



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112584863 A

(43) 申请公布日 2021.03.30

(21) 申请号 201980054508.0

(22) 申请日 2019.08.16

(30) 优先权数据

62/765,150 2018.08.17 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.02.18

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/046903 2019.08.16

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/037258 EN 2020.02.20

(71) 申请人 AB工作室有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 刘跃

(74) 专利代理机构 北京市铸成律师事务所

11313

代理人 王丹丹 王云红

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

权利要求书4页 说明书54页

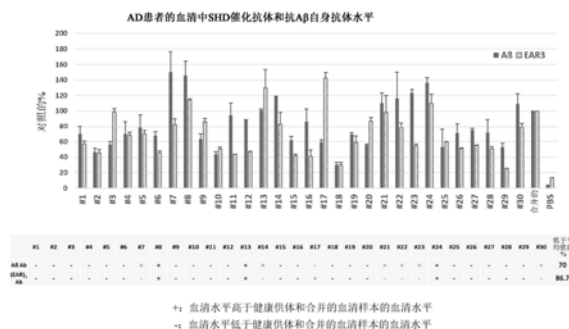
序列表14页 附图8页

(54) 发明名称

催化抗体和其使用方法

(57) 摘要

本申请提供用于确定生物样本中SHD催化抗体水平和用于治疗或预防个体的蛋白聚集疾病(PAD)的方法、组合物和试剂盒。还提供特异性识别淀粉样蛋白 β (A β)肽的催化抗体和其使用方法。



1. 一种用于确定生物样本中一种或多种SHD催化抗体的水平的方法,其包含:

a) 在允许形成催化抗体-底物肽复合物的条件下使所述生物样本与固定在固体支持物上的底物肽接触,和

b) 确定所述催化抗体-底物肽复合物的量,由此提供在所述生物样本中一种或多种SHD催化抗体的水平,

其中所述底物肽包含氨基酸序列(EAR)_n(SEQ ID NO:2),并且其中n为介于1与30之间的整数。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中n为3。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述生物样本为血清样本。

4. 根据权利要求3所述的方法,其中所述血清样本含有至少约1μg/mL免疫球蛋白(Ig)。

5. 根据权利要求1到4中任一项所述的方法,其中使用与总Ig特异性结合的抗体确定所述催化抗体-底物肽复合物的量。

6. 根据权利要求5所述的方法,其中所述抗体用酶或荧光标记来标记。

7. 一种用于确定个体的蛋白聚集疾病(PAD)的风险的方法,其中所述PAD与靶蛋白的聚集相关,所述方法包含确定所述个体的生物样本中一种或多种SHD催化抗体的水平,其中如果所述一种或多种SHD催化抗体的水平低于对照SHD催化抗体水平,那么确定所述个体具有所述PAD的风险。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中一种或多种SHD催化抗体的水平为与所述靶蛋白特异性结合的一种或多种SHD催化抗体的水平。

9. 根据权利要求7所述的方法,其中一种或多种SHD催化抗体的水平为总SHD催化抗体的水平。

10. 根据权利要求9所述的方法,其中通过在允许形成催化抗体-底物肽复合物的条件下使所述个体的血清样本与固定在固体支持物上的底物肽接触并且确定所述催化抗体-底物肽复合物的量来确定总SHD催化抗体的水平,其中所述底物肽包含所述氨基酸序列(EAR)_n(SEQ ID NO:2),其中n为介于1与30之间的整数。

11. 根据权利要求10所述的方法,其中n为3。

12. 根据权利要求10或11所述的方法,其中所述血清样本含有至少约1μg/mL Ig。

13. 根据权利要求10到12中任一项所述的方法,其中使用与总Ig特异性结合的抗体确定所述催化抗体-底物肽复合物的量。

14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述抗体用酶或荧光标记来标记。

15. 根据权利要求7到14中任一项所述的方法,其还包含确定所述个体的生物样本中针对所述靶蛋白的自身抗体的水平,其中如果:(i)所述一种或多种SHD催化抗体的水平低于对照SHD催化抗体水平;和(ii)针对所述靶蛋白的所述自身抗体的水平低于对照自身抗体水平,那么确定所述个体具有所述PAD的风险。

16. 根据权利要求15所述的方法,其中通过在允许形成自身抗体-靶蛋白复合物的条件下使所述个体的血清样本与所述靶蛋白接触并且确定所述自身抗体-靶蛋白复合物的量来确定所述自身抗体的水平。

17. 根据权利要求16所述的方法,其中使用ELISA测定来确定所述自身抗体的水平。

18. 根据权利要求15到17中任一项所述的方法,其中所述对照自身抗体水平为在健康

个体或个体群体中针对所述靶蛋白的所述自身抗体的水平。

19. 根据权利要求7到14中任一项所述的方法, 其还包含确定所述个体的生物样本中所述靶蛋白的水平, 其中如果: (i) 所述一种或多种SHD催化抗体的水平低于对照SHD催化抗体水平; 和 (ii) 所述靶蛋白的水平高于对照靶蛋白水平, 那么确定所述个体具有所述PAD的风险。

20. 根据权利要求7到19中任一项所述的方法, 其中所述对照SHD催化抗体水平为在健康个体或个体群体中一种或多种SHD催化抗体的水平。

21. 根据权利要求7到20中任一项所述的方法, 其中:

- (i) 所述PAD为帕金森氏病, 并且所述靶蛋白为 α -突触核蛋白;
- (ii) 所述PAD为阿尔茨海默氏病或痴呆, 并且所述靶蛋白为Tau或淀粉样蛋白 β (A β);
- (iii) 所述PAD为ATTR淀粉样变性, 并且所述靶蛋白为转甲状腺素蛋白;
- (iv) 所述PAD为AL淀粉样变性, 并且所述靶蛋白为免疫球蛋白轻链;
- (v) 所述PAD为额颞叶退化或肌萎缩性侧索硬化, 并且所述靶蛋白为TDP43;
- (vi) 所述PAD为亨廷顿氏病, 并且所述靶蛋白为亨廷顿蛋白;
- (vii) 所述PAD为II型糖尿病, 并且所述靶蛋白为IAPP; 或
- (viii) 所述PAD为肌萎缩性侧索硬化, 并且所述靶蛋白为SOD1。

22. 一种治疗或预防个体的PAD的方法, 其中所述PAD与靶蛋白的聚集相关, 所述方法包含:

- a) 根据权利要求1到21中任一项所述的方法确定所述个体具有所述PAD的风险; 和
- b) 向所述个体施用有效量的与所述靶蛋白特异性结合的治疗性催化抗体。

23. 根据权利要求22所述的方法, 其中所述PAD为阿尔茨海默氏病, 其中靶蛋白为淀粉样蛋白 β (A β), 其中所述治疗性催化抗体包含: 包含以下的轻链可变区 (V_L): 包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的轻链互补决定区 (LC-CDR) 1、包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的LC-CDR2, 和包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的LC-CDR3, 或其变体, 其在所述LC-CDR中包含至多约5个氨基酸取代; 和/或包含以下的重链可变区 (V_H): 包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的重链互补决定区 (HC-CDR) 1、包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HC-CDR2, 和包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HC-CDR3, 或其变体, 其在所述HC-CDR中包含至多约5个氨基酸取代; 其中在所述 V_L 的位置1处的所述氨基酸残基为D, 在所述 V_L 的位置27A处的所述氨基酸残基为S, 并且在所述 V_L 的位置93处的所述氨基酸残基为H, 并且其中所述编号是根据Kabat的EU索引。

24. 根据权利要求23所述的方法, 其中在所述 V_L 的位置26处的所述氨基酸残基为S, 在所述 V_L 的位置27D处的所述氨基酸残基为D、E或H, 和/或在所述 V_L 的位置28处的所述氨基酸残基为D或N, 并且其中所述编号是根据Kabat的EU索引。

25. 根据权利要求23或24所述的方法, 其中所述治疗性催化抗体包含: (i) 包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的 V_L ; (ii) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的 V_L ; (iii) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的 V_L ; (iv) 包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的 V_L ; (v) 包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的 V_L ; (vi) 包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:22的

氨基酸序列的 V_L ;或(vii)包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的 V_L 。

26.根据权利要求22到25中任一项所述的方法,其中所述治疗性催化抗体为全长IgG抗体。

27.根据权利要求26所述的方法,其中所述治疗性催化抗体包含IgG1或IgG4 Fc区。

28.根据权利要求22到25中任一项所述的方法,其中所述治疗抗体为全长IgM抗体。

29.一种分离的抗AB催化抗体,其包含:包含以下的 V_L :包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的LC-CDR1、包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的LC-CDR2,和包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的LC-CDR3,或其变体,其在所述LC-CDR中包含至多约5个氨基酸取代;和/或包含以下的 V_H :包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HC-CDR1、包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HC-CDR2,和包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HC-CDR3,或其变体,其在所述HC-CDR中包含至多约5个氨基酸取代;其中在所述 V_L 的位置1处的所述氨基酸残基为D,在所述 V_L 的位置27A处的所述氨基酸残基为S,并且在所述 V_L 的位置93处的所述氨基酸残基为H,并且其中所述编号是根据Kabat的EU索引。

30.根据权利要求29所述的抗AB催化抗体,其中所述抗AB催化抗体包含:包含以下的 V_H :包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HC-CDR1、包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HC-CDR2,和包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HC-CDR3;和包含以下的 V_L :包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的LC-CDR1、包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的LC-CDR2,和包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的LC-CDR3。

31.根据权利要求29或30所述的抗AB催化抗体,其中所述抗AB催化抗体切割具有式EAR-AMC (SEQ ID NO:1)的底物。

32.根据权利要求29到31中任一项所述的抗AB催化抗体,其中在所述 V_L 的位置26处的所述氨基酸残基为S,在所述 V_L 的位置27D处的所述氨基酸残基为D、E或H,和/或在所述 V_L 的位置28处的所述氨基酸残基为D或N,并且其中所述编号是根据Kabat的EU索引。

33.根据权利要求29到32中任一项所述的抗AB催化抗体,其中所述抗AB催化抗体包含:(i)包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的 V_L ;(ii)包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的 V_L ;(iii)包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的 V_L ;(iv)包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的 V_L ;(v)包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的 V_L ;(vi)包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的 V_L ;或(vii)包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的 V_L 。

34.根据权利要求29到33中任一项所述的抗AB催化抗体,其中所述抗AB催化抗体为全长IgG抗体。

35.根据权利要求34所述的抗AB催化抗体,其中所述抗AB催化抗体包含IgG1或IgG4 Fc区。

36.根据权利要求29到33中任一项所述的抗AB催化抗体,其中所述抗AB催化抗体为全长IgM抗体。

37.一种治疗或预防个体的阿尔茨海默氏病的方法,其包含向所述个体施用有效量的

根据权利要求29到36中任一项所述的抗A β 催化抗体。

38. 一种用于治疗或预防个体的阿尔茨海默氏病的试剂盒,其包含:

a) 包含所述氨基酸序列 (EAR)_n (SEQ ID NO:2) 的底物肽,其中n为介于1与30之间的整数;

b) A β 肽;和

c) 与总Ig特异性结合的抗体。

39. 根据权利要求38所述的试剂盒,其还包含固体支持物。

40. 根据权利要求38或39所述的试剂盒,其还包含与A β 特异性结合的治疗性催化抗体。

催化抗体和其使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2018年8月17日提交的临时专利申请第62/765,150号的优先权权益，其内容以全文引用的方式并入本文中。

[0003] 以ASCII文本文件提交的序列列表

[0004] 以下以ASCII文本文件提交的内容以全文引用的方式并入本文中：计算机可读形式 (CRF) 的序列列表 (文件名：792702000140SEQLIST.txt, 记录日期：2019年8月5日, 大小：22KB)。

技术领域

[0005] 本申请涉及催化抗体、用于确定催化抗体水平的方法和使用催化抗体治疗的方法。特别地，本申请涉及特异性识别和切割淀粉样蛋白 β (A β) 肽。

背景技术

[0006] 催化抗体为与靶标抗原特异性结合并且催化其靶标抗原化学转变的抗体。蛋白水解催化抗体可水解并且永久地灭活靶标肽。与化学计量结合的常规抗体相比，单个催化抗体分子可在其生物寿命内水解数千个抗原分子，从而实现提高的效能。已在正常人和患有自身免疫疾病的患者中发现天然存在的催化抗体。在针对合成半抗原免疫或使用过渡态类似物从抗体文库中筛选的实验室动物中，催化抗体也已升高。然而，由于它们相对小的催化活性，催化抗体尚未广泛开发为治疗性药剂。

[0007] 蛋白聚集是其中错误折叠的蛋白细胞内或细胞外聚集的生物现象。这些蛋白聚集通常与神经退行性疾病 (包括肌萎缩性侧索硬化 (ALS)、阿尔茨海默氏病 (Alzheimer's disease) (AD)、帕金森病 (Parkinson's disease) (PD)、朊病毒病和其它淀粉样变性疾病) 相关。举例来说，根据淀粉样蛋白假设，可溶性和纤维性淀粉样蛋白 β (A β) 肽聚集对AD的发病机理具有因果关系。A β 聚集激活小胶质炎性过程，直接施加神经毒性作用，并且破坏脑的解剖构造。为了治疗AD，已经应用抗体介导的免疫治疗剂来诱导清除现有的A β 淀粉样蛋白并抑制进一步的A β 聚集。然而，这些基于抗体的疗法中许多已在临床试验中失败，包括贝频珠单抗 (Bapineuzumab) 和索拉珠单抗 (Solanezumab)。

[0008] 本文中所提及的所有公开、专利、专利申请以及已公开的专利申请的公开内容由此以全文引用的方式并入本文中。

发明内容

[0009] 本申请提供用于诊断 (包括确定风险的方法)、治疗和预防个体的蛋白聚集疾病 (PAD)，如阿尔茨海默氏病 (AD) 的组合物和方法。

[0010] 本申请的一个方面提供用于确定生物样本中一种或多种SHD催化抗体 (即，含有丝氨酸、组氨酸和天冬氨酸的催化三联体基序，或“SHD基序”的催化抗体) 的水平的方法，其包含：a) 在允许形成催化抗体-底物肽复合物的条件下使生物样本与固定在固体支持物上的

底物肽接触,和b) 确定催化抗体-底物肽复合物的量,由此提供生物样本中一种或多种SHD催化抗体的水平,其中底物肽包含氨基酸序列(EAR)_n (SEQ ID NO:2),并且其中n为介于1与30之间整数(例如n为3)。在一些实施例中,生物样本与底物肽一起保温约1小时到约16小时,如约1小时到约3小时、约3小时到约8小时,或约8小时到约16小时中的任一种。

[0011] 在根据上文所描述的方法中的任一种的一些实施例中,生物样本为血清样本。在一些实施例中,血清样本含有至少约1μg/mL (例如至少约10μg/mL、25μg/mL,或100μg/mL) 免疫球蛋白(Ig;例如人Ig)。

[0012] 在根据上文所描述的方法中的任一种的一些实施例中,使用与总免疫球蛋白(Ig,如总人Ig) 特异性结合的抗体确定催化抗体-底物肽复合物的量。在一些实施例中,抗体与总IgM、总IgG、总IgA和/或总IgE特异性结合。在一些实施例中,抗体用酶(例如辣根过氧化物酶或“HRP”)或荧光标记(例如FITC) 标记。

[0013] 本申请的一个方面提供用于确定个体的PAD的风险的方法,其中PAD与靶蛋白的聚集相关,所述方法包含确定在个体的生物样本(例如血清样本)中一种或多种SHD催化抗体的水平,其中如果一种或多种SHD催化抗体的水平低于对照SHD催化抗体水平,那么确定个体具有PAD的风险。在一些实施例中,一种或多种SHD催化抗体的水平为与靶蛋白特异性结合的一种或多种SHD催化抗体的水平。在一些实施例中,一种或多种SHD催化抗体的水平为总SHD催化抗体的水平。在一些实施例中,通过在允许形成催化抗体-底物肽复合物的条件下使个体的血清样本与固定在固体支持物上的底物肽接触并且确定催化抗体-底物肽复合物的量来确定总SHD催化抗体的水平,其中底物肽包含氨基酸序列(EAR)_n (SEQ ID NO:2),并且其中n为介于1与30之间整数(例如n为3)。在一些实施例中,血清样本含有至少约1μg/mL (例如至少约10μg/mL、25μg/mL,或100μg/mL) Ig (例如人Ig)。在一些实施例中,生物样本与底物肽一起保温约1小时到约16小时,如约1小时到约3小时、约3小时到约8小时,或约8小时到约16小时中的任一种。在一些实施例中,使用与总Ig (例如总人Ig) 特异性结合的抗体确定催化抗体-底物肽复合物的量。在一些实施例中,抗体与总IgM、总IgG、总IgA和/或总IgE特异性结合。在一些实施例中,抗体用酶(例如辣根过氧化物酶或“HRP”)或荧光标记(例如FITC) 标记。

[0014] 在根据如上文所描述用于确定风险的方法中的任一种的一些实施例中,方法另外包含确定在个体的生物样本(例如血清样本)中针对靶蛋白的自身抗体的水平,并且其中如果:(i) 一种或多种SHD催化抗体的水平低于对照SHD催化抗体水平;和(ii) 针对靶蛋白的自身抗体的水平低于对照自身抗体水平,那么确定个体具有PAD的风险。在一些实施例中,通过在允许形成自身抗体-靶蛋白复合物的条件下使个体的血清样本与靶蛋白接触并且确定自身抗体-靶蛋白复合物的量来确定自身抗体的水平。在一些实施例中,使用ELISA测定来确定自身抗体的水平。在一些实施例中,对照自身抗体水平为在健康个体(例如相同年龄组)中针对靶蛋白的自身抗体的水平。在一些实施例中,对照自身抗体水平为在个体群体(例如相同年龄组)中针对靶蛋白的自身抗体的中值水平。

[0015] 在根据如上文所描述用于确定风险的方法中的任一种的一些实施例中,方法另外包含确定在个体的生物样本(例如血清样本或脑脊髓液样本)中靶蛋白的水平,并且其中如果:(i) 一种或多种SHD催化抗体的水平低于对照SHD催化抗体水平;和(ii) 靶蛋白的水平高于对照靶蛋白水平,那么确定个体具有PAD风险。在一些实施例中,通过在允许形成抗体-靶

蛋白复合物的条件下使个体的生物样本与针对靶蛋白的抗体接触并且确定抗体-靶蛋白复合物的量来确定靶蛋白的水平。在一些实施例中,使用ELISA测定来确定靶蛋白的水平。在一些实施例中,对照靶蛋白水平为在健康个体(例如相同年龄组)中靶蛋白的水平。在一些实施例中,对照靶蛋白水平为在个体群体(例如相同年龄组)中靶蛋白的中值水平。

[0016] 在根据如上文所描述用于确定风险的方法中的任一种的一些实施例中,对照SHD催化抗体水平为在健康个体(例如相同年龄组)中一种或多种SHD催化抗体的水平。在一些实施例中,对照SHD催化抗体水平为在个体群体(例如相同年龄组)中一种或多种SHD催化抗体的中值水平。

[0017] 在根据如上文所描述用于确定风险的方法中的任一种的一些实施例中,PAD为阿尔茨海默氏病,并且其中靶蛋白为淀粉样蛋白 β (A β)。在一些实施例中,PAD为帕金森氏病,并且靶蛋白为 α -突触核蛋白。在一些实施例中,PAD为阿尔茨海默氏病或痴呆,并且靶蛋白为Tau。在一些实施例中,PAD为ATTR淀粉样变性,并且靶蛋白为转甲状腺素蛋白。在一些实施例中,PAD为AL淀粉样变性,并且靶蛋白为免疫球蛋白轻链。在一些实施例中,PAD为额颞叶退化(FTLD)或肌萎缩性侧索硬化(ALS),并且靶蛋白为TDP43。在一些实施例中,PAD为亨廷顿氏病(Huntington's disease),并且靶蛋白为亨廷顿蛋白(Huntingtin)。在一些实施例中,PAD为II型糖尿病,并且靶蛋白为IAPP。在一些实施例中,PAD为肌萎缩性侧索硬化(ALS),并且靶蛋白为SOD1。

[0018] 本申请的一个方面提供治疗或预防个体的蛋白聚集疾病(PAD)的方法,其中PAD与靶蛋白的聚集相关,所述方法包含:a)根据如上文所描述用于确定风险的方法中的任一种确定个体具有PAD风险;和b)向个体施用有效量的与靶蛋白特异性结合的治疗性催化抗体。在一些实施例中,不超过约每三个月,例如约每三个月、约每六个月,或约每一年的频率重复所述方法。

[0019] 在根据上文所描述的治疗方法中的任一种的一些实施例中,PAD为阿尔茨海默氏病,并且其中靶蛋白为淀粉样蛋白 β (A β),并且其中治疗性催化抗体包含:包含以下的轻链可变区(V_L):包含氨基酸序列SEQ ID NO:12的轻链互补决定区(LC-CDR)1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:13的LC-CDR2和包含氨基酸序列SEQ ID NO:14的LC-CDR3,或其变体,其在LC-CDR中包含至多约5(例如1、2、3、4或5)个氨基酸取代,其中在V_L的位置1处的氨基酸残基为D,在V_L的位置27A处的氨基酸残基为S,并且在V_L的位置93处的氨基酸残基为H,并且其中编号是根据Kabat的EU索引。在一些实施例中,治疗性催化抗体包含:包含以下的重链可变区(V_H):包含氨基酸序列SEQ ID NO:9的重链互补决定区(HC-CDR)1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:10的HC-CDR2,和包含氨基酸序列SEQ ID NO:11的HC-CDR3,或其变体,其在HC-CDR中包含至多约5(例如1、2、3、4或5)个氨基酸取代。在一些实施例中,在V_L的位置26处的氨基酸残基为S,在V_L的位置27D处的氨基酸残基为D、E或H,和/或在V_L的位置28处的氨基酸残基为D或N,并且其中编号是根据Kabat的EU索引。在一些实施例中,治疗性催化抗体包含:包含与SEQ ID NO:4、6、19或20的氨基酸序列具有至少约85%序列一致性(例如至少约90%、95%、97%、99%或100%中的任一种)的氨基酸序列的V_H。在一些实施例中,治疗性催化抗体包含:包含与SEQ ID NO:5、7、8、21或22的氨基酸序列具有至少约85%序列一致性(例如至少约90%、95%、97%、99%或100%中的任一种)的氨基酸序列的V_L。在一些实施例中,治疗性催化抗体包含:包含选自SEQ ID NO:4、6、19和20的氨基酸序列的氨基酸序列的V_H,和包含

选自SEQ ID NO:5、7、8、21和22的氨基酸序列的氨基酸序列的 V_L 。在一些实施例中,治疗性催化抗体包含:(i)包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的 V_L ;(ii)包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的 V_L ;(iii)包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的 V_L ;(iv)包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的 V_L ;(v)包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的 V_L ;(vi)包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的 V_L ;或(vii)包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的 V_L 。在一些实施例中,治疗性催化抗体为全长IgG抗体。在一些实施例中,治疗性催化抗体包含IgG1或IgG4 Fc区。在一些实施例中,治疗性催化抗体为全长IgM抗体。

[0020] 本申请的另一个方面提供分离的抗A β 催化抗体,其包含:包含以下的 V_L :包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的LC-CDR1、包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的LC-CDR2和包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的LC-CDR3,或其变体,其在LC-CDR中包含至多约5(例如1、2、3、4或5)个氨基酸取代,其中在 V_L 的位置1处的氨基酸残基为D,在 V_L 的位置27A处的氨基酸残基为S,并且在 V_L 的位置93处的氨基酸残基为H,并且其中编号是根据Kabat的EU索引。在一些实施例中,抗A β 催化抗体包含:包含以下的 V_H :包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HC-CDR1、包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HC-CDR2,和包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HC-CDR3,或其变体,其在HC-CDR中包含至多约5(例如1、2、3、4或5)个氨基酸取代。在一些实施例中,分离的抗A β 催化抗体包含:包含以下的 V_H :包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HC-CDR1、包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HC-CDR2,和包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HC-CDR3;和包含以下的 V_L :包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的LC-CDR1、包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的LC-CDR2,和包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的LC-CDR3。

[0021] 在一些实施例中,提供分离的抗A β 催化抗体,其包含:包含以下的 V_H :包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HC-CDR1、包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HC-CDR2,和包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HC-CDR3,或其变体,其在HC-CDR中包含至多约5(例如1、2、3、4或5)个氨基酸取代,其中在 V_L 的位置1处的氨基酸残基为D,在 V_L 的位置27A处的氨基酸残基为S,并且在 V_L 的位置93处氨基酸残基为H,并且其中编号是根据Kabat的EU索引。在一些实施例中,分离的抗A β 催化抗体包含:包含以下的 V_L :包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的LC-CDR1、包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的LC-CDR2,和包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的LC-CDR3,或其变体,其在LC-CDR中包含至多约5(例如1、2、3、4或5)个氨基酸取代。在一些实施例中,分离的抗A β 催化抗体包含:包含以下的 V_H :包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HC-CDR1、包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HC-CDR2,和包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HC-CDR3;和包含以下的 V_L :包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的LC-CDR1、包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的LC-CDR2,和包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的LC-CDR3。

[0022] 在一些实施例中,提供分离的抗A β 催化抗体,其包含:包含以下的 V_H :包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HC-CDR1、包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HC-CDR2,和包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HC-CDR3;和包含以下的 V_L :包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的LC-CDR1、包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的LC-CDR2,和包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的LC-CDR3,其中在 V_L 的位置1处的氨基酸残基为D,在 V_L 的位置27A处的氨基酸残基为S,并且在

V_L的位置93处的氨基酸残基为H,并且其中编号是根据Kabat的EU索引。

[0023] 在根据上文所描述的抗Aβ催化抗体中的任一种的一些实施例中,抗Aβ催化抗体切割具有式EAR-AMC (SEQ ID NO:1)的底物。

[0024] 在根据上文所描述的抗Aβ催化抗体中的任一种的一些实施例中,在V_L的位置26处的氨基酸残基为S,在V_L的位置27D处的氨基酸残基为D、E或H,和/或在V_L的位置28处的氨基酸残基为D或N,并且其中编号是根据Kabat的EU索引。

[0025] 在根据上文所描述的抗Aβ催化抗体中的任一种的一些实施例中,抗Aβ催化抗体包含:包含具有与SEQ ID NO:4、6、19或20的氨基酸序列至少约85%序列一致性(例如至少约90%、95%、97%、99%或100%中的任一种)的氨基酸序列的V_H。在一些实施例中,抗Aβ催化抗体包含:包含与SEQ ID NO:5、7、8、21或22的氨基酸序列具有至少约85%序列一致性(例如至少约90%、95%、97%、99%或100%中的任一种)的氨基酸序列的V_L。在一些实施例中,抗Aβ催化抗体包含:包含选自SEQ ID NO:4、6、19和20的氨基酸序列的氨基酸序列的V_H,和包含选自SEQ ID NO:5、7、8、21和22的氨基酸序列的氨基酸序列的V_L。在一些实施例中,抗Aβ催化抗体包含:(i)包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的V_H和包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的V_L; (ii)包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的V_H和包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的V_L; (iii)包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的V_H和包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的V_L; (iv)包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的V_H和包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的V_L; (v)包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的V_H和包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的V_L; (vi)包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的V_H和包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的V_L;或(vii)包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的V_H和包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的V_L。

[0026] 在根据上文所描述的抗Aβ催化抗体中的任一种的一些实施例中,抗Aβ催化抗体为全长IgG抗体。在一些实施例中,抗Aβ催化抗体包含IgG1或IgG4 Fc区。在一些实施例中,抗Aβ催化抗体为全长IgM抗体。

[0027] 在一些实施例中,提供一种治疗或预防个体的阿尔茨海默氏病的方法,其包含向个体施用有效量的根据上文所描述的抗Aβ催化抗体中的任一种的抗Aβ催化抗体。

[0028] 还提供制备和使用抗Aβ催化抗体的方法,以及适用于上文所描述的方法中的任一种的试剂盒和制品。

[0029] 在一些实施例中,提供用于治疗或预防个体的阿尔茨海默氏病的试剂盒,其包含:a)包含氨基酸序列(EAR)_n (SEQ ID NO:2)的底物肽,并且其中n为介于1与30之间的整数(例如n为3);b)Aβ肽;和c)与总Ig(例如总人Ig)特异性结合的抗体。在一些实施例中,抗体与总IgM、总IgG、总IgA和/或总IgE特异性结合。在一些实施例中,试剂盒还包含固体支持物,如ELISA板。在一些实施例中,试剂盒还包含与Aβ特异性结合的治疗性催化抗体。

附图说明

[0030] 图1A示出如通过EAR-AMC结合测定确定的在年轻(20-29岁)和老年(60-69岁)成人的血清样本中的催化抗体水平。

[0031] 图1B示出如通过EAR3结合测定确定的在年轻(20-29岁)和老年(60-69岁)成人的血清样本中的催化抗体水平。

[0032] 图2示出健康(HS1-HS8)个体或患有阿尔茨海默氏病(ALZ-1~5)的患者的催化抗

体和A β 特异性自身抗体水平。

[0033] 图3示出两种催化抗体(抗UA15和抗VP)以及非催化抗A β 抗体3D6的V_L序列的比对。对应于SHD基序的氨基酸残基用星号(*)标志。可支持催化抗体的催化功能的氨基酸残基用井号(#)标志。

[0034] 图4示出在非还原和还原电泳条件下各种纯化的3D6衍生的催化抗体的SDS凝胶图像。3D6-D为基于3D6(即,3D6-Y)设计的催化抗体。hu3D6-D H1L1和hu3D6-D H1L2为3D6-D的人源化形式。hu3D6-Y具有与贝频珠单抗相同的序列(即,人源化3D6)。

[0035] 图5示出如使用EAR-AMC底物确定的3D6-D的催化功能。

[0036] 图6示出3D6-D与(EAR)₃(SEQ ID NO:3)和A β 的结合。

[0037] 图7示出人源化3D6催化抗体与A β 的结合。

[0038] 图8示出通过ELISA测定测量的在30位阿尔茨海默氏病(AD)患者的血清中的抗A β 自身抗体水平和SHD催化抗体(识别(EAR)₃)水平。PBS充当阴性对照。来自合并的健康人血清和8位健康供体的血清样本的平均读数充当对照。“对照%”被计算为(AD样本的读数)除以(合并的人血清和8位健康供体的血清的平均读数)。在表中的“+”指示在AD患者血清中的抗A β 自身抗体或SHD催化抗体的血清水平高于健康供体和合并的血清样本的血清水平。在表中的“-”指示在AD患者血清中的抗A β 自身抗体或SHD催化抗体的血清水平低于健康供体和合并的血清样本的血清水平。

