



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102659943 A

(43) 申请公布日 2012. 09. 12

(21) 申请号 201210137369. 8

C07K 1/18 (2006. 01)

(22) 申请日 2006. 12. 11

C07K 1/16 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 39/395 (2006. 01)

05027090. 9 2005. 12. 12 EP

A61P 25/00 (2006. 01)

A61P 25/28 (2006. 01)

(62) 分案原申请数据

A61P 25/16 (2006. 01)

200680046307. 9 2006. 12. 11

G01N 33/68 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

(71) 申请人 豪夫迈·罗氏有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 H·洛茨西尔 W·赫伯 D·舒鲍尔

K·魏尔 M·布洛克豪斯 B·宝曼

H·科尔 A·绍布玛 K·兰奇

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 韦东

(51) Int. Cl.

C07K 16/18 (2006. 01)

C07K 1/36 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 61 页

序列表 18 页 附图 40 页

(54) 发明名称

抗体可变区的糖基化

(57) 摘要

本发明涉及纯化抗体分子的制剂,其特征是重链可变区(V_H)中的至少一个抗原结合位点包含糖基化的天冬酰胺(Asn)。更具体说,提供了包含所述抗体分子和抗体混合物的药学和诊断性组合物,该组合物能够特异性识别β-A4肽/Aβ4。本发明具体涉及包含在重链可变区中有一个或两个具有糖基化天冬酰胺(Asn)的糖基化抗原结合位点的抗体混合物,即重链可变区(V_H)中含有糖基化Asn的抗体同种型的混合物。也公开了包含特异性糖基化抗体同种型的组合物或抗体制剂。而且提供了这些抗体的药学和诊断性用途。所述抗体同种型可用于药学干预淀粉样蛋白形成或淀粉样蛋白斑形成和/或这些病症的诊断。

1. 一种制备组合物中所含有的抗体分子的方法,所述抗体分子能特异性识别 β -A4 肽 /A β 4 的抗体分子,所述方法包括以下步骤:

- (a) 在培养的哺乳动物细胞中重组表达编码抗体分子的异源核酸分子;
- (b) 采用包括以下步骤的方法纯化所述重组表达的抗体分子:
 - (b1) 蛋白 A 柱纯化;
 - (b2) 离子交换柱纯化;和
 - (b3) 大小排阻柱纯化;和

所述组合物中所含的所述抗体分子是单糖基化的抗体分子或双糖基化的抗体分子,或所述组合物所含的所述抗体分子是所述单糖基化的抗体分子和所述双糖基化的抗体分子的混合物,

其中,所述抗体分子在重链可变区含有 SEQ ID NO:10 所示的 CDR1、SEQ ID NO:12 所示的 CDR2、和 SEQ ID NO:14 所示的 CDR3,在轻链可变区中含有 SEQ ID NO:16 所示的 CDR1、SEQ ID NO:18 所示的 CDR2 以及 SEQ ID NO:20 所示的 CDR3;和

其中,所述单糖基化的抗体分子在重链(VH)可变区含有一个糖基化的天冬氨酰(Asn),所述双糖基化的抗体分子在两个抗原结合位点的重链(VH)可变区含有糖基化的天冬氨酰(Asn),其中,重链(VH)可变区的所述糖基化天冬氨酰(Asn)位于 SEQ ID NO:12 所示的 CDR2 中;

所述组合物中少于 5% 的抗体分子的抗原结合位点的重链可变区(V_H)不含糖基化的天冬酰胺(Asn)。

2. 如而对方 1 所述的方法,其特征在于,所述离子交换柱纯化包括阳离子交换色谱。

3. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述方法还包括额外的步骤(c):分析色谱和/或进一步的浓缩步骤。

4. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述 β -A4 肽 /A β 4 具有如下序列或所述序列中至少 15 个氨基酸的部分:

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGATIGLMVGGVVIA (SEQ IDNO:3)。

5. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述抗体分子的至少一个抗原结合位点的重链可变区(V_H)包含一个糖基化的天冬酰胺(Asn),所述 V_H 由以下序列编码:

(a) 包含 SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列的核酸序列:CAGGTGGAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGG CCTGGTGCAACCGGGCGGCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCCTCCGGATTTACCTTTAGCAGCTATGCGATGAGCT GGGTGCGCCAAGCCCCTGGGAAGGTCTCGAGTGGGTGAGCGCTATTAATGCTTCTGGTACTCGTACTTATTATGCT GATTCTGTTAAGGGTCGTTTTACCATTTACGTGATAATTCGAAAAACACCCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCG TGCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTGGTAAGGGTAATACTCATAAGCCTTATGGTTATGTTTCGTTATT TTGATGTTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA;

(b) 编码含有 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列的多肽的核酸序列:QVELVESGGGLVQPGGSLR LSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAINASGTRTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARGKGNTHKPYGYVRYFDVWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:2);或

(c) 简并为(a)-(b)中任一项所述核酸序列的核酸序列。

6. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,含糖基化的天冬酰胺(Asn)的可变区包含在选自下组的重链中:

- (a) SEQ ID NO :5、23 或 25 所示核酸分子编码的重链多肽 ;或
 - (b) 含有 SEQ ID NO :6 或 26 所示氨基酸序列的重链多肽。
7. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述位于 V_H 区的 Asn 糖基化选自 :
- (a) 双触角复合物型糖结构 ;
 - (b) 双触角杂合型糖结构 ;
 - (c) 双触角寡甘露糖型的糖结构 ;和
 - (d) 附图 5 或 27 提供的任意结构的双触角糖结构。
8. 如权利要求 7 所述的方法,其特征在于,所述糖结构不包含核心岩藻糖化。
9. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述抗体分子是重组产生的
10. 如权利要求 9 所述的方法,其特征在于,所述抗体分子是在 CHO 细胞中产生的。
11. 如权利要求 11 所述的方法,其特征在于,所述 CHO 细胞为 CHO K1 或 CHO K1SV。
12. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述组合物为诊断性或药物组合物。
13. 采用权利要求 1 — 12 中任一项所述的方法制备得到的含有抗体分子的组合物。
14. 权利要求 13 所述的组合物在制备预防、改善和 / 或治疗淀粉样蛋白形成和 / 或淀粉斑形成相关性疾病的药物中的应用。
15. 权利要求 13 所述的组合物在制备检测淀粉样蛋白形成和 / 或淀粉斑形成相关性疾病的诊断试剂盒中的应用。
16. 权利要求 13 所述的组合物在制备分解 β 淀粉斑的药物中的应用。
17. 权利要求 13 所述的组合物在制备用于对 β 淀粉斑形成产生被动免疫的药物组合物中的应用。
18. 权利要求 13 所述的组合物在制备预防性治疗淀粉样蛋白形成和 / 或淀粉斑形成相关性疾病的药物组合物中的应用。
19. 如权利要求 18 所述的应用,其特征在于,预先存在的 β 淀粉斑或 β 淀粉斑聚集中间体将减少。
20. 权利要求 13 所述的组合物在制备诊断病人的淀粉样蛋白形成和 / 或淀粉斑形成相关性疾病或诊断病人对患上淀粉样蛋白形成和 / 或淀粉斑形成相关性疾病的易感性的诊断试剂盒中的应用。
21. 如权利要求 14、15、18-20 中任一项所述的应用,其特征在于,所述疾病为痴呆、阿尔茨海默病、运动神经病、唐氏综合征、库贾氏病、荷兰型遗传性脑出血伴淀粉样变、帕金森病、肌萎缩侧索硬化或衰老相关性神经元疾病。
22. 如权利要求 21 所述的应用,所述痴呆是 Lewy 体形成相关性痴呆或 HIV 相关性痴呆。
23. 一种试剂盒,其包含权利要求 13 所述的组合物或采用权利要求 1 — 12 中任一项所述的方法制备得到的抗体。

抗体可变区的糖基化

[0001] 本发明专利申请是国际申请号为 PCT/EP2006/011914、国际申请日为 2006 年 12 月 11 日、进入中国国家阶段的申请号为 200680046307.9、发明名称为“抗体可变区的糖基化”的发明专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及纯化抗体分子制剂,其特征是其中重链可变区(V_H)中至少一个抗原结合位点包含糖基化的天冬酰胺(Asn)。更具体说,所提供的纯化抗体分子能特异性识别 β -A4 肽/ $A\beta$ 4 并在重链可变区(V_H)中包含糖基化。本发明具体涉及包含在重链可变区中有糖基化天冬酰胺(Asn)的一个或两个糖基化抗原结合位点的抗体混合物、即重链可变区(V_H)中含有糖基化 Asn 的抗体同种型的混合物。也公开了包含特定糖基化抗体同种型的混合物或抗体制剂。而且提供了这些抗体的药学和诊断性用途。所述抗体同种型可用于(例如)药学干预淀粉样蛋白形成或淀粉样蛋白斑形成和/或其诊断性用途。

背景技术

[0003] 所有痴呆病例中约 70% 源于阿尔茨海默病,阿尔茨海默病与对认知至关重要的脑区和神经环路的选择性损伤有关。阿尔茨海默病的特征是神经纤维缠结,特别是在海马体神经元和众多包含大多数淀粉沉积致密核心和缓和晕圈(defused halos)的淀粉样蛋白斑中发生的神经纤维缠结。

[0004] 胞外神经炎性斑包含大量优势纤维肽,称为“ β 淀粉样蛋白”、“ $A-\beta$ ”、“ $A\beta$ 4”、“ β -A4”或“ $A\beta$ ”;参见 Selkoe(1994)、Ann. Rev. Cell Biol. 10, 373-403, Koo(1999), PNAS 96 卷, 9989-9990, US 4, 666, 829 或 Glenner(1984), BBRC 12, 1131。这种 β 淀粉样蛋白衍生自“阿耳茨海默前体蛋白/ β -淀粉样蛋白前体蛋白”(APP)。APP 是膜内在糖蛋白(参见 Sisodia(1992), PNAS, 89 卷, 6075 页)和被一种质膜蛋白酶 α -分泌酶在 $A\beta$ 序列内蛋白酶内切(参见 Sisodia(1992)、如上述引文)。而且,其它分泌酶活性,具体说是 β -分泌酶和 γ -分泌酶活性引起淀粉样蛋白- β ($A\beta$) 的胞外释放、 $A\beta$ 包含氨基酸 39 ($A\beta$ 39)、氨基酸 40 ($A\beta$ 40)、氨基酸 42 ($A\beta$ 42) 或氨基酸 43 ($A\beta$ 43);参见 Sinha(1999), PNAS 96, 11094-1053; Price(1998), Science 282, 1078-1083; WO 00/72880 或 Hardy(1997), TINS 20, 154。

[0005] 值得注意的是, $A\beta$ 具有数种天然产生的形式,其中人形式指上述提及的 $A\beta$ 39、 $A\beta$ 40、 $A\beta$ 41、 $A\beta$ 42 和 $A\beta$ 43。最主要的形式 $A\beta$ 42 具有如下氨基酸序列(从 N-末端开始): DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA (SEQ ID NO: 3)。在 $A\beta$ 41、 $A\beta$ 40、 $A\beta$ 39 中,分别丢失了 C-末端氨基酸 A、IA 和 VIA。在 $A\beta$ 43 形式中,上述序列 (SEQ ID NO: 3) 的 C 末端还包含一个苏氨酸残基。

[0006] $A\beta$ 40 原纤维成核所需时间明显长于 $A\beta$ 42 纤维成核;参见上述 Koo 引文和 Harper(1997), Ann. Rev. Biochem. 66, 385-407。如 Wagner(1999), J. Clin. Invest. 104, 1239-1332 所述,更常见 $A\beta$ 42 与神经炎性斑相关,认为它在体外更易形成纤维。

Jarrett(1993), Cell 93, 1055-1058 提示 A β 42 在有序非结晶性 A β 肽的成核依赖性多聚化中用作“晶种”。

[0007] 修饰的 APP 加工和 / 或产生包含蛋白样沉积物的细胞外斑不仅从阿尔茨海默病病理学中获知, 也从患有其它神经病和 / 或神经变性疾病的对象中获知。这些疾病特别包括唐氏综合征、荷兰型遗传性脑出血伴淀粉样变、帕金森病、ALS (肌萎缩侧索硬化)、库贾氏病、HIV- 相关痴呆和运动神经病。

[0008] 迄今, 仅描述过有限的淀粉样蛋白相关疾病的医疗干预方案。例如, 已讨论过胆碱酯酶抑制剂如加兰他敏、卡巴拉汀 (rivastigmine) 或多奈哌齐仅对于轻度到中度阿尔茨海默病患者有益。然而, 此类药物的胆碱能作用引起的不良事件也有报道。虽然此类胆碱能增强性治疗确能对某些症状产生益处, 但大多数治疗病人未能产生满意的治疗响应。据估计仅在约 5% 治疗病人中发生显著的认知提高, 很少有证据表明该治疗能够显著改变此进行性疾病的进程。因此, 临床上迫切需要更有效的治疗手段, 尤其需要那些能够阻止或延迟疾病进展的治疗手段。

[0009] 同样, 近来常用 NMDA- 受体拮抗剂, 如美金刚胺。然而, 由于其药理学活性引起的不良事件也有报道。此外, 此类利用 NMDA- 受体拮抗剂的治疗仅仅被认为是对症治疗方法而非改善疾病的方法。

[0010] 同样也提出了利用免疫调节的方法治疗淀粉样蛋白相关疾病。WO99/27944 公开了包含 A β 肽的某部分和运载体分子的偶联物, 其中所述运载体分子应增强免疫应答。WO 00/72880 提及另一主动免疫方法, 其中也使用 A β 片段诱导免疫应答。

[0011] WO 99/27944 或 WO 01/62801 中也提出了使用常规抗 -A β 抗体的被动免疫方法, WO 02/46237、WO 02/088306 和 WO 02/088307 描述了抗 A β 某部分的特异性人源化抗体。WO 00/77178 描述了与水解中 β -淀粉样蛋白采用的过渡状态结合的抗体。WO 03/070760 公开了识别 A β 肽上两个不连续氨基酸序列的抗体分子。

[0012] WO 03/016466 描述了一种人源化抗 -A β 抗体, 该抗体被修饰以避免其重链发生糖基化, 因为 Wallick(1988) J. Exp. Med. 168, 1099-1109 已假定抗体可变区中的糖基化。

发明内容

[0013] 本发明的根本技术问题在于提供有效的手段和方法以医学控制淀粉样蛋白疾病, 尤其是在需要 (相应) 医疗干预的病人中用于减少有害淀粉样蛋白斑的手段和方法。

[0014] 首先, 本发明提供了一种纯化抗体分子, 其特征是重链可变区 (V_H) 中至少一个抗原结合位点包含糖基化的天冬酰胺 (Asn)。本文提供的本发明纯化抗体或抗体组合物尤其靶向 A β 和 / 或 A β 片段。本文提供的纯化抗体分子, 具体是本发明抗体组合物或抗体制剂可用于制备药学或诊断性组合物以治疗、改善、预防淀粉样变和 / 或淀粉样斑形成相关性疾病。此类疾病的例子如阿尔茨海默病。

[0015] 本发明中, 惊人地发现重链可变区中至少一个抗原结合位点包含 N- 连接的糖基化的纯化抗体分子尤其可用于减少淀粉斑。而且, 发现本发明上下文中所提供的糖基化抗体或抗体组合物特别有用, 并通过有效斑结合显示能够有效跨越血脑屏障 / 血脑边界。

[0016] 本文与现有技术知识形成鲜明对比, WO 03/016466 公开了特别工程改造以使重链缺少 N- 糖基化位点的抗体, 并指出可变区中的糖基化对于抗体亲和力有消极作用。现有

技术中指出所述重链可变 CDR2 区去糖基化形式的抗 A β 抗体对体外合成和纯化的 A β 肽的亲合力明显较高。

[0017] 因此,本发明涉及改进的、纯化的抗体分子或抗体制剂,尤其是抗 A β 4/A β 肽(β 淀粉样蛋白)并在体内非常有效的抗体分子或抗体制剂。本发明抗体分子/抗体制剂的改进在于提供在至少一个重链可变区,如所述重链可变区的 CDR2 区中包含 N-糖基化的纯化抗体分子。如前所述,这与现有技术如 WO 03/016466 形成对比,WO 03/016466 指出在 A β 抗体中必须避免此类 N-糖基化。

[0018] 本发明抗体分子的例子为免疫球蛋白分子,如 IgG 分子。IgG 的特征在于包含两条重链和两条轻链(如图 14 所示),并且该类分子包含两个抗原结合位点。所述抗原结合位点包含“可变区”,其由重链(V_H)某部分和轻链(V_L)某部分组成。抗原-结合位点由 V_H 和 V_L 结构域并列形成。关于抗体分子或免疫球蛋白分子的一般信息也可参见普通教科书,如 Abbas 的“细胞和分子免疫学”,W. B. Saunders Company (W. B. 森德公司)(2003)。

[0019] 一方面,例如提供本发明鉴定的一种免疫球蛋白分子时,描述了一个抗原结合位点的相应重链可变区(V_H)中含有糖基化的天冬酰胺(Asn)的抗体。所述抗体在下文中称为“单糖基化的抗体”;参见图 14。

[0020] 另一方面,提供两个抗原结合位点的对应重链可变区(V_H)中均包含糖基化的天冬酰胺(Asn)的免疫球蛋白分子。所述抗体分子在下文中称为“双糖基化的抗体”,参见图 14。

[0021] 抗原结合位点的重链可变区(V_H)无糖基化的天冬酰胺(Asn)的免疫球蛋白在下文中称为“未糖基化的抗体”。

[0022] 单糖基化的抗体、双糖基化的抗体和未糖基化的抗体可包含同样的氨基酸序列或不同氨基酸序列。因此,术语“抗体”包括抗体分子,尤其是重组产生的抗体分子如免疫球蛋白。然而,如下文所讨论的,术语“抗体分子”也包含免疫球蛋白的已知同种型和修饰物,如单链抗体或单链 Fv 片段(scAB/scFv)或双特异性抗体构建物,所述同种型和修饰物的特征是包含至少一个如本文定义的糖基化 V_H 区。此类同种型或修饰物的具体例子可为 V_H - V_L 或 V_L - V_H 形式的 sc(单链)抗体,其中所述 V_H 包含本文所述糖基化。同样考虑到双特异性 scFv,其形式如 V_H - V_L - V_H - V_L 、 V_L - V_H - V_H - V_L 、 V_H - V_L - V_L - V_H ,其 CDR-2 区域包含本文所述糖基化。

[0023] 本发明上下文中,使用大写字母的术语“抗体”(ANTIBODY)是为了更清晰地表述。然而,小写的术语“抗体”(antibody)也用于本申请上下文中。“ANTIBODY”/“ANTIBODIES”/“antibody”和“antibodies”可互换使用。

[0024] 单糖基化的抗体和双糖基化的抗体在上文中称为“糖基化的抗体同种型”。特征在于重链可变区(V_H)中至少一个抗原结合位点包含糖基化天冬酰胺(Asn)的纯化抗体分子为单糖基化的抗体,它不含或含有很少的双糖基化抗体或未糖基化抗体,即是“纯化的单糖基化的抗体”。本发明上下文中双糖基化抗体不含或含有很少的单糖基化抗体或未糖基化抗体,即是“纯化的双糖基化抗体”。

[0025] 术语“不含或含有很少”指完全不含其它(糖基化)同种型或其它(糖基化)同种型的浓度最多 10%、如最多 5%、如最多 4%、如最多 3%、如最多 2%、如最多 1%、如最多 0.5%、如最多 0.3%、如最多 0.2%。下文和所附实施例将进一步提供此方面的信息。

[0026] 本发明上下文中,术语“单糖基化的抗体”涉及在单一抗体分子(如免疫球蛋白,如 IgG,如 IgG1)的一个(V_H)-区域中含有 N-糖基化的抗体分子。例如,所述“单糖基化形

式”的重链的一个可变区中包含糖基化,如下文所定义的天冬酰胺“Asn 52”位置。该“单糖基化的 IgG1 形式或单糖基化的同种型”也可包含(如本文所示)Fc-部分很保守的糖基化位点的糖基化,如非可变 Fc-部分的天冬酰胺 Asn 306。

[0027] 本发明所意的术语“双-糖基化的抗体”包括本文定义的两个重链可变区(V_H)的糖基化。再次,此“双糖基化的形式”的两条重链可变区均包含糖基化,具体指下文以及所附实施例所示的天冬酰胺 Asn 52 位点。此“双糖基化的 IgG1 形式或双糖基化的同种型”也可包含(如本文所示)在非可变/恒定 Fc-部分很保守的糖基化位点的糖基化,具体如免疫球蛋白的 306 位。附图 14 展示了相应的抗体分子。

[0028] 在本发明上下文中,将可变区,如重链可变区(两个(V_H)区)缺乏此类翻译后修饰的抗体被称为“未糖基化形式”,它的重链可变区不含糖基化。然而,此“未糖基化形式”仍可在抗体恒定区(C-区),如 Fc-部分通常很保守的糖基化位点,具体为本文所定义的非可变/恒定 Fc-部分的天冬酰胺(Asn)306 中包含糖基化,参见 SEQ ID NO:6。

[0029] 重链可变区(V_H)的糖基化天冬酰胺(Asn)可位于互补决定区 2(CDR2 区)。所述重链可变区(V_H)的糖基化天冬酰胺(Asn)可位于可变区 52 位,如下文和 SEQ ID No. 2 所示(或在 SEQ ID NO:6 的 52 位,也包含本文所述的抗体重链的 Fc-部分的)。

[0030] 抗体同种型在抗体分子的恒定/非可变部分,如 IgG 的 Fc-部分,如 IgG1 的 Fc-部分也可包含其它糖基化。Fc-部分的糖基化与很保守的糖基化(位点)有关,其特征是位于重链的 Asn306 位点,参见下列序列:

[0031] QVELVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV

[0032] SAINASGTRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA

[0033] RGKGNT HKPYGYVRYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG

[0034] GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV

[0035] TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG

[0036] GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH

[0037] NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE

[0038] KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES

[0039] NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEAL

[0040] HNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:6)

[0041] 下文同样描述了该序列,并且指出了 CDR、CH-区、重链区以及两个 N-糖基化位点(N52 和 N306):

[0042] QVELVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS **GFTFSSYAMS** WVRQAPGKGLEWV

[0043] S

[0044] **AINASGTRTYYADSVKG** RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA

[0045] R

[0046] **GKGNT HKPYGYVRYFDV** WGQGLTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG

[0047] GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV

[0048] TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCP PCPAPELLG

[0049]

GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH

[0050]

NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE

KTISKAKGQPREPOQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES

NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL

[0051] HNHYTOKSLSLSLSPGK(SEQ ID NO :6)

[0052] **加框**: CDR1、2、3

[0053] 下划线:CH1

[0054] 斜体:铰链区

[0055] 双下划线:CH2

[0056] 点下划线: CH3

[0057] 粗体 N :N- 连接的糖基化位点

[0058] 本发明抗体的 IgG-Fc 区域可为由下列区域组成的同源二聚体:链间二硫键铰链区、糖基化的 C_H2 结构域、C_H2 天冬酰胺 306 (Asn-306) 上携带的 N 连接的寡糖和非共价配对的 C_H3 结构域。Asn-306 上糖基化的寡糖为复合双触角型,可包含具有可变外臂糖的核心七聚糖结构。

[0059] 寡糖影响或者决定 Fc 结构和功能 (Jefferis(1998) Immunol Rev. 163、50-76)。Jefferis(2002) Immunol Lett. 82(1-2), 57-65 和 Krapp(2003) J Mol Biol. 325(5), 979-89 讨论了效应物功能、特定 IgG-Fc 的编号 / 效应物配体相互作用。该保守 Fc- 位置 Asn-306 与 Kabat- 系统的 “Asn-297” 对应 (Kabat(1991) 免疫学感兴趣的蛋白序列 (Sequence of Proteins of Immunological Interest), 第 5 版, 国立卫生研究院公共卫生服务中心 (Public Health Service, National Institutes of Health, 马里兰州贝塞斯达 (Bethesda MD)))。

[0060] 示例性重链可由下列序列编码:

[0061] caggtggaattggtggaaagcggcgccgctggtgcaaccggcgccgagcctgcgtctgagctgcgcg gcc

[0062] tccgatttaccttttagcagctatgcgatgagctgggtgcgccaagcccctgggaagggtctcgagtgg gtagc

[0063] gctattaatgcttctggtactcgctacttattatgctgattctgttaagggtcgttttaccatttcacgt gataattcgaaaa

[0064] acaccctgtatctgcaaataaacagcctgcgtgcggaagatacggccgtgtattattgcgcgcgtggta agggta

[0065] atactcataagccttatggttatgttcgttattttgatgtttggggccaaggcaccctggtgacggtta

gctcagcctc

[0066] caccaagggtccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggcacagcggccct
gggct

[0067] gcctgggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgccttgaccagcggcg
tgca

[0068] caccttcccggctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtgggtgaccgtgcctccag
cagcttg

[0069] ggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgag
ccca

[0070] gatatcgtgcgatatcgtgcaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgccagcacctgaact
cctgggg

[0071] ggaccgtcagttcttcttccccccaaaacccaaggacacctcatgatctcccgaccctgaggtc
acatgc

[0072] gtggtggtggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactgggtacgtggacggcgtggaggtg
cata

[0073] atgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgggtgggtcagcgtcctcacgtcc
tgc

[0074] accaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcg
agaa

[0075] aaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatcccgggatga
gctg

[0076] accaagaaccaggtcagcctgacctgcctgggtcaaaggttctatcccagegacatgccgtggagtgg
gaga

[0077] gcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcc
tctac

[0078] agcaagctcacctggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgag
gctct

[0079] gcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatga (SEQ ID NO :5)。

[0080] 所述重链也可包含（尤其在重组产生过程中）其它序列，如“前导序列”。

[0081] 对应的例子由下列序列编码：

[0082] atgaaacacctgtggttcttctcctgctggtggcagctcccagatgggtcctgtcc (后接)

[0083] caggtggaattggtggaaagcggcgggcggcctggtgcaaccgggcggcagcctgcgtctgagctgcgcg
gcc

[0084] tccgattttaccttttagcagctatgcgatgagctgggtgcgccaagccctgggaagggtctcgagtgg
gtgagc

[0085] gctattaatgcttctggtactcgtaacttattatgctgattctgttaagggtcgttttaccatttcacgt
gataattcgaaaa

[0086] acacctgtatctgcaaatgaacagcctgcgtgcggaagatacggcctgtattattgcgcgcgtggta
agggtg

[0087] atactcataagccttatggttatgttcgttatTTTTgatgtttggggccaaggcaccctggtgacggtta
gctcagcctc

[0088] caccaaggggtccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggcacagcgccct
gggct

[0089] gcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcg
tgca

[0090] caccttcccggctgtcctacagtctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgcctccag
cagcttg

[0091] ggcaccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgag
ccca

[0092] aatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgccagcacctgaactcctggggggaccgtcagtct
tcctctt

[0093] cccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgt
gagc

[0094] cacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaagacaag
ccgc

[0095] gggaggagcagtacaacagcacgtaccgggtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctga
atgg

[0096] caaggagtacaagtgcagggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagc
caaa

[0097] gggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtc
agc

[0098] ctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccg
gaga

[0099] acaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccg
tgga

[0100] agagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggtctgcacaaccactaca
cgag

[0101] aagagcctctccctgtctccgggtaaata (SEQ ID NO :25)

[0102] 对应的氨基酸序列为：

[0103] MKHLWFFLLLVAAPRWLS (后接)

[0104] QVELVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSA

[0105] INASGTRTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGK

[0106] GNTHKPYGYVRYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL

[0107] GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLG

[0108] TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK

[0109] PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY

[0110] NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ

[0111] VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV

[0112] DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO :26)

[0113] 上述序列也包含“信号肽”，在宿主细胞如 CHO 细胞中产生本发明抗体分子时，所述信号肽在分泌途径中被宿主信号肽酶酶解切割。

[0114] 或者，所述重链可由根据重组产生优化的核酸序列编码，如下列序列所示：

[0115] 1 ~~atg~~ gagtttg ggctgagctg ggttttcttc gttgctcttt taagaggtga

[0116] 51 ttcatggaga aatagagaga ctgagtgtga gtgaacatga gtgagaaaaa

[0117] 101 ctggatttgt gtggcatttt ctgataacgg tgccttctg tttgcagggt

[0118] 151 tccagtgt

[0119] 后接

[0120] ca ggtggagctg gtggagtctg ggggaggcct ggtccagcct

[0121] 201 ggggggtccc tgagactctc ctgtgcagcg tctggattca cttcagtag

[0122] 251 ctatgccatg agctgggtcc gccaggctcc aggcaagggg ctgagtgagg

[0123] 301 tgtccgccat aaacgccagc ggtaccgcga cctactatgc agactccgtg

[0124] 351 aagggccgat tcaccatctc cagagacaat tccaagaaca cgctgtatct

[0125] 401 gcaaatgaac agcctgagag ccgaggacac ggctgtgtat tactgtgcga

[0126] 451 gaggcaaggg gaacacccac aagccctacg gctacgtacg ctactttgac

[0127] 501 gtgtggggcc aaggaaccct ggtcaccgtc tctcagggtg agtctcaca

[0128] 551 acctctctcc tgcggccgca gcttgaagtc tgaggcagaa tcttgtccag

[0129] 601 ggtctatcgg actcttgtga gaattagggg ctgacagttg atggtgacaa

[0130] 651 tttcagggtc agtgactgtc tggtttctct gaggtgagac tggaatatag

[0131] 701 gtcaccttga agactaaaga ggggtccagg ggcttttctg cacaggcagg

[0132] 751 gaacagaatg tggaacaatg acttgaatgg ttgattcttg tgtgacacca

[0133] 801 agaattggca taatgtctga gttgcccaag ggtgatctta gctagactct

[0134] 851 ggggtttttg tgggtacag aggaaaaacc cactattgtg attactatgc

[0135] 901 tatggactac tggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc tcaggtaaga

[0136] 951 atggcctctc caggctctta tttttaacct ttgttatgga gttttctgag

[0137] 1001 cattgcagac taatcttgga tatttgcctt gagggagccg gctgagagaa

[0138] 1051 gttgggaaat aaatctgtct agggatctca gacccttag gacagattat

[0139] 1101 ctccacatct ttgaaaaact aagaatctgt gtgatgggtg ttggtggagtc

[0140] 1151 cctggatgat gggataggga ctttggaggc tcatttgagg gagatgctaa

[0141] 1201 aacaatccta tggctggagg gatagttggg gctgtagttg gagattttca

[0142] 1251 gtttttagaa tgaagtatta gctgcaatac ttcaaggacc acctctgtga

[0143] 1301 caaccatttt atacagtatc caggcatagg gacaaaaagt ggagtggggc

[0144] 1351 actttcttta gatttgtgag gaatgttcca cactagattg tttaaaactt

[0145] 1401 catttggttg aaggagctgt cttagtatt gagtcaaggg agaaaggcat

[0146] 1451 ctagectcgg tctcaaaagg gtagttgctg tctagagagg tctgggtggag

[0147] 1501 cctgcaaaag tccagctttc aaaggaacac agaagtatgt gtatggaata

[0148] 1551 ttagaagatg ttgcttttac tcttaagttg gttcctagga aaaatagtta

[0149] 1601 aatactgtga ctttaaaatg tgagagggtt ttcaagtact cattttttta

[0150] 1651 aatgtccaaa atttttgtca atcaatttga ggtcttgttt gtgtagaact
[0151] 1701 gacattactt aaagtttaac cgaggaatgg gagtgaggct ctctcatacc
[0152] 1751 ctattcagaa ctgactttta acaataataa attaagttaa aaatattttt
[0153] 1801 aaatgaattg agcaatgttg agttgagtca agatggccga tcagaaccgg
[0154] 1851 aacacctgca gcagctggca ggaagcaggt catgtggcaa ggctatttgg
[0155] 1901 ggaaggga aaataaaccac taggtaaact tgtagctgtg gtttgaagaa
[0156] 1951 gtggttttga aacactctgt ccagcccccac caaaccgaaa gtccaggctg
[0157] 2001 agcaaaacac cacctgggta atttgcattt ctaaaataag ttgaggattc
[0158] 2051 agccgaaact ggagagggtcc tcttttaact tattgagttc aaccttttaa
[0159] 2101 ttttagcttg agtagttcta gtttcccca acttaagttt atcgacttct
[0160] 2151 aaaatgtatt tagaattcga gctcgggtaca gctttctggg gcaggccagg
[0161] 2201 cctgaccttg gctttggggc agggaggggg ctaagggtgag gcagggtggc
[0162] 2251 ccagcaggtg cacacccaat gcccatgagc ccagacactg gacgctgaac
[0163] 2301 ctgcgagaca gttaagaacc caggggcctc tgcgcctggg ccagctctg
[0164] 2351 tcccacaccg cggtcacatg gcaccacctc tcttgagcc tccaccaagg
[0165] 2401 gcccatcggt ctccccctg gcacctcct ccaagagcac ctctgggggc
[0166] 2451 acagcggccc tgggtgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac
[0167] 2501 ggtgtcgttg aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttcccgg
[0168] 2551 ctgtcctaca gtctcagga ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg
[0169] 2601 ccctccagca gcttgggcac ccagacctac atctgcaacg tgaatcaciaa
[0170] 2651 gccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgggtgagagg ccagcacagg
[0171] 2701 gagggagggt gtctgttgga agccaggctc agcgctcctg cctggacgca
[0172] 2751 tcccggctat gcagccccag tccagggcag caaggcaggc cccgtctgcc
[0173] 2801 tcttaccceg gacgctctgc ccgccccact catgctcagg gagagggtct
[0174] 2851 tctggctttt tcccaggctc tgggcaggca caggctaggt gcccctaacc
[0175] 2901 caggccctgc acacaaaggg gcaggtgctg ggctcagacc tgccaagagc
[0176] 2951 catatccggg aggacctgc ccctgacctc agcccccccc aaaggccaaa
[0177] 3001 ctctccactc cctcagctcg gacaccttct ctctcccag attccagtaa
[0178] 3051 ctcccaatct tctctctgca gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca
[0179] 3101 tgcccaccgt gccaggttaa gccagcccag gcctcgccct ccagctcaag
[0180] 3151 gggggacagg tgccctagag tagcctgcat ccagggacag gccccagccg
[0181] 3201 ggtgtctgca cgctccacct catctcttcc tcagcacctg aactcctggg
[0182] 3251 gggaccgtca gtcttctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga
[0183] 3301 tctcccggac ccctgaggct acatgcgttg tgggtggacgt gagccacgaa
[0184] 3351 gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgttg aggtgcataa
[0185] 3401 tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgttg
[0186] 3451 tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac
[0187] 3501 aagtgaagg tctccaacaa agccctccca gcccccatcg agaaaaccat
[0188] 3551 ctccaaagcc aaaggtggga cccgtggggg gcgagggccca catggacaga

[0189] 3601 ggccggctcg gccaccctc tgccctgaga gtgaccgctg taccaacctc
[0190] 3651 tgtccctaca gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat
[0191] 3701 cccgggatga gctgaccaag aaccaggtca gcctgacctg cctgggtcaaa
[0192] 3751 ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc
[0193] 3801 ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc gacggctcct
[0194] 3851 tcttcctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg
[0195] 3901 aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac
[0196] 3951 gcagaagagc ctctccctgt ccccgggcaa atga (SEQ ID NO :23)

[0197] SEQ ID NO :23 所示“选择性”蛋白序列包含与第一备选物相同的编码序列,然而在一些稍有区别的基因组组成中,包含其它内含子和稍有区别的“前导序列”/“信号序列”。所述“前导序列”也可包含如上所示(其它)内含子。本领域熟练技术人员通过常规方法易于推导出本文所示序列中相应的外显子/内含子结构。

[0198] 本文所述示例抗体也包含轻链,所述轻链可包含或具有下述氨基酸序列:

[0199] DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIY
[0200] GASSRATGVPARFSGSGSTDFLTLSLEPEDFATYYCLQIYNMPITFGQ
[0201] GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
[0202] DNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ
[0203] GLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO :8)

[0204] 其可由下列核酸序列编码:

[0205] gatatcgtgctgaccagagccccggcgaccctgagcctgtctccggcggaacgtgcgaccctgagctgc
agag
[0206] cgagccagagcgtgagcagcagctatctggcgtggtaccagcagaaaccaggtcaagcaccgcgtctat
taatt
[0207] tatggcgcgagcagccgtgcaactgggggtcccgcgcggttttagcggctctggatccggcacggatttt
accctg
[0208] accattagcagcctggaacctgaagactttgcgacttattattgccttcagattttataatatgcctatt
acctttggcca
[0209] gggtagcgaagttgaaattaaacgtacggtggtgcaccatctgttctcatcttcccgccatctgatga
gcagttga
[0210] aatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtgga
aggtgga
[0211] taacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacag
cctc
[0212] agcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccat
cagg
[0213] gcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgttag (SEQ ID NO :7)。
[0214] 本文所述示例抗体的“轻链”也包含在技术生产中尤其有用的“前导序列”。
[0215] 相应序列可为(或可包含于(例如)载体系统中)下列序列:
[0216] atgggtgttcgagaccaggtcttcatcttctgttgctctggatctctgggtgcctacggg (后接)

- [0217] gatatcgtgctgaccagagccccggcgaccctgagcctgtctccggcggaacgtgcgaccctgagctgc
agagcga
- [0218] gccagagcgtgagcagcagctatctggcgtggtaccagcagaaaccagggtcaagcaccgcgtctattaa
tttatggcg
- [0219] cgagcagccgtgcaactgggggtcccgcgcggttttagcggctctggatccggcacggattttacctga
ccattagcag
- [0220] cctggaacctgaagactttgcgacttattattgccttcagatttataatatgcctattacctttggcca
gggtacgaaagtga
- [0221] aattaaacgtacgggtggctgcaccatctgtcttcattctcccgccatctgatgagcagttgaaatctgg
aactgcctctgttg
- [0222] tgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtgggaaggtggataacgccctccaat
cgggtaactc
- [0223] ccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgag
caaagc
- [0224] agactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaa
gagcttcaa
- [0225] caggggagagtgttag (SEQ ID NO :27)
- [0226] 所述序列编码下列氨基酸序列：
- [0227] MVLQTQVFISLLLWISGAYG (后接)
- [0228] DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIY
- [0229] GASSRATGVPARFSGSGGTDFLTLSLEPEDFATYYCLQIYNMPITFGQ
- [0230] GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
- [0231] DNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ
- [0232] GLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO :28)
- [0233] 或者,所述轻链可由根据重组产生优化的核酸序列编码,如下列序列所示：
- [0234] 1 **atg** gacatga gggtcctcgc tcagctcctg gggctcctgc tgctctgttt
- [0235] 51 cccaggtaa gatggagaa actagcagtt tactcagccc aggggtgetca
- [0236] 101 gtactgcttt actattcagg gaaattctct tacaacatga ttaattgtgt
- [0237] 151 ggacatttgt ttttatgttt ccaatctcag gcgccagatg t
- [0238] 后接
- [0239] gatatcgtg
- [0240] 201 ttgacgcagt ctccagccac cctgtctttg tctccagggg aaagagccac
- [0241] 251 cctctcctgc cgggccagtc agagtgttag cagcagctac ttagcctggt
- [0242] 301 accagcagaa acctggccag gcgccaggc tctcatcta tggcgcattc
- [0243] 351 agcagggcca ctggcgtgcc agccagggtc agtggcagtg ggtctgggac
- [0244] 401 agacttcaact ctcaccatca gcagcctgga gcctgaagat ttcgcgacct
- [0245] 451 attactgtct gcagatttac aacatgccta tcacgttcgg ccaagggacc
- [0246] 501 aaggtggaaa tcaaactga gtagaattta aactttgcgg ccgcctagac
- [0247] 551 gtttaagtgg gagatttgga ggggatgagg aatgaaggaa cttcaggata

[0248] 601 gaaaagggct gaagtcaagt tcagctccta aaatggatgt gggagcaaac
[0249] 651 tttgaagata aactgaatga ccagaggat gaaacagcgc agatcaaaga
[0250] 701 ggggcctgga gctctgagaa gagaaggaga ctcatccgtg ttgagtttcc
[0251] 751 acaagtactg tcttgagttt tgcaataaaa gtgggtagc agagttgagt
[0252] 801 gagccgtagg ctgagttctc tcttttgtct cctaagtttt tatgactaca
[0253] 851 aaaatcagta gtatgtcctg aaataatcat taagctgttt gaaagtatga
[0254] 901 ctgcttgcca tgtagatacc atgtcttgct gaatgatcag aagagggtgtg
[0255] 951 actcttattc taaaatttgt cacaaaatgt caaaatgaga gactctgtag
[0256] 1001 gaacgagtcc ttgacagaca gctcaagggg tttttttcct ttgtctcatt
[0257] 1051 tctacatgaa agtaaatttg aaatgatctt ttttattata agagtagaaa
[0258] 1101 tacagttggg tttgaactat atgttttaat ggccacgggt ttgtaagaca
[0259] 1151 tttggctcct tgttttccca gttattactc gattgtaatt ttatatcgcc
[0260] 1201 agcaatggac tgaaacggtc cgcaacctct tctttacaac tgggtgacct
[0261] 1251 cgcggctgtg ccagccattt ggcgttcacc ctgccgctaa gggccatgtg
[0262] 1301 aacccccgcg gtagcatccc ttgctccgcg tggaccactt tcctgaggca
[0263] 1351 cagtgatagg aacagagcca ctaatctgaa gagaacagag atgtgacaga
[0264] 1401 ctacactaat gtgagaaaaa caaggaaagg gtgacttatt ggagatttca
[0265] 1451 gaaataaaat gcatttatta ttatatccc ttattttaat tttctattag
[0266] 1501 ggaattagaa agggcataaa ctgctttatc cagtgttata ttaaaagctt
[0267] 1551 aatgtatata atcttttaga ggtaaaatct acagccagca aaagtcatgg
[0268] 1601 taaatattct ttgactgaac tctactaaa ctccctctaaa ttatatgtca
[0269] 1651 tattaactgg ttaaattaat ataaatttgt gacatgacct taactggtta
[0270] 1701 ggtaggatat tttcttcat gcaaaaatat gactaataat aatttagcac
[0271] 1751 aaaaatattt cccaatactt taattctgtg atagaaaaat gtttaactca
[0272] 1801 gctactataa tcccataatt ttgaaaacta tttattagct tttgtgttg
[0273] 1851 acccttcct agccaaagge aactatttaa ggacccttta aaactcttga
[0274] 1901 aactacttta gagtcattaa gttatttaac cacttttaac tactttaaaa
[0275] 1951 tgatgtcaat tcccttttaa ctattaattt attttaagg gggaaaaggct
[0276] 2001 gctcataatt ctattgtttt tcttggtaaa gaactctcag ttttcgtttt
[0277] 2051 tactacctct gtcaccaag agttggcatc tcaacagagg ggactttccg
[0278] 2101 agaggccatc tggcagttgc ttaagatcag aagtgaagtc tgccagttcc
[0279] 2151 tcccaggcag gtggcccaga ttacagttga cctgttctgg tgtggctaaa
[0280] 2201 aattgtccca tgtggttaca aaccattaga ccagggtctg atgaattgct
[0281] 2251 cagaatattt ctggacaccc aaatacagac cctggcttaa ggccctgtcc
[0282] 2301 atacagtagg tttagcttgg ctacaccaa ggaagccata cagaggctaa
[0283] 2351 tatcagagta ttcttggag agacaggaga aaatgaaagc cagtttctgc
[0284] 2401 tcttacetta tgtgcttggt ttcagactcc caaacatcag gagtgcaga
[0285] 2451 taaactggtc tgaatctctg tctgaagcat ggaactgaaa agaattgagt
[0286] 2501 ttcagggaag aaaggcaata gaaggaagcc tgagaatacg gatcaattct

[0287] 2551 aaactctgag ggggtcggat gacgtggcca ttctttgcct aaagcattga
[0288] 2601 gtttactgca aggtcagaaa agcatgcaaa gccctcagaa tggctgcaaa
[0289] 2651 gagctccaac aaaacaattt agaactttat taaggaatag ggggaagcta
[0290] 2701 ggaagaaact caaaacatca agatttttaa tacgcttctt ggtctccttg
[0291] 2751 ctataattat ctgggataag catgctgttt tctgtctgtc cctaaccatgc
[0292] 2801 cctgtgatta tccgcaaaca acacacccaa gggcagaact ttgttactta
[0293] 2851 aacaccatcc tgtttgcttc ttctctcagg aactgtggct gcaccatctg
[0294] 2901 tcttcatctt cccgccatct gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct
[0295] 2951 gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc agagaggcca aagtacagtg
[0296] 3001 gaaggtggat aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag agtgtcacag
[0297] 3051 agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg
[0298] 3101 agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca
[0299] 3151 tcagggcctg agctcgcccg tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt
[0300] 3201 ag(SEQ ID NO:24)

[0301] 上述示例性轻链“序列”同样具有稍有不同的基因组结构。“选择性序列”包含不同的和/或另外的内含子。因此,对描述“重链”的实施方式加以必要的变更。

[0302] 本发明的上下文中,术语“抗体分子”涉及完整免疫球蛋白分子,如 IgM、IgD、IgE、IgA 或 IgG,如 IgG1、IgG2、IgG2b、IgG3 或 IgG4,以及此类免疫球蛋白分子的某部分,如 Fab- 片段、Fab'- 片段、F(ab)2- 片段、嵌合 F(ab)2 或嵌合 Fab' 片段、嵌合 Fab- 片段或分离的 V_H- 或 CDR- 区(将所述分离的 V_H- 或 CDR- 区整合入或工程改造入相应“框架区”)。术语“抗体分子”也包括包含作为连接于至少一种抗原结合部分/肽如 WO 00/24782 所述肽体的载体的抗体 Fc 结构域的双抗体和分子。因此,本文上下文中的术语“重链可变区(V_H)”不限于完整免疫球蛋白的可变区,而且涉及所述重链可变区(V_H)的对应部分,如 CDR,或单独或组合的 CDR1、2 和/或 3,或可变区的对应“框架”。因此,本发明的抗体分子可以是抗体构建物,该构建物可含有作为抗原结合位点的糖基化重链给定可变区(V_H)的 CDR 或至少一个 CDR。如本文所述,使本发明抗体构建物中所述重链可变区(V_H)的所述对应部分糖基化,例如,在抗原结合位点包含糖基化的天冬酰胺(Asn)。重链可变区(V_H)“隔离部分”的例子是本文列举的 SEQ ID NO:12 包含的 CDR2 区(或由 SEQ ID NO:11 所示核酸序列编码)。

