



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103539857 A

(43) 申请公布日 2014. 01. 29

(21) 申请号 201310338011. 6

C12P 21/02 (2006. 01)

(22) 申请日 2007. 03. 27

(30) 优先权数据

60/787, 588 2006. 03. 30 US

(62) 分案原申请数据

200780012436. 0 2007. 03. 27

(71) 申请人 葛兰素集团有限公司

地址 英国梅得塞克斯

(72) 发明人 S. A. 伯比奇 J. H. 艾利斯

S. K. 福德 V. 格尔马谢夫斯基

U. 库马 K. L. 菲尔波特 P. E. 索登

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 李慧惠 李炳爱

(51) Int. Cl.

C07K 16/18 (2006. 01)

C07K 16/46 (2006. 01)

A61K 39/395 (2006. 01)

A61P 25/28 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书44页

序列表19页

(54) 发明名称

针对 β -淀粉样蛋白肽的抗体

(57) 摘要

结合人类 β -淀粉样蛋白肽的抗体, 使用所述抗体治疗特征在于提高的 β -淀粉样蛋白水平或 β -淀粉样沉淀的疾病或失调的方法, 包含所述抗体的药物组合物和制造方法。

1. 一种治疗性抗体,其是抗体或抗原结合片段和/或其衍生物,其结合 β -淀粉样蛋白肽,并且其包含以下 CDR:

CDRH1:DNGMA (SEQ ID No:1)

CDRH2:FISNLAYSIDYADTVTG (SEQ ID No:2)

CDRH3:GTWFAY (SEQ ID No:3)

处在来源于 VH3 基因家族的人类重链可变区之内,和:

CDRL1:RVSQSLLSNGYTYLH (SEQ ID No:4)

CDRL2:KVSNRFS (SEQ ID No:5)

CDRL3:SQTRHVPYT (SEQ ID No:6)

处在来源于 GenPept 条目 CAA51135 中公开的氨基酸序列的人类轻链可变区 (SEQ ID NO:24) 之内。

2. 根据权利要求 1 的治疗性抗体,其中所述抗体或抗原结合片段和/或其衍生物以低于 100pM 的平衡常数 KD 结合 β -淀粉样蛋白肽 1-12 (SEQ ID NO:15),具有的与 β -淀粉样蛋白肽 2-13 (SEQ ID NO:44) 的结合的平衡常数 KD,1000 倍大于与肽 1-12 (SEQ ID NO:15) 的结合的平衡常数,两种测定都在利用在链霉抗生物素蛋白芯片上捕获的肽的表面等离子共振分析中进行。

3. 根据权利要求 1 的治疗性抗体,其中所述抗体或抗原结合片段和/或其衍生物以低于 10nM 的平衡常数 KD 结合 β -淀粉样蛋白肽 1-40,具有的与 β -淀粉样蛋白肽 2-13 (SEQ ID NO:44) 的结合的平衡常数 KD,1000 倍大于与肽 1-12 (SEQ ID NO:15) 的结合的平衡常数,这些测定在利用 Biocore™3000 的表面等离子共振分析中进行,其中所述抗体首先在 CM5 生物传感器芯片的蛋白 A 表面捕获到 1000-2500 共振单位的水平,已在 HBS-EP 缓冲液中稀释的 β -淀粉样蛋白 1-40、2-13 或 1-12 以 4-500nM 的浓度范围流过捕获的抗体表面 (即实施例的方法 B)。

4. 根据权利要求 1、2 或 3 的治疗性抗体,其中所述人类重链可变区来源于:

- 选自以下 VH3 家族成员的子集的 V 基因:VH3-48、VH3-21、VH3-11、VH3-7、VH3-13、VH3-74、VH3-64、VH3-23、VH3-38、VH3-53、VH3-66、VH3-20、VH3-9& VH3-43

- 选自以下 VH3 家族成员的子集的 V 基因:VH3-48、VH3-21&VH3-11

- VH3-48 基因

或其等位基因。

5. 根据权利要求 4 的治疗性抗体,其中所述人类接受体重链框架与框架 4 一同来源于 M99675 (SEQ ID NO:21)。

6. 根据权利要求 5 的治疗性抗体,其中框架 4 序列是由人类 JH4 迷你基因 (Kabat) 编码的:

YFDYWGQGLVTVSS (SEQ ID No:23)

其中属于 CDR3 区域的开始的四个残基被来自供体抗体的引入的 CDR 替换。

7. 根据权利要求 6 的治疗性抗体,其含有根据在具有序列 SEQ IDNO:17 的供体 VH 结构域和具有序列 SEQ ID NO:19 的 VL 结构域中存在的相应残基的、维持供体抗体对 β -淀粉样蛋白肽的所有的或基本上所有的结合亲和性的一个或多个氨基酸残基替换。

8. 根据权利要求 7 的治疗性抗体,其中来源于 M99675 和 JH4 的人类接受体重链框架含

有选自位置 24、48、93 和 / 或 94 (Kabat 编号) 的一到四个氨基酸残基替换。

9. 根据权利要求 8 的治疗性抗体,其中人类接受体重链框架包含以下的残基(或其保守性替换):

(i)

位置	残基
93	V
94	S

或

(ii)

位置	残基
24	V
93	V
94	S

或

(iii)

位置	残基
48	I
93	V
94	S

10. 根据任何前述权利要求的治疗性抗体,其是 IgG1 同种型。

11. 根据任何前述权利要求的治疗性抗体,其基本上缺乏 a) 通过经典途径的补体的活化;和 b) 调节抗体依赖性细胞毒性的功能。

12. 根据权利要求 10 的治疗性抗体,其中残基 235 和 237 已经被突变成丙氨酸。

13. 一种包含根据任一前述权利要求的治疗性抗体的药物组合物。

14. 权利要求 1 到 12 的任一项的治疗性抗体,用于治疗 β 淀粉样蛋白肽相关疾病。

15. 用于制备权利要求 1 到 12 的任一项的治疗性抗体的方法,其中所述方法包括在宿主细胞中表达编码所述抗体的多核苷酸。

针对 β -淀粉样蛋白肽的抗体

[0001] 本申请为申请号为 200780012436.0 的分案申请,要求 2006 年 3 月 30 日的优先权。

发明领域

[0002] 本发明涉及结合 β -淀粉样蛋白肽、特别是人类 β -淀粉样蛋白肽的抗体。本发明还涉及用所述抗体治疗特征是提高了 β -淀粉样蛋白水平或 β -淀粉样沉淀,特别是阿尔茨海默氏病的疾病或失调的方法,包含所述抗体的药物组合物以及制造的方法。根据以下的描述,本发明的其他方面将变得明显。

[0003] 发明背景

[0004] 阿尔茨海默氏病(AD)是年龄相关的认知下降的最常见原因,在世界范围内影响超过 1 千 2 百万人(Citron M(2002)Nat. Neurosci5, Suppl1055-1057)。疾病的最早的阶段特征在于伴有相关的认知下降和语言及行为缺陷的渐进性的记忆丧失。在疾病的较晚阶段,患者发生全局的健忘症,并具有大大地降低的运动机能。死亡一般在诊断后 9 年发生,通常与其他状况,一般是肺炎相关(Davis K.L. and Samules S.C. (1998)in Pharmacological Management of Neurological and Psychiatric Disorders eds Enna S.J. and Coyle J.T. (McGraw-Hill, New York pp267-316))。当前的治疗代表了症状性的方法,集中于减轻认知损伤和改善与进展的疾病病因相关的行为症状。实际上,这些治疗仅提供了短暂的认知益处,报道的认知损伤的水平仅维持达 2 年。减缓并可能停止病发展的疾病修饰治疗的潜力是巨大的。这种方法将提供对患者、特别是他们的护理者的生活质量的巨大的和持续的改善,以及降低这种疾病的巨大的总体护理成本。

[0005] 阿尔茨海默氏病的临床诊断是基于生理和心理测试的组合,其将产生可能的或大概的阿尔茨海默氏病的诊断结论。在死后,通过良好地表征脑中的神经病学标志来确认疾病,其包括实质斑块和脑血管中 $A\beta$ 的沉积,神经纤丝缠结的神经内形成,突触损失和特定脑区域中的神经元亚群的损失。(Terry, RD (1991) J Neural Trans Suppl53:141-145)。

[0006] 大量的遗传学的、组织学和功能证据表明 β -淀粉样蛋白肽($A\beta$)是阿尔茨海默氏病发展的关键(Selkoe, D. J. (2001) Physiological Reviews81:741-766)。

[0007] $A\beta$ 已知通过 β -淀粉样蛋白前体蛋白(也称为 APP)被称为 BACE1 的天冬氨酰蛋白酶(也称为 β -分泌酶、Asp2 或 Memapsin-2)裂解产生(De Strooper, B. and Konig, G. (1999) Nature402:471-472)。除了实质和血管的沉积之外, $A\beta$ 的可溶的寡聚形式已经被假定促进了 AD 的发作,它们可以通过损害突触功能初步地影响神经元功能(Lambert et. al. (1998) Proceedings of the National Academy of Science, U. S. A. 95:6448-6453)。虽然早期在 AD 中和在 MCI 中发现了不溶的淀粉样蛋白斑块,可溶的 $A\beta$ 聚集物(称为寡聚体或 $A\beta$ 衍生的可扩散配体(ADDL)的水平也在这些个体中增加,与淀粉样蛋白斑块相比,可溶 $A\beta$ 水平与神经纤丝退化、突触标记物的损失更好地相关。(Naslund et. al. (2000) J Am Med Assoc283:1571-1577, Younkin, S. (2001) Nat. Med. 1:8-19)。高度淀粉样变性的 $A\beta$ 42 和氨基末端截短形式 $A\beta$ x-42 是在弥散和老年斑中存在的 $A\beta$ 的优势种类(Iwatsubo, T (1994) Neuron. 13:45 - 53, Gravina, SA(1995) J. Biol. Chem. 270:7013 - 7016)。 $A\beta$ 42 的相

对水平似乎是 A β 聚集成淀粉样蛋白斑块的关键调节物,实际上 A β 42 显示了离体时比其他 A β 更容易聚集(Jarrett, JT (1993)Biochemistry. 32:4693 - 4697),因而暗示了 A β 42 作为 AD 的发病机理的启动分子(Younkin SG, (1998)J. Physiol. (Paris). 92:289 - 292)。虽然 A β 42 是 APP 新陈代谢的副产物,在它的产生中的小的偏差与对 A β 沉积的大的影响相关,因而假定的是,单独的 A β 42 的降低可能是治疗 AD 的有效途径(Younkin SG, (1998) J. Physiol. (Paris). 92:289 - 292)。为了支持这一点,淀粉样蛋白前体蛋白质(APP)和 presenilin 基因中的突变已经被报道主要地提高 A β 42 的相对水平,并因而缩短阿尔茨海默氏病(AD)的发作时间(Selkoe D. J., Podlisny M. B. (2002) Annu. Rev. Genomics Hum. Gemet. 3:67-99)。然而要注意的是沉积速率也取决于分解代谢和 A β 清除。

[0008] 通过在小鼠中过量表达突变的人类转基因已经产生了淀粉样蛋白沉积的动物模型。过量表达单独的人类 APP 转基因的小鼠一般从 12 月龄发展出脑部斑块样 β -淀粉样沉淀(Games D. et al., (1995) Nature373:523-527;Hsiao K. et al., (1996) Science274:99-102)),而携带突变的人类 APP 和 presenilin-1 (PS-1) 转基因的小鼠一般早在 2 月龄发展出脑部斑块样 β -淀粉样沉淀(Kurt M. A. et al., (2001) Exp. Neurol. 171:59-71;McGowan E. et al., (1999) Neurolbiol. Dis. 6:231-244)。

[0009] 变得越来越明显的是,在中枢神经系统(CNS)和血浆之间外源 A β 的转运在脑淀粉样蛋白水平的调节方面起到作用(Shibata, et al (2000) J Clin Invest106:1489-1499),CSF A β 被快速地从 CSF 转运到原生质。因而,使用 A β 肽的主动疫苗接种或特异性 A β 抗体的被动施用快速地结合了外周的 A β ,改变血浆、CSF 之间和最终 CNS 的动力平衡。实际上现在有很多的研究展现了这些方法都可以在淀粉样变性的各种转基因模型中降低 A β 水平,降低 A β 病理并提供认知的益处。还在高等动物中进行了有限的研究。Caribbean vervet 猴(16-10 岁)用 A β 肽免疫 10 个月。在血浆中 A β 40 水平提高 2-5 倍,峰值在 251d,而 A β 40 和 A β 42 的水平到 100d 显著地降低,此后向基线返回。在 CSF 中的这种降低伴随着斑块负荷的显著降低(Lemere, CA (2004) Am J Pathology165:283-297)。血浆 A β 水平的类似提高也在年老的(15-20 岁)恒河猴的免疫之后检测到(Gandy, S (2004) Alzheimer Dis Assoc Disord18:44:46。

[0010] 针对脑淀粉样蛋白的第一个免疫治疗是 Elan/AN-1792,一种活性疫苗。这种治疗在与脑膜脑炎相符的临床征象的出现之后被终止。亚群分析表明,治疗减慢了认知功能的下降(Nature Clin Pract Neurol(2005)1:84-85)。患者的事后的分析也显示了斑块清除的证据(Gilman S. et al, (2005)Neurology64 (9)1553-1562)。Bapineuzumab (AAB-001, Elan/Wyeth),一种被动的 MAb 治疗已经在小的 I 期安全性研究中显示了显著地改善认知分值。

[0011] 特征在于提高的 β -淀粉样蛋白水平或 β -淀粉样沉淀的其他疾病或失调包括轻微的认知损伤(MCI, Blasko I(2006)Neurobiology of aging“Conversion from cognitive health to mild cognitive impairment and Alzheimer’s disease:Prediction by plasma amyloid β 42, medial temporal lobe atrophy and homocysteine”in press, e-published19Oct2006)、伴有荷兰型 β -淀粉样变性的遗传性脑出血、脑 β -淀粉样蛋白血管病和各种类型的退化性痴呆,例如与帕金森氏病相关的那些,渐进性的核上的麻痹、皮层基底退化和阿尔茨海默氏病的弥散 Lewis 体型(Mollenhauer B(2007)J Neural

Transm e-published23Feb2007, van Oijen, M Lancet Neurol. 20065:655-60)和Down综合征(Mehta, PD (2007) J Neurol Sci. 254:22-7)。

[0012] 发明概述

[0013] 在本发明的一个实施方式中,提供了治疗性抗体,其是抗体或抗原结合片段和/或其衍生物,其以低于 100pM 的平衡常数 KD 结合 β -淀粉样蛋白肽 1-12(SEQ ID NO:15),但是不结合 β -淀粉样蛋白肽 2-13 (SEQ ID NO:44),两种测定都在利用在链霉抗生物素蛋白芯片上捕获的肽的表面等离子共振分析中进行。

[0014] 在本发明的另一个实施方式中,提供了治疗性抗体,其是抗体或抗原结合片段和/或其衍生物,其以低于 100pM 的平衡常数 KD 结合 β -淀粉样蛋白肽 1-12(SEQ ID NO:15),具有的与 β -淀粉样蛋白肽 2-13 (SEQ ID NO:44)的结合的平衡常数 KD,1000 倍大于与肽 1-12 (SEQ ID NO:15)的结合的平衡常数,两种测定都在利用在链霉抗生物素蛋白芯片上捕获的肽的表面等离子共振分析中进行。

[0015] 在本发明的另一个实施方式中,提供了治疗性抗体,其是抗体或抗原结合片段和/或其衍生物,其以低于 100pM 的平衡常数 KD 结合 β -淀粉样蛋白肽 1-12(SEQ ID NO:15),具有的与 β -淀粉样蛋白肽 2-13 (SEQ ID NO:44)的结合的平衡常数 KD,10,000 倍大于与肽 1-12 (SEQ ID NO:15)的结合的平衡常数,两种测定都在利用在链霉抗生物素蛋白芯片上捕获的肽的表面等离子共振分析中进行。

[0016] 在一个方面,利用在链霉抗生物素蛋白芯片上捕获的肽的表面等离子共振分析是在以下的实施例中描述的表面等离子共振分析。在另一个方面,利用在链霉抗生物素蛋白芯片上捕获的肽的表面等离子共振分析是以下的 SPR Biacore™ 分析描述的方法 A (i)。

[0017] 在本发明的一个可选择的实施方式中,提供了治疗性抗体,其是抗体或抗原结合片段和/或其衍生物,其以低于 10nM 的平衡常数结合 β -淀粉样蛋白肽 1-40,但是不结合 β -淀粉样蛋白肽 2-13(SEQ ID NO:44),两种测定都在以下的实施例的方法 B 中描述的表面等离子共振分析中进行。

[0018] 在本发明的另一个可选择的实施方式中,提供了治疗性抗体,其是抗体或抗原结合片段和/或其衍生物,其以低于 10nM 的平衡常数结合 β -淀粉样蛋白肽 1-40,具有的与 β -淀粉样蛋白肽 2-13 (SEQ ID NO:44)的结合的平衡常数 KD,1000 倍大于与肽 1-12 (SEQ ID NO:15)的结合的平衡常数,两种测定都在以下的实施例的方法 B 中描述的表面等离子共振分析中进行。

[0019] 在本发明的另一个可选择的实施方式中,提供了治疗性抗体,其是抗体或抗原结合片段和/或其衍生物,其以低于 10nM 的平衡常数结合 β -淀粉样蛋白肽 1-40,具有的与 β -淀粉样蛋白肽 2-13 (SEQ ID NO:44)的结合的平衡常数 KD,10,000 倍大于与肽 1-12 (SEQ ID NO:15)的结合的平衡常数,两种测定都在以下的实施例的方法 B 中描述的表面等离子共振分析中进行。

[0020] 在本发明的实施方式中,提供了治疗性抗体,其是抗体或抗原结合片段和/或其衍生物,其结合 β -淀粉样蛋白肽,并且其包含以下 CDR:

[0021] CDRH1:DNGMA (SEQ ID No:1)

[0022] CDRH2:FISNLAYSIDYADTVTG (SEQ ID No:2)

[0023] CDRH3:GTWFAY (SEQ ID No:3)

[0024] 处在来源于 VH3 基因家族的人类重链可变区之内,和 :

[0025] CDRL1:RVSQSLLSNGYTYLH (SEQ ID No:4)

[0026] CDRL2:KVSNRFS (SEQ ID No:5)

[0027] CDRL3:SQTRHVPYT (SEQ ID No:6)

[0028] 处在来源于 GenPept 条目 CAA51135 中公开的氨基酸序列的人类轻链可变区 (SEQ ID NO :24) 之内。

[0029] 在整个说明书中,术语“CDR”、“CDRL1”、“CDRL2”、“CDRL3”、“CDRH1”、“CDRH2”、“CDRH3” 根据 Kabat et al;Sequences of proteins of Immunological Interest NIH, 1987 中阐述的 Kabat 编号系统。因而,以下的定义了根据本发明的 CDR :

[0030] CDR 残基

[0031] CDRH1:31-35B

[0032] CDRH2:50-65

[0033] CDRH3:95-102

[0034] CDRL1:24-34

[0035] CDRL2:50-56

[0036] CDRL3:89-97

[0037] VH3 基因家族和相关的免疫球蛋白基因命名在 Matsuda et al (Journal of Experimental Medicine, 188:2151-2162, 1998)和 Lefranc&Lefranc(The Immunoglobulin Factsbook. 2001. Academic Press:London) 中描述。

[0038] 在特定的实施方式中,人类重链可变区来源于 :

[0039] •选自以下 VH3 家族成员的子集的 V 基因 :VH3-48、VH3-21、VH3-11、VH3-7、VH3-13、VH3-74、VH3-64、VH3-23、VH3-38、VH3-53、VH3-66、VH3-20、VH3-9&VH3-43

[0040] •选自以下 VH3 家族成员的子集的 V 基因 :VH3-48, VH3-21&VH3-11

[0041] • VH3-48 基因

[0042] 或其等位基因。

[0043] Genbank 条目 M99675 中的序列是 VH3-48 基因的等位基因。M99675 是包括两个外显子的 DNA 的基因组片段的 Genbank 核苷酸序列,所述外显子构成人类重链基因 VH3-48 (SEQ ID NO :22) 并编码 SEQ ID NO :21 中给出的可变区氨基酸序列。在特定的方面,人类接受体重链框架来源于 M99675。

[0044] 为了构建完整的 V- 区域,框架 4 必需添加到种系编码的 V 基因 M99675。适合的框架 4 序列包括人类 JH4 迷你基因(minigene) 编码的那些(Kabat) :

[0045] YFDYWGQGLVTVSS (SEQ ID No:23)

[0046] 其中属于 CDR3 区域的开头的四个残基被来自供体抗体的引入的 CDR 替换。

[0047] 技术人员理解的是,种系 V 基因和 J 基因不包括重链 CDR3 的整个的编码序列。然而,在本发明的抗体中,CDR3 序列由供体免疫球蛋白提供。因而,VH 基因例如 VH3-48、JH 迷你基因例如 JH4 的组合,以及一组重链 CDR,例如 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :2 和 SEQ ID NO :3 (以一定方式组装以模拟成熟的、完整的重排重链可变区)足以定义本发明的重链可变区,例如在 SEQ ID NO :26、28 和 30 中表示的。

