



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110251668 A

(43)申请公布日 2019.09.20

(21)申请号 201910387173.6

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2011.11.29

A61K 39/395(2006.01)

(30)优先权数据

A61K 47/68(2017.01)

61/418,223 2010.11.30 US

A61P 25/00(2006.01)

(62)分案原申请数据

201180057610.X 2011.11.29

(71)申请人 霍夫曼-拉罗奇有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72)发明人 马克·丹尼斯

瑞安·杰斐逊·沃茨 于蕴华

章莹

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任

公司 11021

代理人 张国梁 程金山

权利要求书1页 说明书50页

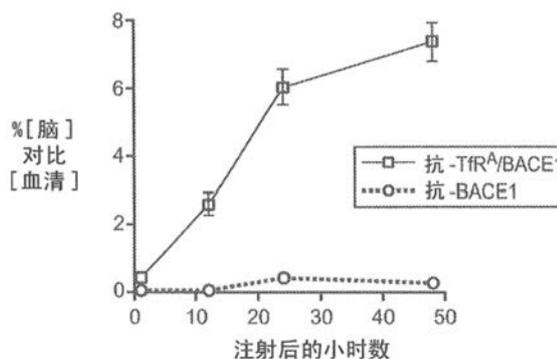
序列表8页 附图25页

(54)发明名称

低亲和力血脑屏障受体抗体及其用途

(57)摘要

本发明涉及结合血脑屏障受体(BBB-R)的抗体及其使用方法。



1. 以低亲和力结合血脑屏障受体 (BBB-R) 的抗体在制备将化合物转运穿过血脑屏障的药物中的应用, 其中所述化合物与所述抗体偶联并暴露于血脑屏障, 以使所述抗体将与其偶联的所述化合物转运穿过血脑屏障, 其中所述BBB-R是运铁蛋白受体 (TfR)。

2. 以低亲和力结合BBB-R的抗体在制备增加CNS对化合物的暴露的药物中的应用, 其中所述化合物与所述抗体偶联, 由此增加CNS对所述化合物的暴露, 其中所述BBB-R是运铁蛋白受体 (TfR)。

3. 以低亲和力结合BBB-R的抗体在制备降低被施用于受试者的化合物的清除率的药物中的应用, 其中所述化合物与所述抗体偶联, 以使所述化合物的清除率降低, 其中所述BBB-R是运铁蛋白受体 (TfR)。

4. 以低亲和力结合BBB-R的抗体在制备增加被施用于受试者的化合物在CNS中滞留的药物中的应用, 其中所述化合物与所述偶联, 以使所述化合物在CNS中的滞留增加, 其中所述BBB-R是运铁蛋白受体 (TfR)。

5. 以低亲和力结合BBB-R的抗体在制备优化在受试者的CNS中有效的化合物的药物动力学和/或药效学的药物中的应用方法, 其中所述化合物与所述抗体偶联, 并且这样选择所述抗体以致于在与所述化合物偶联后所述抗体对所述BBB-R的亲和力导致与所述化合物缀合的所述抗体穿过BBB的一定量的转运, 其使所述化合物在CNS中的药物动力学和/或药效学被优化, 其中所述BBB-R是运铁蛋白受体 (TfR)。

6. 结合BBB-R并偶联化合物的抗体在制备治疗哺乳动物的神经疾病的药物中的应用, 其中已经选择所述抗体以对所述BBB-R具有低亲和力, 并由此提高所述抗体和偶联的化合物的CNS摄取, 其中所述BBB-R是运铁蛋白受体 (TfR)。

7. 一种制备用于将化合物转运穿过BBB的抗体的方法, 所述方法包括: 选择一种对血脑屏障受体 (BBB-R) 特异的抗体, 因为该抗体具有所需的对所述BBB-R的低亲和力, 其中所述BBB-R是运铁蛋白受体 (TfR)。

8. 一种结合BBB-R的抗体, 其中所述抗体对所述BBB-R的亲和力为5nM至10 μ M, 其中所述BBB-R是运铁蛋白受体 (TfR)。

9. 以低亲和力结合BBB-R的抗体在制备用于治疗神经疾病的药物中的用途, 其中所述BBB-R是运铁蛋白受体 (TfR)。

10. 以低亲和力结合BBB-R的抗体, 其用于治疗神经疾病, 其中所述BBB-R是运铁蛋白受体 (TfR)。

低亲和力和血脑屏障受体抗体及其用途

[0001] 本申请是国际申请号PCT/US2011/062445,国际申请日2011年11月29日,中国申请号201180057610.X,发明名称为“低亲和力和血脑屏障受体抗体及其用途”的专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请

[0003] 本申请要求于2010年11月30日提交的美国临时申请序号61/418,223的利益,该美国临时申请通过引用完整地结合于此。

发明领域

[0004] 本发明涉及结合血脑屏障受体 (BBB-R) 的抗体及其使用方法。

[0005] 背景

[0006] 大分子药物的脑穿透严重受限于在很大程度上不能透过的血脑屏障 (BBB)。有克服该障碍的许多策略,包括利用在脑部微血管内皮表达的内源受体的转胞吞作用 (transcytosis) 运输通路。已经针对这些受体设计重组蛋白质如单克隆抗体,以使得能够向脑部进行大分子的受体介导的递送。然而,仍未发现这样的策略,其在使回到血液的反向转胞吞作用最小化的同时使脑摄取最大化,以及使在治疗用药后积累的程度最大化。此外,穿过BBB的抗体是否具有药效学功能是未知的。

[0007] 概述

[0008] 单克隆抗体具有用于治疗神经或者中枢神经系统 (CNS) 疾病的极大治疗潜力,但是血脑屏障 (BBB) 限制其进入脑部。过去的研究显示非常小百分比 (约0.1%) 的在血流中循环的IgG穿过BBB进入CNS (Felgenhauer, Klin. Wschr. 52:1158-1164 (1974)), 其中该抗体的CNS浓度可能不足以允许加强的效果。本发明的方法和组合物提供提高分布到CNS中的抗体的百分比的方法,并且因此更容易达到CNS中的治疗性抗体的浓度。

[0009] 本文中描述了一组针对运铁蛋白受体 (TfR) 的抗体,其在小鼠中单次系统注射后可以示踪剂量和治疗相关剂量将包括抗体和小分子在内的治疗剂递送穿过BBB。注射后24小时抗体的分布从血管变为神经,指示显著量的抗体已经被转胞吞通过脑内皮细胞从而到达实质。对于研究的抗TfR变体来说,摄取到和分布在CNS中的抗体的数量与其对TfR的结合亲和力反相关。使用双特异性抗体来验证BBB转运,所述双特异性抗体结合以下两者:TfR和淀粉状蛋白前体蛋白 (APP) 裂解酶, β -分泌酶 (BACE1)。与单独的单特异性抗BACE1相比,使用本发明的方法改造的双特异性抗TfR/BACE1抗体的单次全身剂量不仅导致在脑中显著的抗体摄取,而且还显著地降低脑 AB_{1-40} 水平,表明BBB穿透性影响抗BACE1的效力。类似地,使用本发明的方法,结合TfR和淀粉状蛋白 β (即,由BACE1裂解APP产生的APP的一部分,其是淀粉状蛋白斑块的一个主要成分) 两者的双特异性抗体可以容易地被摄取到脑中。本文所述的数据和实验突出显示了使用较低亲和力抗体的方法增加抗体被CNS摄取的若干成因机制。首先,高亲和力抗BBB受体 (BBB-R) 抗体 (例如,抗TfR^A) 通过快速地使在脑血管系统中的BBB-R饱和来限制脑摄取,因此减少摄取到脑中的抗体的总量并且还限制其分布到血管系统中。惊人地,降低对BBB-R的亲和力提高脑摄取和分布,观察到从血管系统到分布在CNS中

的神经元和相关的神经毡的定位的明显移动。第二,提出抗体对BBB-R的较低的亲和力削弱了抗体通过BBB-R从BBB的CNS侧回到该膜的血管侧的能力,因为抗体对BBB-R的整体亲和力低并且由于抗体快速扩散到CNS区室(compartment)中而使抗体在BBB的CNS侧的局部浓度是不饱和的。第三,在体内,以及如对于TfR系统所观察到的,对BBB-R具有较低亲和力的抗体不会像对BBB-R具有较高亲和力的那些那样被高效地从系统中清除,并且因此与其较高亲和力的对应物相比保持在较高的循环浓度。这是有优势的,因为较低亲和力抗体的循环抗体水平被维持在治疗水平的的时间比较高亲和力抗体更长,这因此在更长的时间内提高脑对抗体的摄取。此外,在血浆和脑暴露方面的这种提高可以降低临床用药的频率,这将具有潜在的益处,不仅是对于患者顺从性和方便性,而且还在于减轻抗体和/或与其相偶联的治疗性化合物的任何潜在的副作用或者脱靶(off-target)效应。抗TfR/BACE1和抗TfR/A β 都是用于治疗阿尔茨海默病(Alzheimer's disease)的有前途的和新型的候选治疗剂。此外,基于受体介导的转运(RMT)的双特异性靶向技术为用于CNS疾病的大量潜在治疗剂打开了大门。本发明提供改造BBB-渗透性治疗剂(therapeutic)的方法,该方法极大提高治疗剂的跨BBB的转运和CNS分布。

[0010] 因此,在第一实施方案中,本发明提供将化合物转运穿过血脑屏障的方法,所述方法包括将以低亲和力与血脑屏障受体(BBB-R)结合的、与化合物偶联(coupled)的抗体暴露于血脑屏障,以使该抗体将与其偶联的化合物转运穿过血脑屏障。在一个方面中,化合物是神经疾病药物。在另一个方面中,化合物是显影剂。在另一个方面中,化合物被标记。在另一个方面中,抗体被标记。在另一个方面中,抗体不削弱BBB-R与其一种或多种天然配体的结合。在另一个这样的方面中,抗体以这样的方式特异性地结合TfR以致其不抑制TfR与运铁蛋白的结合。在另一个方面中,BBB是在哺乳动物中。在另一个这样的方面中,哺乳动物是人。在另一个这样的方面中,哺乳动物患有神经疾病。在另一个这样的方面中,神经疾病选自自由以下组成的组:阿尔茨海默病(AD),卒中,痴呆,肌营养不良(muscular dystrophy)(MD),多发性硬化(multiple sclerosis)(MS),肌萎缩性侧索硬化(amyotrophic lateral sclerosis)(ALS),囊性纤维化(cystic fibrosis),安吉尔曼综合征(Angelman's syndrome),利德尔综合征(Liddle syndrome),帕金森病(Parkinson's disease),皮克病(Pick's disease),佩吉特病(Paget's disease),癌症,和外伤性脑损伤。在另一个方面中,BBB是在人中。

[0011] 在另一个方面中,抗体具有的对BBB-R的IC₅₀为约1nM至约100 μ M。在另一个这样的方面中,IC₅₀为约5nM至约100 μ M。在另一个这样的方面中,IC₅₀为约50nM至约100 μ M。在另一个这样的方面中,IC₅₀为约100nM至约100 μ M。在另一个方面中,抗体对BBB-R的亲和力为约5nM至约10 μ M。在另一个这样的方面中,抗体,当与化合物偶联时,对BBB-R的亲和力为约30nM至约1 μ M。在另一个这样的方面中,抗体,当与化合物偶联时,对BBB-R的亲和力为约50nM至约1 μ M。在另一个这样的方面中,与化合物偶联的抗体特异性地结合TfR并且其对TfR的亲和力处于对于抗TfR^A/BACE1抗体和抗TfR^E/BACE1抗体所观察到的那些亲和力之间。在另一个这样的方面中,与化合物偶联的抗体特异性地结合TfR并且其对TfR的亲和力处于对于抗TfR^D/BACE1抗体和抗TfR^E/BACE1抗体所观察到的那些亲和力之间。在另一个这样的方面中,与化合物偶联的抗体特异性地结合TfR并且其对TfR的IC₅₀处于对于抗TfR^A/BACE1抗体和抗TfR^E/BACE1抗体所观察到的那些IC₅₀之间。在另一个这样的方面中,与化合物偶联

的抗体特异性地结合TfR并且其对TfR的IC50处于对于抗TfR^D/BACE1抗体和抗TfR^E/BACE1抗体所观察到的那些IC50之间。在一个方面中,使用斯卡查德分析,测量抗BBB-R或者抗BBB-R/化合物对BBB-R的亲合力。在另一个方面中,使用BIACORE分析,测量抗BBB-R或者抗BBB-R/化合物对BBB-R的亲合力。在另一个方面中,使用竞争ELISA,测量抗BBB-R或者抗BBB-R/化合物对BBB-R的亲合力。

[0012] 在另一个方面中,BBB-R选自由以下组成的组:运铁蛋白受体(TfR),胰岛素受体,胰岛素样生长因子受体(IGF受体),低密度脂蛋白受体相关蛋白8(LRP8),低密度脂蛋白受体相关蛋白1(LRP1),和肝素结合性表皮生长因子样生长因子(HB-EGF)。在另一个这样的方面中,BBB-R是人BBB-R。在一个这样的方面中,BBB-R是TfR。在另一个这样的方面中,BBB-R是TfR并且抗体不抑制TfR活性。在另一个这样的方面中,BBB-R是TfR并且抗体不抑制TfR与运铁蛋白结合。在另一个方面中,与化合物偶联的抗体以治疗剂量被施用。在一个这样的方面中,治疗剂量是这样的剂量,其使抗体特异性结合的BBB-R饱和。

[0013] 在另一个方面中,化合物与抗体共价偶联。在一个这样的方面中,化合物通过接头与抗体相连。在一个这样的方面中,接头是可裂解的。在另一个这样的方面中,接头是不可裂解的。在另一个这样的方面中,化合物直接连接到抗体。在一个这样的方面中,抗体是多特异性抗体并且化合物形成多特异性抗体的一部分。在另一个这样的方面中,多特异性抗体包含结合BBB-R的第一抗原结合位点和结合脑抗原的第二抗原结合位点。在另一个这样的方面中,脑抗原选自由以下组成的组: β -分泌酶1(BACE1), $A\beta$,表皮生长因子受体(EGFR),人表皮生长因子受体2(HER2),Tau,脱脂载脂蛋白E4(ApoE4), α -突触核蛋白,CD20,亨廷顿蛋白,朊病毒蛋白(PrP),富含亮氨酸重复序列激酶2(LRRK2),帕金森蛋白,早老蛋白1,早老蛋白2, γ 分泌酶,死亡受体6(DR6),淀粉状蛋白前体蛋白(APP),p75神经营养蛋白受体(p75NTR),和胱天蛋白酶6。在另一个这样的方面中,多特异性抗体结合TfR和BACE1两者。在另一个这样的方面中,多特异性抗体结合TfR和 $A\beta$ 两者。在另一个这样的方面中,多特异性抗体被标记。在另一个方面中,化合物可逆地偶联到抗体以致化合物在BBB转运的同时或之后从抗体释放。

[0014] 在另一个实施方案中,本发明提供使CNS对化合物的暴露增加的方法,其中化合物被偶联到以低亲合力结合BBB-R的抗体,由此增加CNS对化合物的暴露。在一个方面中,化合物是神经疾病药物。在另一个方面中,化合物是显影剂。在另一个方面中,化合物被标记。在另一个方面中,抗体被标记。在另一个方面中,抗体不削弱BBB-R与其一种或多种天然配体的结合。在另一个这样的方面中,抗体以这样的方式特异性地结合TfR以致其不抑制TfR与运铁蛋白结合。在另一个方面中,与抗体偶联的化合物被施用于哺乳动物。在另一个这样的方面中,哺乳动物是人。在另一个这样的方面中,哺乳动物患有神经疾病。在另一个这样的方面中,神经疾病选自由以下组成的组:阿尔茨海默病(AD),卒中,痴呆,肌营养不良(MD),多发性硬化(MS),肌萎缩性侧索硬化(ALS),囊性纤维化,安吉尔曼综合征,利德尔综合征,帕金森病,皮克病,佩吉特病,癌症,和外伤性脑损伤。

[0015] 在另一个方面中,相对于与不具有降低的对BBB-R的亲合力的典型抗体偶联的化合物的CNS暴露,测量CNS对化合物的暴露的增加。在另一个方面中,CNS对化合物的暴露的增加被计算为在施用后在CNS中发现的化合物的量相对于在血清中发现的量的比率。在另一个这样的方面中,CNS暴露的增加导致大于0.1%的比率。在另一个方面中,相对于在不存

在偶联的抗体的情况下的化合物的CNS暴露,测量CNS对化合物的暴露的增加。在另一个方面中,通过成像来测量CNS对化合物的暴露的增加。在另一个方面中,通过间接读出如一种或多种生理学症状的改变来测量CNS对化合物的暴露的增加。

[0016] 在另一个方面中,抗体对BBB-R的IC₅₀为约1nM至约100 μ M。在另一个这样的方面中,IC₅₀为约5nM至约100 μ M。在另一个这样的方面中,IC₅₀为约50nM至约100 μ M。在另一个这样的方面中,IC₅₀为约100nM至约100 μ M。在另一个方面中,抗体对BBB-R的亲合力为约5nM至约10 μ M。在另一个这样的方面中,抗体,当与化合物偶联时,对BBB-R的亲合力为约30nM至约1 μ M。在另一个这样的方面中,抗体,当与化合物偶联时,对BBB-R的亲合力为约50nM至约1 μ M。在另一个这样的方面中,与化合物偶联的抗体特异性地结合TfR并且其对TfR的亲合力处于对于抗TfR^A/BACE1抗体和抗TfR^E/BACE1抗体所观察到的那些亲合力之间。在另一个这样的方面中,与化合物偶联的抗体特异性地结合TfR并且其对TfR的亲合力处于对于抗TfR^D/BACE1抗体和抗TfR^E/BACE1抗体所观察到的那些亲合力之间。在另一个这样的方面中,与化合物偶联的抗体特异性地结合TfR并且其对TfR的IC₅₀处于对于抗TfR^A/BACE1抗体和抗TfR^E/BACE1抗体所观察到的那些IC₅₀之间。在另一个这样的方面中,与化合物偶联的抗体特异性地结合TfR并且其对TfR的IC₅₀处于对于抗TfR^D/BACE1抗体和抗TfR^E/BACE1抗体所观察到的那些IC₅₀之间。在一个方面中,使用斯卡查德分析,测量抗BBB-R或者抗BBB-R/化合物对BBB-R的亲合力。在另一个方面中,使用BIACORE分析,测量抗BBB-R或者抗BBB-R/化合物对BBB-R的亲合力。在另一个方面中,使用竞争ELISA,测量抗BBB-R或者抗BBB-R/化合物对BBB-R的亲合力。

[0017] 在另一个方面中,BBB-R选自由以下组成的组:运铁蛋白受体(TfR),胰岛素受体,胰岛素样生长因子受体(IGF受体),低密度脂蛋白受体相关蛋白8(LRP8),低密度脂蛋白受体相关蛋白1(LRP1),和肝素结合性表皮生长因子样生长因子(HB-EGF)。在另一个这样的方面中,BBB-R是人BBB-R。在一个这样的方面中,BBB-R是TfR。在另一个这样的方面中,BBB-R是TfR并且抗体不抑制TfR活性。在另一个这样的方面中,BBB-R是TfR并且抗体不抑制TfR与运铁蛋白结合。在另一个方面中,与化合物偶联的抗体以治疗剂量被施用。在一个这样的方面中,治疗剂量是这样的剂量,其使抗体特异性结合的BBB-R饱和

[0018] 在另一个方面中,化合物与抗体共价偶联。在一个这样的方面中,化合物通过接头与抗体相连。在一个这样的方面中,接头是可裂解的。在另一个这样的方面中,接头是不可裂解的。在另一个这样的方面中,化合物直接偶联到抗体。在一个这样的方面中,抗体是多特异性抗体并且化合物形成多特异性抗体的一部分。在另一个这样的方面中,多特异性抗体包含结合BBB-R的第一抗原结合位点和结合脑抗原的第二抗原结合位点。在另一个这样的方面中,脑抗原选自由以下组成的组: β -分泌酶1(BACE1), $A\beta$,表皮生长因子受体(EGFR),人表皮生长因子受体2(HER2),Tau,脱脂载脂蛋白E4(ApoE4), α -突触核蛋白,CD20,亨廷顿蛋白,朊病毒蛋白(PrP),富含亮氨酸重复序列激酶2(LRRK2),帕金森蛋白,早老蛋白1,早老蛋白2, γ 分泌酶,死亡受体6(DR6),淀粉状蛋白前体蛋白(APP),p75神经营养蛋白受体(p75NTR),和胱天蛋白酶6。在另一个这样的方面中,多特异性抗体结合TfR和BACE1两者。在另一个这样的方面中,多特异性抗体结合TfR和 $A\beta$ 两者。在另一个这样的方面中,多特异性抗体被标记。在另一个方面中,化合物可逆地偶联到抗体以致化合物在BBB转运的同时或之后从抗体释放。

[0019] 在另一个实施方案中,本发明提供降低被施用于受试者的化合物的清除率的方法,其中化合物被偶联到以低亲和力结合BBB-R的抗体,从而降低化合物的清除率。在一个方面中,化合物是神经疾病药物。在另一个方面中,化合物是显影剂。在另一个方面中,化合物被标记。在另一个方面中,抗体被标记。在另一个方面中,抗体不削弱BBB-R与其一种或多种天然配体的结合。在另一个这样的方面中,抗体以这样的方式特异性地结合TfR以致其不抑制TfR与运铁蛋白结合。在另一个方面中,受试者是哺乳动物。在另一个这样的方面中,哺乳动物是人。在另一个这样的方面中,哺乳动物患有神经疾病。在另一个这样的方面中,神经疾病选自自由以下组成的组:阿尔茨海默病(AD),卒中,痴呆,肌营养不良(MD),多发性硬化(MS),肌萎缩性侧索硬化(ALS),囊性纤维化,安吉尔曼综合征,利德尔综合征,帕金森病,皮克病,佩吉特病,癌症,和外伤性脑损伤。

[0020] 在另一个方面中,相对于与不具有降低的对BBB-R的亲合力的典型抗体偶联的化合物的清除率,测量化合物的清除率的降低。在另一个方面中,相对于化合物在不存在偶联的抗体的情况下的清除率,测量化合物的清除率的降低。

[0021] 在另一个方面中,抗体对BBB-R的IC₅₀为约1nM至约100 μ M。在另一个这样的方面中,IC₅₀为约5nM至约100 μ M。在另一个这样的方面中,IC₅₀为约50nM至约100 μ M。在另一个这样的方面中,IC₅₀为约100nM至约100 μ M。在另一个方面中,抗体对BBB-R的亲合力为约5nM至约10 μ M。在另一个这样的方面中,抗体,当与化合物偶联时,对BBB-R的亲合力为约30nM至约1 μ M。在另一个这样的方面中,抗体,当与化合物偶联时,对BBB-R的亲合力为约50nM至约1 μ M。在另一个这样的方面中,与化合物偶联的抗体特异性地结合TfR并且其对TfR的亲合力处于对于抗TfR^A/BACE1抗体和抗TfR^E/BACE1抗体所观察到的那些亲合力之间。在另一个这样的方面中,与化合物偶联的抗体特异性地结合TfR并且其对TfR的亲合力处于对于抗TfR^D/BACE1抗体和抗TfR^E/BACE1抗体所观察到的那些亲合力之间。在另一个这样的方面中,与化合物偶联的抗体特异性地结合TfR并且其对TfR的IC₅₀处于对于抗TfR^A/BACE1抗体和抗TfR^E/BACE1抗体所观察到的那些IC₅₀之间。在另一个这样的方面中,与化合物偶联的抗体特异性地结合TfR并且其对TfR的IC₅₀处于对于抗TfR^D/BACE1抗体和抗TfR^E/BACE1抗体所观察到的那些IC₅₀之间。在一个方面中,使用斯卡查德分析,测量抗BBB-R或者抗BBB-R/化合物对BBB-R的亲合力。在另一个方面中,使用BIACORE分析,测量抗BBB-R或者抗BBB-R/化合物对BBB-R的亲合力。在另一个方面中,使用竞争ELISA,测量抗BBB-R或者抗BBB-R/化合物对BBB-R的亲合力。

[0022] 在另一个方面中,BBB-R选自自由以下组成的组:运铁蛋白受体(TfR),胰岛素受体,胰岛素样生长因子受体(IGF受体),低密度脂蛋白受体相关蛋白8(LRP8),低密度脂蛋白受体相关蛋白1(LRP1),和肝素结合性表皮生长因子样生长因子(HB-EGF)。在另一个这样的方面中,BBB-R是人BBB-R。在一个这样的方面中,BBB-R是TfR。在另一个这样的方面中,BBB-R是TfR并且抗体不抑制TfR活性。在另一个这样的方面中,BBB-R是TfR并且抗体不抑制TfR与运铁蛋白结合。在另一个方面中,与化合物偶联的抗体以治疗剂量被施用。在一个这样的方面中,治疗剂量是这样的剂量,其使抗体特异性结合的BBB-R饱和。

[0023] 在另一个方面中,化合物与抗体共价偶联。在一个这样的方面中,化合物通过接头与抗体相连。在一个这样的方面中,接头是可裂解的。在另一个这样的方面中,接头是不可裂解的。在另一个这样的方面中,化合物直接偶联到抗体。在一个这样的方面中,抗体是多

特异性抗体并且化合物形成多特异性抗体的一部分。在另一个这样的方面中,多特异性抗体包含结合BBB-R的第一抗原结合位点和结合脑抗原的第二抗原结合位点。在另一个这样的方面中,脑抗原选自由以下组成的组: β -分泌酶1 (BACE1), $A\beta$, 表皮生长因子受体 (EGFR), 人表皮生长因子受体2 (HER2), Tau, 脱脂载脂蛋白E4 (ApoE4), α -突触核蛋白, CD20, 亨廷顿蛋白, 朊病毒蛋白 (PrP), 富含亮氨酸重复序列激酶2 (LRRK2), 帕金森蛋白, 早老蛋白1, 早老蛋白2, γ 分泌酶, 死亡受体6 (DR6), 淀粉状蛋白前体蛋白 (APP), p75神经营养蛋白受体 (p75NTR), 和胱天蛋白酶6。在另一个这样的方面中,多特异性抗体结合TfR和BACE1两者。在另一个这样的方面中,多特异性抗体结合TfR和 $A\beta$ 两者。在另一个这样的方面中,多特异性抗体被标记。在另一个方面中,化合物可逆地偶联到抗体以致化合物在BBB转运的同时或之后从抗体释放。

[0024] 增加被施用于受试者的化合物在CNS中的滞留 (retention) 的方法,其中化合物被偶联到以低亲和力结合BBB-R的抗体,以增加化合物在CNS中的滞留。在一个方面中,化合物是神经疾病药物。在另一个方面中,化合物是显影剂。在另一个方面中,化合物被标记。在另一个方面中,抗体被标记。在另一个方面中,抗体不削弱BBB-R与其一种或多种天然配体的结合。在另一个这样的方面中,抗体以这样的方式特异性地结合TfR以致其不抑制TfR与运铁蛋白结合。在另一个方面中,化合物被施用于哺乳动物。在另一个这样的方面中,哺乳动物是人。在另一个这样的方面中,哺乳动物患有神经疾病。在另一个这样的方面中,神经疾病选自由以下组成的组:阿尔茨海默病 (AD), 卒中, 痴呆, 肌营养不良 (MD), 多发性硬化 (MS), 肌萎缩性侧索硬化 (ALS), 囊性纤维化, 安吉尔曼综合征, 利德尔综合征, 帕金森病, 皮克病, 佩吉特病, 癌症, 和外伤性脑损伤。

[0025] 在另一个方面中,相对于与不具有降低的对BBB-R的亲力的典型抗体偶联的化合物的CNS滞留,测量化合物的CNS滞留的增加。在另一个方面中,化合物的CNS滞留的增加被测量为在施用后在一个或多个时间点CNS中发现的化合物的量相对于在血清中发现的量的比率。在另一个这样的方面中,在施用后在一个或多个时间点CNS滞留的增加导致大于0.1%的比率。在另一个方面中,相对于在不存在偶联的抗体的情况下的化合物的CNS滞留,测量化合物的CNS滞留的增加。在另一个方面中,通过成像,测量化合物的CNS滞留的增加。在另一个方面中,通过间接读出 (readout) 如一种或多种生理症状的改变来测量化合物的CNS滞留的增加。

[0026] 在另一个方面中,抗体对BBB-R的IC₅₀为约1nM至约100 μ M。在另一个这样的方面中,IC₅₀为约5nM至约100 μ M。在另一个这样的方面中,IC₅₀为约50nM至约100 μ M。在另一个这样的方面中,IC₅₀为约100nM至约100 μ M。在另一个方面中,抗体对BBB-R的亲力为约5nM至约10 μ M。在另一个这样的方面中,抗体,当与化合物偶联时,对BBB-R的亲力为约30nM至约1 μ M。在另一个这样的方面中,抗体,当与化合物偶联时,对BBB-R的亲力为约50nM至约1 μ M。在另一个这样的方面中,与化合物偶联的抗体特异性地结合TfR并且其对TfR的亲力处于对于抗TfR^A/BACE1抗体和抗TfR^E/BACE1抗体所观察到的那些亲力之间。在另一个这样的方面中,与化合物偶联的抗体特异性地结合TfR并且其对TfR的亲力处于对于抗TfR^D/BACE1抗体和抗TfR^E/BACE1抗体所观察到的那些亲力之间。在另一个这样的方面中,与化合物偶联的抗体特异性地结合TfR并且其对TfR的IC₅₀处于对于抗TfR^A/BACE1抗体和抗TfR^E/BACE1抗体所观察到的那些IC₅₀之间。在另一个这样的方面中,与化合物偶联的抗体

特异性地结合TfR并且其对TfR的IC50处于对于抗TfR^D/BACE1抗体和抗TfR^E/BACE1抗体所观察到的那些IC50之间。在一个方面中,使用斯卡查德分析,测量抗BBB-R或者抗BBB-R/化合物对BBB-R的亲合力。在另一个方面中,使用BIACORE分析,测量抗BBB-R或者抗BBB-R/化合物对BBB-R的亲合力。在另一个方面中,使用竞争ELISA,测量抗BBB-R或者抗BBB-R/化合物对BBB-R的亲合力。

[0027] 在另一个方面中, BBB-R选自由以下组成的组: 运铁蛋白受体 (TfR), 胰岛素受体, 胰岛素样生长因子受体 (IGF受体), 低密度脂蛋白受体相关蛋白8 (LRP8), 低密度脂蛋白受体相关蛋白1 (LRP1), 和肝素结合性表皮生长因子样生长因子 (HB-EGF)。在另一个这样的方面中, BBB-R是人BBB-R。在一个这样的方面中, BBB-R是TfR。在另一个这样的方面中, BBB-R是TfR并且抗体不抑制TfR活性。在另一个这样的方面中, BBB-R是TfR并且抗体不抑制TfR与运铁蛋白结合。在另一个方面中, 与化合物偶联的抗体以治疗剂量被施用。在一个这样的方面中, 治疗剂量是这样的剂量, 其使抗体特异性结合的BBB-R饱和。

[0028] 在另一个方面中, 化合物与抗体共价偶联。在一个这样的方面中, 化合物通过接头与抗体相连。在一个这样的方面中, 接头是可裂解的。在另一个这样的方面中, 接头是不可裂解的。在另一个这样的方面中, 化合物直接偶联到抗体。在一个这样的方面中, 抗体是多特异性抗体并且化合物形成多特异性抗体的一部分。在另一个这样的方面中, 多特异性抗体包含结合BBB-R的第一抗原结合位点和结合脑抗原的第二抗原结合位点。在另一个这样的方面中, 脑抗原选自由以下组成的组: β -分泌酶1 (BACE1), $A\beta$, 表皮生长因子受体 (EGFR), 人表皮生长因子受体2 (HER2), Tau, 脱脂载脂蛋白E4 (ApoE4), α -突触核蛋白, CD20, 亨廷顿蛋白, 朊病毒蛋白 (PrP), 富含亮氨酸重复序列激酶2 (LRRK2), 帕金森蛋白, 早老蛋白1, 早老蛋白2, γ 分泌酶, 死亡受体6 (DR6), 淀粉状蛋白前体蛋白 (APP), p75神经营养蛋白受体 (p75NTR), 和胱天蛋白酶6。在另一个这样的方面中, 多特异性抗体结合TfR和BACE1两者。在另一个这样的方面中, 多特异性抗体结合TfR和 $A\beta$ 两者。在另一个这样的方面中, 多特异性抗体被标记。在另一个方面中, 化合物可逆地偶联到抗体以致化合物在BBB转运的同时或之后从抗体释放。

[0029] 在另一个实施方案中, 本发明提供优化在受试者的CNS中有效的化合物的药物动力学和/或药效学的方法, 其中化合物被偶联到以低亲和力结合BBB-R的抗体, 并且这样选择所述抗体以致于在与所述化合物偶联后所述抗体对所述BBB-R的亲合力导致与所述化合物缀合的所述抗体穿过BBB的一定量的转运, 其使所述化合物在CNS中的药物动力学和/或药效学被优化。在一个方面中, 化合物是神经疾病药物。在另一个方面中, 化合物是显影剂。在另一个方面中, 化合物被标记。在另一个方面中, 抗体被标记。在另一个方面中, 抗体不削弱BBB-R与其一种或多种天然配体的结合。在另一个这样的方面中, 抗体以这样的方式特异性地结合TfR以致其不抑制TfR与运铁蛋白结合。在另一个方面中, BBB是在哺乳动物中。在另一个这样的方面中, 哺乳动物是人。在另一个这样的方面中, 哺乳动物患有神经疾病。在另一个这样的方面中, 神经疾病选自由以下组成的组: 阿尔茨海默病 (AD), 卒中, 痴呆, 肌营养不良 (MD), 多发性硬化 (MS), 肌萎缩性侧索硬化 (ALS), 囊性纤维化, 安吉尔曼综合征, 利德尔综合征, 帕金森病, 皮克病, 佩吉特病, 癌症, 和外伤性脑损伤。在另一个方面中, BBB是在人中。

[0030] 在一个方面中, 所述优化可以包括产生一系列抗体-化合物复合物, 其中每个抗体

具有不同的对BBB-R的亲合力,并且评估各自在CNS中的药物动力学和/或药效学。在另一个方面中,优化可以是相对于已知标准,如,但不限于,当被直接引入到CNS中时或者当在不存在偶联的抗BBB-R抗体的情况下被引入到受试者中时的化合物的药物动力学和/或药效学。

[0031] 在另一个方面中,抗体对BBB-R的IC₅₀为约1nM至约100 μ M。在另一个这样的方面中,IC₅₀为约5nM至约100 μ M。在另一个这样的方面中,IC₅₀为约50nM至约100 μ M。在另一个这样的方面中,IC₅₀为约100nM至约100 μ M。在另一个方面中,抗体对BBB-R的亲合力为约5nM至约10 μ M。在另一个这样的方面中,抗体,当与化合物偶联时,对BBB-R的亲合力为约30nM至约1 μ M。在另一个这样的方面中,抗体,当与化合物偶联时,对BBB-R的亲合力为约50nM至约1 μ M。在另一个这样的方面中,与化合物偶联的抗体特异性地结合TfR并且其对TfR的亲合力处于对于抗TfR^A/BACE1抗体和抗TfR^E/BACE1抗体所观察到的那些亲合力之间。在另一个这样的方面中,与化合物偶联的抗体特异性地结合TfR并且其对TfR的亲合力处于对于抗TfR^D/BACE1抗体和抗TfR^E/BACE1抗体所观察到的那些亲合力之间。在另一个这样的方面中,与化合物偶联的抗体特异性地结合TfR并且其对TfR的IC₅₀处于对于抗TfR^A/BACE1抗体和抗TfR^E/BACE1抗体所观察到的那些IC₅₀之间。在另一个这样的方面中,与化合物偶联的抗体特异性地结合TfR并且其对TfR的IC₅₀处于对于抗TfR^D/BACE1抗体和抗TfR^E/BACE1抗体所观察到的那些IC₅₀之间。在一个方面中,使用斯卡查德分析,测量抗BBB-R或者抗BBB-R/化合物对BBB-R的亲合力。在另一个方面中,使用BIACORE分析,测量抗BBB-R或者抗BBB-R/化合物对BBB-R的亲合力。在另一个方面中,使用竞争ELISA,测量抗BBB-R或者抗BBB-R/化合物对BBB-R的亲合力。