[0039] 图9A描绘用于检测在30位阿尔茨海默氏病(AD)患者、8位健康供体和合并的健康供体血清样本的血清中抗A β 自身抗体水平和SHD催化抗体(识别(EAR)₃)水平的ELISA实验设计。PBS充当阴性对照。图9B描绘读取在5分钟时间点处A β ELISA结合测定的板。图9C描绘读取在1分钟时间点处(EAR)₃ELISA结合测定的板。

具体实施方式

[0040] 在一个方面,本申请提供用于使用新开发的用于确定生物样本中SHD催化抗体水平的免疫测定诊断和治疗蛋白聚集疾病(PAD)的方法。本申请部分地基于发现在血清中的SHD催化抗体水平与在老年个体和患有阿尔茨海默氏病(AD)的患者中针对淀粉样蛋白 β (A β)肽的自身抗体水平相关。当前,成像仍然是AD最可靠的诊断方法。然而,当疾病在成像分析中示出明显的病理性特征时,已经发生神经损坏。在此阶段,即使治疗性药剂可预防疾病的进一步发展,但是所述治疗性药剂也不大可能逆转神经损坏。本发明允许在早期阶段使用SHD催化抗体水平作为早期诊断生物标志物有效诊断和治疗PAD(如AD)。

[0041] 此外,使用抗体工程,已经基于非催化抗A β 抗体3D6,贝频珠单抗的亲本鼠抗体,设计特异性识别和切割A β 的催化抗体。贝频珠单抗示出在低剂量下为安全的,但是两项大型的III期临床试验示出贝频珠单抗在治疗晚期AD患者方面没有疗效。因为AD患者由于A β 1-40(A β 40)的积聚而具有血脑屏障(BBB),因此常规治疗性抗体(例如贝频珠单抗)可穿透BBB并加重神经炎症。与贝频珠单抗相比,本文所描述的抗A β 催化抗体由于其催化活性在低剂量下具有提高的疗效。在一些实施例中,可使用本文所描述的方法在早期阶段确定个体具有AD的风险,并且用本文所描述的抗A β 催化抗体治疗以预防AD。

[0042] 因此,本申请的一个方面提供用于确定个体的PAD的风险的方法,其中PAD与靶蛋白的聚集相关,所述方法包含确定在个体的生物样本(例如血清样本)中一种或多种SHD催

化抗体的水平,其中如果一种或多种SHD催化抗体的水平低于对照SHD催化抗体水平,那么确定个体具有PAD的风险。在一些实施例中,方法包含:a)在允许形成催化抗体-底物肽复合物的条件下使个体的血清样本与固定在固体支持物上的底物肽接触,和b)确定催化抗体-底物肽复合物的量,由此提供生物样本中一种或多种SHD催化抗体的水平,其中底物肽包含氨基酸序列(EAR)_n(SEQ ID NO:2),并且其中n和介于1与30之间的整数。在一些实施例中,方法还包含确定在个体的生物样本(例如血清样本)中针对靶蛋白的自身抗体的水平,并且其中如果:(i)一种或多种SHD催化抗体的水平低于对照SHD催化抗体水平;和(ii)针对靶蛋白的自身抗体的水平低于对照自身抗体水平,那么确定个体具有PAD的风险。

[0043] 本申请的一个方面提供治疗或预防个体的PAD(例如AD)的方法,其中PAD与靶蛋白(例如Aβ)的聚集相关,所述方法包含:a)确定在个体的生物样本(例如血清样本)中一种或多种SHD催化抗体的水平,其中如果一种或多种SHD催化抗体的水平低于对照SHD催化抗体水平,那么确定个体具有PAD的风险;和b)向个体施用有效量的与靶蛋白(例如Aβ)特异性结合的治疗性催化抗体。在一些实施例中,步骤a)包含:1)在允许形成催化抗体-底物肽复合物的条件下使个体的血清样本与固定在固体支持物上的底物肽接触,和2)确定催化抗体-底物肽复合物的量,由此提供在血清中一种或多种SHD催化抗体的水平,其中底物肽包含氨基酸序列(EAR)_n(SEQ ID NO:2),并且其中n为介于1与30之间的整数。在一些实施例中,步骤a)还包含确定在个体的生物样本(例如血清样本)本中针对靶蛋白的自身抗体的水平,并且其中如果:(i)一种或多种SHD催化抗体的水平低于对照SHD催化抗体水平;和(ii)针对靶蛋白的自身抗体的水平低于对照自身抗体水平,那么确定个体具有PAD的风险。

[0044] 本申请的另一个方面提供分离的抗Aβ催化抗体,其包含:包含以下的轻链可变区(V_L):包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的轻链互补决定区(LC-CDR1)、包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的LC-CDR2,和包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的LC-CDR3,或其变体,其在LC-CDR中包含至多约5个氨基酸取代,其中在V_L的位置1处的氨基酸残基为D,在V_L的位置27A处的氨基酸残基为S,并且在V_L的位置93处的氨基酸残基为H,并且其中编号是根据Kabat的EU索引。在一些实施例中,抗Aβ催化抗体包含:包含以下的重链可变区(V_H):包含氨基酸序列SEQ ID NO:9的重链互补决定区(HC-CDR1)、包含氨基酸序列SEQ ID NO:10的HC-CDR2,和包含氨基酸序列SEQ ID NO:11的HC-CDR3,或其变体,其在HC-CDR中包含至多约5个氨基酸取代。

[0045] 还提供用于诊断、治疗或预防PAD(例如AD)的组合物(如医药组合物)、试剂盒和制品。

[0046] I. 定义

[0047] 如本文所用,“治疗(treatment或treating)”是用于获得有益或期望的结果(包括临床结果)的方法。出于本发明的目的,有益或期望的临床结果包括但不限于以下中的一种或多种:缓解由疾病引起的一种或多种症状;降低疾病的程度;使疾病稳定(例如,预防或延迟疾病的恶化);预防或延迟疾病的扩散;预防或延迟疾病的复发;延迟或减慢疾病的进展;改善疾病状态;提供疾病缓解(部分缓解或完全缓解);减少治疗疾病所需的一种或多种其它药品的剂量;延迟疾病的进展;增加或提高生活质量;增加体重增长;和/或延长存活期。本发明的方法设想了治疗的这些方面中的任何一个或多个。

[0048] 术语“抗体”包括全长抗体及其抗原结合片段。全长抗体包含两条重链和两条轻

链。轻链和重链的可变区负责抗原结合。在两条链中的可变区大体上含有三个高度可变的环,被称作互补决定区(CDR)(包括LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3的轻链(LC)CDR,包括HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3的重链(HC)CDR)。本文公开的抗体和抗原结合片段的CDR边界可通过Kabat、Chothia或Al-Lazikani的约定来定义或识别(Al-Lazikani 1997;Chothia 1985;Chothia 1987;Chothia 1989;Kabat 1987;Kabat 1991)。重链或轻链的三个CDR插入被称为框架区(FR)的侧翼伸长段之间,所述构架区比CDR保守性更高,并形成支架来支持高变环。重链和轻链的恒定区不参与抗原结合,但是表现出各种效应子功能。基于抗体重链恒定区的氨基酸序列将抗体分类。抗体的五种主要类别或同种型为IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,分别以存在 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 重链为特征。若干主要的抗体类别分为亚类,例如IgG1(γ 1重链)、IgG2(γ 2重链)、IgG3(γ 3重链)、IgG4(γ 4重链)、IgA1(α 1重链)或IgA2(α 2重链)。

[0049] 如本文所用,术语“抗原结合片段”是指抗体片段,其包括例如双功能抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv片段、二硫键稳定的Fv片段(dsFv)、(dsFv)₂、双特异性dsFv(dsFv-dsFv')、二硫键稳定的双功能抗体(ds双功能抗体)、单链Fv(scFv)、scFv二聚体(二价双功能抗体)、由包含一个或多个CDR的抗体的一部分形成的多特异性抗体,或与抗原结合但是不包含完整抗体结构的任何其它抗体片段。抗原结合片段能够与亲本抗体或亲本抗体片段(例如,亲本scFv)结合的相同抗原结合。在一些实施例中,抗原结合片段可包含来自特定人抗体的一个或多个CDR,其移植到来自一种或多种不同人抗体的框架区。

[0050] 如本文所用的术语“表位”是指抗体所结合的抗原上特定的一组原子或氨基酸。如果两个抗体对某个抗原呈现竞争性结合,那么他们可结合所述抗原的相同的表位。

[0051] 如本文所用,术语“特异性结合”、“特异性识别”或“对具有特异性的”是指可测量和可重现的相互作用,如在靶标和抗体(例如催化抗体)之间的结合,其决定在存在异质分子群体(包括生物分子)的情况下靶标的存在。举例来说,特异性识别靶标(其可为表位)的抗体为以比其与其它靶标结合的更大亲和性、亲合力、更容易和/或以更长持续时间结合此靶标的抗体。在一些实施例中,特异性识别抗原的抗体以与其对其它靶标的结合亲和力至少约10倍的结合亲和力与抗原的一个或多个抗原决定簇反应。

[0052] 如本文所用,术语“催化抗体”是指具有催化活性的抗体。举例来说,催化抗体可以催化其特异性识别的靶抗原的水解。示例性催化抗体包括但不限于蛋白水解抗体。催化抗体(Catabodies)也称为催化抗体(catalytic antibodies)、抗体酶和分解酶。

[0053] 如本文所用,术语“SHD催化抗体”是指在轻链可变区(V_L)中具有SHD基序的蛋白水解催化抗体。“SHD基序”是指丝氨酸、组氨酸和天冬氨酸残基,它们一起充当催化三联体,以被催化抗体裂解肽键。在一些实施例中,SHD基序为非线性基序,其中催化三联体的丝氨酸、组氨酸和天冬氨酸残基在氨基酸序列中彼此不紧邻。

[0054] 如本文所用,“分离的”抗体是指(1)与自然界发现的蛋白不相关,(2)没有其它蛋白(3)由不同物种的细胞表达,或(4)在自然界中不存在的抗体。

[0055] 如本文所用,术语“分离的核酸”旨在意指基因组、cDNA或合成来源的核酸或其某种组合,由于其来源,“分离的核酸”(1)与所有在自然界中发现“分离的核酸”的多核苷酸的全部或一部分相关,(2)与在自然界中未连接的多核苷酸可操作地连接,或(3)在自然界中不作为较大序列的一部分存在。

[0056] 如本文所用,术语“CDR”或“互补决定区”旨在意指在重链和轻链多肽的可变区内

发现的不连续抗原组合位点。这些特定区已经由Kabat等人,《生物化学杂志(J.Biol.Chem.)》252:6609-6616(1977);Kabat等人,美国卫生与公共服务部,“免疫学关注的蛋白的序列”(1991);Chothia等人,《分子生物学杂志》196:901-917(1987);Al-Lazikani B.等人,《分子生物学杂志》,273:927-948(1997);MacCallum等人,《分子生物学杂志》262:732-745(1996);Abhinandan和Martin,《分子免疫学(Mol.Immunol)》,45:3832-3839(2008);Lefranc M.P.等人,《发展和比较免疫学(Dev.Comp.Immunol.)》27:55-77(2003);以及Honegger和Plückthun,《分子生物学杂志(J.Mol.Biol.)》,309:657-670(2001)描述,其中当彼此比较时,定义包括氨基酸残基的重叠或子集。然而,涉及抗体或移植抗体或其变体的CDR的任何一种定义的应用都旨在落入本文所定义和使用的术语的范围内。作为比较,下表1中阐述涵盖如以上引用的参考文献各自定义的CDR的氨基酸残基。CDR预测算法和界面是所属领域中已知的,包括例如Abhinandan和Martin《分子免疫学》,45:3832-3839(2008);Ehrenmann F.等人,《核酸研究(Nucleic Acids Res.)》,38:D301-D307(2010);以及Adolf-Bryfogle J.等人,《核酸研究》,43:D432-D438(2015)。在本段中引用的参考文献的内容其全文以引用的方式并入本文中,以用于本发明并可能包含在本文的一个或多个权利要求中。

[0057] 表1:CDR定义

	Kabat ¹	Chothia ²	MacCallum ³	IMGT ⁴	AHo ⁵
V _H CDR1	31-35	26-32	30-35	27-38	25-40
V _H CDR2	50-65	53-55	47-58	56-65	58-77
[0058] V _H CDR3	95-102	96-101	93-101	105-117	109-137
V _L CDR1	24-34	26-32	30-36	27-38	25-40
V _L CDR2	50-56	50-52	46-55	56-65	58-77
V _L CDR3	89-97	91-96	89-96	105-117	109-137

[0059] ¹残基编号遵循前述Kabat等人的命名法

[0060] ²残基编号遵循前述Chothia等人的命名法

[0061] ³残基编号遵循前述MacCallum等人的命名法

[0062] ⁴残基编号遵循前述Lefranc等人的命名法

[0063] ⁵残基编号遵循前述Honegger和Plückthun等人的命名法

[0064] 术语“嵌合抗体”是指其中重链和/或轻链的一部分与衍生自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源的抗体,而其余所述链与衍生自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体以及这类抗体的片段中的相应序列相同或同源,只要它们呈现本发明的生物学活性即可(参见美国专利第4,816,567号;和Morrison等人,《美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)》,81:6851-6855(1984))。

[0065] “Fv”为含有完整的抗原识别和结合位点的最小抗体片段。这一片段由一个重链和一个轻链可变区结构域紧密非共价缔合的二聚体组成。从这两个结构域的折叠发出六个高变环(3个环各自来自重链和轻链),它们贡献了用于抗原结合的氨基酸残基并赋予抗原与抗体的结合特异性。然而,即使单个可变域(或包含仅三个对抗原具有特异性的CDR的Fv的一半)也具有识别并结合抗原的能力,但是亲和力低于完整结合位点。

[0066] “单链Fv”,也缩写为“sFv”或“scFv”,是包含V_H和V_L抗体结构域连接成单一多肽链的抗体片段。在一些实施例中,scFv多肽还包含V_H和V_L结构域之间的多肽接头,使得scFv能够形成抗原结合的所需结构。关于scFv的综述,参见Plückthun,《单克隆抗体的药理学(The

Pharmacology of Monoclonal Antibodies)》,第113卷,Rosenburg和Moore编,施普林格出版社(Springer-Verlag),纽约(New York),第269-315页(1994)。

[0067] 术语“双功能抗体”是指通过构建scFv片段(参见前段)而制备的小抗体片段,所述scFv片段通常在 V_H 和 V_L 结构域之间具有短接头(例如约5到约10个残基),使得链间但非链内实现V结构域的配对,产生了二价片段,即具有两个抗原结合位点的片段。双特异性双功能抗体是两个“交叉”scFv片段的异二聚体,其中两个抗体的 V_H 结构域和 V_L 结构域存在于不同多肽链上。双功能抗体更完整地描述于例如EP 404,097;WO 93/11161;以及Hollinger等人,《美国国家科学院院刊》,90:6444-6448(1993)中。

[0068] 非人类(例如啮齿动物)抗体(例如催化抗体)的“人源化”形式是含有来源于非人类抗体的极小序列的嵌合抗体。在大多数情况下,人源化抗体是来自接受体高变区(HVR)的残基被来自具有期望抗体特异性、亲和力和能力的非人类物种(供体抗体),如小鼠、大鼠、兔或非人类灵长类动物的高变区的残基置换的人类免疫球蛋白(接受体抗体)。在一些情况下,人类免疫球蛋白的构架区(FR)残基被相应非人类残基置换。此外,人源化抗体可包含在受体抗体或供体抗体中未发现的残基。进行这些修饰以进一步改善抗体性能。一般来说,人源化抗体将包含至少一个并且典型地两个可变结构域中的基本上全部,其中全部或基本上全部的高变环都对应于非人类免疫球蛋白的高变环并且全部或基本上全部的FR都是具有人类免疫球蛋白序列的FR。人源化抗体任选还包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,典型地是人类免疫球蛋白的至少一部分。有关进一步详情,参见Jones等人,《自然》321:522-525(1986);Reichmann等人,《自然》332:323-329(1988);以及Presta,《结构生物学新见(Curr.Op.Struct.Biol.)》2:593-596(1992)。

[0069] 关于本文中识别的多肽和抗体(例如,催化抗体)序列的“氨基酸序列同一性百分比(%)”或“同源性”定义为在将任何保守取代认为序列同一性的一部分进行序列比对之后,在候选序列中与被比较的多肽中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。为确定氨基酸序列一致性百分比而进行的比对可以所属领域的技术内的各种方式实现,例如使用公开可供使用的计算机软件,如BLAST、BLAST-2、ALIGN、Megalign(DNASTAR)或MUSCLE软件。所属领域的普通技术人员可确定用于测量比对的适当参数,包括在所比较的序列全长内实现最大比对所需的任何算法。然而,出于本文目的,使用序列比较计算机程序MUSCLE产生序列一致性值(Edgar,RC,《核酸研究(Nucleic Acids Research)》32(5):1792-1797,2004;Edgar,R.C.,《BMC生物信息学(BMC Bioinformatics)》5(1):113,2004)。

[0070] 术语“Fc受体”或“FcR”用于描述与抗体Fc区结合的受体。在一个实施例中,本发明的FcR是结合IgG抗体的FcR(γ 受体),并且包括Fc γ RI、Fc γ RII、Fc γ RIII及Fc γ RIV亚类的受体,包括这些受体的等位基因变体以及替代性剪接形式。Fc γ RII受体包括Fc γ RIIA(“活化受体”)和Fc γ RIIB(“抑制受体”),两者具有主要在其胞质结构域方面不同的类似氨基酸序列。活化受体Fc γ RIIA在其胞质结构域中含有基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM)。抑制受体Fc γ RIIB在其胞质结构域中含有基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITIM)(参见M. Daëron,《免疫学年鉴(Annu.Rev.Immunol.)》15:203-234(1997)中的评述)。所述术语包括同种异型,如Fc γ RIIIA同种异型:Fc γ RIIIA-Phe158、Fc γ RIIIA-Val158、Fc γ RIIA-R131和/或Fc γ RIIA H131。FcR评述于Ravetch和Kinet,《免疫学年鉴》,9:457-92(1991);Capel等人,《免疫方法(Immunomethods)》,4:25-34(1994);以及de Haas等人,《实

验室与临床医学杂志(J.Lab.Clin.Med.)》,126:330-41(1995)中。其它FcR,包括将来识别的FcR,都涵盖于在此的术语“FcR”中。所述术语还包括新生儿受体FcRn,其负责将母体的IgG转移到胎儿(Guyer等人,《免疫学杂志(J.Immunol.)》117:587(1976)和Kim等人《免疫学杂志》24:249(1994))。

[0071] 术语“FcRn”指新生儿Fc受体(FcRn)。FcRn在结构上类似于主要组织相容性复合物(MHC)并且由与 $\beta 2$ -微球蛋白非共价结合的 α 链组成。新生儿Fc受体FcRn的多种功能评述于Ghetie和Ward(2000),《免疫学年鉴》18,739-766中。FcRn在免疫球蛋白IgG从母亲被动递送到幼体以及血清IgG含量调控中起作用。FcRn可用作挽救受体,结合和运输在细胞内和穿过细胞的被吞饮的呈完整形式的IgG,并拯救其经历默认降解路径。

[0072] 人类IgGFc区的“CH1结构域”(又称为“H1”的“C1”结构域)通常从约氨基酸118延伸到约氨基酸215(EU编号系统)。

[0073] “铰链区”大体上被定义为从人类IgG1的Glu216到Pro230的伸长段(Burton,《分子免疫学》22:161-206(1985))。可通过放置第一个和最后一个半胱氨酸残基,在相同位置形成重链间S-S键,来将其它IgG同型的铰链区与IgG1序列进行比对。

[0074] 人类IgG Fc区的“CH2结构域”(又称“H2”的“C2”结构域)通常从约氨基酸231延伸到约氨基酸340。CH2结构域的独特之处在于,它不与另一结构域紧密配对。实际上,在完整天然IgG分子的两个CH2结构域之间插入了两个N-连接的分支链碳水化合物链。已经推测,碳水化合物可以提供结构域-结构域配对的替代物,并有助于稳定CH2结构域。Burton,《分子免疫学》22:161-206(1985)。

[0075] “CH3结构域”(又称为“C2”或“H3”结构域)包含C末端残基到Fc区中的CH2结构域(即,从抗体序列的约氨基酸残基341到C末端,典型地在IgG氨基酸残基446或447处)的伸长段。

[0076] “功能Fc片段”具有天然序列Fc区的“效应子功能”。示例性“效应子功能”包括C1q结合;补体依赖性细胞毒性(CDC);Fc受体结合;抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC);噬菌作用;细胞表面受体(例如B细胞受体;BCR)的下调等。这类效应子功能大体上需要Fc区与结合结构域(例如抗体可变结构域)组合,并且可使用在所属领域中是众所周知的各种测定来评估。

[0077] 包含FcR结合亲和力或ADCC活性“改变”的变体IgG Fc的抗体是FcR结合活性(例如Fc γ R或FcRn)和/或ADCC活性相较于亲本多肽或包含天然序列Fc区的多肽有所增强或减弱的抗体。与FcR“呈现增加的结合”的变体Fc结合至少一种FcR的亲和力高于(例如较低的表观Kd或IC₅₀值)亲本多肽或天然序列IgG Fc。根据一些实施例,与亲本多肽相比,结合的改进为约3倍,如约5、10、25、50、60、100、150、200或至多500倍中的任一种,或结合改进约25%到1000%。与FcR“呈现减少的结合”的多肽变体结合至少一种FcR的亲和力低于(例如较高的表观Kd或较高的IC₅₀值)亲本多肽。与亲本多肽相比,结合减少可为结合减少约40%或更多。

[0078] “抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”或“ADCC”是指细胞毒性的一种形式,其中分泌的Ig与某些细胞毒性细胞(例如自然杀伤(NK)细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞)上存在的Fc受体(FcR)结合,使得这些细胞毒性效应子细胞能够与带有抗原的靶细胞特异性结合并且随后利用细胞毒素杀灭靶细胞。抗体“武装”细胞毒性细胞并且是这类杀灭必需的。用于介

导ADCC的原代细胞,NK细胞,仅表达Fc γ RIII,而单核细胞表达Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII。Ravetch和Kinet,Annu的第464页表3总结了造血细胞上的FcR表达。Immunol 9:457-92 (1991)。为了评估所关注分子的ADCC活性,可执行体外ADCC测定,如美国专利第5,500,362号或第5,821,337号中描述的测定。用于这类测定的有效效应子细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和自然杀伤(NK)细胞。替代地或另外,所关注分子的ADCC活性可在体内,例如在如Clynes等人,《美国国家科学院院刊(美国)(PNAS(USA))》,95:652-656 (1998)中所公开的动物模型中评估。

[0079] 包含“呈现增加的ADCC”或在存在人类效应子细胞的情况下比具有野生型IgG Fc的多肽或亲本多肽更有效地介导ADCC的变体Fc区的多肽是当在所述测定中具有变体Fc区的多肽的量与具有野生型Fc区的多肽(或亲本多肽)的量基本上相同时,在体外或体内大体上更有效地介导ADCC的多肽。一般来说,将使用所属领域中已知的任何体外ADCC测定,如用于确定ADCC活性的测定或方法,例如在动物模型中,识别这类变体。在一些实施例中,变体比野生型Fc(或亲本多肽)更有效介导ADCC约5倍到约100倍,例如约25倍到约50倍。

[0080] “补体依赖性细胞毒性”或“CDC”是指在补体存在下靶细胞的裂解。补体系统的第一组分(C1q)与结合至同源抗原的抗体(属于适当子类)结合将起始经典补体路径的活化。为了评估补体活化,可执行CDC测定,例如如Gazzano-Santoro等人,《免疫学方法杂志(J.Immunol.Methods)》202:163 (1996)。Fc区氨基酸序列改变并且C1q结合能力增强或减弱的多肽变体描述于美国专利第6,194,551B1号和W099/51642中。那些专利公开的内容明确地以引用的方式并入本文中。还参见Idusogie等人,《免疫学杂志》164:4178-4184 (2000)。

[0081] 除非另外说明,否则“编码氨基酸序列的核苷酸序列”包括彼此互为简并形式并且编码相同氨基酸序列的所有核苷酸序列。编码蛋白或RNA的短语核苷酸序列还可包括内含子,其程度为编码蛋白的核苷酸序列在某些形式中可包含(一个或多个)内含子。

[0082] 术语“可操作地连接”是指在调节序列和导致后者表达的异源核酸序列之间的功能连接。举例来说,当第一核酸序列与第二核酸序列处于功能关系时,第一核酸序列与第二核酸序列可操作地连接。举例来说,如果启动子影响编码序列的转录或表达,那么启动子与编码序列可操作地连接。一般来说,可操作地连接的DNA序列是连续的,并且必要时在相同阅读框架中接合两个蛋白编码区。

[0083] “同源”是指在两个多肽之间或两个核酸分子之间的序列相似性或序列一致性。当两个比较的序列两者中的位置由相同碱或氨基酸单体子单元占据时,例如如果在两个DNA分子中的每个的位置由腺嘌呤占据,那么所述分子在所述位置处同源。在两个序列之间的同源性百分比随两个序列共用的匹配或同源位置数除以比较的位置数乘以100而变。举例来说,如果两个序列中10个位置中的6个是匹配或同源的,那么两个序列为60%同源。借助于实例,DNA序列ATTGCC和TATGGC的同源性为50%。一般来说,当两个序列比对以得到最大同源性时进行比较。

[0084] 如本文所公开的抗体或组合物的“有效量”是足以进行具体陈述的目的的量。“有效量”可凭经验以及由与所述目的有关的已知方法确定。

[0085] 如本文所用,“药学上可接受的”或“药学上可相容”意指不是生物学上或其它不期望的材料,例如材料可并入向患者给予的医药组合物中,不造成任何显著的不期望的生物效应,或不以有害方式与含有其的组合物的任何其它组分相互作用。药学上可接受的载剂

或赋形剂优选地符合毒理学和制造测试的所需标准和/或包括在由美国食品和药物管理局 (U.S. Food and Drug administration) 编写的《非活性成分指南 (Inactive Ingredient Guide)》中。

[0086] 应理解, 本文所描述的本发明的实施例包括“由…组成”和/或“主要由…组成”的实施例。

[0087] 本文中提及“约”一个值或参数包括 (且描述) 针对所述值或参数本身的变化。举例来说, 提及“约X”的描述包括对“X”的描述。

[0088] 如本文所用, 提及“不是”一个值或参数大体上意指和描述“不是”一个值或参数。

[0089] 除非上下文另外明确规定, 否则如本文和所附权利要求书中所用, 单数形式“一”、“或”和“所述 (the)”包括多个指示物。

[0090] II. 诊断和治疗的方法

[0091] 本申请提供用于确定在样本中一种或多种催化抗体 (例如SHD催化抗体) 的水平的方法, 和用于诊断 (包括确定风险)、治疗或预防个体的蛋白聚集疾病 (PAD) 的方法。在一些实施例中, 一种或多种催化抗体 (例如SHD催化抗体) 的水平为一种或多种催化抗体的蛋白水平。在一些实施例中, 一种或多种催化抗体的水平为一种或多种催化抗体的mRNA水平。在一些实施例中, 本文所描述的方法在免疫测定中使用底物肽来检测在样本中底物肽与一种或多种催化抗体 (例如SHD催化抗体) 的结合, 由此提供在样本中一种或多种催化抗体的水平。在一些实施例中, 一种或多种催化抗体的水平为总催化抗体, 如总SHD催化抗体的水平。在一些实施例中, 一种或多种催化抗体的水平为特异性地结合和切割与PAD相关的靶蛋白 (例如AB) 的一种或多种 (如1、2、3、4或更多种) 催化抗体的水平 (例如总SHD催化抗体水平)。

[0092] 在一些实施例中, 基于催化抗体与包含氨基酸序列 (EAR)_n (SEQ ID NO: 2) 的底物肽的结合确定总SHD催化抗体的水平, 其中n为介于1与30之间的整数。底物肽可包含任何合适数目的EAR重复序列, 包括例如约1-10、10-20、20-30、1-30、1-5、5-10、5-15或15-30中的任一种。在一些实施例中, 底物肽包含氨基酸序列SEQ ID NO: 2, 其中n为约1、2、3、4、5、6、7、8、9或10中的任一种。在一些实施例中, SEQ ID NO: 2的氨基酸序列在底物肽中的N末端、C末端或内部位置处。在一些实施例中, 除了SEQ ID NO: 2的氨基酸序列之外, 底物肽包含氨基酸残基, 例如在SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的N末端和/或C末端处。在一些实施例中, 除了SEQ ID NO: 2的氨基酸序列之外, 底物肽包含至少约1、2、3、5、10、15、20、25或30个氨基酸中的任一种。在一些实施例中, 底物肽的总长度为约3-100个氨基酸, 如约3-10、10-20、20-30、30-40、40-50、50-60、60-70、70-80、80-90、90-100、3-50、50-100、10-30、30-60、60-90、20-40、40-60、60-80或80-100个氨基酸中的任一种。在一些实施例中, 底物肽包含标记, 例如荧光标记、肽标签或生物素标记。在一些实施例中, 底物肽包含式EAR-AMC (SEQ ID NO: 1)。

[0093] 尽管EAR-AMC, 即, 具有与7-氨基-4-甲基香豆素 (AMC) 结合的氨基酸序列的肽, 为SHD催化抗体的已知蛋白水解底物, 但是包含SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的底物肽尚未用于测量结合活性和生物样本中催化抗体的水平。在EAR肽和SHD催化抗体之间的结合是否牢固、持久, 足以允许经由结合测定准确确定SHD催化抗体的水平也是不可预测的。本申请提供使用包含SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的底物肽的免疫测定, 其提供在生物样本 (例如血清样本) 中总SHD催化抗体的水平的精确读数。

