



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101611054 B

(45) 授权公告日 2013.12.25

(21) 申请号 200780044555.4

专利权人 基因技术公司

(22) 申请日 2007.10.02

(72) 发明人 A·普法伊费尔 M·皮尔格伦

A·穆斯 R·沃茨

(30) 优先权数据

06020765.1 2006.10.02 EP

06020766.9 2006.10.02 EP

PCT/EP2006/011862 2006.12.08 EP

60/943,289 2007.06.11 US

60/943,499 2007.06.12 US

PCT/US2007/073504 2007.07.13 US

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 林柏楠

(51) Int. Cl.

C07K 16/18 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2009.06.01

(56) 对比文件

CN 1426423 A, 2003.06.25, 摘要, 说明书第

7 页第二段.

WO 2006066171 A, 2006.06.22, 全文.

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2007/021134 2007.10.02

(87) PCT申请的公布数据

W02008/060364 EN 2008.05.22

审查员 马驰

(73) 专利权人 AC 免疫有限公司

地址 瑞士洛桑

权利要求书2页 说明书71页

序列表73页 附图24页

(54) 发明名称

针对淀粉状蛋白 β 的人源化抗体

(57) 摘要

本发明涉及在治疗由淀粉状蛋白或淀粉状蛋白样蛋白引起的或与其相关的疾病和病症中应用的用于治疗 and 诊断的方法和组合物, 其中所述由淀粉状蛋白或淀粉状蛋白样蛋白引起的或与其相关的疾病和病症包括淀粉状变性, 是一组与淀粉状蛋白相关的疾病和异常, 诸如阿尔茨海默病。本发明提供了新的方法和组合物, 包含具有特异性识别并结合至来自 β -淀粉状蛋白的特定表位能力的高度特异的和高度有效的抗体。本发明教导的所述抗体特别地用于治疗由淀粉状蛋白或淀粉状蛋白样蛋白引起的或与其相关的疾病和病症, 其中所述由淀粉状蛋白或淀粉状蛋白样蛋白引起的或与其相关的疾病和病症包括淀粉状变性, 是一组与淀粉状蛋白斑形成相关的疾病和病症, 包括继发性淀粉状变性和年龄相关性淀粉状变性, 包括但不限于神经疾病诸如阿尔茨海默病 (AD)。

1. 组合物,所述组合物包含特异结合 β -淀粉状蛋白的含有 SEQ ID NO:12 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO:15 所示的重链可变区的人源化抗体或其抗原结合片段,用于监测用包含特异结合至 β -淀粉状蛋白的人源化抗体或其抗原结合片段的药物组合物治疗后的患者中的微小残留病,所述轻链可变区的缩写为 LCVR;所述重链可变区的缩写为 HCVR;所述抗原结合片段是 Fab、Fab'、 $F(ab)_2$ 、 $F(ab')_2$ 、Fab/c、Fv 抗体、或单链 Fv。

2. 组合物,所述组合物包含特异结合 β -淀粉状蛋白的含有 SEQ ID NO:12 所示的 LCVR 和 SEQ ID NO:15 所示的 HCVR 的人源化抗体或其抗原结合片段,用于预测用包含特异结合至 β -淀粉状蛋白的人源化抗体或其抗原结合片段的药物组合物治疗的患者的反应性;其中所述抗原结合片段是 Fab、Fab'、 $F(ab)_2$ 、 $F(ab')_2$ 、Fab/c、Fv 抗体、或单链 Fv。

3. 组合物的用途,所述组合物包含特异结合 β -淀粉状蛋白的含有 SEQ ID NO:12 所示的 LCVR 和 SEQ ID NO:15 所示的 HCVR 的人源化抗体或其抗原结合片段,用于制备药物来监测用包含特异结合至 β -淀粉状蛋白的人源化抗体或其抗原结合片段的药物组合物治疗后的患者中的微小残留病;其中所述抗原结合片段是 Fab、Fab'、 $F(ab)_2$ 、 $F(ab')_2$ 、Fab/c、Fv 抗体、或单链 Fv。

4. 组合物的用途,所述组合物包含特异结合 β -淀粉状蛋白的含有 SEQ ID NO:12 所示的 LCVR 和 SEQ ID NO:15 所示的 HCVR 的人源化抗体或其抗原结合片段,用于制备药物来预测用包含特异结合至 β -淀粉状蛋白的人源化抗体或其抗原结合片段的药物组合物治疗的患者的反应性;其中所述抗原结合片段是 Fab、Fab'、 $F(ab)_2$ 、 $F(ab')_2$ 、Fab/c、Fv 抗体、或单链 Fv。

5. 特异结合 β -淀粉状蛋白的人源化抗体或其抗原结合片段,包含 SEQ ID NO:12 所示的 LCVR 和 SEQ ID NO:15 所示的 HCVR,用于监测用包含特异结合至 β -淀粉状蛋白的人源化抗体或其抗原结合片段的药物组合物治疗后的患者中的微小残留病;其中所述抗原结合片段是 Fab、Fab'、 $F(ab)_2$ 、 $F(ab')_2$ 、Fab/c、Fv 抗体、或单链 Fv。

6. 特异结合 β -淀粉状蛋白的人源化抗体或其抗原结合片段,包含 SEQ ID NO:12 所示的 LCVR 和 SEQ ID NO:15 所示的 HCVR,用于预测用包含特异结合至 β -淀粉状蛋白的人源化抗体或其抗原结合片段的药物组合物治疗的患者的反应性;其中所述抗原结合片段是 Fab、Fab'、 $F(ab)_2$ 、 $F(ab')_2$ 、Fab/c、Fv 抗体、或单链 Fv。

7. 权利要求 1 或 2 的组合物、权利要求 3 或 4 的用途、或者权利要求 5 或 6 的抗体,其中所述患者是人。

8. 权利要求 7 的组合物、用途或者抗体,其中所述人患有阿尔茨海默病。

9. 权利要求 7 的组合物、用途或者抗体,其中所述人患有与脑中 β -淀粉状蛋白浓度增加相关的疾病或病症。

10. 权利要求 1 或 2 的组合物、权利要求 3 或 4 的用途、或者权利要求 5 或 6 的抗体,其中人源化抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO:13 所示的轻链和 SEQ ID NO:16 所示的重链。

11. 权利要求 9 的组合物、用途或者抗体,其中所述疾病或病症是轻度认知损害、唐氏综合征或荷兰型遗传性脑出血伴淀粉状变性。

12. 用于预防 β -淀粉状蛋白诱导的神经元变性的特异结合 β -淀粉状蛋白的人源化抗体或其抗原结合片段,所述人源化抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO:12 所示

的 LCVR 和 SEQ ID NO:15 所示的 HCVR;其中所述抗原结合片段是 Fab、Fab'、F(ab)₂、F(ab')₂、Fab/c、Fv 抗体、或单链 Fv。

13. 用于预防 β-淀粉状蛋白诱导的神经元变性的组合物,所述组合物包含有效量的特异结合 β-淀粉状蛋白的人源化抗体或其抗原结合片段,其中所述人源化抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO:12 所示的 LCVR 和 SEQ ID NO:15 所示的 HCVR;其中所述抗原结合片段是 Fab、Fab'、F(ab)₂、F(ab')₂、Fab/c、Fv 抗体、或单链 Fv。

14. 特异结合 β-淀粉状蛋白的人源化抗体或其抗原结合片段的用途,用于制备预防 β-淀粉状蛋白诱导的神经元变性的药物,其中所述人源化抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO:15 所示的 HCVR 和 SEQ ID NO:12 所示的 LCVR;其中所述抗原结合片段是 Fab、Fab'、F(ab)₂、F(ab')₂、Fab/c、Fv 抗体、或单链 Fv。

15. 根据权利要求 12 的人源化抗体或其抗原结合片段,其中人源化抗体包含 SEQ ID NO:13 所示的轻链和 SEQ ID NO:16 所示的重链。

16. 根据权利要求 13 的组合物,其中人源化抗体包含 SEQ ID NO:13 所示的轻链和 SEQ ID NO:16 所示的重链。

17. 根据权利要求 14 的用途,其中人源化抗体包含 SEQ ID NO:13 所示的轻链和 SEQ ID NO:16 所示的重链。

18. 权利要求 8 的组合物、用途或者抗体,其中人源化抗体或其抗原结合片段是 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 亚类。

19. 权利要求 9 的组合物、用途或者抗体,其中人源化抗体或其抗原结合片段是 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 亚类。

20. 权利要求 12 的人源化抗体或其抗原结合片段、权利要求 13 的组合物、或者权利要求 14 的用途,其中人源化抗体或其抗原结合片段是 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 亚类。

21. 权利要求 1、2 或 13 的组合物、权利要求 3、4 或 14 的用途、或者权利要求 5、6 或 12 的抗体,其中人源化抗体包含 SEQ ID NO:13 所示的轻链和 SEQ ID NO:16 所示的重链,其中 SEQ ID NO:16 的位置 439 上的末端 Lys 缺失。

22. 权利要求 1、2 或 13 的组合物、权利要求 3、4 或 14 的用途、或者权利要求 5、6 或 12 的抗体,其中人源化抗体还包含 SEQ ID NO:17 所示的重链恒定区。

23. 权利要求 22 的组合物、用途或者抗体,其中人源化抗体包含 SEQ ID NO:13 所示的轻链。

针对淀粉状蛋白 β 的人源化抗体

[0001] 本发明涉及用于淀粉状变性的诊断和治疗的方法和组合物,所述淀粉状变性是一组与淀粉状蛋白相关的病症和异常,诸如阿尔茨海默病。

[0002] 淀粉状变性不是单一的疾病实体,而是一群多种以蜡状的、淀粉样蛋白(称之为淀粉状蛋白,它们积累在一个或一个以上的器官或身体系统中)细胞外组织的沉积为特征的进行性疾病过程。随着淀粉状蛋白沉积物聚集,它们开始干扰器官或身体系统的正常功能。至少存在 15 种不同类型的淀粉状变性。主要形式是没有已知前例的原发性淀粉状变性,一些其它疾病之后的继发性淀粉状变性,和遗传性淀粉状变性。

[0003] 继发性淀粉状变性发生在慢性感染或炎症性疾病,诸如结核病、称为家族性地中海热的细菌感染、骨感染(骨髓炎)、类风湿性关节炎、小肠发炎(肉芽肿性回肠炎)、霍奇金病和麻风病期间。

[0004] 淀粉状蛋白沉积物包括淀粉状蛋白 P(五边形)成分 P、与正常血清淀粉状蛋白 P 相关的糖蛋白(SAP)和结缔组织的复合碳水化合物硫酸盐化的糖胺聚糖(GAG)。占淀粉状蛋白物质的 90% 的淀粉状蛋白原纤维(fibril)包含数种不同类型蛋白中的一种。这些蛋白能够折叠为所谓的“ β -折叠”片状原纤维,这种独特的蛋白构型显示出对刚果红(Congo red)的结合部位,导致了淀粉状蛋白的独特的着色性质。

[0005] 许多老年疾病基于或与淀粉状蛋白样蛋白有关,并且部分地以促进疾病发生和疾病进程的淀粉状蛋白或淀粉状蛋白样物质的细胞外沉积的积累为特征。这些疾病包括但不限于神经疾病,诸如阿尔茨海默病(AD),包括以认知记忆能力丧失为特征的疾病或病症,例如,诸如轻度认知损害(MCI),包括以认知记忆能力丧失为特征的疾病或病症,例如,诸如轻度认知损害(MCI)、路易体痴呆(Lewy body dementia)、唐氏综合征(Down's syndrome)、遗传性脑出血伴淀粉状变性(荷兰型);关岛帕金森-痴呆综合征。其它基于淀粉状蛋白样蛋白或与其相关的疾病是进行性核上性麻痹、多发性硬化、克-雅二氏病(Creutzfeldt Jacob disease)、帕金森氏病、HIV 相关痴呆、ALS(肌萎缩性侧索硬化症)、包涵体肌炎(IBM)、成年发病型糖尿病、老年性心脏淀粉状变性、内分泌肿瘤以及其它疾病,包括黄斑变性。

[0006] 尽管这些疾病的发病机理可能是不同的,但它们的特征性沉积物经常含有许多共同的分子成分。在显著程度上,这些可能归因于促进发炎途径的局部活化从而导致活化的补体组分、急性期反应物、免疫调节剂及其它发炎介质的同时沉积(McGeer 等,1994)。

[0007] 阿尔茨海默病(AD)是一种神经疾病,主要认为由淀粉状蛋白斑,即在脑中蛋白质异常沉积的积累所引起的。在感染个体脑中发现的最常见的淀粉状蛋白的类型主要包含 $A\beta$ 原纤维。科学证据表明在斑块中 β -淀粉状蛋白的产生和累积的增加导致神经细胞死亡,这对 AD 的发展和进程有贡献。在关键脑区域的神经细胞的损失又导致神经递质的减少和记忆的减损。主要造成斑块聚集的蛋白质包括淀粉状蛋白前体蛋白(APP)和两种早老蛋白(早老蛋白 I 和早老蛋白 II)。通过酶 β 和 γ 分泌酶连续裂解淀粉状蛋白前体蛋白(APP)(它们在大多数细胞中组成型表达和分解代谢)导致 39 至 43 个氨基酸的 $A\beta$ 肽的释放。APPs 的降解可能会增加它们在斑块中聚集的倾向。由于其 C 末端的两个极疏水的氨基酸残基, $A\beta$ (1-42) 片段尤其具有构建聚集物的高倾向。因此认为 $A\beta$ (1-42) 片段主要参

与并造成 AD 中神经炎斑块形成的起始,并因此具有高病理学潜力。因此需要能预防淀粉状蛋白斑的形成并扩散在 AD 中现存的淀粉状蛋白斑的药剂。

[0008] AD 的症状出现缓慢,第一个症状可能仅仅是轻度健忘。在这一阶段,个体可能忘记新近的事件、活动、熟悉的人或东西的名称以及不能解决简单的数学问题。随着疾病进展,症状能更容易地被注意到并且变得足够严重从而导致患有 AD 的人们或他们的家人寻求医学帮助。AD 的中期症状包括忘记如何做诸如整理清洁的简单任务,以及说话、理解、阅读或书写的问题逐渐显现。后期的 AD 患者可能变得焦虑或具攻击性,可能从家里走失以及最终需要全面护理。

[0009] 目前,唯一的明确诊断 AD 的方法是在个体死后的尸体解剖中鉴别脑组织中的斑块和缠结。因此,当人仍活着的时候,医生只能作出“可能”或“很可能”患有 AD 的诊断。应用目前的方法,内科医生利用数种诊断“很可能”AD 的工具可以至多在 90% 的时间准确地诊断 AD。内科医师询问人的一般健康、过去的医疗问题和此人完成日常活动的任何困难的历史。记忆、问题求解、注意力、计算和语言的行为测试提供认知退化的有关信息,医疗检验诸如血、尿或脊髓液的检验和脑部扫描可以提供一些其它信息。

[0010] AD 的管理由基于药物的和不基于药物的治疗组成。以改变疾病潜在的过程(延缓或逆转进程)为目的的治疗目前大部分是不成功的。恢复神经细胞的化学信使(神经递质)不足(缺陷)或功能障碍的药物,特别是胆碱酯酶抑制剂(ChEI)(诸如他克林和卡巴拉汀(rivastigmine))已显示出可改善症状。ChEI 阻碍神经递质的酶降解,因此增加在脑中可用于传递神经信号的化学信使的量。

[0011] 对于某些在疾病早期和中期阶段的人们,药物他克林(**COGNEX[®]**, Morris Plains, NJ)、多奈哌齐(**ARICEPT[®]**, Tokyo, JP)、卡巴拉汀(**EXELON[®]**, East Hanover, NJ)或加兰他敏(**REMINYL[®]**, New Brunswick, NJ)可以在有限的时间内帮助防止某些症状变得更严重。另一种药物美金刚(**NAMENDA[®]**, New York, NY)已被核准治疗中等至严重的 AD。也有药物用于对付 AD 的精神病学表现。有些药物也可以帮助控制 AD 的行为症状,诸如失眠、兴奋、恍惚、焦虑和抑郁。治疗这些症状通常使得患者更舒服和使对于照顾者来说更容易照顾。不幸的是,尽管显著地治疗进展显示出这一类药剂可靠地比安慰剂好,但是疾病仍继续发展,并且对精神功能的平均作用仅为有限的。很多用于 AD 药物治疗的药物,例如,诸如 ChEI,也具有副作用,包括胃肠功能失调、肝脏毒性和体重减轻。

[0012] 路易体痴呆(LBD)是可在年龄大于 65 岁的人中存在的神经变性疾病,其通常引起认知(思维)损害的症状和反常的行为改变。症状可以包括认知损害、神经征、睡眠紊乱、和自律失调(autonomic failure)。在大多数病例中,认知损害是 LBD 所表现出的特征。患者具有经常发生的进行性加重的神经错乱发作。认知能力的波动往往与注意力和机敏性的移动程度相关。认知损害和思维的波动可在若干分钟、若干小时、或若干天期间变动。路易体是自磷酸化的和非磷酸化的神经丝蛋白形成的;它们含有突触蛋白 α -突触核蛋白和遍在蛋白,其参与去除损伤的或异常的蛋白。除了路易体之外,也可还存在路易神经突(Lewy neurites),其中所述路易神经突是在神经细胞的细胞突起中的包涵体。在患 DLB 的患者脑中可形成淀粉状蛋白斑,但是与患有阿尔茨海默病的患者中所看到的数量相比倾向于较少。在 AD 中的另一微病理学特征-神经原纤维缠结不是 DLB 的主要特征,但是 DLB 除了存

在淀粉状蛋白斑外还通常存在神经原纤维缠结。

[0013] 肌萎缩性侧索硬化症 (ALS) 表征为上运动神经元和下运动神经元变性。在一些 ALS 患者中,可存在痴呆或失语症 (ALS-D)。最常见的痴呆是额颞痴呆 (FTD),并且这些病例中许多病例具有在齿状回的神经元以及额叶和颞叶的浅层神经元中遍在蛋白阳性、tau 阴性的内含物。

[0014] 包涵体肌炎 (IBM) 是通常在年龄超过 50 岁的人中发现的丧失活动能力的病,其中肌纤维发炎并开始萎缩 - 但其中脑不受侵袭并且患者保留他们的智力。在患有该最常见的进行性肌肉疾病的老年人患者的肌细胞中发现了两种参与淀粉状蛋白 β 蛋白产生的酶增加,其中淀粉状蛋白 β 也增加。

[0015] 另外一种基于淀粉状蛋白样蛋白的聚集和沉积或与其相关的疾病是黄斑变性。

[0016] 黄斑变性是引起视网膜 (在眼睛后部的像纸一样薄的组织,在此感光细胞传送视觉信号至大脑) 的中心区域即黄斑区变性的常见的疾病。通过黄斑区处理产生清楚、明晰、“笔直向前”的视觉。损伤黄斑区导致盲点的产生和模糊不清或视物变形。年龄相关性黄斑变性 (AMD) 在美国是引起视力损伤的主要原因,并且对于 65 岁以上的人来说,其为高加索人中法定失明的主要原因。大约有 180 万 40 岁及以上美国人患有晚期 AMD,以及其它 730 万患有中等 AMD 的人具有视力丧失的真实危险。政府估计到 2020 年,将会有 290 万人患有晚期 AMD。AMD 患者常常惊讶和沮丧地发现对这种盲症状的原因和治疗了解的是如此之少。

[0017] 存在两种黄斑变性的形式:干性黄斑变性和湿性黄斑变性。有百分之八十五的黄斑变性患者诊断为干性形式,其中黄斑区的细胞缓慢地开始损坏。尽管一只眼睛可能丧失视力而另外一只眼睛保持未受影响,但两只眼睛通常都受到干性 AMD 的影响。视网膜下的黄色沉积物,即脉络膜小疣是干性 AMD 的早期征兆。随着脉络膜小疣的数目和大小的增加,发展成晚期干性 AMD 或湿性 AMD 的危险也增加。干性 AMD 可能在不转变为疾病的湿性形式的情况下进一步发展并且导致视力的丧失;然而,早期的干性 AMD 也有可能突然变为湿性形式。

[0018] 尽管只占到病例的百分之十五,湿性形式导致了失明的百分之九十,并且被认为是晚期的 AMD (没有早期或中期阶段的湿性 AMD)。湿性 AMD 总是处于疾病的干性形式之后。当干性形式变得更严重,一些人在黄斑区的后面开始有异常的血管生长。这些血管非常脆弱并且会泄漏液体和血液 (因此是“湿性”黄斑变性),这导致了对黄斑区的快速损伤。

[0019] 干性形式的 AMD 开始会常常引起轻度的视力模糊。特别是视力的中心可能变得模糊不清,并且这一区域随着疾病的发展变得更大。如果只有一只眼睛受到影响,则没有症状可以被注意到。在湿性 AMD 中,直线可能看起来像波浪状,并且中心视力的丧失可能很快出现。

[0020] 黄斑变性的诊断一般涉及扩张眼检查、视觉敏感度试验,以及用称之为眼底检查的方法查看眼睛的后部以帮助诊断 AMD,并且如果有湿性 AMD 的嫌疑,则也可能进行荧光素血管造影术。如果干性 AMD 达到晚期阶段,没有预防视力丧失的现行治疗。然而,抗氧化剂和锌的特定高剂量配方可以延缓或预防中期 AMD 发展至晚期阶段。**Macugen®** (哌加他尼钠注射液)、激光光凝术和光动力学治疗可能可以控制黄斑区中的异常血管生长和流血,这对有些患有湿性 AMD 的患者有用;然而,视力已经丧失的则不能通过这些技术恢复。如果

视力已经丧失,存在可以帮助提高生活质量的低视力辅助器。

[0021] 年龄相关性黄斑变性 (AMD) 的最早的征兆之一是称之为脉络膜小疣的细胞外沉积物在视网膜色素上皮 (RPE) 基层层和布鲁赫膜 (BM) 之间的积累。近来由 Anderson 等进行的研究已证实脉络膜小疣包含淀粉状蛋白 β (Experimental Eye Research 78(2004) 243-256)。

[0022] 进行中的研究继续探索可能促进 AMD 的环境、遗传和饮食因素。也正在探索新的治疗策略,包括视网膜细胞移植物、能够预防或减缓疾病发展的药物、放射疗法、基因疗法、植入到视网膜的可帮助刺激视力的计算机芯片、以及预防黄斑区下新血管生长的药剂。

[0023] 开发新药物时,需要考虑的一个重要因素是对目标患者来说使用的容易性。由于对患者的便利性,经口药物递送(特别是片剂、胶囊剂和软胶剂)占有消费剂型的 70%。药物开发者认同患者更喜欢经口递送,而不是接受注射或其它更具侵入性的药物给药方式。导致减少给药次数的间隔(即一天一次或持续释放)的制剂也是优选的。以经口剂型给药抗生素的容易性导致了治疗期间患者顺从性的增加。

[0024] 所需的是预防或处理与淀粉状变性相关的并发症的有效方法和组合物,所述淀粉状变性是一组与淀粉状蛋白斑的形成相关的疾病和病症,包括继发性淀粉状变性和年龄相关性淀粉状变性,包括但不限于神经疾病诸如阿尔茨海默病 (AD)、路易体痴呆、唐氏综合征、遗传性脑出血伴淀粉状变性(荷兰型)、关岛帕金森-痴呆综合征;以及其它基于淀粉状蛋白样蛋白或与其相关的疾病,诸如进行性核上性麻痹、多发性硬化、克-雅二氏病、帕金森氏病、HIV- 相关痴呆、ALS(肌萎缩性侧索硬化症)、成年发病型糖尿病、老年性心脏淀粉状变性、内分泌肿瘤,以及其它疾病,包括黄斑变性。具体而言,需要的是能消除疾病生理学表现,诸如消除与淀粉状蛋白或淀粉状蛋白样肽的纤维的聚集相关的斑块形成的药剂。

[0025] 对于人类阿尔茨海默病,据报道与弗氏完全或不完全佐剂混合的由接种 $A\beta_{1-42}$ 引起的抗淀粉状蛋白抗体能够减少转基因小鼠的淀粉状蛋白的负荷 (Schenk 等,1999)。将在脂质体中重构的四棕榈酰化 $A\beta_{1-16}$ 腹膜内接种到 NORBA 转基因小鼠引起显著的抗淀粉状蛋白抗体滴度,据报道这一抗体也能在体外和体内溶解淀粉状蛋白纤维和斑块 (Nicolau 等,2002)。

[0026] Bard 等 (2000) 首先提出了溶解已出现的淀粉状蛋白斑和纤维的可能机制,他们得出结论,即抗体调理斑块,斑块随后被小神经胶质细胞的巨噬细胞毁坏。De Mattos 等 (2001) 指出抗 β -淀粉状蛋白的中心结构域的 mAb 能够结合和完全隔离血浆淀粉状蛋白。他们认为循环系统中这些 mAb 的存在改变了脑和血浆中的 $A\beta$ 平衡,有利于外周的清除和分解代谢而不是在脑内沉积。

[0027] 用啮齿类动物抗体的长期的人类治疗可能导致抗球蛋白反应,这能在施与后约 8-12 天检测到,并在约 20-30 天达到峰值。如果遭遇了该抗球蛋白反应,必须在不超过约 10 天之后中断治疗,并且通常无法在之后的时间重新治疗,因为这将导致二次抗球蛋白反应的快速开始。尽管啮齿类动物抗体与人类抗体共享了相当大程度上的序列保守性,但是在啮齿类动物和人类抗体之间存在许多序列差异,足以使啮齿类动物抗体在人类中成为免疫原。

[0028] 可以通过直接在人类中产生抗体或通过创造“人源化”(又称“重构 (reshaped)”抗体)来解决这一问题。人源化抗体具有这样的可变区氨基酸序列,所述可变区氨基酸序

列含有散布在人类或人类样构架序列中的啮齿类动物衍生的 CDR。由于人源化抗体的特异性是由啮齿类动物衍生的 CDR 提供的,因此,基本上不经改变的应用它们的残基,仅允许不会显著影响抗体对其靶抗原的亲合性和特异性的小的修饰。构架残基可以衍生自任何灵长类动物,或尤其是衍生自任何人类可变区,或其组合,并且所得到的设计好的可变区被认为是经重构的。

[0029] 为最大可能地在重构抗体中保留亲和力,适当地选择构架区是重要的。已知构架序列以 CDR 正确的空间方向容纳 CDR,用于与抗原相互作用,并且构架残基有时甚至参与抗原结合。为保留抗体对其抗原的亲合性,选择与啮齿类动物构架序列最相似的人类构架序列是有利的。然后仍然可能需要用啮齿类构架中相应的残基替换人类构架序列中的一个或多个氨基酸,以避免亲和性的丧失。通过计算机建模可辅助这一替换。

[0030] 本发明提供包含高特异性和高效抗体、尤其是包括其片段在内的嵌合抗体、更尤其是包括其片段在内的部分或完全的人源化抗体的新的方法和组合物,所述抗体具有特异识别并结合至一系列 β -淀粉状蛋白抗原的特异表位的能力,所述抗原可能以单体、二聚体、三聚体等;以聚合形式;以聚集体、纤维、纤丝的形式;或以斑块的浓缩形式呈递给抗体。通过本发明教导提供的抗体特别对治疗淀粉状变性有用,所述淀粉状变性是一组与淀粉状蛋白斑的形成相关的疾病和病症,包括继发性淀粉状变性和年龄相关性淀粉状变性,包括但不限于神经疾病诸如阿尔茨海默病 (AD)、路易体痴呆、唐氏综合征、遗传性脑出血伴淀粉状变性(荷兰型)、关岛帕金森-痴呆综合征;以及其它基于淀粉状蛋白样蛋白或与其相关的疾病,诸如进行性核上性麻痹、多发性硬化、克-雅二氏病、帕金森氏病、HIV-相关痴呆、ALS(肌萎缩性侧索硬化症)、成年发病型糖尿病、老年性心脏淀粉状变性、内分泌肿瘤,以及其它疾病,包括黄斑变性;这些仅仅是其中的一些例子。

[0031] 发明概述

[0032] 在一个实施方案中,本发明涉及嵌合抗体或嵌合抗体片段、或人源化抗体或人源化抗体片段,其识别并结合至 β -淀粉状蛋白上的至少一个独特的结合部位,特别是至少两个独特的结合部位,以及更特别是至少三个独特的结合部位,其中所述的一个、所述的至少两个和所述的至少三个结合部位的每一个部位均包含主要参与抗体结合的至少一个氨基酸残基或至少两个连续的氨基酸残基。

[0033] 具体而言,根据本发明的嵌合抗体或嵌合抗体片段、或人源化抗体或人源化抗体片段结合 β -淀粉状蛋白上的至少两个、特别是至少三个独特的结合部位,其中三个独特的结合部位中的至少两个包含主要参与抗体结合的至少两个连续的氨基酸残基,并且三个独特的结合部位中的至少一个包含至少一个氨基酸残基。

[0034] 所述的至少两个独特的结合部位在抗原上彼此密切接近地定位,被至少一个不参与抗体结合或与所述的至少两个连续的氨基酸残基相比参与抗体结合程度显著较小的至少一个氨基酸残基隔开和/或侧翼为所述氨基酸,从而形成构象不连续的表位,其中所述独特的结合部位包含至少两个连续的主要参与抗体结合的氨基酸残基。

[0035] 所述的至少三个独特的结合部位在表位上彼此密切接近地定位,被至少一个不参与抗体结合或与主要参与抗体结合的两个氨基酸残基相比参与抗体结合程度显著较小的至少一个氨基酸残基隔开和/或侧翼为所述氨基酸,从而形成构象不连续的表位,其中所述独特的结合部位分别包含主要参与抗体结合的至少两个连续的氨基酸残基和至少一个氨

氨基酸残基。

[0036] 具体而言,提供了嵌合抗体或嵌合抗体片段、或人源化抗体或人源化抗体片段,它们识别并结合至至 β -淀粉状蛋白上的至少一个独特的结合部位,特别是至少两个独特的结合部位,更特别的是至少三个独特的结合部位,其中所述的至少一个、或所述的至少两个独特的结合部位每一个包含至少两个连续的主要参与抗体结合的氨基酸残基,其中代表第一结合部位的至少两个连续的氨基酸残基是埋在以下核心序列 (SEQ ID NO :9) 中的 -Phe-Phe- :

[0037] Xaa₃-Phe-Phe-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆, 其中

[0038] Xaa₃ 是选自 Ala、Val、Leu、正亮氨酸、Met、Phe 和 Ile 的氨基酸残基 ;

[0039] Xaa₄ 是选自 Ala、Val、Leu、Ser 和 Ile 的氨基酸残基 ;

[0040] Xaa₅ 是选自 Glu 和 Asp 的氨基酸残基 ;

[0041] Xaa₆ 是选自 Glu 和 Asp 的氨基酸残基 ;并且其中所述的氨基酸残基 Xaa₃、Xaa₄、Xaa₅ 和 Xaa₆ 不参与抗体结合或与 -Phe-Phe- 结合部位相比参与抗体结合程度较小至显著较小。

[0042] 在本发明的另一个实施方案中,提供了嵌合抗体或嵌合抗体片段、或人源化抗体或人源化抗体片段,其中

[0043] Xaa₃ 是 Val 或 Leu,但尤其是 Val ;

[0044] Xaa₄ 是 Ala 或 Val,但尤其是 Ala ;

[0045] Xaa₅ 是 Glu 或 Asp,但尤其是 Glu ;

[0046] Xaa₆ 是 Glu 或 Asp,但尤其是 Asp。

[0047] 具体而言,提供了嵌合抗体或嵌合抗体片段、或人源化抗体或人源化抗体片段,其识别并结合至至 β -淀粉状蛋白上的至少一个独特的结合部位,特别是至少两个独特的结合部位,更特别的是至少三个独特的结合部位,其中所述的独特的结合部位分别包含主要参与抗体结合的至少一个和至少两个连续的氨基酸残基,其中代表第一个结合部位的至少两个连续的氨基酸残基是埋在以下核心序列中的 -Phe-Phe-,且至少一个氨基酸残基是埋在以下核心序列中的 -His- :

[0048] -Xaa₁-His-Xaa₃-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆-Phe-Phe-Xaa₇-Xaa₈-Xaa₉-

[0049] 其中,

[0050] Xaa₁ 是选自 His、Asn、Gln、Lys 和 Arg 的氨基酸残基 ;

[0051] Xaa₃ 是选自 Asn 和 Gln 的氨基酸残基 ;

[0052] Xaa₄ 是选自 His、Asn、Gln、Lys 和 Arg 的氨基酸残基 ;

[0053] Xaa₅ 是选自 Ala、Val、Leu、Ser 和 Ile 的氨基酸残基 ;

[0054] Xaa₆ 是选自 Ala、Val、Leu、正亮氨酸、Met、Phe 和 Ile 的氨基酸残基 ;

[0055] Xaa₇ 是选自 Ala、Val、Leu 和 Ile 的氨基酸残基 ;

[0056] Xaa₈ 是选自 Glu 和 Asp 的氨基酸残基 ;

[0057] Xaa₉ 是选自 Glu 和 Asp 的氨基酸残基 ;且其中所述的氨基酸残基 Xaa₁、Xaa₃、Xaa₆、Xaa₇、Xaa₈ 和 Xaa₉ 不参与抗体结合或与 -His- 和 -Phe-Phe- 结合部位相比参与抗体结合程度较小至显著较小。

[0058] 在本发明的另一个实施方案中,提供了嵌合抗体或嵌合抗体片段、或人源化抗体或人源化抗体片段,其中

[0059] Xaa₃ 是 Gln 或 Asn, 但尤其是 Gln ;

[0060] Xaa₄ 是 Lys ;

[0061] Xaa₅ 是 Leu ;

[0062] Xaa₆ 是 Val 或 Leu, 但尤其是 Val ;

[0063] Xaa₇ 是 Ala 或 Val, 但尤其是 Ala ;

[0064] Xaa₈ 是 Glu 或 Asp, 但尤其是 Glu ; 且

[0065] Xaa₉ 是 Asp 或 Glu, 但尤其是 Asp。

[0066] 在本发明的另一个实施方案中, 提供了嵌合抗体或嵌合抗体片段、或人源化抗体或人源化抗体片段, 其识别并结合至至 β -淀粉状蛋白上的至少一个独特的结合部位, 特别地至少两个独特的结合部位, 更特别地至少三个独特的结合部位, 其中所述的至少一个或所述的至少两个独特的结合部位每一个包含至少两个连续的主要参与抗体结合的氨基酸残基, 其中代表第二个结合部位的至少两个连续的氨基酸残基是埋在以下核心序列 (SEQID NO :10) 中的 -Lys-Leu- :

[0067] Xaa₁-Xaa₂-Lys-Leu-Xaa₃, 其中

[0068] Xaa₁ 是选自 His、Asn、Gln、Lys 和 Arg 的氨基酸残基 ;

[0069] Xaa₂ 是选自 Asn 和 Gln 的氨基酸残基 ;

[0070] Xaa₃ 是选自 Ala、Val、Leu、正亮氨酸、Met、Phe 和 Ile 的氨基酸残基 ; 且其中所述的氨基酸残基 Xaa₂、Xaa₃ 不参与抗体结合或与 -Lys-Leu- 结合部位相比参与抗体结合程度较小至显著较小。

[0071] 在本发明的另一个实施方案中, 提供了嵌合抗体或嵌合抗体片段、或人源化抗体或人源化抗体片段, 其识别并结合至至 β -淀粉状蛋白上的至少一个独特的结合部位, 特别地至少两个独特的结合部位, 更特别地至少三个独特的结合部位, 其中所述的独特的结合部位分别包含主要参与抗体结合的至少一个和至少两个连续的氨基酸残基, 其中被至少一个不参与抗体结合或与主要参与抗体结合的氨基酸残基相比参与抗体结合程度显著较小的氨基酸残基隔开的至少一个和至少两个连续的氨基酸分别是埋在以下核心序列中的 -His- 和 -Lys-Leu- :

[0072] -His-Xaa₂-Lys-Leu-Xaa₃-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆-Xaa₇-Xaa₈-

[0073] 其中

[0074] Xaa₂ 是选自 Asn 和 Gln 的氨基酸残基 ;

[0075] Xaa₃ 是选自 Ala、Val、Leu、正亮氨酸、Met、Phe 和 Ile 的氨基酸残基 ;

[0076] Xaa₄ 是选自 Ala、Val、Leu、正亮氨酸、Met、Phe 和 Ile 的氨基酸残基 ;

[0077] Xaa₅ 是选自 Ala、Val、Leu、正亮氨酸、Met、Phe 和 Ile 的氨基酸残基 ;

[0078] Xaa₆ 是选自 Ala、Val、Leu、Ser 和 Ile 的氨基酸残基 ;

[0079] Xaa₇ 是选自 Glu 和 Asp 的氨基酸残基 ;

[0080] Xaa₈ 是选自 Glu 和 Asp 的氨基酸残基 ;

[0081] 并且其中所述的氨基酸残基 Xaa₂、Xaa₃、Xaa₆、Xaa₇、Xaa₈ 分别不参与抗体结合或与 -His- 和 -Lys-Leu- 结合部位相比参与抗体结合程度较小至显著较小。

[0082] 在本发明的另一个实施方案中, 提供了嵌合抗体或嵌合抗体片段、或人源化抗体或人源化抗体片段, 其中

[0083] Xaa₂ 是 Gln 或 Asn,但尤其是 Gln ;

[0084] Xaa₃ 是 Val 或 Leu,但尤其是 Val ;

[0085] Xaa₄ 是 Phe ;

[0086] Xaa₅ 是 Phe ;

[0087] Xaa₆ 是 Ala 或 Val,但尤其是 Ala ;

[0088] Xaa₇ 是 Glu 或 Asp,但尤其是 Glu ;且

[0089] Xaa₈ 是 Asp 或 Glu,但尤其是 Asp。

[0090] 在本发明的另一个实施方案中,提供了嵌合抗体或嵌合抗体片段、或人源化抗体或人源化抗体片段,其识别并结合至 β -淀粉状蛋白上的至少两个独特的结合部位,其中所述的至少两个独特的结合部位每一个包含至少两个连续的主要参与抗体结合的氨基酸残基,其中该至少两个连续的氨基酸被至少一个不参与抗体结合或与所述的连续的氨基酸残基相比参与抗体结合程度显著较小的氨基酸残基隔开,其分别是埋在以下核心序列中的代表第一个和第二个结合部位的 -Phe-Phe- 和 -Lys-Leu- :

[0091] Xaa₁-Xaa₂-Lys-Leu-Xaa₃-Phe-Phe-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆, 其中

[0092] Xaa₁ 是选自 His、Asn、Gln、Lys 和 Arg 的氨基酸残基 ;

[0093] Xaa₂ 是选自 Asn 和 Gln 的氨基酸残基 ;

[0094] Xaa₃ 是选自 Ala、Val、Leu、正亮氨酸、Met、Phe 和 Ile 的氨基酸残基 ;

[0095] Xaa₄ 是选自 Ala、Val、Leu、Ser 和 Ile 的氨基酸残基 ;

[0096] Xaa₅ 是选自 Glu 和 Asp 的氨基酸残基 ;

[0097] Xaa₆ 是选自 Glu 和 Asp 的氨基酸残基 ;并且其中所述的氨基酸残基 Xaa₂、Xaa₃、Xaa₄、Xaa₅ 和 Xaa₆ 分别不参与抗体结合或与 -Lys-Leu- 和 -Phe-Phe- 结合部位相比参与抗体结合程度较小至显著较小。

[0098] 在本发明的另一个实施方案中,提供了嵌合抗体或嵌合抗体片段、或人源化抗体或人源化抗体片段,其识别并结合至 β -淀粉状蛋白上的至少一个独特的结合部位,特别地至少两个独特的结合部位,更特别地至少三个独特的结合部位,其中所述的独特的结合部位分别包含主要参与抗体结合的至少一个和至少两个连续的氨基酸残基,其中该至少一个和至少两个连续的氨基酸被至少一个不参与抗体结合或与主要参与抗体结合的氨基酸残基相比参与抗体结合程度显著较小的氨基酸残基隔开,其中所述氨基酸残基分别是埋在以下核心序列中的 -His- 和 -Phe-Phe- 和 -Lys-Leu- :

[0099] His-Xaa₂-Lys-Leu-Xaa₃-Phe-Phe-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆, 其中

[0100] Xaa₂ 是选自 Asn 和 Gln 的氨基酸残基 ;

[0101] Xaa₃ 是选自 Ala、Val、Leu、正亮氨酸、Met、Phe 和 Ile 的氨基酸残基 ;

[0102] Xaa₄ 是选自 Ala、Val、Leu、Ser 和 Ile 的氨基酸残基 ;

[0103] Xaa₅ 是选自 Glu 和 Asp 的氨基酸残基 ;

[0104] Xaa₆ 是选自 Glu 和 Asp 的氨基酸残基 ;并且其中所述的氨基酸残基 Xaa₂、Xaa₃、Xaa₄、Xaa₅ 和 Xaa₆ 分别不参与抗体结合或与 -His-、-Lys-Leu- 和 -Phe-Phe- 结合部位相比参与抗体结合程度较小至显著较小。

[0105] 在本发明的另一个实施方案中,提供了嵌合抗体或嵌合抗体片段、或人源化抗体或人源化抗体片段,其中

[0106] Xaa₂ 是 Gln 或 Asn, 但尤其是 Gln ;

[0107] Xaa₃ 是 Val 或 Leu, 但尤其是 Val ;

[0108] Xaa₄ 是 Ala 或 Val, 但尤其是 Ala ;

[0109] Xaa₅ 是 Glu 或 Asp, 但尤其是 Glu ; 且

[0110] Xaa₆ 是 Asp 或 Glu, 但尤其是 Asp。

[0111] 在本发明的另一个实施方案中, 提供了嵌合抗体或嵌合抗体片段、或人源化抗体或人源化抗体片段, 其识别并结合至 β -淀粉状蛋白上的至少两个独特的结合部位, 其中所述的至少两个独特的结合部位每一个包含至少两个连续的主要参与抗体结合的氨基酸残基, 其中该至少两个连续的氨基酸被至少一个不参与抗体结合或与所述的连续的氨基酸残基相比参与抗体结合程度显著较小的氨基酸残基隔开, 其分别是埋在以下核心序列中的代表第一个和第二个结合部位的 -Phe-Phe- 和 -Lys-Leu- :

[0112] Xaa₁-Xaa₂-Lys-Leu-Xaa₃-Phe-Phe-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆, 其中

[0113] Xaa₁ 是选自 His、Asn、Gln、Lys 和 Arg 的氨基酸残基 ;

[0114] Xaa₂ 是选自 Asn 和 Gln 的氨基酸残基 ;

[0115] Xaa₃ 是选自 Val、Ala、Leu、Met、Phe、正亮氨酸和 Ile 的氨基酸残基 ;

[0116] Xaa₄ 是选自 Ala、Val、Leu 和 Ile 的氨基酸残基 ;

[0117] Xaa₅ 是选自 Glu 和 Asp 的氨基酸残基 ;

[0118] Xaa₆ 是选自 Glu 和 Asp 的氨基酸残基 ; 并且其中所述的氨基酸残基 Xaa₂、Xaa₃、Xaa₄、Xaa₅ 和 Xaa₆ 分别不参与抗体结合或与 -Lys-Leu- 和 -Phe-Phe- 结合部位相比参与抗体结合程度较小至显著较小。

[0119] 在本发明的另一个实施方案中, 提供了嵌合抗体或嵌合抗体片段、或人源化抗体或人源化抗体片段, 其中

[0120] Xaa₁ 是 His 或 Arg, 但尤其是 His ;

[0121] Xaa₂ 是 Gln 或 Asn, 但尤其是 Gln ;

[0122] Xaa₃ 是 Val 或 Leu, 但尤其是 Val ;

[0123] Xaa₄ 是 Ala 或 Val, 但尤其是 Ala ;

[0124] Xaa₅ 是 Glu 或 Asp, 但尤其是 Glu ; 且

[0125] Xaa₆ 是 Asp 或 Glu, 但尤其是 Asp。

[0126] 在本发明的一个实施方案中, 提供了嵌合抗体或嵌合抗体片段、或人源化抗体或人源化抗体片段, 其识别并结合至 β -淀粉状蛋白上的至少两个独特的结合部位, 其中所述的至少两个独特的结合部位每一个包含至少两个连续的主要参与抗体结合的氨基酸残基, 其分别是 -Phe-Phe-Ala-Glu-, 特别是 -Phe-Phe-Ala-, 但尤其是 -Phe-Phe- 和 -Lys-Leu-, 并且其中所述的至少两个独特的结合部位分别呈现出 SEQ ID NO :7 所示的氨基酸序列 -Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp- 和 SEQ ID NO :8 所示的氨基酸序列 His-Gln-Lys-Leu-Val-。

[0127] 在本发明的一个实施方案中, 提供了嵌合抗体或嵌合抗体片段、或人源化抗体或人源化抗体片段, 其识别并结合至 β -淀粉状蛋白上的至少一个独特的结合部位, 特别地至少两个独特的结合部位, 更特别地至少三个独特的结合部位, 其中所述的至少一个或所述的至少两个独特的结合部位分别包含主要参与抗体结合的至少一个和至少两个连续的

氨基酸残基,其分别是 -Phe-Phe- 和 -Lys-Leu- 和 -His-,其中所述的独特的结合部位分别插入在氨基酸序列 -Val-Phe-Phe-Ala-Glu-,和氨基酸序列 -His-Gln-Lys-Leu-Val- 中。

[0128] 在本发明另一个实施方案中,嵌合抗体或嵌合抗体片段、或人源化抗体或人源化抗体片段包含识别并结合至 β -淀粉状蛋白上的至少两个独特的结合部位的抗原识别和结合部位,其中所述的至少两个独特的结合部位每一个包含分别在 SEQ ID NO:7 和 8 中给出的氨基酸序列中的至少两个连续的氨基酸残基,其中所述的连续的氨基酸残基,特别地是 -Phe-Phe- 和 -Lys-Leu- 主要参与结合 β -淀粉状蛋白。

[0129] 在本发明另一个特别的实施方案中,提供了根据本发明的抗体或其片段,其结合 β -淀粉状蛋白上的 4 个独特的结合部位,其中所述的 4 个独特的结合部位包括 2 个每一个包含一个氨基酸残基的结合部位和 2 个每一个包含两个连续的氨基酸残基的结合部位,所述残基主要参与抗体结合,其中所述的 4 个独特的结合部位在 β -淀粉状蛋白上彼此密切接近地定位,并且所述 4 个结合部位分别被至少一个不参与抗体结合或参与结合但与 4 个独特的结合部位的所述一个氨基酸残基和所述两个连续的氨基酸残基相比参与抗体结合程度显著较小的氨基酸残基隔开,因此形成构象不连续的表位。

[0130] 具体而言,第一种两个连续的主要参与抗体结合的氨基酸残基是埋在以下核心序列中的 -Lys-Leu-,且第二种至少两个连续的氨基酸残基是埋在以下核心序列中的 -Phe-Phe-;第一种单氨基酸残基是埋在以下核心序列中的 -His-且第二种单氨基酸残基是埋在以下核心序列中的 -Asp-:

[0131] -Xaa₁-His-Xaa₂-Lys-Leu-Xaa₃-Phe-Phe-Xaa₄-Xaa₅-Asp-Xaa₆,其中

[0132] Xaa₁ 是选自 His、Asn、Gln、Lys 和 Arg 的氨基酸残基,但尤其是 His;

[0133] Xaa₂ 是选自 Asn 和 Gln 的氨基酸残基,但尤其是 Gln;

[0134] Xaa₃ 是选自 Ala、Val、Leu、正亮氨酸、Met、Phe 和 Ile 的氨基酸残基,但尤其是 Val。

[0135] Xaa₄ 是选自 Ala、Val、Leu、Ser 和 Ile 的氨基酸残基,但尤其是 Ala;

[0136] Xaa₅ 是选自 Glu 和 Asp 的氨基酸残基,但尤其是 Glu;

[0137] Xaa₆ 是选自 Ala、Val、Leu、正亮氨酸、Met、Phe 和 Ile 的氨基酸残基,但尤其是 Val;并且其中所述的氨基酸残基 Xaa₁、Xaa₂、Xaa₃、Xaa₄、Xaa₅ 和 Xaa₆ 不参与抗体结合或参与结合但与 -His-、-Asp-、-Lys-Leu- 和 -Phe-Phe- 结合部位相比参与抗体结合程度显著较小。

[0138] 在一个实施方案中,本发明涉及根据本发明的抗体或其片段,其结合 β -淀粉状蛋白上的 4 个独特的结合部位,其中所述的 4 个独特的结合部位包括 2 个每一个包含一个氨基酸残基的结合部位和 2 个每一个包含两个连续的氨基酸残基的结合部位,其中第一种两个连续的主要参与抗体结合的氨基酸残基是埋在以下核心序列中的 -Lys-Leu-,且第二种至少两个连续的氨基酸残基是埋在以下核心序列中的 -Phe-Phe-;第一种单氨基酸残基是埋在以下核心序列中的 -His-且第二种单氨基酸残基是埋在以下核心序列中的 -Asp-:

[0139] -Xaa₁-His-Xaa₂-Lys-Leu-Xaa₃-Phe-Phe-Xaa₄-Xaa₅-Asp-Xaa₆,其中

[0140] Xaa₁ 是选自 His、Asn、Gln、Lys 和 Arg 的氨基酸残基,但尤其是 His;

[0141] Xaa₂ 是选自 Asn 和 Gln 的氨基酸残基,但尤其是 Gln;

[0142] Xaa₃ 是选自 Ala、Val、Leu、正亮氨酸、Met、Phe 和 Ile 的氨基酸残基,但尤其是 Val。

[0143] Xaa₄ 是选自 Ala、Val、Leu、Ser 和 Ile 的氨基酸残基,但尤其是 Ala;

[0144] Xaa₅ 是选自 Glu 和 Asp 的氨基酸残基,但尤其是 Glu;

[0145] Xaa₆ 是选自 Ala、Val、Leu、正亮氨酸、Met、Phe 和 Ile 的氨基酸残基,但尤其是 Val; 并且其中所述的氨基酸残基 Xaa₁、Xaa₂、Xaa₃、Xaa₄、Xaa₅ 和 Xaa₆ 不参与抗体结合或参与结合但与 -His-、-Asp-、-Lys-Leu- 和 -Phe-Phe- 结合部位相比参与抗体结合程度显著较小。

[0146] 在本发明特定的实施方案中,如上文所定义的识别和结合部位形成了位于 β-淀粉状蛋白的 12 至 24 位氨基酸残基之间、特别地 14 至 23 位氨基酸残基之间、更特别地 14 至 20 位氨基酸残基之间区域内的构象上不连续的表位,其中每一包至少 2 个氨基酸残基的至少两个独特的识别和结合部位分别位于位置 16 和 17 以及位置 19 和 20,并且其中包含至少 1 个氨基酸残基的至少一个独特的识别和结合部位位于位置 14,所述残基主要参与 β-淀粉状蛋白的结合且其中所述独特的识别和结合部位至少在一侧的侧翼存在氨基酸残基,特别地是残基 21 和 22,并且被位于位置 15 和 18 的一个氨基酸残基隔开,所述氨基酸残基不直接参与抗原的结合,或至少基本上更小的程度。

[0147] 又在本发明的另一个实施方案中,所述的至少三个独特的识别和结合部位在两侧均存在氨基酸残基,特别地是残基 12 和 13、以及残基 21 和 22,并且被位于位置 15 和 18 的一个氨基酸残基隔开,所述氨基酸残基不直接参与抗原的结合,或至少基本上更小的程度。

[0148] 在特别的实施方案中,所述的主要参与 β-淀粉状蛋白结合连续氨基酸残基,特别地在位置 16 和 17 的 -Lys-Leu- 和在位置 19 和 20 的 -Phe-Phe-,被嵌入到以下核心区域内:

[0149]

Val-	His-	His-	Gln-	Lys-	Leu-	Val-	Phe-	Phe-	Ala-	Glu-	Asp
12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23

[0150] 在另一个特别的实施方案中,所述的主要参与 β-淀粉状蛋白结合的氨基酸残基,特别地在位置 16 和 17 的 -Lys-Leu- 和在位置 19 和 20 的 -Phe-Phe-,以及在位置 14 的 -His- 被嵌入到以下核心区域内:

[0151]

Val-	12	Val-	18	Phe-	19	Phe-	20	Ala-	21	Glu-	22	Asp-	23	Val-	24	Gly-	25
------	----	------	----	------	----	------	----	------	----	------	----	------	----	------	----	------	----

[0152] 在本发明的另一个实施方案中,提供了人源化抗体或人源化抗体片段,其分别在轻链可变区和重链可变区中包含插入在一个或多个人类或灵长类动物衍生的构架区中的至少一个非人源 CDR,特别地两个非人源 CDR,更特别地三个非人源 CDR,并且任选地包含衍生自人类或灵长类动物源抗体的恒定区,所述人源化抗体或人源化抗体片段能够在包含以