[0032] 在另一个方面中,BBB-R选自由以下组成的组:运铁蛋白受体(TfR),胰岛素受体,胰岛素样生长因子受体(IGF受体),低密度脂蛋白受体相关蛋白8(LRP8),低密度脂蛋白受体相关蛋白1(LRP1),和肝素结合性表皮生长因子样生长因子(HB-EGF)。在另一个这样的方面中,BBB-R是人BBB-R。在一个这样的方面中,BBB-R是TfR。在另一个这样的方面中,BBB-R是TfR并且抗体不抑制TfR活性。在另一个这样的方面中,BBB-R是TfR并且抗体不抑制TfR与运铁蛋白结合。在另一个方面中,与化合物偶联的抗体以治疗剂量被施用。在一个这样的方面中,治疗剂量是这样的剂量,其使抗体特异性结合的BBB-R饱和。

[0033] 在另一个方面中,化合物与抗体共价偶联。在一个这样的方面中,化合物通过接头与抗体相连。在一个这样的方面中,接头是可裂解的。在另一个这样的方面中,接头是不可裂解的。在另一个这样的方面中,化合物直接偶联到抗体。在一个这样的方面中,抗体是多特异性抗体并且化合物形成多特异性抗体的一部分。在另一个这样的方面中,多特异性抗体包含结合BBB-R的第一抗原结合位点和结合脑抗原的第二抗原结合位点。在另一个这样的方面中,脑抗原选自由以下组成的组: β -分泌酶1(BACE1), $A\beta$,表皮生长因子受体(EGFR),人表皮生长因子受体2(HER2),Tau,脱脂载脂蛋白E4(ApoE4), α -突触核蛋白,CD20,亨廷顿蛋白,朊病毒蛋白(PrP),富含亮氨酸重复序列激酶2(LRRK2),帕金森蛋白,早老蛋白1,早老蛋白2, γ 分泌酶,死亡受体6(DR6),淀粉状蛋白前体蛋白(APP),p75神经营养蛋白受体(p75NTR),和胱天蛋白酶6。在另一个这样的方面中,多特异性抗体结合TfR和BACE1两者。在另一个这样的方面中,多特异性抗体结合TfR和 $A\beta$ 两者。在另一个这样的方面中,多特异性抗体被标记。在另一个方面中,化合物可逆地偶联到抗体以致化合物在BBB转运的同时或之后从抗体释放。

[0034] 在另一个实施方案中本发明提供治疗哺乳动物的神经疾病的方法,所述方法包括:利用结合BBB-R并且与化合物偶联的抗体治疗哺乳动物,其中所述抗体被选择为具有低的对BBB-R的亲合力并且因此提高所述抗体与偶联的化合物的CNS摄取。在一个方面中,化合物是神经疾病药物。在另一个方面中,化合物是显影剂。在另一个方面中,化合物被标记。在另一个方面中,抗体被标记。在另一个方面中,抗体不削弱BBB-R与其一种或多种天然配体的结合。在另一个这样的方面中,抗体以这样的方式特异性地结合TfR以致其不抑制TfR与运铁蛋白结合。在一个方面中,哺乳动物是人。在另一个这样的方面中,哺乳动物患有神经疾病。在另一个这样的方面中,神经疾病选自由以下组成的组:阿尔茨海默病(AD),卒中,痴呆,肌营养不良(MD),多发性硬化(MS),肌萎缩性侧索硬化(ALS),囊性纤维化,安吉尔曼综合征,利德尔综合征,帕金森病,皮克病,佩吉特病,癌症,和外伤性脑损伤。

[0035] 在一个方面中,治疗导致疾病症状的减轻或者消除。在另一个方面中,治疗导致神经疾病的改善。

[0036] 在另一个方面中,抗体对BBB-R的IC₅₀为约1nM至约100 μ M。在另一个这样的方面中,IC₅₀为约5nM至约100 μ M。在另一个这样的方面中,IC₅₀为约50nM至约100 μ M。在另一个这样的方面中,IC₅₀为约100nM至约100 μ M。在另一个方面中,抗体对BBB-R的亲合力为约5nM至约10 μ M。在另一个这样的方面中,抗体,当与化合物偶联时,对BBB-R的亲合力为约30nM至约1 μ M。在另一个这样的方面中,抗体,当与化合物偶联时,对BBB-R的亲合力为约50nM至约1 μ M。在另一个这样的方面中,与化合物偶联的抗体特异性地结合TfR并且其对TfR的亲合力处于对于抗TfR^A/BACE1抗体和抗TfR^E/BACE1抗体所观察到的那些亲合力之间。在另一个这样的方面中,与化合物偶联的抗体特异性地结合TfR并且其对TfR的亲合力处于对于抗TfR^D/BACE1抗体和抗TfR^E/BACE1抗体所观察到的那些亲合力之间。在另一个这样的方面中,与化合物偶联的抗体特异性地结合TfR并且其对TfR的IC₅₀处于对于抗TfR^A/BACE1抗体和抗TfR^E/BACE1抗体所观察到的那些IC₅₀之间。在另一个这样的方面中,与化合物偶联的抗体特异性地结合TfR并且其对TfR的IC₅₀处于对于抗TfR^D/BACE1抗体和抗TfR^E/BACE1抗体所观察到的那些IC₅₀之间。在一个方面中,使用斯卡查德分析,测量抗BBB-R或者抗BBB-R/化合物对BBB-R的亲合力。在另一个方面中,使用BIACORE分析,测量抗BBB-R或者抗BBB-R/化合物对BBB-R的亲合力。在另一个方面中,使用竞争ELISA,测量抗BBB-R或者抗BBB-R/化合物对BBB-R的亲合力。

[0037] 在另一个方面中,BBB-R选自由以下组成的组:运铁蛋白受体(TfR),胰岛素受体,胰岛素样生长因子受体(IGF受体),低密度脂蛋白受体相关蛋白8(LRP8),低密度脂蛋白受体相关蛋白1(LRP1),和肝素结合性表皮生长因子样生长因子(HB-EGF)。在另一个这样的方面中,BBB-R是人BBB-R。在一个这样的方面中,BBB-R是TfR。在另一个这样的方面中,BBB-R是TfR并且抗体不抑制TfR活性。在另一个这样的方面中,BBB-R是TfR并且抗体不抑制TfR与运铁蛋白结合。在另一个方面中,与化合物偶联的抗体以治疗剂量被施用。在一个这样的方面中,治疗剂量是这样的剂量,其使抗体特异性结合的BBB-R饱和。

[0038] 在另一个方面中,化合物与抗体共价偶联。在一个这样的方面中,化合物通过接头与抗体相连。在一个这样的方面中,接头是可裂解的。在另一个这样的方面中,接头是不可裂解的。在另一个这样的方面中,化合物直接偶联到抗体。在一个这样的方面中,抗体是多特异性抗体并且化合物形成多特异性抗体的一部分。在另一个这样的方面中,多特异性抗

体包含结合BBB-R的第一抗原结合位点和结合脑抗原的第二抗原结合位点。在另一个这样的方面中,脑抗原选自由以下组成的组: β -分泌酶1 (BACE1), A β , 表皮生长因子受体 (EGFR), 人表皮生长因子受体2 (HER2), Tau, 脱脂载脂蛋白E4 (ApoE4), α -突触核蛋白, CD20, 亨廷顿蛋白, 朊病毒蛋白 (PrP), 富含亮氨酸重复序列激酶2 (LRRK2), 帕金森蛋白, 早老蛋白1, 早老蛋白2, γ 分泌酶, 死亡受体6 (DR6), 淀粉状蛋白前体蛋白 (APP), p75神经营养蛋白受体 (p75NTR), 和胱天蛋白酶6。在另一个这样的方面中,多特异性抗体结合TfR和BACE1两者。在另一个这样的方面中,多特异性抗体结合TfR和A β 两者。在另一个这样的方面中,多特异性抗体被标记。在另一个方面中,化合物可逆地偶联到抗体以致化合物在BBB转运的同时或之后从抗体释放。

[0039] 在另一个实施方案中,本发明提供制备可用于将化合物转运穿过BBB的抗体的方法,所述方法包括:选择一种对血脑屏障受体 (BBB-R) 特异的抗体,因为该抗体具有所需的对所述BBB-R的低亲和力。

[0040] 在一个方面中,基于所选抗体的亲和力从一组抗体中选择抗体。在另一个方面中,抗体被改造成具有亲和力。在一个这样的方面中,使用任何本领域已知的蛋白质改造方法来产生抗体,所述方法包括但不限于,噬菌体展示,酵母展示,随机诱变,和定点诱变。

[0041] 在一个方面中,化合物是神经疾病药物。在另一个方面中,化合物是显影剂。在另一个方面中,化合物被标记。在另一个方面中,抗体被标记。在另一个方面中,抗体不削弱BBB-R与其一种或多种天然配体的结合。在另一个这样的方面中,抗体以这样的方式特异性地结合TfR以致其不抑制TfR与运铁蛋白结合。在另一个方面中,BBB是在哺乳动物中。在另一个这样的方面中,哺乳动物是人。在另一个这样的方面中,哺乳动物患有神经疾病。在另一个这样的方面中,神经疾病选自由以下组成的组:阿尔茨海默病 (AD), 卒中, 痴呆, 肌营养不良 (MD), 多发性硬化 (MS), 肌萎缩性侧索硬化 (ALS), 囊性纤维化, 安吉尔曼综合征, 利德尔综合征, 帕金森病, 皮克病, 佩吉特病, 癌症, 和外伤性脑损伤。在另一个方面中,BBB是在人中。

[0042] 在另一个方面中,抗体对BBB-R的IC₅₀为约1nM至约100 μ M。在另一个这样的方面中,IC₅₀为约5nM至约100 μ M。在另一个这样的方面中,IC₅₀为约50nM至约100 μ M。在另一个这样的方面中,IC₅₀为约100nM至约100 μ M。在另一个方面中,抗体对BBB-R的亲和力为约5nM至约10 μ M。在另一个这样的方面中,抗体,当与化合物偶联时,对BBB-R的亲和力为约30nM至约1 μ M。在另一个这样的方面中,抗体,当与化合物偶联时,对BBB-R的亲和力为约50nM至约1 μ M。在另一个这样的方面中,与化合物偶联的抗体特异性地结合TfR并且其对TfR的亲和力处于对于抗TfR^A/BACE1抗体和抗TfR^E/BACE1抗体所观察到的那些亲和力之间。在另一个这样的方面中,与化合物偶联的抗体特异性地结合TfR并且其对TfR的亲和力处于对于抗TfR^D/BACE1抗体和抗TfR^E/BACE1抗体所观察到的那些亲和力之间。在另一个这样的方面中,与化合物偶联的抗体特异性地结合TfR并且其对TfR的IC₅₀处于对于抗TfR^A/BACE1抗体和抗TfR^E/BACE1抗体所观察到的那些IC₅₀之间。在另一个这样的方面中,与化合物偶联的抗体特异性地结合TfR并且其对TfR的IC₅₀处于对于抗TfR^D/BACE1抗体和抗TfR^E/BACE1抗体所观察到的那些IC₅₀之间。在一个方面中,使用斯卡查德分析,测量抗BBB-R或者抗BBB-R/化合物对BBB-R的亲和力。在另一个方面中,使用BIACORE分析,测量抗BBB-R或者抗BBB-R/化合物对BBB-R的亲和力。在另一个方面中,使用竞争ELISA,测量抗BBB-R或者抗BBB-R/化合物

对BBB-R的亲合力。

[0043] 在另一个方面中, BBB-R选自由以下组成的组: 运铁蛋白受体 (TfR), 胰岛素受体, 胰岛素样生长因子受体 (IGF受体), 低密度脂蛋白受体相关蛋白8 (LRP8), 低密度脂蛋白受体相关蛋白1 (LRP1), 和肝素结合性表皮生长因子样生长因子 (HB-EGF)。在另一个这样的方面中, BBB-R是人BBB-R。在一个这样的方面中, BBB-R是TfR。在另一个这样的方面中, BBB-R是TfR并且抗体不抑制TfR活性。在另一个这样的方面中, BBB-R是TfR并且抗体不抑制TfR与运铁蛋白结合。在另一个方面中, 与化合物偶联的抗体以治疗剂量被施用。在一个这样的方面中, 治疗剂量是这样的剂量, 其使抗体特异性结合的BBB-R饱和。

[0044] 在另一个方面中, 化合物与抗体共价偶联。在一个这样的方面中, 化合物通过接头与抗体相连。在一个这样的方面中, 接头是可裂解的。在另一个这样的方面中, 接头是不可裂解的。在另一个这样的方面中, 化合物直接偶联到抗体。在一个这样的方面中, 抗体是多特异性抗体并且化合物形成多特异性抗体的一部分。在另一个这样的方面中, 多特异性抗体包含结合BBB-R的第一抗原结合位点和结合脑抗原的第二抗原结合位点。在另一个这样的方面中, 脑抗原选自由以下组成的组: β -分泌酶1 (BACE1), $A\beta$, 表皮生长因子受体 (EGFR), 人表皮生长因子受体2 (HER2), Tau, 脱脂载脂蛋白E4 (ApoE4), α -突触核蛋白, CD20, 亨廷顿蛋白, 朊病毒蛋白 (PrP), 富含亮氨酸重复序列激酶2 (LRRK2), 帕金森蛋白, 衰老蛋白1, 衰老蛋白2, γ 分泌酶, 死亡受体6 (DR6), 淀粉状蛋白前体蛋白 (APP), p75神经营养蛋白受体 (p75NTR), 和胱天蛋白酶6。在另一个这样的方面中, 多特异性抗体结合TfR和BACE1两者。在另一个这样的方面中, 多特异性抗体结合TfR和 $A\beta$ 两者。在另一个这样的方面中, 多特异性抗体被标记。在另一个方面中, 化合物可逆地偶联到抗体以致化合物在BBB转运的同时或之后从抗体释放。

[0045] 在另一个实施方案中, 本发明提供以低亲合力与血脑屏障受体 (BBB-R) 结合的抗体。在一个方面中, 所述抗体对BBB-R的亲合力为约5nM至约10 μ M。在另一个方面中, 所述抗体对BBB-R的亲合力为约20nM至约1 μ M。在另一个方面中, 抗体对BBB-R的IC₅₀为约1nM至约100 μ M。在另一个这样的方面中, IC₅₀为约5nM至约100 μ M。在另一个这样的方面中, IC₅₀为约50nM至约100 μ M。在另一个这样的方面中, IC₅₀为约100nM至约100 μ M。在另一个这样的方面中, 抗体, 当与化合物偶联时, 对BBB-R的亲合力为约50nM至约1 μ M。在另一个这样的方面中, 与化合物偶联的抗体特异性地结合TfR并且其对TfR的亲合力处于对于抗TfR^A/BACE1抗体和抗TfR^E/BACE1抗体所观察到的那些亲合力之间。在另一个这样的方面中, 与化合物偶联的抗体特异性地结合TfR并且其对TfR的亲合力处于对于抗TfR^D/BACE1抗体和抗TfR^E/BACE1抗体所观察到的那些亲合力之间。在另一个这样的方面中, 与化合物偶联的抗体特异性地结合TfR并且其对TfR的IC₅₀处于对于抗TfR^A/BACE1抗体和抗TfR^E/BACE1抗体所观察到的那些IC₅₀之间。在另一个这样的方面中, 与化合物偶联的抗体特异性地结合TfR并且其对TfR的IC₅₀处于对于抗TfR^D/BACE1抗体和抗TfR^E/BACE1抗体所观察到的那些IC₅₀之间。在一个方面中, 使用斯卡查德分析, 测量抗BBB-R或者抗BBB-R/化合物对BBB-R的亲合力。在另一个方面中, 使用BIACORE分析, 测量抗BBB-R或者抗BBB-R/化合物对BBB-R的亲合力。在另一个方面中, 使用竞争ELISA, 测量抗BBB-R或者抗BBB-R/化合物对BBB-R的亲合力。

[0046] 在另一个方面中, BBB-R选自由以下组成的组: 运铁蛋白受体 (TfR), 胰岛素受体, 胰岛素样生长因子受体 (IGF受体), 低密度脂蛋白受体相关蛋白8 (LRP8), 低密度脂蛋白受

体相关蛋白1 (LRP1), 和肝素结合性表皮生长因子样生长因子 (HB-EGF)。在一个这样的方面中, BBB-R是TfR。在另一个这样的方面中, BBB-R是TfR并且抗体不抑制TfR活性。在另一个这样的方面中, BBB-R是TfR并且抗体不抑制TfR与运铁蛋白结合。在另一个这样的方面中, BBB-R是人BBB-R。

[0047] 在另一个方面中, 抗体与化合物偶联。在一个方面中, 化合物是神经疾病药物。在另一个方面中, 化合物是显影剂。在另一个方面中, 化合物被标记。在另一个方面中, 抗体被标记。在另一个方面中, 抗体不削弱BBB-R与其一种或多种天然配体的结合。在另一个这样的方面中, 抗体以这样的方式特异性地结合TfR以致其不抑制TfR与运铁蛋白结合。

[0048] 在另一个方面中, 化合物与抗体共价偶联。在一个这样的方面中, 化合物通过接头与抗体相连。在一个这样的方面中, 接头是可裂解的。在另一个这样的方面中, 接头是不可裂解的。在另一个这样的方面中, 化合物直接偶联到抗体。在一个这样的方面中, 抗体是多特异性抗体并且化合物形成多特异性抗体的一部分。在另一个这样的方面中, 多特异性抗体包含结合BBB-R的第一抗原结合位点和结合脑抗原的第二抗原结合位点。在另一个这样的方面中, 脑抗原选自由以下组成的组: β -分泌酶1 (BACE1), $A\beta$, 表皮生长因子受体 (EGFR), 人表皮生长因子受体2 (HER2), Tau, 脱脂载脂蛋白E4 (ApoE4), α -突触核蛋白, CD20, 亨廷顿蛋白, 朊病毒蛋白 (PrP), 富含亮氨酸重复序列激酶2 (LRRK2), 帕金森蛋白, 早老蛋白1, 早老蛋白2, γ 分泌酶, 死亡受体6 (DR6), 淀粉状蛋白前体蛋白 (APP), p75神经营养蛋白受体 (p75NTR), 和胱天蛋白酶6。在另一个这样的方面中, 多特异性抗体结合TfR和BACE1两者。在另一个这样的方面中, 多特异性抗体结合TfR和 $A\beta$ 两者。在另一个这样的方面中, 多特异性抗体被标记。在另一个方面中, 化合物可逆地偶联到抗体以致化合物在BBB转运的同时或之后从抗体释放。

[0049] 在另一个方面中, 抗体是具有与BBB-R结合的抗原-结合区域的抗体片段, 其包括但不限于, Fab, Fab', F(ab')₂, 和Fv。在另一个方面中, 抗体是全长抗体。

[0050] 在另一个实施方案中, 本发明提供以低亲和力结合BBB-R的抗体在制备用于治疗神经疾病的药物中的用途。任何前述低亲和力抗BBB-R抗体或本文中其他地方所述的任何低亲和力抗BBB-R抗体可以用于方法中。

[0051] 在另一个实施方案中, 本发明提供以低亲和力结合BBB-R的抗体, 其用于治疗神经疾病。任何前述低亲和力抗BBB-R抗体或本文中其他地方所述的任何低亲和力抗BBB-R抗体可以用于方法中。因此, 在第一方面中, 本发明提供结合血脑屏障受体 (BBB-R) 的抗体, 其中所述抗体对BBB-R的亲和力为约5nM至约10 μ M (例如约20nM至约1 μ M)。任选地, BBB-R选自由以下组成的组: 运铁蛋白受体 (TfR), 胰岛素受体, 胰岛素样生长因子受体 (IGF受体), 低密度脂蛋白受体相关蛋白1 (LRP1), 低密度脂蛋白受体相关蛋白8 (LRP8), 和肝素结合性表皮生长因子样生长因子 (HB-EGF)。任选地, 抗体与治疗性化合物如神经疾病药物偶联。在一个实施方案中, 抗体是包含结合BBB-R的第一抗原结合位点和结合脑抗原的第二抗原结合位点的多特异性抗体, 例如其中脑抗原选自由以下组成的组: β -分泌酶1 (BACE1), 淀粉状蛋白 β ($A\beta$), 表皮生长因子受体 (EGFR), 人表皮生长因子受体2 (HER2), Tau, 脱脂载脂蛋白A3 (ApoE3), 脱脂载脂蛋白E4 (ApoE4), α -突触核蛋白, CD20, 亨廷顿蛋白, 朊病毒蛋白 (PrP), 富含亮氨酸重复序列激酶2 (LRRK2), 帕金森蛋白, 早老蛋白1, 早老蛋白2, γ 分泌酶, 死亡受体6 (DR6), 淀粉状蛋白前体蛋白 (APP), p75神经营养蛋白受体 (p75NTR), 和胱天蛋白酶6。所述

抗体(例如多特异性抗体)包括抗体片段和全长抗体。

[0052] 在另一个实施方案中,本发明提供将治疗性化合物、如神经疾病药物转运穿过血脑屏障的方法,所述方法包括:将与神经疾病药物偶联的抗BBB-R抗体暴露于血脑屏障,以致所述抗体将与其相连的神经疾病药物转运穿过血脑屏障。在该方法中血脑屏障可以是在哺乳动物中,例如患有神经疾病的哺乳动物,所述神经疾病的实例包括:阿尔茨海默病(AD)(包括但不限于,轻度认知障碍(mild cognitive impairment)和前驱期AD),卒中,痴呆,肌营养不良(MD),多发性硬化(MS),肌萎缩性侧索硬化(ALS),囊性纤维化,安吉尔曼综合征,利德尔综合征,帕金森病,皮克病,佩吉特病,癌症(例如影响CNS或者脑的癌症),和外伤性脑损伤。

[0053] 本发明还涉及制备可用于将治疗性化合物如神经疾病药物转运穿过血脑屏障的抗体的方法,所述方法包括:选择一种针对血脑屏障受体(BBB-R)的抗体,因为所述抗体具有约5nM至约10 μ M的对BBB-R的亲合力。在一个实施方案中,所述抗体选自一组抗体,因为它具有所需的亲合力。备选地,或另外地,抗体被改造成具有所需的亲合力。所述方法任选地还包括将抗体与治疗性化合物如神经疾病药物偶联。例如,方法可以包括制备多特异性抗体,所述多特异性抗体包含结合BBB-R的第一抗原结合位点和结合脑抗原的第二抗原结合位点。

[0054] 本发明另外地提供治疗哺乳动物的神经疾病的方法,所述方法包括利用结合血脑屏障受体(BBB-R)和脑抗原两者的多特异性抗体治疗哺乳动物,其中选择抗BBB-R抗体以使其具有对BBB-R的低亲合力并且因此提高抗脑抗原抗体的脑摄取。任选地,多特异性抗体结合以下两者:运铁蛋白受体(TfR)和BACE1或A β 。

[0055] 要理解,本发明的任何前述方法和组合物可以彼此组合和/或与本说明书中所述的本发明的其他方面组合。

[0056] 附图简述

[0057] 图1A-E显示全身施用的抗TfR抗体的显著的脑血管摄取。图1A显示在小鼠中IV施用示踪剂量(约50 μ g/kg)的 131 I抗TfR^A和 125 I对照IgG后的脑摄取,并且将其量化为在IV注射后5分钟、30分钟、1小时、4小时、24小时、48小时和72小时注射剂量/克的脑的平均百分比(n=6)。通过用4mg/kg未标记的抗TfR^A(冷的)注射,减少了 131 I抗TfR^A的摄取。图1B显示在IV注射20mg/kg的对照IgG或者抗TfR^A后1和24小时在脑中的平均抗体摄取的量化(**p=0.0002, n=10)。图1C显示脑与血清浓度的比率的平均百分比(**p=0.003, n=10)。图1D和1E显示在用抗TfR^A进行IV-注射后脑切片的免疫组化染色(图1D,上部的图),其显示与抗原IV(血管标记物)的共定位(下图)。利用对照IgG的IV-注射(图1E,上部的图)显示仅在1小时后以及在没有抗体的情况下在24小时后的脑中的血管分布。比例尺=50 μ m。

[0058] 图2A-F显示,与低的示踪剂量(约50 μ g/kg)相比,当以治疗相关剂量(20mg/kg)施用时,抗TfR抗体的亲合力和脑摄取的程度负相关。图2A显示竞争性结合ELISA,其中增加浓度的抗TfR^{A,B,C,D,E}变体抗体被用于与生物素化的TfR^A竞争结合TfR。抗TfR竞争ELISA在Maxisorp平板(Neptune, N.J.)中进行,所述平板用在PBS中的2.5 μ g/ml的纯化的鼠TfR胞外结构域在4 $^{\circ}$ C过夜包被。用PBS/0.05% Tween 20洗涤平板并使用在PBS中的Superblock封闭缓冲液(Thermo Scientific, Hudson, NH)对其进行封闭。将抗TfR^A、抗TfR^B、抗TfR^C或抗TfR^D的滴定液(titration)(1:3连续稀释)与生物素化的抗TfR^A(0.5nM终浓度)结合并加入到平

板中,在室温1小时。将平板用PBS/0.05% Tween 20洗涤,并将HR-链霉抗生物素蛋白(Southern Biotech,Birmingham)加入到平板中并在室温温育1小时。用PBS/0.05% Tween 20洗涤平板,并且使用TMB底物(BioFX Laboratories,Owings Mills)检测与平板结合的生物素化的抗TfR^A。图2A中的结果呈现来自单一实验的数据,其中全部五种抗TfR变体被分开评估。从该数据确定的IC₅₀值显示在表2中。图2B显示在IV-注射示踪剂量(约50μg/kg)的[¹²⁵I]抗TfR^{A,B,C,D,E}变体后,在5分钟、1小时、4小时、6小时和24小时后,平均脑摄取的量化(n=3)。图2B中的结果呈现来自单一实验的数据,其中所有五种抗TfR变体被分开评估。图2C显示在IV注射20mg/kg的抗TfR变体后在1小时和24小时使用关于图1B所述方法的平均脑摄取的量化。在相同条件下使用抗TfR^E重复实验,所有结果显示在图2C中。图2D是模型,其显示亲和力和脑摄取之间的逆相关。图2E是在用高亲和力抗TfR^A或者较低亲和力抗TfR^{B,C,D}抗体进行IV注射后脑切片的免疫组化染色的比较,其显示抗体分布(左图中的染色是单独的抗TfR的)和与NeuN共定位的程度(右图中的染色是抗TfR和NeuN两者的)的差异。比例尺=50μm。图2F是神经元中的抗TfR^D定位的代表性高倍放大图(如通过NeuN染色指示的);该数据显示抗TfR^D和NeuN共定位并且因此抗TfR^D穿过BBB并且与神经元相互作用,而抗TfR^A主要定位于与神经元相对的血管系统。比例尺=20μm。

[0059] 图3A-G显示双特异性抗TfR/BACE1抗体在体外抑制Aβ并在脑部累积。图3A是双特异性抗体的示意性模型,所述双特异性抗体被改造成结合TfR和β-分泌酶(BACE1)两者。图3B显示如通过以上对于图2A所述的抗TfR竞争ELISA测定测量的亲本抗TfR^A和抗TfR^A/BACE1对TfR的结合亲和力。图3C显示在基于细胞的测定中在用抗TfR^A/BACE1、抗BACE1和对照IgG处理后由稳定表达APP的HEK293细胞产生的Aβ水平的量化。抗体在稳定表达野生型人淀粉状蛋白前体蛋白的HEK293细胞中抑制Aβ₁₋₄₀生产的能力被如下评估。以3×10⁴个细胞/孔的密度将HEK293-APPWT细胞过夜接种到96-孔板中。将含有抗BACE1抗体或对照IgG1抗体的50 μl的新鲜培养基(DMEM+10%FBS)与细胞在37°C温育24小时。收集细胞培养基,并且使用Aβ₁₋₄₀ HTRF®测定(CisBio)根据制造商的说明书测定Aβ₁₋₄₀的存在。将Aβ₁₋₄₀值对细胞生存力进行归一化,所述细胞生存力使用CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay(Promega)确定。实验至少进行三次,并且将每个实验中的每个点一式两份重复。图3D显示在小鼠(n=4)中IV-注射示踪剂量的[¹²⁵I]标记的抗体30分钟,6小时,24小时,和48小时后平均脑摄取的量化。图3E显示脑中平均抗体摄取的量化,并且在图3F中显示在小鼠(n=10)中IV注射20mg/kg的抗体1、12、24和48小时后的平均脑/血清比率。使用与关于图1B所述的实验相同的方案进行图3E和3F中的实验。图3G显示在用抗TfR/BACE1(左图)或对照IgG(右图)进行IV注射后24小时来自小鼠的脑切片的免疫组化染色。在抗TfR^A/BACE1处理后观察到抗体与NeuN的共定位(NeuN神经元染色与渗透性抗体染色相符),但是在用对照IgG处理的小鼠中没有观察到共定位(仅观察到NeuN神经元染色图样,没有抗体染色)。

[0060] 图4A-E显示单次全身剂量的抗TfR^A/BACE1显著地减少中枢和外周Aβ₁₋₄₀。图4A-D显示在IV-注射25mg/kg或50mg/kg的对照IgG、抗BACE1或抗TfR/BACE1后,脑(A,B)和血浆(C,D)Aβ₁₋₄₀水平的量化。简言之,对于Aβ₁₋₄₀测量,将半脑(hemi-brain)在5M盐酸胍缓冲液中均化,并将样品在室温旋转3小时,之后在0.25%酪蛋白,5mM EDTA(pH 8.0)(在含有新鲜添加的拟酶肽(20mg/mL)和亮抑酶肽(10mg/mL)的PBS中)中稀释(1:10)。将稀释的匀浆以14,000rpm离心20分钟并将上清分离用于Aβ₁₋₄₀测量。对于抗体浓度测量,如上所述地,将来自

每只小鼠的相应的半脑在1%NP-40中均化。将全血收集在EDTA microtainer管(BD Diagnostics)中,之后灌注,以5,000xg离心15分钟并分离上清用于测量小鼠血浆A β ₁₋₄₀和抗TfR/BACE1浓度。使用夹心ELISA按照与上述类似的方法测定在血浆和脑中的全部小鼠A β ₁₋₄₀的浓度。将对A β ₁₋₄₀的C端具有特异性的兔多克隆抗体(Millipore, Bedford MA)包被在平板上,并使用生物素化的抗小鼠A β 单克隆抗体M3.2(Covance, Dedham MA)用于检测。在血浆中,测定的量化值的下限为1.96pg/ml,而在脑中测定的量化值的下限为39.1pg/g。使用双尾不成对t检验进行实验组间差异的统计学分析。*表示与对照IgG相比的显著性,而#表示与抗BACE1相比的显著性。对于所有组,*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001;n=10。图4E显示来自(A-D)中的数据平均A β ₁₋₄₀减少,其被计算为相对于用对照IgG注射的小鼠的A β ₁₋₄₀水平的百分比。

[0061] 图5A-B显示获得自首次用于实验(naive)类型的天然多样性噬菌体展示文库的抗BACE1克隆YW412.8和YW412.8的亲和力成熟形式的轻链和重链氨基酸序列。图5A显示可变轻链(VL)序列比对(SEQ ID NO.1-6)。图5B显示可变重链(VH)序列比对(SEQ ID NO.7-8)。在两幅图中,每个克隆的HVR序列由加框的区域指示,其中第一框指示HVR-L1(图5A)或HVR-H1(图5B),第二框指示HVR-L2(图5A)或HVR-H2(图5B),而第三框指示HVR-L3(图5A)或HVR-H3(图5B)。

[0062] 图6A-B显示获得自首次用于实验类型的合成多样性噬菌体展示文库的克隆Fab 12和Fab 12的亲和力成熟形式的轻链和重链氨基酸序列。图6A显示轻链序列比对(SEQ ID NO.9-12)。图6B显示重链序列比对(SEQ ID NO.13)。在两幅图中,每个克隆的HVR序列由加框的区域指示,其中第一框指示HVR-L1(图6A)或HVR-H1(图6B),第二框指示HVR-L2(图6A)或HVR-H2(Fig.6B),而第三框指示HVR-L3(图6A)或HVR-H3(图6B)。

[0063] 图7A-B显示示例性抗A β 抗体的重链(图7A;SEQ ID NO.14)和轻链(图7B;SEQ ID NO.15)。

[0064] 图8A-B显示在小鼠中在单次治疗剂量施用后在血清(图8A)和脑(图8B)中的抗TfR^{A,B,C,D,E}的量化。将六至八周龄的野生型雌性C57B/6小鼠用于所有研究。用20mg/kg的抗TfR变体或对照IgG对小鼠进行静脉注射。在注射后1和12小时以及1、2、4、5、6和8天,测量脑和血清中的抗体水平。总注射体积不超过260 μ L,并且在必要时将抗体稀释在D-PBS(Invitrogen)中。使用与结果显示在图1B中的实验相同的方案进行实验。

[0065] 图9A-E显示双特异性抗TfR^{A,D,E}/BACE1抗体在脑中累积并抑制体内A β 生产的不同程度。图9A显示使用抗TfR^{A,D,E}/BACE1、按照与在图2A中所述相同的测定方法进行的抗TfR竞争ELISA测定的结果。由该数据确定的ICS0值显示在表3中。图9B和9D用数量表示在小鼠(n=6)中在IV注射50mg/kg的抗体1、2、4、6、8和10天后在血浆中观察到的抗体的量(9B)和A β ₁₋₄₀的量(9D)。图9C显示平均脑摄取的量化,而图9E显示在处理1、2、4、6、8和10天在那些相同处理的小鼠的脑中观察到的A β ₁₋₄₀的量。将六至八周龄野生型雌性C57B/6小鼠用于所有研究。用50mg/kg抗TfR/BACE1变体、对照IgG或抗BACE1对小鼠进行静脉注射。在指定的时间后,用D-PBS对小鼠进行灌注,并且如上所述地测量每只动物的脑和血浆抗体浓度。如在图4描述中所述的那样进行测定。

[0066] 图10和11显示双特异性抗TfR^{A,D,E}/A β 抗体在PS2APP小鼠(图10)和野生型小鼠(图11)的脑中累积的不同程度。图10A和11A显示在小鼠(n=4-6)中在腹腔注射50mg/kg的抗体

后1天在血浆中观察到的抗体的量的量化。图10B和11B用数量表示在相同处理的小鼠中的平均脑摄取。

[0067] 本发明实施方案的详述

[0068] I. 定义

[0069] “血脑屏障”或者“BBB”是指外周循环和脑和脊髓之间的生理屏障，其由脑微血管内皮质膜内的紧密连接形成，产生限制分子（甚至非常小的分子如尿素（60道尔顿））转运到脑中的紧密屏障。脑内的血脑屏障，脊髓内的血脊髓屏障，和视网膜内的血视网膜屏障是CNS内的相连的微血管屏障，并且在本文中被称为血脑屏障或者BBB。BBB还包括血-CSF屏障（脉络丛），其中屏障由室管膜细胞而不是微血管内皮细胞组成。

[0070] “中枢神经系统”或者“CNS”是指神经组织的复合体，其控制身体功能，并且包括脑和脊髓。

[0071] “血脑屏障受体”（本文中简称为“BBB-R”）是表达在脑内皮细胞上的跨膜受体蛋白，其能够将分子转运穿过血脑屏障。本文中BBB-R的实例包括：运铁蛋白受体（TfR），胰岛素受体，胰岛素样生长因子受体（IGF-R），低密度脂蛋白受体，其包括但不限于低密度脂蛋白受体相关蛋白1（LRP1）和低密度脂蛋白受体相关蛋白8（LRP8），和肝素结合性表皮生长因子样生长因子（HB-EGF）。本文中的示例性BBB-R是运铁蛋白受体（TfR）。

[0072] “运铁蛋白受体”（“TfR”）是跨膜糖蛋白（分子量约为180,000），其由参与脊椎动物中的铁摄取的两个二硫键键合的亚基（各自的表观分子量为约90,000）组成。在一个实施方案中，本文中的TfR是人TfR，其包含例如在Schneider等Nature 311:675-678（1984）中的氨基酸序列。