[0303] 而且,术语“抗体分子”涉及修饰的和/或改变的抗体分子,像嵌合、人源化或完全人源化抗体。

[0304] 所述“完全人源化抗体”分子也鉴定和记述为“完全人”抗体。可通过本领域已知方法产生所有此类抗体。例如,通过噬菌体展示技术,可采用体外成熟法产生重组抗体分子,该方法如 Knappik(2000) J Mol Biol. 296(1), 57-86 和 Rauchenberger(2003), J Biol Chem. 278(40), 38194-205 所述使用完全人免疫球蛋白 γ 和亚类 -1 框架(IgG1)。

[0305] 如所附实施例所述,术语抗体涉及如 IgG 分子和 IgG1。该术语也涉及修饰的或改变的单克隆或多克隆抗体,同样涉及重组的或合成产生/合成的抗体。该术语同样涉及完整抗体及其抗体片段/部分,如分离的轻链和重链、Fab、Fab/c、Fv、Fab' 和 F(ab')₂。术语“抗体分子”也包括抗体衍生物、双功能抗体和抗体构建物,如单链 Fvs(scFv) 或抗体-融合蛋白。同样可设想包含糖基化 V_H 结构域的催化和/或蛋白水解抗体,如本文所定义的糖基

化 V_H -CDR。术语“抗体分子”也涉及重组生产的抗体分子 / 抗体构建物,它们除一种特异性外(如抗 $A\beta$ / $A\beta$),还可包括其它或更多特异性。此类构建物可包括但不限于“双特异性”或“三特异性”构建物。本发明术语“抗体分子”的其它细节见下。

[0306] 上文指出并考虑到至少一个抗原结合位点,如至少一个本文所述的糖基化的重链可变区中包含本文所定义的糖基化的单链抗体、嵌合抗体、CDR- 嫁接抗体、二价抗体 - 构建物、抗体融合蛋白、交叉克隆抗体或合成抗体。例如当生产单链抗体时,本文所述的“重链可变区”不限于重链本身,还涉及起源于完整抗体重链,如完整免疫球蛋白,如 IgG 的对应部分。此部分可独自或与对应框架部分一起作为对应的 CDR。而且,本文上下文也考虑到免疫球蛋白基因的遗传变体。如免疫球蛋白重 G 链亚类 1 (IgG1) 的遗传变体可在 CH1 结构域中包含 G1m(17) 或 G1m(3) 同种异型标记、或在 CH3 结构域中包含 G1m(1) 或 G1m(非-1) 同种异型标记。本文中优选使用 Gm(17)(z) 和 Gm(1)(a) 同种异型的 IgG1。本发明的抗体分子也包含修饰或突变的抗体,如 Fc- 受体结合或补体结合增强或削弱的突变 IgG。在一个实施方式中,本发明提供的抗体是完全人源化抗体或“完全人”抗体。

[0307] 因此,本发明的抗体也包含交叉克隆抗体,即本文所述包含来自一种或多种亲本或亲和优化抗体的不同抗体区(如 CDR- 区)的抗体。这些交叉克隆抗体可以是数个不同框架,如 IgG- 框架,如(人)IgG1-、IgG2a 或 IgG2b- 框架中的抗体。例如,所述抗体框架为哺乳动物如人的框架。轻链和重链的结构域的总体结构相同,每一结构域含有四个框架区,其序列相对保守并由三个超变结构域(称为互补决定区)(CDR1-3)连接。

[0308] 本文所用“人框架区”涉及与天然产生的人免疫球蛋白框架区基本相同(约 85% 或更多,通常 90-95% 或更多)的框架区。抗体的框架区(如组成性轻链和重链的框架区组合)用于排定 CDR 的位置。CDR 主要负责结合抗原表位。值得注意的是,不仅本文所述的交叉克隆抗体可存在于优选的(人)抗体框架中,包含本文所述抗体的 CDR 的抗体分子同样可被引入免疫球蛋白框架。框架区的例子包括 IgG1、IgG2a 和 IgG2b。最优选的是人框架和人 IgG1 框架,如 SEQ ID NO :6 显示的抗体重链。

[0309] 在一个实施方式中,抗体同种型的重链可变区可包含含有下列氨基酸的

CDR1:

[0310] GFTFSSYAMS (SEQ ID NO :10)

[0311] 所述 CDR1 可由下列核酸序列编码:

[0312] ggattttaccttttagcagctatgcgatgagc (SEQ ID NO :9)

[0313] 抗体同种型的重链可变区中可包含下列**CDR2:**

[0314] AINASGTRTYADSVKG (SEQ ID NO :12)

[0315] (N :完整重链 Asn-52 的 N- 连接糖基化位点)

[0316] 所述**CDR2**可由下列核酸序列编码:

[0317] gctattaatgcttctgtgtactcgctacttattatgctgattctgttaagggt (SEQ ID NO :11)

[0318] 依照本发明在所述 CDR2 区中发生 N- 糖基化,位于重链可变区的对应 Asn52 位点,所述可变区 (V_H) 由 SEQ ID NO :1 所示核酸分子编码并具有 SEQ ID NO :2 所示氨基酸序列。

[0319] 而且,抗体同种型的重链可变区可包含含有下列氨基酸序列的**CDR3:**

- [0320] GKGNTHKPYGYVRYFDV (SEQ ID NO :14)
- [0321] 所述**CDR3**可由下列核酸序列编码：
- [0322] ggtaagggttaatactcataagccttatggttatgttcgttattttgatgtt (SEQ ID NO :13)
- [0323] 抗体同种型可包含轻 (L) 链,其特征为下列 CDR：
- [0324] **CDR1:** RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO :16)
- [0325] agagcgagccagagcgtgagcagcagctatctggcg (SEQ ID NO :15)
- [0326] **CDR2:** GASSRAT (SEQ ID NO :18)
- [0327] ggcgcgagcagccgtgcaact (SEQ ID NO :17)
- [0328] **CDR3:** LQIYNMPI (SEQ ID NO :20)
- [0329] cttcagattttataatatgcctatt (SEQ ID NO :19)
- [0330] 抗体同种型的抗体重链氨基酸序列,如非可变 Fc- 部分中很保守的糖基化位点 Asn 306 (对应于 Kabat- 系统中的“Asn297” (Kabat(1991) 免疫学感兴趣的蛋白序列 (Sequence of proteins of Immunological Interest), 第 5 版, 马里兰州贝塞斯达:国家医学图书馆国立生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine)) 中可包含其它潜在糖基化位点 (如本领域所知的含有 Asn-X-Ser/Thr 基序), 所述重链为或包含上文提供的 SEQ ID NO :5 编码的序列,即 SEQ ID NO :6。
- [0331] 在本发明的一个实施方式中,抗体同种型的特征为至少一个抗原结合位点的重链可变区 (V_H) 中包含糖基化的天冬酰胺 (Asn), 所述 V_H 由下列序列编码：
- [0332] (a) 包含如 SEQ ID NO :1 所示核苷酸序列的核酸分子：
- [0333] CAGGTGGAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCTGGTGCAACCGGGCGGC
- [0334] AGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCTCCGGATTTACCTTTAGCAGCTATGC
- [0335] GATGAGCTGGGTGCGCCAAGCCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAG
- [0336] CGCTATTAATGCTTCTGGTACTCGTACTTATTATGCTGATTCTGTTAAGG
- [0337] GTCGTTTTTACCATTTTACGTGATAATTCGAAAAACACCCTGTATCTGCAA
- [0338] ATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTG
- [0339] GTAAGGGTAATACTCATAAGCCTTATGGTTATGTTGTTATTTTGATGTT
- [0340] TGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA (SEQ ID NO :1) ；
- [0341] (b) 编码含有 SEQ ID NO :2 所示氨基酸序列的核酸分子：
- [0342] QVELVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYAMSWVRQAPGKGLEWV
- [0343] SAI **N** ASGTRTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
- [0344] RGKGNTHKPYGYVRYFDVWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO :2 ;粗体“**N**”代表本文所定义的重链可变区 52 位的 Asn) ；
- [0345] (c) 与核酸分子 (a) 或 (b) 杂交并编码能够与下列 β -A4 肽 /A β 4 氨基酸序列或包含至少 15 个氨基酸的它的片段结合的多肽的核酸分子：
- [0346] DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGATIGLMVGGVVIA (SEQ ID NO :3) ；

[0347] (d) 与核酸分子 (a) 或 (b) 杂交并编码能够与下列 β -A4 肽 /A β 4 氨基酸序列中至少两个区域或与包含至少 15 个氨基酸的 SEQ ID NO :3 片段的至少两个区域结合的多肽的核酸分子：

[0348] DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGATIGLMVGGVVIA (SEQ ID NO :3)。

[0349] 其中所述 β -A4 肽 A β 4 的两个区域或其所述片段包含 SEQ ID No. 3 的 3-6 位和 18-26 位氨基酸；或

[0350] (e) 简并至 (a)-(d) 中任一项定义的核酸序列的核酸序列。

[0351] 本领域技术人员了解本文所用术语“与核酸分子 (a) 或 (b) 杂交并编码能够与 β -A4 肽 /A β 4 上至少两个区域结合的多肽的核酸分子”涉及双链核酸分子的编码链，其中非编码链与上述核酸分子 (a) 和 (b) 杂交。

[0352] 如上所述，含有本文定义 Asn- 糖基化的纯化抗体分子可鉴定和表述为重链包含含糖基化的可变区的抗体分子，所述重链选自：

[0353] (a) SEQ ID NO :5、23 或 25 所示核酸分子编码的重链多肽；

[0354] (b) 含有 SEQ ID NO :6 或 26 所示氨基酸序列的重链多肽；

[0355] (c) 核酸分子编码的重链多肽，该核酸分子能与核酸分子 (a) 杂交，并编码能与下列氨基酸序列所示 β -A4 肽 /A β 4 或包含至少 15 个氨基酸的它的片段结合的多肽

[0356] DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGATIGLMVGGVVIA (SEQ ID NO :3)；或

[0357] (d) 核酸分子编码的重链多肽，该核酸分子能与核酸分子 (a) 杂交，并编码能与下列氨基酸序列所示 β -A4 肽 /A β 4 上至少两个区域或包含至少 15 个氨基酸的 SEQ ID NO. 3 片段的至少两个区域结合的多肽

[0358] DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGATIGLMVGGVVIA (SEQ ID NO :3)；

[0359] 其中所述 β -A4 肽 A β 4 上两个区域或其所述片段包含 3-6 位和 18-26 位氨基酸。

[0360] 上述鉴定的抗体（如本文的示例性抗体）也可包含具有下列氨基酸序列的 L- 链：

[0361] DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGA

[0362] SSRATGVPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFATYYCLQIYNMPITFGGQTKV

[0363] EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ

[0364] SGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT

[0365] KSFNRGEC (SEQ ID NO :22)

[0366] 或由（例如）下列核酸序列编码的 L 链：

[0367] gatatcgtgctgacccagagccccggcgaccctgagcctgtctccggcggaacgtgcgaccctgagctgc
agagcga

[0368] gccagagcgtgagcagcagctatctggcgtggtaccagcagaaaccaggtcaagcaccgcgtctattaa
tttatggcg

[0369] cgagcagccgtgcaactgggggtcccgcgcggttttagcggtcttgatccggcacggattttaccctga
ccattagcag

[0370] cctggaacctgaagactttgcgacttattattgccttcagattttataatatgcctattacctttggcca
gggtacgaaagttga

[0371] aattaaacgtacgggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgcacatctgatgagcagttgaaatctgg
aactgcctctgttg

[0372] tgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtgggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactc

[0373] ccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgagcaaagc

[0374] agactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaa

[0375] caggggagagtgttag (SEQ ID NO :21)

[0376] 如上所述,重链含有本文所定义 Asn-糖基化的纯化抗体分子还可包含选自包含下组的轻链:

[0377] (a) SEQ ID NO :7、21、24 或 27 所示核酸分子编码的轻链多肽;

[0378] (b) 具有 SEQ ID NO :8、22 或 28a 所示氨基酸序列的轻链多肽;

[0379] (c) 核酸分子编码的轻链多肽,该核酸分子能与核酸分子 (a) 杂交,并编码能与下列氨基酸序列所示 β -A4 肽 /A β 4 或包含至少 15 个氨基酸的它的片段结合的多肽:

[0380] DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA (SEQ ID NO :3);或

[0381] (d) 核酸分子编码的轻链多肽,该核酸分子能与核酸分子 (a) 杂交,并编码能与下列氨基酸序列所示 β -A4 肽 /A β 4 上至少两个区域或包含至少 15 个氨基酸的 SEQ ID NO. 3 片段的至少两个区域结合的多肽

[0382] DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA (SEQ ID NO :3);

[0383] 本文中提及核酸序列 /DNA 序列时所用术语“杂交”可涉及严谨或非严谨条件下的杂交。如无进一步说明,优选非严谨条件。所述杂交条件可根据已有实验方法确定,例如: Sambrook, Russell 《分子克隆,实验室手册》(Molecular Cloning, A Laboratory Manual), 冷泉港实验室,纽约 (Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y.) (2001); Ausubel, 《新编分子生物学实验指南》(Current Protocols in Molecular Biology), 纽约的格林出版协会和维利科学公司 (Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N. Y.) (1989), 或 Higgins 和 Hames (编), 《核酸杂交, 实践方法》(Nucleic acid hybridization, a practical approach), IRL 牛津出版社, 华盛顿特区 (IRL Press Oxford, Washington DC) (1985)。条件的设定为本领域技术人员熟练掌握, 并可根据领域所述实验方法确定。因此, 仅特异性杂交序列的检测通常需要严谨的杂交和洗涤条件, 如 0.1xSSC, 0.1%SDS, 65°C。用于检测同源或非精确互补序列的非严谨杂交条件可设定为 6xSSC, 1%SDS, 65°C。众所周知, 探针的长度及所检测核酸的组成构成了杂交条件的另一些参数。注意: 可通过加入和 / 或置换杂交实验中用于抑制背景的另选封闭试剂来改变上述条件。典型的封闭试剂包括邓氏 (Denhardt's) 试剂、BLOTTO、肝素、变性鲑精 DNA 和所有市售制剂。由于兼容性问题, 可能需要加入特定封闭试剂来修饰上述杂交条件。杂交核酸分子也包含上述分子的片段。此片段可代表编码本文定义的非功能性抗体分子或其非功能性片段或 CDR 的核酸序列, 并且长度至少为 12 个核苷酸, 优选至少 15 个, 更优选至少 18 个, 更优选至少 21 个, 更优选至少 30 个, 更优选至少 40 个, 最优选至少 60 个。而且, 与上述任一核酸分子杂交的核酸分子也包括这些分子的互补片段、衍生物和等位基因变体。此外, 杂交复合物指两个核酸序列依靠互补的 G、C 和 A、T 碱基氢键形成的复合物; 碱基堆叠相互作用可进一步稳定这些氢键。两个互补核酸序列的氢键为反向平行构象。杂交复合物可在溶液中形成 (如 Cot 或 Rot 分析) 或在一条溶液中

的核酸序列和另一条固化于固体支持物（如膜、滤器、芯片、插脚或如固定细胞的载玻片）的核酸序列之间形成。术语互补或互补性指在允许的盐和温度条件下多核苷酸通过碱基配对自然结合。例如，序列“A-G-T”与互补序列“T-C-A”结合。两个单链分子的互补可为仅有部分核酸结合的“部分”互补，或为单链分子间全部互补的完全互补。核酸链间的互补程度显著影响核酸链间的杂交效率和长度。当进行依赖于核酸链间结合的扩增反应时，这点尤其重要。

[0384] 术语“杂交序列”优选指与上述编码抗体分子的核酸序列序列相同性为至少 40%、优选至少 50%、更优选至少 60%、更优选至少 70%、特别优选至少 80%、尤其更优选至少 90%、尤其更优选至少 95% 以及最优选至少 97% 的序列。而且，术语“杂交序列”尤指编码与本文上述抗体分子的氨基酸序列序列相同性为至少 40%、优选至少 50%、更优选至少 60%、更优选至少 70%、尤其优选至少 80%、尤其更优选至少 90%、尤其更优选至少 95% 以及最优选至少 97% 的抗体分子的序列。

[0385] 按照本发明，当出现两个或多个核酸或氨基酸序列时，术语“相同”或“相同性百分数”指利用本领域熟知序列比较算法、或人工比对或视觉检视在比较窗口或指定区域上比较和比对最大对应性时，两个或多个序列或亚序列相同、或有特定百分比的氨基酸残基或核苷酸相同（如 60% 或 65% 相同，优选 70–95% 相同，更优选至少 95% 相同）。例如序列相同性为 60%–95% 或更高时认为是二序列基本相同。此定义也应用于测试序列的互补链。优选在至少长约 15–25 个氨基酸或核苷酸的区域，更优选在至少长约 50–100 个氨基酸或核苷酸的区域上存在所述的相同性。本领域技术人员知道如何判断序列间的相同性百分数，例如采用本领域熟知的基于 CLUSTALW 计算机程序的算法 (Thompson Nucl. Acids Res. 2(1994), 4673–4680) 或基于 FASTDB 的算法 (Brutlag Comp. App. Biosci. 6(1990), 237–245)。

[0386] 尽管 FASTDB 算法通常不考虑序列内部非匹配删除或加入，即缺口，但在计算中，可人工纠错以避免高估相同性 %。然而，CLUSTALW 不将序列缺口计入相同性计算中。本领域技术人员也可使用 BLAST 和 BLAST 2.0 算法 (Altschul, Nucl. Acids Res. 25(1997), 3389–3402 ; Altschul, J. Mol. Evol. 36(1993) ; 290–300 ; Altschul, J. Mol. Biol. 215(1990), 403–410)。核酸序列 BLASTN 程序使用默认字长 (W) 为 11，期望值 (E) 为 10，M=5、N=4，并进行双链比较。对于氨基酸序列，BLASTP 程序使用默认字长 (W) 为 3，期望值 (E) 为 10。BLOSUM62 评分矩阵 (Henikoff Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89(1989), 10915) 使用比对值 (B) 为 50、期望值 (E) 为 10、M=5、N=4 并进行双链比较。

[0387] 而且，本发明也涉及核酸分子，与上述杂交分子相比其序列是简并序列。本发明所用术语“由于遗传密码而成为简并性”意味着由于遗传代码的冗余，同一氨基酸可由不同核苷酸序列编码。

[0388] 为了检测在给定抗体序列中的氨基酸残基或核苷酸残基是否对应 SEQ ID NO :1、5、23 和 25 中的任一氨基酸序列或核苷酸序列的特定位置，技术人员可使用本领域中熟知的手段和方法（如比对法），通过人工途径或使用计算机程序途径，例如下文提及的与“杂交”和同源程度的定义有关的途径确定。

[0389] 例如，可使用代表基础本地比对搜索工具 (Basic Local Alignment Search Tool BLAST) 的 BLAST 2.0 (Altschul (1997), 同上 ; Altschul (1993), 同上 ; Altschul (1990), 同上) 搜索本地序列比对。如上文讨论的 BLAST 能够比对核苷酸和氨基酸序列以确定序列相

似性。因为比对的局部属性, BLAST 在确定精确配对或识别相似序列时尤其有用。BLAST 算法输出的基本单位是高分节段对 (High-scoring Segment Pair) (HSP)。HSP 由两个任意等长的序列片段组成, 其比对是局部最大的, 该比对评分达到或超过用户设定的域值或截止评分。BLAST 方法是为了在查询序列和数据库序列间寻找 HSP, 评价任何找到的配对的统计学显著性, 并仅报告道那些满足用户选择的显著性域值的配对。参数 E 确立了报告数据库序列配对的统计学显著性域值。E 可解释为在整个数据库搜索的环境中, 所期望的 HSP (或一组 HSP) 出现频率的上限。程序输出报告任何满足 E 的配对的数据库序列。

[0390] 使用 BLAST 的类似计算机技术 (Altschul (1997), 同上; Altschul (1993), 同上和 Altschul (1990), 同上) 在核苷酸数据库, 如 GenBank 或 EMBL 中搜索相同的或相关的分子。该分析明显快于基于膜的多重杂交。此外, 可更改计算机搜索的灵敏度以确定任何特定配对是否归类为精确或相似。搜索的基础是产物评分, 其定义如下:

[0391] % 序列相同性 x% 最大 BLAST 分数

[0392] 100

[0393] 考虑了两序列间的相似程度以及序列配对的长度。例如, 产物评分为 40 时, 配对精确到有 1-2% 的误差; 若为 70, 配对则为精确。选择产物评分在 15-40 间的分子以鉴定相似的分子, 尽管更低的分数可能鉴定相关分子。本领域内所知能够产生序列比对的程序的例子是 CLUSTALW 计算机程序 (Thompson, Nucl. Acids Res. 2 (1994), 4673-4680) 或 FASTDB (Brutlag Comp. App. Biosci. 6 (1990), 237-245)。

[0394] 在一个实施方式中, 本发明提供糖基化的抗体同种型, 其中位于 V_H 区的 Asn 糖基化选自:

[0395] (a) 双触角复合物型无核心岩藻糖化的糖结构;

[0396] (b) 双触角杂合型的糖结构;

[0397] (c) 双触角寡甘露糖型的糖结构; 和

[0398] (d) 附图 5 或 27 提供的任意结构的双触角结构。

[0399] 在本发明抗体的一个实施方式中, 对应糖结构不包含核心岩藻糖化。

[0400] 对应的 N-糖基化可主要由双触角复合物型无核心岩藻糖化的糖结构 ($\geq 75\%$; 主要 80-90%) 组成, 并且高达 80% 以上触角高度唾液酸化。少数糖结构分别属于双触角杂合子和寡甘露糖型 ($\leq 25\%$), 也参见附图 5 和 27。可变区的糖基化结构不被来自蛋白质 (氨基酸多肽) 的 N-糖苷酶 F 切割 (氨基酸多肽)。

[0401] 在一个实施方式中, 通过以下方法进一步鉴定主要的复合物双触角糖结构

[0402] - 含有连接于一个或另一个或两个触角的一个或两个唾液酸。唾液酸是 N-乙酰基神经氨酸类型, 最可能以 α -2, 3 连接结合于末端 β 1, 4 连接的半乳糖。

[0403] - 缺少核心岩藻糖化, 即在糖链的还原性末端缺少通过 α -1 $\rightarrow$ 6 连接连接于最核心的 N-乙酰葡萄糖胺的岩藻糖残基。

[0404] 在一个实施方式中, 通过以下方法进一步鉴定杂合糖结构:

[0405] - 含有复合型触角 (连接于核心糖结构的乳糖胺单位 (GlcNAc-Gal)) 作为双触角结构的一个臂。该臂主要包含连接于末端 β -1, 4 连接半乳糖的 N-乙酰基神经氨酸。

[0406] - 含有连接于核心糖结构的 1-3 个其它甘露糖亚基作为其它触角。- 缺少核心岩藻糖化, 即在糖链的还原性末端缺少通过 α -1 $\rightarrow$ 6 连接连接于最核心的 N-乙酰葡萄糖胺的

岩藻糖残基。

[0407] 在一个实施方式中,通过以下方法进一步鉴定寡甘露糖型糖结构

[0408] - 在完整的糖结构里含有 4 个 (Man4 → GlcNAc2)、5 个 (Man5 → GlcNAc2) 或 6 个 (Man6 → GlcNAc2) 甘露糖亚基,即典型 N- 连接的核心糖结构中存在 3 个分支甘露糖亚基。

[0409] - 缺少核心岩藻糖化,即在糖链的还原性末端缺少通过 α -1 → 6 连接连接于最核心的 N- 乙酰葡萄糖胺的岩藻糖残基。

[0410] 在本发明另一实施方式中,提供了一种组合物,包含特征是在重链可变区 (V_H) 的一个抗原结合位点包含糖基化的天冬酰胺 (Asn) 的抗体分子,和特征是在重链可变区 (V_H) 的两个抗原结合位点包含糖基化的天冬酰胺 (Asn) 的抗体分子,亦即包含单糖基化抗体和双糖基化抗体的组合物,下文中称作抗体组合物。术语抗体组合物也涉及包含含有至少一个本文所述糖基化 V_H 区或至少一个所述 V_H 区的糖基化 CDR 的分子的组合物,其中所述分子可为上述免疫球蛋白或免疫球蛋白同种型和修饰物。例如,所述组合物也可包含单链抗体 (scFvs) 或含有糖基化 V_H 衍生 CDR 区的双特异性分子。

[0411] 在下文提供本发明抗体组合物的其它定义。

[0412] 抗体组合物不含或仅含极少量的“ V_H 未糖基化”的抗体分子,即可变区,具体为重链可变区 (V_H) 不含本文定义的糖基化的抗体。

[0413] 在本发明的上下文中,尤其在本文所提供的抗体混合物中,术语“不含或仅含极少量的未糖基化的抗体分子”意为抗体组合物包含本文所述未糖基化同种型少于 10%,如少于 5%,如少于 4%,如少于 3%,如少于 2%,如少于 1%,如少于 0.5% 或更少。

[0414] 因此,在一个实施方式中,本发明提供了包含单糖基化和 / 或双糖基化抗体 (糖基化位于重链可变区) 但不含可变区无糖基化的抗体分子的抗体制剂。

[0415] 再次,术语“不含可变区无糖基化的抗体分子”涉及其中本文所述未糖基化同种型的含量至多为 10%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%,例如至多为 4%、3%、2%、1%、0.5%、0.3%、0.2% 的抗体制剂 / 抗体混合物 / 抗体库。

[0416] 在一个实施方式中,本发明提供了不含有多于 0.5% 可变区未糖基化 (例如重链可变区未糖基化) 的抗体同种型的组合物。

[0417] 如上文指出,在本发明的实施方式中,提供了单糖基化抗体和双糖基化抗体,如免疫球蛋白的混合物,所述混合物不含可变区无糖基化的抗体分子。在本发明中将可变区如两个重链可变区 (两个 (V_H)- 区) 不含此类翻译后修饰的抗体称为“未糖基化形式”,它在重链的可变区中不含糖基化。然而,该“未糖基化形式”仍可包含抗体恒定区 (C- 区) 的糖基化,例如,最常见位于 Fc- 部分的高度保守的糖基化位点,具体为本文所定义的在非可变 / 恒定 Fc- 部分的天冬酰胺 (Asn) 306。

[0418] 单独的糖基化抗体同种型或单糖基化和双糖基化同种型的混合物是治疗阿尔茨海默病 (AD) 及其它淀粉样蛋白相关疾病如唐氏综合征、荷兰型遗传性脑出血伴淀粉样变、帕金森病、ALS (肌萎缩侧索硬化)、库贾氏病、HIV- 相关痴呆和运动神经病中非常有用且有利的治疗性抗体制剂。单独的糖基化抗体同种型或单糖基化和双糖基化同种型的混合物也是独特的诊断工具。

[0419] 本文所述两种糖基化同种型在体内的脑穿透性改善且高效。一种 AD 相关的淀粉样变小鼠模型 PS2APP 小鼠显示了有效的大脑穿透性和对 β 淀粉斑的特异性结合。

[0420] 而且,体外免疫组织化学染色检测到提高了对真人 β 淀粉斑的特异性并显著降低了非特异性黏性。如所附实施例所述,人 β 淀粉斑一致性染色 (consistent staining) 的最小有效浓度测定为 10ng/ml。

[0421] 如所附实施例所述,不同糖基化抗体如免疫球蛋白的分离及表征揭示了重链可变区的糖基化对于抗原结合 A β 肽、诊断价值、药理学特性及功能活性有着惊人的影响。可对纯化抗体分子进行 MS- 分析、与可溶性 A β 结合的结合研究 (Biacore) 和表位作图 (Pepspot 分析)、聚集的 A β 的解离以及体内外结合 β 淀粉斑的显微术分析。

[0422] 在本发明的一个实施方式中,纯化抗体或抗体组合物能够特异性识别 β -A4 肽 / A β 4。

[0423] 如本文所述,在一个具体的实施方式中,纯化抗体或抗体组合物涉及能够特异性识别 A β / A β 4 两个区域 (N- 末端区域和中央 / 中间部分) 的抗体或抗体组合物。

[0424] 本发明所用术语“特异性识别”指能够与本文所定义的 β -A4 的两个区域中每一区域至少两个氨基酸特异性作用和 / 或结合的抗体分子。所述术语涉及抗体分子的特异性,即涉及其区分本文所定义 β -A4 肽特定区域和 β -A4 肽的另一不相关区域或另一非 APP- 相关蛋白质 / 肽 / (不相关的) 测试肽的能力。因此,特异性可通过本领域已知方法和本文所述公开的方法进行检测。此类方法包括但不限于 Western 印迹、ELISA-、RIA-、ECL-、IRMA- 检测和肽扫描。此类方法还包括检测 K_D 值,如所附实施例所述。肽扫描 (pepspot 矩阵) 常被用于描绘多肽抗原的线性表位图。在活化纤维素上将肽互相重叠连续合成多肽的一级序列。可通过常规发色法 (含有酶或染料,如辣根过氧化物酶或 4- 氯萘酚或过氧化氢的第二抗体)、化学发光反应或本领域所知的相似方法对准备测试其检测或识别特定抗原 / 表位的能力的抗体对特定肽的识别进行评分。使用化学发光反应或荧光第二抗体时,反应可定量。当抗体与某组重叠肽反应时,可推断出该反应必需的最小氨基酸序列;见本发明提供的说明性实施例。

[0425] 同样的实验可揭示反应肽的两个远距离簇,表明对抗原性多肽中非连续即构象表位的识别 (Geysen (1986), Mol. Immunol. 23, 709-715)。

[0426] 除 pepsot 实验外,可进行标准 ELISA 实验。如所附实施例所示,小六肽可与蛋白质偶联并包被到免疫检测板上,与受试抗体反应。可通过标准发色进行评分 (如辣根过氧化物酶和第二抗体以及四甲基联苯胺和过氧化氢)。通过光密度 (如 450nm) 对某些孔中的反应进行评分。背景 (= 阴性反应) 一般可为 0.10D, 阳性反应一般为 10D。这意味着阳性 / 阴性反应的差异 (比率) 大于 10 倍。所附实施例将给出更多细节。此外,下文中将给出用于检测特异性和“特异性识别”本文定义 β -A4 肽两个区域的能力的定量方法。

[0427] 术语“ β -A4 肽两个区域”涉及的两个区域与 SEQ ID No. 3 (β -A4 肽) N- 末端氨基酸 3-6 和氨基酸 18-24 的中央 / 中间表位有关。如所附实施例所述,本文具体提供并举例的双糖基化抗体 A 同种型 (见所附实施例) 检测了 A β 分子的两个部分,第一部分包含 N- 末端氨基酸 1-10, 第二部分包含 A β 中央 / 中间部分氨基酸 17-26 (如 SEQ ID No. 3 所示)。因此,在本文提供的包含本文所述单糖基化抗体和双糖基化抗体同种型的抗体混合物中,两个区域某种程度上也可放宽至包含氨基酸 1-10 (或 -11 或 -12) 或其较短部分和氨基酸 17-26 (或氨基酸 16-27) 或包含氨基酸 17-26 间较短部分,如氨基酸 19-26 或 20-26。本发明上下文中术语“ β -A4 肽”涉及上文所述 A β 39、A β 41、A β 43, 尤其涉及 A β 40 和 A β 42。

所附 SEQ ID NO:3 中也描述了 A β 42。值得注意的是术语“ β -A4 肽的两个区域”也涉及包含本文所定义 β -A4 肽两个区域或其部分的“表位”和 / 或“抗原决定簇”。依照本发明,在 β -A4 肽一级结构中(在氨基酸序列水平上)所述 β -A4 肽两个区域之间间隔了至少一个氨基酸,如至少两个、三个、四个、五个和六个氨基酸。如本文所示以及所附实施例所记录,本发明抗体 / 抗体分子检测 / 作用于和 / 或结合本文所定义 β -A4 肽的两个区域,其中所述两个区域间隔(在氨基酸序列一级结构水平上)至少一个氨基酸,其中间隔所述两个区域 / “表位”的序列可包含多于七个、八个、十个甚至约十四个氨基酸。

[0428] 术语“ β -A4 肽两个区域”也涉及由所述两个区域或其部分组成的构象表位或不连续表位;参见 Geysen(1986),同上。在本发明的上下文中,通过在一级序列中隔开、但当多肽折叠为天然蛋白时在表面集中的两个或多个离散氨基酸序列确定的构象表位(Sela, (1969)Science 166,1365 和 Laver, (1990)Cell,161,553-6)。考虑到本发明的抗体分子与由本文所述 β -A4 两个区域或下文公开的其部分组成或包含所述区域或部分的构象表位特异性结合和互相作用。认为本发明“抗体分子”对 (a) 含有 β -A4(SEQ ID NO.3) 氨基酸 1-11(或其部分)的氨基酸臂以及 (b) 含有 β -A4(SEQ ID NO.3) 氨基酸 16-27(或其部分)的氨基酸臂具有同时和独立的双重特异性。这些臂的片段或部分包含至少两个,大多数情况下至少三个氨基酸。

[0429] 抗体分子,如免疫球蛋白等可在以下三种系统中进行表达:a) 含有爱波斯坦-巴尔病毒核抗原的瞬转的人胚肾细胞(HEK 293 EBNA,英杰公司(Invitrogen)),b) 瞬转的中国仓鼠卵巢细胞(CHO)以及 c) 稳转 CHO 细胞系(CHO K1 和 CHO K1 SV,龙杂生物公司(Lonza Biologics))。利用特定的纯化步骤可以分离三种不同的抗体分子(未糖基化、单糖基化或双糖基化的抗体分子),包括如下详述的蛋白 A 纯化、阳离子交换色谱以及大小排阻柱分离。

[0430] 在本发明的一个实施方式中,在(如)CHO 细胞或 HEK 293 细胞、优选 CHO 细胞中重组产生抗体分子。在一个具体的实施方式中,在 CHO 细胞中表达后可获得上述鉴定的糖基化模式。CHO 细胞在本领域内为人熟知,包括实验部分中使用的 CHO 细胞,如 CHO K1 或 CHO K1 SV 细胞。常用的 HEK 293 细胞是 HEK 293 EBNA。

[0431] 如实施例所述在真核表达系统尤其在 CHO 细胞中重组表达糖基化的发明抗体。然而,也考虑到其它表达细胞即真核细胞。真核细胞包括(如)真菌或动物细胞。合适真菌细胞的例子是酵母细胞,如酵母属、酿酒酵母种。合适的动物细胞如昆虫细胞、脊椎动物细胞,如哺乳动物细胞,如 NS0、MDCK、U2-OSHeLa、NIH3T3、MOLT-4、Jurkat、PC-12、PC-3、IMR、NT2N、Sk-n-sh、CaSki、C33A。也考虑到人细胞系。这些宿主细胞如 CHO 细胞提供对本发明抗体分子的翻译后修饰,包括前导肽或信号肽序列的移除、H(重)和 L(轻)链的折叠和组装,最重要的是在分子正确位点的糖基化,即在重链可变区的糖基化。如在 CHO 细胞中,在重组生产过程的分泌过程中,此类信号肽或前导序列被宿主的信号肽酶酶切。其它本领域所知合适的细胞系可获自细胞系仓库,如美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)(ATCC)。依照本发明,还考虑到原代细胞 / 细胞培养物可用作宿主细胞。所述细胞具体衍生自昆虫(如果蝇或蜚蠊类昆虫)或哺乳动物(如人、猪、小鼠或大鼠)。所述宿主细胞也可包含来自和 / 或衍生自细胞系如神经母细胞瘤细胞系的细胞。

[0432] 因此,通过重组表达系统制备本发明的抗体分子。此类系统的一个例子(如上所

述) 是使用中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞的哺乳动物表达系统。这些系统可与谷氨酰胺合成酶 (GS) 系统一起使用 (WO 87/04462 ;WO 89/01036 ;Bebbington, 1992, Biotechnology (纽约), 10, 169-75)。该系统包括用编码 GS 酶的基因和所需抗体基因转染 CHO 细胞。利用无谷氨酰胺培养基培养选择 CHO 细胞, 并使用甲硫氨酸亚氨基代砒 (MSX) 抑制 GS 酶。为了生存, 该细胞将增加 GS 酶表达并伴随表达 mAb。

[0433] 另一种可能的表达系统是 CHO dhfr 系统, 其中 CHO 细胞为二氢叶酸还原酶 (dhfr-) 缺陷型, 并且依赖胸苷和次黄嘌呤才能生长。利用抗体和 dhfr 基因转染亲本 (parenteral) CHO dhfr- 细胞系从而能够选择 dhfr+ 表型的 CHO 细胞转化子。在缺乏胸苷和次黄嘌呤的条件下进行选择。使用甲氨蝶呤 (MTX) 可使抗体基因的表达升高。该药物是 dhfr 酶的直接抑制剂, 以便分离在此条件下足以生存的扩增 dhfr 基因拷贝数及抗体基因的抗性集落。

[0434] 可通过包括以下步骤的方法制备纯化抗体分子, 如免疫球蛋白:

[0435] (a) 在哺乳动物细胞, 如 CHO 或 HEK 293 细胞中重组表达编码如上所述抗体分子的异源核酸分子; 和

[0436] (b) 通过包括以下步骤的方法纯化所述重组表达的抗体分子

[0437] (b1) 蛋白 A 柱纯化;

[0438] (b2) 离子交换柱纯化, 如阳离子交换色谱; 以及, 任选

[0439] (b3) 大小排阻柱纯化。

[0440] 纯化实验方案还可包括其它步骤, 如其它浓缩步骤如渗滤, 或分析步骤, 如使用分析柱。该方法 / 步骤还可包括病毒灭活步骤和 / 或病毒去除步骤, 如过滤 / 纳米过滤。同样考虑到可行的是重复特定步骤 (如可进行两步离子交换色谱) 或省去某些步骤 (如大小排阻柱色谱)。

[0441] 蛋白 A 是一组能够与大多数 IgG1 同种型 Fc 区域结合的特异性配体。它由某些金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 菌株合成并可从中分离, 并与色谱珠偶联。可购得数种类型的凝胶制剂。

[0442] 可使用的蛋白 A 柱的例子是 MabSelect (商标) 柱。理想的, 使用 25mM Tris/HCl、25mM NaCl、5mM EDTA 平衡该柱, 并将细胞培养物上清上柱。利用 1M Tris/HCl pH 7.2 洗柱, 用 100mM 乙酸 pH 3.2 洗脱抗体。

[0443] 阳离子交换色谱则利用固定相中带正电的基团和处于流动相中样品的

[0444] 相互作用。当使用弱阳离子交换柱 (如 CM Toyopearl 650[®]) 时, 进行如下色谱步骤: 用 100mM 乙酸 pH 4 预平衡后, 将蛋白 A 洗脱液上柱, 用 100mM 乙酸 pH 4 洗涤, 250mM 乙酸钠 (pH 7.8-8.5) 和 500mM 乙酸钠 (pH 7.8-8.5) 洗脱抗体并分馏。第一步时, 正常洗脱双糖基化同种型组分和单糖基化同种型组分的混合物, 使用第二步则正常洗脱未糖基化同种型组分。

[0445] 当使用强阳离子交换柱 (如 SP Toyopearl 650) 时, 利用盐的步骤洗脱抗体: 用 50mM 乙酸 pH 5.0 预平衡后, 蛋白 A 洗脱液上柱并使用 50mM 乙酸和 210mM 氯化钠以 pH 4 进行第一步洗脱。第二个洗脱步骤使用 50mM 乙酸和 350mM 氯化钠。通过第一个盐步骤正常洗脱双糖基化同种型组分和单糖基化同种型组分的混合物, 通过第二个盐步骤正常洗脱未糖基化同种型。

[0446] 此外,也可从强阳离子交换柱(如 SP- **Sepharose**[®])通过盐梯度来洗脱抗体:预平衡、上柱并在 pH 4.5 洗柱后,使用 50mM MES pH 5.8 - 至 50mM MES/1M 氯化钠 pH 5.8 的盐梯度。通常,双糖基化同种型、单糖基化的同种型和未糖基化同种型组分分别被洗脱。接着可收集双糖基化同种型组分和单糖基化同种型组分,形成产物库和/或所需的抗体混合物。

[0447] 进一步纯化双糖基化抗体分子和单糖基化抗体分子的混合物如免疫球蛋白可使用大小排阻色谱。有用柱子的例子是 Superdex **200**[®] 柱。运行缓冲液的例子包括组氨酸/氯化钠,如 10mM 组氨酸/125mM 氯化钠/pH 6 和磷酸盐缓冲盐水(PBS)。

[0448] 流过模式的阴离子交换色谱后接浓缩/渗滤步骤是另一种纯化步骤。**Q Sepharose**[®]是阴离子交换步骤树脂的例子。例如,用 37.5mM Tris/HCl pH 7.9 三倍稀释 SP 色谱洗脱液并通过 25mM Tris/83 mM 乙酸钠预平衡的 Q-Sepharose 柱。收集流出液并调节至 pH 5.5,利用如 Hydrosart 30 **kD**[®]膜超滤浓缩。接下来用 10 体积的 20mM 组氨酸/HCl pH 5.5 渗滤浓缩液。

[0449] 上述纯化方案也可还包含另一步骤(c)分析色谱步骤,如使用 Mono-SHR5/5 柱。然而,也考虑到其它步骤如渗滤来浓缩抗体分子。

[0450] 在本发明的一个实施方式中,提供了包含本文所述抗体分子或上文所述方法制备的抗体分子的组合物、抗体制剂或抗体库。在本发明的这个实施方式中,所述组合物包含单糖基化或双糖基化抗体。在另一实施方式中,所述组合物包含单糖基化或双糖基化(在重链可变区)抗体并且所述组合物衍生自可变区缺少糖基化的抗体分子。在本实施方式的上下文中,术语“抗体库”涉及单糖基化或双糖基化(在重链可变区)抗体的混合物,这些抗体可单独分离并混合成一种混合物。本文所提供抗体混合物或抗体库可包含 50% 单糖基化的抗体和 50% 双糖基化的抗体(如本文定义)。然而,也考虑了比率为 30/70 至 70/30。然而,本领域熟练技术人员明白本发明抗体混合物中也能采用其它比率。例如,本发明上下文中也可使用 10/90 或 90/10、20/80 或 80/20 以及 40/60 或 60/40。如实施例所述,本文抗体混合物包含本文所定义的双糖基化和单糖基化的抗体的尤其有用的比率为 40/60 - 至 45/55。

[0451] 本文提供的组合物在诊断或药物组合物中尤其有用。

[0452] 因此,本发明提供包含下述成分的诊断或药物组合物:

[0453] (a) 包含一个具有糖基化 Asn 的抗原结合位点的上述抗体分子;

[0454] (b) 包含两个具有糖基化 Asn 的抗原结合位点的上述抗体分子;或者,最优选

[0455] (c) 抗体分子(a)与(b)的混合物。

[0456] 本文提供的包含一个具有糖基化 Asn 的抗原结合位点的抗体分子以及两个具有糖基化 Asn 的抗原结合位点的抗体分子的混合物缺少未糖基化(涉及重链可变区)的同种型。如上文指出,术语“缺少未糖基化(涉及重链可变区)的同种型”涉及混合物/抗体库/抗体制剂,所述混合物中重链可变区未糖基化的抗体种类少于 5%、4%、3%、2%、1%、甚至少于 0.5%。如实施例所述,所述混合物/抗体库/抗体制剂可能几乎不包含(少于 0.5%)未糖基化的同种型。使用本领域已知方法容易测定给定抗体组合物中给定糖基化同种型(如

本文所述,重链可变区的糖基化,见附图 14) 的百分数和 / 或数量,这些方法包括但不限于质谱、SDS-PAGE 分析、离子交换、HPLC、ELISA 等。

[0457] 如所附实施例所示,本发明抗体对真阿尔茨海默病 β 淀粉斑进行特异、灵敏的免疫修饰通过使用 AD 病人脑组织的冰冻切片进行免疫组化染色实验得以证明。利用来自 A β 免疫接种病人的人抗 A β 抗体同样显示了对脑切片的 β 淀粉斑有效染色 (Hock, 2002, *Nature Medicine*, 8, 1270-1275)。此外,在荷载体人 β 淀粉斑的转基因动物模型上也显示了免疫修饰 (Richards, 2003, *J. Neuroscience*, 23, 8989-9003)。在类似的动物模型上证明这种斑结合导致其清除并最终引起疾病相关症状的改善,讨论了 Fc- 依赖过程的参与 (Bard, 2000, *Nature Medicine*, 6, 916-919; Wilcock, 2003, *Neurobiology Disease*, 15, 11-20; Wilcock, 2004, *J. Neuroscience*, 24, 6144-6151)。而且,有报道称抗-A β 抗体与 β 淀粉斑的有效结合与疾病进展减缓有关 (Hock, 2002, *Nature Medicine*, 8, 1270-1275; Hock, 2003, *Neuron*, 38, 547-554)。这个发现以及人脑组织的尸检分析表明小胶质细胞的吞噬作用参与了人体斑清除机制 (Nicoll, 2003, *Nature Medicine*, 9, 448-452)。因此本发明抗体或包含于药物组合物的特定抗体是人 IgG1, IgG1 主要负责人体中 FcR 依赖的过程。本发明抗体 / 混合物有效免疫修饰 β 淀粉斑表明药物能够在人体中有效引起被动免疫以清除存在的 β 淀粉斑并防止 β 淀粉斑的形成。