下氨基酸序列 (SEQ ID NO :11) 的表位处特异地识别并结合 β -淀粉状蛋白,特别地 β -淀粉状蛋白单体肽,更特别地 β -淀粉状蛋白聚合肽,甚至更特别地分离的或作为 β -淀粉状蛋白斑一部分的 β -淀粉状蛋白纤维、原纤维或纤丝:

[0153] Xaa₁-Xaa₂-Lys-Leu-Xaa₃-Phe-Phe-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆,

[0154] 其中,

[0155] Xaa₁ 是选自 His、Asn、Gln 的氨基酸残基,但尤其是 His;

[0156] Xaa₂ 是选自 Asn 和 Gln 的氨基酸残基,但尤其是 Gln;

[0157] Xaa₃ 是选自 Val、Leu 和 Ile 的氨基酸残基,但尤其是 Val;

[0158] Xaa₄ 是选自 Ala 和 Val 的氨基酸残基,但尤其是 Ala;

[0159] Xaa₅ 是选自 Glu 和 Asp 的氨基酸残基,但尤其是 Glu;

[0160] Xaa₆ 是选自 Glu 和 Asp 的氨基酸残基,但尤其是 Asp。

[0161] 又在本发明的另一个实施方案中,提供了人源化抗体或人源化抗体片段,其分别在轻链可变区和重链可变区中包含插入在一个或多个人类或灵长类动物衍生的构架区中的至少一个非人源 CDR,特别地两个非人源 CDR,更特别地三个非人源 CDR,并且任选地包含衍生自人类或灵长类动物源抗体的恒定区,所述人源化抗体或人源化抗体片段能够在包含以下氨基酸序列的表位处特异地识别并结合 β -淀粉状蛋白,特别地 β -淀粉状蛋白单体肽,更特别地 β -淀粉状蛋白聚合肽,甚至更特别地分离的或作为 β -淀粉状蛋白斑一部分的 β -淀粉状蛋白纤维、原纤维或纤丝:

[0162] His-Xaa₂-Lys-Leu-Xaa₃-Phe-Phe-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆,

[0163] 其中,

[0164] Xaa₂ 是选自 Asn 和 Gln 的氨基酸残基,但尤其是 Gln;

[0165] Xaa₃ 是选自 Val、Leu 和 Ile 的氨基酸残基,但尤其是 Val;

[0166] Xaa₄ 是选自 Ala 和 Val 的氨基酸残基,但尤其是 Ala;

[0167] Xaa₅ 是选自 Glu 和 Asp 的氨基酸残基,但尤其是 Glu;

[0168] Xaa₆ 是选自 Glu 和 Asp 的氨基酸残基,但尤其是 Glu;并且其中所述的氨基酸残基 Xaa₂、Xaa₃、Xaa₄、Xaa₅ 和 Xaa₆ 不参与抗体结合或与 -His-、-Lys-Leu- 和 -Phe-Phe- 结合部位相比参与抗体结合程度显著较小。

[0169] 在本发明特定的实施方案中,从供体抗体、特别地从鼠的供体抗体得到非人源 CDR,所述抗体是针对不包含所述的独特的结合部位的抗原片段而产生的。在表位区域的变动可能至少部分地是由超分子抗原构建体的应用引起的,该超分子抗原构建体包含与 β -淀粉状蛋白肽、特别地与 β -淀粉状蛋白肽 A β ₁₋₁₆ 氨基酸序列相对应的抗原肽,该抗原肽用亲水部分,例如,诸如聚乙二醇 (PEG) 修饰,其中所述的亲水部分通过至少一个,特别地一个或两个氨基酸,例如,诸如赖氨酸、谷氨酸和半胱氨酸或任何其它能够作为亲水部分偶联到肽片的连接装置的合适的氨基酸或氨基酸类似物,而共价地连接到每个抗原肽的末端,如在下文中免疫方法中所描述的那样。如本文所描述的那样,当利用 PEG 作为亲水部分时,游离 PEG 末端共价地连接到磷脂酰乙醇胺或任何其它适合于作为锚定元件的化合物上,例如,以将抗原性构建体嵌到脂质体的双分子层中。

[0170] 具体而言,从下述鼠供体抗体获得非人源 CDR,其中所述抗体展示出根据布达佩斯条约于 2005 年 12 月 1 日以保藏号 DSM ACC2750 保藏在位于德国布劳恩斯切魏格,38124

布劳恩斯切魏格, 马斯切尔奥德尔韦格 1B 的“德意志微生物保藏中心 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ)”中的 ACI-01-Ab7C2 (在本申请中也称为“mC2”) 的特征性特性。

[0171] 在本发明的一个实施方案中, 从鼠供体抗体 ACI-01-Ab7C2 (在本申请中也称为“mC2”) 获得非人源 CDR, 所述抗体根据布达佩斯条约于 2005 年 12 月 1 日以保藏号 DSM ACC2750 保藏在位于德国布劳恩斯切魏格, 38124 布劳恩斯切魏格, 马斯切尔奥德尔韦格 1B 的“德意志微生物保藏中心 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ)”中。

[0172] 将脂质 A 用作免疫方案的一部分也能促进表位区域中的变动。

[0173] 在特定的实施方案中, 本发明涉及人源化抗体或人源化抗体片段, 包含整合到人类或灵长类动物衍生的构架区中的至少一个具有选自以下序列的氨基酸序列的肽: 代表重链可变区 (HCVR) CDR2 的 SEQ ID NO: 2 和代表重链可变区 (HCVR) CDR3 的 SEQ ID NO: 3, 以及代表轻链可变区 (LCVR) CDR1 的 SEQ ID NO: 4。

[0174] 在另一个实施方案中, 本发明涉及人源化抗体或人源化抗体片段, 其中所述的人源化抗体包含整合到人类或灵长类动物衍生的重链构架区中的至少一个具有选自以下序列的氨基酸序列的肽: 代表重链可变区 (HCVR) CDR2 的 SEQ ID NO: 2 和代表重链可变区 (HCVR) CDR3 的 SEQ ID NO: 3。

[0175] 又在另一个实施方案中, 本发明涉及人源化抗体或人源化抗体片段, 其中所述的人源化抗体包含整合到人类或灵长类动物衍生的轻链构架区中的具有代表轻链可变区 (LCVR) CDR1 的 SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列的肽。

[0176] 具体而言, 本发明涉及轻链可变区 (LCVR), 其包含整合到人类或灵长类动物衍生的构架区中的至少一个具有代表轻链可变区 (LCVR) CDR1 的 SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列的肽。

[0177] 在另一个特定的实施方案中, 本发明涉及重链可变区 (HCVR), 其包含整合到人类或灵长类动物衍生的构架区中的至少一个具有选自以下序列的氨基酸序列的肽: 代表重链可变区 (HCVR) CDR2 的 SEQ ID NO: 2 和代表重链可变区 (HCVR) CDR3 的 SEQ ID NO: 3。

[0178] 本发明还涉及人源化抗体或人源化抗体片段, 其包含整合到人类或灵长类动物衍生的构架区中的至少两个肽, 所述的肽是不同的且展示出选自以下序列的氨基酸序列: 代表重链可变区 (HCVR) CDR1 的 SEQ ID NO: 1、代表重链可变区 (HCVR) CDR2 的 SEQ ID NO: 2 和代表重链可变区 (HCVR) CDR3 的 SEQ ID NO: 3, 以及代表轻链可变区 (LCVR) CDR1 的 SEQ ID NO: 4、代表轻链可变区 (LCVR) CDR2 的 SEQ ID NO: 5 和代表轻链可变区 (LCVR) CDR3 的 SEQ ID NO: 6, 其中相同的 CDR 不能在抗体中出现两次。具体而言, 如果存在的至少两个 CDR 都是轻链可变区 (LCVR) 的 CDR, 则至少一个所述 CDR 必须是由 SEQ ID NO: 4 代表的 CDR1。

[0179] 本发明还包括人源化抗体或人源化抗体片段, 包含整合到人类或灵长类动物衍生的重链构架区中的至少两个具有选自以下序列的氨基酸序列的肽: 代表重链可变区 (HCVR) CDR1 的 SEQ ID NO: 1、代表重链可变区 (HCVR) CDR2 的 SEQ ID NO: 2 和代表重链可变区 (HCVR) CDR3 的 SEQ ID NO: 3; 但特别地是这样的人源化抗体或人源化抗体片段, 其中相同的 CDR 不能在该抗体中出现两次。

[0180] 具体而言, 本发明涉及重链可变区 (HCVR), 其包含整合到人类或灵长类动物衍

生的重链构架区中的至少两个具有选自以下序列的氨基酸序列的肽：代表重链可变区 (HCVR) CDR1 的 SEQ ID NO :1、代表重链可变区 (HCVR) CDR2 的 SEQ ID NO :2 和代表重链可变区 (HCVR) CDR3 的 SEQ ID NO :3。

[0181] 在其它实施方案中,本发明涉及人源化抗体或人源化抗体片段,包含整合到人类或灵长类动物衍生的轻链构架区中的至少两个具有选自以下序列的氨基酸序列的肽：代表轻链可变区 (LCVR) CDR1 的 SEQ ID NO :4、代表轻链可变区 (LCVR) CDR2 的 SEQ ID NO :5 和代表轻链可变区 (LCVR) CDR3 的 SEQ ID NO :6。

[0182] 具体而言,本发明涉及轻链可变区 (LCVR),其具有整合到人类或灵长类动物衍生的轻链构架区中的至少两个具有选自以下序列的氨基酸序列的肽：代表轻链可变区 (LCVR) CDR1 的 SEQ ID NO :4、代表轻链可变区 (LCVR) CDR2 的 SEQ ID NO :5 和代表轻链可变区 (LCVR) CDR3 的 SEQ ID NO :6,其中相同的 CDR 不能在该抗体中出现两次,具体而言,至少一个所述 CDR 必须是由 SEQ ID NO :4 代表的 CDR1。

[0183] 本发明还涉及人源化抗体或人源化抗体片段,包含整合到人类或灵长类动物衍生的重链构架区中的具有以下氨基酸序列的肽：代表重链可变区 (HCVR) CDR1 的 SEQ ID NO :1、代表重链可变区 (HCVR) CDR2 的 SEQ ID NO :2 和代表重链可变区 (HCVR) CDR3 的 SEQ ID NO :3,特别地以上面所指出的顺序。

[0184] 具体而言,本发明涉及重链可变区 (HCVR),其包含整合到人类或灵长类动物衍生的重链构架区中的具有以下氨基酸序列的肽：代表重链可变区 (HCVR) CDR1 的 SEQ ID NO :1、代表重链可变区 (HCVR) CDR2 的 SEQ ID NO :2 和代表重链可变区 (HCVR) CDR3 的 SEQ ID NO :3,特别地以上面所指出的顺序。

[0185] 本发明还包括人源化抗体或人源化抗体片段,其包含整合到人类或灵长类动物衍生的轻链构架区中的具有以下氨基酸序列的肽：代表轻链可变区 (LCVR) CDR1 的 SEQ ID NO :4、代表轻链可变区 (LCVR) CDR2 的 SEQ ID NO :5 和代表轻链可变区 (LCVR) CDR3 的 SEQ ID NO :6,特别地以上面所指出的顺序。

[0186] 具体而言,本发明涉及轻链可变区 (LCVR),包含整合到人类或灵长类动物衍生的轻链构架区中的具有以下氨基酸序列的肽：代表轻链可变区 (LCVR) CDR1 的 SEQ ID NO :4、代表轻链可变区 (LCVR) CDR2 的 SEQ ID NO :5 和代表轻链可变区 (LCVR) CDR3 的 SEQ ID NO :6,特别地以上面所指出的顺序。

[0187] 本发明还涉及人源化抗体或人源化抗体片段,包含整合到人类或灵长类动物衍生的构架区中的至少三个具有选自以下序列的氨基酸序列的肽：代表重链可变区 (HCVR) CDR1 的 SEQ ID NO :1、代表重链可变区 (HCVR) CDR2 的 SEQ ID NO :2 和代表重链可变区 (HCVR) CDR3 的 SEQ ID NO :3,以及代表轻链可变区 (LCVR) CDR1 的 SEQ ID NO :4、代表轻链可变区 (LCVR) CDR2 的 SEQ ID NO :5 和代表轻链可变区 (LCVR) CDR3 的 SEQ ID NO :6,但特别地是这样的人源化抗体或人源化抗体片段,其中相同的 CDR 不能在该抗体中出现两次。

[0188] 在另一个实施方案中,本发明涉及人源化抗体或人源化抗体片段,所述抗体包含整合到人类或灵长类动物衍生的构架区中的至少四个具有选自以下序列的氨基酸序列的肽：代表重链可变区 (HCVR) CDR1 的 SEQ ID NO :1、代表重链可变区 (HCVR) CDR2 的 SEQ ID NO :2 和代表重链可变区 (HCVR) CDR3 的 SEQ ID NO :3,以及代表轻链可变区 (LCVR) CDR1 的 SEQ ID NO :4、代表轻链可变区 (LCVR) CDR2 的 SEQ ID NO :5 和代表轻链可变区 (LCVR) CDR3 的

SEQ ID NO :6,但特别地是这样的人源化抗体或人源化抗体片段,其中相同的 CDR 不能在该抗体中出现两次。

[0189] 在另一个实施方案中,本发明涉及人源化抗体或人源化抗体片段,包含整合到人类或灵长类动物衍生的构架区中的至少五个具有选自以下序列的氨基酸序列的肽:代表重链可变区 (HCVR) CDR1 的 SEQ ID NO :1、代表重链可变区 (HCVR) CDR2 的 SEQ ID NO :2 和代表重链可变区 (HCVR) CDR3 的 SEQ ID NO :3,以及代表轻链可变区 (LCVR) CDR1 的 SEQ ID NO :4、代表轻链可变区 (LCVR) CDR2 的 SEQ ID NO :5 和代表轻链可变区 (LCVR) CDR3 的 SEQ ID NO :6,但特别地是这样的人源化抗体或人源化抗体片段,其中相同的 CDR 不能在该抗体中出现两次。

[0190] 在另一个实施方案中,本发明涉及人源化抗体或人源化抗体片段,包含整合到人类或灵长类动物衍生的构架区中的具有以下氨基酸序列的肽:代表重链可变区 (HCVR) CDR1 的 SEQ ID NO :1、代表重链可变区 (HCVR) CDR2 的 SEQ ID NO :2 和代表重链可变区 (HCVR) CDR3 的 SEQ ID NO :3,以及代表轻链可变区 (LCVR) CDR1 的 SEQ ID NO :4、代表轻链可变区 (LCVR) CDR2 的 SEQ ID NO :5 和代表轻链可变区 (LCVR) CDR3 的 SEQ ID NO :6。

[0191] 在特定的实施方案中,本发明涉及人源化抗体、重链可变区 (HCVR)、或其片段,其中所述的人源化抗体、重链可变区 (HCVR) 或其片段至少包含整合到人类或灵长类动物衍生的重链构架区中的具有代表重链可变区 (HCVR) CDR2 的 SEQ ID NO :2 氨基酸序列的肽。

[0192] 在另一特定的实施方案中,本发明涉及人源化抗体、重链可变区 (HCVR)、或其片段,其中所述的人源化抗体、重链可变区 (HCVR) 或其片段至少包含整合到人类或灵长类动物衍生的重链构架区中的具有代表重链可变区 (HCVR) CDR3 的 SEQ ID NO :3 氨基酸序列的肽。

[0193] 在另一特定的实施方案中,本发明涉及人源化抗体、重链可变区 (HCVR)、或其片段,所述的抗体、重链可变区 (HCVR) 或其片段包含整合到人类或灵长类动物衍生的重链构架区中的至少两个具有以下氨基酸序列的肽:代表重链可变区 (HCVR) CDR1 的 SEQ ID NO :1 和代表重链可变区 (HCVR) CDR2 的 SEQ ID NO :2。

[0194] 在另一特定的实施方案中,本发明涉及人源化抗体、重链可变区 (HCVR)、或其片段,所述的抗体、重链可变区 (HCVR) 或其片段包含整合到人类或灵长类动物衍生的重链构架区中的至少两个具有以下氨基酸序列的肽:代表重链可变区 (HCVR) CDR1 的 SEQ ID NO :1 和代表重链可变区 (HCVR) CDR3 的 SEQ ID NO :3。

[0195] 在另一特定的实施方案中,本发明涉及人源化抗体、重链可变区 (HCVR)、或其片段,所述的抗体、重链可变区 (HCVR) 或其片段包含整合到人类或灵长类动物衍生的重链构架区中的至少两个具有以下氨基酸序列的肽:代表重链可变区 (HCVR) CDR2 的 SEQ ID NO :2 和代表重链可变区 (HCVR) CDR3 的 SEQ ID NO :3。

[0196] 在另一特定的实施方案中,本发明涉及人源化抗体、轻链可变区 (LCVR)、或其片段,所述的抗体、轻链可变区 (LCVR) 或其片段包含整合到人类或灵长类动物衍生的重链构架区中的至少两个具有以下氨基酸序列的肽:代表轻链可变区 (LCVR) CDR1 的 SEQ ID NO :4 和代表轻链可变区 (LCVR) CDR2 的 SEQ ID NO :5。

[0197] 在另一特定的实施方案中,本发明涉及人源化抗体、轻链可变区 (LCVR)、或其片段,所述的抗体、轻链可变区 (LCVR) 或其片段包含整合到人类或灵长类动物衍生的重链构

架区中的至少两个具有以下氨基酸序列的肽：代表轻链可变区 (LCVR) CDR1 的 SEQ ID NO :4 和代表轻链可变区 (LCVR) CDR3 的 SEQ ID NO :6。

[0198] 本发明还包含人源化抗体或人源化抗体片段,其中小鼠 C2 抗体的重链可变区 (HCVR) 和轻链可变区 (LCVR) 的每一个均贡献了至少一个其 CDR 区给人源化抗体的至少两个 CDR 区。所得到的人源化抗体或人源化抗体片段因此可以包含：

[0199] - 至少和代表 CDR1 (LCVR) 的 SEQ ID NO :4 的氨基酸序列联合的代表 CDR1 (HCVR) 的 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列；

[0200] - 至少和代表 CDR1 (LCVR) 的 SEQ ID NO :4 的氨基酸序列联合的代表 CDR2 (HCVR) 的 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列；

[0201] - 至少和代表 CDR1 (LCVR) 的 SEQ ID NO :4 的氨基酸序列联合的代表 CDR3 (HCVR) 的 SEQ ID NO :3 的氨基酸序列；

[0202] - 至少和代表 CDR2 (LCVR) 的 SEQ ID NO :5 的氨基酸序列联合的代表 CDR1 (HCVR) 的 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列；

[0203] - 至少和代表 CDR2 (LCVR) 的 SEQ ID NO :5 的氨基酸序列联合的代表 CDR2 (HCVR) 的 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列；

[0204] - 至少和代表 CDR3 (LCVR) 的 SEQ ID NO :6 的氨基酸序列联合的代表 CDR2 (HCVR) 的 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列；

[0205] - 至少和代表 CDR3 (LCVR) 的 SEQ ID NO :6 的氨基酸序列联合的代表 CDR1 (HCVR) 的 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列；

[0206] - 至少和代表 CDR2 (LCVR) 的 SEQ ID NO :5 的氨基酸序列联合的代表 CDR3 (HCVR) 的 SEQ ID NO :3 的氨基酸序列；

[0207] - 至少和代表 CDR3 (LCVR) 的 SEQ ID NO :6 的氨基酸序列联合的代表 CDR3 (HCVR) 的 SEQ ID NO :3 的氨基酸序列。

[0208] 在另一实施方案中,本发明涉及上文描述的嵌合抗体或嵌合抗体片段,或人源化抗体或人源化抗体片段,所述抗体包含人类或灵长类动物来源的轻链和 / 或重链恒定区。

[0209] 在另一个实施方案中,本发明涉及嵌合抗体或嵌合抗体片段,或人源化抗体或人源化抗体片段,其中通过保守替换改变至少一个,特别地至少一个但不超过 5 个、更特别地至少一个但不超过 4 个、甚至更特别地至少一个但不超过 3 个、但尤其是至少一个但不超过 2 个如 SEQ ID NO :1-6 给出的代表轻链和 / 或重链 CDR 区的氨基酸,以至于该抗体保留了其完全的功能。

[0210] 具体而言,本发明涉及嵌合抗体或嵌合抗体片段,或人源化抗体或人源化抗体片段,其中在如 SEQ ID NO :5 给出的轻链可变区 (LCVR) 的 CDR2 中,在 Kabat 位置 50 处的 Lys 被选自 Arg、Gln 和 Glu 的氨基酸残基、特别地被 Arg 替换。

[0211] 具体而言,本发明涉及轻链可变区 (LCVR),其中在如 SEQ ID NO :5 给出的 CDR2 中,在 Kabat 位置 50 处的 Lys 被选自 Arg、Gln 和 Glu 的氨基酸残基、特别地被 Arg 替换。

[0212] 在另一实施方案中,本发明涉及嵌合抗体或嵌合抗体片段,或人源化抗体或人源化抗体片段,其中在如 SEQ ID NO :5 给出的轻链可变区 (LCVR) 的 CDR2 中,在 Kabat 位置 53 处的 Ser 被选自 Asn 和 Thr 的氨基酸残基、特别地被 Asn 替换。

[0213] 具体而言,本发明涉及轻链可变区 (LCVR),其中在如 SEQ ID NO :5 给出的 CDR2 中,

在 Kabat 位置 53 处的 Ser 被选自 Asn 和 Thr 的氨基酸残基、特别地被 Asn 替换。

[0214] 在本发明的一个实施方案中,提供了嵌合抗体或嵌合抗体片段,或人源化抗体或人源化抗体片段,其中重链可变区 (HCVR) 具有分别与 SEQ ID NO :15 和 16 给出的序列 90%、特别地 95%、更特别地 98% 同一的氨基酸序列。

[0215] 在本发明的另一个实施方案中,提供了嵌合抗体或嵌合抗体片段,或人源化抗体或人源化抗体片段,其中轻链可变区 (LCVR) 具有分别与 SEQ ID NO :12 和 13 给出的序列 90%、特别地 95%、更特别地 98% 同一的氨基酸序列。

[0216] 在本发明的再另一个实施方案中,提供了人源化抗体或人源化抗体片段,其中重链可变区 (HCVR) 的至少两个、但尤其是三个 CDR 区具有与 SEQ ID NO :1-3 给出的相应的 CDR 区 90%、特别地 95%、更特别地 98% 同一的氨基酸序列。

[0217] 在本发明的其它实施方案中,提供了人源化抗体或人源化抗体片段,其中轻链可变区 (LCVR) 的至少两个、但尤其是三个 CDR 区具有与 SEQ ID NO :4-6 给出的相应的 CDR 区 90%、特别地 95%、更特别地 98% 同一的氨基酸序列。

[0218] 又在另一个实施方案中,本发明涉及上文描述的根据本发明的嵌合抗体或嵌合抗体片段,或人源化抗体或人源化抗体片段,其中重链可变区 (HCVR) 具有分别与 SEQ ID NO :15 和 16 给出的序列 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一的氨基酸序列。

[0219] 又在另一个实施方案中,本发明涉及上文描述的根据本发明的嵌合抗体或嵌合抗体片段,或人源化抗体或人源化抗体片段,其中轻链可变区 (LCVR) 具有分别与 SEQ ID NO :12 和 13 给出的序列 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一的氨基酸序列。

[0220] 又在另一个实施方案中,本发明涉及上文描述的根据本发明的嵌合抗体或嵌合抗体片段,或人源化抗体或人源化抗体片段,其中重链可变区 (HCVR) 的至少一个、特别地至少两个、但尤其是三个 CDR 区具有与 SEQ ID NO :1-3 给出的相应的 CDR 区 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一的氨基酸序列。

[0221] 又在另一个实施方案中,本发明涉及上文描述的根据本发明的嵌合抗体或嵌合抗体片段,或人源化抗体或人源化抗体片段,其中轻链可变区 (LCVR) 的至少一个、特别地至少两个、但尤其是三个 CDR 区具有与 SEQ ID NO :4-6 给出的相应的 CDR 区 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一的氨基酸序列。

[0222] 又在另一个实施方案中,本发明涉及上文描述的根据本发明的人源化抗体,其中通过替换为来自鼠抗体 ACI-01-Ab7C2 的相应区域的氨基酸或与之保守的替换来改变分别获自人类种系 (human germline) V_H 和 V_K 序列的受体构架序列的至少一个氨基酸。

[0223] 具体而言,本发明涉及重链可变区和分别包含该重链可变区的人源化抗体,其中在获自人类种系重链可变区 KABAT 亚组 V_H III 的 V_H 序列的受体构架序列中 Kabat 位置 47 处的 Trp 被选自 Leu、正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala 和 Phe 的氨基酸、特别地被选自 Leu 和 Ile 的氨基酸、但尤其是被 Leu 替换,诸如如 SEQ ID NO :15 所示。

[0224] 本发明还分别涉及重链可变区和包含该重链可变区的人源化抗体,其中在获自人类种系重链可变区 KABAT 亚组 V_H III 的 V_H 序列的受体构架序列中 Kabat 位置 94 处的 Arg 被选自 Ser 和 Thr 的氨基酸、但尤其是被 Ser 替换,诸如如 SEQ ID NO :15 所示。

[0225] 又在另一个实施方案中,本发明分别涉及重链可变区和包含该重链可变区的人源化抗体,其中在获自人类种系重链可变区 KABAT 亚组 V_H III 的 V_H 序列的受体构架序列中 Kabat 位置 47 处的 Trp 被选自 Leu、正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala 和 Phe 的氨基酸、特别地被选自 Leu 和 Ile 的氨基酸、但尤其是被 Ser 替换,并且 Kabat 位置 94 处的 Arg 被选自 Ser 和 Thr 的氨基酸、但尤其是被 Ser 替换,诸如如 SEQ ID NO:15 所示。

[0226] 本发明还分别涉及轻链可变区和包含该轻链可变区的人源化抗体,其中在获自人类种系轻链可变区 KABAT 亚组 V_k II 的 V_k 序列的受体构架序列中 Kabat 位置 45 处的 Gln 被选自 Lys、Arg、Gln 和 Asn 的氨基酸、特别地被选自 Lys 和 Arg 的氨基酸、但尤其是被 Lys 替换。

[0227] 本发明还分别涉及轻链可变区和包含该轻链可变区的人源化抗体,其中在获自人类种系轻链可变区 KABAT 亚组 V_k II 的 V_k 序列的受体构架序列中 Kabat 位置 87 处的 Tyr 被选自 Phe、Leu、Val、Ile 和 Ala 的氨基酸、特别地被选自 Leu 和 Phe 的氨基酸、但尤其是被 Phe 替换。

[0228] 本发明还分别涉及轻链可变区和包含该轻链可变区的人源化抗体,其中在获自小鼠单克隆抗体、特别地鼠抗体 ACI-01-Ab7C2 的 CDR2 区(诸如如 SEQ ID NO:12 所示)的 Kabat 位置 50 处的 Lys 被选自 Arg、Gln、His 和 Asn 的氨基酸、但尤其是被 Arg 替换。

[0229] 又在另一个实施方案中,本发明分别涉及轻链可变区和包含该轻链可变区的人源化抗体,其中在获自小鼠单克隆抗体、特别地鼠抗体 ACI-01-Ab7C2 的 CDR2 区(诸如如 SEQ ID NO:12 所示)的 Kabat 位置 53 处的 Asn 被选自 Ala、Val、Leu、Ser 和 Ile 的氨基酸、但尤其是被 Ser 替换。

[0230] 又在另一个实施方案中,本发明涉及人源化抗体,其中在获自人类种系重链可变区 KABAT 亚组 V_H III 的 V_H 序列的受体构架序列中 Kabat 位置 47 处的 Trp 被选自 Leu、正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala 和 Phe 的氨基酸、特别地被选自 Leu 和 Ile 的氨基酸、但尤其是被 Leu 替换;并且在获自人类种系重链可变区 KABAT 亚组 V_H III 的 V_H 序列的受体构架序列中 Kabat 位置 94 的 Arg 被选自 Ser 和 Thr 的氨基酸、但尤其是被 Ser 替换,诸如如 SEQ ID NO:15 所示;且在获自人类种系轻链可变区 KABAT 亚组 V_k II 的 V_k 序列的受体构架序列中 Kabat 位置 87 的 Tyr 被选自 Phe、Leu、Val、Ile 和 Ala 的氨基酸、特别地被选自 Leu 和 Phe 的氨基酸、但尤其是被 Phe 替换。

[0231] 又在另一个实施方案中,本发明分别涉及重链可变区和包含该重链可变区的人源化抗体,其中在获自人类种系重链可变区 KABAT 亚组 V_H III 的 V_H 序列的受体构架序列(如 SEQ ID NO:15 所示)中 Kabat 位置 47 的 Trp 被 Leu 替换。

[0232] 又在另一个实施方案中,本发明分别涉及重链可变区和包含该重链可变区的人源化抗体,其中在获自人类种系重链可变区 KABAT 亚组 V_H III 的 V_H 序列的受体构架序列中 Kabat 位置 94 的 Arg 被 Ser 替换,诸如如 SEQ ID NO:15 所示。

[0233] 又在另一个实施方案中,本发明分别涉及重链可变区和包含该重链可变区的人源化抗体,其中在获自人类种系重链可变区 KABAT 亚组 V_H III 的 V_H 序列的受体构架序列中 Kabat 位置 47 的 Trp 被 Leu 或 Ile、但尤其是被 Leu 替换;并且在获自人类种系重链可变区 KABAT 亚组 V_H III 的 V_H 序列的受体构架序列中 Kabat 位置 94 的 Arg 被 Ser 替换,诸如如 SEQ IDNO:15 所示。

[0234] 又在另一个实施方案中,本发明分别涉及轻链可变区和包含该轻链可变区的人源化抗体,其中在获自人类种系轻链可变区 KABAT 亚组 V_k II 的 V_k 序列的受体构架序列中 Kabat 位置 87 的 Tyr 被 Phe 替换。

[0235] 又在另一个实施方案中,本发明分别涉及重链可变区和包含该重链可变区的人源化抗体,其中在获自人类种系重链可变区 KABAT 亚组 V_H III 的 V_H 序列的受体构架序列中 Kabat 位置 47 的 Trp 被选自 Leu 和 Ile 的氨基酸、但尤其是被 Leu 替换;并且在获自人类种系重链可变区 KABAT 亚组 V_H III 的 V_H 序列的受体构架序列中 Kabat 位置 94 的 Arg 被 Ser 替换,诸如如 SEQ ID NO:15 所示;并且在获自人类种系轻链可变区 KABAT 亚组 V_k II 的 V_k 序列的受体构架序列中 Kabat 位置 87 的 Tyr 被 Phe 替换。

[0236] 在一个实施方案中,本发明分别涉及重链可变区和包含该重链可变区的人源化抗体,其中在获自人类种系重链可变区 KABAT 亚组 V_H III 的 V_H 序列的受体构架序列中 Kabat 位置 47 的 Trp 被选自 Leu、正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala 和 Phe 的氨基酸、特别地被 Leu 和 Ile、但尤其是被 Leu 替换;并且 Kabat 位置 94 的 Arg 被选自 Ser 和 Thr 的氨基酸、但尤其是被 Ser 替换,诸如如 SEQ ID NO:15 所示;并且其中在获自小鼠单克隆抗体、特别地鼠抗体 ACI-01-Ab7C2 的 CDR2 区 Kabat 位置 50 的 Lys 被选自 Arg、Gln、His 和 Asn 的氨基酸、但尤其是被 Arg 替换。

[0237] 在一个实施方案中,本发明分别涉及重链可变区和包含该重链可变区的人源化抗体,其中在获自人类种系重链可变区 KABAT 亚组 V_H III 的 V_H 序列的受体构架序列中 Kabat 位置 47 的 Trp 被选自 Leu、正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala 和 Phe 的氨基酸、特别地被 Leu 和 Ile、但尤其是被 Leu 替换;并且 Kabat 位置 94 的 Arg 被选自 Ser 和 Thr 的氨基酸、但尤其是被 Ser 替换,诸如如 SEQ ID NO:15 所示;并且其中在获自小鼠单克隆抗体、特别地鼠抗体 ACI-01-Ab7C2 的 CDR2 区 Kabat 位置 53 的 Asn 被选自 Ala、Val、Leu、Ser 和 Ile 的氨基酸、但尤其是被 Ser 替换。

[0238] 在特定的实施方案中,本发明涉及 SEQ ID NO:12 的轻链可变区。

[0239] 在本发明的另一特定实施方案中,提供了包含 SEQ ID NO:12 的轻链可变区的人源化抗体。

[0240] 在特定的实施方案中,本发明涉及 SEQ ID NO:13 所示的包括信号序列的轻链可变区。

[0241] 在本发明的另一特定实施方案中,提供了包含 SEQ ID NO:13 所示的包括信号序列的完整的轻链可变区的人源化抗体。

[0242] 在本发明的另一特定实施方案中,提供了包括 SEQ ID NO:12 的轻链可变区和 SEQ ID NO:14 的轻链恒定区的人源化抗体。

[0243] 在本发明的另一特定实施方案中,提供了包括 SEQ ID NO:13 的完整的轻链可变区和 SEQ ID NO:14 的轻链恒定区的人源化抗体。

[0244] 在特定的实施方案中,本发明涉及 SEQ ID NO:15 的重链可变区。

[0245] 在本发明的另一特定实施方案中,提供了包含 SEQ ID NO:15 的重链可变区的人源化抗体。

[0246] 在特定的实施方案中,本发明涉及 SEQ ID NO:16 所示的包括信号序列的重链可变区。

[0247] 在本发明的另一特定实施方案中,提供了包含 SEQ ID NO :16 所示的包括信号序列的完整的重链可变区的人源化抗体。

[0248] 在本发明的另一特定实施方案中,提供了包含 SEQ ID NO :15 的重链可变区和 SEQ ID NO :17 的重链恒定区的人源化抗体。

[0249] 在本发明的另一特定实施方案中,提供了包含 SEQ ID NO :16 的重链可变区和 SEQ ID NO :17 的重链恒定区的人源化抗体。

[0250] 在一个实施方案中,如本文所描述的根据本发明的人源化抗体与具有至少 30 个、特别地至少 35 个、更特别地至少 38 个、甚至更特别地至少 40 个氨基酸残基的 A β 单体肽和 / 或包含多个所述 A β 单体单位的 A β 聚合可溶性淀粉状蛋白肽,但尤其是与 A β ₁₋₄₂ 单体肽和 / 或包含多个所述 A β ₁₋₄₂ 单体单位的 A β 聚合可溶性淀粉状蛋白肽共孵育,特别地以高达 1 : 1000、特别地高达 1 : 500,更特别地高达 1 : 300,甚至更特别地高达 1 : 200 的抗体对 A β 1-42 的摩尔浓度比,但尤其是 1 : 10 至 1 : 100 之间的摩尔浓度比共孵育后,抑制了 A β 单体聚集成高分子的聚合原纤维。

[0251] 具体而言,根据本发明的抗体和淀粉状蛋白单体肽和 / 或聚合可溶性淀粉状蛋白肽的共孵育在 28°C 至 40°C 之间,特别地在 32°C 和 38°C 之间,更特别地在 37°C 的温度进行 24 小时至 60 小时,特别地 30 小时至 50 小时,更特别地 48 小时,但尤其是 24 小时。

[0252] 在本发明特定的实施方案重,与淀粉状蛋白单体肽和 / 或聚合可溶性淀粉状蛋白肽的共孵育在 37°C 的温度进行 24 小时。

[0253] 具体而言,包括任何功能等效抗体或其功能部分的根据本发明的抗体,特别是人源化抗体,结合 A β ₁₋₄₂ 单体肽和 / 或包含多个所述 A β ₁₋₄₂ 单体单位的 A β 聚合可溶性淀粉状蛋白肽,并且在与 A β ₁₋₄₂ 单体肽和 / 或包含多个所述 A β ₁₋₄₂ 单体单位的 A β 聚合可溶性淀粉状蛋白肽共孵育后,抑制了 A β 单体和 / 或聚合体聚集成高分子的聚合原纤维。

[0254] 在一个实施方案中,与在缓冲液中孵育的分别的淀粉状蛋白肽单体(对照)相比较,在高达 1 : 1000 的抗体对 A β 1-42 的摩尔浓度比、特别地 1 : 10 至 1 : 100 之间的摩尔浓度比、尤其是 1 : 10 的摩尔浓度比时,包括任何功能等效抗体或其功能部分的根据本发明的抗体,特别是人源化抗体,至少 50%、特别地至少 60%、特别地至少 65%、更特别地至少 75%、甚至特别地至少 80%、但尤其是 85% -90% 抑制 A β 单体和 / 或包含多个所述 A β 单体单位的 A β 可溶性聚合体聚集成高分子的聚合原纤维。

[0255] 在本发明特定的实施方案中,在 1 : 100 的抗体对 A β 1-42 的摩尔浓度比时,包括任何功能等效抗体或其功能部分的根据本发明的抗体,特别是人源化抗体,至少 30% 抑制 A β 单体和 / 或包含多个所述 A β 单体单位的 A β 可溶性聚合体聚集成高分子的聚合原纤维。

[0256] 在本发明另一特定的实施方案中,在 1 : 10 的抗体对 A β 1-42 的摩尔浓度比时,包括任何功能等效抗体或其功能部分的根据本发明的抗体,特别是人源化抗体,至少 80% 抑制 A β 单体和 / 或包括多个所述 A β 单体单位的 A β 可溶性聚合体聚集成高分子的聚合原纤维。

[0257] 根据本发明和如本文所描述的抗体与形成淀粉状蛋白的单体和 / 或聚合肽,但特别是与淀粉状蛋白形式(1-42)的结合导致了对单体和 / 或聚合的形成淀粉状蛋白的肽聚集成高分子原纤维或纤维的抑制。通过对形成淀粉状蛋白的单体和 / 或聚合肽聚集的抑

制,根据本发明的抗体能够预防或减缓淀粉状蛋白斑,特别是淀粉状蛋白形式(1-42)的形成,众所周知淀粉状蛋白形式(1-42)通过二级构象的改变变得不可溶,并且是患病动物或人类脑中淀粉状蛋白斑的主要部分。

[0258] 根据本发明的抗体的聚集抑制潜力可以通过任何本领域所熟知的合适的方法来测定,特别是通过密度梯度超速离心法,随后通过在预先形成梯度上的 SDS-PAGE 沉降分析法和 / 或通过硫代黄素 T(thioflavin, Th-T) 荧光测定法来测定。

[0259] 在一个实施方案中,本发明涉及包括任何功能等效抗体或其功能部分的如本文所描述的抗体,特别是人源化抗体,所述抗体在与由具有至少 30 个、特别地至少 35 个、更特别地至少 38 个、甚至更特别地至少 40 个氨基酸残基的 A β 单体肽,但尤其是 A β ₁₋₄₂ 单体肽聚集形成的预形成高分子聚合淀粉状蛋白原纤维或纤丝共孵育,特别地以 1 : 5 至 1 : 1000 之间、特别地以 1 : 10 至 1 : 500 之间、更特别地以 1 : 10 至 1 : 300 之间、甚至更特别地以 1 : 10 至 1 : 100 之间的摩尔浓度比共孵育后,能够使预形成的聚合的原纤维或纤丝解聚至少 20%,特别地至少 30%,更特别地至少 35%,甚至更特别地至少 40%,但尤其是至少 50%或更高。

[0260] 在本发明特定的实施方案中,通过密度梯度超速离心法,随之通过在预先形成的梯度上的 SDS-PAGE 沉降分析法分别测定抗体的聚集抑制和解聚潜力。

[0261] 在本发明另一特定的实施方案中,通过硫代黄素 T(Th-T) 荧光测定法来分别测定抗体的聚集抑制和解聚潜力。

[0262] 在另一特定的实施方案中,根据本发明的抗体与淀粉状蛋白预形成的高分子聚合淀粉状蛋白原纤维或纤丝在 28°C 至 40°C 之间的温度,特别地在 32°C 和 38°C 之间,更特别地在 37°C 共孵育 12 小时至 36 小时,特别地 18 小时至 30 小时,更特别地 24 小时。

[0263] 具体而言,与预形成的高分子聚合淀粉状蛋白原纤维或纤丝在 37°C 的温度共孵育 24 小时。

[0264] 在本发明特定的实施方案中,于 1 : 100 的抗体对 A β ₁₋₄₂ 的摩尔浓度比时,包括任何功能等效抗体或其功能部分的根据本发明的抗体,特别是人源化抗体,能够使预形成的聚合原纤维或纤丝解聚至少 24%。

[0265] 在本发明另一特定的实施方案中,于 1 : 10 的抗体对 A β ₁₋₄₂ 的摩尔浓度比时,包括任何功能等效抗体或其功能部分的根据本发明的抗体,特别是人源化抗体,能够使预形成的聚合原纤维或纤丝解聚至少 32%。

[0266] 通过形成淀粉状蛋白的聚合原纤维或纤丝的解聚,根据本发明的抗体能够预防或减缓淀粉状蛋白斑的形成,这能导致与疾病相关症状的缓解及其进展的延缓或逆转。

[0267] 因此,本发明另一个实施方案提供了如上文所描述的包括任何功能等效抗体或其功能部分的抗体,特别是人源化抗体,所述抗体能够降低患有导致脑中 A β 浓度增加的疾病或病症的动物,特别是哺乳动物,但尤其是人类脑中 A β 的总量。

[0268] 在另一个实施方案中,本发明涉及根据本发明和如上文所描述的人源化抗体,所述抗体是双功能的,因为它表现出聚集抑制特性以及解聚特性两者,特别是配以高度的构象敏感性。

[0269] 具体而言,本发明涉及根据本发明和如上文所描述的嵌合抗体或嵌合抗体片段,或人源化抗体或人源化抗体片段,所述抗体与淀粉状蛋白单体肽和 / 或聚合可溶性淀粉状

蛋白肽,特别是 β -淀粉状蛋白单体肽,例如,诸如 $A\beta$ 单体肽 1-39、1-40、1-41 或 1-42,和/或包含多个所述 $A\beta$ 单体单位的聚合可溶性 β -淀粉状蛋白肽,但尤其是 $A\beta_{1-42}$ 单体和/或包含多个所述 $A\beta_{1-42}$ 单体单位的 $A\beta$ 聚合可溶性淀粉状蛋白肽共孵育后,抑制了 $A\beta$ 单体聚集成高分子的聚合原纤维或纤丝,并且此外,在与由淀粉状蛋白单体肽,特别是 β -淀粉状蛋白单体肽,例如,诸如 $A\beta$ 单体肽 1-39、1-40、1-41 或 1-42,但尤其是 $A\beta_{1-42}$ 单体肽的聚集形成的预形成高分子聚合淀粉状蛋白原纤维或纤丝共孵育后,能够解聚预形成的聚合原纤维或纤丝。

[0270] 另一方面,本发明涉及根据本发明和如上文所描述的嵌合抗体或嵌合抗体片段,或人源化抗体或人源化抗体片段,所述抗体能够引起 β 折叠构象向 α 螺旋和/或无规则卷曲构象,但特别是无规则卷曲构象,甚至更特别的是在分子内给定区域(尤其是在 $A\beta$ 蛋白的 Tyr 10 和 Val 12 环境中)的无规则卷曲构象的转变,这导致了以 β 折叠为代价的无规则卷曲构象的增加,以及预形成的高分子聚合淀粉状蛋白原纤维或纤丝的溶解的提高。具体而言,当与在缓冲液中孵育的分别的预形成淀粉状蛋白聚合原纤维或纤丝(对照)相比较, β 折叠构象减少了至少 30%,特别地至少 35%,以及更特别地至少 40% 及更多。

[0271] 通过固态 ^{13}C NMR 光谱学,但具体而言,通过测定 $A\beta_{1-42}$ 肽中的 Tyr10 和 Val 12C β 的构象的积分强度来测定抗体在引起二级结构转变中的潜力。

[0272] 在本发明的其它实施方案中,提供了根据本发明和如上文所描述的包含至少一个轻链或其片段、或至少一个重链或其片段的嵌合抗体或嵌合抗体片段,或人源化抗体或人源化抗体片段,其中所述抗体或片段以至少约 $1 \times 10^{-7}M$ 至至少约 $1 \times 10^{-12}M$,特别地至少约 $1 \times 10^{-8}M$ 至至少约 $1 \times 10^{-11}M$,更特别地至少约 $1 \times 10^{-9}M$ 至至少约 $1 \times 10^{-10}M$,甚至更特别地至少约 $1 \times 10^{-8}M$ 至至少约 $2 \times 10^{-8}M$ 之间范围的 K_D 的高结合亲和力与 $A\beta$ 单体结合,但优选地不显示出任何显著的与淀粉状蛋白前体蛋白 (APP) 的交叉反应性。

[0273] 在本发明的另一实施方案中,提供了根据本发明和如上文所描述的包含至少一个轻链或其片段、或至少一个重链或其片段的嵌合抗体或嵌合抗体片段,或人源化抗体或人源化抗体片段,其中所述抗体或片段以至少约 $1 \times 10^{-7}M$ 至至少约 $1 \times 10^{-12}M$,特别地至少约 $1 \times 10^{-8}M$ 至至少约 $1 \times 10^{-11}M$,更特别地至少约 $1 \times 10^{-9}M$ 至至少约 $1 \times 10^{-10}M$,甚至更特别地至少约 $2 \times 10^{-9}M$ 至至少约 $5 \times 10^{-9}M$ 之间范围的 K_D 的高结合亲和力与 $A\beta$ 纤维、原纤维或纤丝结合,但优选地不显示出任何显著的与淀粉状蛋白前体蛋白 (APP) 的交叉反应性。

[0274] 在另一实施方案中,根据本发明和如上文描述的抗体或其片段表现出比与 $A\beta$ 单体的结合亲和力高至少 2 倍,特别地至少 4 倍,特别地至少 10 倍,特别地至少 15 倍,更特别地高至少 20 倍,但尤其是至少 25 倍的与 $A\beta$ 纤维、原纤维或纤丝的结合亲和力。

[0275] 在另一实施方案中,提供了如上文所描述的嵌合抗体或嵌合抗体片段,或人源化抗体或人源化抗体片段,所述抗体基本上与哺乳动物、特别是人类脑中的包括 $A\beta$ 斑在内的聚集的 $A\beta$ 结合,但优选地不显示出任何显著的与淀粉状蛋白前体蛋白 (APP) 的交叉反应性。

[0276] 在本发明的另一方面,提供了如上文所描述的嵌合抗体或嵌合抗体片段,或人源化抗体或人源化抗体片段,所述抗体基本上与哺乳动物、特别是人类脑中的可溶的聚合淀粉状蛋白、特别是包括 $A\beta$ 单体在内的淀粉状蛋白 β ($A\beta$) 结合,但优选地不显示出任何显著的与淀粉状蛋白前体蛋白 (APP) 的交叉反应性。

[0277] 还提供了根据本发明和如上文所描述的嵌合抗体或嵌合抗体片段,或人源化抗体或人源化抗体片段,所述抗体显著地减少哺乳动物,特别是人类脑中的 A β 斑块负荷。这可以通过以下方法达到:使抗体与斑块结合,或通过诱导构象的转变和结合并稳定组织和/或体液、特别是脑中解聚的和溶解的淀粉状蛋白形式,尤其是淀粉状蛋白 β (A β) 形式,从而通过使纤维解聚为可溶的聚合或单体形式,从而改变淀粉状蛋白、特别是淀粉状蛋白 β (A β) 之间的平衡,使不溶和聚集状态转变为其可溶形式。通过根据本发明的抗体的活性,使得外周的清除和代谢是占优势的,而不是沉积于组织和/或体液、特别是脑中。由此,不使抗体与斑块结合也能得到根据本发明的抗体的有益效果。

[0278] 通过这一稳定活性,根据本发明的抗体能够中和组织和/体液中聚合和较少聚集的可溶淀粉状蛋白、特别是淀粉状蛋白 β (A β) 蛋白的毒性作用。在本发明特定的实施方案中,根据本发明的抗体因此可以不一定需要结合脑中聚集的淀粉状蛋白 β 即能达到其有益效果。

[0279] 在本发明的其它方面,提供了根据本发明和如上文描述的人源化抗体或人源化抗体片段,其包含掺入有至少一个、特别地至少两个以及更特别地三个获自小鼠供体抗体、特别是获自小鼠抗体 ACI-01-Ab7C2(在本申请中称为“mC2”,且对于人源化 C2 抗体,称为“hC2”)的 CDR 区的至少一个轻链或其片段、或至少一个重链或其片段,其中所述抗体或其片段具有比小鼠供体抗体高至少 5 倍、特别地至少 8 倍、更特别地至少 10 倍、但尤其是至少 15 倍的对 A β 抗原的亲合力,其中所述抗体 ACI-01-Ab7C2 于 2005 年 12 月 1 日以保藏号 DSM ACC2750 保藏在位于德国布劳恩斯切魏格,38124 布劳恩斯切魏格,马斯切尔德尔韦格 1B 的“德意志微生物保藏中心 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ)”中。

[0280] 在一个实施方案中,本发明的抗体可以是任何同种型和亚型(例如, IgM、IgD、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgE、IgA1 和 IgA2) 的完整抗体(例如,具有两个全长的轻链和两个全长的重链);但尤其是 IgG4 同种型抗体;备选地,在另一个实施方案中,其可以是完整抗体的抗原结合片段(例如, Fab、F(ab')₂ 和 Fv)。

[0281] 因此,本发明还涉及本文描述的抗体的抗原结合片段。在本发明的一个实施方案中,该片段选自: Fab 片段、Fab' 片段、F(ab)₂ 片段以及 F_v 片段,包括 Fab 免疫球蛋白表达文库的产物以及任一上述抗体和片段的表位结合片段。

[0282] 在另一个实施方案中,将本发明的抗体或抗原结合片段与聚乙二醇缀合。在另一个实施方案中,对本发明抗体的恒定区进行修饰以相对于未修饰的抗体减少至少一种恒定区介导的生物效应子功能。在另一个实施方案中,本发明的抗体或抗原结合片段包含具有经改变的效应子功能的 Fc 区。

[0283] 本发明还涉及包含编码根据本发明和如上文描述的嵌合抗体或嵌合抗体片段、或人源化抗体或人源化抗体片段的核苷酸序列的核苷酸分子。

[0284] 具体而言,本发明涉及包含编码如分别在 SEQ ID NO:2 和 3 中给出的一段连续氨基酸分子(其代表重链可变区 (HCVR) 的互补决定区 (CDR) 2 和 3) 的核苷酸序列、或其互补序列的核苷酸分子。

[0285] 更具体地,本发明涉及包含编码如 SEQ ID NO:4 给出的代表轻链可变区 (LCVR) 的互补决定区 (CDR) 1 的一段连续氨基酸分子的核苷酸序列、或其互补序列的核苷酸分子。

[0286] 在本发明的另一个实施方案中,提供了包含如 SEQ ID NO:18 和 SEQ ID NO:19 给出的核苷酸序列、或其互补序列的核苷酸分子,其中所述核苷酸分子分别编码重链可变区(HCVR)的 CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列。

[0287] 在本发明的另一个实施方案中,提供了包含如 SEQ ID NO:20 给出的核苷酸序列、或其互补序列的核苷酸分子,其中所述核苷酸分子为编码轻链可变区(LCVR)CDR1 的核苷酸序列。

[0288] 在本发明的另一个实施方案中,提供了包含 SEQ ID NO:21 的核苷酸序列、或其互补序列的核苷酸分子,其中所述核苷酸分子编码轻链可变区。

[0289] 在本发明的另一个实施方案中,提供了包含 SEQ ID NO:22 的核苷酸序列、或其互补序列的核苷酸分子,其中所述核苷酸分子编码包括了信号序列的完整的轻链可变区。

[0290] 在本发明的另一个实施方案中,提供了包含 SEQ ID NO:22 的编码轻链可变区的核苷酸序列和 SEQ ID NO:23 的编码轻链恒定区的核苷酸序列的核苷酸分子。本发明还包含所述核苷酸分子的互补链。

[0291] 在本发明的另一个实施方案中,提供了包含 SEQ ID NO:24 的编码重链可变区的核苷酸序列的核苷酸分子。本发明还包含所述核苷酸分子的互补链。

[0292] 在本发明的另一个实施方案中,提供了包含 SEQ ID NO:25 的编码包括了信号序列的完整的重链可变区的核苷酸序列的核苷酸分子。本发明还包含所述核苷酸分子的互补链。

[0293] 在本发明的另一个实施方案中,提供了包含 SEQ ID NO:25 的编码重链可变区的核苷酸序列和 SEQ ID NO:26 的编码重链恒定区的核苷酸序列的核苷酸分子。本发明还包含所述核苷酸分子的互补链。

[0294] 本发明还包括分离的或作为较大核苷酸分子的一部分的下述核苷酸序列,其中所述核苷酸序列杂交至上述本发明的编码抗体的核苷酸序列之一、特别地杂交至其互补链。

[0295] 具体而言,本发明涉及在常规杂交条件下,特别地在严格杂交条件下杂交至在 SEQ ID NO:18-26 和 29-32 给出的任一核苷酸序列的核苷酸序列,特别地杂交至其互补链的核苷酸序列。

