗原的能力。抗体的表位还可由结合到它的抗原以

鉴定接触残基的抗体的X射线晶体学定义。可替代地,如果抗原中的减少或消除一种抗体的结合的所有氨基酸突变减少或消除另一种抗体的结合,那么两种抗体具有相同表位。如果减少或消除一种抗体的结合的一些氨基酸突变减少或消除另一种抗体的结合,那么两种抗体具有重叠表位。

[0200] 抗体之间的竞争通过以下测定来测定,在所述测定中所测试的抗体抑制参考抗体与共同抗原的特异性结合(参见,例如,Junghans等,Cancer Res.50:1495,1990)。如果过量的测试抗体(例如,至少2x、5x、10x、20x或100x)如在竞争性结合测定中所测量将参考抗体的结合抑制至少50%,则测试抗体与参考抗体竞争。一些测试抗体将参考抗体的结合抑制至少75%、90%或99%。由竞争测定鉴定的抗体(竞争性抗体)包括结合到与参考抗体所结合的表位相同的表位的抗体,以及结合到相邻表位的抗体,其所述相邻表位足够邻近由参考抗体结合的表位以发生位阻。

[0201] 关于结构甲状腺素运载蛋白(TTR)的术语“天然”是指处于正常功能状态的TTR(即,TTR四聚体)的正常折叠结构。因为TTR是它的呈天然折叠形式的四聚体,所以TTR的非天然形式包括例如错误折叠TTR四聚体、TTR单体、TTR的聚集形式和TTR的原纤维形式。TTR的非天然形式可包括包含野生型TTR氨基酸序列或突变的分子。

[0202] 关于TTR的术语“错误折叠”是指TTR多肽单体或多聚体的二级结构和三级结构,并且指示多肽已经采用对于处于正常功能状态的所述蛋白质不正常的构象。虽然TTR错误折叠可由蛋白质突变(例如缺失、置换或添加)引起,但野生型TTR蛋白还可能在疾病中错误折叠,暴露特定表位。

[0203] 术语“药学上可接受的”意指载剂、稀释剂、赋形剂或辅助剂与制剂的其他成分相容,并且对其接受者基本上无害。

[0204] 术语“患者”包括接受预防性或治疗性治疗的人和其他哺乳动物受试者。

[0205] 如果受试者具有至少一种已知的风险因素(例如遗传、生物化学、家族史和情境暴露),则个体处于增加的疾病风险中,与没有所述风险因素的个体相比,使具有所述风险因素的个体处于发展所述疾病统的统计学上显著更大的风险中。

[0206] 术语“生物样品”是指在生物来源(例如人或哺乳动物受试者)内或可从所述生物来源获得的生物材料样品。此类样品可为器官、细胞器、组织、组织切片、体液、外周血、血浆、血清、细胞、诸如蛋白质和肽的分子以及来源于其的任何部分或组合。术语生物样品还可以涵盖由处理样品而获得的任何材料。获得的材料可以包括细胞或其后代。生物样品的处理可以涉及过滤、蒸馏、提取、浓缩、固定、干扰成分的失活等中的一种或多种。

[0207] 术语“对照样品”是指已知或疑似不包含单体、错误折叠、聚集或原纤维形式的甲状腺素运载蛋白(TTR)(诸如呈TTR淀粉样蛋白沉积物)的生物样品。对照样品可从未患有TTR淀粉样变性或特定选择的TTR淀粉样变性类型的个体获得。可替代地,对照样品可自患有TTR淀粉样变性或特定选择的TTR淀粉样变性类型的患者获得。此类样品可与被认为包含TTR淀粉样变性的生物样品在相同的时机时或在不同的时机时获得。生物样品和对照样品均可自相同组织(例如,含有TTR淀粉样蛋白沉积物和周围正常组织的组织切片)获得。优选地,对照样品基本上或完全由不含TTR淀粉样蛋白沉积物的组织组成,并且可用于与被认为包含TTR淀粉样蛋白沉积物的生物样品进行比较。优选地,对照样品中的组织与生物样品中的组织(例如心脏中的心肌细胞)为相同类型。

[0208] 术语“疾病”是指损害生理功能的任何异常病状。所述术语广泛地用于涵盖生理功能受损的任何病症、疾病、异常、病理、病患、病状或综合征，而与病因性质无关。

[0209] 术语“症状”是指由受试者可感知到的疾病的主观证据，诸如改变的步态。“体征”是指由医师可观察到的疾病的客观证据。

[0210] 出于将氨基酸置换分类为保守性或非保守性的目的，氨基酸分组如下：I组（疏水侧链）：met、ala、val、leu、ile；II组（中性亲水性侧链）：cys、ser、thr；III组（酸性侧链）：asp、glu；IV组（碱性侧链）：asn、gln、his、lys、arg；V组（影响链取向的残基）：gly、pro；以及VI组（芳族侧链）：trp、tyr、phe。保守性置换涉及相同类别氨基酸之间的置换。非保守性置换构成这些类别中的一种的成员与另一种的成员的交换。

[0211] 序列同一性百分比用通过Kabat编号惯例最大程度上对齐的抗体序列来测定。对齐后，如果将主题抗体区（例如，重链或轻链的整个成熟可变区）与参考抗体的相同区比较，则主题抗体区与参考抗体区之间的序列同一性百分比为被主题抗体区和参考抗体区中相同氨基酸占据的位置数除以两个区的对齐位置的总数（缺口未进行计数）乘以100以转化为百分比。

[0212] “包含”或“包括”一个或多个所述的要素的组合物或方法可以包括未具体叙述的其它要素。例如，“包含(comprise)”或“包含(include)”抗体的组合物可含有单独的抗体或与其他成分组合的抗体。

[0213] 值的范围的指定包括所述范围内或限定所述范围的所有整数以及由所述范围内的整数限定的所有子范围。

[0214] 除非另外从上下文中显而易见，否则术语“约”涵盖了所述值的标准测量误差范围（例如SEM）内的值。

[0215] 统计学显著性意指 $p \leq 0.05$ 。

[0216] 本发明的抗体可以和适应症与抗体相同的另一种治疗同时施用，意指在施用抗体时期期间至少施用一次另一种治疗，此时期从第一次抗体给药前的一个月开始，并且在最后一次抗体给药后的一个月结束。在此时期期间，可以重复间隔施用另一种治疗，所述重复间隔可能与施用抗体的间隔相同，或可能不同。另一种治疗可为对症治疗。

[0217] 如果治疗仅影响疾病的一个或多个症状，而不影响其原因，即其病因，则治疗为对症的。

[0218] 除非上下文另外明确规定，否则冠词“一个/种(a/an)”和“所述”的单数形式包括复数指代对象。例如，术语“一种化合物”或“至少一种化合物”可以包括多种化合物，包括其混合物。

[0219] 除非上下文另有说明，否则当本说明书公开了产品或方法包括特定特征或特征组合时，本说明书还应理解为公开了产品或方法由特征或特征组合组成或基本上由其组成。

## 具体实施方式

### [0220] I. 概要

[0221] 本发明提供特异性结合到甲状腺素运载蛋白(TTR)的残基101-109的抗体。相对于天然四聚体形式的TTR，一些抗体优先结合单体、错误折叠、聚集或原纤维形式的TTR中的一者或所有。相对于天然四聚体形式的TTR，一些抗体优先结合单体或错误折叠形式的TTR

中的一者或两者。所述抗体可用于治疗或实现预防与TTR积累或TTR沉积物积累相关的疾病或病症(例如,TTR淀粉样变性)。抗体还可用于诊断TTR淀粉样变性以及抑制或减少TTR的聚集。除了其他应用之外,抗体还可用于证明甲状腺素运载蛋白介导的淀粉样变性治疗的药效学作用。优先结合意指对单体、错误折叠、聚集或原纤维形式的TTR中的任一者或所有的缔合常数比对天然四聚体形式的TTR高至少5倍。任选地,对单体、错误折叠、聚集或原纤维形式的TTR中的任一者或所有的缔合常数比对天然四聚体形式的TTR高至少10倍。任选地,例如,诸如18C5的抗体缺乏与天然四聚体形式的TTR的特异性结合。

#### [0222] II. 靶分子

[0223] 甲状腺素运载蛋白(TTR)为主要由肝脏合成的127-氨基酸、55kDa的血清和脑脊液运输蛋白。它也一直被称为前白蛋白、甲状腺素结合前白蛋白、ATTR和TBPA。在其天然状态下,TTR作为四聚体存在。在纯合子中,四聚体包含相同的127-氨基酸的富含 $\beta$ 折叠的亚基。在杂合子中,TTR四聚体由变体和/或野生型亚基组成,通常以统计学方式组合。

[0224] 确立的血液中TTR的功能是运输全视黄醇结合蛋白。虽然TTR是啮齿类动物血液中利用与用于全视黄醇结合蛋白的那些结合位点正交的结合位点的甲状腺素( $T_4$ )的主要载体,但是 $T_4$ 结合位点在人中未被有效占据。

[0225] TTR是至少三十种不同的人蛋白质之一,其细胞外错误折叠和/或组装(淀粉样蛋白生成)成聚集体结构谱被认为引起称为淀粉样蛋白病的退行性疾病。TTR经历构象变化,以便成为淀粉样蛋白生成性的。TTR四聚体解离和部分去折叠暴露了伸展构象中大部分不带电荷的疏水性残基的延伸,有效地错误组装成大部分非结构化的球形聚集体,所述大部分非结构化的球形聚集体最终经历构象转化成交叉 $\beta$ 片层淀粉样蛋白结构。

[0226] 除非从上下文中另外显而易见,否则对甲状腺素运载蛋白(TTR)或其片段或结构域的提及包括天然人氨基酸序列,所述天然人氨基酸序列包括其同工型、突变体和等位基因突变体。示例性TTR多肽序列由登录号P02766.1(UniProt)(SEQ ID NO:26)、AAB35639.1(GenBank)(SEQ ID NO:27)、AAB35640.1(GenBank)(SEQ ID NO:28)和ABI63351.1(GenBank)(SEQ ID NO:29)指定。残基根据Swiss Prot P02766.1来编号,成熟蛋白质(即不包括20个氨基酸信号序列)的第一个氨基酸被定名为残基1。在任何其他TTR蛋白中,残基根据P02766.1中的相应残基在最大对齐上来编号。

#### [0227] III. 甲状腺素运载蛋白淀粉样变性

[0228] 淀粉样变性蛋白(TTR)淀粉样变性是一种全身性病症,其特征不在于致病性、错误折叠的TTR和由TTR组成的淀粉样蛋白原纤维的细胞外沉积。TTR淀粉样变性通常由天然TTR四聚体形式的不稳定引起(归因于环境或遗传条件),导致TTR解离、错误折叠并聚集成淀粉样蛋白原纤维,所述淀粉样蛋白原纤维积累在各种器官和组织中,引起进行性功能障碍。参见,例如,Almeida和Saraiva,FEBS Letters 586:2891-2896(2012);Ando等.,Orphanet Journal of Rare Diseases 8:31(2013)。

[0229] 在人中,野生型TTR四聚体以及由突变型和野生型亚基组成的混合四聚体均可解离、错误折叠并聚集,淀粉样蛋白生成的过程导致受影响组织的退化。因此,TTR淀粉样变性涵盖由起因于TTR突变或起因于非突变的错误折叠的TTR的致病性错误折叠的TTR引起的疾病。

[0230] 例如,野生型ATTR淀粉样变性(也称为老年全身性淀粉样变性或SSA)和老年心脏

淀粉样变性 (SCA) 是由心脏心肌细胞之外和之内的野生型 TTR 淀粉样蛋白沉积引起的年龄相关的淀粉样变性类型。TTR 淀粉样变性还是由使 TTR 蛋白不稳定的突变引起的最常见的遗传性 (家族性) 淀粉样变性形式。与 TTR 基因的点突变相关的 TTR 淀粉样变性包括家族性淀粉样多发性神经病 (FAP)、家族性淀粉样心肌病 (FAC) 和罕见的中枢神经系统选择性淀粉样变性 (CNSA)。遗传性 (家族性) TTR 淀粉样变性患者几乎总是杂合子, 意指 TTR 四聚体由通常在统计学上分布的突变型和/或野生型 TTR 亚基组成。TTR 淀粉样变性的遗传性 (家族性) 版本通常是常染色体显性的, 并且通常比散发性疾病 (SSA 和 SCA) 较早发作。

[0231] 在编码 TTR 的基因中有超过 100 个一直涉及常染色体显性病症 FAP 和 FAC 的突变。参见, 例如, US 2014/0056904; Saraiva, Hum. Mutat. 17 (6): 493-503 (2001); Damas 和 Saraiva, J. Struct. Biol. 130: 290-299; Dwulet 和 Benson, Biochem. Biophys. Res. Commun. 114: 657-662 (1983)。这些引起淀粉样蛋白的突变分布在整个 TTR 分子中。通常, 突变型亚基对 TTR 四聚体结构越不稳定, 淀粉样蛋白病发作越早。TTR 变体的致病潜力通常由其不稳定性及其细胞分泌效率的组合来确定。由一些 TTR 变体引起的初始病理来自 TTR 变体对心脏组织的选择性破坏, 而来自其他 TTR 变体的病理来自损害周围和自主神经系统。由 TTR 淀粉样蛋白生成引起的组织损伤似乎主要来源于小的、可扩散 TTR 聚集体的毒性, 尽管细胞外淀粉样蛋白的积累可能有助于并且几乎必定损害 TTR 淀粉样变性晚期的器官结构。

[0232] TTR 淀粉样变性以许多不同形式呈现, 在个体和地理位置间具有相当多的表型变异。例如, TTR 淀粉样变性可呈现为进行性轴索突感觉自主和运动神经病。TTR 淀粉样变性还可呈现为浸润性心肌病。

[0233] 疾病相关症状的发作年龄在生命的第二个和第九个十年期之间变化, 不同人群间的变化很大。TTR 淀粉样变性的多系统参与是其诊断的线索。例如, 当存在以下中的一种或几种时, 考虑 TTR 淀粉样变性诊断: (1) 神经病家族史, 特别是与心衰竭相关的家族史; (2) 未知病因的神经性疼痛或进行性感障碍; (3) 无明显原因的腕管综合征, 特别是如果其为双侧性的并需要手术释放; (4) 未知病因的胃肠运动障碍或自主神经功能障碍 (例如, 勃起功能障碍、直立性低血压、神经原性膀胱功能障碍 (neurogenic bladder)); (5) 特征在于在不存在高血压的情况下的心室壁增厚的心脏病; (6) 未知来源的晚期房室阻塞, 特别是在伴有心脏增厚时; 以及 (6) 具有棉绒 (cotton-wool) 型的玻璃体内含物。参见, Ando 等, Orphanet Journal of Rare Diseases 8:31 (2013)。其他症状可包括例如多发性神经病、感觉缺失、疼痛、下肢虚弱、出汗障碍、腹泻、便秘、体重损失和尿失禁/尿潴留。

[0234] TTR 淀粉样变性的诊断通常依赖于靶器官活检, 随后用淀粉样蛋白特异性染料刚果红对所切除组织进行组织学染色。如果观察到淀粉样蛋白的阳性测试, 随后进行 TTR 的免疫组织化学染色和质谱鉴定以确保造成淀粉样蛋白形成的前体蛋白确实是 TTR。本文所公开的抗体可用于区分 TTR 淀粉样变性和非 TTR 淀粉样变性, 例如淀粉样轻链 (AL) 淀粉样变性, 也称为原发性系统性淀粉样变性。对于家族性疾病形式, 然后需要证实编码 TTR 的基因的突变, 之后可进行诊断。这可例如通过等电聚焦电泳、聚合酶链式反应或激光解剖/液相色谱串联质谱来实现。参见, 例如, US 2014/0056904; Ruberg 和 Berk, Circulation 126: 1286-1300 (2012); Ando 等, Orphanet Journal of Rare Diseases 8:31 (2013)。

[0235] IV. 抗体

[0236] A. 结合特异性和功能特性

[0237] 本发明提供结合到甲状腺素运载蛋白 (TTR) 蛋白,更具体地结合到TTR的氨基酸残基101-109 (SEQ ID NO:30) 内的表位的单克隆抗体。此类表位在天然TTR四聚体中掩埋,并且在单体、错误折叠、聚集或原纤维形式的TTR中暴露。

[0238] 一种此类抗体为18C5及其嵌合、贴面化和人源化形式。此抗体特异性结合在TTR的氨基酸残基101-109 (SEQ ID NO:30) 内。此抗体的进一步特征在于它结合到单体、错误折叠、聚集或原纤维形式的TTR但不结合到天然四聚体形式的TTR的能力。结合到特定蛋白质或其片段的能力可使用实施例中提供的示例性测定形式来证实。除非从上下文中另外显而易见,否则对18C5的提及应理解为指小鼠形式、嵌合形式、贴面化形式或人源化形式中的任一种。产生单克隆抗体18C5的杂交瘤细胞系于2017年10月31日保存在美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 的专利保藏库,Manassas, Virginia, 20110-2209, 并且指定专利保存号PTA-124570。

[0239] 一些抗体与定名为18C5的抗体结合到相同或重叠的表位。18C5的重链和轻链成熟可变区的序列分别被定名为SEQ ID NO:1和3。具有这种结合特异性的其他抗体可通过以下方式来产生:用TTR或其包括所需表位 (例如SEQ ID NO:30) 的部分免疫小鼠,并筛选所得抗体与单体TTR或包含SEQ ID NO:30的肽的结合,所述肽任选地与具有小鼠18C5 (IgG1,  $\kappa$ ) 的可变区的抗体竞争。包含所需表位的TTR片段可连接到有助于引发对片段的抗体应答的载剂和/或与帮助引发这种应答的佐剂组合。可筛选此类抗体相比于特定残基的突变体与野生型单体形式的TTR或其片段 (例如,SEQ ID NO:26) 的差别结合。针对此类突变体的筛选更精确地定义了结合特异性,以允许鉴定结合被特定残基的诱变抑制并且可能共享其他例证的抗体的功能特性的抗体。所述突变可为用丙氨酸 (或丝氨酸或甘氨酸,如果丙氨酸已经存在) 一次一个残基或更广泛隔开的间隔在整个靶标或其表位已知位于的整个部分中进行的全身性替代置换。如果相同突变组显著降低两种抗体的结合,则两种抗体结合相同的表位。

[0240] 具有所选鼠抗体 (例如18C5) 的结合特异性的抗体还可使用噬菌体展示法的变体来产生。参见, Winter, WO 92/20791。此方法特别适于生产人抗体。在此方法中,所选鼠抗体的重链可变区或轻链可变区用作起始材料。如果例如选择轻链可变区作为起始材料,则构建成员展示相同轻链可变区 (即,鼠起始材料) 和不同重链可变区的噬菌体文库。重链可变区可例如获自重排的人重链可变区的文库。选择对单体TTR或其片段 (例如,氨基酸残基101-109) 显示强特异性结合 (例如,至少 $10^8$ , 并且优选为至少 $10^9 M^{-1}$ ) 的噬菌体。来自此噬菌体的重链可变区然后用作用于构建另外噬菌体文库的起始材料。在此文库中,每个噬菌体展示相同的重链可变区 (即,由第一展示文库鉴别的区) 和不同的轻链可变区。轻链可变区可例如获自重排的人可变轻链区的文库。再次,选择对单体TTR或其片段 (例如氨基酸残基101-109) 显示强特异性结合的噬菌体。所得抗体通常与鼠起始材料具有相同或相似表位特异性。

[0241] 其他抗体可通过诱变编码示例性抗体诸如18C5的重链和轻链的cDNA来获得。与18C5的成熟重链可变区和/或轻链可变区的氨基酸序列至少70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同并且维持其功能特性的单克隆抗体,和/或与各个抗体的区别在于少数功能上无关紧要的氨基酸置换 (例如,保守性置换)、缺失或插入的单克隆抗体也包括在本发明中。还包括如由常规定义 (但优选Kabat) 所定义具有至少一个或所有六个CDR的单克隆抗体,所述单克隆抗体与18C5的对应CDR具有90%、95%、99%或100%同一性。

[0242] 本发明还提供具有完全或基本上来自18C5的一些或所有(例如,3、4、5和6个)CDR的抗体。此类抗体可包括具有完全或基本上来自18C5的重链可变区的至少两个(且通常为全部三个)CDR的重链可变区,和/或具有完全或基本上来自18C5的轻链可变区的至少两个(且通常为全部三个)CDR的轻链可变区。抗体可包括重链和轻链。当CDR含有不多于4、3、2或1个置换、插入或缺失时,其基本上来自相应的18C5 CDR,不同之处在于CDR-H2(当由Kabat定义时)可具有不多于6、5、4、3、2或1个置换、插入或缺失。此类抗体可与18C5的成熟重链可变区和/或轻链可变区的氨基酸序列具有至少70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性并且维持其功能特性,并且/或者与18C5的区别在于少数功能上无关紧要的氨基酸置换(例如,保守性置换)、缺失或插入。

[0243] 18C5的重链的Kabat/Chothia复合物CDR(CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3)分别被定名为SEQ ID NO:5、7和9,并且18C5的轻链的Kabat/Chothia复合物CDR(CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3)分别被定名为SEQ ID NO:11、13和15。

[0244] 表2指示由Kabat、Chothia、Chothia和Kabat的复合物(本文中还称为“Kabat/Chothia复合物”)、AbM以及Contact定义的18C5 CDR。

[0245] 表2

[0246] 使用Kabat编号,由Kabat、Chothia、Chothia和Kabat的复合物、AbM以及Contact定义的18C5 CDR

环	Kabat	Chothia	Chothia 和 Kabat 的复合物	AbM	Contact
[0247] L1	L24--L34 SEQ ID NO:11	L24--L34 SEQ ID NO:11	L24--L34 SEQ ID NO:11	L24--L34 SEQ ID NO:11	L30--L36 SEQ ID NO: 100
L2	L50--L56 SEQ ID NO:13	L50--L56 SEQ ID NO: 13	L50--L56 SEQ ID NO: 13	L50--L56 SEQ ID NO: 13	L46--L55 SEQ ID NO: 101
L3	L89--L97 SEQ ID NO: 15	L89--L97 SEQ ID NO:15	L89--L97 SEQ ID NO: 15	L89--L97 SEQ ID NO: 15	L89--L96 SEQ ID NO: 102
[0248] H1	H31--H35B SEQ ID NO: 93	H26--H32 SEQ ID NO: 94	H26--H35B SEQ ID NO:5	H26--H35B SEQ ID NO:5	H30--H35B SEQ ID NO: 95
H2	H50--H65 SEQ ID NO: 7	H52--H56 SEQ ID NO: 96	H50--H65 SEQ ID NO: 7	H50--H58 SEQ ID NO: 97	H47--H58 SEQ ID NO: 98
H3	H95--H102 SEQ ID NO:9	H95--H102 SEQ ID NO:9	H95--H102 SEQ ID NO: 9	H95--H102 SEQ ID NO: 9	H93--H101 SEQ ID NO: 99

[0249] 由此类测定鉴定的一些抗体可结合到单体、错误折叠、聚集或原纤维形式的TTR,

但不结合到如实施例或其他方式所述的天然四聚体形式的TTR。同样,一些抗体对TTR介导的淀粉样变性组织是免疫反应性的,但对健康组织不是免疫反应性的。

[0250] 一些抗体可在动物模型或临床试验中抑制或减少TTR的聚集、抑制或减少TTR原纤维形成、减少或清除TTR沉积物或聚集的TTR或使TTR的无毒性构象稳定。如动物模型或临床试验所示,一些抗体可治疗、预防或延迟TTR淀粉样变性的发作。用于测试针对TTR淀粉样变性的活性的示例性动物模型包括描述于以下中的那些模型:Kohno等,Am. J. Path. 150 (4) : 1497-1508 (1997);Teng等,Laboratory Investigations 81:385-396 (2001);Wakasugi等,Proc. Japan Acad. 63B:344-347 (1987);Shimada等,Mol. Biol. Med. 6:333-343 (1989);Nagata等,J. Biochem. 117:169-175 (1995);Sousa等,Am. J. Path. 161:1935-1948 (2002);以及Santos等,Neurobiology of Aging 31:280-289 (2010)。

[0251] 可通过用TTR或其片段使动物免疫并筛选诱导抗体以鉴定结合在TTR的残基101-109内的抗体,来鉴定结合到TTR的残基101-109内的表位的抗体。动物可为例如啮齿动物,诸如小鼠、兔子或大鼠。动物可为转基因的,诸如被修饰为具有人免疫球蛋白基因的啮齿动物。用于免疫的片段可为不超过25个TTR的连续残基的片段,所述片段包括TTR的残基101-109内的至少3、4、5、6、7、8或9个连续残基。用于免疫的片段可由TTR的残基101-109组成。用于免疫的片段可连接到载剂以帮助引发抗体的诱导。可通过测定抗体是否结合到由残基101-109组成的TTR的片段来对抗体进行筛选。任选地,还可筛选结合到全长TTR的抗体。

[0252] 可通过提供抗体的展示文库并筛选展示文库以鉴定结合在TTR的残基101-109内的抗体,来鉴定结合到TTR的残基101-109内的表位的抗体。展示文库可为噬菌体展示文库、酵母展示文库、核糖体展示文库等等。例如,展示文库可将抗体展示为Fv片段或Fab。展示文库可为天然展示文库。从噬菌体展示文库分离抗体的方法公开于例如WO 2017/207739中。可替代地,可通过用TTR或其片段使啮齿动物免疫并将编码抗体的重链和轻链的核酸克隆到展示载体中来产生展示文库。啮齿动物可为例如小鼠、兔子或大鼠。用于免疫的片段可为不超过25个TTR的连续残基的片段,所述片段包括TTR的残基101-109内的至少3、4、5、6、7、8或9个连续残基。用于免疫的片段可由TTR的残基101-109组成。用于免疫的片段可连接到载剂以帮助引发抗体的诱导。可筛选结合到由残基101-109组成的TTR的片段的文库成员。任选地,还可筛选结合到全长TTR的文库成员。可在结合到TTR的残基101-109内的表位的参考抗体的存在下筛选文库成员。参考抗体可为抗体18C5。

[0253] 可通过在存在和不存在抗体18C5的情况下使TTR与测试抗体接触并测定抗体与TTR的结合来鉴定与抗体18C5竞争结合以结合到TTR的测试抗体。在抗体18C5的存在下抗体结合的减少指示抗体与抗体18C5竞争结合到TTR。可替代地或除此之外,可通过在存在或不存在测试抗体的情况下使TTR与抗体18C5接触来进行测定,在此情况下,在测试抗体的存在下18C5与TTR的结合的减少指示竞争。

[0254] 可通过以下来鉴定与抗体18C5结合到TTR上相同的表位的抗体:测定由抗体18C5在TTR上结合的表位;用TTR或其片段使动物免疫;以及筛选诱导抗体以鉴定与抗体18C5结合到相同表位的抗体。动物可为例如啮齿动物,诸如小鼠、兔子或大鼠。动物可为转基因的,诸如被修饰为具有人免疫球蛋白基因的啮齿动物。

[0255] 可通过以下来鉴定与抗体18C5结合到TTR上相同的表位的抗体:测定由抗体18C5在TTR上结合的表位;提供抗体的展示文库;以及筛选展示文库以鉴定与抗体18C5结合到相



同表位的抗体。展示文库可为噬菌体展示文库、酵母展示文库或核糖体展示文库。例如，展示文库可将抗体展示为Fv片段或Fab片段。展示文库可为天然展示文库。从噬菌体展示文库分离抗体的方法公开于例如WO 2017/207739中。

[0256] 还可通过噬菌体展示方法产生抗体，以具有所选鼠抗体（例如，18C5）的结合特异性。在此方法中，所选鼠抗体的重链可变区或轻链可变区用作起始材料。如果例如选择轻链可变区作为起始材料，则构建成员展示相同轻链可变区（即，鼠起始材料）和不同重链可变区的噬菌体文库。重链可变区可例如获自重排的人重链可变区的文库。选择对单体TTR或其片段（例如，氨基酸残基101-109）显示强特异性结合（例如，至少 $10^8$ ，并且优选为至少 $10^9 M^{-1}$ ）的噬菌体。来自此噬菌体的重链可变区然后用作用于构建另外噬菌体文库的起始材料。在此文库中，每个噬菌体展示相同的重链可变区（即，由第一展示文库鉴别的区）和不同的轻链可变区。轻链可变区可例如获自重排的人可变轻链区的文库。再次，选择对单体TTR或其片段（例如氨基酸残基101-109）显示强特异性结合的噬菌体。所得抗体通常与鼠起始材料具有相同或相似表位特异性。

[0257] 可通过用TTR或其片段使啮齿动物免疫并将编码抗体的重链和轻链的核酸克隆到展示载体中来产生用于产生与抗体18C5结合到TTR上相同表位的抗体的展示文库。啮齿动物可为例如小鼠、兔子或大鼠。用于免疫的片段可为不超过25个TTR的连续残基的片段，所述片段包括TTR的残基101-109内的至少3、4、5、6、7、8或9个连续残基。用于免疫的片段可由TTR的残基101-109组成。用于免疫的片段可连接到载剂以帮助引发抗体的诱导。

[0258] 可筛选结合到由残基101-109组成的TTR的片段的展示文库成员。任选地，还可筛选结合到全长TTR的文库成员。可在结合到TTR的残基101-109内的表位的参考抗体的存在下筛选文库成员。参考抗体可为抗体18C5。