[0458] 此外,抗体优选可透过血脑屏障到达其目的地。对于大分子如人 IgG 而言,该过程显著减少,因此 CSF 中仅能达到约 0.1-0.2% 血浆抗体浓度。斑清除的机制还是一个存在争议的话题, A β 肽的外周效应可能参与其中 (Dodart, 2002, *Nature Neuroscience*, 5 : 452-457)。因此,产生的治疗性抗体或本发明相应的单糖基化和双糖基化 (重链可变区) 的混合物对于体外无需 Fc- 依赖过程参与的 A β 多聚体解聚以及与 CSF 中可溶性 A β 单体和寡聚体结合同样具有价值,因为中和可溶性单体 A β 肽或寡聚 A β 肽 (如聚集中间体) 同样也可有利于整体的淀粉样变的减轻 (Du, 2003, *Brain*, 126 : 1-5)。

[0459] 本发明组合物可以固体或液体形式给药,可为粉末、片剂、溶液或气溶胶等形式。所述组合物可包含一种或多种本发明的抗体 / 抗体分子,最优选本文提供的单糖基化和双糖基化抗体的混合物。

[0460] 所述药物组合物优选任选地包含药学上可接受的运载体和 / 或稀释剂。本文公开的药物组合物对于治疗神经病和 / 或神经变性疾病尤其有用。所述疾病包括但不限于阿尔茨海默病、肌萎缩侧索硬化 (ALS)、荷兰型遗传性脑出血伴淀粉样变、唐氏综合征、HIV- 痴呆、帕金森病和衰老相关性神经元疾病。可考虑将本发明药物组合物用作淀粉斑形成的有效抑制剂或淀粉斑解聚的有效刺激剂。因此,本发明提供包含本发明化合物的药物组合物,用于治疗淀粉样蛋白形成疾病 / 失调。术语“淀粉样蛋白形成疾病 / 失调”包括淀粉样纤维的形成或沉积和 / 或病理性 APP 蛋白水解相关或引起的任何疾病。淀粉样蛋白形成疾病的示例包括但不限于阿尔茨海默病 (AD)、唐氏综合征、Lewy 体形成相关性痴呆、帕金森病痴呆、轻度认知损伤、大脑淀粉样蛋白血管病和血管性痴呆。不同的淀粉样蛋白形成疾病定义为或特征是淀粉样蛋白沉积物的多肽组分的特性。例如, β 淀粉样蛋白的特征是在阿尔茨海默病对象中发现淀粉样蛋白沉积。

[0461] 合适的药学运载体、赋形剂和 / 或稀释剂的例子为本领域所熟知,包括磷酸盐缓冲盐水溶液、水、乳剂如油 / 水乳剂、各种类型的湿润剂、消毒溶液等。利用已知常规方法可

配制包含此类运载体的组合物。合适的运载体可包含与抗 A β 特异性结合试剂或抗体联用时,保留对 A β 的高度亲和结合性,并不与对象免疫系统反应的任何材料,包括赋形剂、表面活性剂、增强剂等;参见《雷明顿药物科学》(Remington's Pharmaceutical Sciences)(1980)16 版,Osol, A. 编。这些药物组合物可以合适剂量给予对象。可通过不同方式给予合适组合物,如胃肠道外、皮下、腹膜内、外用、支气管内、肺内和鼻内给药,并且,如需局部治疗,可进行损伤内给药。胃肠道外给药包括腹膜内、肌肉内、皮内、皮下、静脉内或动脉内给药。尤其优选的给药方式是注射和/或递送至脑动脉的某部位或直接递送至脑组织。本发明组合物也可直接给予靶位点,如通过生物射弹递送至外部或内部靶位点,如脑。

[0462] 将所需纯度的抗体与任意生理上可接受的运载体、赋形剂、稳定剂、表面活性剂、缓冲液和/或张力剂混合制备包含本文所述糖基化抗体的药物组合物。在所使用的剂量和浓度下,可接受的运载体、赋形剂和/或稳定剂没有毒性,并且包含缓冲剂,如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸、谷胱甘肽、半胱氨酸、甲硫氨酸和柠檬酸;防腐剂(如乙醇、苄醇、苯酚、间甲酚、对氯间甲酚、对羟基苯甲酸甲酯或丙酯、杀藻胺或其组合);氨基酸如精氨酸、甘氨酸、鸟氨酸、赖氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、甲硫氨酸、丝氨酸、脯氨酸和其组合物;单糖、二糖和其它糖;低分子量(少于约 10 个残基)的多肽;蛋白质,如明胶或血清白蛋白;螯合剂如 EDTA;糖如海藻糖、蔗糖、乳糖、葡萄糖、甘露糖、麦芽糖、半乳糖、果糖、山梨糖、棉子糖、葡糖胺、N-甲基葡糖胺(所谓“甲葡胺”)、半乳糖胺和神经氨酸;和/或非离子表面活性剂,如吐温、Brij 普朗尼克、Triton-X 或聚乙二醇(PEG)。

[0463] 药物组合物可为液体形式、冻干形式或冻干形式重建的液体形式,其中在给药前用无菌溶液重建冻干制剂。重建冻干组合物的标准步骤是将一定体积的纯水(通常与冻干中去除的水等量)加回,然而含有抗菌药的溶液也可用于生产胃肠道外给药的药物组合物;参见 Chen(1992)Drug Dev Ind Pharm 18,1311-54。

[0464] 药物组合物中示例性的抗体浓度范围可为约 1mg/mL-200mg/mL 或约 50mg/mL-200mg/mL、或约 150mg/mL-200mg/mL。明确起见,需要强调的是本文标明的浓度是液体中的浓度或自固体形式精确重建的液体中的浓度。

[0465] 抗体的水性制剂可在 pH-缓冲液中制备,如 pH 范围约 4.0-7.0,或约 5.0-6.0、或约 5.5。pH 在该范围内的合适缓冲液的例子包括磷酸盐、组氨酸盐、柠檬酸盐、琥珀酸盐、醋酸盐缓冲液和其它有机酸缓冲液。根据缓冲液和所需制剂张力,缓冲液浓度可为约 1mM-100mM、或约 5mM-50mM。

[0466] 抗体制剂可包含张力剂以调制剂剂的张力。示例性的张力剂包括氯化钠、氯化钾、甘油和来自氨基酸组的任何组分、糖及它们的组合。尽管高渗或低渗溶液可能合适,但优选等张的水性制剂。术语“等张的”指与其它溶液相比该溶液具有相同的张力,如生理盐溶液和血清。张力剂的用量可以是约 5mM-350mM,尤其是 105mM-305mM。

[0467] 也可在抗体制剂中加入表面活性剂以减少制剂抗体的聚集和/或最大程度减少制剂中形成的颗粒和/或降低吸附性。表面活性剂的示范性例子包括聚氧乙基山梨聚糖脂肪酸酯(吐温)、聚氧乙烯烷基醚(Brij)、烷基苯基聚氧乙烯醚(Triton-X)、聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物(泊洛沙姆(Poloxamer)、普朗尼克(Pluronic))和十二烷基硫酸钠(SDS)。优选的聚氧乙烯山梨聚糖脂肪酸酯是聚山梨酯 20(商标吐温 20™)和聚山梨酯 80(商标吐

温 80TM)。优选的聚乙烯-聚丙烯共聚物是商标为普朗尼克® F68 或泊洛沙姆 188TM 的物质。优选的聚氧乙烯烷基醚是商标为 BrijTM 的物质。表面活性剂的示例性浓度范围可以是约 0.001%-1%w/v。

[0468] 也可加入冻干保护剂 (lyoprotectant) 对抗冻干过程中的不稳定条件以保护不稳定活性成分 (如蛋白质)。例如, 已知的冻干保护剂包括糖 (包括葡萄糖和蔗糖)、多元醇 (包括甘露醇、山梨糖醇和甘油) 和氨基酸 (包括丙氨酸、甘氨酸和谷氨酸)。冻干保护剂用量通常为约 10mM-500mM。

[0469] 在一个实施方式中, 该制剂包含上述物质 (即糖基化的抗体、表面活性剂、缓冲剂、稳定剂和 / 或张力剂), 基本不含一种或多种防腐剂, 如乙醇、苄醇、苯酚、间甲酚、对氯间甲酚、对羟基苯甲酸甲酯或丙酯、杀藻胺或其组合。在另一实施方式中, 制剂中可包含防腐剂, 如浓度范围为约 0.001-2%(w/v) 的防腐剂。

[0470] 在一个实施方式中, 本发明抗体制剂为适合肠道外给药的液体或冻干制剂, 可包含:

[0471] - 约 1-200mg/mL 本文所述的糖基化抗体或抗体组合物;

[0472] - 约 0.001-1% 至少一种表面活性剂;

[0473] - 约 1-100mM 缓冲剂;

[0474] - 任选约 10-500mM 稳定剂和 / 或约 5-305mM 张力剂;

[0475] -pH 约 4.0-7.0。

[0476] 在优选实施方式中, 本发明的胃肠道外制剂为含有以下组分的液体或冻干制剂:

[0477] - 约 1-200mg/mL 本文所述糖基化的抗体或抗体组合物,

[0478] -0.04% 吐温 20w/v、

[0479] -20mM L- 组氨酸,

[0480] -250mM 蔗糖,

[0481] -pH 5.5。

[0482] 在更优选实施方式中, 本发明胃肠道外制剂也可包括含有以下组分的冻干制剂:

[0483] -15mg/mL 本文所述的糖基化抗体或抗体组合物,

[0484] -0.04% 吐温 20w/v,

[0485] -20mM L- 组氨酸,

[0486] -250mM 蔗糖,

[0487] -pH 5.5;

[0488] 或者

[0489] -75mg/mL 本文所述的糖基化抗体或抗体组合物,

[0490] -0.04% 吐温 20w/v,

[0491] -20mM L- 组氨酸,

[0492] -250mM 蔗糖,

[0493] -pH 5.5;

[0494] 或者

[0495] -75mg/mL 本文所述的糖基化抗体或抗体组合物,

[0496] -0.02% 吐温 20w/v,

- [0497] -20mM L- 组氨酸,
- [0498] -250mM 蔗糖,
- [0499] -pH 5.5 ;
- [0500] 或者
- [0501] -75mg/mL 本文所述的糖基化抗体或抗体组合物,
- [0502] -0.04% 吐温 20w/v,
- [0503] -20mM L- 组氨酸,
- [0504] -250mM 海藻糖,
- [0505] -pH 5.5 ;
- [0506] 或者
- [0507] -75mg/mL 本文所述的糖基化抗体或抗体组合物,
- [0508] -0.02% 吐温 20w/v,
- [0509] -20mM L- 组氨酸,
- [0510] -250mM 海藻糖,
- [0511] -pH 5.5
- [0512] 在另一更优选实施方式中,本发明胃肠道外制剂也可包括含有以下组分的液体制剂:
- [0513] -7.5mg/mL 本文所述的糖基化抗体或抗体组合物,
- [0514] -0.022% 吐温 20w/v,
- [0515] -120mM L- 组氨酸,
- [0516] -250 125mM 蔗糖,
- [0517] -pH 5.5 ;
- [0518] 或者
- [0519] -37.5mg/mL 本文所述的糖基化抗体或抗体组合物,
- [0520] -0.02% 吐温 20w/v,
- [0521] -10mM L- 组氨酸,
- [0522] -125mM 蔗糖,
- [0523] -pH 5.5 ;
- [0524] 或者
- [0525] -37.5mg/mL 本文所述的糖基化抗体或抗体组合物,
- [0526] -0.01% 吐温 20w/v,
- [0527] -10mM L- 组氨酸,
- [0528] -125mM 蔗糖,
- [0529] -pH 5.5 ;
- [0530] 或者
- [0531] -37.5mg/mL 本文所述的糖基化抗体或抗体组合物,
- [0532] -0.02% 吐温 20w/v,
- [0533] -10mM L- 组氨酸,
- [0534] -125mM 海藻糖,

- [0535] -pH 5.5 ;
[0536] 或者
[0537] -37.5mg/mL 本文所述的糖基化抗体或抗体组合物,
[0538] -0.01% 吐温 20w/v,
[0539] -10mM L- 组氨酸,
[0540] -125mM 海藻糖,
[0541] -pH 5.5 ;
[0542] 或者
[0543] -75mg/mL 本文所述的糖基化抗体或抗体组合物,
[0544] -0.02% 吐温 20w/v,
[0545] -20mM L- 组氨酸,
[0546] -250mM 海藻糖,
[0547] -pH 5.5 ;
[0548] 或者
[0549] -75mg/mL 本文所述的糖基化抗体或抗体组合物,
[0550] -0.02% 吐温 20w/v,
[0551] -20mM L- 组氨酸,
[0552] -250mM 甘露醇,
[0553] -pH 5.5 ;
[0554] 或者
[0555] -75mg/mL 本文所述的糖基化抗体或抗体组合物,
[0556] -0.02% 吐温 20w/v,
[0557] -20mM L- 组氨酸,
[0558] -140mM 氯化钠,
[0559] -pH 5.5 ;
[0560] 或者
[0561] -150mg/mL 本文所述的糖基化抗体或抗体组合物,
[0562] -0.02% 吐温 20w/v,
[0563] -20mM L- 组氨酸,
[0564] -250mM 海藻糖,
[0565] -pH 5.5。
[0566] 或者
[0567] -150mg/mL 本文所述的糖基化抗体或抗体组合物,
[0568] -0.02% 吐温 20w/v,
[0569] -20mM L- 组氨酸,
[0570] -250mM 甘露醇,
[0571] -pH 5.5。
[0572] 或者
[0573] -150mg/mL 本文所述的糖基化抗体或抗体组合物,

[0574] -0.02% 吐温 20w/v,

[0575] -20mM L- 组氨酸,

[0576] -140mM 氯化钠,

[0577] -pH 5.5。

[0578] 或者

[0579] -10mg/mL A β 抗体,

[0580] -0.01% 吐温 20w/v,

[0581] -20mM L- 组氨酸,

[0582] -140mM 氯化钠,

[0583] -pH 5.5。

[0584] 在一个实施方式中,本发明药物组合物为包含下列组分的液体制剂:

[0585] -10mg/mL A β 抗体,

[0586] -0.01% 吐温 20w/v、

[0587] -20mM L- 组氨酸,

[0588] -140mM 氯化钠,

[0589] -pH 5.5。

[0590] 在另一个实施方式中,本发明的药物组合物为包含下列组分的冻干制剂:

[0591] -75mg/mL A β 抗体,

[0592] -0.04% 吐温 20w/v,

[0593] -20mM L- 组氨酸,

[0594] -250mM 蔗糖,

[0595] -pH 5.5。

[0596] 在示例性制剂的上下文中术语“本文所述的糖基化抗体”可包括本发明所述的单糖基化的抗体、本文所述的双糖基化抗体及其混合物。

[0597] 主治医师和临床因素决定给药方案。如医学领域所熟知,任一病人的给药方案取决于很多因素,包括:病人大小、体表面积、年龄、所给具体化合物、性别、给药时间和方式、总体健康状况和同时给予的其它药物。蛋白质性质的药物活性物质的给药量为每剂量 1ng-20mg/kg 体重,例如 0.1mg-10mg/kg 体重、0.5mg-5mg/kg 体重;然而,也考虑到低于或高于此示例范围的剂量,特别是考虑到上述因素时。若方案为连续输注,每分钟给药量应在 1 μ g-10mg/kg 体重的范围内。

[0598] 本文所述药物组合物可配制为短效型、速释型、长效型或缓释型制剂。因此,该药物组合物可适于缓释或控释。

[0599] 利用本领域熟知方法制备缓释制剂。缓释制剂的合适例子包括包含抗体的固体疏水聚合物的半透性基质,其中所述基质为塑形制品形式如薄膜或微胶囊。缓释基质的例子包括聚酯、L- 谷氨酸和乙基-L- 谷氨酸的共聚物、非降解型乙烯-乙酸乙烯酯、水凝胶、聚交酯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。通过使用合适的添加剂、控制水分含量、开发特异性聚合物基质组合物可防止缓释制剂中所含抗体可能发生的生物学活性损失和免疫原性改变。

[0600] 定期评估监测该过程。可局部或全身给予该组合物,即本发明的单糖基化抗体

或双糖基化抗体或其混合物。值得注意的是,外周给药的抗体可进入中枢神经系统,参见 Bard(2000), Nature Med. 6, 916-919 等。胃肠道外给药制剂包含水性和非水性无菌溶液、悬液和乳液。非水性溶剂的例子是丙二醇、聚乙二醇、植物油如橄榄油,以及可注射有机酯如油酸乙酯。水性运载体包括水、醇 / 水溶液、乳液或悬液,包括盐水和缓冲介质。胃肠道外载体包括氯化钠溶液、林格右旋糖溶液、右旋糖和氯化钠、乳糖化林格注射液、或不挥发油。静脉内载体包括液体和营养补充物、电解质补充物(如基于林格右旋糖溶液的补充物)等。也可存在防腐剂和/或其它添加剂,如抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体等。而且,根据药物组合物的计划用途,本发明的药物组合物还可包含其它物质。所述物质可为作用于中枢神经系统的药物,如神经保护因子、胆碱酯酶抑制剂、M1 蕈碱样受体激动剂、激素、抗氧化剂、炎症抑制剂等。尤其优选的是,所述药物组合物中包含其它物质如神经递质和 / 或神经递质替代分子、维生素 E 或 α 硫辛酸。

[0601] 本领域技术人员,具体说但不限于生物化学家、生物学家、化学家、药师和上述专业人员组成的小组,不难工作产生上述药物组合物。医学领域技术人员,如主治医师也清楚如何将此类药物组合物给予需要本文所述药物组合物治疗的病人。此类给药可包含全身给药,如通过输注和 / 或注射给药。然而,也考虑到将本发明化合物和 / 或化合物混合物直接给予脑。例如,该化合物或化合物混合物或化合物制剂可经脑室内或鞘内注射直接给予脑,优选通过缓慢输注以减少对脑实质的影响。也可使用脑内缓慢植入。也考虑到使用基因治疗的方法,例如植入产生本发明所述抗体的重组细胞。这些“重组细胞”应该能够提供本文所定义的可变区糖基化 / 本文所述抗体,尤其是本发明的抗 -A β 抗体的某部分。然而,如上文所指出的,本发明抗体 / 抗体组合物的优点在于它们能够通过血脑屏障并与淀粉斑结合。下文所述的本发明药物组合物可用于治疗迄今未知的或者关于或依赖病理 APP 聚集或病理 APP 加工的所有疾病类型。它们在治疗阿尔茨海默病或胞外 β 淀粉样蛋白沉积似乎起一定作用的其它疾病中尤其有用。它们宜用于人,但本文所述方法、应用及组合物也可用于动物治疗。

[0602] 在本发明的优选实施方式中,上述本发明组合物为诊断性组合物,还任选包含合适的检测手段。诊断性组合物包含上述本发明化合物,即本文所述糖基化抗体中的至少一种。

[0603] 所述诊断性组合物可包含本发明化合物,尤其是本发明的糖基化抗体分子、可溶形式 / 液相,但也考虑到所述化合物结合于 / 附连于和 / 或连接于固体支持物。

[0604] 固体支持物可与本文所述的诊断性组合物联用,或者可将本发明化合物可直接结合于所述固体支持物上。此类支持物为本领域所熟知,包括市售柱材料、聚苯乙烯珠、乳胶珠、磁珠、胶体金属颗粒、玻璃和 / 或硅芯片和表面、硝基纤维素条、膜、薄片、duracytes、反应容器的孔和壁、塑料管等。本发明化合物,尤其是本发明的抗体,可结合于许多不同的运载体。熟知的运载体的例子包括玻璃、聚苯乙烯、聚氯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、聚碳酸酯、右旋糖苷、尼龙、直链淀粉、天然和改性的纤维素、聚丙烯酰胺、琼脂糖和磁石。根据本发明的目的,运载体特性可为可溶性或不溶性。上面鉴定了合适的标记和标记方法,下文中作进一步描述。适合固定 / 固化本发明化合物的方法为人熟知,包括但不限于离子、疏水、共价相互作用等。

[0605] 尤其优选将本发明的诊断性组合物用于检测和 / 或定量测定 APP 和 / 或 APP- 加

工产物,如 β 淀粉样蛋白,或用于检测和 / 或定量测定病理性和 / 或 (遗传) 修饰的 APP 切割位点。

[0606] 如所附实施例所示,本发明糖基化抗体分子尤其可用作以直接免疫荧光法检测阿尔茨海默病人脑切片中真正人淀粉斑的诊断试剂。

[0607] 优选在诊断性组合中使用的所述本发明化合物是可检测标记的。利用本领域熟练技术人员所知且属于本发明范围内的数种技术标记生物分子。本领域一般技术人员了解数种不同标记和标记方法。可用于本发明的标记类型的例子包括酶、放射性同位素、胶体金属、荧光化合物、化学发光化合物和生物发光化合物。

[0608] 常用标记包括荧光染料 (如荧光素、罗丹明和得克萨斯红等)、酶 (如辣根过氧化物酶、 β -半乳糖苷酶、碱性磷酸酶)、放射性同位素 (如 ^{32}P 或 ^{125}I)、生物素、地高辛、胶体金属、化学或生物发光化合物 (如二氧杂环丁烷 (dioxetane)、发光胺或吖啶酮) 等。标记过程,如酶或生物素基团的共价偶联、碘化、磷酸化、生物素化等为本领域所熟知。

[0609] 检测方法包括但不限于:放射自显影、荧光显微术、直接和间接酶反应等。常用检测方法包括放射性同位素或非放射性同位素方法。这些方法包括 Western 印迹、覆盖 (overlay) 实验、RIA (放射性免疫实验) 和 IRMA (免疫放射性免疫测定实验)、EIA (酶免疫实验)、ELISA (酶连免疫吸附实验)、FIA (荧光免疫实验) 和 CLIA (化学发光免疫实验)。

[0610] 而且,本发明提供了本发明糖基化抗体分子、或本发明方法生产的抗体分子、或本文提供的单、双糖基化抗体混合物用于制备预防、治疗和 / 或诊断淀粉样蛋白形成和 / 或淀粉斑形成相关疾病的药物或诊断组合物的应用。进一步优选的是,本文所述化合物,特别是本发明抗体分子用于预防和 / 或治疗与改变或异常的 APP 加工和 / 或淀粉样蛋白形成有关的神经病的应用。将抗体分子,如 (工程改造的) 免疫球蛋白形式,如 IgG 框架、特别是 IgG1 框架中的抗体,或嵌合抗体形式 (尤其是完全人源化抗体或完整抗体)、双特异性抗体、单链 Fv (scFv) 或双特异性 scFv 等用于制备本文所述药物组合物。然而,本文所提供的抗体分子和混合物也可用于诊断,如所附实施例所述,因为本发明抗体分子能特异性作用于或检测 A β 4 和 / 或淀粉样蛋白沉积 / 斑。

[0611] 因此,本发明化合物的发明用途是用于制备治疗需要改善的神经病的药物组合物的用途,例如通过分解 β 淀粉斑、清除淀粉样蛋白 (斑) 或对抗 β 淀粉斑形成的被动免疫来改善该疾病。如所附实施例所示,本发明抗体分子在阻止 A β 聚集和已形成淀粉样蛋白聚集的解聚中尤其有用。因此,本文所述的本发明糖基化抗体或单、双糖基化抗体混合物可用于减少淀粉样沉积物 / 斑,清除淀粉斑 / 斑前体以及保护神经元。尤其考虑到将本发明抗体分子用于防止体内形成淀粉斑以及体内清除已存在的淀粉斑 / 沉积物。而且,本发明抗体分子或混合物可用于对 A β 肽和 A β 聚集体即 β 淀粉斑产生被动免疫。医学使用包含 Fc- 部分的本发明抗体可达到清除 A β 4/A β 4 沉积物的目的。所述抗体的 Fc- 部分在 Fc- 受体介导的免疫应答,例如吸引巨噬细胞 (吞噬细胞和 / 或小胶质细胞) 和 / 或助细胞中尤其有用。介导 Fc- 部分相关的免疫应答时,本发明的抗体分子优选位于 (人) IgG1 框架中。如本文所讨论,优选使用本发明抗体分子或抗体混合物治疗的对象为人对象。也考虑到其它框架,如 IgG2a- 或 IgG2b- 框架可用于本发明抗体分子。在小鼠中尤其考虑了 IgG2a 和 IgG2b 形式的免疫球蛋白框架,例如在本发明抗体分子的科学应用中,如在表达 (人) 野生型或突变型 APP、APP- 片段和 / 或 A β 4 的转基因小鼠中的测试。

[0612] 上述淀粉样蛋白形成和 / 或淀粉斑形成相关疾病的例子包括但不限于痴呆、阿尔茨海默病、运动神经病、帕金森病、ALS (肌萎缩侧索硬化)、痒病、HIV- 相关痴呆以及库贾氏病、荷兰型遗传性脑出血伴淀粉样变、唐氏综合征和衰老相关性神经元疾病。本发明抗体分子及本文提供的组合物也可用于改善和 / 或防止与淀粉样蛋白形成和 / 或淀粉斑形成相关的炎症过程。

[0613] 因此,本发明也提供了治疗、预防和 / 或延迟神经病和 / 或神经变性疾病的方法,其包括给予患有所述神经病和 / 或神经变性疾病的对象和 / 或给予神经病和 / 或神经变性疾病易患个体有效量的抗 A β 抗体分子或本文提供的本发明单、双糖基化 A- β 抗体的混合物和 / 或上文定义的组合物的步骤。本文提供的治疗可包括单独给予本发明化合物 / 组合物或以共同治疗的形式给药,即与其它药物和医药品联合给药。在本发明尤其优选的实施方式中,提供了治疗、预防和 / 或延迟神经病和 / 或神经变性疾病的方法,包括给予需要相应医疗干预的患者本文所提供的包含单、双糖基化抗 A β 抗体的抗体混合物的步骤。

[0614] 本文所用术语“治疗”考虑给予需要的患者本文所述单、双糖基化抗体 (或其混合物)。所述患者可为人患者,在一个实施方式中为患有或易患病理 APP 加工相关性疾病的患者。因此,本文所用术语“治疗”包括预防性和治疗性给予本文提供的化合物或化合物混合物。

[0615] 可用本文提供化合物和组合物治疗的一种疾病是阿尔茨海默病。根据国立神经和语言障碍、中风 / 阿尔茨海默病和相关疾病协会的诊断标准 (NINCDS/ADRDA 标准) (McKhann 等, 1984), 可能诊断有阿尔茨海默病的病人。

[0616] 在本发明的上下文中也可考虑到“共同治疗”情况下使用本文提供的化合物和 / 或组合物,例如当治疗 APP 相关疾病,如阿尔茨海默病时。在所述情况下,考虑到与其它批准药物如美金刚胺、多奈哌齐、酒石酸卡巴拉汀或加兰他敏共同治疗。

[0617] 在又一实施方式中,本发明提供了包含至少一种本文定义的糖基化抗体分子或本文提供的本发明单和 / 或双糖基化方法的混合物的试剂盒。方便地,本发明试剂盒还任选包括缓冲液、储存液和 / 或医学、科学或诊断实验或目的所需的其它试剂和材料。而且,本发明试剂盒的一部分可单独包装于小瓶或瓶中,或者组合包装于容器或多容器单元中。

[0618] 本发明试剂盒宜用于进行本发明方法,并可用于本文引用的数种应用,如用作诊断试剂盒、研究工具或医学工具。此外,本发明试剂盒可包括适合科学、医学和 / 或诊断目的的检测手段。优选依照本领域熟练人员所知的标准步骤生产试剂盒。

附图说明

[0619] 图 1 :重链和轻链序列插入位点的质粒图

[0620] 图 2 :分析色谱图例

[0621] 图 3 :文中所述的 CMT 柱色谱图。双糖基化和单糖基化同种型在双峰 1 中洗脱,未糖基化同种型在峰 2 洗脱。

[0622] 图 4 :抗体 A 同种型的完整 IgG ESI-MS 分析。主峰的分子量以 Da 表示。A :未糖基化的抗体 A ;B :单糖基化的抗体 A ;C :双糖基化的抗体 A

[0623] 图 5 :抗体 N- 糖基化模式的推导方案。以括号表示只发生部分糖基化的结构。A :复合物类型 ;B :杂合子类型 ;C :寡聚甘露糖类型 ;GlcNAc=N- 乙酰基 - 葡萄糖胺、Man= 甘露糖 ;

Gal= 半乳糖 ;Fuc= 岩藻糖 ;NeuAc=N- 乙酰神经氨酸。

[0624] 图 6 :MS 和 HPAEC-PAD 分析推断出的抗体 A Asn306 糖结构的示意图。以括号表示只发生部分糖基化的结构。GlcNAc=N- 乙酰基 - 葡萄糖胺、Man= 甘露糖 ;Gal= 半乳糖 ;Fuc= 岩藻糖 ;NeuAc=N- 乙酰神经氨酸

[0625] 图 7 :抗体 A 同种型与固化纤维状 A β 40 结合 (Biacore 传感器芯片)。抗体浓度 60nM。显示了纯化前所有同种型混合物的结合曲线。

[0626] 图 8 :Pepspot 分析抗体 A 组合物的表位作图。A) 所示单独重叠的十肽点的 pepspot 信号。B) 单独重叠十肽点的信号强度的密度分析。

[0627] 图 9 :解聚实验。抗体 A 组合物和抗体 A 同种型诱导从聚集的 A β 中释放生物素化 A β 。

[0628] 图 10 :包含抗体 A 同种型的抗体 A 组合物从人脑脊液 (CSF) 中捕获可溶性 A β 。平均在 2 个库中分析 4 个阿尔茨海默病人的脑脊液样品。每库进行两次免疫沉淀,然后进行 Western 印迹分析,并利用 Western 印迹光密度对捕获的 A β 进行定量。给定系列 Western 印迹中最高的 A β 值定为 100%。

[0629] 图 11 :体外利用抗体 A 对人淀粉斑进行间接免疫荧光染色。利用 10ng/ml 抗体 A 浓度对真正离体人 β 淀粉斑染色后,进行高度灵敏和特异的检测。利用 (A) 抗体 A 组合物 ;(B) 双糖基化的抗体 A ;(C) 单糖基化的抗体 A ;和 (D) 未糖基化的抗体 A 的山羊抗人 (H+L)-Cy3 抗体检测结合的抗体 A。标尺 =80 μ m。

[0630] 图 12 :共聚焦显微术揭示含有糖基化抗体 A 同种型的 PS2APP 转基因小鼠斑的体内免疫修饰。免疫修饰揭示对小鼠单次给予 1mg 抗体 A 同种型 3 天后抗体 A 同种型的体内结合。图中显示了抗体 A 同种型分布的代表性图片,这些同种型包括双 (A)、单 (B) 和未糖基化的 (C) 抗体 A 同种型。标尺 =80 μ m。

[0631] 图 13 :抗-A β 抗体与细胞表面 APP 的结合分析。流式细胞术分析人 APP 转染的 HEK293 细胞和非转染的对照细胞与抗体的结合。

[0632] 图 14 :抗体 A 非糖基化、单糖基化和双糖基化抗体分子 (免疫球蛋白) 的示意图。

[0633] 图 15 :抗体组合物 (包含单和双糖基化抗体 A)、双糖基化的和单糖基化的抗体 A 同种型 (每周 20mg/kg, i. v.) 或载体治疗 5 个月后,丘脑区总斑表面积 (A)、总斑数目 (B) 以及斑数目和大小分布 (C)。

[0634] 图 16 :抗体组合物 (包含单和双糖基化抗体 A)、双糖基化的和单糖基化的抗体 A 同种型 (每周 20mg/kg, i. v.) 或载体治疗 5 个月后皮层和胼胝体区总斑表面积 (A)、总斑数目 (B) 以及斑数目和大小分布 (C)。

[0635] 图 17 :抗体组合物 (包含单和双糖基化抗体 A)、双糖基化的和单糖基化的抗体 A 同种型 (每周 20mg/kg, i. v.) 或载体治疗 5 个月后海马区总斑表面积 (A)、总斑数目 (B) 以及斑数目和大小分布 (C)。

[0636] 图 18 :抗体组合物 (包含单和双糖基化抗体 A)、双糖基化的和单糖基化的抗体 A 同种型 (每周 20mg/kg, i. v.) 或载体治疗 5 个月后下脚区总斑表面积 (A)、总斑数目 (B) 以及斑数目和大小分布 (C)。

[0637] 图 19 :每两周 1 次共 1、2 和 4 次经 i. v. 将 0.1mg/kg 给予 PS2APP 小鼠后,测量结合于 β 淀粉斑的免疫染色抗体 A 组合物的荧光强度。最后一次注射 2 周后进行分析。

[0638] 图 20 :每月 1 次共 2 和 3 次经 i. v. 将 0.15mg/kg 给予 PS2APP 小鼠后,测量结合于 β 淀粉斑的免疫染色抗体 A 组合物的荧光强度。最后一次注射 2 周后进行分析。

[0639] 图 21 :两周 1 次共 4 次经注射将 0.05、0.1 和 0.30mg/kg 给予 PS2APP 小鼠后,测量结合于 β 淀粉斑的免疫染色抗体 A 组合物的荧光强度,表明淀粉斑结合为剂量相关性。最后一次注射 2 周后进行分析。

[0640] 图 22 :两月 1 次共 3 次经注射将 0.075、0.15 和 0.45mg/kg 给予 PS2APP 小鼠后,测量结合于 β 淀粉斑的免疫染色抗体 A 组合物的荧光强度,表明淀粉斑结合为剂量相关性。最后一次注射 2 周后进行分析。

[0641] 图 23 :人 AD 脑切片与所示浓度抗体 A 组合物及活的分化的人原代巨噬细胞 (80 万细胞 / 毫升) 共孵育 40 小时后,利用抗 A β 鼠单克隆抗体 (BAP-2) 对切片中 A β 进行染色。结果显示淀粉样蛋白载量减少,表明了抗体 A 组合物对 β 淀粉斑的抗原依赖性细胞吞噬作用。标尺 =300 μ m。

[0642] 图 24 :将人 AD 脑切片与 80 万细胞 / 毫升孵育后,抗体 A 组合物对切片中 β 淀粉斑的剂量反应。(A) 显示总斑面积,(B) 是染色强度。

[0643] 图 25 :用 0、0.1、1 和 10 μ g/ml 抗体 A 组合物孵育的 P388D1 细胞的荧光显微照片 (分别为 A-D)。

[0644] 图 26 :利用 A β 偶联荧光珠及 P388D1 细胞定量测定抗体 A 组合物的剂量反应 (表示为相对荧光单位,RFU)。两次独立实验表明抗体 A 组合物的效能范围相当大。

[0645] 图 27 :显示重链恒定区 (Asn 306 ;前 2 列) 和重链可变区 (Asn52 ;第 3、4 列) 中抗体 A 的不同糖结构的表格。

具体实施方式

[0646] 实施例

[0647] 用下列非限定性实施例举例说明本发明。

[0648] 实施例 1 :通过克隆技术产生抗体 A

[0649] 根据本发明,通过常用克隆技术产生 IgG1 分子。用重链可变区 (V_H) 来鉴定抗体 A 的编码序列及表达的氨基酸序列。以下 DNA 序列编码相应的重链例子 :

[0650] caggtggaattggtggaaagcggcgggcgcctggtgcaaccgggcggcagcctgcgtctgagctgcgcg gcc

[0651] tccgattttaccttttagcagctatgcgatgagctgggtgcgccaagccctgggaagggtctcgagtgg gtgagc

[0652] gctattaatgcttctggtactcgctacttattatgctgattctgttaagggtcggttttaccatttcacgt gataattcgaaaa

[0653] acaccctgtatctgcaaataaacagcctgcgtgcggaagatacggcctgtattattgcgcgcgtggta agggta

[0654] atactcataagccttatggttatgttcgttattttgatgtttggggccaaggcaccctggtgacggtta gctcagcctc

[0655] caccaagggtccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggcacagcggccct gggct

- [0656] gcctgggtcaaggactacttccccgaaccgggtgacgggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcgcg
tgca
- [0657] caccttcccggctgtcctacagtccctcaggactctactccctcagcagcgtgggtgaccgtgcctccag
cagcttg
- [0658] ggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgag
ccca
- [0659] gatatcgtgcgatatcgtgcaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgccagcacctgaact
cctgggg
- [0660] ggaccgtcagttcttcttccccccaaaacccaaggacacctcatgatctcccgaccctgaggtc
acatgc
- [0661] gtgggtgggtggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactgggtacgtggacggcgtggaggtg
cata
- [0662] atgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcagctaccgggtgggtcagcgtcctcaccgtcc
tgc
- [0663] accaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcg
agaa
- [0664] aaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatcccgggatga
gctg
- [0665] accaagaaccaggtcagcctgacctgcctgggtcaaaggettctatcccagcgacatcgccgtggagtgg
gaga
- [0666] gcaatgggcagccgggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcc
tctac
- [0667] agcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgatgag
gctct
- [0668] gcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatga (SEQ ID NO :5)。
- [0669] 其编码下列免疫球蛋白 H 链：
- [0670] QVELVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV
- [0671] SAINASGTRTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
- [0672] RGKGNTHKPYGYVRYFDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG
- [0673] GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
- [0674] TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
- [0675] GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
- [0676] NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
- [0677] KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
- [0678] NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSV MHEAL
- [0679] HNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO :6)
- [0680] 如下所示包含额外“前导序列”的序列也可编码同样的重链：
- [0681] atgaaacacctgtggttcttctcctctgctgggtggcagctcccagatgggtcctgtcc
- [0682] caggtggaattggtggaaagcggcgggcgccctggtgcaaccgggcggcagcctgcgtctgagctgcgcg

gcctccg

[0683] gatttaccttttagcagctatgcatgagctgggtgcgccaagccctgggaagggtctcgagtgggtgagcgctattaat

[0684] gcttctggtactcgctacttattatgctgattctgttaagggtcgttttaccatttcacgtgataattcgaaaaacaccctgtatct

[0685] gcaaatgaacagcctgcgtgcggaagatacggcctgtattattgcgcgcgtggtaagggttaataactcataagccttatg

[0686] gttatgttcgttatTTTTgatgtttggggccaaggcaccctggtgacggttagctcagcctccaccaagggtccatcggtctt

[0687] cccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggcacagcggcctgggctgcctgggtcaaggactacttccccg

[0688] aaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctcag

[0689] gactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcaccagacctacatctgcaacgtgaatca

[0690] caagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaattcttgtagacaaaactcacacatgcccaccgtgcc

[0691] cagcacctgaactcctggggggaccgtcagtccttcttccccccaaaaccaaggacaccctcatgatctccccgac

[0692] ccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgt

[0693] ggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgggtggtcagcgtcctcacc

[0694] gtccctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagcccctatga

[0695] gaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgcccccatcccgggattgagctg

[0696] accaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtaaaaggttctatcccagcgacatgccgtggagtgaggagcaat

[0697] gggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacgggtccttcttctctacagcaagctc

[0698] accgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggtctctgcacaacctactac

[0699] acgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaata (SEQ ID NO :25)

[0700] 对应的氨基酸序列为

[0701] MKHLWFFLLLVAAPRWLS

[0702] QVELVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSA

[0703] INASGTRTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGK

[0704] GNTHKPYGYVRYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL

- [0705] GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG
- [0706] TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
- [0707] PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
- [0708] NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
- [0709] VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL
- [0710] DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO :26)
- [0711] 类似地, 下列核苷酸序列编码抗体 A 的轻链:
- [0712] gatatcgtgctgaccagagccccggcgaccctgagcctgtctccgggcgaacgtgcgaccctgagctgc
agag
- [0713] cgagccagagcgtgagcagcagctatctggcgtggtaccagcagaaaccaggtcaagcaccgcgtctat
taatt
- [0714] tatggcgcgagcagccgtgcaactgggggtccccggcgcggttttagcggctctggatccggcacggatttt
accctg
- [0715] accattagcagcctggaacctgaagactttgcgacttattattgccttcagattttataatatgcctatt
acctttggcca
- [0716] gggtagcgaagttgaaattaaacgtacggtagcctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatga
gcagttga
- [0717] aatctggaactgcctctgtttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtga
aggtgga
- [0718] taacgcctccaatcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacag
cctc
- [0719] agcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccat
cagg
- [0720] gcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgttag (SEQ ID NO :7)
- [0721] 并编码下列氨基酸序列 (L 链):
- [0722] DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIY
- [0723] GASSRATGVPARFSGSGGTDFLTITSSLEPEDFATYYCLQIYNMPITFGQ
- [0724] GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
- [0725] DNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ
- [0726] GLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO :8)
- [0727] 同样可使用“前导序列”, 相应的序列为
- [0728] atgggtgttgagaccaggtcttcatttctctgttgctctggatctctgggtgcctacggg
- [0729] gatatcgtgctgaccagagccccggcgaccctgagcctgtctccgggcgaacgtgcgaccctgagctgc
agagcga
- [0730] gccagagcgtgagcagcagctatctggcgtggtaccagcagaaaccaggtcaagcaccgcgtctattaa
tttatggcg
- [0731] cgagcagccgtgcaactgggggtccccggcgcggttttagcggctctggatccggcacggattttaccctga
ccattagcag
- [0732] cctggaacctgaagactttgcgacttattattgccttcagattttataatatgcctattacctttggcca

gggtacgaaagttga

[0733] aattaaacgtacgggtggctgcaccatctgtcttcattctcccgccatctgatgagcagttgaaatctgg
aactgcctctgttg

[0734] tgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaat
cgggtaactc

[0735] ccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgag
caaagc

[0736] agactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaa
gagcttcaa

[0737] caggggagagtgttag (SEQ ID NO :27)

[0738] 该序列编码下列氨基酸序列

[0739] MVLQTQVFISLLLWISGAYG

[0740] DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIY

[0741] GASSRATGVPARFSGSGSTDFLTLSLEPEDFATYYCLQIYNMPITFGQ

[0742] GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV

[0743] DNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ

[0744] GLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO :28)

[0745] 上述序列与 WO 03/070760 所述的 MAB31 有区别。

[0746] 然而, 示例性抗体 A 的重链和轻链也可由下列序列编码 :

[0747] a) 重链

[0748] atggagtttgggctgagctgggttttcctcgttgctcttttaagaggtgattcatggagaaatagagag
actgagtgt

[0749] gagtgaacatgagtgagaaaaactggatttgtgtggcattttctgataacgggtgtccttctgtttgcag
gtgtccagt

[0750] gtcaggtggagctggtggagctctgggggaggcctggtccagcctgggggggtccctgagactctcctgtg
cagc

[0751] gtctggattcaccttcagtagctatgccatgagctgggtccgccaggctccaggcaaggggctcgagtg
ggtgtc

[0752] cgccataaacgccagcggtacccgcacctactatgcagactccgtgaaggggcgattcaccatctccag
agaca

[0753] attccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtg
cgagag

[0754] gcaaggggaacaccacacaagccctacggctacgtacgtactttgacgtgtggggccaaggaaccctgg
tcac

[0755] cgtctctcaggtgagtcctcacaacctctctcctgcggccgcagcttgaagtctgaggcagaatcttg
tccaggg

[0756] tctatcgactcttgtgagaattaggggtgacagttgatggtgacaatttcagggtcagtgactgtct
ggtttctctg

[0757] aggtgagactggaatataggtcaccttgaagactaaagaggggtccaggggcttttctgcacaggcagg

gaaca

[0758] gaatgtggaacaatgacttgaatggttgattcttgtgtgacaccaagaattggcataatgtctgagttg
cccaaggg

[0759] tgatcttagctagactctgggggttttgtcgggtacagaggaaaaaccactattgtgattactatgct
atggactact

[0760] ggggtcaaggaacctcagtcaccgtctcctcaggtagaatggcctctccaggtctttattttaacct
ttgttatgga

[0761] gttttctgagcattgcagactaatcttgatatttgccttgaggagccggctgagagaagttgggaaa
taaactctg

[0762] tctagggatctcagagccttttaggacagattatctccacatctttgaaaaactaagaatctgtgtgatg
gtgttggtg

[0763] gagtccctggatgatgggatagggactttggaggctcatttgaggagatgctaaaacaatcctatggc
tggagg

[0764] gatagttggggctgtagttggagattttcagtttttagaatgaagtattagctgcaatacttcaaggac
cacctctgtg

[0765] acaaccattttatacagtatccaggcatagggacaaaaagtggagtggggcactttctttagatttgtg
aggaatgtt

[0766] ccacactagattgtttaaaacttcatttgttgaaggagctgtcttagtgattgagtcaagggagaaag
gcatctagc

[0767] ctcggtctcaaaagggtagttgctgtctagagaggtctggtggagcctgcaaaagtccagctttcaaag
gaacac

[0768] agaagtatgtgtatggaatattagaagatgttgcttttactcttaagttggttcctaggaaaaatagtt
aaatactgtga

[0769] ctttaaaatgtgagagggttttcaagtactcatttttttaaatgtccaaaatttttgtcaatcaatttg
aggtcttgtttgtg

[0770] agaactgacattacttaagtttaaccgaggaatgggagtgaggctctctcataccctattcagaactg
acttttaac

[0771] aataataaattaagtttaaaatatttttaaatgaattgagcaatgttgagttgagtcaagatggccgat
cagaaccgg

[0772] aacacctgcagcagctggcaggaagcaggctcatgtggcaaggctatttggggaagggaaaaataaaacca
ctag

[0773] gtaaactttagctgtggtttgaagaagtggttttgaaacactctgtccagccccaccaaaccgaaagt
ccaggct

[0774] gagcaaaacaccacctgggtaatttgcatttctaaaataagttgaggattcagccgaaactggagaggt
cctctttt

[0775] aacttattgagttcaaccttttaatttttagcttgagtagttctagtttcccaaacttaagtttatcga
cttctaaaatgtat

[0776] ttagaattcgagctcggtacagctttctggggcaggccaggcctgaccttggctttggggcagggaggg
ggcta