[0296] 在本发明的另一个实施方案中,提供了包含根据本发明和如上文提及的核酸分子的表达载体。

[0297] 在本发明的另一个实施方案中,提供了包含表达载体的细胞,其中所述表达载体包含根据本发明和如上文提及的核酸分子。

[0298] 在另一个实施方案中,本发明涉及包含治疗有效量的根据本发明的抗体,但特别是包括任何功能等效抗体或任何衍生物或其功能部分在内的根据本发明和如上文描述的嵌合抗体或嵌合抗体片段、或人源化抗体或人源化抗体片段的组合物;具体而言是这样的组合物,即其为任选地还包含可药用载体的药物组合物。

[0299] 在本发明的另一实施方案中,所述组合物包含治疗有效量的抗体。

[0300] 本发明还包含混合物,所述混合物包含治疗有效量的抗体,特别是根据本发明的单克隆抗体,但特别是包括任何功能等效抗体或任何衍生物或其功能部分在内的根据本发明和如上文描述的嵌合抗体或嵌合抗体片段、或人源化抗体或人源化抗体片段,以及任选地其它生物活性物质和 / 或可药用载体和 / 或稀释剂和 / 或赋形剂。

[0301] 具体而言,本发明涉及混合物,其中其它生物活性物质是在治疗淀粉状变性中使用的化合物,所述淀粉状变性是一组与淀粉状蛋白或淀粉状蛋白样蛋白,诸如参与阿尔茨海默病的 A β 蛋白相关的疾病和病症。

[0302] 在本发明的另一个实施方案中,其它生物活性物质或化合物还可以是可用于治疗由淀粉状蛋白 β 引起的淀粉状变性或可以用于治疗其它神经病症的治疗剂。

[0303] 其它生物活性物质或化合物可以通过与根据本发明的抗体相同或相似的机理,或通过不相关的作用机理,或通过多种相关和 / 或不相关的作用机理发挥它的生物学效果。

[0304] 一般地,其它的生物活性化合物可以包括中子透射增强剂、精神病治疗药物、乙酰胆碱酯酶抑制剂、钙通道阻断剂、生物胺、苯并二氮~~革~~类镇静剂、乙酰胆碱合成、贮藏或释放增强剂、乙酰胆碱突触后受体激动剂、单胺氧化酶 -A 或 -B 抑制剂、N- 甲基 -D- 天冬氨酸谷氨酸受体拮抗剂、非甾体类抗炎药物、抗氧化剂和 5- 羟色胺能受体拮抗剂。

[0305] 更具体地,本发明涉及混合物,其包含根据本发明的抗体、任意的可药用载体和 / 或稀释剂和 / 或赋形剂、以及至少一种选自以下的化合物:有效抗氧化应激的化合物、抗细胞凋亡的化合物、金属螯合剂、DNA 修复抑制剂诸如哌仑西平和代谢物、3- 氨基 -1- 丙磺酸 (3APS)、1,3- 丙二磺酸 (1,3PDS)、 α - 分泌酶活化剂、 β - 和 γ - 分泌酶抑制剂、 τ 蛋白、神经递质、 β 折叠破坏剂、淀粉状蛋白 β 清除 / 减少细胞内组分的引诱剂、包括焦谷氨酸化淀粉状蛋白 β 3-42 在内的 N 端截短淀粉状蛋白 β 的抑制剂、消炎分子、或胆碱酯酶抑制剂 (ChEI) (诸如他克林、卡巴拉汀、多奈哌齐、和 / 或加兰他敏)、M1 激动剂和其它药物,包括任何淀粉状蛋白或 τ 修饰药物和营养补充剂、以及营养补充剂。

[0306] 本发明还涉及混合物,其中该化合物是胆碱酯酶抑制剂 (ChEI),特别是这样的混合物,其中该化合物选自他克林、卡巴拉汀、多奈哌齐、加兰他敏、烟酸和美金刚胺 (memantine)。

[0307] 在另外的实施方案中,根据本发明的混合物可以包含烟酸或美金刚胺、根据本发明的抗体、以及任意的可药用载体和 / 或稀释剂和 / 或赋形剂。

[0308] 在本发明的另一个实施方案中,提供了混合物,其包含用于治疗包括幻觉、妄想症、思维障碍 (表现为显著的无条理、思维不中肯、言不及义) 以及古怪或紊乱的行为和快感缺乏、情感单调、冷淡、和 不合群的阳性和阴性精神病症状的“非典型的抗精神病药物”,例如,诸如氯氮平、齐拉西酮、利哌利酮、阿立哌唑或奥氮平,以及抗体,特别是根据本发明的单克隆抗体,但特别是根据本发明和如本文描述的嵌合抗体或嵌合抗体片段或人源化抗体或人源化抗体片段,以及任意的可药用载体和 / 或稀释剂和 / 或赋形剂。

[0309] 在本发明的特别的实施方案中,根据本发明和如上文描述的组合物和混合物包含分别是治疗有效量的抗体和生物活性物质。

[0310] 适合与根据本发明的抗体联合用于混合物中的其它化合物描述于 W02004/058258 (特别参见 16 和 17 页),包括治疗性药物靶标 (36-39 页)、链烷磺酸和烷醇硫酸 (39-51 页)、胆碱酯酶抑制剂 (51-56 页)、NMDA 受体拮抗剂 (56-58 页)、雌激素 (58-59 页)、非甾体抗炎药 (60-61 页)、抗氧化剂 (61-62 页)、过氧化物酶体增殖物活化的受体 (PPAR) 激动剂 (63-67 页)、降胆固醇剂 (68-75 页)、淀粉状蛋白抑制剂 (75-77 页);淀粉状蛋白形成抑制剂 (77-78 页)、金属螯合剂 (78-79 页)、精神抑制剂和抗抑郁剂 (80-82 页)、营养补充物 (83-89 页)、增加脑中生物活性物质可利用性的化合物 (参见 89-93 页)

和前体药物 (93 和 94 页), 该文献在此处引入作为参考。

[0311] 在另一个实施方案中, 本发明涉及混合物, 其包含治疗有效量的抗体, 特别是根据本发明的单克隆抗体, 但特别是根据本发明和如上文描述的嵌合抗体或嵌合抗体片段或人源化抗体或人源化抗体片段和 / 或生物活性物质。

[0312] 本发明还涉及抗体, 特别是根据本发明的单克隆抗体, 但特别是根据本发明和如上文描述的嵌合抗体或嵌合抗体片段或人源化抗体或人源化抗体片段, 和 / 或其功能部分, 和 / 或包含所述抗体的药物组合物或混合物在制备治疗或减轻淀粉状变性的效应的药物中的用途, 所述淀粉状变性是一组与淀粉状蛋白斑的形成相关的疾病和病症, 包括继发性淀粉状变性和年龄相关性淀粉状变性, 诸如以下疾病, 包括但不限于神经疾病诸如阿尔茨海默病 (AD)、路易体痴呆、唐氏综合征、遗传性脑出血伴淀粉状变性 (荷兰型)、关岛帕金森 - 痴呆综合征; 以及其它基于淀粉状蛋白样蛋白或与其相关的疾病, 诸如进行性核上性麻痹、多发性硬化、克 - 雅二氏病、帕金森氏病、HIV- 相关痴呆、ALS (肌萎缩性侧索硬化症)、成年发病型糖尿病、老年性心脏淀粉状变性、内分泌肿瘤, 以及其它疾病, 包括黄斑变性。

[0313] 本发明还包括制备用于预防、治疗或减轻淀粉状变性的效应的方法中的抗体, 特别是根据本发明的单克隆抗体, 但特别是根据本发明和如上文描述的嵌合抗体或嵌合抗体片段或人源化抗体或人源化抗体片段, 和 / 或其功能部分, 和 / 或包含特别是治疗有效量的所述抗体和 / 或其功能部分的药物组合物或混合物的方法, 所述方法包括以可药用形式配制抗体, 特别是根据本发明的单克隆抗体, 但特别是根据本发明的嵌合抗体或嵌合抗体片段或人源化抗体或人源化抗体片段, 其中所述淀粉状变性是一组与淀粉状蛋白斑的形成相关的疾病和病症, 包括继发性淀粉状变性和年龄相关性淀粉状变性, 诸如以下疾病, 包括但不限于神经疾病诸如阿尔茨海默病 (AD)、路易体痴呆、唐氏综合征、遗传性脑出血伴淀粉状变性 (荷兰型)、关岛帕金森 - 痴呆综合征; 以及其它基于淀粉状蛋白样蛋白或与其相关的疾病, 诸如进行性核上性麻痹、多发性硬化、克 - 雅二氏病、帕金森氏病、HIV- 相关痴呆、ALS (肌萎缩性侧索硬化症)、成年发病型糖尿病、老年性心脏淀粉状变性、内分泌肿瘤, 以及其它疾病, 包括黄斑变性。

[0314] 本发明还包括预防、治疗或减轻淀粉状变性的效应的方法, 所述淀粉状变性是一组与淀粉状蛋白斑的形成相关的疾病和病症, 包括继发性淀粉状变性和年龄相关性淀粉状变性, 诸如以下疾病, 包括但不限于神经疾病诸如阿尔茨海默病 (AD)、路易体痴呆、唐氏综合征、遗传性脑出血伴淀粉状变性 (荷兰型)、关岛帕金森 - 痴呆综合征; 以及其它基于淀粉状蛋白样蛋白或与其相关的疾病, 诸如进行性核上性麻痹、多发性硬化、克 - 雅二氏病、帕金森氏病、HIV- 相关痴呆、ALS (肌萎缩性侧索硬化症)、成年发病型糖尿病、老年性心脏淀粉状变性、内分泌肿瘤, 以及其它疾病, 包括黄斑变性, 所述方法通过施与抗体和 / 或其功能部分, 但特别是人源化抗体和 / 或其功能部分, 或包含此类抗体和 / 或其功能部分的组合物或混合物给受到此类病症影响的动物或人类, 包括施与治疗有效量的抗体。

[0315] 提供治疗淀粉状变性的方法也是本发明的一个目的, 所述淀粉状变性是一组与淀粉状蛋白斑的形成相关的疾病和病症, 包括继发性淀粉状变性和年龄相关性淀粉状变性, 包括但不限于神经疾病诸如阿尔茨海默病 (AD), 特别是以认知记忆能力丧失为特征的疾病或病症, 所述方法通过给动物、特别是哺乳动物或人类施与根据本发明和如本文描述的抗体, 特别是药物组合物。

[0316] 在本发明特定的实施方案中,提供了通过给动物、特别是哺乳动物或人类施与根据本发明和如上文描述的抗体、特别是药物组合物来保持或增加认知记忆能力,但特别是恢复患有记忆障碍的动物、特别是哺乳动物或人类的认知记忆能力的方法。

[0317] 本发明的另一个目的是,提供应用了根据本发明和如上文所描述的抗体的治疗组合物和制备此类组合物的方法,以及用于治疗淀粉状变性的方法,所述淀粉状变性是一组与淀粉状蛋白斑的形成相关的疾病和病症,包括继发性淀粉状变性和年龄相关性淀粉状变性,包括但不限于神经疾病诸如阿尔茨海默病(AD),特别是以认知记忆能力丧失为特征的疾病或病症。

[0318] 具体而言,本发明涉及导致患有以认知记忆能力丧失为特征的淀粉状蛋白相关病症的动物、特别是哺乳动物或人类保持认知记忆能力的治疗。

[0319] 本发明还涉及在患者中诊断淀粉状蛋白相关疾病或病症的方法,包括检测抗体或其活性片段对样本中或原位的淀粉状蛋白表位的免疫特异性结合,所述方法包括以下步骤:

[0320] (a) 使怀疑含有淀粉状蛋白的样本或特定身体部分或身体区域与抗体,特别是根据本发明的单克隆抗体,但特别是根据本发明和如上文描述的嵌合抗体或嵌合抗体片段或人源化抗体或人源化抗体片段,和/或其功能部分接触,所述抗体结合淀粉状蛋白的表位;

[0321] (b) 允许抗体和/或其功能部分结合至淀粉状蛋白以形成免疫复合物;

[0322] (c) 检测免疫复合物的形成;以及

[0323] (d) 将免疫复合物的存在或不存在与样本或特定身体部分或区域中淀粉状蛋白的存在或不存在相关联。

[0324] 还包括确定组织和/或体液中产生淀粉状蛋白的斑块负荷的程度的方法,包括:

[0325] (a) 获得代表所研究的组织和/或体液的样本;

[0326] (b) 用抗体,特别是根据本发明的单克隆抗体,但特别是根据本发明和如上文描述的嵌合抗体或嵌合抗体片段或人源化抗体或人源化抗体片段,和/或其功能部分测试所述样本中淀粉状蛋白的存在;

[0327] (c) 确定结合到蛋白的抗体的量;以及

[0328] (d) 计算组织和/或体液中的斑块负荷。

[0329] 具体而言,本发明涉及确定组织和/或体液中产生淀粉状蛋白的斑块负荷的程度的方法,其中确定在步骤c)中的免疫复合物的形成,从而使免疫复合物的存在或不存在与淀粉状蛋白的存在或不存在相关联。

[0330] 在本发明的另一实施方案中,提供了用于检测和诊断淀粉状蛋白相关疾病和病症的测试试剂盒,其包括抗体,特别是根据本发明的单克隆抗体,但特别是根据本发明和如上文描述的嵌合抗体或嵌合抗体片段或人源化抗体或人源化抗体片段,和/或其功能部分。

[0331] 具体而言,本发明涉及用于检测和诊断淀粉状蛋白相关疾病和病症的测试试剂盒,其包含容纳一种或多种根据本发明的抗体,和/或其功能部分的容器,以及使用抗体用于结合淀粉状蛋白以形成免疫复合物,以及检测免疫复合物的形成,从而使免疫复合物的存在或不存在与淀粉状蛋白存在或不存在相关联的说明书。

[0332] 另一方面,本发明提供了包含如 SEQ ID NO:27 所示可变区的抗体,或其变体。在一个实施方案中,细胞系表达该抗体。

[0333] 另一方面,本发明提供了包含如SEQ ID NO:29所示可变区的抗体基因,或其变体。在一个实施方案中,细胞系表达该抗体。

[0334] 另一方面,本发明提供了用于解聚预形成的 β 淀粉状蛋白纤维的方法,包括使hC2抗体与预形成的 β 淀粉状蛋白纤维接触。

[0335] 另一方面,本发明提供了根据前述权利要求任一项的人源化抗体其片段,其中所述抗体或其片段使神经元免受A β 诱导的变性。

[0336] 另一方面,本发明提供了预防A β 诱导的神经元变性的方法,包括用有效量的根据本发明的人源化抗体或人源化抗体片段处理神经元。

[0337] 另一方面,本发明提供了根据本说明书的人源化抗体或人源化抗体片段在制备用于预防神经元在暴露于A β 寡聚体后的变性的药物中的用途。

[0338] 在本发明的另一实施方案中,提供了包括任何功能等效抗体或其功能部分的抗体,特别是单克隆抗体,其识别淀粉状蛋白的天然构象,因为它特异结合至淀粉状蛋白寡聚体和纤维,而不结合至未线性化的淀粉状蛋白种类。

[0339] 在本发明的一个进一步的实施方案中,提供了根据本发明的和如上文描述的包括任何功能等效抗体或其功能部分的抗体,特别是单克隆抗体,其中所述抗体或片段以至少约 1×10^{-6} M至至少约 1×10^{-8} M,特别地至少约 1×10^{-6} M至至少约 1×10^{-7} M,更特别地至少约 1×10^{-7} M至至少约 1×10^{-8} M,甚至更特别地至少约 1×10^{-7} M至至少约 4×10^{-7} M的结合亲和力与A β 单体结合,但优选地不显示出任何显著的与淀粉状蛋白前体蛋白(APP)的交叉反应性。

[0340] 在本发明的另一实施方案中,提供了根据本发明的和如上文描述的包括任何功能等效抗体或其功能部分的抗体,特别是单克隆抗体,其中所述抗体或片段以至少约 1×10^{-7} M至至少约 1×10^{-9} M,特别地至少约 1×10^{-7} M至至少约 1×10^{-8} M,更特别地至少约 1×10^{-8} M至至少约 1×10^{-9} M,甚至更特别地至少约 1×10^{-8} M至至少约 5×10^{-8} M的结合亲和力与A β 纤维、原纤维或纤丝结合,但优选地不显示出任何显著的与淀粉状蛋白前体蛋白(APP)的交叉反应性。

[0341] 在另一实施方案中,根据本发明的和如上文描述的包括任何功能等效抗体或其功能部分的抗体,特别是单克隆抗体,表现出比与A β 单体的结合亲和力高至少5倍,特别地至少10倍,更特别地高至少15倍的与A β 纤维、原纤维或纤丝的结合亲和力。

[0342] 通过形成淀粉状蛋白的聚合原纤维或纤丝的解聚,根据本发明的抗体能够预防或减缓淀粉状蛋白斑的形成,这能导致与疾病相关症状的缓解及其进展的延缓或逆转。

[0343] 因此,本发明的另一个实施方案提供了如上文所描述的包括任何功能等效抗体或其功能部分的抗体,特别是单克隆抗体,所述抗体能够降低患有导致脑中A β 浓度增加的疾病或病症的动物,特别是哺乳动物,但尤其是人类脑中A β 的总量。

[0344] 在本发明的另一实施方案中,提供了如上文所描述的包括任何功能等效抗体或其功能部分的抗体,特别是单克隆抗体,所述抗体能够破坏斑块,从而减少患有导致脑中斑块负荷增加的疾病或病症的动物,特别是哺乳动物,但尤其是人类脑中的斑块负荷。包括任何功能等效抗体或其功能部分的根据本发明的抗体减少了脑中的斑块负荷至少20%,特别地至少25%,更特别地至少30%,甚至更特别地大于30%。

[0345] 又在本发明的另一实施方案中,提供了如上文所描述的包括任何功能等效抗体或

其功能部分的抗体,特别是单克隆抗体,所述抗体能够溶解斑块,导致患有导致脑中斑块负荷增加的疾病或病症的动物,特别是哺乳动物,但尤其是人类脑中的斑块量减少。包括任何功能等效抗体或其功能部分的根据本发明的抗体减少了脑中的斑块量至少 10%,特别地至少 15%,更特别地至少 20%。

[0346] 应理解根据本发明的抗体能够表现出如上文所描述的一种、两种或多种特定特性的不同组合。

[0347] 特别地,提供了抗体或其片段,其识别并结合至 β -淀粉状蛋白上的至少一个独特的结合部位,特别是至少两个独特的结合部位,其中所述的至少一个或所述的至少两个独特的结合部位分别包含主要参与抗体结合的至少一个氨基酸残基和至少两个连续的氨基酸残基,其中,在本发明的一个特定的实施方案中,构成第一独特的结合部位的至少一个残基是 Leu,且构成第二独特的结合部位的至少两个连续的氨基酸残基是 -Phe-Phe-,它们埋在以下核心序列中:

[0348] -Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Leu-Xaa₄-Phe-Phe-Xaa₅-Xaa₆-Xaa₇

[0349] 其中

[0350] Xaa₁ 是选自 His、Asn、Gln、Lys、和 Arg 的氨基酸残基;

[0351] Xaa₂ 是选自 Asn 和 Gln 的氨基酸残基;

[0352] Xaa₃ 是选自 Lys、His、Asn、Gln 和 Arg 的氨基酸残基;

[0353] Xaa₄ 是选自 Ala、Val、Leu、正亮氨酸、Met、Phe、和 Ile 的氨基酸残基;

[0354] Xaa₅ 是选自 Ala、Val、Leu、Ser、和 Ile 的氨基酸残基;

[0355] Xaa₆ 是选自 Glu 和 Asp 的氨基酸残基;

[0356] Xaa₇ 是选自 Glu 和 Asp 的氨基酸残基。

[0357] 在另一方面,本发明涉及抗体或其片段,其识别并结合至 β -淀粉状蛋白上的至少一个独特的结合部位,特别地至少两个独特的结合部位,更特别地至少三个独特的结合部位,其中所述的一个或至少两个或至少三个独特的结合部位每一包含主要参与抗体结合的至少一个、特别地至少两个连续的氨基酸残基。

[0358] 特别地,根据本发明的抗体或其片段结合至 β -淀粉状蛋白上的至少两个独特的结合部位,其中所述至少两个独特的结合部位每一包含主要参与抗体结合的至少两个连续的氨基酸残基,其中所述至少两个独特的结合部位彼此密切接近地定位在抗原上,且被不参与抗体结合的或者与所述至少两个连续的氨基酸残基相比参与抗体结合程度显著较小的至少一个氨基酸残基隔开,因此形成构象不连续的表位。

[0359] 在本发明的另一实施方案中,提供了根据本发明的抗体或其片段,其识别并结合至 β -淀粉状蛋白上的至少一个独特的结合部位,特别地至少两个独特的结合部位,更特别地至少三个独特的结合部位,其中所述独特的结合部位分别包含主要参与抗体结合的至少一个氨基酸残基和至少两个连续的氨基酸残基,其中被不参与抗体结合的或者与主要参与抗体结合的所述氨基酸残基相比参与抗体结合程度显著较小的至少一个氨基酸残基隔开的所述至少一个氨基酸和至少两个连续的氨基酸分别为 -His- 和 -Lys-Leu-,它们埋在以下核心序列中:

[0360] -His-Xaa₂-Lys-Leu-Xaa₃-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆-Xaa₇-Xaa₈-, 其中

[0361] Xaa₂ 是选自 Asn 和 Gln 的氨基酸残基;

[0362] Xaa₃ 是选自 Ala、Val、Leu、正亮氨酸、Met、Phe、和 Ile 的氨基酸残基；

[0363] Xaa₄ 是选自 Ala、Val、Leu、正亮氨酸、Met、Phe、和 Ile 的氨基酸残基；

[0364] Xaa₅ 是选自 Ala、Val、Leu、正亮氨酸、Met、Phe、和 Ile 的氨基酸残基；

[0365] Xaa₆ 是选自 Ala、Val、Leu、Ser、和 Ile 的氨基酸残基；

[0366] Xaa₇ 是选自 Glu 和 Asp 的氨基酸残基；

[0367] Xaa₈ 是选自 Glu 和 Asp 的氨基酸残基；

[0368] 并且其中所述氨基酸残基 Xaa₂、Xaa₃、Xaa₆、Xaa₇、Xaa₈ 不参与抗体结合或者与 -His- 和 -Lys-Leu- 结合部位相比参与抗体结合的程度显著较小。

[0369] 在另一实施方案中，提供了抗体或其片段，其识别并结合至 β-淀粉状蛋白上的至少一个独特的结合部位，特别地至少两个独特的结合部位，更特别地至少三个独特的结合部位，其中所述独特的结合部位分别包含主要参与抗体结合的至少一个氨基酸残基和至少两个连续的氨基酸残基，其中代表第一结合部位的至少两个连续的氨基酸残基是 -Phe-Phe- 和至少一个氨基酸残基是 -His-，它们埋在以下核心序列中：

[0370] -Xaa₁-His-Xaa₃-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆-Phe-Phe-Xaa₇-Xaa₈-Xaa₉-，

[0371] 其中

[0372] Xaa₁ 是选自 His、Asn、Gln、Lys、和 Arg 的氨基酸残基；

[0373] Xaa₃ 是选自 Asn 和 Gln 的氨基酸残基；

[0374] Xaa₄ 是选自 His、Asn、Gln、Lys、和 Arg 的氨基酸残基；

[0375] Xaa₅ 是选自 Ala、Val、Leu、Ser、和 Ile 的氨基酸残基；

[0376] Xaa₆ 是选自 Ala、Val、Leu、和 Ile 的氨基酸残基；

[0377] Xaa₇ 是选自 Ala、Val、Leu、和 Ile 的氨基酸残基；

[0378] Xaa₈ 是选自 Glu 和 Asp 的氨基酸残基；

[0379] Xaa₉ 是选自 Glu 和 Asp 的氨基酸残基；

[0380] 并且其中所述氨基酸残基 Xaa₁、Xaa₃、Xaa₆、Xaa₇、Xaa₈、和 Xaa₉ 不参与抗体结合或者与 -His- 和 -Phe-Phe- 结合部位相比参与抗体结合的程度显著较小。

[0381] 在本发明的一个特定的实施方案中，主要参与抗体结合的第一种至少两个连续的氨基酸残基涉及 -Lys- 和 -Leu-，且第二种至少两个连续的氨基酸残基涉及 -Phe-Phe-，它们埋在以下核心序列中：

[0382] -Xaa₁-Xaa₂-Lys-Leu-Xaa₄-Phe-Phe-Xaa₅-Xaa₆-Xaa₇-，

[0383] 其中

[0384] Xaa₁ 是选自 His、Asn、Gln、Lys、和 Arg 的氨基酸残基；

[0385] Xaa₂ 是选自 Asn 和 Gln 的氨基酸残基；

[0386] Xaa₄ 是选自 Ala、Val、Leu、正亮氨酸、Met、Phe、和 Ile 的氨基酸残基；

[0387] Xaa₅ 是选自 Ala、Val、Leu、Ser、和 Ile 的氨基酸残基；

[0388] Xaa₆ 是选自 Glu 和 Asp 的氨基酸残基；

[0389] Xaa₇ 是选自 Glu 和 Asp 的氨基酸残基；

[0390] 并且其中所述氨基酸残基 Xaa₂、Xaa₃、Xaa₄、Xaa₅、Xaa₆、Xaa₇ 不参与抗体结合或者与 -Lys-Leu 和 -Phe-Phe- 结合部位相比参与抗体结合的程度显著较小。

[0391] 在本发明的另一实施方案中，提供了抗体或其片段，其中

[0392] Xaa₁ 是 His 或 Arg,但尤其是 His ;

[0393] Xaa₂ 是 Gln 或 Asn,但尤其是 Gln ;

[0394] Xaa₄ 是 Val 或 Leu,但尤其是 Val ;

[0395] Xaa₅ 是 Ala 或 Val,但尤其是 Ala ;

[0396] Xaa₆ 是 Glu 或 Asp,但尤其是 Glu ;和

[0397] Xaa₇ 是 Asp 或 Glu,但尤其是 Asp。

[0398] 在本发明的一个进一步的实施方案中,根据本发明的抗体或其片段结合至 β -淀粉粉状蛋白上的至少三个独特的结合部位,其中所述至少三个独特的结合部位分别包含至少一个氨基酸残基和至少两个连续的氨基酸残基,所述残基是主要参与抗体结合的,其中所述至少三个独特的结合部位彼此密切接近地定位在抗原上,且被不参与抗体结合的或者分别与所述至少一个氨基酸残基和所述至少两个连续的氨基酸残基相比参与抗体结合程度显著较小的至少一个氨基酸残基隔开,因此形成构象不连续的表位。

[0399] 在本发明的一个特定的实施方案中,第一种主要参与抗体结合的至少两个连续的氨基酸残基涉及 -Lys-Leu-,且第二种至少两个连续的氨基酸残基涉及 -Phe-Phe-,第三种至少一个氨基酸残基涉及 -His-,它们埋在以下核心序列中 :

[0400] -His-Xaa₂-Lys-Leu-Xaa₄-Phe-Phe-Xaa₅-Xaa₆-Xaa₇-,其中

[0401] Xaa₂ 是选自 Asn 和 Gln 的氨基酸残基 ;

[0402] Xaa₄ 是选自 Ala、Val、Leu、正亮氨酸、Met、Phe、和 Ile 的氨基酸残基 ;

[0403] Xaa₅ 是选自 Ala、Val、Leu、Ser、和 Ile 的氨基酸残基 ;

[0404] Xaa₆ 是选自 Glu 和 Asp 的氨基酸残基,

[0405] Xaa₇ 是选自 Glu 和 Asp 的氨基酸残基,

[0406] 并且其中所述氨基酸残基 Xaa₂、Xaa₃、Xaa₄、Xaa₅、Xaa₆、Xaa₇ 不参与抗体结合或者与 -His-、-Lys-Leu-、和 -Phe-Phe- 结合部位相比参与抗体结合的程度显著较小。

[0407] 在本发明的另一实施方案中,提供了抗体或其片段,其中

[0408] Xaa₂ 是 Gln 或 Asn,但尤其是 Gln ;

[0409] Xaa₄ 是 Val 或 Leu,但尤其是 Val ;

[0410] Xaa₅ 是 Ala 或 Val,但尤其是 Ala ;

[0411] Xaa₆ 是 Glu 或 Asp,但尤其是 Glu ;和

[0412] Xaa₇ 是 Glu 或 Asp,但尤其是 Asp ;

[0413] 在本发明的一个特定的实施方案中,第一种主要参与抗体结合的至少两个连续的氨基酸残基涉及 -Lys-Leu-,第二种至少两个连续的氨基酸残基涉及 -Phe-Phe-,且第三种至少一个氨基酸残基涉及 -Asp-,它们埋在以下核心序列中 :

[0414] -Xaa₁-Xaa₂-Lys-Leu-Xaa₄-Phe-Phe-Xaa₅-Xaa₆-Asp-,

[0415] 其中

[0416] Xaa₁ 是选自 His、Asn、Gln、Lys、和 Arg 的氨基酸残基 ;

[0417] Xaa₂ 是选自 Asn 和 Gln 的氨基酸残基 ;

[0418] Xaa₄ 是选自 Ala、Val、Leu、正亮氨酸、Met、Phe、和 Ile 的氨基酸残基 ;

[0419] Xaa₅ 是选自 Ala、Val、Leu、Ser 和 Ile 的氨基酸残基 ;

[0420] Xaa₆ 是选自 Glu 和 Asp 的氨基酸残基,并且其中所述氨基酸残基 Xaa₂、Xaa₃、Xaa₄、

Xaa₅、Xaa₆、Xaa₇ 不参与抗体结合或者与 -Asp-、-Lys-Leu-、和 -Phe-Phe- 结合部位相比参与抗体结合的程度显著较小。

[0421] 在本发明的另一实施方案中,提供了抗体或其片段,其中

[0422] Xaa₁ 是 His 或 Arg,但尤其是 His ;

[0423] Xaa₂ 是 Gln 或 Asn,但尤其是 Gln ;

[0424] Xaa₄ 是 Val 或 Leu,但尤其是 Val ;

[0425] Xaa₅ 是 Ala 或 Val,但尤其是 Ala ;和

[0426] Xaa₆ 是 Glu 或 Asp,但尤其是 Glu。

[0427] 在本发明的另一特定的实施方案中,提供了根据本发明的抗体或其片段,其结合至 β-淀粉状蛋白上的 4 个独特的结合部位,其中所述 4 个独特的结合部位分别包含一个氨基酸残基和两个连续的氨基酸残基,所述残基是主要参与抗体结合的,其中所述 4 个独特的结合部位彼此密切接近地定位在抗原上,且被不参与抗体结合的或者分别与所述一个氨基酸残基和所述两个连续的氨基酸残基相比参与抗体结合程度显著较小的至少一个氨基酸残基隔开,因此形成构象不连续的表位。

[0428] 特别地,第一种主要参与抗体结合的两个连续的氨基酸残基是 -Lys-Leu-,第二种至少两个连续的氨基酸残基是 -Phe-Phe-,第一种单氨基酸残基是 -His-,且第二种单氨基酸残基是 -Asp-,它们埋在以下核心序列中:

[0429] -His-Xaa₂-Lys-Leu-Xaa₄-Phe-Phe-Xaa₅-Xaa₆-Asp-,

[0430] 其中

[0431] Xaa₂ 是选自 Asn 和 Gln 的氨基酸残基;

[0432] Xaa₄ 是选自 Ala、Val、Leu、正亮氨酸、Met、Phe、和 Ile 的氨基酸残基;

[0433] Xaa₅ 是选自 Ala、Val、Leu、Ser、和 Ile 的氨基酸残基;

[0434] Xaa₆ 是选自 Glu 和 Asp 的氨基酸残基;

[0435] 并且其中所述氨基酸残基 Xaa₂、Xaa₃、Xaa₄、Xaa₅、Xaa₆、Xaa₇ 不参与抗体结合或者与 -His-、-Asp-、-Lys-Leu-、和 -Phe-Phe- 结合部位相比参与抗体结合的程度显著较小。

[0436] 在本发明的一个特定的实施方案中,如上文所定义的识别和结合部位形成了位于 β-淀粉状蛋白的 12 至 24 位氨基酸残基之间、特别地 14 至 23 位氨基酸残基之间、更特别地 14 至 20 位氨基酸残基之间区域内的构象上不连续的表位,其中分别包含 1 个和 2 个氨基酸残基的三个独特的识别和结合部位分别位于位置 16、17;和位置 19 和 20;和位置 14,所述残基主要参与 β-淀粉状蛋白的结合,且其中所述三个独特的识别和结合部位分别被位于位置 15 和 18 的一个氨基酸残基隔开,所述氨基酸不参与抗原的结合,或至少以基本上较小的程度。

[0437] 在一个特定的实施方案中,所述的主要参与 β-淀粉状蛋白结合的连续的氨基酸残基,特别地在位置 16 和 17 的 -Lys-Leu- 以及在位置 19 和 20 的 -Phe-Phe- 被埋在以下核心区域中:

[0438] Val- His- His- Gln- Lys- Leu- Val- Phe- Phe- Ala- Glu- Asp

[0439] 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23

[0440] 在另一特定的实施方案中,所述的主要参与 β-淀粉状蛋白结合的连续的氨基酸残基,特别地在位置 16 的 -Lys-,在位置 17 的 -Leu-,和在位置 19 和 20 的 -Phe-Phe-,在位

置 14 的 -His- 被埋在以下核心区域中：

[0441] Val- His- His- Gln- Lys- Leu- Val- Phe- Phe- Ala- Glu- Asp

[0442] 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23

[0443] 根据本发明的上述的单克隆抗体和 / 或其功能部分、和 / 或药物组合物、或包含所述抗体的混合物的用于制备治疗或减轻由淀粉状蛋白或淀粉状蛋白样蛋白引起的或与其相关的疾病和病症的药物的用途也是本发明的一部分，其中所述由淀粉状蛋白或淀粉状蛋白样蛋白引起的或与其相关的疾病和病症包括一组与淀粉状蛋白斑的形成相关的淀粉状变性，包括但不限于继发性淀粉状变性和年龄相关性淀粉状变性，诸如以下疾病，包括但不限于神经疾病诸如阿尔茨海默病 (AD)、包括以认知记忆能力丧失为特征的疾病或病症，例如，诸如轻度认知损害 (MCI)、路易体痴呆、唐氏综合征、遗传性脑出血伴淀粉状变性 (荷兰型)、关岛帕金森 - 痴呆综合征；以及其它基于淀粉状蛋白样蛋白或与其相关的疾病，诸如进行性核上性麻痹、多发性硬化、克 - 雅二氏病、帕金森氏病、HIV- 相关痴呆、ALS (肌萎缩性侧索硬化症)、包涵体肌炎 (IBM)、成年发病型糖尿病、老年性心脏淀粉状变性，内分泌肿瘤以及其它疾病，包括黄斑变性。

[0444] 在本发明的另一实施方案中，提供了使用根据本发明的抗体和 / 或其功能部分、但尤其是单克隆抗体和 / 或其功能部分或功能等效抗体用于制备药物组合物的方法，其中所述药物组合物用于治疗或减轻由淀粉状蛋白或淀粉状蛋白样蛋白引起的或与其相关的疾病和病症的影响，所述由淀粉状蛋白或淀粉状蛋白样蛋白引起的或与其相关的疾病和病症包括一组与淀粉状蛋白斑的形成相关的淀粉状变性，包括但不限于继发性淀粉状变性和年龄相关性淀粉状变性，诸如以下疾病，包括但不限于神经疾病诸如阿尔茨海默病 (AD)、包括以认知记忆能力丧失为特征的疾病或病症，例如，诸如轻度认知损害 (MCI)、路易体痴呆、唐氏综合征、遗传性脑出血伴淀粉状变性 (荷兰型)、关岛帕金森 - 痴呆综合征；以及其它基于淀粉状蛋白样蛋白或与其相关的疾病，诸如进行性核上性麻痹、多发性硬化、克 - 雅二氏病、帕金森氏病、HIV- 相关痴呆、ALS (肌萎缩性侧索硬化症)、包涵体肌炎 (IBM)、成年发病型糖尿病、老年性心脏淀粉状变性，内分泌肿瘤以及其它疾病，包括黄斑变性；所述方法包括将根据本发明的抗体制剂为可药用形式。

[0445] 抗体和 / 或其功能部分、但尤其是单克隆抗体和 / 或其功能部分或功能等效抗体、和包含本发明的所述抗体的组合物和混合物可用于制备治疗或减轻由淀粉状蛋白或淀粉状蛋白样蛋白引起的或与其相关的疾病和病症的影响的药物，其中所述由淀粉状蛋白或淀粉状蛋白样蛋白引起的或与其相关的疾病和病症包括一组与淀粉状蛋白斑的形成相关的淀粉状变性，包括但不限于继发性淀粉状变性和年龄相关性淀粉状变性，诸如以下疾病，包括但不限于神经疾病诸如阿尔茨海默病 (AD)、包括以认知记忆能力丧失为特征的疾病或病症，例如，诸如轻度认知损害 (MCI)、路易体痴呆、唐氏综合征、遗传性脑出血伴淀粉状变性 (荷兰型)、关岛帕金森 - 痴呆综合征；以及其它基于淀粉状蛋白样蛋白或与其相关的疾病，诸如进行性核上性麻痹、多发性硬化、克 - 雅二氏病、帕金森氏病、HIV- 相关痴呆、ALS (肌萎缩性侧索硬化症)、包涵体肌炎 (IBM)、成年发病型糖尿病、老年性心脏淀粉状变性，内分泌肿瘤以及其它疾病，包括黄斑变性。

[0446] 在本发明的一个进一步的实施方案中，提供了减少患有导致脑中斑块负荷增加的疾病或病症的动物，特别是哺乳动物，但尤其是人类脑中的斑块负荷的方法，包括向需要此

种治疗的动物,特别是哺乳动物,更特别是人施与治疗有效量的根据本发明的和如上文所描述的抗体和/或其功能部分、但尤其是单克隆抗体和/或其功能部分或功能等效抗体、或者包含所述抗体的组合物或混合物。

[0447] 特别地,斑块负荷减少了至少 20%,特别地减少了至少 25%,更特别地减少了至少 30%,甚至更特别地减少了多于 30%。

[0448] 在本发明的一个进一步的实施方案中,提供了减少患有导致脑中斑块负荷增加的疾病或病症的动物,特别是哺乳动物,但尤其是人类脑中的斑块量的方法,包括向需要此种治疗的动物,特别是哺乳动物,更特别是人施与治疗有效量的根据本发明的和如上文所描述的抗体和/或其功能部分、但尤其是单克隆抗体和/或其功能部分或功能等效抗体、或者包含所述抗体的组合物或混合物。

[0449] 特别地,脑中的斑块量减少了至少 10%,特别地减少了至少 15%,更特别地减少了多于 15%。

[0450] 又在本发明的另一实施方案中,提供了减少患有导致脑中可溶性 A β 浓度增加的疾病或病症的动物,特别是哺乳动物,但尤其是人类脑中的可溶性 A β 总量的方法,包括向需要此种治疗的动物,特别是哺乳动物,更特别是人施与治疗有效量的根据本发明的和如上文所描述的抗体和/或其功能部分、但尤其是单克隆抗体和/或其功能部分或功能等效抗体、或者包含所述抗体的组合物或混合物。

[0451] 本发明的一个目的是通过将根据本发明的抗体、但尤其是单克隆抗体、或者包含此种抗体的组合物或混合物施与受此种疾病侵袭的动物或人而提供了预防、治疗或减轻由淀粉状蛋白或淀粉状蛋白样蛋白引起的或与其相关的疾病和病症的影响的方法,其中所述由淀粉状蛋白或淀粉状蛋白样蛋白引起的或与其相关的疾病和病症包括一组与淀粉状蛋白斑的形成相关的淀粉状变性,包括但不限于继发性淀粉状变性和年龄相关性淀粉状变性,诸如以下疾病,包括但不限于神经疾病诸如阿尔茨海默病(AD)、包括以认知记忆能力丧失为特征的疾病或病症,例如,诸如轻度认知损害(MCI)、路易体痴呆、唐氏综合征、遗传性脑出血伴淀粉状变性(荷兰型)、关岛帕金森-痴呆综合征;以及其它基于淀粉状蛋白样蛋白或与其相关的疾病,诸如进行性核上性麻痹、多发性硬化、克-雅二氏病、帕金森氏病、HIV-相关痴呆、ALS(肌萎缩性侧索硬化症)、包涵体肌炎(IBM)、成年发病型糖尿病、老年性心脏淀粉状变性,内分泌肿瘤以及其它疾病,包括黄斑变性;所述方法包括向需要此种治疗的动物,特别是哺乳动物,更特别是人施与治疗有效量的根据本发明的和如上文所描述的抗体和/或其功能部分、但尤其是单克隆抗体和/或其功能部分或功能等效抗体、或者包含所述抗体的组合物或混合物。

[0452] 在一个特定的实施方案中,本发明提供了保持或增加患有记忆损害的动物、特别是哺乳动物或人的认知记忆能力的方法,所述方法是通过向需要此种治疗的动物、特别是哺乳动物或人施与根据本发明的抗体、但特别是单克隆抗体、或者包含根据本发明的和如上文所描述的此种抗体的组合物或混合物而实施的。

[0453] 在本发明的另一实施方案中,提供了使用根据本发明的抗体和/或其功能部分、但尤其是单克隆抗体和/或其功能部分或功能等效抗体用于制备药物组合物的方法,其中所述药物组合物用于治疗或减轻由淀粉状蛋白或淀粉状蛋白样蛋白引起的或与其相关的疾病和病症的影响,所述由淀粉状蛋白或淀粉状蛋白样蛋白引起的或与其相关的疾病和病

症包括一组与淀粉状蛋白斑的形成相关的淀粉状变性,包括但不限于继发性淀粉状变性和年龄相关性淀粉状变性,诸如以下疾病,包括但不限于神经疾病诸如阿尔茨海默病(AD)、包括以认知记忆能力丧失为特征的疾病或病症,例如,诸如轻度认知损害(MCI)、路易体痴呆、唐氏综合征、遗传性脑出血伴淀粉状变性(荷兰型)、关岛帕金森-痴呆综合征;以及其它基于淀粉状蛋白样蛋白或与其相关的疾病,诸如进行性核上性麻痹、多发性硬化、克-雅二氏病、帕金森氏病、HIV-相关痴呆、ALS(肌萎缩性侧索硬化症)、包涵体肌炎(IBM)、成年发病型糖尿病、老年性心脏淀粉状变性,内分泌肿瘤以及其它疾病,包括黄斑变性。

[0454] 在一个特定的实施方案中,本发明提供了使用根据本发明的抗体和/或其功能部分、但尤其是单克隆抗体和/或其功能部分或功能等效抗体用于制备保持或增加患有记忆损害的动物、特别是哺乳动物或人的认知记忆能力的药物组合物的方法,所述方法是通过向动物、特别是哺乳动物或人施与根据本发明的和如上文所描述的抗体、但特别是单克隆抗体、或者包含此种抗体的组合物或混合物而实施的。

[0455] 在阅读了以下所公开的实施方案的详细说明和所附权利要求后,本发明的这些和其它目的、特征和优点将变得显而易见。

[0456] 附图和序列简述

[0457] 图1(实施例2):嵌合抗体的小鼠轻链可变区表达盒

[0458] 图2(实施例2):嵌合抗体的小鼠重链可变区表达盒

[0459] 图3(实施例5.2):小鼠重链可变区与最接近的鼠种系序列的比较

[0460] 图4(实施例8):纯化的人源化C2抗体的活性

[0461] 图5(实施例9):与通过瞬时转染产生的嵌合抗体C2ChVHAF/ChVK以及纯化的抗体相比较,通过瞬时表达与C2嵌合重链连接的C2修饰的CDRL2构建体产生的抗体的结合活性。

[0462] 图6(实施例11):嵌合抗体AF和人源化抗体H4K1的免疫组织化学结合测试法的结果

[0463] 图7(实施例12):mC2对淀粉状蛋白纤维的功能性

[0464] 图8(实施例12):在ELISA中人源化C2的结合亲和力

[0465] 图9(实施例14):mC2对不同类淀粉状蛋白的构象特异性结合。在该图说明中的沉淀制备物指 $A\beta_{1-42}$ 纤维,上清制备物指淀粉状蛋白单体。

[0466] 图10:与鼠序列和人类受体序列DPK15和 $J_{\kappa}1$ 相比较的人源化C2VK序列

[0467] 图11:与鼠序列和人类受体序列DP54和 $J_{\mu}6$ 相比较的人源化C2VH序列

[0468] 图12:C2人源化抗体C2HuVK1的轻链可变区的完整DNA和蛋白序列

[0469] 图13:人源化C2抗体的轻链恒定区(人类 C_{κ})的完整DNA和蛋白序列

[0470] 图14:人源化C2抗体的重链恒定区(人类IgG4 ser228-pro)的完整DNA和蛋白序列

[0471] 图15A-C(实施例15):表位作图实验的结果

[0472] 图16(实施例13):聚集测试法实验的结果

[0473] 图17(实施例13):解聚测试法实验的结果

[0474] 图18(实施例16):用人源化抗体C2的神经保护实验的结果

[0475] 图19:在蛋白质印迹和斑点印迹中mACI-01-Ab7 C2单克隆抗体与淀粉状蛋白种

类的结合；

[0476] 图 20 :通过透射电镜术显示的 mACI-01-Ab7 C2 单克隆抗体与淀粉状蛋白纤维的结合；

[0477] 图 21 :在 Th-T 荧光测试法和 U-¹³C Tyr10 和 Val12 标记的 β 淀粉状蛋白 1-42 肽的固态 NMR 之间进行的头对头实验 (head-to-head-experiment) 结果。

[0478] SEQ ID NO :1 C2 HuVH AF 4 人源化重链可变区 (CDR1) 的氨基酸序列

[0479] SEQ ID NO :2 C2 HuVH AF 4 人源化重链可变区 (CDR2) 的氨基酸序列

[0480] SEQ ID NO :3 C2 HuVH AF 4 人源化重链可变区 (CDR3) 的氨基酸序列

[0481] SEQ ID NO :4 C2 HuVK 1 人源化轻链可变区 (CDR1) 的氨基酸序列

[0482] SEQ ID NO :5 C2 HuVK 1 人源化轻链可变区 (CDR2) 的氨基酸序列

[0483] SEQ ID NO :6 C2 HuVK 1 人源化轻链可变区 (CDR3) 的氨基酸序列

[0484] SEQ ID NO :7 A β 表位区 2 的氨基酸序列

[0485] SEQ ID NO :8 A β 表位区 1 的氨基酸序列

[0486] SEQ ID NO :9 A β 表位区 2 修饰的氨基酸序列

[0487] SEQ ID NO :10 A β 表位区 1 修饰的氨基酸序列

[0488] SEQ ID NO :11 表位区修饰的完全的氨基酸序列

[0489] SEQ ID NO :12 C2HuVK 1 人源化轻链可变区的氨基酸序列

[0490] SEQ ID NO :13 C2 人源化轻链的氨基酸序列

[0491] SEQ ID NO :14 人源化 C2 轻链恒定区的氨基酸序列

[0492] SEQ ID NO :15 C2 HuVH AF 4 人源化重链可变区的氨基酸序列

[0493] SEQ ID NO :16 C2 人源化重链的氨基酸序列

[0494] SEQ ID NO :17 Ig γ -4 链 C 区修饰的氨基酸序列

[0495] SEQ ID NO :18 C2 HuVH AF 4 人源化重链可变区 CDR2 的核苷酸序列

[0496] SEQ ID NO :19 C2 HuVH AF 4 人源化重链可变区 CDR3 的核苷酸序列

[0497] SEQ ID NO :20 C2 HuVK 1 人源化轻链可变区 CDR1 的核苷酸序列

[0498] SEQ ID NO :21 C2 HuVK 1 人源化轻链可变区的核苷酸序列

[0499] SEQ ID NO :22 C2 人源化轻链的核苷酸序列

[0500] SEQ ID NO :23 C2 人源化轻链恒定区的核苷酸序列

[0501] SEQ ID NO :24 C2HuVH AF 4 人源化重链可变区的核苷酸序列

[0502] SEQ ID NO :25 C2 人源化重链的核苷酸序列

[0503] SEQ ID NO :26 C2 人源化重链恒定区的核苷酸序列

[0504] SEQ ID NO :27 小鼠 C2 轻链可变区的氨基酸序列

[0505] SEQ ID NO :28 小鼠 C2 重链可变区的氨基酸序列

[0506] SEQ ID NO :29 小鼠 C2 轻链可变区的核苷酸序列

[0507] SEQ ID NO :30 小鼠 C2 轻链的核苷酸序列

[0508] SEQ ID NO :31 小鼠 C2 重链可变区的核苷酸序列

[0509] SEQ ID NO :32 小鼠 C2 重链的核苷酸序列

[0510] SEQ ID NO :33-40 在 A β 肽上的表位区的氨基酸序列变体

[0511] SEQ ID NO :41 小鼠 C2 轻链的氨基酸序列

[0512] SEQ ID NO :42 小鼠 C2 重链的氨基酸序列

[0513] SEQ ID NO :43 抗原性肽 A β ₁₋₁₅

[0514] SEQ ID NO :44 抗原性肽 A β ₁₋₁₆

[0515] SEQ ID NO :45 抗原性肽 A β _{1-16(Δ 14)}

[0516] SEQ ID NO :46 抗原性肽 A β ₂₂₋₃₅

[0517] SEQ ID NO :47 抗原性肽 A β ₂₉₋₄₀

[0518] SEQ ID NO :48 抗原性肽 A β ₁₋₁₇

[0519] 定义

[0520] 文中使用的术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”可以互换,并定义为由通过肽键连接的氨基酸组成的生物分子。

[0521] 除非上下文不合适,否则文中使用的术语“一”、“该”定义为“一个或多个”并且包括复数。

[0522] 句子“由淀粉状蛋白或淀粉状蛋白样蛋白引起的或与其相关的疾病和病症”包括但现不限于由单体、原纤维或聚合状态的淀粉状蛋白样蛋白,或该三者任意组合的存在或活性引起的疾病和病症。此类疾病和病症包括但不限于淀粉状变性、内分泌肿瘤和黄斑变性。

[0523] 术语“淀粉状变性”是指一组与淀粉状蛋白斑的形成相关的疾病和病症,包括但不限于继发性淀粉状变性和年龄相关性淀粉状变性,诸如以下疾病,包括但不限于神经疾病诸如阿尔茨海默病(AD)、包括以认知记忆能力丧失为特征的疾病或病症,例如,诸如轻度认知损害(MCI)、路易体痴呆、唐氏综合征、遗传性脑出血伴淀粉状变性(荷兰型)、关岛帕金森-痴呆综合征;以及其它基于淀粉状蛋白样蛋白或与其相关的疾病,诸如进行性核上性麻痹、多发性硬化、克-雅二氏病、帕金森氏病、HIV-相关痴呆、ALS(肌萎缩性侧索硬化症)、包涵体肌炎(IBM)、成年发病型糖尿病、老年性心脏淀粉状变性,以及各种眼睛疾病,包括黄斑变性、脉络膜小疣相关视神经病、和由于 β 淀粉状蛋白沉积的白内障。

[0524] 文中使用的术语“检测”定义为用已知的技术(诸如免疫化学或组织学方法)检测生物分子,以及指在研究中定性或定量检测生物分子的存在或浓度。

[0525] “聚合的可溶淀粉状蛋白”是指多重聚集的淀粉状蛋白肽、或淀粉状蛋白样肽、或修饰的或截短的淀粉状蛋白肽或淀粉状蛋白肽其它衍生物的单体,其形成在哺乳动物或人类身体中、更特别地在脑中可溶的低聚或多聚结构,但特别是指多重聚集的淀粉状蛋白 β (A β)或修饰的或截短的淀粉状蛋白 β (A β)肽或其衍生物的单体,其在哺乳动物或人类身体中,更特别地在脑中是可溶的。

[0526] “淀粉状蛋白 β 、A β 或 β -淀粉状蛋白”是本领域认可的术语,并且指淀粉状蛋白 β 蛋白和肽、淀粉状蛋白 β 前体蛋白(APP),以及其修饰物、片段或任何功能等效物。具体而言,文中所使用的淀粉状蛋白 β 是指通过APP的蛋白酶剪切产生的任何片段,但尤其是那些参与淀粉状变性病理学或与之相关的片段,包括但不限于A β ₁₋₃₈、A β ₁₋₃₉、A β ₁₋₄₀、A β ₁₋₄₁、A β ₁₋₄₂和A β ₁₋₄₃。

[0527] 上面所提到的淀粉状蛋白 β 肽的结构和序列是本领域技术人员公知的,并且生产所述肽或从脑和其它组织中提取它们的方法描述于,例如Glennner和Wong, Biochem Biophys Res Comm 129, 885-890(1984)。此外,淀粉状蛋白 β 肽也以多种形式商业可获得。