[0094] 因此, 在一些实施例中, 提供用于确定生物样本中一种或多种SHD催化抗体的水平

的方法,其包含:a)在允许形成催化抗体-底物肽复合物的条件下使生物样本与固定在固体支持物上的底物肽接触,和b)确定催化抗体-底物肽复合物的量,由此提供生物样本中一种或多种SHD催化抗体的水平,其中底物肽包含氨基酸序列(EAR)_n(SEQ ID NO:2),并且其中n为介于1与30之间的整数。在一些实施例中,n为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在一些实施例中,底物肽具有式EAR-AMC(SEQ ID NO:1)。在一些实施例中,底物肽包含氨基酸序列EAREAREAR(SEQ ID NO:3)。在一些实施例中,固体支持物为ELISA板。

[0095] 在一些实施例中,提供用于确定生物样本中一种或多种SHD催化抗体的水平的方法,其包含:a)在允许形成催化抗体-底物肽复合物的条件下使生物样本与固定在固体支持物上的底物肽接触,和b)使用与总Ig(例如总人Ig,如总IgM、总IgG、总IgA和/或总IgE)特异性结合的抗体确定催化抗体-底物肽复合物的量,由此提供生物样本中一种或多种SHD催化抗体的水平,其中底物肽包含氨基酸序列(EAR)_n(SEQ ID NO:2),并且其中n为介于1与30之间的整数(例如n为3)。在一些实施例中,抗体用酶(例如HRP)或荧光标记(例如FITC)标记。在一些实施例中,固体支持物为ELISA板。

[0096] 在一些实施例中,提供用于确定生物样本中一种或多种SHD催化抗体的水平的方法,其包含:a)在允许形成催化抗体-底物肽复合物的条件下使生物样本与固定在固体支持物上的底物肽接触,和b)使用与总Ig(例如总人Ig,如总IgM、总IgG、总IgA和/或总IgE)特异性结合的抗体确定催化抗体-底物肽复合物的量,由此提供生物样本中一种或多种SHD催化抗体的水平,其中底物肽包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列。在一些实施例中,抗体用酶(例如HRP)或荧光标记(例如FITC)标记。在一些实施例中,固体支持物为ELISA板。

[0097] 在一些实施例中,提供用于确定生物样本中一种或多种SHD催化抗体的水平的方法,其包含:a)使底物肽与ELISA板接触,以用底物肽包被ELISA板的孔;b)在允许形成催化抗体-底物肽复合物的条件下使生物样本与ELISA板的包被的孔接触,和b)使用与用酶(例如HRP)或荧光标记(例如FITC)标记的总Ig(例如总人Ig,如总IgM、总IgG、总IgA和/或总IgE)特异性结合的抗体确定催化抗体-底物肽复合物的量,由此提供生物样本中一种或多种SHD催化抗体的水平,其中底物肽包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列。

[0098] 在一些实施例中,提供用于确定个体的蛋白聚集疾病(PAD)的风险的方法,其中PAD与靶蛋白的聚集相关,所述方法包含确定在个体的生物样本(例如血清样本)中一种或多种SHD催化抗体的水平,其中如果一种或多种SHD催化抗体的水平低于对照SHD催化抗体水平,那么确定个体具有PAD的风险。在一些实施例中,一种或多种SHD催化抗体的水平为与靶蛋白特异性结合的一种或多种SHD催化抗体的水平。在一些实施例中,一种或多种SHD催化抗体的水平为总SHD催化抗体的水平。在一些实施例中,通过在允许形成催化抗体-底物肽复合物的条件下使个体的血清样本与底物肽接触并且确定催化抗体-底物肽复合物的量来确定总SHD催化抗体的水平。在一些实施例中,底物肽固定在固体支持物上。在一些实施例中,使用本文所描述的确定的SHD催化抗体水平的方法中的任一种确定一种或多种SHD催化抗体的水平。在一些实施例中,(i) PAD为阿尔茨海默氏病,并且靶蛋白为A β ; (ii) PAD为帕金森氏病,并且靶蛋白为 α -突触核蛋白; (iii) PAD为阿尔茨海默氏病或痴呆,并且靶蛋白为Tau; (iv) PAD为ATTR淀粉样变性,并且靶蛋白为转甲状腺素蛋白; (v) PAD为AL淀粉样变性,并且靶蛋白为免疫球蛋白轻链; (vi) 垫为FTLD或ALS,并且靶蛋白为TDP43; (vii) PAD为亨廷顿氏病,并且靶蛋白为亨廷顿蛋白; (viii) PAD为II型糖尿病,并且靶蛋白为IAPP; 和(ix)

PAD为ALS,并且靶蛋白为SOD1。

[0099] 在一些实施例中,提供用于确定个体的阿尔茨海默氏病(AD)的风险方法,其包含:
a) 在允许形成催化抗体-底物肽复合物的条件下使来自个体的血清样本与固定在固体支持物上的底物肽接触,和b) 确定与AB特异性结合的一种或多种SHD催化抗体的量,并且其中如果一种或多种SHD催化抗体的水平低于对照SHD催化抗体水平,那么确定个体具有AD的风险。

[0100] 在一些实施例中,提供用于确定个体的PAD的风险的方法,其中PAD与靶蛋白的聚集相关,所述方法包含a) 确定在个体的生物样本(例如血清样本)中一种或多种SHD催化抗体的水平,和b) 确定在个体的生物样本(例如血清样本)中针对靶蛋白的自身抗体的水平,并且其中如果:(i) 一种或多种SHD催化抗体的水平低于对照SHD催化抗体水平;和(ii) 针对靶蛋白的自身抗体的水平低于对照自身抗体水平,那么确定个体具有PAD的风险。在一些实施例中,一种或多种SHD催化抗体的水平为与靶蛋白特异性结合的一种或多种SHD催化抗体的水平。在一些实施例中,一种或多种SHD催化抗体的水平为总SHD催化抗体的水平。在一些实施例中,通过在允许形成催化抗体-底物肽复合物的条件下使个体的血清样本与底物肽接触并且确定催化抗体-底物肽复合物的量来确定总SHD催化抗体的水平。在一些实施例中,底物肽固定在固体支持物上。在一些实施例中,使用本文所描述的确定SHD催化抗体水平的方法中的任一种确定一种或多种SHD催化抗体的水平。在一些实施例中,通过在允许形成自身抗体-靶蛋白复合物的条件下使个体的血清样本与靶蛋白(或其片段)接触并且确定自身抗体-靶蛋白复合物的量来确定自身抗体的水平。在一些实施例中,使用ELISA测定来确定自身抗体的水平。在一些实施例中,(i) PAD为阿尔茨海默氏病,并且靶蛋白为AB;(ii) PAD为帕金森氏病,并且靶蛋白为 α -突触核蛋白;(iii) PAD为阿尔茨海默氏病或痴呆,并且靶蛋白为Tau;(iv) PAD为ATTR淀粉样变性,并且靶蛋白为转甲状腺素蛋白;(v) PAD为AL淀粉样变性,并且靶蛋白为免疫球蛋白轻链;(vi) 垫为FTLD或ALS,并且靶蛋白为TDP43;(vii) PAD为亨廷顿氏病,并且靶蛋白为亨廷顿蛋白;(viii) PAD为II型糖尿病,并且靶蛋白为IAPP;和(ix) PAD为ALS,并且靶蛋白为SOD1。

[0101] 在一些实施例中,提供用于确定个体的PAD的风险的方法,其中PAD与靶蛋白的聚集相关,所述方法包含a) 确定在个体的生物样本(例如血清样本)中一种或多种SHD催化抗体的水平,和b) 确定在个体的生物样本(例如血清样本或脑脊髓液样本)中靶蛋白的水平,并且其中如果:(i) 一种或多种SHD催化抗体的水平低于对照SHD催化抗体水平;和(ii) 靶蛋白的水平高于对照靶蛋白水平,那么确定个体具有PAD的风险。在一些实施例中,一种或多种SHD催化抗体的水平为与靶蛋白特异性结合的一种或多种SHD催化抗体的水平。在一些实施例中,一种或多种SHD催化抗体的水平为总SHD催化抗体的水平。在一些实施例中,通过在允许形成催化抗体-底物肽复合物的条件下使个体的血清样本与底物肽接触并且确定催化抗体-底物肽复合物的量来确定总SHD催化抗体的水平。在一些实施例中,底物肽固定在固体支持物上。在一些实施例中,使用本文所描述的确定SHD催化抗体水平的方法中的任一种确定一种或多种SHD催化抗体的水平。在一些实施例中,通过在允许形成抗体-靶蛋白复合物的条件下使个体的生物样本与针对靶蛋白的抗体接触并且确定抗体-靶蛋白复合物的量来确定靶蛋白的水平。在一些实施例中,使用ELISA测定来确定靶蛋白的水平。在一些实施例中,(i) PAD为阿尔茨海默氏病,并且靶蛋白为AB;(ii) PAD为帕金森氏病,并且靶蛋白为 α -

突触核蛋白；(iii) PAD为阿尔茨海默氏病或痴呆，并且靶蛋白为Tau；(iv) PAD为ATTR淀粉样变性，并且靶蛋白为转甲状腺素蛋白；(v) PAD为AL淀粉样变性，并且靶蛋白为免疫球蛋白轻链；(vi) 垫为FTLD或ALS，并且靶蛋白为TDP43；(vii) PAD为亨廷顿氏病，并且靶蛋白为亨廷顿蛋白；(viii) PAD为II型糖尿病，并且靶蛋白为IAPP；和(ix) PAD为ALS，并且靶蛋白为SOD1。

[0102] 在一些实施例中，提供用于确定个体的PAD的风险的方法，其中PAD与靶蛋白的聚集相关，所述方法包含：a) 在允许形成催化抗体-底物肽复合物的条件下使个体的血清样本与固定在固体支持物上的底物肽接触，其中底物肽包含氨基酸序列(EAR)_n (SEQ ID NO:2)，其中n为介于1与30之间整数(例如n为3)；b) 确定催化抗体-底物肽复合物的量，由此提供在个体的血清中一种或多种SHD催化抗体的水平；和c) 确定在个体的生物样本(例如血清样本)中针对靶蛋白的自身抗体的水平，并且其中如果：(i) 一种或多种SHD催化抗体的水平低于对照SHD催化抗体水平；和(ii) 针对靶蛋白的自身抗体的水平低于对照自身抗体水平，那么确定个体具有PAD的风险。在一些实施例中，固体支持物为ELISA板。在一些实施例中，通过在允许形成自身抗体-靶蛋白复合物的条件下使个体的血清样本与靶蛋白(或其片段)接触并且确定自身抗体-靶蛋白复合物的量来确定自身抗体的水平。在一些实施例中，使用ELISA测定来确定自身抗体的水平。在一些实施例中，(i) PAD为阿尔茨海默氏病，并且靶蛋白为Aβ；(ii) PAD为帕金森氏病，并且靶蛋白为α-突触核蛋白；(iii) PAD为阿尔茨海默氏病或痴呆，并且靶蛋白为Tau；(iv) PAD为ATTR淀粉样变性，并且靶蛋白为转甲状腺素蛋白；(v) PAD为AL淀粉样变性，并且靶蛋白为免疫球蛋白轻链；(vi) 垫为FTLD或ALS，并且靶蛋白为TDP43；(vii) PAD为亨廷顿氏病，并且靶蛋白为亨廷顿蛋白；(viii) PAD为II型糖尿病，并且靶蛋白为IAPP；和(ix) PAD为ALS，并且靶蛋白为SOD1。

[0103] 在一些实施例中，提供用于确定个体的PAD的风险的方法，其中PAD与靶蛋白的聚集相关，所述方法包含：a) 在允许形成催化抗体-底物肽复合物的条件下使个体的血清样本与固定在固体支持物上的底物肽接触，其中底物肽包含氨基酸序列(EAR)_n (SEQ ID NO:2)，其中n为介于1与30之间的整数(例如n为3)；b) 确定催化抗体-底物肽复合物的量，由此提供在个体的血清中一种或多种SHD催化抗体的水平；和c) 确定在个体的生物样本(例如血清样本或脑脊髓液样本)中靶蛋白的水平，并且其中如果：(i) 一种或多种SHD催化抗体的水平低于对照SHD催化抗体水平；和(ii) 靶蛋白的水平高于对照靶蛋白水平，那么确定个体具有PAD的风险。在一些实施例中，固体支持物为ELISA板。在一些实施例中，通过在允许形成抗体-靶蛋白复合物的条件下使个体的生物样本与针对靶蛋白的抗体接触并且确定抗体-靶蛋白复合物的量来确定靶蛋白的水平。在一些实施例中，使用ELISA测定来确定靶蛋白的水平。在一些实施例中，(i) PAD为阿尔茨海默氏病，并且靶蛋白为Aβ；(ii) PAD为帕金森氏病，并且靶蛋白为α-突触核蛋白；(iii) PAD为阿尔茨海默氏病或痴呆，并且靶蛋白为Tau；(iv) PAD为ATTR淀粉样变性，并且靶蛋白为转甲状腺素蛋白；(v) PAD为AL淀粉样变性，并且靶蛋白为免疫球蛋白轻链；(vi) 垫为FTLD或ALS，并且靶蛋白为TDP43；(vii) PAD为亨廷顿氏病，并且靶蛋白为亨廷顿蛋白；(viii) PAD为II型糖尿病，并且靶蛋白为IAPP；和(ix) PAD为ALS，并且靶蛋白为SOD1。

[0104] 在一些实施例中，提供用于确定个体的PAD的风险的方法，其中PAD与靶蛋白的聚集相关，所述方法包含：a) 在允许形成催化抗体-底物肽复合物的条件下使来自个体的血清

样本与固定在固体支持物上的底物肽接触,其中底物肽包含氨基酸序列(EAR)_n(SEQ ID NO:2),其中n为介于1与30之间的整数(例如n为3);b)使用与总Ig(例如总人Ig,如总IgM、总IgG、总IgA和/或总IgE)特异性结合的抗体确定催化抗体-底物肽复合物的量,由此提供在个体的血清中一种或多种SHD催化抗体的水平;和c)确定在个体的生物样本(例如血清样本)中针对靶蛋白的自身抗体的水平,并且其中如果:(i)一种或多种SHD催化抗体的水平低于对照SHD催化抗体水平;和(ii)针对靶蛋白的自身抗体的水平低于对照自身抗体水平,那么确定个体具有PAD的风险。在一些实施例中,与Ig特异性结合的抗体用酶(例如HRP)或荧光标记(例如FITC)标记。在一些实施例中,固体支持物为ELISA板。在一些实施例中,通过在允许形成自身抗体-靶蛋白复合物的条件下使个体的血清样本与靶蛋白(或其片段)接触并且确定自身抗体-靶蛋白复合物的量来确定自身抗体的水平。在一些实施例中,使用ELISA测定来确定自身抗体的水平。在一些实施例中,(i) PAD为阿尔茨海默氏病,并且靶蛋白为A β ; (ii) PAD为帕金森氏病,并且靶蛋白为 α -突触核蛋白; (iii) PAD为阿尔茨海默氏病或痴呆,并且靶蛋白为Tau; (iv) PAD为ATTR淀粉样变性,并且靶蛋白为转甲状腺素蛋白; (v) PAD为AL淀粉样变性,并且靶蛋白为免疫球蛋白轻链; (vi) 垫为FTLD或ALS,并且靶蛋白为TDP43; (vii) PAD为亨廷顿氏病,并且靶蛋白为亨廷顿蛋白; (viii) PAD为II型糖尿病,并且靶蛋白为IAPP;和(ix) PAD为ALS,并且靶蛋白为SOD1。

[0105] 在一些实施例中,提供用于确定个体的PAD的风险的方法,其中PAD与靶蛋白的聚集相关,所述方法包含:a)在允许形成催化抗体-底物肽复合物的条件下使来自个体的血清样本与固定在固体支持物上的底物肽接触,其中底物肽包含氨基酸序列(EAR)_n(SEQ ID NO:2),其中n为介于1与30之间的整数(例如n为3);b)使用与总Ig(例如总人Ig,如总IgM、总IgG、总IgA和/或总IgE)特异性结合的抗体确定催化抗体-底物肽复合物的量,由此提供在个体的血清中一种或多种SHD催化抗体的水平;和c)确定在个体的生物样本(例如血清样本或脑脊髓液样本)中靶蛋白的水平,并且其中如果:(i)一种或多种SHD催化抗体的水平低于对照SHD催化抗体水平;和(ii)靶蛋白的水平高于对照靶蛋白水平,那么确定个体具有PAD的风险。在一些实施例中,固体支持物为ELISA板。在一些实施例中,通过在允许形成抗体-靶蛋白复合物的条件下使个体的生物样本与针对靶蛋白的抗体接触并且确定抗体-靶蛋白复合物的量来确定靶蛋白的水平。在一些实施例中,使用ELISA测定来确定靶蛋白的水平。在一些实施例中,(i) PAD为阿尔茨海默氏病,并且靶蛋白为A β ; (ii) PAD为帕金森氏病,并且靶蛋白为 α -突触核蛋白; (iii) PAD为阿尔茨海默氏病或痴呆,并且靶蛋白为Tau; (iv) PAD为ATTR淀粉样变性,并且靶蛋白为转甲状腺素蛋白; (v) PAD为AL淀粉样变性,并且靶蛋白为免疫球蛋白轻链; (vi) 垫为FTLD或ALS,并且靶蛋白为TDP43; (vii) PAD为亨廷顿氏病,并且靶蛋白为亨廷顿蛋白; (viii) PAD为II型糖尿病,并且靶蛋白为IAPP;和(ix) PAD为ALS,并且靶蛋白为SOD1。

[0106] 在一些实施例中,提供用于确定个体的阿尔茨海默氏病(AD)的风险的方法,其包含:a)在允许形成催化抗体-底物肽复合物的条件下使来自个体的血清样本与固定在固体支持物上的底物肽接触,其中底物肽包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列;b)使用与总Ig(例如总人Ig,如总IgM、总IgG、总IgA和/或总IgE)特异性结合的抗体确定催化抗体-底物肽复合物的量,由此提供在个体的血清中一种或多种SHD催化抗体的水平;c)在允许形成自身抗体-A β 复合物的条件下使个体的血清样本与A β (例如A β (1-42))接触,和d)确定自身抗体-A β

复合物的量,由此提供针对A β 的自身抗体的水平;并且其中如果:(i)一种或多种SHD催化抗体的水平低于对照SHD催化抗体水平;和(ii)针对A β 的自身抗体的水平低于对照自身抗体水平,那么确定个体具有AD的风险。在一些实施例中,与Ig特异性结合的抗体用酶(例如HRP)或荧光标记(例如FITC)标记。在一些实施例中,固体支持物为ELISA板。在一些实施例中,使用ELISA测定来确定自身抗体的水平。

[0107] 在一些实施例中,提供用于确定个体的阿尔茨海默氏病(AD)的风险的方法,其包含:a)在允许形成催化抗体-底物肽复合物的条件下使来自个体的血清样本与固定在固体支持物上的底物肽接触,其中底物肽包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列;b)使用与总Ig(例如总人Ig,如总IgM、总IgG、总IgA和/或总IgE)特异性结合的抗体确定催化抗体-底物肽复合物的量,由此提供在个体的血清中一种或多种SHD催化抗体的水平;c)在允许形成抗体-A β 复合物的条件下使个体的脑脊液样本与抗A β 抗体接触,和d)确定抗体-A β 复合物的量,由此提供A β 的水平,并且其中如果:(i)一种或多种SHD催化抗体的水平低于对照SHD催化抗体水平;和(ii)A β 的水平高于对照A β 水平,那么确定个体具有AD的风险。在一些实施例中,与Ig特异性结合的抗体用酶(例如HRP)或荧光标记(例如FITC)标记。在一些实施例中,固体支持物为ELISA板。在一些实施例中,使用ELISA测定来确定A β 的水平。

[0108] 本文所描述的诊断方法中的任一种可用于告知使用在所属领域中任何已知的用于治疗PAD的治疗性药剂或本文所描述的任何催化抗体(如抗A β 催化抗体)治疗PAD。本文所描述的诊断方法允许早期检测个体的PAD的风险,由此允许早期干预和防治性治疗PAD。

[0109] 因此,在一些实施例中,提供治疗或预防个体的PAD的方法,其中PAD与靶蛋白的聚集相关,所述方法包含:a)根据如本文所描述的确定风险的方法中的任一种确定个体具有PAD的风险;和b)向个体施用有效量的治疗PAD的治疗性药剂。

[0110] 在一些实施例中,提供治疗或预防个体的PAD的方法,其中PAD与靶蛋白的聚集相关,所述方法包含:a)根据如本文所描述的确定风险的方法中的任一种确定个体具有PAD的风险;和b)向个体施用有效量的与靶蛋白特异性结合的治疗性催化抗体。在一些实施例中,不超过约每三个月,例如约每三个月、约每六个月,或约每一年的频率重复所述方法。在一些实施例中,方法仅进行一次。

[0111] 在一些实施例中,提供治疗或预防个体的AD的方法,其包含:a)根据如本文所描述的确定风险的方法中的任一种确定个体具有AD的风险;和b)向个体施用有效量的抗A β 催化抗体,如在第III部分中描述的抗A β 催化抗体中的任一种。在一些实施例中,不超过约每三个月,例如约每三个月、约每六个月,或约每一年的频率重复所述方法。

[0112] 在一些实施例中,提供治疗或预防个体的PAD的方法,其中PAD与靶蛋白的聚集相关,所述方法包含:a)确定在个体的生物样本(例如血清样本)中一种或多种SHD催化抗体的水平,其中如果一种或多种SHD催化抗体的水平低于对照SHD催化抗体水平,那么确定个体具有PAD的风险;和b)向个体施用有效量的与靶蛋白特异性结合的治疗性催化抗体。在一些实施例中,一种或多种SHD催化抗体的水平为与靶蛋白特异性结合的一种或多种SHD催化抗体的水平。在一些实施例中,一种或多种SHD催化抗体的水平为总SHD催化抗体的水平。在一些实施例中,通过在允许形成催化抗体-底物肽复合物的条件下使个体的血清样本与底物肽接触并且确定催化抗体-底物肽复合物的量来确定总SHD催化抗体的水平。在一些实施例中,底物肽固定在固体支持物上。在一些实施例中,(i)PAD为阿尔茨海默氏病,并且靶蛋白

为A β ; (ii) PAD为帕金森氏病, 并且靶蛋白为 α -突触核蛋白; (iii) PAD为阿尔茨海默氏病或痴呆, 并且靶蛋白为Tau; (iv) PAD为ATTR淀粉样变性, 并且靶蛋白为转甲状腺素蛋白; (v) PAD为AL淀粉样变性, 并且靶蛋白为免疫球蛋白轻链; (vi) 垫为FTLD或ALS, 并且靶蛋白为TDP43; (vii) PAD为亨廷顿氏病, 并且靶蛋白为亨廷顿蛋白; (viii) PAD为II型糖尿病, 并且靶蛋白为IAPP; 和 (ix) PAD为ALS, 并且靶蛋白为SOD1。在一些实施例中, 不超过约每三个月, 例如约每三个月、约每六个月, 或约每一年的频率重复所述方法。

[0113] 在一些实施例中, 提供治疗或预防个体的AD的方法, 其包含: a) 在允许形成催化抗体-底物肽复合物的条件下使来自个体的血清样本与固定在固体支持物上的底物肽接触, 和b) 确定与A β 特异性结合的一种或多种SHD催化抗体的量, 和c) 如果一种或多种SHD催化抗体的水平低于对照SHD催化抗体水平, 那么向个体施用有效量的抗A β 催化抗体。在一些实施例中, 不超过约每三个月, 例如约每三个月、约每六个月, 或约每一年的频率重复所述方法。

[0114] 在一些实施例中, 提供用于治疗或预防个体的PAD的方法, 其中PAD与靶蛋白的聚集相关, 所述方法包含a) 确定在个体的生物样本(例如血清样本)中一种或多种SHD催化抗体的水平, b) 确定在个体的生物样本(例如血清样本)中针对靶蛋白的自身抗体的水平, 和c) 如果: (i) 一种或多种SHD催化抗体的水平低于对照SHD催化抗体水平; 和(ii) 针对靶蛋白的自身抗体的水平低于对照自身抗体水平, 那么向个体施用有效量的与靶蛋白特异性结合的治疗性催化抗体。在一些实施例中, 一种或多种SHD催化抗体的水平为与靶蛋白特异性结合的一种或多种SHD催化抗体的水平。在一些实施例中, 一种或多种SHD催化抗体的水平为总SHD催化抗体的水平。在一些实施例中, 通过在允许形成催化抗体-底物肽复合物的条件下使个体的血清样本与底物肽接触并且确定催化抗体-底物肽复合物的量来确定总催化抗体的水平。在一些实施例中, 底物肽固定在固体支持物上。在一些实施例中, 通过在允许形成自身抗体-靶蛋白复合物的条件下使个体的血清样本与靶蛋白接触并且确定自身抗体-靶蛋白复合物的量来确定自身抗体的水平。在一些实施例中, 使用ELISA测定来确定自身抗体的水平。在一些实施例中, (i) PAD为阿尔茨海默氏病, 并且靶蛋白为A β ; (ii) PAD为帕金森氏病, 并且靶蛋白为 α -突触核蛋白; (iii) PAD为阿尔茨海默氏病或痴呆, 并且靶蛋白为Tau; (iv) PAD为ATTR淀粉样变性, 并且靶蛋白为转甲状腺素蛋白; (v) PAD为AL淀粉样变性, 并且靶蛋白为免疫球蛋白轻链; (vi) 垫为FTLD或ALS, 并且靶蛋白为TDP43; (vii) PAD为亨廷顿氏病, 并且靶蛋白为亨廷顿蛋白; (viii) PAD为II型糖尿病, 并且靶蛋白为IAPP; 和 (ix) PAD为ALS, 并且靶蛋白为SOD1。在一些实施例中, 不超过约每三个月, 例如约每三个月、约每六个月, 或约每一年的频率重复所述方法。

[0115] 在一些实施例中, 提供用于治疗或预防个体的PAD的方法, 其中PAD与靶蛋白的聚集相关, 所述方法包含: a) 在允许形成催化抗体-底物肽复合物的条件下使个体的血清样本与固定在固体支持物上的底物肽接触, 其中底物肽包含氨基酸序列(EAR)_n (SEQ ID NO:2), 其中n为介于1与30之间整数(例如n为3); b) 确定催化抗体-底物肽复合物的量, 由此提供在个体的血清中一种或多种SHD催化抗体的水平; 和c) 确定在个体的生物样本(例如血清样本)中针对靶蛋白的自身抗体的水平, 和d) 如果: (i) 一种或多种SHD催化抗体的水平低于对照SHD催化抗体水平; 和(ii) 针对靶蛋白的自身抗体的水平低于对照自身抗体水平, 那么向个体施用有效量的与靶蛋白特异性结合的治疗性催化抗体。在一些实施例中, 使用与总Ig(例如总人Ig, 如总IgM、总IgG、总IgA和/或总IgE)特异性结合的抗体来确定催化抗体-底物

肽复合物的量。在一些实施例中,与Ig特异性结合的抗体用酶(例如HRP)或荧光标记(例如FITC)标记。在一些实施例中,固体支持物为ELISA板。在一些实施例中,通过在允许形成自身抗体-靶蛋白复合物的条件下使个体的血清样本与靶蛋白接触并且确定自身抗体-靶蛋白复合物的量来确定自身抗体的水平。在一些实施例中,使用ELISA测定来确定自身抗体的水平。在一些实施例中,(i) PAD为阿尔茨海默氏病,并且靶蛋白为A β ; (ii) PAD为帕金森氏病,并且靶蛋白为 α -突触核蛋白; (iii) PAD为阿尔茨海默氏病或痴呆,并且靶蛋白为Tau; (iv) PAD为ATTR淀粉样变性,并且靶蛋白为转甲状腺素蛋白; (v) PAD为AL淀粉样变性,并且靶蛋白为免疫球蛋白轻链; (vi) 垫为FTLD或ALS,并且靶蛋白为TDP43; (vii) PAD为亨廷顿氏病,并且靶蛋白为亨廷顿蛋白; (viii) PAD为II型糖尿病,并且靶蛋白为IAPP; 和 (ix) PAD为ALS,并且靶蛋白为SOD1。在一些实施例中,不超过约每三个月,例如约每三个月、约每六个月,或约每一年的频率重复所述方法。

[0116] 在一些实施例中,提供治疗或预防个体的阿尔茨海默氏病(AD)的方法,其包含:a) 在允许形成催化抗体-底物肽复合物的条件下使来自个体的血清样本与固定在固体支持物上的底物肽接触,其中底物肽包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列;b) 使用与总Ig(例如总人Ig,如总IgM、总IgG、总IgA和/或总IgE)特异性结合的抗体确定催化抗体-底物肽复合物的量,由此提供在个体的血清中一种或多种SHD催化抗体的水平;c) 在允许形成自身抗体-A β 复合物的条件下使个体的血清样本与A β (例如A β (1-42))接触,d) 使用与总Ig(例如总人Ig,如总IgM、总IgG、总IgA和/或总IgE)特异性结合的抗体确定自身抗体-A β 复合物的量,由此提供针对A β 的自身抗体的水平;和e) 如果:(i) 一种或多种SHD催化抗体的水平低于对照SHD催化抗体水平;和(ii) 针对A β 的自身抗体的水平低于对照自身抗体水平,那么向个体施用有效量的抗A β 催化抗体。在一些实施例中,与Ig特异性结合的抗体用酶(例如HRP)或荧光标记(例如FITC)标记。在一些实施例中,固体支持物为ELISA板。在一些实施例中,不超过约每三个月,例如约每三个月、约每六个月,或约每一年的频率重复所述方法。