[0048] 由 Genpept ID CAA51134 编码的可变区具有 SEQ ID NO :24 中给出的氨基酸序列。

[0049] 由 GenPept ID CAA51134 已知的轻链可变区框架序列是完整的重排轻链可变区的推定的氨基酸序列,与数据库中具有相同框架的另一个氨基酸序列:Genpept 登记号码 S40356 相同,并在 Klein, R. et al., Eur. J. Immunol. 23 (12), 3248-3262 (1993) 中描述了。作为 Genbank 登记 NO. X72467 可获得的 CAA51134 的 DNA 编码序列作为 SEQ ID NO:25 来给出。

[0050] 在本发明的特定的方面,人类接受体重链框架来源于 M99675 和 JH4 迷你基因,人类接受体轻链框架来源于 CAA51135,任选地含有一个或多个,例如一到四个,更特别地一到三个,根据在具有序列 SEQ ID NO:17 的供体 V_H 结构域和具有序列 SEQ ID NO:19 的 V_L 结构域中存在的相应残基氨基酸残基的替换,其维持了供体抗体对 β -淀粉样蛋白肽的所有的或基本上所有的结合亲和性。

[0051] “基本上所有的结合亲和性”是指,与供体抗体相比,治疗性抗体具有结合亲和性方面最多 10 倍降低。

[0052] 在更特别的方面,来源于 M99675 和 JH4 的本发明的接受体重链框架具有选自位置 24、48、93 和 / 或 94 (Kabat 编号) 的一到四个氨基酸残基替换。

[0053] 在本发明的更特别的方面,来源于 M99675 和 JH4 的人类接受体重链框架包含以下的残基(或其保守性替换物):

[0054] (i)

[0055] 位置 残基

[0056] 93 V

[0057] 94 S

[0058] 或

[0059] (ii)

[0060]

	位置	残基
[0061]	24	V
	93	V
	94	S

[0062] 或

[0063] (iii)

[0064]

	位置	残基
	48	I
	93	V
	94	S

[0065] 在本发明的一个实施方式中,提供了治疗性抗体,其包含具有 SEQ ID NO:26、28 或 30 中列出的序列的 V_H 链和具有 SEQ ID NO:32 中列出的序列的 V_L 结构域。

[0066] 在本发明的另一个实施方式中,提供了治疗性抗体,所述抗体包含具有 SEQ ID

NO :34、36 或 38 中列出的序列的重链和具有 SEQ ID NO :40 中列出的序列的轻链。

[0067] 在本发明的另一个实施方式中,提供了包含根据本发明的治疗性抗体的药物组合物。

[0068] 在本发明的进一步的实施方式中,提供了治疗受到 β 淀粉样蛋白肽相关疾病影响的人类患者的方法,所述方法包括向所述患者施用治疗有效量的根据本发明的治疗性抗体的步骤。

[0069] 还提供了根据本发明的治疗性抗体在制造用于治疗 β 淀粉样蛋白肽相关疾病的药物方面的用途。

[0070] 在本发明的另一个实施方式中,提供了生产根据本发明的治疗性抗体的过程,所述过程包括在宿主细胞中表达编码所述抗体的多核苷酸。

[0071] 在本发明的另一个实施方式中,提供了编码治疗性抗体重链的多核苷酸,所述治疗性抗体重链包含具有 SEQ ID NO :26、28 或 30 中所列的 V_H 链。

[0072] 在本发明的另一个实施方式中,提供了编码治疗性抗体轻链的多核苷酸,所述治疗性抗体轻链包含具有 SEQ ID NO :32 中所列的 V_L 结构域。

[0073] 在本发明的另一个实施方式中,提供了编码治疗性抗体重链的多核苷酸,所述治疗性抗体重链具有 SEQ ID NO :34、36 或 38 中所列的序列。

[0074] 在本发明的另一个实施方式中,提供了编码治疗性抗体轻链的多核苷酸,所述治疗性抗体轻链具有 SEQ ID NO :40 中所列的序列。

[0075] 在本发明的更特别的实施方式中,提供了编码治疗性抗体重链的多核苷酸,所述多核苷酸包含在 SEQ ID NO :35、37、39 或 42 中所列的序列。

[0076] 在本发明的另一个更特别的实施方式中,提供了编码治疗性抗体轻链的多核苷酸,所述多核苷酸包含在 SEQ ID NO :41 或 43 中所列的序列。

[0077] 在特定的实施方式中,作为抗体或片段和 / 或其衍生物的治疗性抗体基本上缺乏 a) 经典途径的补体的活化 ;和 b) 调节抗体依赖性细胞毒性的功能。

[0078] 在本发明的另一个实施方式中,提供了抗体或其片段,其包含具有序列 SEQ ID NO :17 的 V_H 结构域和具有序列 SEQ ID NO :19 的 V_L 结构域。

[0079] 在本发明的另一个实施方式中,提供了编码包含具有序列 SEQ ID NO :17 的 V_H 结构域的抗体重链或其片段的多核苷酸,特别是 SEQ ID NO :18 的多核苷酸。

[0080] 在本发明的另一个实施方式中,提供了编码包含具有序列 SEQ ID NO :19 的 V_L 结构域的抗体轻链或其片段的多核苷酸,特别是 SEQ ID NO :20 的多核苷酸。

[0081] 发明的详细说明

[0082] 1. 抗体结构

[0083] 1.1 完整抗体

[0084] 完整抗体通常是包含至少两个重链和两个轻链的异多聚糖蛋白。除了 IgM 之外,完整抗体是大约 150KDa 的杂四聚糖蛋白,包括两个相同的轻(L)链和两个相同的重(H)链。一般地,每条轻链通过一个共价的二硫键连接到重链,而不同的免疫球蛋白同种型的重链之间二硫键的数目是可变的。每条重链和轻链也具有链内的二硫键。每条重链在一个末端具有可变区(V_H),之后是多个恒定区。每条轻链具有可变区(V_L)和在它另一个末端的恒定区 ;轻链的恒定区与重链的第一个恒定区对准,轻链可变区与种类的可变区对准。来自大多

数脊椎动物物种的抗体的轻链可以根据恒定区的氨基酸序列被分成称为 Kappa 和 Lambda 的两种类型之一。取决于它们的重链的恒定区的氨基酸序列,人类抗体可以被分成五种不同的种类,IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM。IgG 和 IgA 可以进一步分成子类,IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 ;以及 IgA1 和 IgA2。具有至少 IgG2a、IgG2b 的小鼠和大鼠中存在物种变体。抗体的可变区赋予抗体上的结合特异性,显示了特定的变异性的某些区域称为互补决定区(CDR)。可变区的更保守的部分称为框架区域(FR)。完整重链和轻链的可变区各自包含三个 CDR 连接的四个 FR。每条链中的 CDR 通过 FR 区域紧密地保持在一起,来自另一条链的 CDR 促进了抗体的抗原结合位点的形成。恒定区不直接地涉及抗体与抗原的结合,但是展现了各种效应物功能,例如参与抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、经由与 Fc γ 受体结合的吞噬作用、经由新生 Fc 受体(FcRn)的半衰期/清除率和经由补体级联的 C1q 组件的互补依赖性细胞毒性。人类 IgG2 恒定区缺乏通过经典途径活化补体的能力,或介导抗体依赖性细胞毒性的能力。IgG4 恒定区缺乏通过经典途径活化补体的能力,仅仅微弱地介导抗体依赖性细胞毒性。基本上缺乏这些效应物功能的抗体可以称为“非裂解”抗体。

[0085] 1.1.1 人类抗体

[0086] 人类抗体可以通过本领域技术人员已知的许多方法来产生。人类抗体可以通过利用人类骨髓瘤或小鼠-人类杂交骨髓瘤细胞系的杂交瘤方法来产生,参见 Kozbor J. *Immunol*133, 3001, (1984) 和 Brodeur, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp51-63 (Marcel Dekker Inc, 1987)。可选择的方法包括利用噬菌体库或转基因小鼠,两者都利用了人类 V 区库(参见 Winter G, (1994), *Annu. Rev. Immunol*12, 433-455, Green LL (1999), *J. Immunol. methods*231, 11-23)。

[0087] 几个转基因小鼠品系现在是可获得的,其中它们的小鼠免疫球蛋白基因座已经用人免疫球蛋白基因片段替换(参见 Tomizuka K, (2000) *PNAS*97, 722-727; Fishwild D. M (1996) *Nature Biotechnol.* 14, 845-851, Mendez MJ, 1997, *Nature Genetics*, 15, 146-156)。在抗原攻击时,这种小鼠能够产生人类抗体的所有部分,从中可以选择感兴趣的抗体。

[0088] 特别注意的是 TrimerTM 系统(参见 Eren R et al, (1998) *Immunology*93:154-161),其中人类淋巴细胞被移植到照射的小鼠中,选择淋巴细胞抗体系统(SLAM, 参见 Babcook et al, *PNAS* (1996)93:7843-7848),其中人类(或其他物种)淋巴细胞被有效地穿过大量集中的体外抗体产生过程,随后是 deconvulated、限制稀释和选择过程,以及 Xenomouse IITM。可选择的方法是可以从 Morphotek Inc 获得的,利用 MorphodomaTM 技术。

[0089] 噬菌体展示技术可以用于产生人类抗体(和其片段),参见 McCafferty; *Nature*, 348, 552-553 (1990) 和 Griffiths AD et al (1994) *EMB013*:3245-3260。依据这种技术,抗体 V 区基因按照框架被克隆到丝状噬菌体的主要和次要外壳蛋白基因中,例如 M13 或 fd,在噬菌体粒子的表面上被呈现(通常借助于辅助噬菌体)为功能性抗体片段。根据抗体的功能性质的选择产生了编码展现那些性质的抗体的基因的选择。噬菌体展示技术可以用于从库中选择抗原特异性抗体,所述库从取自受如上所述的疾病或失调影响个体、或作为选择取自未免疫的人类供体的人类 B 细胞制成(参见 Marks; *J. Mol. Bio.* 222, 581-597, 1991)。当期望完整的人类抗体包含 Fc 结构域时,必需的是重新将噬菌体展示的衍生片段克隆到包含期望的恒定区的哺乳动物表达载体中并建立

稳定的表达细胞系。

[0090] 亲合成熟(Marks;Bio/technol10, 779-783 (1992))的技术可以用于改善结合亲和性,其中原始人类抗体的亲和性通过用天然发生的变体连续替换H和L链的V区并在改善的结合亲和性的基础上选择来改善。这种技术的变体例如“表位印记”现在也是可用的,参见W093/06213。也参见Waterhouse;Nucl.Acids Res21, 2265-2266 (1993)。

[0091] 1.2 嵌合的和人源化抗体

[0092] 在人类疾病或失调的治疗中使用非人类抗体带来了潜在的免疫原性的现在公认的难题,特别是在抗体的重复施用时,也就是,患者的免疫系统可以将非人类完整抗体识别为非自身的并产生中和反应。除了开发完全人类抗体(参见上文)之外,多年来已经开发了各种技术来克服这些难题,一般地涉及降低完整治疗性抗体中非人类氨基酸序列的组成,而保持相对容易从免疫的动物,例如大鼠、小鼠或兔获得非人类抗体。大致两种方法已经用于实现这一点。第一种是嵌合抗体,其一般包括融合到人类恒定区的非人类(例如,啮齿动物如小鼠)可变区。由于抗体的抗原结合位点定位于可变区之内,嵌合抗体保持了它对抗体的结合亲和性,但是获得了人类恒定区的效应物功能,因而能够进行效应物功能,例如上文中所述的。嵌合抗体一般使用重组DNA方法产生。编码抗体的DNA(例如,cDNA)使用常规过程(例如,通过使用寡核苷酸探针,其能够特异性地结合编码本发明的抗体的H和L链可变区的基因,例如上文描述的SEQ ID NO:18和20的DNA)来分离和测序。杂交瘤细胞充当这种DNA的典型来源。一旦被分离出来,DNA可以被放入表达载体中,然后将表达载体转染入宿主细胞,例如E.coli、COS细胞、PerC6细胞或不产生免疫球蛋白的骨髓瘤细胞,以获得抗体的合成。通过用人类L和H链的编码序列替换相应的非人类(例如,鼠)H和L恒定区,可以修饰DNA,参见,例如Morrison;PNAS81, 6851 (1984)。因而,本发明的另一个实施方式,提供了嵌合抗体,其包含具有序列SEQ ID NO:17的 V_H 结构域和具有序列SEQ ID NO:19的 V_L 结构域、融合到人类恒定区(其可以是IgG同种型,例如IgG1)。

[0093] 第二种方法涉及产生人源化抗体,其中抗体的非人类内容通过使可变区人源化来降低。人源化的两种技术已经变得流行。第一种是通过CDR移植来人源化。CDR构造环靠近抗体的N-末端,在此它们形成装配在框架区域提供的支架中的表面。抗体的抗原结合特异性主要由拓扑图和由它的CDR表面的化学特性决定。这些特征随后由单独的CDR的构象、CDR的分布以及包含CDR的残基的侧链的性质和分布来决定。免疫原性的大的降低可以通过仅仅移植非人类(例如,鼠)抗体(“供体”抗体)的CDR到适合的人类框架(“接受体框架”)和恒定区中来实现(参见Jones et al (1986)Nature321, 522-525 and Verhoeyen M et al (1988)Science239, 1534-1536)。然而,CDR移植本身不能产生抗原结合性质的完全保留,经常发现的是,如果要恢复显著的抗原结合亲和性,供体抗体的某些框架残基需要被保留(有时称为“回复突变”)在人源化分子中(参见Queen C et al (1989)PNAS86, 10, 029-10, 033, Co, M et al (1991)Nature351, 501-502)。在这种情况下,显示了与非人类供体抗体的最大序列同源性(一般60%或更高)的人类V区域可以从数据库中选择以提供人类框架(FR)。人类FR的选择可以从人类共有的或单独的人类抗体来进行。此时来自供体抗体的必需关键残基被替换到人类接受体框架中以保持CDR构象。抗体的计算机建模可以用于帮助鉴定这种结构上重要的残基,参见W099/48523。

[0094] 做为选择,人源化可以通过“饰面”(veneering)的过程来实现。独特的人类和

鼠免疫球蛋白重链和轻链可变区的统计分析揭示了,暴露的残基的确切模式在人类和鼠抗体中是不同的,各表面位置中的大多数具有对少数不同残基的强的偏爱性(参见 Padlan E. A. et al; (1991) Mol. Immunol. 28, 489-498 and Pedersen J. T. et al (1994) J. Mol. Biol. 235; 959-973)。因而,有可能通过替换其框架区域中与在人类抗体中通常发现的不同的暴露残基来降低非人类 Fv 的免疫原性。因为蛋白质抗原性可能与表面可接近性相关,表面残基的替换可能足以使小鼠可变区对于人类免疫系统来说成为“看不见的”。(还参见 Mark G. E. et al (1994) in Handbook of Experimental Pharmacology vol. 113: The pharmacology of monoclonal Antibodies, Springer-Verlag, pp105-134)。这种人源化的过程被称为“饰面”,因为引物仅改变了抗体的表面,支持性残基保持原状。进一步可选择的方法包括 W004/006955 中阐述的,和 Humaneering™ (Kalobios) 的过程,其利用了细菌表达系统,并产生在序列上接近人类种系的抗体(Alfenito-M Advancing Protein Therapeutics January 2007, San Diego, California)。

[0095] 对本领域技术人员明显的是,术语“衍生的”意图是不仅定义在材料的物理来源的意义上的来源,还定义结构上相同于所述材料、但不来源于参考来源的材料。因而,“供体抗体中存在的残基”不必是从供体抗体纯化的。

[0096] 本领域公认的是,某些氨基酸替换被认为是“保守的”。氨基酸根据常见的侧链性质被分成几组,维持了本发明的治疗性抗体的所有的或基本上所有的结合亲和性的组内的替换被认为是保守性替换,参见以下表 1:

[0097] 表 1

[0098]

侧链	成员
疏水性的	met, ala, val, leu, ile
中性亲水性的	cys, ser, thr
酸性的	asp, glu
碱性的	asn, gln, his, lys, arg
影响链取向的残基	gly, pro
芳香族的	trp, tyr, phe

[0099] 1.3 双特异性抗体

[0100] 双特异性抗体是抗体衍生物,具有对至少两个不同表位的结合特异性,也形成了本发明的部分。产生这种抗体的方法是本领域已知的。惯例地,双特异性抗体的重组生产是基于两条免疫球蛋白 H 链-L 链配对的共表达,其中两条 H 链具有不同的结合特异性,参见 Millstein et al, Nature 305 537-539 (1983), W093/08829 and Traunecker et al EMBO, 10, 1991, 3655-3659。由于 H 和 L 链的随机分配,产生了十种不同抗体的潜在混合物,其中仅有一种具有期望的结合特异性。可选择的方法包括将具有期望的结合特异性的可变区融合到至少包含绞链区、CH2 和 CH3 区域的一部分的重链恒定区。优选的是含

有轻链结合所必需的位点的 CH1 区域存在于至少一个所述融合物中。编码这些融合物和如果希望,编码 L 链的 DNA 被插入到独立的表达载体中,然后共转染到适合的宿主有机体中。然而可能的是将两条或全部三条链的编码序列插入到一个表达载体中。在一个优选的方法中,双特异性抗体由在一条臂上具有第一结合特异性的 H 链和在另一臂上提供第二结合特异性的 H-L 链配对组成,参见 W094/04690。也参见 Suresh et al *Methods in Enzymology*121, 210, 1986。

[0101] 治疗性蛋白质向脑部的递送被血脑屏障(BBB)的存在阻碍。当希望递送本发明的抗体或本发明的抗体片段跨越 BBB 时,已经提出了各种的策略来在需要时增加这种递送。

[0102] 为了从血液获得需要的营养物和因子, BBB 具有某些特定的受体,其将化合物从循环的血液中转移到脑部。研究已经表明,某些化合物如胰岛素(参见 Duffy KR et al(1989) *Brain Res.* 420:32-38)、转铁蛋白(参见 Fishman JB et al(1987) *J. Neurosci*18:299-304)和胰岛素样生长因子 1 和 2 (参见 Pardridge WM (1986) *Endocrine Rev.* 7:314-330 and Duffy KR et al (1986) *Metabolism*37:136-140)经由受体介导的穿细胞作用跨越 BBB。这些分子的受体因而提供了本发明的治疗性抗体使用所谓的“载体化的”抗体接近脑部的潜在手段(参见 Pardridge WM(1999) *Advanced Drug Delivery Review*36:299-321)。例如,针对转铁蛋白受体的抗体已经显示了被动态地转运到脑实质细胞中(参见 Friden PM et al (1991) *PNAS*88:4771-4775 and Friden PM et al (1993) *Science*259:373-377)。因而一种潜在的方法是产生双特异性抗体或双特异性片段,例如上文描述的,其中第一特异性是针对,第二特异性针对位于 BBB 处的转运受体,例如,第二特异性针对转铁蛋白转运受体。

[0103] 1.4 抗体片段

[0104] 在本发明的某些实施方式中,提供了作为抗原结合片段的治疗性抗体。这种片段可以是完整的和 / 或人源化的和 / 或嵌合的抗体的功能性抗原结合片段,例如上文描述的抗体的 Fab Fab、Fd、Fab Fab'、F(ab')₂、Fv、ScFv 片段。缺乏恒定区的片段缺少通过经典途径活化补体的能力或介导抗体依赖性细胞毒性的能力。通常地,这种片段通过完整抗体的蛋白水解消化来产生,通过例如木瓜蛋白酶消化(参见,例如 W094/29348),但可以直接地从重组转化的宿主细胞产生。对于 ScFv 的生产,参见 Bird et al; (1988) *Science*, 242, 423-426。此外,抗体片段可以使用如下所述的多种工程技术产生。

[0105] Fv 片段看起来比 Fab 片段具有更低的它们的两条链的相互作用能。为了稳定 V_H 和 V_L 结构域的缔合,它们已经用肽(Bird et al, (1988) *Science*242, 423-426, Huston et al, *PNAS*, 85, 5879-5883)、二硫桥(Glockshuber et al, (1990) *Biochemistry*, 29, 1362-1367)、和“孔洞中的把手”突变(Zhu et al(1997), *Protein Sci.*, 6, 781-788)来连接。ScFv 片段可以通过本领域技术人员公知的方法来产生,参见 Whitlow et al (1991) *Methods companion Methods Enzymol*, 2, 97-105 and Huston et al (1993) *Int. Rev. Immunol*10, 195-217。ScFv 可以在细菌细胞例如 *E. coli* 中产生,但更一般地在真核细胞中产生。ScFv 的一个缺点是产物的一价性,其排除了由于多价结合的提高的亲合力,以及它们的短半衰期。克服这些难题的尝试包括通过化学偶联(Adams et al (1993) *Can. Res*53, 4026-4034 and McCartney et al (1995) *Protein Eng.* 8, 301-314)或通过含有非配对 C 末端半胱氨酸残基的自发位点特异性二聚化(参见 Kipriyanov et al (1995) *Cell. Biophys*26, 187-204),从含有额外 C 末端半胱氨酸的 ScFV 产生的二价的