[0528] “分离的”意思是指生物分子没有至少一些与之天然存在的组分。

[0529] 文中应用的术语“抗体”是本领域认可的术语,其指结合到已知抗原的分子或分子的活性片段,特别是免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫学活性部分,即含有特异结合抗原的结合部位的分子。免疫球蛋白是包含一个或多个基本上由免疫球蛋白 κ 和 λ 、 α 、 γ 、 δ 、 ϵ 和 μ 恒定区基因、以及大量免疫球蛋白可变区基因编码的多肽的蛋白。轻链可分为 κ 或 λ 。重链可分为 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ ,其依次分别定义免疫球蛋白类型 IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE。还已知了重链的亚类。例如,人类中的 IgG 重链可以是 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 亚类中的任一个。根据本发明的免疫球蛋白可以是任何的类 (IgG、IgM、IgD、IgE、IgA 和 IgY) 或亚类 (IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2) 的免疫球蛋白分子。

[0530] 文中使用的关于抗体的“特异性结合”是指该抗体以比其与结构上不同的抗原更高的亲和力与它的靶抗原结合。

[0531] 已知典型的免疫球蛋白结构单位包含四聚体。每一个四聚体包括两个相同的多肽链对,每一对具有一个“轻”链(约 25kD)和一个“重”链(约 50-70kD)。每一个链的 N 端定义了约 100 至 110 个或更多个主要负责抗原识别的氨基酸的可变区。术语可变轻链 (V_L) 和可变重链 (V_H) 分别指这些轻链和重链。

[0532] 抗体可以作为全长完整的抗体或作为许多已很好的描述了的通过用各种肽酶或化学制品消化产生的片段存在。因此,例如,胃蛋白酶在铰链区的二硫键下面消化抗体产生 $F(ab')_2$,其为 Fab 的二聚体,所述 Fab 本身是通过二硫键与 V_H-CH_1 结合的轻链。 $F(ab')_2$ 可以在中性条件下被还原以破坏铰链区中的二硫键,因此将 $F(ab')_2$ 二聚体转化为 Fab' 单体。Fab' 单体基本上是具有铰链区一部分的 Fab 片段(其它抗体片段的更详细的描述请参见:基础免疫学(Fundamental Immunology),W. E. Paul 编辑,Raven Press,N. Y. (1993))。尽管各种抗体片段是根据完整抗体的消化来定义的,但本领域技术人员能够理解,可以通过化学或通过利用重组 DNA 方法从头合成任意的各种抗体片段。因此,文中使用的术语抗体还包括通过修饰完整抗体或从头合成产生的抗体片段,或通过应用重组 DNA 方法得到抗体或片段。

[0533] “抗体”在本发明的范围内意图包括单克隆抗体、多克隆抗体、嵌合抗体、单链抗体、双特异性抗体、猿源化(simianized)抗体、人抗体和人源化抗体,以及其活性片段。结合已知抗原的分子的活性片段的实例包括分开的轻链和重链、Fab、Fab/c、Fv、Fab' 和 $F(ab')_2$ 片段,包括 Fab 免疫球蛋白表达文库的产物和上面提到的任何抗体和片段的表位结合片段。

[0534] 这些活性片段可以通过多种技术从本发明的抗体中衍生。例如,可以用酶,诸如胃蛋白酶切割单克隆抗体,然后经过 HPLC 凝胶过滤。然后可以通过膜过滤法等收集和浓缩合适的含有 Fab 片段的级分。抗原活性片段分离的其它常规用技术的描述可参见,例如 Khaw, B. A. 等, J. Nucl. Med. 23 :1011-1019(1982);Rousseaux 等, Methods Enzymology, 121 :663-69, Academic Press, 1986。

[0535] 重组制备的抗体可以是常规的全长抗体、来自蛋白水解消化的已知活性抗体片段、独特的活性抗体片段诸如 Fv 或单链 Fv(scFv)、结构域缺失抗体等。Fv 抗体约 50Kd 大小且包含轻链和重链可变区。单链 Fv(“scFv”)多肽是共价连接的 $VH:VL$ 异二聚体,其可以表达自包括编码 VH 和 VL 的序列的核酸,所述序列是直接连接的,或通过编码肽的接头连

接。参见 Huston 等 (1988) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85 :5879-5883。许多结构用于将来自抗体 V 区域的天然聚集的但化学上分离的轻和重多肽链转化为 scFv 分子, 所述 scFv 分子将折叠为基本上与抗原结合部位的结构类似的三维结构。例如, 参见美国专利 5, 091, 513、5, 132, 405 和 4, 956, 778 号。

[0536] 结合部位是指抗体分子的参与抗原结合的部分。抗原结合部位由重 (“H”) 和轻 (“L”) 链的 N 端可变 (“V”) 区的氨基酸残基形成。抗体可变区包含三个称为 “高变区” 或 “互补决定区” (CDR) 的高度相异的片段, 其插入到称为 “构架区” (FR) 的更保守的侧翼片段之间。在抗体分子中, 轻链的三个高变区 (LCDR1、LCDR2、和 LCDR3) 和重链的三个高变区 (HCDR1、HCDR2 和 HCDR3) 在三维空间中相对于彼此布置以形成抗原结合表面或口袋。因此, 抗原结合部位表示构成抗体 CDR 的氨基酸以及构成结合部位口袋的任何构架残基。

[0537] 可以应用本领域公知的方法确定在特定抗体中构成结合部位的氨基酸残基的特性。例如, 可以如最初由 Kabat 等定义的高变区那样鉴定抗体 CDR。(参见 “免疫学感兴趣的蛋白质序列” (“Sequences of Proteins of Immunological Interest”), E. Kabat 等, 美国健康和人类服务部 (U. S. Department of Health and Human Services); Johnson, G 和 Wu, TT(2001), Kabat 数据库及其应用: 未来指引 (Kabat Database and its applications: future directions), Nucleic Acids Research, 29 :205-206 ;http://immuno.bme.nwa.edu)。也可以如最初由 Chothia 和其它人描述的结构上的环结构那样鉴定 CDR 的位置 (参见 Chothia 和 Lesk, J. Mol. Biol. 196, 901 (1987)、Chothia 等, Nature 342, 877 (1989) 和 Tramontano 等, J. Mol. Biol. 215, 175 (1990))。其它方法包括 “AbM 定义” 或 Macallum 等的 CDR 的 “接触定义” (“抗原-抗体相互作用: 接触分析和结合部位拓扑图” (“Antibody-antigen interactions: contact analysis and binding site topography”), J Mol Biol. 1996 年 10 月 11 日 ;262(5) :732-45), 所述 “AbM 定义” 是 Kabat 和 Chothia 之间的折衷方案, 并且是应用 Oxford 分子 AbM 抗体模建软件 (现为 Accelrys) 衍生的。以下图表基于各种已知的定义鉴定 CDR。

[0538]	环	Kabat	AbM	Chothia	接触
[0539]	-----	-----	-----	-----	-----
[0540]	L1	L24--L34	L24--L34	L24--L34	L30--L36
[0541]	L2	L50--L56	L50--L56	L50--L56	L46--L55
[0542]	L3	L89--L97	L89--L97	L89--L97	L89--L96
[0543]	H1	H31--H35B	H26--H35B	H26--H32..34	H30--H35B
[0544]	Kabat 编号方式				
[0545]	H1	H31--H35	H26--H35	H26--H32	H30--H35
[0546]	Chothia 编号方式				
[0547]	H2	H50--H65	H50--H58	H52--H56	H47--H58
[0548]	H3	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H93--H101
[0549]	人们可以通过仅从序列而鉴定抗体中的 CDR 的总体指导如下:				
[0550]	LCDR1:				
[0551]	开始 - 约第 24 个残基。				
[0552]	前面的残基总是 Cys。				

[0553] 后面的残基总是 Trp。一般地,TRP 之后是 TYR-GLN,但也可能是 LEU-GLN、PHE-GLN 或 TYR-LEU。

[0554] 长度是 10 至 17 个残基。

[0555] LCDR2 :

[0556] 开始 - 在 L1 终点之后的第 16 个残基。

[0557] 前面的序列一般是 ILE-TYR,但也可以是 VAL-TYR、ILE-LYS 或 ILE-PHE。

[0558] 长度一般为 7 个残基。

[0559] LCDR3 :

[0560] 开始 - 一般是 L2 终点之后的第 33 个残基。

[0561] 前面的残基是 Cys。

[0562] 后面的序列是 PHE-GLY-X-GLY。

[0563] 长度是 7 至 11 个残基。

[0564] HCDR1 :

[0565] 开始 - 在约第 26 个残基 (CYS 后 4 个残基) [Chothia/AbM 定义],Kabat 定义在 5 个残基以后开始。

[0566] 前面的序列是 CYS-X-X-X。

[0567] 后面的残基是 TRP,其后一般是 VAL,但也可以是 ILE 或 ALA。

[0568] 在 AbM 定义下的长度是 10 至 12 个残基,而 Chothia 定义则不包括最后的 4 个残基。

[0569] HCDR2

[0570] 开始 - 在 CDR-H1 的 Kabat/AbM 定义的终点后第 15 个残基。

[0571] 前面的序列一般是 LEU-GLU-TRP-ILE-GLY (SEQ ID NO. 1),但许多变形也是可能的。

[0572] 后面的序列是 :LYS/ARG-LEU/ILE/VAL/PHE/THR/ALA-THR/SER/ILE/ALA。

[0573] 在 Kabat 定义下的长度是 16 至 19 个残基 (AbM 定义为先 7 个残基终止)。

[0574] HCDR3 :

[0575] 开始 :在 CDR-H2 终点之后第 33 个残基 (CYS 后两个残基)。

[0576] 前面的序列是 CYS-X-X (一般为 CYS-ALA-ARG)。

[0577] 后面的序列是 TRP-GLY-X-GLY。

[0578] 长度是 3 至 25 个残基。

[0579] 可以应用本领域公知的方法,诸如分子模建和 X 光晶体照相术确定特定抗体中的在 CDR 之外,但仍然通过具有作为结合部位衬里部分的侧链而构成结合部位一部分 (即,其可被用于通过结合部位连接) 的氨基酸残基的特性。例如参见 Riechmann 等, (1988) Nature, 332 : ;323-327。

[0580] 嵌合抗体是这样的抗体,即其中该抗体的一个或多个区域来自一个动物物种,且该抗体的一个或多个区域来自不同的动物物种。优选的嵌合抗体是包括来自灵长类动物免疫球蛋白的区域的嵌合抗体。用于人类临床应用的嵌合抗体通常被理解为具有来自非人类动物 (例如啮齿类动物) 的可变区,且具有来自人类的恒定区。相反,人源化抗体利用来自非人类抗体的 CDR,其中所述非人类抗体具有多数或全部来自人类免疫球蛋白的构架

区,以及全部来自人类免疫球蛋白的恒定区。人类嵌合抗体通常被理解为具有来自啮齿类动物的可变区。典型的人类嵌合抗体具有人类重链恒定区和人类轻链恒定区,且具有来自啮齿类动物抗体的重链和轻链两者的可变区。嵌合抗体可以包括某些对人类恒定区的天然氨基酸序列和天然的啮齿类动物可变区序列的改变。可以通过本领域公知的方法制备嵌合和人源化抗体,所述方法包括 CDR 嫁接方法(例如参见,美国专利 5,843,708、6,180,370、5,693,762、5,585,089、5,530,101 号)、链改组策略(例如参见,美国专利 5,565,332 号;Rader 等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA(1998)95:8910-8915)和分子模建策略(美国专利 5,639,641 号)等。

[0581] 在双链抗体的情况下,文中使用的“人源化抗体”是其中至少一条链被人源化的抗体。人源化抗体链具有这样的可变区,即其中一个或多个构架区是人类的。单链的人源化抗体是其中所述链具有这样的可变区的抗体,即在所述的可变区中一个或多个构架区是人类的。人源化抗体链或其片段的可变区的非人类的部分衍生自非人类来源,特别是非人类抗体,一般为啮齿类动物来源的抗体。非人类的对人源化抗体的贡献一般是以至少一个散布在源自一个(或多个)人类免疫球蛋白的构架区中的 CDR 区的形式提供的。此外,可以改变构架区支持残基以保留结合亲和力。

[0582] 人源化抗体还可以包含恒定区(例如,在轻链的情况下,至少一个恒定区或其部分,以及在重链的情况下,优选三个恒定区)。如果存在的话,人源化抗体的恒定区一般是人类的。

[0583] 获得“人源化抗体”的方法对于本领域技术人员是公知的(例如参见,Queen 等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,86:10029-10032(1989)、Hodgson 等,Bio/Technology,9:421(1991))。

[0584] “人源化抗体”也可以通过新颖的基因工程方法得到,其能在大型动物,诸如兔子和小鼠中产生亲和力成熟的人样多克隆抗体。例如参见,美国专利 6,632,976 号。

[0585] 本文使用的术语恒定区(CR)是指免疫球蛋白的恒定区基因。恒定区基因编码抗体分子的赋予效应子功能的部分。对于嵌合的人类抗体和人源化抗体,一般地,非人类(例如,鼠)的恒定区被人类恒定区替换。作为对象的嵌合的或人源化抗体的恒定区通常源自人类免疫球蛋白。重链恒定区可以选自以下 5 种同种型中的任一种: α 、 δ 、 ϵ 、 γ 或 μ 。此外,不同亚类(诸如重链的 IgG 亚类)的重链负责不同的效应子功能,并且因此通过选择期望的重链恒定区,可以制得具有期望效应子功能的抗体。在本发明范围内可以使用的恒定区是 $\gamma 1$ (IgG1)、特别是 $\gamma 1$ (IgG1) 同种型的 Fc 区域; $\gamma 3$ (IgG3) 和尤其是 $\gamma 4$ (IgG4)。轻链恒定区可以是 κ 或 λ 型,优选 κ 型。在一个实施方案中,轻链恒定区是人类 κ 恒定链(Heiter 等(1980)Cell 22:197-207),且重恒定链是人类 IgG4 恒定链。

[0586] 术语“单克隆抗体”也是本领域公认的,并且是指其为产生单克隆抗体的细胞的产物的抗体。单克隆抗体一般通过将正常短命的产生抗体的 B 细胞和快速生长的细胞诸如癌细胞(有时称为“永生”细胞)融合产生。所产生的杂交细胞或杂交瘤快速增殖,产生生产抗体的克隆。

[0587] 对于本发明的目的,应理解“单克隆抗体”也包含由还没有达到完全单克隆性的母克隆生产的抗体。

[0588] “功能等效抗体”在本发明的范围内是指与上面提到的和在此描述的抗体实质上

共有至少一种主要的功能特性的抗体,所述功能特性包括:特异结合 β -淀粉状蛋白,特别是 $A\beta_{1-42}$ 蛋白,以及更特别的 $A\beta_{1-42}$ 蛋白的 16-21 表位区域、体外的免疫反应性、抑制 $A\beta_{1-42}$ 单体聚集成高分子的聚合原纤维和 / 或解聚预形成的 $A\beta_{1-42}$ 聚合原纤维、和 / 或 β 折叠的破坏特性、和当预防性地或治疗性地施与时减轻淀粉状变性的效应,其中所述淀粉状变性是一组与淀粉状蛋白斑的形成相关的疾病和病症,包括继发性淀粉状变性和年龄相关性淀粉状变性,包括但不限于神经疾病诸如阿尔茨海默病 (AD)、路易体痴呆、唐氏综合征、遗传性脑出血伴淀粉状变性 (荷兰型)、关岛帕金森-痴呆综合征;以及其它基于淀粉状蛋白样蛋白或与其相关的疾病,诸如进行性核上性麻痹、多发性硬化、克-雅二氏病、帕金森氏病、HIV-相关痴呆、ALS (肌萎缩性侧索硬化症)、成年发病型糖尿病、老年性心脏淀粉状变性、内分泌肿瘤,以及其它疾病,包括黄斑变性。抗体可以是任何类的,诸如 IgG、IgM 或 IgA 等,或任何亚类的,诸如 IgG1、IgG2a 等以及其它在上文提到或本领域公知的其它亚类,但特别是 IgG4 类。此外,抗体可以通过任何方法生产,诸如噬菌体展示,或在任何生物或细胞系生产,包括细菌、昆虫、哺乳动物或其它生产具有期望特性的抗体 (诸如人源化抗体) 的细胞类型或细胞系。抗体也可以通过组合来自不同物种的 Fab 部分和 Fc 区形成。

[0589] 所使用的术语“杂交”指常规的杂交条件,优选地指在使用 5xSSPE、1% SDS、1x 登哈特 (Denhardt's) 溶液作为溶液和 / 或杂交温度在 35°C 至 70°C 之间、优选 65°C 的杂交条件。杂交后,洗涤优选地在 35°C 和 70°C 之间、优选 65°C 的温度,首先用 2xSSC、1% SDS 和随后用 0.2xSSC 进行 (关于 SSPE、SSC 和登哈特溶液的定义参见上述引文中的 Sambrook 等)。例如描述于上面 Sambrook 等中的严格杂交条件是特别优选的。如果如上面指出的那样在 65°C 进行杂交和洗涤,则例如给出了特别优选的严格杂交条件。非严格杂交条件,例如在 45°C 进行杂交和洗涤是较不优选的,以及在 35°C 甚至更不优选。

[0590] 两个序列之间的“同源性”通过序列同一性确定。如果两条待相互比较的序列在长度上有区别,序列同一性优选的指与较长序列核苷酸残基相同的较短序列的核苷酸残基百分数。序列同一性可以通过使用诸如 Bestfit 程序 (Wisconsin 序列分析包,版本 8, Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive Madison, WI 53711) 的计算机程序照惯例测定。Bestfit 利用 Smith 和 Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2 (1981), 482-489 的局部同源算法,目的是找出两个序列之间具有最高序列同一性的部分。当使用 Bestfit 或其它的序列比对程序以确定特定的序列是否与本发明的参考序列具有例如 95% 的序列同一性时,优选的如此设置参数以使得序列同一性百分比是对于参考序列的全长计算并且允许高达参考序列中核苷酸总数的 5% 的同源性缺口。当使用 Bestfit 时,所谓的任意的参数优选地设在它们的预定 (“缺省”) 值。出现在给定序列和以上所描述的本发明的序列之间的比较中的偏差可能由例如添加、缺失、替换、插入或重组所导致。这类序列比较也可以优选的用程序 “fasta20u66” (2.0u66 版本, 1998 年 9 月, William R. Pearson 和 the University of Virginia; 也参见 W. R. Pearson (1990), *Methods in Enzymology* 183, 63-98, 所附的实例和 <http://workbench.sdsc.edu/>)。为此目的,可以使用 “缺省” 参数设置。

[0591] 根据本发明的抗体可以是免疫球蛋白或抗体,其被理解为具有它的每一结合位点相同 (如果是多价的话), 或备选地, 可以是 “双特异性抗体” 或 “双功能抗体”。

[0592] “双特异性抗体” 或 “双功能抗体” 是具有两个不同的重 / 轻链对和两个不同的结

合部位的人工杂化抗体。可以通过多种方法,包括杂交瘤融合或 Fab' 片段的连接制备双特异抗体。例如参见, Songsivilai 和 Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79 :315-321 (1990); Kostelny 等, J. Immunol. 148, 1547-1553 (1992)。

[0593] 术语“片段”是指包含比完整或完全抗体或抗体链更少的氨基酸残基的抗体或抗体链的部分或一段。可以通过化学或酶处理完整或完全的抗体或抗体链获得片段。还可以通过重组方式获得片段。示范性片段包括 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fabc 和 / 或 Fv 片段。术语“抗原结合片段”是指结合抗原或与完整抗体(即与它们所源自的完整抗体)竞争抗原结合(即,特异性结合)的免疫球蛋白或抗体的多肽片段。

[0594] 通过重组 DNA 技术,或通过酶或化学切割完整的免疫球蛋白制备结合片段。结合片段包括 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fabc、Fv、单链和单链抗体。

[0595] “片段”还指包含另一多肽氨基酸序列的至少 5 个连续的氨基酸残基、至少 10 个连续的氨基酸残基、至少 15 个连续的氨基酸残基、至少 20 个连续的氨基酸残基、至少 25 个连续的氨基酸残基、至少 40 个连续的氨基酸残基、至少 50 个连续的氨基酸残基、至少 60 个连续的氨基酸残基、至少 70 个连续的氨基酸残基、至少 80 个连续的氨基酸残基、至少 90 个连续的氨基酸残基、至少 100 个连续的氨基酸残基、至少 125 个连续的氨基酸残基、至少 150 个连续的氨基酸残基、至少 175 个连续的氨基酸残基、至少 200 个连续的氨基酸残基、至少 250 个连续的氨基酸残基的氨基酸序列的肽或多肽。在特别的实施方案中,多肽片段保留了该多肽的至少一种功能。

[0596] 术语“抗原”是指能结合抗体的实体或其片段。免疫原是指能在生物体、特别是动物、更特别的是包括人类在内的哺乳动物中引发免疫反应的抗原。术语抗原包括称为抗原决定簇或表位的区域,所述区域是指抗原的一部分(其为接触的,或其在支持位于负责抗原性的抗原或抗原决定簇中的接触中起着重要作用)。

[0597] 如在本文中使用的术语“可溶的”指在水性溶液中部分或完全溶解。

[0598] 也在本文中使用的术语“免疫原性的”指引起针对免疫原抗原的抗体、T 细胞和其它反应性免疫细胞的产生的物质。

[0599] 当个体产生足够的抗所施与的本发明的免疫原性组合物的抗体、T 细胞和其它反应性免疫细胞的时候,发生免疫反应以缓解或减轻所要治疗的病症。

[0600] 文中使用的术语免疫原性是指当施与接受者时,抗原引起免疫反应(体液或细胞免疫反应)的能力的计量。本发明涉及减少作为对象的人类嵌合或人源化抗体免疫原性的方法。

[0601] 减少免疫原性的人源化抗体是指展示出相对于亲本抗体(例如,鼠抗体)的减少了免疫原性的人源化抗体。

[0602] 基本上保留了亲本抗体的结合特性的人源化抗体是指保留了特异结合被用以产生此种人源化抗体的亲本抗体识别的抗原的能力的抗体。优选地,人源化抗体展示出和亲本抗体相同或基本相同的抗原结合亲和力和亲合力。理想地,该抗体的亲和力不少于亲本抗体亲和力的 10%,更优选不少于亲本抗体的 30%,以及更优选地,亲和力不少于亲本抗体的 50%。用于分析抗原结合亲和力的方法是本领域公知的,且包括半数最大结合测试法、竞争测试法和斯卡查德分析。在本申请中描述了合适的抗原结合测试法。

[0603] “回复突变(back mutation)”是引入编码人源化抗体的核苷酸序列中的突变,该

突变产生与母本抗体（例如，供体抗体，例如鼠抗体）中的氨基酸对应的氨基酸。在本发明抗体的人源化过程中，可以保留来自亲本抗体中某些构架残基，以基本上保留亲本抗体的结合特性，而同时最小化所得抗体的潜在的免疫原性。在本发明的一个实施方案中，亲本抗体是小鼠抗体。例如，回复突变使人类构架残基改变为亲本鼠残基。可以回复突变的构架残基的实例包括但不限于：规范残基 (canonical residues)、界面填充残基、与结合部位接近的稀有亲本残基、在“游标区 (Vernier Zone)”（其形成 CDR 位于其上的平台）(Foote 和 Winter, 1992, J. Mol. Biol. 224, 487-499) 中的残基、以及接近于 CDR H3 的那些残基。

[0604] 如本文所使用的“保守改变”是指与天然蛋白相比，分别是基本上在构象上或抗原上是中性的、在突变体多肽的三级结构中产生最小的变化的、或在突变多肽的抗原决定簇中产生最小的变化的改变。当提及本发明的抗体和抗体片段时，保守改变的意思是不会使该抗体不能结合主题受体的氨基酸替换。本领域普通技术人员将能够预测可以制造哪些氨基酸替换，同时维持构象上和抗原上中性的高度可能性。例如在 Berzofsky, (1985) Science 229 :932-940 和 Bowie 等 (1990) Science 247 :1306-1310 中提供了此类指导。应当考虑的影响维持构象上和抗原上中性的可能性的因素包括，但不限于：(a) 疏水氨基酸的替换较不可能影响抗原性，因为疏水残基更可能位于蛋白的内部；(b) 物理化学类似的氨基酸的替换较不可能影响构象，因为替换的氨基酸残基结构上模拟天然氨基酸；(c) 进化上保守的序列的改变可能不利地影响构象，因为此类保守表明该氨基酸序列可能具有功能重要性。本领域普通技术人员将能够应用公知的测试法评估蛋白质构象的改变，所述测试法包括但不限于微量补体结合法 (Wasserman 等 (1961) J. Immunol. 87 :290-295 ;Levine 等 (1967) Meth. Enzymol. 11 :928-936) 和通过应用构象依赖性的单克隆抗体的结合研究 (Lewis 等 (1983) Biochem. 22 :948-954)。

[0605] 此外，术语“治疗有效量”指抗体的量，当其施与给人类或动物时，在所述人类或动物中足以产生治疗效果。本领域技术人员按照常规方法能很容易的确定治疗有效量。

[0606] 本文所使用的术语“治疗”、“预防”是指因施与预防剂或治疗剂所致的受试者疾病的一种或多种症状的复发或开始的预防。

[0607] 人源化抗体的构建

[0608] 通过参考以下包含于此的具体实施方案的详细描述，能更容易理解本发明。尽管本发明根据其特定的实施方案的特定细节进行描述，但并不意欲把这些细节当作是对本发明范围的限制。

[0609] 本发明提供了包含高特异性和高效抗体的新的方法和组合物，所述抗体具有特异性地识别并结合至来自 β 淀粉状蛋白抗原范围内的特异表位的能力。通过本发明的教导得到的抗体尤其可用于治疗淀粉状变性，这是一组与淀粉状蛋白斑的形成相关的疾病和病症，包括继发性淀粉状变性和年龄相关性淀粉状变性，诸如以下疾病，包括但不限于神经疾病诸如阿尔茨海默病 (AD)、路易体痴呆、唐氏综合征、遗传性脑出血伴淀粉状变性（荷兰型）、关岛帕金森 - 痴呆综合征；以及其它基于淀粉状蛋白样蛋白或与其相关的疾病，诸如进行性核上性麻痹、多发性硬化、克 - 雅二氏病、遗传性脑出血伴淀粉状变性荷兰型、帕金森氏病、HIV- 相关痴呆、ALS (肌萎缩性侧索硬化症)、成年发病型糖尿病、老年性心脏淀粉状变性、内分泌肿瘤，以及其它疾病，包括黄斑变性，这些仅仅是列举。

[0610] 可在本发明的范围内产生出根据本发明的完全的人源化或重构的可变区，通过首

先设计含有埋入到人类衍生的构架序列中的非人类、特别是啮齿类动物衍生的 CDR,但尤其是衍生自鼠抗体 ACI-01-Ab7C2(在申请中称为“mC2”,并根据布达佩斯条约于 2005 年 12 月 1 日以保藏号 DSMACC2750 保藏在位于德国布劳恩斯切魏格,38124 布劳恩斯切魏格,马斯切尔奥德尔韦格 1B 的“德意志微生物保藏中心 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH ;DSMZ)”) 的 CDR 的可变区氨基酸序列。可以从根据本发明的抗体获得的非人类、特别是啮齿类动物衍生的 CDR 提供了期望的特异性。因此,这些残基基本上未改变地包括在重构的可变区的设计中。因此,应当将任何修饰限制为最小,且严密地监视在抗体特异性和亲和力方面的改变。另一方面,理论上构架残基可以衍生自任何的人类可变区。

[0611] 为了产生显示出可接受的或甚至提高了的亲和力的重构抗体,应当选择同样地适用于产生重构的可变区和适用于保留抗体亲和力的人类构架序列。

[0612] 为达到这一目的,开发了最佳适合策略 (best-fit strategy)。因为已知构架序列支撑 CDR 以它们正确的空间方向用于与抗原相互作用,并且构架残基有时甚至能够参与抗原结合,这一策略以最小化可能负面影响抗体三维结构的改变为目的,通过从与非人类、特别是啮齿类动物衍生的可变区最同源或类似的人类可变区衍生用于抗体重构的人类构架序列。这还将最大化亲和力将保留在重构抗体中的可能性。

[0613] 在其最简单的水平,“最佳适合”策略包括将供体啮齿类动物 V 区域与所有已知的人类 V 区氨基酸序列相比较,并然后选择最同源的以向人源化过程提供受体构架区。事实上,有若干个其它需要考虑的因素,并且它们可能影响受体构架区的最终选择。在任何实验工作之前,在这一考虑中可以应用分子建模预测,以试图最大化所得到的重构抗体的亲和力。实际上,模型的目的是预测最同源的人类构架的哪些关键残基(如果有的话)需要如在啮齿类动物中那样保留,以在重构抗体中获得最佳亲和力。

[0614] 在本发明的一个实施方案中,CDR 可从小鼠单克隆抗体,特别是从在共同未决申请 EP 05 02 7092.5(2005 年 12 月 12 提交)中描述的小鼠单克隆抗体 ACI-01-Ab7C2 得到,所述申请的公开在此引入作为参考。

[0615] 产生小鼠单克隆抗体 ACI-01-Ab7C2(在本申请中称为“mC2”,且对于人源化 C2 抗体,称为 hC2)的杂交瘤细胞 FP-12H3-C2 于 2005 年 12 月 1 日在共同未决申请 EP05027092.5 号中根据布达佩斯条约以保藏号 DSMACC2750 保藏在位于德国布劳恩斯切魏格,38124 布劳恩斯切魏格,马斯切尔奥德尔韦格 1B 的“德意志微生物保藏中心 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH ;DSMZ) ”中。

[0616] 可以通过抗超分子抗原构建体来产生小鼠抗体,所述超分子抗原构建体包含对应于 β -淀粉状蛋白肽,特别是 β -淀粉状蛋白肽 $A\beta_{1-15}$ 、 $A\beta_{1-16}$ 和 $A\beta_{1-16(\Delta 14)}$ 氨基酸序列的抗原肽,所述抗原肽用疏水部分(例如,诸如棕榈酸)或亲水部分(例如,诸如聚乙二醇(PEG))或两者的组合进行修饰,其中所述疏水和亲水部分分别通过至少一个,特别是一个或两个氨基酸,例如,诸如赖氨酸、谷氨酸和半胱氨酸或任何其它的能够用作将亲水和疏水部分偶联到肽片段的连接结构的合适的氨基酸或氨基酸类似物而共价地连接到抗原性肽的每一个末端。当使用 PEG 作为亲水部分时,游离的 PEG 末端共价地连接到磷脂酰乙醇胺或任何其它适合于作为锚定元件的化合物上,例如,以将抗原构建体埋在脂质体的双分子层中。

[0617] 具体而言,可以通过抗超分子抗原构建体来产生小鼠抗体,所述超分子抗原构建体包含对应于 β -淀粉状蛋白肽 A β 1-16 的氨基酸序列的抗原肽,所述抗原肽用亲水部分(例如,诸如聚乙二醇(PEG))进行修饰,其中亲水部分通过至少一个,特别是一个或两个氨基酸,例如,诸如赖氨酸、谷氨酸和半胱氨酸或任何其它的能够用作将亲水和疏水部分偶联到肽片段的连接结构的合适的氨基酸或氨基酸类似物而共价地连接到抗原性肽的每一个末端。当使用 PEG 作为亲水部分时,游离的 PEG 末端共价地连接到磷脂酰乙醇胺或任何其它适合于作为锚定元件的化合物上,例如,以将抗原构建体埋在脂质体的双分子层中。

[0618] 在本发明的一个实施方案中,提供了嵌合抗体或嵌合抗体片段、或人源化抗体或人源化抗体片段,它们在可变区中包含嵌入在一个或多个人类或灵长类动物来源的构架区中并与衍生自人类或灵长类动物来源抗体的恒定区组合的至少一个非人类来源的 CDR,所述嵌合抗体或嵌合抗体片段、或人源化抗体或人源化抗体片段能够特异性地识别并结合 β 淀粉状蛋白单体肽。

[0619] CDR 含有最可能结合抗原的残基,并必须保留在重构抗体中。通过根据 Kabat 等,免疫学感兴趣的蛋白质序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest),第 5 版,美国健康和人类服务部(U. S. Department of Health and Human Services),美国政府印刷局(The United States Government Printing Office),1991 的序列定义 CDR。当关键残基在很大程度上决定 CDR 环的结构构象时,CDR 落入标准类型(Chothia 等,1989 Nature, 342, 877-883)。这些残基几乎总是保留在重构抗体中。

[0620] 在制备根据本发明的人源化抗体的方法中,将 C2 重链和轻链可变区(V_H 和 V_K)的氨基酸序列与 NCBI 及 Kabat 数据库中的啮齿类动物抗体 V_H 和 V_K 序列相比较。

[0621] 与 C2 V_K 最匹配的小鼠种系基因是 bb1,基因座 MMU231201,(Schable 等,1999)。比较显示两个氨基酸与这一种系序列不同,两个均位于 CDRL1 内。可以发现具有类似但不同的序列的成熟鼠抗体。若干个具有同一的 CDRL2 和同一的 CDRL3,但 C2 的 CDRL1 似乎是独特的。与人类种系 V_K 序列的比较显示来自亚组 V_{KII} 的基因对于 C2 V_K 是最匹配的(Cox 等,1994)。因此可将 C2 V_K 归于 KABAT 亚组 MuV_{KII} 序列。

[0622] 可以选择 DPK15 和人类 J 区域 HuJ_{K1} 以向人源化 V_K 提供受体构架序列。

[0623] 已经定义了可在可变轻链和重链之间的界面处的残基(Chothia 等,1985 J. Mol. Biol, 186, 651-663)。这些通常保留在重构抗体中。在 V_{KII} 亚组中,小鼠 C2 V_K 位置 87 的 Phe 很少在界面上,而在该界面上 Tyr 更常见,表明这一构架残基可能对于抗体活性很重要。Tyr 87 存在于人类种系和人源化 C2VK 中。

[0624] 因此,可以如此的设计人源化 V_K 序列,以使得 C2HuVK1 由具有来自 DPK15 和人类 J_{K1} 的构架的小鼠 C2 V_K CDR 组成。在本发明特定的实施方案中,可以在人类构架区位置 45 和 / 或 87 替换鼠残基。在可从小鼠单克隆抗体,特别是鼠抗体 ACI-01-Ab7C2 得到的 CDR2 区域中,可以在 Kabat 位置 50 和 / 或 53 进行氨基酸替换。残基 45 可能参与支持 CDR 的构象。残基 87 位于 V_H 和 V_K 结构域的界面上。因此,这些残基对于维持抗体结合可能是很关键的。

[0625] 与 C2 V_H AF 最匹配的小鼠种系基因是 VH7183,基因座 AF 120466(Langdon 等,2000)。与人类种系 V_H 序列的比较显示来自亚组 V_{HIII} 的基因与 C2 V_H 最匹配。可将 C2 V_H AF 归于 KABAT 亚组 MuV_{HIII} 。可选择序列 DP54 和人类 J 区域 HuJ_{H6} 以向人源化 V_H 提供受体

构架序列。

[0626] 比较显示在 C2VH 序列和人类受体种系序列 DP54 及 J_H6 之间有九个氨基酸不同,其大多位于 CDRH2 内。发现了具有同一或相似(一个残基不同)的 CDRH1 或具有相似的 CDRH2(一个残基不同)的成熟鼠抗体,但是没有抗体具有与 C2 V_H AF 同一的全部三个 CDR。C2 抗体的 CDRH3 极其短,仅仅由三个残基组成。然而,在数据库中发现了具有这一长度的 CDRH3 的其它抗体。C2 V_H 的残基 47 是 Leu,而不是较常见的 Trp,且残基 94 是 Ser 而不是通常的 Arg,表明这些构架残基可能对于抗体活性是很重要的。

[0627] 可以设计多种人源化 V_H 序列。C2HuVH1 由具有来自 DP54 的构架的 C2 V_H AF CDR 和 HuJ_H6 组成。在本发明特定的实施方案中,可以在人类构架区位置 47 或 94 或两者替换鼠残基。构架 2 中的残基 47 与 CDR 及 V_K 结构域两者接触。残基 94 可能参与支持 CDR 的构象。因此这些残基对于维持抗体结合可能是很关键的。

[0628] 可以设计不同的 HCVR 和 LCVR 区域,其包含可从供体抗体,例如鼠抗体得到的、埋入到天然或经修饰的人类或灵长类动物来源的构架区中的非人类 CDR。修饰可以特别地涉及构架区中的一个或多个氨基酸的交换,所述交换是通过在分别的亚组中的这一位置更普遍发现的非人类残基,特别是鼠残基,或通过具有与在分别的亚组中的这一位置更普遍发现的残基类似的性质的残基进行的。

[0629] 构架区的修饰,构架序列支撑 CDR 以它们正确的空间方向用于与抗原相互作用,并且构架残基有时甚至可以参与抗原结合。在本发明的一个实施方案中,进行测量以进一步改造所选择的人类构架序列以使得它们与啮齿类动物构架序列最类似,以最大化亲和力将保留在重构抗体中的可能性。

[0630] 因此,可以替换人类构架区中的鼠残基。具体而言,可以在人类重链可变区(HCVR)构架区位置 47 或 94 或两者,以及人类轻链可变区(LCVR)构架区位置 45 和 / 或 87 替换鼠残基。在可从小鼠单克隆抗体,特别是鼠抗体 ACI-01-Ab7C2 得到的 CDR2 区域中,可在 Kabat 位置 50 和 / 或 53 进行氨基酸替换。

[0631] 可以通过在分别的亚组中的这一位置较普遍地发现的鼠残基交换在人类构架区中上面所示位置中发现的残基。具体而言,在如 SEQ ID NO:15 所示的人类或灵长类动物来源的重链可变区的构架区中 Kabat 位置 47 的 Trp 可被 Leu 或被下述氨基酸残基替换,其中所述氨基酸残基具有类似的性质并且该氨基酸的替换导致这样的改变,即所述改变基本上在构象上或抗原性上中性的、产生在突变多肽的三级结构中的最小的变化、或产生在抗原决定簇中最小的变化。具体而言,在如 SEQ ID NO:15 所示的人类或灵长类动物来源的重链可变区的构架区中 Kabat 位置 47 的 Trp 还可被选自正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala 和 Phe 的氨基酸替换,特别地被 Ile 替换。可以考虑构象上和抗原性上中性的备选保守替换。

[0632] 在如 SEQ ID NO:15 所示的人类或灵长类动物来源的重链可变区的构架区中 Kabat 位置 94 的 Arg 可被 Ser 或被下述氨基酸残基替换,其中所述氨基酸残基具有类似的性质并且该氨基酸的替换导致这样的改变,即所述改变基本上在构象上或抗原性上中性的、产生在突变多肽的三级结构中的最小的变化、或产生在抗原决定簇中最小的变化。具体而言,在如 SEQ ID NO:15 所示的人类或灵长类动物来源的重链可变区的构架区中 Kabat 位置 94 的 Arg 可备选地被 Thr 替换。

[0633] 在本发明的另一个实施方案中,在人源化抗体中可以替换两个残基。

[0634] 在如 SEQ ID NO:12 所示的人类或灵长类动物来源的轻链可变区的构架区中 Kabat 位置 45 的 Gln 可被 Lys 或被下述氨基酸残基替换,其中所述氨基酸残基具有类似的性质并且该氨基酸的替换导致这样的改变,即所述改变基本上在构象上或抗原性上中性的、产生在突变多肽的三级结构中的最小的变化、或产生在抗原决定簇中最小的变化。具体而言,在如 SEQ ID NO:12 所示的人类或灵长类动物来源的轻链可变区的构架区中 Kabat 位置 45 的 Gln 可被选自 Arg、Gln 和 Asn 的氨基酸替换,特别地被 Arg 替换。

[0635] 在如 SEQ ID NO:12 所示的人类或灵长类动物来源的轻链可变区的构架区中 Kabat 位置 50 的 Leu 可被 Lys 或被下述氨基酸残基替换,其中所述氨基酸残基具有类似的性质并且该氨基酸的替换导致这样的改变,即所述改变基本上在构象上或抗原性上中性的、产生在突变多肽的三级结构中的最小的变化、或产生在抗原决定簇中最小的变化。具体而言,在如 SEQ ID NO:12 所示的人类或灵长类动物来源的轻链可变区的构架区中 Kabat 位置 50 的 Leu 可被选自 Arg、Gln 和 Asn 的氨基酸替换,特别地被 Arg 替换。

[0636] 在如 SEQ ID NO:12 所示的人类或灵长类动物来源的轻链可变区的构架区中 Kabat 位置 53 的 Asn 可被 His 和 Gln,或被下述氨基酸残基替换,其中所述氨基酸残基具有类似的性质并且该氨基酸的替换导致这样的改变,即所述改变基本上在构象上或抗原性上中性的、产生在突变多肽的三级结构中的最小的变化、或产生在抗原决定簇中最小的变化。具体而言,在如 SEQ ID NO:12 所示的人类或灵长类动物来源的轻链可变区的构架区中 Kabat 位置 53 的 Asn 可被选自 Gln、His、Lys 和 Arg 的氨基酸替换。

[0637] 在如 SEQ ID NO:12 所示的人类或灵长类动物来源的轻链可变区的构架区中 Kabat 位置 87 的 Thr 可被 Phe 或被下述氨基酸残基替换,其中所述氨基酸残基具有类似的性质并且该氨基酸的替换导致这样的改变,即所述改变基本上在构象上或抗原性上中性的、产生在突变多肽的三级结构中的最小的变化、或产生在抗原决定簇中最小的变化。具体而言,在如 SEQ ID NO:12 所示的人类或灵长类动物来源的轻链可变区的构架区中 Kabat 位置 87 的 Tyr 可被选自 Leu、Val、Ile 和 Ala 的氨基酸替换,特别地被 Leu 替换。

[0638] 然后可将这样得到的可变区与衍生自人类或灵长类动物来源抗体的恒定区,特别地分别与人类 IgG4 或 κ 恒定区组合,其中所述可变区包含埋入在一个或多个人类或灵长类动物衍生的构架区中的至少一个非人类来源的 CDR。可以例如通过将铰链区中位置 228 的丝氨酸改变为脯氨酸 (HuIgG4Ser-Pro) 来修饰 IgG4 恒定区。这一突变稳定了链间的二硫键,并且阻止了可能在天然人类 IgG4 制品中发生的半分子的形成。可以通过缺失如 SEQ ID NO:16 所示的位置 439 上的末端 Lys 进一步修饰 IgG4 恒定区。

[0639] 可以通过本领域已知的方法,例如诸如重叠 PCR 重组,来构建经修饰的可变区。可将嵌合抗体的表达盒 C2ChV_HAF 和 C2ChV_K 用于将构架区诱变为所需序列的模板。合成包含待改变区域的诱变引物对的组。可将所产生的人源化 V_H 和 V_K 表达盒克隆到本领域已知的合适的克隆载体中,例如诸如 pUC19。在确定了全部 DNA 序列对于每一个 V_H 和 V_K 都是正确的之后,可将经修饰的重链和轻链 V 区域基因作为表达盒从克隆载体中切除。然后可将它们转移到合适的表达载体中,所述表达载体诸如分别包括人类 IgG4Ser-Pro 或 κ 恒定区的 pSVgpt 和 pSVhyg。

[0640] 表达载体

[0641] 表达载体 pSVgpt 基于 pSV₂gpt (Mulligan 和 Berg, 1980), 且包括用于在细菌细胞

中选择的氨苄青霉素抗性基因、用于在哺乳动物细胞中选择的 gpt 基因、鼠重链免疫球蛋白增强子区域、编码恒定区基因的基因组序列和 SV40 多聚 A 序列。将用于表达的重链可变区作为 HindIII 至 BamHI 片段插入。

[0642] 表达载体 pSVhyg 包括用于在细菌细胞中选择的氨苄青霉素抗性基因、用于在哺乳动物细胞中选择的 hyg 基因、鼠重链免疫球蛋白增强子区域、编码 κ 恒定区基因且包括 κ 增强子的基因组序列和 SV40 多聚 A 序列。将用于表达的轻链可变区作为 HindIII 至 BamHI 片段插入。

[0643] 然后确定 DNA 序列对于表达载体中的人源化 V_H 和 V_K 是正确的。

[0644] 对于抗体生产,可将人源化重链和轻链表达载体导入本领域公知的合适的生产细胞系中,例如诸如 NSO 细胞。可以通过共转染完成表达载体的导入,其中所述共转染是通过电穿孔或任何其它本领域中可利用的合适的转化技术完成的。然后可选择并放大产生抗体的细胞系,以及纯化人源化抗体。然后可通过标准技术诸如 SDS-PAGE 分析纯化的抗体。

[0645] 具有提高的亲和力、特异性和稳定性的抗体

[0646] 可以轻微地修饰小鼠 C2 抗体的 CDRL2 序列 (“KVSNRFS”),而不会不利地影响抗体活性。可以通过将位置 50 的 K 改变为 R 以及将位置 53 的 N 改变为 S 进行保守突变。该两个备选的 CDRL2 序列因此分别是“RVSNRFS”和“KVSSRFS”。没有其它改变掺入到鼠 VK 序列中,分别作为 C2VK-R 和 C2VK-S。

[0647] 可以通过改变其糖基化特性或模式修饰上文描述的根据本发明的抗体或其片段的亲和力、特异性和稳定性,以产生提高了的治疗价值。

[0648] 为达到该在糖基化模式中的改变,可以改造宿主细胞,使得它们能够表达修饰糖蛋白的糖基转移酶活性的优选的范围,其升高复合物 N 连接的寡糖携带的二等分 GlcNAc。此外,可以得到糖蛋白的经修饰的糖形式,例如具有增强的 Fc 介导的细胞毒性的抗体,所述抗体包括完整抗体分子、抗体片段、或包括与免疫球蛋白的 Fc 区域等价区域的融合蛋白。

[0649] 获得具有经修饰的糖基化模式的抗体的方法是本领域普通技术人员公知的,并且例如描述于 EP 1071700、US2005272128、Ferrara 等 (2006) J BiolChem 281(8), 5032-5036)、Ferrara 等 (2006) Biotechnology and Bioengineering 93(5), 851-861。

[0650] 药物制备物和施与

[0651] 根据本发明的抗体,但特别是根据本发明的单克隆抗体可以用公知的技术制备为生理学上可接受的制剂,并且其可以包含可药用载体、稀释剂和 / 或赋形剂。例如,根据本发明和在上文中描述的包括任何功能等效抗体或其功能部分的抗体、特别是包括任何功能等效抗体或其功能部分的单克隆抗与可药用载体、稀释剂和 / 或赋形剂结合形成药物组合物。适宜的药学载体、稀释剂和 / 或赋形剂是本领域公知的并且包含例如磷酸缓冲盐溶液、水、乳液 (诸如油 / 水乳液)、多种湿润剂、无菌溶液等。

[0652] 根据本发明的药物组合物的配制可以根据本领域技术人员公知的标准方法完成。

[0653] 本发明的组合物可以以固体、液体或气溶胶的形式以合适的、药学有效剂量施与受试者。固体组合物的实例包括片剂、乳膏以及可植入的剂量单位。片剂可以经口施与。治疗乳膏可以局部施与。可植入的剂量单位可以局部地例如在肿瘤部位施与;或可以经植入用于全身地释放治疗组合物,例如经皮下植入。液体组合物的实例包括适合肌内、皮下、静

脉内、动脉内注射的制剂,以及用于局部或眼内施与的制剂。气溶胶制剂的实例包含用于施与至肺的吸入制剂。

[0654] 组合物可以通过标准的施与途径施与。一般来说,组合物可以通过局部、经口、直肠、鼻、真皮内、腹膜内或非肠胃的(例如静脉内、皮下、肌肉内)途径施与。此外,还可将组合物掺入到持续释放基质中,诸如生物可降解的聚合物,将聚合物植入期望递送位置例如肿瘤部位附近。方法包括单剂量的施与、以预定的时间间隔重复剂量施与、以及持续施与预定的一段时间。

[0655] 本文使用的持续释放基质是由通常可被酶或酸/碱水解或通过溶解而可降解的聚合物这样的物质制造的基质。一旦植入到体内,基质受到酶和体液的影响。期望的持续释放基质选择为生物相容性物质,诸如脂质体、聚丙交酯(聚丙交酯酸)、聚乙交酯(乙醇酸的聚合物)、聚丙交酯共乙交酯(乳酸和乙醇酸的共聚物)、聚酞类、聚原酸酯、多肽、透明质酸、胶原、硫酸软骨素、羧酸、脂肪酸、磷脂、多糖、核酸、聚氨基酸、诸如苯丙氨酸、酪氨酸、异亮氨酸的氨基酸、多核苷酸、聚乙烯基丙烯、聚乙烯吡咯烷酮和聚硅氧烷。优选的生物可降解基质是聚丙交酯、聚乙交酯或聚丙交酯共乙交酯(乳酸和乙醇酸的共聚物)之一的基质。

[0656] 本领域技术人员公知组合物的剂量取决于多种因素,例如,诸如待治疗的症状、所使用的特定组合物、以及其它临床因素(诸如患者的体重、尺寸、性别和一般健康状况)、身体表面面积、待施与的特定的化合物或组合物、同时施与的其它药物以及施与途径。

[0657] 组合物可以和其它包含生物活性物质或化合物的组合物联合施与,特别是选自下列的化合物的至少一种、以及本发明的抗体、以及任意的可药用载体和/或稀释剂和/或赋形剂:抗氧化应激的化合物、抗细胞凋亡的化合物、金属螯合剂、DNA修复抑制剂诸如哌仑西平和代谢物、3-氨基-1-丙磺酸(3APS)、1,3-丙二磺酸(1,3PDS)、 α -分泌酶活化剂、 β -和 γ -分泌酶抑制剂、 τ 蛋白、神经递质、 β 折叠破坏剂、淀粉状蛋白 β 清除/减少细胞内组分的引诱剂、包括焦谷氨酸化淀粉状蛋白 β 3-42在内的N端截短淀粉状蛋白 β 的抑制剂、消炎分子、“非典型的抗精神病药物”(例如,诸如氯氮平、齐拉西酮、利哌利酮、阿立哌唑或奥氮平)、或胆碱酯酶抑制剂(ChEI)(诸如他克林、卡巴拉汀、多奈哌齐、和/或加兰他敏)、M1激动剂和其它药物,包括任何淀粉状蛋白或 τ 修饰药物、以及营养补充剂,诸如维生素B12、半胱氨酸、乙酰胆碱前体、卵磷脂、胆碱、银杏、乙酰基-L-肉毒碱、艾地苯醌、丙戊茶碱或黄嘌呤衍生物;以及疾病治疗方法。

[0658] 蛋白质药理学活性物质可以以每剂1ng至10mg之间的量存在。一般地,施与方案可以是0.1 μ g至10mg之间范围的根据本发明的抗体、特别是1.0 μ g至1.0mg的范围、更特别的1.0 μ g至100 μ g之间的范围,所有落入这些范围的单个数值也是本发明的一部分。如果通过连续输注进行施与,更适当的剂量可以是每小时每千克体重0.01 μ g至10mg单位之间的范围,所有落入这些范围的单个数值也是本发明的一部分。

[0659] 施与通常是非肠胃的,例如静脉内地施与。非肠胃施与的制品包括无菌水性或非水性溶液、悬浮液和乳液。非水性溶剂包括但不限于丙二醇、聚乙二醇、植物油(诸如橄榄油)、以及可注射的有机酯(诸如油酸乙酯)。水性溶液可以选自水、醇/水溶液、乳液或包括盐和缓冲介质的悬浮液。非肠胃的载体包括氯化钠溶液、林格氏右旋糖、右旋糖和氯化钠、乳酸林格氏液或不挥发油。静脉内载体包括流体和营养补充物、电解质补充物(诸如基于林格氏右旋糖的那些)以及其它物质。也可以存在防腐剂,例如,诸如抗菌剂、抗氧化剂、

螯合剂、惰性气体等。

[0660] 药物组合物可以进一步包含蛋白质载体,例如,诸如血清白蛋白或免疫球蛋白,特别是人类来源的。其它的生物活性物质也可以存在于发明的药物组合物中,取决于它的目的用途。

[0661] 当结合靶标位于脑中时,本发明的某些实施方式提供抗体或其活性片段穿过血脑屏障。某些神经变性疾病与血脑屏障渗透性的升高相关,由此抗体或其活性片段能很容易地被导入脑中。当血脑屏障仍保持完整无缺时,存在若干种本领域已知的用于将分子转运穿过它的方法,包括但不限于:物理方法、基于脂质地方法、以及基于受体和通道的方法。