[0259] 例如，可通过测量18C5相比于特定残基的突变体与野生型单体形式的TTR或其片段的结合来测定由抗体18C5在TTR上结合的表位。所述突变可为用丙氨酸（或丝氨酸或甘氨酸，如果丙氨酸已经存在）一次一个残基或更广泛隔开的间隔在整个靶标或其表位已知位于的整个部分中进行的全身性替代置换。如果抗原中的减少或消除一种抗体的结合的所有氨基酸突变减少或消除另一种抗体的结合，那么两种抗体具有相同表位。由抗体18C5在TTR上结合的表位还可由结合到它的抗原以鉴定接触残基的抗体的X射线晶体学测定。如果两个抗体具有相同的接触残基，则其结合相同的表位。

[0260] 结合到不同于18C5的TTR表位的抗TTR抗体，包括其嵌合版本和人源化版本，可与本发明的18C5抗体一起用于组合疗法、双特异性抗体、TTR相关病症的诊断和/或治疗的方法以及检测TTR的方法中。结合到不同于18C5的TTR表位的此类抗TTR抗体可包括如下表3中的抗体。

[0261] 表3：抗TTR抗体。

名称	根据报告的 TTR 上的表位	根据报告的 VH/VL 或 CDR	参考文献
9D5	EHAENVFTA (89-97)	Kabat CDR:	WO

名称	根据报告的 TTR 上的表位	根据报告的 VH/VL 或 CDR	参考文献
	(SEQ ID NO:45)	CDR-H1 SEQ ID NO:75 CDR-H2 SEQ ID NO:76 CDR-H3 SEQ ID NO:77 CDR-L1 SEQ ID NO:78 CDR-L2 SEQ ID NO:79 CDR-L3 SEQ ID NO:80	2016/120810 A1 ATCC 保存号 PTA-124078 日期: 2017 年 4 月 4 日
14G8	EHAEEVFTA (89-97) (SEQ ID NO:45)	Kabat CDR: CDR-H1 SEQ ID NO:39 CDR-H2 SEQ ID NO:40 CDR-H3 SEQ ID NO:41 CDR-L1 SEQ ID NO:42 CDR-L2 SEQ ID NO:43 CDR-L3 SEQ ID NO:44	WO 2016/120810 A1 ATCC 保存号 PTA-124079 日期: 2017 年 4 月 4 日
5A1	EHAEEVFTA (89-97) (SEQ ID NO:45)	Kabat CDR: CDR-H1 SEQ ID NO:46 CDR-H2 SEQ ID NO:47 CDR-H3 SEQ ID NO:48 CDR-L1 SEQ ID NO 49 CDR-L2 SEQ ID NO :50 CDR-L3 SEQ ID NO: 51	WO 2016/120811 ATCC 保存号 PTA-124080 日期: 2017 年 4 月 4 日
6C1	EHAEEVFTA (89-97) (SEQ ID NO:45)	Kabat CDR: CDR-H1 SEQ ID NO:52 CDR-H2 SEQ ID NO:53 CDR-H3 SEQ ID NO: 54 CDR-L1 SEQ ID NO: 55 CDR-L2 SEQ ID NO:56 CDR-L3 SEQ ID NO: 57	WO 2016/120809 ATCC 保存号 PTA-124077 日期: 2017 年 4 月 4 日
AD7F6		VH SEQ ID NO: 58 VL SEQ ID NO: 59	WO 2010/030203 A1
RT24	118-122, 115-124	CDR-H1 SEQ ID NO: 60 CDR-H2 SEQ ID NO: 61 CDR-H3 SEQ ID NO:62 CDR-L1 SEQ ID NO: 63 CDR-L2 SEQ ID NO: 64 CDR-L3 SEQ ID NO:65	WO 2015/115331
NI-301.35G11	53-63, 54-61	CDR-H1 SEQ ID NO: 66 CDR-H2 SEQ ID NO: 67 CDR-H3 SEQ ID NO:68 CDR-L1 SEQ ID NO: 69 CDR-L2 SEQ ID NO: 70 CDR-L3 SEQ ID NO:71	US 2016/0355576 A1
MFD101,	ADDTWEPFASGKT		US

[0263]

名称	根据报告的 TTR 上的表位	根据报告的 VH/VL 或 CDR	参考文献
MDF102, MFD103, MFD105	(残基 36-49) (SEQ ID NO:72)		2016/0039916 A1
MFD107, MFD108, MFD109, MFD111	TSESGELHGLTTE (残基 49-61) (SEQ ID NO:73)		US 2016/0039916 A1
MFD114	ALLSPYSYSTTAV (残基 109-121) (SEQ ID NO:74)		US 2016/0039916 A1
	30-66		US 2016/0039916 A1
[0264]	70-127		US 2016/0039916 A1
	80-127		US 2016/0039916 A1
	90-127		US 2016/0039916 A1
	100-127		US 2016/0039916 A1
	110-127		US 2016/0039916 A1
	115-127		US 2016/0039916 A1

[0265] B. 非人抗体

[0266] 针对单体TTR或其片段(例如,氨基酸残基101-109)进行的其他非人抗体(例如鼠、豚鼠、灵长类动物、兔或大鼠)的生产可通过例如用TTR或其片段免疫动物来实现。参见, Harlow和Lane, Antibodies, A Laboratory Manual (CSHP NY, 1988) (出于所有目的通过引用的方式并入)。这种免疫原可自天然来源、由肽合成或重组表达来获得。任选地,免疫原可与载体蛋白融合或以其他方式复合施用。任选地,免疫原可与佐剂一起施用。几种类型的佐剂可如下所述来使用。对于实验室动物的免疫,优选完全弗氏佐剂,随后为不完全佐剂。兔或豚鼠通常用于制备多克隆抗体。小鼠通常用于制备单克隆抗体。筛选抗体与单体TTR或TTR内的表位(例如,包含氨基酸残基101-109中的一个或多个的表位)的特异性结合。此类筛选可通过确定抗体与单体TTR变体(诸如含有氨基酸残基101-109或这些残基内的突变的TTR变体)的结合以及确定哪些TTR变体结合到抗体来实现。结合可例如通过蛋白质印迹、FACS或ELISA来评估。

[0267] C. 人源化抗体

[0268] 人源化抗体是遗传工程化抗体,在所述遗传工程化抗体中来自非人“供体”抗体的

CDR被移植到人“受体”抗体序列中(参见,例如,Queen,US 5,530,101和5,585,089;Winter,US 5,225,539;Carter,US 6,407,213;Adair,US 5,859,205;以及Foote,US 6,881,557)。受体抗体序列可为例如成熟人抗体序列、此类序列的复合物、人抗体序列的共有序列或种系区序列。因此,人源化抗体为具有完全或基本上来自供体抗体的至少三个、四个、五个或全部CDR以及完全或基本上来自人抗体序列的可变区框架序列和恒定区(如果存在)的抗体。类似地,人源化重链具有完全或基本上来自供体抗体重链的至少一个、两个和通常全部三个CDR,以及基本上来自人重链可变区框架和恒定区序列的重链可变区框架序列和重链恒定区(如果存在)。类似地,人源化轻链具有完全或基本上来自供体抗体轻链的至少一个、两个和通常全部三个CDR,以及基本上来自人轻链可变区框架和恒定区序列的轻链可变区框架序列和轻链恒定区(如果存在)。不同于纳米抗体和dAb,人源化抗体包含人源化重链和人源化轻链。当相应残基(如由任何常规定义所定义,但优选由Kabat定义所定义)中的至少85%、90%、95%或100%在各个CDR之间相同时,人源化抗体中的CDR基本上来自非人抗体中的相应CDR。当由任何常规定义所定义但优选由Kabat所定义的相应残基中的至少85%、90%、95%或100%相同时,抗体链的可变区框架序列或抗体链的恒定区分别基本上来自人可变区框架序列或人恒定区。为了根据2014年世界卫生组织(WHO)国际非专有名称(INN)对人源化抗体的定义被分类为人源化,抗体必须在成熟可变区中与人种系抗体序列(即体细胞超突变前)具有至少85%同一性。混合抗体为一个抗体链(例如重链)满足阈值但另一个抗体链(例如轻链)不满足阈值的抗体。即使两条链的可变框架区基本上为人而具有一些鼠回复突变,如果两条链都不满足阈值,则将抗体分类为嵌合的。参见,Jones等(2016) The INNs and outs of antibody nonproprietary names,mAbs 8:1,1-9,DOI:10.1080/19420862.2015.1114320。另外参见“WHO-INN:International nonproprietary names (INN)for biological and biotechnological substances(a review)”(互联网)2014。可从以下获得:<http://www.who.int/medicines/services/inn/BioRev2014.pdf>),以引用方式并入本文。为免存疑,如本文所使用的术语“人源化”并不旨在限于2014年WHO INN对人源化抗体的定义。本文提供的人源化抗体中的一些在任一个或两个成熟可变区中与人种系序列具有至少85%的序列同一性,并且本文提供的人源化抗体中的一些在任一个或两个成熟可变区中与人种系序列具有小于85%的序列同一性。本文提供的人源化抗体的成熟重链可变区中的一些与人种系序列具有约60%至100%的序列同一性,诸如例如,在约60%至69%、70%至79%、80%至84%或85%至89%的范围内。成熟重链可变区重链中的一些低于2014年WHO INN定义,并且与人种系序列具有例如约64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%或82%、83%或84%的序列同一性,而其他成熟重链可变区符合2014年WHO INN定义,并且与人种系序列具有约85%、86%、87%、88%、89%或更高的序列同一性。本文提供的人源化抗体的成熟轻链可变区中的一些与人种系序列具有约60%至100%的序列同一性,诸如例如,在约80%至84%或85%至89%的范围内。成熟轻链可变区中的一些低于2014年WHO INN定义,并且与人种系序列具有例如约81%、82%、83%或84%的序列同一性,而其他成熟轻链可变区符合2014年WHO INN定义,并且与人种系序列具有约85%、86%、87%、88%、89%或更高的序列同一性。本文提供的一些根据2014年WHO INN定义为“嵌合”的人源化抗体具有与人种系序列小于85%同一性的成熟重链可变区,其与具有与人种系序列小于85%同一性的成熟轻链可变区

配对。例如,本文提供的一些根据2014年WHO INN定义为“混合”的人源化抗体具有与人种系序列至少85%序列同一性的成熟重链可变区,其与具有与人种系序列小于85%序列同一性的成熟轻链可变区配对,反之亦然。本文提供的一些人源化抗体符合2014年WHO INN对“人源化”的定义并且具有与人种系序列至少85%同一性的成熟重链可变区,其与具有与人种系序列至少85%序列同一性的成熟轻链可变区配对。符合2014年WHO INN对“人源化”的定义的示例性18C5抗体包括具有氨基酸序列为SEQ ID NO:85或SEQ ID NO:86的成熟重链可变区的抗体,所述成熟重链可变区与具有氨基酸序列SEQ ID NO:91或SEQ ID NO:92的成熟轻链可变区配对。

[0269] 虽然人源化抗体通常并入来自小鼠抗体的所有六个CDR(优选如由Kabat所定义),但是它们也可以用少于来自小鼠抗体的所有CDR制造(例如,至少3、4或5个CDR)(例如,Pascalis等,J.Immunol.169:3076,2002;Vajdos等,J.of Mol.Biol.,320:415-428,2002;Iwahashi等,Mol.Immunol.36:1079-1091,1999;Tamura等,J.Immunol.,164:1432-1441,2000)。

[0270] 在一些抗体中,仅需要一部分CDR(即结合所需的CDR残基的亚基,称为SDR)来保留人源化抗体中的结合。未接触抗原并且未处于SDR中的CDR残基可基于先前的研究(例如,通常不需要CDR H2中的残基H60-H65)由位于Chothia高变环外的Kabat CDR区(Chothia,J.Mol.Biol.196:901,1987)通过分子模拟和/或凭经验或如Gonzales等,Mol.Immunol.41:863,2004中所述来鉴定。在不存在一个或多个供体CDR残基或省略整个供体CDR的位置处的此类人源化抗体中,占据所述位置的氨基酸可为占据受体抗体序列中相应位置(由Kabat编号)的氨基酸。包括CDR中供体氨基酸的受体的这种置换数目反映竞争平衡考虑。此类置换在减少人源化抗体中的小鼠氨基酸的数目以及因此降低潜在免疫原性方面是潜在有利的。然而,置换还可引起亲和力的变化,并且优选避免亲和力的显著降低。CDR和氨基酸内用于置换的置换位置也可凭经验来选择。

[0271] 人受体抗体序列可任选地选自许多已知的人抗体序列,以在人受体序列可变区框架与供体抗体链的相应可变区框架之间提供高度的序列同一性(例如,65-85%同一性)。

[0272] 18C5重链的受体序列的一个实例为人源化Crenezumab Fab(CreneFab) VH,具有PDB登录号5VZY(SEQ ID NO:83)。18C5轻链的受体序列的一个实例为人源化Crenezumab Fab(CreneFab) VL,具有PDB登录号5VZY(SEQ ID NO:89)。18C5轻链的受体序列的另一个实例为人种系基因IGKV2-30\*02(SEQ ID NO:90)。

[0273] 如果链(轻链或重链)选择多于一个人受体抗体序列,则可将那些受体的复合物或杂交物用于该链,并且可从所使用的人受体抗体序列中的任一个中取得用于不同位置的氨基酸。

[0274] 来自人可变区框架残基的某些氨基酸可基于它们对CDR构象和/或与抗原结合的可能影响来选择以进行置换。此类可能影响的研究是通过建模、特定位置处氨基酸特征的检查或特定氨基酸的置换或诱变的效应的经验观察来进行。

[0275] 例如,当鼠可变区框架残基与所选人可变区框架残基之间的氨基酸不同时,当合理预期氨基酸的以下特征时人框架氨基酸可被来自小鼠抗体的等同框架氨基酸置换:

[0276] (1) 直接非共价结合抗原;

[0277] (2) 与CDR区相邻或处于由Chothia而非Kabat定义的CDR内;

[0278] (3)以其他方式与CDR区(例如,处于CDR区的约6Å内)相互作用(例如通过对同源已知免疫球蛋白链的解析结构上的轻链或重链进行建模来鉴定);或

[0279] (4)为参与VL-VH界面的残基。

[0280] 本发明提供了鼠18C5抗体的人源化形式,其包括2个例证的人源化重链成熟可变区(hu18C5-VH\_v1(SEQ ID NO:85)和hu18C5-VH\_v2(SEQ ID NO:86))、以及2个例证的人源化轻链成熟可变区(hu18C5-VL\_v1(SEQ ID NO:91)和hu18C5-VL\_v2(SEQ ID NO:92))。

[0281] 在一个实施方案中,使用允许使用QuikChange定点诱变引入多个突变、缺失和插入的二阶段PCR方案生成人源化序列[Wang,W.和Malcolm,B.A.(1999)BioTechniques 26:680-682]。

[0282] 来自自由Queen,US 5,530,101所定义的类别(1)至(3)的框架残基有时被可替代地称为标准(canonical)残基和微调(vernier)残基。帮助定义CDR环构象的框架残基有时被称为标准残基(Chothia&Lesk,J.Mol.Biol.196:901-917(1987);Thornton&Martin,J.Mol.Biol.263:800-815(1996))。支持抗原结合环构象并在微调抗体与抗原的适合中发挥作用的框架残基有时被称为微调残基(Foote和Winter,J.Mol.Biol 224:487-499(1992))。

[0283] 作为置换的候选者的其他框架残基为产生潜在糖基化位点的残基。置换的另一些候选者为在所述位置对于人免疫球蛋白不寻常的受体人框架氨基酸。这些氨基酸可被来自小鼠供体抗体的等同位置或更典型的人免疫球蛋白的等同位置的氨基酸置换。

[0284] 作为置换的候选者的其他框架残基为可由谷氨酰胺(Q)替代的N端谷氨酸残基(E)。

[0285] 示例性人源化抗体为小鼠18C5的人源化形式,定名为Hu18C5。

[0286] 小鼠抗体18C5包含具有分别包含SEQ ID NO:81和SEQ ID NO:87的氨基酸序列的成熟重链可变区和轻链可变区。本发明提供了2个例证的人源化成熟重链可变区:hu18C5-VH\_v1和hu18C5-VH\_v2。本发明还提供了2个例证的人成熟轻链可变区:hu18C5-VL\_v1和hu18C5-VL\_v2。针对轻链可变区(表6和图4)和重链可变区(表7和图3)示出鼠18C5和各种人源化抗体的对齐。

[0287] 如实施例7中所进一步详细说明,由于诸如以下的原因:对CDR构象和/或与抗原结合的可能影响、介导重链与轻链之间的相互作用、与恒定区的相互作用、作为所需或非所需翻译后修饰的位点、作为其在人可变区序列中的位置的不寻常残基以及因此潜在地为免疫原性的、获得聚集潜力以及其他原因,18C5的以下8个可变区框架位置被视为2个例证的人成熟轻链可变区和2个例证的人成熟重链可变区中的置换的候选者:L2(I2V)、L45(Q45R)、H37(V37A)、H45(L45Q)、H47(L47W)、H48(V48I)、H49(A49G)和H94(S94R)。

[0288] 此处,与其他地方一样,第一提及的残基为通过在CDR-H1的情况下将Kabat CDR或复合Chothia-Kabat CDR移植到人受体框架中形成的人源化抗体的残基,并且第二提及的残基为考虑用于替代所述残基的残基。因此,在可变区框架内,第一提及的残基为人,并且在CDR内,第一提及的残基为小鼠。

[0289] 此类人源化抗体的CDR区可与18C5小鼠供体抗体的CDR区相同或基本相同。CDR区可由诸如表1中的那些常规定义的任何常规定义来定义,但优选如由Kabat或Kabat+Chothia复合物所定义。

[0290] 除非另有说明,否则可变区框架位置符合Kabat编号。

[0291] 人源化18C5变体中另外变异的可能性是可变区框架中的另外回复突变。许多不与人源化mAb中的CDR接触的框架残基可适应来自供体小鼠mAb或其他小鼠或人抗体的相应位置的氨基酸置换,并且甚至许多潜在CDR接触残基也可适于置换。即使CDR内的氨基酸也可例如用在用于供应可变区框架的人受体序列的相应位置处发现的残基来改变。此外,替代性人受体序列可用于例如重链和/或轻链。如果使用不同的受体序列,则可能不会进行以上推荐的一个或多个回复突变,因为相应供体和受体残基在没有回复突变的情况下已经相同。

[0292] Hu18C5变体(无论是否保守)中的一些替代或回复突变对人源化mAb的结合亲和力或效价没有显著影响,所述人源化mAb的结合亲和力或效价即其结合到单体TTR的能力(例如,变体人源化18C5抗体的本实例中描述的一些或所有测定中的效价与鼠18C5的效价基本相同,即在实验误差内)。

[0293] D. 嵌合抗体和贴面化抗体

[0294] 本发明还提供嵌合形式和贴面化形式的非人抗体,特别是实施例的18C5抗体。

[0295] 嵌合抗体为非人抗体(例如小鼠)的轻链和重链的成熟可变区与人轻链和重链恒定区组合的抗体。此类抗体基本上或完全保留小鼠抗体的结合特异性,并且为约三分之二的人序列。在一个实施方案中,嵌合18C5抗体具有成熟重链可变区氨基酸序列SEQ ID NO:81、成熟轻链可变区氨基酸序列SEQ ID NO:87、人重链恒定区氨基酸序列SEQ ID NO:17以及人轻链恒定区氨基酸序列SEQ ID NO:19。

[0296] 贴面化抗体是一种类型的人源化抗体,其保留非人抗体的一些且通常所有CDR以及一些非人可变区框架残基,但以来自人抗体序列的相应位置的残基替代可能有助于B细胞或T细胞表位的其他可变区框架残基,例如暴露的残基(Padlan, Mol. Immunol. 28:489, 1991)。结果是CDR完全或基本上来自非人抗体并且通过置换使非人抗体的可变区框架变得更人样的抗体。在本发明中包括贴面化形式的18C5抗体。

[0297] E. 人抗体

[0298] 针对单体TTR或其片段的人抗体(例如, TTR的氨基酸残基101-109 (SEQ ID NO:30)) 通过以下描述的各种技术来提供。一些人抗体通过竞争性结合实验、通过以上Winter的噬菌体展示法或以其他方式来选择,以与特定小鼠抗体(诸如实例中描述的小鼠单克隆抗体中的一种)具有相同的表位特异性。还可通过仅使用TTR的片段(诸如仅含有TTR的氨基酸残基101-109的TTR变体)作为靶抗原和/或通过筛选针对TTR变体(诸如含有TTR的氨基酸残基101-109内的各种突变的TTR变体)的集合的抗体来筛选人抗体的特定表位特异性。

[0299] 用于产生人抗体的方法包括:Oestberg等, Hybridoma 2:361-367 (1983); Oestberg, 美国专利号4,634,664; 以及Engleman等, 美国专利4,634,666中的三源杂交瘤法、包含人免疫球蛋白基因的转基因小鼠的用途(参见,例如, Lonberg等, W093/12227 (1993); US 5,877,397; US 5,874,299; US 5,814,318; US 5,789,650; US 5,770,429; US 5,661,016; US 5,633,425; US 5,625,126; US 5,569,825; US 5,545,806; Neuberger, Nat. Biotechnol. 14:826 (1996); 以及Kucherlapati, W0 91/10741 (1991)) 以及噬菌体展示法(参见,例如, Dower等, W0 91/17271; McCafferty等, W0 92/01047; US 5,877,218; US 5,871,907; US 5,858,657; US 5,837,242; US 5,733,743; 以及US 5,565,332)。

### [0300] F. 恒定区的选择

[0301] 嵌合抗体、贴面化抗体或人源化抗体的重链可变区和轻链可变区可连接到人恒定区的至少一部分。恒定区的选择部分取决于是否需要抗体依赖性细胞介导的细胞毒性、抗体依赖性细胞吞噬作用和/或补体依赖性细胞毒性。例如,人同种型IgG1和IgG3具有补体依赖性细胞毒性,并且人同种型IgG2和IgG4不具有。与人IgG2和IgG4相比,人IgG1和IgG3还诱导更强的细胞介导的效应物功能。轻链恒定区可为 $\lambda$ 或 $\kappa$ 。恒定区的编号惯例包括EU编号(Edelman,G.M.等,Proc.Natl.Acad.USA,63,78-85(1969))、Kabat编号(Kabat,Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institutes of Health,Bethesda,MD,1991,IMGT唯一编号(Lefranc M.-P.等,IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor constant domains and Ig superfamily C-like domains,Dev.Comp.Immunol.,29,185-203(2005)以及IMGT外显子编号(Lefranc,同上)。

[0302] 轻链和/或重链的氨基端或羧基端处的一个或几个氨基酸(诸如重链的C端赖氨酸)可能在一定比例或全部分子中丢失或衍生。可在恒定区进行置换以减少或增加效应物功能,诸如补体介导的细胞毒性或ADCC(参见,例如,Winter等,美国专利号5,624,821;Tso等,美国专利号5,834,597;以及Lazar等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 103:4005,2006),或延长人体内的半衰期(参见,例如,Hinton等,J.Biol.Chem.279:6213,2004)。示例性置换包括位置250处的Gln和/或位置428处的Leu(EU编号在本段中用于恒定区)以增加抗体半衰期。位置234、235、236和/或237中的任一个或所有处的置换降低对Fc $\gamma$ 受体,特别是Fc $\gamma$ RI受体的亲和力(参见,例如,US 6,624,821)。人IgG1的位置234、235和237处的丙氨酸置换可用于减少效应物功能。一些抗体具有人IgG1的位置234、235和237处的丙氨酸置换,以减少效应物功能。任选地,人IgG2中位置234、236和/或237被丙氨酸置换,并且位置235被谷氨酰胺置换(参见,例如,US 5,624,821)。在一些抗体中,使用通过EU编号的人IgG1的位置241、264、265、270、296、297、322、329和331中的一个或多个处的突变。在一些抗体中,使用通过EU编号的人IgG1的位置318、320和322中的一个或多个处的突变。在一些抗体中,位置234和/或235被丙氨酸置换,并且/或者位置329被甘氨酸置换。在一些抗体中,诸如在SEQ ID NO:27中,位置234和235被丙氨酸置换。在一些抗体中,同种型为人IgG2或IgG4。

[0303] 示例性人轻链 $\kappa$ 恒定区具有SEQ ID NO:24的氨基酸序列。SEQ ID NO:24的N端精氨酸可被省略,在所述情况下,轻链 $\kappa$ 恒定区具有SEQ ID NO:25的氨基酸序列。示例性人IgG1重链恒定区具有SEQ ID NO:21的氨基酸序列(具有或没有C端赖氨酸)。抗体可表达为含有两条轻链和两条重链的四聚体、单独重链、轻链,Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>和Fv或单链抗体,在所述单链抗体中重链和轻链成熟可变结构域通过间隔区来连接。

[0304] 人恒定区在不同个体之间显示出同种异型变异和同族同种异型变异(isoallotypic variation),即恒定区可在不同个体中在一个或多个多态位置处不同。同族同种异型(Isoallotype)与同种异型的区别在于识别同族同种异型的血清结合到一个或多个其他同种型的非多态性区。因此,例如,另一个重链恒定区具有IgG1 G1m3同种异型,并且具有SEQ ID NO:22的氨基酸序列。IgG1 G1m3同种异型的另一个重链恒定区具有SEQ ID NO:23的氨基酸序列(具有或没有C端赖氨酸)。对人恒定区的引用包括具有任何天然同种异型或占据天然同种异型中位置的残基的任何排列的恒定区。

### [0305] G. 重组抗体的表达



[0306] 已知用于使用抗体表达细胞系(例如杂交瘤)产生嵌合抗体和人源化抗体的许多方法。例如,抗体的免疫球蛋白可变区可使用熟知方法来克隆和测序。在一种方法中,重链可变VH区通过RT-PCR使用由杂交瘤细胞制备的mRNA来克隆。共有引物用于涵盖翻译起始密码子的VH区前导肽作为5'引物和g2b恒定区特异性3'引物。示例性引物在Schenk等的美国专利公布US 2005/0009150(下文中的“Schenk”)中有所描述。可比较来自多个独立来源的克隆的序列,以确保未在扩增过程中引入变化。VH区的序列还可通过对通过5'RACE RT-PCR方法和3'g2b特异性引物获得的VH片段进行测序来测定或确认。

[0307] 轻链可变VL区可以类似方式克隆。在一种方法中,共有引物组使用设计来与涵盖翻译起始密码子的VL区杂交的5'引物和对V-J连接区下游的Ck区特异性的3'引物来设计用于扩增VL区。在第二种方法中,5'RACE RT-PCR方法用于克隆编码VL的cDNA。示例性引物在Schenk中有所描述,同上。克隆的序列然后与编码人(或其他非人物种)恒定区的序列组合。编码人恒定区的示例性序列包括:SEQ ID NO:32,其编码人IgG1恒定区;以及SEQ ID NO:33和34,其编码人κ轻链恒定区。

[0308] 在一种方法中,重链和轻链可变区被重新工程化以编码各个VDJ或VJ接点下游的剪接供体序列,并且被克隆到哺乳动物表达载体(诸如用于重链的pCMV-hγ1和用于轻链的pCMV-Mc1)中。这些载体将人γ1和Ck恒定区编码为插入的可变区盒下游的外显子片段。在序列验证之后,重链和轻链表达载体可共转染到CHO细胞中以产生嵌合抗体。条件培养基在转染后48小时收集,并通过蛋白质印迹分析来测定抗体产生或通过ELISA来测定抗原结合。嵌合抗体如上所述来进行人源化。

[0309] 嵌合抗体、贴面化抗体、人源化抗体和人抗体通常通过重组表达来产生。重组多核苷酸构建体通常包括可操作地连接到抗体链的编码序列的表达控制序列,包括天然相关表达控制元件或异源表达控制元件,诸如启动子。表达控制序列可为能够转化或转染真核或原核宿主细胞的载体中的启动子系统。一旦已经将载体并入适当宿主中,就将宿主保持在适于核苷酸序列的高水平表达以及交叉反应抗体的收集和纯化的条件下。

[0310] 这些表达载体通常可在宿主有机体中作为游离基因体(episome)或宿主染色体DNA的整体部分复制。通常,表达载体含有选择标记(例如氨苄青霉素抗性或潮霉素抗性)以允许检测用所需DNA序列转化的那些细胞。

[0311] 大肠杆菌(E.coli)是一种可用于表达抗体,特别是抗体片段的原核宿主。微生物诸如酵母也可用于表达。酵母菌属(Saccharomyces)是具有合适载体的酵母宿主,所述合适载体根据需要具有表达控制序列、复制起点、终止序列等。典型启动子包括3-磷酸甘油酸激酶和其他解糖酶。在其他事项中,可诱导酵母启动子包括来自乙醇脱氢酶、异细胞色素C和负责麦芽糖和半乳糖利用的酶的启动子。

[0312] 哺乳动物细胞可用于表达编码免疫球蛋白或其片段的核苷酸区段。参见,Winnacker,From Genes to Clones,(VCH Publishers,NY,1987)。许多能够分泌完整异源蛋白质的合适的宿主细胞系已有所开发,并且包括CHO细胞系、各种COS细胞系、HeLa细胞、HEK293细胞、L细胞和非抗体产生骨髓瘤,包括Sp2/0和NS0。细胞可能是非人的。这些细胞的表达载体可包括表达控制序列,诸如复制起点、启动子、增强子(Queen等,Immunol.Rev.89:49(1986)),以及必要的处理信息位点,诸如核糖体结合位点、RNA剪接位点、多聚腺苷酸化位点和转录终止子序列。表达控制序列可包括来源于内源基因、巨细胞病毒、SV40、腺病毒、