[0117] 在一些实施例中,提供治疗或预防个体的阿尔茨海默氏病(AD)的方法,其包含:a) 确定在个体的生物样本(例如血清样本)中一种或多种SHD催化抗体的水平,b) 确定在个体的生物样本(例如血清样本)中针对A β 的自身抗体的水平,和c) 如果:(i) 一种或多种SHD催化抗体的水平低于对照SHD催化抗体水平;和(ii) 针对A β 的自身抗体的水平低于对照自身抗体水平,那么向个体施用有效量的抗A β 催化抗体,其中抗A β 催化抗体包含:包含以下的轻链可变区(V_L):包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的轻链互补决定区(LC-CDR)1、包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的LC-CDR2,和包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的LC-CDR3,或其变体,其在LC-CDR中包含至多约5个氨基酸取代,其中在V_L的位置1处的氨基酸残基为D,在V_L的位置27A处的氨基酸残基为S,并且在V_L的位置93处的氨基酸残基为H,并且其中编号是根据Kabat的EU索引。在一些实施例中,抗A β 催化抗体包含:包含以下的重链可变区(V_H):包含氨基酸序列SEQ ID NO:9的重链互补决定区(HC-CDR)1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:10的HC-CDR2,和包含氨基酸序列SEQ ID NO:11的HC-CDR3,或其变体,其在HC-CDR中包含至多约5个氨基酸取代。在一些实施例中,在V_L的位置26处的氨基酸残基为S,在V_L的位置27D处的氨基酸残基为D、E或H,和/或在V_L的位置28处的氨基酸残基为D或N,并且其中编号是根据Kabat的EU索引。在一些实施例中,抗A β 催化抗体包含:包含与SEQ ID NO:4、6、19或20的氨基酸序列具有至少约85%序列一致性的氨基酸序列的V_H;和/或包含与SEQ ID NO:5、7、8、21或22

的氨基酸序列具有至少约85%序列一致性的氨基酸序列的 V_L 。在一些实施例中,抗AB催化抗体包含:(i)包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的 V_L ;(ii)包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的 V_L ;(iii)包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的 V_L ;(iv)包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的 V_L ;(v)包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的 V_L ;(vi)包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的 V_L ;或(vii)包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的 V_L 。在一些实施例中,抗AB催化抗体为全长抗体,如IgG1或IgG4抗体。在一些实施例中,不超过约每三个月,例如约每三个月、约每六个月,或约每一年的频率重复所述方法。

[0118] 在一些实施例中,提供治疗或预防个体的AD的方法,其包含:a)在允许形成催化抗体-底物肽复合物的条件下使来自个体的血清样本与固定在固体支持物上的底物肽接触,其中底物肽包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列;b)使用与总Ig(例如总人Ig,如总IgM、总IgG、总IgA和/或总IgE)特异性结合的抗体确定催化抗体-底物肽复合物的量,由此提供在个体的血清中一种或多种SHD催化抗体的水平;c)在允许形成自身抗体-AB复合物的条件下使个体的血清样本与AB(例如AB(1-42))接触;d)使用与总Ig(例如总人Ig,如总IgM总IgG、总IgA和/或总IgE)特异性结合的抗体确定自身抗体-AB复合物的量,由此提供针对AB的自身抗体的水平;和e)如果:(i)一种或多种SHD催化抗体的水平低于对照SHD催化抗体水平;(ii)针对AB的自身抗体的水平低于对照自身抗体水平,那么向个体施用有效量的抗AB催化抗体,其中抗AB催化抗体包含:包含以下的 V_L :包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的轻链互补决定区(LC-CDR1)、包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的LC-CDR2,和包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的LC-CDR3,或其变体,其在LC-CDR中包含至多约5个氨基酸取代,其中在 V_L 的位置1处的氨基酸残基为D,在 V_L 的位置27A处的氨基酸残基为S,并且在 V_L 的位置93处的氨基酸残基为H,并且其中编号是根据Kabat的EU索引;和包含以下的 V_H :包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HC-CDR1、包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HC-CDR2,和包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HC-CDR3,或其变体,其在HC-CDR中包含至多约5个氨基酸取代。在一些实施例中,在 V_L 的位置26处的氨基酸残基为S,在 V_L 的位置27D处的氨基酸残基为D、E或H,和/或在 V_L 的位置28处的氨基酸残基为D或N,并且其中编号是根据Kabat的EU索引。在一些实施例中,抗AB催化抗体包含:包含与SEQ ID NO:4、6、19或20的氨基酸序列具有至少约85%序列一致性的氨基酸序列的 V_H ;和/或包含与SEQ ID NO:5、7、8、21或22的氨基酸序列具有至少约85%序列一致性的氨基酸序列的 V_L 。在一些实施例中,抗AB催化抗体包含:(i)包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的 V_L ;(ii)包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的 V_L ;(iii)包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的 V_L ;(iv)包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的 V_L ;(v)包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的 V_L ;(vi)包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的 V_L ;或(vii)包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的 V_L 。在一些实施例中,抗AB催化抗体为全长抗体,如IgG1或IgG4抗体。在一些实施例中,与Ig特异性结合的抗体用酶(例如HRP)或荧光标记(例如FITC)标记。在一些实施例中,固体

支持物为ELISA板。在一些实施例中,不超过约每三个月,例如约每三个月、约每六个月,或约每一年的频率重复所述方法。

[0119] 本文所描述的方法检测一种或多种SHD催化抗体、针对靶蛋白的自身抗体靶蛋白的水平,包括但不限于蛋白水平和mRNA水平。可使用免疫测定、质谱法或其它分子生物学技术检测蛋白水平。可使用定量PCR或其它分子生物学技术检测mRNA的水平。

[0120] 在一些实施例中,方法包含使用包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的底物肽检测一种或多种SHD催化抗体的水平。在一些实施例中,一种或多种SHD催化抗体的水平为总SHD催化抗体的水平。在一些实施例中,一种或多种SHD催化抗体的水平为与靶蛋白特异性结合的一种或多种SHD催化抗体的水平。在一些实施例中,通过以下来确定与靶蛋白特异性结合的一种或多种SHD催化抗体的水平:a)从生物样本提取(例如免疫下拉)与靶蛋白特异性结合的抗体,和b)使所提取抗体与底物肽接触。在一些实施例中,通过以下来确定与靶蛋白特异性结合的一种或多种SHD催化抗体的水平:a)在允许形成催化抗体-靶蛋白复合物的条件下使生物样本与固定在固体支持物上的靶蛋白(例如A β)接触;b)在允许形成催化抗体-靶蛋白-底物肽复合物的条件下使催化抗体-靶蛋白复合物与包含标记(例如AMC或生物素)的底物肽接触;c)使催化抗体-靶蛋白-底物肽与针对标记的抗体接触;和d)确定针对与催化抗体-靶蛋白-底物肽结合的标记的抗体的量,由此提供与靶蛋白特异性结合的一种或多种SHD催化抗体的水平。

[0121] 底物肽或靶蛋白(或其片段,例如A β)可通过化学合成获得。底物肽或靶蛋白(或其片段,例如A β)可经由固定部分,如生物素、链霉亲和素、抗生物素蛋白或肽标签固定到固体支持物。在一些实施例中,将固体支持物官能化以与底物肽结合。在一些实施例中,固体支持物为ELISA板。ELISA板可为由聚苯乙烯或聚氯乙烯制成的平底多孔(例如96孔)板。底物肽或靶蛋白(或其片段,例如A β)可经由被动吸附包被到ELISA板上。由于在底物肽或靶蛋白(或其片段,例如A β)上的氨基酸侧链和ELISA板的塑料表面之间的疏水相互作用,吸附被动发生。在一些实施例中,底物肽以约1-2 μ g/孔的密度包被在ELISA板的表面上。

[0122] 在ELISA板上的示例性包被条件涉及添加50-100 μ l的包被缓冲液,其含有浓度为1-10 μ g/ml的底物肽,并且在4 $^{\circ}$ C下保温过夜或在37 $^{\circ}$ C下维持1-3小时。可使用替代的温度、时间、缓冲液和包被剂浓度,并且应通过实验测试。示例性包被缓冲液包括在pH 9.6下的碳酸氢盐缓冲液和磷酸缓冲液盐水(PBS)。在一些实施例中,在底物肽或靶蛋白(或其片段,例如A β)固定之后,使用清洗缓冲液,如PBS或PBST(在PBS中的0.1%TWEEN-20)洗涤固体支持物(例如ELISA板)(例如三次)。在一些实施例中,固体支持物(例如ELISA板)用封闭缓冲液,如在PBS中的10%胎牛血清(FBS),或在PBS中的1%BSA封闭。在一些实施例中,在封闭之后,使用清洗缓冲液,如PBS或PBST洗涤固体支持物(例如ELISA板)(例如三次)。

[0123] 一种或多种催化抗体、针对靶蛋白的自身抗体和靶蛋白的水平使用样本(例如来自个体的样本或参考样本)确定。在一些实施例中,样本为生物样本。在一些实施例中,生物样本为生物流体样本或生物组织样本。在一些实施例中,生物流体样本为体液,如血液、血浆、血清、脑脊髓液(CSF)或脑间质液(ISF)。在一些实施例中,生物样本为活检样本。在一些实施例中,生物样本为组织或细胞样本。在一些实施例中,生物样本为B细胞样本。在一些实施例中,生物样本例如通过免疫沉淀富含某些分子,如免疫球蛋白或靶蛋白结合分子的样本。

[0124] 在一些实施例中,在治疗的过程期间获得多个样本,例如每月、每2个月、每三个月、每4个月、每5个月、每6个月或每年。在一些实施例中,用于确定一种或多种催化抗体的水平的样本和用于确定自身抗体或靶蛋白的水平水平的样本同时从个体获得,或为同一样本的等分试样。在一些实施例中,用于确定一种或多种催化抗体的水平的样本和用于确定自身抗体或靶蛋白的水平水平的样本在不同时间从个体获得,和/或来自不同来源。在一些实施例中,同一样本用于确定一种或多种SHD催化抗体的水平和针对靶蛋白(例如A β)的自身抗体的水平。在一些实施例中,血清样本用于确定一种或多种SHD催化抗体的水平,并且CSF样本用于确定A β 的水平。

[0125] 在一些实施例中,生物样本为血清样本。在一些实施例中,血清样本含有至少约1 μ g/mL,例如至少约2、5、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250或更多 μ g/mL Ig中的任一种。在一些实施例中,血清样本含有至少约100 μ g/mL Ig。在一些实施例中,血清样本不含大于约500、400、300、250、200或150 μ g/mL Ig中的任一种。

[0126] 在一些实施例中,生物样本与底物肽或靶蛋白(或其片段例如A β)一起保温约1小时到约16小时,包括例如约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16小时中的任一种。在一些实施例中,生物样本与底物肽或靶蛋白(或其片段,例如A β)一起保温至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16小时中的任一种。在一些实施例中,生物样本与底物肽或靶蛋白(或其片段,例如A β)一起保温不超过约16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1小时中的任一种。在一些实施例中,生物样本与底物肽或靶蛋白(或其片段,例如A β)一起保温约1小时到约3小时。在一些实施例中,生物样本与底物肽或靶蛋白(或其片段,例如A β)一起保温过夜。在一些实施例中,保温在室温下进行。在一些实施例中,保温在4 $^{\circ}$ C下进行。

[0127] 在一些实施例中,在生物样本与底物肽或靶蛋白(或其片段,例如A β)一起保温之后,用清洗缓冲液,如PBS或PBST洗涤固体支持物(例如ELISA板)(例如三次)。在一些实施例中,固体支持物(例如ELISA板)用封闭缓冲液,如在PBS中的10%胎牛血清(FBS),或在PBS中的1%BSA封闭。在一些实施例中,在封闭之后,使用清洗缓冲液,如PBS或PBST洗涤固体支持物(例如ELISA板)(例如三次)。

[0128] 可使用与物种特异性免疫球蛋白分子(如人Ig)特异性结合抗体检测催化抗体-底物肽复合物或自身抗体-靶蛋白复合物的量。在一些实施例中,抗体与总IgM、总IgG、总IgA和/或总IgE特异性结合。与人Ig特异性结合的示例性抗体包括但不限于山羊抗人Ig。可用酶(例如HRP)标记与Ig特异性结合的抗体,用于使用增强的化学发光(ECL)底物进行检测。替代地,与Ig特异性结合的抗体可用荧光标记(例如FITC)标记,用于直接检测。板读取器可用于使用合适的激发、发射和截止波长设置来检测ECL信号或荧光信号。

[0129] 用于确定针对A β 的一种或多种自身抗体的水平的其它方法为所属领域中已知的,并且这类方法可用于本文所描述的诊断、治疗或预防AD的方法中的任一种。参见例如Weksler ME等人“患有阿尔茨海默病的患者的血清抗淀粉样蛋白肽抗体的水平低于健康老年个体。(Patients with Alzheimer disease have lower levels of serum anti-amyloid peptide antibodies than healthy elderly individuals.)”《实验老年医学(Exp Gerontol.)》37:943-948(2002);Mruthinti S等人“阿尔茨海默病的自身免疫性:结合A β 和RAGE肽的循环IgG的水平增加。(Autoimmunity in Alzheimer's disease:

increased levels of circulating IgGs binding Abeta and RAGE peptides.)”《衰老神经生物学(Neurobiol.Aging)》,25:1023-1032(2004);Kellner A.等人“针对 β 淀粉样蛋白的自身抗体在阿尔茨海默氏病中是常见的,并有助于控制斑块负担(Autoantibodies against beta-amyloid are common in Alzheimer's disease and help control plaque burden)”,《神经病学年鉴(Ann.Neurol.)》65:24-31(2009);Britschgi M,Olin CE,Johns HT,Takeda-Uchimura Y等人“针对淀粉样蛋白生成的肽装配的神经保护性天然抗体随着正常衰老和阿尔茨海默氏病的发展而降低”《美国国家科学院院刊》,106:12145-12150(2009),其以引用的方式并入本文中。在一些实施例中,使用ELISA测定来确定针对靶蛋白(例如A β)的一种或多种自身抗体的水平。

[0130] 可使用ELISA测定或液相色谱法/串联质谱测定来确定在生物样本(例如血清样本或脑脊髓样本)中靶蛋白(例如A β)的水平。

[0131] 在一些实施例中,一种或多种SHD催化抗体的水平与对照SHD催化抗体水平比较。在一些实施例中,一种或多种SHD催化抗体的水平与在对照样本中一种或多种SHD催化抗体的水平比较。在一些实施例中,一种或多种SHD催化抗体的水平与在多个对照样本中一种或多种SHD催化抗体的水平比较。在一些实施例中,多个对照样本用于产生统计分布,所述统计分布用于对相同年龄或相同年龄组的个体中的一种或多种SHD催化抗体的水平进行分类或排序。

[0132] 在一些实施例中,针对靶蛋白(例如A β)的自身抗体的水平与对照自身抗体水平比较。在一些实施例中,针对靶蛋白(例如A β)的自身抗体的水平与在对照样本中针对靶蛋白(例如A β)的自身抗体的水平比较。在一些实施例中,针对靶蛋白(例如A β)的自身抗体的水平与在多个对照样本中针对靶蛋白(例如A β)的自身抗体的水平比较。在一些实施例中,多个对照样本用于产生统计分布,所述统计分布用于对针对在个体的某个群体(如健康个体、患有PAD(例如AD)的个体,或相同年龄或相同年龄组的个体)中靶蛋白(例如A β)的自身抗体的水平进行分类或排序。

[0133] 在一些实施例中,靶蛋白(例如A β)的水平与对照靶蛋白水平比较。在一些实施例中,靶蛋白(例如A β)的水平与在对照样本中靶蛋白(例如A β)的水平比较。在一些实施例中,靶蛋白(例如A β)的水平与在多个对照样本中靶蛋白(例如A β)的水平比较。在一些实施例中,多个对照样本用于产生统计分布,所述统计分布用于对在个体的某个群体(如健康个体、患有PAD(例如AD)的个体,或相同年龄或相同年龄组的个体)中靶蛋白(例如A β)的水平进行分类或排序。

[0134] 示例性年龄组包括但不限于18-30岁、30-40岁、40-50岁、50-60岁、60-70岁、70-80岁、80-90岁、18-40岁、40-90岁、18-60岁、60-90岁、60岁或更年长、70岁或更年长、75岁或更年长、80岁或更年长、85岁或更年长,或90岁或更年长。

[0135] 对照样本可使用与非对照样本相同的方法获得。在一些实施例中,对照样本从不同个体获得,如健康个体或不患有PAD的个体,和/或具有类似种族、年龄和性别的个体。在一些实施例中,多个对照样本(例如来自不同个体)用于确定一种或多种SHD催化抗体、针对靶蛋白(例如A β)的自身抗体,或靶蛋白(例如A β)的水平的范围。

[0136] 在一些实施例中,对照SHD催化抗体水平为在健康个体中一种或多种SHD催化抗体的水平。在一些实施例中,对照SHD催化抗体水平为在个体的群体中(例如相同年龄组的个

体,或约18岁到约50岁(例如约18岁到约40岁,或约18岁到约30岁)的个体)一种或多种SHD催化抗体的平均或中值水平。在一些实施例中,对照自身抗体水平为在健康个体中针对靶蛋白(例如A β)的自身抗体的水平。在一些实施例中,对照自身抗体水平为在个体群体(例如相同年龄组的个体)中针对靶蛋白的自身抗体的中值水平。在一些实施例中,对照靶蛋白水平为在健康个体中靶蛋白(例如A β)的水平。在一些实施例中,对照靶蛋白水平为在个体的群体(例如相同年龄组)中靶蛋白的中值水平。

[0137] 在一些实施例中,一种或多种SHD催化抗体、针对靶蛋白(例如A β)的自身抗体或靶蛋白(例如A β)的水平与对照或参考比较(例如个体的群体的中值或平均水平或健康个体的水平)。在一些实施例中,对照水平为预定阈值水平。举例来说,如果确定个体的一种或多种SHD催化抗体的水平不大于约在相同年龄或相同年龄组中个体的群体的中值水平的90%、80%、75%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%或更低中的任一种,那么确定个体具有低的一种或多种SHD催化抗体的水平。替代地,如果确定个体的一种或多种SHD催化抗体的水平大于约在相同年龄组的个体的群体的中值水平20%、50%、75%、2 $\times$ 、3 $\times$ 、5 $\times$ 、10 $\times$ 或更多中的任一种,那么确定个体具有高的一种或多种SHD催化抗体水平。

[0138] 如果确定个体的针对靶蛋白(例如A β)的一种或多种自身抗体的水平不大于约在相同年龄组中的个体的群体的中值水平的90%、80%、75%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%或更低中的任一种,那么确定个体具有低的针对靶蛋白(例如A β)的一种或多种自身抗体的水平。替代地,如果确定个体的针对靶蛋白(例如A β)的一种或多种自身抗体的水平大于约在相同年龄组中的个体的群体的中值水平20%、50%、75%、2 $\times$ 、3 $\times$ 、5 $\times$ 、10 $\times$ 或更多中的任一种,那么确定个体具有高的针对靶蛋白(例如A β)的一种或多种自身抗体的水平。

[0139] 如果确定个体的靶蛋白(例如A β)的水平不大于约在相同年龄组中的个体的群体的中值水平的90%、80%、75%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%或更低中的任一种,那么确定个体具有低的靶蛋白(例如A β)的水平。替代地,如果确定个体的靶蛋白(例如A β)的水平大于约在相同年龄组中的个体的群体的中值水平20%、50%、75%、2 $\times$ 、3 $\times$ 、5 $\times$ 、10 $\times$ 或更多中的任一种,那么确定个体具有高的靶蛋白(例如A β)的水平。

[0140] 在一些实施例中,如果:(i)一种或多种SHD催化抗体的水平低于对照SHD催化抗体水平;和(ii)针对靶蛋白(例如A β)的自身抗体的水平低于对照自身抗体水平,那么确定个体具有PAD(例如AD)的风险。在一些实施例中,具有PAD(例如AD)风险的个体的一种或多种SHD催化抗体的水平不大于约在相同年龄组中个体的群体的中值的90%、80%、75%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%或更低中的任一种。在一些实施例中,具有PAD(例如AD)风险的个体的针对靶蛋白(例如A β)的自身抗体的水平不大于约在相同年龄组中个体的群体的中值的90%、80%、75%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%或更低中的任一种。

[0141] 在一些实施例中,如果:(i)一种或多种SHD催化抗体的水平低于对照SHD催化抗体水平;和(ii)靶蛋白(例如A β)的水平高于对照靶蛋白水平,那么确定个体具有PAD(例如AD)的风险。在一些实施例中,具有PAD(例如AD)风险的个体的一种或多种SHD催化抗体的水平不大于约在相同年龄组中个体的群体的中值的90%、80%、75%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%或更低中的任一种。在一些实施例中,具有PAD(例如AD)风险的个体的靶蛋白(例如A β)的水平不大于约在相同年龄组中个体的群体的中值的20%、50%、75%、2 $\times$ 、3

×、5×、10×或更多或中的任一种。

[0142] 本文所描述的诊断和治疗的方法可应用于患有PAD或具有PAD风险的个体。在一些实施例中,个体为哺乳动物,并且包括但不限于人、牛、马、猫、犬、啮齿动物(小鼠、大鼠或仓鼠)或非人类灵长类动物。在一些实施例中,个体为人。在一些实施例中,个体为年轻人类个体,如不大于约60、50、40、30或25岁中的任一种的人类个体。在一些实施例中,个体为老年人类个体,如年龄大于约50、60、70或80岁中的任一种的人类个体。如本文所用,“处于风险中”的个体是处于罹患PAD(例如AD)风险中的个体。“处于风险中”的个体在本文所述的治疗方法之前可能或可能不具有可检测的疾病,并且可能或可能不具有所显示的可检测的疾病。“处于风险中”表示个体具有一种或多种所谓的风险因素,所述因素是与罹患本文所述的PAD(例如AD)相关的可测量参数。具有一种或多种这些风险因素的个体具有比不具有这些风险因素的个体更高的罹患PAD(例如AD)的机率。

[0143] 许多PADs为所属领域中已知的,并且可用本文所描述的方法诊断、治疗或预防。示例性PADs包括但不限于与Aβ的积聚相关的阿尔茨海默氏病;与α-突触核蛋白的积聚相关的帕金森氏病;与Tau的积聚相关的阿尔茨海默氏病或痴呆;与转甲状腺素蛋白的积聚相关的ATTR淀粉样变性;与免疫球蛋白轻链的积聚相关的AL淀粉样变性;与TDP43(43kDa的TAR DNA结合蛋白)的积聚相关的泛素阳性神经元和神经胶质包涵体(如FTLD或ALS);与亨廷顿蛋白的积聚相关的亨廷顿氏病;与IAPP的积聚相关的II型糖尿病;和与SOD1的积聚相关的ALS。

[0144] 如果确定个体患有PAD或具有PAD的风险,例如如果:(i)一种或多种SHD催化抗体的水平低于对照SHD催化抗体水平;和(ii)针对靶蛋白(例如Aβ)的自身抗体的水平低于对照自身抗体水平,或靶蛋白(例如Aβ)的水平高于对照靶蛋白水平,可向个体施用特异性结合和切割靶蛋白(例如Aβ)的治疗性催化抗体。可使用任何合适的剂量(包括剂量和给药时间表/频率)和施用途径向个体施用治疗性催化抗体。可根据个体的大小和条件并且根据标准治疗性实践确定剂量(或有效量的治疗性催化抗体)。施用途径根据已知和公认的方法,如通过在一段时间内以合适的方式单次或多次推注或输注,例如通过皮下、静脉内、腹膜内、肌内、动脉内、病灶内、关节内或口服途经注射或输注。动物实验为确定用于人类诊断应用的有效剂量提供可靠指导。种间有效剂量的缩放可遵循Mordenti,J.和Chappell,W.出的原则执行。“毒物动力学中种间缩放的使用(The Use of Interspecies Scaling in Toxicokinetics)”,《毒物动力学和新药开发》,Yacobi等人编,盖蒙出版社(Pergamon Press),纽约,1989年,第42-46页。

[0145] 在一些实施例中,有效量的治疗性催化抗体(例如抗Aβ催化抗体)为约1μg/m²到约100mg/m²,或约1μg/Kg到约100mg/kg。在一些实施例,用于施用治疗性催化抗体(例如抗Aβ催化抗体)的给药频率为每天到约每三个月一次。在一些实施例中,治疗性催化抗体的施用可在延长的时间段内延长,如约一个月到数年

[0146] 在一些实施例中,周期性评估一种或多种SHD催化抗体、针对靶蛋白(例如Aβ)的自身抗体和/或靶蛋白(例如Aβ)的水平,以调节治疗性催化抗体所述剂量和给药频率。在一些实施例中,约每个月、每2个月、每3个月、每4个月、每6个月或每年评估一种或多种SHD催化抗体、针对靶蛋白(例如Aβ)的自身抗体和/或靶蛋白(例如Aβ)的水平。在一些实施例中,如果:(i)一种或多种催化抗体的水平低于对照催化抗体水平;和(ii)针对靶蛋白(例如Aβ)的

自身抗体的水平低于对照自身抗体水平,或靶蛋白(例如A β)的水平高于对照靶蛋白水平,那么重复治疗性催化抗体(例如抗A β 催化抗体)的施用。

[0147] III. 抗A β 催化抗体

[0148] 本申请提供特异性结合和切割与PAD相关的靶蛋白的治疗性催化抗体。在第II部分中描述的治疗方法可使用在此部分中描述的治疗性催化抗体(例如抗A β 催化抗体)中的任一种。在一些实施例中,治疗性催化抗体切割具有式EAR-AMC (SEQ ID NO:1)的底物。在一些实施例中,治疗性催化抗体为在轻链可变区(V_L)中具有SHD基序的催化抗体。

[0149] 在一些实施例中,提供特异性结合和切割淀粉样蛋白 β (A β)肽的催化抗体。在一些实施例中,抗A β 催化抗体切割具有式EAR-AMC (SEQ ID NO:1)的底物。在一些实施例中,抗A β 催化抗体在轻链可变区(V_L)中包含SHD基序。

[0150] 在一些实施例中,提供来源于3D6的分离的抗A β 催化抗体。在一些实施例中,抗A β 催化抗体的V_L来源于3D6,其中在V_L的位置1处的氨基酸为Asp(D),并且其中编号是根据Kabat的EU索引。在一些实施例中,在V_L的位置26处的氨基酸残基为Ser(S),在V_L的位置27D处的氨基酸残基为D、Glu(E)或His(H),和/或在V_L的位置28处的氨基酸残基为D或Gln(N),并且其中编号是根据Kabat的EU索引。在一些实施例中,抗A β 催化抗体的重链可变区(V_H)来源于3D6。在一些实施例中,基于与A β 结合亲和力从具有人类种系V_H序列的噬菌体文库筛选抗A β 催化抗体的V_H。在一些实施例中,抗A β 催化抗体与3D6竞争性地与A β 特异性结合。

[0151] 在一些实施例中,提供分离的抗A β 催化抗体,其包含:包含3D6的一个、两个或三个LC-CDR的V_L,其中在V_L的位置1处的氨基酸残基为D,在V_L的位置27A处的氨基酸残基为S,并且在V_L的位置93处的氨基酸残基为H,并且其中编号是根据Kabat的EU索引。在一些实施例中,提供分离的抗A β 催化抗体,其包含:包含3D6的LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3的V_L,其中在V_L的位置1处的氨基酸残基为D,在V_L的位置27A处的氨基酸残基为S,并且在V_L的位置93处的氨基酸残基为H,并且其中编号是根据Kabat的EU索引。在一些实施例中,在V_L的位置26处的氨基酸残基为Ser(S),在V_L的位置27D处的氨基酸残基为D、E或H,和/或在V_L的位置28处的氨基酸残基为D或N,并且其中编号是根据Kabat的EU索引。在一些实施例中,抗A β 催化抗体包含:包含3D6的一个、两个或三个HC-CDR的V_H。在一些实施例中,抗A β 催化抗体包含3D6的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3。在一些实施例中,基于与A β 的结合亲和力从具有人类种系V_H序列的噬菌体文库筛选抗A β 催化抗体的V_H。

[0152] 在一些实施例中,提供分离的抗A β 催化抗体,其包含:包含以下的V_L:包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的LC-CDR1、包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的LC-CDR2,和包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的LC-CDR3,或其变体,其在LC-CDR中包含至多约5(例如1、2、3、4或5)个氨基酸取代,其中在V_L的位置1处的氨基酸残基为D,在V_L的位置27A处的氨基酸残基为S,并且在V_L的位置93处氨基酸残基为H,并且其中编号是根据Kabat的EU索引。在一些实施例中,在V_L的位置26处的氨基酸残基为Ser(S),在V_L的位置27D处的氨基酸残基为D、E或H,和/或在V_L的位置28处的氨基酸残基为D或N,并且其中编号是根据Kabat的EU索引。在一些实施例中,抗A β 催化抗体包含:包含以下的V_H:包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HC-CDR1、包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HC-CDR2,和包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HC-CDR3,或其变体,其在HC-CDR中包含至多约5(例如1、2、3、4或5)个氨基酸取代。在一些实施例中,基于与A β 的结合亲和力从具有人类种系V_H序列的噬菌体文库筛选抗A β 催化抗体的V_H。

[0153] 在一些实施例中,提供分离的抗AB催化抗体,其包含:包含以下的 V_L :包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的LC-CDR1、包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的LC-CDR2,和包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的LC-CDR3,其中在 V_L 的位置1处的氨基酸残基为D,在 V_L 的位置27A处的氨基酸残基为S,并且在 V_L 的位置93处的氨基酸残基为H,并且其中编号是根据Kabat的EU索引。在一些实施例中,在 V_L 的位置26处的氨基酸残基为Ser (S),在 V_L 的位置27D处的氨基酸残基为D、E或H,和/或在 V_L 的位置28处的氨基酸残基为D或N,并且其中编号是根据Kabat的EU索引。在一些实施例中,抗AB催化抗体包含:包含以下的 V_H :包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HC-CDR1、包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HC-CDR2,和包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HC-CDR3。在一些实施例中,基于与AB的结合亲和力从具有人类种系 V_H 序列的噬菌体文库筛选抗AB催化抗体的 V_H 。

[0154] 在一些实施例中,提供分离的抗AB催化抗体,其包含:包含以下的 V_L :包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的LC-CDR1、包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的LC-CDR2,和包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的LC-CDR3;其中在 V_L 的位置1处的氨基酸残基为D,在 V_L 的位置27A处的氨基酸残基为S,并且在 V_L 的位置93处的氨基酸残基为H,并且其中编号是根据Kabat的EU索引;和包含以下的 V_H :包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HC-CDR1、包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HC-CDR2,和包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HC-CDR3。在一些实施例中,在 V_L 的位置26处的氨基酸残基为Ser (S),在 V_L 的位置27D处的氨基酸残基为D、E或H,和/或在 V_L 的位置28处的氨基酸残基为D或N,并且其中编号是根据Kabat的EU索引。