[0662] 转运抗体或其活性片段穿过血脑屏障的物理方法包括但不限于:完全地规避血脑屏障,或通过血脑屏障中产生开口。规避方法包括但不限于:直接注射至脑中(例如参见, Papanastassiou 等, *Gene Therapy* 9:398-406(2002))和在脑中植入传送装置(例如参见, Gill 等, *Nature Med.* 9:589-595(2003)、和 Gliadel Wafers™, Guildford Pharmaceutical)。在屏障中产生开口的方法包括但不限于:超声(例如参见美国专利公开 2002/0038086 号)、渗透压力(例如通过施与高渗甘露糖醇 (Neuwelt, E. A., 血脑屏障的应用及其操作 (Implication of the Blood-Brain Barrier and its Manipulation), 卷1和2, Plenum Press, N. Y. (1989)))、例如通过缓激肽或透化剂 A-7(例如美国专利 5, 112, 596、5, 268, 164、5, 506, 206 和 5, 686, 416 号)的透化作用、以及用含有编码抗体或抗原结合片段的基因的载体转染跨越血脑屏障的神经元(例如参见美国专利公开 2003/0083299 号)。

[0663] 转运抗体或其活性片段穿过血脑屏障的基于脂质体的方法包括但不限于:将抗体或其活性片段封进与抗体结合片段偶联的脂质体内部,所述抗体结合片段结合血脑屏障的血管内皮上的受体(例如参见美国专利申请公开 20020025313 号)、以及将抗体或其活性片段包被在低密度脂蛋白颗粒中(例如参见美国专利申请公开 20040204354 号)或载脂蛋白 E 中(例如参见美国专利申请公开 20040131692 号)。

[0664] 转运抗体或其活性片段穿过血脑屏障的基于受体和通道的方法包括但不限于:应用糖皮质激素阻滞物增加血脑屏障的渗透性(例如参见美国专利申请公开 2002/0065259、2003/0162695 和 2005/0124533 号);活化钾通道(例如参见美国专利申请公开 2005/0089473 号)、抑制 ABC 药物转运装置(例如参见美国专利申请公开 2003/0073713 号);用转铁蛋白包被抗体并调制活化一个或多个转铁蛋白受体(例如参见美国专利申请公开 2003/0129186 号)、以及阳离子化抗体(例如参见美国专利 5, 004, 697 号)。

[0665] 检测 / 诊断

[0666] 在本发明另外的实施方案中,提供了可用于检测和诊断淀粉状蛋白相关疾病或病症的方法和试剂盒。这些方法包括通常用于检测或定量生物样本中或原位条件下的物质的公知的免疫学方法。

[0667] 淀粉状蛋白相关疾病或病症的诊断可以通过检测单克隆抗体或其活性片段与样本或原位淀粉状蛋白表位的免疫特异结合来完成,其包括使怀疑含有淀粉状蛋白的样本或特定身体部分或身体区域与结合淀粉状蛋白表位的抗体接触,允许抗体结合至淀粉状蛋白以形成免疫复合物,检测免疫复合物的形成,并将免疫复合物的存在或不存在与样本或特定身体部分或区域中淀粉状蛋白的存在或不存在相关联,任选地将所述免疫复合物的量与正常对照值比较,其中与正常对照值相比较,所述集聚物的量的增加指示了所述患者患有

淀粉状蛋白相关疾病或病症或者有发展为淀粉状蛋白相关疾病或病症的危险。

[0668] 通过检测单克隆抗体或其活性片段与样本中的或原位的淀粉状蛋白的表位的免疫特异性结合可以实现监测用根据本发明的抗体或疫苗组合物治疗后的患者中的微小残留病 (minimal residual disease), 其包括使怀疑含有淀粉状蛋白抗原的样本或特定身体部分或身体区域与结合淀粉状蛋白表位的抗体接触, 允许抗体结合至淀粉状蛋白抗原以形成免疫复合物, 检测免疫复合物的形成, 并将免疫复合物的存在或不存在与样本或特定身体部分或区域中淀粉状蛋白的存在或不存在相关联, 任选地将所述免疫复合物的量与正常对照值比较, 其中与正常对照值相比较, 所述集聚物的量的增加指示了所述患者可能仍患有微小残留病。

[0669] 通过检测单克隆抗体或其活性片段与样本中的或原位的淀粉状蛋白表位的免疫特异性结合可以实现预测用根据本发明的疫苗组合物治疗的患者的反应性, 其包括使怀疑含有淀粉状蛋白抗原的样本或特定身体部分或身体区域与结合淀粉状蛋白表位的抗体接触, 允许抗体结合至淀粉状蛋白抗原以形成免疫复合物, 检测免疫复合物的形成, 并将免疫复合物的存在或不存在与样本或特定身体部分或区域中淀粉状蛋白的存在或不存在相关联, 任选地比较治疗开始前后所述免疫复合物的量, 其中所述集聚物的量的降低指示了所述患者对治疗具有高的反应潜力。

[0670] 可以用于诊断淀粉状蛋白相关疾病或病症的生物样本是例如体液, 诸如血清、血浆、唾液、胃分泌液、黏液、脑脊髓液、淋巴液等; 或从生物体获得的组织或细胞样本, 诸如神经、脑、心脏或血管组织。为检测在样本中淀粉状蛋白的存在或不存在, 可以使用任何本领域普通技术人员公知的免疫测定法 (参见 Harlow 和 Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1988) 555-612), 例如, 利用应用了用于检测的第二试剂的间接检测方法的分析、ELISA 和免疫沉淀法和凝集测试法。例如 Maertens 和 Stuyver 的 W096/13590, Zrein 等 (1998) 和 W096/29605 给出了这些测试法的详细描述。

[0671] 对于原位诊断, 可以利用领域公知的方法将抗体或其任何活性和功能部分施与待诊断的生物, 例如静脉内、鼻内、腹膜内、大脑内、动脉内注射, 从而根据本发明的抗体与淀粉状蛋白抗原上的表位区域之间可能发生特异性结合。可以通过连接至抗体或其功能片段的标记物检测抗体 / 抗原复合物。

[0672] 用于诊断应用的免疫测定法通常依赖于标记的抗原、抗体或用于检测的第二试剂。蛋白或试剂可以用本领域技术人员公知的化合物标记, 包括酶、放射性同位素、以及荧光、发光以及显色物质, 包括有色粒子, 诸如胶体金和乳胶微球。在这些方法中, 放射性标记几乎可以应用于所有类型的测试并且具有最多的变化。在必须避免放射性或需要快速结果时, 缀合酶的标记特别有用。尽管荧光染料在使用中需要昂贵的设备, 但荧光染料提供了非常敏感的检测方法。用于这些检测的抗体包括单克隆抗体、多克隆抗体和经亲和纯化的多克隆抗体。

[0673] 备选地, 可以通过与经标记的对免疫球蛋白具有亲和力的物质 (诸如蛋白 A 或蛋白 G 或第二抗体) 的反应来间接地标记抗体。抗体可以与第二物质缀合, 并且用标记的对缀合到抗体的第二物质有亲和力的第三物质检测。例如, 抗体可以缀合生物素, 以及用标记的亲合素或链亲合素检测抗体 - 生物素缀合物。类似的, 抗体可以缀合半抗原, 以及用标记

的抗半抗原抗体检测抗体-半抗原缀合物。

[0674] 本领域技术人员公知这些和其它可用于本发明的适合标记物。可以应用本领域普通技术人员普遍公知的标准技术完成这些标记物与抗体或其片段的结合。Kennedy, J. H., 等, 1976 (Clin. Chim. Acta 70 :1-31), 和 Schurs, A. H. W. M. 等, 1977 (Clin. Chim Acta 81 : 1-40) 描述了典型的技术。在后者提到的偶联技术是戊二醛法、高碘酸盐法、双马来酰亚胺法以及其它方法, 所有的这些都在此引入作为参考。

[0675] 当前的免疫测定法利用双抗体方法以检测分析物的存在, 其中, 抗体通过与已用可检测的标记物标记的第二抗体反应被间接标记。第二抗体优选的是与单克隆抗体来源动物的抗体结合的抗体。换句话说, 如果单克隆抗体是小鼠抗体, 则标记的第二抗体是抗小鼠抗体。对于下面描述的测试中使用的单克隆抗体, 这种标记物优选地是抗体包被的珠, 特别是磁珠。对于将在此描述的免疫测定中应用的多克隆抗体, 优选的标记物是可检测的分子, 诸如放射性的、荧光的、或电化学发光物质。

[0676] 也可以在本发明的范围内应用备选的双抗体系统, 由于它们适合于快速测定分析物的存在, 经常被称为快速格式系统 (fast format systems)。该系统需要抗体与分析物之间的高亲和力。根据本发明的一个实施方案, 用一对各自对淀粉状蛋白特异的抗体测定淀粉状蛋白的存在。所述的抗原对中的一个在此被称为“检测抗体”, 以及所述的抗原对中的另一个在此被称为“俘获抗体”。本发明的单克隆抗体可以用做俘获或检测抗体。本发明的单克隆抗体也可作为俘获和检测抗体一起用于单个分析。本发明的一个实施方案因此应用双抗体夹心法以在生物流体样本中检测淀粉状蛋白。在这一方法中, 分析物 (淀粉状蛋白) 被夹在检测抗体和俘获抗体之间, 俘获抗体不可逆的固定在固体支持物上。检测抗体包含可检测的标记物, 以鉴定抗体-分析物夹心的存在并且因此鉴定分析物的存在。

[0677] 示例性固相物质包括但不限于在放射免疫测定和酶免疫测定领域中公知的微量滴定板、聚苯乙烯试管、磁性、塑料或玻璃小珠和玻片。用于将抗体偶联到固相的方法也是本领域技术人员公知的。最近, 多种多孔材料诸如尼龙、硝化纤维素、醋酸纤维素、玻璃纤维和其它的多孔聚合物也已被用做固体支持物。

[0678] 本发明也涉及检测生物样本中淀粉状蛋白的诊断试剂盒, 其包含上面定义的组合物。此外, 本发明涉及后面的诊断试剂盒, 除了如上面定义的组合物外, 其还包括上面所定义的检测试剂。术语“诊断试剂盒”一般涉及本领域公知的任何诊断试剂盒。更具体地说, 后一术语指如在 Zrein 等 (1998) 描述的诊断试剂盒。

[0679] 本发明的另一个目的是提供用于检测和诊断淀粉状蛋白相关疾病和病症的包含根据本发明的抗体的新免疫探针和测试试剂盒。对于免疫探针, 抗体直接或间接的与合适的报告分子 (例如, 酶或放射性核素) 相连接。测试试剂盒包含容纳一种或多种根据本发明的抗体的容器, 以及使用抗体用于结合淀粉状蛋白以形成免疫复合物及检测免疫复合物的形成从而使免疫复合物的存在或不存在与淀粉状蛋白存在或不存在相关联的说明书。

实施例

[0680] 材料

[0681] 小鼠单克隆抗体 ACI-01-Ab7C2 (在本申请中称为“mC2”, 以及对于人源化 C2 抗体称为 hC2) 的开发和制备描述于 2005 年 12 月 12 日提交的共同未决申请 EP 05027092. 5, 其

全文在此引入作为参考。

[0682] 产生小鼠单克隆抗体 ACI-01-Ab7C2(在本申请中称为“mC2”,以及对于人源化 C2 抗体,称为 hC2) 的杂交瘤细胞 FP-12H3-C2 于 2005 年 12 月 1 日在共同未决申请 EP05027092.5 号中根据布达佩斯条约以保藏号 DSM ACC2750 保藏在位于德国布劳恩斯切魏格,38124 布劳恩斯切魏格,马斯切尔奥德尔韦格 1B 的“德意志微生物保藏中心(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH;DSMZ)”中。

[0683] 将杂交瘤细胞培养于补充有 10% 胎牛血清和抗生素(青霉素/链霉素)的 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基(DMEM)中。检查了所产生的抗体的同位型,并且发现是小鼠 IgG2b/ κ ,和期望的一样。

[0684] 测试法

[0685] 与淀粉状蛋白 β 结合的 ELISA 提供了 C2 抗体效力的可靠测量。阳性对照抗体,鼠 FP-12H3-C2(Genovac 批号:AK379/01),以及标准 Chemicon 抗体 1560(批号:0508008791)。

[0686] 人类恒定区的选择

[0687] 对于临床抗体候选者来说,免疫系统的募集是不期望的,对于重链,所选择的人类恒定区是人类 IgG4,对其进行修饰以将铰链区中位置 228 的丝氨酸改变为脯氨酸(HuIgG4Ser-Pro)。这一突变稳定了链间的二硫键,并且阻止了可能在天然人类 IgG4 制品中发生的半分子的形成。从生产细胞系表达的抗体还将具有移除的末端赖氨酸。人类恒定区 HuIgG4Ser-Pro 和人类 κ 的序列分别在 SEQ ID NO:17 和 14 中给出。

[0688] 实施例 1 抗体可变区的克隆和测序

[0689] 应用 Qiagen Rneasy 微型试剂盒(目录号:74104)从 3×10^6 个杂交瘤细胞(一个 T175 培养瓶)中制备总 RNA。将 RNA 洗脱在 50 μ L 水中,并在 1.2% 琼脂糖凝胶上检查。保留来自细胞的条件培养基,并在抗体活性测试法中将样本用于测试。

[0690] 用小鼠 IgG 和 κ 恒定区引物应用逆转录酶制备 V_H 和 V_K cDNA。应用大量信号序列引物通过 PCR 扩增第一链 cDNA。将扩增的 DNA 凝胶纯化并克隆至载体 pGem[®] T Easy(Promega)中。通过 PCR 针对期望大小的插入片段对得到的 V_H 和 V_K 克隆进行筛选,并通过自动 DNA 测序确定所选择的克隆的序列。参照其它抗体序列(Kabat EA 等,1991)确定互补决定区(CDR)在序列中的位置。在本申请中贯穿使用对于抗体可变区的 Kabat 编号规则;因此残基编号可能与严格的线性编号不同。

[0691] mC2V κ 的 DNA 序列及推出的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:29 和 27 所示。四个克隆给出这一同一的生产序列。在许多克隆中也发现了由杂交瘤融合配偶体产生的非生产性异常 V_K 序列。

[0692] 对于 mC2V H ,分离了两个不同的生产性序列。在总共 29 个克隆中发现了 mC2V H AF 序列(参见 SEQ ID NO:30),在个别克隆中有 14 个单碱基对改变。在总共 8 个克隆中发现了 mC2V H B 序列。它们中的五个代表多数序列,而其它 3 个克隆是在其上的变体。有可能这些类似 V_H B 序列是作为 PCR 扩增的人工产物产生的。从 C2 杂交瘤细胞中也得到了非生产性异常 V_H ,并将其归因于有缺陷的 V-D-J 结合。

[0693] 为确定哪一个是正确的活性 mC2V H ,用该两个不同的 V_H 序列 AF 和 B 与 mC2V κ 组合,制备了两个嵌合抗体,以测试正确的抗体活性。

[0694] 实施例 2 嵌合抗体基因的构建

[0695] 以其最常见形式的人类嵌合抗体由与鼠（或其它非人类）可变区连接的人类恒定区组成。嵌合抗体提供了非常有用的工具，首先用于确认已鉴定的正确的可变区，其次在具有相同的效应子功能并利用相同的第二检测试剂作为人源化或工程抗体的抗原结合测试法中用作对照抗体，以及还可用于研究关于抗体特定靶标的人类恒定区的药物代谢动力学和其它特性。

[0696] 构建了两个嵌合重链表达载体，其由与表达载体 pSVgpt 中的 HuIgG4(Ser-Pro) 恒定区连接的 mC2V_H AF 或 mC2V_H B 可变区组成。该载体基于 pSV₂gpt (Mulligan 和 Berg, 1980)，且包括用于在细菌细胞中选择的氨苄青霉素抗性基因、用于在哺乳动物细胞中选择的 gpt 基因、鼠重链免疫球蛋白增强子区域、编码恒定区基因的基因组序列和 SV40 多聚 A 序列。将用于表达的重链可变区作为 HindIII 至 BamHI 片段插入。

[0697] 构建了嵌合轻链载体，其由与表达载体 pSVhyg 中的人类 C_κ 恒定区的 C2VK 组成。pSVhyg (Hieter PA 等, 1980) 包括用于在细菌细胞中选择的氨苄青霉素抗性基因、用于在哺乳动物细胞中选择的 hyg 基因、鼠重链免疫球蛋白增强子区域、编码 κ 恒定区基因且包括 κ 增强子的基因组序列和 SV40 多聚 A 序列。将用于表达的轻链可变区作为 HindIII 至 BamHI 片段插入。

[0698] 应用载体 VH-PCR1 和 VK-PCR1 作为模板 (Riechmann 等, 1988)，通过添加包括前导信号肽、前导内含子和鼠免疫球蛋白启动子的 5' 侧翼序列，以及包括剪接部位和内含子序列的 3' 侧翼序列，构建鼠 C2VH 和 VK 序列的表达盒。确定嵌合表达载体中 VH 和 VK 的 DNA 序列是正确的。表达盒中 VH 和 VK 基因的 DNA 和氨基酸序列如图 1 和 2 所示。

[0699] 实施例 3 嵌合抗体的表达

[0700] 3.1 在稳定细胞系中的表达

[0701] 用于抗体表达的宿主细胞系是 NS0，其为不产生免疫球蛋白的小鼠骨髓瘤，获自欧洲动物细胞培养物保藏中心 (European Collection of Animal Cell Cultures), Porton UK (ECACC 号 85110503)。通过电穿孔将重链和轻链表达载体共转染入 NS0 细胞。在补充有 10% 胎牛血清 (FBS)、0.8 μg/ml 霉酚酸和 250 μg/ml 黄嘌呤的 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基 (DMEM) 中选择表达 gpt 基因的克隆。通过用于人类 IgG 的 ELISA 筛选产生人类抗体的转染的细胞克隆。放大分泌抗体的细胞系，以及选择产量最高的细胞并冷冻于液氮中。在如上面那样的但仅含有 5% FBS 的培养基中放大对于每一抗体的最佳生产细胞系。应用 **Prosep®**-A (Bioprocessing 有限公司) 纯化嵌合抗体。通过对人类 IgG κ 抗体的 ELISA 确定浓度。还通过 SDS-PAGE 分析抗体。

[0702] 3.2 嵌合抗体的瞬时表达

[0703] 为加速不同嵌合抗体的测试，应用瞬时表达以快速生产小量的含有重组抗体的细胞上清液用于测试。将 mC2V_H 和 V_K 表达盒转移至基于 pcDNA3.1 (Invitrogen) 的载体上用于瞬时表达。重链载体包括人类 IgG 恒定区。轻链载体包括人类 κ 恒定区。根据生产商提供的方案利用 Lipofectamine 2000 试剂 (Invitrogen 目录号: 11668) 将 mC2V_H AF 和 mC2V_H B 两者与 mC2V_K 转染至人类胚肾 (HEK 298) 细胞中。在转染 3 天后，从细胞中收获条件培养基。通过用于人类 IgG κ 抗体的 ELISA 确定所产生的抗体量。

[0704] 实施例 4：嵌合 C2 抗体的活性

[0705] 4.1 通过瞬时转染产生的嵌合 C2 抗体的活性

[0706] 在结合淀粉状蛋白 β 的 ELISA 中测试两个不同嵌合抗体的来自瞬时转染的条件培养基样本。结果清楚地表明 C2VH AF 是正确的序列。C2V_HAF/C2V_K 嵌合抗体在测试中很好地结合,而 C2V_H B/C2V_K 完全没有显示出任何结合。Chemicon 1560 鼠对照抗体显示出良好的结合,但通过经纯化的鼠 C2 抗体提供的结合很低。应当注意,对于具有小鼠恒定区的鼠抗体和具有人类恒定区的嵌合抗体的比较,应用了不同的二抗,因此该结果不是可以直接比较的。后面发现来自 C2 杂交瘤细胞的条件培养基在测试法中给出了良好的结果。

[0707] 4.2 纯化的嵌合 C2 抗体的活性

[0708] 如所描述的那样从稳定的 NS0 细胞中纯化两种不同的 C2 嵌合抗体,并应用淀粉状蛋白 β ELISA 进行测试。得到的结果与用瞬时表达的抗体得到的结果一致。C2ChVH AF/ChVK 抗体在 ELISA 中结合良好,而 C2ChVH B/ChVK 抗体完全不结合。

[0709] 实施例 5:人源化 C2 抗体基因的设计

[0710] 将 mC2V_H 和 V_K 氨基酸序列与 NCBI 及 Kabat 数据库中的啮齿类动物抗体 V_H 和 V_K 序列相比较。

[0711] 5.1 轻链可变区

[0712] 与 mC2V_K 最匹配的小鼠种系基因是 bb1,基因座 MMU231201 (Schable 等,1999)。仅仅两个氨基酸与该种系序列不同,两个均位于 CDRL1 内。发现了具有类似但不同一的序列的成熟鼠抗体。若干个具有同一的 CDRL2 和同一的 CDRL3,但 mC2 的 CDRL1 似乎是独特的。可将 mC2V_K 归于 KABAT 亚组 MuV_KII。mC2V_K 的位置 87 是 F 而不是在该亚组中更常见的 Y,表明这一构架残基对于抗体活性可能是很重要的。与人类种系 V_K 序列的比较显示来自亚组 V_KII 的基因对于 C2V_K 是最匹配的 (Cox 等,1994)。选择序列 DPK15 和人类 J 区域 HuJ_K1 以向人源化 V_K 提供受体构架序列。

[0713] 设计了四个人源化 V_K 序列。C2HuVK1 由与来自 DPK 15 和人类 J_K1 的构架区一起的 mC2V_K CDR 组成。在第 2、3 和 4 种形式中,在构架中在位置 45 或 87 上或两者替换了鼠残基。残基 45 可能参与支持 CDR 的构象。残基 87 位于 V_H 和 V_K 结构域的界面上。因此,这些残基可能对于维持抗体结合是很关键的。位置和轻链构架区中进行的改变如表 6 所示。人源化序列与 mC2V_K 序列以及与 DPK15 和人类 J_K1 的比较。

[0714] 5.2 重链可变区

[0715] 与 mC2V_H AF 最密切匹配的小鼠种系基因是 VH7183,基因座 AF120466 (Langdon 等,2000)。该比较如图 3 所示。九个氨基酸与这一种系序列不同,大多数位于 CDR2 内。发现了具有同一或类似(一个残基不同)的 CDR1 或具有类似 CDR2(一个残基不同)的成熟鼠抗体,但是没有一个抗体具有三个与 mC2V_H AF 同一的 CDR。mC2 抗体的 CDR3 极其短,仅由三个残基组成。然而,在数据库中发现了具有这一长度的 CDR3 的其它抗体。可将 mC2V_H AF 归于 KABAT 亚组 MuV_HIIID。mC2V_H 的残基 47 是 L 而不是较常见的 W,以及残基 94 是 S 而不是通常的 R,表明这些构架残基对于抗体活性可能是很重要的。与人类种系 V_H 序列的比较显示来自亚组 V_HIII 的基因与 mC2V_H 最匹配。选择了序列 DP54 和人类 J 区域 HuJ_H6 以向人源化 V_H 提供受体构架序列。

[0716] 设计了四个人源化 V_H 序列。C2HuVH1 由与来自 DP54 和 HuJ_H6 的构架一起的 mC2V_H AF CDR 组成。在第 2、3 和 4 种形式中,在构架中在位置 47 或 94 处或两者替换了鼠残基。构架 2 中的残基 47 与 CDR 及 V_K 结构域两者接触。残基 94 可能参与支持 CDR 的构象。因

此,这些残基可能对于维持抗体结合是关键的。

[0717] 位置和在重链构架区中进行的改变如表 7 所示。

[0718] 实施例 6 :人源化抗体基因的构建

[0719] 通过重叠 PCR 重组方法构建修饰的可变区。将嵌合抗体 C2ChV_H AF 和 C2ChV_K 的表达盒用作用于将构架区诱变为所需序列的模板。合成包含待改变区域的诱变引物对的组。将所产生的人源化 V_H 和 V_K 表达盒克隆到 pUC19 中,并确定全部 DNA 序列对于每一个 V_H 和 V_K 都是正确的。将经修饰的重链和轻链 V 区域基因作为 HindIII 至 BamHI 的表达盒从 pUC19 中切除。然后将它们转移到分别包括人类 IgG4 Ser-Pro 或 κ 恒定区的 pSVgpt 和 pSVhyg 中,作为嵌合抗体载体。确定表达载体中的人源化 V_H 和 V_K 的 DNA 序列是正确的。

[0720] 实施例 7 人源化抗体的表达

[0721] 7.1 在稳定细胞系中的表达

[0722] 至于嵌合抗体的表达,将人源化重链和轻链表达载体通过电穿孔共转染至 NS0 细胞中。选择并放大产生抗体的细胞系,并且纯化人源化抗体,确切地作为嵌合抗体。通过 SDS-PAGE 分析纯化的抗体。

[0723] 7.2 人源化抗体的瞬时表达

[0724] 为加速不同人源化 V_H 和 V_K 构建体的测试,还将 C2 人源化 V_H 和 V_K 表达盒转染至 7.2 节描述的用于瞬时表达的载体中。将所述四个人源化 C2V_K 构建体与嵌合 C2V_H 构建体共转染至 HEK293 细胞。类似地,将四个人源化 C2V_H 构建体与嵌合 C2V_K 构建体共转染至 HEK293 细胞。转染三天后,从细胞中收获条件培养基。通过用于人类 IgG κ 抗体的 ELISA 确定产生的抗体量。

[0725] 实施例 8 :人源化 C2 抗体的活性

[0726] 8.1 通过瞬时转染产生的人源化 C2 抗体的活性

[0727] 在淀粉状蛋白 β ELISA 中测试来自瞬时转染的条件培养基样本。所得到的结果清楚地表明当与嵌合 C2 κ 链组合时,人源化 VH 构建体 C2HuVHAF 的第 2 和 4 种形式是有功能的,并且在测试法中与嵌合 C2 抗体是相当的。相反,含有与嵌合 C2 κ 链组合的 C2HuVH AF 的第 1 和 3 种形式的抗体在测试法中完全没有显示出结合。这表明在位置 94 的鼠残基的替换对于抗体活性是必需的。在 ELISA 中含有与四个人源化 C2 κ 链组合的嵌合 C2 重链的抗体全部都显示出良好的结合,其与嵌合抗体是相当的。

[0728] 8.2 纯化的人源化 C2 抗体的活性

[0729] 如所描述的那样从稳定的 NS0 细胞系纯化包括两个人源化重链和四个人源化轻链的所有组合的八个不同的人源化 C2 抗体,并使用淀粉状蛋白 β ELISA 测试(图 4)。

[0730] 所得到的结果清楚地表明在测试法中 C2HuVH4 抗体比 C2HuVH2 抗体表现更好。在 C2HuVH2 抗体中,C2HuVH2/HuVK3 显示出最佳的结合活性,但与嵌合对照抗体 C2ChVHAF/ChVK 相比,其约降低了两倍。与对照相比,C2HuVH2/HuVK2 活性降低了四至五倍。包含与四个不同的人源化轻链一起的 C2HuVH4 的抗体的活性是类似的。观察到最高活性的是 C2HuVH4/HuVK1,且四个抗体在测试法中都与对照嵌合抗体相接近。

[0731] 实施例 9 对 CDRL2 的修饰

[0732] 9.1 设计具有修饰的 CDR2 的轻链

[0733] 如上面提到的那样,许多抗体与 C2 抗体共有相同的 CDRL2 序列(“KVSNRFS”)。决

定测试是否可以轻微地修饰 CDRL2 而不会不利地影响抗体活性。选择了两个保守替换：位置 50 的 K 替换为 R，以及位置 53 的 N 替换为 S。因此，该两个备选的 CDRL2 序列是“RVSNRFS”和“KVSSRFS”。将它们掺入没有其它改变的鼠 V_k 序列中，分别作为 mC2VK-R 和 mC2VK-S。

[0734] 9.2 修饰的 CDRL2 抗体的瞬时表达

[0735] 将具有在 11.2.1 节中描述的经修饰的 CDRL2 的两个 C2 轻链构建体克隆至轻链载体，用于瞬时表达。每一个都与嵌合 C2V_H 载体共转染至 HEK293 细胞中。转染三天后从细胞收获条件培养基。通过用于人类 IgG κ 抗体的 ELISA 确定所产生的抗体量。

[0736] 9.3 具有经修饰的 CDRL2 的 C2 抗体的活性

[0737] 在淀粉状蛋白 β ELISA 中测试来自具有和 mC2V_H 组合的经修饰的 CDRL2 的 mC2V_KS 瞬时转染的条件培养基样本（图 5）。VK-R 和 VK-S 抗体两者都与嵌合 C2 抗体相当，表明在测试法中，所选择的对 CDRL2 的各修饰不会显著地影响抗体的活性。

[0738] 实施例 10 亲和力测定

[0739] 为评估小鼠 (ACI-01-Ab-7-C2) 嵌合 (AF) 和人源化抗体 (H4K1、H4K4) 的结合特异性和亲和力，应用淀粉状蛋白 β 1-42 单体和纤维作为固定在 CM5 芯片上的抗原进行 BIACORE. RTM. 分析。BIACORE. RTM. 技术利用在抗体结合至固定在层上的抗原后表面层上的折射率改变。通过从表面折射的激光的表面等离子体共振 (surface plasmon resonance ;SPR) 检测结合。信号动力学结合速率 (on rate) 和解离速率 (off rate) 的分析允许区分非特异和特异相互作用。使用的抗体浓度在 0.05 μ M 至 1.0 μ M 的范围。

[0740] 表 1：小鼠 (ACI-01-Ab-7-C2) 嵌合 (AF) 和人源化抗体 (H4K1、H4K4) 对淀粉状蛋白 β 1-42 单体和纤维的结合特异性和亲和力

[0741] 单体

纤维

[0742] k_a (1/Ms) k_d (1/s) KD k_a (1/Ms) k_d (1/s) KD (M)

[0743] (M)

[0744] 小鼠 ACI-01-Ab-7-C2 | 1.8E+04 | 2.7E-03 | 1.5E-07 | 2.4E+04 | 9.9E-04 | 4.1E-08

[0745] 嵌合 AF 4.7E+04 9.5E-04 2E-08 5.1E+04 3.3E-04 6.5E-09

[0746] 人源化 H4K1 5.0E+04 9.5E-04 1.9E-08 4.9E+04 2.3E-04 4.7E-09

[0747] 人源化 H4K4 2.5E+04 4.4E-04 1.8E-08 1.3E+05 3.0E-04 2.3E-09

[0748] 实施例 11 免疫组织化学结合测试法

[0749] 11.1 人类脑切片

[0750] 在伦理学批准后从波恩的 Universitätsklinik 获得来自健康的、非痴呆的前 AD (pre-AD) 及 AD 患者的脑。将脑在甲醛中固定，并使海马区脱水，包埋于石蜡中，并用切片机制成 5 μ m 切片。将石蜡切片于 RT 下保藏，直到使用。对于新鲜材料，用低温恒温器切成 5 μ m 低温切片，并将切片保藏在 -80°C，直到使用。

[0751] 11.2 免疫组织化学

[0752] 通过将玻片浸泡于二甲苯中，随后浸泡于 100% 乙醇、90% 乙醇和 70% 乙醇中而使石蜡切片脱石蜡和再水化。通过在水中的 10% H_2O_2 、10% 甲醇中孵育 30 分钟降低背景。通过将玻片在 100% 甲酸中孵育 3 分钟得到抗原恢复。在 Tris 缓冲盐水 (TBS, pH 7.5) 中洗涤 3 次后，通过将玻片在 TBS 中的 10% BSA、0.25% Triton X-100 中孵育 2 小时封闭非特异标记。在洗涤（在 TBS 中 3 次）后，通过添加未标记的抗 - 人类 IgG (Biomeda) 并将玻片在潮

湿室中在 RT 下孵育过夜而进行内源抗体的封闭。在另外的 3 次洗涤后,将人类抗淀粉状蛋白一级抗体加到玻片上,并在 RT 下孵育另一 24 小时。洗涤后,往玻片加入碱性磷酸酶标记的二级抗人类 IgG (Sigma) 并在 RT 下孵育 2 小时。洗涤后,用液体永久红 (Dakocytomation) 显影玻片,用水洗涤,并风干,随后用永久封片介质 (corbitbalsam) 封片。

[0753] 将冷冻切片在 -80°C 在甲醇中固定 30 分钟,并通过添加 H_2O_2 到冷甲醇中至 10% 的终浓度并在 RT 下孵育 30 分钟而降低背景。在 Tris 缓冲盐水 (TBS, pH7.5) 中洗涤 3 次后,通过如上面那样在 TBS 中的 10% BSA、0.25% Triton X-100 中孵育 2 小时封闭非特异标记,并且进行如上面那样的染色步骤。

[0754] 用 Leica DMLB 显微镜检查切片,并用 Leica DC500 相机和 LeicaFireCam1.2.0 软件拍照。

[0755] 人类抗体 A 和 C 均标记了来自 AD 疾病患者的脑的斑块 (图 6)。弥散和核心斑均被标记。此外,非痴呆的前 AD 患者中的弥散斑块也能够被 A 和 C 抗体检测到。用两个抗体都标记了脑淀粉状蛋白血管疾病 (CAA) 中的淀粉状蛋白,并且还检测到了可能与细胞内淀粉状蛋白相对应的神经元的一些染色。在来自健康患者的对照脑中并没有看到标记。可以在用甲酸预处理的石蜡切片上检测到斑块,但在没有甲酸预处理的石蜡切片上以及在甲醇中固定的冷冻切片上没有斑块被标记。人类抗体 B 没有在石蜡切片上检测到斑块,并且小鼠抗体没有染色人类脑的石蜡或冷冻切片。

[0756] 缩写

[0757] A = 结合的嵌合抗体 AF (IgG4) (mC2Ch VHAF)

[0758] B = 非结合的嵌合抗体 B (IgG4) (mC2VHB)

[0759] C = 结合的人源化抗体 H4K1 (IgG4) (HuVH4/HuVK1)

[0760] 小鼠 = ACI-01-Ab-C2 小鼠抗体 (IgG2b)

[0761] 实施例 12 :mC2 对淀粉状蛋白纤维的功能性

[0762] 12.1 在结合 mC2 抗体后, $\text{A}\beta_{1-42}$ 纤维的构象改变和解聚的引发

[0763] 为评估抗体能够解聚预形成 β 淀粉状蛋白 ($\text{A}\beta_{1-42}$) 纤维的机制,进行了测量解聚的硫代黄素 T (Th-T) 荧光测试法和分析二级构象的 $\text{U-}^{13}\text{C}$ 酪氨酸 10 和缬氨酸 12 标记的 $\text{A}\beta_{1-42}$ 肽的固态核磁共振 (NMR) 的并行比较 (图 7A)。mC2 抗体溶解了 35.4% 的预形成 $\text{A}\beta_{1-42}$ 纤维并同时诱导二级构象从 β 折叠向无规则卷曲的转变。就无规则卷曲而言, β 折叠构象总量的减少约为 35%, 并因此与用荧光 Th-T 测试法测量的减少总量接近一致 (图 7B)。这些数据表明 mC2 抗体的结合引发二级结构的转变,其可能引起 β 折叠的平行分子间排列的不稳定,导致延伸的纤维断裂成较小的片段。

[0764] 12.2 mC2 抗体的构象依赖性结合亲和力

[0765] 由于在科学文献中公知抗体 - 抗原结合能量的一部分可以用于抗原构象的能量依赖性改变 (Blond 和 Goldberg, 1987), 因此进行 C2 抗体结合到整个 $\text{A}\beta_{1-42}$ 蛋白与结合到 9 个氨基酸长的包含抗体的表位的较小肽的结合亲和力的比较实验 (图 8)。为进行此比较,通过 ELISA 使用生物素化的覆盖 C2 表位的全部氨基酸序列的肽 (Mimotopes 生产, 购自 ANAWA TradingSA) 和生物素化的完整 $\text{A}\beta_{1-42}$ 肽 (Bachem) 分析了人源化抗体 C2 的亲合力。根据制造商 (Mimotopes) 的说明书进行分析。如在图 8 和表 2 中说明的那样,抗体与包含其特异表位 ($\text{A}\beta_{1-42}$ 序列的氨基酸 13-21) 的肽的结合亲和力比与整个 $\text{A}\beta_{1-42}$ 蛋白的

结合亲和力高 36.0%。因此提示结合亲和力能量之差被用于淀粉状蛋白二级构象的能量消耗性转变,以在对于抗体相互作用而言更可接受的布局呈现抗原。这解释了为什么抗体对天然抗原(整个淀粉状蛋白肽)的亲和力比对分离的亚单位的亲和力低。

[0766] 表 2

[0767]

	O.D	
	淀粉状蛋白 β 13-21	淀粉状蛋白 β 1-42
hC2	1.225	0.9005
对照 IgG	0.171	0.196

[0768] 实施例 13 :抗淀粉状蛋白 hC2 对淀粉状蛋白 β 1-42 肽聚集的影响

[0769] 为评估人源化抗人类淀粉状蛋白 β 单克隆抗体 hC2 介导对淀粉状蛋白 β ($A\beta$) 的抗聚集和解聚效果的能力,进行了硫代黄素 T 分光荧光测试法。

[0770] 13.1 聚集抑制测试法

[0771] 将 $A\beta$ 1-42 冻干粉末在六氟异丙醇 (HFIP) 中重构至 1mM。在室温下超声处理肽溶液 15 分钟,搅拌过夜,将等分试样装入未硅化的微型离心管中。然后在氩气流下蒸发 HFIP。将得到的肽薄片真空干燥 10 分钟并储藏于 -80°C ,直到使用。

[0772] 为测试抗体介导的对 $A\beta$ 1-42 聚集的抑制,将 hC2 抗体预稀释于 PBS 中,并在未硅化的孵育管中制得含有如下成分的测试溶液:3.3 或 0.33 μM 预稀释的抗体、10 μM 硫代黄素 T、33 μM $A\beta$ 1-42、和 8.2% DMSO。因此,抗体对 $A\beta$ 1-42 的最终摩尔比是 1 : 10 和 1 : 100。还制备了合适的对照溶液。然后将溶液在 37°C 孵育 24 小时,并在 Perkin-Elmer FluoroCount 分光荧光计上在黑色 384 孔板 (Perkin-Elmer) 中以六个重复读出分光荧光(相对荧光单位;RFU)。然后测量分光荧光并如下计算%解聚。

[0773] 13.2 解聚测试法

[0774] 为测试抗体介导的预聚集的 $A\beta$ 1-42 的解聚,将如上面描述的那样制备的低分子量 $A\beta$ 1-42 配制为在 27% DMSO 和 1x PBS 中的 110 μM 溶液。

[0775] 然后使该溶液在 37°C 聚集 24 小时,随后加入以下物质:3.3 或 0.33 μM 预稀释的抗体、和 10 μM 硫代黄素 T。这导致了抗体对 $A\beta$ 1-42 的 1 : 10 和 1 : 100 的摩尔比。然后将该溶液在 37°C 再温育 24 小时。然后测量分光荧光并如下计算%解聚。

[0776] 13.3 计算

[0777] 根据如下等式将聚集抑制或解聚分别表达为平均%抑制或解聚 \pm 平均值的标准误 (SEM) :

[0778] $\% \text{抑制} = \{[(\text{阳性对照的 RFU} - \text{阴性对照的 RFU}) - (\text{有 } A\beta \text{ 1-42 的样本的 RFU} - \text{没有 } A\beta \text{ 1-42 的样本的 RFU})] / (\text{阳性对照的 RFU} - \text{阴性对照的 RFU})\} \times 100\%$

[0779] 13.4 结果

[0780] 13.4.1 $A\beta$ 1-42 聚集的抑制

[0781] 应用 hC2 抗体的 $A\beta$ 1-42 聚集的抑制如表 3 和图 11 所示。当抗体对 $A\beta$ 1-42 的摩尔比是 1 : 100 时,抑制平均为 30% (2 次独立实验),而当摩尔比是 1 : 10 时,抑制是

80% (2次独立实验,参见表3)。

[0782] 表3:抗体对A β 1-42的摩尔比是1:100和1:10时,hC2介导的A β 1-42聚集的抑制

[0783]

抗体	摩尔比 (抗体比 A β 1-42)	
	1:100	1:10
hC2	30.0 \pm 4.1%	80.4 \pm 6.9%

[0784] 13.4.2 预聚集的A β 1-42的解聚

[0785] 应用hC2抗体对预聚集的A β 1-42的解聚如表4和图12所示。当抗体对A β 1-42的摩尔比是1:100时,解聚平均为24%,而当摩尔比是1:10时,解聚是32%(3次独立实验,参见表4)。

[0786] 表4:抗体对A β 1-42的摩尔比是1:100和1:10时,hC2介导的预聚集A β 1-42的解聚。

[0787]

抗体	摩尔比 (抗体比 A β 1-42)	
	1:100	1:10
hC2	23.9 \pm 4.4%	31.9\pm3.5%

[0788] 应用硫代黄素T测试法,可以证明抗A β 人源化抗体hC2的双功能特性,即抑制A β 1-42聚集为致病的初原纤维构象(protofibrillar conformation),并且此外还解聚预形成的A β 1-42初原纤维(protofibrils)。当抗体对A β 1-42的摩尔比是1:10时,hC2使A β 1-42聚集抑制了80%。在1:10的摩尔比下,显示hC2解聚预聚集的A β 1-42初原纤维的能力为32%。

[0789] 实施例14:mC2与不同类的淀粉状蛋白的构象特异性结合

[0790] 为了评估mC2对不同阶段聚合的淀粉状蛋白,即对单体、聚合的可溶淀粉状蛋白以及原纤维淀粉状蛋白的特异性,进行了包被有这些不同阶段聚合的 β 淀粉状蛋白的ELISA(图9)。根据修改的(Klein,2002)公开的方法制备单体,根据(Barghorn等,2005)制备可溶的聚合淀粉状蛋白 β ,且通过将淀粉状蛋白(Bachem,瑞士)以在Tris/HCl(pH 7.4)中1 μ g/ μ l的终浓度在37 $^{\circ}$ C孵育5天,随后离心(10,000rpm,5分钟)来制备纤维。然后将淀粉状蛋白聚合物以55 μ g/ml的终浓度包被在ELISA板上,并通过使用碱性磷酸盐标记的抗小鼠IgG单克隆抗体(Jackson)进行结合亲和力ELISA。如表5显示的那样,mC2抗体与可溶的聚合淀粉状蛋白 β 的结合亲和力比与纤维的结合亲和力更高,并且与单体的结合亲和力最低。这些数据表明,抗体的结合受到淀粉状蛋白表位和不同淀粉状蛋白聚集物的构象的影响。

[0791] 表5:mC2对淀粉状蛋白单体、寡聚体和纤维的构象特异性结合

[0792]

mC2 Ab 浓度(μ g/ml)	O.D		
	寡聚体	纤维	单体
0.625	2.806	1.620	1.155
0.312	1.724	0.989	0.649
0.156	1.036	0.631	0.397
0.078	0.652	0.499	0.333

[0793]

[0794] 实施例 15 :AC 免疫的单克隆抗体 hC2 的表位作图

[0795] 通过 ELISA 使用三种不同的肽文库进行人源化单克隆抗体 hC2 的表位作图。一个文库包含总共 33 个生物素化的覆盖 A β 1-42 的完整氨基酸 (aa) 序列 (由 Mimotopes 制造, 购自 ANAWA Trading SA) 的肽, 第二个文库包含生物素化的使用来自第一肽文库的肽 12 (A β 的第 12-20 位氨基酸) 并用丙氨酸替代序列中每一个 aa 的肽 (参见下表 8), 以及第三个文库包含生物素化的肽 13、14 或 15 (A β 的第 13-21、14-22 或 15-23 位氨基酸) 并在每种情况下将最后的氨基酸替代为丙氨酸或将已经是丙氨酸的第 21 位氨基酸替代为甘氨酸 (参见下表 9)。应用生物素化的完整 A β 1-42 肽作为阳性对照 (Bachem)。根据制造商 (Mimotopes) 的说明进行表位作图。简单的说, 将经链亲和素包被的板 (NUNC) 在 4°C 用 PBS 中的 0.1% BSA 封闭过夜。用 PBS-0.05% 吐温 20 洗涤后, 用来自文库的不同肽在室温下包被板 1 小时, 肽在 PBS 中 0.1% BSA、0.1% 叠氮化钠中稀释至 10 μ M 终浓度。洗涤后, 将培养板与 hC2 抗体或非 A β 结合的嵌合 IgG4 抗体在室温下孵育 1 小时, 抗体在 PBS 中 2% BSA、0.1% 叠氮化钠中稀释至 200ng/ml。再次洗涤板, 并用碱性磷酸酶偶联的山羊抗人 IgG 在室温下孵育 1 小时。在最终洗涤后, 将板与磷酸酶底物 (pNPP) 孵育并用 ELISA 板读取器在 405nm 读数。

[0796] 显示人源化单克隆抗体 hC2 特异结合第一个肽文库的肽 12、13、14、15 和 16。这些肽分别包含 A β 1-42 的 12-20、13-21、14-22、15-23 和 16-24, 这提示表位位于 A β 的区域 12-24。用丙氨酸替代的第二个文库用于测定结合 A β 12-20 (VHHQKLVFF) 的关键氨基酸。当氨基酸 16、17、19 或 20 被丙氨酸替代后, hC2 抗体的结合完全丧失, 表明这些氨基酸对于抗体与 A β 的结合是绝对关键的。当第 15 和 18 位氨基酸被替代时, hC2 抗体的结合部分丧失。

[0797] 当第 14 位氨基酸被替代为丙氨酸时, 结合也几乎完全丧失, 表明第 14 位氨基酸对结合也是非常重要的。

[0798] 最后, 使用第三个文库以测定第 21、21 或 23 位氨基酸对表位的结合是否是关键的。当第 23 位氨基酸被丙氨酸替代时, 抗体与第 15-23 位氨基酸的结合降低了, 表明第 23 位氨基酸对结合也是重要的。当第 21 位氨基酸被甘氨酸替代时, 结合部分丧失, 以及当第 22 位氨基酸被丙氨酸替代时, 结合轻微丧失。

[0799] 实施例 16 :通过 hC2 抗体的神经保护

[0800] 在体外测试法中评估了抗体 hC2 保护神经元免于 A β 寡聚体诱导的变性的能力。分离了胚胎第 16.5-17.5 天小鼠皮质神经元, 使之分开, 并在体外培养于 N3-F12 培养基中。

总共培养细胞九天,在第 3 天以及在加入 A β 寡聚体、或 A β 寡聚体及抗 A β 抗体 hC2 的那一天供给养分。在第 5 天 (“4 天 A β ”) 或第 6 天 (“3 天 A β ”), 仅用 2 μ M A β 寡聚体、或用 2 μ M A β 寡聚体和 50 μ g/mL 抗 A β 抗体 hC2 的联合处理某些孔的细胞。

[0801] 通过将 A β 1-42(rPeptide) 溶解于 HFIP 中制备 A β 寡聚体,然后将 A β 肽从那里分装为 1mg/ml 的 10 μ l 等分试样,并且然后在通风橱中蒸发 30 分钟,并将肽薄膜储藏于 -80 $^{\circ}$ C,直到使用。使用时,将肽薄膜溶解于 10 μ l DMSO 中,然后溶解于 78.6 μ l HAMS F12,然后将 A β 肽溶液在 4 $^{\circ}$ C 孵育 24-48 小时 (25 μ M 的 A β 终浓度)。

[0802] 对于对照细胞,在第 5 天仅加入和 A β -DMSO 相同体积的 DMSO-F12,并将细胞再培养 4 天,不做任何其它处理。第 9 天,固定来自所有培养条件的神经元,并用 TuJ1 (抗 β -微管蛋白抗体) 染色,随后用 FITC 标记的二抗染色,以显现微管,并且因此一般地显现神经元进程。结果如图 13 所示。

[0803] 培养 9 天后,未处理的小鼠胚胎皮质神经元显示出正常的形态 (图 13,最左图)。用 A β 寡聚体处理细胞 3 天诱导轴突变性并导致轴突总数量的减少 (图 13,较低中图),并且这一影响在 4 天的处理后甚至更显著 (图 13,较高中图)。相反,用 A β 寡聚体和抗 A β 抗体 hC2 联合处理的细胞看起来和对照细胞类似 (图 13,上和下右图)。这些结果表明抗 A β 抗体 hC2 能够保护胚胎小鼠皮质神经元免于 A β 寡聚体诱导的变性。

[0804] 表 6 :位置和在入源化 C2 轻链构架区中进行的改变

[0805]

轻链位置	45	87	50	53
小鼠 C2V _k	K	F	K	N
人源化 C2HuV _k 1	Q	Y	K	N
人源化 C2HuV _k 2	Q	F	K	N
人源化 C2HuV _k 3	K	Y	K	N
人源化 C2HuV _k 4	K	F	K	N
人类种系 dpk15	Q	Y	L	N
小鼠 C2V _k -R			R	
小鼠 C2V _k -S				S

[0806] 表 7 :位置和在入源化 C2 重链构架区中进行的改变

[0807]

重链位置	47	94
小鼠 C2VHAF	L	S

人源化 C2HuVHAF1	W	R
人源化 C2HuVHAF2	W	S
人源化 C2HuVHAF3	L	R
人源化 C2HuVHAF4	L	S
人类种系 DP-54	W	R

[0808] 用轻链人源化 C2HuV_K1、C2HuV_K2、C2HuV_K3、C2HuV_K4 以及重链 C2HuVHAF4 和 C2HuVHAF2 构建了总共 8 种不同的抗体。

[0809] 表 8 :第二个文库所用肽的概述

[0810] 用斜体和下划线标记了对于结合重要的氨基酸,并且用斜体和粗体标记了对结合绝对关键的氨基酸。

[0811] p12-20 V H H Q K L V F F

[0812] A12 A H H Q K L V F F

[0813] A13 V A H Q K L V F F

[0814] A14 V H A Q K L V F F

[0815] A15 V H H A K L V F F

[0816] A16 V H H Q A L V F F

[0817] A17 V H H Q K A V F F

[0818] A18 V H H Q K L A F F

[0819] A19 V H H Q K L V A F

[0820] A20 V H H Q K L V F A

[0821] 氨基酸编号 12 13 14 15 16 17 18 19 20

[0822] 表 9 :第三个文库所用肽的概述

[0823] 用斜体和下划线标记了对于结合重要的氨基酸,并且用斜体和粗体标记了对结合绝对关键的氨基酸。

[0824] p13-21 H H Q K L V F F A

[0825] p13-21 G21 H H Q K L V F F G

[0826] p14-22 H Q K L V F F A E

[0827] p14-22 A22 H Q K L V F F A A

[0828] p15-23 Q K L V F F A E D

[0829] p15-23 A23 Q K L V F F A E A

[0830] 氨基酸编号 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23

[0831] 实施例 17 :在蛋白质印迹和斑点印迹中 AC 免疫的单克隆抗体 mACI-01-Ab7C2 与淀粉状蛋白种类的结合

[0832] 为了确定小鼠抗体 mACI-01-Ab7C2 的结合是否取决于 Aβ 的天然构象,进行了通过蛋白质印迹的结合至线性淀粉状蛋白或在斑点印迹上的结合至天然淀粉状蛋白的比较(图 2a 和 2b)。

[0833] 通过在 HFIP 中溶解 A β 1-42 肽并在氩下蒸发溶剂产生淀粉状蛋白单体。将干燥的肽薄膜储存在 -80°C 直至使用。对于制备单体,将肽薄膜重悬于 DMSO 中至浓度 2.75 μ g/ μ l,并在 PBS 中稀释至 1 μ g/ μ l。对于制备寡聚体,将干燥的肽薄膜重悬于 DMSO 中至 5mM,超声处理并添加 PBS 达到 400 μ M 淀粉状蛋白,然后添加 SDS 至终浓度 0.2%。在 37°C 孵育 6 小时后,将淀粉状蛋白于水中稀释至终浓度 100 μ M,并在 37°C 再孵育 18 小时。用冰冷的 33% 甲醇、4% 乙酸溶液在 4°C 沉淀淀粉状蛋白寡聚体 1 小时,16200g 旋转 10 分钟,并将沉淀重悬于 5mM Na₂H₂PO₄、35mM NaCl pH 7.4 至终浓度 1 μ g/ μ l。对于制备纤维,将肽薄膜于 Tris-HCl 50mM 缓冲液中稀释至淀粉状蛋白的浓度为 1mg/ml,并在 37°C 孵育 5 天。将管于 10000g 旋转 5 分钟,并将沉淀重悬于 0.1M 碳酸盐缓冲液 pH 9.6 中至 1 μ g/ μ l。

[0834] 将 1 或 5 μ g 单体、寡聚体或纤维于 PBS 和上样缓冲液中稀释,并上样于 12% SDS-PAGE,然后将凝胶转移至硝酸纤维素膜。备选地,将 3 或 1 μ g 或 100 和 10ng 淀粉状蛋白种类于 PBS 中稀释并直接点在硝酸纤维素膜上,将膜在室温干燥 1 小时。用酪蛋白溶液 (Vector) 封闭 30 分钟后,将膜用在酪蛋白溶液中稀释至 1 μ g/ml 的 mACI-01-Ab7C2 或 6E10 (Chemicon) 抗体孵育 30 分钟。在酪蛋白溶液中洗 3 次后,将膜用在酪蛋白溶液中稀释的 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG (Dako Cytomation) 室温孵育 30 分钟,洗 3 次并用 DAB 底物 (Dako Cytomation) 显色。