[0777] aggtgaggcaggtggcgccagcaggtgcacaccaatgccatgagcccagacactggacgtgaacct
cgc
[0778] ggacagttaagaaccaggggcctctgcgctgggcccagctctgtccacaccgcggtcacatggcac
cacc
[0779] tctcttgagcctccaccaagggcccatcggtcttccccctggcacccctcctccaagagcacctctggg
ggcaca
[0780] gcggccctgggctgcctgggtcaaggactacttccccgaaccggtgacgggtgctgtggaactcaggcgcc
ctga
[0781] ccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtga
ccgtgc
[0782] cctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtgg
acaa
[0783] gaaagttggtgagaggccagcacagggagggagggtgtctgctggaagccaggctcagcgctcctgcct
gga
[0784] cgcatcccggtatgcagccccagtcaggggcagcaaggcaggccccgtctgcctcttcacccggagcc
tctg
[0785] cccgccccactcatgctcaggagaggggtcttctggctttttccaggctctgggcaggcacaggctag
gtgccc
[0786] ctaaccaggccctgcacacaaaggggcaggtgctgggctcagacctgccaagagccatatccgggagg
acc
[0787] ctgcccctgacctaaagccaccccaaaggccaaactctccactccctcagctcggacaccttctctcct
cccagat
[0788] tccagtaactcccaatcttctctctgcagagcccaaactcttgtagaaaaactcacacatgccaccgtg
cccagta
[0789] agccagcccaggcctcgccctccagctcaaggcgggacaggtgccttagagtagcctgcatccagggac
agg
[0790] ccccagccgggtgctgacacgtccacctccatctcttctcagcactgaactcctggggggaccgtca
gtcttcc
[0791] tcttccccccaaaacccaaggacacctcatgatctcccggaccttgaggtcacatgcgtggtggtgg
acgtga
[0792] gccacgaagacctgaggtcaagttcaactgggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaa
agcc
[0793] gcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggct
gaat
[0794] ggcaaggagtacaagtgcagggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaa
gcca
[0795] aaggtgggacccgtgggggtgcgagggccacatggacagaggccggtcggccccacctctgcctgaga
gtg
[0796] accgctgtaccaacctctgtccctacagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatcc

cgga

[0797] tgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgt
ggagt

[0798] gggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgctgctggactccgacggctcct
tctt

[0799] cctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgat
gcatg

[0800] aggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtccccgggcaaatga (SEQ ID NO :
23)

[0801] b) 轻链

[0802] atggacatgagggctcctcgctcagctcctggggctcctgctgctctgtttccaggtaaggatggagaa
cactagc

[0803] agtttactcagcccaggggtgctcagtactgctttactattcagggaattctcttacaacatgattaat
tgtgtggacat

[0804] ttgtttttatgtttccaatctcaggcgccagatgtgatatcgtgttgacgcagtctccagccacctgt
ctttgtctcca

[0805] ggggaaagagccacctctcctgccgggcccagtcagagtgttagcagcagctacttagcctggtaccag
caga

[0806] aacctggccaggcgcccaggctcctcatctatggcgcatccagcagggccactggcgtgccagccaggt
tcag

[0807] tggcagtggggtctgggacagacttcactctcaccatcagcagcctggagcctgaagatttcgcgaccta
ttactgt

[0808] ctgcagattttacaacatgcctatcacgttcggccaagggaaccaaggtggaaatcaaactgagtagaat
ttaaact

[0809] ttgcggccgcctagacgtttaagtgggagatttggaggggatgaggaatgaaggaacttcaggatagaa
aagg

[0810] ctgaagtcaagttcagctcctaaaaatggatgtgggagcaaactttgaagataaactgaatgaccagag
gatgaa

[0811] acagcgcagatcaaagaggggacctggagctctgagaagagaaggagactcatccgtgttgagtttccac
aagta

[0812] ctgtcttgagttttgcaataaaaagtgggtagcagagttgagtgagecgtaggctgagttctctctttt
gtctcctaag

[0813] tttttatgactacaaaaatcagtagtatgtcctgaaataatcattaagctgtttgaaagtatgactgct
tgccatgtaga

[0814] taccatgtcttgctgaatgatcagaagaggtgtgactcttattctaaaatttgcacaaaatgtcaaaa
tgagagactc

[0815] tgtaggaacgagtccttgacagacagctcaaggggttttttctttgtctcatttctacatgaaagta
aatttgaaatg

[0816] atctttttttattataagagtagaaaatacagttgggtttgaactatatgttttaaatggccacgggtttgt

aagacatttggtc

[0817] ctttgttttccagttattactcgattgtaattttatatcgccagcaatggactgaaacgggtccgcaac
ctcttctttaca

[0818] actgggtgacctcgcggtgtgccagccatttggcggtcacctgcccgttaagggccatgtgaaccccc
gcggt

[0819] agcatcccttgctccggtggaccactttcctgaggcacagtgataggaacagagccactaatctgaag
agaaca

[0820] gagatgtgacagactacactaatgtgagaaaaacaaggaaagggtgacttattggagatttcagaaata
aaatgc

[0821] atttattattatattcccttatttttaattttctattaggaattagaaagggcataaactgctttatcc
agtgttatattaaaa

[0822] gcttaatgtatataatcttttagaggtaaaatctacagccagcaaaagtcatggtaaataattctttgac
tgaactctcac

[0823] taaactcctctaaattatatgtcatattaactggttaaattaataaatttgtgacatgaccttaact
ggttaggttagga

[0824] tatttttcttcatgcaaaaatatgactaataataatttagcacaaaaatatttcccaatactttaattc
tgtgatagaaaaa

[0825] tgtttaactcagctactataatcccataattttgaaaactatttattagcttttgtgtttgaccttcc
ctagccaaaggca

[0826] actatttaaggaccttttaaactcttgaaactacttttagagtcattaagttatttaaccactttta
tactttaaaatgat

[0827] gtcaattcccttttaactattaatttattttaaggggggaaaggctgctcataattctattgttttct
tggtaaagaactct

[0828] cagttttcgtttttactacctctgtcacccaagagttggcatctcaacagaggggactttccgagaggc
catctggca

[0829] gttgcttaagatcagaagtgaagtctgccagttcctcccaggcaggtggcccagattacagttgacctg
ttctggtg

[0830] tggctaaaaattgtcccatgtggttacaaaccattagaccaggtctgatgaattgctcagaatatttc
tggaacccc

[0831] aaatacagacctggcttaaggccctgtccatacagtaggttttagcttggtacaccaaaggaagccat
acagag

[0832] gctaatatcagagtattcttggaagagacaggagaaaatgaaagccagtttctgctcttaccttatgtg
cttgtgttca

[0833] gactcccaaacatcaggagtgctcagataaactgggtctgaatctctgtctgaagcatggaactgaaaaga
atgtagt

[0834] ttcaggaagaaaggcaatagaaggaagcctgagaatacggatcaattctaaactctgaggggggtcgga
tgacg

[0835] tggccattctttgcctaaagcattgagtttactgcaaggtcagaaaagcatgcaaagccctcagaatgg
ctgcaaa

[0836] gagctccaacaaaacaatttagaactttattaaggaatagggggaagctaggaagaaactcaaacatc
aagattt

[0837] taaatacgttcttgggtctccttgctataattatctgggataagcatgctgttttctgtctgtccctaa
catgccctgtga

[0838] ttatccgcaaacacacaccaagggcagaactttgttacttaaacaccatcctgtttgcttctttcct
caggaactgt

[0839] ggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgt
gtgcctgct

[0840] gaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactc
ccagg

[0841] agagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgagcaaag
cag

[0842] actacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaaga
gcttc

[0843] aacaggggagagtgttag (SEQ ID NO:24)

[0844] 实施例 1.1 载体构建

[0845] 抗体 A 序列来源于初筛合成噬菌体展示文库 MorphoSys HuCAL 文库后的二次成熟。最初在德国 MorphoSys 的载体 pMorph 中提供抗体 A 的 DNA, 对应于 W0 03/070760, 附件 p6/43 中图 2 所示 Fab 表达载体。出于本发明目的的载体构建中, 编码载体 pEE6.1 和 pEE14.4 (均购自龙杂生物公司) 以在同一载体中获得含两条链的构建物, 参见附图 1; 参见 W0 87/04462 或 W0 89/01036。应用下列方案进行克隆:

[0846] 利用引物 ACGTAAGCTTGCCGCCACCATGGTGTGCAG (正义链; HindIII; SEQ ID NO. 29) 和引物 ACGTGAATTCCTAACACTCTCCCCTGTT (反义链, EcoRI; SEQ ID NO. 30) 从载体 MS-Roche#7.9.H7_Ig_κ 链 (如 W003/070760 所述) PCR 分离 Igκ 链, 插入 pCR 2.1 Topo TA 中, 并对插入物进行完全测序。HindIII/EcoR 消化 pCR Topo 2.1 从而移出 Igκ 链插入物, 并将其作为 HindIII/EcoRI 插入物连接入载体 pEE14.4 中。

[0847] 利用引物 ACGTAAGCTTGCCGCCACCATGAAACACCTG (正义链, HindIII; SEQ ID NO:31) 和引物 ACGTGAATTCTCATTTACCCGAGACAG (反义链, EcoRI; SEQ ID NO:32) 从载体 pMorph MS-Roche #7.9.H7_IgG1 中 PCR 克隆 Igγ1 重链, 插入 pCR 2.1 Topo TA 中, 并对插入物进行完全测序。HindIII/EcoRI 消化 pCR Topo 2.1 从而移出 Igγ1 重链插入物, 将其作为 HindIII/EcoRI 插入物连接入载体 pEE 6.4 中。NotI/SalI 消化 pEE 6.4 IgG1 移出重链表达盒, 并将分离片段插入 SalI/NotI 消化的 pEE14.4κ 中得到最终双基因构建物 pEE 14.4 mAb-31。

[0848] 实施例 1.2: 转染 CHO 细胞并表达抗体 A

[0849] 根据标准实验方法进行转染。宿主细胞系 CHO K1 衍生自龙杂生物公司工作细胞库 (WCB) #028-W2 (Lonza, 2002, 1-179), 宿主细胞系 CHO K1 SV 衍生自龙杂生物公司主细胞库 (MCB) #269-M (Lonza, 2003, 1-87)。

[0850] 利用脂质体转染 (Fugene, 罗氏诊断公司) 用含有重链和 κ 轻链基因的载体 pEE 14.4 MAb31 转染衍生自 WCB#028-W2 的贴壁 CHO K1 细胞。在 DMEM、GS 补充物 (均来自 JRH

生物科技公司 (JRH Biosciences))、10% 透析 FCS (PAA 实验室公司 (PAA Laboratories), CoS#R0-CEP 2001-083-Rev 00) 和 50 μ M 甲硫氨酸砒亚胺 (MSX 购自西格玛公司 (sigma)) 存在下选择转染分离物。2 周后, 挑选集落并转移至 96 孔培养板, 利用 ELISA 检测抗体的产生。通过有限连续稀释克隆抗体 A 表达量最高的 4 个集落, 以获得单细胞衍生的培养物, 一周后衍生出 82 个克隆并进行扩增。

[0851] 选择其中一个克隆, 其贴壁状态下有着最高特异性产率 48pg/ 细胞 / 天。通过有限稀释进一步亚克隆以获得具有高稳定性的良好抗体生产者 (Pu, (1998) Mol Biotechnol, 10, 17-25)。此外, 利用电穿孔将载体 pEE 14.4 MAb31 转染至 CHO K1 细胞的悬浮变体 CHO K1 SV 细胞 (来自 MCB #269-M) 中。如前所述选择转染子, 通过有限稀释对得到的克隆进行单细胞克隆, 得到数个抗体 A 的高产克隆。

[0852] 实施例 1.3 使抗体 A 表达克隆适应悬浮培养

[0853] 在含有不同蛋白水解产物的 DHI 培养基中检测 CHO K1 克隆的最佳生长性质: 细胞最终适应含有 / 不含谷胺酰胺 (英杰公司 (Invitrogen)) 的 DHI 培养基, 这种培养基是 DMEM、Ham's F12 和 IMDM 分别以 1:1:2(v:v:v) 比例混合的混合物 (Schlaeger 和 Schump, 1992, J Immunol Methods, 146, 111-20), 其中有如下改变: 大豆和稻米水解产物: 0.2% soy HyPep 1510 和 0.2% rice HyPep 5603 (凯瑞生物科技公司 (Kerry Bioscience))、0.03% 普朗尼克 F68 (英杰公司)、25 μ M MSX (西格玛公司) 和 5% 透析 FCS (PAA 实验室公司)。逐渐降低 FCS 浓度, 直到细胞在无血清 DHI 培养基中指数生长。用无血清 DHI 培养基冻存数种重组细胞克隆的原代种子细胞库。

[0854] 利用两步过程 (Lonza) 使 CHO K1 SV 克隆适应从含 10% 透析 FCS 的 DMEM 改变为在含 25 μ M MSX 的化学成分明确的 CD-CHO 培养基 (吉布科-英杰公司 (Gibco-Invitrogen)) 中悬浮生长。在 CD-CHO 中产生细胞库。任选地, 任何其它供 CHO 细胞生长的无血清、无蛋白培养基均可用于悬浮培养并作为抗体表达的基础。

[0855] 实施例 2: 生产抗体 A

[0856] 生产抗体 A (通过补料 - 分批发酵)

[0857] 利用下述方法从振荡培养或旋动培养的储存培养物中发酵制备 CHO 克隆:

[0858] 在 100ml 振荡培养瓶或标称容积 50-75ml 的旋瓶中分别用含 25 μ M MSX 的各培养基解冻 - 冻存管的各克隆。

[0859] 以 1:5 比例连续分瓶扩增细胞, 在振荡培养瓶或旋瓶得到体积为 400-500ml 的储存培养物。用于发酵接种的细胞可衍生自解冻后至多 90 天的这些储存培养物。在 2L 振荡培养瓶或旋瓶中, 种子列车 (seed train) 由 2x1000ml 步骤组成, 随后接种于另一个 10L 发酵罐中。或者, 10L 发酵罐本身可用作补料 - 分批发酵容器或用于接种 100L 通过补料 - 分批发酵罐。培养基中含有 MSX 作为选择条件, 直到接种 10L 发酵罐时除去 MSX。

[0860] 发酵过程:

[0861] 第 0 天: 从 3-4x10⁵/ 毫升细胞开始 (由种子培养物 1:4-1:5 分瓶而来)。

[0862] 第 2-3 天: 开始补料, 细胞密度应高于 1.5x10⁶/ 毫升。

[0863] 补料: 每天 2% 连续或一次性补料。

[0864] 在整个发酵过程中, 利用离子交换色谱监测抗体 A 同种型组合物 (见下)。

[0865] 第 14-18 天: 当细胞活力开始下降 (50%) 并达到预期滴度, 则通过离心和 / 或过滤

和过滤除菌收集细胞上清,并按照下一章节所述进一步处理。

[0866] 按照标准步骤进行发酵,参见如 Werner, (1993), *Arzneimittelforschung*, 43, 1242-9 或 Rendall, (2003), 第十八届 ESACT 会议录 (Proceedings of the 18th ESACT meeting), 2003 年 5 月 11-14 日, 1, 701-704)。

[0867] 实施例 3 :纯化抗体 A

[0868] 纯化过程基于三个色谱步骤和一个渗滤步骤:蛋白 A 亲和色谱、阳离子交换色谱、阴离子交换色谱和利用 100kD 膜进行渗滤。凝胶类型和柱尺寸为 11MabSelect (GE 保健公司 (GE Healthcare), Art. 17-5199, 柱直径 9cm, 床长度 18+/-2cm)、0.41 CM-Toyopearl 650M (托所生物科技公司 (Toso Bioscience), Art. 007972, 小离子容量=85 微当量/毫升, 直径 5.0cm, 床长度 20+/-2cm)、1.31 Q-Sepharose FF (GE 保健公司, Art. 17-0510-04)、直径 9cm, 床长度 20+/-2cm。柱子在室温下运行。组分储存于 2-8℃。在 280nm 处进行检测。使用面积为 0.1m² 的 Biomax 100 超滤模块 (密立博集团公司, Art. P2B100A01) 进行浓缩和渗滤。

[0869] 蛋白 A 色谱

[0870] 使用纯化水制备下列溶液:

[0871] 溶液 A (平衡缓冲液): 25mM Tris, 25mM NaCl, 5mM EDTA, 利用 HCl 调节至 pH 7.1+/-0.1

[0872] 溶液 B (洗涤缓冲液 1): 100mM 乙酸, 用 NaOH 调节至 pH 4.5+/-0.1

[0873] 溶液 C (洗脱缓冲液): 100mM 乙酸, 用 NaOH 调节至 pH 3.2+/-0.1

[0874] 溶液 D (洗涤缓冲液 2): 100mM 乙酸, 75mM NaCl, pH 3+/-0.1

[0875] 溶液 E (再生缓冲液): 2M 盐酸胍, 100mM Tris, 用 HCl 调节至 pH 7.5+/-0.1

[0876] 溶液 F (储存缓冲液): 200mM 苄醇, 100mM 乙酸, 用 NaOH 调节至 pH 5.0+/-0.1

[0877] 首先用 3 床体积的溶液 A 平衡柱子。

[0878] 接下来利用澄清的细胞培养物上清装柱 (45l, 386mg/l 抗体)

[0879] 用 5 床体积的溶液 A 洗涤,

[0880] 用 3 床体积的溶液 B 洗涤,

[0881] 用 3.5 床体积的溶液 C 洗脱, 并收集洗脱液,

[0882] 用 3 柱体积的溶液 D 洗涤, 和

[0883] 用 2 柱体积的溶液 E 再生,

[0884] 用 3 床体积的缓冲液 A 平衡,

[0885] 并且用床体积的缓冲液 F 洗涤以便储存。

[0886] 所有色谱步骤均使用 100cm/h 的线性流速。

[0887] 柱载量为 17.4g 抗体 /l Mabselect 凝胶, 全部同种型混合物的产率为 96%。

[0888] 病毒灭活

[0889] 使用纯化水制备下列溶液:

[0890] 溶液 G (调节溶液): 2M 乙酸钠

[0891] 加入浓乙酸或 2M 乙酸钠 (溶液 G) 将蛋白 A 洗脱液的 pH 调节至 pH 3.5-3.7。搅动 15 分钟然后加入 2M 乙酸钠 (溶液 G) 调节至 pH 4+/-0.1。

[0892] 阳离子交换色谱

- [0893] 使用纯化水制备下列溶液：
- [0894] 溶液 H(平衡缓冲液)：100mM 乙酸，用 NaOH 调节至 pH 4.0+/-0.1
- [0895] 溶液 I(洗脱缓冲液 1)：250mM 乙酸钠，无需调节 pH，pH 7.8-8.5
- [0896] 溶液 J(洗脱缓冲液 2)：500mM 乙酸钠，无需调节 pH，pH 7.8-8.5
- [0897] 溶液 K(再生溶液)：0.5M 氢氧化钠
- [0898] 溶液 L(储存缓冲液)：0.01M 氢氧化钠
- [0899] 首先利用 2 床体积的溶液 K 再生柱，然后用 5 床体积的溶液 H 平衡。
- [0900] 接着用蛋白 A 洗脱液等份装柱，并用 1 床体积的溶液 H 洗涤。
- [0901] 接着用 6 床体积的溶液 I 洗脱。此步骤中，双糖基化和单糖基化同种型被洗脱。在下一步骤中，用 3 床体积的溶液 J 洗脱未糖基化同种型。
- [0902] 在使用两床体积的溶液 K 再生柱后，将柱储存于该缓冲液中 24 小时，接着再用 2 床体积的溶液 K 洗涤。用 3 床体积的溶液 L 洗涤以便存储。
- [0903] 图 3 显示了色谱图例。
- [0904] 如下所述通过分析性 IEX 分析色谱组分。
- [0905] 所有的色谱步骤均使用 100cm/h 的线性流速。
- [0906] 柱载量为 14.3g 抗体 /1 CM Toyopearl 650M，双糖基化和单糖基化同种型混合物的产率为 79%，未糖基化同种型的产率为 6.2%。
- [0907] 利用 Q-Sepharose FF 进行流过 (Flow through) 色谱
- [0908] 使用纯化水制备下列溶液：
- [0909] 溶液 M(稀释缓冲液)：37.5mM Tris，用乙酸调节至 pH 7.9+/-0.1
- [0910] 溶液 N(调节溶液)：2M Tris
- [0911] 溶液 O(平衡缓冲液)：83mM 乙酸钠，25mM Tris，pH 7.5+/-0.1
- [0912] 溶液 P(再生缓冲液 1)：0.5M NaOH/1M NaCl
- [0913] 溶液 Q(再生缓冲液 2)：0.2M 乙酸 /1M NaCl
- [0914] 溶液 R(储存缓冲液)：0.01M NaOH
- [0915] 首先，利用溶液 M 1:3 稀释 CMT 柱(酸性)的洗脱液并用溶液 N 调节至 pH 7.5。
- [0916] 首先利用 2 床体积的溶液 O 平衡柱，接着将稀释的 CMT 柱洗脱液过柱并收集流出液。利用溶液 O 洗掉柱上的产物直至 280nm 吸光度低于 0.1(收集流出液)。
- [0917] 用 1.5 床的溶液 P 再生该柱，储存 1 小时后再用 1.5 床体积的溶液 P 再生该柱。然后再用 2 床体积的溶液 Q 再生该柱，用 3 床体积的溶液 R 洗涤并储存。
- [0918] 所有的色谱步骤均使用 100cm/h 的线性流速。
- [0919] 柱载量为 3.5g 抗体 /1 Q Sepharose FF，双糖基化和单糖基化同种型混合物的产率为 91%。
- [0920] 渗滤
- [0921] 使用纯化水制备下列溶液：
- [0922] 溶液 S(渗滤缓冲液)：20mM 组氨酸，用 HCl 调节至 pH 5.5
- [0923] 滤器支架 Pellicon 2(密立博集团公司)配备有 1 个型号为 Biomax 100(密立博集团公司，面积=0.1m²、Art. P2B100A01)的超滤模块。配有硅树脂管的 WATSON-MARLOW 501U 泵用于泵吸。用缓冲液 O 冲洗该系统，然后于 4-11℃在 1 小时内将 3.8 升(1.1g 抗体 /1)

的 QS 色谱流出液（用浓乙酸调节至 pH 5.5）浓缩至 250-300ml。接着用 3l 缓冲液 S（约为 10 体积）进行渗滤（V= 常量）（4-11°）。最后利用 Millipac 20 滤器（密立博集团公司）对产物进行过滤除菌。超滤 / 渗滤步骤的产率为 91%。产物浓度为 15mg/ml。产物冻存于 -70℃。

[0924] 用于分析组分的分析性 IEX 方法

[0925] 柱: Mono-S HR 5/5 (GE 保健公司, Art. 17-0547-01)

[0926] 缓冲液 1: 50mM 吗啉代乙磺酸, 用氢氧化钠调节至 pH 5.8

[0927] 缓冲液 2: 50mM 吗啉代乙磺酸, 1M NaCl, 用氢氧化钠调节 pH 5.8

[0928] 流速: 1ml/min

[0929] 检测: 280nm

[0930] 上样量: 36-72 μ

[0931] 梯度:

[0932]

时间	%缓冲液 2
0 分钟	0
1	0
25	63
27	63
28	0
35	0

[0933] 图 2 给出示例性色谱:

[0934] 产率

[0935]

步骤	同种型	步骤产率
----	-----	------

[0936]

MabSelect(蛋白 A)	所有同种型的混合物	96 %
CM-Toyopearl 650 M	单糖基化抗体 A 和双糖基化抗体 A 的混合物 未糖基化抗体 A 含量<0.5%	79 %
	未糖基化抗体 A	6.2 %
Q-Sepharose FF	单糖基化抗体 A 和双糖基化抗体 A 的混合物 未糖基化抗体 A 含量<0.5%	91 %
浓缩和渗滤	单糖基化抗体 A 和双糖基化抗体 A 的混合物 未糖基化抗体 A 含量<0.5%	91 %

[0937] 实施例 4: SDS-PAGE 鉴定抗体 A 同种型

[0938] 依照标准实验方法使用 4-12% NuPage 梯度 Bis-Tris 凝胶（英杰公司）和 MARK12（英杰公司）作为对照进行 SDS-PAGE 分析。每孔上样 1-3 μg 蛋白 A 纯化的发酵物

上清液 (Prod 01、02、03) 或旋动培养物上清液 (所有其它泳道)。在还原条件下进行分析时,在重链分子量范围内得到峰 1 的单一条带 (双糖基化抗体 A)、峰 2 的两条条带 (单糖基化抗体 A) 和峰 3 的单一条带 (未糖基化抗体 A)。峰 2 二条带的分子量分别对应峰 1 和峰 2 的分子量。

[0939] 使用以下数种表达系统得到相似的结果,如:HEK 293 EBNA 细胞瞬时转染、CHO 细胞瞬时转染和 CHO 细胞稳定转染。

[0940] 实施例 5:质谱 (MS) 分析鉴定抗体 A 同种型。

[0941] 利用电喷雾电离质谱 A (ESI-MS) 测定所有抗体 A 同种型的完整抗体质谱图。

[0942] 为此,在非还原条件下制备抗体 A 的样品。通过 G25 凝胶过滤使样品脱盐至 2% 甲酸和 40% 乙腈中,然后在沃特斯公司 (Waters) 的 Q-Tof2 或 LCT- 质谱仪上进行 ESI-MS 分析。

[0943] 通过分子量分离得到未糖基化抗体 A 和单糖基化抗体 A 的分子量差别为 1623。从氨基酸序列预测的未糖基化抗体 A 的分子量为 145,987Da,这与实验测定的分子量 145,979Da 吻合。相似的,如图 4 所示单、双糖基化抗体同种型分子量差 1624Da。所观察到的分子量的差异与下文进一步详述的 N-糖基化类型相一致。

[0944] 实施例 6:抗体 A 的 Asn-52 糖基化结构

[0945] Asn52 是重链可变部分序列 aaa-aaa-Asn-Ala-Ser-aaa-aaa 的一部分,其对应 N-糖基化共有序列 Asn-aaa-Ser/Thr。通过对抗体 A 同种型进行胰蛋白酶解肽作图及质谱评估含 Asn52 的肽 HC/T4 确认 Asn52 的 N-连接糖基化。在未糖基化抗体 A 的胰蛋白酶解肽图中,只出现了质量对应于未糖基化 HC/T4 肽的肽,表明 Asn52 未糖基化,而在单、双糖基化的抗体 A 中,检测到质量对应于含 N-连接糖结构的 HC/T4 的肽。

[0946] 为进一步确认在重链蛋白酶解肽 HC/T4 中共有序列的糖基化,从糖基化抗体 A 同种型的肽图中分离糖基化 HC/T4 肽,并在 N-糖苷酶 F 孵育之前和之后进行 MALDI-质谱分析。在 N-糖苷酶 F 作用之前,获得对应包含 N-连接糖结构的 HC/T4 肽的质量。然而,N-糖苷酶 F 作用的 HC/T4 肽的质量对应于所需未糖基化 HC/T4+1Da 的预计质量,正如 N-糖苷酶 F 从天冬酰胺移去糖链 (Asn-Asp 转换) 时的预计质量。

[0947] 在连接于 Asn52 的糖结构中 N-乙酰神经氨酸的出现进一步表明了 N-连接复合物和杂合类型糖结构的存在。因此,单用 N-糖苷酶 F (去除 Asn306 而非 Asn52 上的 N-糖) 处理或与神经酰胺酶联合处理糖基化抗体 A 同种型,并在变性、还原和脱盐分离 HC 和 LC 后进行分析。两种方法处理的 HC 质量相差约 291Da 或 582Da,对应 1 或 2 个唾液酸。由此可知复合物和 / 或杂合类型的 N-连接糖连接于 Asn52。

[0948] Asn-52 糖基化 (N 糖基化) 主要由无核心岩藻糖化的双触角复合物型糖结构 ($\geq 75\%$; 主要为 80-90%) 组成,并且高度唾液酸化,以致于高达 80% 的复合物型触角包含 N-乙酰神经氨酸。少数糖结构分别属于双触角杂合子和寡聚甘露糖型 ($\leq 25\%$) (图 5 或图 27)。所有 Asn52 糖基化结构的共性是无法被 N-糖苷酶 F 从完整抗体 A 上切割下来。

[0949] 实施例 7:抗体 A 的 Asn306 糖基化结构

[0950] 如上指出,抗体 A 含有连接于重链 (HC)Fc- 部分的天冬酰胺 306 (Asn306) 的抗体型糖基化,它由复合物双触角型寡糖链组成。众所周知,抗体包含此类复合物双触角寡糖链的不同同种型,其不同之处在于末端半乳糖化、唾液酸化的程度以及核心岩藻糖化的程度。

此外已知 Fc 糖链结构缺少核心岩藻糖化的程度对于抗体体内的效能很重要,广为接受的是核心岩藻糖化程度调节抗体的效应物功能。

[0951] 对抗体 A 主体而言,发现连接于 Asn306 的 Fc 糖链的抗体典型变化 (Routier(1997), Glycoconjugate 14(2), 201-207; Raju(2003), BioProcess International, 44-52) 与末端半乳糖化和核心岩藻糖化有关。

[0952] 检测到末端半乳糖基化 (G0 :G1 :G2 结构) 程度的异质性为约 35-40%G0- 结构、约 45%G1- 结构和约 15-20%G2- 结构 (参见图 6 或图 27 的结构示意图)。

[0953] 缺少核心岩藻糖化,即缺少连接于核心糖结构最内侧 N- 乙酰葡萄糖胺的岩藻糖单元的 Fc- 糖结构的含量也许对抗体很重要,因为岩藻糖单元的存在与否可调节该抗体与效应细胞 Fc- 受体的结合,从而影响这些细胞的活动。

[0954] 利用下述两种不同方法检测抗体 A 中 Asn306 缺少核心岩藻糖化的糖链同种型的相对含量:

[0955] A) 完全糖基化 HC 的质谱:

[0956] 用 6M 盐酸胍和 250mM TCEP 使抗体 A 变性并还原为轻链 (LC) 和糖基化 HC。还原样品脱盐到 2% 甲酸和 40% 乙腈中,并用于在沃特斯公司的 Q-ToF2 或 LCT-HC 质谱仪上进行 ESI-MS 分析。通过获取的 m/z 谱,通过含有所选单一 m/z 状态的单个寡糖同种型的糖基化 HC 的峰高计算各寡糖同种型相对含量。对于计算缺少核心岩藻糖化的糖结构的相对含量而言,缺少核心岩藻糖的 G0 结构 (G0-Fuc) 的峰高与 G0+(G0-Fuc) 之和相关联。

[0957] 通过糖基化 HC 和 HC 质量差别来区别各个糖结构,在对照实验中 MS- 分析之前,通过与 N- 糖苷酶 F 孵育去除 HC 的寡糖结构。

[0958] B) HPAEC-PAD 色谱分析释放的寡糖:

[0959] 在 pH 7.2 的磷酸钠缓冲液中孵育抗体 A 样品与 N- 糖苷酶 F,以便释放 Asn306 上的寡糖链 (在所使用的条件下,不会从完整非变性抗体释放 Asn52 的糖结构)。通过离心过滤分将释放糖链与抗体 A 蛋白分离开,并在 BioLC 系统中用来自迪氏公司 (Dionex) 的 Carbo Pac PA200 柱进行分析,使用强碱性 (pH 13) 的乙酸钠梯度。所用柱能够将非岩藻糖化的寡糖链与岩藻糖化寡糖链分离开。通过对 Carbo Pac PA200 柱分析的样品停留时间与合适寡糖标准品的停留时间进行比较,并通过测定 MALDI 质谱分离和收集的峰的摩尔质量,可将所获各峰指定到对应的糖结构。为计算缺少核心岩藻糖化糖结构的相对含量,对所有缺少核心岩藻糖的结构的面积分 % 求和。

[0960] 数批双、单糖基化抗体 A 同种型混合物和纯化抗体 A 同种型的分析揭示了非岩藻糖化 Asn306 连接的寡糖链的含量分别在 ~14% - 27% (MS 测定) 和 6%-26% (HPAEC-PAD 测定) 的范围内。

[0961] 实施例 8:利用表面等离子共振 (SPR) 在体外测定抗体 A 组合物和同种型 (如本发明未糖基化、单糖基化或双糖基化抗体) 与 A β 1-40 和 A β 1-42 纤维结合的 KD 值

[0962] 表面等离子共振 (SPR) 在线测定抗体 A 与 A β 纤维的结合,如下所述测定分子相互作用的亲和力:利用 Biacore2000 和 Biacore3000 仪器进行测量。37°C 下在 10mM 醋酸钠缓冲液 (pH 4.0) 中将 200 μ g/ml 浓度的合成肽孵育三天,以便在体外产生 A β 1-40 和 A β 1-42 纤维。电子显微镜确认两种肽的纤维结构, A β 1-40 主要显示为较短纤维 (<1 微米) 而 A β 1-42 主要显示较长纤维 (>1 微米)。假定与无定形聚集物和无结构沉淀的不清

楚混合物相比,这些纤维更接近人AD脑中聚集的A β 肽。将纤维1:10稀释并按照厂商指导手册所述直接偶联于CM5(BIA应用手册(BIAapplication Handbook),AB版,Biacore AB,乌普萨拉,1998)。

[0963] 偶联过程包括活化步骤和固定步骤,在活化步骤中用N-羟基琥珀酰亚胺和盐酸1-乙基-1-(3-二氨基丙基)-碳二亚胺的水性混合物接触表面从而将表面的羧基基团转化成化学反应性琥珀酰亚胺酯基团,在固定过程中,活化表面与溶解于10mM醋酸缓冲液(pH 4.5)的纤维接触达到200-350共振单位(1个共振单位对应的表面载量约为1皮克/mm²)。接着,表面加载纤维与浓度范围为200nM $\geq$ C $\geq$ 0.15nM的抗体溶液接触。图7显示了监测到的结合相(与缓冲液接触期间)和解离相(随后与缓冲液接触期间)的典型的时间依赖反应曲线(=感应谱)。

[0964] 下表中显示了A β 1-40和A β 1-42纤维与抗体A同种型结合的K_D值。简要的,利用Scatchard类型分析计算K_D值,该分析使用浓度依赖的平衡结合反应。可以两种方法获得这些平衡结合常数。

[0965] 由于低抗体浓度下结合过程极慢,所以达到平衡的接触时间间隔非常长(图7)。不过,可以在Biacore仪器上实现这种接触时间间隔,可对实验平衡反应进行Scatchard分析。

[0966] 也可通过无限外推较短时间依赖性结合曲线来获取平衡结合数据。这些理论上获得的平衡结合水平可再次用于测定K_D值。

[0967] 与测定平衡传感器响应曲线的方式无关,可独立获取Scatchard曲线图。从Scatchard曲线图可得到第二亲和成熟循环衍生的抗体A同种型更高(二价)和更低(单价)的亲合相互作用。这两种亲和力代表如下表所示范围的较低和较高的K_D值:

[0968]

		1-40 高亲和 K _D 值 (nM)	1-40 低亲和 K _D 值 (nM)
抗体 A 组合物(单、双糖基化的抗体 A 的混合物)	外推	0.49	27.25
	Stdev	0.10	8.40
	平衡	0.41	21.00
双糖基化的抗体 A	外推	1.43	18.51
	stdev	0.02	22.33
	平衡	1.54	29.00
单糖基化的抗体 A	外推	0.25	7.55
	stdev	0.02	2.06
	平衡	0.12	11.10
未糖基化的抗体 A	外推	0.19	1.99
	stdev	0.03	0.15
	平衡	0.42	2.82

[0969] 上表显示经表面等离子共振检测,由抗体A同种型和A β 1-40纤维相互作用形成的低亲和力复合物(单价)和高亲和力复合物(二价)的K_D值。给出外推平衡反应所得(标记为“外推”)和实验测定平衡反应所得(标记为“实验”)的K_D值。至少测定外推值6

次并给出标准差。基于实验和外推平衡传感器反应的 K_D 在由标准差给定的限度内相等。

[0970] 实施例 9 :通过 Pepspot 十肽分析对抗体 A 组合物及同种型 (如本发明的未糖基化、单糖基化或双糖基化抗体) 进行表位作图

[0971] 表位 (抗原决定簇) 可为线性或构象的。本文所述双表位特异性是抗体与两种非连续线性肽的反应性。

[0972] 用于限定特异性表位识别的表位作图方法是基于使用 6 肽偶联物包被微孔板的 ELISA 技术或基于 pepspot 技术。后一技术可使用将蛋白质 Western 印迹到 PVDF 膜上的已知实验方法检测和定量测定抗体。

[0973] 设计应用表位作图技术以特异性检测线性表位,但是这些技术不能对空间上更复杂的表位如非连续或构象表位进行作图。可应用于构象或不连续表位作图的技术如结构域扫描和组合肽矩阵需要长至 36 个氨基酸的长肽 (结构域) 或各自由 12 个氨基酸组成的肽组合。

[0974] 因此认为所应用的技术为线性表位特异的,不包括不连续或不连续散在的构象表位。

[0975] 总之,所呈现的数据表明本文所定义的 A β 肽内两个区域类似独立线性表位,根据所研究抗体对一种六聚体或十聚体 A β 肽的独特双表位特异性同时识别。

[0976] 将下列包含 A β (1-42) 的氨基酸序列分成含有 1 个氨基酸移码的 43 条重叠十肽。数字指来自 A β 1-40 序列的必需氨基酸,为了使抗体最优结合十肽上必须存在这些氨基酸。

[0977] ISEVKM¹DAEF RHDSGYEVHH QKLVFFAEDV GSNKGAIIGLMVGGVVI⁴²ATV IV (SEQ ID NO : 4)。因此,DAEF RHDSGYEVHHQKLVFFAEDV GSNKGAIIGL MVGGVVIA (SEQ ID NO :3) 代表 A β 4/ β -A4 肽的氨基酸 1-42。

[0978] 供应商 (捷瑞尼生物工具公司 (Jerini BioTools), 柏林) 合成的 43 条十肽 N 末端乙酰化且 C 末端共价连接于纤维素片 (“pepspot”)。在震荡平台上将纤维素片与封闭缓冲液 (50mM Tris • HCl, 140mM NaCl, 5mM NaEDTA, 0.05%NP40 (福禄卡公司 (Fluka)), 0.25% 明胶 (西格玛)、1% 牛血清白蛋白片段 V (西格玛), pH 7.4) 中的单克隆抗体 (1 μ g/ml) 孵育 2 小时。在震荡平台上用 TBS (10mM Tris.HCl, 150mM NaCl, pH 7.5) 洗涤纤维片三次, 各三分钟。然后将纤维片压在滤纸上, 用阴极缓冲液 (25mM Tris 碱, 40mM 6-氨基己酸, 0.01%SDS, 20% 甲醇) 润湿, 转移至半干印迹架, 有肽的一侧面朝向等尺寸的 PVDF 膜 (伯乐公司 (Biorad))。

[0979] 半干印迹架包含新鲜湿润的略大于肽片的滤纸 (Whatman 3 号) :

[0980] 阴极缓冲液润湿的三张纸

[0981] 肽片

[0982] 甲醇湿润的一张 PVDF 膜

[0983] 阳极缓冲液 1 (30mM Tris 碱, 20% 甲醇) 润湿的三张纸

[0984] 阳极缓冲液 2 (0.3mM Tris 碱, 20% 甲醇) 润湿的三张纸

[0985] 在阴阳极电流密度为 0.8mA/cm² 下转移 1 小时, 这个时间足以从纤维素片上完全洗脱抗体并转移至 PVDF 膜上。将 PVDF 膜浸没于封闭缓冲液中 10 分钟。以 1:10000 稀释度将荧光素 IRdye800 标记的山羊抗 - 人 IgG (H+L) (洛克兰公司, 货号 609-132-123) 加入

奥德赛 (Odyssey) 封闭缓冲液中 (Li-Cor), 进一步用 PBS 和 0.05% 吐温 20 1:1 稀释。膜在震荡平台上孵育 1 小时。用 TBST (含 0.005% 吐温 20 的 TBS) 洗涤 3x10 分钟。将膜干燥并用长波长荧光扫描仪 (奥德赛公司 (Odyssey)) 扫描 800nm 荧光, 如图 8 所示。

[0986] 利用针刺标记 PVDF 膜, 以便准确地标记抗体反应斑点。所研究的抗体表位定义为反应肽中的最小氨基酸序列。对每一斑点的荧光强度进行积分并记录为相对荧光单位 (RFU)。为了比较, 以同一方式分析两种小鼠单克隆抗体, 其中 BAP-1 相当于对 N 末端结构域具有特异性的抗体 6E10 (Kim(1998)), BAP-44 相当于对中间结构域具有特异性的抗体 4G8 (Kim(1998)), 除了在检测中使用抗 - 小鼠 Ig 替代抗 - 人 Ig。

[0987] 值得注意的是, 单价 Fab 片段亲和成熟并转变为全长 IgG1 抗体通常会引起表位识别序列的增宽, 如 pepspot 和 ELISA 分析所示。这也许涉及由于亲和成熟在抗体抗原结合区域募集了更多的接触点, 或者涉及与最小表位的更强结合以致可检测到对相邻氨基酸的微弱作用。后者也许是用全长 IgG 抗体探查 A β - 衍生肽时的情况。如下表所示, 当对母体 Fab 和对应完全成熟 IgG 进行比较时, N 末端和中间表位的识别序列扩展三个氨基酸。然而, 值得注意的是为了在氨基酸 C 端共价连接对十肽进行修饰, 该氨基酸由于空间位阻不易接近全长抗体。若在此情况下, 最后一个 C 末端氨基酸未对表位识别序列产生显著贡献, 并且本发明所用的 pepspot 分析中必须考虑最小识别序列的 C 末端可能减少一个氨基酸。

[0988]	抗体	氨基酸位置	氨基酸位置
	双糖基化的抗体 A	3-4(1-10)	18-24(17-26)
	单糖基化的抗体 A	4-5(3-11)	20-26
	未糖基化的抗体 A	3-4	20-24
	抗体 A 组合物(单糖基化和双糖基化的抗体 A 同种型的混合物(1:1))	3-5(3-11)	19-26
	BAP-44(小鼠单克隆)		19-21
	BAP-1(小鼠单克隆)	4-6	

[0989] 上表涉及在纤维素片上对全长 IgG 抗体与十肽结合进行的 pepspot 分析。数字指 A β 1-40 序列中氨基酸的位置, 为了与抗体结合十肽中必须存在这些氨基酸。表位进一步的延伸标示于括号中以便表明达到最大结合所需的侧接氨基酸。

[0990] 实施例 10: 使用抗体 A 同种型 (即本发明未糖基化、单糖基化或双糖基化抗体) 诱导聚集 A β 释放生物素化 A β 的解聚实验。

[0991] 检测抗体 A 同种型诱导聚集 A β 解聚的潜能的实验设定如下:

[0992] 在抗体 A 同种型作用前首先将生物素化 A β 1-40 掺入预制的 A β 1-40/A β 1-42 纤维中。如下所述使用链霉亲和素-POD 偶联物的实验检测生物素化 A β 的释放。

[0993] 在水性缓冲液中孵育数天后, 合成 A β 自发聚集并形成与阿尔茨海默病患者脑中见到淀粉沉积类似的纤维结构。下列体外实验适合用于检测生物素化 A β 掺入预制 A β 聚集体中或从中释放, 从而分析抗 A β 抗体和其它 A β 结合蛋白如清蛋白的 A β 中和作用

(Bohrmann(1999) J. Biol. Chem. 274, 15990-15995)。通过掺入的生物素化 A β 1-40 的释放测量抗体 A 同种型诱导的聚集 A β 解聚。

[0994] 实验步骤：

[0995] 用 A β 1-40 和 A β 1-42 (均为 2 μ M, 每孔 100 μ l) 的 1:1 混合物在 37 $^{\circ}$ C 条件下包被 NUNC Maxisorb 微量滴定板 (MTP) 3 天。在此条件下, 孔表面吸附并固化高度聚集并纤维化的 A β 。移去包被液在室温下干燥该平板 2-4 小时。干燥的平板可存于 -20 $^{\circ}$ C。为了掺入生物素化的 A β , 37 $^{\circ}$ C 下用溶于含 0.05%NaN₃ TBS 的 20nM 生物素化 A β 1-40 孵育包被平板过夜 (200 μ l/孔)。300 μ l/孔 T-PBS 洗板 3 次, 加入用含 0.05%NaN₃ TBS 连续稀释的抗体并在 37 $^{\circ}$ C 孵育 3 小时。洗涤该平板并分析是否存在生物素化 A β 1-40。300 μ l T-PBS 洗涤 3 次后, 加入用含 1%BSA T-PBS 1:1000 稀释的链霉亲和素-POD 偶联物 (100 μ l/孔) (罗氏分子生化公司 (Roche Molecular Biochemicals) 并在室温下孵育 2 小时。300 μ l T-PBS 洗板 3 次, 加入 100 μ l/孔新鲜配制的四甲基联苯胺 (TMB) 溶液。[配制 TMB 溶液: 10ml 30mM 柠檬酸 pH 4.1 (用 KOH 调节) + 0.5ml TMB (12mg TMB 溶于 1ml 丙酮 + 9ml 甲醇) + 0.01ml 35% H₂O₂]。加入 100 μ l/孔 1N H₂SO₄ 中止反应, 在微量滴定板读板机上读出 450nm 的吸光度。

[0996] 如附图 9 所示, 利用掺入的生物素化 A β 1-40 的释放测定抗体 A 同种型诱导的聚集 A β 的解聚。抗体 A 同种型和小鼠单克隆抗体 BAP-1 活性相似 (图 9), 但是显然 BAP-2、BAP-17 和 4G8 抗体从固化 A β 堆中释放生物素化 A β 效能较弱 (数据未显示)。可通过与细胞表面全长 APP 反应的特性清除地区分 BAP-1 与糖基化抗体 A。具有此类特性的抗体如 BAP-1 因其可能诱导自身免疫反应将不能用于治疗应用。有趣的是, 尽管 BAP-2 对暴露于聚集 A β 的氨基酸残基 4-6 具有特异性, 但在此实验中 BAP-2 活性明显较低, 这表明并非所有 N 末端特异性抗体都有等效的从预制聚集物中释放 A β 的能力。BAP-17 (C 末端特异性) 和 4G8 (氨基酸残基 16-24 特异性) 在此实验中效率相对较低是因为这两个表位在聚集 A β 中隐蔽的特性。所用浓度的 BSA 对聚集 A β 无效。