[0073] “神经疾病”当在本文中使用时是指影响CNS和/或具有在CNS中的病因的疾病或病症。示例性CNS疾病或病症包括但不限于，神经病，淀粉样变性，癌症，眼病或病症，病毒或微生物感染，发炎，缺血，神经变性疾病，发作，行为障碍和溶酶体贮积症（lysosomal storage disease）。对于本申请来说，将理解CNS包括眼，其通常通过血视网膜屏障与身体的其他部分隔离。神经疾病的具体实例包括但不限于，神经变性疾病（包括但不限于，雷维小体病（Lewy body disease），脊髓灰质炎后综合征（postpoliomyelitis syndrome），夏伊-德雷格综合征（Shy-Draeger syndrome），橄榄体脑桥小脑萎缩（olivopontocerebellar atrophy），帕金森病（Parkinson's disease），多系统萎缩（multiple system atrophy），纹状体黑质变性（striatonigral degeneration），Tau病变（tauopathy）（包括但不限于，阿尔茨海默病（Alzheimer disease）和核上性麻痹（supranuclear palsy）），朊病毒病（prion disease）（包括但不限于，牛海绵状脑病（bovine spongiform encephalopathy），痒病（scrapie），克-雅综合征（Creutzfeldt-Jakob syndrome），库鲁病（kuru），格-施-沙病（Gerstmann-Straussler-Scheinker disease），慢性消耗性疾病（chronic wasting disease），和致命性家族性失眠症（fatal familial insomnia）），延髓性麻痹（bulbar palsy），运动神经元病（motor neuron disease），和heterodegenerative疾病（包括但不限于卡纳范病（Canavan disease），亨廷顿病（Huntington's disease），神经元蜡样脂褐素沉积症（neuronal ceroid-lipofuscinosis），亚历山大病（Alexander's disease），图雷特综合征（Tourette's syndrome），门克斯扭结发综合征（Menkes kinky hair syndrome），科凯恩综合征（Cockayne syndrome），哈勒沃登-施帕茨综合征（Halervorden-Spatz

syndrome), 拉福拉病 (lafora disease), 雷特综合征 (Rett syndrome), 肝豆状核变性 (hepatolenticular degeneration), 莱施-奈恩综合征 (Lesch-Nyhan syndrome), 和翁-隆综合征 (Unverricht-Lundborg syndrome)), 痴呆 (包括但不限于, 皮克病 (Pick's disease), 和脊髓小脑性共济失调 (spinocerebellar ataxia)), 癌症 (例如 CNS 和/或脑的癌症, 包括源自身体其他位置的癌症的脑转移癌)。

[0074] “神经疾病药物”是治疗一种或多种神经疾病的药物或治疗剂。本发明的神经疾病药物包括, 但不限于, 抗体, 肽, 蛋白质, 一种或多种 CNS 靶标的天然配体, 一种或多种 CNS 靶标的天然配体的修饰形式, 适体, 抑制性核酸 (即, 小的抑制性 RNA (siRNA) 和短发夹 RNA (shRNA)), 核酶, 和小分子, 或上述中任何一种的活性片段。本发明的示例性神经疾病药物描述于此并且包括但不限于: 抗体, 适体, 蛋白质, 肽, 抑制性核酸和小分子和上述中任何一种的活性片段, 它们是它们本身或者特异性识别和/或作用于 (即, 抑制, 活化, 或检测) CNS 抗原或者靶标分子如, 但不限于, 淀粉状蛋白前体蛋白或其部分, 淀粉状蛋白 β , β -分泌酶, γ -分泌酶, tau, α -突触核蛋白, 帕金森蛋白, 亨廷顿蛋白, DR6, 早老蛋白, ApoE, 神经胶质瘤或其他 CNS 癌症标记物, 和神经营养蛋白。神经疾病药物以及可以使用它们治疗的疾病的非限制性实例被提供在以下表 1 中:

[0075] 表 1: 神经疾病药物以及可以使用它们治疗的相应疾病的非限制性实例

[0076]

药物	神经疾病
抗 BACE1 抗体	阿尔茨海默病, 急性和慢性脑损伤, 卒中
抗 A β 抗体	阿尔茨海默病
神经营养蛋白	卒中, 急性脑损伤, 脊髓损伤

[0077]

脑源性神经营养因子 (BDNF), 成纤维细胞生长因子 2 (FGF-2)	慢性脑损伤 (神经发生)
抗表皮生长因子受体 (EGFR)-抗体	脑癌
胶质细胞系衍生神经因子 (GDNF)	帕金森病
脑源性神经营养因子 (BDNF)	肌萎缩性侧索硬化, 抑郁
溶酶体酶	脑的溶酶体贮积症
睫状神经营养因子 (CNTF)	肌萎缩性侧索硬化
神经调节蛋白-1	神经分裂症
抗 HER2 抗体 (例如曲妥珠单抗 (trastuzumab))	来自 HER2 阳性癌症的脑转移癌

[0078] “显影剂”是这样的化合物,其具有允许它的存在和/或位置被直接或间接检测到的一种或多种性质。这样的显影剂的实例包括结合有使检测成为可能的标记部分的蛋白质和小分子化合物。

[0079] “CNS抗原”或者“脑抗原”是表达在包括脑在内的CNS中的抗原,其可以被抗体或小分子所靶向。这样的抗原的实例包括,但不限于: β -分泌酶1 (BACE1), 淀粉状蛋白 β (A β), 表皮生长因子受体 (EGFR), 人表皮生长因子受体2 (HER2), Tau, 脱脂载脂蛋白E4 (ApoE4), α -突触核蛋白, CD20, 亨廷顿蛋白, 朊病毒蛋白 (PrP), 富含亮氨酸重复序列激酶2 (LRRK2), 帕金蛋白, 早老蛋白1, 早老蛋白2, γ 分泌酶, 死亡受体6 (DR6), 淀粉状蛋白前体蛋白 (APP), p75 神经生长蛋白受体 (p75NTR), 和胱天蛋白酶6。在一个实施方案中, 抗原是BACE1。

[0080] 除非另外说明, 术语“BACE1”当在本文中使用时是指来自任何脊椎动物来源(包括哺乳动物如灵长类动物(例如人)和啮齿类动物(例如, 小鼠和大鼠))的任何天然 β -分泌酶1(也被称为 β -位淀粉状蛋白前体蛋白裂解酶1, 膜相关天冬氨酸蛋白酶2, memapsin 2, 天冬氨酸蛋白酶2或Asp2)。该术语包括“全长”未加工的BACE1以及由细胞内加工产生的任何形式的BACE1。该术语包括“全长”未加工的BACE1以及由细胞内加工产生的任何形式的BACE1。该术语还包括天然存在的BACE1的变体, 例如, 剪接变体或等位变体。示例性BACE1多肽的氨基酸序列有人BACE1、同种型A的序列, 如在Vassar等, *Science* 286:735-741 (1999) 中报道的, 该文献通过引用完整地结合于本文中。存在数种其他同种型的人BACE1, 包括同种型B、C和D。参见UniProtKB/Swiss-Prot条目P56817, 其通过引用完整地结合于本文中。

[0081] 术语“抗 β -分泌酶抗体”、“抗BACE1抗体”、“结合 β -分泌酶的抗体”和“结合BACE1的抗体”是指这样的抗体, 所述抗体能够以足够的亲和力结合BACE1, 以致该抗体可以用作靶向BACE1中的诊断和/或治疗剂。在一个实施方案中, 抗BACE1抗体与不相关的、非BACE1蛋白结合的程度小于该抗体与BACE1的结合(如通过例如放射免疫测定(RIA)所测量的)的约10%。在某些实施方案中, 结合BACE1的抗体的解离常数(Kd) $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 、 $\leq 0.1\text{nM}$ 、 $\leq 0.01\text{nM}$ 或 $\leq 0.001\text{nM}$ (例如 10^{-8}M 以下, 例如 10^{-8}M 至 10^{-13}M , 例如, 10^{-9}M 至 10^{-13}M)。在某些实施方案中, 抗BACE1抗体结合在来自不同物种和同种型的BACE1中保守的BACE1的表位。在一个实施方案中, 提供这样的抗体, 其结合在BACE1上由抗BACE1抗体YW412.8.31结合的表位。在其他实施方案中, 提供这样的抗体, 其结合BACE1内、位于BACE1的催化结构域中的外结合位点(exosite)。在一个实施方案中, 提供这样的抗体, 其与在Kornacker等, *Biochem.* 44:11567-11573 (2005) (该文献通过引用完整地结合在本文中) 中鉴定的肽(即, 肽1、2、3、1-11、1-10、1-9、1-8、1-7、1-6、2-12、3-12、4-12、5-12、6-12、7-12、8-12、9-12、10-12、4、5、6、5-10、5-9、合成的(scrambled)、Y5A、P6A、Y7A、F8A、I9A、P10A和L11A)竞争结合BACE1。示例性BACE1抗体序列显示在图5A-B和图6A-B中。本文中的一个示例性抗体包含抗体YW412.8.31的可变结构域(例如如在图5A-B中的)。

[0082] 本文中的“天然序列”蛋白质是指包含在自然中发现的蛋白质的氨基酸序列的蛋白质, 包括天然存在的蛋白质的变体。该术语当在本文中使用时包括从其天然来源分离的蛋白质或者重组制备的蛋白质。

[0083] 术语“抗体”在本文中以最广义使用, 并且具体地涵盖单克隆抗体, 多克隆抗体, 由至少两个完整抗体形成的多特异性抗体(例如, 双特异性抗体), 和抗体片段, 只要它们显示所需的生物学活性。

[0084] “抗体片段”在本文中包括保持结合抗原活性的完整抗体的一部分。抗体片段的实例包括Fab, Fab', F(ab')₂, 和Fv片段; 双抗体; 线性抗体; 单链抗体分子; 和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0085] 术语“单克隆抗体”在用于本文时指从一群基本上同质的抗体中获得的抗体, 即除了可能的变体(该变体可以在产生单克隆抗体的过程中出现, 此类变体通常少量存在)外, 构成群体的个体抗体是相同的和/或结合相同的表位。相比于通常包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制备物, 每个单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。除它们的特异性外, 单克隆抗体的优势在于它们不受其它免疫球蛋白的污染。修饰语“单克隆”表明抗体从基本上同质的抗体群获得的特征, 不应解释为要求通过任何特定方法来生产抗体。例如, 根据本发明使用的单克隆抗体可通过最先由Kohler等, *Nature*, 256:495(1975)描述的杂交瘤方法制备, 或者可以通过重组DNA方法(见, 例如, 美国专利号4,816,567)制备。“单克隆抗体”也可以使用例如在Clackson等, *Nature*, 352:624-628(1991)和Marks等, *J.Mol.Biol.*, 222:581-597(1991)中所述的技术从噬菌体抗体文库分离。本文中的单克隆抗体的具体实例包括嵌合抗体, 人源化抗体, 和人抗体, 包括它们的抗原-结合片段。

[0086] 单克隆抗体在本文中具体地包括: “嵌合”抗体(免疫球蛋白), 其中重链和/或轻链的一部分与衍生自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源, 而所述链的剩余部分与衍生自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源; 以及此类抗体的片段, 只要它们展现出期望的生物学活性(美国专利No.4,816,567; Morrison等, *Proc.Nat.Acad.Sci.USA*(美国国家科学院学报)81:6851-6855(1984))。本文感兴趣的嵌合抗体包括“灵长类源化(primatized)”抗体, 该抗体包含来源于非人灵长类动物(例如旧世界猴(Old World Monkey), 如狒狒、恒河猴(rhesus)或者食蟹猴(cynomolgus monkey))的可变结构域抗原-结合序列以及人恒定区序列(美国专利号5,693,780)。

[0087] 非人(例如鼠)抗体的“人源化”形式指最低限度包含衍生自非人免疫球蛋白的序列的嵌合抗体。在大部分情况中, 人源化抗体是人免疫球蛋白(受体抗体), 其中受体高变区的残基被具有所需特异性、亲和力和能力的非人物种(供体抗体)(诸如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类动物)的高变区残基替换。在有些情况中, 将人免疫球蛋白的构架区(FR)残基用相应的非人残基替换。此外, 人源化抗体可包含在受体抗体中或在供体抗体中没有发现的残基。进行这些修饰以进一步改进抗体的性能。一般而言, 人源化抗体将包含基本上全部的至少一个、典型地两个可变结构域, 其中所有或基本上所有高变区对应于非人免疫球蛋白的高变区, 且所有或基本上所有FR是人免疫球蛋白序列的那些, 不同之处在于如上所述的FR置换。人源化抗体任选还将包含至少部分免疫球蛋白恒定区, 所述免疫球蛋白恒定区典型地是人免疫球蛋白的恒定区。更多细节参见例如Jones等, *自然(Nature)* 321:522-525(1986); Riechmann等, *自然(Nature)* 332:323-329(1988); 及Presta, *Curr.Op.Struct.Biol.* 2:593-596(1992)。

[0088] “人抗体”在本文中是包含这样的氨基酸序列结构的抗体, 所述氨基酸序列结构与可获得自人B细胞的抗体的氨基酸序列结构对应, 并且包括人抗体的抗原-结合片段。可以通过多种技术鉴定或制备这样的抗体, 所述技术包括但不限于: 通过在免疫后能够在不存在内源免疫球蛋白生产的情况下生产人抗体的转基因动物(例如, 小鼠)生产(见, 例如,

Jakobovits等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits等, Nature, 362:255-258 (1993); Bruggermann等, Year in Immuno., 7:33 (1993); 和美国专利号5,591,669, 5,589,369和5,545,807); 从表达人抗体或人抗体片段的噬菌体展示文库选择(见, 例如, McCafferty等, Nature 348:552-553 (1990); Johnson等, Current Opinlon in Structural Biology 3:564-571 (1993); Clackson等, Nature, 352:624-628 (1991); Marks等, J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991); Griffith等, EMBO J. 12:725-734 (1993); 美国专利号5,565,332和5,573,905); 通过体外活化的B细胞生成(见美国专利5,567,610和5,229,275); 和分离自生产人抗体的杂交瘤。

[0089] “多特异性抗体”在本文中是对至少两个不同的表位具有结合特异性的抗体。示例性多特异性抗体可以结合BBB-R和脑抗原两者。多特异性抗体可以被制备成长抗体或抗体片段(例如F(ab')₂双特异性抗体)。也预期有改造的具有两个、三个或更多个(例如四个)功能性抗原结合位点的抗体(见, 例如, 美国申请号US 2002/0004587 A1, Miller等)。多特异性抗体可以被制备成长抗体或抗体片段。

[0090] 本文中的抗体包括具有改变的抗原结合或生物学活性的“氨基酸序列变体”。这样的氨基酸变化的实例包括具有增强的对抗原的亲力的抗体(例如“亲和力成熟”抗体), 和具有改变的Fc区(如果存在的话)的抗体, 例如具有改变的(增加或减小的)依赖抗体的细胞介导的细胞毒性(ADCC)和/或依赖补体的细胞毒性(CDC)的抗体(见, 例如, WO 00/42072, Presta, L. 和WO 99/51642, Iduosogie等); 和/或具有增加的或减小的血清半衰期的抗体(见, 例如, W000/42072, Presta, L.)。

[0091] “亲和力修饰的变体”具有一个或多个被置换的亲本抗体的高变区或者构架残基(例如亲本嵌合、人源化或人抗体的), 其改变(增加或减小)亲和力。在一个实施方案中, 根据本发明, 所得的被选用于进一步开发的变体将具有减小的对BBB-R的亲和力。产生这种置换变体的简便方式是使用噬菌体展示。简言之, 将若干个高变区位点(例如6-7个位点)突变以在每个位点产生所有可能的氨基置换。因此产生的抗体变体以单价形式从丝状噬菌体颗粒展示为与包装在每个颗粒内的M13的基因III产物的融合体(fusion)。然后对噬菌体展示的变体的生物学活性(例如结合亲和力)进行筛选。为了鉴定用于修饰的候选高变区位点, 可以进行丙氨酸扫描诱变以鉴别显著有助于抗原结合的高变区残基。备选地, 或另外地, 可能有利的是分析抗原-抗体复合物的晶体结构从而鉴别抗体及其靶标间的接触点。根据本文所述的技术, 这样的接触残基和邻近残基是置换的候选物。在这样的变体产生后, 对一组变体进行筛选, 并且可以选择具有改变的亲和力的抗体用于进一步的开发。

[0092] 抗体在本文中可以与例如“异源分子”缀合以增加半衰期或稳定性或者在其他方面改善抗体。例如, 抗体可以与多种非蛋白聚合物(例如, 聚乙二醇(PEG), 聚丙二醇, 聚氧化烯, 或聚乙二醇和聚丙二醇的共聚物)相连。与一种或多种PEG分子相连的抗体片段、如Fab'是本发明的示例性实施方案。

[0093] 本文中的抗体可以是“糖基化变体”以使与Fc区相连的任何糖(如果存在的话)被改变。例如, 具有缺乏与抗体的Fc区偶联的岩藻糖的成熟糖结构的抗体描述于美国专利申请号US 2003/0157108 (Presta, L.)中。也参见US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd)。在与抗体的Fc区连接的糖中具有平分型N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)的抗体引用在WO 2003/011878 (Jean-Mairet)等和美国专利号6,602,684 (Umana等)中。在与抗体的Fc区连接

的寡糖中具有至少一个半乳糖残基的抗体在WO 1997/30087, Patel等中被报道。也参见WO 1998/58964 (Raju, S.) 和WO 1999/22764 (Raju, S.), 其涉及具有改变的与其Fc区连接的糖的抗体。也参见US 2005/0123546 (Umana等), 其描述了具有修饰的糖基化的抗体。

[0094] 术语“高变区”当在本文中使用时是指抗体的负责抗原结合的氨基酸残基。高变区包含来自“互补决定区”或者“CDR”的氨基酸残基(例如轻链可变结构域中的残基24-34 (L1)、50-56 (L2) 和89-97 (L3) 和重链可变结构域中的31-35 (H1)、50-65 (H2) 和95-102 (H3); Kabat等, 免疫学感兴趣的蛋白的序列 (Sequences of Proteins of Immunological Interest), 第5版. 公众健康服务 (Public Health Service), 国立卫生研究所 (National Institutes of Health), Bethesda, MD. (1991)) 和/或来自“高变环”的那些残基(例如轻链可变结构域中的残基26-32 (L1)、50-52 (L2) 和91-96 (L3) 以及重链可变结构域中的26-32 (H1)、53-55 (H2) 和96-101 (H3); Chothia和Lesk, 分子生物学杂志 (J. Mol. Biol.) 196:901-917 (1987))。“构架”或“FR”残基是不同于本文所定义的高变区残基的那些可变结构域残基。

[0095] “全长抗体”是这样的抗体, 其包含抗原-结合可变区以及轻链恒定结构域 (CL) 和重链恒定结构域, CH1, CH2和CH3。恒定结构域可以是天然序列恒定结构域(例如人天然序列恒定结构域)或其氨基酸序列变体。

[0096] “裸抗体”是没有缀合异源分子(如细胞毒性部分、聚合物或放射性标记)的抗体(如本文所定义的)。

[0097] 抗体“效应子功能”指那些可归因于抗体的Fc区(天然序列Fc区或氨基酸序列变体Fc区)的生物学活性。抗体效应子功能的实例包括: C1q结合, 补体依赖性细胞毒性 (CDC), Fc受体结合, 抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 等。在一个实施方案中, 本文中的抗体基本上缺少效应子功能。

[0098] 取决于其重链恒定结构域的氨基酸序列, 可以将全长抗体分配到不同的“类别”。有五个主要类别的全长抗体: IgA, IgD, IgE, IgG和IgM, 并且这些中的数个可以进一步被划分为亚类(同种型), 例如, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA和IgA2。对应于不同类别的抗体的重链恒定结构域分别被称为 α , δ , ϵ , γ 和 μ 。不同类别的免疫球蛋白的亚基结构和三维构形是已知的。

[0099] 术语“重组抗体”, 当在本文中使用时, 是指这样的抗体(例如嵌合、人源化或人抗体或其抗原-结合片段), 该抗体由包含编码所述抗体的核酸的重组宿主细胞表达。用于生产重组抗体的“宿主细胞”的实例包括: (1) 哺乳动物细胞, 例如, 中国仓鼠卵巢 (CHO)、COS、骨髓瘤细胞(包括Y0和NS0细胞), 幼仓鼠肾细胞 (BHK), HeLa细胞和Vero细胞; (2) 昆虫细胞, 例如, sf9, sf21和Tn5; (3) 植物细胞, 例如属于烟草属 (genus *Nicotiana*) 的植物(例如烟草 (*Nicotiana tabacum*)); (4) 酵母细胞, 例如, 属于酵母属 (genus *Saccharomyces*) 的那些(例如酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)) 或属于曲霉属 (genus *Aspergillus*) 的那些(例如黑曲霉 (*Aspergillus niger*)); (5) 细菌细胞, 例如大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 细胞或者枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 细胞等。

[0100] 当用于本文中时, “特异性结合”或“特异地结合”是指抗体选择性地或优先地结合抗原。通常使用标准测定, 如斯卡查德分析或表面等离子共振技术(例如使用BIACORE®) 确定结合亲和力。

[0101] 与参照抗体“结合相同表位的抗体”是指这样的抗体,其在竞争测定中阻断50%以上的所述参照抗体与其抗原的结合,反之,参照抗体在竞争测定中阻断50%以上的该抗体与其抗原的结合。在一个实施方案中,抗BACE1抗体结合为YW412.8.31所结合的BACE1表位。

[0102] 术语“细胞毒性剂”用在本发明中指抑制或防止细胞功能和/或引起细胞死亡或破坏的物质。细胞毒性剂包括但不限于:放射性同位素(例如,At²¹¹,I¹³¹,I¹²⁵,Y⁹⁰,Re¹⁸⁶,Re¹⁸⁸,Sm¹⁵³,Bi²¹²,P³²,Pb²¹²和Lu的放射性同位素);化疗剂或药物(例如,甲氨蝶呤(methotrexate),阿霉素(adriamycin),长春花生物碱(vinca alkaloids)(长春新碱(vincristine),长春碱(vinblastine),依托泊苷(etoposide)),多柔比星(doxorubicin),美法仑(melphalan),丝裂霉素(mitomycin)C,苯丁酸氮芥(chlorambucil),柔红霉素(daunorubicin)或其它嵌入剂);生长抑制剂;酶及其片段如核酸水解酶;抗生素;毒素如小分子毒素或细菌、真菌、植物或动物起源的酶促活性毒素,包括其片段和/或变体。

[0103] 试剂例如药物制剂的“有效量”是指在需要的剂量和时间阶段有效获得所需的治疗或预防结果的量。

[0104] 术语“Fc区”在本文中用于定义免疫球蛋白重链的C端区域,所述区域包含至少一部分的恒定区。该术语包括天然序列Fc区和变体Fc区。在一个实施方案中,人IgG重链Fc区从Cys226或Pro230延伸至重链的羧基端。然而,Fc区的C端赖氨酸(Lys447)可以存在或者可以不存在。除非另外说明,Fc区或恒定区中的氨基酸残基的编号是根据EU编号系统,其也被称为EU索引,如在Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest(免疫学感兴趣的蛋白质的序列),5th Ed.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD,1991中所述。

[0105] “构架”或“FR”是指除高变区(HVR)残基之外的可变结构域残基。可变结构域的FR通常由以下四个FR结构域组成:FR1,FR2,FR3和FR4。因此,HVR和FR序列通常以下列顺序出现在VH(或VL)中:FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

[0106] “免疫缀合物”是与一个或多个异源分子(包括但不限于标记或细胞毒性剂)缀合的抗体。任选地,这样的缀合是通过接头。

[0107] “接头”当在本文中使用时是这样的结构,其将抗BBB-R抗体共价或非共价地与异源分子相连。在某些实施方案中,接头是肽。在其他实施方案中,接头是化学接头。

[0108] “标记”是与本文中的抗体偶联并被用于检测或成像的标记物。这样的标记的实例包括:放射性标记、荧光团、生色团或亲和力标签。在一个实施方案中,标记是用于医疗成像的放射性标记,例如^{99m}Tc或¹¹²³I,或用于核磁共振(NMR)成像(也被称为磁共振成像,mri)的自旋标记,如又有碘-123,碘-131,铟-111,氟-19,碳-13,氮-15,氧-17,钆,锰,铁等。

[0109] “个体”或“受试者”是哺乳动物。哺乳动物包括但不限于,家养动物(例如,牛,羊,猫,狗和马),灵长类动物(例如,人和非人灵长类动物如猴),兔,以及啮齿类动物(例如,小鼠和大鼠)。在某些实施方案中,个体或受试者是人。

[0110] “分离的”抗体是这样的抗体,其已经与其天然环境的组分分离。在一些实施方案中,将抗体纯化至超过95%或99%纯度,如通过例如电泳(例如,SDS-PAGE,等电聚焦(IEF),毛细管电泳)或层析(例如,离子交换或反相HPLC)确定的。对于用于评估抗体纯度的方法的综述,参见,例如,Flatman等,J.Chromatogr.B 848:79-87(2007)。

[0111] “包装说明书”用于指常规地包含在治疗性产品的商业包装中的说明书,其含有关

于适应症、用法、剂量、施用、组合疗法、禁忌症和/或关于使用此类治疗性产品的警告的信息。

[0112] 术语“药物制剂”指这样的制剂,其以允许包含在其中的活性成分的生物学活性有效的形式存在,并且不包含对被施用所述制剂的受试者具有不可接受的毒性的另外的成分。

[0113] “药用载体”是指药物制剂中不同于活性成分的成分,其对受试者是无毒的。药用载体包括但不限于缓冲剂、赋形剂、稳定剂或防腐剂。

[0114] 用于本文时,“治疗(treatment)”(及其语法变化如“治疗(treat)”或“治疗(treating)”)指在尝试改变待治疗的个体的天然进程中的临床干预,并且可以为了预防或在临床病理学的进程中进行。治疗的理想效果包括但不限于防止疾病发生或复发,缓和症状,消除疾病的任何直接或间接病理学后果,预防转移,降低疾病进展速率,改善或减轻疾病状态,和症状缓解或改善的预后。在一些实施方案中,将本发明的抗体用于延缓疾病的发生或减缓疾病的进展。

[0115] II. 组合物和方法

[0116] II. 制备抗BBB-R抗体及其缀合物

[0117] 本发明的方法和制品使用,或包括,结合BBB-R的抗体。用于生产或筛选抗体的BBB-R抗原可以是,例如,可溶形式的,或其包含所需的表位的部分(例如胞外结构域)。备选地,或另外地,在其细胞表面表达BBB-R的细胞可以用于产生或筛选抗体。可用于生产抗体的其他形式的BBB-R对于本领域技术人员将是明显的。本文中的BBB-R的实例包括运铁蛋白受体(TfR),胰岛素受体,胰岛素样生长因子受体(IGF-R),低密度脂蛋白受体相关蛋白1(LRP1)和LRP8等,以及肝素结合性表皮生长因子样生长因子(HB-EGF)。

[0118] 根据本发明,选择“低亲和力”抗BBB-R(例如抗TfR)抗体,该选择是基于本文中显示此种抗体显示提高的CNS(例如,脑)摄取的数据。为鉴别此种低亲和力抗体,用于测量抗体亲和力的多种测定是可用的,其包括但不限于:斯卡查德测定和表面等离子共振技术(例如使用BIACORE®)。根据本发明的一个实施方案,抗体对BBB-R抗原(例如对TfR)的亲合力为从约5nM,或从约20nM,或从约100nM,至约10 μ M,或至约1 μ M,或至约500nM。因此,亲合力可以为约5nM至约10 μ M,或约20nM至约1 μ M,或约100nM至约500nM,例如通过斯卡查德分析或者BIACORE®所测量的。

[0119] 因此,本发明提供制备可以用于将神经疾病药物转运穿过血脑屏障的抗体的方法,所述方法包括从针对血脑屏障受体(BBB-R)的一组抗体中选择一种抗体(因为其对BBB-R的亲合力在从约5nM,或从约20nM,或从约100nM,至约10 μ M,或至约1 μ M,或至约500mM的范围内)。因此,亲合力可以为约5nM至约10 μ M,或约20nM至约1 μ M,或约100nM至约500nM,例如通过斯卡查德分析或者BIACORE®测量的。如本领域普通技术人员将理解的,由于例如空间位阻或甚至由于一个结合臂的消除(如果抗体被制成具有多特异性并且具有与不同于该抗体的原始靶标的抗原结合的一个或多个臂),将异源分子/化合物与抗体缀合将通常降低抗体对其靶标的亲合力。在一个实施方案中,对TfR具有特异性的、与BACE1缀合的本发明的低亲和力抗体具有如通过BIACORE测量的约30nM的对TfR的Kd。在另一个实施方案中,对TfR具有特异性的、与BACE1缀合的本发明的低亲和力抗体具有如通过BIACORE测量的约600nM的对TfR的Kd。

[0120] 用于评估抗体亲和力的一个示例性测定是通过斯卡查德分析。例如,可以使用乳过氧(化)物酶法(Bennett和Horuk,Methods in Enzymology 288pg.134-148(1997))将目的抗BBB-R抗体碘化。通过凝胶过滤使用NAP-5柱纯化放射性标记的抗BBB-R抗体以使其与游离的¹²⁵I-Na分开,并测量其比活性。将50μL含有固定浓度的碘化抗体和递减浓度的连续稀释的未标记抗体的竞争反应混合物放置在96-孔板中。在37°C在5%CO₂中在培养基中培养瞬时表达BBB-R的细胞,所述培养基由补充以10%FBS,2mM L-谷氨酰胺和1×青霉素-链霉素的Dulbecco改良eagle氏培养基(DMEM)(Genentech)组成。使用Sigma Cell Dissociation Solution(细胞解离溶液)将细胞与培养皿脱离,并用结合缓冲液(含有1%牛血清清蛋白,50mM HEPES,pH 7.2,和0.2%叠氮化钠的DMEM)洗涤。将洗涤的细胞以200,000个细胞/0.2mL结合缓冲液的近似密度添加到含有50-μL竞争反应混合物的96-孔板中。未标记的抗体在含有细胞的竞争反应中的终浓度是变化的,开始为1000nM,然后通过1:2倍稀释递减达10个浓度,并且包括零添加、仅缓冲液的样品。测定每个浓度的未标记抗体的含有细胞的竞争反应,一式三份。将含有细胞的竞争反应在室温温育2小时。在2小时温育后,将竞争反应转移至滤板并用结合缓冲液洗涤四次以将游离的与结合的碘化抗体分离。通过γ计数器对过滤器进行计数,并使用Munson和Rodbard的拟合算法(1980)评估结合数据以确定抗体的结合亲和力。

[0121] 可以如下地进行使用本发明的组合物的示例性斯卡查德分析。使用乳过氧化物酶法(Bennett和Horuk,Methods in Enzymology 288 pg.134-148(1997))将抗TFR^A碘化。通过凝胶过滤使用NAP-5柱纯化放射性标记的抗TFR^A以使其与游离的¹²⁵I-Na分开;纯化的抗TFR^A具有19.82μCi/μg的比活性。将50μL含有固定浓度的碘化抗体和递减浓度的连续稀释的未标记抗体的竞争反应混合物放置在96-孔板中。在37°C在5%CO₂中在培养基中培养瞬时表达鼠TfR的293细胞,所述培养基由补充以10%FBS,2mM L-谷氨酰胺和1×青霉素-链霉素的Dulbecco改良eagle氏培养基(DMEM)(Genentech)组成。使用Sigma Cell Dissociation Solution(细胞解离溶液)将细胞与培养皿脱离,并用结合缓冲液(含有1%牛血清清蛋白,50mM HEPES,pH 7.2,和0.2%叠氮化钠的DMEM)洗涤。将洗涤的细胞以200,000个细胞/0.2mL结合缓冲液的近似密度添加到含有50-μL竞争反应混合物的96-孔板中。碘化的抗体在每个含有细胞的竞争反应中的终浓度都是100pM(134,000cpm/0.25mL)。未标记的抗体在含有细胞的竞争反应中的终浓度是变化的,开始为1000nM,然后通过1:2倍稀释递减达10个浓度,并且包括零添加、仅缓冲液的样品。测定每个浓度的未标记抗体的含有细胞的竞争反应,一式三份。将含有细胞的竞争反应在室温温育2小时。在2小时温育后,将竞争反应转移至Millipore Multiscreen滤板并用结合缓冲液洗涤四次以将游离的与结合的碘化抗体分离。在Wallac Wizard 1470 γ计数器(PerkinElmer Life and Analytical Sciences;Waltham,MA)上对过滤器进行计数。使用New Ligand软件(Genentech)(该软件使用Munson和Rodbard的拟合算法(1980))评估结合数据以确定抗体的结合亲和力。

[0122] 可以如下地进行使用本发明的组合物的示例性BIACORE®分析。Kd是使用表面等离子共振测定法使用BIACORE®-2000(BIAcore,Inc.,Piscataway,NJ)在25°C使用抗人Fc试剂盒(BiAcore Inc.,Piscataway,NJ)测量的。简而言之,依照供应商的说明用N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐(EDC)和N-羟基-琥珀酰亚胺(NHS)活化羧甲基化右旋糖苷生物传感器芯片(CM5,BIACORE,Inc.)。用10mM乙酸钠pH 4.0将抗人Fc抗体

稀释至50 μ g/ml,然后以5 μ l/分钟的流速注入,以获得约10000个响应单位(RU)的偶联蛋白质。在注入抗体后,注入1M乙醇胺以封闭未反应基团。为了进行动力学测量,将抗TfR抗体变体注入到HBS-P中至达到约220RU,然后在25 $^{\circ}$ C以约30 μ l/min的流速将MuTfR-His的两倍连续稀释液(0.61nM至157nM)注入到HBS-P中。使用简单一对朗格缪尔(Langmuir)结合模型(BIACORE[®] Evaluation Software version 3.2)通过同时拟合缔合和解离传感图来计算缔合速率(kon)和解离速率(koff)。平衡解离常数(Kd)以比率koff/kon计算。参见例如Chen等,J.Mol.Biol.(分子生物学杂志)293:865-881(1999)。

[0123] 根据另一个实施方案,Kd是使用表面等离子共振测定法使用BIACORE[®]-2000装置(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)在25 $^{\circ}$ C使用抗人Fc试剂盒(BiAcore Inc., Piscataway, NJ)测量的。简而言之,依照供应商的说明用N-乙基-N[']-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐(EDC)和N-羟基-琥珀酰亚胺(NHS)活化羧甲基化右旋糖苷生物传感器芯片(CM5, BIACORE, Inc.)。用10mM乙酸钠pH 4.0将抗人Fc抗体稀释至50 μ g/ml,然后以5 μ l/分钟的流速注入,以获得约10000个响应单位(RU)的偶联蛋白质。在注入抗体后,注入1M乙醇胺以封闭未反应基团。为了进行动力学测量,将抗BBB-R抗体变体注入到HBS-P中至达到约220RU,然后在25 $^{\circ}$ C以约30 μ l/min的流速将BBB-R-His的两倍连续稀释液(0.61nM至157nM)注入到HBS-P中。使用简单一对朗格缪尔(Langmuir)结合模型(BIACORE[®] Evaluation Software version 3.2)通过同时拟合缔合和解离传感图来计算缔合速率(kon)和解离速率(koff)。平衡解离常数(Kd)以比率koff/kon计算。参见例如Chen等,J.Mol.Biol.(分子生物学杂志)293:865-881(1999)。

[0124] 一种或多种抗体对BBB-R的亲力的替代性量度是其半最大抑制浓度(IC50),其是抑制已知BBB-R配体与BBB-R的50%的结合所需的抗体的多少的量度。已知若干种确定给定化合物的IC50的方法;普遍方法是进行竞争结合测定,如本文在实施例中(即关于图2A)所述的。通常,高IC50指示需要更多的抗体以抑制已知配体的结合,并且因此该抗体对所述配体的亲和力相对较低。反之,低IC50指示需要较少的抗体以抑制已知配体的结合,并且因此该抗体对所述配体的亲和力相对较高。

[0125] 测量IC50的示例性竞争性ELISA测定是这样的测定,其中将递增浓度的抗TfR或抗TfR/脑抗原(即,抗TfR/BACE1,抗TfR/AB等)变体抗体用于与生物素化的TfR^A竞争结合TfR。抗TfR竞争ELISA在包被以2.5 μ g/ml纯化的鼠TfR胞外结构域(在PBS中)的Maxisorp板(Neptune, N. J.)中在4 $^{\circ}$ C过夜进行。将平板用PBS/0.05%Tween 20洗涤,并使用在PBS中的Superblock封闭缓冲液(Thermo Scientific, Hudson, NH)封闭。将每个个体抗TfR或抗TfR/脑抗原(即,抗TfR/BACE1或抗TfR/AB)的滴定液(1:3连续稀释)与生物素化的抗TfR^A(0.5nM终浓度)组合并加入到平板,在室温达1小时。将平板用PBS/0.05%Tween 20洗涤,并将HRP-链霉抗生物素蛋白(Southern Biotech, Birmingham)加入到平板中并在室温温育1小时。用PBS/0.05%Tween 20洗涤平板,并且使用TMB底物(BioFX Laboratories, Owings Mills)检测与平板结合的生物素化的抗TfR^A。