牛乳头瘤病毒等的启动子。参见Co等, *J. Immunol.* 148:1149 (1992)。

[0313] 可替代地, 抗体编码序列可并入转基因中以引入转基因动物的基因组中, 随后在转基因动物的乳汁中表达(参见, 例如, 美国专利号5,741,957; 美国专利号5,304,489; 以及美国专利号5,849,992)。合适的转基因包括与来自乳腺特异性基因诸如酪蛋白或 $\beta$ 乳球蛋白的启动子和增强子可操作地连接的轻链和/或重链编码序列。

[0314] 含有目标DNA区段的载体可通过取决于细胞宿主类型的方法来转移到宿主细胞中。例如, 氯化钙转染通常用于原核细胞, 而磷酸钙处理、电穿孔、脂质转染、基因枪或基于病毒的转染可用于其他细胞宿主。用于转化哺乳动物细胞的其他方法包括使用聚凝胺、原生质体融合、脂质体、电穿孔和显微注射。为了产生转基因动物, 转基因可被显微注射到受精的卵母细胞中, 或者可并入胚胎干细胞的基因组中, 并且此类细胞的核被转移到去核卵母细胞中。

[0315] 使编码抗体重链和轻链的载体引入细胞培养物中, 可以筛选细胞库在无血清培养基中的生长生产率和产物质量。然后可使最高生产的细胞库进行基于FACS的单细胞克隆以产生单克隆系。可使用对应于大于7.5g/L培养物的产物滴度的高于50pg或100pg/细胞/天的特定生产率。还可测试由单细胞克隆产生的抗体的浊度、过滤特性、PAGE、IEF、UV扫描、HP-SEC、碳水化合物-寡糖作图、质谱和结合测定, 诸如ELISA或Biacore。所选克隆然后可在多个小瓶中入库并冷冻储存, 以便进行随后的使用。

[0316] 一旦表达, 抗体可根据本领域的标准程序纯化, 所述标准程序包括蛋白A捕获、HPLC纯化、柱色谱、凝胶电泳等(通常参见, *Scopes, Protein Purification* (Springer-Verlag, NY, 1982))。

[0317] 可使用用于抗体的商业生产的方法, 包括密码子优化、启动子的选择、转录元件的选择、终止子的选择、无血清单细胞克隆、细胞库、用于扩增拷贝数的选择标记的使用、CHO终止子或蛋白质滴度的改善(参见, 例如, US 5,786,464; US 6,114,148; US 6,063,598; US 7,569,339; W02004/050884; W02008/012142; W02008/012142; W02005/019442; W02008/107388; W02009/027471; 以及US 5,888,809)。

[0318] IV. 活性免疫原

[0319] 本发明还提供用于治疗或实现预防受试者中的甲状腺素运载蛋白介导的淀粉样变性的方法, 所述方法包括施用包含针对TTR的抗体的诱导免疫应答的剂。剂可自身和/或当连接到载剂和/或在佐剂存在下时诱导抗体。用于主动免疫的此种剂用于在患者中诱导结合上述被动免疫所述的相同类型的抗体。一些此类方法包括以有效产生TTR抗体的方案向受试者施用包含抗体18C5特异性结合的表位的免疫原。在一些方法中, 免疫原包含具有抗体18C5特异性结合的TTR的至多20个连续氨基酸的TTR肽。在一些方法中, 免疫原包含具有来自TTR的残基87-127的至多20个连续氨基酸的TTR肽。在一些方法中, 免疫原包含具有来自TTR的残基100-110的至多11个连续氨基酸的TTR肽。在一些方法中, 免疫原包含具有来自TTR的残基101-109的至多9个连续氨基酸的TTR肽。在一些方法中, TTR肽表位由来自TTR的残基87-127的4-11个连续氨基酸组成。在一些方法中, TTR肽表位由来自TTR的残基100-110的4-11个连续氨基酸组成。在一些方法中, TTR肽表位由来自TTR的残基101-109的4-9个连续氨基酸组成。一些用作免疫原的TTR肽缺乏T细胞表位。此类肽连接到异源载剂以供应T细胞表位。

[0320] 为了诱导与18C5结合到相同或重叠的表位的抗体,可对这些抗体的表位特异性作图(例如,通过测试与跨越TTR的一系列重叠的肽的结合)。然后,由表位组成或包括表位或与表位重叠的TTR片段可用作免疫原。

[0321] 任选地,将TTR肽连接到异源载剂和/或与佐剂组合施用以帮助引发抗体。如果使用的话,异源载剂和佐剂可与用于产生单克隆抗体的相同,但是也可选择更好的药物适用性以用于人。合适的载剂包括血清白蛋白、匙孔血蓝蛋白、免疫球蛋白分子、甲状腺球蛋白、卵清蛋白、破伤风类毒素或来自如白喉(例如,CRM197)、大肠杆菌、霍乱或幽门螺旋杆菌(*H. pylori*)的其他病原细菌的类毒素或减毒的毒素衍生物。T细胞表位也是合适的载剂分子。通过将本发明的剂与免疫刺激性聚合物分子(例如,三棕榈酰-S-甘油半胱氨酸(Pam<sub>3</sub>Cys)、甘露聚糖(甘露糖聚合物)或葡聚糖( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 2聚合物)、细胞因子(例如,IL-1、IL-1 $\alpha$ 和 $\beta$ 肽、IL-2、 $\gamma$ -INF、IL-10、GM-CSF)和趋化因子(例如,MIP1- $\alpha$ 和 $\beta$ 以及RANTES)连接,可形成一些缀合物。免疫原可在具有或不具有间隔区氨基酸的情况下(例如,gly-gly)连接到载剂。另外的载剂包括病毒样颗粒。病毒样颗粒(VLP),也称为假病毒颗粒或病毒衍生的颗粒,代表由能够在体内自组装成具有确定的球形对称性的VLP的病毒衣壳和/或包膜蛋白的多个拷贝组成的亚基结构。(Powilleit等,(2007)PLoS ONE 2(5):e415)。可替代地,肽免疫原可连接到至少一种能够结合大部分MHC II类分子的人工T细胞表位,诸如pan DR表位("PADRE")。PADRE描述于US 5,736,142、WO 95/07707以及Alexander J等,Immunity,1:751-761(1994)中。活性免疫原可以多聚体形式存在,其中免疫原和/或其载剂的多个拷贝作为单个共价分子存在。

[0322] 片段通常与药学上可接受的佐剂一起施用。相对于单独使用肽的情况,佐剂增加了诱导抗体的滴度和/或诱导抗体的结合亲和力。多种佐剂可与TTR的免疫原性片段组合使用以引发免疫应答。优选的佐剂增大对免疫原的固有应答而不导致免疫原中的将影响应答的定性形式的构象变化。优选的佐剂包括铝盐,诸如氢氧化铝和磷酸铝、3脱-O-酰化单磷酸脂质A(MPL<sup>TM</sup>) (参见GB 2220211 (RIBI ImmunoChem Research Inc.,Hamilton,Montana,现在是Corixa的一部分)。Stimulon<sup>TM</sup> QS-21是从南美洲发现的Quillaja Saponaria Molina树的树皮中分离出来的三萜苷或皂苷(参见Kensil等,于Vaccine Design:The Subunit and Adjuvant Approach(编Powell&Newman,Plenum Press,NY,1995);US 5,057,540),(Aquila BioPharmaceuticals,Framingham,MA;现在的Antigenics,Inc.,New York,NY)。其他佐剂是水包油乳液(诸如角鲨烯或花生油),其任选地与诸如单磷酸脂质A(参见Stoute等,N.Engl.J.Med.336,86-91(1997))、普朗尼克聚合物和灭活分枝杆菌的免疫刺激剂组合。Ribi佐剂为水包油乳液。Ribi包含用含有Tween 80的盐水乳化的可代谢油(角鲨烯)。Ribi还包含充当免疫刺激剂的精制分枝杆菌产物和细菌单磷酸脂质A。另一种佐剂为CpG(WO 98/40100)。佐剂可作为具有活性剂的治疗组合物的组分来施用,或可独立地施用,在施用治疗剂之前施用,与施用治疗剂同时施用或在施用治疗剂之后施用。

[0323] 还可使用诱导针对TTR的抗体的TTR天然片段的类似物。例如,在此类肽中,一个或多个或所有的L-氨基酸可被D-氨基酸置换。此外,氨基酸的顺序可反向(逆肽)。任选地,肽包括反向顺序的所有D-氨基酸(逆反肽)。不一定具有与TTR肽显著的氨基酸序列相似性,但是仍可充当TTR肽的模拟物并诱导相似的免疫应答的肽和其他化合物。还可使用如上所述的针对TTR单克隆抗体的抗独特型抗体。此类抗Id抗体模拟抗原并对其产生免疫应答(参见

Essential Immunology, Roit编, Blackwell Scientific Publications, Palo Alto, Ca第6版, 第181页)。

[0324] 肽(和任选地与肽融合的载剂)还可以编码肽的核酸的形式施用并在患者中原位表达。编码免疫原的核酸区段通常连接到允许DNA区段在患者的预期靶细胞中表达的调控元件,诸如启动子和增强子。为了在血细胞中表达,如诱导免疫应答所需要的那样,来自轻链或重链免疫球蛋白基因的启动子和增强子元件或CMV主要中间早期启动子和增强子适合直接表达。通常将连接的调控元件和编码序列克隆到载体中。抗体还可以编码抗体重链和/或轻链的核酸的形式施用。如果重链和轻链都存在,则链优选作为单链抗体连接。还可例如通过亲和色谱从用肽免疫原治疗的患者的血清中制备用于被动施用的抗体。

[0325] DNA可以裸露形式(即,没有胶体或包封材料)递送。可替代地,可使用许多病毒载体系统,包括逆转录病毒系统(参见,例如,Lawrie和Tumin, Cur. Opin. Genet. Develop. 3, 102-109(1993));腺病毒载体{参见,例如,Bett等, J. Virol. 67, 591-1(1993)};腺相关病毒载体{参见,例如Zhou等, J. Exp. Med. 179, 1867(1994)};来自包括牛痘病毒和禽痘病毒的痘家族的病毒载体;来自 $\alpha$ 病毒属的病毒载体,诸如源自辛德毕斯(Sindbis)病毒和塞姆利基森林(Semliki Forest)病毒的那些病毒载体(参见,例如,Dubensky等, J. Virol. 70, 508-519(1996));委内瑞拉马脑炎病毒(参见US 5,643,576)和弹状病毒,诸如水泡性口炎病毒(参见WO 96/34625)和乳头状瘤病毒(Ohe等, Human Gene Therapy 6, 325-333(1995);Woo等, WO 94/12629以及Xiao&Brandsma, Nucleic Acids. Res. 24, 2630-2622(1996))。

[0326] 编码免疫原的DNA或含有其的载体可被包装到脂质体中。合适的脂质和相关类似物由US5,208,036、US 5,264,618、US 5,279,833和US 5,283,185描述。载体和编码免疫原的DNA也可吸附到颗粒载剂或与颗粒载剂缔合,所述颗粒载剂的实例包括聚甲基丙烯酸甲酯聚合物和聚交酯以及聚(丙交酯-共-乙交酯), (参见例如McGee等, J. Micro Encap. 1996)。

[0327] H. 抗体筛选测定

[0328] 抗体可进行数个筛选,包括结合测定、功能筛选、具有与TTR沉积相关的疾病的动物模型中的筛选以及临床试验。结合测定测试特异性结合以及任选地对单体TTR或其片段的亲和力和表位特异性。例如,结合测定可筛选结合到TTR的氨基酸残基101-109(SEQ ID NO:30)的抗体,所述氨基酸残基101-109是在天然TTR四聚体中掩埋并在单体、错误折叠、聚集或原纤维形式的TTR中暴露的表位。同样可筛选能够诱导具有此种结合特异性的抗体的活性免疫原。在这种情况下,使用活性免疫原来使实验动物免疫,并且测试所得血清的适当结合特异性。还可筛选抗体结合TTR的前原纤维的非天然构象和TTR淀粉样蛋白原纤维而非天然TTR构象的能力。例如,可筛选抗体结合到由天然四聚体TTR解离或解聚产生的单体形式的TTR的能力,并且可如实例中所述或以其他方式针对天然四聚体TTR对抗体进行反筛选。同样,还可筛选抗体对TTR介导的淀粉样变性组织而非健康组织的免疫反应性。此类筛选有时与示例性抗体相竞争地加以进行,所述示例性抗体诸如具有18C5的可变区的抗体或IgG1 $\kappa$ 同种型。任选地,在所述测定中,将抗体或TTR靶固定化。

[0329] 功能测定可在细胞模型中进行,所述细胞模型包括天然表达TTR或用编码TTR或其片段的DNA转染的细胞。合适的细胞包括来源于受TTR淀粉样蛋白生成影响的组织或其他组织的细胞。可筛选细胞的单体、错误折叠、聚集或原纤维形式的TTR的降低的水平(例

如,通过对细胞提取物或上清液进行的蛋白质印迹或免疫沉淀)或归因于单体、错误折叠、聚集或原纤维形式的TTR的降低的毒性。例如,可测试抗体抑制或减少TTR聚集、抑制或减少TTR原纤维形成、减少TTR沉积物、清除聚集的TTR或使TTR的无毒性构象稳定的能力。

[0330] 其他功能测定可在溶液中进行,诸如当溶液中的单体TTR或错误折叠的TTR中间体与抗体接触时,测试抗体是否能够破坏或减少TTR原纤维形成。原纤维形成的程度可通过浊度测量例如在配备有温度控制单元的UV可见分光光度计上在400nm处来探测。硫磺素-T也可用于评估淀粉样蛋白原纤维形成的程度。例如,将5倍摩尔过量的硫磺素-T加入TTR样品中,并在室温下放置30分钟,之后进行测量。硫磺素-T荧光可使用分光荧光计来监测。参见,US 2014/0056904。

[0331] 动物模型筛选测试抗体或活性免疫原治疗性地或预防性地治疗模拟与TTR或TTR沉积物积累相关的人疾病的动物模型的体征或症状的能力。此类疾病包括TTR淀粉样变性类型,诸如野生型ATTR淀粉样变性(也称为老年全身性淀粉样变性SSA)、老年心脏淀粉样变性(SCA)、家族性淀粉样多发性神经病(FAP)、家族性淀粉样心肌病(FAC)和中枢神经系统选择性淀粉样变性(CNSA)。可监测的合适体征或症状包括淀粉样沉积物在各种组织诸如胃肠道或心脏中的存在和程度。还可测试活性免疫原在血清中抗体的诱导。淀粉样蛋白沉积物的减少程度可通过与适当对照比较来确定,所述适当对照诸如已经接受对照抗体(例如,同种型匹配的对照抗体)或对照免疫原、安慰剂或完全未接受治疗的对照动物中TTR淀粉样蛋白沉积物的水平。用于测试针对TTR淀粉样变性的活性的示例性动物模型为在内源性小鼠Ttr基因座处携带无效突变以及携带包含与家族性淀粉样变性多发性神经病相关的V30M突变的人突变体TTR基因的小鼠模型。参见,例如,Kohno等,Am. J. Path. 150 (4):1497-1508 (1997);Cardoso和Saraiva,FASEB J 20 (2):234-239(2006)。还存在类似模型,包括其他的家族性TTR淀粉样变性版本的模型和散发性TTR淀粉样变性版本的模型。参见,例如,Teng等,Lab. Invest. 81 (3):385-396(2001);Recent Advances in Transthyretin Evolution, Structure, and Biological Functions,第261-280页(2009)中Ito和Maeda,Mouse Models of Transthyretin Amyloidosis (Springer Berlin Heidelberg)。转基因动物可包括人TTR转基因,诸如具有与TTR淀粉样变性相关的突变的TTR转基因或野生型TTR转基因。为了便于在动物模型中进行测试,可使用具有适于动物模型的恒定区的嵌合抗体(例如,小鼠-大鼠嵌合体可用于测试大鼠中的抗体)。可得出结论,如果相应小鼠抗体或嵌合抗体在适当动物模型中有效并且人源化抗体具有相似结合亲和力(例如,在实验误差内,诸如乘1.5、2或3的系数),则人源化版本的抗体将是有效的。

[0332] 临床试验测试在患有与TTR淀粉样变性相关的疾病的人中的安全性和功效。

#### [0333] I. 核酸

[0334] 本发明还提供编码上述重链和轻链中的任一条的核酸(例如,SEQ ID NO:2、4、18和20)。任选地,此类核酸还编码信号肽,并且可与连接到恒定区的信号肽(例如,具有可分别由SEQ ID NO:36(重链)和38(轻链)编码的SEQ ID NO:35(重链)和37(轻链)的氨基酸序列的信号肽)一起表达。核酸的编码序列可与调控序列可操作地连接以确保编码序列的表达,所述调控序列诸如启动子、增强子、核糖体结合位点、转录终止信号等。编码重链和轻链的核酸可以分离形式存在或可克隆到一个或多个载体中。核酸可以通过例如重叠寡核苷酸的固相合成或PCR来合成。编码重链和轻链的核酸可例如在表达载体内连接成一个连续的

核酸,或者可为单独的,例如各自克隆到其自身表达载体中。

[0335] J. 缀合抗体

[0336] 特异性结合到在致病性形式的TTR中暴露但不在天然四聚体形式的TTR中暴露的抗原(诸如TTR的氨基酸残基101-109(SEQ ID NO:30))的缀合抗体可用于检测单体、错误折叠、聚集或原纤维形式的TTR的存在;监测和评估用于治疗诊断为TTR淀粉样变性的患者的治疗剂的功效;抑制或减少TTR聚集;抑制或减少TTR原纤维形成;减少或清除TTR沉积物;使TTR的无毒性构象稳定;或治疗或实现预防患者的TTR淀粉样变性。例如,此类抗体可与其他治疗部分、其他蛋白质、其他抗体和/或可检测标签缀合。参见,WO 03/057838;US 8,455,622。

[0337] 缀合的治疗部分可为可用于治疗、防治、减轻、预防或改善患者中的不良病状或疾病(诸如TTR淀粉样变性)的任何剂。治疗部分可以包括例如免疫调节剂或促进或增强抗体活性的任何生物活性剂。免疫调节剂可为刺激或抑制免疫应答的发展或维持的任何剂。如果此类治疗部分偶联到对单体、错误折叠、聚集或原纤维形式的TTR具有特异性的抗体,诸如本文所述的抗体,则偶联的治疗部分将相比于天然四聚体形式的TTR对非天然、致病形式的TTR具有特异性亲和力。因此,缀合抗体的施用直接靶向包含致病形式的TTR的组织,而对周围正常的健康组织具有最小损伤。这对于毒性太大而不能自身施用的治疗部分特别有用。此外,可使用较少量的治疗部分。

[0338] 合适的治疗部分的实例包括降低TTR水平、使TTR的天然四聚体结构稳定、抑制TTR聚集、破坏TTR原纤维或淀粉样蛋白形成或中和细胞毒性的药物。参见,例如,Almeida和Saraiva,FEBS Letters 586:2891-2896(2012);Saraiva,FEBS Letters 498:201-203(2001);Ando等,Orphanet Journal of Rare Diseases 8:31(2013);Ruberg和Berk,Circulation 126:1286-1300(2012);Johnson等,J.Mol.Biol.421(2-3):185-203(2012),Ueda和Ando,Translational Neurodegeneration 3:19(2014);以及Hawkins等Annals of Medicine 47:625-638(2015)。例如,抗体可缀合到他发米帝司、二氟尼柳、ALN-TTR01、ALNTTR02、反义寡核苷酸(诸如IONIS TTRx(伊诺特森))、siRNA(诸如帕替司兰或瑞维司兰)、强力霉素(doxy)、牛磺熊去氧胆酸(TUDCA)、Doxy-TUDCA、环糊精(CyD)、4'-碘-4'-脱氧阿霉素(IDOX)、表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)、姜黄素、白藜芦醇(3,5,4'-三羟基二苯乙烯)或血清淀粉样P成分(SAP)抗体。其他代表性治疗部分包括已知可用于治疗、管理或减轻TTR淀粉样变性或TTR淀粉样变性症状的其他剂。参见,例如,Ando等,Orphanet Journal of Rare Diseases 8:31(2013)的TTR淀粉样变性的常见临床症状和用于治疗这些症状的典型的剂。

[0339] 抗体还可与其他蛋白质偶联。例如,抗体可与Fynomer偶联。Fynomer是来源于人Fyn SH3结构域的小结合蛋白(例如,7kDa)。它们可为稳定和可溶的,并且它们可缺乏半胱氨酸残基和二硫键。Fynomer可经工程化以结合到与抗体具有相同亲和力和特异性的靶分子。它们适于产生基于抗体的多特异性融合蛋白。例如,Fynomer可与抗体的N端和/或C端融合以产生具有不同构造的双特异性和三特异性FynomAb。Fynomer可使用Fynomer文库通过筛选技术使用FACS、Biacore和基于细胞的测定来选择,所述筛选技术允许有效选择具有最佳特性的Fynomer。Fynomer的实例公开于以下中:Grabulovski等,J.Biol.Chem.282:3196-3204(2007);Bertschinger等,Protein Eng.Des.Sel.20:57-68(2007);Schlatter等,

MAbs.4:497-508(2011);Banner等,Acta.Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.69(Pt6):1124-1137(2013);以及Brack等,Mol.Cancer Ther.13:2030-2039(2014)。

[0340] 本文公开的抗体还可偶联或缀合到一种或多种其他抗体(例如,以形成抗体异源缀合物)。此类其他抗体可结合到TTR或其部分内的不同表位或者可结合到不同靶抗原。结合到不同于18C5的TTR表位的此类抗TTR抗体可包括如表3中的抗体。

[0341] 抗体还可与可检测标签偶联。此类抗体可用于例如诊断TTR淀粉样变性、监测TTR淀粉样变性的进展和/或评估治疗的功效。此类抗体特别可用于在患有或易感TTR淀粉样变性的受试者中或在自此类受试者获得的适当生物样品中进行此类测定。可偶联或连接到本文所公开的抗体的代表性可检测标签包括各种酶,诸如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;辅基,诸如链霉亲和素、亲和素或生物素;荧光材料,诸如伞形酮、DyLight fluor、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪基胺荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白;发光材料,诸如鲁米诺;生物发光材料,诸如荧光素酶、荧光素和水母发光蛋白;放射性材料,诸如钇<sup>90</sup>(90Y)、放射性银-111、放射性银-199、铋<sup>213</sup>、碘(<sup>131</sup>I、<sup>125</sup>I、<sup>123</sup>I、<sup>121</sup>I)、碳(<sup>14</sup>C)、硫(<sup>35</sup>S)、氚(<sup>3</sup>H)、铟(<sup>115</sup>In、<sup>113</sup>In、<sup>112</sup>In、<sup>111</sup>In)、锝(<sup>99</sup>Tc)、钛(<sup>201</sup>Ti)、镓(<sup>68</sup>Ga、<sup>67</sup>Ga)、钯(<sup>103</sup>Pd)、钼(<sup>99</sup>Mo)、氙(<sup>133</sup>Xe)、氟(<sup>18</sup>F)、<sup>153</sup>Sm、<sup>177</sup>Lu、<sup>159</sup>Gd、<sup>149</sup>Pm、<sup>140</sup>La、<sup>175</sup>Yb、<sup>166</sup>Ho、<sup>90</sup>Y、<sup>47</sup>Sc、<sup>186</sup>Re、<sup>188</sup>Re、<sup>142</sup>Pr、<sup>105</sup>Rh、<sup>97</sup>Ru、<sup>68</sup>Ge、<sup>57</sup>Co、<sup>65</sup>Zn、<sup>85</sup>Sr、<sup>32</sup>P、<sup>153</sup>Gd、<sup>169</sup>Yb、<sup>51</sup>Cr、<sup>54</sup>Mn、<sup>75</sup>Se、<sup>113</sup>Sn和<sup>117</sup>Tin;使用各种正电子发射断层摄影术的正电子发射金属;非放射性顺磁性金属离子;以及经放射性标记或缀合到特定放射性同位素的分子。可偶联或连接到本文所公开的抗体的代表性可检测标签包括电化学发光标签,例如MSD GOLD SULFO-TAG NHS-Ester(SULFO-TAG)(Meso Scale Diagnostics,Rockville,MD)。

[0342] 放射性同位素与抗体的键联可用常规双功能螯合物进行。对于放射性银-111和放射性银-199键联,可使用基于硫的接头。参见,Hazra等,Cell Biophys.24-25:1-7(1994)。银放射性同位素的键联可能涉及用抗坏血酸还原免疫球蛋白。对于放射性同位素,诸如<sup>111</sup>In和<sup>90</sup>Y,可使用替伊莫单抗,并且替伊莫单抗将与此类同位素反应,以分别形成<sup>111</sup>In-替伊莫单抗和<sup>90</sup>Y-替伊莫单抗。参见Witzig,Cancer Chemother.Pharmacol.,48增刊1:S91-S95(2001)。

[0343] 使用本领域已知的技术,治疗部分、其他蛋白质、其他抗体和/或可检测标签可直接地或通过中间体(例如接头)间接地偶联或缀合到鼠、嵌合、贴面化或人源化18C5抗体。参见例如,Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy,Reisfeld等(编),第243-56页(Alan R.Liss,Inc.1985)中的Arnon等,“Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy”;Controlled Drug Delivery(第2版),Robinson等(编),第623-53页(Marcel Dekker,Inc.1987)中的Hellstrom等,“Antibodies For Drug Delivery”;Monoclonal Antibodies 84:Biological And Clinical Applications,Pinchera等(编),第475-506页(1985)中的Thorpe,“Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy:A Review”;Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy,Baldwin等(编),第303-16页(Academic Press 1985)中的“Analysis, Results,And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy”;以及Thorpe等,Immunol.Rev.,62:119-58(1982)。合适的接头包括例如可切割接头和不可切割接头。可采用在酸性或还原条件下在暴露于特定蛋白

酶时或在其他限定条件下释放偶联的治疗部分、蛋白质、抗体和/或可检测标签的不同接头。

#### [0344] V. 治疗应用

[0345] 以上抗体可用于治疗或实现预防患有至少部分由甲状腺素运载蛋白 (TTR) 介导并且特别是由单体、错误折叠、聚集或原纤维形式的TTR介导的疾病或处于所述疾病的风险中的患者的疾病。虽然实践不需要对机制的理解,但是据信以下机制中的任一种或全部可能有助于使用以上抗体治疗TTR淀粉样变性:抗体介导的TTR聚集和原纤维形成的抑制、抗体介导的TTR的无毒性构象(例如,四聚体形式)的稳定或抗体介导的聚集TTR、寡聚TTR或单体TTR的清除。抗体-药物缀合物可具有由缀合部分确定的另外作用机制。

[0346] 抗体以有效方案施用,所述有效方案意指延迟发作、降低严重性、抑制进一步恶化和/或减轻所治疗的病症的至少一种体征或症状的剂量、施用途径和施用频率。如果患者已经患有病症,则所述方案可被称为治疗有效方案。如果相对于一般群体,患者处于升高的病症风险中但尚未经历症状,则所述方案可被称为预防有效方案。在一些情况下,相对于历史对照或相同患者的过去经验,可在单独患者中观察到治疗功效或预防功效。在其他情况下,相对于未治疗的患者的对照群体,可在治疗患者群体中在临床前或临床试验中证实治疗功效或预防功效。

[0347] 施用频率取决于抗体在循环中的半衰期、患者病状和施用途径以及其他因素。响应于患者病状的变化或所治疗病症的进展,频率可为每日一次、每周一次、每月一次、每季度一次或按不规则的时间间隔。静脉内施用的示例性频率在连续疗程内处于每周一次与每季度一次之间,尽管或多或少的频繁给药也是可能的。对于皮下施用,示例性给药频率为每日至每月,尽管或多或少的频繁给药也是可能的。

[0348] 施用的剂量数目取决于病症是急性还是慢性疾病以及病症对治疗的应答。对于急性病症或慢性病症的急性加重,1与10个之间的剂量通常是足够的。有时,任选地呈分开形式的单次推注剂量足以用于急性病症或慢性病症的急性加重。对于急性病症或急性加重的复发,可将治疗重复。对于慢性病症,抗体可以规律间隔(例如每周一次、每两周一次、每月一次、每季度一次、每六个月一次)施用,持续至少1、5或10年或患者的终生。

#### [0349] VI. 药物组合物和使用方法

[0350] 本文提供几种诊断、监测、治疗或实现预防至少部分由甲状腺素运载蛋白 (TTR) 介导并且特别是由单体、错误折叠、聚集或原纤维形式的TTR(例如,TTR淀粉样变性)介导的疾病或病状的方法。此类疾病的实例包括家族性TTR淀粉样变性,诸如家族性淀粉样心肌病(FAC)或运动员或其他进行极限有氧运动的人的心肌病或肥大、家族性淀粉样多发性神经病(FAP)或中枢神经系统选择性淀粉样变性(CNSA)以及散发性TTR淀粉样变性,诸如老年全身性淀粉样变性(SSA)或老年心脏淀粉样变性(SCA)。TTR淀粉样变性还可能与各种以组织或器官退化或创伤为特征的疾病和病状的原因或结果相关。TTR沉积物的积累有助于与疾病或病状相关的器官或组织功能障碍。用目前的剂和方法可以治疗或预防的此种病状的实例是椎管狭窄(Westermark等,Upsala J. Medical Sciences 119,223-238(2014)以及Yanagisawa等,Modern Pathology 28,201-207(2015)。同样可以治疗或预防的另一种疾病是骨关节炎(Takanashi等,Amyloid 20,151-155(2013),Gu等,Biomed&Biotechnol.15,92-99;Takinami等,Biomarker Insights 8,85-95(2014);Akasaki等,Arthritis