(ScFv')₂。做为选择,通过缩短肽接头到3到12个残基之间来形成“双抗体”,可以迫使 ScFv 形成多聚体,参见 Holliger et al PNAS (1993), 90, 6444-6448。更进一步缩小接头可以产生 ScFv 三聚体(“三抗体”,参见 Kortt et al (1997) Protein Eng, 10, 423-433)和四聚体(“四抗体”,参见 Le Gall et al (1999) FEBS Lett, 453, 164-168)。二价的 ScFv 分子的构建也可以通过与蛋白质二聚化基序遗传学融合来形成“迷你抗体”来实现(参见 Pack et al (1992) Biochemistry 31, 1579-1584) and “minibodies” (see Hu et al (1996), Cancer Res. 56, 3055-3061)。ScFv-Sc-Fv 串联物((ScFv)₂)也可以通过第三个肽接头连接两个 ScFv 单位来产生,参见 Kurucz et al (1995) J. Immunol. 154, 4576-4582。双特异性双抗体可以通过两个单链融合产物的非共价缔合来产生,所述融合产物由通过短接头连接到另一个抗体的 V_L 结构域的来自一个抗体的 V_H 结构域组成,参见 Kipriyanov et al (1998), Int. J. Can 77, 763-772。这种双特异性双抗体的稳定性可以通过导入二硫桥或上文描述的“孔洞中的把手”突变,或通过形成单链双抗体(ScDb)来增强,在所述单链双抗体中两个杂交的 ScFv 片段通过肽接头连接,参见 Kontermann et al (1999) J. Immunol. Methods 226:179-188。通过,例如将 ScFv 片段融合到 IgG 分子的 CH3 结构域,或通过绞链区融合到 Fab 片段,可以获得四价的双特异性分子,参见 Coloma et al (1997) Nature Biotechnol. 15, 159-163。做为选择,通过双特异性单链双抗体的融合已经创建了四价的双特异性(参见 Alt et al, (1999) FEBS Lett 454, 90-94。较小的四价双特异性分子也可以通过 ScFv ScFv-ScFv 串联物使用含有螺旋-环-螺旋基序的接头的二聚作用(DiBi miniantibodies, see Muller et al (1998) FEBS Lett 432, 45-49),或包含在一定取向上以防止分子内配对的四个抗体可变区(V_H和V_L)的单链分子(串联双抗体,参见 Kipriyanov et al, (1999) J. Mol. Biol. 293, 41-56)来形成。双特异性 F(ab')₂ 片段可以通过 Fab' 片段的化学偶联或通过经由亮氨酸拉链结构的异二聚化来创建(参见 Shalaby et al, (1992) J. Exp. Med. 175, 217-225 and Kostelny et al (1992), J. Immunol. 148, 1547-1553)。还可用的是分离的 V_H 和 V_L 结构域,参见 US6, 248, 516 ;US6, 291, 158;US6, 172, 197。

[0106] 1.5 异共轭抗体

[0107] 异共轭抗体是衍生物,其也形成本发明的实施方式。异共轭抗体由使用任何方便的交联方法形成的两个共价连接的抗体组成。参见 US4, 676, 980。

[0108] 1.6 其他修饰。

[0109] 抗体的 Fc 区域和各种 Fc 受体(Fc γ R)之间的相互作用被认为介导抗体的效应物功能,其包括抗体依赖性细胞毒性(ADCC)、补体的固定、吞噬作用和抗体的半衰期/清除。对本发明的抗体的 Fc 区域的各种修饰可以取决于期望的效应物性质来进行。特别地,基本上缺乏 a) 通过经典途径的补体的活化;和 b) 调节抗体依赖性细胞毒性的功能的人类恒定区可以包括 IgG4 恒定区, IgG2 恒定区,和含有特定突变的 IgG1 恒定区,例如 EP0307434 (W08807089)、EP0629240 (W09317105) 和 W02004/014953 中描述的在位置 234、235、236、237、297、318、320 和 / 或 322 的突变。在重链恒定区的 CH2 结构域内残基 235 或 237 处(Kabat 编号;EU Index 系统)的突变已经单独地被描述降低对 Fc γ RI、Fc γ RII 和 Fc γ RIII 的结合,因而降低抗体依赖性细胞毒性(ADCC) (Duncan et al. Nature 1988, 332;563-564;Lund et al. J. Immunol. 1991, 147;2657-2662;Chappel et al. PNAS 1991, 88;9036-9040;Burton and Woof, Adv. Immunol. 1992, 51;1-84;Morgan et al

., Immunology1995, 86;319-324;Hezareh et al., J. Virol. 2001, 75 (24);12161-12168)。进一步的,一些报道也描述了这些残基中的一些在征募或调节互补依赖性细胞毒性(CDC)中的牵涉(Morgan et al., 1995;Xu et al., Cell. Immunol. 2000;200:16-26;Hezareh et al., J. Virol. 2001, 75 (24);12161-12168)。因而残基 235 和 237 都被突变成丙氨酸残基(Brett et al. Immunology1997, 91;346-353;Bartholomew et al. Immunology1995, 85;41-48;和 W09958679)来降低补体介导的和 Fc γ R 介导的效果。包含这些恒定区的抗体可以称为“非裂解”抗体。

[0110] 人们可以将补救受体结合表位包括到抗体中来提高血清半衰期,参见 US5, 739, 277。

[0111] 存在着五种当前识别的人类 Fc γ 受体, Fc γ R (I)、Fc γ RIIa、Fc γ RIIb、Fc γ RIIIa 和新生儿的 FcRn。Shields et al, (2001)J. Biol. Chem276, 6591-6604 展现了 IgG1 残基的通用组涉及结合所有的 Fc γ R, 而 Fc γ RII 和 Fc γ RIII 利用了这个通用组之外的不同的位点。当改变成丙氨酸时,一组 IgG1 残基降低对所有 Fc γ R 的结合:Pro-238、Asp-265、Asp-270、Asn-297 和 Pro-239。所有的都在 IgG CH2 结构域中,簇拥靠近连接 CH1 和 CH2 的铰链。虽然 Fc γ RI 仅利用 IgG1 参见的通用组用于结合,Fc γ RII 和 Fc γ RIII 与通用组之外的不同的残基相互作用。某些残基的改变仅降低对 Fc γ RII (例如 Arg-292)或对 Fc γ RIII (例如 Glu-293)的结合。某些变体显示了对 Fc γ RII 或 Fc γ RIII 的改善的结合,但是不影响对另一受体的结合(例如, Ser-267Ala 改善对 Fc γ RII 的结合,但是对 Fc γ RIII 的结合不受影响)。其他的变体展现了对 Fc γ RII 或 Fc γ RIII 的改善的结合,与另一受体的结合降低(例如, Ser-298Ala 改善对 Fc γ RIII 的结合,降低对 Fc γ RII 的结合)。对于 Fc γ RIIIa,最佳的结合 IgG1 变体具有在 Ser-298、Glu-333 和 Lys-334 处的组合的丙氨酸替换。新生儿的 FcRn 受体被认为涉及包含 IgG1 分子免于降解,因而提高血清半衰期和跨组织的穿细胞作用(参见 Junghans R. P (1997) Immunol. Res16. 29-57and Ghetie et al(2000)Annu. Rev. Immunol. 18, 739-766)。被确定与人类 FcRn 直接相互作用的人类 IgG1 残基包括 Ile253、Ser254、Lys288、Thr307、Gln311、Asn434 和 His435。

[0112] 本发明的治疗性抗体可以包括任何的以上的恒定区修饰。

[0113] 在特定的实施方式中,所述治疗性抗体基本上缺乏 a) 通过经典途径的补体的活化;和 b) 调节抗体依赖性细胞毒性的功能。在更特别的实施方式中,本发明提供了本发明的治疗性抗体,具有以上详述的任何一个(或多个)残基改变以修改半衰期/清除和/或效应物功能,如 ADCC 和/或互补依赖性细胞毒性和/或补体裂解。

[0114] 在本发明的进一步的方面,所述治疗性抗体具有同种型人类 IgG1 的恒定区,具有在位置 235 (例如, L235A)和 237 (例如 G237A)的丙氨酸(或其他破坏)替换(编号根据 Kabat 中阐述的 EU 方案)。

[0115] 本发明的其他衍生物包括本发明的抗体的糖基化变体。在抗体的恒定区中保守位置处抗体的糖基化已知对于抗体功能具有深刻的影响,特别是效应物功能,例如如上描述的那些,参见,例如 Boyd et al(1996), Mol. Immunol. 32, 1311-1318。其中添加、替换、删除或修饰了一个或多个碳水化合物部分的本发明的治疗性抗体的糖基化变体是期待的。导入天冬酰胺-X-丝氨酸或天冬酰胺-X-苏氨酸基序创建了碳水化合物部分的酶学附着的潜在位点,因而可以用于操作抗体的糖基化。在 Raju et al (2001) Biochemistry40, 8868-8876

中, TNFR-IgG 免疫粘附素的末端唾液酸化通过利用 β -1, 4- 半乳糖基转移酶和 / 或 α , 2, 3 唾液酸转移酶的重新半乳糖基化或重新唾液酸化的过程来提高。提高末端唾液酸化被认为提高免疫球蛋白的半衰期。与大多数糖蛋白一样, 在自然中抗体一般作为糖形式的混合物来产生。当抗体在真核的特别是哺乳动物细胞中产生时, 这种混合物是特别明显的。已经开发了多种方法来制造限定的糖形式, 参见 Zhang et al Science (2004), 303, 371, Sears et al, Science, (2001) 291, 2344, Wacker et al (2002) Science, 2981790, Davis et al (2002) Chem. Rev. 102, 579, Hang et al (2001) Acc. Chem. Res 34, 727。因而, 本发明涉及在此描述的多种治疗性抗体(其可以是 IgG 同种型, 例如 IgG1), 其包含所述抗体的预定数量(例如 7 个或更少, 例如 5 个或更少, 例如两个或一个)糖形式。

[0116] 根据本发明的衍生物还包括与非蛋白性聚合物例如聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇或聚氧化烯联结的本发明的治疗性抗体。蛋白质与 PEG 的结合是用于提高蛋白质的半衰期、以及降低蛋白质的抗原性和免疫原性的建立的技术。已经用完整抗体以及 Fab' 片段研究了使用不同分子量和形式(线性或分支的)的 PEG 化, 参见 Koumenis I. L. et al (2000) Int. J. Pharmaceut. 198:83-95。特定的实施方式包括与 PEG 联结的、没有 a) 通过经典途径的补体的活化; 和 b) 调节抗体依赖性细胞毒性的效应物功能的本发明的抗原结合片段(例如, Fab 片段或 scFv)。

[0117] 2. 生产方法

[0118] 本发明的抗体可以在转基因有机体例如山羊(参见 Pollock et al (1999), J. Immunol. Methods 231:147-157)、鸡(参见 Morrow KJJ (2000) Genet. Eng. News 20:1-55)、小鼠(参见 Pollock et al ibid) 或植物(参见 Doran PM, (2000) Curr. Opinion Biotechnol. 11, 199-204, Ma JK-C (1998), Nat. Med. 4;601-606, Baez J et al, BioPharm (2000) 13:50-54, Stoger E et al; (2000) Plant Mol. Biol. 42:583-590) 中产生。抗体也可以通过化学合成产生。然而, 本发明的抗体一般使用本领域技术人员公知的重组细胞培养物技术产生。编码抗体的多核苷酸被分离并插入可复制载体例如质粒中, 用于在宿主细胞中进一步增殖或表达。一种有用的表达系统是谷氨酸合成酶系统(例如, Lonza Biologics 所出售的), 特别是其中宿主细胞是 CHO 或 NS0 时(见下文)。使用常规过程容易地分离和测序编码抗体的多核苷酸(例如, 寡核苷酸探针)。可以使用的载体包括质粒、病毒、噬菌体、转座子、微染色体, 其中质粒是典型的实施方式。一般地, 这些载体进一步包括与轻链和 / 或重链多核苷酸可操作连接的信号序列、复制起点、一个或多个标记基因、增强子元件、启动子和转录终止序列以便于表达。编码轻链和重链的多核苷酸可以插入独立的载体中, 并同时地或次序地导入(例如, 通过转化、转染、电穿孔或转导) 相同的宿主细胞, 或者, 如果希望, 重链和轻链可以在这种导入之前被插入相同的载体。

[0119] 对于本领域技术人员直接显而易见的是, 由于遗传密码的冗余, 对于在此公开的那些的可选择的多核苷酸也是可获得的, 其将编码本发明的多肽。

[0120] 2.1 信号序列

[0121] 本发明的抗体可以作为融合蛋白产生, 具有异源信号序列, 具有在成熟蛋白质的 N 末端的特异性裂解位点。信号序列应当被宿主细胞识别和加工。对于原核宿主细胞, 信号序列可以是碱性磷酸酶、青霉素酶或热稳定肠毒素 II 前导区。对于酵母分泌, 信号序列可以是酵母转化酶前导区、 α 因子前导区或酸性磷酸酶前导区, 参见, 例如 W090/13646。在哺

乳动物细胞系统中,病毒分泌前导区例如单纯性疱疹 gD 信号和天然的免疫球蛋白信号序列(例如,人类 Ig 重链)是可用的。一般地,信号序列被按阅读框连接到编码本发明的抗体的多核苷酸上。

[0122] 2.2 复制起点

[0123] 复制起点是本领域公知的, pBR322 适合于大多数革兰氏阴性细菌, 2 μ 质粒适合于大多数酵母, 各种病毒来源的例如 SV40、多形瘤、腺病毒、VSV 或 BPV 适合于大多数哺乳动物细胞。一般地, SV40 复制起点组件不需要整合的哺乳动物表达载体。然而, 可以包括 SV40ori, 因为它含有早期启动子。

[0124] 2.3 选择标记

[0125] 典型的选择基因编码了蛋白质, 所述蛋白质(a) 赋予对抗生素或其他毒素例如氨苄青霉素、新霉素、氨基蝶呤或四环素的抗性, 或(b) 补足营养缺陷或补充复合培养基中不可获得的营养物, 或(c) 两者的组合。选择方案可以涉及延滞不含载体的宿主细胞的生长。用编码本发明的治疗性抗体的基因成功地转化的细胞由于例如共同递送的选择标记物所赋予的药物抗性而存活。一个实例是 DHFR 选择系统, 其中转化体在 DHFR 阴性宿主菌株中产生(例如, 参见 Page and Sydenham 1991 Biotechnology 9:64-68)。在这个系统中, DHFR 基因与本发明的抗体多核苷酸序列共同递送, 然后通过核苷撤除选择 DHFR 阳性细胞。如果需要, DHFR 抑制物氨基蝶呤也被采用来选择具有 DHFR 基因扩增的转化体。通过将 DHFR 基因可操作连接到本发明的抗体编码序列或其功能衍生物上, DHFR 基因扩增引起感兴趣的期望抗体序列的伴随的扩增。CHO 细胞是这种 DHFR/ 氨基蝶呤选择的特别有用的细胞系, 利用 DHFR 系统扩增和选择宿主细胞的方法是本领域很好地建立的, 参见 Kaufman R. J. et al J. Mol. Biol. (1982) 159, 601-621, 综述参见 Werner RG, Noe W, Kopp K, Schluter M, "Appropriate mammalian expression systems for biopharmaceuticals", Arzneimittel-Forschung. 48 (8) :870-80, 1998 Aug. 进一步的实例是谷氨酸合成酶表达系统(Bebbington et al Biotechnology 1992 Vol 10 p169)。用于酵母中的适合的选择基因是 trp1 基因; 参见 Stinchcomb et al Nature 282, 38, 1979。

[0126] 2.4 启动子

[0127] 用于表达本发明的抗体的适合的启动子可操作连接到编码抗体的 DNA/ 多核苷酸。用于原核宿主的启动子包括 phoA 启动子、 β -内酰胺酶和乳糖启动子系统、碱性磷酸酶、色氨酸和杂交启动子例如 Tac 适合于在酵母细胞中表达的启动子包括 3-磷酸甘油酸激酶或其他糖酵解酶, 例如烯醇酶、甘油醛 3 磷酸脱氢酶、己糖激酶、丙酮酸脱羧酶、果糖磷酸激酶、葡萄糖 6 磷酸异构酶、3-磷酸甘油酸变位酶和葡糖激酶。可诱导的酵母启动子包括乙醇脱氢酶 2、异细胞色素 C、酸性磷酸酶、金属硫蛋白和对氮代谢或麦芽糖/ 半乳糖利用负责的酶。

[0128] 用于在哺乳动物细胞系统中表达的启动子包括 RNA 聚合酶 II 启动子, 包括病毒启动子例如多形瘤、禽痘和腺病毒(例如腺病毒 2)、牛乳头状瘤病毒、禽类肉瘤病毒、巨细胞病毒(特别是即时早期启动子)、逆转录病毒、B 型肝炎病毒、肌动蛋白、劳氏肉瘤病毒(RSV) 启动子和早期或晚期猿猴病毒 40 和非病毒启动子, 例如 EF-1 α (Mizushima and Nagata Nucleic Acids Res 1990 18 (17):5322)。启动子的选择可以基于与用于表达的宿主细胞的适合的兼容性。

[0129] 2.5 增强子元件

[0130] 当适合时,例如,用于在高等真核生物中表达,可以包括其他增强子元件,来代替或附加于发现位于如上所述的启动子中的那些。适合的哺乳动物增强子序列包括来自球蛋白、弹性蛋白酶、白蛋白、甲胎蛋白、金属硫蛋白和胰岛素的增强子元件。做为选择,人们可以使用来自真核细胞病毒的增强子元件,例如 SV40 增强子、巨细胞病毒早期启动子增强子、多形瘤增强子、杆状病毒增强子或鼠 IgG2a 基因座(参见 W004/009823)。虽然这些增强子一般位于载体上启动子上游的位置,它们也可以位于其它地方,例如在非翻译区域内,或多聚腺苷酸信号的下游。增强子的选择和位置可以基于与用于表达的宿主细胞的适合的兼容性。

[0131] 2.6 多聚腺苷酸化 / 终止

[0132] 在真核系统中,多腺苷酸化信号被可操作连接到编码本发明的抗体的多核苷酸上。这种信号一般位于开放阅读框的 3'。在哺乳动物系统中,信号的非限制性实例包括来自生长激素、延伸因子 -1 α 和病毒(例如,SV40)基因或逆转录病毒长末端重复的那些。在酵母系统中,多聚腺苷酸化 / 终止信号的实例包括来自磷酸甘油酸激酶(PGK)和乙醇脱氢酶 1 (ADH)基因的那些。在原核系统中,多腺苷酸化信号一般是不需要的,反而通常是采用较短的和更为确定的终止子序列。多聚腺苷酸化 / 终止序列的选择可以基于与用于表达的宿主细胞的适合的兼容性。

[0133] 2.7 用于增加产量的其他方法 / 元件

[0134] 除了以上的之外,可以采用其他特征来增加产量,包括染色质重建元件,内含子和宿主细胞特异性密码子修饰。本发明的抗体的密码子利用率可以被修饰以适应宿主细胞的密码子偏爱,以增加转录产物和 / 或产物产生(eg Hoekema A et al Mol Cell Biol 19877 (8):2914-24)。密码子的选择可以基于与用于表达的宿主细胞的适合的兼容性。

[0135] 2.8 宿主细胞

[0136] 用于克隆或表达编码本发明的抗体的载体的适合的宿主细胞是原核细胞、酵母或更高等的真核细胞。适合的原核细胞包括真细菌,例如肠杆菌科,例如 Escherichia, 例如 E. coli (例如 ATCC31,446 ;31,53727,325)、Enterobacter、Erwinia、Klebsiella Proteus Proteus、Salmonella,例如 Salmonella typhimurium、Serratia,例如 Serratia marcescans 和 Shigella 以及 Bacilli, 例如 B. subtilis 和 B. licheniformis (参见 DD266710)、Pseudomonas, 例如 P. aeruginosa 和 Streptomyces。对于酵母宿主细胞, Saccharomyces cerevisiae、schizosaccharomyces pombe、Kluyveromyces (例如 ATCC16,045 ;12,424 ;24178 ;56,500)、yarrowia (EP402,226)、Pichia Pastoris (EP183,070,也参见 Peng Peng et al J. Biotechnol. 108 (2004) 185-192)、Candida、Trichoderma reesia (EP244,234)、Penicillin、Tolypocladium 和 Aspergillus 宿主例如 A. nidulans 和 A. niger 也是期待的。

[0137] 虽然原核和酵母宿主细胞是本发明特别期待的,然而一般地,本发明的宿主细胞是脊椎动物细胞。适合的脊椎动物宿主细胞包括哺乳动物细胞,例如 COS-1 (ATCC No. CRL1650)、COS-7 (ATCC CRL1651)、人类胚肾系 293、PerC6 (Cruce11)、婴儿仓鼠肾脏细胞(BHK) (ATCC CRL. 1632)、BHK570 (ATCC NO:CRL10314)、293 (ATCC NO. CRL1573)、中国仓鼠卵巢细胞 CHO (例如 CHO-K1、ATCC NO :CCL61, DHFR-CHO 细胞系例如 DG44 (Urlaub et

al, Somat Cell Mol Genet (1986) Vol12pp555-566),特别是适合于悬浮培养的那些 CHO 细胞系、小鼠滋养细胞、猴肾脏细胞、非洲绿猴肾脏细胞(ATCC CRL-1587)、HeLa 细胞、犬肾脏细胞(ATCC CCL34)、人类肺细胞(ATCC CCL75)、Hep G2 和骨髓瘤或淋巴瘤细胞,例如 NS0 (参见 US5, 807, 715)、Sp2/0、Y0。