[0997] 与双糖基化同种型相比, 单糖基化同种型在体外具有更高的解聚聚集 A β 肽的能力, 在体内也许相同。

[0998] 实施例 11: 抗体 A 组合物及包含同种型 (本发明单、双糖基化的抗体) 从人脑脊液 (CSF) 中捕获可溶性 A β

[0999] 利用免疫沉淀 (IP) 和半定量 Western 印迹 (WB) 分析测定从人 CSF 中捕获可溶性 A β 的能力。

[1000] 实验步骤：

[1001] 按照以下方案免疫沉淀人 CSF：

[1002] 70 μ l 人 CSF

[1003] 20 μ l 孵育缓冲液 (50mM Tris, 140mM NaCl, 5mM EDTA, 0.05%NP-40, 1%BSA, 0.25%明胶, 0.25%奶粉, pH 7.2)

[1004] 10 μ l 来自母液的抗体 A (1000-10 μ g/ml)

[1005] 100 μ l

[1006] 溶液置于 4 $^{\circ}$ C 1 小时。加入 40 μ l 蛋白 G 琼脂糖珠 (安玛西亚生物科技公司 (Amersham Biosciences) #17-0618-01; PBS 洗涤, 50%浆液) 并在旋转器上 4 $^{\circ}$ C 孵育 2 小时。

4°C 500g 离心 3 分钟后, 去除上清并将 200 μ l PBS 加入珠中, 转移到密立博滤器管 0.45 μ m 中 (密立博公司 #UFC30HVN) 并在 4°C 500g 离心 3 分钟。珠子中再加入 200 μ l PBS, 涡旋并在 4°C 2000g 离心 3 分钟。加入 45 μ l 含 DTT 的 1xNuPage 样品缓冲液, 70°C 放置 10 分钟后, 4°C 2000g 离心 3 分钟。

[1007] 在 SDS-PAGE 中, 将 18 μ l 蛋白 G 洗脱液施加到 NuPage 凝胶 10%Bis-Tris 凝胶上, 同时将 A β ₁₋₄₂ (霸凯公司 (Bachem)) 直接加入样品缓冲液作为内标, 并在 MES 缓冲系统中电泳。

[1008] 将该凝胶转移到 Hybond C extra 膜 (挪威克斯公司 (Novex) 半干系统) 上。室温下干膜 3 分钟。将膜转移到预热的 PBS 中并在 600W 微波炉中加热 3 分钟。利用 SuperBlock 溶液 (皮尔斯公司 (Pierce)) 封闭 1 小时, 再用含 5% 奶粉 (伯乐公司) 的 T-PBS (含 0.1% 吐温 20 的 PBS) 封闭 1 小时。

[1009] 4°C 下用抗 A β 抗体 W02 抗体 (1:1500-1:2000 稀释, 基因泰克公司, 苏黎世, 瑞士) 在旋转器上孵育过夜, 然后用 T-PBS 洗涤三次每次 5 分钟, 然后在室温下用 T-PBS 1:5000 稀释的抗小鼠 IgG-HRP (达科公司 (Dako)) 孵育 2 小时。再用 T-PBS 洗涤三次每次 5 分钟, 接着用 LumiLight Plus 在室温下孵育 5 分钟。利用 Alpha Innotech 数码相机系统将 Western 印迹数字化并分析其光密度。

[1010] 如图 10 所示, 免疫沉淀和 Western 印迹实验显示抗体 A 组合物 (包含单和双糖基化的抗体 A 同种型) 与人 CSF 中可溶性 A β 有效结合。值得注意的是, 在这个实验中, 单糖基化的抗体 A 比双糖基化的抗体 A 能够更有效捕获可溶性 A β (图 10)。

[1011] 实施例 12: 抗体 A 组合物和同种型 (如本发明的未糖基化、单糖基化或双糖基化抗体) 对人淀粉斑进行体外免疫染色。

[1012] 利用间接免疫荧光通过免疫组织化学分析检测糖基化的抗体 A 同种型对获自严重阿尔茨海默病患者脑切片的真正人 β -淀粉斑的染色能力。显示了对真正人 β -淀粉斑特异和敏感的染色。

[1013] 间接免疫荧光标记来自于阿尔茨海默病诊断阳性病人尸检获取的丘脑未固定组织的冰冻切片。使用连续的两步孵育检测结合的抗体 A 同种型, 通过亲和纯化的偶联于 Cy3 的山羊抗人 (GAH) IgG (H+L) (#109-165-003, 批号 49353, 杰克逊免疫研究公司 (Jackson Immuno Research)) 显示。对照组包括单独的无关人 IgG1 抗体 (西格玛公司) 和第二抗体, 均产生阴性结果。

[1014] 所有类型 β 淀粉斑均被敏感、特异的检测并当抗体 A 浓度为 10ng/ml 时被一致揭示 (图 11)。

[1015] 当糖基化抗体 A 同种型浓度高至 1 μ g/ml 时, 能特异和灵敏地对真正人 β 淀粉斑染色。

[1016] 浓度为 10 μ g/ml 时观察到背景染色, 使用未糖基化的抗体 A 同种型时最显著。经过体外组织切片, 未糖基化同种型在接触的载玻片表面和几乎所有组织组分上具有相当大的非特异性粘性。这似乎是离子和 / 或疏水作用造成的非特异性结合。

[1017] 实施例 13: 在小鼠阿尔茨海默病模型中利用抗体 A 修饰 β 淀粉斑

[1018] 为研究糖基化的抗体 A 同种型体内免疫修饰 β 淀粉斑的能力, 利用单次给药研究在 PS2APP 双重转基因小鼠 (Richards (2003)、J. Neuroscience、23、8989-9003) 中进行研

究。以 1mg/ 小鼠的剂量给予糖基化的抗体 A 同种型,3 天后用磷酸盐缓冲盐水对动物进行灌注,将脑冻存于干冰上,准备用于冰冻切片。

[1019] 两种糖基化同种型均在体内显示了改进的和高效的脑渗透作用(与未糖基化形式相比)。在一种 AD 相关淀粉样变的小鼠模型,PS2APP 小鼠中显示了有效的脑渗透及对 β 淀粉斑的特异性结合。

[1020] 用未固定的冰冻切片评估 β 淀粉斑结合抗体的存在,其中采用偶联于 Cy3 的山羊抗人 IgG (H+L) (#109-165-003,杰克逊免疫研究公司)进行间接免疫荧光单一标记(图 12),或者再利用 BAP-2-Alexa488 免疫偶联物复染以观察组织中存在的所有 β 淀粉斑类型的位置和分布。

[1021] 利用免疫荧光染色方法检测结合的抗体 A。切片黏附于预冷的载玻片后,于 PBS 中水化,再用 -20°C 预冷的丙酮处理 2 分钟。用 PBS 洗涤两次每次 2 分钟。用含 1% BSA 的 PBS 封闭非特异性结合位点,或通过 UltraV block(拉波威信公司(LabVision))孵育 5 分钟、PBS 洗涤、在含 10% 正常绵羊血清的强力封闭溶液(博奥基因公司(Biogenex))中孵育 20 分钟进行封闭。在含有 10% 正常绵羊血清的 PBS 中洗涤后,用亲和纯化的偶联于 Cy3 的山羊抗人 (GAH) IgG (H+L) (#109-165-003,批号 49353,杰克逊免疫研究公司)(浓度 $15\mu\text{g}/\text{ml}$) 室温下孵育该载玻片 1 小时。通过与浓度为 $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 的一种偶联于 Alexa 488 的小鼠单克隆抗体抗体 BAP-2 室温下孵育 1 小时对淀粉斑进行复染。在 4mM CuSO_4 的 50mM 醋酸铵溶液中孵育以淬灭脂褐质(lipofuscin)的自发荧光。用双蒸水冲洗盖片并用 $500\mu\text{l}$ PBS/片洗涤两次,用荧光封片剂(达科公司(Dako)S3023)包埋盖片。

[1022] 用激光共聚焦显微术成像,用 IMARIS 和 COLOCALIZATION 软件(比特普兰公司(Bitplane),瑞士)对图片进行共定位的定量分析。

[1023] 小鼠单次给药 1mg/ 小鼠三天后,发现糖基化的抗体 A 同种型在体内透过血脑屏障并有效免疫修饰/结合所有的 β 淀粉斑。图 12 显示了代表性图片。明显的对比是未在淀粉斑处检测到未糖基化形式。

[1024] 实施例 14:抗体 A 同种型与 HEK293 细胞表面表达的淀粉样前体蛋白(APP) 结合的研究

[1025] 本领域熟知流式细胞术。流式细胞术测量的相对荧光单位(如 FL1-H)表明各抗体与细胞表面的结合。与未转染的 HEK293 相比,APP 转染的 HEK293 发生的荧光改变表明与细胞表面发生不良反应。例如,与未转染的 HEK293 细胞相比(图 13,虚线,右图),抗 N 末端结构域的抗体 BAP-1 和 BAP-2 能显著改变 HEK293/APP 的 FL-1 信号(图 13,实线,右图)。类似地,BAP-44 抗体(中间 $\text{A}\beta$ 表位特异性)引起的改变大小相似。相反,所有的抗体 A 同种型(图 13 左图)(N-末端和中间 $\text{A}-\beta$ 表位特异性)未显示出显著荧光改变。未转染的 HEK293 细胞比 APP 转染细胞显示出更高的本底荧光,这是因为不同的细胞大小及表面特性。FACScan 仪器与 Cellquest Pro 软件包(均为贝克顿迪金森公司产品(Becton Dickinson))联合使用。

[1026] 抗体 A 同种型对细胞表面 APP 无反应性(图 13)。

[1027] 实施例 15:小鼠阿尔茨海默病模型中 $\text{A}\beta$ 淀粉斑沉积的形态学分析

[1028] 利用定量计算机辅助影像分析研究接受 5 个月抗体 A 组合物或抗体 A 同种型治疗的 PS2APP 小鼠脑的不同区域(丘脑、皮层、海马区和下脚)的中抗体 A 组合物或抗体 A 同

种型体内降低淀粉样变的能力。

[1029] 因此,利用抗体 A 组合物或抗体 A 同种型及载体对雄性 PS2APP 转基因小鼠进行静脉注射。75 只 5-6 月龄的 PS2APP 小鼠分为 5 组 (A-E),每组 15 只小鼠。从第 0 天开始,每只小鼠通过尾静脉推注接受 0.1mL 载体 (0mg/kg)、或抗体 A 制剂 (20mg/kg)。A、B、C、D 和 E 组 PS2APP 小鼠分别接受载体 (组氨酸缓冲盐水)、含有单、双糖基化抗体 A 但不含未糖基化抗体 A 的抗体 A 组合物、双糖基化的抗体 A、单糖基化的抗体 A 和未糖基化的抗体 A。

[1030] 注射抗-CD-4 抗体 (杂交瘤克隆 GK 1.5 购自 ATCC) 诱导对人抗-A β 抗体给药产生免疫耐受。对耐药抗体的监测表明抗体治疗的动物在治疗 16 周以上后仅发生中等程度的免疫应答并且可检测抗体具有低亲和力或者仅有少量产生 (数据未显示)。

[1031] 治疗 5 个月后小鼠被处死。对未固定的脑进行矢向切片,包括丘脑、海马结构和皮层区。每一脑半球按照如下方法制备 50 张切片:从侧面~1.92 处开始,连续切出 5 个 5x10 μ m 和 5x20 μ m 切片。连续切片中没有间隔,共使用组织 750 μ m。因此切片系列在侧面约 1.20 处结束 (Paxinos 和 Franklin,2003)。为了进行形态定量分析,每十张切片使用一张。

[1032] 使用浓度为 5 μ g/ml 的双糖基化抗体 A 同种型对切片中的淀粉斑沉积物进行染色。使用偶联于 Alexa-488 荧光团的小鼠单克隆抗体 (BAP-2) (5 μ g/ml) 对 A β 染色的结果相当,尽管神经元的显著胞内和背景染色干扰了下述图片常规处理。应用 15 μ g/ml 浓度的亲和纯化的偶联 Cy3 的山羊抗-人 (GAH) IgG (H+L) (#109-165-003,批号 49353,杰克逊免疫研究公司 (Jackson Immuno Research)) 在室温下孵育 1 小时以便检测。500 μ l PBS/片洗涤两次后,用荧光封片剂 (S3023,达科公司) 包埋该载玻片。

[1033] 使用 GenePix 个人 4100A 微阵列扫描仪 (埃克松仪器公司 (Axon Instruments), 现在为分子仪器公司 (Molecular Devices),美国加州) 获取图像。通过计算机辅助图像分析使用无偏形态测定方法,使用两个参数测量 β 淀粉斑载量和数目,这两个参数是 β 淀粉斑覆盖面积的百分数和 β 淀粉斑数目。使用 MCID M7 Elite 软件 (图像研究公司 (Image Research Inc),加拿大安大略省圣凯瑟琳 (St. Catherines/Ontario,Canada)) 定量测定斑载量和数目。用细节提取滤镜和靶点着重滤镜增强扫描图像。对所得图像进行二进制化、根据染色强度调整阈值。在原始参考图像上标示出伪像、血管和边缘效应。在参考图像上勾画感兴趣区域。在二进制图片中测量这些区域的面积、斑占据面积以及斑数目以进行最终的定量。忽略单一像素。使用通用电子表格软件进行计算 (微软 Excel,美国华盛顿州雷蒙德)。将斑尺寸分为 11 组,范围从 <100 到 >1000 μ m²。使用双尾异方差 t-检验进行统计学评估。

[1034] 为了进行比较和统计评估,利用一组 (15 只动物) 未治疗 6 月龄 PS2APP 小鼠开始研究,以测定淀粉样变 (β 淀粉斑病) 基线。具有显著性水平的结果显示于图 15-18 中 (*: $p \leq 0.05$;** : $p \leq 0.01$;*** : $p \leq 0.001$)。

[1035] 在丘脑区淀粉斑的减少尤其显著 (图 15)。经测定抗体治疗组总 β 淀粉斑表面积平均减少:抗体 A 组合物 64%、双糖基化的抗体 A 70%、单糖基化的抗体 A 81% 和未糖基化抗体 A 44%。总 β 淀粉斑数目平均减少:抗体 A 组合物 70%、双糖基化的抗体 A 78%、单糖基化的抗体 A 82% 和未糖基化抗体 A 36%。值得注意的是未糖基化抗体的显著性低,观察到变化相当大。

[1036] 图 16 显示新皮质区域及胼胝体淀粉斑的减少。经检测抗体治疗组总 β 淀粉斑表面积平均减少:抗体 A 组合物 19%、双糖基化的抗体 A 27%、单糖基化的抗体 A 30% 和未糖基化抗体 A 10%。总 β 淀粉斑数目平均减少:抗体 A 组合物 40%、双糖基化的抗体 A 46%、单糖基化的抗体 A 42% 和未糖基化抗体 A 11%。

[1037] 图 17 显示整个海马区淀粉斑的减少。经检测抗体治疗组总 β 淀粉斑表面积平均减少:抗体 A 组合物 12%、双糖基化的抗体 A 24%、单糖基化的抗体 A 24% 和未糖基化抗体 A 6%。总 β 淀粉斑数目平均减少:抗体 A 组合物 36%、双糖基化的抗体 A 46%、单糖基化的抗体 A 37% 和未糖基化抗体 A 3%。

[1038] 图 18 显示淀粉样变高度易感区域脑下脚淀粉斑的减少。经检测抗体治疗组总 β 淀粉斑表面积平均减少:抗体 A 组合物 2%、双糖基化的抗体 A 12%、单糖基化的抗体 A 5% 和未糖基化抗体 A 1%。总 β 淀粉斑数目平均减少:抗体 A 组合物 22%、双糖基化的抗体 A 36%、单糖基化的抗体 A 13% 和未糖基化抗体 A 1%。抗体 A 组合物和主要 N-糖基化同种型(双糖基化的抗体 A 和单糖基化的抗体 A)降低 β 淀粉斑载量和斑数目的效能相当。斑载量的减少最明显并在低或中等淀粉样变区域具有统计学显著性。

[1039] 总之,在所有测量的脑区域发现,用抗体 A 组合物和两种含 Asn52 糖基化的抗体 A 同种型治疗后, β 淀粉斑数目的减少具有统计显著性。相反的是,发现对丘脑 β 淀粉斑数目的影响很小,使用抗体 A 的未糖基化同种型治疗后对其它研究脑区域的 β 淀粉斑数目无显著影响,其中未糖基化同种型是在本发明详述的纯化后被排除于抗体 A 组合物之外。

[1040] 我们也研究了涉及斑大小的斑清除效力。通常,发现受试人抗 $A\beta$ 抗体能明显清除小 β 淀粉斑。该现象在全部脑区域均可观察到(图 15C、16C、17C 和 18C)。相反,用抗体 A 的未糖基化同种型观察到的趋势很小或无显著性趋势。

[1041] 对于抗体 A 和主要 Asn52 糖基化同种型的比较分析显示其降低斑载量的能力相当,然而未糖基化同种型则没有显著降低斑载量的效应。

[1042] 实施例 16:抗体 A 组合物与 β 淀粉斑结合的体内药代动力学。

[1043] 比较两种给药频率以研究抗体 A 组合物的结合动力学,如上述定义抗体 A 组合物包含单糖基化抗体 A 和双糖基化抗体 A,不含未糖基化抗体 A。

[1044] 因此,通过尾静脉注射给予 PS2APP 转基因雄性小鼠抗体 A 组合物,每隔两周给予 0.05、0.1 和 0.3mg/kg 共给四次,或者每隔一个月给予 0.075、0.15 和 0.45mg/kg 共给三次。为了比较,每隔两周给予 0.1mg/kg 一次和两次,每隔一月给予 0.15mg/kg 两次,最后一次给药两周后处死所有小鼠。根据 Paxinos 和 Franklin,准备未固定的 PS2APP 脑组织(包括丘脑、海马结构和皮层区域)在侧向 ~ 1.92 至 1.2mm 处进行矢向切片。在低温器中制作 40 μ m 脑切片。

[1045] 使用免疫荧光离体免疫染色法检测结合的抗体 A 组合物抗体。因此,将脑切片,并与检测抗体一亲和纯化的偶联 Cy3 的山羊抗人 (GAH) IgG (H+L) (#109-165-003,批号 49353,杰克逊免疫研究公司 (Jackson Immuno Research)) (15 μ g/ml) 室温下孵育 1 小时。使用一种偶联 Alexa488 荧光团的小鼠抗 $A\beta$ 单克隆抗体 BAP-2 (0.5 μ g/ml) 室温下孵育 1 小时,以便对 β 淀粉斑进行复染。

[1046] 如上所述使用莱卡 (Leica) TCS SP2 AOBS 激光共聚焦扫描显微镜记录接近小脑的皮层枕叶的图像。利用 IMARIS 软件 (比特普兰 (Bitplane), 瑞士) 进行计算机辅助图像处

理。首先利用软件的裁剪功能选择较低剂量（两个最高剂量 0.3 和 0.45mg/kg 除外）的斑图像，因为获取最高剂量组的线性信号记录需要不同的增益设定。在设定阈值 (T) 为 β 淀粉斑位点上结合的 GAH-Cy3 的读数后，使用超越 (SURPASS) 功能选取正体素 (voxel)。对于较低和较高剂量组，阈值分别设定为 19 和 12。作为 β 淀粉斑特异性的对照，比较双重标记后 GAH-Cy3 染色图像和偶联 Alexa488 的小鼠单克隆 BAP2 染色的斑图像，并在不同通道记录。

[1047] 使用 IMARIS MeasurementPro 软件模块对所有图像的定量描述进行描述性统计。选择低剂量组 β 淀粉斑或高剂量组图像总信号确定平均体素荧光强度 (MVI) 值。机器噪声、组织散射信号和脂褐质自发荧光引起基线 MVI (B)。为了校正背景，测量远离 β 淀粉斑区域的平均信号强度确定 B，并从所有测定图像 MVI 中减去 B (MVI-B=S)。从每个剂量组的每只小鼠的每张脑切片上获取 3-4 张图像得到类似斑平均强度的信号强度 (S)。为了具有可比性，将信号强度标准化至获自早先研究的参比样品。我们使用单次给药 0.25mg/kg 后的 PS2APP 小鼠脑切片作为参照。给药后一周作为测量终点。

[1048] 将全部测量强度值标准化至使用单次给予 0.25mg/kg 抗体 A 组合物一周后测量的 β 淀粉斑处的平均强度（见下表）。对每剂量组 3 只动物进行免疫染色并测定其信号强度平均值后，用 CLSM 得到免疫阳性 β 淀粉斑的平均相对荧光强度的标准化值。仅在低剂量组观察到无抗体 A 组合物衍生的抗体 A 的斑，很可能由于抗体 A 组合物衍生的抗体 A 有限或部分占据了斑表面，而在切片过程中丢失。因此，仅将免疫阳性斑纳入比较分析中。

[1049] 下表显示 PS2APP 转基因小鼠中多次静脉推注抗体 A 组合物后每个剂量组的平均相对荧光强度：

[1050]

剂量- 间隔/注射次数	免疫阳性抗体 A 组合物 β 淀粉斑的平均荧光强度标 准化值		抗体 A 组合物免疫阴 性 β 淀粉斑的百分比
	%	SD	%
0.25mg-单次 ¹	100	6	0
0.05mg-每两周/4x	53	2	58
0.075mg-每月/3x	57	6	39
0.15mg-每月/2x	106	6	19
0.1mg-每两周/1x	59	8	45
0.1mg-每两周/2x	83	26	21
0.1mg-每两周/4x	88	12	2
0.15mg-每月/3x	93	19	1
0.3mg-每两周/4x	148	24	0
0.45mg-每月/3x	184	20	0

[1051] ¹ 实验数据代表标准化至 1 周后单次给药 0.25mg/kg 所得数据的强度值。

[1052] 图 19 显示抗体 A 组合物结合和连续每两周给药 0.1mg/kg 次数的关系。两次给药后，虽然免疫染色的程度差异大而且并未达到显著性，但平均强度出现上升。4 次注射后， β 淀粉斑的免疫染色更加均一，但平均强度仅轻微上升。总体上，双周给药的数据清楚表明斑结合增加的趋势与给药次数相关。

[1053] 图 20 显示抗体 A 组合物结合和连续每月给药 0.15mg/kg 的次数的关系。有趣的

是,给药两次和三次后获得的水平相当。这并非所期望的结果,也许表明启动了早期效应,这种效应导致清除机制的时间依赖性差异(如小胶质细胞活化延迟)。

[1054] 图 21、22 显示抗体 A 组合物结合效力和给药剂量的关系。双周给予 0.05、0.1 和 0.3mg/kg(图 21)和每月给予 0.075、0.15 和 0.45mg/kg(图 22)清楚显示了剂量关系。有证据表明反应是非线性的,并且其它因素如小胶质细胞活化时间延迟也可能影响所观察到的非线性。

[1055] 因此得出以下结论:抗体 A 组合物与小鼠 A β 斑结合是剂量相关的,表明多次给药具有累加效应。

[1056] 实施例 17:抗原依赖性胞吞作用分析。

[1057] 为了检测抗体 A 组合物介导的胞吞效应,将来自 AD 脑切片的真正 A β 斑与不同浓度抗体 A 组合物(如上文所定义抗体 A 组合物包含单糖基化抗体 A 和双糖基化抗体 A 但不含未糖基化抗体 A)预孵育,并且接触活的人原代单核细胞。

[1058] 由严重 AD 病例(Braak 第 IV 阶段)制备皮层枕叶区的未固定的人 AD 脑组织切片。切片在 PBS 中再水化 5 分钟后加入活细胞。使用 PBS 配制的指定浓度抗体 A 组合物抗体孵育 1 小时。PBS 洗涤后加入活细胞。在 37℃、5% 二氧化碳的条件下,用含 1% 抗生素(稀释自含有 10,000U/ml 青霉素和 10,000mg/ml 链霉素(吉布科 #15140-122)的母液)的 RPMI 1640(吉布科 #61870-044)培养基培养密度为 0.8 和 1.5×10^6 /ml 的预刺激的人原代单核细胞 2-4 天。制备预刺激人原代单核细胞的方法为本领域所熟知,如使用刺激因子如巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)制备。

[1059] 孵育后,小心移去培养基,在含 2% 甲醛的 PBS 中化学固定 10 分钟以保存切片。使用浓度为 10mg/ml 的一种偶联 Alexa 488(分子探针公司(Molecular Probes):A-20181,单克隆抗体标记试剂盒)的小鼠单克隆抗体抗体 BAP-2 在室温下孵育 1 小时,对残留淀粉斑载量进行染色。

[1060] 通过测量免疫荧光染色的残留 A β 斑确定斑移除的量。利用莱卡 TCS SP2 AOBS 共聚焦激光扫描显微镜记录图像。采用 488nm 激发波长、针孔设定 4、HCX PL FL 20x/0.40 校正物镜记录一个光学层面,但在一个实验中,使用 HCPL Fluotar 10x/0.30 物镜、针孔设定 3。在所有图像中保持仪器设定不变以便于比较相关定量结果。特殊的,调整激光功率、增益和偏移量以使观察信号强度处于动态监测范围内。对于每一抗体 A 组合物浓度,在连续切片的相似位置记录灰质区以便最大程度减小解剖学差异可能对斑载量造成的波动。在所有抗体 A 组合物浓度缺少细胞的条件下,测定抗体 A 组合物和检测抗体 BAP-2 的潜在竞争结合。使用无关人 IgG1(塞罗泰克公司(Serotec),PHP010)抗体作为另一对照。使用 IMARIS 软件(比特普兰,瑞士)进行图像分析。通过设定强度阈值创建代表与斑结合的 BAP-2 目标的 BAP-2 阳性像素的等高面。利用 SurpassPro 软件模块的“等高面功能”计算表面积和总荧光强度值。数据表示为从一张脑切片的 5 个灰质区域获取的平均染色面积和总染色强度值。仪器噪声形成信号基线,并发现组织散射信号是可忽略的,因此无需从总强度信号中减去。

[1061] 如图 23 所示,A β 斑染色的减少表明来自人 AD 脑切片中 A β 斑吞噬作用增强,从而显示了抗体 A 组合物的定性效应。免疫组织化学揭示与 100ng/ml 抗体 A 组合物预孵育 40 小时后明显可见可染色 A β 斑减少。在抗体 A 组合物浓度为 1 和 5mg/ml 时,此效应非常

明显。5mg/ml 时,胞吞作用显然大量清除了 A β 斑,仅留下很少的大 A β 斑。图 24 显示了同一实验中基于免疫反应信号的定量测量结果表示为面积和强度。

[1062] 或者,利用 A β 偶联的荧光聚苯乙烯珠测量抗体 A 组合物介导的胞吞作用。因此,荧光珠 (3 μ m, Fluoresbrite carboxy YG, 颇里塞恩斯公司 (Polysciences Inc.)) 与 A β 偶联。简要的,用偶联缓冲液 (50mM MES 缓冲液、pH 5.2、1% DMSO) 悬浮和离心来洗涤珠两次。将沉淀 (约 10 μ l) 悬浮于 200 μ l 偶联缓冲液中,在偶联缓冲液中加入 20 μ l 20% EDC 溶液 (乙基-二氨基丙基-碳二亚胺,皮尔斯公司) 进行激活。立即加入 20 μ g A β (1-40) 或 A β (1-42) (用 0.1% 氢氧化铵配制,霸凯公司 (Bachem)) 能启动该偶联反应。孵育过夜后利用 0.5ml 10mM Tris.HCl pH 8.0 和 0.5ml 储存缓冲液 (10mM Tris.HCl pH8.0, 0.05% BSA, 0.05% NaN₃) 分别洗涤珠三次。将 1% 悬液储存于 4 $^{\circ}$ C 待用。利用与所有 D-氨基酸 A β (1-40) (用 0.1% 氢氧化铵配制,霸凯公司) 偶联的 Fluoresbrite Carboxy NYO (红色荧光) 珠作为阴性对照。

[1063] 鼠单核细胞 / 巨噬细胞 (细胞系 P388D1) 在 C24 透明组织培养板或 C96 黑色微孔板中生长至约 50% 汇合度。培养基为含 5%FBS、谷氨酰胺和抗生素的 IMEM。为封闭非特异性清道夫受体,在 200ml 培养体积中加入 10ml 岩藻依聚糖 (福祿卡公司, 10mg/ml 水溶液) 并孵育 2 小时。加入连续稀释的抗体 A 组合物并预孵育 30 分钟。加入荧光 A β 珠悬液 (20 μ l) 并孵育 3 小时以进行胞吞作用。分别利用冰冷 EDTA 和 PBS 用力清洗贴壁细胞一次和两次以移除细胞表面的粘着物。利用蔡司 (Zeiss) Axiovert 405 观察监测残留的珠子,或通过微孔板荧光计 (Fluoroscan, 实验室系统公司 (Labsystems)) 用 444nm (激发光) 和 485nm (发射光) 滤光片组对其进行定量。

[1064] 图 25 显示抗体 A 组合物在 P388D1 细胞中对偶联荧光珠的合成 A β 聚集物胞吞作用的定性影响。图 26 显示抗体 A 组合物剂量反应的定量测定结果。两次独立实验揭示了 EC₅₀ 范围为 30-200ng/ml, MEC 范围为 10-60ng/ml。孵育化学计量法差异即珠 / 细胞比可能引起了观察到的差异。单价抗体与有限的抗原相互作用导致了在浓度 >200ng/ml 时观察到的珠胞吞作用的下降。

[1065] 因此得出结论,抗体 A 组合物以剂量相关方式有效诱导 AD 脑组织切片中 A β 斑的胞吞作用。

[0001]

序 列 表

<110> 豪夫迈·罗氏有限公司(F. Hoffmann-La Roche AG)

<120> 抗体可变区的糖基化

<130> K1314 PCT S3

<150> EP 05 02 7090.9

<151> 2005-12-12

<160> 32

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 378

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗体A的VH区

<400> 1

caggtggaat tgggtggaag cggcggcggc ctgggtgcaac cgggcggcag cctgcgtctg	60
agctgcgegg cctccggatt taccttttagc agctatgcga tgagctgggt gcgccaagcc	120
cciggggaagg gtctcgagtg ggtgagcgct attaatgctt ctggtactcg tacttattat	180
gctgattctg ttaagggtcg ttttaccatt tcacgtgata attcgaaaaa caccctgtat	240
ctgcaaatga acagcctgcg tgcggaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtggtaag	300
ggtaatactc ataagcetta tggttatgtt cgttattttg atgtttgggg ccaaggcacc	360
ctgggtgacgg ttagctca	378

<210> 2

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗体A的VH区

<400> 2

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

[0002]

```

<400> 4
Ile Ser Glu Val Lys Met Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr
1 5 10 15
Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser
20 25 30
Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
35 40 45
Thr Val Ile Val
50

```

66

<210> 5
 <211> 1391
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 含有抗体 A 的 Fc 区的重链

<400> 5
 caggtggaat tggtagaaag cggcggcggc ctggtgcaac cgggcggcag cctgcgtctg 60
 agctgcgcgg cctccggatt taccttttagc agctatgcga tgagctgggt gcgccaagcc 120
 cctgggaagg gtctcgagtg ggtgagcgtc attaatgctt ctggtactcg tacttattat 180
 gctgattctg ttaagggtcg ttttaccatt tcacgtgata attcgaaaaa caccctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgcggaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtggtaag 300
 ggtaatactc ataagcctta tggttatggt cgttatgttg atgtttgggg ccaaggcacc 360
 ctggtgacgg ttagctcagc ctccaccaag ggtccatcgg tcttccccct ggcaccctcc 420
 tccaagagea cctctggggg cacagcggcc ctgggctgcc tggteaagga ctacttcccc 480
 gaaccggtga cgggtgctgt gaactcaggc gccctgacca gcggcggtga caccttcccc 540
 gctgtcctac agtcctcagg actctactcc ctccagcagc tggtagaccg gccctccagc 600
 agcttgggca cccagaccta catctgcaac gtgaatcaca agcccagcaa caccaagggtg 660
 gacaagaaag ttgagccagc atatcgtgcg atatcgtgca atcttgtgac aaaactcaca 720
 catgccaccg gtgccagca cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc 780
 caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg 840
 acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggtc cgtggacggc gtggaggtgc 900
 ataatgcaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cagtaaccgg gtggtcagcg 960
 tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca 1020
 acaaagccct cccagcccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag 1080
 aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc 1140
 tgacctgect ggtcaaagge ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg 1200
 ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct 1260
 tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcagggaac gtcttctcat 1320
 gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tcctgtctc 1380
 cgggtaaatg a 1391

<210> 6
 <211> 456
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 含有抗体 A 的 Fc 区的重链

<400> 6
 Gln Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

[0004]

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

[0005]

370 375 380
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 385 390 395 400
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 405 410 415
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 420 425 430
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 435 440 445
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455

<210> 7
 <211> 648
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗体 A 的轻链

<400> 7
 gatatcgtgc tgaccagag cccggcgacc ctgagcctgt ctccgggcca acgtgcgacc 60
 ctgagctgca gagcgagcca gagcgtgagc agcagctatc tggcgtggta ccagcagaaa 120
 ccaggteaag caccgcgtct attaatattat ggcgcgagca gccgtgcaac tgggggtccc 180
 gcgcgtttta gcggtcttgg atecggcagc gatittaccc tgaccattag cagcctggaa 240
 cctgaagact ttgcgactta ttattgcctt cagatttata atatgcctat tacctttggc 300
 cagggtacga aagttgaaat taaacgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttccc 360
 ccctctgatg agcagttgaa atcttggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataactc 420
 tatcccagag aggcctaaagt acagtggaag gtggataacg cctccaatc gggtaactcc 480
 caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacctg 540
 acgtgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctggaagt caccatcag 600
 ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtggttag 648

<210> 8
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗体 A 的轻链

<400> 8
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser

[0006]

	20		25		30										
Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu
	35						40					45			
Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser
	50					55					60				
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu
65					70					75				80	
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Gln	Ile	Tyr	Asn	Met	Pro
			85							90				95	
Ile	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala
	100							105					110		
Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser
	115						120					125			
Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu
	130					135					140				
Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser
145					150					155				160	
Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu
			165						170				175		
Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val
		180						185					190		
Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys
	195						200					205			
Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys									
	210					215									

<210> 9
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CDR1 重链

<400> 9
 ggatttacct ttagcagcta tgcgatgagc

30

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

<220>
 <223> CDR1 重链

[0007]

<400> 10

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser
1 5 10

<210> 11

<211> 51

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR2 重链

<400> 11

gctattaatg cttctggtag tegtacttat tatgctgatt ctgttaaggg t 51

<210> 12

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR2 重链

<400> 12

Ala Ile Asn Ala Ser Gly Thr Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 13

<211> 51

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR3 重链

<400> 13

ggtaagggtg atactcataa gccttatggt tatgttcggt atttgatgt t 51

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

[0008]

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR3 重链

<400> 14

Gly Lys Gly Asn Thr His Lys Pro Tyr Gly Tyr Val Arg Tyr Phe Asp
1 5 10 15

Val

<210> 15

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR1 轻链

<400> 15

agagcgagcc agagcgtgag cagcagctat ctggcg 36

<210> 16

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR1 轻链

<400> 16

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR2 轻链

[0009]

<400> 17
ggcgcgagca gccgtgcaac t 21

<210> 18
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR2 轻链

<400> 18
Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 19
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR3 轻链

<400> 19
cttcagattt ataatatgcc tatt 24

<210> 20
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR3 轻链

<400> 20
Leu Gln Ile Tyr Asn Met Pro Ile
1 5

<210> 21
<211> 648

[0010]

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗体 A 的轻链

<400> 21

gatatcgtgc	tgaccagag	cccgcgacc	ctgagcctgt	ctccgggcca	acgtgcgacc	60
ctgagctgca	gagcgagcca	gagcgtgagc	agcagctatc	tggcgtggta	ccagcagaaa	120
ccaggtaag	caccgcgtct	attaatttat	ggcgcgagca	gccgtgcaac	tgggggtcccg	180
gcgcgtttta	gcggctctgg	atccggcacg	gatittaccc	tgaccattag	cagcctggaa	240
cctgaagact	ttgcgactta	ttatigcctt	cagatttata	atatgcctat	tacctttggc	300
cagggtacga	aagttgaaat	taaacgtacg	gtggctgcac	catctgtctt	catcttcccg	360
ccatctgatg	agcagttgaa	atctggaact	gcctctgttg	tgtgcctgct	gaataacttc	420
tatccagag	aggccaaagt	acagtggaag	gtggataacg	ccctccaate	gggtaactcc	480
caggagagt	tcacagagca	ggacagcaang	gacagcacct	acagcctcag	cagcaccctg	540
acgtgagca	aagcagacta	cgagaaacac	aaagtctacg	cctgcgaagt	caccatcag	600
ggcctgagct	cgcccgteac	aaagagcttc	aacaggggag	agtgttag		648

<210> 22

<211> 215

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗体 A 的轻链

<400> 22

Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1			5						10					15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Ser
		20						25				30			
Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu
	35					40					45				
Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser
	50					55					60				
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu
65					70				75					80	
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Gln	Ile	Tyr	Asn	Met	Pro
			85						90					95	
Ile	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala
			100						105					110	
Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser
			115						120					125	
Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu
	130					135								140	

[0011]

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 145 150 155 160
 Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 165 170 175
 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 180 185 190
 Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 195 200 205
 Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 23
 <211> 3984
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 编码含有抗体 A Fc 区的重链的另选序列

<400> 23
 atggagtttg ggtgagctg ggttttccctc gttgctcttt taagaggatga ttcattggaga 60
 aatagagaga ctgagtgtga gtgaacatga gtgagaaaaa ctggatttgt gtggcatttt 120
 ctgataaegg tgtccttctg tttgcagggtg tccagtgtca ggtggagctg gtggagtctg 180
 ggggaggcct ggtccagcct ggggggtccc tgagactctc ctgtgcagcg tctggattca 240
 ccttcagtag ctatgccatg agctgggtcc gccaggctcc aggcaagggg ctcgagtggg 300
 tgccgccat aaacgccagc ggtaccgca cctactatgc agactccgtg aagggccgat 360
 tcaccatctc cagagacaat tccaagaaca cgtgttatct gcaaatgaac agcctgagag 420
 ccgaggacac ggtgtgtgat tactgtgcga gaggaacggg gaacaccac aagccctacg 480
 gctacgtacg ctactttgac gtgtggggcc aaggaacct ggtcacctgc tctcagggtg 540
 agtcctcaca acctctctcc tgcggccgca gcttgaagtc tgaggcagaa tcttgccag 600
 ggtctatcgg actcttgtga gaattagggg ctgacagttg atggtgacaa tttcagggtc 660
 agtgactgtc tggtttctct gaggtgagac tggaatatag gtcacctga agactaaaga 720
 ggggtccagg ggttttctg cacaggcagg gaacagaatg tggaacaatg acttgaatgg 780
 ttgattcttg tgtgacacca agaattgca taatgtctga gttgcccag ggtgatctta 840
 gctagactct ggggtttttg tcgggtacag aggaaaaacc cactattgtg attactatgc 900
 tatggactac tggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc tcaggtaaga atggcctctc 960
 caggctttta ttttaacct ttgttatgga gttttctgag cattgcagac taatcttgga 1020
 tatttgcct gagggagccg gctgagagaa gttgggaaat aaatctgtct agggatctca 1080
 gagcctttag gacagattat ctccacatct ttgaaaaact aagaatctgt gtgatgggtg 1140
 tgggtggagtc cctggatgat gggataggga ctttgaggc tcatttgagg gagatgctaa 1200
 aacaatccta tggtggagg gatagttggg gctgtagttg gagattttca gtttttagaa 1260
 tgaagtatta gctcaatac ttcaaggacc acctctgtga caaccatttt atacagtatc 1320
 caggcatagg gacaaaaagt ggagtggggc actttcttta gatttgtgag gaatgttcca 1380
 cactagattg tttaaaactt catttgttgg aaggagctgt cttagtattt gattcaaggg 1440
 agaaaggcat ctaccctcgg tctcaaaagg gtagttgctg tctagagagg tctggtggag 1500
 cctgcaaaag tccagctttc aaaggaacac agaagtatgt gtatggaata ttagaagatg 1560

[0012]

ttgcttttac	tcttaagttg	gttcctagga	aaaatagtta	aatactgtga	ctttaaaatg	1620
tgagagggtt	ttcaagtact	catTTTTTTT	aatgtccaaa	atttttgtca	atcaatttga	1680
ggtcttgttt	gtgtagaact	gacattactt	aaagtTTAAC	cgaggaatgg	gagtgaggct	1740
ctctcatacc	ctattcagaa	ctgactTTTt	acaataataa	attaagtTTt	aaatatTTTT	1800
aaatgaattg	agcaatgttg	agttgagtca	agatggccga	tcagaaccgg	aacacctgca	1860
gcagctggca	ggaagcaggt	catgtggcaa	ggctatttgg	ggaagggaat	ataaaaaccac	1920
taggtaaact	tgtagctgtg	gtttgaagaa	gtggTTTTga	aacactctgt	ccagccccac	1980
caaaccgaaa	gtccaggctg	agcaaaacac	cacctgggta	atttgcattt	ctaaaataag	2040
ttgaggattc	agccgaaact	ggagaggTcc	tctTTTAACT	tattgagTtc	aacctTTTaa	2100
TTTTagcttg	agtagttctt	gtttccccaa	acttaagTtt	atcgactTct	aaaatgtatt	2160
tagaattcga	gctcggtaca	gctttctggg	gcaggccagg	cctgaccttg	gctttggggc	2220
agggaggggg	ctaaggtgag	gcaggTggcg	ccagcaggTg	cacaccaaat	gcccattgagc	2280
ccagacactg	gacgctgaac	ctcgcggaac	gttaagaacc	caggggcctc	tgcgcctggg	2340
cccagctctg	tcccacaccg	cggtcacatg	gcaccacTc	tcttgagcc	tccaccaagg	2400
gcccacgggt	cttccccctg	gcacctctct	ccaagagcac	ctctgggggc	acagcggccc	2460
tgggtgcct	ggTcaaggac	tacttccccg	aaccggTgac	ggTgtcgtgg	aaetcaggcg	2520
ccctgaccag	cggcgtgcac	accttccccg	ctgtcctaca	gtcctcagga	ctctactccc	2580
tcagcagcgt	ggtgaccgtg	ccctccagca	gcttgggcac	ccagacctac	atctgcaacg	2640
tgaatcacia	gcccagcaac	accaaggTgg	acaagaaagt	tggTgagagg	ccagcacagg	2700
gaggagggtt	gtctgctgga	agccaggctc	agcgtcctg	cctggagcca	tcccggtat	2760
gcagccccag	tccagggcag	caaggcaggc	ccgtctgccc	tcttcaccgc	gagcctctgc	2820
ccgccccact	catgctcagg	gagagggtct	tctggctttt	tcccaggctc	tgggcaggca	2880
caggctaggT	gcccctaacc	caggccccgc	acacaaaggg	gcaggTgctg	ggctcagacc	2940
tgccaaagagc	catatccggg	aggacctgTc	ccctgacctt	agcccccccc	aaaggccaaa	3000
ctctccactc	cctcagctcg	gacaccttct	ctcctcccag	attccagtaa	ctcccaatct	3060
tctctctgca	gagcccaaTt	ctgtgacaaa	aaetcacaca	tgccaccctg	gcccaggtaa	3120
gccagcccag	gcctcgccct	ccagctcaag	gcgggacagg	tgccttagag	tagcctgcat	3180
ccagggacag	gccccagccg	ggtgctgaca	cgTccacctc	catctcttcc	tcagcactg	3240
aactcctggg	gggaccgtca	gtcttccctt	tccccccaaa	acccaaggac	acctctatga	3300
tctccccgac	ccctgaggTc	acatgcgtgg	tggTggacgt	gagccacgaa	gacctgagg	3360
tcaagtTcaa	ctggtacgtg	gacggcgtgg	aggtgcataa	tgccaaagaca	aagccgcggg	3420
aggagcagta	caacagcacg	taccgtgtgg	tcagcgtcct	caccgtcctg	caccaggact	3480
ggctgaattg	caaggagtac	aagtgcagg	tctccaacaa	agccctccca	gcccccatcg	3540
agaaaaccat	ctccaaagcc	aaaggTggga	cccgtggggT	gcgaggggcca	catggacaga	3600
ggccgggtcg	gcccaccctc	tgccttgaga	gtgaccgctg	taccaacctc	tgtccctaca	3660
gggcagcccc	gagaaccaca	ggtgtacacc	ctgcccccat	ccgggatga	gctgaccaag	3720
aaccaggTca	gcctgacctg	cctggTcaaa	ggcttctate	ccagcgacat	cggcgtggag	3780
tgggagagca	atgggcagcc	ggagaacaac	tacaagacca	cgcctccctg	gctggactcc	3840
gacggctcct	tcttctctta	cagcaagctc	accgtggaca	agagcaggTg	gcagcagggg	3900
aacgtcttct	catgctccgt	gatgcatgag	gctctgcaca	accactacac	gcagaagagc	3960
ctctccctgt	ccccgggcaa	atga				3984

<210> 24

<211> 3202

<212> DNA

<213> 人工序列

[0013]