Rheumatol. 67, 2097-2107 (2015)。同样可以治疗或预防的另一种疾病是类风湿性关节炎 (Clement等, JCI Insight 1epublish (2016)。可以治疗或预防的另一种疾病是幼年特发性关节炎 (Sharma等, PLoS One 9, e93905; 1-12 (2014)。可以治疗或预防的另一种疾病是年龄相关性黄斑变性 (湿性或干性)。同样可以治疗或预防的另一类病状是韧带和肌腱病症, 诸如肩袖的病症 (Sueyoshi等人, Human Pathol. 42, 1259-64 (2011)。

[0351] 可将上述抗体并入药物组合物中以用于治疗或预防任何一种上述疾病和病状。通常, 有此需要的受试者施用抗体或含有抗体的药物组合物。适于治疗的患者包括处于TTR淀粉样变性的风险中但未显示出症状的个体, 以及目前显示出症状的患者。一些患者可在TTR淀粉样变性的前驱阶段治疗。

[0352] 可向具有有已知TTR淀粉样变性遗传风险的个体预防性地施用药物组合物。此类个体包括具有已经受这种疾病的亲属的那些个体以及由遗传或生物化学标记 (例如, 与TTR淀粉样变性相关的TTR突变) 的分析确定风险的那些个体, 所述分析包括使用本文所提供的诊断方法。例如, 在编码TTR的基因中有超过100个一直涉及TTR淀粉样变性的突变。参见, 例如, US 2014/0056904; Saraiva, Hum. Mutat. 17 (6) : 493-503 (2001); Damas和Saraiva, J. Struct. Biol. 130: 290-299; Dwulet和Benson, Biochem. Biophys. Res. Commun. 114: 657-662 (1983)。

[0353] 患有TTR淀粉样变性的个体有时可从TTR淀粉样变性的临床表现中识别, 所述临床表现包括以下中的一种或多种: (1) 神经病家族史, 特别是与心衰竭相关的家族史; (2) 未知病因的神经性疼痛或进行性感觉障碍; (3) 无明显原因的腕管综合征, 特别是如果其为双侧性的并需要手术释放; (4) 未知病因的胃肠运动障碍或自主神经功能障碍 (例如, 勃起功能障碍、直立性低血压、神经原性膀胱功能障碍 (neurogenic bladder)); (5) 特征在于在不存在高血压的情况下的心室壁增厚的心脏病; (6) 未知来源的晚期房室阻塞, 特别是在伴有心脏增厚时; 以及 (6) 具有棉绒 (cotton-wool) 型的玻璃体内含物。参见, Ando等, Orphanet Journal of Rare Diseases 8:31 (2013)。然而, TTR淀粉样变性的明确诊断通常依赖于靶器官活检, 随后用淀粉样蛋白特异性染料刚果红对所切除组织进行组织学染色。如果观察到淀粉样蛋白的阳性测试, 随后进行TTR的免疫组织化学染色和质谱鉴定以确保造成淀粉样蛋白形成的前体蛋白确实是TTR。对于家族性疾病形式, 然后需要证实编码TTR的基因的突变, 之后可进行明确诊断。

[0354] 受试者的鉴定可发生在临床环境或其他地方中, 诸如例如通过受试者自己使用自我测试试剂盒来发生在所述受试者的家中。例如, 可基于诸如周围神经病 (感觉和运动)、自主神经病、胃肠损伤、心肌病、肾病或眼部沉积的各种症状来鉴定受试者。参见, Ando等, Orphanet Journal of Rare Diseases 8:31 (2013)。如实例中所公开, 还可通过与对照样品相比来自受试者的血浆样品中非天然形式的TTR的水平的增加来鉴定受试者。

[0355] 如TTR淀粉样变性的家族史、遗传测试或医疗筛选所保证, 治疗可在任何年龄 (例如20、30、40、50、60或70岁) 时开始。治疗通常在一段时间内需要多个剂量, 并且可通过测定抗体或活化T细胞或B细胞随时间推移对治疗剂 (例如, 包含氨基酸残基101-109的截短形式的TTR) 的应答来监测。如果应答下降, 则指示加强剂量。

[0356] 在预防应用中, 以有效降低风险、减轻严重性或延迟疾病 (例如, TTR淀粉样变性) 的至少一种体征或症状发作的方案 (施用的剂量、频率和途径) 向易感所述疾病或以其他方

式处于所述疾病风险中的受试者施用抗体或用于诱导抗体的剂或其药物组合物。在治疗应用中,以有效减轻或至少抑制疾病(例如,TTR淀粉样变性)的至少一种体征或症状进一步恶化的方案(施用的剂量、频率和途径)向疑似或已经患有所述疾病的受试者施用抗体或诱导抗体的免疫原。

[0357] 如果与未由本文公开的方法治疗的可比较受试者的对照群体中的平均结果相比,单独治疗的受试者取得更有利结果,或者如果与对照临床试验(例如,II期、II/III期或III期试验)中的对照受试者或处于 $p < 0.05$ 或 $0.01$ 或甚至 $0.001$ 水平下的动物模型相比,在所治疗受试者中证实了方案的更有利结果,则所述方案被认为是治疗或预防有效的。

[0358] 抗体的有效方案可用于例如抑制或减少患有与TTR积累相关的病状或处于所述病状的风险中的受试者中的TTR聚集;抑制或减少患有与TTR积累相关的病状或处于所述病状的风险中的受试者中的TTR原纤维形成;抑制或减少患有与TTR积累相关的病状或处于所述病状的风险中的受试者中的TTR沉积物或聚集的TTR;使患有与TTR积累相关的病状或处于所述病状的风险中的受试者中的TTR的无毒性构象稳定;抑制患有与TTR积累相关的病状或处于所述病状的风险中的受试者中TTR聚集体、原纤维或沉积物的毒性作用;诊断疑似包含淀粉样蛋白积累的组织中TTR淀粉样蛋白积累的存在或不存在;通过检测施用抗体后的受试者中结合抗体的存在来确定受试者中TTR沉积物的水平;检测受试者中单体、错误折叠、聚集或原纤维形式的TTR的存在;监测和评估用于治疗诊断为TTR淀粉样变性的患者的治疗剂的功效;在受试者种诱导包含TTR的抗体的免疫应答;延迟与受试者中TTR淀粉样蛋白积累相关的病状的发作;或治疗或实现预防患者的TTR淀粉样变性。

[0359] 有效剂量根据许多不同因素而变化,所述许多不同因素诸如施用手段、靶位点、受试者的生理状态、受试者是人还是动物、所施用的其他药物以及治疗是预防性的还是治疗性的。

[0360] 抗体的示例性剂量范围可为约 $0.1-20$ 或 $0.5-5\text{mg/kg}$ 体重(例如, $0.5$ 、 $1$ 、 $2$ 、 $3$ 、 $4$ 或 $5\text{mg/kg}$ )或作为固定剂量的 $10-1500\text{mg}$ 。剂量取决于患者的病状和对先前治疗的应答(如果有的话)、治疗是预防性还是治疗性的以及病症是急性还是慢性的,以及其他因素。

[0361] 抗体可每日一次、在交替数天时、每周一次、每两周一次、每月一次、每季度一次或根据由经验分析确定的任何其他时程来以所述剂量施用。示例性治疗需要以多剂量经过例如至少6个月的延长时期来施用。另外的示例性治疗方案需要每两周施用一次或每月施用一次或每3至6个月施用一次。

[0362] 供主动施用的剂的量对于每个患者而言自 $0.1-500\mu\text{g}$ 变化且更通常对于人施用而言每次注射 $1-100$ 或 $1-10\mu\text{g}$ 。剂量是指用于免疫的活性剂的重量,不包括与其连接以帮助引发免疫应答的任何载剂。注射的时间选择可自一天一次至一年一次至十年一次显著变化。典型的方案包括免疫,之后以一定的时间间隔进行加强注射,诸如6周间隔或两个月。另一方案包括免疫、随后在1、2和12个月后进行加强注射。另一方案包括每两个月持续终身进行注射。可替代地,加强注射可不定期进行,如通过监测免疫应答所指示。

[0363] 抗体或用于诱导抗体的剂可通过外周途径施用。施用途径包括局部、静脉内、口服、皮下、动脉内、颅内、鞘内、腹膜内、鼻内或肌内。抗体的示例性施用途径可为静脉内或皮下。主动免疫的示例性途径为皮下和肌内。例如,静脉施用可以通过输注诸如30-90分钟的时间段。此类型的注射最通常在手臂或腿部肌肉中进行。在一些方法中,将剂直接注射到已

积累沉积物的特定组织中,例如颅内注射。

[0364] 用于胃肠外施用的药物组合物可为无菌且基本上等渗的(250-350mOsm/kg水),并且在GMP条件下制备。药物组合物可以单位剂型(即,单次施用的剂量)提供。药物组合物可使用一种或多种生理上可接受的载剂、稀释剂、赋形剂或辅助剂来配制。制剂取决于所选的施用途径。对于注射,抗体可在水溶液中配制,例如在生理学上相容的缓冲液例如汉克斯氏溶液、林格氏溶液或生理盐水或乙酸盐缓冲液中配制(以减少注射部位处的不适)。所述溶液可以含有配制剂,如助悬剂、稳定剂和/或分散剂。可替代地,抗体可以冻干形式用于在使用之前用适合的媒介物(例如,无菌的无热原水)复原。

[0365] 所述方案可与有效治疗或预防所治疗疾病的另一种剂组合施用、同时施用或顺序施用。此类剂可包括抑制TTR表达的siRNA或Vyndaqel,其为TTR在四聚体形成中的稳定剂。此类剂可包括TTR四聚体稳定剂(诸如他发米帝司或二氟尼柳)(参见,例如,W02011116123、美国专利号9,150,489)、抑制TTR表达的基因疗法诸如反义寡核苷酸(诸如IONIS-TTRx(伊诺特森))(参见,例如,美国专利号8,101,743、8,697,860、9,061,044和9,399,774;日本专利号JP5896175)或siRNA(诸如帕替司兰或瑞维司兰)(参见,例如,W02016033326)、淀粉样降解物诸如强力霉素(doxy)、牛磺熊去氧胆酸(TUDCA)、Doxy-TUDCA、环糊精(CyD)、4'-碘-4'-脱氧阿霉素(IDOX)或血清淀粉样P成分(SAP)抗体。

[0366] 可将有效治疗或预防所治疗疾病的另一种剂施用到先前使用本文公开的抗体治疗的受试者。使用有效治疗或预防所治疗疾病的另一种剂治疗的受试者可不再接受本文公开的抗体治疗。

[0367] 使用本文公开的抗体的治疗可与对所治疗的病症有效的其他治疗组合。组合治疗可以一起配制或单独施用。可用于组合疗法的治疗的一些实例包括结合不同于18C5的表位的第二抗TTR抗体,例如如表3所公开的抗体。

[0368] 治疗后,可评估受试者的病状以确定所述治疗的进展或功效。此类方法优选测试TTR淀粉样蛋白水平的变化或非天然形式TTR的水平。例如,可评估TTR淀粉样蛋白水平以确定在治疗之前在可比较的情况下相对于受试者的TTR淀粉样蛋白水平的改善。受试者的TTR淀粉样蛋白水平还可在可比较的情况下与对照群体进行比较。对照群体可为类似受折磨、未治疗的受试者或正常未治疗的受试者(以及其他对照受试者)。相对于接近或达到未治疗的正常受试者中水平的类似受折磨、未治疗的受试者或水平的改善指示对治疗的阳性应答。

[0369] TTR淀粉样蛋白水平可通过许多方法测量,所述许多方法包括成像技术。合适的成像技术的实例包括用放射性标记的TTR或其片段、TTR抗体或其片段、基于刚果红的淀粉样蛋白成像剂例如像PIB(US 2011/0008255)、淀粉样蛋白成像肽p31(淀粉样蛋白成像肽p31的生物分布与基于刚果红组织染色的淀粉样蛋白定量相关,Wal1等,文摘号1573,2011 ISNM年会)以及其他PET标签进行的PET扫描。非天然形式的TTR的水平可例如通过以下方式来测量:用本文公开的抗体对来自受试者的血浆样品或活检样品进行进行SDS-PAGE/蛋白质印迹或Meso Scale Discovery板测定,并且如实例中所述测量与对照样品进行比较。

[0370] A. 诊断方法和监测方法

[0371] 还提供检测患有或易感与TTR沉积或致病形式的TTR(例如,单体、错误折叠、聚集或原纤维形式的TTR)相关的疾病的患者中针对TTR的免疫应答的方法。所述方法可用于监

测用本文提供的剂进行的治疗性和预防性治疗的过程。被动免疫后的抗体谱通常显示抗体浓度的即时峰值,随后显示指数衰减。在没有另外剂量的情况下,衰减在数天至数月的时期内接近治疗前水平,这取决于所施用的抗体的半衰期。例如,一些人抗体的半衰期为约20天。

[0372] 在一些方法中,在施用前进行受试者中TTR抗体的基线测量,此后进行第二测量以确定峰值抗体水平,并且间隔进行一次或多次另外测量以监测抗体水平的衰减。当抗体水平已经下降到基线或减去基线的峰值的预定百分比(例如,50%、25%或10%)时,施用另外剂量的抗体。在一些方法中,将减去背景的峰值或随后测量水平与先前经确定来构成其他受试者的有益的预防性或治疗性治疗方案的参考水平进行比较。如果测量的抗体水平显著小于参考水平(例如,小于平均值减去1或优选地为,受益于治疗的受试者群体中的参考值的两个标准偏差),则指示另外剂量的抗体的施用。

[0373] 还提供例如通过测量来自受试者的样品中TTR淀粉样蛋白或致病形式的TTR(例如单体、错误折叠、聚集或原纤维形式的TTR)或通过受试者中的TTR进行体内成像来检测受试者中单体、错误折叠、聚集或原纤维形式的TTR的方法。此类方法可用于诊断或确诊与此类致病形式的TTR(例如,TTR淀粉样变性)相关的疾病或其易感性。所述方法还可用于无症状受试者。单体、错误折叠、聚集或原纤维形式的TTR的存在指示对未来症状性疾病的易感性。所述方法还可用于监测以前已诊断为TTR淀粉样变性的受试者的疾病进展和/或对治疗的应答。

[0374] 自患有、疑似患有TTR淀粉样变性或处于患有TTR淀粉样变性的风险中的受试者获得的生物样品可与本文所公开的抗体接触以评估单体、错误折叠、聚集或原纤维形式的TTR的存在。例如,此类受试者中单体、错误折叠、聚集或原纤维形式的TTR的水平可与健康受试者中存在的那些水平进行比较。可替代地,接受疾病治疗的此类受试者中TTR淀粉样蛋白或致病形式的TTR(例如,单体、错误折叠、聚集或原纤维形式的TTR)的水平可与未对TTR淀粉样变性进行治疗的受试者的那些水平进行比较。一些此类测试涉及获自此类受试者的组织的活检。ELISA测定也可用于例如评估流体样品中单体、错误折叠、聚集或原纤维形式的TTR的水平。一些此类ELISA测定涉及抗TTR抗体,所述抗TTR抗体相对于天然四聚体形式的TTR而优先结合单体、错误折叠、聚集或原纤维形式的TTR。

[0375] 一些此类测试为夹心免疫测定。一些此类免疫测定采用Meso Scale Discovery (MSD)电化学发光平台(Meso Scale Diagnostics,Rockville,MD)。一些此类免疫测定在报告抗体上使用电化学发光标签,例如MSD测定(Meso Scale Diagnostics,Rockville,MD)。例如,报告抗体可使用SULFO-TAG标签标记((Meso Scale Diagnostics,Rockville,MD)。可用于电化学发光测定的板可并入电极(例如,MSD板(Meso Scale Diagnostics,Rockville,MD)。可用于电化学发光测定的板可在每个孔的底部并入电极(例如,MSD板,(Meso Scale Diagnostics,Rockville,MD)。一些测定采用经标记的捕获抗体。例如,经标记的捕获抗体可为18C5或其人源化、嵌合或贴面化变体。一些测定采用经标记的报告抗体。例如,经标记的报告抗体可为18C5或其人源化、嵌合或贴面化变体。经标记的报告抗体也可为表3的抗体或其人源化、嵌合或贴面化变体。经标记的报告抗体可为结合TTR而无构象特异性的抗体。在一个实施方案中,结合TTR而无构象特异性的抗体可为8C3或7G7或其人源化、嵌合或贴面化变体(参见,例如,WO 2016/120811)。在一个实施方案中,结合TTR而无构象特异性的抗体

可为多克隆抗体。在一个实施方案中,多克隆抗体为多克隆兔抗人前白蛋白(目录号A000202-2,Dako,Agilent Technologies,Inc,Santa Clara,CA)。在一个实施方案中,多克隆兔抗TTR抗体为Sigma,目录号HPA002550(Sigma-Aldrich,St.Louis,MO),

[0376] 一些测定检测到样品中所有错误折叠的TTR(即,包括单体和多聚体的所有错误折叠形式的TTR)。其他测定特异性检测单体的错误折叠的TTR或多聚的错误折叠的TTR。其他测定检测所有形式的TTR(错误折叠形式和天然四聚体形式)。一些此类测定采用特异性结合到TTR的残基101-109内的表位的捕获抗体和特异性结合到TTR的不同表位的报告抗体;其中如果样品中存在错误折叠的TTR,则捕获抗体和报告抗体与错误折叠的TTR结合形成夹心复合物;并且其中检测与错误折叠的TTR结合的报告抗体(如果有的话)指示存在于样品中的所有错误折叠形式的TTR的存在或不存在。此类报告抗体可包括9D5、14G8、5A1、6C1、AD7F6、RT24、NI-301.35G11、MFD101、MDF102、MFD103、MFD105、MFD107、MFD108、MFD109、MFD111、MFD114或其嵌合版本或人源化版本。此类报告抗体可包括结合在TTR的残基89-97、118-122、115-124、53-63、54-61、36-49、49-61、109-121、30-66、70-127、80-127、90-127、100-127、110-127或115-127内的抗体。此类报告抗体可包括8C3或7G7(参见,例如,WO 2016/120811)。此类报告抗体可包括多克隆兔抗人前白蛋白(目录号A000202-2,Dako,Agilent Technologies,Inc,Santa Clara,CA)或多克隆兔抗TTR抗体(Sigma,目录号HPA002550,Sigma-Aldrich,St.Louis,MO),

[0377] 一些测定检测样品中多聚形式的错误折叠的TTR。此类测定可被配置为相比于单体的错误折叠的TTR优先或专门检测多聚的错误折叠的TTR。一些此类测定采用特异性结合到TTR的残基101-109内的表位的捕获抗体和特异性结合到TTR的残基101-109内的表位的报告抗体。捕获抗体和报告抗体的此种组合相比于单体TTR可以优先或专门结合到多聚TTR,因为TTR的多个拷贝为抗体结合提供多个表位。检测与多聚的错误折叠的TTR结合的报告抗体(如果有的话)指示多聚的错误折叠的TTR的存在或不存在。在一些此类测定中,报告抗体与捕获抗体竞争结合TTR和/或报告抗体与捕获抗体结合到TTR的相同或重叠表位。在一些此类测定中,捕获抗体在多聚的错误折叠的TTR中结合第一错误折叠的TTR分子,并且报告抗体在多聚的错误折叠的TTR中结合第二错误折叠的TTR分子。捕获抗体与报告抗体之间的结合竞争排除或至少减少(取决于竞争是重叠表位还是空间位阻的结果)同时结合和检测单体的错误折叠的TTR。在一些此类测定中,检测与多聚的TTR中第二错误折叠的TTR分子结合的报告抗体结合指示多聚的错误折叠的TTR的存在或不存在。

[0378] 本文公开的抗体可用于一种测定生物样品中总多聚的错误折叠的甲状腺素运载蛋白(TTR)水平与总错误折叠的TTR水平的比率的方法。在检测单体的错误折叠的TTR和多聚的错误折叠的TTR的第一测定中,可测定生物样品的第一部分的样品中所有错误折叠的TTR(即包括单体和多聚体的所有错误折叠形式的TTR)。第一测定可采用特异性结合到TTR的残基101-109内的表位的捕获抗体和特异性结合到TTR的不同表位的报告抗体。如果样品中存在错误折叠的TTR,则捕获抗体和报告抗体与错误折叠的TTR结合形成夹心复合物。检测与错误折叠的TTR结合的报告抗体(如果有的话)指示样品中错误折叠的TTR的存在与不存在。在相比于单体的错误折叠的TTR优先检测多聚的错误折叠的TTR的第二测定中,可测定生物样品的第二部分的生物样品中多聚形式的错误折叠的TTR。第二测定可采用特异性结合到TTR的残基101-109内的表位的捕获抗体和特异性结合到TTR的残基101-109内的表

位的报告抗体。如果样品中存在多聚的错误折叠的TTR,则捕获抗体和报告抗体与多聚的错误折叠的TTR结合形成夹心复合物。捕获抗体和报告抗体可优先或专门同时结合到多聚的错误折叠的TTR(如果有的话),以指示多聚的错误折叠的TTR的存在或不存在。在一些此类测定中,报告抗体与捕获抗体竞争结合TTR,或结合到与捕获抗体相同或重叠的表位。在一些此类测定中,捕获抗体在多聚的错误折叠的TTR中结合第一错误折叠的TTR分子,并且报告抗体在多聚的错误折叠的TTR中结合第二错误折叠的TTR分子。捕获抗体与报告抗体之间的结合竞争排除或至少减少(取决于竞争是重叠表位还是空间位阻的结果)同时结合和检测单体的错误折叠的TTR。在一些此类测定中,检测与多聚的TTR中第二错误折叠的TTR分子结合的报告抗体结合指示多聚的错误折叠的TTR的存在或不存在。在一些测定中,计算了多聚的错误折叠的TTR与所有错误折叠的TTR的比率。

[0379] 本文公开的抗体还可用于一种测定生物样品中所有错误折叠的TTR与总TTR(错误折叠形式和天然四聚体形式)的比率的方法。在检测单体的错误折叠的TTR和多聚的错误折叠的TTR的第一测定中,可测定生物样品的第一部分的样品中所有错误折叠的TTR(即包括单体和多聚体的所有错误折叠形式的TTR)。第一测定可采用特异性结合到TTR的残基101-109内的表位的捕获抗体和特异性结合到TTR的不同表位的报告抗体。如果样品中存在错误折叠的TTR,则捕获抗体和报告抗体与错误折叠的TTR结合形成夹心复合物。检测与错误折叠的TTR结合的报告抗体(如果有的话)指示样品中错误折叠的TTR的存在与不存在。在检测总TTR的第二测定中,可测定生物样品的第二部分的总TTR(错误折叠形式和天然四聚体形式)。第二测定可采用结合TTR而无构象特异性的捕获抗体和结合TTR而无构象特异性的报告抗体。如果样品中存在TTR,则捕获抗体和报告抗体与TTR结合形成夹心复合物。检测与TTR结合的报告抗体(如果有的话)指示存在于样品中的TTR的存在或不存在。可计算所有错误折叠的TTR与总TTR(错误折叠形式和天然四聚体形式)的比率。

[0380] 体内成像法可通过以下方式运作:施用试剂,诸如结合到受试者中的单体、错误折叠、聚集或原纤维形式的TTR的抗体,然后在所述试剂已经结合后检测所述试剂。此类抗体通常结合到TTR残基101-109内的表位。如果需要,清除应答可通过使用缺乏全长恒定区的抗体片段(诸如Fab)来避免。在一些方法中,相同抗体可以用作治疗试剂和诊断试剂。

[0381] 诊断试剂可通过静脉内注射来向受试者体内施用,或通过视为合理的其他途径来施用。试剂的剂量应处于与治疗方法的剂量相同的范围内。通常,试剂被标记,尽管在一些方法中,对单体、错误折叠、聚集或原纤维形式的TTR具有亲和力的第一试剂未被标记,并且第二标记用于结合到第一试剂。标签的选择取决于检测手段。例如,荧光标签适于光学检测。顺磁性标签的使用适于在没有手术干预的情况下进行断层摄影检测。还可使用PET或SPECT来检测放射性标签。

[0382] 诊断通过将标记的位点的数目、大小和/或强度与相应基线值比较来进行。基线值可代表未患病个体的群体的平均水平。基线值还可代表相同受试者中确定的先前水平。例如,基线值可在开始治疗之前在受试者中测定,并且此后测量值与基线值进行比较。值相对于基线的减少通常表示对治疗的阳性应答。

[0383] 监测错误折叠的TTR、多聚的错误折叠的TTR、甲状腺素运载蛋白沉积物、抗TTR抗体结合等等的量的变化,允许根据治疗调整治疗方案。然后,可确定是否调整治疗,并且如果需要,可根据监测调整治疗。显著的变化意指治疗后参数值相对于基数的比较提供了治

疗产生或未产生有益效果的一些证据。在一些情况下,患者自身参数值的变化提供了治疗产生或未产生有益效果的证据。在其他情况下,将患者中值的变化(如果有的话)与未经历治疗的患者的代表性对照人群中值的变化(如果有的话)进行比较。特定患者的应答与对照患者的正常应答之间的差异(例如,平均值加标准偏差的方差)也可以提供治疗方案在或不在实现对患者的有益效果的证据。在确定是否和如何调整治疗时,上述TTR参数的变化还可与其他诸如副作用的体征或症状的变化结合。

[0384] 在一些患者中,监测指示,错误折叠的TTR、多聚的错误折叠的TTR、甲状腺素运载蛋白沉积物或抗TTR抗体结合的量与先前检测到的相同或更大。在此类患者中,如果不存在不可接受的副作用,如果还没有达到最大推荐剂量,则治疗方案可以按原样继续,或甚至增加施用频率和/或剂量。

[0385] 在一些患者中,监测指示错误折叠的TTR、错误折叠的多聚TTR、甲状腺素运载蛋白沉积物、抗TTR抗体结合等等的量的可检测到的下降,但是错误折叠的TTR、多聚错误折叠的TTR、甲状腺素运载蛋白沉积物或抗TTR抗体结合的量仍高于正常值。在此类患者中,如果不存在不可接受的副作用,如果还没有达到最大推荐剂量,则治疗方案可以按原样继续,或甚至增加施用频率和/或剂量。可替代地,在一些此类患者中,可以停止治疗方案并替换为使用诸如以下的其他剂的治疗:TTR四聚体稳定剂、基于反义寡核苷酸的治疗、基于RNA干扰(RNAi)的治疗或强力霉素加牛磺熊去氧胆酸。

[0386] 如果监测指示患者中一定量的错误折叠的TTR、多聚错误折叠的TTR、甲状腺素运载蛋白沉积物、抗TTR抗体结合等等已降至或接近正常水平的错误折叠的TTR、多聚错误折叠的TTR、甲状腺素运载蛋白沉积物或抗TTR抗体结合的量,则可将治疗方案从诱导中的一种(即,使错误折叠的TTR、多聚错误折叠的TTR、甲状腺素运载蛋白沉积物或抗TTR抗体结合的水平降低)调整为维持中的一种(即,将错误折叠的TTR、多聚错误折叠的TTR、甲状腺素运载蛋白沉积物或抗TTR抗体结合的量保持在大致恒定水平)。通过减少施用治疗的剂量和或频率,可以实现此种方案。可替代地,在一些此类患者中,可以停止治疗方案并替换为使用诸如以下的其他剂的治疗:TTR四聚体稳定剂、基于反义寡核苷酸的治疗、基于RNA干扰(RNAi)的治疗或强力霉素加牛磺熊去氧胆酸。

[0387] 在其他患者中,监测可指示治疗方案有一些有益效果,但为次优效果。最佳效果可定义为在开始治疗后的给定时间点经历治疗方案的患者的代表性样品所经历的错误折叠的TTR、多聚错误折叠的TTR、甲状腺素运载蛋白沉积物的量或抗TTR抗体结合的量变化的上半部分或前四分之一内的错误折叠的TTR、多聚错误折叠的TTR、甲状腺素运载蛋白沉积物或抗TTR抗体结合的量百分比减少。其错误折叠的TTR、多聚错误折叠的TTR、甲状腺素运载蛋白沉积物或抗TTR抗体结合的量经历较小下降的患者或保持恒定或甚至增加但是程度低于在没有治疗方案的情况下的预期程度(例如,如从未施用治疗方案的患者的对照组推断)的患者可被分类为经历阳性但次优应答。此类患者可任选地进行增加剂的施用剂量和或频率的方案调整。可替代地或除此之外,如果上调不引起改善的应答,则在一些此类患者中,可以停止治疗方案并替换为使用诸如以下的其他剂的治疗:TTR四聚体稳定剂、基于反义寡核苷酸的治疗、基于RNA干扰(RNAi)的治疗或强力霉素加牛磺熊去氧胆酸。

[0388] 在一些患者中,错误折叠的TTR、多聚错误折叠的TTR、甲状腺素运载蛋白沉积物或抗TTR抗体结合的量可以与未接受治疗的患者中错误折叠的TTR、多聚错误折叠的TTR、甲状

腺素运载蛋白沉积物或抗TTR抗体结合类似或更大的方式增加。如果此类增加持续一段时间,则如果需要,可停止治疗转而使用一种或多种其他剂治疗。

[0389] 使用本文公开的抗体的诊断方法可与结合不同于18C5的表位的第二抗TTR抗体(例如如表3所公开的抗体)组合进行。

[0390] 还提供了区分甲状腺素运载蛋白介导的淀粉样变性和非TTR淀粉样变性,例如淀粉样轻链(AL)淀粉样变性,也称为原发性系统性淀粉样变性的方法。

[0391] IX. 试剂盒

[0392] 本发明还提供包含本文所公开的人源化18C5抗体和相关材料诸如使用说明书(例如包装插页)的试剂盒(例如,容器)。使用说明可含有例如用于施用抗体和任选的一种或多种另外的剂的说明书。抗体的容器可为单位剂量、大量(bulk)包装(例如,多剂量包装)或亚单位剂量。