[0138] 因而在本发明的一个实施方式中,提供了包含载体的稳定地转化的宿主细胞,所述载体编码在此描述的治疗性抗体的重链和 / 或轻链。一般地,这种宿主细胞包含编码轻链的第一载体和编码所述重链的第二载体。

[0139] 这种宿主细胞也可以进一步被工程化或改造来修改本发明的抗体的性质、功能和 / 或产量。非限制性实例包括特定的修饰(例如,糖基化)酶和蛋白质折叠陪伴分子的表达。

[0140] 2.9 细胞培养方法

[0141] 用编码本发明的治疗抗体的载体转化的宿主细胞可以通过本领域技术人员已知的任何方法来培养。宿主细胞可以培养在旋转烧瓶、摇瓶、滚瓶、波反应器(例如,来自 wavebiotech.com 的 System1000)或空心纤维系统中,但是对于大规模生产优选的是,搅拌罐反应器或袋反应器(例如, Wave Biotech, New Jersey USA)被特别地使用用于悬浮培养。一般地,搅拌罐适合于利用例如起泡器、挡板或低剪切转子的曝气。对于泡柱和气升反应器,可以使用空气或氧气泡的直接曝气。当宿主细胞在无血清培养基中培养时,这可以补充以细胞保护试剂,例如 pluronic F-68 以帮助防止作为曝气过程的结果的细胞损伤。取决于宿主细胞特征,微载体可以用作锚基依赖性细胞系的生长底物,或者细胞可以适合于悬浮培养(这是典型的)。宿主细胞特别是脊椎动物宿主细胞的培养可以利用多种操作方式,例如分批、进料-分批、重复的分批过程(参见 Drapeau et al (1994) cytotechnology15:103-109)、扩展的分配过程或灌流培养。虽然重组转化的哺乳动物宿主细胞可以在包含胎牛血清(FCS)的含有血清的培养基中培养,优选的是这种宿主细胞在如 Keen et al (1995)Cytotechnology17:153-163 中所公开的无血清培养基中或商业上可获得的培养基如 ProCHO-CDM 或 UltraCHO™(Cambrex NJ, USA)中培养,必要时补充能量来源例如葡萄糖和合成的生长因子例如重组胰岛素。宿主细胞的无血清培养可能需要适合于在无血清条件中生长的那些细胞。一种适应的方法是在含有血清的培养基中培养这种宿主细胞,并重复地将 80% 的培养基交换为无血清培养基,从而宿主细胞学习在无血清条件中的适应。(参见例如, Scharfenberg K et al(1995)in Animal Cell technology:Developments towards the 21st century (Beuvery E. C. et al eds), pp619-623, Kluwer Academic publishers)。

[0142] 分泌到培养基中的本发明的抗体可以使用各种技术来从培养基中回收和纯化,以提供适合于预定用途的纯度。例如,与包含治疗性抗体的培养基相比,用于治疗人类患者的本发明的治疗抗体的使用一般需要如还原 SDS-PAGE 所测定的至少 95% 的纯度,更一般地 98% 或 99% 纯度。在第一种情况下,来自培养基的细胞碎片一般使用离心、随后通过利用例如微量过滤、超滤和 / 或深度过滤的上清液澄清步骤来除去。做为选择,抗体可以通过微量过滤、超滤或深度过滤,没有在先的离心来收获。各种其他技术例如透渗析和凝胶电泳和层析技术例如羟磷灰石(HA)、亲和层析(任选的涉及例如聚组氨酸的亲亲和标签系统)和 / 或疏水性相互作用层析(HIC,参见 US5, 429, 746)是可获得的。在一个实施方式中,本发明的抗体在一些澄清步骤之后使用蛋白 A 或 G 亲和层析来捕获,随后是进一步的层析步骤,例如离

子交换和 / 或 HA 层析、阴离子或阳离子交换、空间排阻层析和硫酸铵沉淀。一般地,还采用了各种病毒去除步骤(例如,使用 DV-20 过滤器的纳滤)。在这几个步骤之后,提供了包含至少 10mg/ml 或更高例如 100mg/ml 或更多本发明的抗体的纯化的(一般单克隆的)制品,因而形成本发明的实施方式。达到 100mg/ml 或更高的浓度可以通过超速离心来产生。适当地,这种制品基本上没有聚集形式的本发明的抗体。

[0143] 细菌系统特别适合于抗体片段的表达。这种片段被细胞内地定位或处在周质中。不溶的周质蛋白质可以被提取,并根据本领域技术人员已知的方法重折叠形成活性蛋白质,参见 Sanchez et al (1999) *J. Biotechnol.* 72, 13-20 and Cupit PM et al (1999) *Lett Appl Microbiol*, 29, 273-277。

[0144] 3. 药物组合物

[0145] 如上文描述的本发明的抗体的纯化的制品(特别是单克隆的制品),可以掺入到药物组合物中,用于人类疾病和失调例如上文列出的那些的治疗。一般地,这种组合物进一步包含已知的和可接受的药物操作需要的药学上可接受的(即,惰性的)载体,参见,例如 Remingtons Pharmaceutical Sciences, 16th ed, (1980), Mack Publishing Co. 这种载体的实例包括灭菌的载体,例如盐水、Ringers 溶液或葡萄糖溶液,用适合的缓冲液例如三水乙酸钠缓冲到药学上可接受的 pH 值,例如在 5 到 8 的范围内的 pH 值。用于注射(例如,通过静脉内的、腹膜内的、皮内的、皮下的、肌肉内的或口内的)的药物组合物适当地没有可见的颗粒物质,可以包含 1mg 到 10g 的治疗性抗体,一般地 5mg 到 1g,更特别地 5mg 到 25mg、或 50mg 的抗体。这种药物组合物的制备的方法是本领域技术人员公知的。在一个实施方式中,药物组合物包含处在单位剂型中的 1mg 到 10g 的本发明的治疗性抗体,任选地与使用说明书一起。本发明的药物组合物可以是冻干的(冷冻干燥的),用于在施用之前根据本领域公知的或本领域技术人员显而易见的方法来重构。当本发明的实施方式包含具有 IgG1 同种型的本发明的抗体时,金属离子包括铜的螯合剂,例如柠檬酸盐(例如柠檬酸钠)或 EDTA 或组氨酸可以添加到药物组合物中,来降低这种同种型的抗体的金属介导的降解的程度,参见 EP0612251。药物组合物也可以包含增溶剂,例如精氨酸碱、洗涤剂 / 抗聚集试剂,例如聚山梨酸酯 80,和惰性气体例如氮气来替换小瓶顶部空间的氧气。

[0146] 用于施用本发明的抗体的有效剂量和治疗方式一般经验性地确定,取决于一些因素,例如患者的年龄、体重和健康状况,以及要治疗的疾病或失调。这些因素在看护医师的能力之内。选择合适剂量的指导可以在例如 Smith et al (1977) *Antibodies in human diagnosis and therapy*, Raven Press, New York 中找到,但一般是 1mg 到 10g。在一个实施方式中,用于治疗人类患者的给药方式是每周或每两周一次皮下地施用 1mg 到 1g 本发明的治疗性抗体,或每 1 或 2 个月静脉内输注。这种剂量相应于 0.014-140mg/kg,例如 0.014-14mg/kg。本发明的组合物也可以预防性地使用。

[0147] 4. 临床用途

[0148] 要理解的是,以提高的 β -淀粉样蛋白水平或 β -淀粉样沉淀为特征的疾病包括阿尔茨海默氏病、轻微的认知损伤、Down's 综合症、具有荷兰型 β -淀粉样变性的遗传性脑出血、脑部 β -淀粉样蛋白血管病和各种类型的退化性痴呆,例如与帕金森氏病相关的那些,渐进性的核上的麻痹、皮层基底退化和阿尔茨海默氏病的弥散 Lewis 体型。

[0149] 最优选的,特征在于提高的 β -淀粉样蛋白水平或 β -淀粉样沉淀的疾病是阿尔

茨海默氏病。

[0150] 虽然已经相对于人类疾病或失调的治疗大体上描述了本发明,本发明也可以应用于非人类哺乳动物中类似疾病或失调的治疗。

实施例

[0151] 方法

[0152] Biacore™/Biacore3000 容许利用 SPR 测量分子间相互作用的实时动力学的设备

[0153] SPR (表面等离子共振)-Biacore™ 仪器采用的、用于测量传感器芯片上物质变化的物理现象

[0154] CM5 具有用羧基甲基化的葡聚糖基质包被的通用表面的 Biacore™ 传感器芯片

[0155] ELISA 酶联免疫吸附分析

[0156] SRU 容许监视无标记的生物化学相互作用的 SRU

BIND™ Biosensor 技术

[0157] Integra CL1000 IBS Integra Biosciences 销售的迷你生物反应器

[0158] FMAT 荧光微体积分析技术(Applied Biosystems)

[0159] ABi8200 用于 FMAT 的 Applied Biosystems8200 荧光宏共焦细胞检测系统

[0160] FPLC 快速蛋白质液相层析

[0161] ProSepA HiTrap GE Healthcare 销售的用于 FPLC 的蛋白 A 柱

[0162] 材料

[0163] DMSO 二甲基亚砷

[0164] HEPES N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-(2-乙烷磺酸)

[0165] EDTA 乙二胺四乙酸

[0166] Tris HCl - 三-(羟甲基)氨基甲烷盐酸

[0167] NaCl - 氯化钠

[0168] Tween-20 - 聚氧乙烯山梨醇酐单硬脂酸酯

[0169] BSA - 牛血清白蛋白

[0170] PBS - 磷酸盐缓冲盐水

[0171] PFA - 多聚甲醛

[0172] IMS - 工业用甲醇变性酒精

[0173] DAB - 3,3'-二氨基联苯胺

[0174] DMEM dulbecco's 修饰的 eagle's 培养基

[0175] FCS 胎牛血清

[0176] Opti-MEM Invitrogen/Gibco 的基于修饰的 eagle's 培养基的培养基

[0177] Lipofectamine Invitrogen/Gibco 销售的基于阳离子脂质的细胞转染试

剂

- [0178] Transfast Promega 销售的脂质体转染试剂
- [0179] Versene 金属离子螯合剂(乙二胺四乙酸)
- [0180] Glutamax 添加到培养基的稳定形式的谷氨酰胺(二肽 L-Ananyl-L-谷氨酰胺添加剂)
- [0181] HistoClear 组织清洗试剂
- [0182] HBS-EP 缓冲液 含有 0.01M HEPES pH7.4、0.15M NaCl、3mM EDTA、0.005% 表面活性剂 P20 的通用的 Biacore™ 缓冲液

[0183] 小鼠单克隆抗体 2E7 的产生

[0184] 小鼠单克隆抗体 2E7 从常规的小鼠免疫产生。用在弗氏佐剂中配制的可溶的或聚集的 β -淀粉样蛋白 1-40 和 1-42 免疫小鼠。在没有佐剂的最后强化之后,脾细胞与骨髓瘤细胞融合。融合的细胞在 96 孔平板中生长,筛选杂交瘤上清液的潜在的线索。通过用可溶的 β -淀粉样蛋白 1-40 免疫获得的选择的抗体 2E7,是鼠 IgG2a 同种型,在如下所述的流出分析中具有 β -淀粉样蛋白结合活性,当通过 Biacore™、方法 A(i)测量时具有对 β -淀粉样蛋白 1-40 的 36.1pM 的亲合性(表 10A)。

[0185] 2E7 的表位作图

[0186] 为了精细地绘制抗体 2E7 对 β -淀粉样蛋白肽的结合,利用了肽集合(A)。肽集合(A)包括一组 31 个 12-mer 重叠肽,覆盖了 β -淀粉样蛋白 1-42 肽的完整序列。每个连续的肽在 β -淀粉样蛋白肽内的连续氨基酸处开始,从而移动连续肽之间覆盖的序列单个氨基酸。集合(A)中的所有肽含有 3 个氨基酸 C-末端接头(甘氨酸-丝氨酸-甘氨酸)和末端生物素化的赖氨酸残基。此外,除了肽 Ab1DAEFRHDSGYEVGSGK-生物素(SEQ ID NO:15)之外的所有肽是 N-末端乙酰化的。肽的第二个集合(集合(B))包括来自含 β -淀粉样蛋白序列的氨基酸 1 到 10 的肽的连续的一个氨基酸 C-末端删除。集合(B)中的所有肽含有 3 个氨基酸的 C-末端接头(甘氨酸-丝氨酸-甘氨酸)和末端生物素化的赖氨酸残基,但是具有额外的甘氨酸和丝氨酸残基来替换删除的 β -淀粉样蛋白氨基酸(表 2)。因而,集合(B)中的所有肽是相同的长度。

[0187] 表 2

[0188] 含有 β -淀粉样蛋白的截短的 N-末端的生物素化的肽(集合(B))的序列

[0189] DAEFRHDSGYGSGGSK-生物素 (SEQ ID No:7)

[0190] DAEFRHDSG--GSGGSGSK-生物素 (SEQ ID No:8)

[0191] DAEFRHDS--GSGGSGGSK-生物素 (SEQ ID No:9)

[0192] DAEFRHD--GSGGSGGSK-生物素 (SEQ ID No:10)

[0193] DAEFRH--GSGGSGGSGSK-生物素 (SEQ ID No:11)

[0194] DAEFR--GSGGSGGSGSK-生物素 (SEQ ID No:12)

[0195] DAEF--GSGGSGGSGGSK-生物素 (SEQ ID No:13)

[0196] DAE--GSGGSGGSGGSGSK-生物素 (SEQ ID No:14)

[0197] 利用 Optical Biosensors 监视 2E7 与 β -淀粉样蛋白衍生的肽的结合

[0198] 96 孔 SRU Bind™ 链霉抗生物素蛋白包被的平板(SRU Biosystems)用含有 1%DMSO 的 PBS 洗涤来除去甘油和防腐剂。50 μ l/孔的体积放置平衡到室温来提供恒定的基线。生

物素化的肽在含有 1%DMSO 的 PBS 中稀释到大约 0.3 μ g/ml, 各 50 μ l 添加到反应孔中, 孵育大约 1 小时。使用不同的平板部分制备复制的反应孔, 至少一个无肽的对照孔用于每个部分中来参考减去数据。在肽捕获之后, 平板用含有 1%DMSO 的 PBS 洗涤, 留下每孔 50 μ l 新鲜缓冲液来提供读出器上新的基线。没有看出从表面上肽的衰减。缓冲液然后用 40 μ l/孔的含有 20–60nM 的测试抗体的缓冲液替换 2 小时。发现的是, 抗体 2E7 仅仅结合肽集合 (A) (肽 Ab1, SEQ ID NO:15) 中包含 β -淀粉样蛋白肽的氨基酸 1–12 的肽。这个结果表明, 残基 1 处的天冬氨酸对于与这个肽的结合是关键的。

[0199] 为了进一步表征抗体 2E7 的结合位点, 利用了肽集合 (B)。使用 SRU BIND™ 生物传感器方法, 抗体 2E7 显示了与包含 β -淀粉样蛋白肽的氨基酸 1–3 和 1–4 的肽 (SEQ ID NO:14 和 13) 的可忽略的结合。与包含 β -淀粉样蛋白肽的氨基酸 1–7 的肽 (SEQ ID NO:10) 的结合与包含 β -淀粉样蛋白肽的氨基酸 1–12 的肽 (来自肽集合 (A)) 是可比较的。观察到与包含 β -淀粉样蛋白肽的氨基酸 1–5 或 1–6 的肽 (SEQ ID NO:12 或 11) 的结合, 但是比与包含 β -淀粉样蛋白肽的氨基酸 1–7 的肽 (SEQ ID NO:10) 的结合更弱。

[0200] 因而显示的是, 如使用这种方法测量的, 仅 β -淀粉样蛋白肽的残基 1–7 是完全结合所需的。

[0201] 表面等离子共振分析

[0202] 除了如上所述的实验, Biacore™3000 光生物传感蛋白被用于监视 2E7 抗体与选定的 β -淀粉样蛋白序列衍生的肽的结合。通过将高达 64nM 的测试抗体在独立的链霉抗生物素蛋白芯片表面上捕获的肽上注射 5 分钟 (130–230RU (共振单位)), 来测量结合。含有 0.01M HEPES pH7.4、0.15M NaCl、3mM EDTA 和 0.005% 表面活性剂 P20™、25°C 的运行缓冲液 (HBS-EP) 在 20 μ l/分钟的流速下使用。所有的运行相对于空白链霉抗生物素蛋白表面和空白注射来双重参考。使用 Biacore™ 分析软件 BIAevaluation™ 版本 4.1 进行分析。集合 (A) 中选定的肽的结果进一步确认了 SRU BIND™ 得出的数据, 表明 2E7 仅与包含 β -淀粉样蛋白肽的氨基酸 1–12 的肽 (SEQ ID NO:15) 以大约 50pM 的表观平衡常数 KD 结合。在相同的条件下, 2E7 不结合包含 β -淀粉样蛋白肽的氨基酸 2–13 的肽。

[0203] 肽 A 2–13 AEFRHDSGYEVHSGK-生物素 (SEQ ID No:44)

[0204] 使用的实验方法和条件容许检测高的以及更低亲和性的分子——在相同的实验设置中, 通过与 2E7 对比, 识别 β -淀粉样蛋白肽的 N-末端表位的另一个抗体显示了以 7nM 的表观 KD 结合 2–13 肽 (SEQ ID NO:44)。2E7 不结合来自 β -淀粉样蛋白肽的中央区域的集合 (A) 中的肽的选集。在独立的实验中, β -淀粉样蛋白 1–40 肽经由它的被生物素化的 N-末端天冬氨酸残基被捕获。这种肽被捕获在如早先描述的 Biacore™ 链霉抗生物素蛋白包被的芯片上。在 66nM 注射 1 分钟的抗体 2E7 不能结合这种肽。因而, 断定的是, 早先描述的 N-末端结合位点被接头和捕获方法所屏蔽, 因而进一步确认了尽头的 N-末端含有核心结合位点。

[0205] 与表达淀粉样蛋白前体蛋白 (APP) 的细胞的结合

[0206] β -淀粉样蛋白由肽组成, 所述肽通过称为淀粉样蛋白前体蛋白 (APP) 的 I 型跨膜前体蛋白的蛋白水解裂解形成。APP 具有大的细胞外结构域, 与这个蛋白质的结合可以潜在地启动抗体依赖性细胞毒性反应 (ADCC)。

[0207] 为了表征抗体与细胞表面全长 APP 的结合, 利用了基于 FMAT™ABI8200 的分析。

[0208] 使用野生型 APPDNA 的 HEK293T 细胞的转染

[0209] HEK293T 细胞维持在含有 10% (v/v) FCS 和 1×Glutamax 的 DMEM F12 培养基中。细胞播种到 75cm² 组织培养烧瓶中,并在转染之前生长到 60-80% 汇合 (18-24h)。为了转染, 9 μg 的 DNA (野生型 APP DNA (在 PCDNA3.1 (Invitrogen) 载体中), 或仅载体的对照) 与 0.3ml 的 Opti-MEMTM 介质混合。30 μl LipofectamineTM 转染试剂与 0.3ml Opti-MEMTM 介质混合,集中两种混合物。在添加进一步的 4.8ml Opti-MEMTM 介质之前,在室温下孵育集中的混合物 30 分钟。最终的混合物添加到细胞(用 Opti-MEMTM 介质洗涤之后) 5 小时,然后添加 6ml 的 DMEM 中的 10% (v/v) 新生小牛血清。转染后 48 小时,除去上清液,在凡尔生中洗涤单层,然后将 3ml 的 VerseneTM 螯合剂添加到每个烧瓶,在 37°C 孵育 5 分钟,脱离的细胞在 200g 团化 5 分钟。产生的细胞团粒轻轻地重悬浮在 1ml 分析缓冲液 (2% 热处理的血清, 0.5%BSA, PBS pH7.4 中的 0.1%NaN₃、通过 0.2 μm 滤过滤器过滤) 中来产生单细胞悬浮液。

[0210] 基于 FMATTMABI8200 的分析

[0211] 测试抗体 (2E7、LN27 (Zymed) 针对 APP 的细胞外结构域的小鼠 IgG 作为阳性对照, 识别 β-淀粉样蛋白肽的 x-40 形式的抗体 G210 作为阴性对照) 在聚丙烯平板中无菌过量的分析缓冲液 (2% 热处理血清、0.5%BSA、PBS pH7.2 中的 0.1%NaN₃) 中稀释到 10 μg/ml, 然后在沿平板向下进行六个系列的 1:1 稀释。仅分析缓冲液被用作空白物。50 μl 的用野生型 APP DNA 转染的 HEK293T 细胞的悬浮液 (实验 1:10,000 个细胞; 实验 2:20,000 个细胞) 被添加到 96 孔平板的每个孔中, 向其中每种抗体溶液的 5 μl 被添加到双份的孔中。50 μl/孔的 F-MATTM 蓝色抗小鼠 IgG 储备物, (抗体使用来自 ABI, 4328408 的 F-MATTM 蓝色单官能活性染料试剂盒标记), 在分析缓冲液中稀释 1:500 (实验 1) 和 1:1000 (实验 2), 然后添加到每个孔中, 简短地摇动平板, 静置沉淀 1 小时。平板然后使用 ABI8200 荧光宏共焦细胞检测系统 (Applied Biosystems) 来读取。