[0835] 如阳性对照抗体 6E10 那样,在斑点印迹测试法中,单克隆小鼠抗体 mACI-01-Ab7C2 特异地结合单体、寡聚体和纤维。相反,通过蛋白质印迹,mACI-01-Ab7C2 抗体不检测线性淀粉状蛋白种类,这与明显识别所有线性肽的 6E10 抗体相反。该结果表明 mACI-01-Ab7C2 与淀粉状蛋白的结合依赖于淀粉状蛋白的天然构象。

[0836] 实施例 18 :mACI-01Ab7C2-A β 1-42 相互作用

[0837] 使用表面等离子体共振研究了 AC 免疫的主要抗体 mACI-01-Ab7C2 (mC2) 与淀粉状蛋白肽 A β 1-42 之间的相互作用。测定了小鼠抗体 mACI-01-Ab7C2 与 A β 1-42 的单体或纤维的结合。

[0838] 全部 SPR 实验在 Biacore X 仪器 (Biacore AB) 上实施。用于固定的试剂 (EDC、NHS 和乙醇胺)、传感器芯片 CM5 和 SA 以及运行缓冲液和样本缓冲液 HBS-EP 购自 Biacore AB。乙酸钠 (10mM, pH 5.0) 用作偶联缓冲液来增加偶联产量。通过添加 PBS 缓冲液至 A β 1-42 至终浓度 3mg/ml 并将小瓶置于 37°C 7 天而制备纤维状的 A β 1-42 (Bachem)。将纤维状的 A β 1-42 偶联至含有表面结合的羧甲基葡聚糖基质的 CM5 传感器芯片。将生物素化的单体 A β 1-42 (Bachem) 偶联至由羧甲基葡聚糖基质与共价连接的链亲和素组成的传感器芯片 SA。通常使用运行缓冲液系列稀释而测试 4 个或 5 个浓度的 mAb。从最低浓度开始进行注射,并且以流速 30 μ L/分钟 3 分钟流过 fc 1 和 2。流通池 2 未被衍生化,并且从 fc 1 减去反应来校正仪器噪声和体折射 (bulkrefractive) 变化。注射结束后,立即用运行缓冲液洗表面 5 分钟。为了从 A β 1-42 原纤维移去仍结合的抗体,通过注射 10mM NaOH 脉冲进行表面再生。使用 BIAevaluation 3.0,用针对数值积分和整体分析的算法进行动力学分析。对于注射不同浓度的分析物获得的曲线进行叠加,并将基线调整为零。对于曲线拟合,将所有数据同时拟合至 1 : 1 均一复合物。

[0839] 确定了小鼠 mACI-01-Ab7 C2 抗体与淀粉状蛋白的结合相当强。如表 2 中所示,小鼠抗体 mACI-01-Ab7 C2 以平均结合常数 (ka) 3.8×10^4 M/s,解离常数 (kd) 1.1×10^{-3} s⁻¹,并

因此以所得的平均 $KD = 3.5 \times 10^{-8} M$ 特异地结合至固定化的 $A\beta_{1-42}$ 纤维。mACI-01-Ab7C2 与 $A\beta$ 单体的结合相似或稍快, 平均 k_a 为 $1.6 \times 10^4 M/s$, 但解离较快, KD 为 $2.5 \times 10^{-7} M$ 。

[0840] 表 2

[0841]

	单体			纤维		
	$k_a(l/Ms)$	$k_d(l/s)$	$KD(M)$	$k_a(l/Ms)$	$k_d(l/s)$	$KD(M)$
mACI-01-Ab7 C2 实验1	1.8E+04	2.7E-03	1.5E-07	2.4E+04	9.9E-04	4.1E-08
mACI-01-Ab7 C2 实验2	1.5E+04	5.3E-03	3.5E-07	5.60E+04	9.66E-04	1.73E-08
mACI-01-Ab7 C2 实验3						
平均mACI-01- Ab7 C2	1.6E+04 ± 0.21	4.0E-03 1.84	2.5E-07 1.41	3.8E+04 1.66	1.1E-03 0.3	3.5E-08 1.53

[0842] 实施例 19 :mACI-01-Ab7 C2 单克隆抗体与淀粉状蛋白纤维的结合

[0843] 为了分析抗体在预形成的纤维上的分子结合侧, 进行了负相差透射电镜术 (TEM) (图 3a 和 3b)。

[0844] 根据文献 4 和 5, 将抗体 mACI-01-Ab7C2 与 8nm 胶体金偶联。对于淀粉状蛋白 1-42 ($A\beta_{1-42}$) 纤维的共孵育, 将 $6.65 \mu M$ 纤维与金标记的抗体以 1 : 100 的摩尔比室温孵育 24 小时。接下来, 将 $5 \mu l$ 样本孵育在覆盖有钨 /C 膜的新辉光放电 Cu 栅格 (网眼 200) 上 45 秒, 用水洗 3 次并用 2% 新鲜稀释的和过滤的乙酸双氧铀洗 1 次。将样本在 2% 乙酸双氧铀中染色 15-20 秒。吸取在栅格上的过量的染料并接下来风干。每一样本制备三个栅格。用透射电镜 Hitachi 7000 分析栅格。

[0845] 单克隆抗体 mACI-01-Ab7 C2 直接结合 $A\beta_{1-42}$ 纤维。令人感兴趣的是, 抗体显示非对称结合至单纤维的轴, 但结合至特定且不是所有的纤维网络侧支的区域。似乎抗体靶向侧支中的特定区域。可能的解释是仅在该特定的侧支中存在特定的二级结构。该假设得到 NMR 数据的支持, 显示抗体诱导构象转换, 并因此可能是其结合依赖于包含 β 折叠结构的淀粉状蛋白纤维的构象。

[0846] 实施例 20 :单克隆抗体 mACI-01-Ab7 C2 的表位绘图

[0847] 通过 ELISA 使用三个不同的肽文库进行单克隆抗体 mACI-01-Ab7 C2 的表位绘图。一个文库包含覆盖 $A\beta_{1-42}$ 的全部氨基酸 (aa) 序列的总共 33 种生物素化的肽 (由 Mimotopes 生产并购自 ANAWA Trading SA), 第二个文库含有使用来自第一个肽文库的肽 12 ($A\beta$ 的 aa12-20) 并用丙氨酸替换序列中的每一氨基酸的生物素化肽 (参见下表 41), 并且第三个文库含有生物素化肽 13、14 或 15 ($A\beta$ 的 aa13-21, 14-22 或 15-23) 并且在每一情况下替换最后的氨基酸为丙氨酸, 或者对于 aa21 已是丙氨酸时替换最后的氨基酸为甘氨酸 (参见下表 5)。生物素化的完整 $A\beta_{1-42}$ 肽用作阳性对照 (Bachem)。根据生产商 (Mimotopes) 的说明书进行表位绘图。简而言之, 将链亲和素包被的板 (NUNC) 用 PBS 中的 0.1% BSA 于 $4^\circ C$ 封闭过夜。用 PBS-0.05% 吐温 20 洗板后, 用来自文库的使用 PBS 中的 0.1% BSA、0.1% 叠氮钠稀释至终浓度 $10 \mu M$ 的不同肽室温包被板 1 小时。洗涤后, 将板在室温用 mACI-01-Ab7 C2 抗体或同种型对照小鼠 IgG2b 抗体室温孵育 1 小时, 其中所述抗体

用 PBS 中的 2% BSA、0.1% 叠氮钠稀释至 10 μ g/ml。再次洗板并用缀和有碱性磷酸酶的山羊抗小鼠 IgG 室温孵育 1 小时。在最后的洗涤后,将板与磷酸酶底物 (pNPP) 孵育并使用 ELISA 板读数仪在 405nm 处读数。

[0848] 显示了单克隆抗体 mACI-01-Ab7C2 特异地结合至第一个肽文库的肽 12、13、14 和 15。这四个肽包含 A β 1-42 的 aa12-20 (VHHQKLVFF), 13-21 (HHQKLVFFA), 14-22 (HQKLVFFAE) 和 15-23 (QKLVFFAED), 暗示了表位位于 A β 的区域 12-23。具有丙氨酸替换的第二个文库用于确定结合肽 12-20 (VHHQKLVFF) 的关键氨基酸。当氨基酸 16、17、19 或 20 被丙氨酸替换后, mACI-01-Ab7 C2 抗体完全丧失结合, 表明这些氨基酸对于抗体结合至 A β 是绝对关键的。当氨基酸 15 和 18 被替换后, mACI-01-Ab7 C2 抗体的结合部分丧失。

[0849] 当氨基酸 14 被替换为丙氨酸, 结合也是几乎完全丧失, 表明氨基酸 14 对于结合也是非常重要的。

[0850] 最后, 第三个文库用于确定氨基酸 21、22 或 23 是否对于结合至表位是关键。当氨基酸 23 被替换为丙氨酸, 抗体对于氨基酸 15-23 的结合降低, 表明氨基酸 23 对于结合也是重要的。当氨基酸 21 被替换为甘氨酸时, 结合部分丧失; 并且当氨基酸 22 被替换为丙氨酸时, 结合略微丧失。

[0851] 表 4. 用在第二个文库中的肽的总结

[0852] 对于结合重要的氨基酸用斜体和下划线标出, 并且对于结合绝对关键的氨基酸用粗斜体和下划线标出

[0853] p12-20 V H H Q K L V F F

[0854] A12 A H H Q K L V F F

[0855] A13 V A H Q K L V F F

[0856] A14 V H A Q K L V F F

[0857] A15 V H H A K L V F F

[0858] A16 V H H Q A L V F F

[0859] A17 V H H Q K A V F F

[0860] A18 V H H Q K L A F F

[0861] A19 V H H Q K L V A F

[0862] A20 V H H Q K L V F A

[0863] 氨基酸编号 12 13 14 15 16 17 18 19 20

[0864] 表 5. 用在第三个文库中的肽的总结

[0865] 对于结合重要的氨基酸用斜体和下划线标出, 并且对于结合绝对关键的氨基酸用粗斜体和下划线标出

[0866] p13-21 H H Q K L V F F A

[0867] p13-21 G21 H H Q K L V F F G

[0868] p14-22 H Q K L V F F A E

[0869] p14-22 A22 H Q K L V F F A A

[0870] p15-23 Q K L V F F A E D

[0871] p15-23 A23 Q K L V F F A E A

[0872] 氨基酸编号 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23

[0873] 实施例 21 :用 mACI-01-Ab7 C2 被动接种单转基因 hAPP 小鼠对脑淀粉状蛋白负荷的影响

[0874] 为了评估 mACI-01-Ab7 C2 单克隆抗体结合和清除可溶的淀粉状蛋白出脑的体内能力,将性别和年龄匹配的 6 月龄单 hAPP 小鼠⁹用不同剂量进行被动免疫研究。在研究结束时通过收获动物的脑和进行 A β 1-40 和 A β 1-42 特异性 ELISA (TGC, 德国) 来分析可溶的淀粉状蛋白负荷。

[0875] 每组 8-13 只动物接受在 200 μ l PBS 中的 100、300 和 1000 μ g 单克隆抗体的两次注射,间隔为一周,而仅注射 PBS 的动物用作对照。在第二次注射后一天,处死动物用于可溶的淀粉状蛋白组分的生物化学分析。为了定量人 A β 1-40 和人 A β 1-42 在脑匀浆和 / 或在脑脊液 (CSF) 的可溶组分中的量,使用了商业可获得的酶联免疫吸附测试 (ELISA) 试剂盒 (人淀粉状蛋白 β 40 或 β 42 ELISA 高灵敏的, TGC, Switzerland)。按照制造商的方案进行 ELISA。简而言之,在无蛋白结合能力的 96 孔聚丙烯板 (Greiner, 德国) 中制备标准品 (合成的 A β 1-40 或 A β 1-42 的稀释物) 和样本。标准品稀释至终浓度 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.3 和 15.6 pg/ml, 用 ELISA 试剂盒中的样本稀释液制备样本至终体积 60 μ l。由于随着小鼠年龄增加淀粉状蛋白水平也增加,并且由于实际的评估需要在标准曲线的线性部分读取样本,用于 A β 40 分析的样本 2 : 3 稀释,用于 A β 42 分析的样本不稀释。

[0876] 将样本、标准品和空白 (50 μ l) 添加至抗 A β 包被的聚苯乙烯板 (捕捉抗体选择性识别抗原的 C-末端), 并添加选择性的抗 A β 抗体缀合物 (生物素化的检测抗体), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 以允许形成抗体-淀粉状蛋白-抗体复合物。第二天, 添加链亲和素-过氧化物酶缀合物, 30 分钟后添加 TMB/ 过氧化物混合物, 导致底物转化为有色产物, 并用带有 450nm 滤器的 ELISA 读数仪通过光度测定法测定颜色强度。通过将吸光度与合成的 A β 1-40 或 A β 1-42 制备的标准曲线比较而定量样本的 A β 含量。数据表示为相对于平均对照值的各改变 (相对于对照的百分数)。

[0877] 以剂量 300 μ g 两次腹膜内注射单克隆抗体 ACI-01-Ab7 C2 而被动免疫单 hAPP 小鼠时, 脑匀浆中 A β 40 的总量能够被显著降低, 和 A β 42 略不显著 (A β 40 : -27.3 \pm 13.9%, $p < 0.05$; A β 42 : -8.6 \pm 22.4, $p = 0.56$; 不成对 Student T 检验), 而 100 和 1000 μ g 没有达到显著性。用 100 μ g 免疫导致脑匀浆中 A β 40 和 A β 42 增加 (A β 40 : 32.3 \pm 36.8%; A β 42 : 38.3 \pm 51.4%), 而用 1000 μ g 处理导致淀粉状蛋白负荷降低的正确趋势和每组使用增加数量的动物能够潜在有效 (A β 40 : -2.2 \pm 26.0%; A β 42 : -9.3 \pm 15.9%)。这些数据表明, 在短期免疫方案 (acute immunization protocol) 中, 抗体 mACI-01-Ab7 C2 能够降低这种鼠 AD 模型的脑中的 A β 。有趣的是, 剂量关系似乎是瞬变的, 而必须使用较大的组进行更多研究以获得显著性数据。

[0878] 实施例 22 : 在双转基因 hAPPxPS1 小鼠中长期被动施用 (Chronic Passive Administration) mACI-01-Ab7 C2 对斑块负荷的影响

[0879] 为了评估 mACI-01-Ab7 C2 单克隆抗体结合和降低脑中淀粉状蛋白斑的体内能力, 用性别和年龄匹配的 3.5 月龄双转基因 hAPPxPS1 小鼠¹⁰进行了 4 个月长的长期被动免疫研究。在研究结束时通过硫代黄素 S 结合的动物脑的组织化学来分析淀粉状蛋白斑。

[0880] 15 只转基因动物接受每周一次注射在 PBS 中的 500 μ g 单克隆抗体, 接受 16 次。仅注射 PBS 的 15 只动物用作对照。所有的注射均是腹膜内给予。处死时, 将小鼠麻醉并用

4℃生理血清经心冲洗,以从脑血管去除血液。随后,将脑从颅内取出,并在冠状缝/额板中切一下分开后脑和前脑。使用中线矢状切将前脑平均地分为左半球和右半球。

[0881] 将一个半球在4%多聚甲醛中后固定过夜用于组织学分析。切矢状振动切片机切面(40 μm)用于自由漂浮孵育并贮存在4℃直至在具0.1%叠氮钠的PBS中染色。用硫代黄素S染色致密斑块的不同水平的五个切片。随机使用所有动物的切片用于染色和不定样本定量。用配备有Sony DXC-9100P照相机的Leica DMR显微镜成像并用计算机的Leica Q-Win软件进行分析。在图像获得过程中保持显微镜光强度和聚光器设置恒定。对所有获得的图像进行相同的计算机子程序以最小化研究者偏差。在分析中使用一致的密度分割阈(Density slice thresholding)。选择脑下脚(subiculum)区域用于自动定量硫代黄素S染色中的淀粉状蛋白负荷。

[0882] 当双hAPP/PS1小鼠如上所述被动免疫4个月后,在脑下脚区域的总斑块负荷和斑块数能够被显著降低。对于斑块负荷,能够达到显著降低31%(mACI-01-Ab7 C2: $1.11 \pm 0.21\%$ 和对照: $1.61 \pm 0.35\%$; $p = 0.003$, Mann-Whitney U-检验),而长期被动免疫显著降低斑块量19%(mACI-01-Ab7 C2: 8.73 ± 1.36 和对照: 10.78 ± 1.36 ; $p = 0.006$, Mann-Whitney U-检验),表明发生斑块溶解的程度稍低于斑块破坏。

[0883] 实施例23:用mACI-01-Ab7 C2被动接种对单转基因hAPP小鼠记忆能力的影响

[0884] 为了分析mACI-01-Ab7 C2抗体改变或增强认知功能的体内能力,将性别和年龄匹配的9月龄单hAPP小鼠用于被动免疫研究。在研究结束时通过新的目标识别任务(Object Recognition Task;ORT)评估来测定非空间认知。

[0885] 每组12只动物接受两次腹膜内注射在200 μl PBS中的400 μg单克隆抗体,将仅注射PBS的用作对照。在第二次注射后一天,在新的目标识别任务(ORT)中研究认知能力。对于ORT的记录而言,将小鼠置于一个行为活动场10分钟并面对新的未知目标。记录探索时间。三小时后将相同的动物再置于相同的活动场进行第二次研究,但是除了旧的之前探索过的目标之外,还有新的目标。再次记录对两种目标的探索时间,并将所获得的认知指数计算为对新的目标的探索时间与总探索时间的比值,并表示为相对于对照的改变百分率。

[0886] 用mACI-01-Ab7 C2被动接种导致单转基因AD小鼠的认知记忆能力显著增强(mACI-01-Ab7 C2: $131.6 \pm 9.1\%$ 和对照: $100.0 \pm 9.2\%$, $p < 0.05$;非成对Student T检验,且每组 $n = 12$)。

[0887] 参考文献:

[0888] Barghorn S, Nimmrich V, Striebinger A, Krantz C, Keller P, Janson B, Bahr M, Schmidt M, Bitner RS, Harlan J, Barlow E, Ebert U, Hillen H (2005) 球形淀粉状蛋白β肽寡聚体 - 在阿尔茨海默病中的同质且稳定的神经病理蛋白, J Neurochem 95:834-847.

[0889] Blond 和 Goldberg, 1987, PNAS, 1987年3月1日, 卷84 | 5期 | 1147-1151

[0890] Cox JPL, Tomlinson IM 和 Winter G. Eur. J. Immunol. 1994;24:827-836. 人类种系Vκ片段的目录揭示它们使用中的强偏差。

[0891] Hieter PA, Max EE, Seidman JG, Maizel JV Jr, Leder P. 克隆的人类和小鼠κ免疫球蛋白恒定和J区基因在功能片段中保留同源性, Cell. 1980年11月;22(1Pt1):197-207.

[0892] Kabat EA, Wu TT, Perry HM, Gottesman KS, Foeller C. 免疫学感兴趣的蛋白质序

列,美国健康和人类服务部,1991。

[0893] Klein WL(2002) 在阿尔茨海默病中的 A β 毒性:球形可溶的多聚淀粉状蛋白 β (ADDLs) 作为新疫苗和药物靶标. *Neurochem Int* 41(5):345-352.

[0894] Langdon SD, Inaioki M, Kelsoe G. 和 Tedder TF. *Immunogenetics* 2000 ;51 : 241-245. C57BL/6 小鼠中的 V(H)7183 基因家族成员的种系序列显示在近期进化期间特定序列的自然选择。

[0895] Mulligan RC 和 Berg P. *Science* 1980 ;209 :1422-1427. 细菌基因在哺乳动物细胞中的表达

[0896] Riechmann L, Clark M, Waldmann H, Winter G, *Nature* 1988 ;332 :323-327. 重构人类抗体用于治疗 .

[0897] Schable KP, Thiebe R, Bensch A, Brensing-Kueppers J, Heim V, Kirschbaum T, Lamm R, Ohnrich M, Pourrajabi S, Roschenthaler F, Schwendinger J, Wichelhaus D, Zocher I 和 Zachau HG. *Eur. J. Immunol.* 1999 ;29 :2082-2086. 小鼠基因组中的免疫球蛋白 V κ 基因、假基因、残余基因和孤儿基因的特征 .

[0898] Tomlinson IM, Walter G, Marks JD, Llewelyn MB 和 Winter G., *J. Mol. Biol.* 1992 ;227 :776-798. 人类种系 V H 序列库揭示约 50 组具有不同高变环的 V H 片段 .

[0001]

序 列 表

- <110> AC 免疫有限公司
基因技术公司
- <120> 针对淀粉状蛋白 B 的人源化抗体
- <130> 089667-0131
- <140> PCT/US07/021134
<141> 2007-10-02
- <150> PCT/US07/073504
<151> 2007-07-13
- <150> 60/943, 499
<151> 2007-06-12
- <150> 60/943, 289
<151> 2007-06-11
- <150> PCT/EP06/011862
<151> 2006-12-08
- <150> EP 06020766.9
<151> 2006-10-02
- <150> EP 06020765.1
<151> 2006-10-02
- <160> 101
- <170> PatentIn 版本 3.3
- <210> 1
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
- <220>
<223> /注解= “人工序列的描述：合成的肽”
- <400> 1
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser
1 5 10
- <210> 2
<211> 17
<212> PRT

[0002]

<213> 人工序列

<220>

<223> /注解= “人工序列的描述：合成的肽”

<400> 2

Ser Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> /注解= “人工序列的描述：合成的肽”

<400> 3

Gly Asp Tyr

1

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> /注解= “人工序列的描述：合成的肽”

<400> 4

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser Asn Gly Asp Thr Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> /注解= “人工序列的描述：合成的肽”

<400> 5

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

[0003]

1

5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> /注解= “人工序列的描述：合成的肽”

<400> 6

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr

1

5

<210> 7

<211> 6

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 7

Val Phe Phe Ala Glu Asp

1

5

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> 人

<400> 8

His Gln Lys Leu Val

1

5

<210> 9

<211> 6

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> 变体

<222> (1)..(1)

<223> /替换=“Val” “Leu” “正亮氨酸” “Met” “Phe” 或 “Ile”

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

[0004]

<223> /注解= “在序列中给出的残基相对于对所述位置的注释中的那些残基而言不优选”

<220>

<221> 变体

<222> (4).. (4)

<223> /替换=“Val” “Leu” “Ser” 或 “Ile”

<220>

<221> 变体

<222> (5).. (5)

<223> /替换=“Asp”

<220>

<221> 变体

<222> (6).. (6)

<223> /替换=“Asp”

<220>

<221> misc_feature

<222> (4).. (6)

<223> /注解= “在序列中给出的残基相对于对所述位置的注释中的那些残基而言不优选”

<400> 9

Ala Phe Phe Ala Glu Glu

1

5

<210> 10

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> /注解= “人工序列的描述：合成的肽”

<220>

<221> 变体

<222> (1).. (1)

<223> /替换=“Asn” “Gln” “Lys” 或 “Arg”

<220>

<221> 变体

<222> (2).. (2)

<223> /替换=“Gln”

<220>

<221> misc_feature

<222> (1).. (2)

<223> /注解= “在序列中给出的残基相对于对所述位置的注释中的那些残基而言不优选”

[0005]

<220>
<221> 变体
<222> (5).. (5)
<223> /替换="Val" "Leu" "正亮氨酸" "Met" "Phe" 或 "Ile"

<220>
<221> misc_feature
<222> (5).. (5)
<223> /注解= "在序列中给出的残基相对于对所述位置的注释中的那些残基而言不优选"

<400> 10
His Asn Lys Leu Ala
1 5

<210> 11
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> /注解= "人工序列的描述: 合成的肽"

<220>
<221> 变体
<222> (1).. (1)
<223> /替换="Asn" 或 "Gln"

<220>
<221> 变体
<222> (2).. (2)
<223> /替换="Asn"

<220>
<221> 变体
<222> (5).. (5)
<223> /替换="Leu" 或 "Ile"

<220>
<221> 变体
<222> (8).. (8)
<223> /替换="Val"

<220>
<221> 变体
<222> (9).. (9)

[0006]

<223> /替换="Asp"

<220>

<221> 变体

<222> (10).. (10)

<223> /替换="Glu"

<400> 11

His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp

1 5 10

<210> 12

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> /注解= "人工序列的描述: 合成的多肽"

<400> 12

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

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser

20 25 30

Asn Gly Asp Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

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

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 13

[0007]

<211> 219
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> /注解= “人工序列的描述：合成的多肽”

 <400> 13
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

 Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

[0008]

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 14

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> /注解= “人工序列的描述：合成的多肽”

<400> 14

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

[0009]

<210> 15
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> /注解= “人工序列的描述: 合成的多肽”

<400> 15
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

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

Ala Ser Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110

<210> 16
 <211> 439
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> /注解= “人工序列的描述: 合成的多肽”

<400> 16

[0010]

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

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

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

Ala Ser Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 115 120 125

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 130 135 140

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 145 150 155 160

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 165 170 175

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 180 185 190

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 195 200 205

[0011]

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 210 215 220

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 225 230 235 240

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 245 250 255

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 260 265 270

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 275 280 285

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 290 295 300

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 305 310 315 320

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 325 330 335

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 340 345 350

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 355 360 365

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 370 375 380

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 385 390 395 400

[0012]

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 405 410 415

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 420 425 430

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435

<210> 17
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 17
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

[0013]

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

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

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

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Leu Gly
325

[0014]

<210> 18	
<211> 51	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> /注解= “人工序列的描述：合成的寡核苷酸”	
<400> 18	
agcatcaata gtaatggtgg tagcacctat tatccagaca gtgtgaaggg c	51
<210> 19	
<211> 9	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> /注解= “人工序列的描述：合成的寡核苷酸”	
<400> 19	
ggtgactac	9
<210> 20	
<211> 49	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> /注解= “人工序列的描述：合成的寡核苷酸”	
<400> 20	
agatctagtc agagccttgt atatagtaat ggagacacct atttacatt	49
<210> 21	
<211> 336	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> /注解= “人工序列的描述：合成的多核苷酸”	
<400> 21	
gatattgtga tgaccaatc tccactctcc ctgcctgtca ctctggtga gcctgcctcc	60
atctcttgca gatctagtca gagccttgta tatagtaatg gagacaccta ttacattgg	120

[0015]

tacctgcaga agccaggcca gtctccacag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt	180
tctgggggtcc cagacagggtt cagtggcagt ggatcagggga cagatttcac actcaagatc	240
agcagagtgg aggctgagga tgtgggagtt tattactgct ctcaaagtac acatgttcct	300
tggacgttcg gccaaaggcac caaggtggaa atcaaa	336

<210> 22

<211> 657

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> /注解= “人工序列的描述：合成的多核苷酸”

<400> 22

gatattgtga tgaccaatc tccactctcc ctgcctgtca ctcttggtga gcctgcctcc	60
atctcttgca gatctagtca gagccttgta tatagtaatg gagacaccta tttacattgg	120
tacctgcaga agccaggcca gtctccacag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt	180
tctgggggtcc cagacagggtt cagtggcagt ggatcagggga cagatttcac actcaagatc	240
agcagagtgg aggctgagga tgtgggagtt tattactgct ctcaaagtac acatgttcct	300
tggacgttcg gccaaaggcac caaggtggaa atcaaaagga ctgtggctgc accatctgtc	360
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg	420
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgcctccaa	480
tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc	540
agcagcacc tgacgtgag caaagcagac tacgagaac acaaagtcta cgcctgcgaa	600
gtcaccate agggcctgag ctgccccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt	657

<210> 23

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> /注解= “人工序列的描述：合成的多核苷酸”

[0016]

<400> 23
 aggactgtgg ctgcaccatc tgtcttcac tccccccat ctgatgagca gttgaaatct 60
 ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag 120
 tggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180
 agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc acctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240
 aaacacaaag tctacgctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag 300
 agcttcaaca ggggagagtg t 321

<210> 24
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> /注解= “人工序列的描述：合成的多核苷酸”

<400> 24
 gaggtgcagc tggctgagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatggca tgtcttgggt tcgccaggct 120
 ccaggcaagg gtctcgaatt ggtcgcaagc atcaatagta atggtggtag cacctattat 180
 ccagacagtg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa ctcctgtac 240
 ctgcaaatga acagtctgag agctgaggac accgccgtgt attactgtgc aagtggtagc 300
 tactggggcc aaggcaccac tgtcacagtc tcctca 336

<210> 25
 <211> 1317
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> /注解= “人工序列的描述：合成的多核苷酸”

<400> 25
 gaggtgcagc tggctgagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatggca tgtcttgggt tcgccaggct 120
 ccaggcaagg gtctcgaatt ggtcgcaagc atcaatagta atggtggtag cacctattat 180

[0017]

ccagacagtg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa ctccctgtac 240
 ctgcaaatga acagtctgag agctgaggac accgccgtgt attactgtgc aagtgggtgac 300
 tactggggcc aaggcaccac tgtcacagtc tcctcagctt ccaccaaggc cccatccgtc 360
 ttccccctgg cgccctgctc cagatcgacc tccgagagca cagccgccct gggctgcctg 420
 gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc 480
 ggcgtgcaca cttccccggc tgcctacag tcctcaggac tctactcctt cagcagcgtg 540
 gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacg aagacctaca cctgcaacgt agatcacaag 600
 cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtt gagtccaaat atggcccccc gtgtccccca 660
 tgcccagcac ctgagttcct ggggggacca tcagtcttcc tgttcccccc aaaacccaag 720
 gacactctca tgatctcccg gaccctgag gtcacgtgcg tggtggtgga cgtgagccag 780
 gaagaccccg aggtccagtt caactggtac gtggatggcg tggaggtgca taatgccaag 840
 acaaagccgc gggaggagca gttcaacagc acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc 900
 ctgcaccagg actggctgaa cgcaaggag tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc 960
 ccgtctcca tcgagaaaac catctccaaa gccaaagggc agccccgaga gccacaggtg 1020
 tacaccctgc ccccatccca ggaggagatg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg 1080
 gtcaaaggct tetaccccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag 1140
 aacaactaca agaccacgcc tcccgtctc gattccgacg gtccttctt cctctacagc 1200
 aggctaaccg tggacaagag caggtggcag gaggggaatg tcttctcatg ctccgtgatg 1260
 catgaggctc tgcacaacca ctacacacag aagagcctct ccctgtctct gggtaaa 1317

<210> 26

<211> 981

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> /注解= “人工序列的描述：合成的多核苷酸”

<400> 26

gcttccacca agggcccatc cgtcttcccc ctggcgcctt gctccagatc gacctccgag 60

[0018]

agcacagccg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgtcg	120
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca	180
ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc	240
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtcc	300
aaatatggtc ccccgtgtcc cccatgcccc gcacctgagt tcttgggggg accatcagtc	360
ttcctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg	420
tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggctc agttcaactg gtacgtggat	480
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac	540
cggtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag	600
tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtcc tccatcgaga aaacctctc caaagccaaa	660
gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgccccat cccaggagga gatgaccaag	720
aaccagggtca gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag	780
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctcccgt cctcgattcc	840
gacggctcct tcttctctta cagcaggcta accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg	900
aatgtttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc	960
ctctccctgt ctctgggtaa a	981

<210> 27

<211> 112

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 27

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

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

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

[0019]

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

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

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

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 28

<211> 112

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 28

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Ala Ser Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

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

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ser Thr Leu Thr Val Ser Ser
 100 105 110

[0020]

<210> 29		
<211> 336		
<212> DNA		
<213> 小家鼠		
<400> 29		
gatgttgatga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc	60	
atctcttgca gatctagtca gaggccttgta tatagtaatg gagacaccta ttacattgg	120	
tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtcc caaccgattt	180	
tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagattcac actcaagatc	240	
agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaagtac acatgttcct	300	
tggacgttcg gtggaggcac caagctagaa atcaaa	336	
<210> 30		
<211> 417		
<212> DNA		
<213> 小家鼠		
<400> 30		
atgaagttgc ctgtaggct gttggtgctg atgttctgga ttctgcttc cagcagtgat	60	
gttgatgatga cccaaactcc actctccctg cctgtcagtc ttggagatca agcctccatc	120	
tcttgcagat ctagtccagag cctgttatat agtaatggag acacctattt acattgggtac	180	
ctgcagaagc caggccagtc tccaaagctc ctgatctaca aagtttcaa ccgattttct	240	
gggggtcccag acaggttcag tggcagtgga tcaggacag attcacact caagatcagc	300	
agagtggagg ctgaggatct gggagtttat ttctgctctc aaagtacaca tgttccttgg	360	
acgttcggtg gaggcaccaa gctagaaatc aaacgggctg atgctgcacc aactgta	417	
<210> 31		
<211> 336		
<212> DNA		
<213> 小家鼠		
<400> 31		
gaggtgcagc tggaggagtc tgggggagc ttagtgcagc ctggagggtc cctgaaactc	60	

[0021]

tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatggca tgtcttgggt tcgccagact 120
ccagacaaga ggctggaatt ggtcgcaagc atcaatagta atggtggtag cacctattat 180
ccagacagtg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240
ctgcaaatga gcagtctgaa gtctgaggac acagccatgt attactgtgc aagtggtgac 300
tactggggcc aaggctccac tctcacagtc tctca 336

<210> 32
<211> 408
<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 32
atgrasttsg ggytcagmtt grttttcctt gcccttattt taaaaggtgt ccaatgtgag 60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggetta gtgcagcctg gagggtcctt gaaactctcc 120
tgtgcagcct ctggattcac tttcagtagc tatggcatgt cttgggttcg ccagactcca 180
gacaagaggc tggatttggc cgcaagcatc aatagtaatg gtggtagcac ctattatcca 240
gacagtgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg 300
caaatgagca gtctgaagtc tgaggacaca gccatgtatt actgtgcaag tggtgactac 360
tggggccaag gctccactct cacagtctcc tcagccaaaa caacaccc 408

<210> 33
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> /注解= “人工序列的描述：合成的肽”

<220>
<221> 变体
<222> (2).. (2)
<223> /替换=“Gln”

<220>
<221> misc_feature
<222> (2).. (2)
<223> /注解= “在序列中给出的残基相对于对所述位置的注释中的那些残基而言不优选”

[0022]

<220>
 <221> 变体
 <222> (5).. (5)
 <223> /替换="Val" "Leu" "正亮氨酸" "Met" "Phe" 或 "Ile"

<220>
 <221> 变体
 <222> (6).. (6)
 <223> /替换="Val" "Leu" "正亮氨酸" "Met" "Phe" 或 "Ile"

<220>
 <221> 变体
 <222> (7).. (7)
 <223> /替换="Val" "Leu" "正亮氨酸" "Met" "Phe" 或 "Ile"

<220>
 <221> 变体
 <222> (8).. (8)
 <223> /替换="Val" "Leu" "Ser" 或 "Ile"

<220>
 <221> 变体
 <222> (9).. (9)
 <223> /替换="Asp"

<220>
 <221> 变体
 <222> (10).. (10)
 <223> /替换="Asp"

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5).. (10)
 <223> /注解= "在序列中给出的残基相对于对所述位置的注释中的那些残基而言不优选"

<400> 33
 His Asn Lys Leu Ala Ala Ala Ala Glu Glu
 1 5 10

<210> 34
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> /注解= "人工序列的描述：合成的肽"

[0023]

- <220>
<221> 变体
<222> (1).. (1)
<223> /替换="Asn" "Gln" "Lys" 或 "Arg"
- <220>
<221> misc_feature
<222> (1).. (1)
<223> /注解= "在序列中给出的残基相对于对所述位置的注释中的那些残基而言不优选"
- <220>
<221> 变体
<222> (3).. (3)
<223> /替换="Gln"
- <220>
<221> 变体
<222> (4).. (4)
<223> /替换="Asn" "Gln" "Lys" 或 "Arg"
- <220>
<221> 变体
<222> (5).. (5)
<223> /替换="Val" "Leu" "Ser" 或 "Ile"
- <220>
<221> 变体
<222> (6).. (6)
<223> /替换="Val" "Leu" "Ser" 或 "Ile"
- <220>
<221> misc_feature
<222> (3).. (6)
<223> /注解= "在序列中给出的残基相对于对所述位置的注释中的那些残基而言不优选"
- <220>
<221> 变体
<222> (9).. (9)
<223> /替换="Val" "Leu" "Ser" 或 "Ile"
- <220>
<221> 变体
<222> (10).. (10)
<223> /替换="Asp"
- <220>

[0024]

- <221> 变体
<222> (11)..(11)
<223> /替换="Asp"
- <220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(11)
<223> /注解="在序列中给出的残基相对于对所述位置的注释中的那些残基而言不优选"
- <400> 34
His His Asn His Ala Ala Phe Phe Ala Glu Glu
1 5 10
- <210> 35
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
- <220>
<223> /注解="人工序列的描述: 合成的肽"
- <220>
<221> 变体
<222> (1)..(1)
<223> /替换="Asn" "Gln" "Lys" 或 "Arg"
- <220>
<221> 变体
<222> (2)..(2)
<223> /替换="Gln"
- <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(2)
<223> /注解="在序列中给出的残基相对于对所述位置的注释中的那些残基而言不优选"
- <220>
<221> 变体
<222> (5)..(5)
<223> /替换="Val" "Leu" "正亮氨酸" "Met" "Phe" 或 "Ile"
- <220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> /注解="在序列中给出的残基相对于对所述位置的注释中的那些残基而言不优选"

[0025]

<220>
 <221> 变体
 <222> (8)..(8)
 <223> /替换="Val" "Leu" "Ser" 或 "Ile"

 <220>
 <221> 变体
 <222> (9)..(9)
 <223> /替换="Asp"

 <220>
 <221> 变体
 <222> (10)..(10)
 <223> /替换="Asp"

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(10)
 <223> /注解= "在序列中给出的残基相对于对所述位置的注释中的那些残基而言不优选"

 <400> 35
 His Asn Lys Leu Ala Phe Phe Ala Glu Glu
 1 5 10

 <210> 36
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> /注解= "人工序列的描述: 合成的肽"

 <220>
 <221> 变体
 <222> (2)..(2)
 <223> /替换="Gln"

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> /注解= "在序列中给出的残基相对于对所述位置的注释中的那些残基而言不优选"

 <220>
 <221> 变体
 <222> (5)..(5)

[0026]

<223> /替换="Val" "Leu" "正亮氨酸" "Met" "Phe" 或 "Ile"

<220>

<221> misc_feature

<222> (5).. (5)

<223> /注解= "在序列中给出的残基相对于对所述位置的注释中的那些残基而言不优选"

<220>

<221> 变体

<222> (8).. (8)

<223> /替换="Val" "Leu" "Ser" 或 "Ile"

<220>

<221> 变体

<222> (9).. (9)

<223> /替换="Asp"

<220>

<221> 变体

<222> (10).. (10)

<223> /替换="Asp"

<220>

<221> misc_feature

<222> (8).. (10)

<223> /注解= "在序列中给出的残基相对于对所述位置的注释中的那些残基而言不优选"

<400> 36

His Asn Lys Leu Ala Phe Phe Ala Glu Glu

1

5

10

<210> 37

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> /注解= "人工序列的描述：合成的肽"

<220>

<221> 变体

<222> (1).. (1)

<223> /替换="Asn" "Gln" "Lys" 或 "Arg"

<220>

<221> 变体

[0027]

<222> (2).. (2)
 <223> /替换="Gln"

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1).. (2)
 <223> /注解= "在序列中给出的残基相对于对所述位置的注释中的那些残基而言不优选"

<220>
 <221> 变体
 <222> (5).. (5)
 <223> /替换="Val" "Leu" "正亮氨酸" "Met" "Phe" 或 "Ile"

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5).. (5)
 <223> /注解= "在序列中给出的残基相对于对所述位置的注释中的那些残基而言不优选"

<220>
 <221> 变体
 <222> (8).. (8)
 <223> /替换="Val" "Leu" "Ser" 或 "Ile"

<220>
 <221> 变体
 <222> (9).. (9)
 <223> /替换="Asp"

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8).. (9)
 <223> /注解= "在序列中给出的残基相对于对所述位置的注释中的那些残基而言不优选"

<400> 37
 His Asn Lys Leu Ala Phe Phe Ala Glu Asp
 1 5 10

<210> 38
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> /注解= "人工序列的描述: 合成的肽"

[0028]

<220>
<221> 变体
<222> (2)..(2)
<223> /替换="Gln"

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> /注解="在序列中给出的残基相对于对所述位置的注释中的那些残基而言不优选"

<220>
<221> 变体
<222> (5)..(5)
<223> /替换="Val" "Leu" "正亮氨酸" "Met" "Phe" 或 "Ile"

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> /注解="在序列中给出的残基相对于对所述位置的注释中的那些残基而言不优选"

<220>
<221> 变体
<222> (8)..(8)
<223> /替换="Val" "Leu" "Ser" 或 "Ile"

<220>
<221> 变体
<222> (9)..(9)
<223> /替换="Asp"

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(9)
<223> /注解="在序列中给出的残基相对于对所述位置的注释中的那些残基而言不优选"

<400> 38
His Asn Lys Leu Ala Phe Phe Ala Glu Asp
1 5 10

<210> 39
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

[0029]

<223> /注解=“人工序列的描述：合成的肽”

<220>

<221> 变体

<222> (1)..(1)

<223> /替换=“Asn” “Gln” “Lys” 或 “Arg”

<220>

<221> 变体

<222> (2)..(2)

<223> /替换=“Gln”

<220>

<221> 变体

<222> (3)..(3)

<223> /替换=“His” “Asn” “Gln” 或 “Arg”

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> /注解=“在序列中给出的残基相对于对所述位置的注释中的那些残基而言不优选”

<220>

<221> 变体

<222> (5)..(5)

<223> /替换=“Val” “Leu” “正亮氨酸” “Met” “Phe” 或 “Ile”

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> /注解=“在序列中给出的残基相对于对所述位置的注释中的那些残基而言不优选”

<220>

<221> 变体

<222> (8)..(8)

<223> /替换=“Val” “Leu” “Ser” 或 “Ile”

<220>

<221> 变体

<222> (9)..(9)

<223> /替换=“Asp”

<220>

<221> 变体

<222> (10)..(10)

<223> /替换=“Asp”

[0030]

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(10)
 <223> /注解= “在序列中给出的残基相对于对所述位置的注释中的那些残基而言不优选”

<400> 39
 His Asn Lys Leu Ala Phe Phe Ala Glu Glu
 1 5 10

<210> 40
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 40
 Val His His Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp
 1 5 10

<210> 41
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 41
 Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

[0031]

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 115 120 125

Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
 145 150 155 160

Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
 180 185 190

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
 195 200 205

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 210 215

<210> 42

<211> 448

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 42

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

[0032]

Ala Ser Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ser Thr Leu Thr Val Ser Ser
100 105 110

Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Cys Gly
115 120 125

Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr
130 135 140

Phe Pro Glu Ser Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser
145 150 155 160

Ser Val His Thr Phe Pro Ala Leu Leu Gln Ser Gly Leu Tyr Thr Met
165 170 175

Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val
180 185 190

Thr Cys Ser Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Thr Val Asp Lys Lys
195 200 205

Leu Glu Pro Ser Gly Pro Ile Ser Thr Ile Asn Pro Cys Pro Pro Cys
210 215 220

Lys Glu Cys His Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Glu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Ile Phe Pro Pro Asn Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu

[0033]

245	250	255
Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro 260	265	270
Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala 275	280	285
Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Ile Arg Val Val 290	295	300
Ser Thr Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe 305	310	315
Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr 325	330	335
Ile Ser Lys Ile Lys Gly Leu Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Ile Leu 340	345	350
Pro Pro Pro Ala Glu Gln Leu Ser Arg Lys Asp Val Ser Leu Thr Cys 355	360	365
Leu Val Val Gly Phe Asn Pro Gly Asp Ile Ser Val Glu Trp Thr Ser 370	375	380
Asn Gly His Thr Glu Glu Asn Tyr Lys Asp Thr Ala Pro Val Leu Asp 385	390	395
Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Ile Tyr Ser Lys Leu Asn Met Lys Thr Ser 405	410	415
Lys Trp Glu Lys Thr Asp Ser Phe Ser Cys Asn Val Arg His Glu Gly 420	425	430
Leu Lys Asn Tyr Tyr Leu Lys Lys Thr Ile Ser Arg Ser Pro Gly Lys 435	440	445

[0034]

<210> 43

<211> 15

<212> PRT

<213> 人

<400> 43

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

1 5 10 15

<210> 44

<211> 16

<212> PRT

<213> 人

<400> 44

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

1 5 10 15

<210> 45

<211> 15

<212> PRT

<213> 人

<400> 45

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

1 5 10 15

<210> 46

<211> 14

<212> PRT

<213> 人

<400> 46

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

1 5 10

<210> 47

<211> 12

<212> PRT

<213> 人

<400> 47

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

1 5 10

[0035]

<210> 48
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 48
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10 15

Leu

<210> 49
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> /注解=“人工序列的描述：合成的肽”

<220>
 <221> 变体
 <222> (1)..(1)
 <223> /替换=“Asn” “Gln” “Lys” 或 “Arg”

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> /注解=“在序列中给出的残基相对于对所述位置的注释中的那些残基而言不优选”

<220>
 <221> 变体
 <222> (3)..(3)
 <223> /替换=“Gln”

<220>
 <221> 变体
 <222> (4)..(4)
 <223> /替换=“Asn” “Gln” “Lys” 或 “Arg”

<220>
 <221> 变体
 <222> (5)..(5)
 <223> /替换=“Val” “Leu” “Ser” 或 “Ile”

[0036]

- <220>
<221> 变体
<222> (6)..(6)
<223> /替换="Val" "Leu" "正亮氨酸" "Met" "Phe" 或 "Ile"
- <220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(6)
<223> /注解="在序列中给出的残基相对于对所述位置的注释中的那些残基而言不优选"
- <220>
<221> 变体
<222> (9)..(9)
<223> /替换="Val" "Leu" 或 "Ile"
- <220>
<221> 变体
<222> (10)..(10)
<223> /替换="Asp"
- <220>
<221> 变体
<222> (11)..(11)
<223> /替换="Asp"
- <220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(11)
<223> /注解="在序列中给出的残基相对于对所述位置的注释中的那些残基而言不优选"
- <400> 49
His His Asn His Ala Ala Phe Phe Ala Glu Glu
1 5 10
- <210> 50
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
- <220>
<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
- <220>
<221> 变体
<222> (1)..(1)
<223> /替换="Asn" "Gln" "Lys" 或 "Arg"

[0037]

- <220>
 <221> 变体
 <222> (2).. (2)
 <223> /替换="Gln"
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1).. (2)
 <223> /注解= "在序列中给出的残基相对于对所述位置的注释中的那些残基而言不优选"
- <220>
 <221> 变体
 <222> (5).. (5)
 <223> /替换="Ala" "Leu" "Met" "Phe" "正亮氨酸" 或 "Ile"
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5).. (5)
 <223> /注解= "在序列中给出的残基相对于对所述位置的注释中的那些残基而言不优选"
- <220>
 <221> 变体
 <222> (8).. (8)
 <223> /替换="Val" "Leu" 或 "Ile"
- <220>
 <221> 变体
 <222> (9).. (9)
 <223> /替换="Asp"
- <220>
 <221> 变体
 <222> (10).. (10)
 <223> /替换="Asp"
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8).. (10)
 <223> /注解= "在序列中给出的残基相对于对所述位置的注释中的那些残基而言不优选"
- <400> 50
 His Asn Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Glu
 1 5 10
- <210> 51

[0038]

- <211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
- <220>
<223> /注解=“人工序列的描述：合成的肽”
- <400> 51
Phe Phe Ala Glu
1
- <210> 52
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
- <220>
<223> /注解=“人工序列的描述：合成的肽”
- <220>
<221> 变体
<222> (1)..(1)
<223> /替换=“Asn” “Gln” “Lys” 或 “Arg”
- <220>
<221> 变体
<222> (3)..(3)
<223> /替换=“Asn”
- <220>
<221> 变体
<222> (6)..(6)
<223> /替换=“Ala” “Leu” “正亮氨酸” “Met” “Phe” 或 “Ile”
- <220>
<221> 变体
<222> (9)..(9)
<223> /替换=“Val” “Leu” “Ser” 或 “Ile”
- <220>
<221> 变体
<222> (10)..(10)
<223> /替换=“Asp”
- <220>
<221> 变体
<222> (12)..(12)
<223> /替换=“Ala” “Leu” “正亮氨酸” “Met” “Phe” 或 “Ile”

[0039]

<400> 52
His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val
1 5 10

<210> 53
<211> 10
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> 变体
<222> (2).. (2)
<223> /替换="Asn"

<220>
<221> 变体
<222> (5).. (5)
<223> /替换="Leu" 或 "Ile"

<220>
<221> 变体
<222> (8).. (8)
<223> /替换="Val"

<220>
<221> 变体
<222> (9).. (9)
<223> /替换="Asp"

<220>
<221> 变体
<222> (10).. (10)
<223> /替换="Asp"

<400> 53
His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Glu
1 5 10

<210> 54
<211> 11
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> 变体

[0040]

- <222> (1).. (1)
<223> /替换="Asn" "Gln" "Lys" 或 "Arg"
- <220>
<221> misc_feature
<222> (1).. (1)
<223> /注解="在序列中给出的残基相对于对所述位置的注释中的那些残基而言不优选"
- <220>
<221> 变体
<222> (3).. (3)
<223> /替换="Gln"
- <220>
<221> 变体
<222> (4).. (4)
<223> /替换="Asn" "Gln" "Lys" 或 "Arg"
- <220>
<221> 变体
<222> (5).. (5)
<223> /替换="Val" "Leu" "Ser" 或 "Ile"
- <220>
<221> 变体
<222> (6).. (6)
<223> /替换="Val" "Leu" 或 "Ile"
- <220>
<221> misc_feature
<222> (3).. (6)
<223> /注解="在序列中给出的残基相对于对所述位置的注释中的那些残基而言不优选"
- <220>
<221> 变体
<222> (9).. (9)
<223> /替换="Val" "Leu" 或 "Ile"
- <220>
<221> 变体
<222> (10).. (10)
<223> /替换="Asp"
- <220>
<221> 变体
<222> (11).. (11)
<223> /替换="Asp"

[0041]

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(11)
<223> /注解=“在序列中给出的残基相对于对所述位置的注释中的那些残基而言不优选”

<400> 54
His His Asn His Ala Ala Phe Phe Ala Glu Glu
1 5 10

<210> 55
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

<400> 55
Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp
1 5 10

<210> 56
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> /注解=“人工序列的描述：合成的肽”

<400> 56
Leu Glu Trp Ile Gly
1 5

<210> 57
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> /注解=“人工序列的描述：合成的肽”

<400> 57
Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 58
<211> 7
<212> PRT

[0042]

<213> 人工序列

<220>

<223> /注解= “人工序列的描述：合成的肽”

<400> 58

Lys Val Ser Ser Arg Phe Ser

1 5

<210> 59

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> /注解= “人工序列的描述：合成的肽”

<400> 59

Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe

1 5

<210> 60

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> /注解= “人工序列的描述：合成的肽”

<400> 60

Ala His His Gln Lys Leu Val Phe Phe

1 5

<210> 61

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> /注解= “人工序列的描述：合成的肽”

<400> 61

Val Ala His Gln Lys Leu Val Phe Phe

1 5

<210> 62

[0043]

<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> /注解= “人工序列的描述：合成的肽”

<400> 62
Val His Ala Gln Lys Leu Val Phe Phe
1 5

<210> 63
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> /注解= “人工序列的描述：合成的肽”

<400> 63
Val His His Ala Lys Leu Val Phe Phe
1 5

<210> 64
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> /注解= “人工序列的描述：合成的肽”

<400> 64
Val His His Gln Ala Leu Val Phe Phe
1 5

<210> 65
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> /注解= “人工序列的描述：合成的肽”

<400> 65
Val His His Gln Lys Ala Val Phe Phe
1 5

[0044]

<210> 66
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> /注解= “人工序列的描述：合成的肽”

<400> 66
Val His His Gln Lys Leu Ala Phe Phe
1 5

<210> 67
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> /注解= “人工序列的描述：合成的肽”

<400> 67
Val His His Gln Lys Leu Val Ala Phe
1 5

<210> 68
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> /注解= “人工序列的描述：合成的肽”

<400> 68
Val His His Gln Lys Leu Val Phe Ala
1 5

<210> 69
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> /注解= “人工序列的描述：合成的肽”

<400> 69
His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala

[0045]

1 5

<210> 70
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> /注解= “人工序列的描述: 合成的肽”

<400> 70
His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Gly
1 5

<210> 71
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> /注解= “人工序列的描述: 合成的肽”

<400> 71
His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu
1 5

<210> 72
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> /注解= “人工序列的描述: 合成的肽”

<400> 72
His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Ala
1 5

<210> 73
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> /注解= “人工序列的描述: 合成的肽”

[0046]

<400> 73
 Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp
 1 5

<210> 74
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> /注解=“人工序列的描述：合成的肽”

<400> 74
 Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Ala
 1 5

<210> 75
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> /注解=“人工序列的描述：合成的肽”

<220>
 <221> 变体
 <222> (1)..(1)
 <223> /替换=“Asn”或“Gln”

<220>
 <221> 变体
 <222> (2)..(2)
 <223> /替换=“Asn”

<220>
 <221> 变体
 <222> (5)..(5)
 <223> /替换=“Leu”或“Ile”

<220>
 <221> 变体
 <222> (8)..(8)
 <223> /替换=“Val”

<220>
 <221> 变体
 <222> (9)..(9)

[0047]

<223> /替换="Asp"

<220>

<221> 变体

<222> (10).. (10)

<223> /替换="Glu"

<400> 75

His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp

1 5 10

<210> 76

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> /注解= "人工序列的描述：合成的肽"

<220>

<221> 变体

<222> (1).. (1)

<223> /替换="Asn" "Gln" "Lys" 或 "Arg"

<220>

<221> misc_feature

<222> (1).. (1)

<223> /注解= "在序列中给出的残基相对于对所述位置的注释中的那些残基而言不优选"

<220>

<221> 变体

<222> (3).. (3)

<223> /替换="Gln"

<220>

<221> 变体

<222> (4).. (4)

<223> /替换="Asn" "Gln" "Lys" 或 "Arg"

<220>

<221> 变体

<222> (5).. (5)

<223> /替换="Val" "Leu" "Ser" 或 "Ile"

<220>

<221> 变体

<222> (6).. (6)

[0048]

<223> /替换="Val" "Leu" 或 "Ile"

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(6)

<223> /注解= "在序列中给出的残基相对于对所述位置的注释中的那些残基而言不优选"

<220>

<221> 变体

<222> (9)..(11)

<223> /替换="Val" "Leu" 或 "Ile"

<220>

<221> 变体

<222> (9)..(11)

<223> /替换="Asp"

<220>

<221> 变体

<222> (9)..(11)

<223> /替换="Asp"

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)..(11)

<223> /注解= "在序列中给出的残基相对于对所述位置的注释中的那些残基而言不优选"

<400> 76

His His Asn His Ala Ala Phe Phe Ala Glu Glu

1

5

10

<210> 77

<211> 635

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> /注解= "人工序列的描述：合成的多核苷酸"

<220>

<221> CDS

<222> (122)..(166)

<220>

<221> CDS

<222> (249)..(596)

[0049]

<400> 77	
aagcttatga atatgcaaat cctctgaatc tacatggtaa atataggttt gtctatacca	60
caaacagaaa aacatgagat cacagttctc tctacagtta ctgagcacac aggacctcac	120
c atg gga tgg agc tgt atc atc ctc ttc ttg gta gca aca gct aca	166
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr	
1 5 10 15	
ggtaaggggc tcacagtagc aggcttgagg tctggacata tatatgggtg acaatgacat	226
ccactttgcc tttctctcca ca ggt gtc cac tcc gat gtt gtg atg acc caa	278
Gly Val His Ser Asp Val Val Met Thr Gln	
20 25	
act cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct	326
Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser	
30 35 40	
tgc aga tct agt cag agc ctt gta tat agt aat gga gac acc tat tta	374
Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser Asn Gly Asp Thr Tyr Leu	
45 50 55	
cat tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct cca aag ctc ctg atc tac	422
His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr	
60 65 70	
aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt	470
Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser	
75 80 85	
gga tca ggg aca gat ttc aca ctc aag atc agc aga gtg gag gct gag	518
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu	
90 95 100 105	
gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt cct tgg acg	566
Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr	
110 115 120	
ttc ggc gga ggc acc aag ctg gaa atc aaa cgtgagtaga atttaaactt	616
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
125 130	
tgcttcctca gttgatcc	635
<210> 78	
<211> 15	
<212> PRT	
<213> 人工序列	

[0050]

<220>

<223> /注解= “人工序列的描述: 合成的肽”

<400> 78

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr
 1 5 10 15

<210> 79

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> /注解= “人工序列的描述: 合成的多肽”

<400> 79

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

Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser
 20 25 30

Leu Val Tyr Ser Asn Gly Asp Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys
 35 40 45

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

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

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe
 85 90 95

Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 100 105 110

Leu Glu Ile Lys
 115

[0051]

<210> 80
 <211> 798
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> /注解= “人工序列的描述：合成的多核苷酸”

<220>
 <221> CDS
 <222> (122).. (166)

<220>
 <221> CDS
 <222> (249).. (596)

<400> 80
 aagcittatga atatgcaaat cctctgaatc tacatggtaa atataggttt gtctatacca 60
 caaacagaaa aacatgagat cacagttctc tctacagtta ctgagcacac aggacctcac 120
 c atg gga tgg agc tgt atc atc ctc ttc ttg gta gca aca gct aca 166
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr
 1 5 10 15
 ggtaaggggc tcacagtagc aggcttgagg tctggacata tatatgggtg acaatgacat 226
 ccactttgcc tttctctcca ca ggt gtc cac tcc gag gtg cag ctg gtc gag 278
 Gly Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
 20 25
 tct ggg gga ggc tta gtg cag cct gga ggg tcc ctg aaa ctc tcc tgt 326
 Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys
 30 35 40
 gca gcc tct gga ttc act ttc agt agc tat ggc atg tct tgg gtt cgc 374
 Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg
 45 50 55
 cag act cca gac aag agg ctg gaa ttg gtc gca agc atc aat agt aat 422
 Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Leu Val Ala Ser Ile Asn Ser Asn
 60 65 70
 ggt ggt agc acc tat tat cca gac agt gtg aag ggc cga ttc acc atc 470
 Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
 75 80 85
 tcc aga gac aat gcc aag aac acc ctg tac ctg caa atg agc agt ctg 518
 Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu

[0052]

90	95	100	105	
aag tct gag gac aca gcc atg tat tac tgt gca agt ggt gac tac tgg				566
Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Ser Gly Asp Tyr Trp				
	110	115	120	
ggc caa ggc tcc act ctc aca gtc tcc tca ggtgagtcct tacaacctct				616
Gly Gln Gly Ser Thr Leu Thr Val Ser Ser				
	125	130		
ctcttctatt cagcttaaat agatttact gcatttggtg ggggggaaat gtgtgtatct				676
gaatttcagg tcatgaagga ctagggacac cttgggagtc agaaagggtc attgggagcc				736
cgggctgatg cagacagaca tcctcagctc ccagacttca tggccagaga tttataggat				796
cc				798
<210> 81				
<211> 116				
<212> PRT				
<213> 人工序列				
<220>				
<223> /注解= “人工序列的描述: 合成的多肽”				
<400> 81				
Gly Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val				
1	5	10	15	
Gln Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr				
	20	25	30	
Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg				
	35	40	45	
Leu Glu Leu Val Ala Ser Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr				
50	55	60		
Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys				
65	70	75	80	
Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala				

[0053]

85

90

95

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

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 82

<211> 99

<212> PRT

<213> 小鼠属 (Mus sp.)