<220>

<223> 编码抗体 A 轻链的另选序列

<400> 24

atggacatga	gggtccctgc	tcagctectg	gggctccctgc	tgctctgttt	cccaggtaag	60
gatggagaac	actagcagtt	tactcagccc	agggtgctca	gtactgcttt	actattcagg	120
gaaattctct	tacaacatga	ttaattgtgt	ggacatttgt	ttttatgttt	ccaatctcag	180
gcgccagatg	tgatatcgtg	ttgacgcagt	ctccagccac	cctgtctttg	tctccagggg	240
aaagagccac	cctctcctgc	cgggccagtc	agagtgttag	cagcagctac	ttagcctggg	300
accagcagaa	acctggccag	gcgccccagg	tcctcatcta	tggcgcaccc	agcagggcca	360
ctggcgtgcc	agccagggtc	agtggcagtg	ggctctgggac	agacttcact	ctcaccatca	420
gcagcctgga	gctgaagat	ttegcgacct	attactgtct	gcagatttac	aacatgccta	480
tcaggttcgg	ccaagggacc	aaggtggaaa	tcaaacgtga	gtagaattta	aactttgcgg	540
ccgcctagac	gtttaagttg	gagatttgga	ggggatgagg	aatgaaggaa	cttcaggata	600
gaaaagggct	gaagtcaagt	tcagctecta	aaatggatgt	gggagcaaac	tttgaagata	660
aactgaatga	cccagaggat	gaaacagcgc	agatcaaaga	ggggcctgga	gctctgagaa	720
gagaaggaga	ctcatccgtg	ttgagtttcc	acaagtactg	tcttgagttt	tgcaataaaa	780
gtgggatage	agagttgagt	gagccttagg	ctgagttctc	tcttttgtct	cctaagtttt	840
tatgactaca	aaaatcagta	gtatgtcttg	aaataatcat	taagctgttt	gaaagtatga	900
ctgcttgcca	tgtagatacc	atgtcttgct	gaatgatcag	aagaggtgtg	actcttattc	960
taaaatttgt	cacaaaatgt	caaaatgaga	gactctgtag	gaacgagtcc	ttgacagaca	1020
gctcaagggg	tttttttcct	ttgtctcatt	tctacatgaa	agtaaatttg	aatgatcttt	1080
ttttattata	agagtagaaa	tacagttggg	tttgaactat	atgttttaat	ggccacgggt	1140
ttgtaagaca	tttggtcctt	tgttttccca	gttattactc	gattgtaatt	ttatatcgcc	1200
agcaatggac	tgaaacggtc	cgcacacctt	tctttacaac	tgggtgacct	cgcggctgtg	1260
ccagccattt	ggcgttcacc	ctgccgctaa	gggccatgtg	aacccccgcg	gtagcatccc	1320
ttgtctcgcg	tggaccactt	tcctgaggca	cagtgatagg	aacagagcca	ctaactctga	1380
gagaacagag	atgtgacaga	ctacactaat	gtgagaaaaa	caaggaaagg	gtgacttatt	1440
ggagatttca	gaaataaaaat	gcattttatta	ttatatcccc	ttatttttaat	tttctattag	1500
ggaattagaa	agggcataaa	ctgctttatc	cagtgttata	ttaaaagcct	aatgtatata	1560
atctttttaga	ggtaaaaatct	acagccagca	aaagtcattg	taaatattct	ttgactgaac	1620
tctcactaaa	ctcctctaaa	ttatatgtca	tattaactgg	ttaaattaat	ataaatttgt	1680
gacatgacct	taactgggtta	ggtagatat	ttttcttcat	gcaaaaatat	gactaataat	1740
aatttagcac	aaaaataatt	cccaatactt	taattctgtg	atagaaaaat	gtttaactca	1800
getactataa	tcccataatt	ttgaaaacta	tttatttagt	tttgtgtttg	acccttcctt	1860
agccaaagge	aactatttta	ggacccttta	aaactcttga	aactacttta	gagtcattaa	1920
gttattttaac	cacttttaat	tacttttaaa	tgatgtcaat	tcccttttaa	ctatttaattt	1980
attttaaggg	gggaaaggct	gtctataatt	ctattgtttt	tcttggtaaa	gaactctcag	2040
ttttctgttt	tactacctct	gtcacccaag	agttggcacc	tcaacagagg	ggactttccg	2100
agagggccatc	tggcagttgc	ttaagatcag	aagtgaagtc	tgccagttcc	tcccaggcag	2160
gtggcccgaga	ttacagttga	cctgtttctg	tgtggctaaa	aattgtccca	tgtggttaca	2220
aaccattaga	ccagggtctg	atgaattgct	cagaatattt	ctggacaccc	aaatacagac	2280
cctggcttaa	ggccctgtcc	atacagtagg	tttagcttgg	ctacacccaa	ggaagccata	2340
cagaggctaa	tatcagagta	ttcttggaag	agacaggaga	aatgaaagc	cagttttctgc	2400
tcttacctta	tgtgcttgtg	ttcagactcc	caaacatcag	gagtgtcaga	taaactggtc	2460
tgaatctctg	tctgaagcat	ggaactgaaa	agaatgtagt	ttcagggaag	aaaggcaata	2520

[0014]

```

gaaggaagcc tgagaatacg gatcaattct aaactctgag ggggtcggat gacgtggcca 2580
ttctttgcct aaagcattga gtttactgca aggtcagaaa agcatgcaaa gccctcagaa 2640
tggtcgcaaa gagctccaac aaaacaattt agaactttat taaggaatag ggggaagcta 2700
ggaagaaact caaaacatca agattttaaa tacgettctt ggtctccttg ctataattat 2760
ctgggataag catgctgttt tctgtctgtc cctaacatgc cctgtgatta tccgcaaaca 2820
acacacccaa gggcagaact ttgttactta aacaccatcc tgtttgcttc tttcctcagg 2880
aactgtggct gcaccatctg tcttcattct cccgccatct gatgagcagt tgaaatctgg 2940
aactgcctct gttgtgtgcc tgetgaataa cttctatecc agagaggcca aagtacagtg 3000
gaaggtggat aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag agtgtcacag agcaggacag 3060
caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg agcaaagcag actacagaaa 3120
acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg agctcgcccg tcacaaagag 3180
cttcaacagg ggagagtgtt ag 3202

```

<210> 25

<211> 1428

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含有抗体 A Fc 区和前导序列的重链

<400> 25

```

atgaaacacc tgtgtttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt cctgtcccag 60
gtggaattgg tggaaagcgg cggcgccctg gtgcaaccgg gcggcagcct gcgtctgagc 120
tgcgcgccct cgggatttac ctftagcagc tatgcgatga gctgggtgcg ccaagccctt 180
gggaagggtc tcgagtgggt gacgctatt aatgcttctg gtactcgtac ttattatgct 240
gattctgtta agggctgctt taccatttca cgtgataatt cgaaaaacac cctgtatctg 300
caaatgaaca gcctgcgtgc ggaagatacg gccgtgtatt attgcgcgcg tggtaagggt 360
aatactcata agccttatgg ttatgttcgt tattttgatg ttgggggcca aggcaccctg 420
gtgacggtta gctcagcctc caccaagggt ccacgtgtct tccccctggc accctcctcc 480
aagagcacct ctggggggcac agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa 540
ccggtgacgg tgtcgtggaa ctccaggccc ctgaccagcg gcgtgcacac cttccccgct 600
gtcctacagt cctcaggaet ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc 660
ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aatcacaaag ccagcaacac caaggtggac 720
aagaaagtgg agcccaaate ttgtgacaaa actcacacat gcccaccgtg cccagcacct 780
gaactcctgg ggggaccgtc agtcttctc ttccccccaa aaccacaagga caccctcatg 840
atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg gtggtggacg tgagccacga agacctgag 900
gtcaagtcca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg 960
gaggagcagt acaacagcac gtaccgggtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac 1020
tggtggaatg gcaaggagta caagtgaag gtctccaaca aagccctccc agcccccatc 1080
gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag ccccgagaac cacagggtga caccctgccc 1140
ccatcccggg atgagctgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggg caaagcttc 1200
tatccagcgg acatgcctgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag 1260
accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc tcttcttctc tctacagcaa gctcaccgtg 1320
gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg 1380
cacaaccact acaagcagaa gagcctctcc ctgtctccgg gtaaatga 1428

```

[0015]

<210> 26
 <211> 475
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 含有抗体 A Fc 区 and 前导序列的重链

<400> 26
 Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15
 Val Leu Ser Gln Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Ser Ala Ile Asn Ala Ser Gly Thr Arg Thr Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Lys Gly Asn Thr His Lys Pro Tyr Gly Tyr
 115 120 125
 Val Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 130 135 140
 Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
 145 150 155 160
 Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 165 170 175
 Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 180 185 190
 Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 195 200 205
 Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
 210 215 220
 Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 225 230 235 240
 Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 245 250 255
 Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 260 265 270
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 275 280 285

[0016]

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 290 295 300
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 305 310 315 320
 Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 325 330 335
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 340 345 350
 Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 355 360 365
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 370 375 380
 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 385 390 395 400
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 405 410 415
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 420 425 430
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 435 440 445
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 450 455 460
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470 475

<210> 27
 <211> 708
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 含有前导序列的抗体 A 的轻链

<400> 27
 atgggtgttgc agaccaggt cttcatttct ctgttgctct ggatctctgg tgcctacggg 60
 gatatcgtgc tgaccagag cccggcgacc ctgagcctgt ctccgggcga acgtgcgacc 120
 ctgagctgca gacgagcca gagegtgagc agcagctatc tggcgtggta ccagcagaaa 180
 ccaggtcaag caccgcgtct attaatttat ggcgcgagca gccgtgcaac tgggggtcccg 240
 gcgcgtttta gcggctctgg atccggcacg gattttaccc tgaccattag cagcctggaa 300
 cctgaagact ttgcgactta ttattgcctt cagatttata atatgcctat tacctttggc 360
 cagggtacga aagttgaaat taaacgtacg gttgctgcac catctgtctt catcttcccg 420
 ccattctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 480
 tateccagag aggccaaagt acagtggaa gtggataacg cctccaatc gggttaactec 540
 caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 600
 acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag 660
 ggccctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgtag 708

[0017]

<210> 28
 <211> 235
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 含有前导序列的抗体 A 的轻链

<400> 28
 Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
 1 5 10 15
 Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
 20 25 30
 Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 35 40 45
 Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
 50 55 60
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Val Pro
 65 70 75 80
 Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 85 90 95
 Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Ile
 100 105 110
 Tyr Asn Met Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 115 120 125
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 130 135 140
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 145 150 155 160
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 165 170 175
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 180 185 190
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 195 200 205
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 210 215 220
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 29
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> 人工序列

[0018]

<220>

<223> MS-Roche #7.9.H7_Ig_κ 正向引物

<400> 29

acgtaagctt gccgccacca tgggtgttgca g

31

<210> 30

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> MS-Roche #7.9.H7_Ig_κ 反向引物

<400> 30

acgtgaattc ctaacactct cccctggt

28

<210> 31

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> MS-Roche #7.9.H7_IgG1 正向引物

<400> 31

acgtaagctt gccgccacca tgaaacacct g

31

<210> 32

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> MS-Roche #7.9.H7_IgG1 反向引物

<400> 32

acgtgaattc tcatttaccg ggagacag

28

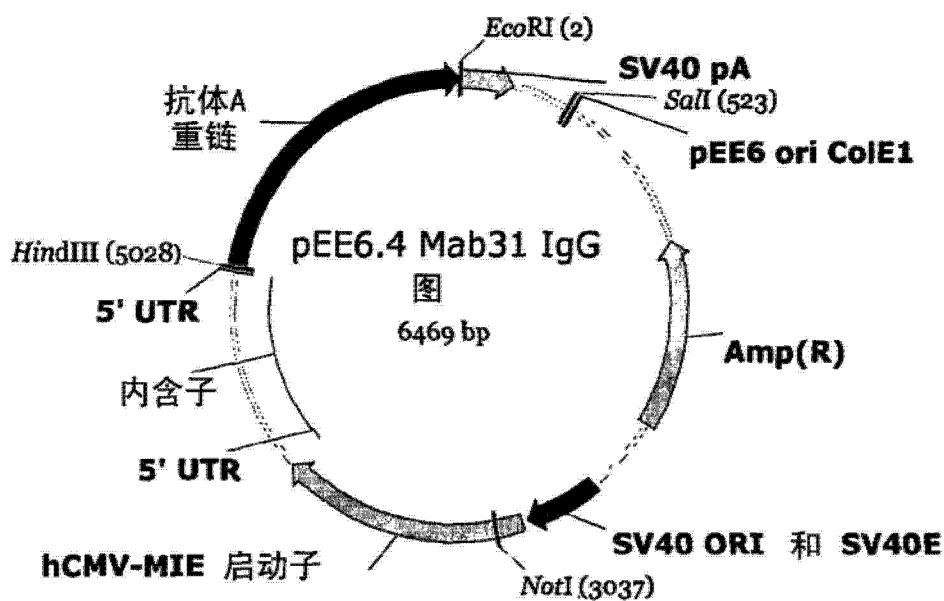


图 1A

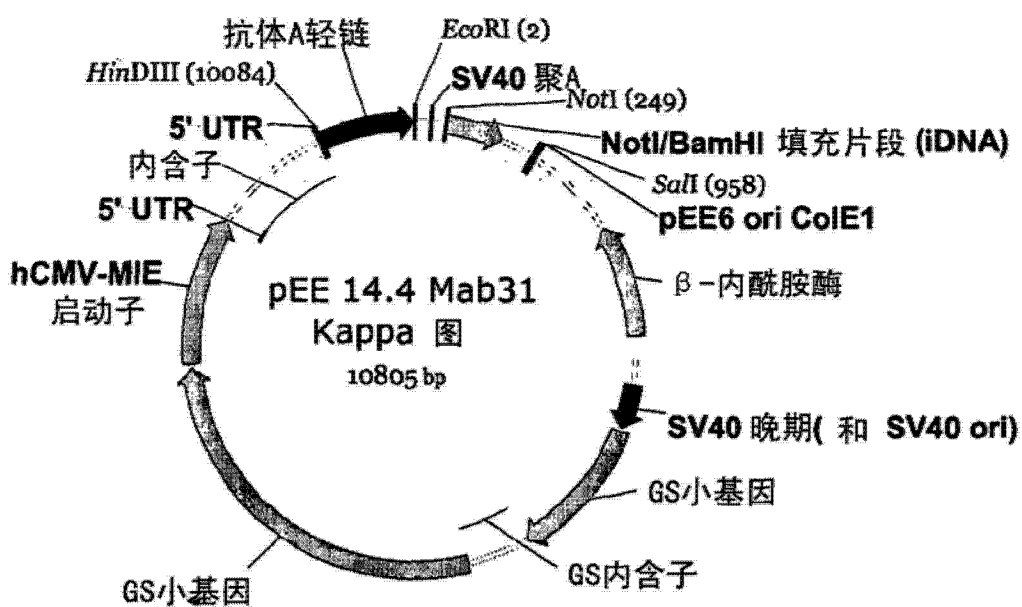


图 1B

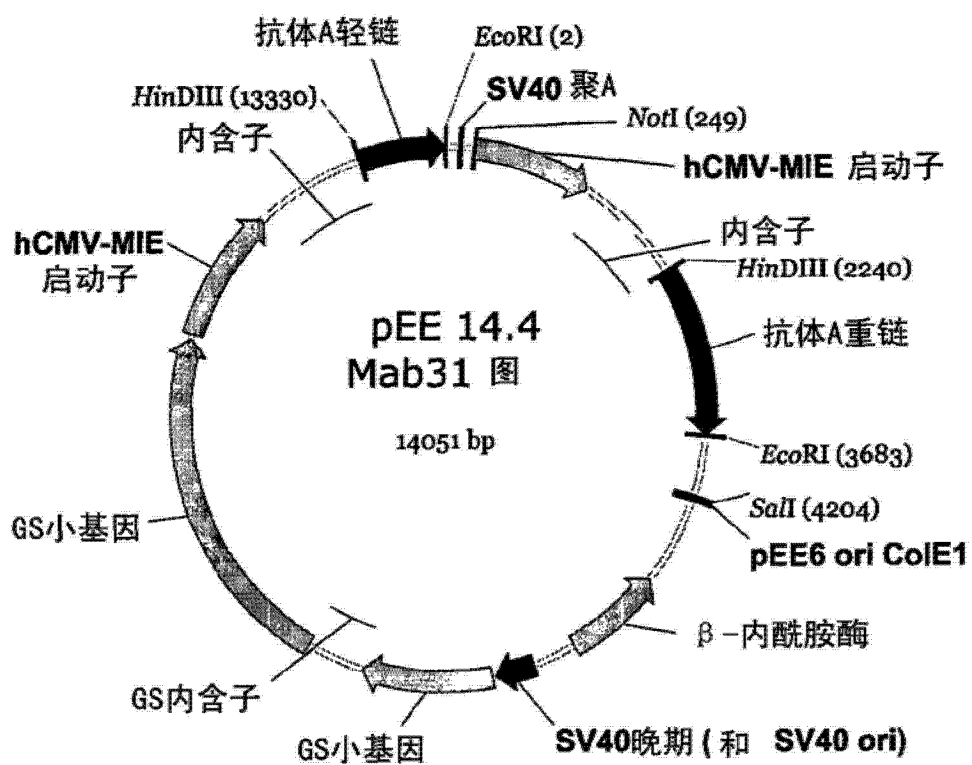


图 1C

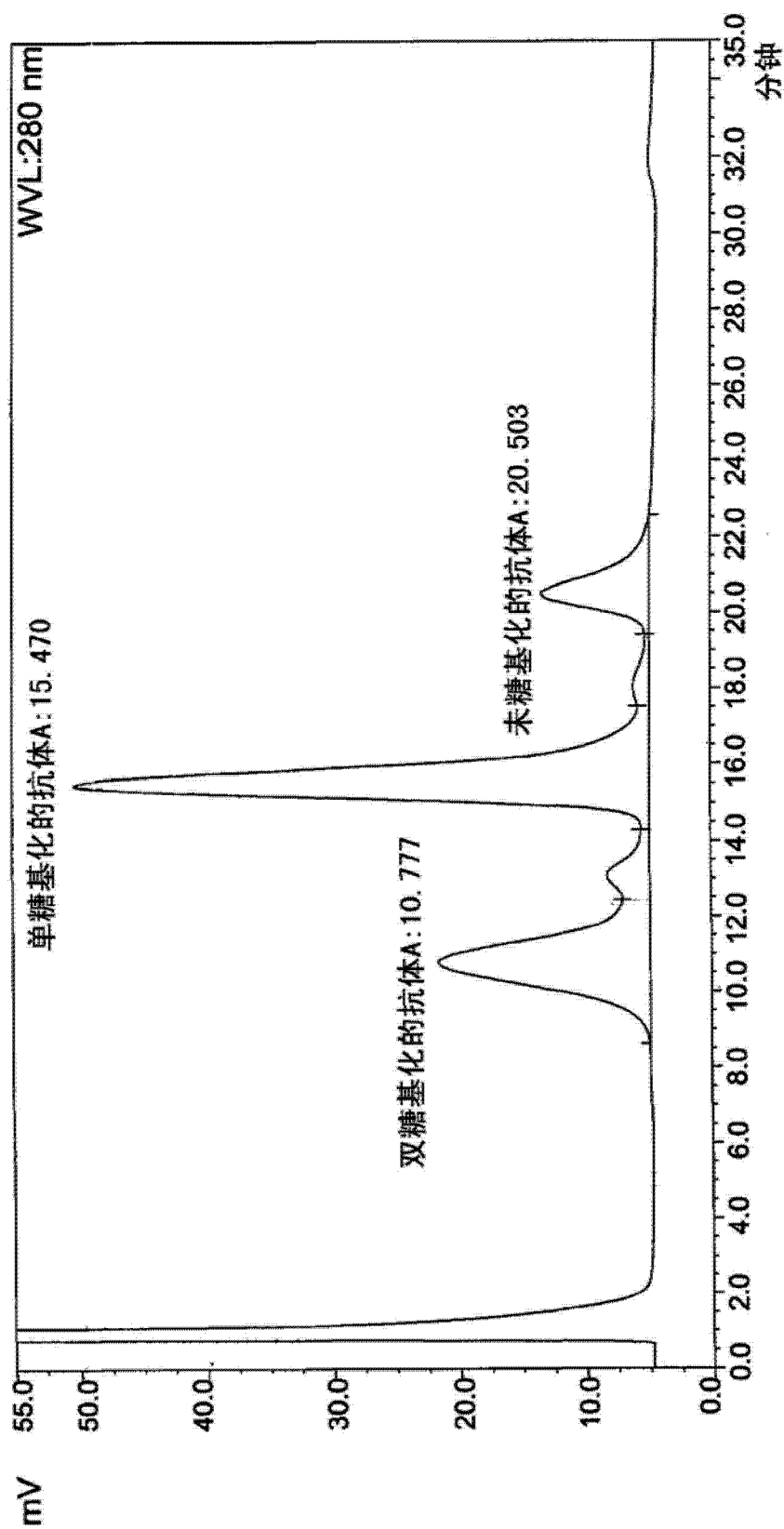


图 2

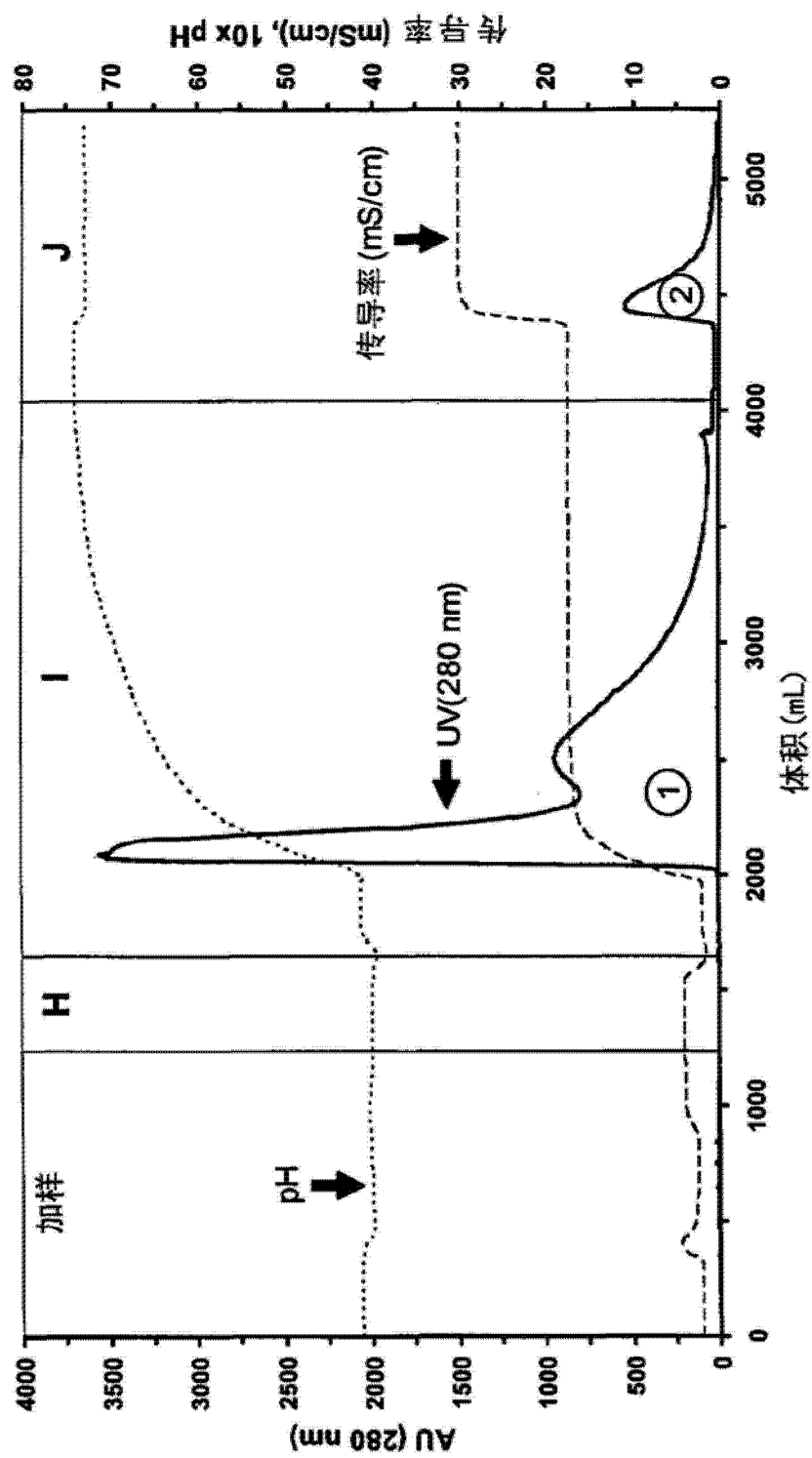


图 3

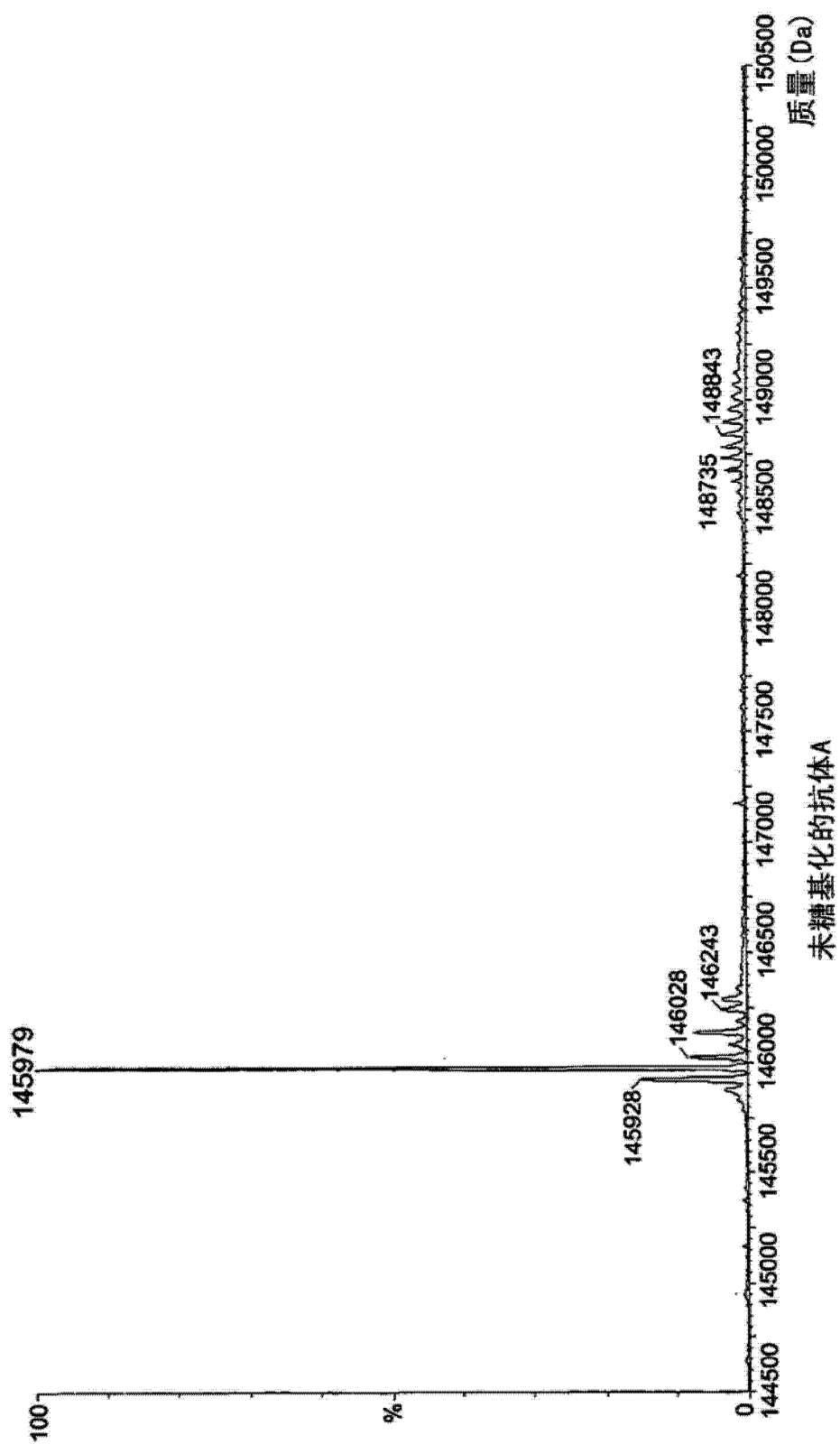


图 4A

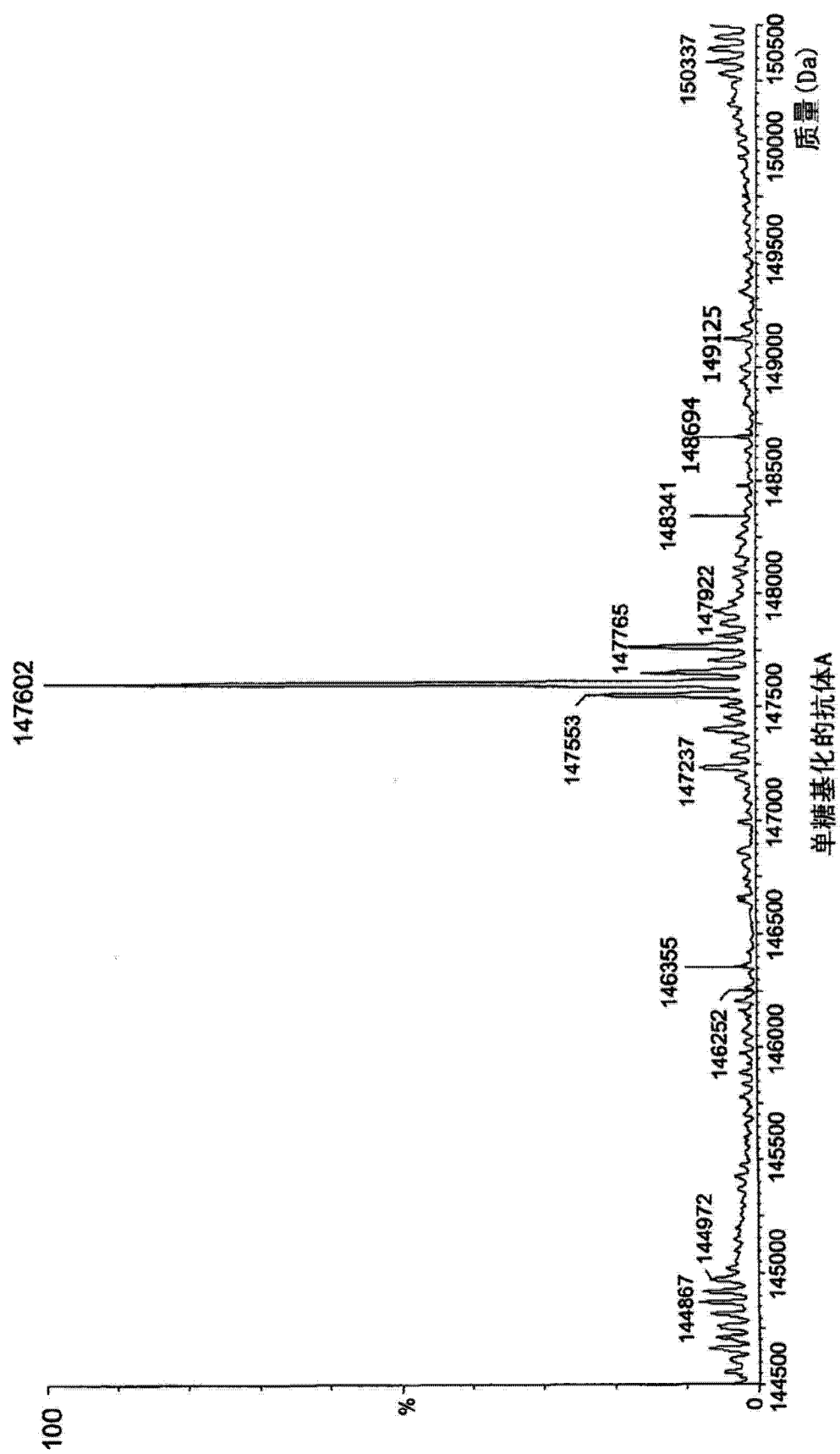


图 4B

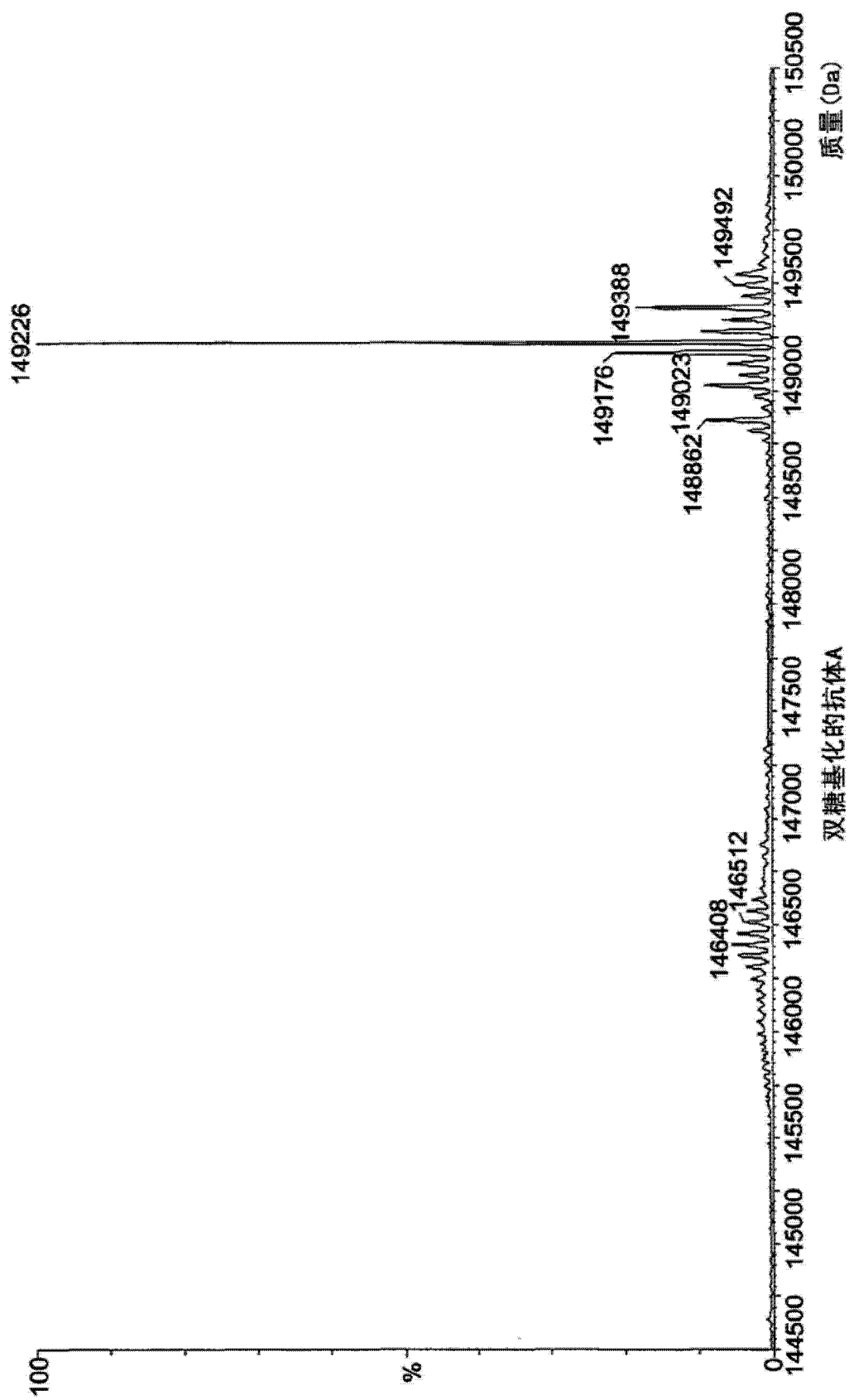


图 4C

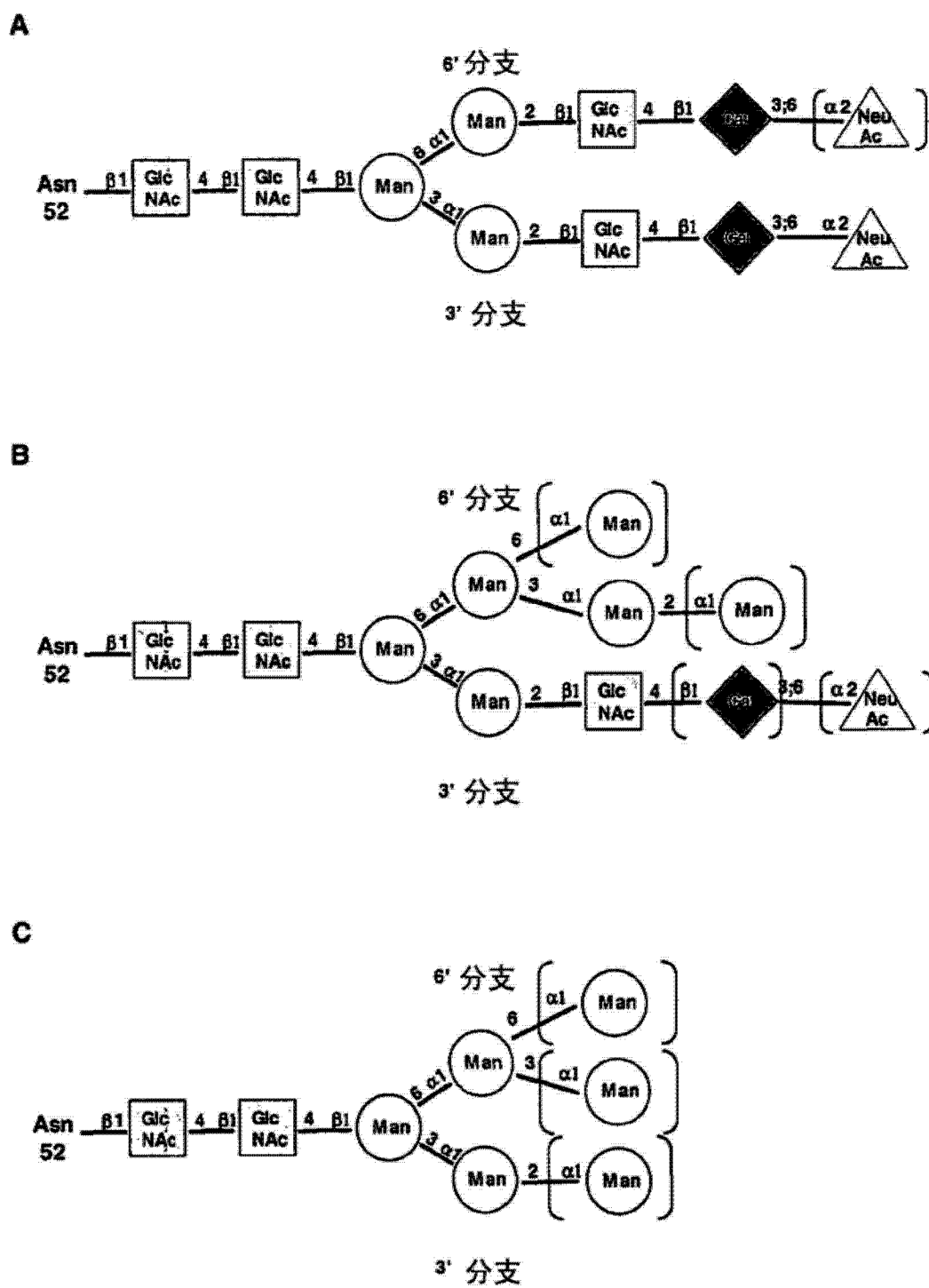


图 5

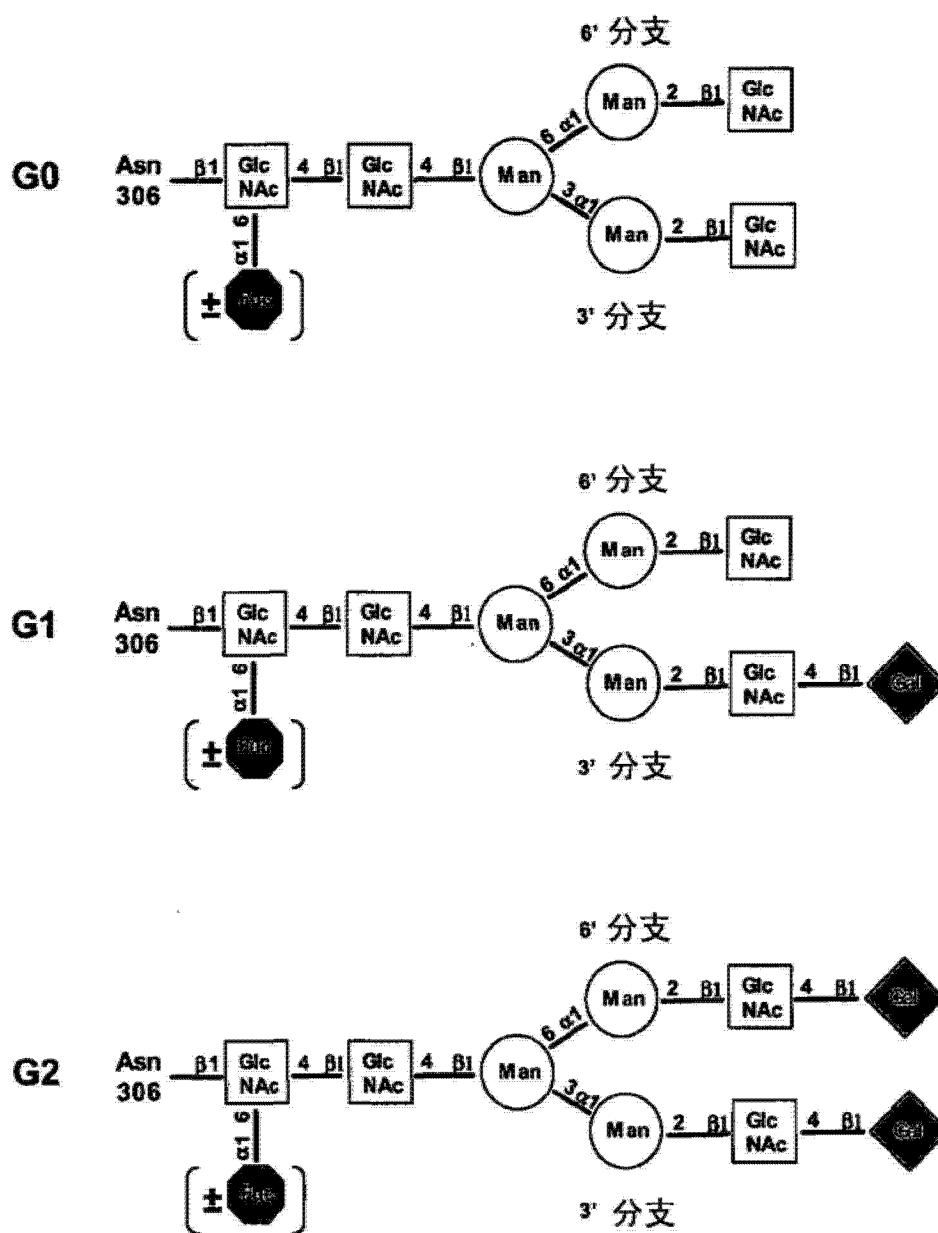


图 6

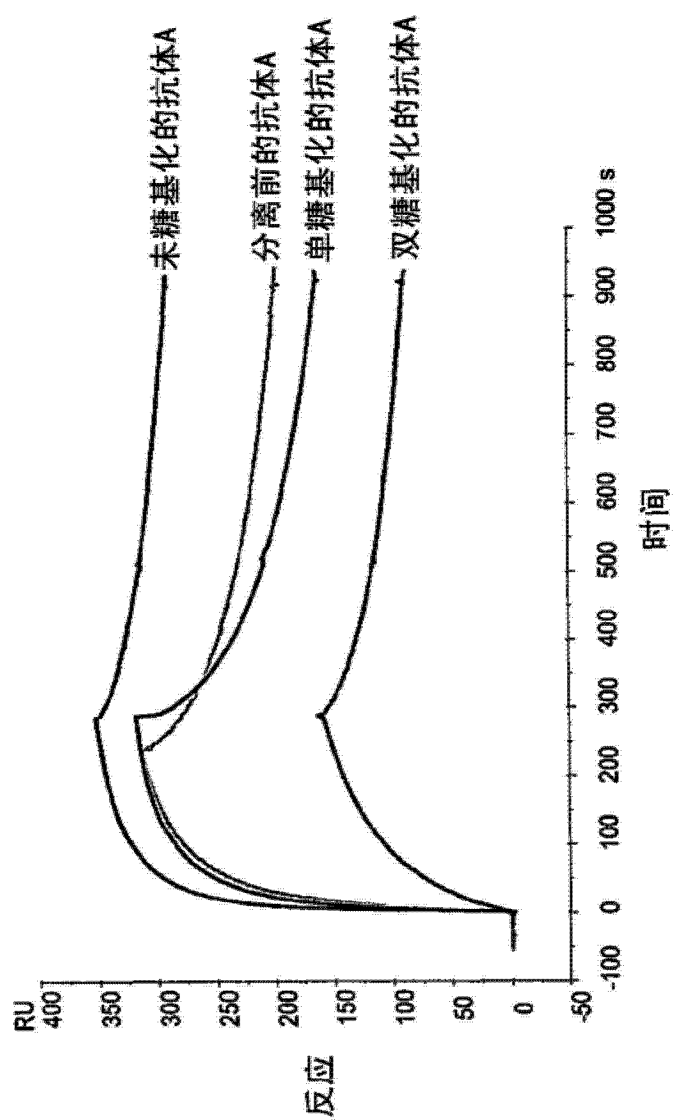


图 7

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
21	22	23	24	25	26				
1	ISEVKMDAEF								
2	SEVKMDAEFR								
3	EVKMDAEFRH								
4	VKMDAEFRHD								
5	KMDAEFRHDS								
6	MDAEFRHDS								
7	DAEFRHDSGY								
8	AEFRHDSGYE								
9	EFRHDSGYEV								
10	FRHDSGYEVH								
21	OKLVFFAEDV								
22	KLVFFAEDVG								
23	LVFFAEDVGS								
24	VFFAEDVGSN								
25	FFAEDVGSNK								
26	FAEDVGSNK								