[0126] 在一个实施方案中,低亲和力抗BBB-R抗体在本文中与标记和/或神经疾病药物或者显影剂偶联以便更有效地将标记和/或药物或显影剂转运穿过BBB。这样的偶联可以通过化学交联剂或者通过生成融合蛋白等实现。

[0127] 共价缀合可以是直接的或是通过接头来实现的。在某些实施方案中,直接缀合是通过构建蛋白融合体(即,通过编码BBB-R抗体和神经疾病药物的两个基因的遗传融合并且作为单个蛋白质表达)来实现的。在某些实施方案中,直接缀合是通过在抗BBB-R抗体的两个部分中的一个上的反应基团和神经药物上的相应基团或受体之间形成共价键来实现的。在某些实施方案中,直接缀合是通过将要被缀合的两个分子中的一个修饰(即,遗传修饰)成包含反应基团(作为非限制性实例,巯基或羧基)来实现的,该基团与要被缀合的另一个分子在合适的条件下形成共价偶联。作为一个非限制性实例,可以将具有所需反应基团(即,半胱氨酸残基)的分子(即,氨基酸)引入到,例如,抗BBB-R抗体中,并与神经药物形成二硫键。将核酸与蛋白质共价缀合的方法也是本领域中已知的(即,光致交联,参见,例如,Zatsepin等,Russ.Chem.Rev.74:77-95(2005))。非共价缀合可以通过任何非共价偶联方式,包括疏水键、离子键、静电相互作用等,如本领域普通技术人员容易理解的。缀合也可以使用多种接头进行。例如,可以使用多种双功能蛋白偶联剂缀合抗BBB-R抗体和神经药物,所述偶联剂如N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)、琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC)、亚氨基硫烷(IT)、亚氨酸酯(诸如盐酸己二亚酰胺二甲酯物)的双功能衍生物、活性酯类(诸如辛二酸二琥珀酰亚胺基酯)、醛类(诸如戊二醛)、双叠氮化合物(诸如双(对-叠氮苯甲酰基)己二胺)、双重氮衍生物(诸如双(对-重氮苯甲酰基)乙二胺)、二异氰酸酯(诸如甲苯2,6-二异氰酸酯)、和双活性氟化合物(诸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。也可以使用由通过肽键相连的一至二十个氨基酸组成的肽接头。在某些这样的实施方案中,氨基酸选自二十种天然存在的氨基酸。在某些其他的这样的实施方案中,一个或多个氨基酸选自甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸、天冬氨酸、谷氨酰胺和赖氨酸。接头可以是促进神经药物在递送到脑后释放的“可裂解接头”。举例来说,可使用酸不稳定接头、肽酶敏感性接头、光不稳定接头、二甲基接头或含二硫化物的接头(Chari等人,Cancer Res.(癌症研究)52:127-131(1992);美国专利第5,208,020号)。

[0128] 本发明清楚地预期,但不限于,利用交联剂试剂制备的缀合物,所述交联剂试剂包括但不限于,BMPS,EMCS,GMBS,HBVS,LC-SMCC,MBS,MPBH,SBAP,SIA,SIAB,SMCC,SMPB,SMPH,硫代EMCS,硫代GMBS,硫代KMUS,硫代MBS,硫代SIAB,硫代SMCC和硫代SMPB和SVSB(琥珀酰亚胺基-(4-乙烯基砵)苯甲酸酯),所述交联剂试剂可商购获得(例如购自Pierce Biotechnology,Inc.,Rockford,IL.,U.S.A)。

[0129] 对于神经病病症,可以选择作为镇痛药的神经药物,包括但不限于,麻醉药/阿片类镇痛药(即,吗啡,芬太尼(fentanyl),丙碘酮(hydrocodone),哌替啶(meperidine),美沙酮(methadone),羟吗啡酮(oxycodone),喷他佐辛(pentazocine),丙氧芬(propoxyphene),曲马朵(tramadol),可待因(codeine)和羟可酮(oxycodone)),非甾类抗炎药(NSAID)(即,布洛芬(ibuprofen),萘普生(naproxen),双氯芬酸(diclofenac),二氟尼柳(diflunisal),依托度酸(etodolac),非诺洛芬(fenoprofen),氟比洛芬(flurbiprofen),吲哚美辛(indomethacin),酮咯酸(ketorolac),甲芬那酸(mefenamic acid),美洛昔康(meloxicam),萘丁美酮(nabumetone),奥沙普秦(oxaprozin),吡罗昔康(piroxicam),舒林酸(sulindac)和托美丁(tolmetin)),皮质类甾醇(即,可的松(cortisone),泼尼松(prednisone),泼尼松龙(prednisolone),地塞米松(dexamethasone),甲泼尼龙(methylprednisolone)和去炎松(triamcinolone)),抗偏头痛

剂(即, sumatriptan, 阿莫曲普坦 (almotriptan), 夫罗曲普坦 (frovatriptan), 舒马普坦 (sumatriptan), 利扎曲普坦 (rizatriptan), 依来曲普坦 (eletriptan), 佐米曲普坦 (zolmitriptan), 双氢麦角胺 (dihydroergotamine), 依来曲普坦 (eletriptan) 和麦角胺 (ergotamine)), 醋氨酚 (acetaminophen), 水杨酸盐(即, 阿司匹林 (aspirin), 水杨酸胆碱 (choline salicylate), 水杨酸镁 (magnesium salicylate), 二氟尼柳 (diflunisal) 和双水杨酯 (salsalate)), 抗惊厥药(即, 卡马西平 (carbamazepine), 氯硝西洋 (clonazepam), 加巴喷丁 (gabapentin), 拉莫三嗪 (lamotrigine), 普瑞巴林 (pregabalin), 噻加宾 (tiagabine) 和托吡酯 (topiramate)), 麻醉药(即, 异氟醚 (isoflurane), 三氯乙烯 (trichloroethylene), 氟烷 (halothane), 七氟烷 (sevoflurane), 苯佐卡因 (benzocaine), 氯普鲁卡因 (chloroprocaine), 可卡因 (cocaine), 环美卡因 (cyclopropylmepivacaine), 二甲卡因 (dimethocaine), 丙氧卡因 (propoxycaïne), 普鲁卡因 (procaine), 奴佛卡因 (novocaine), 丙美卡因 (proparacaine), 丁卡因 (tetracaine), 阿替卡因 (articaine), 布比卡因 (bupivacaine), 卡替卡因 (carticaine), 辛可卡因 (cinchocaine), 依替卡因 (etidocaine), 左布比卡因 (levobupivacaine), 利多卡因 (lidocaine), 甲哌卡因 (mepivacaine), 哌罗卡因 (piperocaine), 丙胺卡因 (prilocaine), 罗哌卡因 (ropivacaine), 三甲卡因 (trimecaine), 蛤蚌毒素 (saxitoxin) 和河豚毒素 (tetrodotoxin)), 和cox-2-抑制剂(即, 塞来昔布 (celecoxib), 罗非昔布 (rofecoxib) 和伐地考昔 (valdecoxib))。对于伴有眩晕的神经病病症, 可以选择作为抗眩晕剂的神经药物, 其包括但不限于, 美克洛嗪 (meclizine), 苯海拉明 (diphenhydramine), 异丙嗪 (promethazine) 和地西洋 (diazepam)。对于伴有恶心的神经病病症, 可以选择作为抗恶心剂的神经药物, 其包括但不限于, 异丙嗪 (promethazine), 氯丙嗪 (chlorpromazine), 丙氯拉嗪 (prochlorperazine), 曲美苄胺 (trimethobenzamide) 和甲氧氯普胺 (metoclopramide)。对于神经变性疾病, 可以选择是生长激素或神经营养因子的神经药物; 实例包括但不限于脑源性神经营养因子 (BDNF), 神经生长因子 (NGF), 神经营养蛋白-4/5, 成纤维细胞生长因子 (FGF)-2 和其他 FGF, 神经营养蛋白 (NT)-3, 促红细胞生成素 (EPO), 肝细胞生长因子 (HGF), 表皮生长因子 (EGF), 转化生长因子 (TGF)- α , TGF- β , 血管内皮生长因子 (VEGF), 白介素-1受体拮抗剂 (IL-1ra), 睫状神经营养因子 (CNTF), 神经胶质源性神经营养因子 (GDNF), neurturin, 血小板源性生长因子 (PDGF), 调蛋白 (heregulin), 神经调节蛋白, artemin, persephin, 白介素, 胶质细胞源性神经营养因子 (GFR), 粒细胞集落刺激因子 (CSF), 粒细胞-巨噬细胞-CSF, 导蛋白 (netrin), 心肌营养蛋白-1, 刺猬分子 (hedgehogs), 白血病抑制因子 (LIF), 中期因子, 多效营养因子, 骨形成蛋白 (BMP), 导蛋白, 皂化蛋白, 脑信号蛋白和干细胞因子 (SCF)。

[0130] 对于癌症, 可以选择是化疗剂的神经药物。化疗剂的实例包括烷基化试剂, 如塞替哌 (thiotepa) 和环磷酰胺 (cyclophosphamide) (CYTOXAN®); 烷基磺酸酯 (alkyl sulfonates) 如白消安 (busulfan), 英丙舒凡 (improsulfan) 和哌泊舒凡 (pipsulfan); 吡丙啶类 (aziridines) 如苯佐替派 (benzodopa)、卡波醌 (carboquone)、美妥替哌 (meturedopa) 和乌瑞替哌 (uredopa); 乙撑亚胺类 (ethylenimines) 和甲基蜜胺类 (methylamelamines), 包括六甲蜜胺 (altretamine)、曲他胺 (triethylenemelamine)、三亚乙基磷酰胺 (triethylenephosphoramidate)、三乙烯硫代磷酸胺

(triethylenethiophosphoramidate) 和三羟甲蜜胺 (trimethylmelamine); 聚乙酸类 (acetogenins) (特别是布拉他辛 (bullatacin) 和布拉他辛酮 (bullatacinone)); Δ -9-四氢大麻酚 (delta-9-tetrahydrocannabinol) (屈大麻酚 (dronabinol)、**MARINOL®**); β -拉帕醌 (beta-lapachone); 拉帕醇 (lapachol); 秋水仙碱 (colchicines); 桦木酸 (betulinic acid); 喜树碱 (camptothecin) (包括合成的类似物托泊替康 (topotecan) (**HYCAMTIN®**))、CPT-11 (伊立替康 (irinotecan) **CAMPTOSAR®**)、乙酰喜树碱 (acetylcamptothecin)、东莨菪亭 (scopollectin) 和 9-氨基喜树碱 (9-aminocamptothecin); 苔藓抑素 (bryostatins); 海绵多烯酮类化合物 (callystatin); CC-1065 (包括其阿多来新 (adozelesin)、卡折来新 (carzelesin) 和比折来新 (bizelesin) 合成类似物); 鬼臼毒素 (podophyllotoxin); 鬼臼酸 (podophyllinic acid); 替尼泊昔 (teniposide); 隐藻素类 (cryptophycins) (特别是隐藻素 1 和隐藻素 8); 多拉司他汀 (dolastatin); 倍癌霉素 (duocarmycin) (包括合成的类似物、KW-2189 和 CB1-TM1); 艾榴素 (eleutherobin); pancratistatin; 匍枝珊瑚醇 (sarcodictyin); 海绵素 (spongistatin); 氮芥 (nitrogen mustards) 如苯丁酸氮芥 (chlorambucil)、萘氮芥 (chlornaphazine)、胆磷酰胺 (chlorophosphamide)、雌莫司汀 (estramustine)、异环磷酰胺 (ifosfamide)、氮芥 (mechlorethamine)、盐酸氧氮芥 (mechlorethamine oxide hydrochloride)、美法仑 (melphalan)、新氮芥 (novembichin)、苯芥胆甾醇 (phenesterine)、泼尼莫司汀 (prednimustine)、曲磷胺 (trofosfamide)、尿嘧啶氮芥 (uracil mustard); 亚硝基脲类 (nitrosoureas) 如卡莫司汀 (carmustine)、氯脲菌素 (chlorozotocin)、福莫司汀 (fotemustine)、洛莫司汀 (lomustine)、尼莫司汀 (nimustine) 和雷莫司汀 (ranimustine); 抗生素如烯二炔类 (enediynes) 抗生素 (例如加利车霉素 (calicheamicin), 尤其是加利车霉素 γ 1I 和加利车霉素 ω 1I (参见例如 Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33:183-186 (1994))); 烯二炔葱环类抗生素 (dynemicin), 包括烯二炔葱环类抗生素 A; 埃斯波霉素 (esperamicin); 以及新制癌菌素 (neocarzinostatin) 生色团和相关色素蛋白烯二炔类抗生素生色团)、阿克拉霉素 (aclacinomysins)、放线菌素 (actinomycin)、蒽霉素 (anthramycin)、偶氮丝氨酸 (azaserine)、博来霉素 (bleomycins)、放线菌素 C (cactinomycin)、carabycin、洋红霉素 (carminomycin)、嗜癌霉素 (carzinophilin)、色霉素 (chromomycins)、放线菌素 D (dactinomycin)、柔红霉素 (daunorubicin)、地托比星 (detorubicin)、6-重氮-5-氧代-L-正亮氨酸 (6-diazo-5-oxo-L-norleucine)、**ADRIAMYCIN®** 多柔比星 (doxorubicin) (包括吗啉代-多柔比星 (morpholino-doxorubicin)、氰基吗啉代-多柔比星 (cyanomorpholino-doxorubicin)、2-吡咯啉-多柔比星 (2-pyrrolino-doxorubicin) 和脱氧多柔比星 (deoxydoxorubicin))、表柔比星 (epirubicin)、依索比星 (esorubicin)、伊达比星 (idarubicin)、马塞罗霉素 (marcellomycin)、丝裂霉素类 (mitomycins) 如丝裂霉素 C、麦考酚酸 (mycophenolic acid)、诺拉霉素 (nogalamycin)、橄榄霉素 (olivomycins)、培洛霉素 (peplomycin)、紫菜霉素 (porfiromycin)、嘌呤霉素 (puromycin)、三铁阿霉素 (quelamycin)、罗多比星 (rodorubicin)、链黑霉素 (streptonigrin)、链佐星 (streptozocin)、杀结核菌素 (tubercidin)、乌苯美司 (ubenimex)、净司他丁 (zinostatin)、佐柔比星 (zorubicin); 抗代

谢物如甲氨喋呤 (methotrexate) 和5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil) (5-FU); 叶酸类似物如二甲叶酸 (denopterin)、甲氨喋呤、喋罗呤 (pteropterin)、三甲曲沙 (trimetrexate); 嘌呤类似物如氟达拉滨 (fludarabine)、6-巯嘌呤 (6-mercaptopurine)、硫咪嘌呤 (thiamiprine)、硫鸟嘌呤 (thioguanine); 嘧啶类似物如安西他滨 (ancitabine)、阿扎胞苷 (azacitidine)、6-氮尿苷 (6-azauridine)、卡莫氟 (carmofur)、阿糖胞苷 (cytarabine)、双脱氧尿苷 (dideoxyuridine)、去氧氟尿苷 (doxifluridine)、依诺他滨 (enocitabine)、氟尿苷 (floxuridine); 雄激素类, 诸如卡鲁睾酮 (calusterone)、丙酸屈他雄酮 (dromostanolone propionate)、环硫雄醇 (epitiostanol)、美雄烷 (mepitiostane)、睾内酯 (testolactone); 抗肾上腺药 (anti-adrenals) 如氨鲁米特 (aminoglutethimide)、米托坦 (mitotane)、曲洛司坦 (trilostane); 叶酸补偿剂如亚叶酸 (frolinic acid); 醋葡醛内酯 (aceglatone); 羟醛磷酸胺配糖 (aldophosphamide glycoside); 5-氨基酮戊酸 (aminolevulinic acid); 恩尿嘧啶 (eniluracil); 安吡啶 (amsacrine); bestrabucil; 比生群 (bisantrene); 依达曲沙 (edatraxate); defofamine; 秋水仙胺 (demecolcine); 地吡醌 (diaziquone); elfornithine; 依利醋铵 (elliptinium acetate); 埃坡霉素 (epothilone); 依托格鲁 (etoglucid); 硝酸镓 (gallium nitrate); 羟基脲 (hydroxyurea); 香菇多糖 (lentinan); 氯尼达明 (lonidainine); 美登木素生物碱类 (maytansinoids) 如美登素 (maytansine) 和安丝菌素 (ansamitocins); 米托胍脲 (mitoguazone); 米托蒽醌 (mitoxantrone); 莫哌达醇 (mopidanmol); 尼曲吡啶 (nitraerine); 喷司他丁 (pentostatin); 异丙嗪 (phenamet); 吡柔比星 (pirarubicin); 洛索蒽醌 (losoxantrone); 2-乙基酰肼 (2-ethylhydrazide); 丙卡巴肼 (procarbazine); **PSK®** 多糖复合物 (JHS Natural Products (JHS天然产品), Eugene, OR); 雷佐生 (razoxane); 利索新 (rhizoxin); 西佐喃 (sizofiran); 锗螺胺 (spirogermanium); 细交链孢菌酮酸 (tenuazonic acid); 三亚胺醌 (triaziquone); 2,2', 2'-三氯三乙胺 (2,2', 2"-trichlorotriethylamine); 单端孢霉烯族化合物 (trichothecenes) (特别是T-2毒素、verracurin A、杆孢菌素A (roridin A) 和蛇形菌素 (anguidine)); 乌拉坦 (urethan); 长春地辛 (vindesine) (**ELDISINE®**、**FILDESIN®**); 达卡巴嗪 (dacarbazine); 甘露莫司汀 (mannomustine); 二溴甘露醇 (mitobronitol); 二溴卫矛醇 (mitolactol); 哌泊溴烷 (pipobroman); gacytosine; 阿糖胞苷 (arabinoside) ("Ara-C"); 塞替哌 (thiotepa); 紫杉烷类化合物 (taxoid), 例如 **TAXOL®** 紫杉醇 (paclitaxel) (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.)、不含Cremophor的ABRAXANETM (ABRAXANETM Cremophor-free), 紫杉醇的白蛋白改造的纳米颗粒制剂 (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) 和 **TAXOTERE®** 多西他塞 (docetaxel) (**Rhône-Poulenc Rorer**, Antony, 法国); 苯丁酸氮芥 (chlorambucil); 吉西他滨 (gemcitabine) (**GEMZAR®**); 6-硫鸟嘌呤 (6-thioguanine); 巯嘌呤 (mercaptopurine); 甲氨喋呤; 铂类似物如顺铂 (cisplatin) 和卡铂 (carboplatin); 长春碱 (vinblastine) (**VELBAN®**); 铂; 依托泊苷 (etoposide) (VP-16); 异环磷酰胺 (ifosfamide); 米托蒽醌 (mitoxantrone); 长春新碱 (vincristine) (**ONCOVIN®**); 奥沙利铂 (oxaliplatin); 亚叶酸 (leucovorin); 长春瑞滨

(vinorelbine) (**NAVELBINE®**); 诺安托 (novantrone); 依达曲沙 (edatrexate); 道诺霉素 (daunomycin); 氨基喋呤 (aminopterin); 伊班膦酸盐 (ibandronate); 拓扑异构酶抑制剂 RFS 2000; 二氟甲基鸟氨酸 (difluoromethylornithine) (DMFO); 类视黄酸类 (retinoids) 如视黄酸 (retinoic acid); 卡培他滨 (capecitabine) (**XELODA®**); 以上任何一种的药用盐、酸或衍生物; 以及以上各项中的两个以上的组合, CHOP, 即环磷酰胺、多柔比星、长春新碱、和泼尼松龙 (prednisolone) 的组合疗法的缩写; 以及 FOLFOX, 即与 5-FU 和亚叶酸 (leucovorin) 组合的奥沙利铂 (oxaliplatin) (**ELOXATIN™**) 的治疗方案的缩写。

[0131] 同样包括在对化疗剂的该定义中的是抗激素剂, 其作用为调节、降低、阻断或抑制可促进癌生长的激素效果, 并且通常为系统或全身治疗的形式。它们自身可以是激素。实例包括抗雌激素类和选择性雌激素受体调控物类 (SERM), 包括, 例如, 他莫昔芬 (tamoxifen) (包括 **NOLVADEX®** 他莫昔芬), **EVISTA®** 雷洛昔芬 (raloxifene), 屈洛昔芬 (droloxifene), 4-羟基他莫昔芬, 曲沃昔芬 (trioxifene), keoxifene, LY117018, 奥那司酮 (onapristone), 和 **FARESTON®** 托瑞米芬 (toremifene); 抗黄体酮; 雌激素受体下调剂 (ERDs); 起作用抑制或关闭卵巢的药剂, 例如, 促黄体生成激素释放素 (leutinizing hormone-releasing hormone) (LHRH) 激动剂如 **LUPRON®** 和 **ELIGARD®** 醋酸亮丙立德 (leuprolide acetate), 醋酸戈舍瑞林 (goserelinacetate)、醋酸布舍瑞林 (buserelin acetate) 和 tripterelin; 其他抗雄激素类, 如氟他胺 (flutamide)、尼鲁米特 (nilutamide) 和比卡鲁胺 (bicalutamide); 和抑制芳香酶的芳香酶抑制剂, 其调节肾上腺中的雌激素生产, 诸如例如, 4(5)-咪唑、氨基鲁米特 (aminoglutethimide)、**MEGASE®** 醋酸甲地孕酮 (megestrolacetate)、**AROMASIN®** 依西美坦 (exemestane)、福美坦 (formestane), 法偭唑 (fadrozole)、**RIVISOR®** 伏氯唑 (vorozole)、**FEMARA®** 来曲唑 (letrozole) 和 **ARIMIDEX®** 阿那曲唑 (anastrozole)。此外, 对化疗剂的这种定义包括二膦酸盐类 (bisphosphonates) 如氯膦酸盐 (clodronate) (例如, **BONEFOS®** 或 **OSTAC®**)、**DIDROCAL®** 依替膦酸盐 (etidronate)、NE-58095、**ZOMETA®** 唑来膦酸 (zoledronic acid) / 唑来膦酸盐 (zoledronate)、**FOSAMAX®** 阿仑膦酸盐 (alendronate)、**ARELIA®** 帕米膦酸盐 (pamidronate)、**SKELID®** 替鲁膦酸盐 (tiludronate) 或 **ACTONEL®** 利塞膦酸盐 (risedronate); 以及曲沙他滨 (troxacitabine) (1,3-二氧戊环核苷胞嘧啶类似物); 反义寡核苷酸, 特别是抑制在涉及异常细胞增殖的信号传导途径中基因的表达的那些, 诸如例如, PKC- α 、Raf、H-Ras 和表皮生长因子受体 (EGF-R); 疫苗诸如 **THERATOPE®** 疫苗和基因治疗疫苗、例如, **ALLOVECTIN®** 疫苗、**LEUVECTIN®** 疫苗和 **VAXID®** 支苗; **LURTOTECAN®** 拓扑异构酶 1 抑制剂; **ABARELIX®** rmRH; 托西拉帕替尼 (lapatinib ditosylate) (ErbB-2 和 EGFR 双重酪氨酸激酶小分子抑制剂, 也已知为 GW572016); 和以上任何一种的药用盐、酸或衍生物。

[0132] 可以被选作用于癌症治疗或预防的神经药物的另一组化合物是抗癌免疫球蛋白 (包括但不限于, 曲妥珠单抗 (trastuzumab), 贝伐珠单抗 (bevacizumab), 阿仑单抗 (alemtuxumab), 西妥昔单抗 (cetuximab), 吉妥珠单抗 (gemtuzumab ozogamicin), 替尼莫

单抗(ibrutumomab tiuxetan),帕尼单抗(panitumumab)和利妥昔单抗(rituximab)。在一些情况中,与有毒的标记结合的抗体可以用于靶向并杀死目的细胞(即,癌症细胞),所述抗体包括但不限于,具有¹³¹I放射性标记的托西莫单抗(tositumomab)。

[0133] 对于眼疾病或病症,可以选择是以下各项的神经药物:抗新生血管眼科试剂(即,贝伐珠单抗(bevacizumab),兰尼单抗(ranibizumab)和培加尼布(pegaptanib)),眼科青光眼药(即,卡巴胆碱(carbachol),肾上腺素(epinephrine),地美溴铵(demecarium bromide),阿可乐定(apraclonidine),溴莫尼定(brimonidine),布林唑胺(brinzolamide),左布诺洛尔(levobunolol),噻吗洛尔(timolol),倍他洛尔(betaxolol),多佐胺(dorzolamide),比马前列素(bimatoprost),卡替洛尔(cartelolol),美替洛尔(metipranolol),地匹福林(dipivefrin),曲伏前列素(travoprost)和拉坦前列素(latanoprost)),碳酸酐酶抑制剂(即,醋甲唑胺(methazolamide)和乙酰唑胺(acetazolamide)),眼科抗组胺剂(即,萘甲唑啉(naphazoline),去氧肾上腺素(phenylephrine)和四氢唑啉(tetrahydrozoline)),眼用润滑剂,眼科甾类化合物(即,氟米龙(flurmetholone),泼尼松龙(prednisolone),氯替泼诺(lozeprednol),地塞米松(dexamethasone),二氟泼尼酯(difluprednate),利美索龙(rimexolone),醋酸氟轻松(flucinolone),甲羟松(medrysone)和去炎松(triamcinolone)),眼科麻醉剂(即,利多卡因(lidocaine),丙美卡因(proparacaine)和丁卡因(tetracaine)),眼科抗感染剂(即,左氧氟沙星(levofloxacin),加替沙星(gatifloxacin),环丙沙星(ciprofloxacin),莫西沙星(moxifloxacin),氯霉素(chloramphenicol),杆菌肽/多粘菌素b(bacitracin/polymyxin b),磺胺醋酰(sulfacetamide),妥布霉素(tobramycin),阿奇霉素(azithromycin),贝西沙星(besifloxacin),诺氟沙星(norfloxacin),磺胺异噁唑(sulfisoxazole),庆大霉素(gentamicin),碘苷(idoxuridine),红霉素(erythromycin),那他霉素(natamycin),短杆菌肽(gramicidin),新霉素(neomycin),氧氟沙星(ofloxacin),曲氟尿苷(trifluridine),更昔洛韦(ganciclovir),阿糖腺苷(vidarabine)),眼科抗炎剂(即,奈帕芬胺(nepafenac),酮咯酸(ketorolac),氟比洛芬(flurbiprofen),舒洛芬(suprofen),环孢菌素(cyclosporine),去炎松(triamcinolone),双氯芬酸(diclofenac)和溴芬酸(bromfenac)),和眼科抗组胺剂或解充血药(即,酮替芬(ketotifen),奥洛他定(olopatadine),依匹斯汀(epinastine),萘甲唑啉(naphazoline),色甘酸钠(cromolyn),四氢唑啉(tetrahydrozoline),吡嘧司特(pemirolast),贝他斯汀(bepotastine),萘甲唑啉(naphazoline),去氧肾上腺素(phenylephrine),奈多罗米(nedocromil),洛度沙胺(lodoxamide),去氧肾上腺素(phenylephrine),依美斯汀(emedastine)和氮卓斯汀(azelastine))。

[0134] 对于发作疾病,可以选择是抗惊厥药或抗癫痫药的神经药物,其包括但不限于,巴比妥酸盐(barbiturate)抗惊厥药(即,扑米酮(primidone),美沙比妥(metharbital),甲苯比妥(mephobarbital),阿洛巴比妥(allobarbitol),异戊巴比妥(amobarbital),阿普比妥(aprobarbital),苯烯比妥(alphenal),巴比妥(barbital),溴烯比妥(brallobarbitol)和苯巴比妥(phenobarbital)),苯并二氮草类(benzodiazepine)抗惊厥药(即,地西洋(diazepam),氯硝西洋(clonazepam)和劳拉西洋(lorazepam)),氨基甲酸酯(carbamate)抗惊厥药(即非尔氨酯(felbamate)),碳酸酐酶(carbonic anhydrase)抑制剂抗惊厥药(即,

乙酰唑胺 (acetazolamide), 托吡酯 (topiramate) 和唑尼沙胺 (zonisamide)), 二苯并氮草 (dibenzazepine) 抗惊厥药 (即, 卢非酰胺 (rufinamide), 卡马西平 (carbamazepine) 和奥卡西平 (oxcarbazepine)), 脂肪酸衍生物抗惊厥药 (即, 双丙戊酸钠 (divalproex) 和丙戊酸 (valproic acid)), γ -氨基丁酸类似物 (即, 普瑞巴林 (pregabalin), 加巴喷丁 (gabapentin) 和氨己烯酸 (vigabatrin)), γ -氨基丁酸再摄取抑制剂 (即, 噻加宾 (tiagabine)), γ -氨基丁酸转氨酶抑制剂 (即, 氨己烯酸 (vigabatrin), 乙内酰脲抗惊厥药 (即苯妥英 (phenytoin), 乙苯妥英 (ethotoin), 磷苯妥英 (fosphenytoin) 和美芬妥英 (mephenytoin)), 杂类抗惊厥药 (即, 拉科酰胺 (lacosamide) 和硫酸镁), 孕酮类 (即, 黄体酮 (progesterone)), 噁唑烷二酮 (oxazolidinedione) 抗惊厥药 (即, 甲乙双酮 (paramethadione) 和三甲双酮 (trimethadione)), 吡咯烷抗惊厥药 (即, 左乙拉西坦 (levetiracetam)), 琥珀酰亚胺抗惊厥药 (即, 乙琥胺 (ethosuximide) 和甲琥胺 (methsuximide)), 三嗪抗惊厥药 (即, 拉莫三嗪 (lamotrigine)), 和尿素抗惊厥药 (即, 苯乙酰胺 (phenacemide) 和苯丁酰胺 (pheneturide))。

[0135] 对于溶酶体贮存病, 可以选择这样的神经药物, 其自身或以其他方式模拟在疾病中受损的酶的活性。用于治疗溶酶体贮存病的示例性重组酶包括但不限于在例如美国专利申请公开号 2005/0142141 中描述的那些 (即, α -L-艾杜糖醛酸酶 (iduronidase), 艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶, N-硫酸酯酶, α -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶, N-乙酰-半乳糖胺-6-硫酸酯酶, β -半乳糖苷酶, 芳基硫酸酯酶 B, β -葡糖醛酸糖苷酶, 酸性 α -葡糖苷酶, 葡糖脑苷脂酶, α -半乳糖苷酶 A, 己糖胺酶 A, 酸性神经磷脂酶, β -半乳糖脑苷脂酶, β -半乳糖苷酶, 芳基硫酸酯酶 A, 酸性酰胺酶, 天冬氨酸酰胺酶 (aspartoacylase), 棕榈酰-蛋白硫酯酶 1 和三肽酰氨肽酶 1)。

[0136] 对于淀粉样变性, 可以选择这样的神经药物, 其包括但不限于, 特异性地结合选自 β 分泌酶, tau, 早老蛋白, 淀粉状蛋白前体蛋白或其部分, 淀粉状蛋白 β 肽或其低聚物或纤维 (fibril), 死亡受体 6 (DR6), 高度糖基化终产物受体 (RAGE), 帕金森蛋白和亨廷顿蛋白的靶标的抗体或其他结合分子 (包括但不限于小分子, 肽, 适体, 或其他蛋白质结合物); 胆碱酯酶抑制剂 (即, 加兰他敏 (galantamine), 多奈哌齐 (donepezil), 里斯的明 (rivastigmine) 和他克林 (tacrine)); NMDA 受体拮抗剂 (即, 美金刚 (memantine)), 单胺耗竭剂 (monoamine depletor) (即, 丁苯那嗪 (tetrabenazine)); 氢麦角碱 (ergoloid mesylate); 抗胆碱能抗帕金森病药 (即, 丙环定 (procyclidine), 苯海拉明 (diphenhydramine), trihexylphenidyl, 苯扎托品 (benztropine), 比哌立登 (biperiden) 和苯海索 (trihexyphenidyl)); 多巴胺能抗帕金森病药 (即, 恩他卡朋 (entacapone), 司来吉兰 (selegiline), 普拉克索 (pramipexole), 溴隐亭 (bromocriptine), 罗替高汀 (rotigotine), 司来吉兰 (selegiline), 罗匹尼罗 (ropinirole), 雷沙吉兰 (rasagiline), 阿扑吗啡 (apomorphine), 卡比多巴 (carbidopa), 左旋多巴 (levodopa), 培高利特 (pergolide), 托卡朋 (tolcapone) 和金刚烷胺 (amantadine)); 丁苯那嗪 (tetrabenazine); 抗炎药 (包括但不限于, 非甾类抗炎药 (即, 吲哚美辛 (indomethacin) 和以上列出的其他化合物); 激素 (即, 雌激素, 孕酮和亮丙立德 (leuprolide)); 维生素 (即, 叶酸和烟酰胺); dimebolin; 高牛磺酸 (homotaurine) (即, 3-氨基丙磺酸; 3APS); 5-羟色胺受体活性调节剂 (即, 扎利罗登 (xaliproden)); 干扰素和糖皮质激素。

[0137] 对于病毒或微生物疾病, 可以选择这样的神经药物, 其包括但不限于, 抗病毒化合

物(包括但不限于,金刚烷抗病毒药(即,金刚乙胺(rimantadine)和金刚烷胺),抗病毒干扰素(即,聚乙二醇干扰素 α -2b(peginterferon α -2b)),趋化因子(chemokine)受体拮抗剂(即,马拉韦罗(maraviroc)),整合酶链转移抑制剂(即,raltegravir),神经氨酸酶(neuraminidase)抑制剂(即,奥塞米韦(oseltamivir)和扎那米韦(zanamivir)),非核苷逆转录酶抑制剂(即,依法韦仑(efavirenz),依曲韦林(etravirine),地拉韦啉(delavirdine)和奈韦拉平(nevirapine)),核苷逆转录酶抑制剂(去羟肌苷加(tenofovir),阿巴卡韦(abacavir),拉米夫定(lamivudine),齐多夫定(zidovudine),司他夫定(stavudine),恩替卡韦(entecavir),恩曲他滨(emtricitabine),阿德福韦(adefovir),扎昔他宾(zalcitabine),替比夫定(telbivudine)和去羟肌苷(didanosine)),蛋白酶抑制剂(即,达芦那韦(darunavir),阿扎那韦(atazanavir),呋山那韦(fosamprenavir),替拉那韦(tipranavir),利托纳韦(ritonavir),奈芬纳韦(nelfinavir),氨普那韦(amprenavir),茛地那韦(indinavir)和沙奎那韦(saquinavir)),嘌呤核苷(即,伐昔洛韦(valacyclovir),泛昔洛韦(famciclovir),阿昔洛韦(acyclovir),利巴韦林(ribavirin),更昔洛韦(ganciclovir),缬更昔洛韦(valganciclovir)和西多福韦(cidofovir)),和杂类抗病毒药(即,恩夫韦肽(enfuvirtide),膦甲酸(foscarnet),帕利珠单抗(palivizumab)和福米韦生(fomivirsen)),抗生素(包括但不限于,氨基青霉素(即,羟氨苄青霉素(amoxicillin),氨苄青霉素(ampicillin),苯唑西林(oxacillin),萘夫西林(nafcillin),氯唑西林(cloxacillin),双氯西林(dicloxacillin),flucoxacillin,替莫西林(temocillin),阿洛西林(azlocillin),羟苄青霉素(carbenicillin),替卡西林(ticarcillin),美洛西林(mezlocillin),哌拉西林(piperacillin)和巴氨西林(bacampicillin)),头孢菌素(cephalosporin)(即,头孢唑林(cefazolin),头孢氨苄(cephalexin),头孢噻吩(cephalothin),头孢孟多(cefamandole),头孢曲松(ceftriaxone),头孢噻肟(cefotaxime),头孢达肟(cefpodoxime),头孢他啶(ceftazidime),头孢羟氨苄(cefadroxil),头孢拉定(cephradine),氯碳头孢(loracarbef),头孢替坦(cefotetan),头孢唑肟(cefuroxime),头孢丙烯(cefprozil),头孢克洛(cefaclor)和头孢西丁(cefoxitin)),碳青霉烯/培南(carbapenem/penem)(即,亚胺培南(imipenem),美罗培南(meropenem),厄他培南(ertapenem),法罗培南(faropenem)和多利培南(doripenem)),单酰胺菌素(monobactam)(即,胺曲南(aztreonam),替吉莫南(tigemonam),nocardicin A和烟毒素- β -内酰胺(tabtoxinine- β -lactam)),与另一种 β -内酰胺抗生素联合的 β -内酰胺酶抑制剂(即,克拉维酸(clavulanic acid),三唑巴坦(tazobactam)和舒巴克坦(sulbactam)),氨基葡萄糖苷(即,阿米卡星(amikacin),庆大霉素(gentamicin),卡那霉素(kanamycin),新霉素(neomycin),奈替米星(netilmicin),链霉素,托普霉素(tobramycin)和巴龙霉素(paromomycin)),安沙霉素(ansamycin)(即,格尔德霉素(geldanamycin)和除莠霉素(herbimycin)),碳头孢烯(carbacephem)(即,氯碳头孢(loracarbef)),糖肽(即,替考拉宁(teicoplanin)和万古霉素(vancomycin)),大环内酯(即,阿奇霉素(azithromycin),克拉霉素(clarithromycin),地红霉素(dirithromycin),红霉素(erythromycin),罗红霉素(roxithromycin),醋竹桃霉素(troleandomycin),泰利霉素(telithromycin)和壮观霉素(spectinomycin)),单酰胺菌素(即,胺曲南(aztreonam)),喹诺酮(quinolone)(即,环丙沙星(ciprofloxacin),依诺沙星(enoxacin),