[0212] 得到的计数数据然后使用 ExcelTM 电子表格软件来解释。简要地, 模拟转染的计数从全长 APP 转染的细胞计数中减去, 来获得每种抗体的特异的信号。选择处在线性部分的两种抗体浓度 (1.25 和 0.63 μg/ml), 在这些浓度下背景噪声校正的得到的计数被表示为 LN27 抗体结合的百分比, 在两个抗体浓度上平均。产生的数据中表 3 中描述 (LN27 结合的 %±SE)。

[0213] 因而, 在这个分析系统内, 2E7 与细胞表面 APP 的结合不能与阴性对照抗体 G210 的区分。

[0214] 表 3

[0215]

抗体	实验 1	实验 2
LN27	100.0±7.1	100.0±4.7
G210	5.5±1.3	2.0±1.6
2E7	9.9±3.7	2.2±1.4

[0216] 与淀粉样蛋白前体蛋白质衍生的肽的结合

[0217] 早先描述的表面作图研究显示了, 抗体 2E7 结合 β-淀粉样蛋白肽的尽头的 N-末

端,在位置 1 的天冬氨酸残基是结合必需的。这表明,抗体识别由 β -分泌酶位点处的 APP 裂解所形成的“新”表位。这个观察结果表明,抗体 2E7 应当不识别邻近的 APP 肽序列。为了测试这个假说,合成了 APP 肽(肽 APP1,SEQ ID NO:16),其包括 β -淀粉样蛋白肽的残基 1-7 和五个邻近的 APP 衍生的氨基酸。因而,肽 APP1 含有从 BACE-1 裂解位点的 N-末端的位置 5 到 BACE-1 裂解位点的 C-末端的位置 7 的连续氨基酸,并且被 N-末端乙酰化。抗体 2E7 结合 APP 衍生的肽 APP1 和 β -淀粉样蛋白 1-12 肽(肽 Ab1)的能力使用 Biacore™ 方法来比较(如早先对表位作图所描述的)。抗体 2E7 显示了对 β -淀粉样蛋白肽 Ab-1 的高亲和性,其含有基础表位 1-7。然而,对于也含有基础 β -淀粉样蛋白衍生的序列 1-7 的 APP1 肽没有观察到结合。

[0218] 肽 A 1 DAEFRHDSGYEVGSGK-生物素 SEQ ID No:15

[0219] APP1 AcNH-SEVKMDAEFRHDGSGK-生物素 SEQ ID No:16

[0220] 基于 FMAT™ 的细胞结合和基于 Biacore™ 的肽作图的组合已经被利用来显示,在这些形式中,2E7 对全长 APP 蛋白没有结合亲和性。假定 β -淀粉样蛋白肽的位置 1 处的天冬氨酸残基是结合必需的,断定的是,2E7 仅仅识别 β -淀粉样蛋白的“新”N-末端,因此应当不识别细胞表明表达的 APP。

[0221] 体内生物学活性

[0222] I¹²⁵ β -淀粉样蛋白流出模型

[0223] 许多公开的研究显示了, β -淀粉样蛋白抗体可以与血流中的 β -淀粉样蛋白肽形成复合物。争论的是,这种外周 β -淀粉样蛋白的收缴容许 CNS 淀粉样蛋白向血流的进一步的流出(DeMattos RB,PNAS (2001),98 (15);8850-8855)。开发了急性的药物动力学模型来筛选抗体与血流中脑衍生的 β -淀粉样蛋白肽复合的能力。

[0224] 麻醉(4%异氟烷)中雄性 C57/BL6J 小鼠中进行,在 100% 氧气中维持(1.5%异氟烷)。动物然后置于立体定位框架中。在沿着矢状缝中线切开之后,孔眼被钻通颅骨,导引套管被插入到侧面脑室中(共-纵座标前后(AP)-0.5mm,侧面(L)+0.7mm,腹面(V)-2.5mm)。进一步的两个孔眼被钻通颅骨,在其中放置皮层螺丝。套管通过氰基丙烯酸酯凝胶锚定就位,围绕氰基丙烯酸酯凝胶头帽缝合切口。手术后,小鼠皮下地接受 0.3ml 盐水,置于温暖环境中来从麻醉中恢复。在正位反射恢复时,小鼠被单独地置房,接受 5 天的标准术后照料。进一步的 5 天不允许操作,直到恢复术前体重。在恢复之后,通过血管紧张素 II 饮用反应验证套管位置。每只小鼠接受 100ng 血管紧张素 II (AII)(在 0.9%盐水中制成)侧脑室内的(ICV)施用(5 μ l)。在施用 AII 之后,观察水摄取 15 分钟。具有对 AII 的阳性致渴反应的小鼠(持续饮用)被包括在研究中,其不快于 AII 注射后五天开始。

[0225] 在研究的当天,小鼠置于温暖环境中 5-10 分钟来诱导血管舒张,是便于向尾静脉注射所必需的。测试抗体(600 μ g)或 PBS 媒介物(剂量体积不大于 10ml 每 kg 体重)经由尾静脉注射,小鼠在注射后返回它们单独的笼子中。在尾静脉注射后精确的 1 小时之时,小鼠用 2ng (1 μ Ci)的 I¹²⁵ β -淀粉样蛋白 1-40 (Amersham Biosciences,UK))慢慢地 ICV 注射(2 μ l 每分钟),5 μ l 的剂量体积。在 ICV 剂量之后精确地四小时,采集 50 μ l 的大血管血液,在闪烁计数器上测量放射性水平。

[0226] 用 2E7 注射到尾静脉内的小鼠(每个处理组 n=6)显示了在 50 μ l 大血管血液中放射性信号的统计学上显著的增加(每分钟计数 -CPM),与在媒介物注射的小鼠中检测的信号

相比(CPM-媒介物 =1339.7±496.2496.2vs. 2E74387.9±980.3 ;ANOVA:F (2, 13)=4.97, p<0.05. Post-hoc LSD :p=0.012E7vs. 媒介物 [post-hoc Duncans :p=0.022E7vs 媒介物])。

[0227] 在使用 2E7 用相同的方案的两个进一步的研究中, 当与媒介物注射的对照相比时, 观察到流出到血液中的淀粉样蛋白方面的相似的提高(CPM 血液:媒介物 352+/-113 对比 2E72397+/-353, 和媒介物 1281+/-312 对比 2E75291+/-885 ;post-hoc LSD 测试的 ANOVA p<0.001vs. 媒介物)。

[0228] 转基因的 CNS β - 淀粉样蛋白降低模型

[0229] 1. 2 月龄 TASTPM 小鼠的 4 周给药后的 β - 淀粉样蛋白载荷

[0230] 雌雄 TASTPM 转基因小鼠(双重突变体 APP^{swe}×PS1.M146V, Howlett DR (2004) Brain Research1017 (1-2) 130-136) 在研究开始时年龄在 61 和 65 天之间, 独立地置房。相同数量的小鼠被分配到每个处理组(每个组 N=12) 中, 根据性别和年龄随机化。处理组包括以下的:A :MOPC21 (具有未知特异性的抗体, Holton et al (1987) J. Immunol139 (9) 3041-3049, 阴性对照), B :2E7 (测试抗体)。所有的抗体溶于 PBS 中, 通过腹膜内的途径给药。不考虑动物体重, 施用 300 μ g 的抗体。动物每周两次给药持续四周。最后的剂量之后一天, 动物通过使用戊巴比妥钠过量给药来处死。脑进行解剖并切成对半。切成对半的脑样品收集到预先称重的 2ml eppendorfTM 试管中, 并突然冷冻。样品随后解冻, 重新称重, 添加含有 Complete protease inhibitorTM 片剂(Boehringer Mannheim) 的 1ml5M 胍 HCl, 之后样品进行匀化, 并在 4°C 孵育 >90 分钟, 伴随稳定搅动。

[0231] 样品在分析缓冲液(50mM Tris HCl, pH7.4, 150mM NaCl, 0.05%Tween-20+1%BSA) 中 1 比 10 稀释, 在 4°C 在 20,000G 涡旋和旋转 20 分钟。除去上清液, 作为三份的样品添加到分析平板上。

[0232] A β 40 和 A β 42 的水平使用基于电化学发光免疫分析(BioVerisTM) 的感光平板、采用 OritagTM 特异性标记来标记的 C- 末端特异性 β - 淀粉样蛋白抗体(针对 A β 40 或 A β 42) 用于捕获 A β 40 或 A β 42, 以及生物素化的 N- 末端特异性 A β 抗体, 来测量。抗体-A β 复合物使用结合生物素化的抗体(DynabeadsTM, Dynal) 的链霉抗生物素蛋白包被的珠子来捕获, 伴随强力混合在室温下孵育过夜, 在 BioVerisTMM8 光检测器中分析。使用在含有所需浓度的胍 HCl 的分析缓冲液中的人类 A β 40 和 A β 42 肽构建标准曲线。使用 Excel RobosageTM 统计分析软件分析数据, A β 水平表示为 pmole/g 组织。

[0233] 在这个范例中, 使用 2E7 抗体处理降低了 CNS A β 42 载荷达 37%(p<0.001), 和 CNS A β 40 达 23% (p<0.001)。

[0234] 在随后在相似实验条件下的研究中, 当与 PBS 处理的动物相比时, 2E7 抗体降低了 CNS A β 42 载荷达 38% (研究 1, 仅雄性)、22% (研究 2, 非显著的) 和 39% (研究 3, 雄性, p=0.001) 和 13% (研究 3, 雌性, 非显著的)。在这些研究中, 当与 PBS 处理的动物相比时, 2E7 还降低了 CNS A β 40 达 18% (研究 3, 雄性, p=0.017), 并提供了 CNS 中 A β 40 的非显著降低达 25% (研究 1, 仅雄性), <1% (研究 2) 和 3% 的非显著的提高(研究 3, 雌性)。

[0235] 2. 4 月龄 T A Σ T I I M 小鼠的 4 个月给药后的 β - 淀粉样蛋白载荷

[0236] 简要地, 4 个月龄的 TASTPM 转基因小鼠经由腹膜内(i. p.) 途径每周一次或两次给药 300 μ g 抗体。在 4 个月的给药之后, 通过 ELISA 测量 CNS β - 淀粉样蛋白水平, 通过免疫组织化学测量斑块载荷。在 4 个月和 8 个月龄之间, CNS β - 淀粉样蛋白载荷指数地提高,

因而,斑块病理快速地发展(Howlett DR (2004) Brain Research 1017 (1-2) 130-136)。

[0237] 小鼠在研究开始时年龄在 120 和 128 之间,独立地置房。相似数量的小鼠被分配到每个处理组(每个组 N=20 或 21)中,根据性别和年龄随机化。处理组包含以下的:A:每周两次 PBS (媒介物) 给药, B:每周一次 2E7 给药, C:每周两次 2E7 给药, D:每周一次 PBS 给药。300 微克剂量(79 微升体积)的 2E7 经由腹膜内的途径施用。媒介物处理的动物接受相同体积的 PBS。动物给药持续十八周。TASTPM 小鼠容易遭受自发的发作,作为结果,许多动物在研究的过程中死亡。最后的数量如下:A:4 只雌性,9 只雄性;B:5 只雌性,8 只雄性;C:4 只雌性,9 只雄性;D:2 只雌性,9 只雄性。在最后的给药后两天或四天(每个组相等的数量),通过用戊巴比妥钠过量给药来处死动物。来自每个小鼠的尾部尖端样品被采集用于基因型的确认。脑进行解剖并切成对半。右侧半球通过在 4% 多聚甲醛中浸入来固定,并为组织学进行加工。左半球收集到预先称重的 2ml eppendorf™ 试管中,在干冰上冷冻,保存在 -80℃ 用于淀粉样蛋白含量的随后的分析。在分析之前,样品被解冻,重新称重,添加含有 Complete protease inhibitor™ 片剂(Boehringer Mannheim)的 1ml 的 5M 胍 HCl,之后样品进行匀化,在 4℃ 孵育 >90 分钟,伴随稳定的搅动。

[0238] 样品在分析缓冲液(50mM Tris HCl, pH7.4, 150mM NaCl, 0.05%Tween-20+1%BSA)中 1 比 10 稀释,在 4℃ 在 20,000G 涡旋和旋转 20 分钟。上清液进一步 1:1000 稀释,作为三份的样品添加到分析平板上。

[0239] 对于 4 周的给药研究,测量 A β 40 和 A β 42 的水平。

[0240] 使用变量分析,包括在模型中的处理、性别和给药时间表作为固定的影响。还包括了在三种因素之间的所有的相互作用。在两个给药时间表(每周一次或两次)之间没有显著差异。使用这种实验设计,首先可以评估在给药时间表之间是否存在任何显著的差异,其次,由于没有这种显著差异,来自两个给药时间表的数据可以组合,因而通过加倍分析中的小鼠的数目来提高实验的能力。

[0241] 在这个范例中,用 2E7 抗体处理降低了 CNS A β 42 载荷达 22.5%(p=0.0152)。CNS A β 40 的水平也降低了达 12.1%,但是这个数字没有达到统计显著性(p=0.118)。

[0242] 进行了这些样品的复杂的免疫组织化学分析来确定显示了斑块病理的脑组织的区域。切片取自在有尾的水平上的皮层,和取自在海马的水平上的皮层。邻近的切片用 A β 40 或 A β 42 特异性抗体染色,或作为选择用淀粉样蛋白染料 Congo Red 来染色。使用图像分析软件,对斑块染色的切片的面积被表示为总切片面积的百分比。

[0243] 在固定之后,PFA 浸没的一半脑冠形地切入脑基质中成为 6×2mm 的厚切片。这些 2mm 切片将被称为切片 A 到 F, A 是最靠近嘴的, F 是最为尾部的。切片 A、B&C 和 D、E&F 被置于为每只动物编号的独立的包埋盒中。盒在 PFA 中保持,直到准备加工和包埋。

[0244] 在 Citadel™1000 (Shandon) 组织处理器上进行包埋。所有组织接受以下的加工方式:

[0245] 70%IMS - 1 小时

[0246] 100%IMS - 3x1 小时

[0247] 100%乙醇 - 2 小时

[0248] 100%异丁醇;1x2 小时;1x1.5 小时

[0249] HistoClear™ - 2x1.5 小时

[0250] Paraffin wax - 2x2 小时

[0251] 在加工过程完成时,将蜡浸透的组织切片转移到熔化的石蜡填充的基底模具,利用 Histocentre™ (Shandon)石蜡包埋系统来包埋。组织进行包埋,使得切片 A、B&C 进入一个模具 ;D、E&F 进入第二个模具。对所有的切片组进行这个,即,每个切成对半的脑产生各三个切片的两蜡块。切片置于模具中,使得每个片的尾侧表面成为将来的切削表面。小心以确保每个切片很好地推压到模具中,使得每一个的显微切片将平行地发生。然后将穿孔的加工盒小心地置于每个模具上,然后将其用熔化的蜡封顶。包埋的方块然后在冷却平板上冷却,直到它们可以从模具上取出。方块在室温下保存直到显微切片所需时。方块进行随机切割,5 微米切片漂浮在预先标记的胶质包被的载玻片 (Superfrost™, Erie Scientific Company) 上。两个切片漂浮在每个载玻片上。只要可能,安装连续的切片,载玻片从 1 到 25 连续地计数。从每个方块采集五十个切片 (25 个载玻片)。载玻片在加热板上干燥,然后在室温下保存直到需要时。

[0252] 对 30 个载玻片的组进行免疫组织化学。在每个载玻片上,用 A β 40 抗体标记顶部切片 (G30, 识别 x-40 β - 淀粉样蛋白的兔多克隆的), 下部切片使用 A β 42 抗体, 20G10, 是识别 X-42 β - 淀粉样蛋白的单克隆抗体。标记每个方块每种抗体至少 5 个切片。

[0253] 如下进行标记。在通过 HistoClear 和梯度酒精脱蜡之后,切片浸入 85% 甲酸中 8 分钟,然后在 0.3% 过氧化氢中阻断 30 分钟来阻断内源的过氧化物酶。抗体 G30 和 20G10 都以 1:1000 稀释度施加过夜,切片保持在 4°C。切片的发展是使用相应的生物素化的抗兔和抗小鼠二级抗体。颜色发生使用二氨基联苯胺盐酸盐染色试剂盒 (DAB™, Vector Labs) 实现。切片在脱水之前用 Mayer's 苏木色素简短地复染,清洗并盖片。

[0254] 在显微镜检查之前,切片保持干燥至少 48 小时。图像在装备有数字式照相机 Leica DMRB™ 显微镜上捕获。图像使用 Qwin™ 软件 (Leica) 分析,结果作为 A β 抗体标记的截面积的 % 来呈现。

[0255] 使用变量分析,包括在模型中的处理、性别和给药时间表作为固定的影响。还包括了在三种因素之间的所有的相互作用。在两个给药时间表 (每周一次或两次) 之间没有显著差异。使用我们种实验设计,我们首先可以评估在给药时间表之间是否存在任何显著的差异,其次,由于没有这种显著差异,来自两个给药时间表的数据可以组合,因而通过加倍分析中的小鼠的数目来提高实验的能力。

[0256] 在这个范例中,用 2E7 抗体处理降低了斑块病理,如使用识别 A β 42 的抗体所测量的。在皮层中在海马的水平上,斑块病理降低达 27.1% ($p=0.0026$),在皮层中在尾的水平上达 43% ($p<0.0001$)。当使用识别 A β 40 的抗体测量时,斑块病理也降低了。在皮层中在海马的水平上,斑块病理降低达 16.6% ($p=0.0421$),在皮层中在尾的水平上达 17.3% ($p=0.0342$)。

[0257] 在用媒介物或 2E7 处理的、来自这项研究的任何小鼠中,没有观察到微出血的增加。这种方法通过产生不溶的蓝色化合物显现三价铁 (铁是红细胞中存在的携氧血红蛋白的主要成分)。来自所有动物的脑的各个水平都是清澈的。

[0258] 认识模型

[0259] 在如上所述的 4 月龄 TASTPM 小鼠的 4 个月给药之后,在两种认知模型中测试这些小鼠:目标识别分析和恐惧条件分析。

[0260] 目标识别分析

[0261] 目标识别分析采用了动物探索新物体的天然的倾向,并依靠动物回想早先探索过的物体(熟悉的物体)的能力。八个月龄的 TASTPM 小鼠已经被报道展现了区分新的和熟悉的物体的能力的缺陷(Howlett et al., 2004),表明这些动物中受损的认知能力。然而,在这项研究中,用媒介物处理的 8 月龄的 TASTPM 小鼠没有展现认知损伤,即,它们能够区分新的和熟悉的物体。因而,没有窗口来研究由 2E7 处理引起的任何潜在的治疗效果。

[0262] 恐惧条件分析

[0263] 恐惧条件模型被设计以测试动物将早先的痛苦刺激与环境或辅助信号相关联的能力,以及在 Xh 延迟之后给予相同的环境或音调回想这一点的能力。在这项研究中,用媒介物处理的 8 个月龄的 TASTPM 小鼠(每周一次或两次)展现了环境区分方面的不足,指示了这些动物中的认知损伤。当两周一次施用,这种不足不受 2E7 处理的影响。

[0264] 6 月龄 TASTPM 小鼠的 4 个月给药

[0265] 这项研究涉及向 TASTPM 小鼠施用 2E7 (每周两次, 300 μ g i. p.) 4 个月,在 3 月龄开始。对照动物接受 PBS 中的 IgG2A。如上所述,脑被解剖并切成对半。右侧半球通过在 4% 多聚甲醛中浸入来固定,并为组织学进行加工。左半球收集到预先称重的 2ml eppendorf™ 试管中,在干冰上冷冻,保存在 -80°C 用于淀粉样蛋白含量的随后的分析。

[0266] 来自脑样品的随机选集的每一个的单个切片通过 IHC 的初步分析(n=6 媒介物, n=7 2E7 处理的组)使用如上述相同的一般方案来进行。统计分析(Student's t- 测验)显示,在用 2E7 给药的小鼠中,在丘脑中(71.9%, p=0.007)和在丘脑+皮层+海马中(54.1%, p=0.022)有 A β 42 斑块载荷的显著降低,在 A β 40 方面没有显著变化。

[0267] 对于脑 A β 40 和 A β 42 的生物化学测量,如上述地加工和测量样品(稀释因数 1:10,000)。在用 2E7 给药的小鼠中(n=12 对照, n=16 处理的),A β 42 显著地降低 29.9% (p=0.01)。A β 40 浓度也降低了(22.6%),但是这种降低没有达到统计显著性(p=0.052)。