[0393] 包装插页是指习惯上包括于治疗产品的商业包装中的说明书,所述说明书含有关于指征、用法、剂量、施用、禁忌症和/或涉及所述治疗产品使用的警告的信息

[0394] 试剂盒还可包括包含药学上可接受的缓冲液的第二容器,所述药学上可接受的缓冲剂诸如抑菌性注射用水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液和右旋糖溶液。它还可包含从商业和使用者立场来看希望的其他材料,包括其他缓冲液、稀释剂、过滤器、针以及注射器。

[0395] X. 其他应用

[0396] 在临床诊断或治疗或研究的情况下,抗体可用于检测单体、错误折叠、聚集或原纤维形式的甲状腺素运载蛋白(TTR)或其片段。例如,抗体可用于检测生物样品中单体、错误折叠、聚集或原纤维形式的TTR的存在,所述存在作为生物样品包含TTR淀粉样沉积物的指示。抗体与生物样品的结合可与抗体与对照样品的结合进行比较。对照样品和生物样品可包含相同组织来源的细胞。对照样品和生物样品可自相同个体或不同个体获得,并且在相同时机或不同时机时获得。如果需要,在多个时机时评估多个生物样品和多个对照样品,以防止独立于样品之间差异的随机变化。然后可在生物样品与对照样品之间进行直接比较,以确定抗体与生物样品的结合(即单体、错误折叠、聚集或原纤维形式的TTR的存在)相对于抗体与对照样品的结合是否增加、减少或相同。抗体与生物样品的结合相对于对照样品的增加指示生物样品中单体、错误折叠、聚集或原纤维形式的TTR的存在。在一些情况下,增加的抗体结合为统计学上显著的。任选地,抗体与生物样品的结合比抗体与对照样品的结合高至少1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍或100倍。

[0397] 此外,抗体可用于检测生物样品中单体、错误折叠、聚集或原纤维形式的TTR的存在,以监测和评估用于治疗诊断为TTR淀粉样变性的患者的治疗剂的功效。评估来自诊断为TTR淀粉样变性的患者的生物样品以建立抗体与样品的结合的基线(即,样品中单体、错误折叠、聚集或原纤维形式的TTR的存在的基线),之后开始用治疗剂进行的疗法。在一些情况下,来自患者的多个生物样品在多个时机时进行评估,以建立独立于治疗的随机变化的基线和量度。然后在一个方案中施用治疗剂。所述方案可包括在一段时间内多次施用所述剂。任选地,在来自患者的多个生物样品中在多个时机时评估抗体的结合(即,单体、错误折叠、聚集或原纤维形式的TTR的存在),以建立随机变化的量度并且显示对免疫疗法的应答的趋势。然后比较抗体与生物样品的结合的各种评估。如果仅进行两次评估,则可在两次评估之



间进行直接比较,以确定抗体结合(即,单体、错误折叠、聚集或原纤维形式的TTR的存在)在两次评估之间是否增加、减少或保持相同。如果进行多于两次的测量,则可将测量值分析为在用治疗剂治疗前开始并且贯穿疗程进行的时间过程。在抗体与生物样品的结合已减少(单体、错误折叠、聚集或原纤维形式的TTR的存在)的患者中,可得出结论,治疗剂有效治疗患者的TTR淀粉样变性。抗体结合的减少可为统计学上显著的。任选地,结合减少至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。可协同评估TTR淀粉样变性的其他体征和症状来进行抗体结合的评估。

[0398] 抗体还可用作检测单体、错误折叠、聚集或原纤维形式的TTR或其片段的实验室研究的研究试剂。在此类用途中,抗体可用荧光分子、自旋标记分子、酶或放射性同位素来标记,并且可以具有进行检测测定的所有必需试剂的试剂盒形式来提供。抗体还可用于例如通过亲和色谱来纯化单体、错误折叠、聚集或原纤维形式的TTR或单体、错误折叠、聚集或原纤维形式的TTR的结合配偶体。

[0399] 抗体还可用于在生物样品中抑制或减少TTR聚集、抑制或减少TTR原纤维形成、减少或清除TTR沉积物或TTR聚集体或使TTR的无毒性构象稳定。生物样品可包括例如血液、血清、血浆或组织(例如,来自心脏、周围神经系统、自主神经系统、肾、眼睛、腹部脂肪或胃肠道的组织)。在一些情况下,TTR聚集、TTR原纤维形成或TTR沉积物被抑制或减少至少10%、20%、25%、30%、40%、50%或75%(例如,10%-75%或30%-70%)。用于检测原纤维形成的测定在本文其他地方有所描述。另参见,US 2014/0056904。

[0400] 上文或下文所引用的所有专利文件、网站、其它出版物、登录号等以引用的方式整体并入本文用于所有目的,其程度就如同每一个单个项目被具体地和单独地表示为如此以引用的方式并入本文。如果序列的不同版本与不同时间的登录号有关,那么意指与在本申请的实际申请日期时的登录号相关的版本。实际申请日期意指提到所述登录号的优先权申请的实际申请日期或申请日期的较早日期,如果适用的话。同样,除非另有说明,否则如果不同版本的出版物、网站等在不同时间公布,则最近在申请的有效申请日期公布的版本是有意义的。除非另外明确指明,否则本发明的任何特征、步骤、要素、实施方案或方面可以与任何其它组合使用。尽管已经出于清楚和理解的目的经由说明和实施例相当详细地描述了本发明,但是将显而易见的是,某些变化方案和改动方案可以在所附权利要求的范围内实施。

[0401] 实施例

[0402] 实施例1. 18C5的免疫原制备和小鼠免疫

[0403] BALB/c和C57BL/6雌性小鼠均注射具有在F87M和L110M处的突变的基因工程化的甲状腺素运载蛋白,称为甲状腺素运载蛋白双突变体(TTR-DM)。每周使用5只BALB/c注射RIBI佐剂中乳化的TTR-DM,腹腔注射,50 $\mu$ g/小鼠注射3次,之后25 $\mu$ g/小鼠注射3次,并且之后10 $\mu$ g/小鼠注射4次,此外对5只C57BL/6小鼠以50 $\mu$ g/小鼠注射3次、以25 $\mu$ g/小鼠注射3次并且以10 $\mu$ g/小鼠注射4次,在RIBI佐剂中乳化。对小鼠的TTR-DM、天然四聚体TTR和his-MCAM进行滴度测定。通过修改Kohler和Milstein将具有对TTR-DM滴度最高和对天然四聚体TTR和his-MCAM(BALB/c#1和5以及C57BL/6#4和5)滴度最低的小鼠进行融合。对所得杂交瘤进行TTR-DM、天然四聚体TTR和his-MCAM的筛选。克隆对TTR-DM显示特异性的杂交瘤并且进一步表征。鉴定18C5。

[0404] 实施例2.通过BIAcore表征18C5

[0405] 使用Biacore T200进行分析,以比较鼠抗体与6M盐酸胍中变性的重组人TTR (Gu-hTTR)、6M盐酸胍中变性的食蟹猴TTR (Gu-cTTR) 和天然四聚体人TTR的结合亲和力。通过胺偶联将抗小鼠抗体固定在传感器芯片CM3 (GE Healthcare Life Sciences) 上,并且捕获鼠抗体(配体)至一定水平,以确保分析物的最大结合为50RU(约250RU的配体结合)。在运行缓冲液(HBS+0.05%P-20,1mg/mL BSA,50mM Gu-HCl)中,以50 $\mu$ L/min将各种浓度的Gu-TTR (0.4nM至100nM) 在捕获的配体上传递经过300s缔合时间和900s解离时间。在pH 1.7下,通过2次短注射10mM甘氨酸-HCl来完成芯片表面的再生。使用的Gu-cTTR的浓度范围为1-1000nM,而人TTR四聚体的浓度范围为10nM至10000nM。将数据空白减去到不含配体的传感器和0nM分析物浓度。使用Biacore评估软件(v3.0)的1:1全局拟合进行分析,其中本体折射率设置为零RU。结合数据在表4中示出。

[0406] 表4. 18C5与人错误折叠的TTR和食蟹猴错误折叠的TTR以及人TTR四聚体的结合数据。

	TTR	ka 1/Ms	kd 1/s	K <sub>D</sub> nM
	人错误折叠的TTR	1.1X10 <sup>5</sup>	6.2X10 <sup>-4</sup>	5.9 nM
[0407]	食蟹猴错误折叠的TTR	1.0X10 <sup>5</sup>	9.2X10 <sup>-4</sup>	在最高浓度下的最小结合,难以估计KD
	人TTR四聚体	2.2X10 <sup>3</sup>	2.2X10 <sup>-4</sup>	在最高浓度下的最小结合,难以估计KD

[0408] 实施例3:通过BIAcore表征嵌合18C5

[0409] 使用Biacore T200进行分析,以比较鼠和嵌合抗体与6M盐酸胍中变性的重组人TTR (Gu-hTTR) 的结合亲和力。通过胺偶联将抗人抗体固定在传感器芯片CM3 (GE Healthcare Life Sciences) 上的流动池1和2并且将抗小鼠抗体固定在流动池3和4,捕获嵌合和鼠18C5抗体(配体)至一定水平,以确保分析物的最大结合为50RU(约250RU的配体结合)。在运行缓冲液(HBS+0.05%P-20,1mg/mL BSA,50mM Gu-HCl)中,以50 $\mu$ L/min将各种浓度的Gu-TTR (0.4nM至100nM) 在捕获的配体上传递经过300s缔合时间和900s解离时间。在pH 1.7下,通过2次短注射3M氯化镁或2次短注射10mM甘氨酸-HCl来完成芯片表面的再生。将数据空白减去到不含配体的传感器和0nM分析物浓度。使用Biacore评估软件(v3.0)的1:1全局拟合进行分析,其中本体折射率设置为零RU。结合数据在表5中示出。

[0410] 将嵌合18C5抗体的成熟重链可变区氨基酸序列提供为SEQ ID NO:81,将嵌合18C5抗体的成熟轻链可变区氨基酸序列提供为SEQ ID NO:87,人重链恒定区氨基酸序列为SEQ ID NO:17以及人轻链恒定区氨基酸序列SEQ ID NO:19。

[0411] 表5. 鼠和嵌合抗体与6M盐酸胍中变性的重组人TTR的结合数据。

TTR	ka 1/Ms	kd 1/s	K <sub>D</sub> nM
嵌合18C5	1.3X10 <sup>5</sup>	1.6X10 <sup>-4</sup>	1.8nM
鼠18C5	9.9X10 <sup>4</sup>	2.1X10 <sup>-4</sup>	2.2nM

[0413] 实施例4. 18C5的表位作图

[0414] 初始作图显示出18C5的表位位于SEQ ID NO:26的87-127内。进一步作图显示出表

位位于SEQ ID NO:26的101-109之间。对错误折叠的食蟹猴TTR的低得多的亲和力表明氨基酸104是重要的,因为这是人与食蟹猴TTR之间唯一的氨基酸置换。

[0415] 实施例5. 18C5的序列

[0416] 18C5杂交瘤克隆LA89 18C5.A1.A1冻存细胞团块用于mRNA提取和纯化。使用Oligotex直接mRNA微型试剂盒(Qiagen,目录号72022)方案进行mRNA分离和纯化。简而言之,将 $9 \times 10^6$ 个杂交瘤克隆细胞在高变性异硫氰酸胍缓冲液的存在下裂解和均质化,所述缓冲液使RNA酶失活。将Oligotex悬浮液添加到裂解混合物中,允许oligotex颗粒的oligo dT30与mRNA的poly-A尾之间进行杂交。然后,洗涤污染物并洗脱poly-A+RNA。使用Marathon cDNA扩增试剂盒(Clontech,目录号634913)将mRNA反转录为cDNA。将衔接子连接到cDNA的5'端。5' RACE法用于扩增V区。PCR使用5' V区共有引物和恒定区特异性锚定引物。将扩增的V区克隆到pTOP0克隆载体中,并且转化到Top10大肠杆菌中。生长15-20个单个菌落,并且对纯化的质粒进行测序。如果克隆序列满足以下标准,则将其视为真正的V区序列:

[0417] Met与C区之间无终止密码子

[0418] 序列含有抗体V区的关键特征

[0419] 序列含有可定义的CDR。

[0420] 具有匹配ORF的最少三个独立克隆

[0421] 将所测定的可变区序列克隆到表达载体中并转染到CHO细胞中。使用鼠18C5作为对照抗体来表征纯化的嵌合抗体的结合。

[0422] 将18C5的成熟重链可变氨基酸序列提供为SEQ ID NO:81,并且将18C5的成熟轻链可变氨基酸序列提供为SEQ ID NO:87。将Kabat/Chothia复合物重链CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3氨基酸序列分别提供为SEQ ID NO:5、7和9。将Kabat/Chothia复合物轻链CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3氨基酸序列分别提供为SEQ ID NO:11、13和15。

[0423] 实施例6.通过蛋白质印迹分析证明18C5的特异性

[0424] 为了证明18C5对非天然(变性)TTR的构象特异性,如下进行蛋白质印迹分析:

[0425] 程序:

[0426] SDS-聚丙烯酰胺凝胶

[0427] 天然TTR:将LDS样品缓冲液(Life Technologies)中重组人TTR的1.0、0.5和0.1 $\mu$ g样品在10%NuPAGE bis-tris凝胶(MES缓冲液;90V,105min)上运行,并且转移到硝化纤维素膜上以进行蛋白质印迹分析。

[0428] 变性TTR:除LDS样品缓冲液含有还原剂并且样品在SDS-PAGE前经煮沸变性外,如上所述制备重组人TTR用于天然TTR。

[0429] 蛋白质印迹分析

[0430] SDS-PAGE凝胶在硝化纤维素膜(iBlot,Life Technologies)上印迹,用封闭缓冲液(LI-COR,Lincoln,NE)处理,并且在1.0- $\mu$ g/mL一级抗体中孵育,用1x TBS洗涤,并且放置在1:20000稀释的IRDye 800CW结合山羊抗小鼠或抗兔二级抗体(LI-COR,Lincoln,NE)中,然后在Odyssey CLx红外成像仪(LI-COR,Lincoln,NE)上成像。

[0431] 结果和讨论:

[0432] 天然与变性重组TTR的蛋白质印迹(图1)显示出,18C5具有对天然TTR物种(泳道1-3)的极弱反应性,但是对变性TTR单体( $\sim$ 15kDa)的极强反应性,其中对变性二聚体( $\sim$

30kDa)的反应性轻微(泳道5-7)。泳道4示出分子量标记物。

[0433] 相比之下,非构象特异性的商业TTR抗体(Sigma,目录号HPA002550)不能区分天然TTR和变性TTR,并且对单体以及二聚天然TTR和变性TTR示出极强的反应性(图2)。泳道1-3示出天然TTR的结果;泳道4示出分子量标记物,并且泳道5-7示出变性TTR的结果。

[0434] 实施例7.人源化18C5抗体的设计

[0435] 用于人源化的起始点或供体抗体为小鼠抗体18C5。将成熟m18C5的重链可变氨基酸序列提供为SEQ ID NO:81。将成熟m18C5的轻链可变氨基酸序列提供为SEQ ID NO:87。将重链Kabat/Chothia复合物CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列分别提供为SEQ ID NO:5、7和9。将轻链Kabat CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列分别提供为SEQ ID NO:11、13和15。在整个描述中使用Kabat编号。

[0436] 18C5的可变区序列与来自Kabat等的抗体可变区的共有序列的对齐指示18C5的重链可变区(VH)属于小鼠VH亚组3b,这对应于人VH亚组3。18C5的 $\kappa$ 轻链可变区(VL)属于小鼠Vk亚组2,这对应于人Vk亚组2。[Kabat E.A.等,(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版,NIH出版号91-3242.]。

[0437] Vk和Vh结构域之间的界面处的残基是通常发现的残基,不同之处在于Ala在重链中处于位置37处,而通常Val或Ile处于此位置。Leu在Vh中处于通常为Asp、Gly或Ser的位置95处。这些位置是回复突变的候选位置。对于Vk链,Glu 34通常为Ala、His、Asn或Ser,并且这些位置是回复突变的候选位置。

[0438] 使用基于Martin序列的CDR识别规则识别18C5 VH和VL的CDR。然后,使用Martin表3.5中提供的关键残基总结将CDR分配给Chothia标准类(Martin ACR.(2010).于:Kontermann R and Dübel S(编).Antibody Engineering.Heidelberg,Germany:Springer International Publishing AG.):

[0439] CDR-H1由10个氨基酸组成并且与Chothia标准类1类似。

[0440] CDR-H2由17个氨基酸组成并且与Chothia标准类3类似。

[0441] CDR-H3由4个氨基酸组成;不存在CDR-H3的类。

[0442] CDR-L1由16个氨基酸组成并且与Chothia标准类4类似。

[0443] CDR-L2由7个氨基酸组成并且属于Chothia标准类1。

[0444] CDR-L3由9个氨基酸组成并且与Chothia标准类1类似。

[0445] 对PDB数据库中的蛋白质序列进行了搜索[Deshpande等,2005,Nucleic Acids Research 33:D233-D237],以找到将提供18C5的粗略结构模型的结构。鼠抗焦谷氨酸A $\beta$ 抗体Fab c#17(PDB code 5MYK) [Piechotta,A.等,((2017)J.Biol.Chem.292:12713-12724)的晶体结构用于Vh和Vk结构,因为其具有良好的分辨率(1.6Å)以及与18C5 Vh和Vk的整体序列相似性,保留了环的相同标准结构。Bioluminate软件用于对18C5的粗略结构建模。此软件由Schrodinger公司授权。

[0446] 18C5 VH和VL的框架与Ultsch M等((2016)Sci Rep.6:39374)设计的人源化Crenezumab Fab(CreneFab)PDB:5VZY的相应区域具有高度的序列相似性。18C5和CreneFab的可变结构域对于CDR-H1、H2、L1、L2和L3环也具有相同的长度。选择CreneFab VH(5VZY-VH)和VL(5VZY-VL)的框架区作为18C5的CDR的受体序列。Bioluminate软件用于对结构建模。此软件由Schrodinger公司授权。

[0447] 使用IMGT Domain GapAlign工具将由抗体人源化过程产生的重链和轻链变体序列进一步与人种系序列对齐,以评估由WHO INN委员会指南概述的重链和轻链的人源性。(WHO-INN:International nonproprietary names (INN) for biological and biotechnological substances (a review) (互联网) 2014。可从以下获得:<http://www.who.int/medicines/services/inn/BioRev2014.pdf>)。在可能的情况下,将残基变更为与相应的人种系序列对齐,以增强人源性。对于人源化VL<sub>v2</sub>变体,引入Q45R突变以使序列更类似于人种系基因IGKV2-30\*02 (GenBank登录号CAA77315;SEQ ID NO:90)。由CreneFab框架和18C5 CDR组成的氨基酸序列被定名为hu18C5-VH<sub>v1</sub>和hu18C5-VL<sub>v1</sub>。

[0448] 另外版本的hu18C5-VH和hu18C5-VL被设计为使得能够评估各种框架残基对抗原结合和免疫原性的贡献。考虑突变的位置包括以下的那些:

[0449] -定义标准CDR构象(概述于Martin 2010中),

[0450] -在微调区内(Foote J和Winter G. (1992)。J Mol Biol.224(2):487-99),

[0451] -定位到VH/VL结构域界面(概述于Leger OJP和Saldanha J. (2000) Preparation of recombinant antibodies from immune rodent spleens and the design of their humanization by CDR grafting.于:Shepherd P and Dean C(编).Monoclonal Antibodies:a Practical Approach.Oxford,UK:Oxford University Press),

[0452] -易受翻译后修饰的影响,诸如糖基化或焦谷氨酰胺化,

[0453] -根据移植到Crenezumab Fab框架上的18C5 CDR的模型,被预计与CDR发生冲突的残基占据,或

[0454] -被人抗体序列中罕见的残基占据,其中亲代小鼠18C5残基或一些其他残基更为普遍。

[0455] 构建了2个人源化重链可变区变体和2个人源化轻链可变区变体,其含有不同排列的置换:hu18C5-VH<sub>v1</sub>和hu18C5-VH<sub>v2</sub>(分别为SEQ ID NO:85-86)以及hu18C5-VL<sub>v1</sub>和hu18C5-VL<sub>v2\_v6</sub>(分别为SEQ ID NO:91-92)。(表6和表7)。示例性人源化Vk和Vh设计以及基于所选人框架的回复突变和其他突变分别示于表6和表7中。表6和表7中的粗体区域表示如由Kabat/Chothia复合物定义的CDR。“-”表示在指示位置没有氨基酸。SEQ ID NO:86和92含有如表8所示的回复突变和其他突变。表9中列出了hu18C5-VH<sub>v1</sub>和hu18C5-VH<sub>v2</sub>中位置的氨基酸。表10中列出了hu18C5-VL<sub>v1</sub>和hu18C5-VL<sub>v2</sub>中位置的氨基酸。人源化VH链hu18C5-VH<sub>v1</sub>和hu18C5-VH<sub>v2</sub>(分别为SEQ ID NO:85-86)关于最类似的人种系基因IGHV3-48\*01的人源性百分比,以及人源化VL链hu18C5-VL<sub>v1</sub>和hu18C5-VL<sub>v2</sub>(分别为SEQ ID NO:91-92)关于最类似的人种系基因IGKV2-30\*02的人源性百分比在表11中示出。

[0456] 表7:人源化18C5 VL区

[0457]

线性残基#	Kabat 残基#	FR 或 CDR	鼠 18C5 VL (SEQ ID NO:87)	受体 5VZY-VL_huFrwk (CreneFab) 登录号 5VZY (SEQ ID NO: 89)	hu18C5-VL_v1 (SEQ ID NO:91)	hu18C5-VL_v2 (SEQ ID NO:92)
1	1	Fr1	D	D	D	D
2	2	Fr1	V	I	I	V
3	3	Fr1	L	V	V	V
4	4	Fr1	M	M	M	M
5	5	Fr1	T	T	T	T
6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q
7	7	Fr1	T	S	S	S
8	8	Fr1	P	P	P	P
9	9	Fr1	L	L	L	L
10	10	Fr1	S	S	S	S
11	11	Fr1	L	L	L	L
12	12	Fr1	P	P	P	P
13	13	Fr1	V	V	V	V
14	14	Fr1	S	T	T	T
15	15	Fr1	L	P	P	P
16	16	Fr1	G	G	G	G
17	17	Fr1	D	E	E	E
18	18	Fr1	Q	P	P	P
19	19	Fr1	A	A	A	A
20	20	Fr1	S	S	S	S
21	21	Fr1	I	I	I	I

[0458]

22	22	Fr1	S	S	S	S
23	23	Fr1	C	C	C	C
<b>24</b>	<b>24</b>	<b>CDR-L1</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>
<b>25</b>	<b>25</b>	<b>CDR-L1</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>
<b>26</b>	<b>26</b>	<b>CDR-L1</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>
<b>27</b>	<b>27</b>	<b>CDR-L1</b>	<b>Q</b>	<b>Q</b>	<b>Q</b>	<b>Q</b>
<b>28</b>	<b>27A</b>	<b>CDR-L1</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>
<b>29</b>	<b>27B</b>	<b>CDR-L1</b>	<b>I</b>	<b>L</b>	<b>I</b>	<b>I</b>
<b>30</b>	<b>27C</b>	<b>CDR-L1</b>	<b>V</b>	<b>V</b>	<b>V</b>	<b>V</b>
<b>31</b>	<b>27D</b>	<b>CDR-L1</b>	<b>D</b>	<b>Y</b>	<b>D</b>	<b>D</b>
<b>32</b>	<b>27E</b>	<b>CDR-L1</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>
<b>33</b>	<b>27F</b>	<b>CDR-L1</b>				
<b>34</b>	<b>28</b>	<b>CDR-L1</b>	<b>N</b>	<b>N</b>	<b>N</b>	<b>N</b>
<b>35</b>	<b>29</b>	<b>CDR-L1</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>
<b>36</b>	<b>30</b>	<b>CDR-L1</b>	<b>N</b>	<b>D</b>	<b>N</b>	<b>N</b>
<b>37</b>	<b>31</b>	<b>CDR-L1</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>
<b>38</b>	<b>32</b>	<b>CDR-L1</b>	<b>Y</b>	<b>Y</b>	<b>Y</b>	<b>Y</b>
<b>39</b>	<b>33</b>	<b>CDR-L1</b>	<b>L</b>	<b>L</b>	<b>L</b>	<b>L</b>
<b>40</b>	<b>34</b>	<b>CDR-L1</b>	<b>E</b>	<b>H</b>	<b>E</b>	<b>E</b>
41	35	Fr2	W	W	W	W
42	36	Fr2	Y	Y	Y	Y
43	37	Fr2	L	L	L	L
44	38	Fr2	Q	Q	Q	Q
45	39	Fr2	K	K	K	K
46	40	Fr2	P	P	P	P
47	41	Fr2	G	G	G	G
48	42	Fr2	Q	Q	Q	Q
49	43	Fr2	S	S	S	S
50	44	Fr2	P	P	P	P
51	45	Fr2	K	Q	Q	R
52	46	Fr2	L	L	L	L
53	47	Fr2	L	L	L	L
54	48	Fr2	I	I	I	I
55	49	Fr2	Y	Y	Y	Y
<b>56</b>	<b>50</b>	<b>CDR-L2</b>	<b>K</b>	<b>K</b>	<b>K</b>	<b>K</b>
<b>57</b>	<b>51</b>	<b>CDR-L2</b>	<b>V</b>	<b>V</b>	<b>V</b>	<b>V</b>
<b>58</b>	<b>52</b>	<b>CDR-L2</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>
<b>59</b>	<b>53</b>	<b>CDR-L2</b>	<b>N</b>	<b>N</b>	<b>N</b>	<b>N</b>
<b>60</b>	<b>54</b>	<b>CDR-L2</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>
<b>61</b>	<b>55</b>	<b>CDR-L2</b>	<b>F</b>	<b>F</b>	<b>F</b>	<b>F</b>
<b>62</b>	<b>56</b>	<b>CDR-L2</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>
63	57	Fr3	G	G	G	G
64	58	Fr3	V	V	V	V
65	59	Fr3	P	P	P	P
66	60	Fr3	D	D	D	D
67	61	Fr3	R	R	R	R
68	62	Fr3	F	F	F	F
69	63	Fr3	S	S	S	S

[0459]

70	64	Fr3	G	G	G	G
71	65	Fr3	S	S	S	S
72	66	Fr3	G	G	G	G
73	67	Fr3	S	S	S	S
74	68	Fr3	G	G	G	G
75	69	Fr3	T	T	T	T
76	70	Fr3	D	D	D	D
77	71	Fr3	F	F	F	F
78	72	Fr3	T	T	T	T
79	73	Fr3	L	L	L	L
80	74	Fr3	K	K	K	K
81	75	Fr3	I	I	I	I
82	76	Fr3	S	S	S	S
83	77	Fr3	R	R	R	R
84	78	Fr3	V	V	V	V
85	79	Fr3	E	E	E	E
86	80	Fr3	A	A	A	A
87	81	Fr3	E	E	E	E
88	82	Fr3	D	D	D	D
89	83	Fr3	L	V	V	V
90	84	Fr3	G	G	G	G
91	85	Fr3	I	V	V	V
92	86	Fr3	Y	Y	Y	Y
93	87	Fr3	Y	Y	Y	Y
94	88	Fr3	C	C	C	C
<b>95</b>	<b>89</b>	<b>CDR-L3</b>	<b>F</b>	<b>S</b>	<b>F</b>	<b>F</b>
<b>96</b>	<b>90</b>	<b>CDR-L3</b>	<b>Q</b>	<b>Q</b>	<b>Q</b>	<b>Q</b>
<b>97</b>	<b>91</b>	<b>CDR-L3</b>	<b>G</b>	<b>S</b>	<b>G</b>	<b>G</b>
<b>98</b>	<b>92</b>	<b>CDR-L3</b>	<b>S</b>	<b>T</b>	<b>S</b>	<b>S</b>
<b>99</b>	<b>93</b>	<b>CDR-L3</b>	<b>H</b>	<b>H</b>	<b>H</b>	<b>H</b>
<b>100</b>	<b>94</b>	<b>CDR-L3</b>	<b>V</b>	<b>V</b>	<b>V</b>	<b>V</b>
<b>101</b>	<b>95</b>	<b>CDR-L3</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>
<b>102</b>	<b>95A</b>	<b>CDR-L3</b>	-	-	-	-
<b>103</b>	<b>95B</b>	<b>CDR-L3</b>	-	-	-	-
<b>104</b>	<b>95C</b>	<b>CDR-L3</b>	-	-	-	-
<b>105</b>	<b>95D</b>	<b>CDR-L3</b>	-	-	-	-
<b>106</b>	<b>95E</b>	<b>CDR-L3</b>	-	-	-	-
<b>107</b>	<b>95F</b>	<b>CDR-L3</b>	-	-	-	-
<b>108</b>	<b>96</b>	<b>CDR-L3</b>	<b>L</b>	<b>W</b>	<b>L</b>	<b>L</b>
<b>109</b>	<b>97</b>	<b>CDR-L3</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>
110	98	Fr4	F	F	F	F
111	99	Fr4	G	G	G	G
112	100	Fr4	A	Q	Q	Q
113	101	Fr4	G	G	G	G
114	102	Fr4	T	T	T	T
115	103	Fr4	K	K	K	K
116	104	Fr4	L	V	V	V
117	105	Fr4	E	E	E	E