加替沙星 (gatifloxacin), 左氧氟沙星 (levofloxacin), 利莫沙星 (lomefloxacin), 莫西沙星 (moxifloxacin), 诺氟沙星 (norfloxacin), 氧氟沙星 (ofloxacin), 曲伐沙星 (trovafloxacin), 格帕沙星 (grepafloxacin), 司帕沙星 (sparfloxacin) 和替马沙星 (temafloxacin), 磺酰胺 (即, 磺胺米隆 (mafenide), sulfonamidochrysoidine, 乙酰磺胺 (sulfacetamide), 磺胺嘧啶 (sulfadiazine), 磺胺甲二唑 (sulfamethizole), 磺胺 (sulfanilamide), 柳氮磺吡啶 (sulfasalazine), 磺胺异噁唑 (sulfisoxazole), 甲氧苄啶 (trimethoprim), 甲氧苄啶 (trimethoprim) 和磺胺甲噁唑 (sulfamethoxazole)), 四环素 (tetracycline) (即, 四环素 (tetracycline), 地美环素 (demeclocycline), 多西环素 (doxycycline), 米诺环素 (minocycline) 和土霉素 (oxytetracycline)), 抗肿瘤药或细胞毒性抗生素 (即, 多柔比星 (doxorubicin), 米托蒽醌 (mitoxantrone), 博来霉素 (bleomycin), 柔红霉素 (daunorubicin), 更生霉素 (dactinomycin), 表柔比星 (epirubicin), 伊达比星 (idarubicin), 普利霉素 (plicamycin), 丝裂霉素 (mitomycin), 喷司他丁 (pentostatin) 和戊柔比星 (valrubicin)) 和杂类抗菌化合物 (即, 杆菌肽 (bacitracin), 粘菌素 (colistin) 和多粘菌素B (polymyxinB)), 抗真菌剂 (即, 甲硝唑 (metronidazole), 硝唑尼特 (nitazoxanide), 替硝唑 (tinidazole), 氯喹 (chloroquine), 双碘喹啉 (iodoquinol) 和巴龙霉素 (paromomycin)), 和抗寄生虫药 (包括但不限于, 奎宁 (quinine), 氯喹 (chloroquine), 阿莫地喹 (amodiaquine), 乙胺嘧啶 (pyrimethamine), 磺胺多辛 (sulphadoxine), 百乐君 (proguanil), 甲氟喹 (mefloquine), 阿托伐醌 (atovaquone), 伯氨喹 (primaquine), 青蒿素 (artemesinin), 卤泛群 (halofantrine), 多西环素 (doxycycline), 克林霉素 (clindamycin), 甲苯达唑 (mebendazole), 双羟萘酸噻嘧啶 (pyrantel pamoate), 噻苯哒唑 (thiabendazole), 乙胺嗪 (diethylcarbamazine), 伊维菌素 (ivermectin), 利福平 (rifampin), 两性霉素B (amphotericin B), 美拉肿醇 (melarsoprol), eforinthine 和阿苯达唑 (albendazole))。

[0138] 对于缺血, 可以选择这样的神经药物, 其包括但不限于, 溶血栓药 (即, 尿激酶, 阿替普酶 (alteplase), 瑞替普酶 (reteplase) 和替奈普酶 (tenecteplase)), 血小板凝集抑制剂 (即, 阿司匹林 (aspirin), 西洛他唑 (cilostazol), 氯吡格雷 (clopidogrel), 普拉格雷 (prasugrel) 和双嘧达莫 (dipyridamole)), 他汀 (statin) (即, 洛伐他汀 (lovastatin), 普伐他汀 (pravastatin), 氟伐他汀 (fluvastatin), 罗舒伐他汀 (rosuvastatin), 阿托伐他汀 (atorvastatin), 辛伐他汀 (simvastatin), 西立伐他汀 (cerivastatin) 和匹伐他汀 (pitavastatin)), 和提高血液流动或血管弹性的化合物, 包括例如血压药物。

[0139] 对于行为障碍, 神经药物可以选自行为修正化合物, 其包括但不限于, 非典型抗精神病药 (即, 利哌立酮 (risperidone), 奥氮平 (olanzapine), aripiprazole, 喹硫平 (quetiapine), 帕潘立酮 (paliperidone), 阿塞那平 (asenapine), 氯氮平 (clozapine), 伊潘立酮 (iloperidone) 和齐拉西酮 (ziprasidone)), 吩噻嗪抗精神病药 (即, 丙氯拉嗪 (prochlorperazine), 氯丙嗪 (chlorpromazine), 氟奋乃静 (fluphenazine), 奋乃静 (perphenazine), 三氟拉嗪 (trifluoperazine), 硫利达嗪 (thioridazine) 和美索达嗪 (mesoridazine)), 噻吨 (即, 氨砒噻吨 (thiothixene)), 杂类抗精神病药 (即, 匹莫齐特 (pimozide), 锂 (lithium), 吗茛酮 (molindone), 氟哌啶醇 (haloperidol) 和洛沙平 (loxapine)), 选择性5-羟色胺再摄取抑制剂 (即, 西酞普兰 (citalopram), 依他普仑

(escitalopram), 帕罗西汀 (paroxetine), 氟西汀 (fluoxetine) 和舍曲林 (sertraline)), 5-羟色胺-去甲肾上腺素 (norepinephrine) 再摄取抑制剂 (即, 度洛西汀 (duloxetine), 文拉法辛 (venlafaxine), 地文拉法辛 (desvenlafaxine)), 三环抗抑郁药 (即, 多塞平 (doxepin)), 氯米帕明 (clomipramine), 阿莫沙平 (amoxapine), 去甲替林 (nortriptyline), 阿米替林 (amitriptyline), 曲米帕明 (trimipramine), 丙咪嗪 (imipramine), 普罗替林 (protriptyline) 和地昔帕明 (desipramine)), 四环抗抑郁药 (即, 米氮平 (mirtazapine) 和麦普替林 (maprotiline)), 苯基哌嗪抗抑郁药 (即, 曲唑酮 (trazodone) 和奈法唑酮 (nefazodone)), 单胺氧化酶抑制剂 (即, 异卡波肼 (isocarboxazid), 苯乙肼 (phenelzine), 司来吉兰 (selegiline) 和反苯环丙铵 (tranylcypromine)), 苯并二氮草 (即, 阿普唑仑 (alprazolam), 艾司唑仑 (estazolam), 氟西洋 (flurazepam), 氯硝西洋 (clonazepam), 劳拉西洋 (lorazepam) 和地西洋 (diazepam)), 去甲肾上腺素-多巴胺再摄取抑制剂 (即, 安非他酮 (bupropion)), CNS 兴奋剂 (即, 芬特明 (phentermine), 安非拉酮 (diethylpropion), 甲基苯丙胺 (methamphetamine), 右旋安非他命 (dextroamphetamine), 安非他命 (amphetamine), 哌醋甲酯 (methylphenidate), 右哌甲酯 (dexmethylphenidate), 利右苯丙胺 (lisdexamfetamine), 莫达非尼 (modafinil), 匹莫林 (pemoline), 苯甲曲秦 (phendimetrazine), 苄非他明 (benzphetamine), 苯甲曲秦 (phendimetrazine), 阿莫非尼 (armodafinil), 安非拉酮 (diethylpropion), 咖啡因 (caffeine), 阿托西汀 (atomoxetine), 多沙普仑 (doxapram) 和 马吲哚 (mazindol)), 抗焦虑药/镇静药/催眠药 (包括但不限于, 巴比妥酸盐 (barbiturate) (即, 司可巴比妥 (secobarbital), 苯巴比妥 (phenobarbital) 和 甲苯比妥 (mephobarbital)), 苯并二氮草 (如上所述), 和 杂类抗焦虑药/镇静药/催眠药 (即 苯海拉明 (diphenhydramine), 羟丁酸钠 (sodium oxybate), 扎来普隆 (zaleplon), 羟嗪 (hydroxyzine), 水合氯醛 (chloral hydrate), aolpidem, 丁螺环酮 (buspirone), 多塞平 (doxepin), 左旋佐匹克隆 (eszopiclone), 雷美尔通 (ramelteon), 甲丙氨酯 (meprobamate) 和 乙氯维诺 (ethchlorvynol))), 分泌素 (参见, 例如, Ratliff-Schaub 等, *Autism* 9:256-265 (2005)), 阿片样肽 (参见, 例如, Cowen 等, *J. Neurochem.* 89:273-285 (2004)), 和 神经肽 (参见, 例如, Hethwa 等, *Am. J. Physiol.* 289:E301-305 (2005))。

[0140] 对于 CNS 炎症, 可以选择治疗炎症自身的神经药物 (即, 非甾体抗炎剂如布洛芬或萘普生), 或治疗炎症的潜在原因的神经药物 (即, 抗病毒或抗癌剂)。

[0141] 根据本发明的一个实施方案, “偶联” 通过生成多特异性抗体 (例如双特异性抗体) 实现。多特异性抗体是对至少两个不同位点具有结合特异性的单克隆抗体。在一个实施方案中, 多特异性抗体包含结合 BBB-R 的第一抗原结合位点和结合脑抗原的第二抗原结合位点, 所述脑抗原如 β -分泌酶 1 (BACE1) 或 $A\beta$, 和本文所公开的其他脑抗原。

[0142] 为此种多特异性/双特异性抗体所结合的示例性脑抗原是 BACE1, 并且与其结合的示例性抗体是本文中图 5a-b 中的 YW412.8.31 抗体。

[0143] 在另一个实施方案中, 脑抗原是 $A\beta$, 示例性的此种抗体被公开于 W02007068412、W02008011348、W020080156622 和 W02008156621 中 (所述文献通过引用清楚地结合于本文中), 其中示例性 $A\beta$ 抗体包括包含分别在图 7a 和 7b 中的重链和轻链氨基酸序列的

IgG4MABT5102A抗体。

[0144] 用于制备多特异性抗体的技术包括但不限于,重组共表达具有不同特异性的两个免疫球蛋白重链-轻链对(参见Milstein和Cuello,Nature 305:537(1983)),WO 93/08829和Traunecker等,EMBO J.10:3655(1991)),及“凸起-入-孔洞(knob-in-hole)”改造(参见例如美国专利第5,731,168号)。也可通过以下方法制得多特异性抗体:改造用于制备抗体Fc-异二聚分子的静电导引效应(WO 2009/089004A1);将两种或两种以上抗体或片段交联(参见例如美国专利第4,676,980号,及Brennan等人Science(科学),229:81(1985));使用亮氨酸拉链来产生双特异性抗体(参见例如Kostelny等人,J.Immunol.(免疫学杂志),148(5):1547-1553(1992));使用“双抗体”技术来制得双特异性抗体片段(参见例如Hollinger等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:6444-6448(1993));及使用单链Fv(sFv)二聚体(参见例如Gruber等人,J.Immunol.(免疫学杂志),152:5368(1994))及如例如Tutt等人,J.Immunol.(免疫学杂志)147:60(1991)中所述制备三特异性抗体。

[0145] 本文中包括具有三个或三个以上功能性抗原结合位点的经改造的抗体,包括“章鱼抗体(Octopus antibodies)”或“双-可变结构域免疫球蛋白”(DVD)(参见,例如US 2006/0025576A1,和Wu等,Nature Biotechnology(2007))。

[0146] 本文中的抗体或片段也包括包含结合至BBB-R(例如TfR)以及脑抗原(例如BACE1)的抗原结合位点的“双重作用FAB”或“DAF”(例如参见US 2008/0069820)。

[0147] 在一个实施方案中,抗体是抗体片段,以上公开了多种这样的片段。

[0148] 在另一个实施方案中,抗体是完整的或全长抗体。取决于其重链恒定结构域的氨基酸序列,可以将完整抗体分配到不同的“类别”。有五个主要类别的完整抗体:IgA,IgD,IgE,IgG和IgM,并且这些中的数个可以进一步被划分为亚类(同种型),例如,IgG1,IgG2,IgG3,IgG4,IgA和IgA2。对应于不同类别的抗体的重链恒定结构域分别被称为 α , δ , ϵ , γ 和 μ 。不同类别的免疫球蛋白的亚基结构和三维构型是公知的。在一个实施方案中,完整抗体缺少效应子功能。

[0149] 用于生产抗体的技术是已知的,并且实例被提供在以上在本文件的定义部分中。在一个实施方案中,抗体是嵌合抗体、人源化抗体或人抗体或其抗原-结合片段。

[0150] 多种技术可用于确定抗体与BBB-R的结合。一种这样的测定是酶联免疫吸附测定(ELISA),其用于确认与人BBB-R(及脑抗原)结合的能力。根据该测定,将包被有抗原(例如重组sBBB-R)的平板与包含抗BBB-R抗体的样品一起温育,并且测定抗体与目的抗原的结合。

[0151] 在一个方面中,例如,通过已知方法如ELISA、蛋白印迹法等,测试本发明抗体的抗原结合活性。

[0152] 可以如实施例所公开的或如对于目的抗脑抗原抗体来说已知的进行用于评估全身施用的抗体的摄取以及抗体的其他生物学活性的测定。

[0153] 现在将描述其中多特异性抗体结合BACE1的示例性测定。

[0154] 竞争测定可以用于鉴别与本文所述的任何抗体或Fab(例如,YW412.8,YW412.8.31,YW412.8.30,YW412.8.2,YW412.8.29,YW412.8.51,Fab12,LC6,LC9,LC10)竞争结合BACE1的抗体。在某些实施方案中,这样的竞争性抗体与本文所述的任何抗体或Fab(例如,YW412.8,YW412.8.31,YW412.8.30,YW412.8.2,YW412.8.29,YW412.8.51,Fab12,LC6,

LC9,LC10) 结合相同的表位(例如,线性或构象表位)。用于将抗体结合的表位作图的详细的示例性方法被提供于Morris(1996)“Epitope Mapping Protocols(表位作图实验方案)”, Methods in Molecular Biology卷66(Humana Press,Totowa,NJ)中。

[0155] 在示例性竞争测定中,将固定化的BACE1在含有与BACE1结合的第一标记的抗体(例如,YW412.8,YW412.8.31,YW412.8.30,YW412.8.2,YW412.8.29,YW412.8.51,Fab12,LC6,LC9,LC10)和第二未标记的抗体(测试其与第一抗体竞争结合BACE1的能力)的溶液中温育。第二抗体可以存在于杂交瘤上清液中。作为对照,将固定化的BACE1在含有第一标记的抗体而不含有第二未标记的抗体的溶液中温育。在允许第一抗体与BACE1结合的条件下温育后,除去过量的未结合的抗体,并且测量与固定化的BACE1结合的标记的量。如果相对于对照样品在测试样品中与固定化的BACE1结合的标记的量显著减少,则这说明第二抗体与第一抗体竞争结合BACE1。参见Harlow和Lane(1988)Antibodies:A Laboratory Manual(抗体:实验室手册)ch.14(Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,NY)。

[0156] 在一个方面中,提供测定以鉴别其具有生物学活性的抗BACE1抗体。生物学活性可以包括,例如,抑制BACE1天冬氨酰蛋白酶活性。还提供在体内和/或体外具有这样的生物学活性的抗体,例如,如通过均相时间分辨荧光HTRF测定或微流体毛细管电泳(MCE)测定,使用合成的底物肽,或在体内在表达BACE1底物如APP的细胞系中评估的。

[0157] 本文中的抗体(包括多特异性抗体)任选地在转化有编码其重链和轻链的核酸序列的宿主细胞中重组制备(例如其中宿主细胞已经被其中具有所述核酸的一种或多种载体转化)。宿主细胞任选是哺乳动物细胞,例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。

[0158] III. 药物制剂

[0159] 通过将具有所需纯度的抗体与任选的药用载体、赋形剂或稳定剂(Remington's Pharmaceutical Sciences,第16版,Osol,A.编(1980))混合来制备根据本发明使用的抗体的治疗制剂,以用于以冻干制剂或水溶液形式储存。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所用剂量及浓度下对接受者无毒,且包括:缓冲液,例如磷酸盐、柠檬酸盐及其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸及甲硫氨酸;防腐剂(例如氯化十八烷基二甲基苄铵、氯化六羟季铵、苯扎氯铵、苜索氯铵;苯酚、丁醇或苜醇;对羟基苯甲酸烷基酯,例如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;及间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,例如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,例如聚乙烯吡咯酮;氨基酸,例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他糖类,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,例如EDTA;糖类,例如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;成盐平衡离子,例如钠离子;金属复合体(例如Zn-蛋白质复合体);和/或非离子表面活性剂,例如TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇(PEG)。

[0160] 本文中的制剂在必要时也可以包含超过一种活性化合物,任选地包含具有不会不利地影响彼此的互补活性的那些。此种药物的类型和有效量取决于例如存在于制剂中的抗体的量以及受试者的临床参数。以下讨论示例性的此种药物。

[0161] 也可将活性成分截留于例如通过凝聚技术或通过界面聚合所制备的微囊中,例如,分别是在羟甲基纤维素或明胶微囊及聚-(甲基丙烯酸甲酯)微囊中,胶体释药系统(例如脂质体、白蛋白微球体、微乳液、纳米粒子及纳米囊)中或粗滴乳状液中。这些技术披露于Remington's Pharmaceutical Sciences,第16版,Osol,A.编(1980)中。

[0162] 可制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适实例包括含有抗体的固体疏水性聚合物的半渗透基质,该基质呈成形物品形式,例如薄膜或微囊形式。持续释放基质的实例包括聚酯、水凝胶(例如聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙醇醇))、聚交酯(美国专利第3,773,919号)、L-谷氨酸与 γ 乙基-L-谷氨酸酯的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯酯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物,例如LUPRON DEPOT™(由乳酸-乙醇酸共聚物与乙酸亮丙瑞林(leuprolide acetate)组成的可注射微球体)、和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。

[0163] 欲用于体内施用的制剂必须是无菌的。这可以通过借助无菌过滤膜过滤而轻易地实现。

[0164] 在一个实施方案中,制剂是等张的。

[0165] IV. 抗BBB-R抗体的治疗用途

[0166] 抗BBB-R抗体(包括包含它们的多特异性抗体)可以被用于多种体内方法。例如,本发明提供将治疗性化合物转运穿过血脑屏障的方法,所述方法包括将与治疗性化合物偶联的抗BBB-R抗体(例如与BBB-R和脑抗原两者结合的多特异性抗体)暴露于BBB,以使该抗体将与其偶联的治疗性化合物转运穿过BBB。在另一个实施例中,本发明提供将神经疾病药物转运穿过血脑屏障的方法,所述方法包括将与脑疾病药物偶联的抗BBB-R抗体(例如与BBB-R和脑抗原两者结合的多特异性抗体)暴露于BBB,以使该抗体将与其偶联的神经疾病药物转运穿过BBB。在一个实施方案中,本文中的BBB是在哺乳动物(例如人)(例如患有神经疾病的人)中,所述神经疾病包括但不限于:阿尔茨海默病(AD),卒中,痴呆,肌营养不良(MD),多发性硬化(MS),肌萎缩性侧索硬化(ALS),囊性纤维化,安吉尔曼综合征,利德尔综合征,帕金森病,皮克病,佩吉特病,癌症,外伤性脑损伤等。

[0167] 在一个实施方案中,神经疾病选自:神经病,淀粉样变性,癌症(例如涉及CNS或脑的癌症),眼睛疾病或病症,病毒或微生物感染,炎症(例如CNS或脑的炎症),缺血,神经变性疾病,发作,行为障碍,溶酶体贮积症等。

[0168] 神经病病症是神经系统的疾病或异常,其特征在于不适当的或不受控的神经信号传导或缺少神经信号传导,并且包括但不限于,慢性疼痛(包括感受伤害的疼痛),由对身体组织的损伤引起的疼痛,包括癌相关的疼痛,神经性疼痛(由神经、脊髓或脑中的异常引起的疼痛),和精神性疼痛(完全或大部分与心理障碍相关),头痛,偏头痛,神经病,以及常常伴随这样的神经病病症的症状和综合征如眩晕或恶心。

[0169] 淀粉样变性是一组疾病和病症,其与在CNS中的胞外蛋白质沉积物相关,其包括但不限于,继发性淀粉样变性,年龄相关性淀粉样变性,阿尔茨海默病(AD),轻度认知障碍(mild cognitive impairment,MCI),雷维小体痴呆,唐氏综合征,遗传性脑出血伴淀粉样变性(Dutch型);Guam Parkinson-痴呆综合症状,脑淀粉样血管病,亨廷顿病,进行性核上性麻痹,多发性硬化;克-雅病,帕金森病,传递性海绵状脑病,HIV相关痴呆,肌萎缩性脊髓侧索硬化症(ALS),包涵体肌炎(inclusion-body myositis,IBM),和涉及 β -淀粉样蛋白沉积的眼病(即,黄斑变性,玻璃疣相关视神经病变和白内障)。

[0170] CNS的癌症表征为一个或多个CNS细胞(即,神经细胞)的异常增殖,并且包括但不限于,胶质瘤(glioma),多形性胶质母细胞瘤(glioblastoma multiforme),脑膜瘤(meningioma),星细胞瘤(astrocytoma),听神经瘤(acoustic neuroma),软骨瘤(chondroma),少突神经胶质瘤(oligodendroglioma),成神经管细胞瘤

(medulloblastomas), 神经节神经胶质瘤(ganglioglioma), 神经鞘瘤(Schwannoma), 神经纤维瘤(neurofibroma), 成神经细胞瘤(neuroblastoma), 和硬膜外、髓内或硬膜内肿瘤。

[0171] 眼疾病或病症是眼睛的疾病或病症,为本文的目的,眼睛被视为属于BBB的CNS器官。眼病或病症包括但不限于,巩膜、角膜、虹膜和睫状体的病症(即,巩膜炎(scleritis)、角膜炎(keratitis)、角膜溃疡(corneal ulcer),角膜擦伤(corneal abrasion),雪盲(snow blindness),电光性眼炎(arc eye),Thygeson浅层点状角膜病变(Thygeson's superficial punctate keratopathy),角膜新生血管化(corneal neovascularisation),富克斯营养不良(Fuchs' dystrophy),圆锥形角膜(keratoconus),干燥性角膜结膜炎(keratoconjunctivitis sicca),虹膜炎(iritis)和葡萄膜炎(uveitis)),晶状体的病症(即,白内障(cataract)),脉络膜和视网膜的病症(即,视网膜脱离(retinal detachment),视网膜劈裂症(retinoschisis),高血压性视网膜病变(hypertensive retinopathy),糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy),视网膜病(retinopathy),早产儿视网膜病,老年性黄斑变性(age-related macular degeneration),黄斑变性(macular degeneration)(湿性或干性),视网膜外膜(epiretinal membrane),色素性视网膜炎(retinitis pigmentosa)和黄斑水肿(macular edema)),青光眼(glaucoma),悬浮物(floaters),视神经和视觉通路的病症(即,莱伯遗传性视神经病(Leber's hereditary optic neuropathy)和视觉盘玻璃疣(optic disc drusen)),眼肌/双眼移动调节/折射的病症(即,斜视,眼肌瘫痪(ophthalmoparesis),进行性外部眼肌麻痹(ophthalmoplegia),内斜视,外斜视,远视,近视,散光,屈光不正,老花眼和眼肌麻痹),视觉障碍和失明(即,弱视,莱伯先天性黑矇(Lever's congenital amaurosis),暗点,色盲(color blindness),全色盲(achromatopsia),夜盲症(nyctalopia),失明(blindness),河盲(river blindness)和微眼炎/缺损(micro-ophthalmia/coloboma)),红眼,阿盖耳罗伯逊瞳孔(Argyll Robertsonpupil),角膜真菌病(keratomycosis),干眼病和无虹膜(aniridia)。

[0172] CNS的病毒或微生物感染包括但不限于由以下引起的感染:病毒(即,流感,HIV,脊髓灰质炎病毒,风疹,),细菌(即,奈瑟氏球菌属(Neisseriasp.),链球菌属(Streptococcus sp.),假单胞菌属(Pseudomonas sp.),变形菌属(Proteus sp.),大肠杆菌(E.coli),金黄色葡萄球菌(S.aureus),肺炎球菌属(Pneumococcus sp.),脑膜炎球菌属(Meningococcus sp.),嗜血杆菌属(Haemophilus sp.),和结核分枝杆菌(Mycobacterium tuberculosis))和其他微生物如真菌(即,酵母,新型隐球菌(Cryptococcus neoformans)),寄生虫(即,弓形虫(toxoplasma gondii))或变形虫(amoebas),导致CNS病理生理学,包括但不限于,脑膜炎,脑炎,脊髓炎,血管炎和脓肿(abscess),其可以是急性的或慢性的。

[0173] CNS的炎症是这样的炎症,其由对CNS的损伤导致,所述损伤可以是物理损伤(即,由于事故,手术,脑创伤,脊髓损伤,脑震荡(concussion)所致的)或由于一种或多种CNS的其他疾病或病症(即,脓肿,癌症,病毒或微生物感染)导致或与之相关的损伤。

[0174] 当用于本文中时,CNS的缺血是指一组病症,其与脑部的异常血流或血管行为或其病因相关,并且包括但不限于,局灶性脑缺血(focal brain ischemia),全局脑缺血(global brain ischemia),卒中(即,蛛网膜下出血和脑内出血(intracerebral hemorrhage)),和动脉瘤。

[0175] 神经变性疾病是一组疾病和病症,其与CNS中神经细胞丧失功能或死亡相关,并且

包括但不限于,肾上腺脑白质营养不良(adrenoleukodystrophy),亚历山大病,阿尔珀斯病(Alper's disease),肌萎缩性侧索硬化,运动失调性毛细血管扩张症(ataxia telangiectasia),Batten病(Batten disease),科凯恩综合征,基层皮质变性(corticobasal degeneration),由淀粉样变性引起或与其相关的变性,弗里德赖希共济失调症(Friedreich's ataxia),额颞叶变性(temporal lobar degeneration),Kennedy病(Kennedy's disease),多系统萎缩,多发性硬化,原发性侧索硬化,进行性核上性麻痹,脊髓性肌萎缩,横贯性脊髓炎,雷夫叙姆病(Refsum's disease),和脊髓小脑性共济失调。

[0176] CNS的发作疾病和病症涉及CNS中的不适当和/或异常电导,并且包括但不限于,癫痫(即,失神发作(absence seizures),失张力发作(atonic seizures),良性运动性癫痫(benign Rolandic epilepsy),儿童期失神(childhood absence),阵挛发作(clonic seizures),复杂部分发作(complex partial seizures),额叶性癫痫(frontal lobe epilepsy),发热性癫痫发作(febrile seizures),婴儿痉挛(infantile spasms),少年肌阵挛性癫痫(juvenile myoclonic epilepsy),青少年期失神癫痫(juvenile absence epilepsy),伦-格综合征(Lennox-Gastaut syndrome),兰-克综合征(Landau-Kleffner Syndrome),Dravet综合征(Dravet's syndrome),Otahara综合征(Otahara syndrome),West综合征(West syndrome),肌肉阵挛性发作(myoclonic seizures),线粒体病(mitochondrial disorders),进行性肌阵挛性癫痫(progressive myoclonic epilepsies),精神性发作(psychogenic seizures),反射性癫痫(reflex epilepsy),Rasmussen综合征(Rasmussen's Syndrome),简单部分发作(simple partial seizures),继发性全身性癫痫发作(secondarily generalized seizures),颞叶癫痫(temporal lobe epilepsy),阵挛性发作(tonic seizures),强直发作(tonic seizures),精神运动发作(psychomotor seizures),边缘叶癫痫(limbic epilepsy),部分性癫痫发作(partial-onset seizures),全身发作性癫痫发作(generalized-onset seizures),癫痫持续状态(status epilepticus),腹型癫痫(abdominal epilepsy),失神型发作(akinetic seizures),植物神经性发作(autonomic seizures),大量双侧肌阵挛(massive bilateral myoclonus),月经性癫痫(catamenial epilepsy),跌倒发作(drop seizures),情绪性发作(emotional seizures),病灶性发作(focal seizures),发笑发作(gelastic seizures),贾克森扩布(Jacksonian March),拉福拉病(Lafora Disease),运动性发作(motor seizures),多病灶性发作(multifocal seizures),夜发作(nocturnal seizures),光敏性发作(photosensitive seizure),假性发作(pseudo seizures),感觉性发作(sensory seizures),微小发作(subtle seizures),sylvan 发作(sylvan seizures),戒断发作(withdrawal seizures),和视反射发作(visual reflex seizures))。

[0177] 行为障碍是CNS的病症,其表征为就受折磨的受试者而言的异常行为,并且包括但不限于:睡眠障碍(sleep disorders)(即,失眠(insomnia),深眠状态(parasomnias),夜惊(night terrors),昼夜节律睡眠障碍(circadianrhythm sleep disorders),和发作性睡眠病(narcolepsy)),心境障碍(mood disorders)(即,抑郁(depression),自杀性抑郁(suicidal depression),焦虑(anxiety),慢性情感障碍(chronic affective disorders),恐怖病(phobias),惊恐发作(panic attacks),强迫性障碍(obsessive-compulsive disorder),注意力缺陷伴多动障碍(attention deficit hyperactivity

disorder) (ADHD), 注意缺陷障碍 (attention deficit disorder) (ADD), 慢性疲劳综合征 (chronic fatigue syndrome), 广场恐怖症 (agoraphobia), 创伤后应激障碍 (post-traumatic stress disorder), 双相性精神障碍 (bipolar disorder), 进食障碍 (即, 厌食症 (anorexia) 或贪食症 (bulimia)), 精神病 (psychoses), 发育行为障碍 (developmental behavioral disorder) (即, 自闭症 (autism), 雷特综合征 (Rett's syndrome), Asperger 综合征 (Asperger's syndrome)), 人格障碍和精神障碍 (即, 精神分裂症 (schizophrenia), 妄想障碍 (delusional disorder), 等)。

[0178] 溶酶体贮积症 (Lysosomal storage disorder) 是代谢病症, 在一些情况中其与 CNS 相关或具有 CNS 特异性症状; 这样的病症包括但不限于泰-萨克斯病 (Tay-Sachs disease), 戈谢病 (Gaucher's disease), 法布里病 (Fabry disease), 粘多糖贮积症 (I, II, III, IV, V, VI 和 VII 型), 糖原贮积病 (glycogen storage disease), GM1 神经节苷脂贮积症 (GM1-gangliosidosis), 异染性脑白质病变 (metachromatic leukodystrophy), Farber 病 (Farber's disease), 卡纳范脑白质营养不良 (Canavan's leukodystrophy), 和神经元蜡样脂褐素沉积症 (neuronal ceroid lipofuscinoses) 1 型和 2 型, 尼曼-皮克病 (Niemann-Pick disease), Pompe 病 (Pompe disease), 和克拉伯病 (Krabbe's disease)。

[0179] 在一个方面中, 抗体被用于在症状发作前检测神经疾病和/或评估疾病或病症的严重性或持续时间。在一个方面中, 抗体允许对神经疾病进行检测和/或成像, 包括通过放射照相术、断层摄影术或磁共振成像 (MRI) 进行成像。

[0180] 在一个方面中, 提供用作药物的低亲和力抗 BBB-R 抗体。在另外的方面中, 提供用于治疗神经疾病或病症 (例如, 阿尔茨海默病) 的低亲和力抗 BBB-R 抗体。在某些实施方案中, 提供用于治疗方法中的低亲和力抗 BBB-R 抗体。在某些实施方案中, 本发明提供低亲和力抗 BBB-R 抗体, 其用于治疗患有神经疾病或病症的个体的方法中, 所述方法包括向个体施用有效量的抗 BBB-R 抗体 (任选地与神经疾病药物偶联)。在一个这样的实施方案中, 方法还包括向个体施用有效量的至少一种另外的治疗剂。在另外的实施方案中, 本发明提供抗 BBB-R 抗体, 其用于在处于神经疾病或病症 (例如, 阿尔茨海默病) 的风险中或患有所述疾病或病症的患者中减少或抑制淀粉状蛋白斑块形成。根据任何以上实施方案的“个体”任选地是人。在特定方面中, 用于本发明方法中的抗 BBB-R 抗体提高与其偶联的神经疾病药物的摄取。

[0181] 在另一个方面中, 本发明提供低亲和力抗 BBB-R 抗体在生产或制备药物中的用途。在一个实施方案中, 所述药物是用于治疗神经疾病或病症。在另一个实施方案中, 所述药物是用于治疗神经疾病或病症的方法中, 所述方法包括向患有神经疾病或病症的个体施用有效量的所述药物。在一个这样的实施方案中, 所述方法还包括向个体施用有效量的至少一种另外的治疗剂。

[0182] 在另一个方面中, 本发明提供治疗阿尔茨海默病的方法。在一个实施方案中, 所述方法包括向患有阿尔茨海默病的个体施用有效量的、结合 BACE1 和 TfR 两者的多特异性抗体。在一个这样的实施方案中, 所述方法还包括向个体施用有效量的至少一种另外的治疗剂。根据任何以上实施方案的“个体”可以是人。

[0183] 在治疗中, 本发明的抗 BBB-R 抗体可以单独使用或与其他药剂组合使用。例如, 本发明的抗 BBB-R 抗体可以与至少一种另外的治疗剂共同施用。在某些实施方案中, 另外的治

疗剂是这样的治疗剂,其可以有效地治疗与采用抗BBB-R抗体所治疗的神经疾病相同或不同的神经疾病。示例性的另外的治疗剂包括但不限于:以上所述的多种神经药物,胆碱酯酶抑制剂(如多奈哌齐,加兰他敏,利斯的明和他克林),NMDA受体拮抗剂(如丁苯那嗪),淀粉状蛋白 β 肽聚集抑制剂,抗氧化剂, γ -分泌酶调节物,神经生长因子(NGF)模拟物或NGF基因疗法,PPAR γ 激动剂,HMS-CoA还原酶抑制剂(他汀类),丙嗪类,钙通道阻断剂,GABA受体拮抗剂,糖原合成酶激酶抑制剂,静脉内免疫球蛋白,毒蕈碱(muscarinic)受体激动剂,烟碱(nicotinic)受体调节物,主动或被动淀粉状蛋白 β 肽免疫,磷酸二酯酶抑制剂,5-羟色胺受体拮抗剂和抗淀粉状蛋白 β 肽抗体。在某些实施方案中,因其减轻神经药物的一种或多种副作用的能力而选择至少一种另外的治疗剂。

[0184] 这样的以上所述的组合疗法包括组合给药(其中两种以上治疗剂被包含在相同或分开的制剂中),和分别给药,其中,本发明抗体的给药可以发生在另外的治疗剂和/或佐剂的给药之前、同时和/或之后。本发明的抗体也可以与其他介入疗法组合使用,介入疗法诸如,但不限于,放射疗法,行为疗法,或本领域中已知的且对于待治疗或预防的神经疾病来说是合适的其他疗法。

[0185] 本发明的抗BBB-R抗体(以及任何另外的治疗剂)可以通过任何合适的方法给药,包括肠胃外给药,肺内给药和鼻内给药,并且,如果局部治疗需要,病灶内给药。肠胃外输注包括肌肉内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下给药。在一定程度上根据用药是短期或长期而定,可通过任何适合途径,例如通过注射,例如静脉内或皮下注射用药。本文中涵盖各种剂量给药方案,包括,但不限于,单次给药或在多个时间点多次给药、推注给药及脉冲输注。