[0268] 杂交瘤可变区的克隆

[0269] 可变区序列

[0270] 从 2E7 杂交瘤细胞提取总 RNA,然后通过逆转录和聚合酶链式反应(RT-PCR)产生重链和轻链可变区 cDNA 序列。RT-PCR 的正向引物是特异于鼠免疫球蛋白基因前导区序列的简并引物的混合物,反向引物特异于抗体恒定区,在这种情况下,重链是鼠同种型 IgG2a,轻链是鼠的 kappa。根据 Jones and Bendig (Bio/Technology 9:88, 1991) 描述的策略设计引物。对于两个 V 区域序列一式两份进行 RT-PCR,以允许随后正确的 V 区序列的证实。通过 RT-PCR 产生的 V 区域产物被克隆(Invitrogen TA Cloning Kit),获得序列数据。

[0271] 2E7V_H 氨基酸序列 (SEQ ID No:17)

[0272] EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAVSGFTFSDNGMAWVRQAPRKGPWEIAFISNLA

[0273] YSIDYADTVTGRFTISRDNKNTLYLEMSSLRSEDTAMYCVSGTWFAYWGQGTLLV

[0274] TVSA

[0275] 2E7V_H DNA 序列 (SEQ ID No:18)

[0276] GAGGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCC

[0277] TGAAACTCTCCTGTGCAGTCTCTGGATTCACTTTCAGTGACAACGGAATGGCGT

[0278] GGGTTCGACAGGCTCCAAGGAAGGGCCTGAGTGGATAGCGTTCATTAGTAAT

- [0279] TTGGCATATAGTATCGACTACGCAGACACTGTGACGGGCCGATTACCCATCTCT
 [0280] AGAGATAATGCCAAGAATACCCTGTACCTGGAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAG
 [0281] GACACGGCCATGTACTATTGTGTAAGCGGGACCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAA
 [0282] GGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA
 [0283] 2E7_L 氨基酸序列 (SEQ ID No:19)
 [0284] DVVLTQTPLSLPVSLGDQASISCRVQSLLHSNGYTYLHWYLVKPGQSPKLLIYKVS
 [0285] NRFSGVPDRFSGSGSDFTLTKISRVEAEDLGVIYFCSQTRHVPYTFGGGTKLEIK
 [0286] 2E7_L DNA 序列 ((SEQ ID No:20)
 [0287] GATGTTGTGCTGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAA
 [0288] GCCTCCATCTCTTGCAGAGTTAGTCAGAGCCTTTTACACAGTAATGGATACACCT
 [0289] ATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACA
 [0290] AAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAG
 [0291] GGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTT
 [0292] TATTTCTGCTCTCAAAGTAGACATGTTCCGTACACGTTCCGAGGGGGACCAAG
 [0293] CTGGAAATAAAA
 [0294] 互补决定区 (CDR) 在氨基酸序列中是下划线的。
 [0295] 2E7 嵌合体的克隆和表达

[0296] 产生由移植到重链的人类 IgG1 (Fc 突变的, (L235A, G237A)) 或轻链的人类 kappa 区域的亲本鼠的 V 区域组成的嵌合 2E7 抗体 (2E7c), 以表达重组抗体材料, 其可以用于确认功能性的鼠 V 区域的正确克隆。编码 2E7 鼠重链和轻链 V 区域的 DNA 和内源的鼠信号序列按阅读框克隆到分别已经含有人类恒定区 (IgG1Fc 突变的 (L235A, G237A) 或人类 C kappa) 的哺乳动物表达载体 RLD-bshe (用于重链) 和 RLN-bshe (用于轻链) 中。

- [0297] 用于重链表达的 RLD-bshe 表达载体的元件:
 [0298]

	碱基对	DNA 片段的描述
	0-1014	启动子 (SV40/RSV)
	1015-2442	抗体重链
[0299]	2443-2765	Poly A
	2766-3142	BG 启动子
	3239-3802	DHFR
	3803-4162	Poly A
	4163-6322	总主干
	5077-5937 (互补链)	β 内酰胺酶

[0300] (以上给出的元件的位置和载体的总尺寸仅是例示的目的, 将取决于抗体链插入物的大小)。

- [0301] 用于轻链表达的 RLN-bshe 表达载体的元件:
 [0302]

碱基对	DNA 片段的描述
0-1014	启动子 (SV40/RSV)
1015-1731	抗体轻链
1732-2051	Poly A
2388-2764	BG 启动子
2774-3568	新霉素
3569-3876	Poly A
3877-6063	总主干
5077-5937 (互补链)	β 内酰胺酶

[0303] (以上给出的元件的位置和载体的总尺寸仅是例示的目的,将取决于抗体链插入物的大小)

[0304] 具有正确地克隆的 V_H 和 V_L 序列的克隆被鉴定,准备质粒用于在悬浮培养 CHO 细胞中表达。表达的 2E7 抗体通过在 FPLC 系统上的蛋白 A 层析从细胞培养上清液中纯化,然后通过 ELISA 和利用 Biacore™ 技术的 SPR 测试与 $A\beta$ 的结合。结果表明,克隆并表达了正确的 2E7 小鼠 V 区域,产生了具有与亲本鼠抗体 2E7 相似特征的功能性抗体。

[0305] 轻链人源化

[0306] 具有 Genpept ID CAA51135 (SEQ ID NO:24)和 Genbank Accession No X72467 的人类接受体序列,其具有氨基酸水平上 77% 的同一性(包括 CDR)被选择作为接受体框架。构建体 L1 是来自 2E7VL 结构域的鼠 CDR 进入这个接受体框架的移植物。

[0307] 重链人源化

[0308] 与 2E7 小鼠可变重链区域在氨基酸水平上具有 74% 的同一性(包括 CDR1 和 2)的 VH3-48 基因的等位基因,人类序列 Genbank 登记号 No M99675(SEQ ID NO:21),与人类 JH4 迷你基因一起,被选择作为人类重链接受体框架。根据 M99675 序列和 JH4 设计三个人源化可变重链变体。H1 是使用 Kabat 定义在位置 93 和 94 具有两个另外的框架回复突变的鼠 CDR 的移植物。H2 和 H3 都来自 H1,但是包括一个另外的框架突变,其在每个构建体中是不同的(分别是位置 24 和 48,参见表 4)。

[0309] 表 4

[0310]

构建体	模板 框架	残基 (Kabat#)	人类	小鼠
H1	M99675 和 JH4	93,94	分别是 A 和 R	分别是 V 和 S
H2	H1	24	A	V
H3	H1	48	V	I

[0311] 人源化的重链和轻链 DNA 的构建

[0312] 通过构建重叠寡聚物和 PCR 扩增从头合成人源化的 V 区域。包括了用于克隆到哺乳动物表达载体 RLD-bshe 和 RLN-bshe 中的限制性位点以及来自选定的人类接受体框架的人免疫球蛋白信号序列。然后, 编码人源化 V 区域(H1 (SEQ ID NO :27)、H2 (SEQ ID NO :29)、H3 (SEQ ID NO :31)、L1 (SEQ ID NO :33)) 的 DNA 与信号序列和限制性位点一起按阅读框克隆到哺乳动物表达载体中 ;H1、H2 和 H3 克隆到 RLD-bshe 中来产生编码各含有突变 L235A 和 G237A 的三个全长人类 IgG1Fc 突变的重链、全长 H1(SEQ ID NO :35)、全长 H2(SEQ ID NO :37) 和全长 H3 (SEQ ID NO :39) 的 DNA ;L1 按阅读框克隆到含有编码人类 kappa 恒定区的 DNA 的 RLN-bshe 中, 产生编码全长人类 kappa 轻链的 DNA (SEQ ID NO :41)。

[0313] 人源化重链和轻链抗体组合的代表的实例

[0314] 在 6 孔平板中, 使用所有组合的人源化轻链和重链 DNA 构建体, CHOK1 细胞以小规模短暂地转染 ;L1+H1、L1+H2、L1+H3(SEQ ID NO :35+41、37+41、39+41)。在具有 5% 极低 IgG 胎儿牛血清和 2mM 谷氨酰胺的 DMEM F12 中传代的 CHOK1 细胞在 6 孔平板上生长到汇合。汇合细胞用 Optimem Glutamax 介质(Invitrogen) 中的总共 7.5 μ gDNA :30 μ gTransfast 脂质(Promega) 来转染。转染的细胞在 5%CO₂、37°C 下孵育。在 72 小时, 收获上清液, 分析抗体浓度, 然后通过 ELISA 测试与人类 A β 的结合。与三种人源化重链组合的人源化的 L1 都表达结合人类 A β 的完整抗体。

[0315] 人源化的抗体也使用 DNA 的脂质体递送(例如, TransFast (Promega)) 在大规模短暂的 CHOK1 细胞转染中表达, 并在培养瓶中表达。对于在短暂转染中表达水平的优化, 使用重链比轻链表达载体 DNA 比例 1 :6。来自短暂的转染的材料使用 ProSepA 柱或具有 ProSepA HiTrap 柱的 FPLC 来纯化。

[0316] 2E7 人源化变体 H1L1、H2L1 和 H3L1 在 β -淀粉样蛋白结合 ELISA 中的评估

[0317] 评估 2E7H1L1、H2L1 和 H3L1 人源化变体与 C 末端生物素化的人类 A β 肽(1-40) 的结合。嵌合的 2E7 被用作参考。表 5-7 显示了来自大规模短暂转染的各个批次的纯化材料的结果。

[0318] 表 5

[0319]

ELISA	MAb	EC ₅₀ (μ g/ml)	标准误差
A β 结合	2E7c 嵌合体	0.033	0.00144
	H1L1	0.035	0.00142
	H2L1	0.048	0.00202
	H3L1	0.044	0.00105

[0320] 表 6

[0321]

ELISA	MAb	EC ₅₀ (μg/ml)	标准误差
Aβ 结合	2E7c 嵌合体	0.043	0.00183
	H1L1	0.051	0.00164
	H2L1	0.044	0.00191
	H3L1	0.055	0.00094

[0322] 表 7

[0323]

ELISA	MAb	EC ₅₀ (μg/ml)	标准误差
Aβ 结合	2E7c 嵌合体	0.044	0.00169
	H1L1	0.047	0.00265
	H2L1	0.041	0.00174
	H3L1	0.040	0.00116

[0324] 这些结果表明了 2E7 衍生的人源化变体的每一种的非常相似的 Aβ 结合分布型。与 2E7c 的 EC₅₀ 值的比较显示了通过人源化过程引起 Aβ 结合活性的微小损失。

[0325] 通过竞争性 ELISA 的 2E7 人源化变体的比较

[0326] 在竞争性 ELISA 中评估了 2E7c 嵌合的和人源化抗体 H1L1、H2L1 和 H3L1 它们抑制人类 Aβ 肽和亲本小鼠 2E7MAb 之间的结合的能力。

[0327] 建立了两种类型的竞争性 ELISA, 以比较三种人源化变体与 2E7 嵌合抗体相比的 Aβ 结合活性。

[0328] 1) 固定的 β-淀粉样蛋白; 生物素化的人类 Aβ 肽(1-40)通过链霉抗生物素蛋白固定在 ELISA 平板上。小鼠 2E7 抗体以固定浓度添加, 连同着 2E7 衍生的人源化变体抗体的稀释度系列。然后用抗小鼠 IgG 共轭物检测结合的小鼠 2E7。表 8 显示了两个分析的结果。

[0329] 表 8

[0330]

竞争 MAb	实验 1		实验 2	
	IC ₅₀ (μg/ml)	标准误差	IC ₅₀ (μg/ml)	标准误差
2E7c 嵌合体	1.31	0.20	1.29	0.13
H1L1	1.62	0.40	1.76	0.21
H2L1	1.28	0.26	1.66	0.28
H3L1	1.53	0.16	1.39	0.23

[0331] 2) 溶液中的 β-淀粉样蛋白; 固定浓度的 β-淀粉样蛋白与人源化 2E7 抗体变体

的稀释度系列预先孵育——向含有固定的小鼠 2E7MAb 的反应孔中短时间添加包括复合的和游离的淀粉样蛋白的混合物。然后检测仍然可结合固定的亲本 2E7MAb 的游离 β -淀粉样蛋白的数量。表 9 显示了两个分析的结果。

[0332] 表 9

[0333]

竞争 MAb	实验 1		实验 2	
	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	标准误差	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	标准误差
2E7c 嵌合体	0.052	0.006	-	-
H1L1	0.114	0.014	0.140	0.024
H2L1	0.075	0.009	0.119	0.014
H3L1	0.069	0.004	0.115	0.013

[0334] 所有的人源化抗体变体以非常相似的分布型抑制小鼠 2E7MAb 与 β -淀粉样蛋白的结合。对 H2L1 和 H3L1 变体产生的 IC₅₀ 值一致地接近 2E7c 嵌合体的(当使用时),其在两种分析中具有最高的抑制活性。然而,变体 H1L1 显示了在两种分析中有些降低的抑制活性,表明了对 β -淀粉样蛋白的可能稍微更低的亲和性。

[0335] 2E7、2E7c、H1L1、H2L1、H3L1 的 SPR Biacore™ 分析

[0336] 使用 Biacore™ 分析在 Biacore™3000 上评估了重组小鼠 2E7MAb、2E7c 人源化变体 H1L1、H2L1 和 H3L1 与人类 β -淀粉样蛋白肽(1-40)和(1-42)结合的动力学参数。使用了两种不同的分析形式。

[0337] 方法 A

[0338] (i)简要地,<20 共振单位的 β -淀粉样蛋白 1-40 肽(在 C-末端生物素化的)捕获在链霉抗生物素蛋白生物传感器芯片上(表 10A 使用的)。抗体在 HBS-EP 缓冲液中稀释,以 0.001nM-8nM 的浓度范围流过链霉抗生物素蛋白/ β -淀粉样蛋白表面(对于表 10A)。进行两个独立的运行;每个运行在新的链霉抗生物素蛋白/ β -淀粉样蛋白表面上进行。运行 1 和 2 是基本上相同的,然而在使用的参数上有一些差异;运行 1 使用在其上捕获了 16RU 的 β -淀粉样蛋白的芯片表面进行,使用 0.001nM-8nM 的抗体浓度,在 50 μl 每分钟的流速下使用 4 分钟的缔合时间和 20 分钟的解离时间。对于运行 2,捕获了低于 10RU 的 β -淀粉样蛋白,使用 0.003125nM-8nM 的抗体浓度。流动速度和缔合时间与运行 1 相同,然而解离时间降低到 15 分钟。

[0339] (ii) β -淀粉样蛋白(1-40)和(1-42)被胺结合到 CM5 生物传感器芯片的不同表面,达到 <20 共振单位的水平(表 10B 使用的)。

[0340] 抗体在 HBS-EP 缓冲液中稀释,以 1nM-64nM 的浓度范围流过生物传感器/ β -淀粉样蛋白表面(表 10B 使用的)。

[0341] 方法 B

[0342] 在第二中情况中,分析被反转,在于抗体首先在 CM5 生物传感器芯片的抗小鼠 IgG 多克隆抗体表面(对于重组小鼠 2E7Mab) 或或蛋白 A 表面(对于人源化 H2L1) 捕获到 1000-2500 共振单位的水平。新制备的 β -淀粉样蛋白(1-40)或(1-42)在 HBS-EP 缓冲液中稀释,以 4-500nM 的浓度范围流过捕获的抗体表面(表 10C 和 10D)。

[0343] 在两种方法中,再生是经由 100mM H_3PO_4 的脉冲,对于表 10A 数据还跟随着 50mM NaOH 的脉冲。显示了表面是稳定的并且不受再生的影响。所有运行相对于缓冲液空白注射双重参考。分析使用 Biacore™ 分析软件 BIAevaluation 版本 4.1 进行。

[0344] 结果

[0345] 方法 A (i)被用于通过 β -淀粉样蛋白结合动力学数据排列抗体。获得的数据在表 10A 中显示。这显示了,亲本 2E7Mab 具有对链霉抗生物素蛋白捕获的 β -淀粉样蛋白的 36.1pM 的 KD。嵌合的小鼠-人类抗体显示了稍微降低的 45.8pM 的 KD,人源化的构建体从 54 (H2L1) 到 93.6pM (H1L1)。总之,这展现了人源化操作已经是非常成功的,损失了非常少的亲和性。对 H2 和 H3 导入的其他回复突变具有小的但是有益的效果,然而 H2 和 H3 构建体之间的差异在这些实验的标准偏差之内。

[0346] 表 10A

抗体		<i>ka</i>	<i>kd</i>	KD (pm)
2E7	运行 1	1.61e6	6.17e-5	38.3
	运行 2	1.69e6	5.72e-5	33.8
	平均 (SD)	1.65e6	5.97e-5	36.1 (3.2)
c2E7	运行 1	1.34e6	6.44e-5	48.1
	运行 2	1.3e6	5.65e-5	43.5
	平均 (SD)	1.32e6	6.10e-5	45.8 (3.3)
H1L1	运行 1	5.60e5	5.32e-5	95.0
	运行 2	6.37e5	5.87e-5	92.2
	平均 (SD)	5.99e5	5.60e-5	93.6 (2.0)
H2L1	运行 1	9.91e5	5.76e-5	58.1
	运行 2	1.1e6	5.49e-5	49.8
	平均 (SD)	1.05e6	5.63e-5	54.0 (5.9)
H3L1	运行 1	8.24e5	6.26e-5	76.0
	运行 2	8.3e5	4.75e-5	57.2
	平均 (SD)	8.27e5	5.47e-5	66.6 (13.3)

[0348] 方法 A (ii)被用于确认与 β -淀粉样蛋白(1-40)相比在 β -淀粉样蛋白(1-42)的 C-末端上另外两个氨基酸残基没有显著地改变 2E7 和 H2L1 的结合性质。获得的数据在表 10B 中显示,并且确认了这一点。

[0349] 表 10B

抗体	B-淀粉 样蛋白	k_a ($M s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	KD (pM)
2E7	1-40	4.05e5	1.28e-	317
	1-42	3.82e5	4 1.51e- 4	394
H2L	1-40	3.33e5	1.22e-	366
1	1-42	3.40e5	4 1.55e- 4	456

[0350]

[0351]

[0352] 方法 B 被用于否定在第一分析形式中潜在地所见的亲合力影响(avidity effects)。由单个抗体分子的两个 Fab 结构域同时与生物传感器表面的两个邻近的 β -淀粉样蛋白分子的结合引起的亲合力影响,将提高结合的表观的亲合性。使用方法 B 获得的亲和性测量值在表 10C 中显示。

[0353] 表 10C

抗体	k_a ($M s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	KD (nM) 和标准偏差 n=3
2E7	2.83e5	4.28e-4	1.58
	$\pm 0.54e5$	\pm 0.65e-4	± 0.55
H2L	1.06e5	7.50e-4	7.32
	$\pm 0.27e5$	± 0.50	± 1.64

[0354]

[0355] 通过与方法 A (i) 类似的方法,当通过木瓜蛋白酶消化获得的 H2L1 的 Fab 片段片段结合链霉抗生物素蛋白捕获的 β -淀粉样蛋白(1-40)时,获得了这种分析提供的真实 1:1 结合亲和性的证据,估计的 KD 为 2.4nM。

[0356] 方法 B 还被用于确认与 β -淀粉样蛋白(1-40)相比在 β -淀粉样蛋白(1-42)的 C-末端的另外两个氨基酸残基不显著地改变称为 2F11 的相同的序列克隆与小鼠 2E7MAb 的结合性质。获得的数据在表 10D 中显示。

[0357] 表 10D

[0358]	抗体	β -淀粉样蛋白	k_a (Ms^{-1})	k_d (s^{-1})	KD (nM)
	2F11	1-42	2.39e5	2.74e-	1.14
[0359]	2F11	1-40	2.99e5	4	1.31
				3.92e-	
				4	

[0360] 在类似于如上所述利用表面等离子共振分析对 2E7 的表位作图研究的研究中,在与包括 β -淀粉样蛋白肽的氨基酸 1-12 的肽 ($A\beta$ 1, SEQ ID NO:15) 结合、并且不与包含 β -淀粉样蛋白肽的氨基酸 2-13 的肽 ($A\beta$ 2-13, SEQ ID NO:44) 结合方面, H2L1 的表现与 2E7 类似。

[0361] 在 I^{125} β -淀粉样蛋白流出模型中 H2L1 的活性

[0362] 为了功能上地比较人源化 H2L1 与亲本小鼠单克隆抗体 2E7, 在如上所述的 I^{125} β -淀粉样蛋白流出模型中在同一天测试了这两者。

[0363] 与载体对照相比, H2L1 和 2E7 显著地提高了血液中的每分钟计数 (CPM)。血液中的放射性的 CPM 如下 (媒介物: 1940 ± 166 ; 2E7: 10065 ± 1386 ; H2L1: 10913 ± 1535)。使用的统计是 post-hoc LSD 测试的 ANOVA。n=7 媒介物, n=6 2E7, n=6 H2L1, ($p < 0.001$ 每个测试的化合物 vs. 媒介物)。

[0364] 这个数据提供了进一步的证据, 人源化 H2L1 抗体保持了小鼠 2E7 分子显示的功能性质。

[0365] H2L1 和 2E7 的药物动力学的研究

[0366] 研究了小鼠中的测试抗体的末端半衰期。通过向 4 只小鼠的 1h 静脉内的输注施用测试抗体, 来实现每只小鼠的 $400 \mu\text{g}$ 的目标剂量。系列血液样品取自每只小鼠直到给药后 5 天 (来自 2E7 组的一只小鼠没有完成研究, 来自 H2L1 组的一只从随后的分析中除去, 因为变得明显的是没有 i. v. 地施用剂量)。使用 β -淀粉样蛋白捕获 ELISA 来测量抗体水平。

[0367] 数据的分析表明, 人源化抗体 H2L1 具有在小鼠中大约 82 小时的末端半衰期 (表 11), 其与亲本小鼠单克隆抗体 2E7 (大约 75 小时) 是可比较的。

[0368] 表 11

参数	平均值 \pm SD (n=3)
Cmax ($\mu\text{g/mL}$)	291 \pm 43
Tmax (h) #	2.0 (1.1-2.1)
CLp (mL/h/kg)	0.9 \pm 0.1
$t_{1/2}$ (h)	82 \pm 4
Vss (mL/kg)	94 \pm 12

[0370] # 中值和范围

[0371] Cmax 观察到的最大血浆浓度。

[0372] T_{max} 观察到最大血浆浓度的时间

[0373] CL_p 总血浆清除率;剂量/AUC_(0-inf).