图 8A

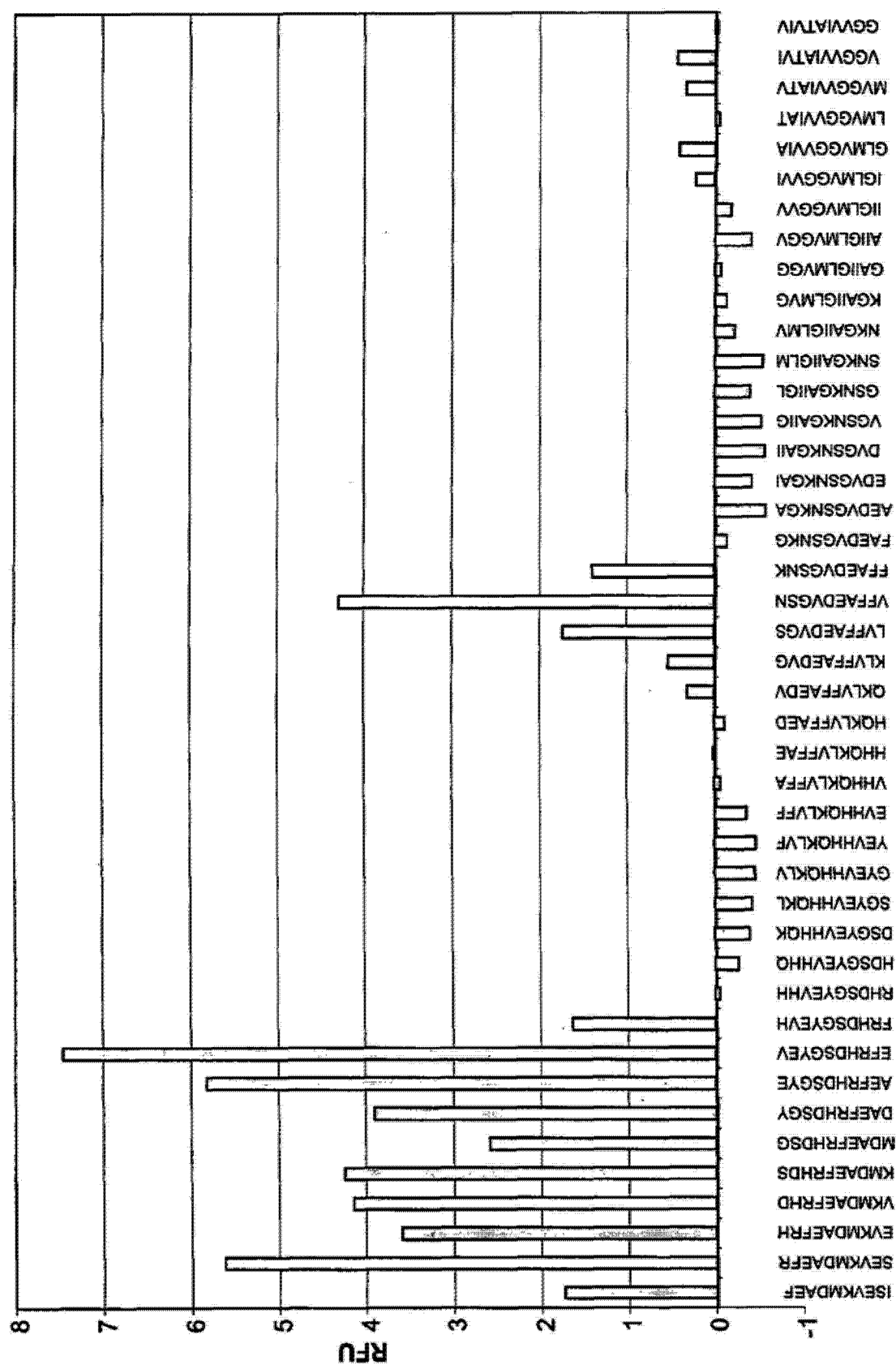


图 8B

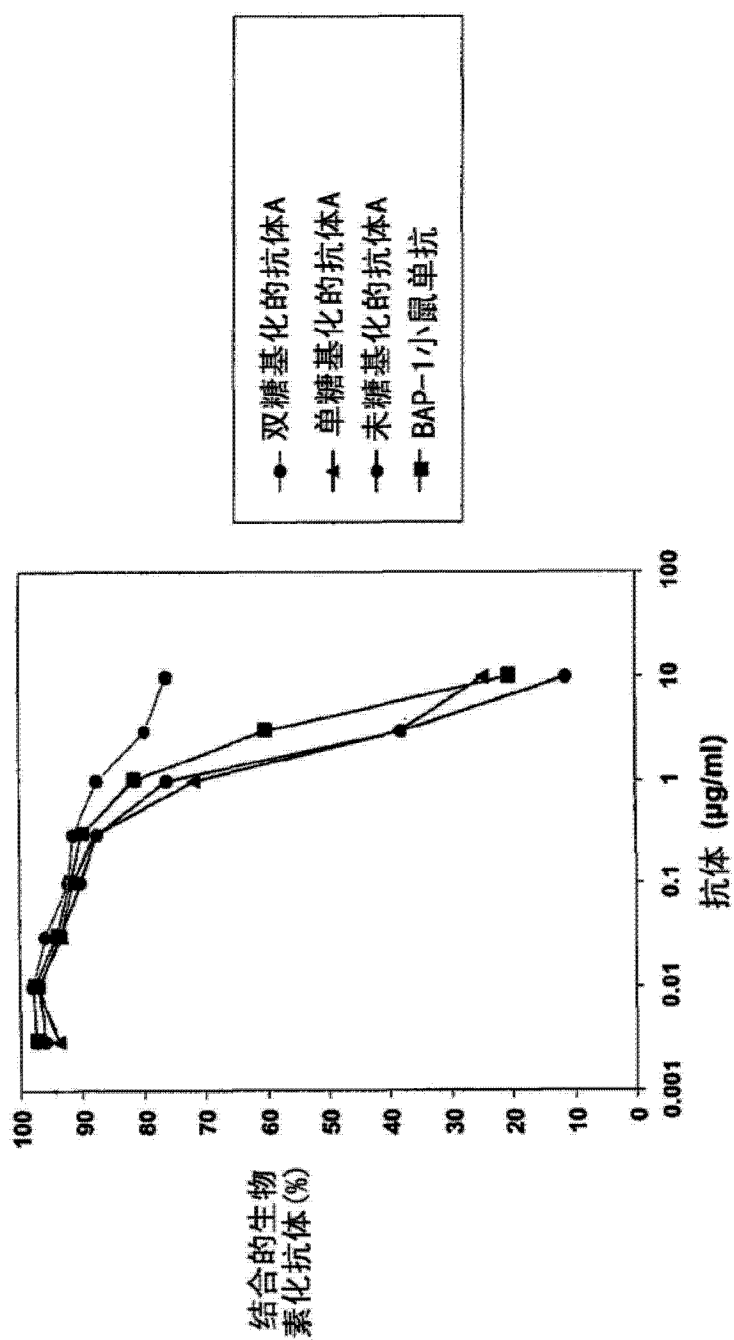


图 9

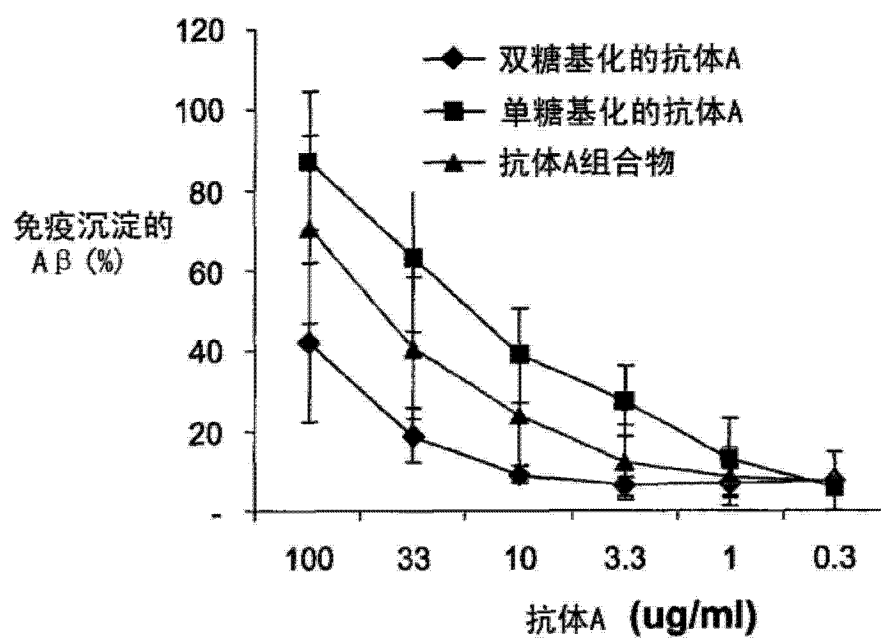


图 10

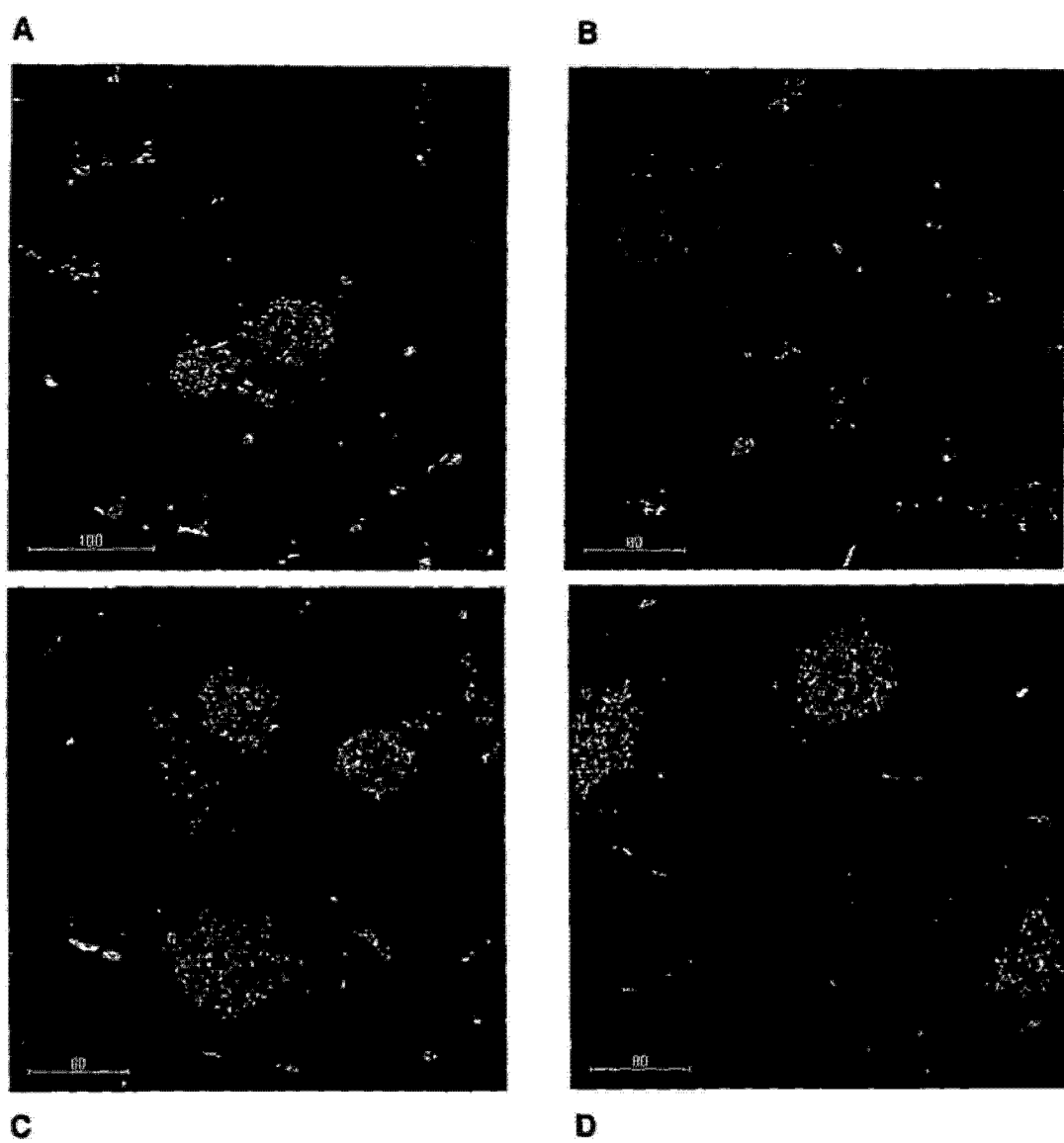


图 11

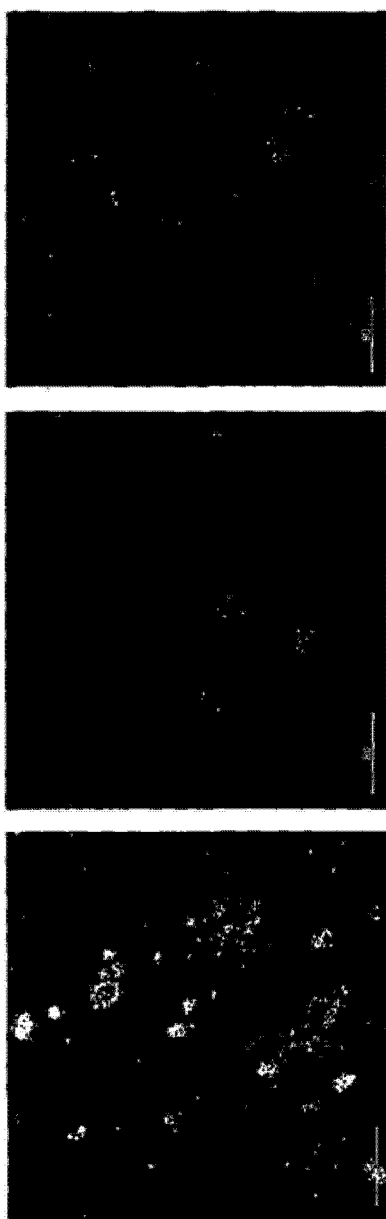


图 12

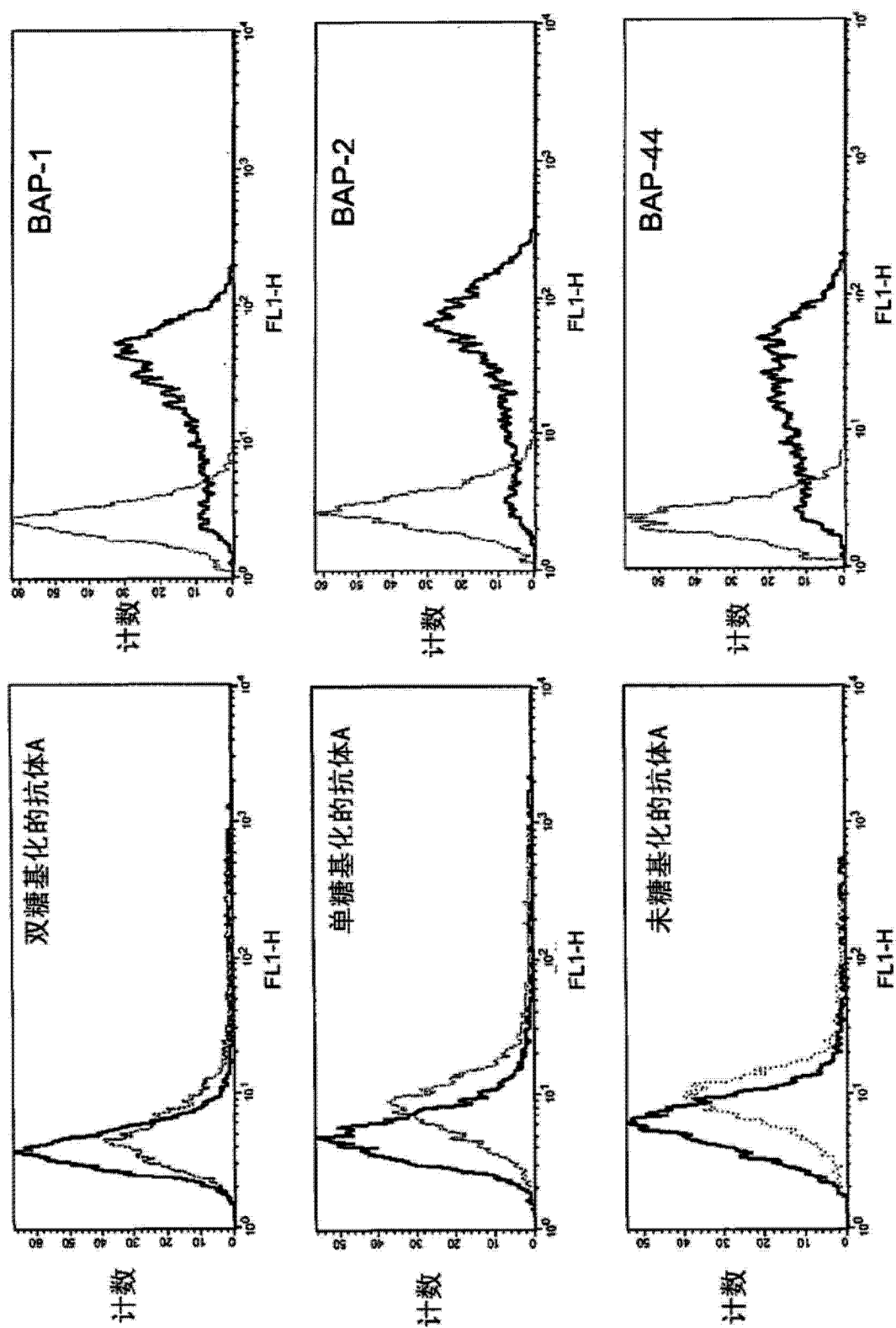


图 13

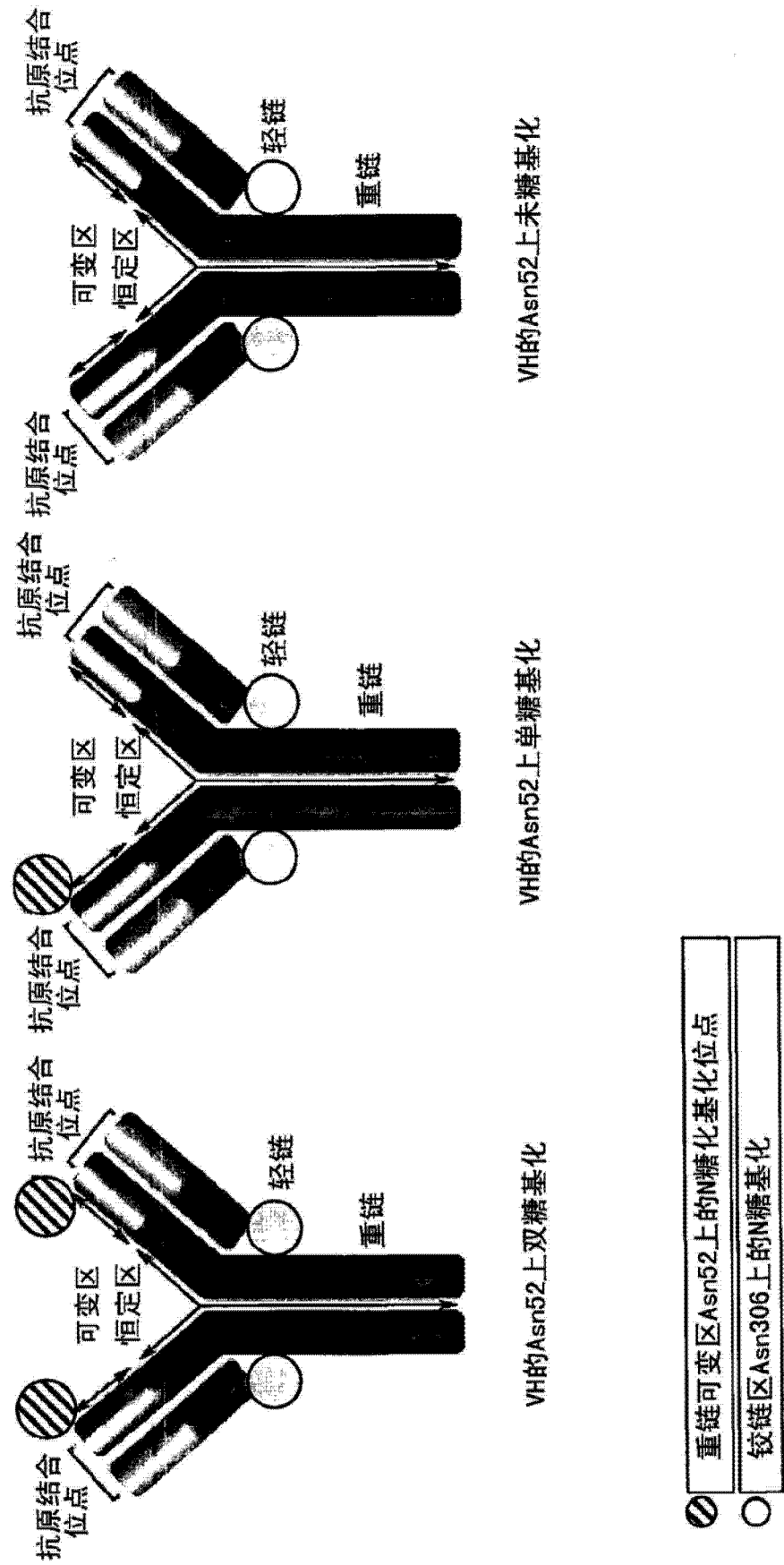


图 14

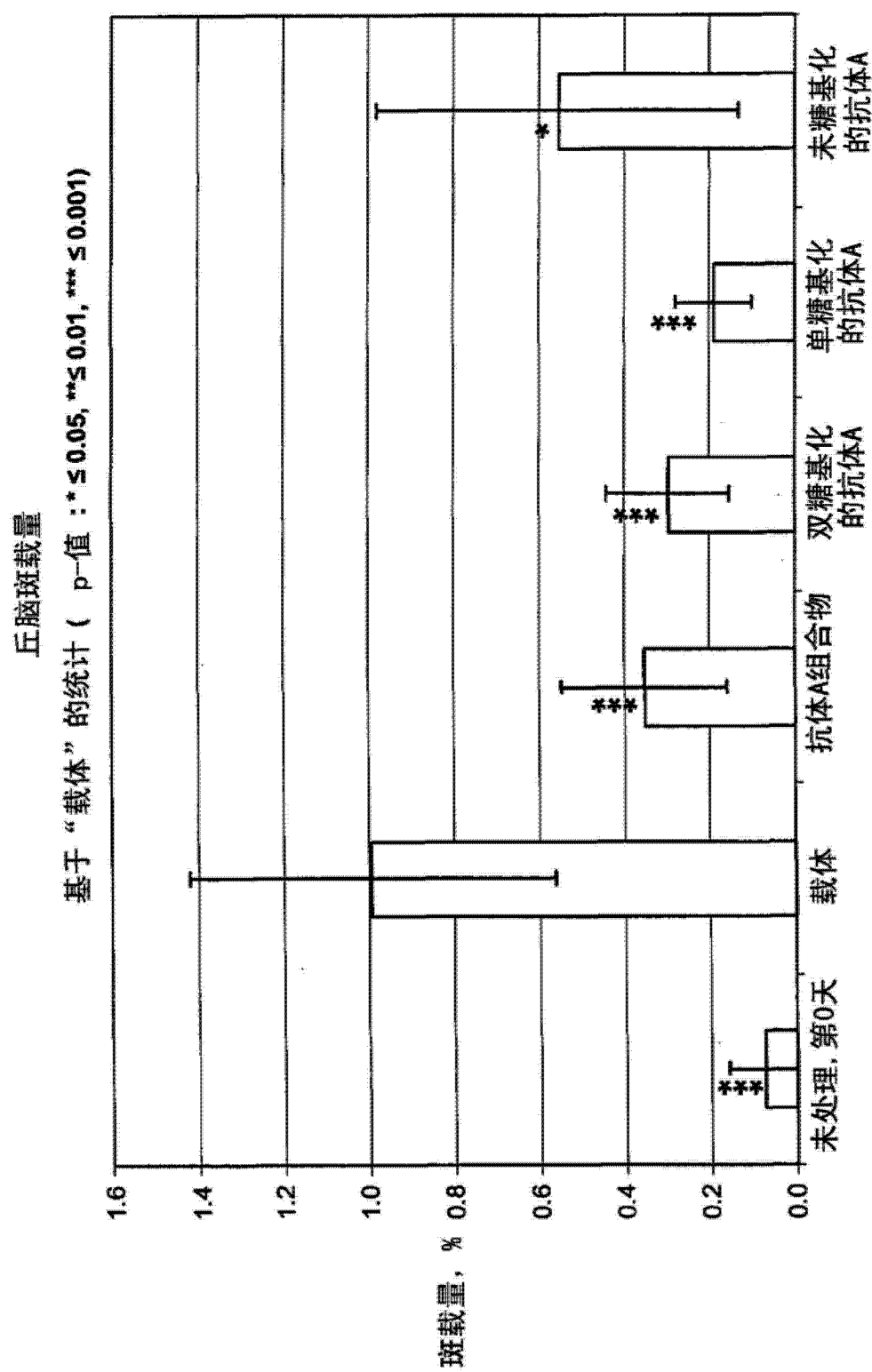


图 15A

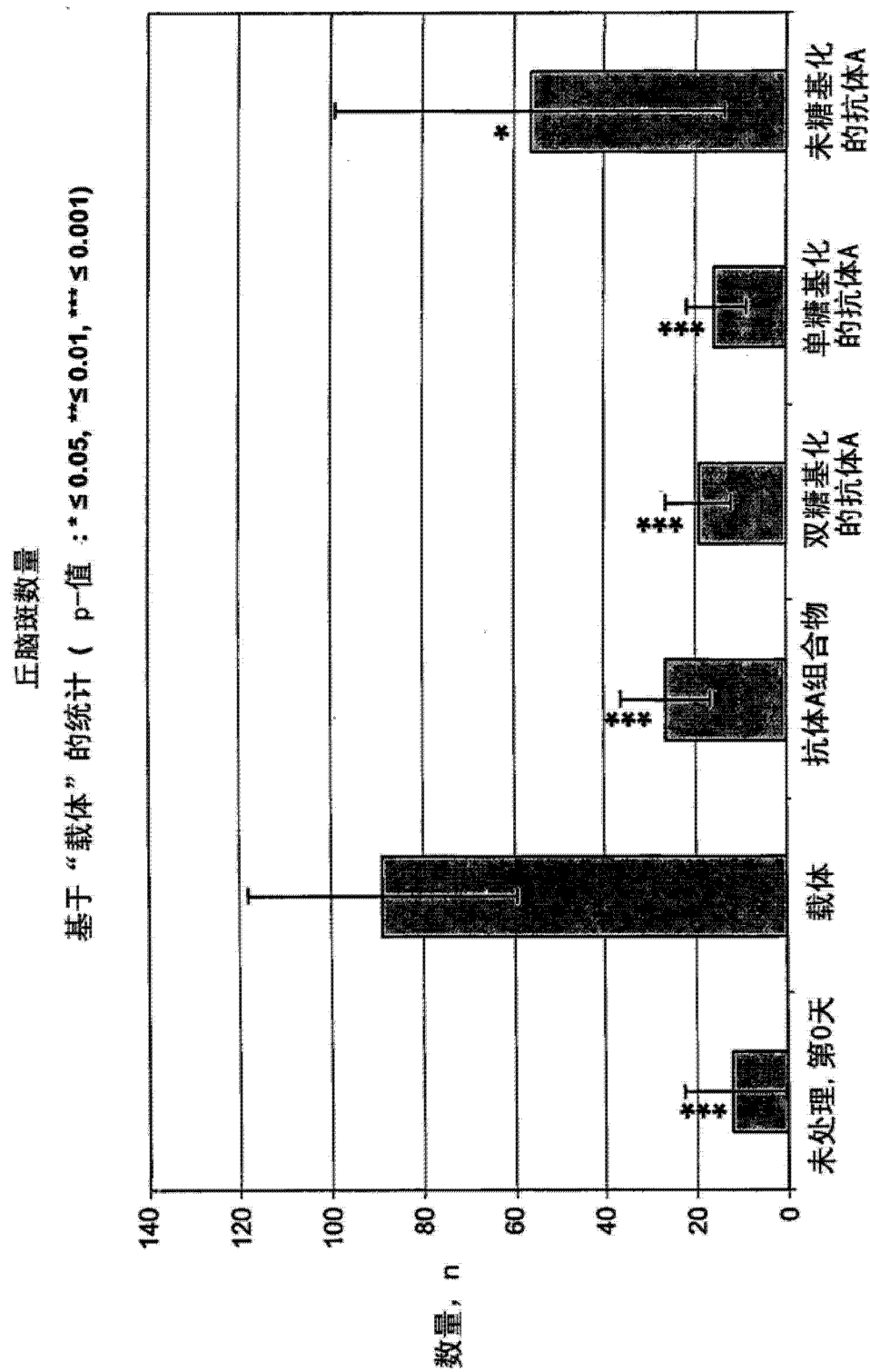


图 15B

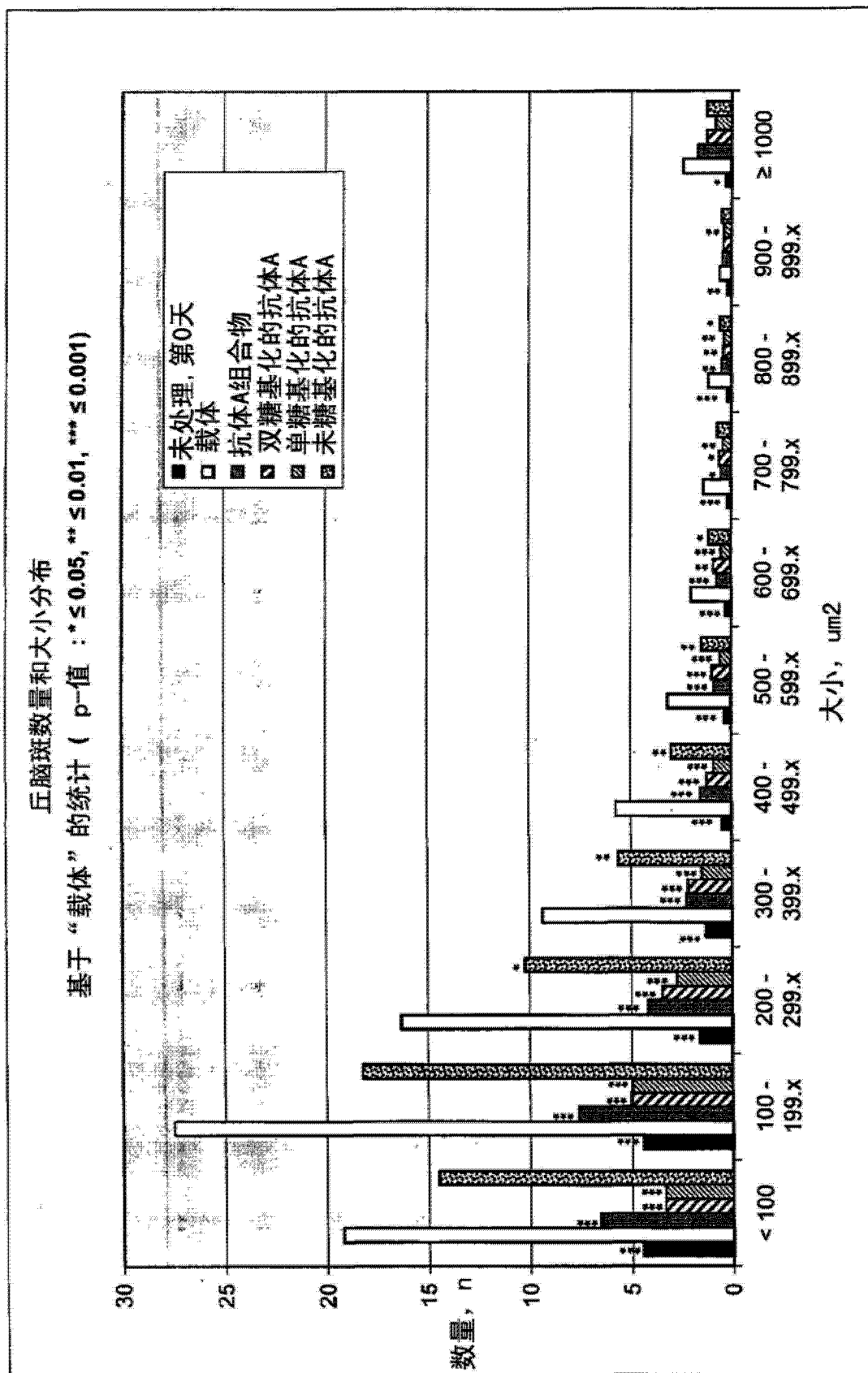


图 15C

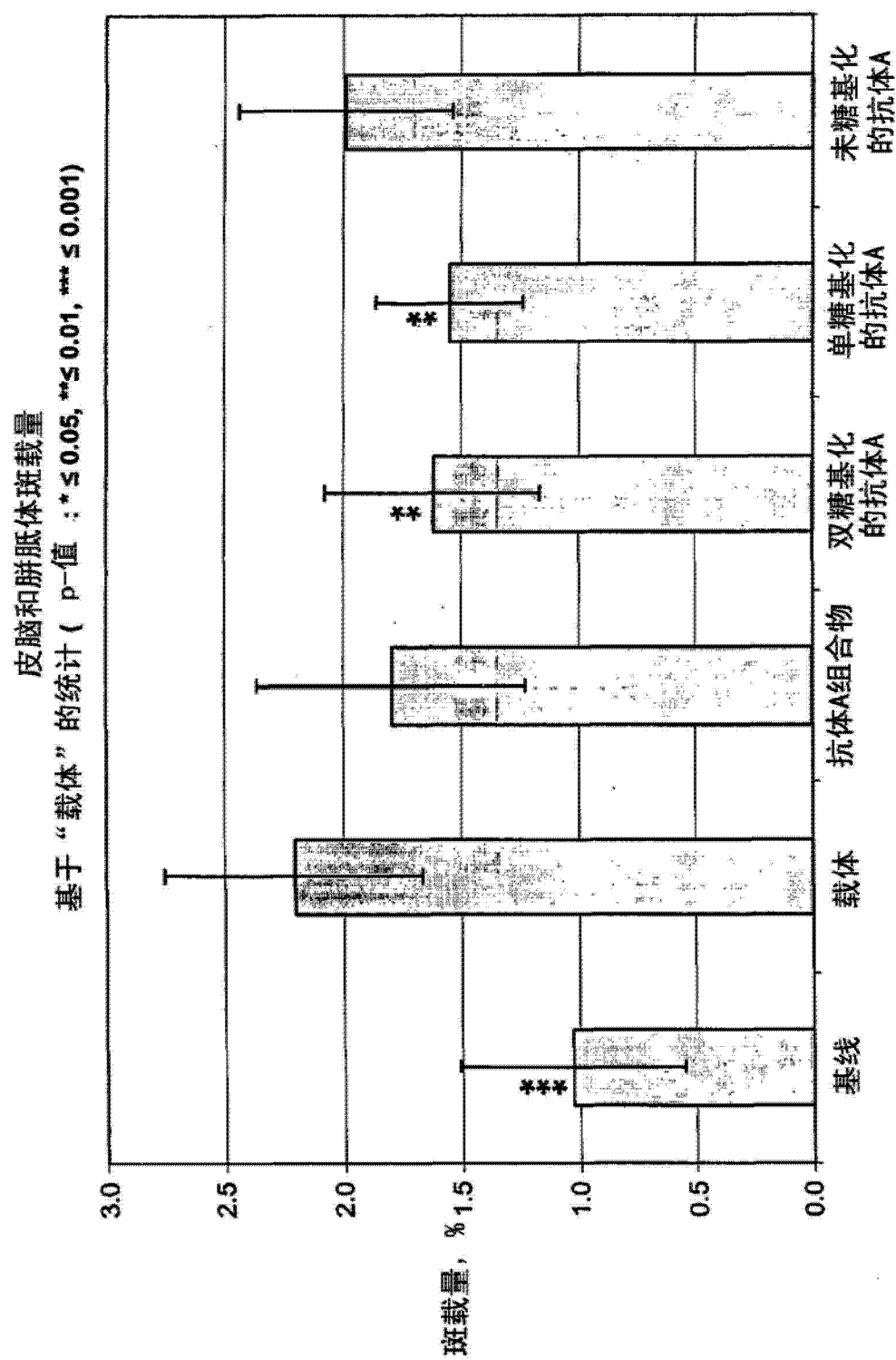


图 16A

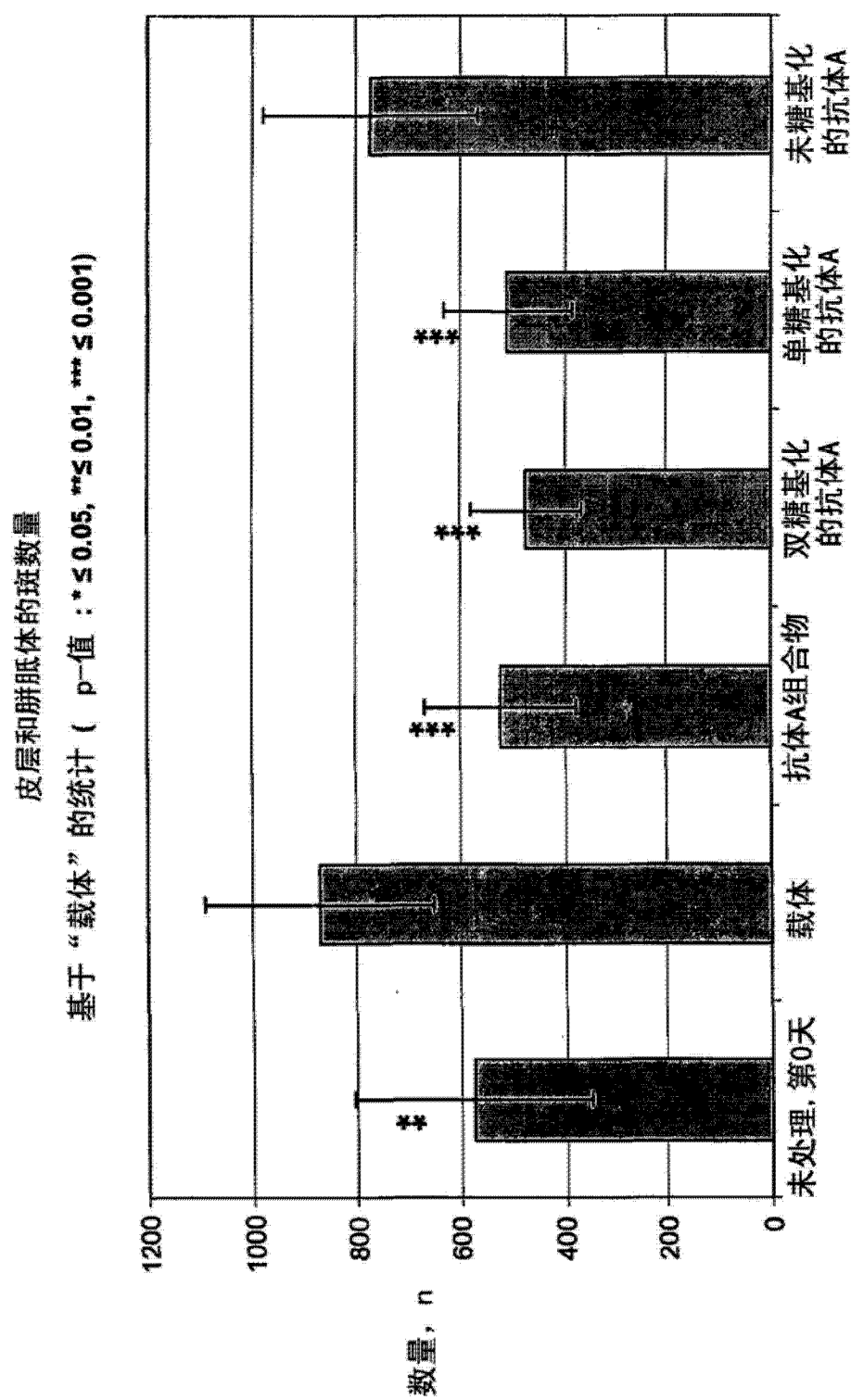


图 16B

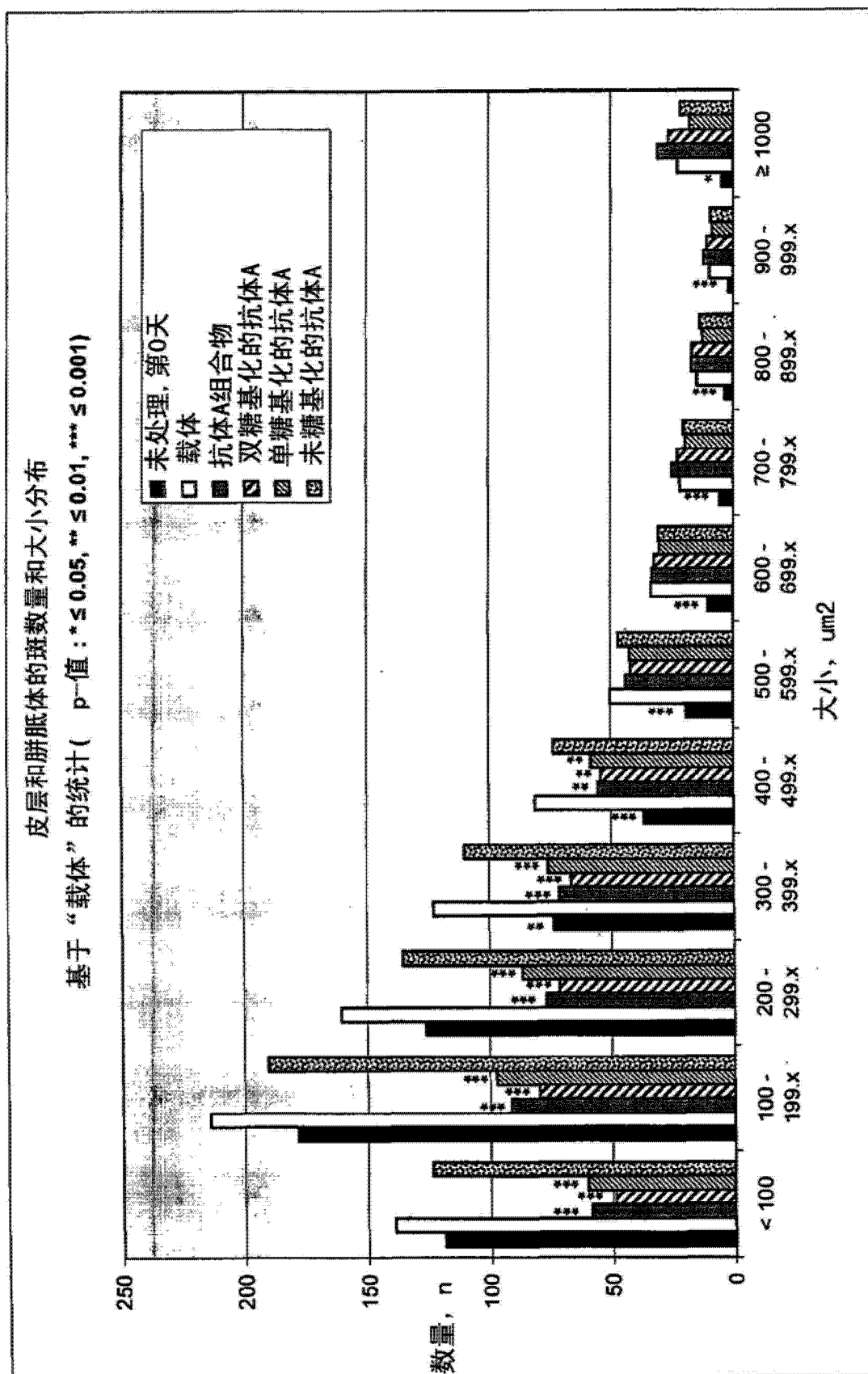


图 16C

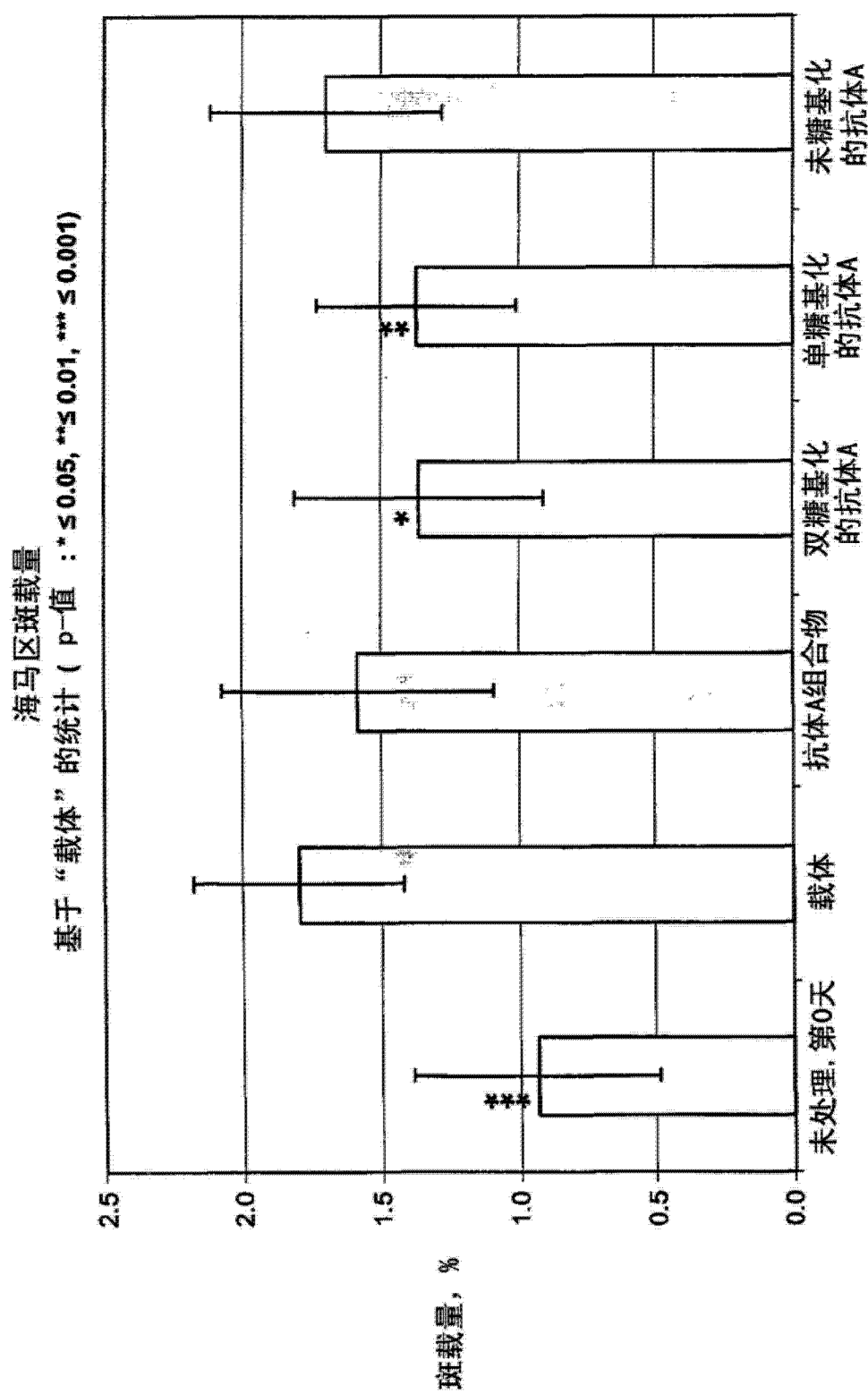


图 17A

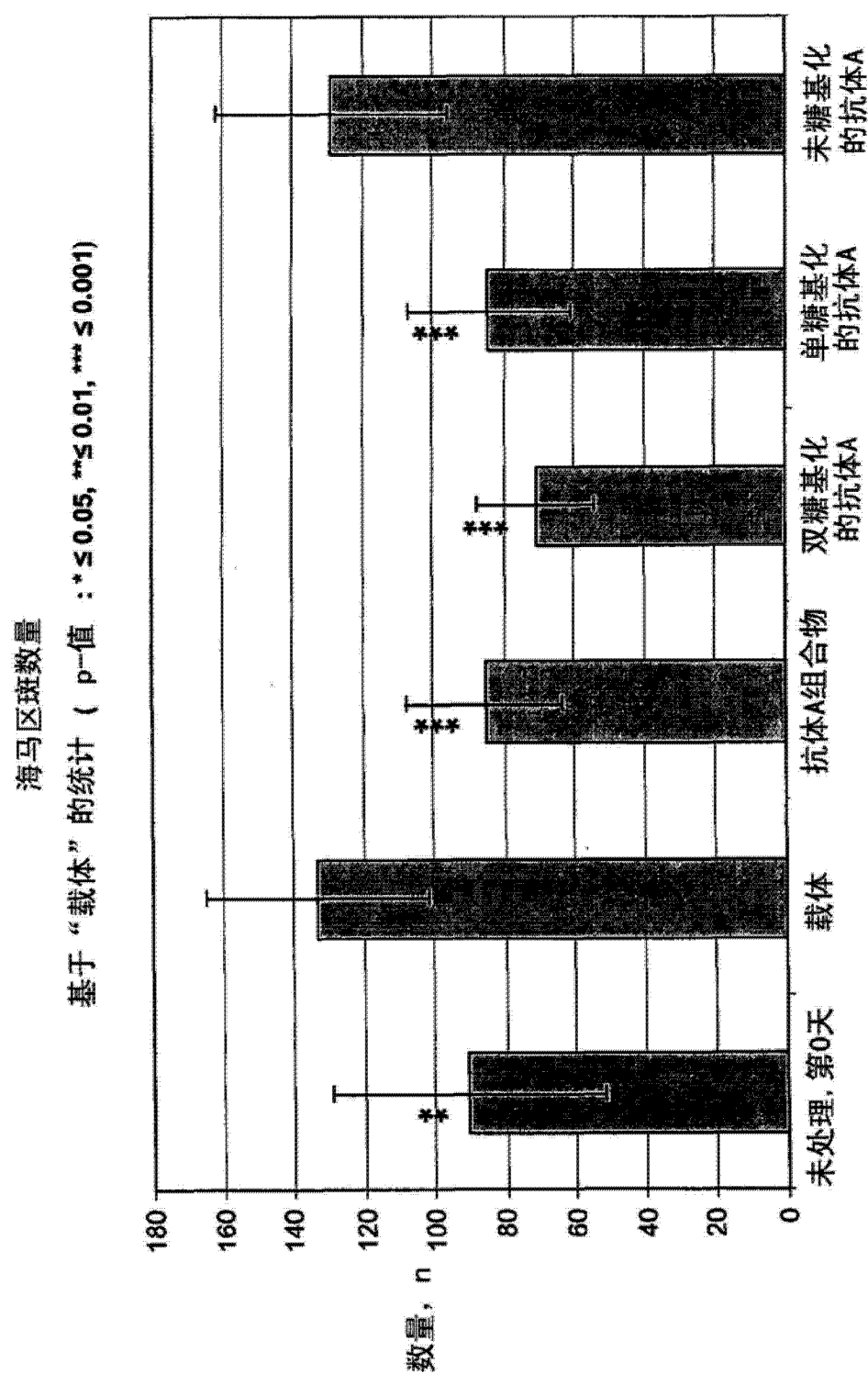


图 17B

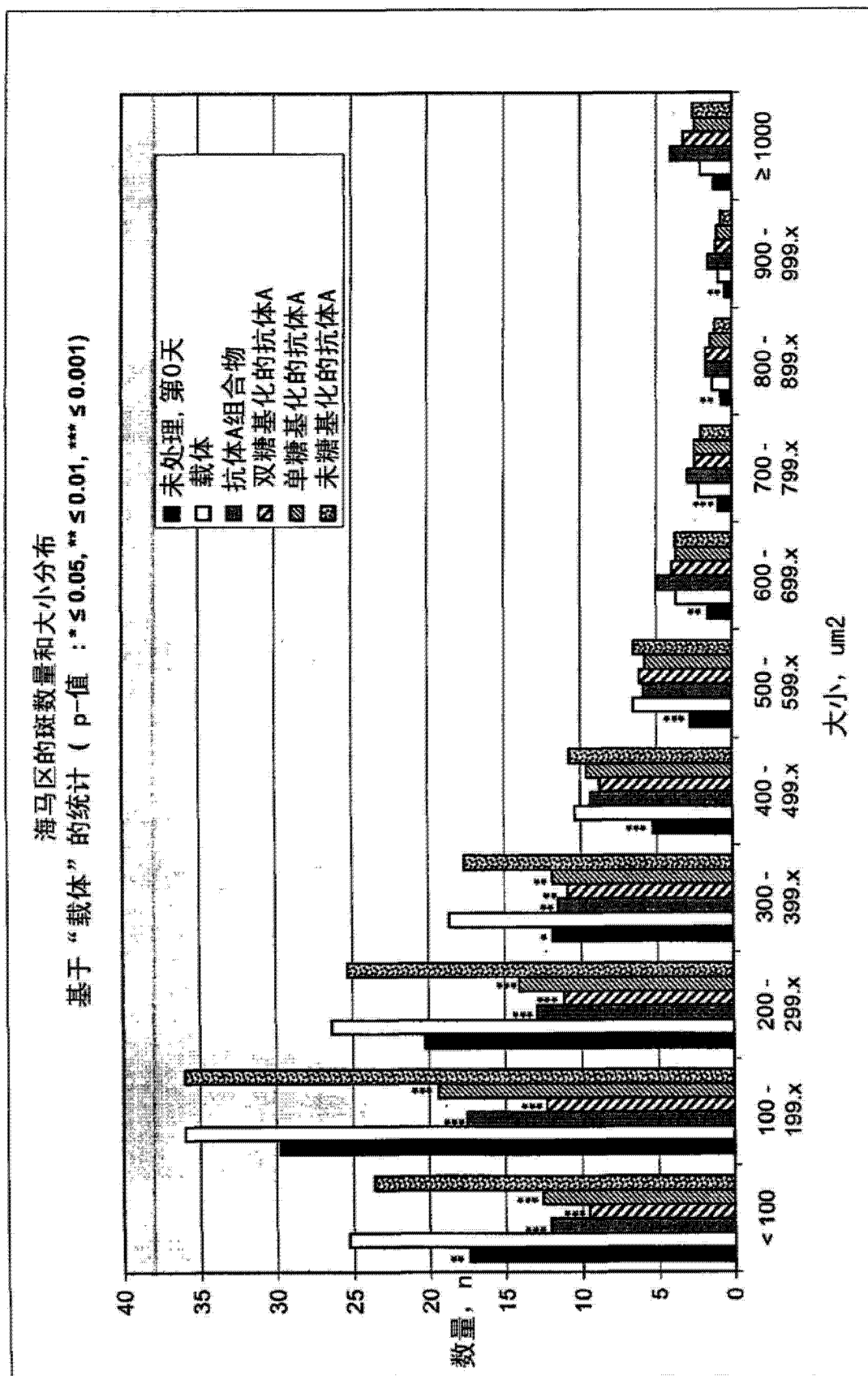


图 17C

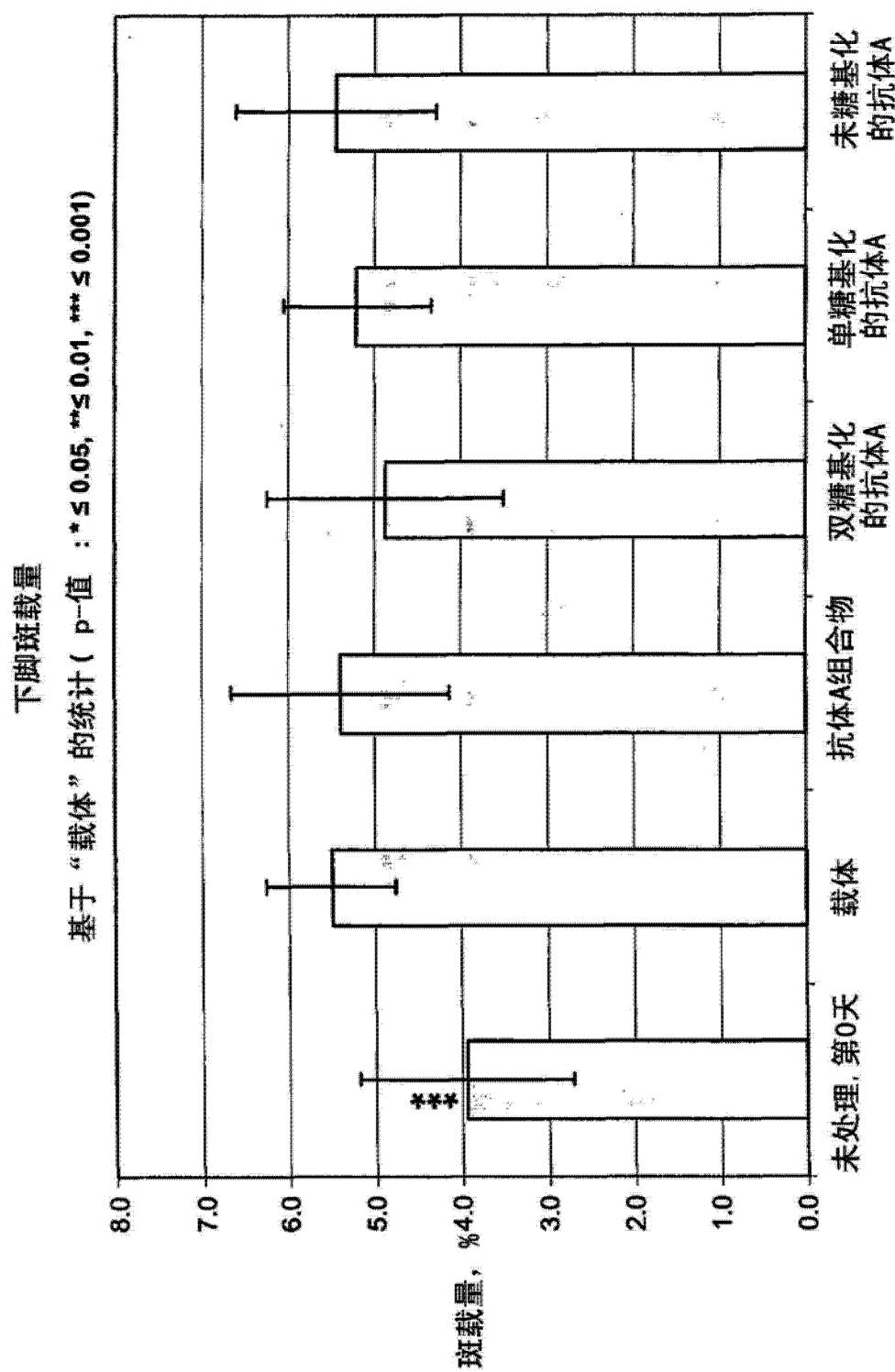


图 18A

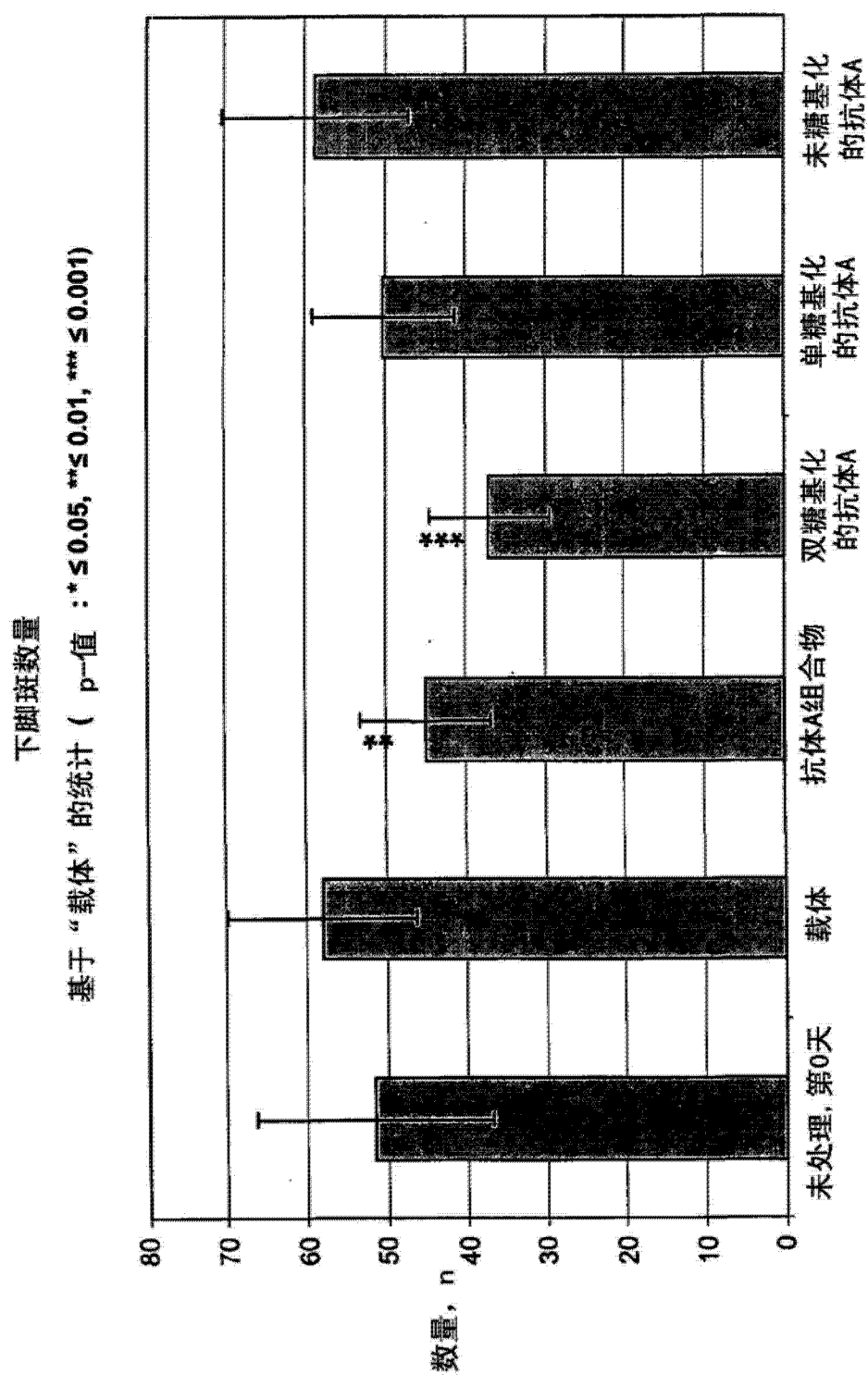


图 18B

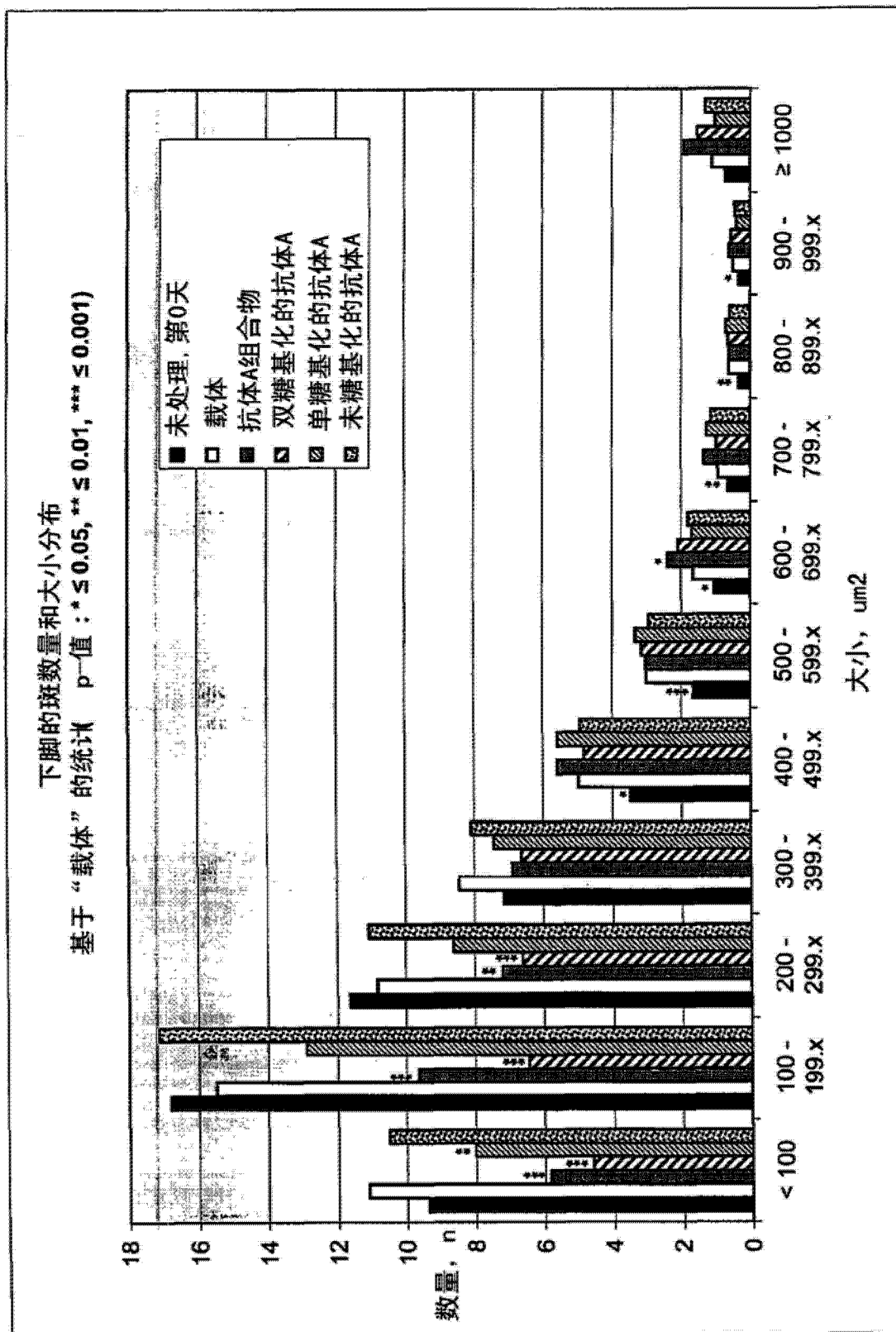


图 18C

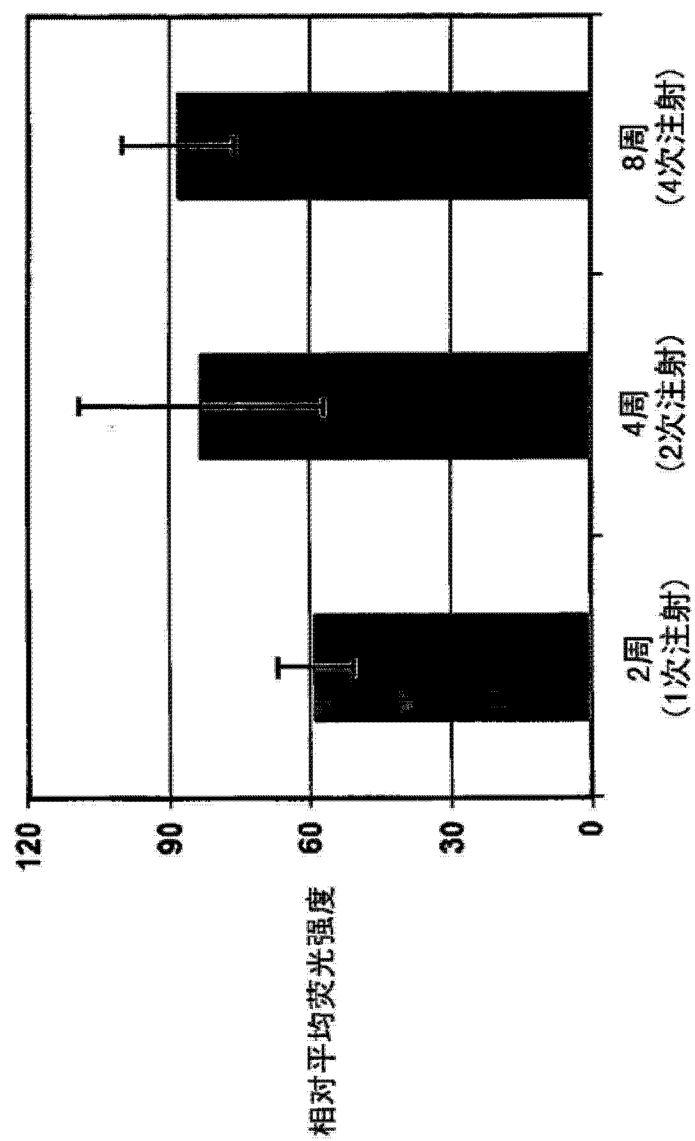


图 19

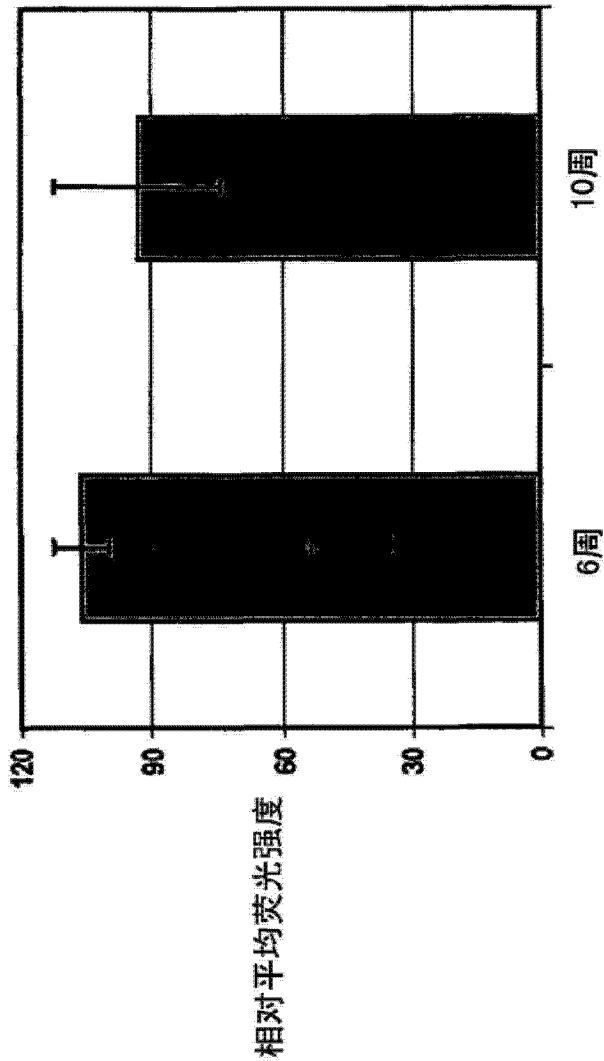


图 20

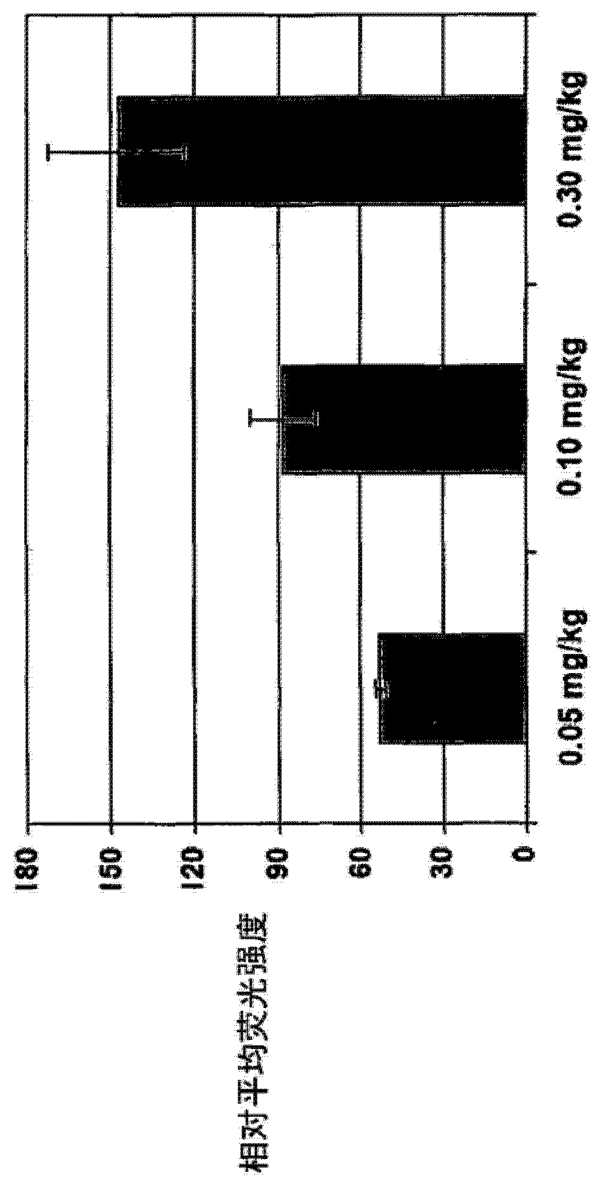


图 21

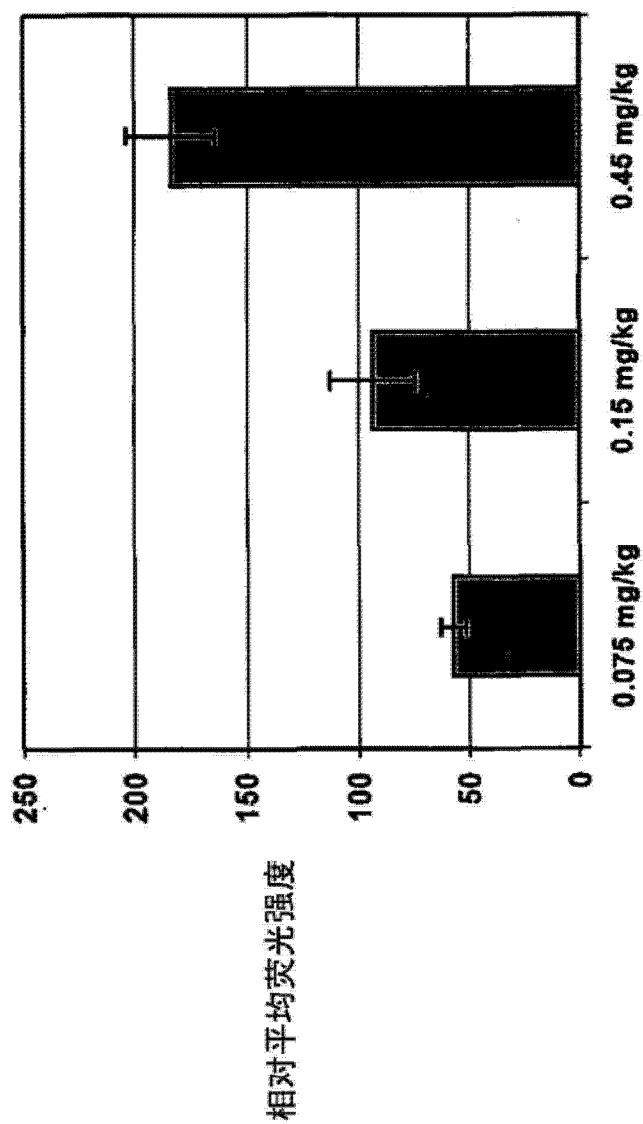


图 22

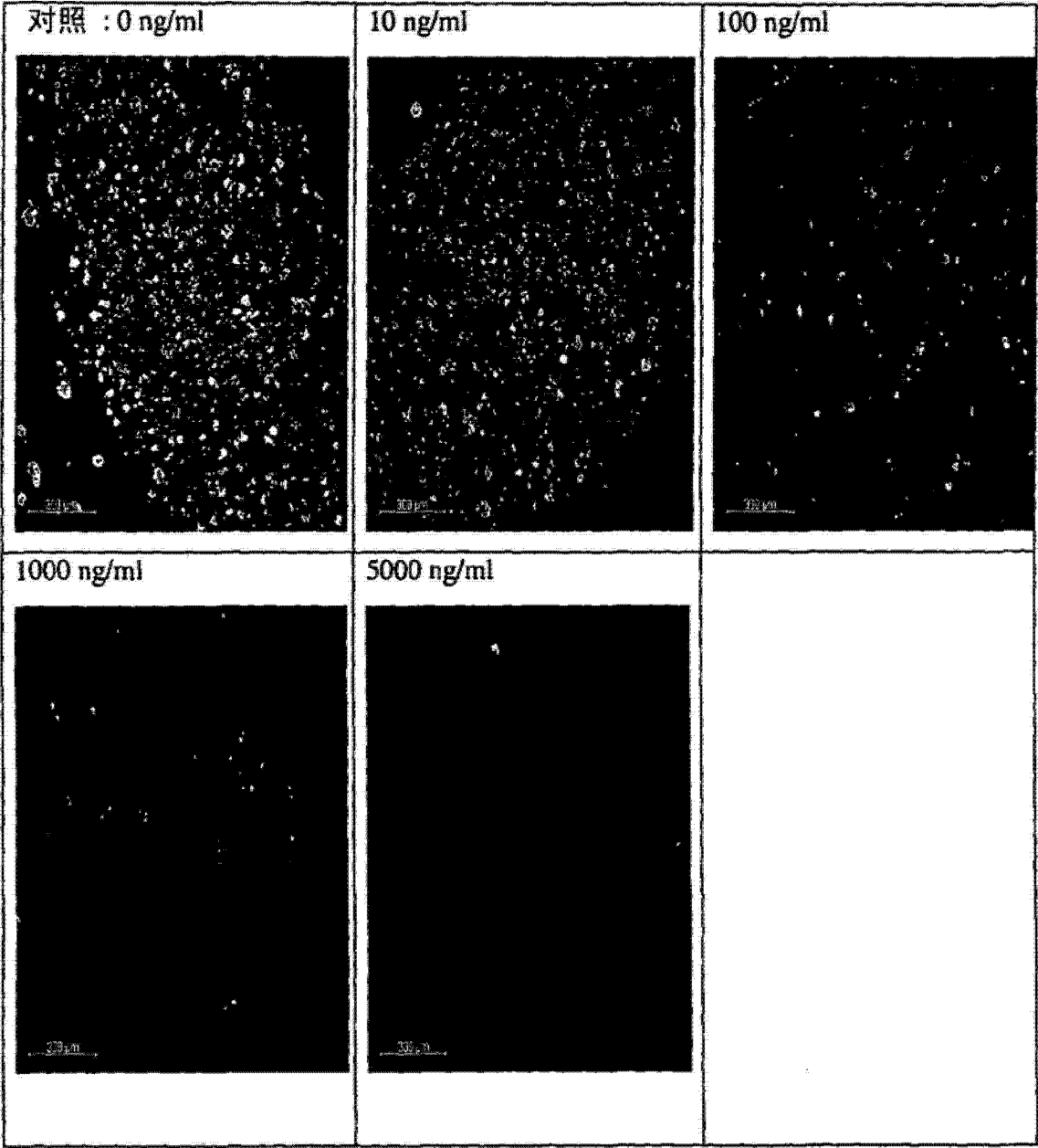


图 23

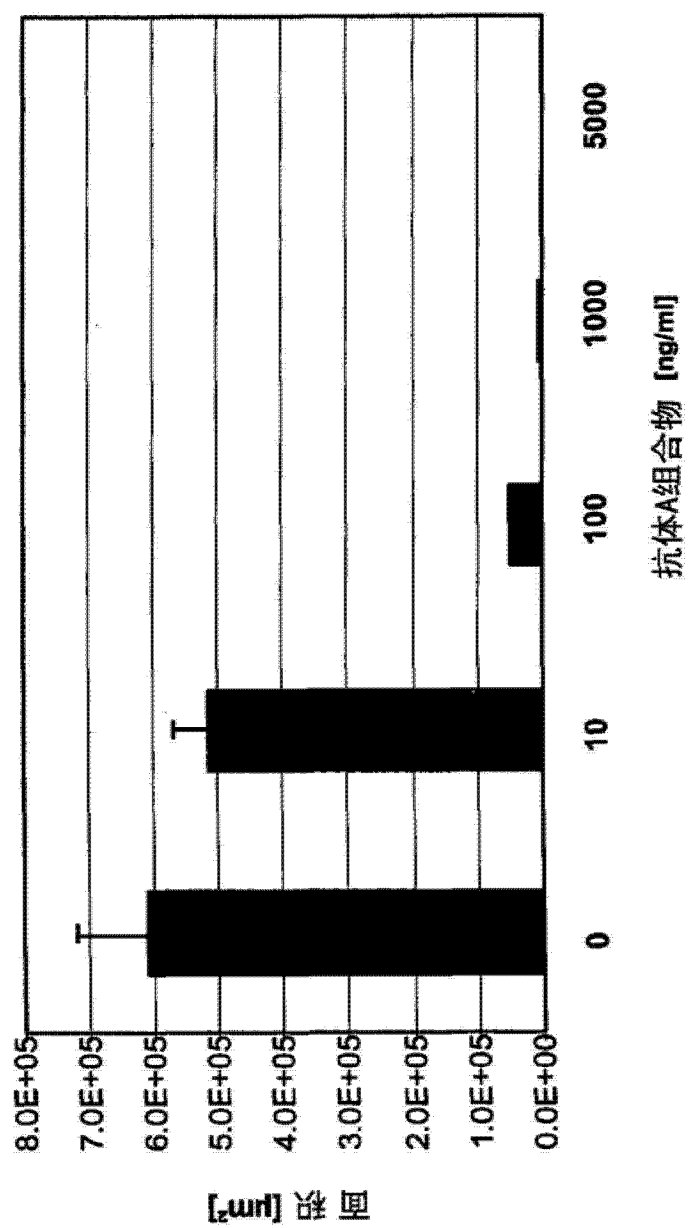


图 24A

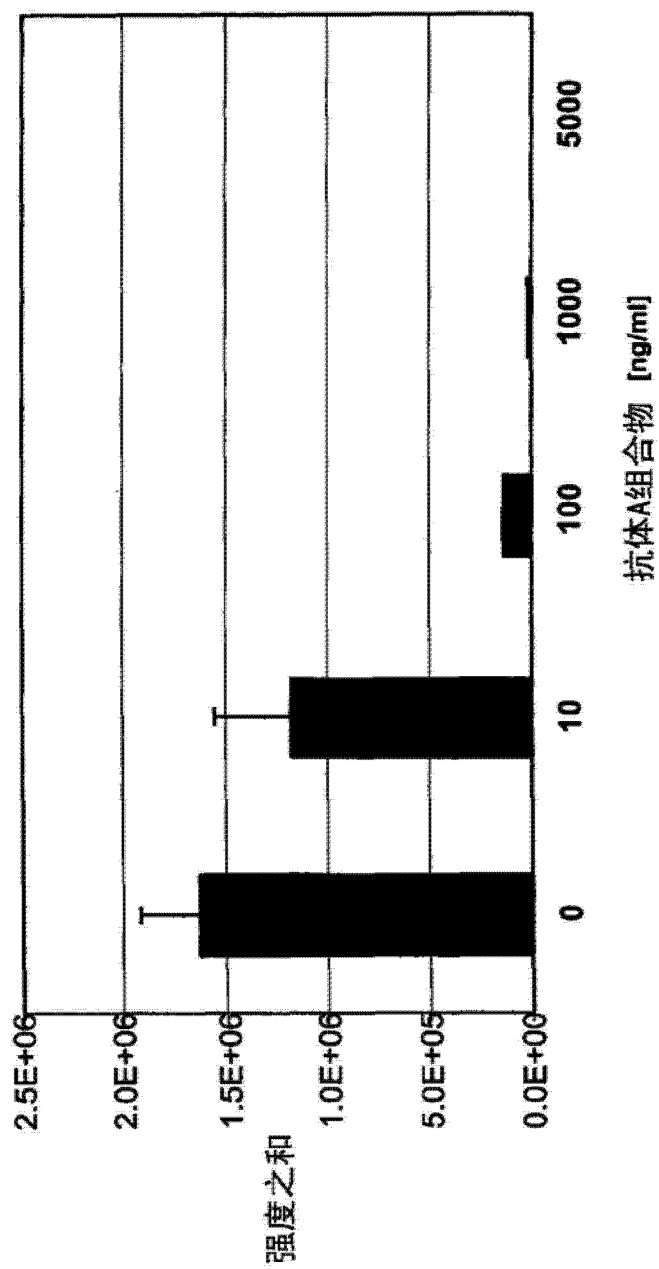


图 24B

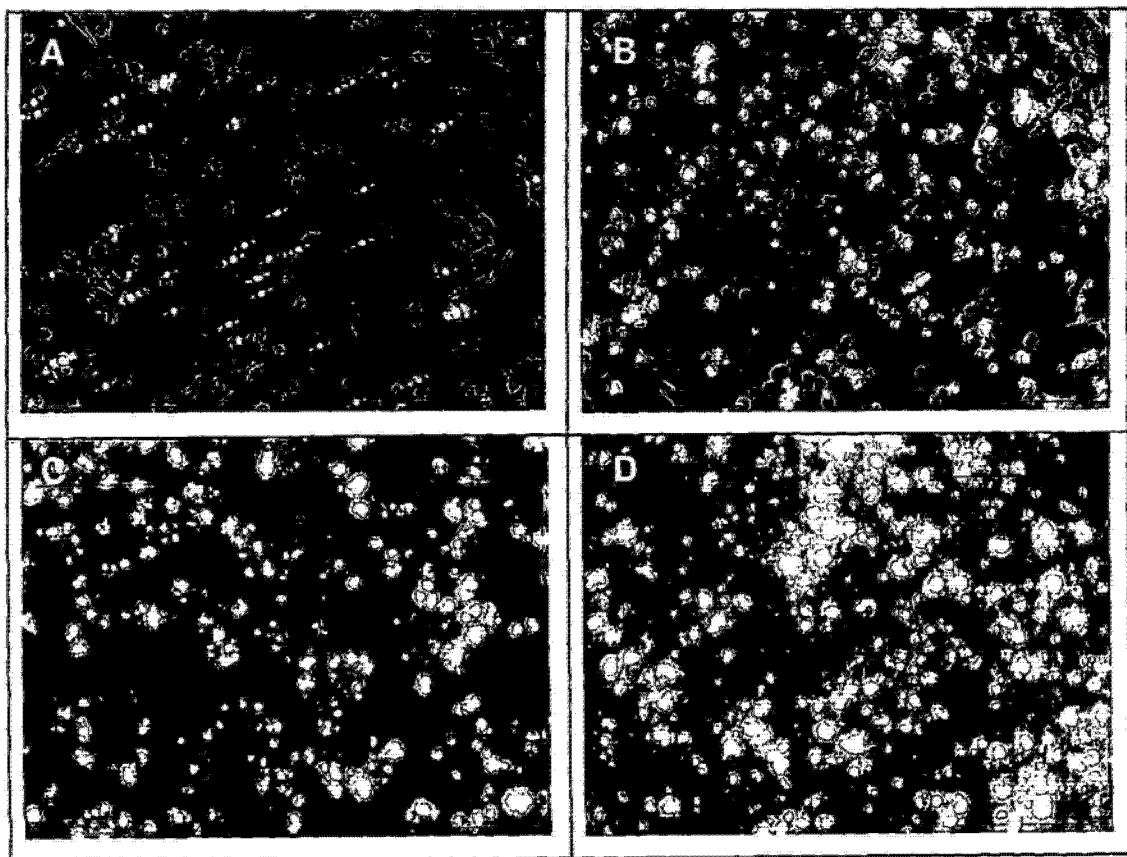


图 25

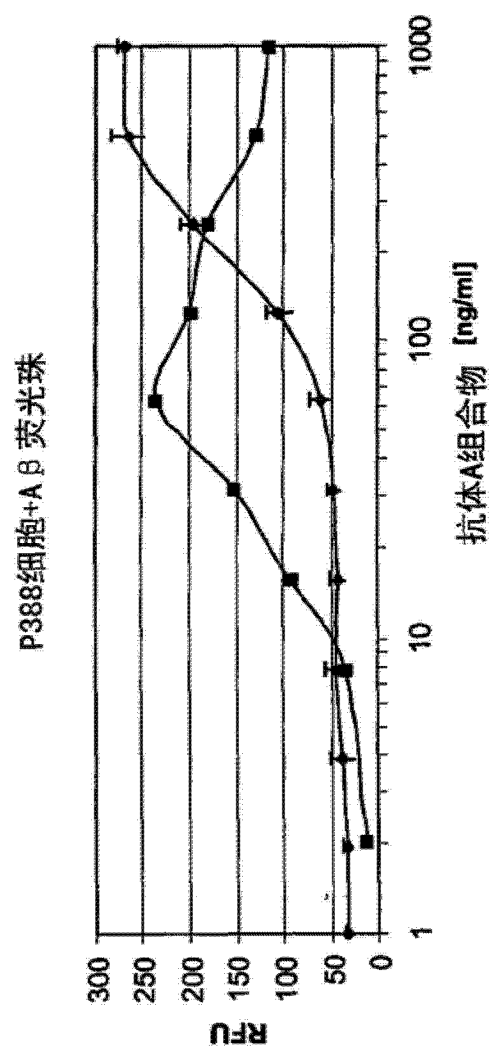