[0460]	118	106	Fr4	L	I	I	I
	119	106A	Fr4				
	120	107	Fr4	K	K	K	K

[0461] 表7:人源化18C5 VH区

线性残基#	Kabat 残基#	FR 或 CDR	鼠_18C5_VH (SEQ ID NO: 81)	受体 5VZY-VH_huFrwk (CreneFab) 登录号 5VZY (SEQ ID NO:83)	hu18C5-VH_v1 (SEQ ID NO:85)	hu18C5-VH_v2 (SEQ ID NO:86)
1	1	Fr1	E	E	E	E
2	2	Fr1	V	V	V	V
3	3	Fr1	K	Q	Q	Q
4	4	Fr1	L	L	L	L
5	5	Fr1	L	V	V	V
6	6	Fr1	E	E	E	E
7	7	Fr1	S	S	S	S
8	8	Fr1	G	G	G	G
9	9	Fr1	G	G	G	G
10	10	Fr1	G	G	G	G
11	11	Fr1	L	L	L	L
12	12	Fr1	V	V	V	V
13	13	Fr1	Q	Q	Q	Q
14	14	Fr1	P	P	P	P
15	15	Fr1	G	G	G	G
16	16	Fr1	G	G	G	G
17	17	Fr1	S	S	S	S
18	18	Fr1	L	L	L	L
19	19	Fr1	N	R	R	R
20	20	Fr1	L	L	L	L
21	21	Fr1	S	S	S	S
22	22	Fr1	C	C	C	C
23	23	Fr1	V	A	A	A
24	24	Fr1	A	A	A	A
25	25	Fr1	S	S	S	S
26	26	<b>CDR-H1</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>

[0463]

27	27	CDR-H1	F	F	F	F
28	28	CDR-H1	D	T	D	D
29	29	CDR-H1	F	F	F	F
30	30	CDR-H1	S	S	S	S
31	31	CDR-H1	R	S	R	R
32	32	CDR-H1	F	Y	F	F
33	33	CDR-H1	W	G	W	W
34	34	CDR-H1	M	M	M	M
35	35	CDR-H1	S	S	S	S
36	35A	CDR-H1	-	-	-	-
37	35B	CDR-H1	-	-	-	-
38	36	Fr2	W	W	W	W
39	37	Fr2	A	V	V	A
40	38	Fr2	R	R	R	R
41	39	Fr2	Q	Q	Q	Q
42	40	Fr2	A	A	A	A
43	41	Fr2	P	P	P	P
44	42	Fr2	G	G	G	G
45	43	Fr2	R	K	K	K
46	44	Fr2	G	G	G	G
47	45	Fr2	Q	L	L	Q
48	46	Fr2	E	E	E	E
49	47	Fr2	W	L	L	W
50	48	Fr2	I	V	V	I
51	49	Fr2	G	A	A	G
52	50	CDR-H2	E	S	E	E
53	51	CDR-H2	I	I	I	I
54	52	CDR-H2	N	N	N	N
55	52A	CDR-H2	P	S	P	P
56	52B	CDR-H2	-	-	-	-
57	52C	CDR-H2	-	-	-	-
58	53	CDR-H2	G	N	G	G
59	54	CDR-H2	S	G	S	S
60	55	CDR-H2	S	G	S	S
61	56	CDR-H2	T	S	T	T
62	57	CDR-H2	I	T	I	I
63	58	CDR-H2	N	Y	N	N
64	59	CDR-H2	Y	Y	Y	Y
65	60	CDR-H2	T	P	T	T
66	61	CDR-H2	P	D	P	P
67	62	CDR-H2	S	S	S	S
68	63	CDR-H2	L	V	L	L
69	64	CDR-H2	K	K	K	K
70	65	CDR-H2	D	G	D	D
71	66	Fr3	K	R	R	R
72	67	Fr3	F	F	F	F
73	68	Fr3	I	T	T	T
74	69	Fr3	I	I	I	I

[0464]

75	70	Fr3	S	S	S	S
76	71	Fr3	R	R	R	R
77	72	Fr3	D	D	D	D
78	73	Fr3	N	N	N	N
79	74	Fr3	A	A	A	A
80	75	Fr3	K	K	K	K
81	76	Fr3	N	N	N	N
82	77	Fr3	T	S	S	S
83	78	Fr3	L	L	L	L
84	79	Fr3	F	Y	Y	Y
85	80	Fr3	L	L	L	L
86	81	Fr3	Q	Q	Q	Q
87	82	Fr3	M	M	M	M
88	82A	Fr3	S	N	N	N
89	82B	Fr3	K	S	S	S
90	82C	Fr3	V	L	L	L
91	83	Fr3	R	R	R	R
92	84	Fr3	S	A	A	A
93	85	Fr3	E	E	E	E
94	86	Fr3	D	D	D	D
95	87	Fr3	S	T	T	T
96	88	Fr3	A	A	A	A
97	89	Fr3	L	V	V	V
98	90	Fr3	Y	Y	Y	Y
99	91	Fr3	Y	Y	Y	Y
100	92	Fr3	C	C	C	C
101	93	Fr3	A	A	A	A
102	94	Fr3	R	S	S	R
<b>103</b>	<b>95</b>	<b>CDR-H3</b>	<b>L</b>	<b>G</b>	<b>L</b>	<b>L</b>
<b>104</b>	<b>96</b>	<b>CDR-H3</b>	<b>G</b>	<b>-</b>	<b>G</b>	<b>G</b>
<b>105</b>	<b>97</b>	<b>CDR-H3</b>	<b>Y</b>	<b>-</b>	<b>Y</b>	<b>Y</b>
<b>106</b>	<b>98</b>	<b>CDR-H3</b>	<b>G</b>	<b>-</b>	<b>G</b>	<b>G</b>
<b>107</b>	<b>99</b>	<b>CDR-H3</b>	<b>N</b>	<b>-</b>	<b>N</b>	<b>N</b>
<b>108</b>	<b>100</b>	<b>CDR-H3</b>	<b>Y</b>	<b>-</b>	<b>Y</b>	<b>Y</b>
<b>109</b>	<b>100A</b>	<b>CDR-H3</b>	<b>G</b>	<b>-</b>	<b>G</b>	<b>G</b>
<b>110</b>	<b>100B</b>	<b>CDR-H3</b>	<b>W</b>	<b>-</b>	<b>W</b>	<b>W</b>
<b>111</b>	<b>100C</b>	<b>CDR-H3</b>	<b>A</b>	<b>-</b>	<b>A</b>	<b>A</b>
<b>112</b>	<b>100D</b>	<b>CDR-H3</b>	<b>L</b>	<b>-</b>	<b>L</b>	<b>L</b>
<b>113</b>	<b>100E</b>	<b>CDR-H3</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>114</b>	<b>100F</b>	<b>CDR-H3</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>115</b>	<b>100G</b>	<b>CDR-H3</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>116</b>	<b>100H</b>	<b>CDR-H3</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>117</b>	<b>100I</b>	<b>CDR-H3</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>118</b>	<b>100J</b>	<b>CDR-H3</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>119</b>	<b>100K</b>	<b>CDR-H3</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>120</b>	<b>101</b>	<b>CDR-H3</b>	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>D</b>
<b>121</b>	<b>102</b>	<b>CDR-H3</b>	<b>Y</b>	<b>Y</b>	<b>Y</b>	<b>Y</b>
122	103	Fr4	W	W	W	W

[0465]	123	104	Fr4	G	G	G	G
	124	105	Fr4	Q	Q	Q	Q
	125	106	Fr4	G	G	G	G
	126	107	Fr4	T	T	T	T
	127	108	Fr4	S	T	T	T
	128	109	Fr4	V	V	V	V
	129	110	Fr4	T	T	T	T
	130	111	Fr4	V	V	V	V
	131	112	Fr4	S	S	S	S
	132	113	Fr4	S	S	S	S

[0466] 表8

[0467] 人源化18C5的V<sub>H</sub>、V<sub>L</sub>回复突变和其他突变

V <sub>H</sub> 或 V <sub>L</sub> 变体	V <sub>H</sub> 或 V <sub>L</sub> 外显子受体序列	受体框架残基的变化 (基于 Kabat/Chothia 复合物 CDR)
hu18C5-VH_v1 (SEQ ID NO:85)	受体 5VZY-VH_huFrwk (CreneFab)登录号 5VZY (SEQ ID NO:83)	无
hu18C5-VH_v2 (SEQ ID NO:86)	受体 5VZY-VH_huFrwk (CreneFab)登录号 5VZY (SEQ ID NO:83)	H37, H45, H47, H48, H49, H94
hu18C5-VL_v1 (SEQ ID NO:91)	受体 5VZY-VL_huFrwk (CreneFab)登录号 5VZY (SEQ ID NO: 89)	无
hu18C5-VL_v2 (SEQ ID NO:92)	受体 5VZY-VL_huFrwk (CreneFab)登录号 5VZY (SEQ ID NO: 89)	L2, L45

[0469] 表9

[0470] 人源化18C5抗体的重链中回复突变和其他突变的框架残基的Kabat编号(基于Kabat/Chothia复合物CDR)

[0471]

Kabat 残基#	受体 5VZY-VH_huFrwk (CreneFab) 登录号 5VZY (SEQ ID NO:83)	鼠 18C5 VH (SEQ ID NO: 81)	hu18C5-VH_v1 (SEQ ID NO:85)	hu18C5-VH_v2 (SEQ ID NO:86)
H37	V	A	V	A
H45	L	Q	L	Q
H47	L	W	L	W
H48	V	I	V	I
H49	A	G	A	G
H94	S	R	S	R

[0472] 表10

[0473] 人源化18C5抗体的轻链中回复突变和其他突变的框架残基的Kabat编号(基于Kabat/Chothia复合物CDR)

[0474]

Kabat 残基#	受体 5VZY-VL_huFrwk (CreneFab) 登录号 5VZY (SEQ ID NO: 89)	鼠 18C5 VL (SEQ ID NO:87)	hu18C5-VL_v1 (SEQ ID NO:91)	hu18C5-VL_v2 (SEQ ID NO:92)
L2	I	V	I	V
L45	Q	K	Q	R

[0475] 表11

[0476] 人源化18C5抗体的重链和轻链的人源性百分比

[0477]

V <sub>H</sub> 或V <sub>L</sub> 变体	人源性%
hu18C5-VH_v1 (SEQ ID NO:85)	96.2%
hu18C5-VH_v2 (SEQ ID NO:86)	93.8%
hu18C5-VL_v1 (SEQ ID NO:91)	88.6%
hu18C5-VL_v2 (SEQ ID NO:92)	92.4%

[0478] 小鼠与人受体序列之间Chothia类标准残基、微调残基或界面/包装残基有所不同的位置为置换的候选者。Chothia类标准残基的实例包括表6和表7中的Kabat残基H48。界面/包装(VH+VL)残基的实例包括表6和表7中的Kabat残基H35、H37、H39、H45、H47、H91、H93、H95、H103、L34、L36、L38、L44、L46、L87、L89、L91、L96和L98。

[0479] 用于在轻链可变区中选择表6中所指示位置作为置换的候选者的原理如下。

[0480] I2V为Chothia标准残基的回复突变。

[0481] Q45R为向IGKV2-30\*02种系残基的突变。Q在此位置在人中罕见。R在此位置是常见的。

[0482] hu18C5-VL\_v1:将18C5-VL的CDR-L1、L2和L3环移植到CreneFab的框架上(5VZY-VL)。

[0483] hu18C5-VL\_v2:在定义Chothia标准类的关键位置、作为微调区的一部分的位置或位于VH/VL结构域界面的位置复原所有框架置换;hu18C5-VL\_v2将回复突变I2V和人受体并入种系突变Q45R,以使得能够评估这些位置对抗原结合亲和力和免疫原性的贡献。

[0484] 轻链可变区:

[0485] hu18C5-VL\_1(SEQ ID N0:91)

DIVMTQSPSLPVTTPGEPASISCRSSQSIVDSNGNTYLEWYLQ

[0486] KPGQSPQLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG

VYYCFQGS HVPLTFGQGTKVEIK

[0487] hu18C5-VL\_2(SEQ ID N0:92)

[0488] DVVMTQSPSLPVTTPGEPASISCRSSQSIVDSNGNTYLEWYLQ

KPGQSPRLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG

[0489] VYYCFQGS HVPLTFGQGTKVEIK

[0490] 用于在重链可变区中选择表7中所指示位置作为置换的候选者的原理如下。

[0491] V37A:为微调区中的回复突变。Val示出与Trp47的排斥相互作用。

[0492] L45Q:为每个Chothia核心界面残基的回复突变。在此位置的Leu具有排斥范德瓦耳斯相互作用。

[0493] L47W:为界面残基的回复突变。在鼠18C5中,Trp在47位置并且Trp与Ser 35形成氢键,从而稳定链内β折叠。Leu不建立与任何残基的任何界面,并且可使构象不稳定。

[0494] V48I:为CDR相互作用的微调区残基的回复突变,以保持此相互作用。

[0495] A49G:为微调区残基的回复突变。

[0496] S94R:为微调区残基的回复突变,以保持CDR相互作用。

[0497] hu18C5-VH\_v1:将18C5-VH的CDR-H1、H2和H3环移植到CreneFab VH的框架上(5VZY-VH)。

[0498] Hu18C5-VH\_v2:在定义Chothia标准类的关键位置、作为微调区的一部分的位置或位于VH/VL结构域界面的位置复原所有框架置换。18C5-VH\_v2并入回复突变V37A、L45Q、L47W、V48I、A49G和S94R,以使得能够评估这些位置对抗原结合亲和力和免疫原性的贡献。

[0499] 重链可变区:

[0500] hu18C5-VH\_1(SEQ ID N0:85)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFD FSRFWMSWVRQAP

[0501] KGKLELVAEINPGSSTIN YTPSLKDRFTISRDN AKNSLYLQMNSLR

AEDTAVYYCASLGYGNYGWALDYWGQGT TTVTVSS

[0502] hu18C5-VH\_2(SEQ ID N0:86)

- EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDSSRFWMSWARQAP
- [0503] GKGEWIGEINPGSSTINYTPSLKDRFTISRDNKNSLYLQMNSLR  
AEDTAVYYCARLGYGNYGWALDYWGQGTTVTVSS
- [0504] 序列表:
- [0505] SEQ ID NO:1
- [0506] 具有信号肽的18C5 VH氨基酸序列
- MDFGLIFFIVALLKGVQCEVKLLESGGGLVQPGGSLNLSCVA
- [0507] SGFDSSRFWMSWARQAPGRGQEWIGEINPGSSTINYTPSLKDKFII  
SRDNKNTLFLQMSKVRSEDSALYYCARLGYGNYGWALDYWG  
QGTSVTVSS
- [0508] SEQ ID NO:2
- [0509] 编码具有信号肽的小鼠18C5 VH的核苷酸序列
- ATGGATTTTGGGCTGATTTTTTTCATTGTTGCCCTTTTAAA
- AGGGGTCCAGTGTGAGGTAAAGCTTCTCGAGTCTGGAGGTGGC
- CTGGTGCAGCCTGGAGGATCCCTGAATCTCTCCTGTGTAGCCTC
- AGGATTCGATTTTAGTAGATTCTGGATGAGTTGGGCTCGGCAG
- [0510] GCTCCAGGGAGAGGACAGGAATGGATTGGAGAGATTAATCCA  
GGAAGCAGTACGATAAACTATACGCCATCTCTGAAGGATAAAT  
TCATCATCTCCAGAGACAACGCCAAAATACGCTGTTCCCTGCA  
AATGAGCAAAGTGAGATCTGAGGACTCAGCCCTTTATTACTGT  
GCAAGACTGGGGTATGGTAACTACGGATGGGCTCTGGACTACT  
GGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA
- [0511] SEQ ID NO:3
- [0512] 具有信号肽的18C5 VL氨基酸序列
- MKLPVRLLVLMFWIPASRSDVLMQTPLSLPVS LGDQASISC
- [0513] RSSQSIVDSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVS NRFSGVPDRFSG  
SGSGTDFTLKISRVEAEDLGIYYCFQGSHVPLTFGAGTKLELK
- [0514] SEQ ID NO:4
- [0515] 编码具有信号肽的小鼠18C5 VL的核苷酸序列

- ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGAT  
TCCTGCTTCCAGAAGTGATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCT  
CCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGA  
TCTAGTCAGAGCATTGTAGATAGTAATGGAAACACCTATTTAG  
[0516] AATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGAT  
CTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTC  
AGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCA  
GAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAATTTATTACTGCTTTCAAGG  
TTCACATGTTCCGCTCACGTTCCGGTGCTGGGACCAAGTTGGAG  
CTGAAA
- [0517] SEQ ID NO:5  
[0518] 18C5 CDR-H1的氨基酸序列  
[0519] **GFDFSRFWMS**
- [0520] SEQ ID NO:6  
[0521] 编码18C5 CDR-H1的核酸序列  
[0522] **GGATTCGATTTTAGTAGATTCTGGATGAGT**
- [0523] SEQ ID NO:7  
[0524] 18C5 CDR-H2的氨基酸序列  
[0525] **EINPGSSTINYTPSLKD**
- [0526] SEQ ID NO:8  
[0527] 编码18C5 CDR-H2的核酸序列  
[0528] **GAGATTAATCCAGGAAGCAGTACGATAAACTATAACGCCAT  
CTCTGAAGGAT**
- [0529] SEQ ID NO:9  
[0530] 18C5 CDR-H3的氨基酸序列  
[0531] **LGYGNYGWALDY**
- [0532] SEQ ID NO:10  
[0533] 编码18C5 CDR-H3的核酸序列  
[0534] **CTGGGGTATGGTAACTACGGATGGGCTCTGGACTAC**
- [0535] SEQ ID NO:11  
[0536] 18C5 CDR-L1的氨基酸序列  
[0537] **RSSQSIVDSNGNTYLE**
- [0538] SEQ ID NO:12  
[0539] 编码18C5 CDR-L1的核酸序列  
[0540] **AGATCTAGTCAGAGCATTGTAGATAGTAATGGAAACACCT  
ATTTAGAA**



- [0541] SEQ ID NO:13
- [0542] 18C5 CDR-L2的氨基酸序列
- [0543] **KVSNRFS**
- [0544] SEQ ID NO:14
- [0545] 编码18C5 CDR-L2的核酸序列
- [0546] **AAAGTTTCCAACCGATTTTCT**
- [0547] SEQ ID NO:15
- [0548] 18C5 CDR-L3的氨基酸序列
- [0549] **FQGS HVPLT**
- [0550] SEQ ID NO:16
- [0551] 编码18C5 CDR-L3的核酸序列
- [0552] **TTTCAAGGTTACATGTTCCGCTCACG**
- [0553] SEQ ID NO:17
- [0554] 嵌合18C5重链恒定区(人IgG1)的氨基酸序列
- ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN**  
**SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK**  
**PSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL**  
**MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ**
- [0555] **YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA**  
**KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN**  
**GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM**  
**HEALHNHYTQKSLSLSPGK**
- [0556] SEQ ID NO:18
- [0557] 编码嵌合18C5重链恒定区(人IgG1)的核酸

GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTC  
CTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTG  
GTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCGTGGA  
ACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACACCTTCCCGGCTGTCCT  
ACAGTCCTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTG  
CCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGA  
ATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGC  
CCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCAGC  
ACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAA  
AACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTAC  
ATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAA  
GTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG  
[0558] ACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTG  
GTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCA  
AGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCC  
CATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGA  
ACCACAGGTGTACACGCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACC  
AAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATC  
CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG  
AGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGG  
CTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGG  
TGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGG  
CTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCC  
GGGTAAATGA

[0559] SEQ ID NO:19

[0560] 嵌合18C5轻链恒定区(人κ)的氨基酸序列

[0561] RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK  
VDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYA

[0562] CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0563] SEQ ID NO:20

[0564] 编码嵌合18C5轻链恒定区(人κ)的氨基酸序列的核酸序列

[0565] CGGGGAAGTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCC  
ATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGC  
CTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGA  
AGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGT  
CACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAG  
CACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGT  
CTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTC  
ACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

[0566] SEQ ID NO:21

[0567] 示例性IgG1重链恒定区的氨基酸序列

[0568] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN  
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK  
PSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL  
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNVKTKPREEQ  
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA  
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN  
GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM  
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0569] SEQ ID NO:22

[0570] 示例性IgG1 G1m3重链恒定区的氨基酸序列

[0571] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN  
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK  
PSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL  
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ  
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA  
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN  
GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM  
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0573] SEQ ID NO:23

[0574] 示例性IgG1 G1m3重链恒定区的氨基酸序列

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN  
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK  
PSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL  
[0575] MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ  
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA  
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN  
GQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM  
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0576] SEQ ID NO:24

[0577] 具有N端精氨酸的示例性轻链恒定区的氨基酸序列

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK  
[0578] VDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYA  
CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0579] SEQ ID NO:25

[0580] 没有N端精氨酸的示例性轻链恒定区的氨基酸序列

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV  
DNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACE  
VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0581] SEQ ID NO:26

[0582] 登录号P02766.1(UniProt)中列出的人甲状腺素运载蛋白的氨基酸序列

MASHRLLLCLAGLVFVSEAGPTGTGESKCPLMVKVLDAVR  
[0583] GSPAINVAVHVFRKAADDTWEPFASGKTSESGELHGLTTEEEFVE  
GIYKVEIDTKSYWKALGISPFHEHAEVVFTANDSGPRRYTIAALLS  
PYSYSTTAVVTNPKE

[0584] SEQ ID NO:27

[0585] 登录号AAB35639.1(GenBank)中列出的人甲状腺素运载蛋白的氨基酸序列

GPTGTGESKCPLMVKVLDAVRGSPAINVAVHVFRKAADDT  
[0586] WEPFASGKTSESGELHGLTTEEQFVEGIYKVEIDTKSYWKALGISP  
FHEHAEVVFTANDSGPRRYTIAALLSPYSYSTTAVVTNPKE

[0587] SEQ ID NO:28

[0588] 登录号AAB35640.1(GenBank)中列出的人甲状腺素运载蛋白的氨基酸序列

GPTGTGESKCPLMVKVLDAVRGSPAINVAVHVFRKAADDT  
[0589] WEPFASGKTSESGELHGLTTEEQFVEGIYKVEIDTKSYWKALGISP  
FHEHAEVVFTANDSGPRRYTIAALLSPYSYSTTAVVTNPKE

[0590] SEQ ID NO:29

- [0591] 登录号和ABI63351.1 (GenBank)中列出的人甲状腺素运载蛋白的氨基酸序列  
MASHRLLLCLAGLVFVSEAGPTGTGESKCPMLVKVLDVR
- [0592] GSPAINVAVHVFRKAADDTWEPFASGKTSESGELHGLTTEEEFVE  
GIYKVEIDTKSYWKALGISPFHEHAEVVFTANDSGPRRYSYSTTA  
VVTNPKE
- [0593] SEQ ID NO:30
- [0594] 人甲状腺素运载蛋白的残基101-109的氨基酸序列
- [0595] GPRRYTIAA
- [0596] SEQ ID NO:31
- [0597] 人甲状腺素运载蛋白的残基87-127的氨基酸序列
- [0598] FHEHAEVVFTANDSGPRRYTIAALLSPYSYSTTAVVTNPKE
- [0599] SEQ ID NO:32
- [0600] 编码示例性IgG1 G1m3重链恒定区的核酸序列  
GCCTCCACCAAGGGTCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTC  
CTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTG  
GTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACT  
CAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCT  
ACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTG  
[0601] CCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGA  
ATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGC  
CCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCAGC  
ACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCCAA  
AACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAC

ATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAA  
GTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG  
ACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTG  
GTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCA  
AGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCC  
CATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGA  
[0602] ACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACC  
AAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATC  
CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG  
AGAACA ACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGG  
CTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGG  
TGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGG  
CTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCC  
GGGTAAA

[0603] SEQ ID NO:33

[0604] 编码具有N端精氨酸的示例性轻链恒定区的核酸序列

CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATC  
TGATGAGCAGTTGAAATCTGGA ACTGCCTCTGTTGTGTGCCTG  
CTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGG  
[0605] TGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCAC  
AGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCAC  
CCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTA  
CGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACA  
AAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

[0606] SEQ ID NO:34

[0607] 编码没有N端精氨酸的示例性轻链恒定区的核酸序列

ACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGA  
TGAGCAGTTGAAATCTGGA ACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTG  
AATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTG  
[0608] GATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAG  
AGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCC  
TGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACG  
CCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAA  
GAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

- [0609] SEQ ID NO:35
- [0610] 重链恒定区信号肽的氨基酸序列
- [0611] **MNFGLSLIFLVLVLKGVQC**
- [0612] SEQ ID NO:36
- [0613] 编码重链恒定区信号肽的核酸序列
- [0614] **ATGAACTTTGGGCTCAGCTTGATTTTCCTTGTCCTTGTTTTA  
AAAGGTGTCCAGTGT**
- [0615] SEQ ID NO:37
- [0616] 轻链恒定区信号肽的氨基酸序列
- [0617] **MESHTQVFVFLWLSGVDG**
- [0618] SEQ ID NO:38
- [0619] 编码轻链恒定区信号肽的核酸序列
- [0620] **ATGGAGTCACATACTCAGGTCTTTGTATTCGTGTTTCTCTG  
GTTGTCTGGTGTGACGGA**
- [0621] SEQ ID NO:39
- [0622] 14G8的Kabat CDR-H1的氨基酸序列
- [0623] **SYTMS**
- [0624] SEQ ID NO:40
- [0625] 14G8的Kabat CDR-H2的氨基酸序列
- [0626] **EINNSGDTTYYPDTVKG**
- [0627] SEQ ID NO:41
- [0628] 14G8的Kabat CDR-H3的氨基酸序列
- [0629] **HYYYGGGYGGWFFDV**
- [0630] SEQ ID NO:42
- [0631] 14G8的Kabat CDR-L1的氨基酸序列
- [0632] **RSNKSLLSNGNTYLY**
- [0633] SEQ ID NO:43
- [0634] 14G8的Kabat CDR-L2的氨基酸序列
- [0635] **RVSNLAS**
- [0636] SEQ ID NO:44
- [0637] 14G8的Kabat CDR-L3的氨基酸序列
- [0638] **MQHLEYPLT**
- [0639] SEQ ID NO:45
- [0640] 5A1的表位
- [0641] **EHAEVVFTA**
- [0642] SEQ ID NO:46

- [0643] 5A1的Kabat CDR-H1的氨基酸序列  
[0644] **NYAMS**  
[0645] SEQ ID NO:47  
[0646] 5A1的Kabat CDR-H2的氨基酸序列  
[0647] **SISSGGSTYYPDSVKG**  
[0648] SEQ ID NO:48  
[0649] 5A1的Kabat CDR-H3的氨基酸序列  
[0650] **YYYGQYFDF**  
[0651] SEQ ID NO:49  
[0652] 5A1的Kabat CDR-L1的氨基酸序列  
[0653] **KASQDVSTTVA**  
[0654] SEQ ID NO:50  
[0655] 5A1的Kabat CDR-L2的氨基酸序列  
[0656] **SASYRCT**  
[0657] SEQ ID NO:51  
[0658] 5A1的Kabat CDR-L3的氨基酸序列  
[0659] **QQHYSTPLT**  
[0660] SEQ ID NO:52  
[0661] 6C1的Kabat CDR-H1的氨基酸序列  
[0662] **NYYMS**  
[0663] SEQ ID NO:53  
[0664] 6C1的Kabat CDR-H2的氨基酸序列  
[0665] **YISIDGNNIYHPDSVKG**  
[0666] SEQ ID NO:54  
[0667] 6C1的Kabat CDR-H3的氨基酸序列  
[0668] **DSDYGYFDV**  
[0669] SEQ ID NO:55  
[0670] 6C1的Kabat CDR-L1的氨基酸序列  
[0671] **RSSQSIVHSNGNTYLE**  
[0672] SEQ ID NO:56  
[0673] 6C1的Kabat CDR-L2的氨基酸序列  
[0674] **KVSKRFS**  
[0675] SEQ ID NO:57  
[0676] 6C1的Kabat CDR-L3的氨基酸序列  
[0677] **FQGSHVPLT**  
[0678] SEQ ID NO:58



- [0679] AD7F6的VH区的氨基酸序列  
EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSAASGFTFSNYGMSWIRQTPD  
KRLEWVATISSSGTYTYTESVKGRFTVSRDNAKNTLSLQMSNLK  
SDDTAMYYCTRQAYGREYFDVWGTGTTVTVSSAKTTPPSVYPLA  
PGCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPESVTVTWNSGSLSSSVHTFPALL  
QSGLYTMSSSVTVPSSTWPSQTVTCSVAHPASSTTVDKKLEPSGPI
- [0680] STINPCPPCKECHKCPAPNLEGGPSVFIFPPNIKDVLMISLTPKVTC  
VVVDVSEDDPDVRISWVFNVEVHTAQTQTHREDYNSTIRVVSA  
LPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPSPIERTISKIKGLVRAPQVYIL  
PPPAEQLSRKDVSLTCLVVGFNPGDISVEWTSNGHTEENYKDTAP  
VLDSDGSYFIYSKLDIKTSTVGENRFLMQRETRGSEKLLPEEDHL  
PSPGK
- [0681] SEQ ID NO:59
- [0682] AD7F6的VL区的氨基酸序列  
DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLFDSRTRKNYLAWY  
QQKPGQSPKLLIYWASNRESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAED
- [0683] LAVYFCKQSNYLRTFGGGTRVEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGG  
ASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTY  
SMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
- [0684] SEQ ID NO:60
- [0685] RT24的CDR-H1的氨基酸序列
- [0686] **RYWIT**
- [0687] SEQ ID NO:61
- [0688] RT24的CDR-H2的氨基酸序列
- [0689] **DIYPGSGRTNYNEKFKN**
- [0690] SEQ ID NO:62
- [0691] RT24的CDR-H3的氨基酸序列
- [0692] **YYGSTYFYV**
- [0693] SEQ ID NO:63
- [0694] RT24的CDR-L1的氨基酸序列
- [0695] **RSSKSLLYKDGKTYLN**
- [0696] SEQ ID NO:64
- [0697] RT24的CDR-L2的氨基酸序列
- [0698] **LMSTRAS**
- [0699] SEQ ID NO:65
- [0700] RT24的CDR-L3的氨基酸序列