[0374] $t^{1/2}$ 末期半衰期被测定为 $\ln 2/z$ 的比值,其中 z 是末期速率常数;针对视觉上评估末期 \log 线性阶段的起始之后发生的那些浓度-时间配对使用未加权的线性回归分析(在 \log 变换之后)来计算。

[0375] V_{ss} 稳态下的分布体积; $CL_p \times MRT_{0-inf}$.

[0376] 在老年非人类灵长类中 H2L1 对外周淀粉样蛋白载荷的影响

[0377] 在老年的 *Cynomolgus* 猴(大约 15 岁)中进行研究,来研究关于淀粉样蛋白/H2L1 复合物形成和清除、以及随后对 CSF 和 CNS 淀粉样蛋白水平的影响之间的暴露反应相互关系。在第一剂 H2L1 之前 3 周,每周地采集腰椎 CSF (在开他敏镇静下进行)和血液样品。在第 3 周的采样之后立即地,动物接受安慰剂($n=10$)、0.1mg/kg ($n=5$)、1mg/kg ($n=5$) 或 10mg/kg ($n=10$) H2L1,然后每 2 周持续 12 周。用于 H2L1 和总 A β 42 的血浆分析的血液样品每周地采集。用于 A β _{40/42} 的定量的 CSF 样品每 2 周地采集。在给药周期完成之后,动物被安乐死,为了通过如上所述的生化分析的 β -淀粉样蛋白脑部定量以及微出血的研究。在最低剂量组中(0.1mg/kg),动物以交错的方式安乐死,以评估作为给药终止、以及由此血浆淀粉样蛋白库的饱和的结果,在脑水平中潜在的时间过程影响。

[0378] 这项研究在实验阶段开始之前由 Maccine Pte Ltd 的 Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)或“Maccine”批准。IACUC 方案编号是 #_08-2006。GSK 进行了 Maccine 的现场考察,回顾了他们的伦理审核过程,发现这是可接受的。

[0379] 血浆样品连续稀释 1:10 到 1:50000,添加到 A β ₄₀ 包被的 ELISA 平板。在稀释剂中 0-10 μ g/ml H2L1 的范围上产生标准曲线。在 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育之后,使用抗人类 IgG 辣根过氧化物酶(Amersham- 稀释剂中 1:2000 稀释)和四甲基联苯胺检测系统来检视 H2L1。在单次和重复的 iv 丸剂施用之后,H2L1 的血浆水平看起来以剂量依赖性方式提高。在药物动力学方面没有严重的非线性的证据,表明对于大部分的给药间隔,实现了与游离淀粉样蛋白水平相比血浆中 H2L1 的过量摩尔浓度。

[0380] 使用商业上可获得的 A β 1-42ELISA 试剂盒(Innogenetics)根据厂家说明书,使用在试剂盒稀释剂中创建的范围从 500-7pg/ml 的标准曲线,测量纯净血浆中的总 A β 42。在根据试剂盒说明书一式两份分析之前,样品和标准在 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。要注意的是,由于 A β 42 分析提供的检测抗体的干扰,这种试剂盒不能用于测量游离 A β 42 水平,而是测量表观的“总”A β 42。在 A β 42 水平方面有着剂量和浓度依赖性的提高(分别在 10、1 或 0.1mg/kg H2L1 之后检测的大约 300、125 和 25pg/ml 高峰水平)。

[0381] 根据该分析,“总”A β ₄₂ 的增加可能是由于淀粉样蛋白从血浆库之外显著流出的结果,这似乎取决于 H2L1 浓度 >1 μ g/mL,并且看起来不是复合物的清除缺乏的结果。根据在给药间隔上总 A β ₄₂ 的消除速率以及总水平的变动,这是明显的。

[0382] 迄今为止,仅血浆分析被完成了和被完整地分析了。然而,初步分析表明,存在着在用 10mg/kg H2L1 处理之后“总”A β 42 的 CSF 中的降低和海马水平中的提高的倾向。

[0383] 在某些脑切片中,如 Perl's 普鲁士蓝染色方法所显示的,检测到微出血的小的区域。这种方法通过产生不溶的蓝色化合物显现三价铁(铁是红细胞中存在的携氧血红蛋白的主要成分)。然而,在媒介物和药物处理的动物之间的发生率方面没有差异。

[0384] 对老年的 Cynomolgus 恒河猴的脑中 β 淀粉样蛋白斑块和血浆中总 β 淀粉样蛋白的分析

[0385] 人类 AD 的脑脊液(CSF)和组织参数已经在猕猴中展现了。老年的猕猴已经显示了具有淀粉样蛋白沉积的证据。(Covance, The cynomolgus monkey as a model for Alzheimer's disease. In: Buse E, Habermann G, Friderichs-Gromoll S, Kaspereit J, Nowak P and Niggemann K, editors. Poster Presentation at the 44th Annual Meeting of the Society of Toxicology, New Orleans, Louisiana, 6 to 10 March 2005)。在老龄的、约 20 岁的生育期后的雌性猴中研究了 H2L1 在老化的脑中引发不适当的反应(例如脑炎)的可能性。此外,还在以两周间隔静脉内施用 8 周之后研究了安全性、治疗相关的微出血、测试材料的中和 / 清除、超敏反应、免疫复合物病。此外,分析了 CNS 和血液样品的 A β 40/42 的水平。

[0386] 研究设计

[0387] 5 只(组 1)、9 只(组 2)或 10 只(组 3)衰老老雌性猕猴的组每两周通过缓慢的丸剂施用静脉内地给予媒介物(4ml/kg)中的 0(媒介物)、50 或 100mg/kg/ 给药天的 H2L1 持续 8 周。媒介物由三水乙酸钠 6.81mg/mL、脱水依地酸二钠 0.0186mg/mL、聚山梨酸酯 800.2mg/mL、和 L-精氨酸碱 10mg/mL 组成, pH 值是 5.5。选择剂量水平来研究 5 倍或 10 倍于预定的临床剂量水平的剂量水平。

[0388] 给药前、每天(临床征象、体重、采食量)、第 4 周和尸检前一周进行以下评估:生活动物观察、体重、体温、血液学、临床化学(包括脑脊液 [CSF] 分析)、尿分析、和 CSF 中细胞因子测定。在尸检之后,对所有动物进行器官称重、宏观观察、和脑的显微镜观察、颈部脊髓和肉眼损害。在每次给药之后进行毒性细胞因子评估。

[0389] 结果

[0390] 没有预料外的死亡,没有表明测试项目在施用剂量上对动物的一般状况的影响的征兆。临床病理(血液学和血清化学)方面仅有的显著的观察结果被断定是年龄相关的而不是测试项目相关的。

[0391] 对 H2L1 的全身性暴露(通过 AUC_{0- τ} 和 C_{max} 测量的)大致与剂量成比例地提高。对于两个剂量组,在第一剂和第四剂采样期间之间的全身性暴露中没有显著改变(≥ 2 倍)。

[0392] 通过 CSF 分析检测的,在脑中没有任何炎症反应的征兆,在尸检时没有暗示测试项目影响的肉眼可见的或显微发现,特别是没有微出血或脑炎。

[0393] 该项研究遵照 German Chemical Law, annex 2 to § 19a Chemikalien Gesetz, June 2002, the OECD Principles of Good Laboratory Practice (revised 1997, issued January 1998) ENV/MC/CHEM (98)17, the Consensus Document "The Application of the OECD Principles of GLP to the Organisation and Management of Multi-Site Studies" ENV/JM/MONO (2002)9 中阐述的 Good Laboratory Practice Regulations 来进行。根据上述规则 and 标准进行的研究被认为是美国 FDA 管理权限可接受的。

[0394] CNS 中斑块载荷的分析

[0395] 来自上述研究的媒介物处理的恒河猴的左脑半球通过免疫组织化学来分析。含有齿状回和海马部分的中间枕叶顶叶沟回的水平处的冠状面,如上所述被加工到蜡中。对

于免疫组织化学,切片用 pan-A β 抗体(1E8,针对 A β 13-27 的单克隆抗体)或用 A β 42 抗体(20G10,识别 A β x-42 的单克隆抗体)标记,如上述显现标记。为每个切片采集斑块数目的可见的计数。来自所有五只媒介物处理的猕猴的组织显示了实质的 A β 斑块的证据。还有脑血管标记的 A β 和神经内 A β 的证据。

[0396] 血浆中 β 淀粉样蛋白 / 抗体复合物的分析

[0397] 对来自用 50mg/kg (n=9) 或 100mg/kg (n=10) H2L1 给药的动物、或媒介物给药的对照(n=5)的、两个时点(在给药开始 4 周和 8 周的末尾)的血浆样品进行生化分析。100 μ l 双份样品使用商业上可获得的 Innogenetics A β 1-42ELISA 试剂盒分析,在 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。分析纯净的和 1:10 稀释度(使用提供的稀释剂)的对照样品,而来自给药动物的样品纯净和在 1:25 稀释度测试。随后分析吸光度值,未知的吸光度值利用标准曲线来回算成 pg/ml 值,然后对任何分析稀释度来校正。来自这些样品的 A β 42 的总血浆水平在以下的表 12 中显示(数字是 pg/ml \pm SE);来自用 H2L1 处理的动物的所有样品含有与对照组中相比显著更高水平的 A β 42 (通过 student t- 测验 p<0.001)。

[0398] 表 12

[0399]

	第 4 周 (pg/ml)	第 8 周 (pg/ml)
对照 (1:10)	104.1 \pm 30.4	29.8 \pm 7.9
50mg/kg (1:25)	830.5 \pm 79.1	615.8 \pm 50.2
100mg/kg (1:25)	1020.5 \pm 84.4	492.7 \pm 46.3

[0400] 报告的数据从稀释的样品获得。来自纯净样品的结果不被使用,因为许多数据点要么大于顶部标准,要么由于样品体积局限仅作为单个点被分析。

[0401] 生产过程

[0402] 编码 H2L1、可操作连接到可扩增选择标记物例如 DHFR 或谷氨酰胺合成酶的表达载体可以用于转染或转导合适的亲本 CHO 细胞系(例如, CHODG44 或 CHOK1)来产生适合于在大规模上产生单克隆抗体的工程化的细胞系(综述参见 Bebbington and Hentschel DNA Cloning Volume III; A practical approach (edited by Glover DM) (Oxford IRL press, 1987)。为了提高表达水平,编码序列可以密码子优化以免除顺式作用序列基序和极端的 GC 含量(高或低)。SEQ ID NO :42 和 NO :43 例示了 H2 重链和 L1 轻链的这种编码序列。大规模生产可以使用无动物衍生成分的培养基的搅拌罐生物反应器中进行,之后纯化。这可以包括收获物的澄清,之后是蛋白 -A 亲和层析,以及使用离子(例如阳离子)交换和混合模式(例如,陶瓷羟磷灰石)层析单元操作的进一步纯化。病毒去除纳滤之后是最终的超滤 / 渗滤步骤,其允许制剂适合于预定的施用途径。

[0403] 药物制剂的实例

	<u>成分</u>	<u>数量 (per mL)</u>
	H2L1	50mg
	三水乙酸钠	6.81mg
[0404]	聚山梨酸酯80	0.20mg
	精氨酸碱	10.00mg
	氯化钠	3.00mg
	依地酸二钠二水合物	0.0186mg
	盐酸	适量来得到pH 5.5
[0405]	注射用水	得出1.0mL
	氮气	填充顶部空间
[0406]	<u>接受体框架和人源化变体的 V 区的氨基酸序列</u>	
[0407]	M99675 重链接受体框架 V 区域, 氨基酸序列 (SEQ ID No:21)	
[0408]	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSYISSSS	
[0409]	STIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	
[0410]	M99675 重链接受体框架 V 区域 DNA (SEQ ID No:22)	
[0411]	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCC	
[0412]	TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTATAGCATGAACT	
[0413]	GGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTtCATAATTAGTAGT	
[0414]	AGTAGTAGTACCATATACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCC	
[0415]	AGAGACAATGCCAAGAAGCTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAG	
[0416]	GACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGA	
[0417]	CAA51135 轻链接受体框架 V 区域氨基酸序列 (SEQ ID No:24)	
[0418]	DIVMTQSPLSLPVTPEPASISCRSSQSLLLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLG	
[0419]	NRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCMQALQTPWTFGQGTKVEIK	
[0420]	CAA51135 轻链接受体框架 V 区域 DNA (SEQ ID No:25)	
[0421]	GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCG	
[0422]	GCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCATAGTAATGGATAACAAC	
[0423]	TATTTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTAT	
[0424]	TTGGGTTCTAATCGGGCCTCCGGGTCCTGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATC	
[0425]	AGGCACAGATTTTACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGG	
[0426]	TTTATTACTGCATGCAAGCTCTACAAACTCCGTGGACGTTCCGCCAAGGGACCA	
[0427]	AGGTGGAAATCAAA	
[0428]	人源化的重链 V 区域变体 H1, 氨基酸序列 (SEQ ID No:26)	
[0429]	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNGMAWVRQAPGKGLEWVSEISNL	
[0430]	AYSIDYADTVTGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVSGTWFAYWGQGL	
[0431]	VTVSS	
[0432]	人源化的重链 V 区域变体 H1DNA 编码序列 (SEQ ID No:27)	

- [0433] GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCC
- [0434] TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTGACAACCGGAATGGCGT
- [0435] GGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCATTATTAGTAAT
- [0436] TTGGCATATAGTATCGACTACGCAGACACTGTGACGGGCCGATTACCCATCTCC
- [0437] AGAGACAATGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAG
- [0438] GACACGGCTGTGTATTACTGTGTCAGCGGGACCTGGTTTGCTTACTGGGGCCA
- [0439] GGGCACACTAGTCACAGTCTCCTCA
- [0440] 人源化的重链 V 区域变体 H2, 氨基酸序列 (SEQ ID No:28)
- [0441] EVQLVESGGGLVQP~~GG~~SLRLSCAVSGFTFS~~DN~~MAWVRQAPGKLEWVSFISNL
- [0442] AYSIDYADTVTGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVSGTWFAYwGQGTL
- [0443] VTVSS
- [0444] 人源化的重链 V 区域变体 H2DNA (SEQ ID No:29)
- [0445] GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCC
- [0446] TGAGACTCTCCTGTGCAGTCTCTGGATTACCTTCAGTGACAACCGGAATGGCGT
- [0447] GGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCATTATTAGTAAT
- [0448] TTGGCATATAGTATCGACTACGCAGACACTGTGACGGGCCGATTACCCATCTCC
- [0449] AGAGACAATGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAG
- [0450] GACACGGCTGTGTATTACTGTGTCAGCGGGACCTGGTTTGCTTACTGGGGCCA
- [0451] GGGCACACTAGTCACAGTCTCCTCA
- [0452] 人源化的重链 V 区域变体 H3, 氨基酸序列 (SEQ ID No:30)
- [0453] EVQLVESGGGLVQP~~GG~~SLRLSCAASGFTFS~~DN~~MAWVRQAPGKLEWISFISNLA
- [0454] YSIDYADTVTGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVSGTWFAYWGQGTLL
- [0455] TVSS
- [0456] 人源化的重链 V 区域变体 H3DNA (SEQ ID No:31)
- [0457] GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCC
- [0458] TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTGACAACCGGAATGGCGT
- [0459] GGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCTCATTATTAGTAAT
- [0460] TTGGCATATAGTATCGACTACGCAGACACTGTGACGGGCCGATTACCCATCTCC
- [0461] AGAGACAATGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAG
- [0462] GACACGGCTGTGTATTACTGTGTCAGCGGGACCTGGTTTGCTTACTGGGGCCA
- [0463] GGGCACACTAGTCACAGTCTCCTCA
- [0464] 人源化的轻链 V 区域变体 L1 氨基酸序列 (SEQ ID No:32)
- [0465] DIVMTQSPLSLPVTPEPASI~~SCR~~VSQSL~~L~~HSNGWYLHWY~~L~~QKPGQSPQLLIYKVS
- [0466] NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQTRHVPYTFGGGTKVEIK
- [0467] 人源化的轻链 v 区域变体 L1DNA (SEQ ID No:33)
- [0468] GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTACCCCTGGAGAGCCG
- [0469] GCCTCCATCTCCTGCAGAGTTAGTCAGAGCCTTTTACACAGTAATGGATACACC
- [0470] TATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTAT
- [0471] AAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCTGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCA

- [0472] GGCACAGATTTTACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTT
- [0473] TATTACTGCTCTCAAACCTAGACATGTTCCGTACACGTTCCGGCGGAGGGACCAAG
- [0474] GTGGAAATCAAA
- [0475] 成熟的 H1 重链氨基酸序列 (Fc 突变的, 双突变是粗体字的) (SEQ ID No:34)
- [0476] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNGMAWVRQAPGKGLEWVSFISNL
- [0477] AYSIDYADTVTGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVSGTWFAYWGQTL
- [0478] VTVSSASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
- [0479] TFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTH
- [0480] CPPCPAPELAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
- [0481] VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
- [0482] AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
- [0483] PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0484] H1 全长 DNA (SEQ ID No:35)
- [0485] GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG
- [0486] GGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTG
- [0487] GATTCACCTTCAGTGACAACCGAATGG
- [0488] CGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCATTCATTAGT
- [0489] AATTTGGCATATAGTATCGACTACGCA
- [0490] GACTACTGTGACGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACTCACTG
- [0491] TATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGC
- [0492] CGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGTCAGCGGGACCTGGTTTGCTTACTGGG
- [0493] GCCAGGGCACACTAGTCACAGTCTCCT
- [0494] CAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGC
- [0495] ACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGC
- [0496] TGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCGTGGAACCTCAGG
- [0497] CGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTT
- [0498] CCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCG
- [0499] TGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGA
- [0500] CCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAA
- [0501] GTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCT
- [0502] CACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCGCGGGGGCACCGTCAGTCTT
- [0503] CCTCTTCCCCCAAAAACCAAGGACAC
- [0504] CCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC
- [0505] ACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACT
- [0506] GGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAAGCCGCGGGAGGA
- [0507] GCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTC
- [0508] AGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTG
- [0509] CAAGGTCTCCAACAAAAGCCCTCCCAGC
- [0510] CCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGG

- [0511] TGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATG
- [0512] AGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA
- [0513] GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC
- [0514] AATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGA
- [0515] CGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCT
- [0516] CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGA
- [0517] TGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACA
- [0518] CGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
- [0519] 成熟的 H2 重链氨基酸序列, (Fc 突变的, 双突变是粗体字的) (SEQ ID No:36)
- [0520] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFSDNGMAWVRQAPGKLEWVSFISNL
- [0521] AYSIDYADTVTGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVSGTWFAYWGQGTL
- [0522] VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
- [0523] TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTH
- [0524] CPPCPAPELAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCWVDVSHEDPEVKFNWYVDG
- [0525] VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISK
- [0526] AKGQPREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
- [0527] PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0528] H2 全长 DNA (SEQ ID No:37)
- [0529] GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCC
- [0530] TGAGACTCTCCTGTGCAGTCTCTGGATT
- [0531] CACCTTCAGTGACAACCGAATGGCGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGG
- [0532] CTGGAGTGGGTTTCATTCATTAGTAATT
- [0533] TGGCATATAGTATCGACTACGCAGACACTGTGACGGGCCGATTCACCATCTCCA
- [0534] GAGACAATGCCAAGAACTCACTGTAT
- [0535] CTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGTGTCAG
- [0536] CGGGACCTGGTTTGCTTACTGGGGCCA
- [0537] GGGCACACTAGTCACAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCC
- [0538] CCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCT
- [0539] CTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACC
- [0540] GGTGACGGTGTGCGTGGAACTCAGGCGCC
- [0541] CTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTA
- [0542] CTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCC
- [0543] CTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCA
- [0544] GCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTG
- [0545] AGCCCCAAATCTTGTGACAAAACACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAC
- [0546] TCGCGGGGGCACCGTCAGTCTTCCCTC
- [0547] TTCCCCCAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTCACA
- [0548] TGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGA
- [0549] AGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATG

- [0550] CCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGT
[0551] ACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGG
[0552] CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAG
[0553] GTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAAACCATCTCCAAAGCCAAA
[0554] GGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTA
[0555] CACCCTGCCCCATCCCAGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCT
[0556] GCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCG
[0557] ACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGAC
[0558] CACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGC
[0559] TCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGG
[0560] GAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA
[0561] TGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA
[0562] AA
[0563] 成熟的 H3 重链氨基酸序列 (Fc 突变的, 双突变是粗体字的) (SEQ ID No. 38)
[0564] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNGMAWVRQAPGKLEWISFISNLA
[0565] YSIDYADTVTGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVSGTWFAYWGQGTLV
[0566] TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
[0567] FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHT
[0568] CPPCPAPELAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
[0569] VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
[0570] AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
[0571] PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALHNHYTQKSLSLSPGK
[0572] H3 全长 DNA (SEQ ID No.:39)
[0573] GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCC
[0574] TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTGACAACGGAATGGCGT
[0575] GGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCTCATTCAATTAGTAAT
[0576] TTGGCATATAGTATCGACTACGCAGACACTGTGACGGGCCGATTACCATCTCC
[0577] AGAGACAATGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAG
[0578] GACACGGCTGTGTATTACTGTGTGACGGGACCTGGTTTGCTTACTGGGGCCA
[0579] GGGCACACTAGTCACAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCATCGGTCTTCC
[0580] CCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTG
[0581] CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACTCAGGCG
[0582] CCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTC
[0583] TACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGAC
[0584] CTACATCTGCAACGTGAATCAACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAAGT
[0585] TGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGA
[0586] ACTCGCGGGGGCACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAAAACCAAGGACACCC
[0587] TCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAC
[0588] GAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAA

- [0589] TGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCA
[0590] GCGTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC
[0591] AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCC
[0592] AAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGA
[0593] GCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA
[0594] GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAA
[0595] GACCACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGC
[0596] TCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG
[0597] ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCG
[0598] GGTA
[0599] 成熟的轻链氨基酸序列 (SEQ ID No :40)
[0600] DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRVQSLLHSNGWYLHWYLRKPGQSPQLLIYKVS
[0601] NRFSGVPDRFSGSGSDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQTRHVPYTFGGGKVEIKR
[0602] TVAAPSVFIFPpSDEQLKSGTASVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
[0603] EQDSKDYSLSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
[0604] L1 全长 DNA (SEQ ID No :41)
[0605] GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTACCCCTGGAGAGCCG
[0606] GCCTCCATCTCCTGCAGAGTTAGTCAGAGCCTTTTACACAGTAATGGATACACC
[0607] TATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTAT
[0608] AAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCTGACAGGTTTCAAGTGGCAGTGGATCA
[0609] GGCACAGATTTTACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTT
[0610] TATTACTGCTCTCAAACCTAGACATGTTCCGTACACGTTCCGGCGGAGGGACCAAG
[0611] GTGGAAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTTCATCTTCCCGCCATCT
[0612] GATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTC
[0613] TATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGACAACGCCCTCCAATCGGG
[0614] TAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCC
[0615] TCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAAACAAAAGTCTAC
[0616] GCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAAAAAGAGCTTCAA
[0617] CAGGGGAGAGTGT
[0618] 优化的 H2 重链 DNA (SEQ ID No :42)
[0619] GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGCGGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCAGCC
[0620] TGAGACTGAGCTGTGCCGTGTCCGGCTTACCTTACAGCGACAACGGCATGGCC
[0621] TGGGTGAGGCAGGCCCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCTTTCATCAGCA
[0622] ACCTGGCCTACAGCATCGACTACGCCGACACCGTGACCGGCAGATTACCATC
[0623] AGCCGGGACAACGCCAAGAACAGCCTGTACCTGAGATGAACAGCCTGAGAGC
[0624] CGAGGACACCGCGTGTACTACTGTGTGAGCGGCACCTGGTTCGCCTACTGGG
[0625] GCCAGGGCACCTGGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCACAAGGGCCCCAGCGT
[0626] GTTCCCCCTGGCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGGCACAGCCGCCCTG
[0627] GGCTGCCTGGTGAAGGACTACnCCCCGAACCGGTGACCGTGTCTGGAACAG

[0628] CGGAGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGC
[0629] GGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCA
[0630] CCCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGAC
[0631] AAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACACCTGCCCCCCCTGCC
[0632] TGCCCCCGAGCTGGCCGGAGCCCCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAGCCTA
[0633] AGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGAT
[0634] GTGAGCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
[0635] GGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACC
[0636] GGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGA
[0637] GTACAAGTGAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCTATCGAGAAAACCAT
[0638] CAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCT
[0639] AGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGG
[0640] CTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAG
[0641] AACAACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCCTG
[0642] TACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAG
[0643] CTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCAGAAGAGCCTGA
[0644] GCCTGTCCCCTGGCAAG
[0645] 优化的 L1 轻链 DNA (SEQ ID No: 43)
[0646] GACATCGTGATGACCCAGAGCCCCCTGAGCCTGCCCGTGACCCCTGGCGA
[0647] GCCCGCCAGCATCAGCTGTAGAGTGAGCCAGAGCCTGCTGCACAGCAACG
[0648] GCTACACCTACCTGCACTGGTATCTGCAGAAGCCTGGCCAGAGCCCTCAG
[0649] CTGCTGATCTACAAGGTGTCCAACCGGTTACGCGGCGTGCTGATAGATTC
[0650] AGCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGAAGATCAGCAGAGTGGA
[0651] GGCCGAGGATGTGGGCGTGTACTACTGCTCCCAGACCAGACACGTGCCTT
[0652] ACACCTTTGGCGGCGGAACAAAGGTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCC
[0653] CCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGCAC
[0654] CGCCAGCGTGGTGTGTCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGG
[0655] TGCAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAG
[0656] CGTGACCCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCC
[0657] TGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAG
[0658] GTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGG
[0659] CGAGTGC

[0001]

序列表

<110> Glaxo Group Limited

<120> 抗体

<130> PB61927

<160> 44

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 1

Asp Asn Gly Met Ala

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 2

Phe Ile Ser Asn Leu Ala Tyr Ser Ile Asp Tyr Ala Asp Thr Val Thr

1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 6

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 3

Gly Thr Trp Phe Ala Tyr

1 5

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> 小鼠

[0002]

<400> 4
 Arg Val Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Thr Tyr Leu His
 1 5 10 15

<210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<400> 5
 Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<400> 6
 Ser Gln Thr Arg His Val Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 7
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 肽

<221> MOD_RES
 <222> (16)..(0)
 <223> 生物素化的

<400> 7
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Gly Ser Gly Gly Ser Lys
 1 5 10 15

<210> 8
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 肽

[0003]

<221> MOD_RES

<222> (16)...(0)

<223> 生物素化的

<400> 8

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Gly Ser Gly Ser Gly Ser Lys
1 5 10 15

<210> 9

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<221> MOD_RES

<222> (16)...(0)

<223> 生物素化的

<400> 9

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Lys
1 5 10 15

<210> 10

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<221> MOD_RES

<222> (16)...(0)

<223> 生物素化的

<400> 10

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Lys
1 5 10 15

<210> 11

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0004]

<223> 肽

<221> MOD_RES

<222> (16)...(0)

<223> 生物素化的

<400> 11

Asp Ala Glu Phe Arg His Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Lys
 1 5 10 15

<210> 12

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<221> MOD_RES

<222> (16)...(0)

<223> 生物素化的

<400> 12

Asp Ala Glu Phe Arg Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Ser Lys
 1 5 10 15

<210> 13

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<221> MOD_RES

<222> (16)...(0)

<223> 生物素化的

<400> 13

Asp Ala Glu Phe Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Lys
 1 5 10 15

<210> 14

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

[0005]

<220>

<223> 肽

<221> MOD_RES

<222> (16)...(0)

<223> 生物素化的

<400> 14

Asp Ala Glu Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Lys

1 5 10 15

<210> 15

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<221> MOD_RES

<222> (16)...(0)

<223> 生物素化的

<400> 15

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

1 5 10 15

<210> 16

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<221> ACETYLATION

<222> (1)...(0)

<221> MOD_RES

<222> (16)...(0)

<223> 生物素化的

<400> 16

Ser Glu Val Lys Met Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Gly Ser Gly Lys

1 5 10 15

<210> 17

[0006]

<211> 115

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 17

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

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Asn

20 25 30

Gly Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Arg Lys Gly Pro Glu Trp Ile

35 40 45

Ala Phe Ile Ser Asn Leu Ala Tyr Ser Ile Asp Tyr Ala Asp Thr Val

50 55 60

Thr Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Val Ser Gly Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ala

115

<210> 18

<211> 345

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 18

gaggtgaagc tgggtggagtc tggggggagge ttagtgcage ctggagggtc cctgaaaetc 60

tctctgfcag tctctggatt cactttcagt gacaacggaa tggcgtgggt tgcacaggct 120

ccaaggaagg ggccctgagt gatagcgttc attagtaatt tggcatatag tafcactac 180

gcagacactg tgacgggccc attcaccatc tctagagata atgccaagaa taccctgtac 240

ctggaaatga gcagtctgag gtctgaggac acggccatgt actattgtgt aagcgggacc 300

tggtttgett actggggcca agggactctg gtcactgtct ctgca 345

<210> 19

<211> 112

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 19

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

1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Val Ser Gln Ser Leu Leu His Ser

20 25 30

Asn Gly Tyr 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

[0007]

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 Thr
 85 90 95
 Arg His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 20
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> 小鼠

<400> 20
 gatgttgtgc tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gctctggaga tcaagcctcc 60
 atctcttgc gagttagtca gacccttta cacagtaatg gatacaccta ttacatigg 120
 tacctgcaga agccaggcca gtcctcaaag ctctgatct acaaagttc caaccgattt 180
 tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
 agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaactag acatgttccg 300
 tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa 336

<210> 21
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 21
 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
 Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala 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

<210> 22
 <211> 296
 <212> DNA
 <213> 人

<400> 22
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggagc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactic 60

[0008]

tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatagca tgaactgggt cegccagget 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggttcatac attagtagta gtagtagtac catatactac 180
 gcagactctg tgaagggccg attaccatc tccagagaca atgccaagaa ctcactgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagaga 296

<210> 23
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 23
 Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10 15

<210> 24
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 24
 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 Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 25
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> 人

<400> 25
 gatattgtga tgactcagtc tccactcicc ctgcccgtca cccttgaga gccggcctcc 60
 atctcctgca ggctagtca gacctcctg catagtaatg gatcaacta ttggattgg 120
 tacctgcaga agccaggcca gtctccacag ctctgatct attgggttc taatcgggcc 180
 tccggggtec ctgacaggtt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaac 240
 agcagagtgg aggctgagga tgtgggggtt tattactgca tgcaagctct acaaacctcc 300
 tggacgttcg gccaaaggac caaggtggaa atcaaaa 336

[0009]

<210> 26
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人源化的

<400> 26
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Asn
 20 25 30
 Gly Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Phe Ile Ser Asn Leu Ala Tyr Ser Ile Asp Tyr Ala Asp Thr Val
 50 55 60
 Thr 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
 Val Ser Gly Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 115

<210> 27
 <211> 345
 <212> DNA
 <213> 人

<400> 27
 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtcag cctctggatt caccitcagt gacaacggaa tggcgtgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggittcattc attagtaatt tggcatatag tatcgactac 180
 gcagacactg tgacgggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa ctcactgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgt cagcgggacc 300
 tggittgctt actggggcca gggcacacta gtcacagtct cctca 345

<210> 28
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 28
 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 Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Asn
 20 25 30

[0010]

Gly Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Phe Ile Ser Asn Leu Ala Tyr Ser Ile Asp Tyr Ala Asp Thr Val
 50 55 60
 Thr 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
 Val Ser Gly Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 115

<210> 29
 <211> 345
 <212> DNA
 <213> 人

<400> 29
 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggagge ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
 tctgtgcag tctctggait caccttcagt gacaacggaa tggcgtgggt cgcaccaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtttcattc attagtaatt tggcatatag tctcgaactac 180
 gcagacactg tgacgggceg ataccaccatc tccagagaca atgccaagaa ctcaactgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgt cagcgggacc 300
 tggtttgcct actggggcca gggcacacta gtcacagtct cctca 345

<210> 30
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 30
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Asn
 20 25 30
 Gly Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Ser Phe Ile Ser Asn Leu Ala Tyr Ser Ile Asp Tyr Ala Asp Thr Val
 50 55 60
 Thr 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
 Val Ser Gly Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 115

[0011]

<210> 31
 <211> 345
 <212> DNA
 <213> 人

<400> 31
 gaggtgcagc tggtagtc tgggggagc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
 tctgtgcag cctctggatt caccttcagt gacaacggaa tggcgtgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg ggcctggagtg gatctcattc attagtaatt tggcatatag tatcgactac 180
 gcagacaactg tgacgggccc atccaccatc tccagagaca atgccaagaa ctcactgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgt cagcgggacc 300
 tggfittgctt actggggcca gggcacacta gtcacagtct cctca 345

<210> 32
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 32
 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 Val Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Tyr 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 Thr
 85 90 95
 Arg His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 33
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> 人

<400> 33
 gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc 60
 atctctgca gagtagtca gacccttta cacagtaatg gatacaccta ttacattgg 120
 tacctgcaga agccagggca gtcctcacag ctctgatct ataaagtct caaccgattt 180
 tctggggtcc ctgacaggtt cagtggcagt ggtacaggca cagattttac actgaaaatc 240
 agcagagtgg aggtgagga tgtgggggtt tattactgct ctcaaactag acatgttccg 300
 tacacgttcg gcggaggac caaggtggaa atcaaa 336

<210> 34

[0012]

<211> 445
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 34
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Asn
 20 25 30
 Gly Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Phe Ile Ser Asn Leu Ala Tyr Ser Ile Asp Tyr Ala Asp Thr Val
 50 55 60
 Thr 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
 Val Ser Gly Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125
 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140
 Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160
 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175
 Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 180 185 190
 Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205
 Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 210 215 220
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Ala Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 260 265 270
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350
 Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys

[0013]

1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Asn
 20 25 30
 Gly Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Phe Ile Ser Asn Leu Ala Tyr Ser Ile Asp Tyr Ala Asp Thr Val
 50 55 60
 Thr 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
 Val Ser Gly Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125
 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140
 Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160
 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175
 Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 180 185 190
 Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205
 Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 210 215 220
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Ala Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 260 265 270
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350
 Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln

[0015]

50 55 60
 Thr 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
 Val Ser Gly Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125
 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140
 Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160
 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175
 Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 180 185 190
 Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205
 Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 210 215 220
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Ala Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 260 265 270
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350
 Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

[0017]

<210> 39
<211> 1335
<212> DNA
<213> 人

<400> 39
gaggtgcagc tggaggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt gacaacggaa tggcgtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg gatctcaltc attagtaatt tggcatatag tatcgactac 180
gcagacactg tgacgggccc attcaccatc tccagagaca atgccaagaa ctcaactgat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgt cagcggggacc 300
tggtttgcct actggggcca gggcacacta gtcacagtct cctcagcctc caccaagggc 360
ccatcggctt tccccctggc accctctccc aagagcacct ctggggggcac agcggccctg 420
ggctgcctgg tcaaggacta ctccccgaa ccggtgacgg tctcgtggaa ctcaggcgcc 480
ctgaccagcg gcgtgcacac ctcccggct gtcctacagt cctcaggact ctactccctc 540
agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaactg 600
aatcacaage ccagcaacac caaggtggac aagaaagttg agcccaaatc ttgtgacaaa 660
actcacacat gccaccgtg cccagcacct gaactcggcg gggcaccgtc agtctctctc 720
ttcccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccga ccctgaggt cacatgcgtg 780
gtggtggacg tgagccacga agacctgag gtcaagtca actggtactg ggacggcgtg 840
gaggtgcata atgccaagac aaagccggcg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 900
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag 960
gtctccaaca aagccctccc agccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaaggcag 1020
ccccgagaac cacaggtgta caccctgcc ccatcccggg atgagctgac caagaaccag 1080
gtcagcctga cctgctgggt caaagcttc tatcccagcg acatcgcctg ggagtgggag 1140
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1200
tcctctctcc tetacagcaa gtcaccgtg gacaagagca ggtggcagea ggggaacgtc 1260
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acagcgagaa gagcctctcc 1320
ctgtctccgg gtaaa 1335

<210> 40
<211> 219
<212> PRT
<213> 人

<400> 40
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 Val Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30
Asn Gly Tyr 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 Thr
85 90 95
Arg His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

[0018]

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

<210> 41
 <211> 657
 <212> DNA
 <213> 人

<400> 41
 gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc 60
 atctcctgca gagttagtca gaccctttta cacagtaatg gatacaccta ttacattgg 120
 taccctgcaga agccagggca gtctccacag ctctgatct ataaagtct caaccgattt 180
 tctgggtcc ctgacagggt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaac 240
 agcagagtgg aggctgagga tgttgggtt tattactgct ctcaaactag acatgttccg 300
 tacactgtcg gccgagggac caaggtggaa atcaaactga cggcggctgc accatctgtc 360
 ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgctctgt tgtgtgctg 420
 ctgaataact tctateccag agaggccaaa gtacagtggg aggtggacaa cgccctccaa 480
 tccggtaact cccaggagag tgcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540
 agcagcacc tgacgtgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgctgcgaa 600
 gtcaccatc agggcctgag ctgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt 657

<210> 42
 <211> 1335
 <212> DNA
 <213> 人

<400> 42
 gaggtgcagc tggcggagtc tggcggcgga ctggtgcagc ctggcggcag cctgagactg 60
 agctgtgccc tgcctggcct caccctcagc gacaacggca tggcctgggt gaggcaggcc 120
 cctggcaagg gcctggagtg ggtgtcctc atcagcaacc tggcctacag catcgactac 180
 gccgacaccg tgaccggcag attcaccatc agccgggaca acgccaagaa cagcctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgag agccgaggac accgcccgtg actactgtgt gagcggcacc 300
 tggctgcct actggggcca gggcaccctg gtgaccgtgt ccagcggcag caccaagggc 360
 cccagcgtgt tccccctgg ccccagcagc aagagcacca gccggcggcag agccgcccctg 420
 ggcctgctgg tgaaggacta ctccccgaa cgggtgaccg tgtctggaa cagcggagcc 480
 ctgaccagcg gcgtgcacac ctccccgcc gtctgcaga gcagcggcct gtacagcctg 540

[0019]

agcagcgtgg tgaccgtgcc cagcagcagc ctgggcaccc agacctacat ctgtaacgtg 600
 aaccacaage ccagcaaac caaggtggac aagaaggtgg agcccaagag ctgtgacaag 660
 acccacacct gccccccctg cctctcccc gagctggccc gageccccag cgtgttctg 720
 ttcccccca agcctaagga caccctgatg atcagcagaa cccccaggtg gacctgtgtg 780
 gtggtggatg tgagccacga ggaccctgag gtgaagtca actggtacgt ggacggcgtg 840
 gaggtgcaca atgccaagac caagcccagg gaggagcagt acaacagcac ctaccgggtg 900
 gtgtcegtgc tgaccgtgct gcaccaggat tgctgaacg gcaaggagta caagtgaag 960
 gtgtccaaca aggcctgcc tgcctctatc gaaaaacca tcagcaaggc caagggccag 1020
 cccagagagc ccaggtgta caccctgcc cctagcagag atgagctgac caagaaccag 1080
 gtgtccctga cctgctgtgt gaagggcttc taccceagcg acatgccctg ggagtgggag 1140
 agcaacggcc agcccagaaa caactacaag accaccccc ctgtgtgga cagcgatggc 1200
 agctttctcc tctacagcaa gctgaccgtg gacaagagca gatggcagca gggcaacgtg 1260
 ttcagctgct ccgtgatgca cgaggccctg cacaatcact acaccagaa gagcctgagc 1320
 ctgtccccctg gcaag 1335

- <210> 43
- <211> 657
- <212> DNA
- <213> 人

<400> 43
 gacatcgtga tgaccagag cccctgagc ctgcccgtga ccctggcga gcccgccage 60
 atcagctgta gactgagcca gagcctgctg cacagcaacg gctacaccta cctgactgg 120
 tatctgcaga agcctggcca gaccctcag ctgtgatct acaaggtgtc caaccggttc 180
 agcggcgtgc ctgatagatt cagcggcagc ggtccggca ccgactcac cctgaagatc 240
 agcagagtgg agcccagga tgtggcgtg tactactgct cccagaccag acactgect 300
 tacacctttg gcgccggaac aaaggtggag atcaagcgtc cggcggcgc cccagcgtg 360
 ttcacltcc ccccagcga tgagcagctg aagagcggca ccgccagcgt ggtgtgtctg 420
 ctgaacaact tctaccccc ggaggccaag gtgcagtgga aggtggaca tgcctgcag 480
 agcggcaaca gccaggagag cgtgaccgag caggacagca aggactccac ctacagcctg 540
 agcagcacc tgaccctgag caagggccgac tacgagaagc acaaggtgta cgcctgtgag 600
 gtgaccace agggcctgtc cagccccgtg accaagagct tcaaccgggg cgagtgc 657

- <210> 44
- <211> 16
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 肽

- <221> MOD_RES
- <222> (16)...(0)
- <223> 生物素化的

<400> 44
 Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His Gly Ser Gly Lys
 1 5 10 15