[0155] 在一些实施例中,提供分离的抗AB催化抗体,其包含:包含以下的 V_L :包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的LC-CDR1、包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的LC-CDR2,和包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的LC-CDR3,其中在 V_L 的位置1处的氨基酸残基为D,在 V_L 的位置27A处的氨基酸残基为S,并且在 V_L 的位置93处的氨基酸残基为H,在 V_L 的位置26处的氨基酸残基为S,在 V_L 的位置27D处的氨基酸残基为D、E或H,和/或在 V_L 的位置28处的氨基酸残基为D或N,并且其中编号是根据Kabat的EU索引;和包含以下的 V_H :包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HC-CDR1、包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HC-CDR2,和包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HC-CDR3。

[0156] 在一些实施例中,提供分离的抗AB催化抗体,其包含:包含SEQ ID NO:12、13和14的氨基酸序列的 V_L ,其中在 V_L 的位置1处的氨基酸残基为D,在 V_L 的位置27A处的氨基酸残基为S,并且在 V_L 的位置93处的氨基酸残基为H,并且其中编号是根据Kabat的EU索引。在一些实施例中,抗AB催化抗体包含:包含SEQ ID NO:9、10和11的氨基酸序列。在一些实施例中,在 V_L 的位置26处的氨基酸残基为Ser (S),在 V_L 的位置27D处的氨基酸残基为D、E或H,和/或在 V_L 的位置28处的氨基酸残基为D或N,并且其中编号是根据Kabat的EU索引。在一些实施例中,基于与AB的结合亲和力从具有人类种系 V_H 序列的噬菌体文库筛选抗AB催化抗体的 V_H 。

[0157] 在一些实施例中,提供分离的抗AB催化抗体,其包含:包含与SEQ ID NO:5、7或8的氨基酸序列具有至少约85% (例如至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%中的任一种) 序列一致性的氨基酸序列的 V_L ,其中在 V_L 的位置1处的氨基酸残基为D,在 V_L 的位置27A处的氨基酸残基为S,并且在 V_L 的位置93处的氨基酸残基为H,并且其中编号是根据Kabat的EU索引。在一些实施例中,在 V_L 的位置26处的氨基酸残基为Ser (S),在 V_L 的位置27D处的氨基酸残基为D、E或H,和/或在 V_L 的位

置28处的氨基酸残基为D或N,并且其中编号是根据Kabat的EU索引。在一些实施例中,抗AB催化抗体包含:包含与SEQ ID NO:4或6的氨基酸序列具有至少约85% (例如至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%中的任一种)序列一致性的氨基酸序列的V_H。在一些实施例中,基于与AB的结合亲和力从具有人类种系V_H序列的噬菌体文库筛选抗AB催化抗体的V_H。

[0158] 在一些实施例中,提供分离的抗AB催化抗体,其包含:包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的V_H和包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的V_L。在一些实施例中,提供分离的抗AB催化抗体,其包含:包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的V_H和包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的V_L。在一些实施例中,提供分离的抗AB催化抗体,其包含:包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的V_H和包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的V_L。在一些实施例中,提供分离的抗AB催化抗体,其包含:包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的V_H和包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的V_L。在一些实施例中,提供分离的抗AB催化抗体,其包含:包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的V_H和包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的V_L。在一些实施例中,提供分离的抗AB催化抗体,其包含:包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的V_H和包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的V_L。在一些实施例中,提供分离的抗AB催化抗体,其包含:包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的V_H和包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的V_L。在一些实施例中,提供分离的抗AB催化抗体,其包含:包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的V_H和包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的V_L。在一些实施例中,提供分离的抗AB催化抗体,其包含:包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的V_H和包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的V_L。在一些实施例中,提供分离的抗AB催化抗体,其包含:包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的V_H和包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的V_L。在一些实施例中,提供分离的抗AB催化抗体,其包含:包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的V_H和包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的V_L。在一些实施例中,提供分离的抗AB催化抗体,其包含:包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的V_H和包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的V_L。在一些实施例中,提供分离的抗AB催化抗体,其包含:包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的V_H和包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的V_L。

[0159] 在一些实施例中,提供分离的抗AB催化抗体,其与本文所描述的抗AB催化抗体中的任一种竞争性地特异性结合和切割AB。

[0160] 在一些实施例中,抗AB催化抗体为抗原结合片段,如scFv或Fab。在一些实施例中,抗AB催化抗体包含抗体重链恒定区和抗体轻链恒定区。在一些实施例中,抗AB催化抗体为全长抗体,如全长IgG抗体。在一些实施例中,全长抗AB催化抗体为IgA、IgD、IgE、IgG或IgM抗体。在一些实施例中,全长抗AB催化抗体包含IgG恒定结构域,如的IgG1、IgG2、IgG3和IgG4 (包括其变体)中的任一种的恒定结构域。在一些实施例中,抗AB催化抗体包含IgG1重链恒定区。在一些实施例中,抗AB催化抗体包含IgG2重链恒定区。在一些实施例中,抗AB催化抗体包含IgG3重链恒定区。在一些实施例中,抗AB催化抗体包含IgG4重链恒定区。在一些实施例中,重链恒定区包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列或由其组成。在一些实施例中,重链恒定区包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列或由其组成。在一些实施例中,抗AB催化抗体包含κ轻链恒定区。在一些实施例中,轻链恒定区包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列或由其组成。在一些实施例中,抗AB催化抗体包含λ轻链恒定区。在一些实施例中,轻链恒定区包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列或由其组成。在一些实施例中,抗AB催化抗体包含κ轻链恒定区。

[0161] 在一些实施例中,抗AB催化抗体包含Fc区。在一些实施例中,抗AB催化抗体包含人

IgG的Fc区。在一些实施例中,抗AB催化抗体包含具有增强的抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 和/或补体依赖性细胞毒性 (CDC) 效应子功能的Fc区。在一些实施例中,抗AB催化抗体包含具有降低的ADCC和/或CDC效应子功能的Fc区。

[0162] 在一些实施例中,抗AB催化抗体为鼠、嵌合、人源化或人类的。

[0163] 在一些实施例中,提供包含IgG1恒定结构域的全长抗AB催化抗体,其中抗AB催化抗体包含:包含以下的 V_L :包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的LC-CDR1、包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的LC-CDR2,和包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的LC-CDR3,或其变体,其在LC-CDR中包含至多约5 (例如1、2、3、4或5) 个氨基酸取代,其中在 V_L 的位置1处的氨基酸残基为D,在 V_L 的位置27A处的氨基酸残基为S,并且在 V_L 的位置93处的氨基酸残基为H,并且其中编号是根据Kabat的EU索引。在一些实施例中,在 V_L 的位置26处的氨基酸残基为Ser (S),在 V_L 的位置27D处的氨基酸残基为D、E或H,和/或在 V_L 的位置28处的氨基酸残基为D或N,并且其中编号是根据Kabat的EU索引。在一些实施例中,抗AB催化抗体包含:包含以下的 V_H :包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HC-CDR1、包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HC-CDR2,和包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HC-CDR3,或其变体,其在HC-CDR中包含至多约5 (例如1、2、3、4或5) 个氨基酸取代。在一些实施例中,基于与AB的结合亲和力从具有人类种系 V_H 序列的噬菌体文库筛选抗AB催化抗体的 V_H 。在一些实施例中,抗AB催化抗体包含:包含与SEQ ID NO:5、7、8、21或22的氨基酸序列具有至少约85%序列一致性的氨基酸序列的 V_L 。在一些实施例中,抗AB催化抗体包含:包含与SEQ ID NO:4、6、19或20的氨基酸序列具有至少约85%序列一致性的氨基酸序列的 V_H 。在一些实施例中,抗AB催化抗体包含:(i) 包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的 V_L ; (ii) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的 V_L ; (iii) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的 V_L ; (iv) 包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的 V_L ; (v) 包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的 V_L ; (vi) 包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的 V_L ;或(vii) 包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的 V_L 。

[0164] 在一些实施例中,提供包含IgG4恒定结构域的全长抗AB催化抗体,其中抗AB催化抗体包含:包含以下的 V_L :包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的LC-CDR1、包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的LC-CDR2,和包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的LC-CDR3,或其变体,其在LC-CDR中包含至多约5 (例如1、2、3、4或5) 个氨基酸取代,其中在 V_L 的位置1处的氨基酸残基为D,在 V_L 的位置27A处的氨基酸残基为S,并且在 V_L 的位置93处的氨基酸残基为H,并且其中编号是根据Kabat的EU索引。在一些实施例中,在 V_L 的位置26处的氨基酸残基为Ser (S),在 V_L 的位置27D处的氨基酸残基为D、E或H,和/或在 V_L 的位置28处的氨基酸残基为D或N,并且其中编号是根据Kabat的EU索引。在一些实施例中,抗AB催化抗体包含:包含以下的 V_H :包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HC-CDR1、包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HC-CDR2,和包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HC-CDR3,或其变体,其在HC-CDR中包含至多约5 (例如1、2、3、4或5) 个氨基酸取代。在一些实施例中,基于与AB的结合亲和力从具有人类种系 V_H 序列的噬菌体文库筛选抗AB催化抗体的 V_H 。在一些实施例中,抗AB催化抗体包含:包含与SEQ ID NO:5、7、8、21或22的氨基酸序列具有至少约85%序列一致性的氨基酸序列的 V_L 。在一些实施例

中,抗A β 催化抗体包含:包含与SEQ ID NO:4、6、19或20的氨基酸序列具有至少约85%序列一致性的氨基酸序列的V_H。在一些实施例中,抗A β 催化抗体包含:(i)包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的V_H和包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的V_L; (ii)包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的V_H和包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的V_L; (iii)包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的V_H和包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的V_L; (iv)包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的V_H和包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的V_L; (v)包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的V_H和包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的V_L; (vi)包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的V_H和包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的V_L;或(vii)包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的V_H和包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的V_L。

[0165] 示例性抗体序列在下表2中示出。所属领域技术人员将认识到,已知许多用于预测抗体重链和轻链可变区中的CDR位置的算法,并且基于替代的预测算法,包含来自本文所描述的催化抗体的CDR的催化抗体也在本发明的范围内。所属领域的技术人员还将认识到,催化抗体包含来自本文所描述的催化抗体的V_H或V_L序列,但是基于替代算法在本发明的范围内。

[0166] 表2. 示例性抗A β 催化抗体序列。

[0167]

SEQ ID NO	描述	序列
4	3D6 V _H	EVKLVESGGGLVKPGASLKLSCAASGFTFSNYGMSWVRQNSDKRLEWVASIRSGGGRITYSDNVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLKSEDTALYYCVRYDHYSGSSDYWGQGTITVTVSS
5	3D6-D V _L	DVVMQTQPTLTLSTIGQPASISCKSSQSLLDSGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRIEAEDGLYYCWQGTHTFPRTFGGGTKLEIKR
6	hu3D6-D V _H v1 (“H1”)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQAPDKRLEWVASIRSGGGRITYSDNVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTALYYCVRYDHYSGSSDYWGQGTITVTVSS
7	hu3D6-D V _L v1 (“L1”)	DVVMQTQSPLSLPVTLGEPASISCKSSQSLLDSGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHTFPRTFGGGTKLEIKR
8	hu3D6-D V _L v2 (“L2”)	DVVMQTQSPLSLPVTLGEPASISCKSSQSLLDSGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRIEAEDVGLYYCWQGTHTFPRTFGGGTKLEIKR
9	HC-CDR1	NYGMS

[0168]

SEQ ID NO	描述	序列
10	HC-CDR2	SIRSGGGRTYYSDNVKG
11	HC-CDR3	YDHYSGSSDY
12	LC-CDR1	KSSQSLLDSGDKTYLN
13	LC-CDR2	LVSKLDS
14	LC-CDR3	WQGTHFPRT
15	IgG1 重链恒定区	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
16	IgG4 重链恒定区	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYTCNVDHK PSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
17	轻链 κ 恒定区	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
18	轻链 λ 恒定区	QPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKAD GSPVKAGVETTKPSKQSNKKAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS
19	hu3D6-D V _H v2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSAAAGFTFSNYGMSWVRQASD KRLEWVASIRSGGGRTYYSDNVKGRFTISRDNKNTLYLQMNS LRAEDTALYYCVRYDHYSGSSDYWGQGTLLTVSS
20	hu3D6-D V _H v3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSAAAGFTFSNYGMSWVRQNSD KRLEWVASIRSGGGRTYYSDNVKGRFTISRDNKNTLYLQMNS LRAEDTALYYCVRYDHYSGSSDYWGQGTLLTVSS
21	hu3D6-D V _L v3	DVVMTQSPSLPVTLLGQPASISCKSSQSLLDSGDKTYLNWLLQ RPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV GVYYCWQGTHFPRTFGGGTKVEIKR
22	hu3D6-D V _L v4	DVVMTQSPSLPVTLLGQPASISCKSSQSLLDSGDKTYLNWLLQ RPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV GVYYCWQGTHFPRTFGGGTKVEIKR

[0169] 还提供治疗或预防个体的阿尔茨海默氏病的方法,其包含向个体施用有效量的本文所描述的抗Aβ催化抗体(或其医药组合物)中的任一种。

[0170] Aβ肽

[0171] 在一些实施例中,抗Aβ催化抗体特异性结合和切割Aβ肽。在一些实施例中,抗Aβ催化抗体与人类Aβ肽,如Aβ(1-40)或Aβ(1-42)特异性结合和切割。在一些实施例中,抗Aβ催化抗体特异性结合和切割呈螺旋构象的Aβ肽。在一些实施例中,抗Aβ催化抗体与Aβ的N末端特异性结合,如Aβ(1-40)的N末端3、4、5、6、7、8、9、10或更多个氨基酸。

[0172] 在一些实施例中,抗Aβ催化抗体特异性结合和切割Aβ低聚物。在一些实施例中,抗Aβ催化抗体特异性结合和切割可溶性Aβ。在一些实施例中,抗Aβ催化抗体特异性结合和切割在淀粉样蛋白斑块中的Aβ。在一些实施例中,抗Aβ催化抗体特异性结合和切割在脑中的Aβ。在一些实施例中,抗Aβ催化抗体特异性结合和切割血管Aβ。

[0173] 在一些实施例中,抗A β 催化抗体与来自除人类外的物种,如小鼠或大鼠的A β 交叉反应。在一些实施例中,抗A β 催化抗体完全对人类A β 具有特异性,并且不表现出物种或其它类型的非人类交叉反应性。在一些实施例中,抗A β 催化抗体与A β 的至少一个等位变体交叉反应。在一些实施例中,抗A β 催化抗体不与A β 的任何等位变体交叉反应。

[0174] A β 为36-43个氨基酸的肽,其已经暗示为在阿尔茨海默患者的脑中发现的淀粉样蛋白斑块的主要组分。A β 肽来源于淀粉样蛋白前体蛋白(APP),其被 β 分泌酶和 γ 分泌酶切割,以产生A β 。A β 分子可聚集以形成柔性可溶性低聚物,其可以若干形式存在并且对神经元有毒。

[0175] 最近的研究表明,所述肽的可溶性寡聚形式可能是罹患阿尔茨海默氏病的原因。根据“淀粉样蛋白假设”,A β 斑块是造成阿尔茨海默氏病的病理的原因。患有散发性阿尔茨海默氏病的患者脑A β 升高。A β 为脑实质和血管淀粉样蛋白的主要成分,并且它促成脑血管病灶并具有神经毒性。A β 主要以可溶性A β 40在血浆、脑脊髓液(CSF)和脑间质液(ISF)中循环。老年淀粉样蛋白斑块含有A β 40和A β 42,而血管淀粉样蛋白主要为较短的A β 40。在两个病灶中均发现若干A β 序列。总A β 水平或A β 40和A β 42的相对浓度增加已经涉及家族性和散发性阿尔茨海默氏病的发病机理。由于其更具疏水性,A β 42为最高程度的淀粉样蛋白生成形式的肽。A β 42也被称作A β (1-42)。A β 40也被称作A β (1-40)。

[0176] 贝频珠单抗为鼠单克隆抗体3D6的人源化形式,其靶向呈螺旋构象的A β 肽的N末端5个残基。当抗体未能遏制认知下降时,在患有轻度到中度阿尔茨海默氏病的患者中贝频珠单抗的大规模III期临床试验于2012年8月停止。此外,贝频珠单抗为第一个被发现引起淀粉样蛋白相关成像异常的抗体,包括接受高剂量的患者的脑组织中流体积聚。接受0.5或1mg的贝频珠单抗的患者未发现健康风险。

[0177] 3D6的V_H包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列。3D6的V_L包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列。贝频珠单抗的V_H包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列。贝频珠单抗的V_L包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列。

[0178] SEQ ID NO:23 3D6 V_L

[0179] YVVMQTPLTSLVITIGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGLYYCWQGTHFPRTFGGQTKLEIKR

[0180] SEQ ID NO:24 贝频珠单抗V_H

[0181] EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQAPGKGLEWVASIRSGGGRTYYSDNVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCVRYDHYSGSSDYWGQGTLVTVSS

[0182] SEQ ID NO:25 贝频珠单抗V_L

[0183] YVVMQSPSLPVTTPGEPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQKPGQSPQRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPRTFGGQTKVEIKR

[0184] 抗体变体

[0185] 本文还提供上文所描述的治疗性催化抗体(如抗A β 催化抗体)中的任一种的变体和衍生物。

[0186] 取代、插入、缺失和变体

[0187] 在一些实施例中,涵盖本文提供的治疗性催化抗体(如抗A β 催化抗体)的氨基酸序列变体。举例来说,可能需要改进催化抗体的结合亲和力和/或其它生物学特性。可通过将

适当的修饰引入编码催化抗体的核苷酸序列或通过肽合成来制备催化抗体的氨基酸序列变体。这类修饰包括例如在催化抗体的氨基酸序列内的残基的缺失,和/或插入和/或取代。可进行缺失、插入和取代的任何组合以获得最终构建体,其条件是最终构建体具有期望特性,例如抗原结合和切割。

[0188] 在一些实施例中,提供具有一个或多个氨基酸取代的催化抗体变体。用于取代突变诱发的所关注的位点包括CDR和FR。可以将氨基酸取代引入所关注的催化抗体中,并且针对期望活性筛选产物,例如,保留/改进的抗原结合和切割,降低的免疫原性或改进的ADCC或CDC。

[0189] 在下表3中示出保守性取代。

[0190] 表3:保守性取代

原始残基	示例性取代	优选的取代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸	Leu

[0192] 氨基酸可根据常见的侧链特性分为不同的类别:

[0193] a. 疏水性: 正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile;

[0194] b. 中性亲水性: Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;

[0195] c. 酸性: Asp、Glu;

[0196] d. 碱性: His、Lys、Arg;

[0197] e. 影响链定向的残基: Gly、Pro;

[0198] f. 芳香族: Trp、Tyr、Phe。

[0199] 非保守取代将需要这些类别中的一个的成员与另一类别交换。

[0200] 示例性取代型变体为亲和力成熟的催化抗体,其可例如使用基于噬菌体展示的亲和力成熟技术方便地产生。简单来说,使一个或多个CDR残基突变并且将变体催化抗体展示在噬菌体上,并且针对特定生物活性(例如结合亲和力)进行筛选。可在HVR内进行改变(例如取代),以例如改进抗体亲和力。这类改变可在HVR“热点(hotspot)”,即由在体细胞成熟

过程期间经历高频率突变的密码子所编码的残基(参见例如,Chowdhury,《分子生物学方法(Methods Mol.Biol.)》207:179-196(2008)),和/或特异性确定残基(SDR)中进行,其中测试所得变体 V_H 或 V_L 的结合亲和力。通过构建二级文库并从中重新选择来进行亲和力成熟已描述于例如Hoogenboom等人的《分子生物学方法》178:1-37(O'Brien等人编,Human Press,新泽西州特图瓦市(Totowa,NJ)(2001))中。

[0201] 在亲和力成熟的一些实施例中,通过多种方法中的任一种(例如易错PCR、链改组或寡核苷酸定向诱变)将多样性引入选择用于成熟的可变基因中。然后创建二级文库。然后筛选库以识别具有期望亲和力的任何抗体变体。引入多样性的另一种方法涉及HVR引导的方法,其中将若干HVR残基(例如每次4-6个残基)随机分组。可例如使用丙氨酸扫描突变诱发或建模来特异性地识别涉及抗原结合的HVR残基。尤其通常靶向CDR-H3和CDR-L3。

[0202] 在一些实施例中,取代、插入或缺失可在一个或多个CDR内出现,只要这类变化不显著降低催化抗体结合和切割抗原的能力。举例来说,可在CDR中进行不显著降低结合亲和力或抗原切割活性的保守性改变(例如,如本文所提供的保守性取代)。这类变化可在HVR“热点”或SDR外。在以上所提供的变体 V_H 和 V_L 序列的一些实施例中,每个CDR未改变,或含有不超过一个、两个或三个氨基酸取代。

[0203] 一种适用于识别可靶向抗体的残基或区域进行突变诱发的方法称为“丙氨酸扫描突变诱发”,如Cunningham和Wells(1989)《科学(science)》,244:1081-1085所述。在此方法中,识别靶残基的残基或基团(例如带电残基,如Arg、Asp、His、Lys和Glu)并且被中性或带负电氨基酸(例如丙氨酸或聚丙氨酸)置换,以确定抗体与抗原的相互作用是否受影响。可在表明对初始取代的功能灵敏性的氨基酸位置处引入其它取代。替代地或另外,可确定抗原-抗体复合物的晶体结构以识别在抗体和抗原之间的接触点。这类接触残基和邻接残基可作为取代的候选物靶向或除去。可筛选变体,以确定其是否含有期望特性。

[0204] 本文所描述的催化抗体变体维持其针对靶蛋白(例如AB)的催化活性。催化三联体,即在治疗性催化抗体的 V_L 中的SHD基序不能被取代。在一些实施例中,支持其催化活性的在治疗性催化抗体的 V_L 中的一个或多个氨基酸残基不能被取代,包括例如在 V_L 的位置26、27D和28处的氨基酸残基,其中编号是根据Kabat的EU索引。

[0205] 氨基酸序列插入包括从一个残基到含有一百个或更多个残基的多肽的长度范围内的氨基和/或羧基末端融合,以及序列内部插入单个或多个氨基酸残基。末端插入的实例包括具有N末端甲硫氨酰基残基的催化抗体。催化抗体的其它插入型变体包括增加抗体的血清半衰期的酶(例如对于ADEPT)或多肽与抗体的N或C末端的融合。

[0206] 催化抗体变体还提供氨基末端前导延伸。举例来说,氨基末端前导序列的一个或多个氨基酸残基存在于抗体的任何一个或多个重链或轻链的氨基末端处。示例性氨基末端前导延伸包含三个氨基酸残基,VHS,或由其组成,其存在于抗体变体的一个或两个轻链上。

[0207] 嵌合和人源化催化抗体

[0208] 在一些实施例中,本文提供的治疗性催化抗体为嵌合抗体。某些嵌合抗体描述于例如美国专利第4,816,567号;和Morrison等人,(1984)《美国国家科学院院刊》,81:6851-6855(1984)。在一个实例中,嵌合抗体包含非人类可变区(例如来源于小鼠的可变区)和人类恒定区。在另一实例中,嵌合抗体为其中类别或子类别已从亲本抗体的类别或子类别改变的“类别转换”抗体。嵌合抗体包括其抗原结合片段。

[0209] 在一些实施例中,提供人源化催化抗体。人源化抗体用作治疗性分子,因为人源化抗体减少或消除人类对非人类抗体的免疫应答(如人类抗小鼠抗体(HAMA)应答),其可导致对抗体治疗剂的免疫应答,并且降低治疗剂的有效性。

[0210] 在一些实施例中,嵌合抗体为人源化抗体。典型地,将非人类抗体人源化,以减少对人类的免疫原性,同时保留亲本非人类抗体的特异性和亲和力。一般来说,人源化抗体包含其中HVR,例如CDR(或其部分)来源于非人类抗体的一个或多个可变结构域,和来源于人类抗体序列的FR(或其部分)。人源化抗体任选地还将包含人类恒定区的至少一部分。在一些实施例中,在人源化抗体中的一些FR残基被来自非人类抗体(例如HVR残基来源于其的抗体)的相应残基取代,例如以恢复或改进抗体特异性或亲和力。

[0211] 人源化抗体和其制备方法评述于例如Almagro和Fransson, (2008)《生物科学前沿(Front.Biosci.)》13:1619-1633,并且进一步描述于例如Riechmann等人, (1988)《自然》332:323-329;Queen等人, (1989)《美国国家科学院院刊》86:10029-10033;美国专利第5,821,337号、第7,527,791号、第6,982,321号,和第7,087,409号;Kashmiri等人, (2005)《方法(Methods)》36:25-34(描述SDR(a-CDR)移植);Padlan, (1991)《分子免疫学》28:489-498(描述“表面重修”);Dall’Acqua等人, (2005)《方法》36:43-60(描述“FR改组”);和Osborn等人, (2005)《方法》36:61-68和Klimka等人, (2000)《英国癌症杂志(Br.J.Cancer)》83:252-260(描述FR改组的“指导选择”方法)。

[0212] 可用于人源化的人类框架区包括不限于:使用“最佳拟合”方法选择的框架区(参见例如Sims等人(1993)《免疫学杂志》151:2296);来源于轻链或重链可变区的特定子组的人类抗体的共有序列的框架区(参见例如Carter等人(1992)《美国国家科学院院刊》,89:4285;和Presta等人(1993)《免疫学杂志》,151:2623);人类成熟(体细胞突变)框架区或人类种系框架区(参见例如Almagro和Fransson, (2008)《生物科学前沿》13:1619-1633);和来源于筛选FR文库的框架区(参见例如Baca等人, (1997)《生物化学杂志(J.Biol.Chem.)》272:10678-10684和Rosok等人, (1996)《生物化学杂志》271:22611-22618)。

[0213] 文库来源的抗体

[0214] 治疗性催化抗体可通过针对具有期望活性的抗体的筛选组合文库来分离。举例来说,所属领域中已知多种方法用于产生噬菌体展示文库和针对具有期望结合特性的抗体筛选这类文库。这类方法评述于例如Hoogenboom等人《分子生物学方法》178:1-37(O’Brien等人编,Human Press,新泽西州特图瓦市,2001),并且进一步描述与例如McCafferty等人,《自然》348:552-554;Clackson等人,《自然》352:624-628(1991);Marks等人,《分子生物学杂志》222:581-597(1992);Marks和Bradbury,《分子生物学方法》248:161-175(Lo,编,Human Press,新泽西州特图瓦市,2003);Sidhu等人,《分子生物学杂志》338(2):299-310(2004);Lee等人,《分子生物学杂志》340(5):1073-1093(2004);Fellouse,《美国国家科学院院刊》101(34):12467-12472(2004);和Lee等人,《免疫学方法杂志》284(1-2):119-132(2004)。

[0215] 在某些噬菌体展示方法中, V_H 和 V_L 基因的谱系分别通过聚合酶链反应(PCR)克隆并且在噬菌体文库中随机重组,其然后可筛选抗原结合噬菌体,如描述于Winter等人,《免疫学年度评论(Ann.Rev.Immunol.)》,12:433-455(1994)。噬菌体通常将抗体片段展示为scFv片段或Fab片段。来自免疫源的文库无需构建杂交瘤即可提供针对免疫原的高亲和力抗体。

替代地,可克隆原生组库以在无任何免疫接种的情况下将抗体的单一来源提供到广泛范围的非自身和自身抗原,如Griffiths等人,《欧洲分子生物学杂志(EMBO J)》,12:725-734 (1993)中所描述的。最后,也可通过克隆来自干细胞的未重新排列的V-基因片段,并且使用含有随机序列的PCR引物来合成制备原生文库,以编码高度可变CDR3区并且实现体外重排列,如例如通过Hoogenboom和Winter,《分子生物学杂志》,227:381-388 (1992)中所描述。描述人类抗体噬菌体文库的专利公开包括例如:美国专利第5,750,373号,和美国专利公开案第2005/0079574号、第2005/0119455号、第2005/0266000号、第2007/0117126号、第2007/0160598号、第2007/0237764号、第2007/0292936号和第2009/0002360号。

[0216] Fc区变体

[0217] 在一些实施例中,一个或多个氨基酸修饰可引入到本文所提供的治疗性催化抗体(如抗A β 催化抗体)的Fc区,由此产生Fc区变体。在一些实施例中,Fc区变体具有增强的ADCC效应子功能,通常与结合到Fc受体(FcR)有关。在一些实施例中,Fc区变体已降低ADCC效应子功能。有许多可改变效应子功能的Fc序列变化或突变的实例。举例来说,WO 00/42072和Shields等人,《生物化学杂志》9(2):6591-6604 (2001)描述了与FcR的结合改进或减少的抗体变体。那些公开的内容明确地以引用的方式并入本文中。

[0218] 在一些实施例中,治疗性催化抗体包含具有一些但非全部效应子功能的Fc区,所述Fc区使其成为其中催化抗体的活体内半衰期很重要而某些效应子功能(如CDC和ADCC)为不必要的或有害的应用的所期望的候选。可以行体外和/或体内细胞毒性测定,以证实CDC和/或ADCC活性的减少/耗尽。举例来说,可进行Fc受体(FcR)结合测定,以确保抗体缺乏Fc γ R结合(因此可能缺乏ADCC活性),但保留FcRn结合能力。用于介导ADCC的原代细胞,NK细胞,仅表达Fc γ RIII,而单核细胞表达Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII。在造血细胞上的FcR表达概述于表3中,在以下第464页中:Ravetch和Kinet,《免疫学年鉴》9:457-492 (1991)。评估所关注的分子的ADCC活性的体外测定的非限制性实例描述于美国专利第5,500,362号中(参见例如Hellstrom,I.等人《美国国家科学院院刊》83:7059-7063 (1986))和Hellstrom,I.等人,《美国国家科学院院刊》82:1499-1502 (1985);美国专利第5,821,337号(参见Bruggemann,M.等人,《实验医学杂志(J.Exp.Med.)》166:1351-1361 (1987))。替代地,可采用非放射性测定方法(参见例如用于流式细胞术的ACT1TM非放射性细胞毒性测定(加利福尼亚州山景城(Mountain View,CA)的细胞技术公司(Cell Technology Inc.));以及CytoTox 96TM非放射性细胞毒性测定法(威斯康星州麦迪逊的普洛麦格公司(Promega, Madison, Wis.))。用于这类测定的有效效应子细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和自然杀伤(NK)细胞。替代地或另外,所关注分子的ADCC活性可在体内,例如在如Clynes等人,《美国国家科学院院刊》,95:652-656 (1998)中所公开的动物模型中评估。还可进行C1q结合测定,以证实抗体不能够结合C1q且因此缺乏CDC活性。参见例如WO 2006/029879和WO 2005/100402中的C1q和C3c结合ELISA。为了评估补体活化,可进行CDC测定(参见例如Gazzano-Santoro等人,《免疫学方法杂志》202:163 (1996);等人,Cragg,M.S.等人,《血液(Blood)》101:1045-1052 (2003);以及Cragg,M.S.和M.J.Glennie,《血液》103:2738-2743 (2004))。FcRn结合和活体内清除/半衰期确定还可使用所属领域中已知的方法进行(参见例如Petkova,S.B.等人,《国际免疫学(Int'l.Immunol.)》18(12):1759-1769 (2006))。