[0186] 基于脂质的运输抗体或其片段穿过血脑屏障的方法包括但不限于,将抗体或其片段包封在脂质体中,所述脂质体与抗体结合片段结合,所述抗体结合片段结合血脑屏障的血管内皮上的受体(见例如,美国专利申请公布号20020025313),以及将抗体或其活性片段包被在低密度脂蛋白颗粒(见例如,美国专利申请公布号20040204354)或脱脂载脂蛋白E(见例如,美国专利申请公布号20040131692)中。

[0187] 本发明的抗体将以与良好医疗实践相一致的方式配制、剂量给药和施用。在这方面考虑的因素包括待治疗的具体病症、待治疗的具体哺乳动物、个体患者的临床状态、病症的原因、递送试剂的位点、给药方法、给药时间安排、和医疗从业者已知的其他因素。所述抗体不需要,但任选地,与目前用于预防或治疗所讨论病症的一种或多种药剂一起配制。所述其他药剂的有效量取决于制剂中存在的抗体的量、病症或治疗的类型、和以上讨论的其他因素。这些一般以相同剂量,并使用如本文中所述的给药途径,或以本文中所述的剂量的约1-99%,或以通过经验/临床确定为合适的任意剂量和任何途径来使用。

[0188] 为了预防或治疗疾病,本发明的抗体的合适剂量(当单独或与一种或多种其他另外的治疗剂组合使用时)将取决于待治疗疾病的类型、抗体的类型、疾病的严重性和进程、所述抗体是以预防目的施用还是以治疗目的施用、以前的治疗、患者的临床病史和对所述抗体的应答,和主治医师的判断力。所述抗体以一次治疗或经过一系列治疗合适地施用于患者。根据疾病的类型和严重性,约 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ - $15\text{mg}/\text{kg}$ (例如 $0.1\text{mg}/\text{kg}$ - $10\text{mg}/\text{kg}$)的抗体可以是用于向患者施用的最初候选剂量,无论,例如,通过一次或多次分别施药,或通过连续输注。一个典型的日剂量可以在约 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ - $100\text{mg}/\text{kg}$ 或更多的范围内,其取决于上文提及的因素。为了重复施用数日或更长,根据病症,通常将持续治疗直至出现疾病症状的理想抑制。

所述抗体的一个示范性剂量应该在约0.05mg/kg-约10mg/kg范围内。因此,约0.5mg/kg、2.0mg/kg、4.0mg/kg或10mg/kg(或其任意组合)的一个或多个剂量可以施用于患者。这样的剂量可以间隔地,例如每周或每三周施用(例如以使得患者接受约2-约20或例如约6个剂量的所述抗体)。可以施用最初较高的负荷剂量,随后是一个或多个较低的剂量。然而,其它治疗方案可以是有用的。该疗法的进展可以容易地通过常规技术和测定来监测。

[0189] 要理解,任何以上制剂或治疗方法可以使用本发明的免疫缀合物进行以代替抗BBB-R抗体或作为抗BBB-R抗体的补充。

[0190] V. 制品

[0191] 在本发明的另一方面中,提供一种制品,所述制品包含可用于治疗、预防和/或诊断上述病症的材料。该制品包括容器和在容器上或与容器一起的标签或包装说明书(package insert)。适合的容器包括,例如,瓶子、小瓶、注射器、IV溶液包等。所述容器可以由各种材料诸如玻璃或塑料制成。容器装有组合物,所述组合物是单独地或与可有效用于治疗、预防和/或诊断所述病症的另一种组合物组合,并且可以具有无菌的存取口(例如,所述容器可以是具有可被皮下注射针刺穿的塞子的静脉输注液袋或小瓶)。组合物中至少一种活性试剂是本发明的抗体。标签或包装说明书标明该组合物是用于治疗特定的病症。此外,所述制品可以包含(a)其中包含组合物的第一容器,其中所述组合物包含本发明的抗体;和(b)其中包含组合物的第二容器,其中所述组合物包含另一种细胞毒性剂或其他的治疗剂。本发明的该实施方案中的制品还可以包括包装说明书,所述包装说明书指明所述组合物可以用于治疗特定病症。备选地,或另外地,所述制品还可以包括第二(或第三)容器,所述第二(或第三)容器包含药用缓冲剂,如抑菌注射用水(BWFI),磷酸盐缓冲盐水,林格氏液(Ringer's solution)和葡萄糖溶液。从商业和用户立场,它还可以包括所需的其他材料,包括其他缓冲剂、稀释剂、滤膜、针头和注射器。

[0192] 要理解,任何以上制品可以包括本发明的免疫缀合物以代替抗BBB-R抗体或作为抗BBB-R抗体的补充。

[0193] 该制品任选地还包括包装说明书,其具有对在受试者中治疗神经疾病的说明,其中该说明指示利用如本文中所公开的抗体的治疗来治疗神经疾病,并且任选地指示所述抗体由于其对BBB-R的低亲和力而改进穿过BBB的摄取。

[0194] III. 实施例

[0195] 该实施例评估运铁蛋白受体(TfR),运铁蛋白受体通过全铁-运铁蛋白(holo-transferrin)复合物介导铁到脑中的转运(Scarlatos等.Brain Res 683:164-171(1995))。在野生型小鼠脑中摄取的双标记实验中,将不与内源运铁蛋白竞争结合TfR的人嵌合抗鼠运铁蛋白受体(抗TfR^A)抗体与人对照IgG比较。将单次示踪剂量(约50μg/kg)的^[131I]抗TfR^A和^[125I]对照IgG经静脉内(i.v.)注入野生型小鼠中,并且在5分钟,0.5小时,1小时,4小时,24小时,48小时和72小时测量脑摄取。在所有时间点都观察到脑中^[131I]抗TfR^A摄取的显著增加,所述摄取被测量为注射剂量/克脑的百分比(图1A)。在其峰值处,注射后1小时,与^[125I]对照IgG相比,^[131I]抗TfR^A脑累积有>11倍的差异(n=6)。如果还共同施用未标记的抗TfR^A(4mg/kg体重),则^[131I]抗TfR^A的脑累积几乎降低至对照IgG的水平,指示特异的、靶标驱动的摄取。

[0196] 为了评估脑中的显著抗体摄取是否也发生在治疗剂量水平,以20mg/kg经静脉内

(i.v.)给野生型小鼠施用抗TfR^A或者对照IgG。在注射后1和24小时使用人Fc夹心ELISA,测定皮质和血清中的人抗体浓度。简言之,在指定的给药时间后,用D-PBS以2ml/min的速率给小鼠进行灌注达8分钟。摘除脑并分离皮质和海马,在含有Complete Mini不含EDTA的蛋白酶抑制剂混合物(cocktail)片剂(Roche Diagnostics)的PBS中的1%NP-40(Cal-Biochem)中进行均化。将均化的脑样品在4℃旋转1小时,之后以14,000rpm离心20分钟。分离上清用于脑抗体测量。收集全血,之后注入微量血清分离管(serum separator microcontainer tube)(BD Diagnostics)中,允许其凝块达至少30分钟,并且以5,000xg旋转沉降(spun down)达90秒。分离上清用于血清抗体测量。通过ELISA测量小鼠血清和脑样品中的抗体浓度。将NUNC 384-孔Maxisorp免疫平板(Neptune,NJ)包被以驴抗人IgG的F(ab')₂片段,Fc片段特异性多克隆抗体(Jackson ImmunoResearch,West Grove,PA),在4℃过夜。在25℃,用含有0.5%BSA的PBS将平板封闭1小时。将每种抗体用作内标以量化各自的抗体浓度。使用微平板洗涤器(Bio-Tek Instruments,Inc.,Winooski,VT)以含有0.05%Tween 20的PBS洗涤平板。将标准品和样品稀释在含有0.5%BSA,0.35MNaCl,0.25%CHAPS,5mM EDTA,0.05%Tween-20和15ppm Proclin的PBS中,并将其加入到微平板中,在25℃达两个小时。利用辣根过氧化物酶缀合的F(ab')₂羊抗-人IgG、Fc特异性多克隆抗体(Jackson ImmunoResearch)检测结合的抗体,使用3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)(KPL,Inc.,Gaithersburg,MD)进行显影,并且在Multiskan Ascent读数器(Multiskan Ascent reader)(Thermo Scientific,Hudson,NH)上以450nm的波长测量吸光度。从标准曲线使用四参数非线性回归程序确定浓度。在血清中该测定的定量下限(LLOQ)值为3.12ng/ml,而在脑中为15.6ng/g。使用双尾不成对t检验对实验组间的差异进行统计分析。

[0197] 与对照IgG相比,在施用抗体后24小时,在脑中抗TfR^A的浓度显著更高(图1B,p=0.0002,n=10)。另外地,在24小时,与对照IgG相比,对于抗TfR^A,与血清相比的脑中的人IgG浓度高>2.5倍(图1C,p=0.003,n=10)。与放射性标记的示踪数据一起,这些结果指示全身施用的抗TfR^A可以在脑中累积,然而抗体在脑中的组织分布仍然有待理解。

[0198] 为了确定全身施用的抗体在脑中的分布,给野生型小鼠静脉注射20mg/kg的抗TfR^A或者对照IgG,用PBS灌注以冲洗掉任何残留的循环抗体,并且用荧光抗人IgG二抗对脑切片进行染色以确定抗体定位。在循环1小时后,抗TfR^A具有显著的血管分布,如由其与基膜标记物抗胶原IV的共定位所指示的(图1D,左列)。虽然较不显著,但是对照IgG也定位于血管系统,指示在1小时暴露后,治疗剂量水平的全身施用的IgG保持血管分布(图1E,左列)。然而,在注射后24小时在抗体定位方面有显著差异。抗TfR^A分布不再仅是在血管中,而是改为显示适度的实质染色(图1D,右列)。相反地,在注射后24小时,对照IgG抗体大部分不在脑组织中(图1E,右列)。这些结果指示当以治疗相关水平用药时,抗TfR^A可以穿透BBB(如由适度的实质染色所证实的),然而,大量的脑累积的抗体在大部分局限于BBB的内皮细胞。

[0199] 实质中的累积要求结合至表达在脑内皮细胞上的表面TfR以及在RMT后从该受体解离。不受制于任何理论,假定减小的对TfR的亲合力可以有助于在RMT后解离并且允许增强的在实质中的累积。此外,具有降低的亲合力的抗TfR在浓度受限的环境中(如在脑中,其中抗TfR浓度低)将较不有效地被捕获和转运。然而,在临床环境中,抗TfR治疗剂的血清水平将仍然足够高以保持受体在血管内腔中的饱和。

[0200] 为检验该预测,产生抗TfR^A的变体,变化在于其对TfR的结合亲和力。在竞争ELISA

测定中检验这些变体(图2A);在受测试的任何TfR抗体中,抗TfR^A具有最强的亲和力以及最低的IC₅₀,并且抗TfR^{B,C,D}中的每个具有逐渐降低的亲和力和逐渐升高的IC₅₀。之后,产生变体抗TfR^E,并在相同的测定中与抗TfR^{A,B,C,D}变体一起检测;如在图2A中所示,与任何其他测试的抗TfR抗体相比,它竞争结合TfR的能力显著较弱,并且它具有相应的高的IC₅₀值(表2)。

[0201] 表2:抗TfR抗体的IC₅₀测量

[0202]

抗体	IC ₅₀ (nM)	标准差
抗TfR ^A	1.7	0.1
抗TfR ^B	6.9	0.4
抗TfR ^C	65	12
抗TfR ^D	111	16
抗TfR ^E	>5x10 ⁴	-

[0203] 在非TfR饱和(示踪剂量)和TfR饱和(治疗剂量)环境中测试这些变体。将示踪水平的¹²⁵I抗TfR^A,¹²⁵I抗TfR^B,¹²⁵I抗TfR^C,¹²⁵I抗TfR^D和¹²⁵I抗TfR^E(它们对TfR的亲和力不同,其中抗TfR^A的亲和力>抗TfR^B的亲和力>抗TfR^C的亲和力>抗TfR^D的亲和力>抗TfR^E的亲和力)静脉注射到小鼠中,并在注射后1小时、4小时或24小时测量脑摄取。该测定初始利用¹²⁵I抗TfR^A,¹²⁵I抗TfR^B,¹²⁵I抗TfR^C,和¹²⁵I抗TfR^D进行,并且之后在构建¹²⁵I抗TfR^E后重复,结果显示在图2B中。与提出的模型一致,与较高亲和力变体相比,示踪剂量水平的较低亲和力的抗TfR抗体导致在脑中较少的摄取(图2B)。然而,与示踪剂量形成鲜明对比,在治疗水平(20mg/kg,在1和24小时评估),由于亲和力降低,所以这些相同的较低亲和力变体的脑摄取在24小时显示增加的脑摄取,而在1小时没有观察到摄取的显著差异(图2C)。这些数据支持以下假说:较低亲和力RMT抗体在限制浓度下将展示减少的转运,而在饱和条件下的转运将不受影响。

[0204] 因此,提出以下模型:在非饱和浓度下,与高亲和力抗体相比,较少的低亲和力抗体结合至血管系统内腔侧上的受体,导致较少的内皮摄取(图2D,左图)。然而,在较高的治疗剂量下,与亲和力无关,内腔侧的受体都将被饱和,导致相似的内皮摄取(图2D,右图)。在这些条件下,较低亲和力RMT抗体可以通过以下方式获得更大的脑累积:1)使从RMT靶标解离最大化,从而促进向脑内的释放,和2)减小从脑中流出的可能性,因为在BBB的实质侧浓度是受限的。因此,在治疗环境中,RMT靶标的较低亲和力抗体令人惊奇地有利于实质累积。

[0205] 为了评估这些展示增加的脑摄取的变体的定位,给小鼠通过静脉内剂量给药20mg/kg的高亲和力抗TfR^A或较低亲和力变体抗TfR^{B,C,D}。在24小时后,对动物进行PBS灌注,并且对脑切片进行针对人IgG和神经元标记物NeuN的共染色(图2E)。如之前观察到的,高亲和力抗TfR^A处理的动物具有主要的血管染色以及低水平的实质信号(图2E,顶行)。然而,较低亲和力抗TfR^{B,C,D}具有显著更明显的细胞染色,未描绘皮质血管(图2E,抗TfR^{B,C,D}的数据)。此外,利用NeuN的共定位的染色指示抗体从血管系统重新分布到神经元。这在抗TfR^D变体的代表性的放大图像中是尤其显著的(图2F)。与脑摄取数据一起,这些结果指示抗体的显著更高的脑累积可以通过降低抗TfR对TfR的亲和力来实现,并且较低亲和力抗体如抗TfR^D选择性地分布到神经元。

[0206] 当评估结合TfR和淀粉状蛋白前体蛋白 (APP) 裂解酶, β 分泌酶 (BACE1) 两者的双特异性抗体 (抗TfR^A/BACE1) 时, 抗TfR抗体穿过BBB的转运被进一步确定 (图3A)。高亲和力抗TfR^A被用于改造具有双特异性的TfR结合臂, 其中使用标准‘凸出入孔洞 (knob in hole)’双特异性抗体构建技术 (参见, 例如, Ridgway等, *Protein Eng.* (1996) 9 (7):617-621)。除了在抗TfR (孔洞 (hole)) 和抗BACE1 (凸出 (knob)) 的Fc中的凸出和孔洞突变以外, 抗体的抗TfR臂在Fc区中包含消除糖基化的突变 (N297G)。凸出和孔洞半抗体被分别纯化, 并被退火以在体外生成无糖基化的双特异性IgG。与亲本抗TfR^A相比, 由于二价结合的丧失, 抗TfR^A/BACE1抗体对TfR的结合亲和力显著减小 (图3B)。BACE1主要表达在CNS中的神经元上, 并被认为是通过APP裂解形成 β 淀粉状蛋白 ($A\beta_{1-40}$) 的主要贡献者 (Vassar等, *Science* 286:735-741 (1999))。BACE1的抗体已经被描述成抑制BACE1活性的有效工具, 并且可以在体内减少 $A\beta_{1-40}$ 生产。在稳定表达APP的HEK293细胞系中检测抗TfR/BACE1对BACE1的抑制。与抗BACE1相比, 双特异性抗体在抑制 $A\beta_{1-40}$ 生产方面具有类似的效力和效能, 表明抗TfR/BACE1是BACE1活性的有完全功能的大分子抑制剂 (图3C)。

[0207] 基于该模型, 预期与单独的抗TfR相比, 此较低的亲和力的双特异性抗体将是用于增加摄取的更有利的候选物。为研究双特异性抗体的脑累积, 将示踪剂量的 [¹²⁵I] 抗TfR^A/BACE1与 [¹²⁵I] 抗TfR^A和 [¹²⁵I] 抗BACE1相比较, 并且在静脉注射后30分钟, 6小时, 24小时和48小时评估脑摄取。在所有时间点, 与 [¹²⁵I] 抗BACE1相比, 观察到 [¹²⁵I] 抗TfR/BACE1的显著更高的脑摄取 (图3d, n=4)。与亲和力假说一致, 此非饱和示踪剂量的 [¹²⁵I] 抗TfR^A的脑摄取比较低亲和力的 [¹²⁵I] 抗TfR^A/BACE1的脑摄取大得多。为评估在治疗剂量水平的抗体累积, 给小鼠静脉注射20mg/kg的抗TfR^A/BACE1或抗BACE1, 并在1, 12, 24和48小时后确定抗体的脑摄取。与单特异性抗BACE1相比, 施用双特异性抗TfR^A/BACE1在所有时间点都导致显著更高的脑摄取 (图3E)。如由亲和力模型所预测的, 摄取的程度显著地大于单独的较高亲和力的抗TfR^A (将图3E与1B比较)。在注射后24小时实现峰值累积, 达到~20nM的浓度并且在注射后48小时仍然是升高的, 甚至是在外周的抗体水平被清除至其在1小时时的浓度的~12%时。当将抗体在脑中和在血清中的平均百分比比较时, 通过双特异性抗体增强的摄取是非常明显的 (图3F)。

[0208] 为确定抗TfR^A/BACE1在全身施用后的定位, 在注射后对小鼠进行24小时的PBS灌注, 并且利用抗人荧光二抗 (secondary) 将抗体分布可视化 (图3G)。类似于较低亲和力的抗TfR抗体的定位, 除了血管染色以外还有明显的实质染色。实质与NeuN的共定位指示这些抗体定位于神经元群体。相反地, 被注射以对照IgG的动物显示完全缺乏血管和实质染色两者。总之, 这些数据指示双特异性抗TfR^A/BACE1穿过BBB并且可以显著地累积在脑实质中。

[0209] 为评估抗TfR^A/BACE1对体内 $A\beta_{1-40}$ 生产的效力, 给野生型小鼠施用单次25mg/kg或50mg/kg剂量的对照IgG, 抗BACE1或抗TfR/BACE1。基于以下观察, 即脑抗体摄取在注射后24小时达到峰值 (参见图3E), 在经静脉内施用抗体后的24和48小时测定脑和血浆 $A\beta_{1-40}$ 水平。在25mg/kg, 在注射后24 (p=0.001, n=10) 和48 (p=0.0003, n=10) 小时, 与对照IgG相比, 抗TfR^A/BACE1能够显著降低脑 $A\beta_{1-40}$ 水平, 而抗BACE1对 $A\beta_{1-40}$ 减少没有影响 (图4A)。在50mg/kg, 在两个时间点, 与对照IgG相比, 抗TfR^A/BACE1对减少脑 $A\beta_{1-40}$ 具有甚至更显著的效果 (图3B, 24小时和48小时都是: p<0.0001, n=10)。与对照相比, 以此剂量施用抗BACE1也显著地减少脑 $A\beta_{1-40}$ 水平 (24小时: p<0.0001, n=10; 48小时: p=0.006, n=10), 但是其程度较双

特异性抗TfR^A/BACE1 (24小时和48小时都是: $p < 0.0001$, $n = 10$) 显著地更低。值得注意的是, 在测量的所有时间点和剂量, 双特异性抗体减少AB₁₋₄₀的能力是抗BACE1的2至3倍。在50mg/kg, 抗TfR^A/BACE1的最大作用在注射后48小时达到, 其中与对照IgG相比, 脑AB₁₋₄₀减少 $50.0 \pm 1.9\%$ (图4E)。对于抗TfR^A/BACE1, 在两个剂量和时间点, 也观察到外周AB₁₋₄₀的显著减少(图4C-D)。用抗BACE1处理仅在24小时时间点导致外周AB₁₋₄₀的减少(25mg/kg: $p = 0.01$, 50mg/kg: $p = 0.002$; 每个: $n = 10$)。这些数据确认改造成穿过BBB的抗体可以是药效学有效的。此外, 双特异性抗体的脑穿透性的增加通过显著地降低脑AB₁₋₄₀水平使其变为更有效的BACE1抑制剂药物。

[0210] 然而, 在20mg/kg的治疗剂量, 相对于抗TfR^A或者抗TfR^D治疗的动物, 在抗TfR^E治疗的动物中, BBB穿透和进入CNS的非血管部分被增强(图8B)。显著地, 抗TfR^D在脑中实现更高的初始浓度, 其在第2天后稳定下降; 另一方面, 抗TfR^E在测试的8天时间内一贯地保持高水平的脑暴露。相关地, 在评估的时间内, 在所有抗TfR抗体中, 血清中的抗TfR^E浓度减小最少(图8A)。总之, 该数据指示, 通常对TfR的较低亲和力惊人地减少血清清除率并增加脑暴露, 而在某阈值较低亲和力开始削弱利用该抗体可获得的最大脑暴露。在该实施例中, 对于运铁蛋白受体, 可以在抗体抗TfR^D和抗TfR^E的亲和力之间找到最佳点。

[0211] 重要地, 这些数据突出显示了使用较低亲和力抗体的方法增加抗体被CNS摄取的若干成因机制。首先, 高亲和力抗TfR抗体(例如, 抗TfR^A, 图1D)通过快速地使在脑血管系统中的TfR饱和来限制脑摄取, 因此减少摄取到脑中的抗体的总量并且还限制其分布到血管系统中。惊人地, 降低亲和力(例如, 抗TfR^{B-E}, 和抗TfR^{A,D,E}/BACE1, 图2C, 2E, 2F, 3E-G和9C)提高脑摄取和分布, 观察到从血管系统到神经元和相关的神经毡的定位的明显移动。第二, 提出抗体对TfR的较低亲和力削弱抗体通过TfR从膜的CNS侧返回BBB的血管侧的能力, 因为该抗体对TfR的总体亲和力是低的, 并且该抗体在BBB的CNS侧的局部浓度由于抗体快速分散到CNS区室中而是不饱和的(参见, 例如, 图1D, 2E和2F)。第三, 在体内, 对TfR具有较低亲和力的抗体不像对TfR具有较高亲和力的那些抗体那样被有效地从系统中清除(见图8A和9B), 并且因此相比于它们的较高亲和力的对应物, 保持在更高的循环浓度。这是有利的, 因为较低亲和力抗体的循环抗体水平相比于较高亲和力抗体在更长的时间内维持在治疗水平, 这因此长时间提高脑对抗体的摄取(将图9C中的抗TfR^A/BACE1与抗TfR^D/BACE1比较)。此外, 血浆和脑暴露两者的这样的提高可以降低临床用药的频率, 这将具有潜在的好处, 不仅是对于患者顺从性和方便性来说, 还在于减轻抗体和/或与其偶联的治疗性化合物的任何潜在副作用或脱靶效应。

[0212] 进行进一步的研究以评估是否进一步降低双特异性抗TfR^A/BACE1抗体的亲和力能够进一步提高它的BBB和实质穿透。使用与用于抗TfR^A/BACE1抗体的相同的构建方法, 构建两种另外的双特异性抗体: 抗TfR^D/BACE1和抗TfR^E/BACE1。进行竞争ELISA测定(图9A), 所得的IC₅₀如下:

[0213] 表3: 抗TfR/BACE1抗体的IC₅₀/亲和力测量

[0214]

抗体	IC ₅₀	Kd (Biacore) (nM)
抗TfR ^A /BACE1	15nM	33.3 ± 1.7
抗TfR ^D /BACE1	1.6 μM	630 ± 50

抗TfR ^E /BACE1	>50 μ M	N.D.
--------------------------	-------------	------

[0215] 同样对各个双特异性抗体和TfR之间的结合进行Kd的表面等离子共振测量。表3中的 **BIACORE®** 分析如下进行。使用表面等离子共振测定,使用 **BIACORE®-T-100** (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ), 在25°C使用penta-His Ab捕获仪 (capture) (Qiagen, Valencia, CA) 测量Kd。简言之,依照供应商的说明书用N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 和N-羧基-琥珀酰亚胺 (NHS) 活化羧甲基化右旋糖苷生物传感器芯片 (CM5, BIAcore, Inc.)。用100mM乙酸钠pH 4.0将Penta-His抗体稀释至50 μ g/ml,然后以5 μ l/分钟的流速注入,以获得约10000个响应单位 (RU) 的偶联蛋白质。注入抗原后,注入1M乙醇胺以封闭未反应基团。为了进行动力学测量,将MuTfR-His注入HBS-P中以达到约50个RU,然后在25°C以约30 μ l/分钟的流速将两倍连续稀释的抗TfR^A/BACE1 (1.95nM至1000nM) 或抗TfR^D/BACE1 (9.75nM至5000nM) 注入HBS-P中。使用简单一对一朗格缪尔 (Langmuir) 结合模型 (**BIACORE®** Evaluation Software version 3.2) 通过同时拟合缔合和解离传感图来计算缔合速率 (k_{on}) 和解离速率 (k_{off})。以比率 k_{off}/k_{on} 计算平衡解离常数 (Kd)。参见例如Chen等, J. Mol. Biol. (分子生物学杂志) 293:865-881 (1999)。抗TfR^E/BACE1的亲合力过于弱以致不能通过表面等离子共振测定。

[0216] 如在图9A和表2和3中所示,双特异性抗TfR^A/BACE1和抗TfR^D/BACE1抗体与TfR的结合明显不如相应的单特异性抗TfR^A和抗TfR^D(将图9A与图2A比较)。对于抗TfR^E/BACE1,双特异性和单特异性的部分结合曲线还表明双特异性抗TfR^E/BACE1具有比相应的单特异性抗TfR^E高得多的IC50。

[0217] 在上述的相同的体内 $\text{A}\beta_{1-40}$ 生产测定中测试这些抗体。简言之,通过静脉内尾静脉注射给6-8周龄的野生型C57B1/6小鼠施用单次50mg/kg剂量的对照IgG,单特异性抗BACE1,或抗TfR^A/BACE1,抗TfR^D/BACE1,或抗TfR^E/BACE1,6只小鼠/抗体处理/时间点,总计处理180只小鼠。在静脉施用抗体后的1,2,4,6,8和10天测定脑和血浆 $\text{A}\beta_{1-40}$ 水平(图9B-9E)。在最早的时间点在脑中发现的双特异性抗体的浓度(图9C)对于抗TfR^A/BACE1和抗TfR^D/BACE1而言是最大的,在1天时间点抗TfR^A/BACE1和抗TfR^D/BACE1中每个的浓度是由抗TfR^E/BACE1获得的浓度的两倍还多。然而,到第6天,抗TfR^A/BACE1脑浓度水平回到对照水平,并且到第10天,抗TfR^D/BACE1水平也是如此。相反地,与抗TfR^A/BACE1和抗TfR^D/BACE1相比,最低亲和力的双特异性抗体抗TfR^E/BACE1具有低得多的脑抗体浓度的相对减少,符合以下提出的模型,即抗TfR的较低亲和力导致该抗体被从实质空间输出的能力降低。脑中的 $\text{A}\beta_{1-40}$ 水平(图9E)以与通过观察到的脑中的双特异性抗体的浓度预期的大致相同的比例降低:抗TfR^A/BACE1和抗TfR^D/BACE1在最早的时间点(第1-2天)具有类似降低的观察到的脑 $\text{A}\beta_{1-40}$ 水平,该水平在随后的时间点快速增加(抗TfR^A/BACE1)或在随后的时间点更适度地增加(抗TfR^D/BACE1),这与观察到的这些抗体中的每个的脑浓度的降低一致(图9C)。值得注意的是,虽然抗TfR^E/BACE1抗体处理导致比利用其他双特异性抗体观察到的更适度的脑 $\text{A}\beta_{1-40}$ 水平的降低,但是此降低在所有时间点是一致的(图9E)。

[0218] 血浆测量(图9B)显示抗TfR^A/BACE1到第4天被清除,而抗TfR^D/BACE1在所有时间点一直维持在相对低的水平,并且抗TfR^E/BACE1的水平在所有时间点保持与对照类似。与此发现一致,对于抗TfR^D/BACE1、抗TfR^E/BACE1和抗BACE1中的每个,在所有时间点,观察到的血浆 $\text{A}\beta_{1-40}$ 水平(图9D)类似地从对照抗gD水平下降。抗TfR^A/BACE1在1,2和4天时间点显示

类似的减少,并在较晚的时间点快速回到对照水平,这与观察到的抗体从血浆中的消失相符。

[0219] 这些结果再次证实双特异性抗TfR/BACE1抗体有效穿过BBB并抑制哺乳动物体内系统中的BACE1活性。它们还表明处于抗TfR^D/BACE1的亲合力和抗TfR^E/BACE1的亲合力之间的对TfR的亲合力可以提供实质/脑中持续性和活性的最佳组合。然而,要注意,对于每个脑靶标来说,对该靶标具有特异性的双特异性臂的效力将决定多少抗TfR/靶标双特异性抗体必需存在于BBB的CNS侧以获得所需的结果,并且因此决定必需将什么程度的抗TfR对TfR的亲合力用于双特异性抗体以获得所述浓度。本发明提供方法用于确定和设计双特异性抗体,以在BBB的非特许侧施用后在CNS中获得这样的靶标水平。

[0220] 使用另一种抗TfR双特异性抗体,即结合TfR和淀粉状蛋白 β 两者的抗TfR/ β ,证实并扩展这些结果。制备三种双特异性变体:抗TfR^A/ β ,抗TfR^D/ β 和抗TfR^E/ β ,其中使用与以上用于制备抗TfR/BACE1双特异性的方法相同的方法。 β 是淀粉状蛋白斑块的主要成分,其被认为参与AD的发展。通过结合并除去 β (处于其游离状态或低聚状态)抑制斑块形成,可以抑制AD的发展或进展。评估这些双特异性抗体中的每个的药物动力学性质。

[0221] 将单次50mg/kg剂量的对照IgG、单特异性抗 β 抗体或各个双特异性抗体经腹腔注射到8-16周龄野生型C57BL/6J小鼠或者表达人早老蛋白2和人淀粉状蛋白前体蛋白(PS2APP)的小鼠中。由于转基因动物数目有限,仅两种双特异性变体(抗TfR^D/ β 和抗TfR^E/ β) 在PS2APP小鼠中被测定。在每个治疗组中给四至六只同样的小鼠给药。在24小时后处死小鼠,并且测量脑和血浆中的药物水平,与抗TfR/BACE1双特异性抗体研究一样。在处死前,同样在给药后6小时收集血液以用于血浆抗体浓度的早期评估。抗体浓度的血浆测量(图10A和11A)显示在给药后6小时所有抗体以相似的水平存在。然而,到24小时,相比于对照IgG,对照单特异性抗 β 水平降低。这类似于之前对该抗 β 分子的观察。在24小时,抗TfR^A/ β 在外周中显示与抗 β 相似的抗体水平,而抗TfR^D/ β 和抗TfR^E/ β 显示稍微提高的水平,介于抗 β 和对照IgG之间。

[0222] 在脑中发现的双特异性抗体的浓度相比于对照IgG和抗 β 两者都增加(图10B和11B)。相比于抗 β ,抗TfR^A/ β 具有12倍高的浓度,抗TfR^D/ β 具有8至15倍高的浓度,而抗TfR^E/ β 具有4至5倍高的浓度。相比于抗 β 的抗TfR^{A,D,E}/ β 抗体的脑摄取的增加甚至大于所见到的相比于抗BACE1的抗TfR^{A,D,E}/BACE1双特异性抗体的增加。这可能是由于在给药后24小时相比于对照IgG的抗 β 的外周暴露的减少,这导致与对照IgG相比在脑中更低水平的抗 β 。

[0223] 这些发现首先证明以治疗相关剂量施用的大分子抗体可以穿过BBB并且产生显著的和持续的脑摄取。此外,这些结果证明抗体亲和力和脑摄取程度之间的逆相关关系,这促进了对RMT动力学的理解。此新的认识可以应用于多个其他潜在RMT靶标以提供用于将抗体药物递送到CNS中的更有效的策略。另外地,这些体内结果证明双特异性抗体通过显著地增加靶向抗体药物的脑穿透性可以极大地提高有希望的抗淀粉状蛋白生成(anti-amyloidogenic)治疗剂的效力。这可以是非常有利的,因为增强的药物递送将转化为较少的潜在副作用,这是由于所需的治疗剂量更低。更通常地,该技术具有巨大的潜能而被应用于针对各种各样的CNS疾病的治疗剂,并且代表了一种提供更安全抗体药物的改进的方法。

[0224] 虽然为了清楚理解的目的,已经借助于附图和实例详细描述了上述发明,但是描

述和实例不应当解释为限制本发明的范围。本文中引用的所有专利和科学文献的公开内容通过引用完整地明确结合于此。

序列表

<110> 霍夫曼-拉罗奇有限公司
 <120> 低亲和力血脑屏障受体抗体及其用途
 <130> P4499R1-WO
 <141> 2011-11-29
 <150> US 61/418,223
 <151> 2010-11-30
 <160> 15
 <210> 1
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列是合成的

<400> 1
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser
 20 25 30
 Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 35 40 45
 Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90
 Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 95 100 105
 Ile Lys Arg

[0001]

<210> 2
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列是合成的

<400> 2
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser
 20 25 30
 Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 35 40 45
 Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90
 Phe Pro Thr Tyr Leu Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu

	95	100	105
	Ile Lys Arg		
<210>	3		
<211>	108		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	序列是合成的		
<400>	3		
Asp	Ile	Gln	Met
1	5	10	15
Gly	Asp	Arg	Val
20	25	30	
Thr	Ala	Val	Ala
35	40	45	
Leu	Leu	Ile	Tyr
50	55	60	
Arg	Phe	Ser	Gly
65	70	75	
Ser	Ser	Leu	Gln
80	85	90	
Gly	Tyr	Asn	Asp
95	100	105	
	Ile Lys Arg		
[0002]			
<210>	4		
<211>	108		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	序列是合成的		
<400>	4		
Asp	Ile	Gln	Met
1	5	10	15
Gly	Asp	Arg	Val
20	25	30	
Thr	Ala	Val	Ala
35	40	45	
Leu	Leu	Ile	Tyr
50	55	60	
Arg	Phe	Ser	Gly
65	70	75	
Ser	Ser	Leu	Gln
80	85	90	
Ser	Ser	Thr	Asp
95	100	105	
	Ile Lys Arg		
<210>	5		
<211>	108		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		

<220>

<223> 序列是合成的

<400> 5

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

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Val Val Ala
 20 25 30

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

Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60

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

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90

Asp Ala Thr Ser Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 6

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400> 6

[0003]

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

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser
 20 25 30

Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 35 40 45

Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60

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

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90

Tyr Ala Thr Asp Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 7

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400> 7

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

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

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

<210> 8
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列是合成的

<400> 8
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Leu
 20 25 30
 Gly Tyr Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr
 50 55 60
 Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser
 65 70 75
 Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val
 95 100 105
 Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 110 115

[0004]

<210> 9
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列是合成的

<400> 9
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser
 20 25 30
 Ser Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 35 40 45
 Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Ser Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln

80 85 90
 Tyr Ser Tyr Ser Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 10
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列是合成的

<400> 10
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser
 20 25 30
 Ser Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 35 40 45
 Leu Leu Ile Ser Trp Ala Ser Trp Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90
 Tyr Ser Tyr Ser Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 95 100 105

[0005]

Ile Lys Arg

<210> 11
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列是合成的

<400> 11
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser
 20 25 30
 Ser Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 35 40 45
 Leu Leu Ile Trp Tyr Ala Ser Trp Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90
 Tyr Ser Tyr Ser Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 12
 <211> 108

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 序列是合成的

<400> 12
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser
20 25 30
Ser Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45
Leu Leu Ile Trp Trp Ala Ser Ser Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90
Tyr Ser Tyr Ser Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105
Ile Lys Arg

<210> 13
<211> 126
<212> PRT
<213> 人工序列

[0006]

<220>
<223> 序列是合成的

<400> 13
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Phe Tyr
20 25 30
Tyr Ser Ser Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45
Glu Trp Val Ala Ser Ile Ser Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr
50 55 60
Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser
65 70 75
Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Pro Thr His Tyr Tyr Tyr
95 100 105
Tyr Ala Lys Gly Tyr Lys Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
110 115 120
Leu Val Thr Val Ser Ser
125