图 26

名称	结构 ¹⁾	名称 ²⁾	结构 ¹⁾
Asn 306_G0		Asn 52_G2_0NANA-F	
Asn 306_G0-GlcNac		Asn 52_G2_1NANA-F	
Asn 306_G1		Asn 52_G2_2NANA-F	
Asn 306_G2		Asn 52_hyb_Man5_1NANA	
Asn 306_G0-F		Asn 52_hyb_Man4_1NANA	
Asn 306_G1-F		Asn 52_hyb_Man3_1NANA	
Asn 306_G2-F		Asn 52_Man5	
Asn 306_Man5			

1) 岩藻糖 △, 甘露糖 ●, N-乙酰葡萄糖胺 □, 半乳糖 ○, N-乙酰神经氨酸 ◇
2) “hyb” 指杂合子结构

图 27

专利名称(译)	抗体可变区的糖基化		
公开(公告)号	CN102659943A	公开(公告)日	2012-09-12
申请号	CN201210137369.8	申请日	2006-12-11
申请(专利权)人(译)	豪夫迈·罗氏有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	豪夫迈·罗氏有限公司		
[标]发明人	H洛茨西尔 W赫伯 D舒鲍尔 K魏尔 M布洛克豪斯 B宝曼 H科尔 A绍布玛 K兰奇		
发明人	H·洛茨西尔 W·赫伯 D·舒鲍尔 K·魏尔 M·布洛克豪斯 B·宝曼 H·科尔 A·绍布玛 K·兰奇		
IPC分类号	C07K16/18 C07K1/36 C07K1/18 C07K1/16 A61K39/395 A61P25/00 A61P25/28 A61P25/16 G01N33/68 G01N33/53		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P25/00 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/28 C07K16/18 C07K2317/41 C07K2317/56 C07K2317/77 A61K39/3955		
代理人(译)	韦东		
优先权	2005027090 2005-12-12 EP		
其他公开文献	CN102659943B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及纯化抗体分子的制剂，其特征是重链可变区(VH)中的至少一个抗原结合位点包含糖基化的天冬酰胺(Asn)。更具体说，提供了包含所述抗体分子和抗体混合物的药学和诊断性组合物，该组合物能够特异性识别β-A4肽/Aβ4。本发明具体涉及包含在重链可变区中有一个或两个具有糖基化天冬酰胺(Asn)的糖基化抗原结合位点的抗体混合物，即重链可变区(VH)中含有糖基化Asn的抗体同种型的混合物。也公开了包含特异性糖基化抗体同种型的组合物或抗体制剂。而且提供了这些抗体的药学和诊断性用途。所述抗体同种型可用于药学干预淀粉样蛋白形成或淀粉样蛋白斑形成和/或这些病症的诊断。

GRATIA PATRI MORTUO DISSEMINANDA