[0219] 具有降低的效应子功能的抗体包括取代Fc区残基238、265、269、270、297、327和

329中的一个或多个的抗体(美国专利第6,737,056号)。这类Fc突变体包括具有在氨基酸位置265、269、270、297和327中的两个或更多个处的取代的Fc突变体,包括具有将残基265和297取代为丙氨酸的所谓的“DANA”Fc突变体(美国专利第7,332,581号)。

[0220] 描述了具有改进或减弱的对FcR的结合的某些抗体变体。(参见例如美国专利第6,737,056号;W02004/056312,和Shields等人,《生物化学杂志》9(2):6591-6604(2001)。

[0221] 在一些实施例中,在产生改变(即,改进或减弱)的C1q结合和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)的Fc区中进行改变,例如如描述于美国专利第6,194,551号、W0 99/51642和Idusogie等人,《免疫学杂志》164:4178-4184(2000)。

[0222] 具有增加的半衰期和改进的与FcRn结合的抗体描述于US2005/0014934A1(Hinton等人)。那些抗体包含具有一个或多个取代的Fc区,所述取代改进了Fc区与FcRn的结合。这类Fc变体包括在以下Fc区残基中的一个或多个处具有取代的那些:238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424或434,例如,Fc区残基434的取代(美国专利第7,371,826号)。

[0223] 关于Fc区变体的其它实例还参见Duncan和Winter,《自然》322:738-40(1988);美国专利第5,648,260号;美国专利第5,624,821号和W0 94/29351。

[0224] 糖基化变体

[0225] 在一些实施例中,改变本文提供的治疗性催化抗体(如抗AB催化抗体)的增加或减少构建体糖基化的程度。将糖基化位点添加或缺失到抗体可方便地通过改变抗体的氨基酸序列以使得产生或移除一个或多个糖基化位点来实现。

[0226] 在催化抗体包含Fc区的情况下,附接到其上的碳水化合物可改变。由哺乳动物细胞产生的天然抗体通常包含支化双天线低聚糖,其通常通过与Fc区的CH2结构域的Asn297的N键连而附接。参见例Wright等人,《TIBTECH》15:26-32(1997)。低聚糖可包括各种碳水化合物,例如甘露糖、N-乙酰基葡萄糖胺(GlcNAc)、半乳糖和唾液酸,以及连接到双天线低聚糖结构的“茎”中的GlcNAc的岩藻糖。在一些实施例中,可进行在催化抗体中低聚糖的修饰以便产生具有某些改进特性的催化抗体变体。

[0227] 附接到Fc的CH2结构域的N-聚糖为异质的。在CHO细胞中产生的抗体或Fc融合蛋白通过岩藻糖基转移酶活性被岩藻糖基化。参见Shoji-Hosaka等人,《生物化学杂志》2006,140:777-83。通常,在人血清中可检测到少量天然存在的无岩藻糖基化IgG。Fc的N-糖基化用于与Fc γ R结合是重要的;并且N-聚糖的无岩藻糖基化提高Fc与Fc γ RIIIa的结合能力。Fc增加 γ RIIIa结合可增强ADCC,这在其中期望细胞毒性的某些治疗性应用中可能是有利的。

[0228] 在一些实施例中,当不期望Fc介导的细胞毒性时,增强的效应子功能可为不利的。在一些实施例中,Fc片段或CH2结构域不是糖基化的。在一些实施例中,在CH2结构域中的N-糖基化位点突变,以防止糖基化。

[0229] 在一些实施例中,催化抗体变体被提供为具有缺少与Fc区(直接或间接)附接的岩藻糖的碳水化合物结构。举例来说,这类抗体中岩藻糖的量可为1%到80%、1%到65%、5%到65%或20%到40%。岩藻糖的量通过计算Asn297处的相对于如通过MALDI-TOF质谱测量的与Asn 297附接的所有糖结构(例如,复杂、杂合和高甘露糖结构)的总和的糖链内的岩藻糖的平均量确定的,例如,如W0 2008/077546中所描述的。Asn297是指位于约Fc区中约位置

297处(Fe区残基的EU编号)的天冬酰胺残基;然而,由于抗体中的微小序列变化,Asn297还可以位于位置297的上游或下游约 ± 3 个氨基酸处,即,在位置294与300之间。这类岩藻糖基化变体可具有改进的ADCC功能。参见例如美国专利公开第US 2003/0157108号(Presta, L.);US 2004/0093621(协和发酵麒麟株式会社(Kyowa Hakko Kogyo Co.,Ltd))。与“去岩藻糖化”或“岩藻糖不足”抗体变体相关的公开的实例包括:US 2003/0157108;WO 2000/61739;WO 2001/29246;US 2003/0115614;US 2002/0164328;US 2004/0093621;US 2004/0132140;US 2004/0110704;US 2004/0110282;US 2004/0109865;WO 2003/085119;WO 2003/084570;WO 2005/035586;WO 2005/035778;WO2005/053742;WO2002/031140;Okazaki等人,《分子生物学杂志》336:1239-1249(2004);Yamane-Ohnuki等人,《生物技术与生物工程(Biotechnol.Bioeng.)》87:614(2004)。能够产生去岩藻糖化抗体的细胞系的实例包括缺失蛋白质岩藻糖基化的Lec13 CHO细胞(Ripka等人,《生物化学与生物物理学集刊(Arch.Biochem.Biophys.)》249:533-545(1986);美国专利申请第US 2003/0157108A1号,Presta,L;和WO 2004/056312A1,Adams等人,尤其在实例11处),和基因敲除细胞系,如 α -1,6-岩藻糖苷转移酶基因,FUT8,基因敲除CHO细胞(参见例如Yamane-Ohnuki等人《生物技术与生物工程》87:614(2004);Kanda,Y.等人,《生物技术与生物工程》,94(4):680-688(2006)和WO2003/085107)。

[0230] 催化抗体变体进一步具备平分低聚糖,例如其中由GlcNAc平分附接到抗体的Fc区的双天线低聚糖。这类抗体变体可具有降低岩藻糖基化和/或改进的ADCC功能。这类抗体变体的实例描述于例如WO 2003/011878(Jean-Mairet等人);美国专利第6,602,684号(Umana等人)和US 2005/0123546(Umana等人)中。还提供具有附接到Fc区的低聚糖中的至少一个半乳糖残基的抗体变体。这类抗体变体可具有改进的CDC功能。这类抗体变体描述于例如:WO 1997/30087(Patel等人);WO 1998/58964(Raju,S.)和WO 1999/22764(Raju,S.)中。

[0231] 衍生物

[0232] 在一些实施例中,可进一步修饰本文所提供的治疗性催化抗体(如抗AB催化抗体),以含有所属领域中已知的并且容易获得的附加非蛋白质部分。适用于催化抗体的衍生作用的部分包括但不限于水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性实例包括但不限于聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇的共聚物、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚-1,3-二氧戊环、聚-1,3,6-三噁烷、乙烯/马来酸酐共聚物、聚氨基酸(均聚物或无规共聚物),和葡聚糖或聚(N-乙烯基吡咯烷酮)聚乙二醇、丙二醇均聚物、环氧丙烷/环氧乙烷共聚物、聚氧乙烯化多元醇(例如甘油)、聚乙烯醇和其混合物。聚乙二醇丙醛由于其在水中的稳定性而在制造中具有优势。聚合物可具有任何分子量,并且可是支链或非支链的。附接到催化抗体的聚合物的数量可变化,并且如果附接多于一种聚合物,那么它们可为相同或不同的分子。一般来说,可基于包括但不限于以下的考虑确定用于衍生作用聚合物的数量和/或类型:待改进的催化抗体的特定特性或功能,催化抗体衍生物是否将用于在定义的条件下的疗法等。

[0233] IV. 制备方法

[0234] 本文所描述的治疗性催化抗体(如抗AB催化抗体)可使用在所属领域中任何已知方法制备,包括下文描述和在实例中的那些。可通过针对靶抗原(如过渡态类似物)免疫实验室动物来获得治疗性代谢物。参见,例如,US2010018361A1和Taguchi H等人“在防御阿尔

茨海默病中淀粉样蛋白 β 肽催化抗体 (Catalytic antibodies to amyloid beta peptide in defense against Alzheimer disease)”《自身免疫性疾病综述 (Autoimmun.Rev.)》7: 391-397 (2008), 其以引用的方式并入本文中。催化抗体还可重组表达。

[0235] 核酸

[0236] 本申请还提供分离的核酸分子, 其包含编码本文所描述的治疗性催化抗体 (如抗A β 催化抗体) 的一个或多个链的多核苷酸。在一些实施例中, 核酸分子包含编码治疗性催化抗体 (如抗A β 催化抗体) 的重链或轻链的多核苷酸。在一些实施例中, 核酸分子包含编码重链的多核苷酸和编码治疗性催化抗体 (如抗A β 催化抗体) 的轻链的多核苷酸。在一些实施例中, 第一核酸分子包含编码重链的第一多核苷酸, 并且第二核酸分子包含编码轻链的第二多核苷酸。在一些实施例中, 编码重链的第一多核苷酸可操作地连接到第一启动子, 并且编码轻链的第二多核苷酸可操作地连接到第二启动子。在一些实施例中, 编码重链的多核苷酸和编码轻链的多核苷酸可操作地连接到启动子。

[0237] 附加启动子元件 (例如增强子) 调节转录起始的频率。典型地, 这些位于起始位点上游30-110bp的区, 尽管最近已显示许多启动子也含有起始位点下游的功能元件。启动子元件之间的间距通常是灵活的, 使得当元件相对于彼此倒置或移动时, 启动子功能得以保留。在胸苷激酶 (tk) 启动子中, 启动子元件之间的间隔可在活性开始下降之前增加到50bp。

[0238] 合适的启动子的一个实例是立即早期巨细胞病毒 (CMV) 启动子序列。此启动子序列为强组成型启动子序列, 能够驱动与其可操作连接的任何聚核苷酸序列的高水平表达。合适的启动子的另一个实例为延伸生长因子-1 α (EF-1 α)。然而, 还可使用其它组成型启动子序列, 包括但不限于猿猴病毒40 (SV40) 早期启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒 (MMTV)、人类免疫缺陷病毒 (HIV) 长末端重复序列 (LTR) 启动子、MoMuLV启动子、禽白血病毒启动子、埃-巴二氏病毒 (Epstein-Barr virus) 立即早期启动子、劳氏肉瘤病毒 (Rous sarcoma virus) 启动子, 以及人类基因启动子, 如但不限于肌动蛋白启动子、肌球蛋白启动子、血红蛋白启动子和肌酸激酶启动子。另外, 本发明不应限于使用组成型启动子。诱导型启动子也被认为是本发明的一部分。诱导型启动子的使用提供了一种分子开关, 所述分子开关能够在需要这类表达时接通与其可操作连接的聚核苷酸序列的表达, 或在不需要表达时关断所述表达。诱导型启动子的实例包括但不限于金属硫蛋白启动子、糖皮质激素启动子、孕酮启动子和四环素启动子。

[0239] 在一些实施例中, 治疗性催化抗体的表达为诱导型的。在一些实施例中, 编码治疗性催化抗体的核酸序列可操作地连接到诱导型启动子。

[0240] 在一些实施例中, 编码治疗性催化抗体 (如抗A β 催化抗体) 的重链或轻链的多核苷酸包含编码前导序列的核苷酸序列, 所述前导序列在被翻译时位于重链或轻链的N末端。前导序列可为天然重链或轻链前导序列, 或可为另一种异源前导序列。在一些实施例中, 编码治疗性催化抗体 (如抗A β 催化抗体) 的核酸 (一组核酸) 还可包含编码肽标签 (如蛋白质纯化标签, 例如His标签、HA标签) 的核酸序列。

[0241] 本申请还包括这些核酸序列的变体。举例来说, 变体包括在至少中等严格的杂交条件下与编码本文所描述的治疗性催化抗体中的任一种的核酸序列杂交的核苷酸序列。

[0242] 可使用在所属领域中常规的重组DNA技术构建核酸分子。在一些实施例中, 核酸分子为适合于在选择的宿主细胞中表达的表达载体。

[0243] 载体

[0244] 提供包含编码本文所描述的治疗性催化抗体(如抗AB催化抗体)中的任一种的重链和/或轻链的多核苷酸的载体。这类载体包括但不限于DNA载体、噬菌体载体病毒载体、逆转录病毒载体等。在一些实施例中,载体包含编码重链的第一多核苷酸序列和编码轻链的第二多核苷酸序列。在一些实施例中,重链和轻链从载体表达为两个单独的多肽。在一些实施例中,重链和轻链表达为单个多肽的一部分。

[0245] 在一些实施例中,第一载体包含编码重链的多核苷酸,并且第二载体包含编码轻链的多核苷酸。在一些实施例中,第一载体和第二载体以类似的量(如类似摩尔量或类似质量量)转染到宿主细胞中。在一些实施例中,将摩尔或质量比在5:1和1:5之间的第一载体和第二载体转染到宿主细胞中。在一些实施例中,对于编码重链的载体和编码轻链的载体,使用在1:1和1:5的之间的质量比。在一些实施例中,对于编码重链的载体和编码轻链的载体,使用1:2的质量比。

[0246] 可将核酸克隆到多种类型的载体中。举例来说,可将核酸克隆到载体中,所述载体包括但不限于质粒、噬菌粒、噬菌体衍生物、动物病毒和粘粒。备受关注的载体包括表达载体、复制载体、探针产生载体和测序载体。

[0247] 此外,可按病毒载体的形式,将表达载体提供给细胞。病毒载体技术在所属领域中为众所周知的,并且描述于例如Green和Sambrook(2013,《分子克隆:实验指南(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)》,纽约冷泉港实验室(Cold Spring Harbor Laboratory, New York)),和其它病毒学和分子生物学手册。用作载体的病毒包括但不限于逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒和慢病毒。一般来说,合适的载体含有在至少一种生物中有复制功能的起点、启动子序列、方便的限制性核酸内切酶位点和一种或多种可选择的标志物(参见例如WO 01/96584;WO 01/29058;和美国专利第6,326,193号)。

[0248] 简单来说,可通过将核酸插入到适当表达载体中,使得核酸可操作地连接到5'和3'调节元件,包括例如启动子(例如淋巴细胞特异性启动子)和3'非翻译区(UTR),来实现通过编码催化抗体的天然或合成核酸表达治疗性催化抗体。载体可适合于在宿主细胞中进行复制和整合。典型的克隆和表达载体含适用于调节期望的核酸序列的表达的转录和翻译终止子、初始序列和启动子。

[0249] 在一些实施例中,选择针对在CHO或CHO来源的细胞或在NS0细胞中表达多肽而优化的载体。示例性这类载体描述于例如Running Deer等人,《生物技术进展(Biotechnol.Prog.)》20:880-889(2004)。

[0250] 为了评估多肽或其部分的表达,待引入细胞中的表达载体还可含有选择标志物基因或报告基因,或两者,以促进从寻求的细胞群中识别和选择表达细胞通过病毒载体转染或感染。在其它方面,选择标志物可携带在单独的DNA片段上且用于共转染程序。选择标志物和报导基因均可侧接有适当的调节序列,以使得能够在宿主细胞中表达。适用的选择标志物包括例如抗生素抗性基因,如neo等。

[0251] 报告基因用于识别潜在转染的细胞和评估调节序列的功能。一般来说,报告基因是如下的基因:受体生物体或组织来源中不存在或不被受体来源表达,并且编码通过一些易于检测的特性(例如酶活性)来体现表达的多肽。在DNA已引入到受体细胞之后的合适时间测定报告基因的表达。合适的报告基因可包括编码荧光素酶、 β -半乳糖苷酶、氯霉素乙酰

转移酶、分泌的碱性磷酸酶或绿色荧光蛋白基因的基因(例如Ui-Tei等人,2000《FEBS快报(FEBS Letters)》479:79-82)。合适的表达系统是众所周知的且可使用已知技术制备或商业上获得。一般来说,将具有最小5'侧接区,显示最高水平的报告基因表达的构筑体识别为启动子。这类启动子区可与报告基因连接且用于评估药剂调节启动子驱动的转录的能力。

[0252] 宿主细胞

[0253] 本申请提供分离的宿主细胞,其包含本文所描述的治疗性催化抗体(如抗Aβ催化抗体)、核酸分子或载体中的任一种。

[0254] 本文所描述的治疗性催化抗体(如抗Aβ催化抗体)可在原核细胞(如细菌细胞)中;或在真核细胞(如真菌细胞(酵母)、植物细胞、昆虫细胞和哺乳动物细胞)中表达。这类表达可例如根据所属领域中已知的程序进行。可用于表达多肽的示例性真核细胞包括但不限于COS细胞,包括COS 7细胞;293细胞,包括293-6E细胞;CHO细胞,包括CHO-S、DG44、Lec13CHO细胞和FUT8CHO细胞;PER.C6[®]细胞(Crucell);和NSO细胞。合适的非哺乳动物宿主细胞包括原核生物(如大肠杆菌或枯草芽孢杆菌)和酵母(酿酒酵母、粟酒裂殖酵母;或乳酸克鲁维酵母)。在一些实施例中,基于特定真核宿主细胞对抗体的重链和/或轻链进行期望翻译后修饰的能力选择真核宿主细胞。举例来说,在一些实施例中,CHO细胞产生比在293细胞中产生的相同多肽高的唾液酸化水平的多肽。

[0255] 将一个或多个核酸引入到期望宿主细胞中可通过任何方法实现,所述方法包括但不限于磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖介导的转染、阳离子脂质介导的转染、穿孔、转导、感染等。非限制性示例性方法描述于例如Sambrook等人,《分子克隆实验指南》,第3版,冷泉港实验室出版社(2001)。可根据任何合适的方法在期望的宿主细胞中瞬时或稳定地转染核酸。

[0256] 在一些实施例中,治疗性催化抗体在无细胞系统中产生。非限制性示例性无细胞系统描述于例如Sitaraman等人,《分子生物学方法》498:229-44(2009);Spirin,《生物技术趋势(Trends Biotechnol.)》22:538-45(2004);Endo等人,《生物技术进展(Biotechnol.Adv.)》21:695-713(2003)。

[0257] 纯化

[0258] 治疗性催化抗体(如抗Aβ催化抗体)可通过任何合适方法纯化。这类方法包括但不限于使用亲和力基质或疏水相互作用色谱。合适的亲和力配体包括结合抗体恒定区的配体。举例来说,蛋白A、蛋白G、蛋白A/G或抗体亲和力柱可用于结合恒定区并且纯化包含Fc片段的抗体。疏水相互作用色谱法,例如丁基或苯基柱,也可适合于纯化某些多肽,如抗体。离子交换色谱法(例如阴离子交换色谱法和/或阳离子交换色谱法)也可适合于纯化某些多肽,如抗体。混合模式色谱法(例如反相/阴离子交换、反相/阳离子交换、亲水性相互作用/阴离子交换、亲水性相互作用/阳离子交换等)还可适合于纯化某些多肽,如抗体。许多纯化多肽的方法为所属领域中已知的。

[0259] V. 组合物、试剂盒和制品

[0260] 本文还提供包含本文所描述的治疗性催化抗体(如抗Aβ催化抗体)、核酸、载体或宿主细胞中的任一种的组合(如医药组合物)。

[0261] 本文描述的治疗性催化抗体(如抗Aβ催化抗体)的医药组合物可通过将具有期望纯度的治疗性催化抗体(如抗Aβ催化抗体)与任选的药学上可接受的载剂、赋形剂或稳定剂(《雷明顿的药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)》第16版,Osol,A.

编(1980)),其呈冻干调配物或水溶液形式。可接受的载剂、赋形剂或稳定剂在所用剂量和浓度下对接受者无毒性,并且包括缓冲液,如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(如十八烷基二甲基苯甲基氯化铵、氯化六羟季铵;苯扎氯铵(benzalkonium chloride)、苄索氯铵(benzethonium chloride);酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷酯,如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;以及间甲酚);低分子量(小于约10个残基)多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其它碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,如EDTA;糖,如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐相对离子,如钠;金属复合物(例如Zn-蛋白质复合物);和/或非离子型表面活性剂,如TWEENTM、PLURONICSTM或聚乙二醇(PEG)。适于皮下施用的冻干配制物描述于W097/04801中。这类冻干配制物可用合适的稀释剂复原至高蛋白质浓度并且复原的配制物可皮下施用所述本文中待治成像、诊断或疗的个体。

[0262] 待用于体内施用的医药组合物必须无菌。这易于通过例如通过无菌过滤膜过滤实现。

[0263] 还提供适用于本文所描述的确催化抗体水平、诊断和治疗的方法中的任一种的试剂盒,包括包含本文所描述的治疗性催化抗体(如抗A β 催化抗体)中的任一种的试剂盒。

[0264] 在一些实施例中,提供用于确定生物样本的催化抗体水平的试剂盒,其包含:包含氨基酸序列(EAR)_n(SEQ ID NO:2)的底物肽,并且其中n为介于1与30之间的整数(例如n为3)。在一些实施例中,试剂盒还包含与总Ig(例如总人Ig,如总IgM、总IgG、总IgA和/或总IgE)特异性结合的抗体。在一些实施例中,试剂盒包含固体支持物(例如ELISA板)。

[0265] 在一些实施例中,提供用于诊断个体的PAD或确定PAD的风险的试剂盒,其中PAD与靶蛋白相关,所述试剂盒包含:a)包含氨基酸序列(EAR)_n(SEQ ID NO:2)的底物肽,并且其中n为介于1与30之间的整数(例如n为3);和b)靶蛋白(或其片段)或针对靶蛋白的抗体。在一些实施例中,试剂盒还包含与总Ig(例如总人Ig,如总IgM、总IgG、总IgA和/或总IgE)特异性结合的抗体。在一些实施例中,试剂盒包含固体支持物(例如ELISA板)。

[0266] 在一些实施例中,提供用于诊断个体的AD或确定AD的风险的试剂盒,其包含:a)包含氨基酸序列(EAR)_n(SEQ ID NO:2)的底物肽,并且其中n为介于1与30之间的整数(例如n为3);b)A β 肽(例如A β (1-42))或抗A β 抗体;和c)与总Ig(例如总人Ig,如总IgM、总IgG、总IgA和/或总IgE)特异性结合的抗体。在一些实施例中,试剂盒包含固体支持物(例如ELISA板)。

[0267] 在一些实施例中,提供用于治疗或预防个体的PAD的试剂盒,其中PAD与靶蛋白相关,所述试剂盒包含:a)包含氨基酸序列(EAR)_n(SEQ ID NO:2)的底物肽,并且其中n为介于1与30之间的整数(例如n为3);b)靶蛋白(或其片段)或针对靶蛋白的抗体;c)与总Ig(例如总人Ig,如总IgM、总IgG、总IgA和/或总IgE)特异性结合抗体;和d)与靶蛋白特异性结合的治疗性催化抗体。在一些实施例中,试剂盒包含固体支持物(例如ELISA板)。

[0268] 在一些实施例中,提供用于治疗或预防个体的AD的试剂盒,其包含:a)包含氨基酸序列(EAR)_n(SEQ ID NO:2)的底物肽,并且其中n为介于1与30之间的整数(例如n为3);b)A β 肽(例如A β (1-42))或抗A β 抗体;c)与总Ig(例如总人Ig,如总IgM、总IgG、总IgA和/或总IgE)特异性结合的抗体;和d)与A β ,如本文所描述的抗A β 催化抗体中的任一种特异性结合的治疗性催化抗体。在一些实施例中,试剂盒包含固体支持物(例如ELISA板)。

[0269] 在一些实施例中,提供用于治疗或预防个体的AD的试剂盒,其包含:包含抗AB催化抗体和药学上可接受的载剂的医药组合物,其中抗AB催化抗体包含:包含以下的 V_L :包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的LC-CDR1、包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的LC-CDR2,和包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的LC-CDR3,或其变体,其在LC-CDR中包含至多约5个氨基酸取代,其中在 V_L 的位置1处的氨基酸残基为D,在 V_L 的位置27A处的氨基酸残基为S,并且在 V_L 的位置93处的氨基酸残基为H,并且其中编号是根据Kabat的EU索引。在一些实施例中,在 V_L 的位置26处的氨基酸残基为Ser (S),在 V_L 的位置27D处的氨基酸残基为D、E或H,和/或在 V_L 的位置28处的氨基酸残基为D或N,并且其中编号是根据Kabat的EU索引。在一些实施例中,抗AB催化抗体包含:包含以下的 V_H :包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HC-CDR1、包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HC-CDR2,和包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HC-CDR3,或其变体,其在HC-CDR中包含至多约5个氨基酸取代。

[0270] 本申请的试剂盒在合适的包装中。合适包装包括但不限于小瓶、瓶子、罐、柔性包装(例如密封聚酯薄膜或塑料袋)等。试剂盒可任选地提供附加组分如试剂(例如ECL底物)、缓冲液(例如包被缓冲液、封闭缓冲液、洗涤缓冲液、抗体稀释液缓冲液、显影缓冲液等)、抗体(例如抗人Ig抗体)和解释的信息。

[0271] 因此,本申请还提供制品。制品可包含容器以及在容器上或与容器相关的标记或包装插页。合适的容器包括小瓶(如密封的小瓶)、瓶子、罐、柔性包装等。在一些实施例中,容器保持医药组合物,并且可具有无菌接取口(例如容器可为静脉内溶液袋或具有可被皮下注射针刺穿的塞子的小瓶)。在一些实施例中,容器保持用于免疫测定的底物肽或靶蛋白(例如AB)。标记或包装插页指示组合物用于诊断(包括确定风险)、治疗或预防个体的PAD(例如AD)。标记或包装插页将还包含用于执行免疫测定以确定生物样本中一种或多种SHD催化抗体水平,和/或向个体施用医药组合物的指令。标记可指示用于重构和/或使用各种组分的指引。保持医药组合物的容器可为多次使用的小瓶,其允许重复施用重构的配制物(例如2-6次施用)。包装插页是指通常包括在诊断和/或治疗产品的商业包装中的含有关于适应症、用法、剂量、施用、有关使用这类产品的禁忌和/或警告的信息的说明书。此外,制品还可以包含第二容器,所述第二容器包含药学上可接受的缓冲液,如注射用抑菌水(BWFI)、磷酸盐缓冲生理盐水、林格氏溶液(Ringer's solution)和葡萄糖溶液。它还可包括从商业和用户的观点看所期望的其它材料,包括其它缓冲液、稀释剂、过滤器、针及注射器。

[0272] 试剂盒还可包括多个单位剂量的医药组合物以及使用说明书,并且以足以在药房(例如医院药房和混合药房)储存和使用的量包装。

[0273] 示例性实施例

[0274] 实施例1.一种用于确定生物样本中一种或多种SHD催化抗体的水平的方法,其包含:

[0275] a)在允许形成催化抗体-底物肽复合物的条件下使所述生物样本与固定在固体支持物上的底物肽接触,和

[0276] b)确定所述催化抗体-底物肽复合物的量,由此提供在所述生物样本中一种或多种SHD催化抗体的水平,

[0277] 其中所述底物肽包含氨基酸序列 $(EAR)_n$ (SEQ ID NO:2),并且其中n为介于1与30之间的整数。

- [0278] 实施例2.根据实施例1所述的方法,其中n为3。
- [0279] 实施例3.根据实施例1或2所述的方法,其中所述生物样本为血清样本。
- [0280] 实施例4.根据实施例3所述的方法,其中所述血清样本含有至少约1 μ g/mL免疫球蛋白(Ig)。
- [0281] 实施例5.根据实施例1到4中的任一项所述的方法,其中所述生物样本与所述底物肽一起保温约1小时到约16小时。
- [0282] 实施例6.根据实施例1到5中任一项所述的方法,其中使用与总Ig特异性结合的抗体确定所述催化抗体-底物肽复合物的量。
- [0283] 实施例7.根据实施例6所述的方法,其中所述抗体用酶或荧光标记来标记。
- [0284] 实施例8.一种用于确定个体的蛋白聚集疾病(PAD)的风险的方法,其中所述PAD与靶蛋白的聚集相关,所述方法包含确定所述个体的生物样本中一种或多种SHD催化抗体的水平,其中如果所述一种或多种SHD催化抗体的水平低于对照SHD催化抗体水平,那么确定所述个体具有所述PAD的风险。
- [0285] 实施例9.根据实施例8所述的方法,其中一种或多种SHD催化抗体的水平为与所述靶蛋白特异性结合的一种或多种SHD催化抗体的水平。
- [0286] 实施例10.根据实施例8所述的方法,其中一种或多种SHD催化抗体的水平为总SHD催化抗体的水平。
- [0287] 实施例11.根据实施例10所述的方法,其中通过在允许形成催化抗体-底物肽复合物的条件下使个体的血清样本与固定在固体支持物上的底物肽接触并且确定催化抗体-底物肽复合物的量来确定总SHD催化抗体的水平,其中所述底物肽包含所述氨基酸序列(EAR)_n(SEQ ID NO:2),其中n为介于1与30之间的整数。
- [0288] 实施例12.根据实施例11所述的方法,其中n为3。
- [0289] 实施例13.根据实施例11或12所述的方法,其中所述血清样本含有至少约1 μ g/mL Ig。
- [0290] 实施例14.根据实施例11到13中任一项所述的方法,其中所述血清样本与所述底物肽一起保温约1小时到约16小时。
- [0291] 实施例15.根据实施例11到14中任一项所述的方法,其中使用与总Ig特异性结合的抗体确定所述催化抗体-底物肽复合物的量。
- [0292] 实施例16.根据实施例15所述的方法,其中所述抗体用酶或荧光标记来标记。
- [0293] 实施例17.根据权利要求8到16中任一项所述的方法,其还包含确定所述个体的生物样本中针对所述靶蛋白的自身抗体的水平,其中如果:(i)所述一种或多种SHD催化抗体的水平低于对照SHD催化抗体水平;和(ii)针对所述靶蛋白的所述自身抗体的水平低于对照自身抗体水平,那么确定所述个体具有所述PAD的风险。
- [0294] 实施例18.根据实施例17所述的方法,其中通过在允许形成自身抗体-靶蛋白复合物的条件下使所述个体的血清样本与所述靶蛋白接触并且确定所述自身抗体-靶蛋白复合物的量来确定所述自身抗体的水平。
- [0295] 实施例19.根据实施例18所述的方法,其中使用ELISA测定确定所述自身抗体的水平。
- [0296] 实施例20.根据实施例17到19中任一项所述的方法,其中所述对照自身抗体水平