- [0701] **QQLVEYPRT**
- [0702] SEQ ID NO:66
- [0703] NI-301.35G11的CDR-H1的氨基酸序列
- [0704] **SYAMS**
- [0705] SEQ ID NO:67
- [0706] NI-301.35G11的CDR-H2的氨基酸序列
- [0707] **SISGSGDTTKYTDSVKG**
- [0708] SEQ ID NO:68
- [0709] NI-301.35G11的CDR-H3的氨基酸序列
- [0710] **DGSGRIDPFAL**
- [0711] SEQ ID NO:69
- [0712] NI-301.35G11的CDR-L1的氨基酸序列
- [0713] **RSSRSLVYSDGNIYLN**
- [0714] SEQ ID NO:70
- [0715] NI-301.35G11的CDR-L2的氨基酸序列
- [0716] **KVSNRDSG**
- [0717] SEQ ID NO:71
- [0718] NI-301.35G11的CDR-L3的氨基酸序列
- [0719] **MQGTHWPRT**
- [0720] SEQ ID NO:72
- [0721] MFD101、MDF102、MFD103、MFD105的表位
- [0722] **ADDTWEPFASGKT**
- [0723] SEQ ID NO:73
- [0724] MFD107、MFD108、MFD109、MFD111的表位
- [0725] **TSESGELHGLTTE**
- [0726] SEQ ID NO:74
- [0727] MFD114的表位
- [0728] **ALLSPYSYSTTAV**
- [0729] SEQ ID NO:75
- [0730] 抗体9D5的Kabat CDR-H1的氨基酸序列
- [0731] **SYTMS**
- [0732] SEQ ID NO:76
- [0733] 抗体9D5的Kabat CDR-H2的氨基酸序列
- [0734] **EISNSGDTTYYPDTVKG**
- [0735] SEQ ID NO:77
- [0736] 抗体9D5的Kabat CDR-H3的氨基酸序列
- [0737] **HYYYGGGYGGWFFDV**

- [0738] SEQ ID NO:78
- [0739] 抗体9D5的Kabat CDR-L1的氨基酸序列
- [0740] **RSSKSLLSNGNTYLY**
- [0741] SEQ ID NO:79
- [0742] 抗体9D5的Kabat CDR-L2的氨基酸序列
- [0743] **RVSNLAS**
- [0744] SEQ ID NO:80
- [0745] 抗体9D5的Kabat CDR-L3的氨基酸序列
- [0746] **MQHLEYPLT**
- [0747] SEQ ID NO:81
- [0748] 小鼠18C5抗体的成熟重链可变区的氨基酸序列
- EVKLLESGGGLVQPGGSLNLSCVASGFDFSRFWMSWARQAP**
- [0749] **GRGQEWIGEINPGSSTINYTPSLKDKFIISRDNAKNTLFLQMSKVRS**  
**EDSALYYCARLGYGNYGWALDYWGQGTSVTVSS**
- [0750] SEQ ID NO:82
- [0751] 鼠抗焦谷氨酸A $\beta$ 抗体Fab c#17的重链可变区的氨基酸序列
- EVKLVESGGGLVQPGGSRKLSAASGFTFSDYGMAWVRQAP**
- [0752] **GKGPEWVAFISNLAYSIIYADTVTGRFTISRENAKNTLYLEMSSL**  
**RSEDTAMYYCARYDYDNILDYVMDYWGQGTSVTVSS**
- [0753] SEQ ID NO:83
- [0754] 人源化Crenezumab Fab (CreneFab) PDB:5VZY的重链可变区的氨基酸序列
- EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSAAASGFTFSSYGMSWVRQAP**
- [0755] **GKGLELVAASINSNGGSTIYPDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL**  
**RAEDTAVYYCASGDYWGQGTTLTVTVSS**
- [0756] SEQ ID NO:84
- [0757] 人种系序列IGHV3-48\*01的重链可变区的氨基酸序列
- EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSAAASGFTFSSYSMNWVRQAP**
- [0758] **GKGLEWVSYISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR**  
**AEDTAVYYCARYFDYWGQGTTLTVTVSS**
- [0759] **AEDTAVYYCARYFDYWGQGTTLTVTVSS**
- [0760] SEQ ID NO:85
- [0761] 人源化18C5抗体hu18C5-VH\_1的重链可变区的氨基酸序列
- EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSAAASGFDFSRFWMSWVRQAP**
- [0762] **GKGLELVAEINPGSSTINYTPSLKDRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR**  
**AEDTAVYYCASLGYGNYGWALDYWGQGTTLTVTVSS**
- [0763] SEQ ID NO:86
- [0764] 人源化18C5抗体hu18C5-VH\_2的重链可变区的氨基酸序列

- EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDLRSRWMSWARQAP
- [0765] GKGQEWIGEINPGSSTINYTPSLKDRFTISRDNKNSLYLQMNSLR  
AEDTAVYYCARLGYGNYGWALDYWGQGTTVTVSS
- [0766] SEQ ID NO:87
- [0767] 小鼠18C5抗体的成熟轻链可变区的氨基酸序列
- DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIIVDSNGNTYLEWYL
- [0768] QKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDL  
GIYYCFQGSHVPLTFGAGTKLELK
- [0769] SEQ ID NO:88
- [0770] 鼠抗焦谷氨酸A $\beta$ 抗体Fab c#17的轻链可变区的氨基酸序列
- DVVMVTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSDGNTYLHWYL
- [0771] QKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDL  
GVYFCSQSTHVPPTFGGGTKLEIK
- [0772] SEQ ID NO:89
- [0773] 人源化Crenezumab Fab (CreneFab) PDB:5VZY的轻链可变区的氨基酸序列
- DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVYSNGDNTYLHWYLQ
- [0774] KPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG  
VYYCSQSTHVPWTFGQGTKVEIK
- [0775] SEQ ID NO:90
- [0776] 人种系序列IGKV2-30\*2的轻链可变区的氨基酸序列
- DVVMVTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLNWFQ
- [0777] QRPQGSPRLLIYKVSNRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV  
GVYYCMQGTHTWPWTFGQGTKVEIK
- [0778] SEQ ID NO:91
- [0779] 人源化18C5抗体hu18C5-VL\_1的轻链可变区的氨基酸序列
- DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSIIVDSNGNTYLEWYLQ
- [0780] KPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG  
VYYCFQGSHVPLTFGQGTKVEIK
- [0781] SEQ ID NO:92
- [0782] 人源化18C5抗体hu18C5-VL\_2的轻链可变区的氨基酸序列
- DVVMVTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSIIVDSNGNTYLEWYLQ
- [0783] KPGQSPRLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG  
VYYCFQGSHVPLTFGQGTKVEIK
- [0784] SEQ ID NO:93
- [0785] 小鼠18C5抗体的Kabat CDR-H1的氨基酸序列

- [0786] **RFWMS**
- [0787] SEQ ID NO:94
- [0788] 小鼠18C5抗体的Chothia CDR-H1的氨基酸序列
- [0789] **GFDFSRF**
- [0790] SEQ ID NO:95
- [0791] 小鼠18C5抗体的Contact CDR-H1的氨基酸序列
- [0792] **SRFWMS**
- [0793] SEQ ID NO:96
- [0794] 小鼠18C5抗体的Chothia CDR-H2的氨基酸序列
- [0795] **NPGSST**
- [0796] SEQ ID NO:97
- [0797] 小鼠18C5抗体的AbM CDR-H2的氨基酸序列
- [0798] **EINPGSSTIN**
- [0799] SEQ ID NO:98
- [0800] 小鼠18C5抗体的Contact CDR-H2的氨基酸序列
- [0801] **WIGEINPGSSTIN**
- [0802] SEQ ID NO:99
- [0803] 小鼠18C5抗体的Contact CDR-H3的氨基酸序列
- [0804] **ARLGYGNYGWALD**
- [0805] SEQ ID NO:100
- [0806] 小鼠18C5抗体的Contact CDR-L1的氨基酸序列
- [0807] **NTYLEWY**
- [0808] SEQ ID NO:101
- [0809] 小鼠18C5抗体的Contact CDR-L2的氨基酸序列
- [0810] **LLIYKVS NRF**
- [0811] SEQ ID NO:102
- [0812] 小鼠18C5抗体的Contact CDR-L3的氨基酸序列
- [0813] **FQGS HVPL**

[0001] 序列表  
 [0002] <110> 普罗塞纳生物科学有限公司 (PROTHENA BIOSCIENCES, INC.)  
 [0003] 萨尔曼·约书亚·R (SALMANS, JOSHUA R.)  
 [0004] 亚历山大·斯维特拉娜 (ALEXANDER, SVETLANA)  
 [0005] 巴伯尔·罗宾 (BARBOUR, ROBIN)  
 [0006] 桧垣·杰弗里·N (HIGAKI, JEFFREY N.)  
 [0007] 尼贾尔·塔罗陈 (NIJJAR, TARLOCHAN)  
 [0008] <120> 抗甲状腺素运载蛋白抗体  
 [0009] <130> 057450-516711  
 [0010] <150> US 62/569,436  
 [0011] <151> 2017-10-06  
 [0012] <150> US 62/598,965  
 [0013] <151> 2017-12-14  
 [0014] <160> 102  
 [0015] <170> PatentIn version 3.5  
 [0016] <210> 1  
 [0017] <211> 139  
 [0018] <212> PRT  
 [0019] <213> 人工序列 (Artificial sequence)  
 [0020] <220>  
 [0021] <223> 合成的  
 [0022] <400> 1  
 [0023] Met Asp Phe Gly Leu Ile Phe Phe Ile Val Ala Leu Leu Lys Gly Val  
 [0024] 1 5 10 15  
 [0025] Gln Cys Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro  
 [0026] 20 25 30  
 [0027] Gly Gly Ser Leu Asn Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser  
 [0028] 35 40 45  
 [0029] Arg Phe Trp Met Ser Trp Ala Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Gln Glu  
 [0030] 50 55 60  
 [0031] Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Gly Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro  
 [0032] 65 70 75 80  
 [0033] Ser Leu Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr  
 [0034] 85 90 95  
 [0035] Leu Phe Leu Gln Met Ser Lys Val Arg Ser Glu Asp Ser Ala Leu Tyr  
 [0036] 100 105 110  
 [0037] Tyr Cys Ala Arg Leu Gly Tyr Gly Asn Tyr Gly Trp Ala Leu Asp Tyr  
 [0038] 115 120 125

[0039] Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 [0040] 130 135  
 [0041] <210> 2  
 [0042] <211> 417  
 [0043] <212> DNA  
 [0044] <213> 人工序列(Artificial sequence)  
 [0045] <220>  
 [0046] <223> 合成的  
 [0047] <400> 2  
 [0048] atggattttg ggctgatttt ttccattggt gcccttttaa aaggggtcca gtgtgaggta 60  
 [0049] aagcttctcg agtctggagg tggcctgggt cagcctggag gatccctgaa tctctcctgt 120  
 [0050] gtagcctcag gattcgattt tagtagattc tggatgagtt gggctcggca ggctccaggg 180  
 [0051] agaggacagg aatggattgg agagattaat ccaggaagca gtacgataaa ctatacgcca 240  
 [0052] tctctgaagg ataaattcat catctccaga gacaacgcca aaaatacgt gttcctgcaa 300  
 [0053] atgagcaaag tgagatctga ggactcagcc ctttattact gtgcaagact ggggtatggt 360  
 [0054] aactacggat gggctctgga ctactggggt caaggaacct cagtcaccgt ctctca 417  
 [0055] <210> 3  
 [0056] <211> 131  
 [0057] <212> PRT  
 [0058] <213> 人工序列(Artificial sequence)  
 [0059] <220>  
 [0060] <223> 合成的  
 [0061] <400> 3  
 [0062] Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala  
 [0063] 1 5 10 15  
 [0064] Ser Arg Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val  
 [0065] 20 25 30  
 [0066] Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile  
 [0067] 35 40 45  
 [0068] Val Asp Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro  
 [0069] 50 55 60  
 [0070] Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser  
 [0071] 65 70 75 80  
 [0072] Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 [0073] 85 90 95  
 [0074] Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys  
 [0075] 100 105 110  
 [0076] Phe Gln Gly Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu  
 [0077] 115 120 125

- [0078] Glu Leu Lys  
 [0079] 130  
 [0080] <210> 4  
 [0081] <211> 393  
 [0082] <212> DNA  
 [0083] <213> 人工序列(Artificial sequence)  
 [0084] <220>  
 [0085] <223> 合成的  
 [0086] <400> 4  
 [0087] atgaagttgc ctgtaggct gttggtgctg atgttctgga ttctgcttc cagaagtgat 60  
 [0088] gttttgatga cccaaactcc actctccctg cctgtcagtc ttggagatca agcctccatc 120  
 [0089] tcttgcagat ctagtccagag cattgtagat agtaatggaa acacctattht agaatggtac 180  
 [0090] ctgcagaaac caggccagtc tccaaagctc ctgatctaca aagtttccaa ccgattttct 240  
 [0091] ggggtcccag acaggttcag tggcagtgga tcaggacag atttcacact caagatcagc 300  
 [0092] agagtggagg ctgaggatct gggaatttat tactgctttc aagttcaca tgttccgctc 360  
 [0093] acgttcggtg ctgggaccaa gttggagctg aaa 393  
 [0094] <210> 5  
 [0095] <211> 10  
 [0096] <212> PRT  
 [0097] <213> 人工序列(Artificial sequence)  
 [0098] <220>  
 [0099] <223> 合成的  
 [0100] <400> 5  
 [0101] Gly Phe Asp Phe Ser Arg Phe Trp Met Ser  
 [0102] 1 5 10  
 [0103] <210> 6  
 [0104] <211> 30  
 [0105] <212> DNA  
 [0106] <213> 人工序列(Artificial sequence)  
 [0107] <220>  
 [0108] <223> 合成的  
 [0109] <400> 6  
 [0110] ggattcagatt ttagtagatt ctggatgagt 30  
 [0111] <210> 7  
 [0112] <211> 17  
 [0113] <212> PRT  
 [0114] <213> 人工序列(Artificial sequence)  
 [0115] <220>  
 [0116] <223> 合成的



[0117]	<400> 7
[0118]	Glu Ile Asn Pro Gly Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Leu Lys
[0119]	1                      5                      10                      15
[0120]	Asp
[0121]	<210> 8
[0122]	<211> 51
[0123]	<212> DNA
[0124]	<213> 人工序列(Artificial sequence)
[0125]	<220>
[0126]	<223> 合成的
[0127]	<400> 8
[0128]	gagattaatc caggaagcag tacgataaac tatacgccat ctctgaagga t 51
[0129]	<210> 9
[0130]	<211> 12
[0131]	<212> PRT
[0132]	<213> 人工序列(Artificial sequence)
[0133]	<220>
[0134]	<223> 合成的
[0135]	<400> 9
[0136]	Leu Gly Tyr Gly Asn Tyr Gly Trp Ala Leu Asp Tyr
[0137]	1                      5                      10
[0138]	<210> 10
[0139]	<211> 36
[0140]	<212> DNA
[0141]	<213> 人工序列(Artificial sequence)
[0142]	<220>
[0143]	<223> 合成的
[0144]	<400> 10
[0145]	ctggggtatg gtaactacgg atgggctctg gactac 36
[0146]	<210> 11
[0147]	<211> 16
[0148]	<212> PRT
[0149]	<213> 人工序列(Artificial sequence)
[0150]	<220>
[0151]	<223> 合成的
[0152]	<400> 11
[0153]	Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Asp Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
[0154]	1                      5                      10                      15
[0155]	<210> 12

- [0156] <211> 48  
[0157] <212> DNA  
[0158] <213> 人工序列(Artificial sequence)  
[0159] <220>  
[0160] <223> 合成的  
[0161] <400> 12  
[0162] agatctagtc agagcattgt agatagtaat ggaaacacct atttagaa 48  
[0163] <210> 13  
[0164] <211> 7  
[0165] <212> PRT  
[0166] <213> 人工序列(Artificial sequence)  
[0167] <220>  
[0168] <223> 合成的  
[0169] <400> 13  
[0170] Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser  
[0171] 1                    5  
[0172] <210> 14  
[0173] <211> 21  
[0174] <212> DNA  
[0175] <213> 人工序列(Artificial sequence)  
[0176] <220>  
[0177] <223> 合成的  
[0178] <400> 14  
[0179] aaagtttcca accgattttc t 21  
[0180] <210> 15  
[0181] <211> 9  
[0182] <212> PRT  
[0183] <213> 人工序列(Artificial sequence)  
[0184] <220>  
[0185] <223> 合成的  
[0186] <400> 15  
[0187] Phe Gln Gly Ser His Val Pro Leu Thr  
[0188] 1                    5  
[0189] <210> 16  
[0190] <211> 27  
[0191] <212> DNA  
[0192] <213> 人工序列(Artificial sequence)  
[0193] <220>  
[0194] <223> 合成的

[0195]	<400>	16
[0196]	tttcaaggtt cacatgttcc gctcacg	27
[0197]	<210>	17
[0198]	<211>	330
[0199]	<212>	PRT
[0200]	<213>	人工序列(Artificial sequence)
[0201]	<220>	
[0202]	<223>	合成的
[0203]	<400>	17
[0204]	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys	
[0205]	1	5 10 15
[0206]	Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr	
[0207]		20 25 30
[0208]	Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser	
[0209]		35 40 45
[0210]	Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser	
[0211]		50 55 60
[0212]	Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr	
[0213]		65 70 75 80
[0214]	Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys	
[0215]		85 90 95
[0216]	Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys	
[0217]		100 105 110
[0218]	Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro	
[0219]		115 120 125
[0220]	Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys	
[0221]		130 135 140
[0222]	Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp	
[0223]		145 150 155 160
[0224]	Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu	
[0225]		165 170 175
[0226]	Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu	
[0227]		180 185 190
[0228]	His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn	
[0229]		195 200 205
[0230]	Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly	
[0231]		210 215 220
[0232]	Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu	
[0233]		225 230 235 240

[0234]	Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
[0235]	245                                  250                                  255
[0236]	Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
[0237]	260                                  265                                  270
[0238]	Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
[0239]	275                                  280                                  285
[0240]	Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
[0241]	290                                  295                                  300
[0242]	Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
[0243]	305                                  310                                  315                                  320
[0244]	Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
[0245]	325                                  330
[0246]	<210> 18
[0247]	<211> 993
[0248]	<212> DNA
[0249]	<213> 人工序列(Artificial sequence)
[0250]	<220>
[0251]	<223> 合成的
[0252]	<400> 18
[0253]	gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60
[0254]	ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgtcg 120
[0255]	tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtctctca 180
[0256]	ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 240
[0257]	tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc 300
[0258]	aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgccag cacctgaact cctgggggga 360
[0259]	ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaacc aaggacacc tcattgatctc ccggaccct 420
[0260]	gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480
[0261]	tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 540
[0262]	agcacgtacc gtgtggtcag cgctctcacc gtctctgacc aggactggct gaatggcaag 600
[0263]	gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 660
[0264]	aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacacgc tgccccatc ccgggaggag 720
[0265]	atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780
[0266]	gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 840
[0267]	ctggactccg acggtctctt ctctctctat agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 900
[0268]	cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 960
[0269]	cagaagagcc tctccctgtc cccgggtaaa tga 993
[0270]	<210> 19
[0271]	<211> 107
[0272]	<212> PRT

- [0273] <213> 人工序列(Artificial sequence)
- [0274] <220>
- [0275] <223> 合成的
- [0276] <400> 19
- [0277] Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
- [0278] 1                   5                   10                   15
- [0279] Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
- [0280]                   20                   25                   30
- [0281] Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
- [0282]                   35                   40                   45
- [0283] Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
- [0284]                   50                   55                   60
- [0285] Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
- [0286] 65                   70                   75                   80
- [0287] Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
- [0288]                   85                   90                   95
- [0289] Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
- [0290]                   100                   105
- [0291] <210> 20
- [0292] <211> 327
- [0293] <212> DNA
- [0294] <213> 人工序列(Artificial sequence)
- [0295] <220>
- [0296] <223> 合成的
- [0297] <400> 20
- [0298] cggggaactg tggctgcacc atctgtcttc atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa 60
- [0299] tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg aataacttct atcccagaga ggccaaagta 120
- [0300] cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag 180
- [0301] gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc agcaccctga cgctgagcaa agcagactac 240
- [0302] gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca 300
- [0303] aagagcttca acaggggaga gtgttag 327
- [0304] <210> 21
- [0305] <211> 330
- [0306] <212> PRT
- [0307] <213> 人工序列(Artificial sequence)
- [0308] <220>
- [0309] <223> 合成的
- [0310] <400> 21
- [0311] Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

[0312]	1	5	10	15
[0313]	Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr			
[0314]		20	25	30
[0315]	Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser			
[0316]		35	40	45
[0317]	Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser			
[0318]		50	55	60
[0319]	Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr			
[0320]		65	70	75
[0321]	Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys			
[0322]		85	90	95
[0323]	Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys			
[0324]		100	105	110
[0325]	Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro			
[0326]		115	120	125
[0327]	Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys			
[0328]		130	135	140
[0329]	Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp			
[0330]		145	150	155
[0331]	Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Val Lys Thr Lys Pro Arg Glu			
[0332]		165	170	175
[0333]	Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu			
[0334]		180	185	190
[0335]	His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn			
[0336]		195	200	205
[0337]	Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly			
[0338]		210	215	220
[0339]	Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu			
[0340]		225	230	235
[0341]	Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr			
[0342]		245	250	255
[0343]	Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn			
[0344]		260	265	270
[0345]	Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe			
[0346]		275	280	285
[0347]	Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn			
[0348]		290	295	300
[0349]	Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr			
[0350]		305	310	315
				320

[0351]	Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
[0352]	325 330
[0353]	<210> 22
[0354]	<211> 330
[0355]	<212> PRT
[0356]	<213> 人工序列(Artificial sequence)
[0357]	<220>
[0358]	<223> 合成的
[0359]	<400> 22
[0360]	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
[0361]	1 5 10 15
[0362]	Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
[0363]	20 25 30
[0364]	Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
[0365]	35 40 45
[0366]	Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
[0367]	50 55 60
[0368]	Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
[0369]	65 70 75 80
[0370]	Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
[0371]	85 90 95
[0372]	Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
[0373]	100 105 110
[0374]	Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
[0375]	115 120 125
[0376]	Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
[0377]	130 135 140
[0378]	Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
[0379]	145 150 155 160
[0380]	Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
[0381]	165 170 175
[0382]	Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
[0383]	180 185 190
[0384]	His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
[0385]	195 200 205
[0386]	Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
[0387]	210 215 220
[0388]	Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
[0389]	225 230 235 240

[0390]	Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
[0391]	245 250 255
[0392]	Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
[0393]	260 265 270
[0394]	Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
[0395]	275 280 285
[0396]	Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
[0397]	290 295 300
[0398]	Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
[0399]	305 310 315 320
[0400]	Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
[0401]	325 330
[0402]	<210> 23
[0403]	<211> 330
[0404]	<212> PRT
[0405]	<213> 人工序列(Artificial sequence)
[0406]	<220>
[0407]	<223> 合成的
[0408]	<400> 23
[0409]	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
[0410]	1 5 10 15
[0411]	Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
[0412]	20 25 30
[0413]	Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
[0414]	35 40 45
[0415]	Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
[0416]	50 55 60
[0417]	Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
[0418]	65 70 75 80
[0419]	Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
[0420]	85 90 95
[0421]	Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
[0422]	100 105 110
[0423]	Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
[0424]	115 120 125
[0425]	Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
[0426]	130 135 140
[0427]	Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
[0428]	145 150 155 160



[0429]	Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
[0430]	165 170 175
[0431]	Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
[0432]	180 185 190
[0433]	His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
[0434]	195 200 205
[0435]	Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
[0436]	210 215 220
[0437]	Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
[0438]	225 230 235 240
[0439]	Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
[0440]	245 250 255
[0441]	Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
[0442]	260 265 270
[0443]	Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
[0444]	275 280 285
[0445]	Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
[0446]	290 295 300
[0447]	Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
[0448]	305 310 315 320
[0449]	Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
[0450]	325 330
[0451]	<210> 24
[0452]	<211> 107
[0453]	<212> PRT
[0454]	<213> 人工序列(Artificial sequence)
[0455]	<220>
[0456]	<223> 合成的
[0457]	<400> 24
[0458]	Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
[0459]	1 5 10 15
[0460]	Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
[0461]	20 25 30
[0462]	Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
[0463]	35 40 45
[0464]	Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
[0465]	50 55 60
[0466]	Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
[0467]	65 70 75 80

[0468]	Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
[0469]	85 90 95
[0470]	Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[0471]	100 105
[0472]	<210> 25
[0473]	<211> 106
[0474]	<212> PRT
[0475]	<213> 人工序列(Artificial sequence)
[0476]	<220>
[0477]	<223> 合成的
[0478]	<400> 25
[0479]	Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
[0480]	1 5 10 15
[0481]	Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
[0482]	20 25 30
[0483]	Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
[0484]	35 40 45
[0485]	Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
[0486]	50 55 60
[0487]	Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
[0488]	65 70 75 80
[0489]	His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
[0490]	85 90 95
[0491]	Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[0492]	100 105
[0493]	<210> 26
[0494]	<211> 147
[0495]	<212> PRT
[0496]	<213> 智人(Homo sapiens)
[0497]	<400> 26
[0498]	Met Ala Ser His Arg Leu Leu Leu Leu Cys Leu Ala Gly Leu Val Phe
[0499]	1 5 10 15
[0500]	Val Ser Glu Ala Gly Pro Thr Gly Thr Gly Glu Ser Lys Cys Pro Leu
[0501]	20 25 30
[0502]	Met Val Lys Val Leu Asp Ala Val Arg Gly Ser Pro Ala Ile Asn Val
[0503]	35 40 45
[0504]	Ala Val His Val Phe Arg Lys Ala Ala Asp Asp Thr Trp Glu Pro Phe
[0505]	50 55 60
[0506]	Ala Ser Gly Lys Thr Ser Glu Ser Gly Glu Leu His Gly Leu Thr Thr

[0507]	65	70	75	80
[0508]	Glu Glu Glu Phe Val	Glu Gly Ile Tyr Lys Val	Glu Ile Asp Thr Lys	
[0509]		85	90	95
[0510]	Ser Tyr Trp Lys Ala	Leu Gly Ile Ser Pro Phe	His Glu His Ala Glu	
[0511]		100	105	110
[0512]	Val Val Phe Thr Ala	Asn Asp Ser Gly Pro Arg	Arg Tyr Thr Ile Ala	
[0513]		115	120	125
[0514]	Ala Leu Leu Ser Pro	Tyr Ser Tyr Ser Thr Thr	Ala Val Val Thr Asn	
[0515]		130	135	140
[0516]	Pro Lys Glu			
[0517]	145			
[0518]	<210> 27			
[0519]	<211> 127			
[0520]	<212> PRT			
[0521]	<213> 智人(Homo sapiens)			
[0522]	<400> 27			
[0523]	Gly Pro Thr Gly Thr	Gly Glu Ser Lys Cys Pro	Leu Met Val Lys Val	
[0524]	1	5	10	15
[0525]	Leu Asp Ala Val Arg	Gly Ser Pro Ala Ile	Asn Val Ala Val His Val	
[0526]		20	25	30
[0527]	Phe Arg Lys Ala Ala	Asp Asp Thr Trp Glu Pro	Phe Ala Ser Gly Lys	
[0528]		35	40	45
[0529]	Thr Ser Glu Ser Gly	Glu Leu His Gly Leu Thr	Thr Thr Glu Glu Gln Phe	
[0530]		50	55	60
[0531]	Val Glu Gly Ile Tyr	Lys Val Glu Ile Asp Thr	Lys Ser Tyr Trp Lys	
[0532]	65	70	75	80
[0533]	Ala Leu Gly Ile Ser	Pro Phe His Glu His	Ala Glu Val Val Phe Thr	
[0534]		85	90	95
[0535]	Ala Asn Asp Ser Gly	Pro Arg Arg Tyr Thr	Ile Ala Ala Leu Leu Ser	
[0536]		100	105	110
[0537]	Pro Tyr Ser Tyr Ser	Thr Thr Ala Val Val	Thr Asn Pro Lys Glu	
[0538]		115	120	125
[0539]	<210> 28			
[0540]	<211> 127			
[0541]	<212> PRT			
[0542]	<213> 智人(Homo sapiens)			
[0543]	<400> 28			
[0544]	Gly Pro Thr Gly Thr	Gly Glu Ser Lys Cys Pro	Leu Met Val Lys Val	
[0545]	1	5	10	15