<400> 82

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

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

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Arg

<210> 83

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

[0054]

<220>

<223> /注解= “人工序列的描述：合成的多肽”

<400> 83

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

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

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

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

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

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

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 84

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> /注解= “人工序列的描述：合成的多肽”

<400> 84

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

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

[0055]

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

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

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

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

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 85

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> /注解= “人工序列的描述：合成的多肽”

<400> 85

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

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

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

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

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

[0056]

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

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 86

<211> 100

<212> PRT

<213> 小鼠属

<400> 86

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

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

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

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

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

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

Leu Gln Thr Pro
100

<210> 87

<211> 12

<212> PRT

<213> 人

<400> 87

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

[0057]

1 5 10

<210> 88
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> /注解= “人工序列的描述：合成的多肽”

<400> 88
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

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

Ala Ser Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110

<210> 89
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> /注解= “人工序列的描述：合成的多肽”

[0058]

<400> 89
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Ser Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110

<210> 90
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> /注解= “人工序列的描述：合成的多肽”

<400> 90
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val
 35 40 45

[0059]

Ala Ser Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 91

<211> 98

<212> PRT

<213> 小鼠属

<400> 91

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

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

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

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg

[0060]

<210> 92
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 92
 Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 1 5 10 15

Thr Val Ser Ser
 20

<210> 93
 <211> 635
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> /注解= “人工序列的描述：合成的多核苷酸”

<220>
 <221> CDS
 <222> (122)..(166)

<220>
 <221> CDS
 <222> (249)..(596)

<400> 93
 aagcttatga atatgcaaat cctctgaatc tacatggtaa atataggttt gtctatacca 60
 caaacagaaa aacatgagat cacagttctc tctacagtta ctgagcacac aggacctcac 120
 c atg gga tgg agc tgt atc atc ctc ttc ttg gta gca aca gct aca 166
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr
 1 5 10 15
 ggtaaggggc tcacagtagc aggcttgagg tctggacata tatatgggtg acaatgacat 226
 ccactttgcc tttctctcca ca ggt gtc cac tcc gat att gtg atg acc caa 278
 Gly Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln
 20 25
 tct cca ctc tcc ctg cct gtc act cct ggt gag cct gcc tcc atc tct 326
 Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser
 30 35 40

[0061]

tgc aga tct agt cag agc ctt gta tat agt aat gga gac acc tat tta Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser Asn Gly Asp Thr Tyr Leu 45 50 55	374
cat tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct cca cag ctc ctg atc tac His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr 60 65 70	422
aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser 75 80 85	470
gga tca ggg aca gat ttc aca ctc aag atc agc aga gtg gag gct gag Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu 90 95 100 105	518
gat gtg gga gtt tat tac tgc tct caa agt aca cat gtt cct tgg acg Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr 110 115 120	566
ttc ggc caa ggc acc aag gtg gaa atc aaa cgtgagtaga atttaaactt Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 125 130	616
tgcttcctca gttgatcc	635
<210> 94 <211> 116 <212> PRT <213> 人工序列	
<220> <223> /注解= “人工序列的描述: 合成的多肽”	
<400> 94 Gly Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro 1 5 10 15	
Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser 20 25 30	
Leu Val Tyr Ser Asn Gly Asp Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys 35 40 45	
Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe	

[0062]

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

<210> 95

<211> 5561

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> /注解= “人工序列的描述：合成的多核苷酸”

<220>

<221> CDS

<222> (2138).. (2455)

<400> 95

```

ggatcctggc agagtctcac agatgcttct gagacaacat ttgctttcaa aaaatgaacc      60
acacacatcc taaagatctc agccacttcc catgtttcat tttatgttac agcaaacatc      120
acaacaatca ttctacaga tcaccactgc atgtgatcaa taaaatagtt tttgcaacaa      180
tggtacttat gataatcatc ttttattggt tacaataact gctttacaat agttattcgg      240
ttgcactggt catattagat ttccaattag ctcacttagg aacataagtc cctcgaacag      300
ctcagtcac ttttcatc ctgtttctat ccctacac tctttccttt gcagacgact      360
atctcctaca ctgaaacagg aaagctagct ttttttttc agtgctattt aattatttca      420
atatacctctc atcaaatgta tttaaataac aaaagctcaa ccaaaaagaa agaaatatgt      480
aattctttca gagtaaaaat cacacccatg acctggccac tgagggcttg atcaattcac      540

```

[0063]

tttgaatttg gcattaaata ccattaaggt atattaactg attttaaaat aagatatatt	600
cgtgaccatg tttttaactt tcaaaaatgt agctgccagt gtgtgatttt atttcagttg	660
tacaaaatat ctaaacctat agcaatgtga ttaataaaaa cttaaacata tttccagta	720
ccttaattct gtgataggaa aattttaatc tgagtatttt aatttcataa tctctaaaat	780
agtttaatga tttgtcattg tgttgctgtc gtttacccca gctgatctca aaagtgatat	840
ttaaggagat tattttggtc tgcaacaact tgataggact attttagggc ctttttaag	900
ctctattaaa actaacttac aacgattcaa aactgtttta aactatttca aatgatttt	960
agagcctttt gaaaactctt ttaaacactt tttaaactct attaaaacta ataagataac	1020
ttgaaataat tttcatgtca aatacattaa ctgtttaatg tttaaatgcc agatgaaaaa	1080
tgtaaagcta tcaagaattc acccagatag gagtatcttc atagcatgtt tttccctgct	1140
tattttccag tgatcacatt attttgctac catggttatt ttatacaatt atctgaaaaa	1200
aattagttat gaagattaaa agagaagaaa atattaaca taagagattc agtctttcat	1260
gttgaactgc ttggttaaca gtgaagttag ttttaaaaaa aaaaaaaact atttctgtta	1320
tcagctgact tctccctatc tgttgacttc tcccagcaaa agattcttat tttacatttt	1380
aactactgct ctcccacca acgggtggaa tccccagag ggggatttcc aagaggccac	1440
ctggcagttg ctgagggtca gaagtgaagc tagccacttc ctcttaggca ggtggccaag	1500
attacagttg acctctctg gtatggctga aaattgctgc atatggttac aggccttgag	1560
gcctttggga gggcttagag agttgctgga acagtcagaa ggtggagggg ctgacaccac	1620
ccaggcgcag aggcagggtc cagggcctgc tctgcagga ggttttagcc cagccagccc	1680
aaagtaaccc ccgggagcct gttatcccag cacagtctg gaagaggcac aggggaaata	1740
aaagcggacg gaggttttcc ttgactcagc cgctgcctgg tcttctcag acctgttctg	1800
aattctaaac tctgaggggg tcggatgacg tggccattct ttgcctaaag cattgagttt	1860
actgcaaggt cagaaaagca tgcaaagccc tcagaatggc tgcaaagagc tccaacaaaa	1920
caatttagaa ctttattaag gaataggggg aagctaggaa gaaactcaaa acatcaagat	1980
tttaaatagc cttcttggtc tccttgctat aattatctgg gataagcatg ctgttttctg	2040

[0064]

tctgtcccta acatgccctg tgattatccg caaacaacac acccaagggc agaactttgt	2100
tacttaaaca ccacctgtt tgcttctttc ctcagga act gtg gct gca cca tct	2155
Thr Val Ala Ala Pro Ser	
1 5	
gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga act gcc	2203
Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala	
10 15 20	
tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc aaa gta	2251
Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val	
25 30 35	
cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag gag agt	2299
Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser	
40 45 50	
gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc tac agc ctc agc agc acc	2347
Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr	
55 60 65 70	
ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac gcc tgc	2395
Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys	
75 80 85	
gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc ttc aac	2443
Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn	
90 95 100	
agg gga gag tgt tagagggaga agtgcccca cctgctctc agttccagcc	2495
Arg Gly Glu Cys	
105	
tgacccctc ccacctttg gectctgacc ctttttccac aggggacctc ccctattgc	2555
ggctctccag ctcatctttc acctcacc cctcctctc cttggcttta attatgctaa	2615
tgttggagga gaatgaataa ataaagttaa tctttgcacc tgtggtttct ctctttcctc	2675
atthaataat tattatctgt tgttttacca actactcaat ttctcttata agggactaaa	2735
tatgtagtca tctaaggcg cataaccatt tataaaaatc atccttcatt ctattttacc	2795
ctatcatcct ctgcaagaca gtctccctc aaaccacaaa gccttctgtc ctacagtcc	2855
cctgggcat ggtaggagag acttgcttcc ttgttttccc ctctcagca agcctcata	2915
gtccttttta agggtgacag gtcttacagt catatatcct ttgattcaat tcctgagaa	2975

[0065]

tcaaccaaag caaatTTTTTc aaaagaagaa acctgctata aagagaatca ttcattgcaa 3035
catgatataa aataacaaca caataaaagc aattaaataa acaaacaata gggaaatggt 3095
taagttcatc atggtactta gacttaatgg aatgcatgc cttatttaca tttttaaaca 3155
ggtactgagg gactcctgtc tgccaagggc cgtattgagt actttccaca acctaattta 3215
atccacacta tactgtgaga ttaaaaacat tcattaaat gttgcaaagg ttctataaag 3275
ctgagagaca aatatattct ataactcagc aatcccactt ctagatgact gagtgtcccc 3335
accacacaaa aaactatgca agaatgttca aagcagcttt atttacaaaa gccaaaaatt 3395
ggaaatagcc cgattgtcca acaatagaat gagttattaa actgtggtat gtttatacat 3455
tagaatacc aatgaggaga attaacaagc tacaactata cctactcaca cagatgaatc 3515
tcataaaaat aatgttacat aagagaaact caatgcaaaa gatatgttct gtatgttttc 3575
atccatataa agttcaaac caggtaaaaa taaagttaga aatttggatg gaaattactc 3635
ttagctgggg gtggcgagt tagtgcctgg gagaagacaa gaaggggctt ctggggctt 3695
ggtaatgttc tgttcctcgt gtggggttgt gcagttatga tctgtgcact gttctgtata 3755
cacattatgc ttcaaaataa cttcacataa agaacatctt ataccagtt aatagataga 3815
agaggaataa gtaatagtc aagaccatgc agctggtgag tgggggggccc tgggatcaaa 3875
tagctacctg cctaactcctg ccctcttgag ccctgaaatga gtctgccttc cagggctcaa 3935
ggtgctcaac aaaacaacag gcctgctatt ttctggcat ctgtgcctg tttggctagc 3995
taggagcaca catacataga aattaaatga aacagacctt cagcaagggg acagaggaca 4055
gaattaacct tgcccagaca ctggaaacct atgtatgaac actcacatgt ttgggaaggg 4115
ggaagggcac atgtaaataa ggactcttcc tcattctatg gggcactctg gccctgcccc 4175
tctcagctac tcatccatcc aacacacctt tctaagtacc tctctctgcc tacactctga 4235
aggggttcag gagtaactaa cacagcatcc cttccctcaa atgactgacc atccctttgt 4295
cctgctttgt ttttctttcc agtcagtact gggaaagtgg ggaaggacag tcatggaaaa 4355
actacataag gaagcacctt gcccttctgc ctcttgagaa tgttgatgag tatcaaatct 4415
ttcaaacttt ggaggtttga gtaggggtga gactcagtaa tgtcccttcc aatgacatga 4475

[0066]

acttgctcac tcatccctgg gggccaaatt gaacaatcaa aggcaggcat aatccagtta 4535
 tgaattcaaa cttcttctc agaagataac actctgaagg gaaaccacc cataacctaa 4595
 gcaagtgaag acaggtgctg caggtggaat tgtgtccttc aaaaaggtat gctcaactcc 4655
 ttgctcttgg tactcataaa tgggtcacat aatgtgact ttatttggaa atagggtctt 4715
 tgcagagta atcaagtcaa aattaggtca tactgaaatg tttgtgagga tgcggtgaaa 4775
 atggatcatt catatattgc tgggtggaat ataaaagggt atagctactc tagaaaatag 4835
 ttgtcagttt cttgaaaaac taaacaaaag acacctacca tatgaccag gaattgtact 4895
 ccttggaat ttacccccag gaaataaaaa cttatgtcca cacagaacc atacatgatt 4955
 gttcacagca gctttatttg ttgtagccaa agctagaaag agccaacca tccctcaata 5015
 ggcaactagc ctaacaaatt gtaatatatc catgcatag aatgctatga ggcaataaaa 5075
 aggaacgaag tgttgataca gagaactgga gtgattctga aggactttct actgagtga 5135
 aaaagccaat ctgaaagggt cacataccat gtgattcctt ttatgtaaca ttgttgaagt 5195
 gacaaaatta taggataga gaacagattc tggttgccag gggttagggt ggtggagaaa 5255
 gaagagtagg cgaaactata aaggagatc tttgtgatca tgggataaat ctgtatcttg 5315
 attgcagtgg tagttgcagg catctagaca tgtgataaaa tgacatagaa ctgtacacac 5375
 ttattttatc aatgtcaaatt tcttggtttt aatatcgtac tgtaattacg taagaagtaa 5435
 ccaacaggag aaactgggtg caggacacat cagacctctg tgctttatat cctgtctttg 5495
 ctactttctg tgaatctata attatttcca aataattttt ttaaactttt tttttatgct 5555
 ggatcg 5561

<210> 96

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> /注解= “人工序列的描述：合成的多肽”

<400> 96

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln

[0067]

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

<210> 97

<211> 2027

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> /注解= “人工序列的描述：合成的多核苷酸”

<220>

<221> CDS

<222> (230).. (523)

<220>

<221> CDS

<222> (920).. (955)

<220>

<221> CDS

<222> (1074).. (1403)

<220>

<221> CDS

<222> (1501).. (1821)

[0068]

<400> 97	
ggatcctcta gattgagctt tctggggcag gccaggcctg accttggctg ggggcagga	60
gggggctaag gtgacgcagg tggcgcagc caggtgcaca cccaatgcc atgagcccag	120
acactggacc ctgcatggac catcgcggat agacaagaac cgaggggect ctgcgcctg	180
ggcccagctc tgtcccacac cgcggtcaca tggcaccacc tctcttga gct tcc acc	238
	Ala Ser Thr
	1
aag ggc cca tcc gtc ttc ccc ctg gcg ccc tgc tcc aga tgc acc tcc	286
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser	
5 10 15	
gag agc aca gcc gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa	334
Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu	
20 25 30 35	
ccg gtg acg gtg tgc tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac	382
Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His	
40 45 50	
acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc	430
Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser	
55 60 65	
gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acg aag acc tac acc tgc	478
Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys	
70 75 80	
aac gta gat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt	523
Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val	
85 90 95	
ggtgagaggc cagcacaggg agggagggtg tctgctggaa gccaggctca gccctcctgc	583
ctggacgcac cccggctgtg cagccccagc ccagggcagc aaggcatgcc ccatctgtct	643
cctcaccgg aggcctctga ccacccact catgctcagg gagagggtct tctggatttt	703
tccaccaggc tccgggcagc cacaggctgg atgccctac cccaggccct gcgcatacag	763
gggcaggtgc tgcgctcaga cctgccaaga gccatatccg ggaggaccct gccctgacc	823
taagcccacc ccaaaggcca aactctccac tcctcagct cagacacctt ctctcctccc	883
agatcgatct gagtaactcc caatcttctc tctgca gag tcc aaa tat ggt ccc	937
	Glu Ser Lys Tyr Gly Pro

[0069]

100

ccg tgt ccc cca tgc cca ggtaagccaa cccaggcctc gccctccage	985		
Pro Cys Pro Pro Cys Pro			
105	110		
tcaaggcggg acaggtgccc tagagtagcc tgcattccagg gacaggcccc agccgggtgc	1045		
tgacgcatcc acctccatct ctctctca gca cct gag ttc ctg ggg gga cca	1097		
Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro			
115			
tca gtc ttc ctg ttc ccc cca aaa ccc aag gac act ctc atg atc tcc	1145		
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser			
120	125	130	
cgg acc cct gag gtc acg tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cag gaa gac	1193		
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp			
135	140	145	150
ccc gag gtc cag ttc aac tgg tac gtg gat ggc gtg gag gtg cat aat	1241		
Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn			
155	160	165	
gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag ttc aac agc acg tac cgt gtg	1289		
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val			
170	175	180	
gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aac ggc aag gag	1337		
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu			
185	190	195	
tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa ggc ctc ccg tcc tcc atc gag aaa	1385		
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys			
200	205	210	
acc atc tcc aaa gcc aaa ggtgggaccc acggggtgcg agggccacat	1433		
Thr Ile Ser Lys Ala Lys			
215	220		
ggacagaggt cagctcggcc caccctctgc cctgggagtg accgctgtgc caacctctgt	1493		
ccctaca ggg cag ccc cga gag cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc	1542		
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser			
225	230		
cag gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa	1590		
Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys			
235	240	245	250

[0070]

ggc ttc tac ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln 255 260 265	1638
ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtc ctc gat tcc gac ggc Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly 270 275 280	1686
tcc ttc ttc ctc tac agc agg cta acc gtg gac aag agc agg tgg cag Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln 285 290 295	1734
gag ggg aat gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn 300 305 310	1782
cac tac aca cag aag agc etc tcc ctg tct ctg ggt aaa tgagtgccag His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys 315 320 325	1831
ggccggcaag cccccgtcc ccgggctctc ggggtcgcgc gaggatgctt ggcacgtacc	1891
ccgtctacat acttcccagg caccagcat gaaataaag caccaccac tgcctgggc	1951
ccctgtgaga ctgtgatggt tctttccacg ggtcaggccg agtctgaggc ctgagtgaca	2011
tgagggaggc agatcc	2027
<210> 98	
<211> 98	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> /注解= “人工序列的描述: 合成的肽”	
<400> 98	
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg 1 5 10 15	
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr 20 25 30	
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser 35 40 45	

[0071]

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

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

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

Arg Val

<210> 99

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> /注解= “人工序列的描述：合成的肽”

<400> 99

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10

<210> 100

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> /注解= “人工序列的描述：合成的多肽”

<400> 100

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 25 30

Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
 35 40 45

[0072]

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
100 105 110

<210> 101

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> /注解= “人工序列的描述：合成的多肽”

<400> 101

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

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
50 55 60

Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
85 90 95

[0073]

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
100 105

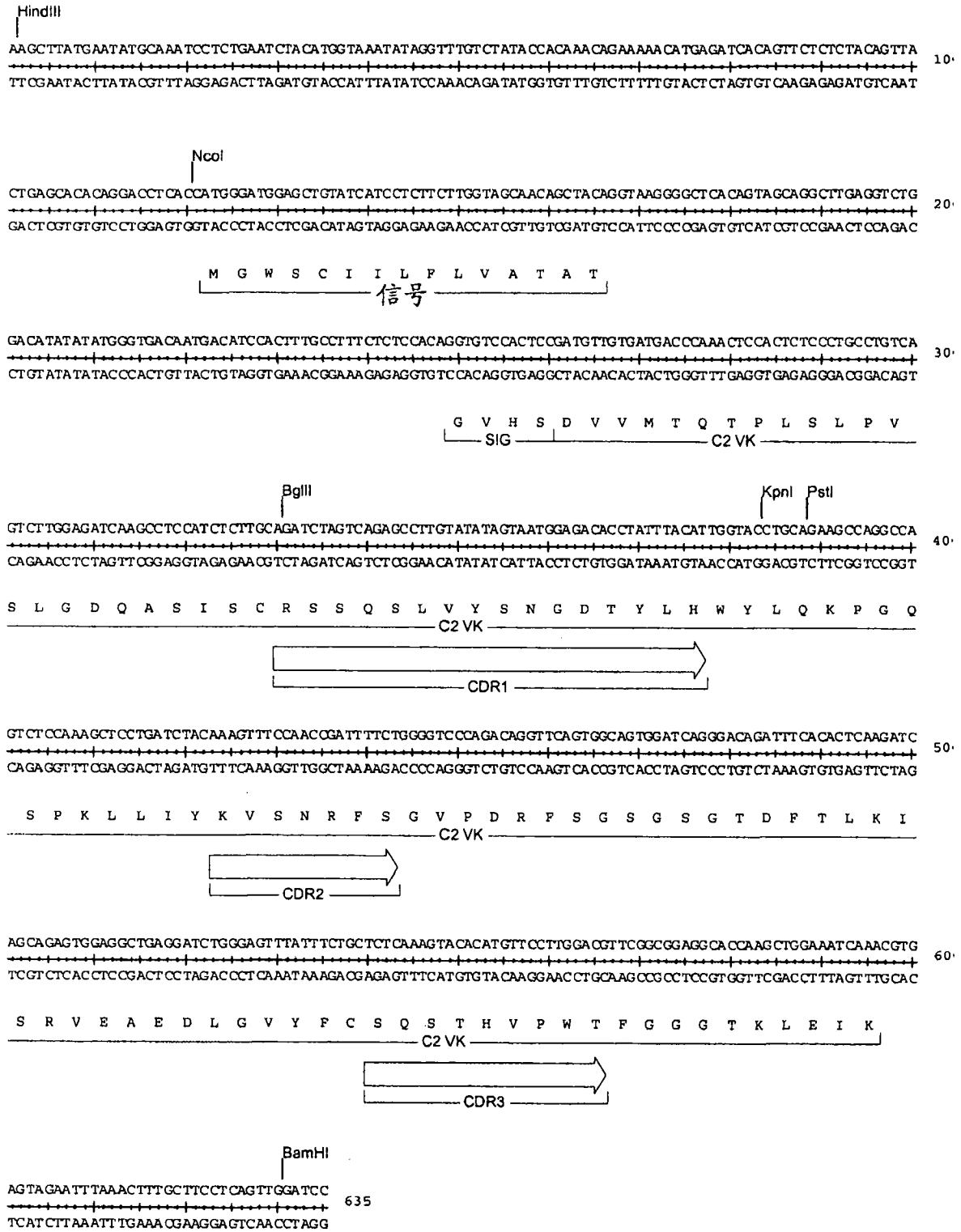


图 1

(实施例 2)

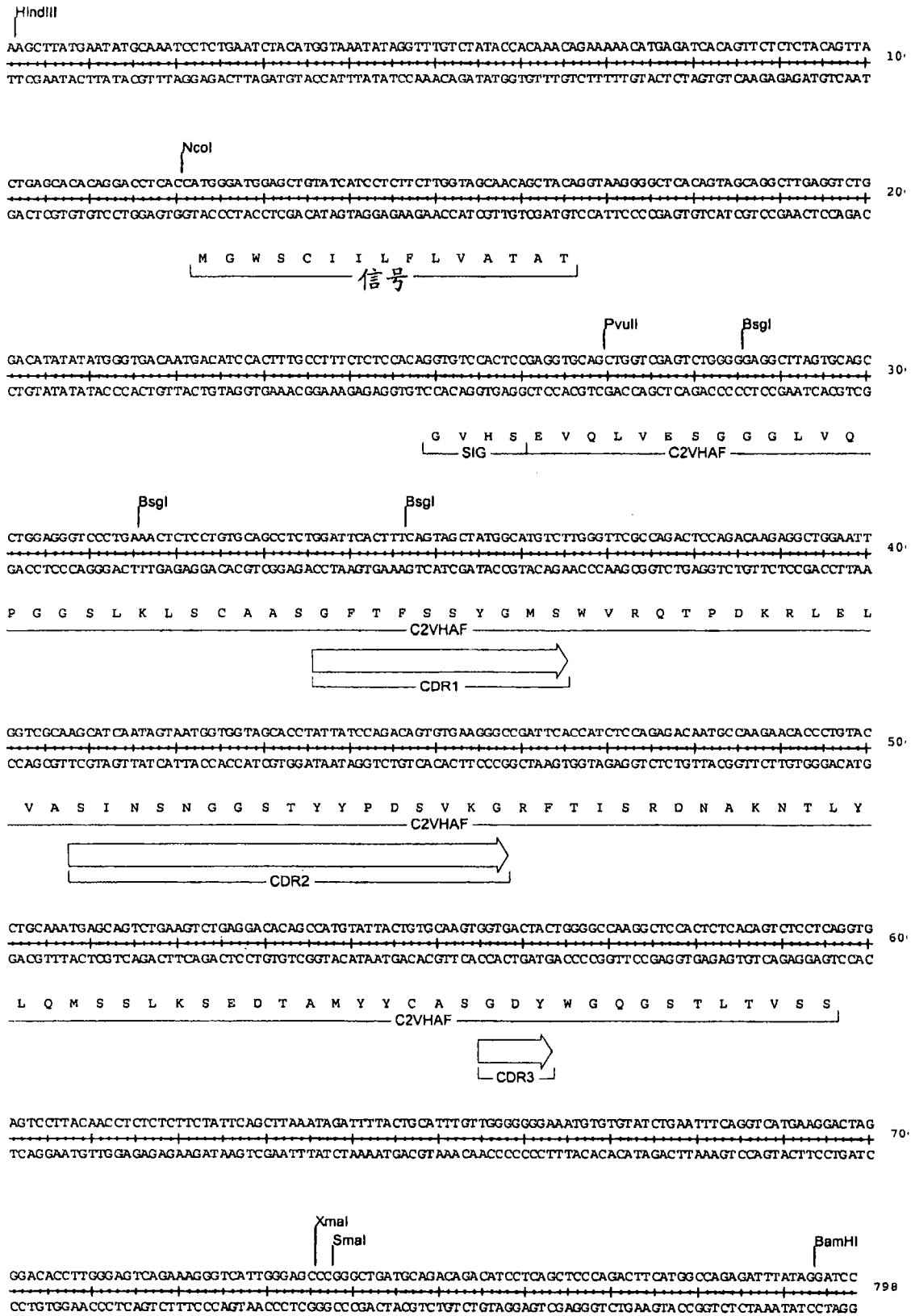


图 2
(实施例 2)

	10	20	30
C2VHAF	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L K L S C A A S G F T F S		
AF120466	E V K L V E S G G G L V K P G G S L K L S C A A S G F T F S		
	40	50	60
C2VHAF	S Y G M S W V R Q T P D K R L E L V A S I N S N G G S T Y Y		
AF120466	S Y G M S W V R Q T P D K R L E W V A T I S S G G S Y T Y Y		
	70	80	90
C2VHAF	P D S V K G R F T I S R D N A K N T L Y L Q M S S L K S E D		
AF120466	P D S V K G R F T I S R D N A K N T L Y L Q M S S L K S E D		
	100	110	
C2VHAF	T A M Y Y C A S G D Y W G Q G S T L T V S S		
AF120466	T A M Y Y C A R R		

图 3

(实施例 5.2)

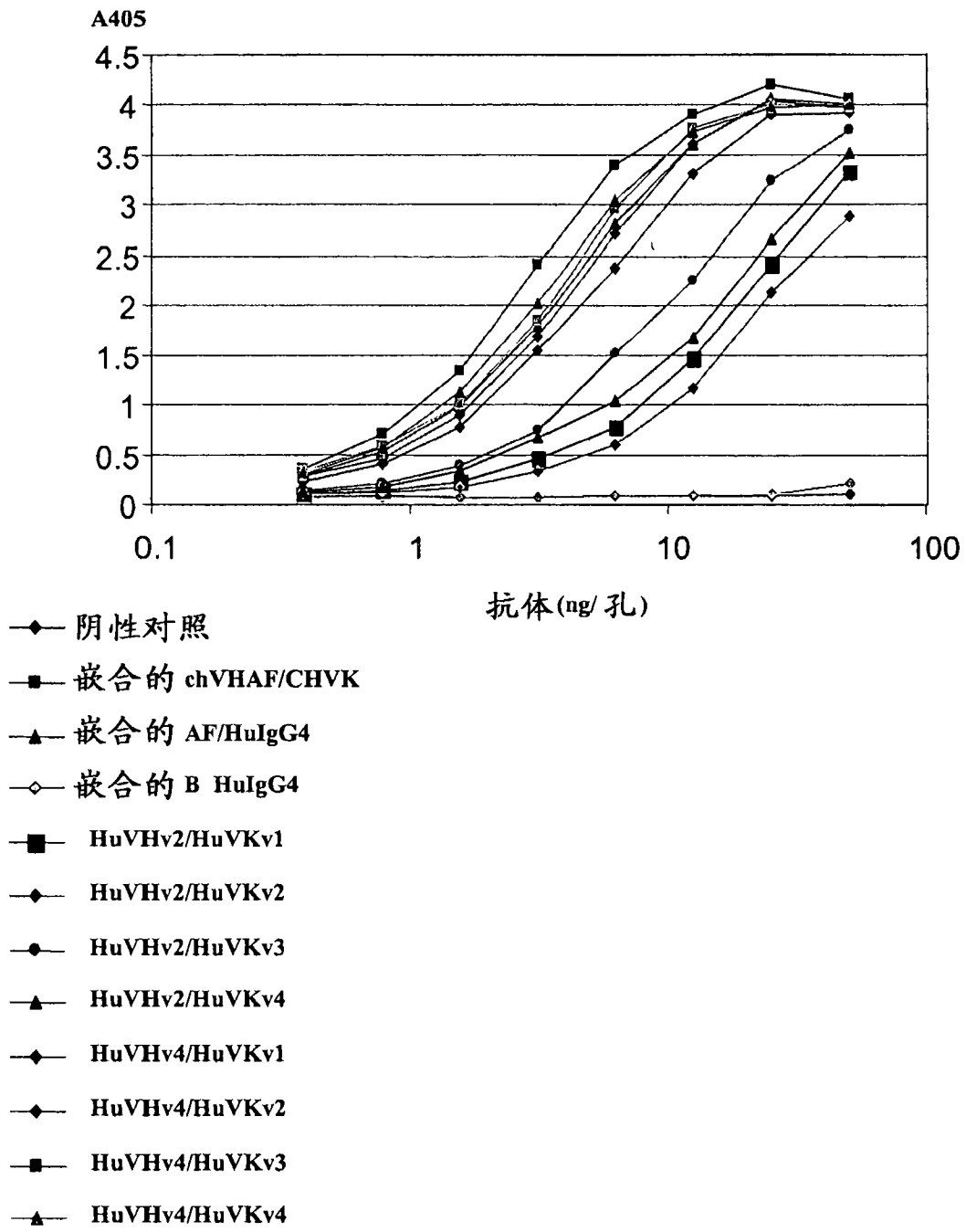


图 4

(实施例 8)

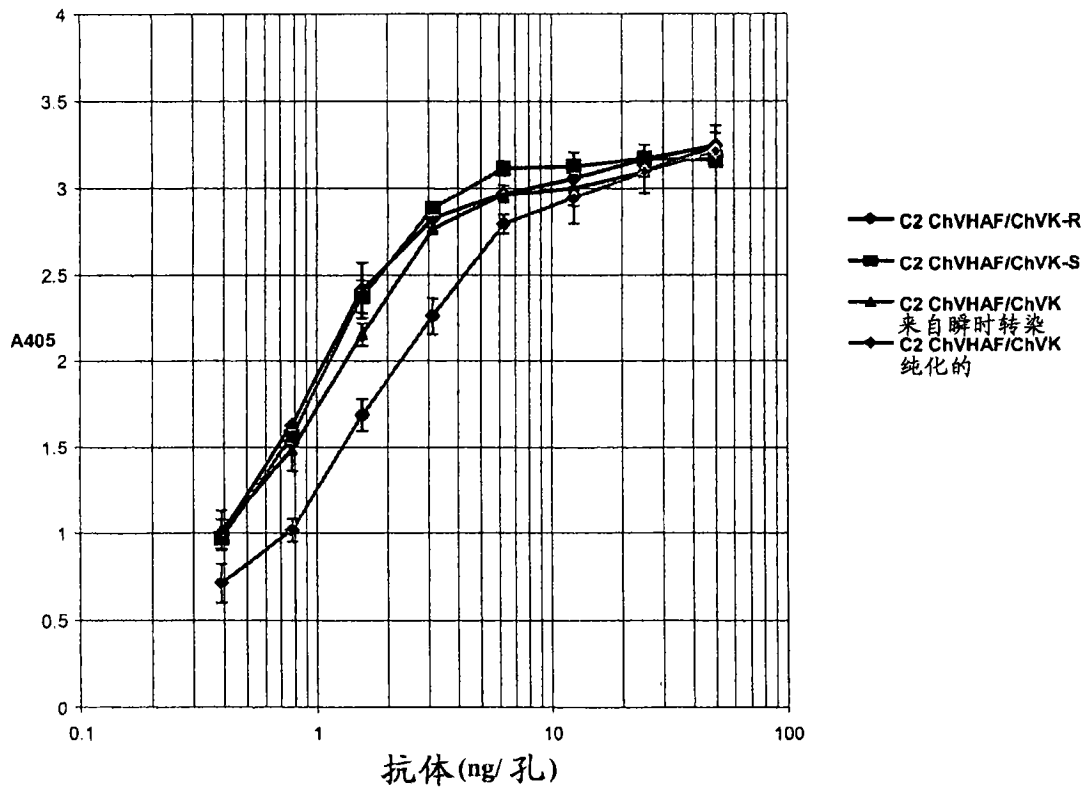


图 5

(实施例 9)

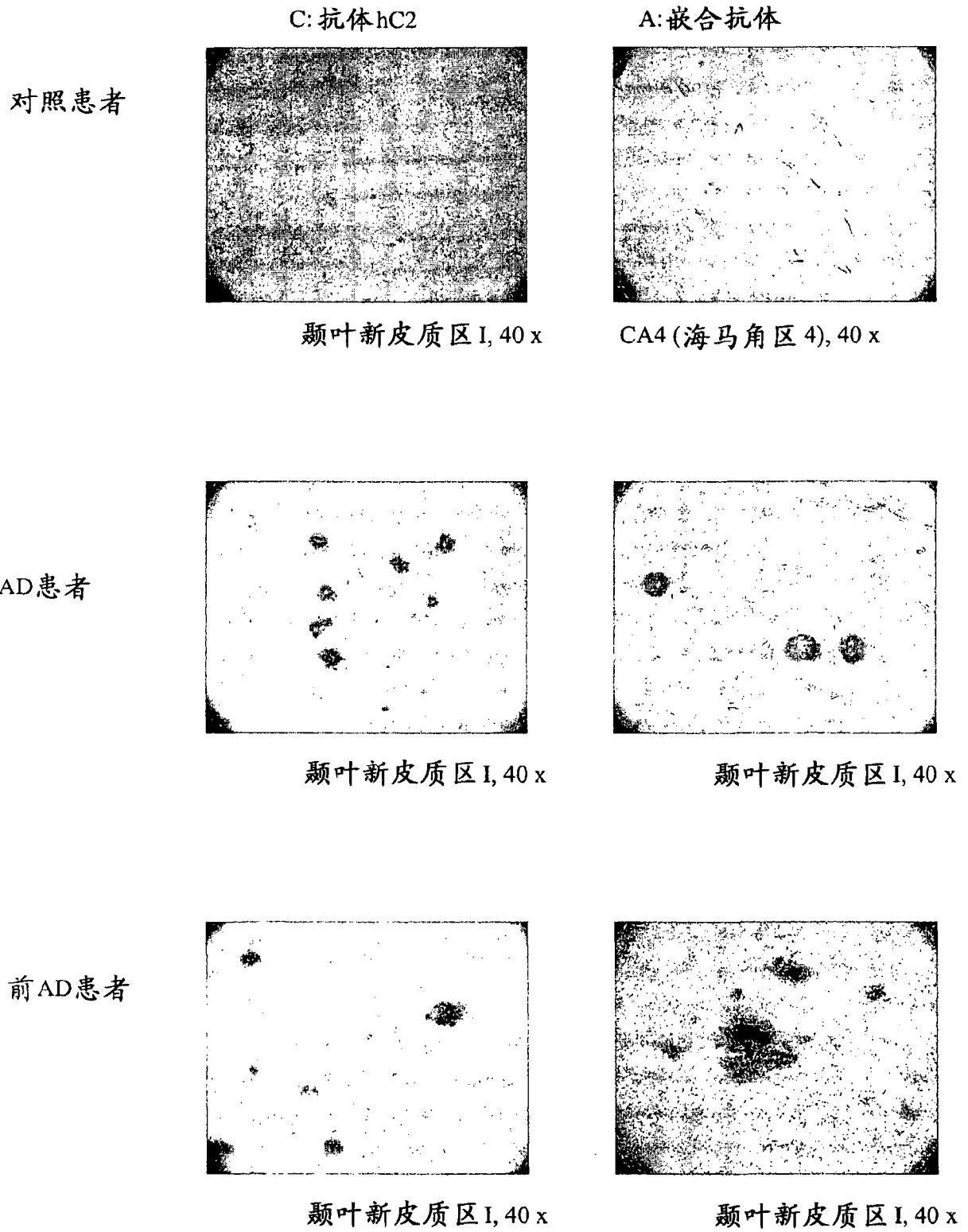
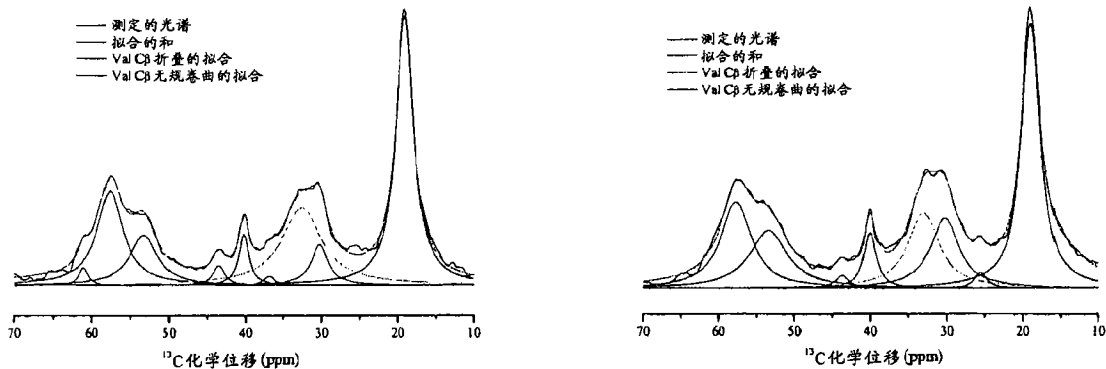


图 6

(实施例 11)

A)



B)

	PBS			小鼠 C2		
	δ ISO (ppm)	FWHH (Hz)	% 积分强度	δ ISO (ppm)	FWHH (Hz)	% 积分强度
Val C β 折叠	32.60	479	81.7	33.09	366	53.5
Val C β 无规卷曲	30.27	200	18.3	30.27	340	46.5

A) 比较与 PBS (左图; 用作对照) 或者 ACI-7-C2 (右图) 孵育 24 小时然后冷冻干燥的 U-¹³C Tyr10 和 Val12 标记的淀粉状蛋白 β 1-42 纤维的 ¹³C CPMAS 光谱并拟合。对 Val12 C β 的两个构象的拟合显示为绿色 (折叠) 和蓝色 (无规卷曲)。在 c33 ppm 处的峰对应于纤维的 β 折叠构象, 而在 30 ppm 处的峰是无规卷曲构象的结果。
 B) 比较 Val 12 C β 的两个构象的拟合参数。这两个构象的拟合的化学位移非常相似, 但积分强度非常不同, 这反映了原始的 β 构象减少约 35% (1 - (53.5/81.7))。这与我们通过荧光测定法获得的值非常紧密地吻合。

图 7

(实施例 12)

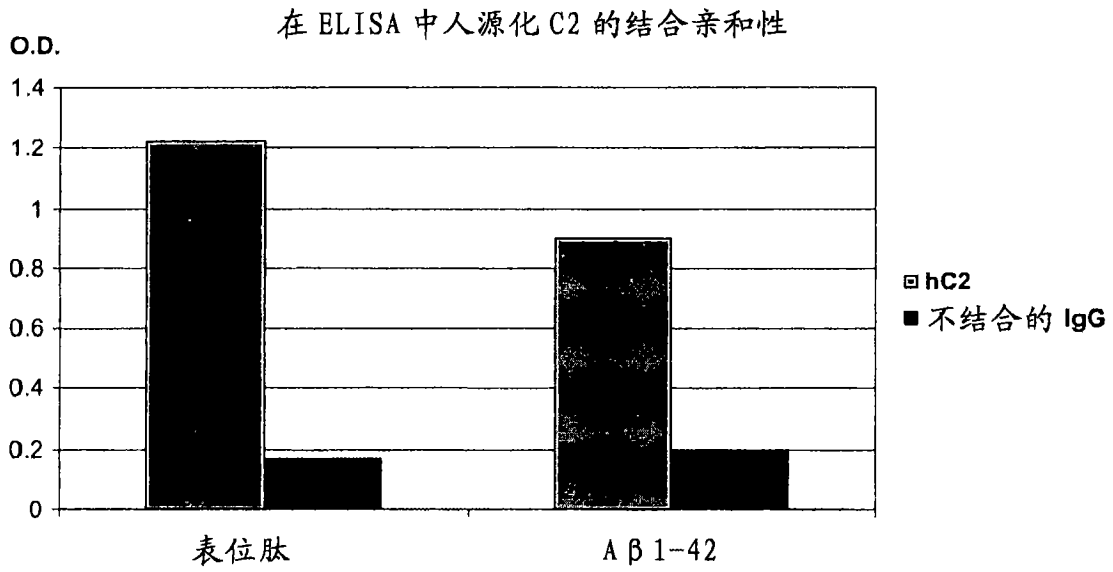


图 8

(实施例 12)

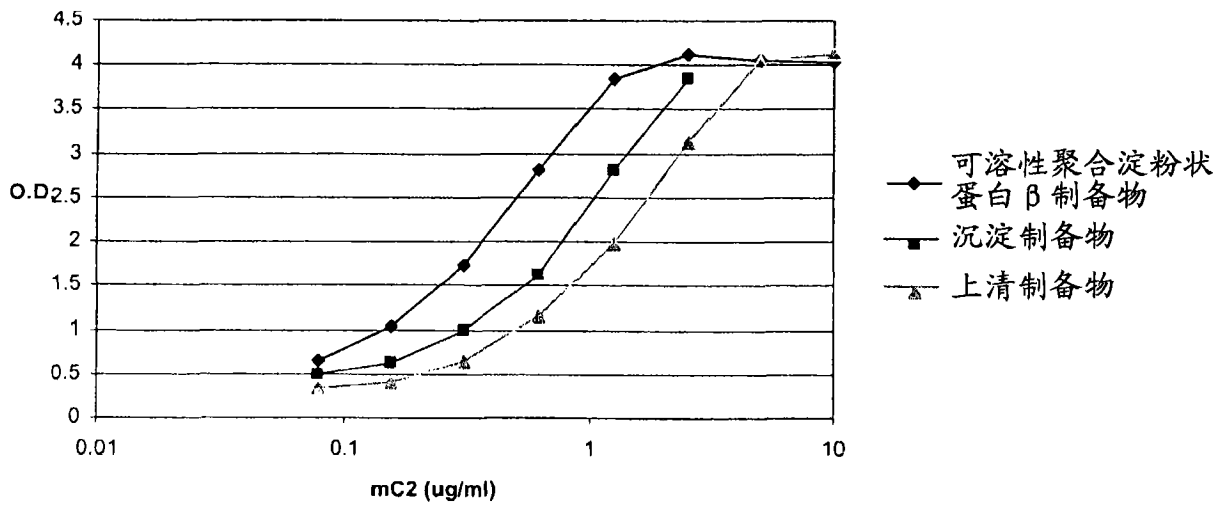


图 9

(实施例 13)

		10	20	30																										
C2VK	D	V	V	M	T	Q	T	P	L	S	L	P	V	S	L	G	D	Q	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	S	L	V
C2HuVK1	D	I	V	M	T	Q	S	P	L	S	L	P	V	T	P	G	E	P	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	S	L	V
C2HuVK2	D	I	V	M	T	Q	S	P	L	S	L	P	V	T	P	G	E	P	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	S	L	V
C2HuVK3	D	I	V	M	T	Q	S	P	L	S	L	P	V	T	P	G	E	P	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	S	L	V
C2HuVK4	D	I	V	M	T	Q	S	P	L	S	L	P	V	T	P	G	E	P	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	S	L	V
dpk15	D	I	V	M	T	Q	S	P	L	S	L	P	V	T	P	G	E	P	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	S	L	L
JK1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		40	50	60																										
C2VK	Y	S	N	G	D	T	Y	L	H	W	Y	L	Q	K	P	G	Q	S	P	K	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	F
C2HuVK1	Y	S	N	G	D	T	Y	L	H	W	Y	L	Q	K	P	G	Q	S	P	Q	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	F
C2HuVK2	Y	S	N	G	D	T	Y	L	H	W	Y	L	Q	K	P	G	Q	S	P	Q	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	F
C2HuVK3	Y	S	N	G	D	T	Y	L	H	W	Y	L	Q	K	P	G	Q	S	P	K	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	F
C2HuVK4	Y	S	N	G	D	T	Y	L	H	W	Y	L	Q	K	P	G	Q	S	P	K	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	F
dpk15	H	S	N	G	Y	N	Y	L	D	W	Y	L	Q	K	P	G	Q	S	P	Q	L	L	I	Y	L	G	S	N	R	A
JK1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		70	80	90																										
C2VK	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	A	E	D	L	G	V
C2HuVK1	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	A	E	D	V	G	V
C2HuVK2	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	A	E	D	V	G	V
C2HuVK3	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	A	E	D	V	G	V
C2HuVK4	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	A	E	D	V	G	V
dpk15	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	A	E	D	V	G	V
JK1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		100	110																											
C2VK	Y	F	C	S	Q	S	T	H	V	P	W	T	F	G	G	G	T	K	L	E	I	K								
C2HuVK1	Y	Y	C	S	Q	S	T	H	V	P	W	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K								
C2HuVK2	Y	F	C	S	Q	S	T	H	V	P	W	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K								
C2HuVK3	Y	Y	C	S	Q	S	T	H	V	P	W	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K								
C2HuVK4	Y	F	C	S	Q	S	T	H	V	P	W	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K								
dpk15	Y	Y	C	M	Q	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	L	Q	T	P								
JK1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	W	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K								

图 10

	10	20	30
C2VHAF	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L K	L S C A A S	G F T F S
C2HuVHAF1	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L	R L S C A A S	G F T F S
C2HuVHAF2	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L	R L S C A A S	G F T F S
C2HuVHAF3	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L	R L S C A A S	G F T F S
C2HuVHAF4	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L	R L S C A A S	G F T F S
DP-54	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L	R L S C A A S	G F T F S
HUJH6	- - - - -	- - - - -	- - - - -