<210> 14
<211> 438
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 序列是合成的

<400> 14

[0007]

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 20 25 30
 Ser Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Leu Val Ala Ser Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr
 50 55 60
 Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
 65 70 75
 Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 95 100 105
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 110 115 120
 Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
 125 130 135
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 140 145 150
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 155 160 165
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 170 175 180
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys
 185 190 195
 Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val
 200 205 210
 Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 215 220 225
 Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 230 235 240
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 245 250 255
 Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
 260 265 270
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 275 280 285
 Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 290 295 300
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 305 310 315
 Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 320 325 330
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 335 340 345
 Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 350 355 360
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 365 370 375
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu

	380	385	390
	Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp		
	395	400	405
	Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met		
	410	415	420
	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu		
	425	430	435
	Ser Leu Gly		
	<210> 15		
	<211> 219		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 序列是合成的		
	<400> 15		
	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro		
	1	5	10
	Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val		
	20	25	30
	Tyr Ser Asn Gly Asp Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro		
	35	40	45
[0008]	Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe		
	50	55	60
	Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp		
	65	70	75
	Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val		
	80	85	90
	Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln		
	95	100	105
	Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val		
	110	115	120
	Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala		
	125	130	135
	Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys		
	140	145	150
	Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln		
	155	160	165
	Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu		
	170	175	180
	Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys		
	185	190	195
	Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val		
	200	205	210
	Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
	215		