为在健康个体中针对所述靶蛋白的所述自身抗体的水平。

[0297] 实施例21.根据实施例17到19中任一项所述的方法,其中所述对照自身抗体水平为在个体的群体中针对所述靶蛋白的所述自身抗体的中值水平。

[0298] 实施例22.根据实施例8到16中任一项所述的方法,其还包含确定所述个体的生物样本中所述靶蛋白的水平,其中如果:(i)所述一种或多种SHD催化抗体的水平低于对照SHD催化抗体水平;和(ii)所述靶蛋白的水平高于对照靶蛋白水平,那么确定所述个体具有所述PAD的风险。

[0299] 实施例23.根据实施例8到22中任一项所述的方法,其中所述对照SHD催化抗体水平为在健康个体中一种或多种SHD催化抗体的水平。

[0300] 实施例24.根据实施例8到22中任一项所述的方法,其中所述对照SHD催化抗体水平为在个体中一种或多种SHD催化抗体的中值水平。

[0301] 实施例25.根据实施例8到24中任一项所述的方法,其中所述PAD为阿尔茨海默氏病,并且其中所述靶蛋白为淀粉样蛋白 β (A β)。

[0302] 实施例26.根据实施例8到24中任一项所述的方法,其中:

[0303] (i)所述PAD为帕金森氏病,并且所述靶蛋白为 α -突触核蛋白;

[0304] (ii)所述PAD为阿尔茨海默氏病或痴呆,并且所述靶蛋白为Tau;

[0305] (iii)所述PAD为ATTR淀粉样变性,并且所述靶蛋白为转甲状腺素蛋白;

[0306] (iv)所述PAD为AL淀粉样变性,并且所述靶蛋白为免疫球蛋白轻链;

[0307] (v)所述PAD为额颞叶退化或肌萎缩性侧索硬化,并且所述靶蛋白为TDP43;

[0308] (vi)所述PAD为亨廷顿氏病,并且所述靶蛋白为亨廷顿蛋白;

[0309] (vii)所述PAD为II型糖尿病,并且所述靶蛋白为IAPP;或

[0310] (viii)所述PAD为肌萎缩性侧索硬化,并且所述靶蛋白为SOD1。

[0311] 实施例27.一种治疗或预防个体的PAD的方法,其中所述PAD与靶蛋白的聚集相关,所述方法包含:

[0312] a)根据实施例1到26中任一项所述的方法确定所述个体具有所述PAD的风险;和

[0313] b)向所述个体施用有效量的与所述靶蛋白特异性结合的治疗性催化抗体。

[0314] 实施例28.根据实施例27所述的方法,其中以不大于约每三个月的频率重复所述方法。

[0315] 实施例29.根据实施例27或28所述的方法,其中所述PAD为阿尔茨海默氏病,其中所述靶蛋白为淀粉样蛋白 β (A β),其中所述治疗性催化抗体包含:包含以下的轻链可变区(V_L):包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的轻链互补决定区(LC-CDR)1、包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的LC-CDR2,和包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的LC-CDR3,或其变体,其在所述LC-CDR中包含至多约5个氨基酸取代,其中在所述 V_L 的位置1处的所述氨基酸残基为D,在所述 V_L 的位置27A处的所述氨基酸残基为S,并且在所述 V_L 的位置93处的所述氨基酸残基为H,并且其中编号是根据Kabat的EU索引。

[0316] 实施例30.根据实施例29所述的方法,其中所述治疗性催化抗体包含:包含以下的重链可变区(V_H):包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的重链互补决定区(HC-CDR)1、包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HC-CDR2,和包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HC-CDR3,或其变体,其在所述HC-CDR中包含至多约5个氨基酸取代。

[0317] 实施例31. 根据实施例29或30所述的方法, 其中在所述 V_L 的位置26处的所述氨基酸残基为S, 在所述 V_L 的位置27D处的所述氨基酸残基为D、E或H, 和/或在所述 V_L 的位置28处的所述氨基酸残基为D或N, 并且其中所述编号是根据Kabat的EU索引。

[0318] 实施例32. 根据实施例29到31中任一项所述的方法, 其中所述治疗性催化抗体包含: 包含与SEQ ID NO: 4、6、19或20的氨基酸序列具有至少约85%序列一致性的所述氨基酸序列的 V_H ; 和/或包含与SEQ ID NO: 5、7、8、21或22的所述氨基酸序列具有至少约85%序列一致性的氨基酸序列 V_L 。

[0319] 实施例33. 根据实施例32所述的方法, 其中所述治疗性催化抗体包含: (i) 包含SEQ ID NO: 4的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO: 5的氨基酸序列的 V_L ; (ii) 包含SEQ ID NO: 6的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO: 7的氨基酸序列的 V_L ; (iii) 包含SEQ ID NO: 6的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO: 8的氨基酸序列的 V_L ; (iv) 包含SEQ ID NO: 19的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO: 21的氨基酸序列的 V_L ; (v) 包含SEQ ID NO: 20的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO: 21的氨基酸序列的 V_L ; (vi) 包含SEQ ID NO: 19的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO: 22的氨基酸序列的 V_L ; 或 (vii) 包含SEQ ID NO: 20的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO: 22的氨基酸序列的 V_L 。

[0320] 实施例34. 根据实施例27到33中任一项所述的方法, 其中所述治疗性催化抗体为全长IgG抗体。

[0321] 实施例35. 根据实施例34所述的方法, 其中所述治疗性催化抗体包含IgG1或IgG4 Fc区。

[0322] 实施例36. 根据实施例27到33中任一项所述的方法, 其中所述治疗抗体为全长IgM抗体。

[0323] 实施例37. 一种分离的抗AB催化抗体, 其包含: 包含以下的 V_L : 包含SEQ ID NO: 12的氨基酸序列的LC-CDR1、包含SEQ ID NO: 13的氨基酸序列的LC-CDR2, 和包含SEQ ID NO: 14的氨基酸序列的LC-CDR3, 或其变体, 其在所述LC-CDR中包含至多约5个氨基酸取代, 其中在所述 V_L 的位置1处的所述氨基酸残基为D, 在所述 V_L 的位置27A处的所述氨基酸残基为S, 并且在所述 V_L 的位置93处的所述氨基酸残基为H, 并且其中所述编号是根据Kabat的EU索引。

[0324] 实施例38. 一种分离的抗AB催化抗体, 其包含: 包含以下的 V_H : 包含SEQ ID NO: 9的氨基酸序列的HC-CDR1、包含SEQ ID NO: 10氨基酸序列的HC-CDR2, 和包含SEQ ID NO: 11的氨基酸序列的HC-CDR3, 或其变体, 其在所述HC-CDR中包含至多约5个氨基酸取代, 其中在所述 V_L 的位置1处的所述氨基酸残基为D, 在所述 V_L 的位置27A处的所述氨基酸残基为S, 并且在所述 V_L 的位置93处的所述氨基酸残基为H, 并且其中所述编号是根据Kabat的EU索引。

[0325] 实施例39. 根据实施例37或38所述的抗AB催化抗体, 其中所述抗AB催化抗体包含: 包含以下的 V_H : 包含SEQ ID NO: 9的氨基酸序列的HC-CDR1、包含SEQ ID NO: 10的氨基酸序列的HC-CDR2, 和包含SEQ ID NO: 11的氨基酸序列的HC-CDR3; 和包含以下的 V_L : 包含SEQ ID NO: 12的氨基酸序列的LC-CDR1、包含SEQ ID NO: 13的氨基酸序列的LC-CDR2, 和包含SEQ ID NO: 14的氨基酸序列的LC-CDR3。

[0326] 实施例40. 根据实施例37到39中任一项所述的抗AB催化抗体, 其中所述抗AB催化抗体切割具有式EAR-AMC (SEQ ID NO: 1) 的底物。

[0327] 实施例41. 根据实施例37到40中任一项所述的抗AB催化抗体, 其中在所述 V_L 的位

置26处的所述氨基酸残基为S,在所述V_L的位置27D处的所述氨基酸残基为D、E或H,和/或在所述V_L的位置28处的所述氨基酸残基为D或N,并且其中所述编号是根据Kabat的EU索引。

[0328] 实施例42.根据实施例37到41中任一项所述的抗Aβ催化抗体,其中所述抗Aβ催化抗体包含:包含与SEQ ID NO:4、6、19或20的氨基酸序列具有至少约85%序列一致性的所述氨基酸序列的V_H;和/或包含与SEQ ID NO:5、7、8、21或22的所述氨基酸序列具有至少约85%序列一致性的氨基酸序列V_L。

[0329] 实施例43.根据实施例42所述的抗Aβ催化抗体,其中所述抗Aβ催化抗体包含:(i)包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的V_H和包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的V_L;(ii)包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的V_H和包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的V_L;(iii)包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的V_H和包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的V_L;(iv)包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的V_H和包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的V_L;(v)包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的V_H和包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的V_L;(vi)包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的V_H和包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的V_L;或(vii)包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的V_H和包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的V_L。

[0330] 实施例44.根据实施例37到43中任一项所述的抗Aβ催化抗体,其中所述抗Aβ催化抗体为全长IgG抗体。

[0331] 实施例45.根据实施例44所述的抗Aβ催化抗体,其中所述抗Aβ催化抗体包含IgG1或IgG4 Fc区。

[0332] 实施例46.根据实施例37到43中任一项所述的抗Aβ催化抗体,其中所述抗Aβ催化抗体为全长IgM抗体。

[0333] 实施例47.一种治疗或预防个体的阿尔茨海默氏病的方法,其包含向所述个体施用有效量的根据实施例37到46中任一项所述的抗Aβ催化抗体。

[0334] 实施例48.A用于治疗或预防个体的阿尔茨海默氏病的试剂盒,其包含:

[0335] a) 包含所述氨基酸序列(EAR)_n(SEQ ID NO:2)的底物肽,其中n为介于1与30之间的整数;

[0336] b) Aβ肽;和

[0337] c) 与总Ig特异性结合的抗体。

[0338] 实施例49.根据实施例48所述的试剂盒,其还包含固体支持物。

[0339] 实施例50.根据实施例48或49所述的试剂盒,其还包含与Aβ特异性结合的治疗性催化抗体。

[0340] 实例

[0341] 以下实例仅旨在为本发明的示例,并且因此不应视为以任何方式限制本发明。以下实例和详细描述是为了说明,而非为了限制而提供。

[0342] 实例1.作为阿尔茨海默氏病的血清生物标志物的催化抗体

[0343] 此实例提供实验数据,其展示SHD催化抗体(即,具有“SHD”基序的催化抗体)可用作血清生物标志物,以诊断或预测蛋白聚集疾病(PAD),如阿尔茨海默氏病(AD)。

[0344] A.在年轻和老年成人的血清样本中的催化抗体水平

[0345] 使用两种免疫测定测量年轻成人(20到29岁;HS2、HS6、HS7和HS8)和老年成人(60到69岁HS1、HS3、HS4和HS5)的血清SHD催化抗体水平。在EAR-AMC结合测定中,ELISA板用与

7-氨基-4-甲基香豆素 (AMC) 结合的EAR肽 (SEQ ID NO:1) 包被 (“EAR-AMC”, 100X, Bachem Americas公司Cat号I-1575.0050)。在EAR3结合测定中, ELISA板用 (EAR)₃ (SEQ ID NO:3) 包被。

[0346] 简要地说, 每个ELISA板用在包被缓冲液 (0.2M碳酸钠-碳酸氢盐缓冲液, pH 9.4) 中最终浓度为约5μg/mL的相应肽包被, 100μL/孔在4℃下过夜。板用洗涤缓冲液 (PBST: 在磷酸缓冲液盐水 “PBS” 中的0.1% Tween-20) 洗涤三次。然后在室温下用封闭缓冲液 (在PBS中的1% BSA) 封闭板1小时, 并用洗涤缓冲液洗涤三次。向板的每个孔中添加100μL的相应血清样本 (25μg/mL或100μg/mL), 并且PBS充当阴性对照。在保温1小时之后, 然后将板用洗涤缓冲液洗涤三次。向板的每个孔添加100μL的与辣根过氧化物酶结合的针对人IgG的山羊多克隆抗体 (GAH-HRP; Abcam Cat号ab98605), 其以1:10,000稀释, 并且在室温下保温1小时并且被保护以免暴露于光。用显影缓冲液 (3.6mM Na₂HPO₄, 1.4mM NaH₂PO₄, 在pH 7.2下) 新制备HRP底物 (Amplex Red和H₂O₂), 并且将100μL的HRP底物添加到每个孔中并且保温1-5分钟。随后使用板读取器 (激发波长=530nm, 发射波长=590nm, 并且截止波长=570nm) 检测信号。

[0347] 图1A示出EAR-AMC结合测定的结果, 并且图1B示出EAR3结合测定的结果。在这两种测定中, 相较于老年成人组 (60-69岁) 4个血清样本中的3个, 人血清池 (HS池) 和年轻成人组 (20-29岁) 的4个血清样本中的3个具有较高的血清SHD催化抗体水平。此结果表明血清SHD催化抗体的减少可能是与年龄有关的事件, 并且SHD催化抗体的血清水平可用作生物标志物以预测蛋白聚集疾病。

[0348] B. 在催化抗体水平和Aβ特异性自身抗体水平之间的相关性

[0349] 接下来, 使用两种免疫测定确定来自健康个体 (HS1-8) 和阿尔茨海默氏病患者 (ALZ1-5) 的血清样本中催化抗体水平和Aβ特异性自身抗体水平。在EAR3结合测定中, ELISA板用 (EAR)₃ 肽 (SEQ ID NO:3) 以最终浓度5μg/mL包被。在Aβ结合测定中, ELISA板用生物素化淀粉样蛋白 (1-42) 肽以最终浓度1μg/mL包被。

[0350] 简单来说, 每个ELISA板用在包被缓冲液 (0.2M碳酸钠-碳酸氢盐缓冲液, pH 9.4) 中的相应肽包被, 100μL/孔在4℃下过夜。将板用洗涤缓冲液 (PBST) 洗涤三次。然后在室温下用封闭缓冲液 (10% 胎牛血清) 封闭板1小时, 并且用洗涤缓冲液洗涤三次。向板的每个孔添加100μL的相应血清样本 (100μg/mL), 并且PBS充当阴性对照。在保温1小时之后, 将板用洗涤缓冲液洗涤三次, 并且在室温下用封闭缓冲液封闭1小时。随后将板用洗涤缓冲液洗涤三次。向板的每个孔添加100μL GAH-HRP (Abcam Cat号ab98605), 其以1:10,000稀释, 并且在室温下保温1小时并且被保护以免暴露于光。用显影缓冲液 (3.6mM Na₂HPO₄, 1.4mM NaH₂PO₄, 在pH 7.2下) 新制备HRP底物 (Amplex Red和H₂O₂), 并且将100μL的HRP底物添加到每个孔中并且保温1-5分钟。随后使用板读取器 (激发波长=530nm, 发射波长=590nm, 并且截止波长=570nm) 检测信号。

[0351] 图2示出 (EAR)₃ 和Aβ结合测定的结果。相较于健康个体, 5个AD患者中的4个的催化抗体和Aβ特异性自身抗体血清含量显著降低。此结果表明血清SHD催化抗体水平和Aβ特异性自身抗体水平的共同减少可用作AD诊断的生物标志物。

[0352] 实例2. 抗Aβ催化抗体的设计和表征

[0353] 此实例基于特异性结合Aβ的3D6, 非催化抗体描述抗Aβ催化抗体的设计和表征。

[0354] A. 3D6-D的设计

[0355] 先前研究已发现人IgM自身抗体经由丝氨酸蛋白酶样机制水解A β 。脑和周围的A β 彼此平衡。周围A β 水解可诱导脑A β 储存耗尽,而IgM不穿过BBB。然而,IgM介导先天免疫应答,通常具有对靶抗原的较低的亲和力,并且更难以制造。因此,我们寻求工程化可水解A β 的IgG催化抗体。

[0356] 已知SHD催化抗体具有为轻链可变区(V_L)的SHD基序。参见,Gao QS等人“蛋白水解抗体轻链的位点定向突变诱发(Site-directed mutagenesis of proteolytic antibody light chain)”《分子生物学杂志》253(5):658(1995)。因此,我们将公布的若干A β 特异性IgG非催化抗体的 V_L 序列与公布的催化抗体的 V_L 序列比对。我们发现除具有“SHY”而不是“SHD”基序以外,鼠版本的贝频珠单抗,3D6,与其它公布的催化抗体 V_L 序列,尤其与抗UA15 V_L 序列具有高同源性(Planque SA等人“对转甲状腺素蛋白淀粉样蛋白有选择性的生理IgM类别催化抗体(Physiological IgM Class Catalytic Antibodies Selective for Transthyretin Amyloid)”《生物化学杂志》,289(19):13243-13258(2014))。抗UA15(催化抗体)、抗VP(催化抗体)和3D6(抗A β 非催化抗体)的 V_L 的序列比对结果在图3中示出。

[0357] 通过用D置换在3D6的 V_L 的位置1处的Y残基工程化3D6-D抗体,并且重组表达和纯化。图4示出3D6-D和3D6(即,3D6-Y)抗体和其人源化形式的还原和非还原凝胶电泳。3D6-D催化抗体的序列在表2中示出。

[0358] B. 3D6-D的催化活性

[0359] 在EAR-AMC催化功能测定中评估3D6-D抗体的催化活性。简单来说,ELISA板的每个孔用(100X,Bachem Americas公司Cat号I-1575.0050)包被,其以1:100稀释。3D6-D(400ng/ml)、3D6-Y(400ng/mL)、胰蛋白酶(0.25%胰蛋白酶-EDTA,以1:10,000稀释)各自与在PBS缓冲液中的酶测定缓冲液(50mM Tris-HCl,pH 7.7,0.1M甘氨酸,0.025%Tween-20)和EAR-AMC(100 μ M)混合。PBS缓冲液用作阴性对照,而IgG1用作同种型对照。将混合物转移到ELISA板的不同孔,其紧密地密封并且在37 $^{\circ}$ C下保温20小时或68小时。在保温结束时,使用板读取器(激发波长=360nm,发射波长=470nm,并且截止波长=455nm)检测信号。EAR-AMC为SHD催化抗体的底物,其在Arg和AMC之间的共价结合处切割EAR-AMC,由此释放AMC。

[0360] EAR-AMC催化功能测定的结果在图4中示出。3D6-D示出强的切割活性,但是野生型3D6抗体(具有Y残基)未切割EAR-AMC底物。

[0361] C. 3D6-D的A β -结合

[0362] 使用分别如在实例1中所描述的EAR3结合测定和A β 结合测定确定3D6-、3D6或同种型对照(IgG1)与(EAR)₃和A β 的结合。将每种抗体以100 μ g/mL的浓度添加到ELISA板的孔中。如图6所示,3D6-D具有与3D6抗体可比较的(EAR)₃和A β 结合活性,这表明3D6-D为对A β 的高亲和力IgG1催化抗体。

[0363] D. 3D6-D的人源化

[0364] 为了降低3D6-D催化抗体的免疫原性,通过将3D6-D的CDR移植到人抗体框架序列中来生产人源化的催化抗体。进一步引入人抗体框架序列向原始小鼠序列的回复突变,以维持人源化抗体的亲和力并促进抗体的进一步开发。此外,可支持SHD基序催化功能的SHD基序和其它残基(例如图3中的标志“#”的残基)和/或维持SHD基序的构象结构向原始小鼠序列的回复突变。示例性人源化3D6-D抗体序列在表2中示出。

[0365] 使用A β 结合测定确定人源化3D6-D催化抗体与A β 的结合亲和力。简单来说,ELISA

板用在A缓冲液(0.2M碳酸钠-碳酸氢盐缓冲液,pH 9.4)中以1 μ g/mL的AB(1-42)肽包被,100 μ L/孔在4 $^{\circ}$ C下过夜。去除AB肽,并且将板用250 μ L/孔的洗涤缓冲液(PBST)洗涤三次。然后将板在室温下用200 μ L/孔的封闭缓冲液(在PBST中的1%BSA)封闭1小时,并且用250 μ L/孔的洗涤缓冲液洗涤两次。向板的每个孔添加100 μ L的抗体样本(在3ng/mL到20 μ g/mL的范围内3X连续稀释)并且在室温下保温1小时。测试的样本包括3D6-D、人源化3D6-Y(贝频珠单抗)、hu3D6-D H1L1、hu3D6-D H1L2和3D6-Y。然后将板用250 μ L/孔的洗涤缓冲液洗涤三次。向板的每个孔添加100 μ L山羊抗人IgG-HRP(Jackson Immun.Cat.号109-035-003),其在测定缓冲液(0.1%BSA/PBST)中以1:2,000稀释,并且在室温下保温1小时。然后将板用250 μ L/孔的洗涤缓冲液洗涤三次。用显影缓冲液(3.6mM Na₂HPO₄,1.4mM NaH₂PO₄,在pH 7.2下)新制备HRP底物(Amples Red和H₂O₂),并且将100 μ L的HRP底物添加到每个孔中并且保温1-60分钟。随后使用板读取器(激发波长=530nm,发射波长=590nm,并且截止波长=570nm)检测信号。

[0366] 如图7所示,人源化3D6-D催化抗体(hu3D6-D H1L1和hu3D6-D H1L2)具有与AB,如贝频珠单抗可比较的结合亲和力。

[0367] E. 3D6-D变体的噬菌体文库淘选

[0368] 针对AB淘选具有3D6-D的人种系V_H和人源化V_L序列的人scFv/Fab噬菌体文库,以选择人源化抗AB催化scFv或Fab。噬菌体文库中的HC-CDR序列是随机的。基于对AB的高特异性选择scFv或Fab。使用实施例2中描述的EAR-AMC催化功能测定评估所选择的scFv和Fab的催化活性。选择的抗ABscFv和Fab用于制备全长IgG(例如IgG1或IgG4)催化抗体。

[0369] 实例3.确定在阿尔茨海默氏病(AD)患者的人血清中抗AB自身抗体和SHD催化抗体水平

[0370] 进行此实验以检测在阿尔茨海默氏病(AD)患者对健康个体的血清中抗AB自身抗体水平和SHD催化抗体(识别(EAR)₃肽)水平。

[0371] 在此测定中使用的30个AD血清样本包括25个新AD患者血清样本和5个来自实例1的旧的AD患者血清样本。8个健康供体血清(HS)样本来自年轻人(20到29岁;HS2、HS6、HS7和HS8)和老年人(60到69岁;HS1、HS3、HS4和HS5),如在实例1中所使用。一个合并的健康供体血清样本充当阳性对照(NHS;创新研究)。PBS充当阴性对照。总共40个测试样本在16000g下离心10分钟,并且收集上清液用于ELISA测定。每个样本重复测试两次。

[0372] 在EAR3结合测定中,ELISA板用(EAR)₃(SEQ ID NO:3)包被。将(EAR)₃储备液(5mg/mL)用包被缓冲液(0.2M碳酸钠-碳酸氢盐缓冲液,pH 9.4)稀释100倍,其中最终浓度为50 μ g/mL,包被100 μ L/孔,4 $^{\circ}$ C过夜。在AB结合测定中,ELISA板在包被缓冲液(0.2M碳酸钠-bicarbonate缓冲液,pH 9.4)中以2 μ g/mL的最终浓度(1mg/mL储备液稀释500倍)用生物素化淀粉样蛋白(1-42)肽包被,100 μ L/孔,4 $^{\circ}$ C过夜。每次将板用200 μ L洗涤缓冲液(PBST:在磷酸缓冲液盐水“PBS”中0.1%Tween-20)洗涤三次。然后在室温下将板用封闭缓冲液(在PBST中1%BSA)封闭2小时,并且每次用200 μ L洗涤缓冲液(PBST)洗涤三次。向板的每个孔添加100 μ L的相应测试样本,PBS以1:100稀释。对于每个肽靶,所有样本均一式两份进行测试。参见图9A用于加载设计。在4 $^{\circ}$ C保温过夜之后,然后每次板用200 μ L洗涤缓冲液(PBST)洗涤三次。向板的每个孔添加100 μ L的与辣根过氧化物酶结合的针对人IgG的山羊多克隆抗体(GAH-HRP;Abcam Cat号ab98605),其在封闭缓冲液(在PBST中1%BSA)中以1:5000稀释,并且在室

温下保温1小时,被保护以免暴露于光。然后将板每次用200 μ L洗涤缓冲液(PBST)洗涤三次。用显影缓冲液(3.6mM Na_2HPO_4 , 1.4mM NaH_2PO_4 , 在pH 7.2下)新制备HRP底物(Amplex Red和 H_2O_2): 20mL显影缓冲液+26.6 μ L Amplex Red+6.6 μ L H_2O_2 。将100 μ L的制备的HRP底物添加到每个孔中并且保温1-5分钟。随后分别在1分钟、5分钟、10分钟、20分钟、30分钟和60分钟处使用板读取器(激发波长=530nm, 发射波长=590nm, 并且截止波长=570nm)检测信号。来自合并的人血清和8位健康供体的血清样本的平均读数充当对照。“对照%”被计算为(AD样本的读数)除以(合并的人血清和8位健康供体的血清的平均读数), 参见图8。图8的表和条形图基于图9B-9C中的读数产生。

[0373] 如从图9B-9C可看出, 结合测定均能很好地工作, 因为阳性对照的读数(合并的健康人血清)比PBS阴性对照高得多(对于 $\text{A}\beta$ 结合高于80倍, 对于 $(\text{EAR})_3$ 结合高于100倍)。

[0374] 如从图8、9B和9C可看出, 约70%的AD患者具有相较于对照较低的血清抗 $\text{A}\beta$ 自身抗体的水平, 并且约86.7%的AD患者具有较低的血清SHD催化抗体的水平, 相较于对照, 所述SHD催化抗体识别 $(\text{EAR})_3$ 肽。这些数据表明血清抗 $\text{A}\beta$ 自身抗体和SHD催化抗体的共同减少可用作AD诊断和预后的良好生物标志物。

序列表

SEQ ID NO: 1 (底物肽氨基酸序列; AMC = 7-氨基-4-甲基香豆素)

EAR-AMC

SEQ ID NO: 2 (底物肽氨基酸序列; n = 1-30)

(EAR)_n

SEQ ID NO: 3 (底物肽氨基酸序列)

EAREAREAR

SEQ ID NO: 4 (抗 A β 催化抗体 3D6 VH 氨基酸序列; CDR 为带下划线的)

EVKLVESGGGLVKPGASLKLSAASGFTFSNYGMSWVRQNSDKRLEWVASIRSGGGRTYYSDNVK
GRFTISRENAKNTLYLQMSSLKSEDTALYYCVRYDHYSGSSDYWGQGT_{TV}TVSS

SEQ ID NO: 5 (抗 A β 催化抗体 3D6-D VL 氨基酸序列; CDR 为带下划线的)

DVVMQTPTLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLVSKLDSGVPDRF
TSGSGSGTDFTLKISRIEAEDLGLYYCWQGTHPRTFGGGTKLEIKR

SEQ ID NO: 6 (抗 A β 催化抗体 hu3D6-D VHv1 “H1” 氨基酸序列; CDR 为带下划线的)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQAPDKRLEWVASIRSGGGRTYYSDNVK
GRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTALYYCVRYDHYSGSSDYWGQGT_{LV}TVSS

SEQ ID NO: 7 (抗 A β 催化抗体 hu3D6-D VLv1 “L1” 氨基酸序列; CDR 为带下划线的)

DVVMQTQSPLSLPVTLGEPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLVSKLDSGVPDRF
SGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHPRTFGGGTKLEIKR

SEQ ID NO: 8 (抗 A β 催化抗体 hu3D6-D VLv2 “L2” 氨基酸序列; CDR 为带下划线的)

DVVMQTQSPLSLPVTLGEPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLVSKLDSGVPDRF
SGSGSGTDFTLKISRIEAEDVGLYYCWQGTHPRTFGGGTKLEIKR

SEQ ID NO: 9 (抗 A β 催化抗体 HC-CDR1 氨基酸序列)

NYGMS

SEQ ID NO: 10 (抗 A β 催化抗体 HC-CDR2 氨基酸序列)

SIRSGGGRTYYSDNVKG

SEQ ID NO: 11 (抗 A β 催化抗体 HC-CDR3 氨基酸序列)

YDHYSGSSDY

SEQ ID NO: 12 (抗 A β 催化抗体 LC-CDR1 氨基酸序列)

KSSQSLLDSDGKTYLN

SEQ ID NO: 13 (抗 A β 催化抗体 LC-CDR2 氨基酸序列)

LVSKLDS

SEQ ID NO: 14 (抗 A β 催化抗体 LC-CDR3 氨基酸序列)

WQGTHPRT

SEQ ID NO: 15 (IgG1 重链恒定区氨基酸序列)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS

[0375]

VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 16 (IgG4 重链恒定区氨基酸序列)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPSCPAEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVDVSDQEDPEVFQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO: 17 (轻链 κ 恒定区氨基酸序列)

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 18 (轻链 λ 恒定区氨基酸序列)

QPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNKYA
ASSYLSLTPEQWKSHRYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

SEQ ID NO: 19 (抗 A β 催化抗体 hu3D6-D VHv2 “H2” 氨基酸序列; CDR 为带下划线的)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQASDKRLEWVASIRSGGGRTYYSDNVK
GRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTALYYCVRYDHYSGSSDYWGQGLTVTVSS

[0376]