	40	50	60
C2VHAF	S Y G M S W V R Q T P D K R L E L V A	S I N S N G G S T Y Y	
C2HuVHAF1	S Y G M S W V R Q A P G K G L E W V A	S I N S N G G S T Y Y	
C2HuVHAF2	S Y G M S W V R Q A P G K G L E W V A	S I N S N G G S T Y Y	
C2HuVHAF3	S Y G M S W V R Q A P G K G L E L V A	S I N S N G G S T Y Y	
C2HuVHAF4	S Y G M S W V R Q A P G K G L E L V A	S I N S N G G S T Y Y	
DP-54	S Y W M S W V R Q A P G K G L E W V A	N I K Q D G S E K Y Y	
HUJH6	- - - - -	- - - - -	- - - - - Y Y

	70	80	90
C2VHAF	P D S V K G R F T I S R D N A K N T	L Y L Q M S S L K S E D	
C2HuVHAF1	P D S V K G R F T I S R D N A K N S	L Y L Q M N S L R A E D	
C2HuVHAF2	P D S V K G R F T I S R D N A K N S	L Y L Q M N S L R A E D	
C2HuVHAF3	P D S V K G R F T I S R D N A K N S	L Y L Q M N S L R A E D	
C2HuVHAF4	P D S V K G R F T I S R D N A K N S	L Y L Q M N S L R A E D	
DP-54	V D S V K G R F T I S R D N A K N S	L Y L Q M N S L R A E D	
HUJH6	- - - - -	- - - - -	- - - - -

	100	110
C2VHAF	T A M Y Y C A S G D Y W G Q G S T L T V S S	
C2HuVHAF1	T A V Y Y C A R G D Y W G Q G T T V T V S S	
C2HuVHAF2	T A V Y Y C A S G D Y W G Q G T T V T V S S	
C2HuVHAF3	T A V Y Y C A R G D Y W G Q G T T V T V S S	
C2HuVHAF4	T A V Y Y C A S G D Y W G Q G T T V T V S S	
DP-54	T A V Y Y C A R	
HUJH6	- - - Y Y Y G M - D V W G Q G T T V T V S S	

图 11

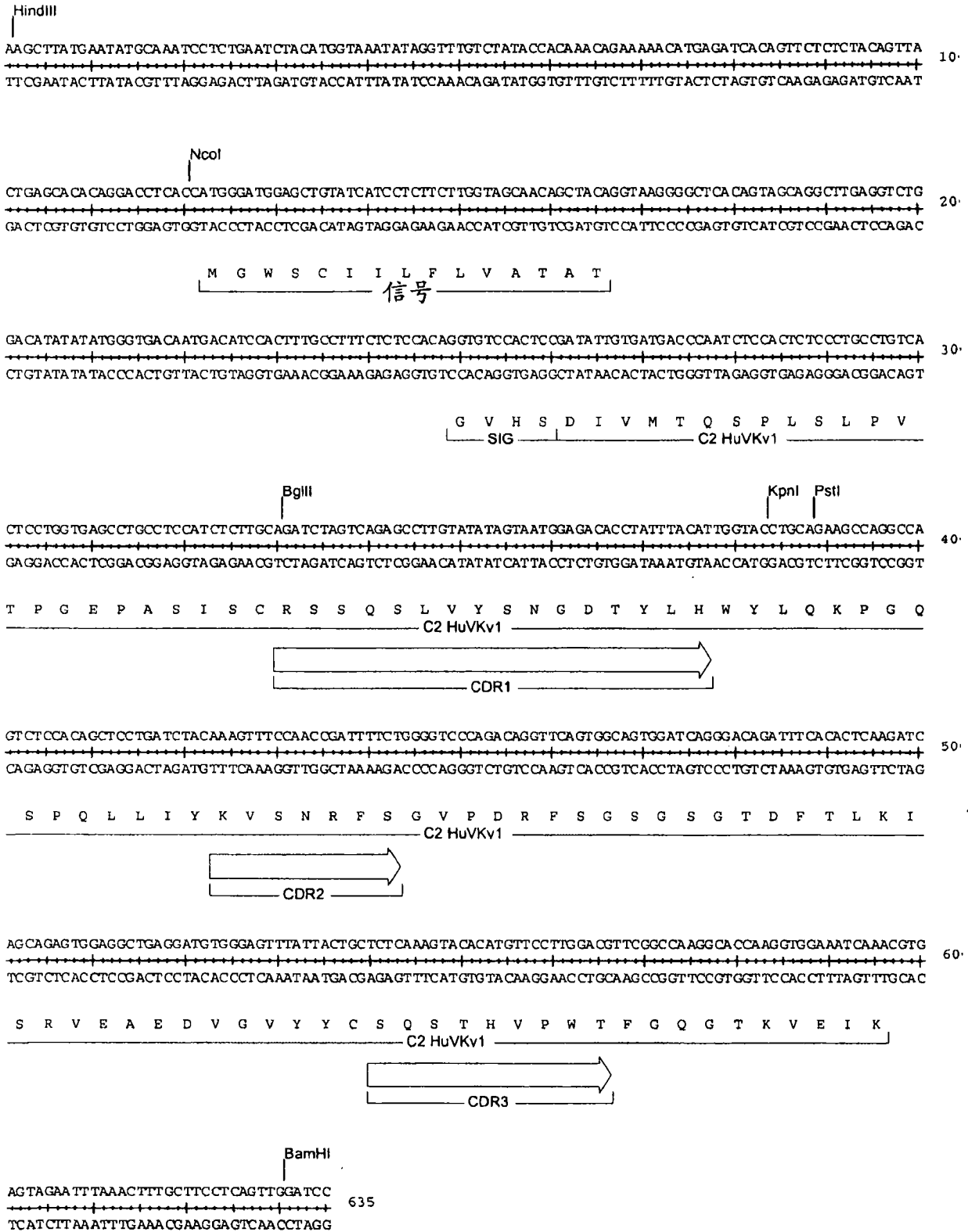


图 12

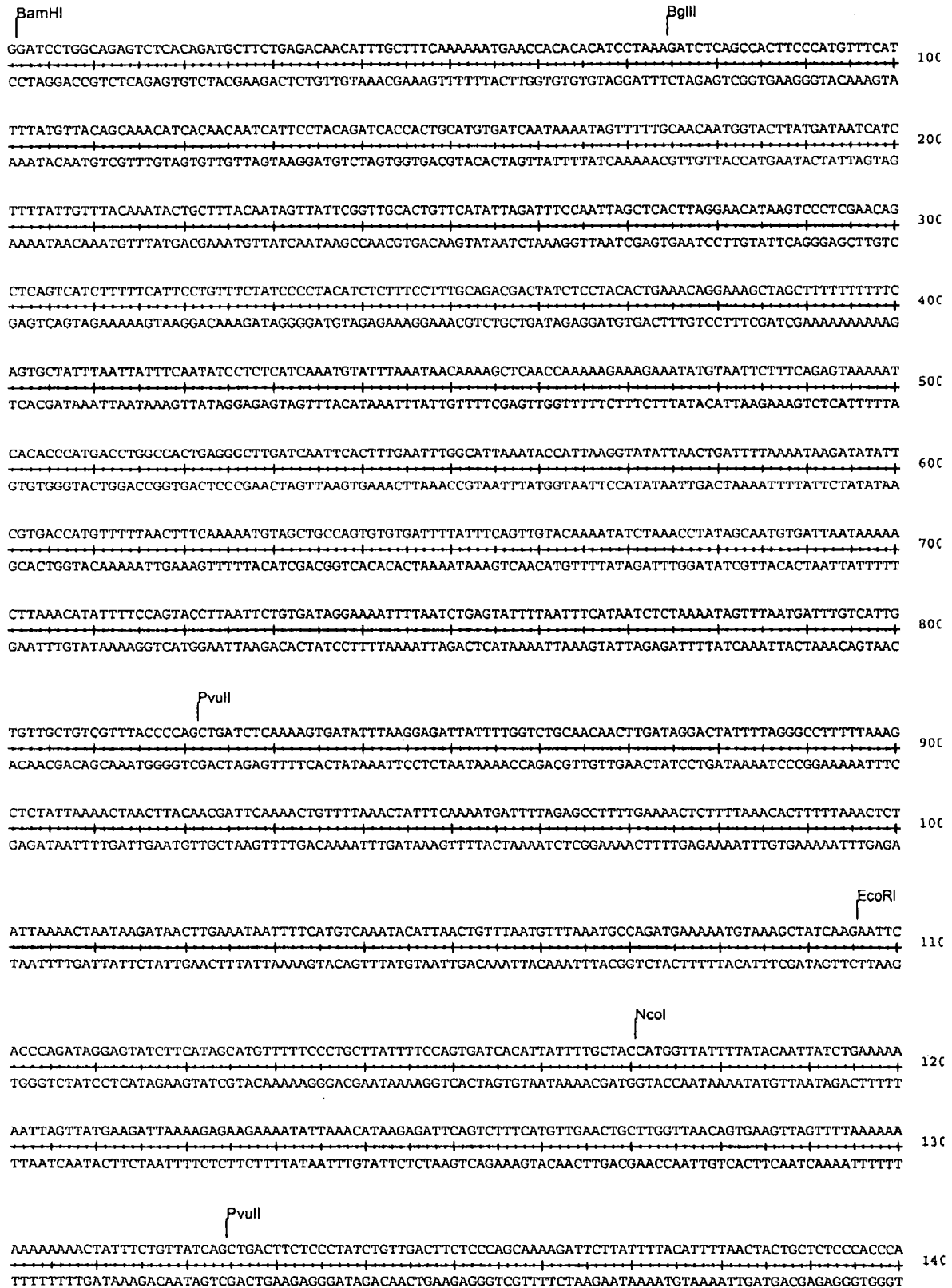


图 13-1

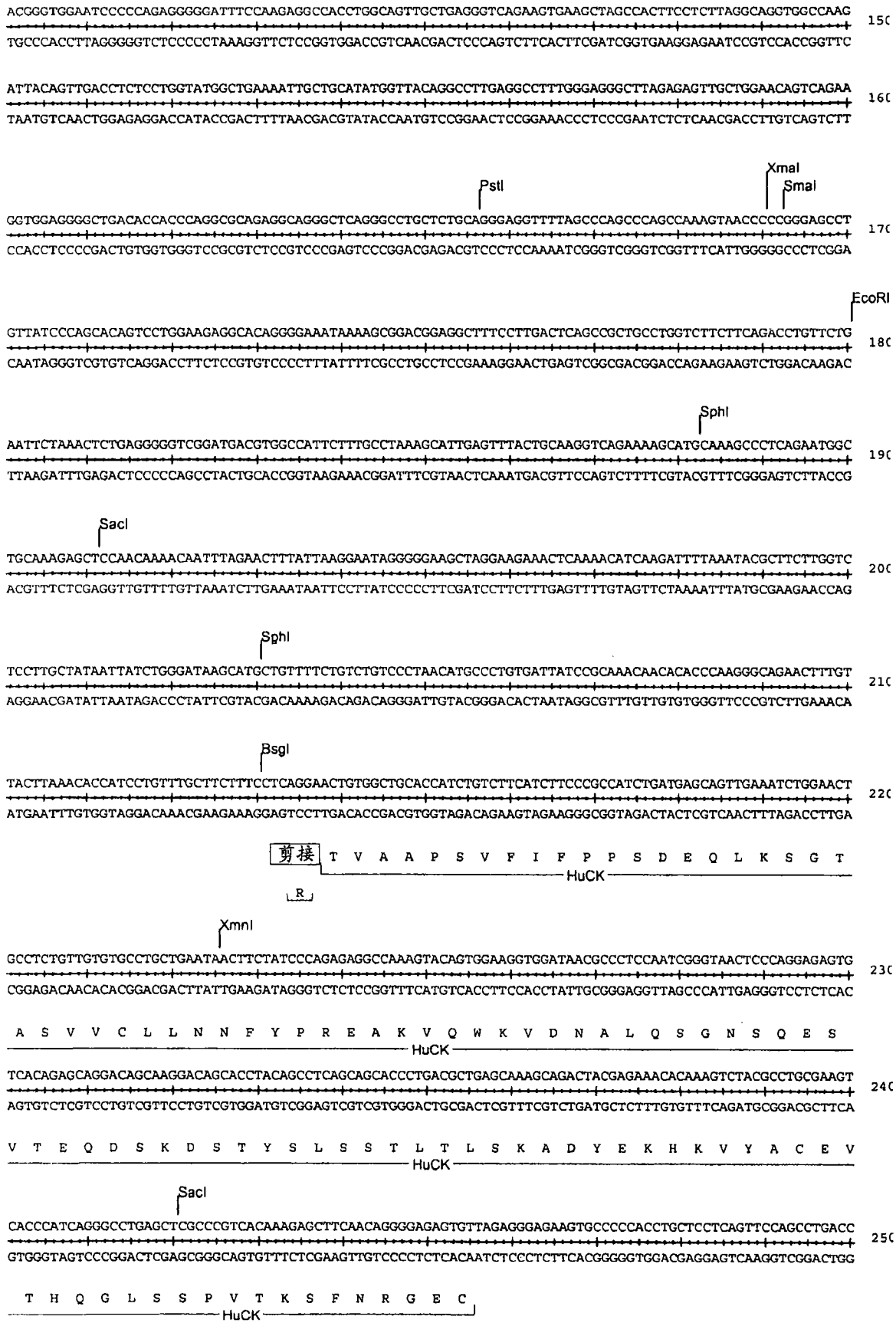


图 13-2

CCCTCCCATCCTTTGGCCTCTGACCCTTTTCCACAGGGGACCTACCCCTATTGCGGTCTCCAGCTCATCTTTCACCTCACCCCTCCTCCTCTGG 26C
GGGAGGGTAGAAACCGGAGACTGGGAAAAAGGTGTCCCTGGATGGGATAACGCCAGGAGGTCGAGTAGAAAAGTGGAGTGGGGGAGGAGGAGAAAC

CTTTAATTATGCTAATGTTGGAGGAGAATGAATAAATAAGTGAATCTTTCACCTGTGGTTTCTCTCTTCCCTCATTTAATAATTATTATCTGTTGTTT 27C
GAAATTAATACGATTACAACCTCCTCTACTTATTTATTTCACTTAGAAAACGTGGACACCAAAAGAGAGAAAAGGAGTAAATTAATAATAGACAAACAA

TACCAACTACTCAATTTCTCTTATAAGGGACTAAATATGTAGTCATCCTAAGGCGCATAACCATTTATAAAAAATCATCCTTCATTCTATTTACCCATC 28C
ATGGTTGATGAGTTAAAGAGAATATCCCTGATTTATACATCAGTAGGATTCCGCGTATTGGTAAATATTTTAGTAGGAAGTAAGATAAAATGGGATAG

NcoI

ATCCTCTGCAAGACAGTCTCCCTCAAACCCACAAGCCTTCTGTCTCACAGTCCCCTGGGCCATGGTAGGAGAGACTTGCTTCTTGTTTCCCTCCT 29C
TAGGAGACGTTCTGTGAGGAGGGAGTTTGGGTGTTCCGAAGACAGGAGTGTCAAGGGACCCGGTACCATCCTCTCTGAACGAAGGAACAAAAGGGGAGGA

CAGCAAGCCCTCATAGTCCTTTTAAGGGTGACAGGCTTACAGTCATATATCCTTTGATTCAATCCCTGAGAATCAACCAAAGCAAATTTTCAAAG 30C
GTCGTTCCGGAGTATCAGGAAAAATCCCCTGTCCAGAATGTGAGTATATAGGAACTAAGTTAAGGGACTCTAGTTGGTTTCGTTTAAAAAGTTTTC

AAGAAACCTGCTATAAGAGAATCAATTCATGCAACATGATATAAAATAACAACACAATAAAAGCAATTAAATAACAAACAATAGGGAAATGTTTAAAGT 31C
TTCTTTGACGATATTTCTCTTAGTAAGTAACGTTGTAATAATTTTATGTTGTTGTTATTTTCGTTAATTTAATTGTTTGTATCCCTTACAAATTC

TCATCATGGTACTTAGACTTAAAGGAATGTCATGCCTTATTTACATTTTTAAACAGGACTGAGGGACTCCTGTCTGCCAAGGGCCGTATGAGTACTTT 32C
AGTAGTACCATGAATCTGAATTACCTTACAGTACGGAATAAATGTAAAAATTTGTCCATGACTCCCTGAGGACAGACGGTCCCGGCATAACTCATGAAA

CCACAACCTAATTTAATCCACACTATACTGTGAGATAAAAACATTCATTAATAATGTTGCAAGGTTCTATAAGCTGAGAGACAAATATATTCTATAAC 33C
GGTGTGGAATAAATTAGGTGTGATAGCACTCTAATTTTGTAAAGTAATTTTACAACGTTTCCAAGATATTCGACTCTCTGTTTATATAAGATATTG

XbaI

TCAGCAATCCCCTCTAGATGACTGAGTGTCCCACCCACCAAAAACTATGCAAGAATGTTCAAAGCAGCTTATTTTCAAAGCCAAAAATTGGAAA 34C
AGTCGTTAGGGTGAAGATCTACTGACTCACAGGGTGGTGGTTTTTTGATACGTTCTTACAAGTTTCGTCGAAATAAATGTTTTCGGTTTTTAACTTTT

TAGCCCGATGTCACCAATAGAAATGAGTTATTAACTGTGGTATGTTTATACATTAGAATACCAATGAGGAGAATTAACAAGCTACAACATACCTAC 35C
ATCGGGCTAACAGGTTGTTATCTTACTCAATAATTGACACCATACAAAATATGTAATCTTATGGGTTACTCCTCTAATGTTTCGATGTTGATATGGATG

TCACACAGATGAATCTCATAAAAAATAATGTACATAAGAGAACTCAATGCAAAAGATATGTTCTGTATGTTTTTCATCCATATAAGTTCAAACCCAGGT 36C
AGTGTGCTACTTAGAGTATTTTATTACAATGATTCTCTTTGAGTTACGTTTCTATACAAGACATACAAAAGTAGGTATATTTCAAGTTTTGGTCCA

AAAAATAAGTTAGAAAATTTGGATGGAATACTCTTAGCTGGGGTGGGCGAGTTAGTGCCTGGGAGAAGACAAGAAGGGGCTTCTGGGGTCTTGGTAA 37C
TTTTTATTTCAATCTTTAAACCTACCTTAAATGAGAAATCGACCCCAACCGCTCAATCAGGACCCCTCTCTGTTCTTCCCGAAGACCCAGAACCATT

BspI

TGTTCTGTTCCCTCGTGTGGGGTGTGCACTTATGATCTGTGACTGTTCTGTATACACATATGCTTCAAATAACTTCACATAAAGAACATCTTATACC 38C
ACAAGACAAGGAGCACACCCCAACCGTCAATACTAGACACGTCACAAGACATATGTTGTAATACGAAGTTTATTGAAGTGTATTTCTGTAGAATATGG

PvuII

CAGTTAATAGATAGAAGGGAATAAGTAATAGTCAAGACCATGCAGCTGGTAAGTGGGGGGCCCTGGGATCAAATAGCTACCTGCCTAATCTGCCTC 39C
GTCAAATATCTATCTTCTCTTATTCATTATCCAGTCTGTTGACGTCGACCATTCACCCCCCGGACCTAGTTTATCGATGGACGGATTAGGACGGGAG

图 13-3

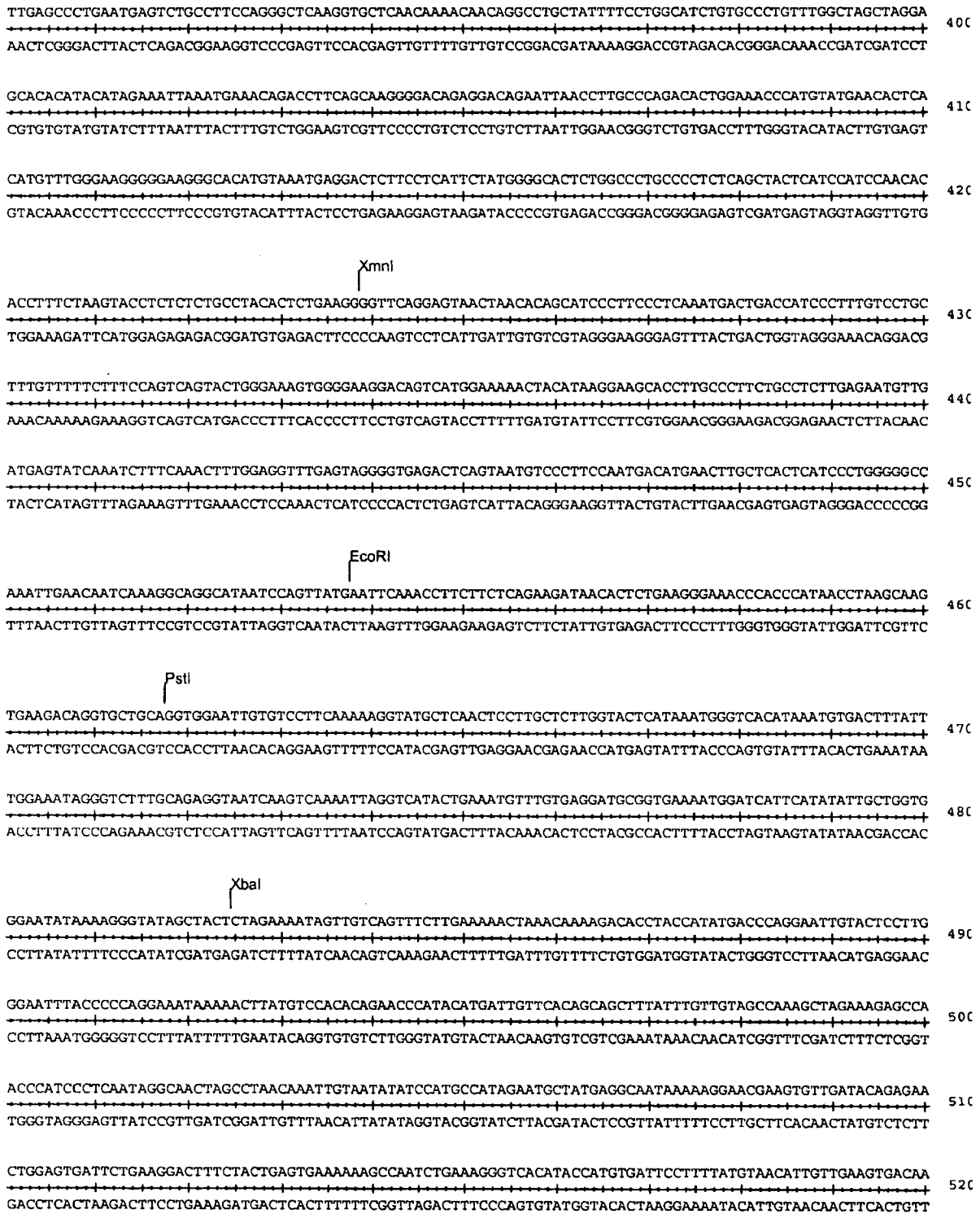


图 13-4

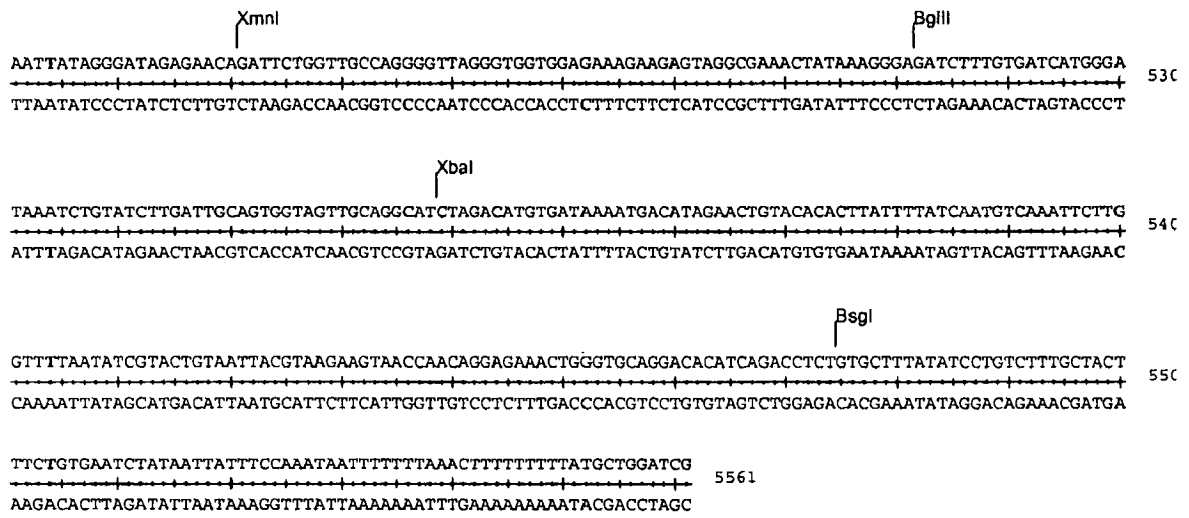


图 13-5

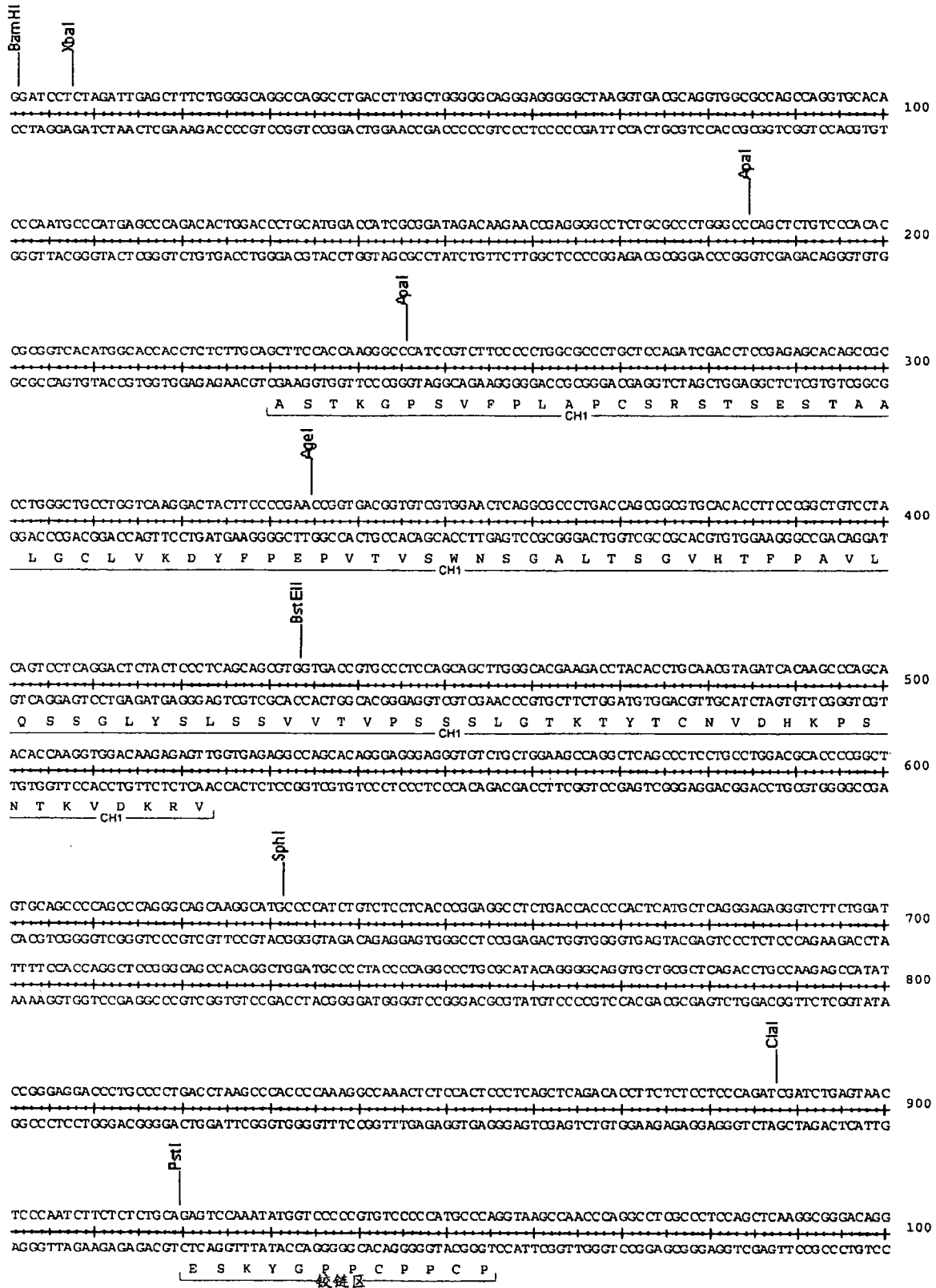


图 14-1

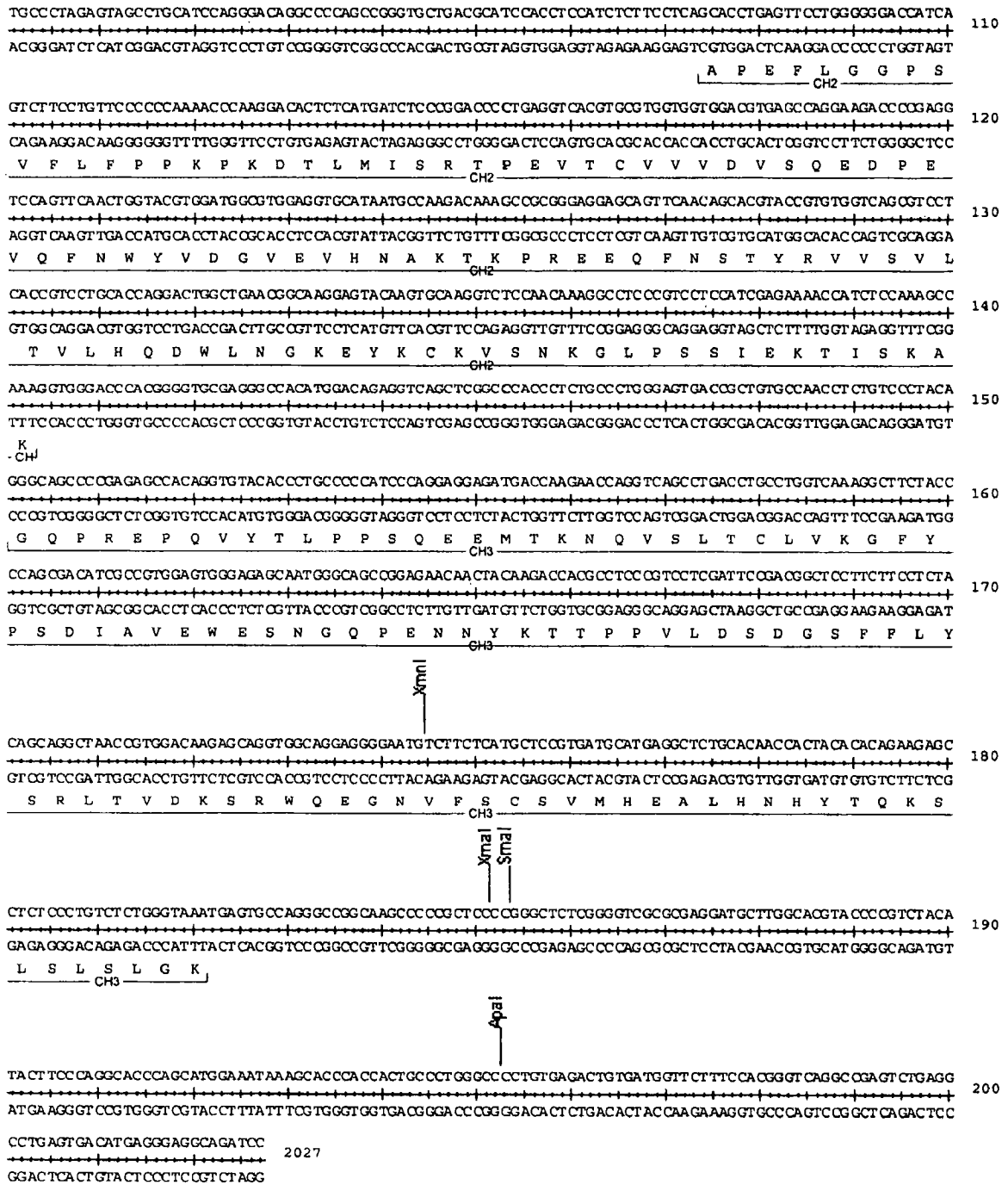


图 14-2

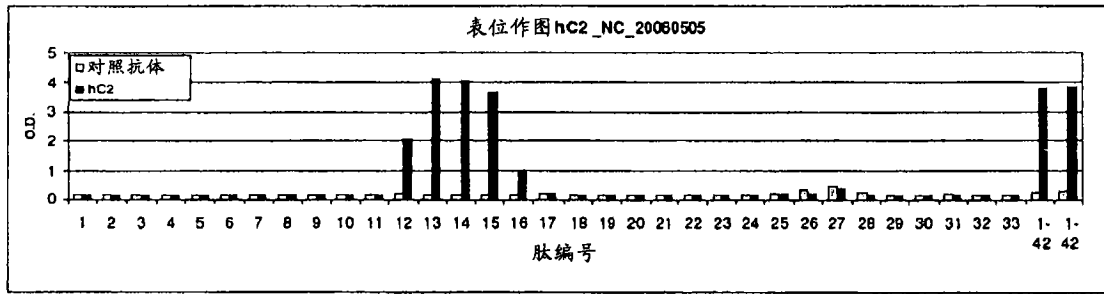


图 1 hC2 结合至 Aβ 1-42 肽文库的肽 12、13、14、15 和 16。
hC2 与 Aβ 1-42 的重叠肽的结合通过 ELISA 分析。与全长的 Aβ 1-42 的结合和不结合的嵌合抗体（对照抗体）的结合分别用作阳性对照和阴性对照。肽编号对应于在 Aβ 1-42 序列中肽起始的氨基酸。

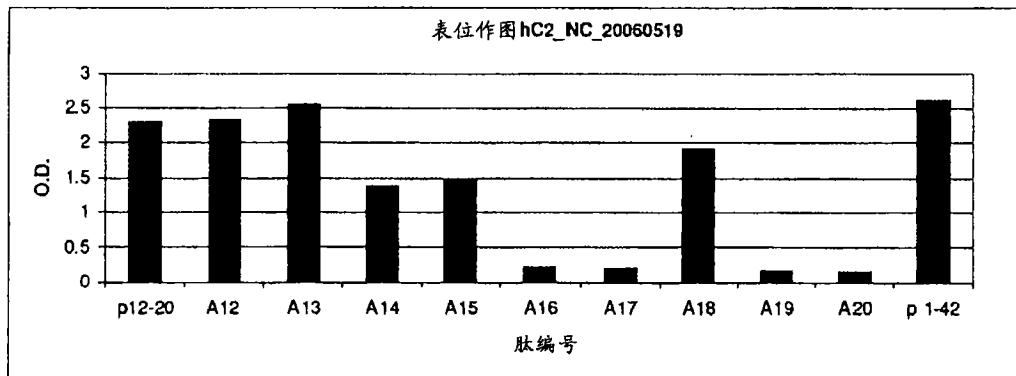


图 2 hC2 结合至 Aβ 12-20 完全取决于第 16、17、19 和 20 位氨基酸，并部分取决于第 14、15 和 18 位氨基酸。
hC2 与 Aβ 12-20 的结合和与丙氨酸替代的 Aβ 12-20 的结合通过 ELISA 分析。与全长的 Aβ 1-42 的结合用作阳性对照。编号对应于被丙氨酸替代的氨基酸。结果表示为 OD。

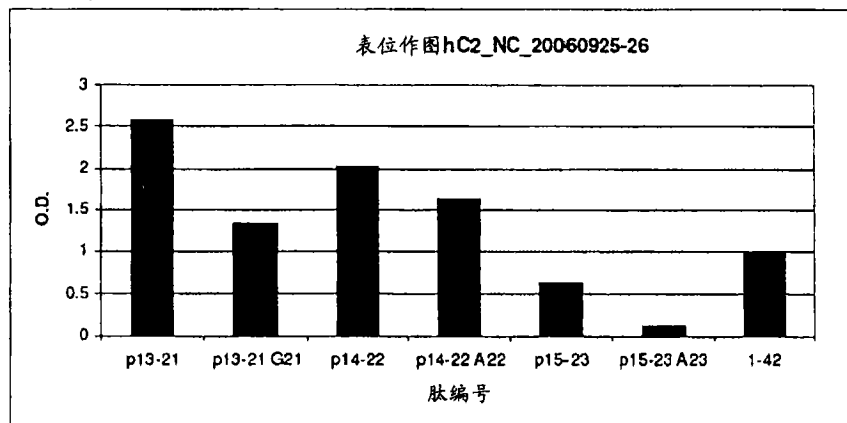


图 3 hC2 结合至 Aβ 15-23 取决于第 23 位氨基酸，并部分取决于第 21 位氨基酸，并轻微取决于第 22 位氨基酸。
hC2 与 Aβ 13-21、14-22、或 15-23 的结合和与 13-21G21、14-22A22、或 15-23A23 的结合通过 ELISA 分析。与全长的 Aβ 1-42 的结合用作阳性对照。结果表示为 OD。

图 15

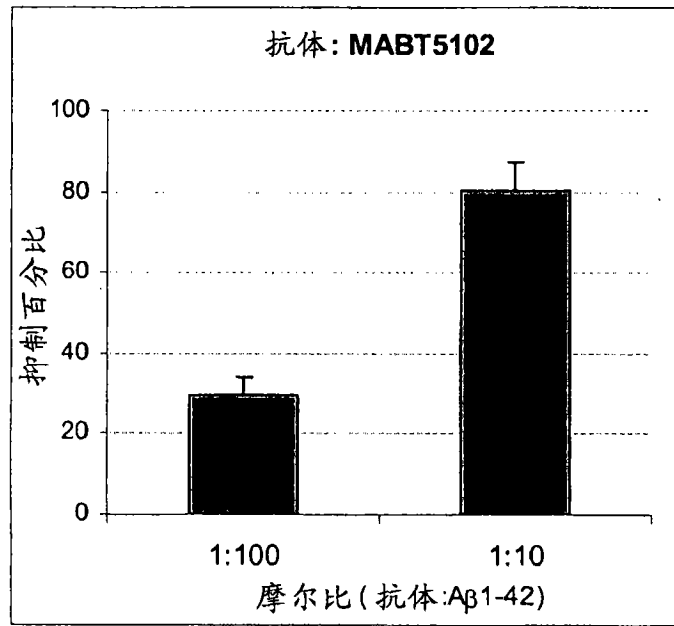


图 16

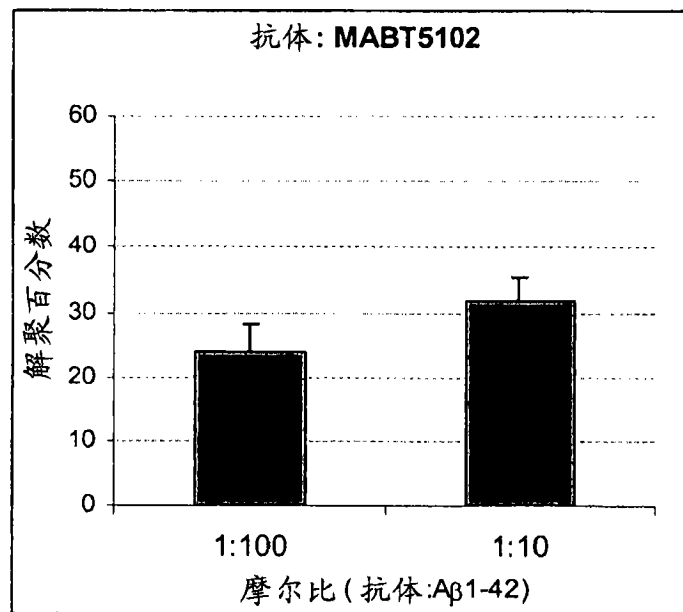


图 17

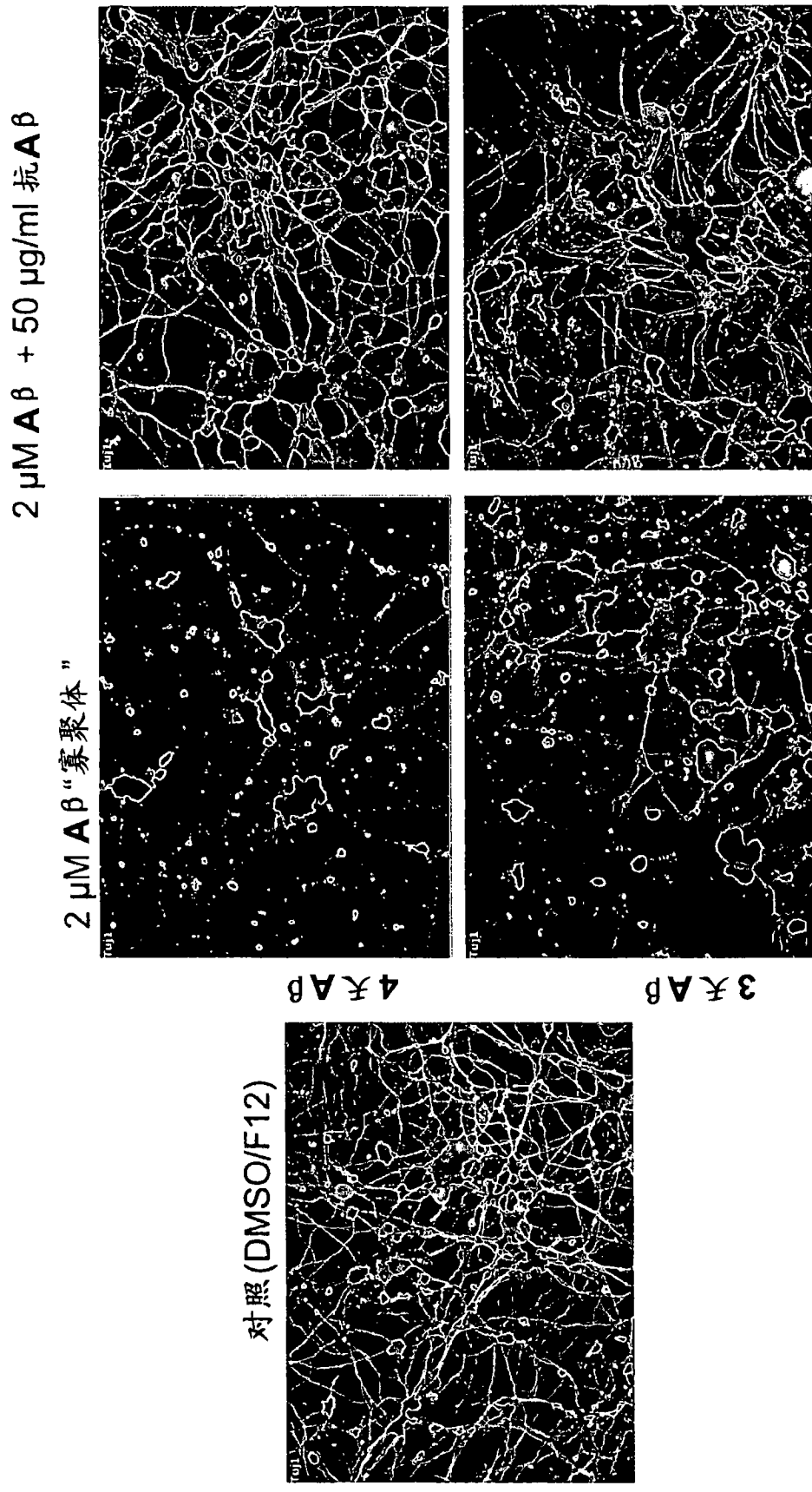


图 18

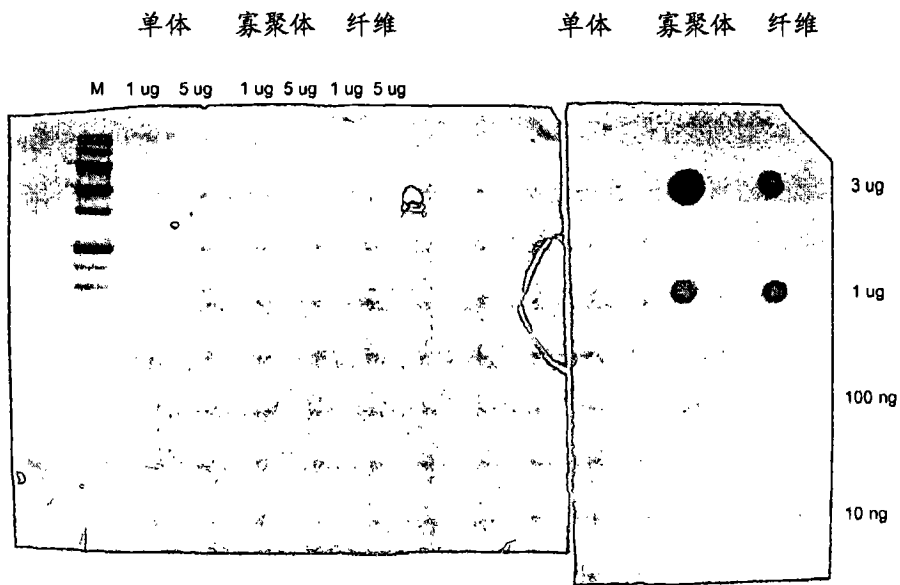


图 19a

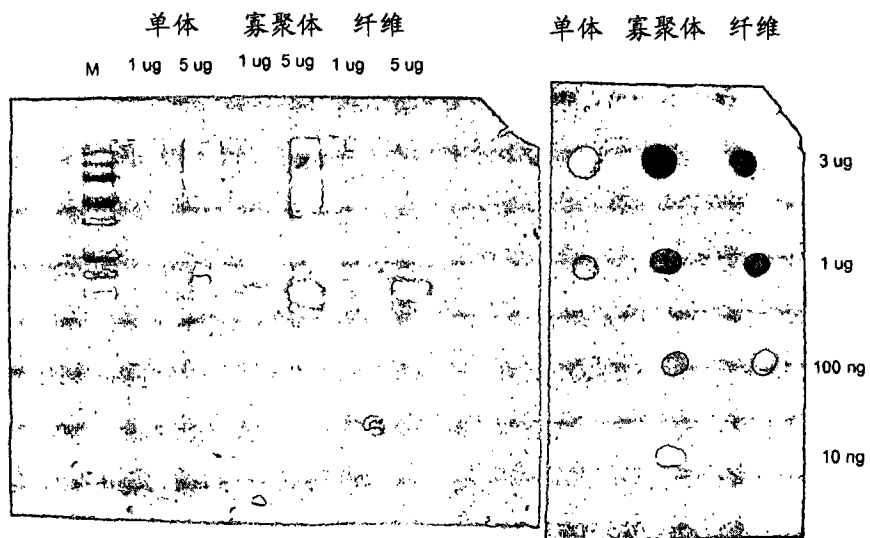


图 19b

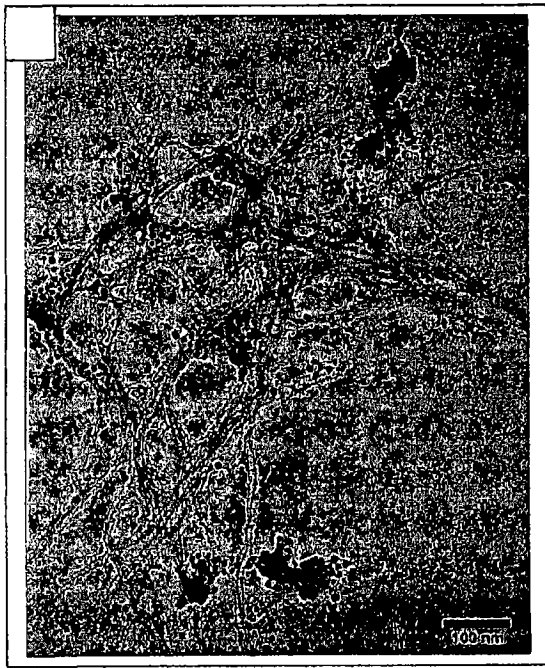


图 20a

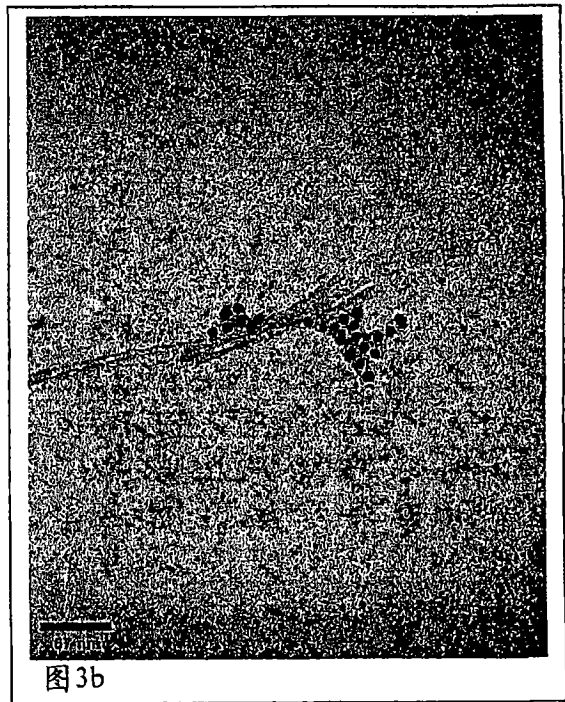
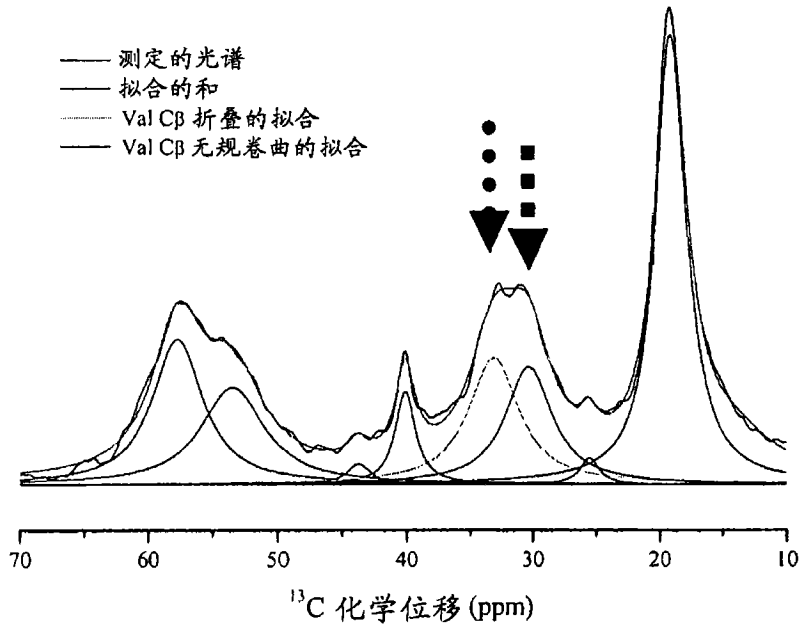
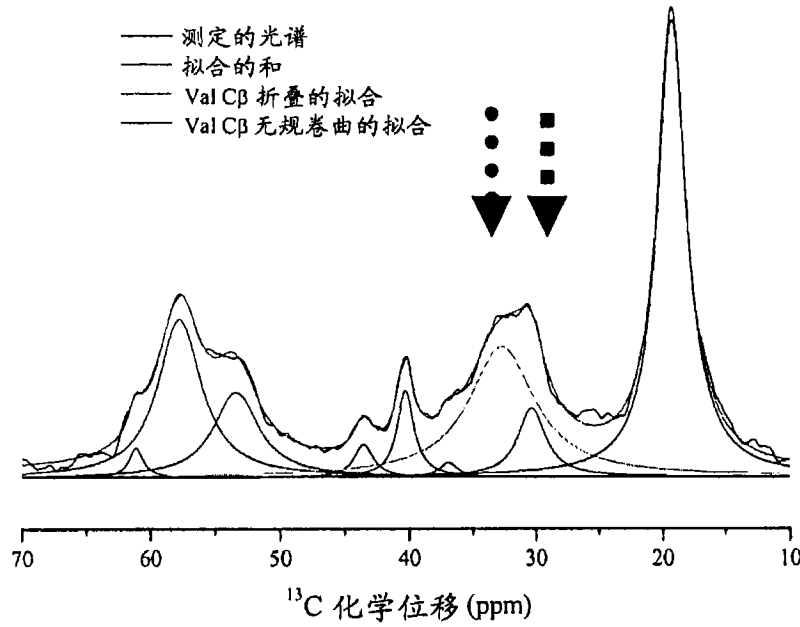


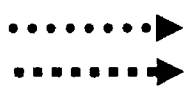
图 20b



对照



ACI-01-Ab7



^{13}C 标记的 Val12 的 β 折叠的拟合

^{13}C 标记的 Val12 的 无规卷曲的拟合

图 21