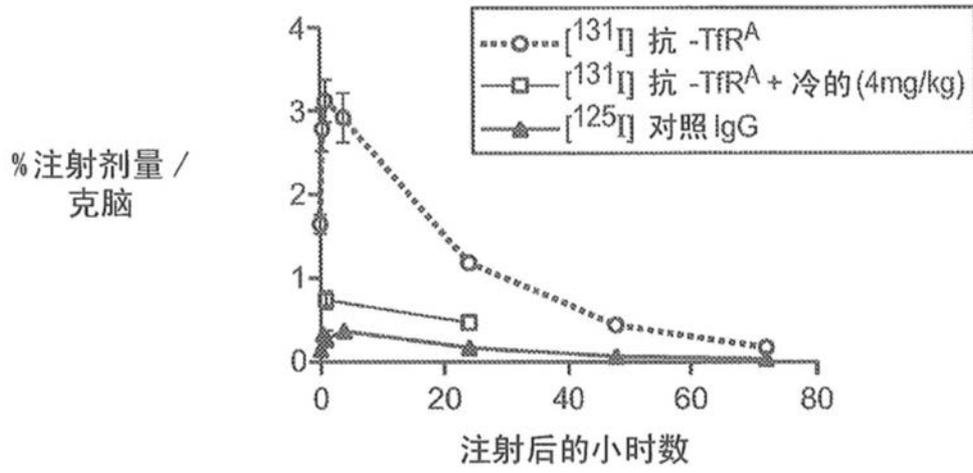


图1A

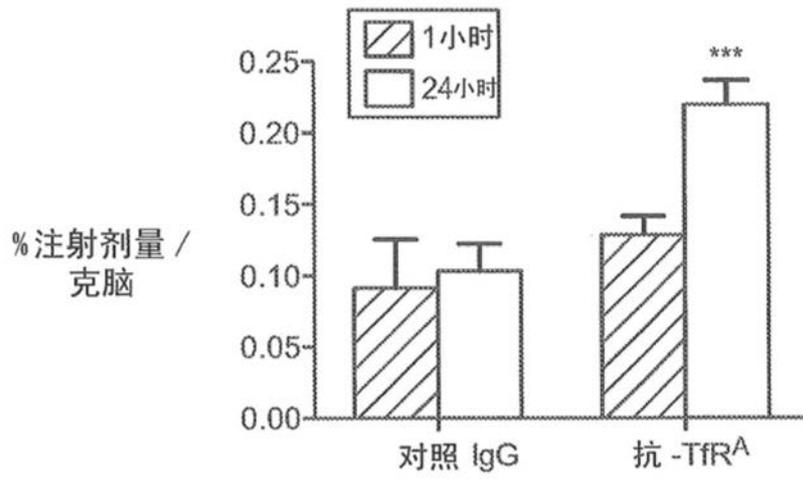


图1B

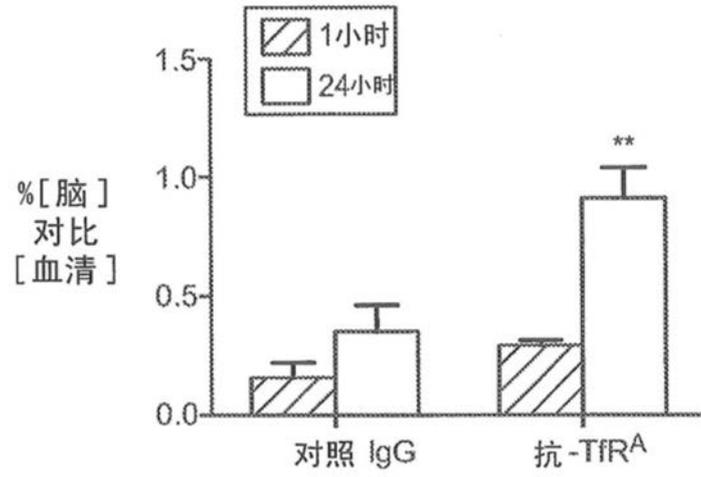


图1C

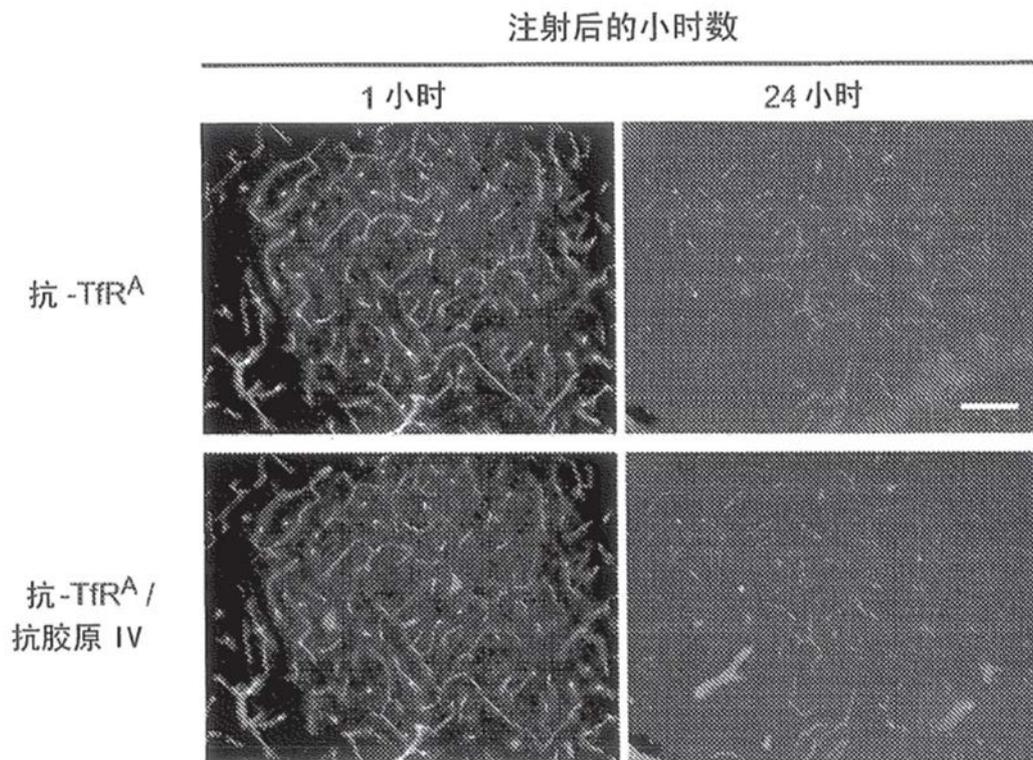


图1D

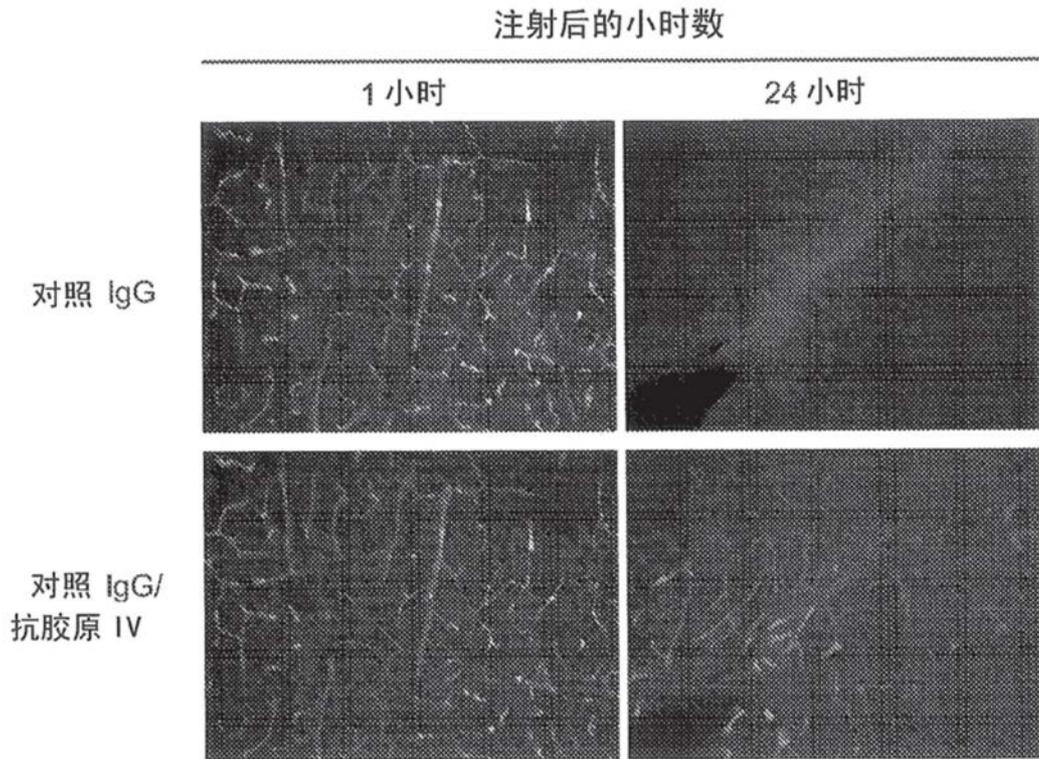


图1E

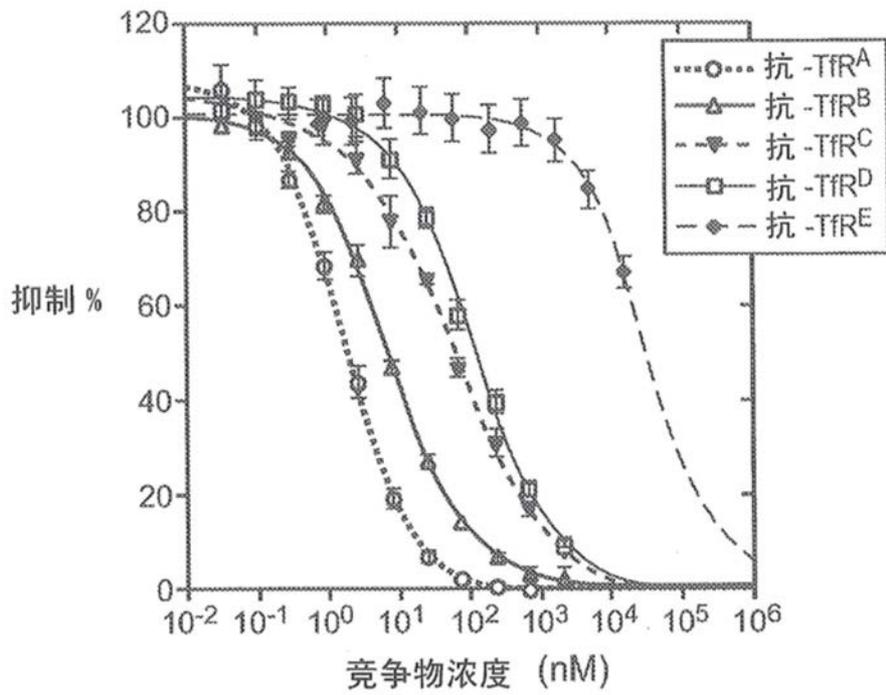


图2A

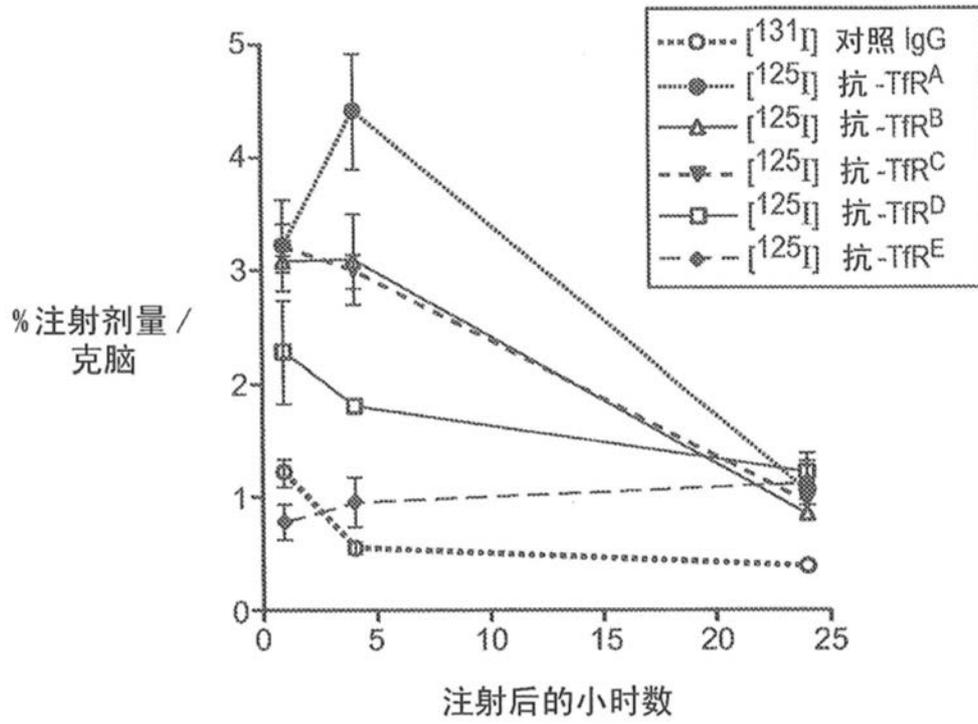


图2B

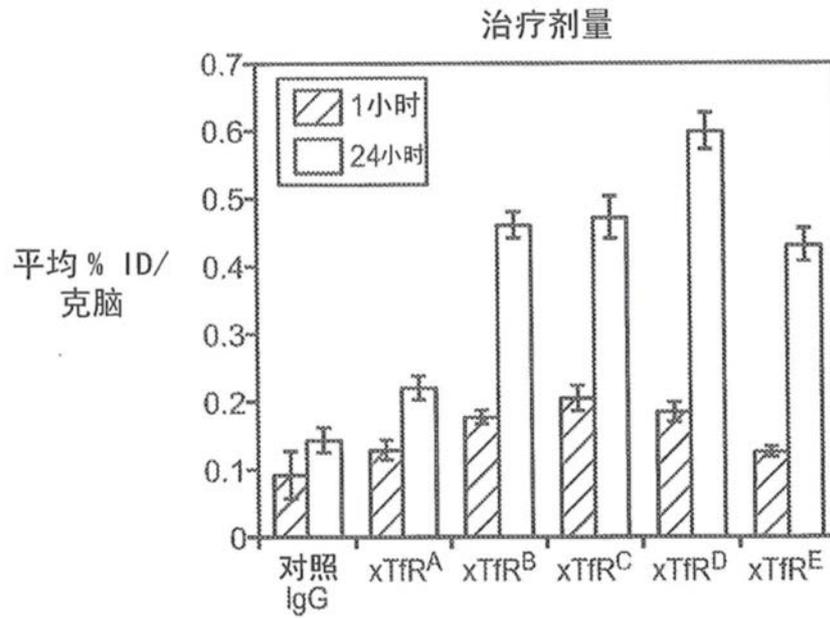


图2C

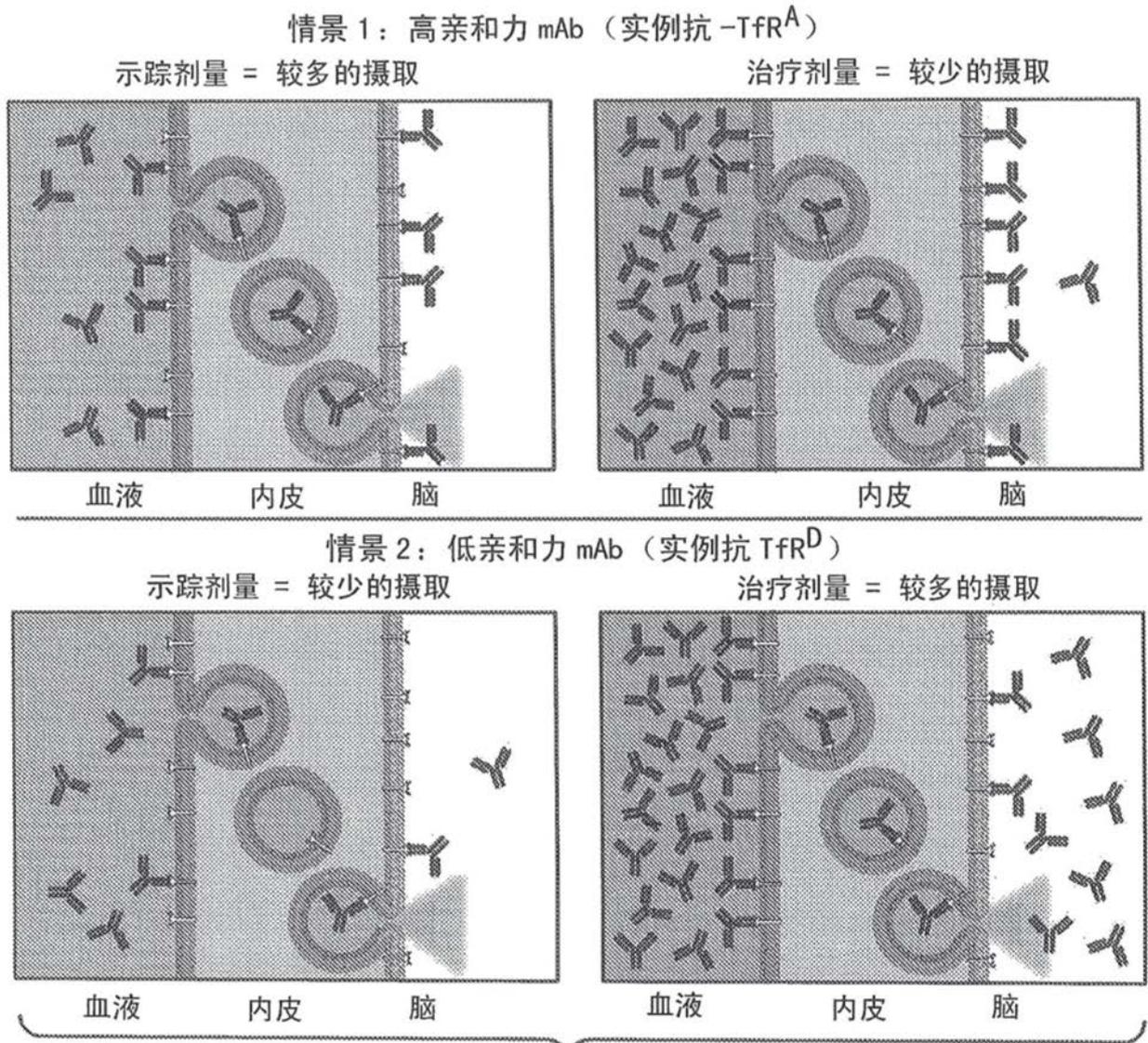


图 2D

图2D

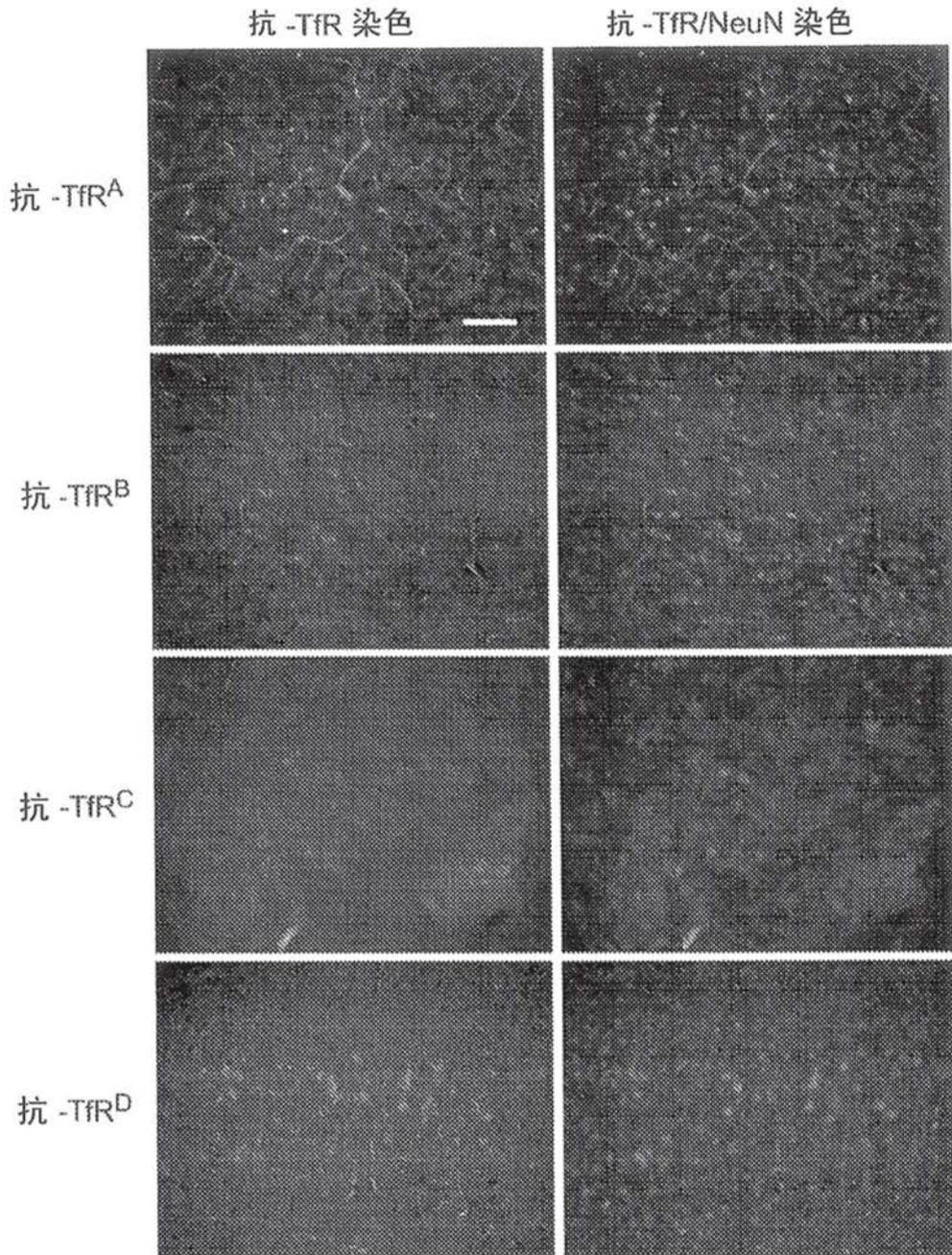


图2E

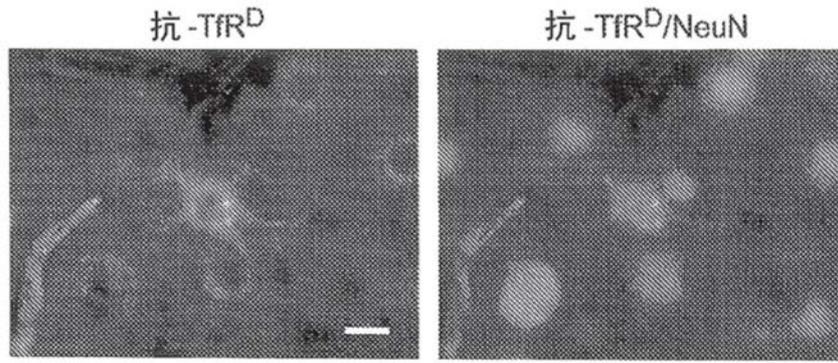


图2F

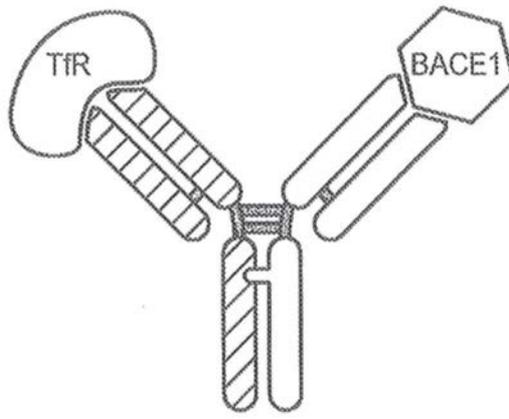


图3A

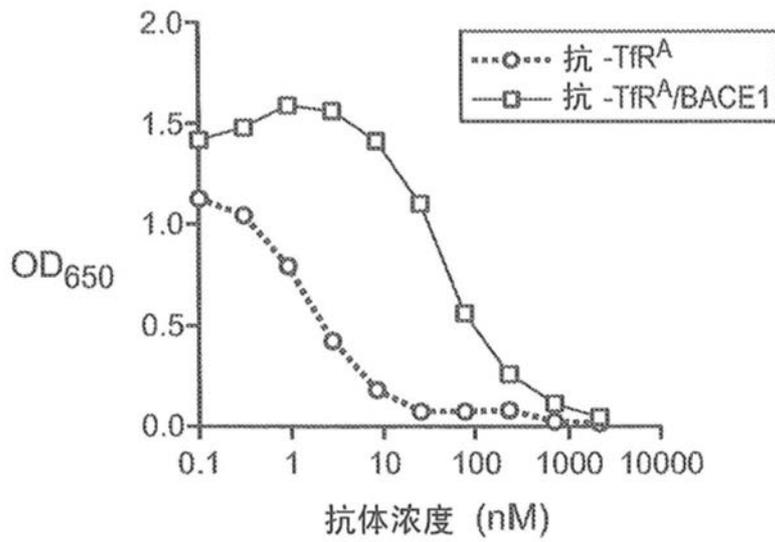


图3B

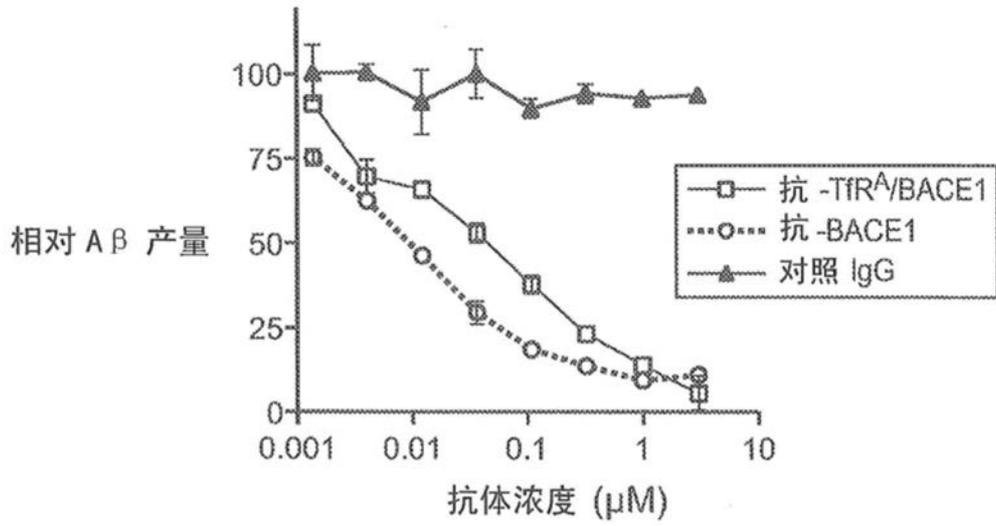


图3C

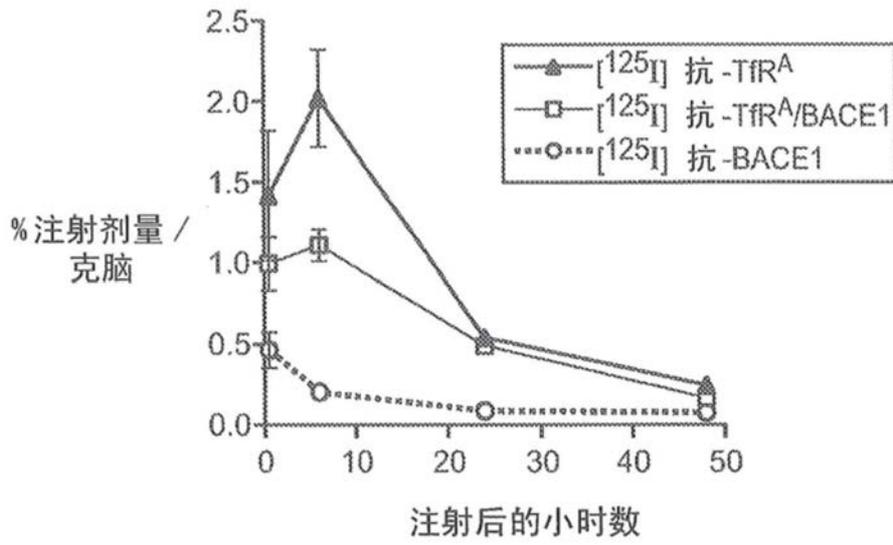


图3D

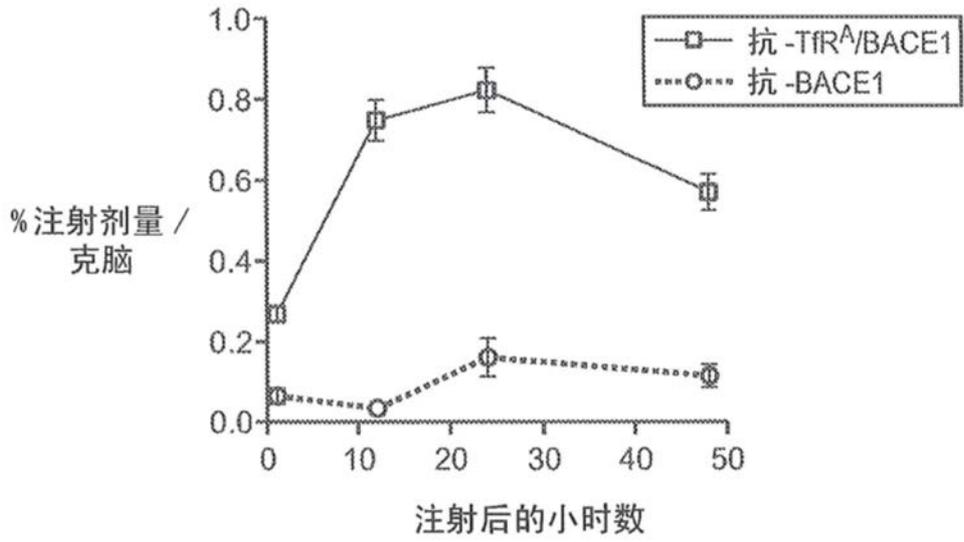


图3E

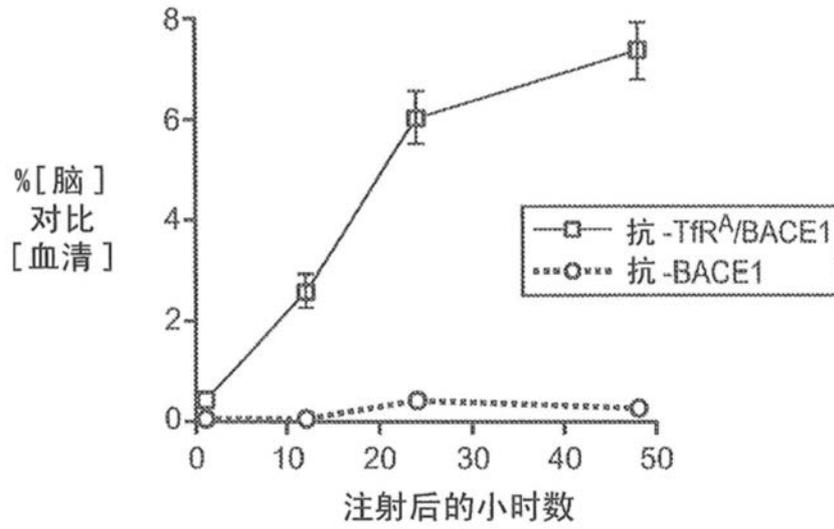


图3F

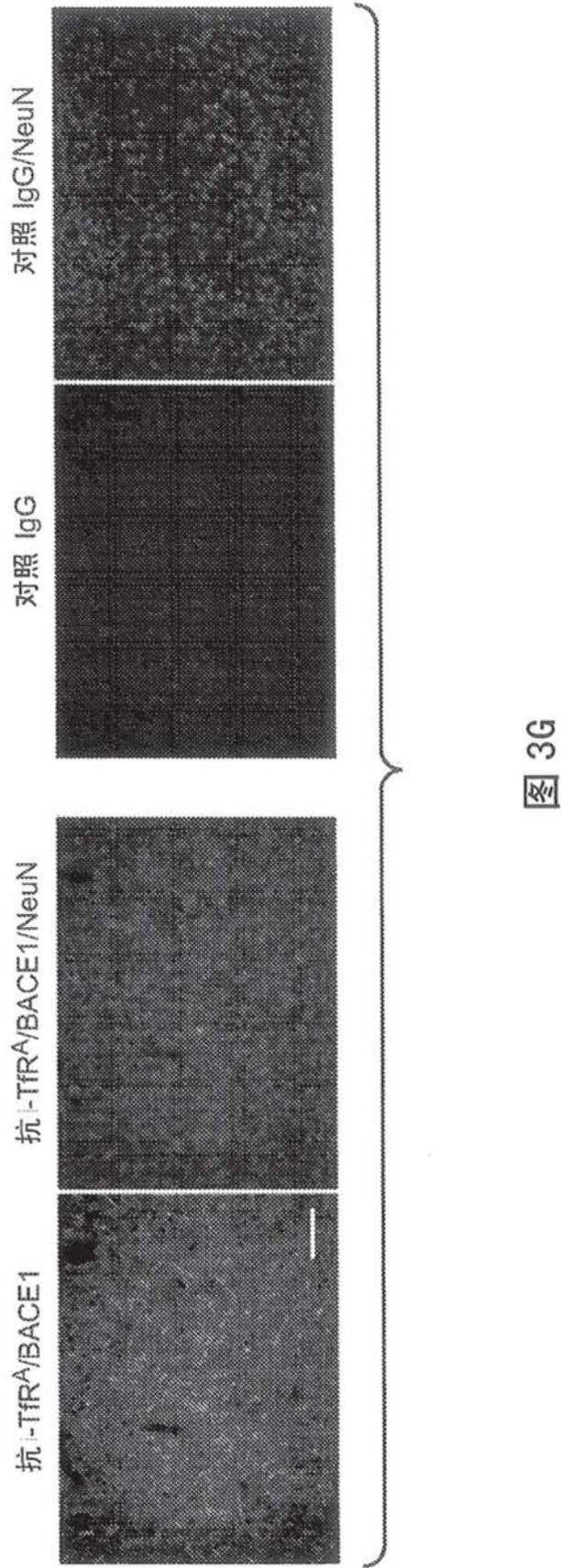


图3G

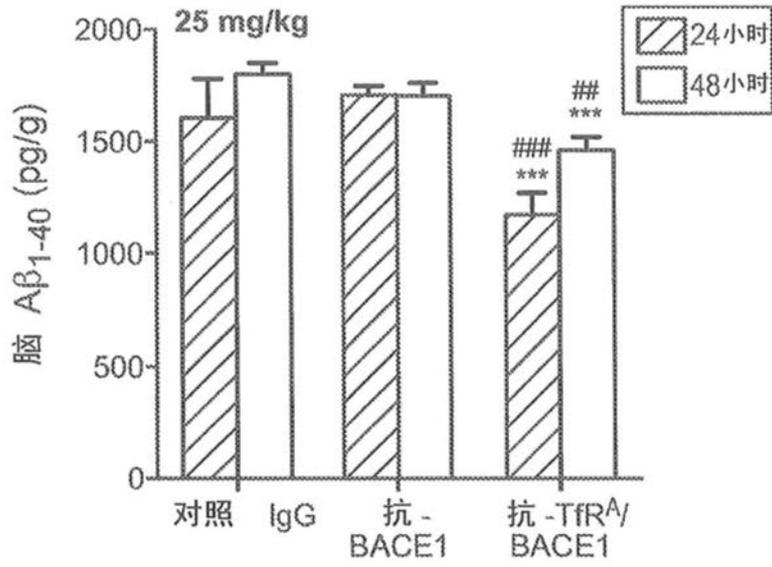


图4A

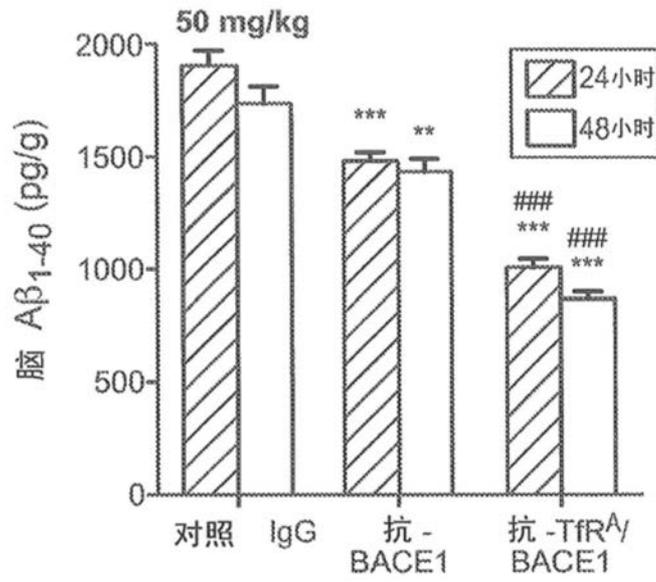


图4B

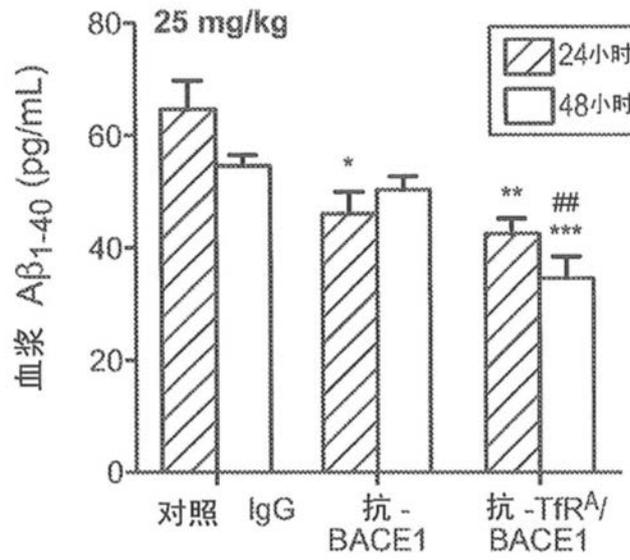


图4C

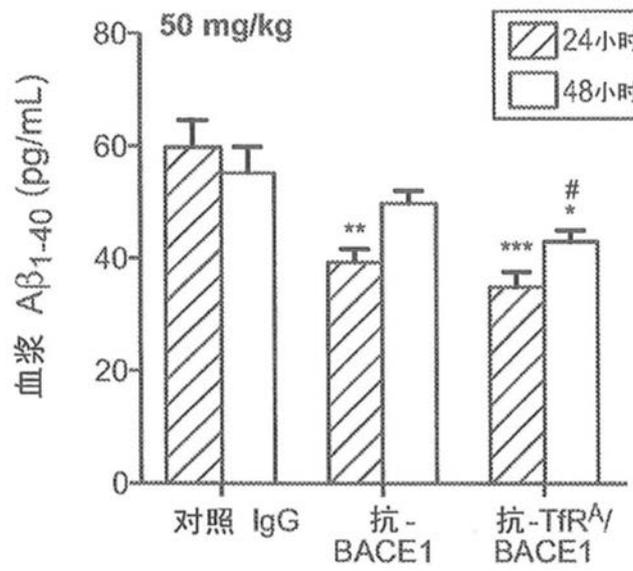


图4D

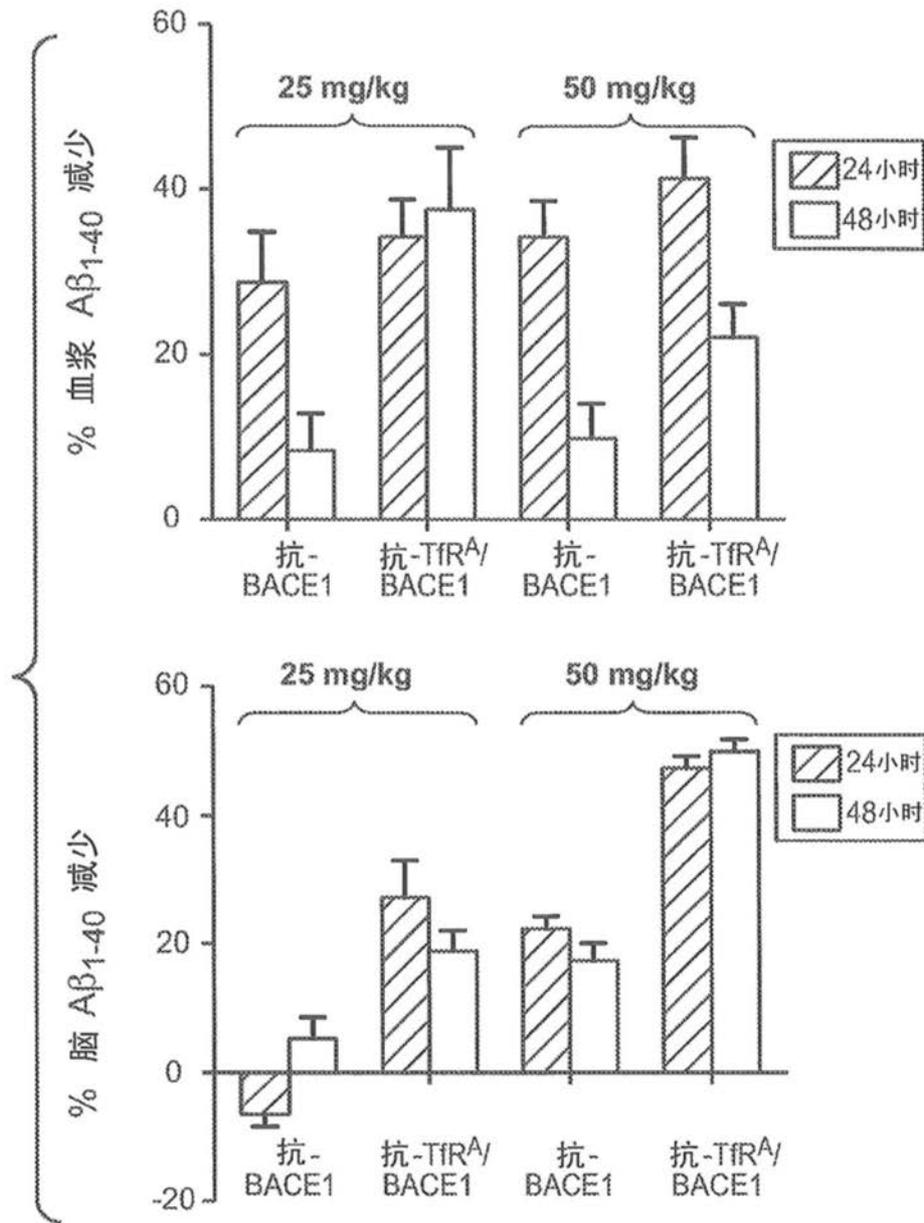


图4E

Kabat#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	A	B	C	D	E	F	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	
	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q						
YW412.8	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q						
YW412.8.31	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q						
YW412.8.30	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q						
YW412.8.2	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q						
YW412.8.29	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q						
YW412.8.51	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q						
Kabat#	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	
	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
YW412.8	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P		
YW412.8.31	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P		
YW412.8.30	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P		
YW412.8.2	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P		
YW412.8.29	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P		
YW412.8.51	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P		
Kabat#	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108																
	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	Y	T	P	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	S	E	I	D	N	O	:	1									
YW412.8	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	Y	T	P	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	S	E	I	D	N	O	:	1									
YW412.8.31	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	Y	T	P	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	S	E	I	D	N	O	:	2									
YW412.8.30	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	Y	T	P	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	S	E	I	D	N	O	:	3									
YW412.8.2	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	Y	T	P	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	S	E	I	D	N	O	:	4									
YW412.8.29	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	Y	T	P	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	S	E	I	D	N	O	:	5									
YW412.8.51	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	Y	T	P	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	S	E	I	D	N	O	:	6									

图 5A

图5A

Kabat#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40							
YW412.8	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	F	T	F	S	G	Y	A	I	H	W	V	R	Q	A						
YW412.8.31	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	F	T	F	S	G	Y	A	I	H	W	V	R	Q	A						
YW412.8.30	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	F	T	F	S	G	Y	A	I	H	W	V	R	Q	A						
YW412.8.2	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	F	T	F	S	G	Y	A	I	H	W	V	R	Q	A						
YW412.8.29	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	F	T	F	S	G	Y	A	I	H	W	V	R	Q	A						
YW412.8.51	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	F	T	F	S	G	Y	A	I	H	W	V	R	Q	A						
Kabat#	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	A	B	C	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78						
YW412.8	P	G	K	G	L	E	W	V	G	W	I	S	P	A	G	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A							
YW412.8.31	P	G	K	G	L	E	W	V	G	W	I	S	P	A	G	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A							
YW412.8.30	P	G	K	G	L	E	W	V	G	W	I	S	P	A	G	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A							
YW412.8.2	P	G	K	G	L	E	W	V	G	W	I	S	P	A	G	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A							
YW412.8.29	P	G	K	G	L	E	W	V	G	W	I	S	P	A	G	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A							
YW412.8.51	P	G	K	G	L	E	W	V	G	W	I	S	P	A	G	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A							
Kabat#	79	80	81	82	A	B	C	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	A	B	C	D	E	F	G	H	K	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113
YW412.8	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	7					
YW412.8.31	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	8					
YW412.8.30	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	7					
YW412.8.2	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	7					
YW412.8.29	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	7					
YW412.8.51	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	7					

图 5B

图5B

1 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYGMSWVRQA PGKGLELVAS
51 INSNGGSTYY PDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCASGD
101 YWGQGTTVTV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT
151 VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTVPSSSLGT KTYTCNVDHK
201 PSNTKVDKRV ESKYGPPCPP CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE
251 VTCVVVDVSQ EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV
301 LHQDWLNGKE YKCKVSNKGL PSSIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSQEEM
351 TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL DSDGSFFLYS
401 RLTVDKSRWQ EGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSLG (SEQ ID NO: 14)

图7A

1 DIVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLV YSNGDTYLHW YLQKPGQSPQ
51 LLIYKVSNRG SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCSQSTHVP
101 WTFGQGTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK
151 VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE
201 VTHQGLSSPV TKSFNREGC (SEQ ID NO: 15)

图7B

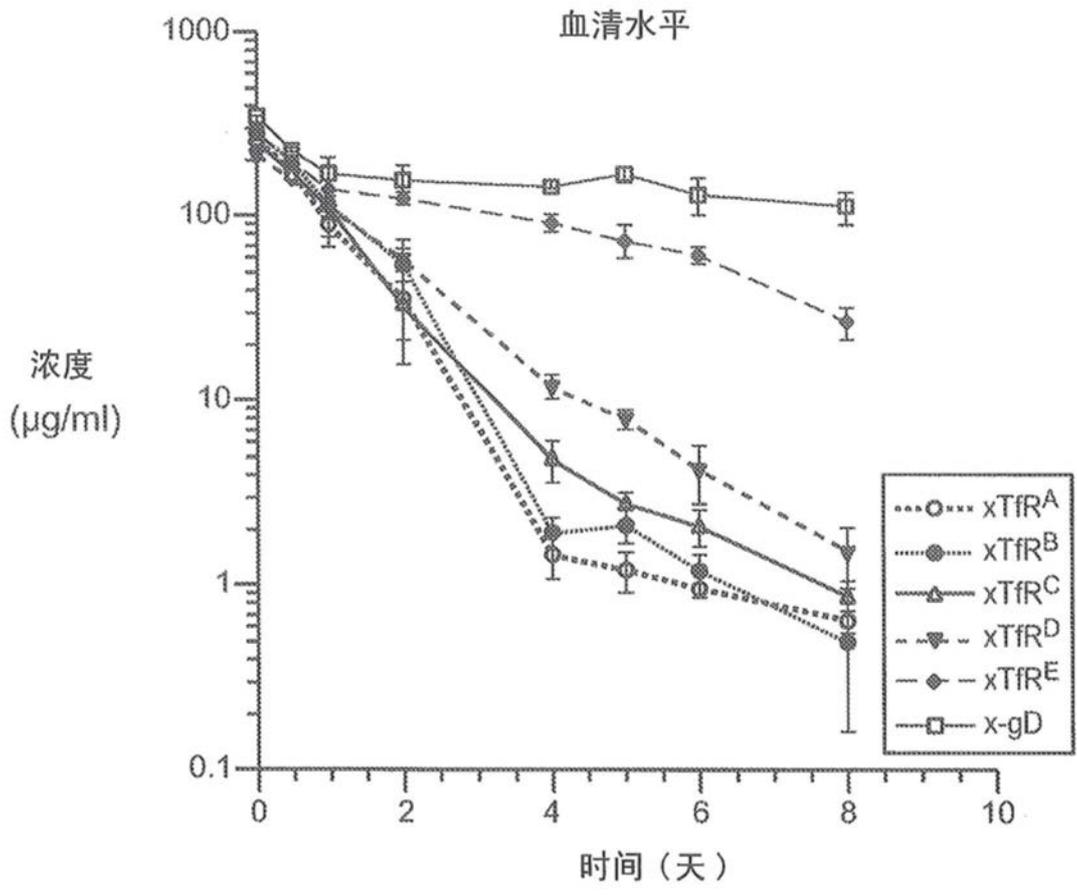


图8A

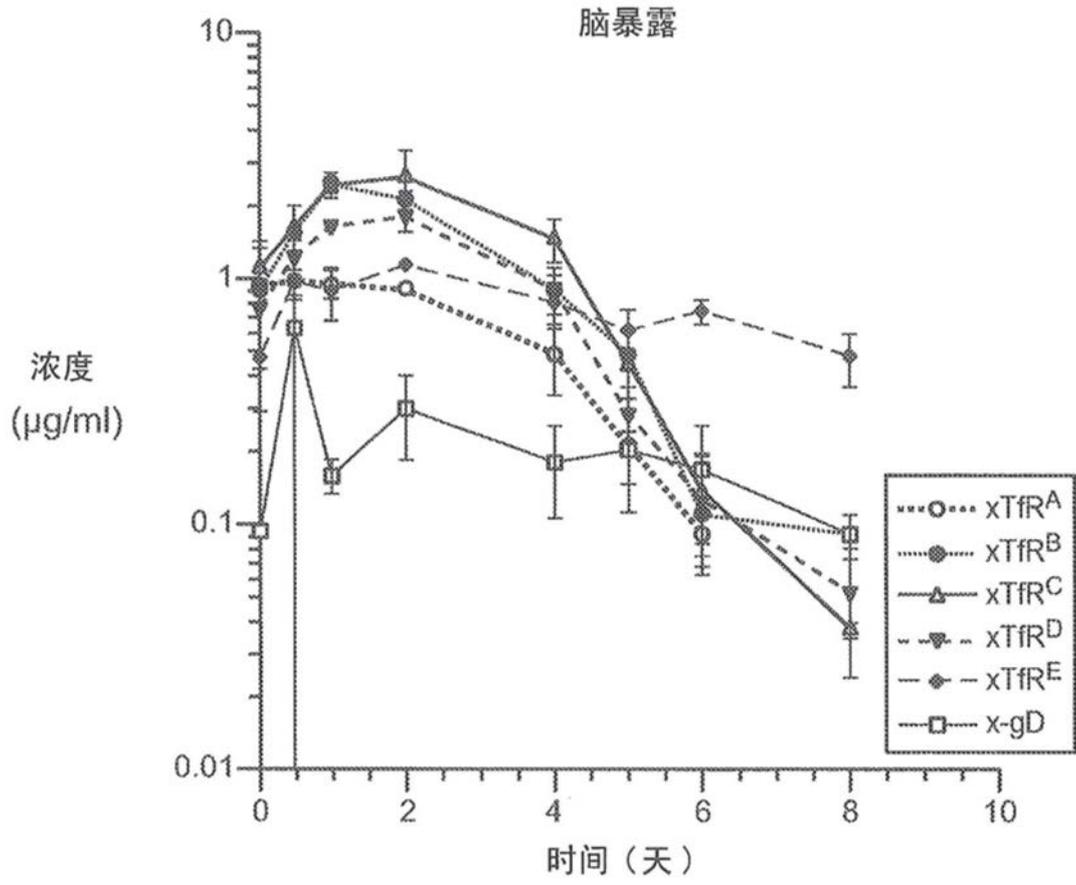


图8B

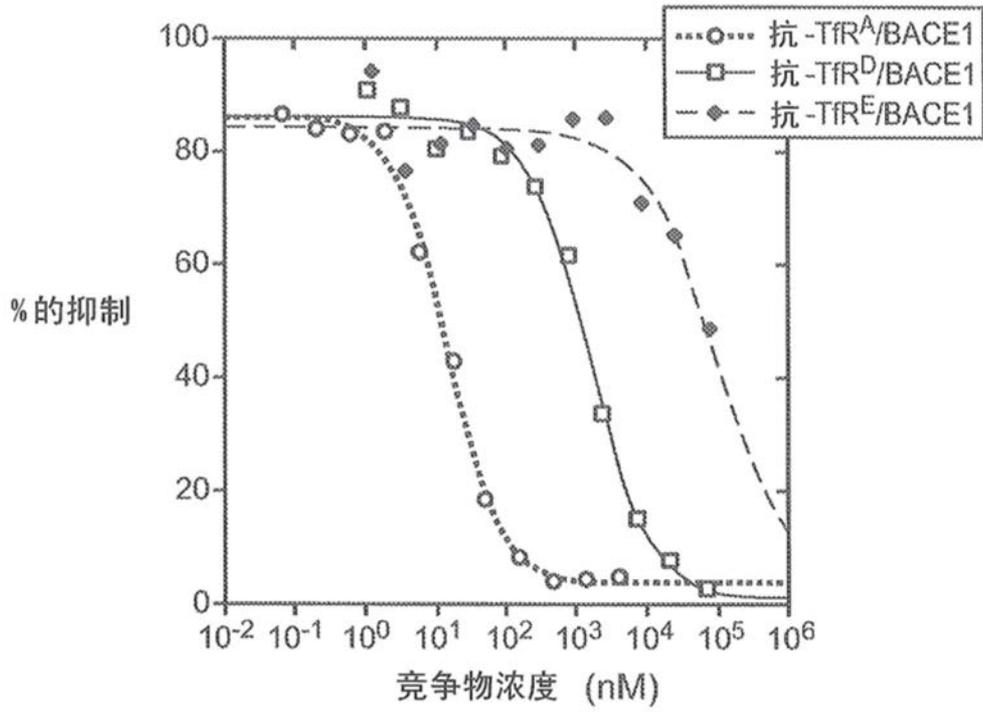


图9A

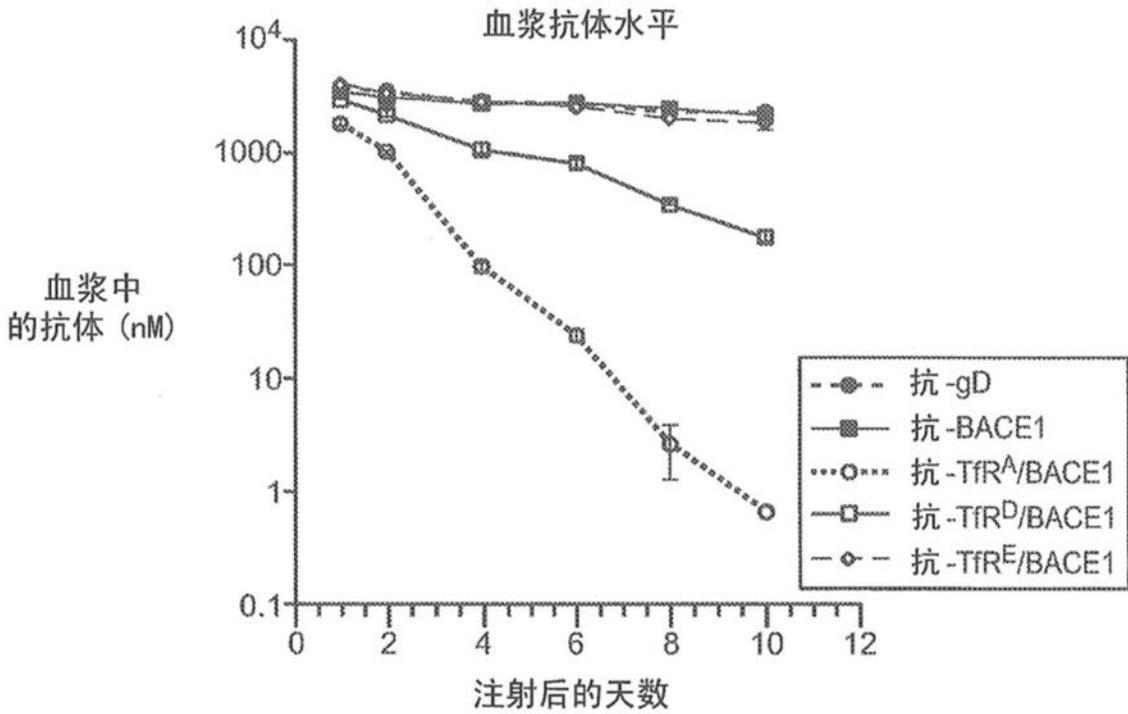


图9B

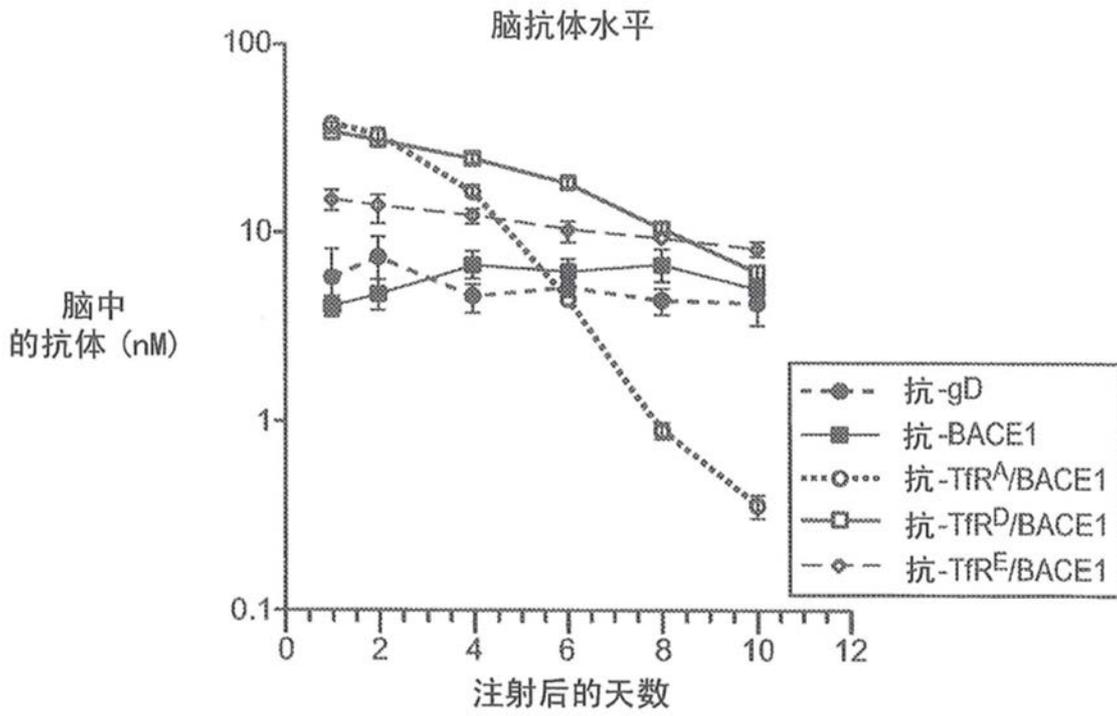


图9C

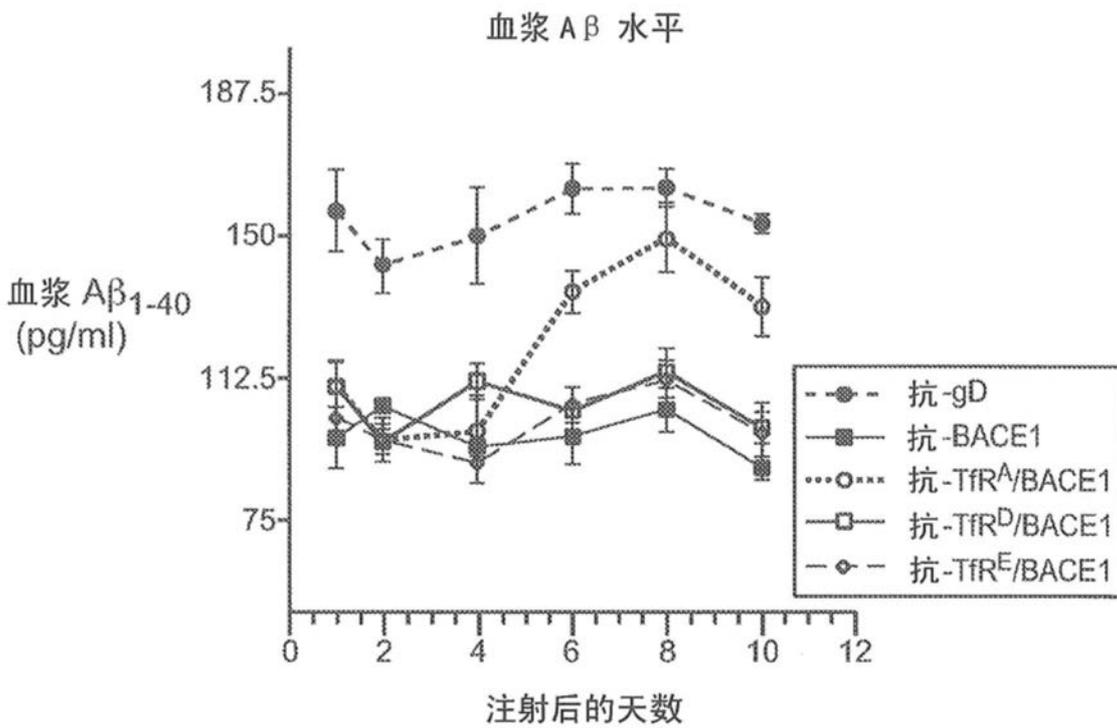


图9D

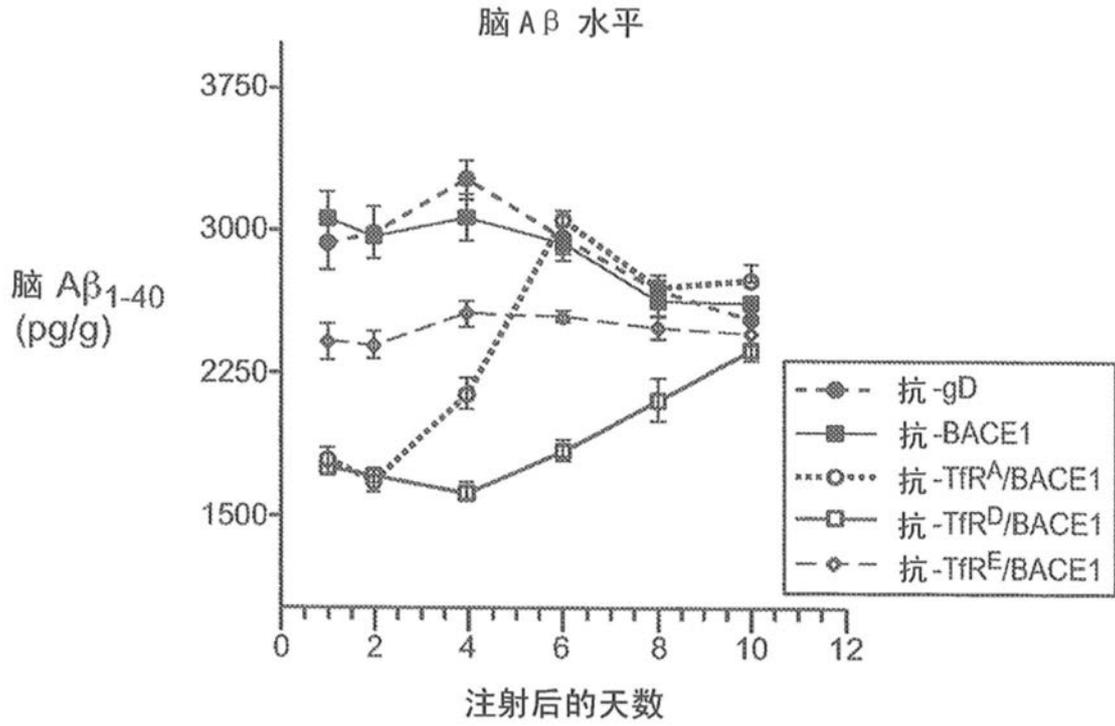


图9E

PS2APP 小鼠

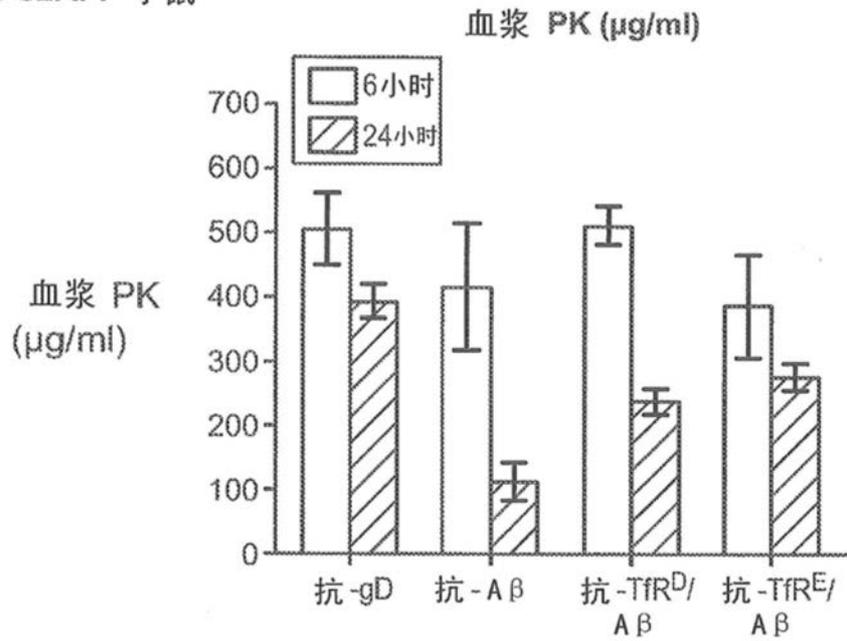


图10A

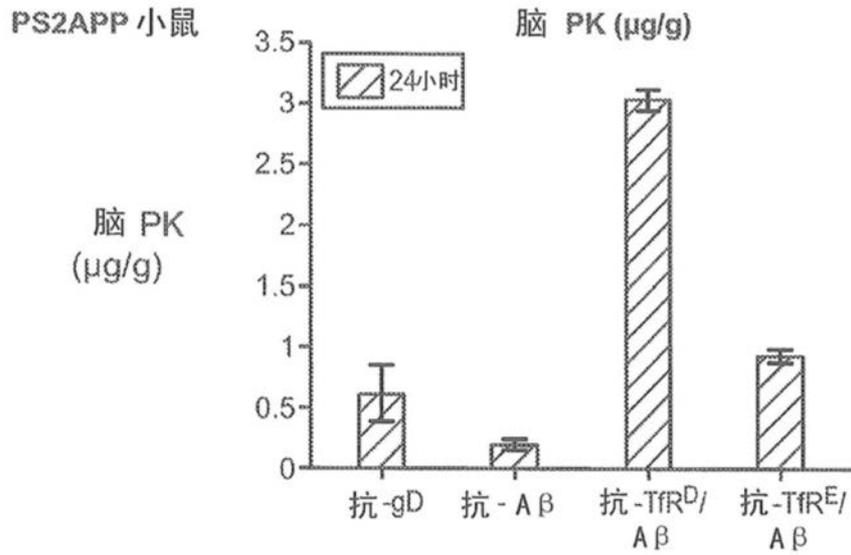


图10B

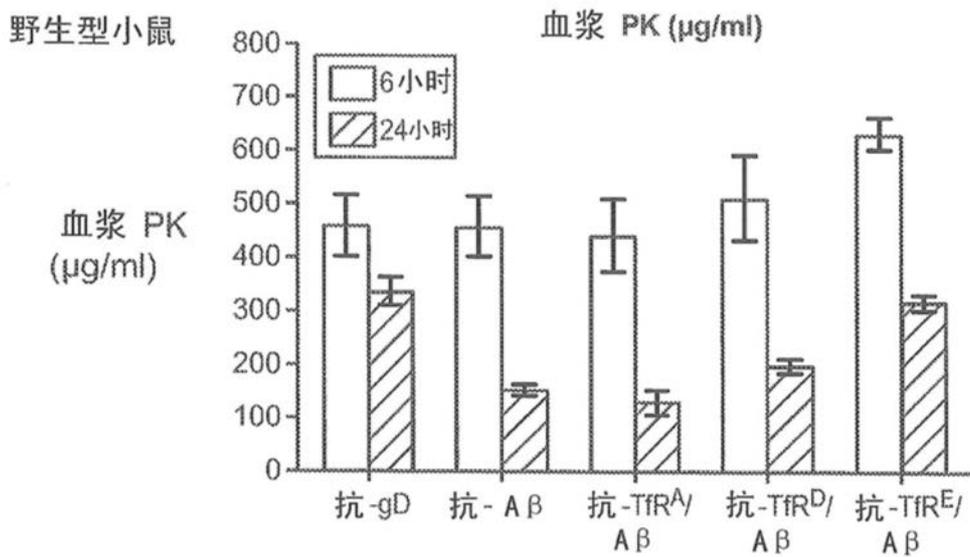


图11A

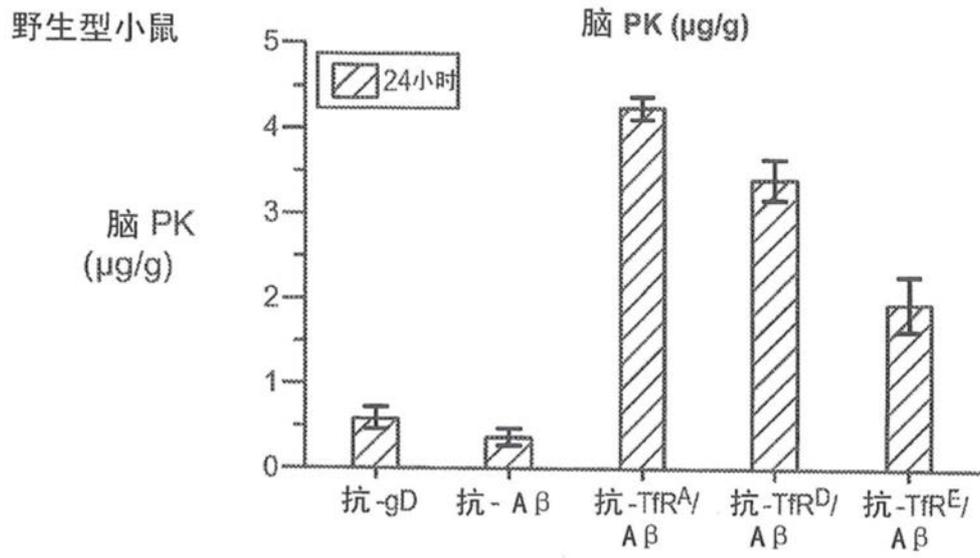


图11B