SEQ ID NO: 20 (抗 A β 催化抗体 hu3D6-D VHv3 “H3” 氨基酸序列; CDR 为带下划线的)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQNSDKRLEWVASIRSGGGRTYYSDNVK
GRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTALYYCVRYDHYSGSSDYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 21 (抗 A β 催化抗体 hu3D6-D VLv3 “L3” 氨基酸序列; CDR 为带下划线的)

DVVMQTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPRRLIYLVSKLDSGVPDRF
SGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTDFPRTFGGGTKVEIKR

SEQ ID NO: 22 (抗 A β 催化抗体 hu3D6-D VLv4 “L4” 氨基酸序列; CDR 为带下划线的)

DVVMQTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPRRLIYLVSKLDSGVPDRF
SGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTDFPRTFGGGTKVEIKR

SEQ ID NO: 23 (抗 A β 催化抗体 3D6 VL 氨基酸序列; CDR 为带下划线的)

YVVMQTQPTLTLVTIGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLVSKLDSGVPDRF
TGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGLYYCWQGTDFPRTFGGGTKLEIKR

SEQ ID NO: 24 (贝频珠单抗 VH 氨基酸序列; CDR 为带下划线的)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQAPGKGLEWVASIRSGGGRTYYSDNVK
GRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCVRYDHYSGSSDYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 25 (贝频珠单抗 VL 氨基酸序列; CDR 为带下划线的)

YVVMQTQSPLSLPVTGPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQKPGQSPQRLIYLVSKLDSGVPDRF
SGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTDFPRTFGGGTKVEIKR

序列表

<110> AB工作室公司 (AB STUDIO INC.)
<120> 催化抗体和其使用方法
<130> 79270-20001.40
<140> Not Yet Assigned
<141> Concurrently Herewith
<150> US 62/765,150
<151> 2018-08-17
<160> 25
<170> FastSEQ for Windows Version 4.0
<210> 1
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> 3
<223> 与7-氨基-4-甲基香豆素结合
<400> 1
Glu Ala Arg
1
<210> 2
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> (1) ... (3)
<223> 可存在于1-30个重复序列中
<400> 2
Glu Ala Arg
1
<210> 3
<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 3

Glu Ala Arg Glu Ala Arg Glu Ala Arg

1 5

<210> 4

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 4

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr

20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Asn Ser Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Ser Ile Arg Ser Gly Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser Asp Asn Val

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys

85 90 95

Val Arg Tyr Asp His Tyr Ser Gly Ser Ser Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 5

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 5

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

1 5 10 15

Gln	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Asp	Ser
20				25				30							
Asp	Gly	Lys	Thr	Tyr	Leu	Asn	Trp	Leu	Leu	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Ser
35				40				45							
Pro	Lys	Arg	Leu	Ile	Tyr	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Asp	Ser	Gly	Val	Pro
50				55				60							
Asp	Arg	Phe	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile
65				70				75				80			
Ser	Arg	Ile	Glu	Ala	Glu	Asp	Leu	Gly	Leu	Tyr	Tyr	Cys	Trp	Gln	Gly
85				90				95							
Thr	His	Phe	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
100				105				110							

Arg

<210> 6

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 6

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

<210> 7

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 7

```

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

```

Arg

<210> 8

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 8

```

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

```

	100	105	110
Arg			
<210> 9			
<211> 5			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成构建体			
<400> 9			
Asn Tyr Gly Met Ser			
1	5		
<210> 10			
<211> 17			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成构建体			
<400> 10			
Ser Ile Arg Ser Gly Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser Asp Asn Val Lys			
1	5	10	15
Gly			
<210> 11			
<211> 10			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成构建体			
<400> 11			
Tyr Asp His Tyr Ser Gly Ser Ser Asp Tyr			
1	5	10	
<210> 12			
<211> 16			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成构建体			
<400> 12			
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn			
1	5	10	15

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 13

Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser

1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 14

Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Arg Thr

1 5

<210> 15

<211> 330

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 15

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 16

<211> 327

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 16

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

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

<210> 17

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 17

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

<210> 18

<211> 105

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 18

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

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100 105

<210> 19

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 19

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Ser Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Ser Ile Arg Ser Gly Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser Asp Asn 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 Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95
Val Arg Tyr Asp His Tyr Ser Gly Ser Ser Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 20

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 20

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Asn Ser Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Ser Ile Arg Ser Gly Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser Asp Asn Val

<400> 22

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

Arg

<210> 23

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 23

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

Arg

<210> 24

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 24

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

<210> 25

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 25

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

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

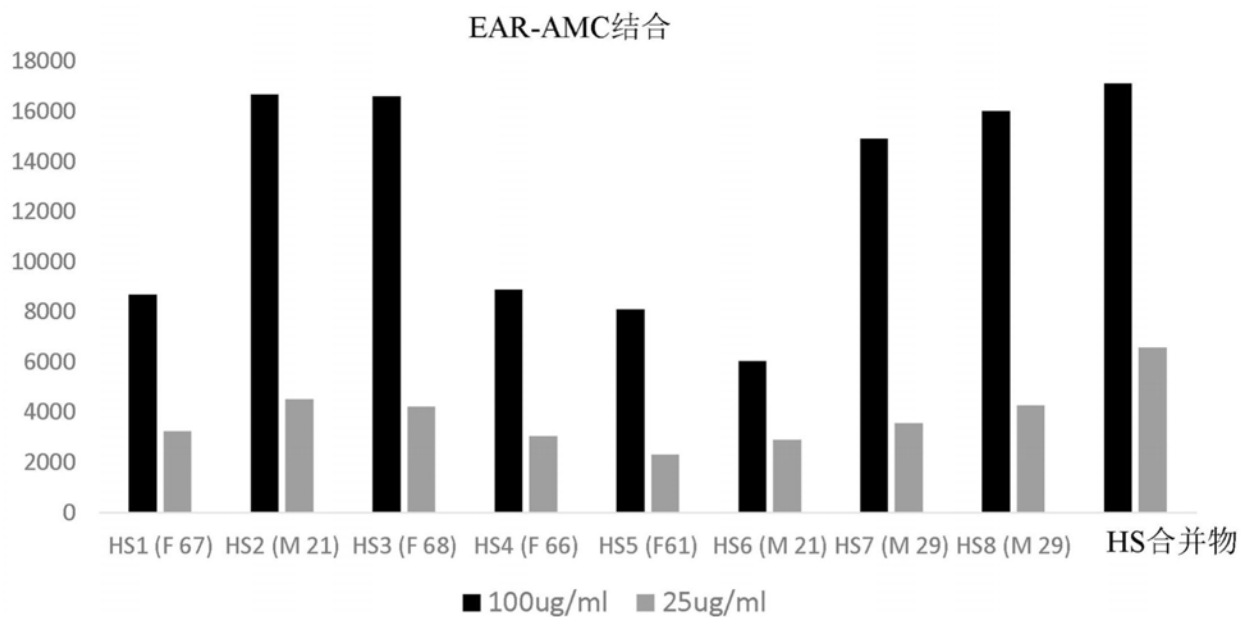


图1A

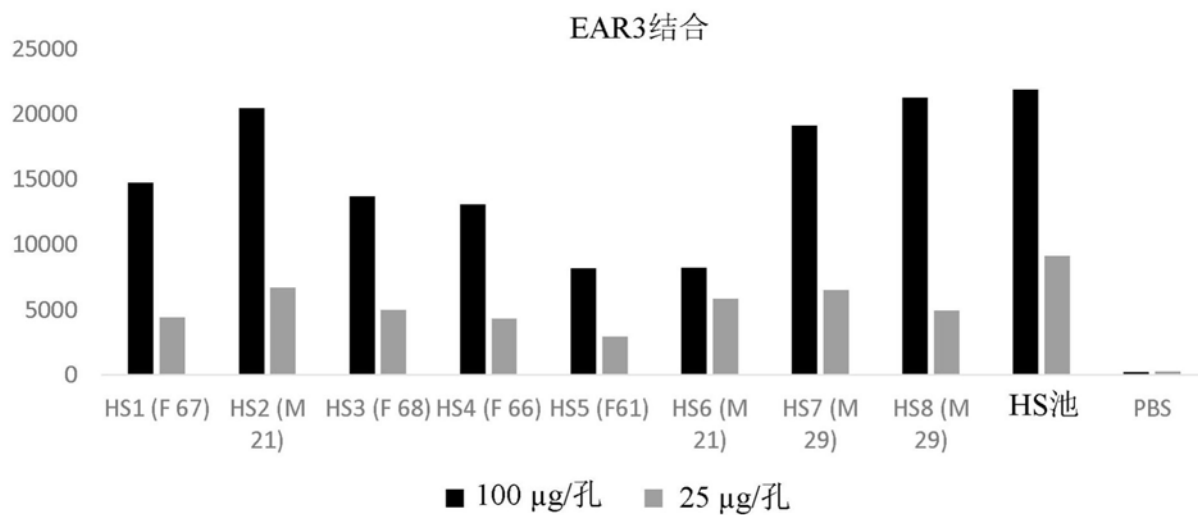


图1B

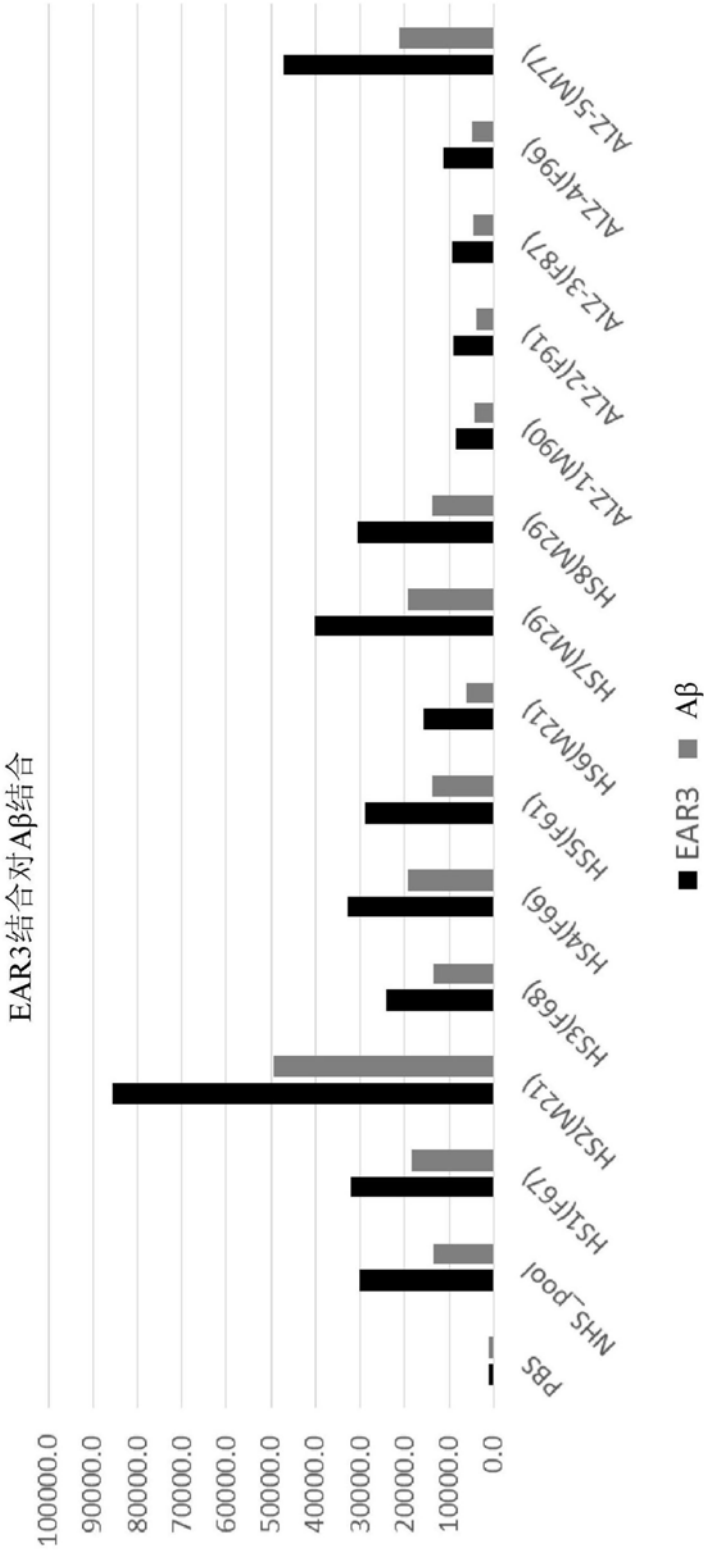


图2

大多数	DVVM	QTPL	TL	SVTI	GQPASI	SCKSSQ	SLLD	SDSGKTYL	NWML	QRP	GQSPKRLI	YLVSKLD
	*					#	*	#				
		10			20			30		40		50
												60
抗UA 15VL	DVVM	QTPL	TL	SVTI	GQPASI	SCKSSQ	SLLD	SDSGKTYL	NWML	QRP	GQSPKRLI	YLVSKLD
抗V P VL	DVVM	QTPL	TL	SVTI	GQPASI	SCKSSQ	SLLD	HTD	SGKTYL	NWML	QRP	GQSPKRLI
3D6V L蛋白	YVVM	QTPL	TL	SVTI	GQPASI	SCKSSQ	SLLD	SDSGKTYL	NWML	QRP	GQSPKRLI	YLVSKLD

大多数	SGVPDR	FTGSG	SGTDFTLKI	SRVEA	EDLGVYYC	WQGTHFPQT	FGG	TKLEIKR
		70		80		90		100
						*		110
抗UA 15VL	SGVPDR	FTGSG	SGTDFTLKI	SRVEA	EDLGVYYC	WQGTHFPQT	FGG	TKLEIKR
抗V P VL	SGVPDR	FTGSG	SGTDFTLKI	SRVEA	EDLGVYYC	WQGTHFPQT	FGG	TKLEIKR
3D6V L蛋白	SGVPDR	FTGSG	SGTDFTLKI	SR	EAEDLGLYYC	WQGTHFP	R	FGG

*SHD基序

#可支持催化抗体功能的残基

图3

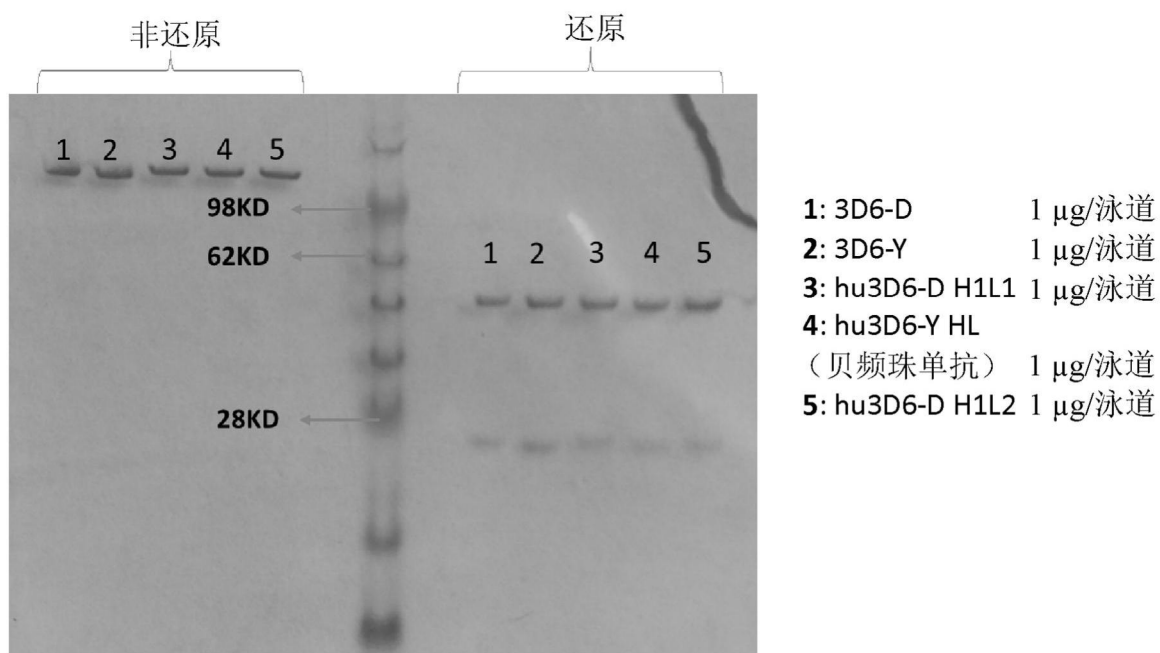


图4

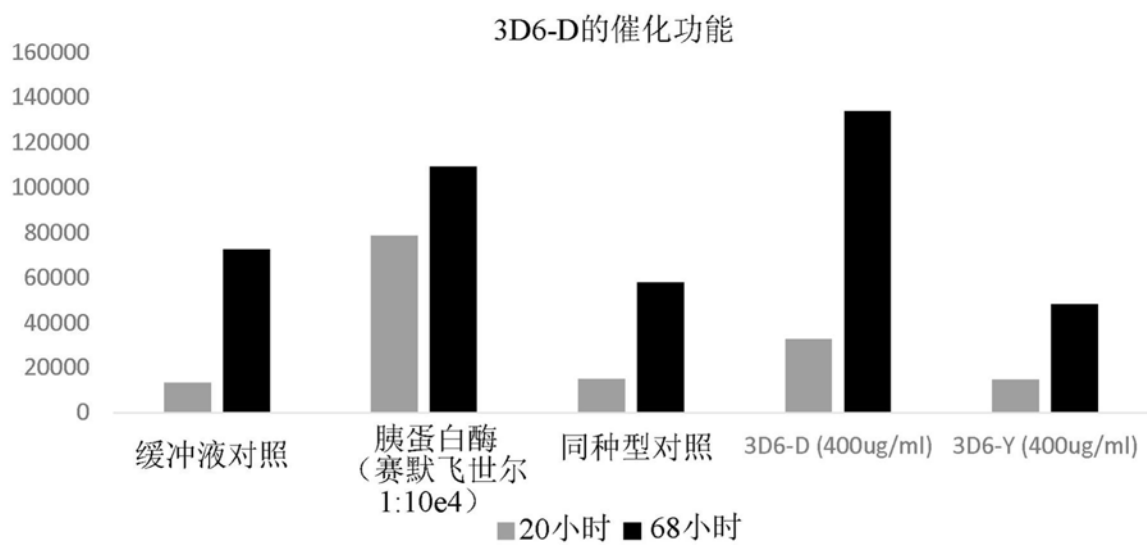


图5

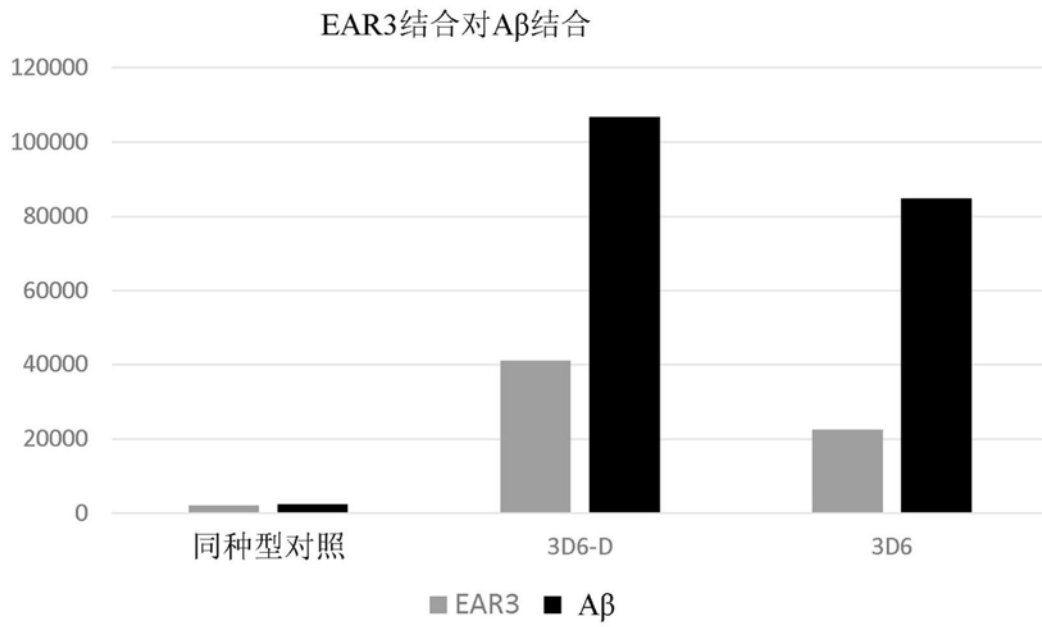


图6

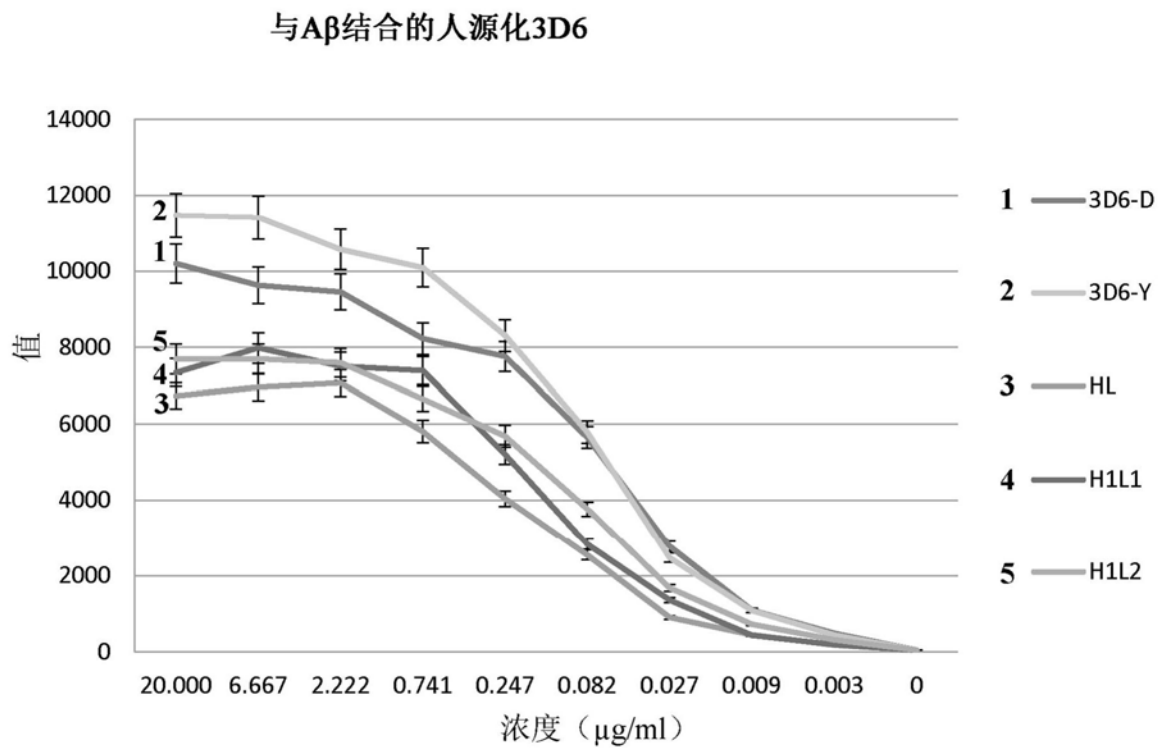
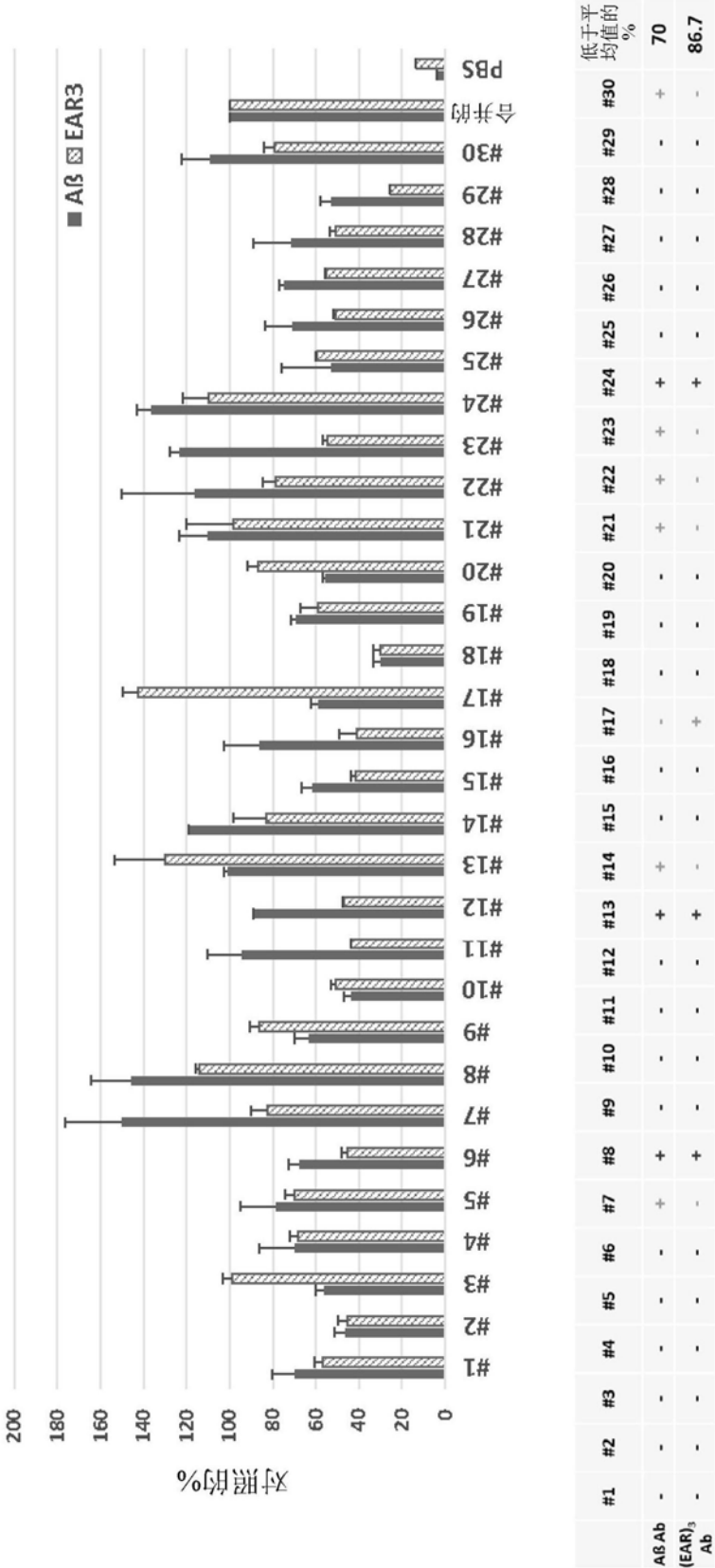


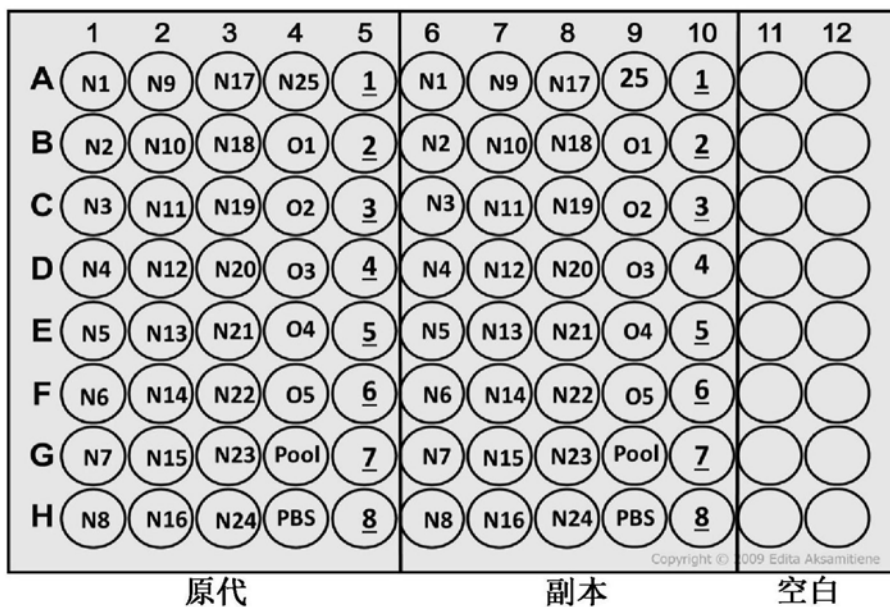
图7

AD患者的血清中SHD催化抗体和抗Aβ自身抗体水平



+：血清水平高于健康供体和合并的血清样本的血清水平
-：血清水平低于健康供体和合并的血清样本的血清水平

图8



1-25（泳道1-3 + A4，泳道6-8 + A9）：新的AD血清样本

1-5（泳道4，泳道9）：旧的AD血清样本

池：合并的来自健康人的血清样本

1-8（泳道5，泳道10）：健康人血清样本

图9A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	9286	8160	7350	6011	11753	7519	7092	6833	6737	15593	9	8
B	5997	5525	3867	8327	8015	5101	5023	3348	8750	10127	7	10
C	6420	12688	8530	8800	6770	7059	9951	8179	9197	6458	10	7
D	9779	10665	6778	8104	8892	6936	10544	6581	9074	11856	12	10
E	10841	12266	14327	6081	11118	8097	12039	12138	6570	12006	11	10
F	8532	14267	11081	12343	6992	7720	14275	16807	13831	9256	8	15
G	20232	6974	15196	14274	6292	15784	7794	14426	15050	6919	4	9
H	19067	9029	15822	417	11088	15940	11736	16927	387	12545	6	8

图9B

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	35776	53901	89004	39028	55688	32711	50382	82550	33009	55823	0	-1
B	29302	31641	19445	32800	64531	25609	29673	16858	28662	65251	2	-2
C	61349	26369	38987	35746	21249	57690	26162	32357	30529	20749	1	1
D	42875	28517	54333	32770	44931	39348	27799	50259	28509	47002	1	3
E	44084	88439	68478	16034	76852	40230	68557	49798	14612	76957	-1	1
F	28578	56464	49953	49637	22578	25960	43564	45129	45709	18169	-1	3
G	53112	25912	33975	66919	46255	46549	24110	32131	56263	46078	-3	-1
H	68264	28254	71251	8103	104107	69622	21390	60776	8452	92201	-4	2

图9C