[0546]	Leu Asp Ala Val Arg Gly Ser Pro Ala Ile Asn Val Ala Val His Val
[0547]	20 25 30
[0548]	Phe Arg Lys Ala Ala Asp Asp Thr Trp Glu Pro Phe Ala Ser Gly Lys
[0549]	35 40 45
[0550]	Thr Ser Glu Ser Gly Glu Leu His Gly Leu Thr Thr Glu Glu Gln Phe
[0551]	50 55 60
[0552]	Val Glu Gly Ile Tyr Lys Val Glu Ile Asp Thr Lys Ser Tyr Trp Lys
[0553]	65 70 75 80
[0554]	Ala Leu Gly Ile Ser Pro Phe His Glu His Ala Glu Val Val Phe Thr
[0555]	85 90 95
[0556]	Ala Asn Asp Ser Gly Pro Arg Arg Tyr Thr Ile Ala Ala Leu Leu Ser
[0557]	100 105 110
[0558]	Pro Tyr Ser Tyr Ser Thr Thr Ala Val Val Thr Asn Pro Lys Glu
[0559]	115 120 125
[0560]	<210> 29
[0561]	<211> 138
[0562]	<212> PRT
[0563]	<213> 智人(Homo sapiens)
[0564]	<400> 29
[0565]	Met Ala Ser His Arg Leu Leu Leu Leu Cys Leu Ala Gly Leu Val Phe
[0566]	1 5 10 15
[0567]	Val Ser Glu Ala Gly Pro Thr Gly Thr Gly Glu Ser Lys Cys Pro Leu
[0568]	20 25 30
[0569]	Met Val Lys Val Leu Asp Ala Val Arg Gly Ser Pro Ala Ile Asn Val
[0570]	35 40 45
[0571]	Ala Val His Val Phe Arg Lys Ala Ala Asp Asp Thr Trp Glu Pro Phe
[0572]	50 55 60
[0573]	Ala Ser Gly Lys Thr Ser Glu Ser Gly Glu Leu His Gly Leu Thr Thr
[0574]	65 70 75 80
[0575]	Glu Glu Glu Phe Val Glu Gly Ile Tyr Lys Val Glu Ile Asp Thr Lys
[0576]	85 90 95
[0577]	Ser Tyr Trp Lys Ala Leu Gly Ile Ser Pro Phe His Glu His Ala Glu
[0578]	100 105 110
[0579]	Val Val Phe Thr Ala Asn Asp Ser Gly Pro Arg Arg Tyr Ser Tyr Ser
[0580]	115 120 125
[0581]	Thr Thr Ala Val Val Thr Asn Pro Lys Glu
[0582]	130 135
[0583]	<210> 30
[0584]	<211> 9

[0585] <212> PRT  
 [0586] <213> 智人(Homo sapiens)  
 [0587] <400> 30  
 [0588] Gly Pro Arg Arg Tyr Thr Ile Ala Ala  
 [0589] 1 5  
 [0590] <210> 31  
 [0591] <211> 41  
 [0592] <212> PRT  
 [0593] <213> 智人(Homo sapiens)  
 [0594] <400> 31  
 [0595] Phe His Glu His Ala Glu Val Val Phe Thr Ala Asn Asp Ser Gly Pro  
 [0596] 1 5 10 15  
 [0597] Arg Arg Tyr Thr Ile Ala Ala Leu Leu Ser Pro Tyr Ser Tyr Ser Thr  
 [0598] 20 25 30  
 [0599] Thr Ala Val Val Thr Asn Pro Lys Glu  
 [0600] 35 40  
 [0601] <210> 32  
 [0602] <211> 990  
 [0603] <212> DNA  
 [0604] <213> 人工序列(Artificial sequence)  
 [0605] <220>  
 [0606] <223> 合成的  
 [0607] <400> 32  
 [0608] gcctccacca aggggtccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60  
 [0609] ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgtcg 120  
 [0610] tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 180  
 [0611] ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacccagacc 240  
 [0612] tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc 300  
 [0613] aaatcttgtg acaaaactca cacatgcccc ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga 360  
 [0614] ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaacce aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctc 420  
 [0615] gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480  
 [0616] tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 540  
 [0617] agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtctctgacc aggactggct gaatggcaag 600  
 [0618] gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 660  
 [0619] aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccgggaggag 720  
 [0620] atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780  
 [0621] gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 840  
 [0622] ctggactccg acggctcctt ctctctctat agcaagctca ccgtggacaa gagcagggtg 900  
 [0623] cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccaactacag 960



- [0663] <212> DNA
- [0664] <213> 人工序列(Artificial sequence)
- [0665] <220>
- [0666] <223> 合成的
- [0667] <400> 36
- [0668] atgaactttg ggctcagctt gattttcctt gtccttgttt taaaagggtg ccagtgt 57
- [0669] <210> 37
- [0670] <211> 20
- [0671] <212> PRT
- [0672] <213> 人工序列(Artificial sequence)
- [0673] <220>
- [0674] <223> 合成的
- [0675] <400> 37
- [0676] Met Glu Ser His Thr Gln Val Phe Val Phe Val Phe Leu Trp Leu Ser
- [0677] 1                    5                    10                    15
- [0678] Gly Val Asp Gly
- [0679]                    20
- [0680] <210> 38
- [0681] <211> 60
- [0682] <212> DNA
- [0683] <213> 人工序列(Artificial sequence)
- [0684] <220>
- [0685] <223> 合成的
- [0686] <400> 38
- [0687] atggagtcac atactcaggt ctttgtattc gtgtttctct ggttgtctgg tgttgacgga 60
- [0688] <210> 39
- [0689] <211> 5
- [0690] <212> PRT
- [0691] <213> 人工序列(Artificial sequence)
- [0692] <220>
- [0693] <223> 合成的
- [0694] <400> 39
- [0695] Ser Tyr Thr Met Ser
- [0696] 1                    5
- [0697] <210> 40
- [0698] <211> 17
- [0699] <212> PRT
- [0700] <213> 人工序列(Artificial sequence)
- [0701] <220>





- [0741] Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Leu Thr  
 [0742] 1 5  
 [0743] <210> 45  
 [0744] <211> 9  
 [0745] <212> PRT  
 [0746] <213> 人工序列(Artificial sequence)  
 [0747] <220>  
 [0748] <223> 合成的  
 [0749] <400> 45  
 [0750] Glu His Ala Glu Val Val Phe Thr Ala  
 [0751] 1 5  
 [0752] <210> 46  
 [0753] <211> 5  
 [0754] <212> PRT  
 [0755] <213> 人工序列(Artificial sequence)  
 [0756] <220>  
 [0757] <223> 合成的  
 [0758] <400> 46  
 [0759] Asn Tyr Ala Met Ser  
 [0760] 1 5  
 [0761] <210> 47  
 [0762] <211> 16  
 [0763] <212> PRT  
 [0764] <213> 人工序列(Artificial sequence)  
 [0765] <220>  
 [0766] <223> 合成的  
 [0767] <400> 47  
 [0768] Ser Ile Ser Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly  
 [0769] 1 5 10 15  
 [0770] <210> 48  
 [0771] <211> 9  
 [0772] <212> PRT  
 [0773] <213> 人工序列(Artificial sequence)  
 [0774] <220>  
 [0775] <223> 合成的  
 [0776] <400> 48  
 [0777] Tyr Tyr Tyr Gly Gln Tyr Phe Asp Phe  
 [0778] 1 5  
 [0779] <210> 49





[0858] <400> 57  
 [0859] Phe Gln Gly Ser His Val Pro Leu Thr  
 [0860] 1 5  
 [0861] <210> 58  
 [0862] <211> 455  
 [0863] <212> PRT  
 [0864] <213> 人工序列(Artificial sequence)  
 [0865] <220>  
 [0866] <223> 合成的  
 [0867] <400> 58  
 [0868] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 [0869] 1 5 10 15  
 [0870] Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr  
 [0871] 20 25 30  
 [0872] Gly Met Ser Trp Ile Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val  
 [0873] 35 40 45  
 [0874] Ala Thr Ile Ser Ser Ser Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Thr Glu Ser Val  
 [0875] 50 55 60  
 [0876] Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Ser  
 [0877] 65 70 75 80  
 [0878] Leu Gln Met Ser Asn Leu Lys Ser Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 [0879] 85 90 95  
 [0880] Thr Arg Gln Ala Tyr Gly Arg Glu Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly  
 [0881] 100 105 110  
 [0882] Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr  
 [0883] 115 120 125  
 [0884] Pro Leu Ala Pro Gly Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu  
 [0885] 130 135 140  
 [0886] Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Ser Val Thr Val Thr Trp  
 [0887] 145 150 155 160  
 [0888] Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Ser Val His Thr Phe Pro Ala Leu Leu  
 [0889] 165 170 175  
 [0890] Gln Ser Gly Leu Tyr Thr Met Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser  
 [0891] 180 185 190  
 [0892] Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Ser Val Ala His Pro Ala Ser  
 [0893] 195 200 205  
 [0894] Ser Thr Thr Val Asp Lys Lys Leu Glu Pro Ser Gly Pro Ile Ser Thr  
 [0895] 210 215 220  
 [0896] Ile Asn Pro Cys Pro Pro Cys Lys Glu Cys His Lys Cys Pro Ala Pro

[0897]	225	230	235	240
[0898]	Asn Leu Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Asn Ile Lys			
[0899]		245	250	255
[0900]	Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val			
[0901]		260	265	270
[0902]	Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Arg Ile Ser Trp Phe Val Asn			
[0903]		275	280	285
[0904]	Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr			
[0905]		290	295	300
[0906]	Asn Ser Thr Ile Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp			
[0907]	305	310	315	320
[0908]	Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu			
[0909]		325	330	335
[0910]	Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Ile Lys Gly Leu Val Arg			
[0911]		340	345	350
[0912]	Ala Pro Gln Val Tyr Ile Leu Pro Pro Pro Ala Glu Gln Leu Ser Arg			
[0913]		355	360	365
[0914]	Lys Asp Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Val Gly Phe Asn Pro Gly Asp			
[0915]		370	375	380
[0916]	Ile Ser Val Glu Trp Thr Ser Asn Gly His Thr Glu Glu Asn Tyr Lys			
[0917]	385	390	395	400
[0918]	Asp Thr Ala Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Ile Tyr Ser			
[0919]		405	410	415
[0920]	Lys Leu Asp Ile Lys Thr Ser Thr Val Gly Glu Asn Arg Phe Leu Leu			
[0921]		420	425	430
[0922]	Met Gln Arg Glu Thr Arg Gly Ser Glu Lys Leu Leu Pro Glu Glu Asp			
[0923]		435	440	445
[0924]	His Leu Pro Ser Pro Gly Lys			
[0925]		450	455	
[0926]	<210> 59			
[0927]	<211> 219			
[0928]	<212> PRT			
[0929]	<213> 人工序列(Artificial sequence)			
[0930]	<220>			
[0931]	<223> 合成的			
[0932]	<400> 59			
[0933]	Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly			
[0934]	1	5	10	15
[0935]	Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asp Ser			

[0936]	20	25	30
[0937]	Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln		
[0938]	35	40	45
[0939]	Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Asn Arg Glu Ser Gly Val		
[0940]	50	55	60
[0941]	Pro Asp Arg Phe Ile Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr		
[0942]	65	70	75
[0943]	Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Lys Gln		
[0944]	85	90	95
[0945]	Ser Asn Tyr Leu Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Val Glu Ile Lys		
[0946]	100	105	110
[0947]	Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu		
[0948]	115	120	125
[0949]	Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe		
[0950]	130	135	140
[0951]	Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg		
[0952]	145	150	155
[0953]	Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser		
[0954]	165	170	175
[0955]	Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu		
[0956]	180	185	190
[0957]	Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser		
[0958]	195	200	205
[0959]	Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys		
[0960]	210	215	
[0961]	<210> 60		
[0962]	<211> 5		
[0963]	<212> PRT		
[0964]	<213> 人工序列(Artificial sequence)		
[0965]	<220>		
[0966]	<223> 合成的		
[0967]	<400> 60		
[0968]	Arg Tyr Trp Ile Thr		
[0969]	1	5	
[0970]	<210> 61		
[0971]	<211> 17		
[0972]	<212> PRT		
[0973]	<213> 人工序列(Artificial sequence)		
[0974]	<220>		

[0975]	<223>	合成的
[0976]	<400>	61
[0977]	Asp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys	
[0978]	1	5 10 15
[0979]	Asn	
[0980]	<210>	62
[0981]	<211>	9
[0982]	<212>	PRT
[0983]	<213>	人工序列(Artificial sequence)
[0984]	<220>	
[0985]	<223>	合成的
[0986]	<400>	62
[0987]	Tyr Tyr Gly Ser Thr Tyr Phe Tyr Val	
[0988]	1	5
[0989]	<210>	63
[0990]	<211>	16
[0991]	<212>	PRT
[0992]	<213>	人工序列(Artificial sequence)
[0993]	<220>	
[0994]	<223>	合成的
[0995]	<400>	63
[0996]	Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Tyr Lys Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn	
[0997]	1	5 10 15
[0998]	<210>	64
[0999]	<211>	7
[1000]	<212>	PRT
[1001]	<213>	人工序列(Artificial sequence)
[1002]	<220>	
[1003]	<223>	合成的
[1004]	<400>	64
[1005]	Leu Met Ser Thr Arg Ala Ser	
[1006]	1	5
[1007]	<210>	65
[1008]	<211>	9
[1009]	<212>	PRT
[1010]	<213>	人工序列(Artificial sequence)
[1011]	<220>	
[1012]	<223>	合成的
[1013]	<400>	65





- [1053] <210> 70  
[1054] <211> 8  
[1055] <212> PRT  
[1056] <213> 人工序列(Artificial sequence)  
[1057] <220>  
[1058] <223> 合成的  
[1059] <400> 70  
[1060] Lys Val Ser Asn Arg Asp Ser Gly  
[1061] 1 5  
[1062] <210> 71  
[1063] <211> 9  
[1064] <212> PRT  
[1065] <213> 人工序列(Artificial sequence)  
[1066] <220>  
[1067] <223> 合成的  
[1068] <400> 71  
[1069] Met Gln Gly Thr His Trp Pro Arg Thr  
[1070] 1 5  
[1071] <210> 72  
[1072] <211> 13  
[1073] <212> PRT  
[1074] <213> 人工序列(Artificial sequence)  
[1075] <220>  
[1076] <223> 合成的  
[1077] <400> 72  
[1078] Ala Asp Asp Thr Trp Glu Pro Phe Ala Ser Gly Lys Thr  
[1079] 1 5 10  
[1080] <210> 73  
[1081] <211> 13  
[1082] <212> PRT  
[1083] <213> 人工序列(Artificial sequence)  
[1084] <220>  
[1085] <223> 合成的  
[1086] <400> 73  
[1087] Thr Ser Glu Ser Gly Glu Leu His Gly Leu Thr Thr Glu  
[1088] 1 5 10  
[1089] <210> 74  
[1090] <211> 13  
[1091] <212> PRT



[1131]	<223>	合成的
[1132]	<400>	78
[1133]	Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr	
[1134]	1	5 10 15
[1135]	<210>	79
[1136]	<211>	7
[1137]	<212>	PRT
[1138]	<213>	人工序列(Artificial sequence)
[1139]	<220>	
[1140]	<223>	合成的
[1141]	<400>	79
[1142]	Arg Val Ser Asn Leu Ala Ser	
[1143]	1	5
[1144]	<210>	80
[1145]	<211>	9
[1146]	<212>	PRT
[1147]	<213>	人工序列(Artificial sequence)
[1148]	<220>	
[1149]	<223>	合成的
[1150]	<400>	80
[1151]	Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Leu Thr	
[1152]	1	5
[1153]	<210>	81
[1154]	<211>	121
[1155]	<212>	PRT
[1156]	<213>	人工序列(Artificial sequence)
[1157]	<220>	
[1158]	<223>	合成的
[1159]	<400>	81
[1160]	Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
[1161]	1	5 10 15
[1162]	Ser Leu Asn Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Phe	
[1163]		20 25 30
[1164]	Trp Met Ser Trp Ala Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Gln Glu Trp Ile	
[1165]		35 40 45
[1166]	Gly Glu Ile Asn Pro Gly Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Leu	
[1167]		50 55 60
[1168]	Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe	
[1169]	65	70 75 80

[1170]	Leu Gln Met Ser Lys Val Arg Ser Glu Asp Ser Ala Leu Tyr Tyr Cys
[1171]	85 90 95
[1172]	Ala Arg Leu Gly Tyr Gly Asn Tyr Gly Trp Ala Leu Asp Tyr Trp Gly
[1173]	100 105 110
[1174]	Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
[1175]	115 120
[1176]	<210> 82
[1177]	<211> 122
[1178]	<212> PRT
[1179]	<213> 人工序列(Artificial sequence)
[1180]	<220>
[1181]	<223> 合成的
[1182]	<400> 82
[1183]	Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[1184]	1 5 10 15
[1185]	Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
[1186]	20 25 30
[1187]	Gly Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val
[1188]	35 40 45
[1189]	Ala Phe Ile Ser Asn Leu Ala Tyr Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
[1190]	50 55 60
[1191]	Thr Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
[1192]	65 70 75 80
[1193]	Leu Glu Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
[1194]	85 90 95
[1195]	Ala Arg Tyr Asp Tyr Asp Asn Ile Leu Asp Tyr Val Met Asp Tyr Trp
[1196]	100 105 110
[1197]	Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
[1198]	115 120
[1199]	<210> 83
[1200]	<211> 112
[1201]	<212> PRT
[1202]	<213> 人工序列(Artificial sequence)
[1203]	<220>
[1204]	<223> 合成的
[1205]	<400> 83
[1206]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[1207]	1 5 10 15
[1208]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

[1209]		20		25		30													
[1210]	Gly	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Leu	Val			
[1211]		35		40		45													
[1212]	Ala	Ser	Ile	Asn	Ser	Asn	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Ser	Val			
[1213]		50		55		60													
[1214]	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr			
[1215]		65		70		75													
[1216]	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys			
[1217]				85		90													
[1218]	Ala	Ser	Gly	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser			
[1219]				100		105													
[1220]	<210>	84																	
[1221]	<211>	113																	
[1222]	<212>	PRT																	
[1223]	<213>	智人(Homo sapiens)																	
[1224]	<400>	84																	
[1225]	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly			
[1226]		1		5		10													
[1227]	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr			
[1228]				20		25													
[1229]	Ser	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val			
[1230]				35		40													
[1231]	Ser	Tyr	Ile	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Thr	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val			
[1232]				50		55													
[1233]	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr			
[1234]				65		70													
[1235]	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys			
[1236]				85		90													
[1237]	Ala	Arg	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser			
[1238]				100		105													
[1239]	Ser																		
[1240]	<210>	85																	
[1241]	<211>	121																	
[1242]	<212>	PRT																	
[1243]	<213>	人工序列(Artificial sequence)																	
[1244]	<220>																		
[1245]	<223>	合成的																	
[1246]	<400>	85																	
[1247]	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly			

[1248]	1	5	10	15
[1249]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Phe			
[1250]	20	25	30	
[1251]	Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val			
[1252]	35	40	45	
[1253]	Ala Glu Ile Asn Pro Gly Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Leu			
[1254]	50	55	60	
[1255]	Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr			
[1256]	65	70	75	80
[1257]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
[1258]	85	90	95	
[1259]	Ala Ser Leu Gly Tyr Gly Asn Tyr Gly Trp Ala Leu Asp Tyr Trp Gly			
[1260]	100	105	110	
[1261]	Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser			
[1262]	115	120		
[1263]	<210> 86			
[1264]	<211> 121			
[1265]	<212> PRT			
[1266]	<213> 人工序列(Artificial sequence)			
[1267]	<220>			
[1268]	<223> 合成的			
[1269]	<400> 86			
[1270]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
[1271]	1	5	10	15
[1272]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Phe			
[1273]	20	25	30	
[1274]	Trp Met Ser Trp Ala Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Gln Glu Trp Ile			
[1275]	35	40	45	
[1276]	Gly Glu Ile Asn Pro Gly Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Leu			
[1277]	50	55	60	
[1278]	Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr			
[1279]	65	70	75	80
[1280]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
[1281]	85	90	95	
[1282]	Ala Arg Leu Gly Tyr Gly Asn Tyr Gly Trp Ala Leu Asp Tyr Trp Gly			
[1283]	100	105	110	
[1284]	Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser			
[1285]	115	120		
[1286]	<210> 87			



[1326]	Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[1327]	100                    105                    110
[1328]	<210> 89
[1329]	<211> 112
[1330]	<212> PRT
[1331]	<213> 人工序列(Artificial sequence)
[1332]	<220>
[1333]	<223> 合成的
[1334]	<400> 89
[1335]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
[1336]	1                    5                    10                    15
[1337]	Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser
[1338]	20                    25                    30
[1339]	Asn Gly Asp Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
[1340]	35                    40                    45
[1341]	Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
[1342]	50                    55                    60
[1343]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
[1344]	65                    70                    75                    80
[1345]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
[1346]	85                    90                    95
[1347]	Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[1348]	100                    105                    110
[1349]	<210> 90
[1350]	<211> 112
[1351]	<212> PRT
[1352]	<213> 智人(Homo sapiens)
[1353]	<400> 90
[1354]	Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
[1355]	1                    5                    10                    15
[1356]	Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
[1357]	20                    25                    30
[1358]	Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
[1359]	35                    40                    45
[1360]	Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Asp Ser Gly Val Pro
[1361]	50                    55                    60
[1362]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
[1363]	65                    70                    75                    80
[1364]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly





- [1404] Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 [1405] 65 70 75 80  
 [1406] Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
 [1407] 85 90 95  
 [1408] Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 [1409] 100 105 110  
 [1410] <210> 93  
 [1411] <211> 5  
 [1412] <212> PRT  
 [1413] <213> 人工序列(Artificial sequence)  
 [1414] <220>  
 [1415] <223> 合成的  
 [1416] <400> 93  
 [1417] Arg Phe Trp Met Ser  
 [1418] 1 5  
 [1419] <210> 94  
 [1420] <211> 7  
 [1421] <212> PRT  
 [1422] <213> 人工序列(Artificial sequence)  
 [1423] <220>  
 [1424] <223> 合成的  
 [1425] <400> 94  
 [1426] Gly Phe Asp Phe Ser Arg Phe  
 [1427] 1 5  
 [1428] <210> 95  
 [1429] <211> 6  
 [1430] <212> PRT  
 [1431] <213> 人工序列(Artificial sequence)  
 [1432] <220>  
 [1433] <223> 合成的  
 [1434] <400> 95  
 [1435] Ser Arg Phe Trp Met Ser  
 [1436] 1 5  
 [1437] <210> 96  
 [1438] <211> 6  
 [1439] <212> PRT  
 [1440] <213> 人工序列(Artificial sequence)  
 [1441] <220>  
 [1442] <223> 合成的

- [1443] <400> 96  
 [1444] Asn Pro Gly Ser Ser Thr  
 [1445] 1 5  
 [1446] <210> 97  
 [1447] <211> 10  
 [1448] <212> PRT  
 [1449] <213> 人工序列(Artificial sequence)  
 [1450] <220>  
 [1451] <223> 合成的  
 [1452] <400> 97  
 [1453] Glu Ile Asn Pro Gly Ser Ser Thr Ile Asn  
 [1454] 1 5 10  
 [1455] <210> 98  
 [1456] <211> 13  
 [1457] <212> PRT  
 [1458] <213> 人工序列(Artificial sequence)  
 [1459] <220>  
 [1460] <223> 合成的  
 [1461] <400> 98  
 [1462] Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Gly Ser Ser Thr Ile Asn  
 [1463] 1 5 10  
 [1464] <210> 99  
 [1465] <211> 13  
 [1466] <212> PRT  
 [1467] <213> 人工序列(Artificial sequence)  
 [1468] <220>  
 [1469] <223> 合成的  
 [1470] <400> 99  
 [1471] Ala Arg Leu Gly Tyr Gly Asn Tyr Gly Trp Ala Leu Asp  
 [1472] 1 5 10  
 [1473] <210> 100  
 [1474] <211> 7  
 [1475] <212> PRT  
 [1476] <213> 人工序列(Artificial sequence)  
 [1477] <220>  
 [1478] <223> 合成的  
 [1479] <400> 100  
 [1480] Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr  
 [1481] 1 5



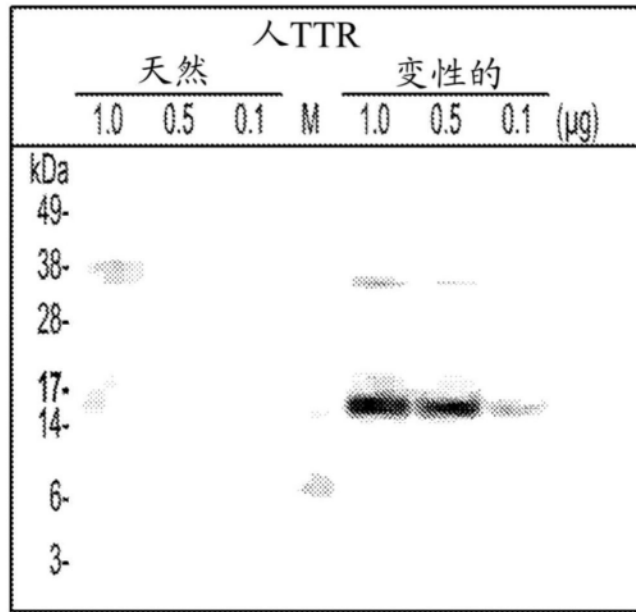


图1

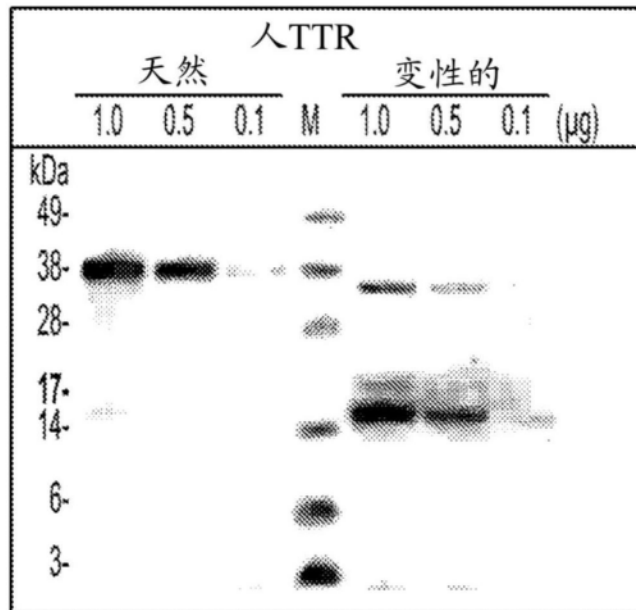


图2

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 10      20      30      40      50      60
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
18C5VH Pro  EVKLESGGGLVQPGGSLNLSVYASGDFSRFWMSWARQAPGRQEWGEINPGSSTINYTPSLK 65
IGHV3-48*01 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTFSSYSMNWVRQAPCKGLEWYSYISSSSTIYYADSVK 65
CreneFab VH  EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTFSSYGMWVRQAPCKGLELVASINSNGGSIYPPDSVK 65
hu18C5VHv1  EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGDFSRFWMSWVRQAPCKGLELVAEINPGSSTINYPPSLK 65
hu18C5VHv2  EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGDFSRFWMSWVRQAPCKQWICEINPGSSTINYPPSLK 65

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 70      80      90      100     110     120
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
18C5VH Pro  DRFTISRDNAKNSLYIQMSKVSEDSALYYCARLGYGNYGNWALDYWGQGTSVTVSS 121
IGHV3-48*01  GRFTISRDNAKNSLYIQMSLRAEDIAYYYCARY-----F-DYWGQGLTVTVSS 113
CreneFab VH  GRFTISRDNAKNSLYIQMSLRAEDIAYYYCASG-----DYWGQGTTVTVSS 112
hu18C5VHv1  DRFTISRDNAKNSLYIQMSLRAEDIAYYYCASLGYGNYGNWALDYWGQGTTVTVSS 121
hu18C5VHv2  DRFTISRDNAKNSLYIQMSLRAEDIAYYYCARLGYGNYGNWALDYWGQGTTVTVSS 121

```

图3

```

-----+-----+-----+-----+-----+
      10      20      30      40      50      60
-----+-----+-----+-----+-----+
18C5VL_pro  DVLMTQPLSLPVSILGDAQASISCRSSQSIVDSNGNTYLEWYLQPGQSPKLLIYKYSNRF 60
IGKV2-30*02 DVMVTSPLSLPVTIGQPASISCRSSQSLVHSIDGNTYLAHWFQQRPGQSPRRLIYKYSNRD 60
crenefab-VL DVMVTSPLSLPVTGEPASISCRSSQSLVYSNGDYLAHWYLOKPGQSPQLLIYKYSNRE 60
hu18C5VLv1 DVMVTSPLSLPVTGEPASISCRSSQSIVDSNGNTYLEWYLQPGQSPQLLIYKYSNRE 60
hu18C5VLv2 DVMVTSPLSLPVTGEPASISCRSSQSIVDSNGNTYLEWYLQPGQSPRLLIYKYSNRE 60

-----+-----+-----+-----+-----+
      70      80      90      100     110
-----+-----+-----+-----+-----+
18C5VL_pro  SGVPRFSGSGSGTFTLKISRVEAEDLGIYYCFQGSHVPLTFGAGTLELK 112
IGKV2-30*02 SGVPRFSGSGSGTFTLKISRVEAEDGVVYCMQGTHTWTFFGQTKVEIK 112
crenefab-VL SGVPRFSGSGSGTFTLKISRVEAEDGVVYCSQSTHVTWTFFGQTKVEIK 112
hu18C5VLv1 SGVPRFSGSGSGTFTLKISRVEAEDGVVYCFQGSHVPLTFGQTKVEIK 112
hu18C5VLv2 SGVPRFSGSGSGTFTLKISRVEAEDGVVYCFQGSHVPLTFGQTKVEIK 112

```

图4