



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I608014 B

(45)公告日：中華民國 106 (2017) 年 12 月 11 日

(21)申請案號：103133840

(22)申請日：中華民國 96 (2007) 年 07 月 13 日

(51)Int. Cl. : C07K16/00 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P25/28 (2006.01)

(30)優先權：2006/07/14 歐洲專利局 06014730.3

2006/10/02 歐洲專利局 06020765.1

2007/06/12 美國 60/943,499

(71)申請人：A C 免疫公司 (瑞士) AC IMMUNE S.A. (CH)

瑞士

建南德克公司 (美國) GENENTECH, INC. (US)

美國

(72)發明人：菲弗 安得瑞 PFEIFER, ANDREA (DE)；皮爾格蘭 瑪利亞 PIHLGREN, MARIA

(SE)；慕斯 安卓斯 MUHS, ANDREAS (DE)；華茲 萊恩 WATTS, RYAN (US)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

WO 03/039467A2

WO 2004/071408A2

審查人員：施雅儀

申請專利範圍項數：23 項 圖式數：18 共 146 頁

(54)名稱

抗 β -類澱粉抗體或其抗原結合片段、其用途及使用方法

ANTI-BETA-AMYLOID ANTIBODIES OR ANTIGEN-BINDING FRAGMENTS THEREOF, THE USE AND METHOD OF USE THEREOF

(57)摘要

本發明係關於嵌合及人類化抗體，及用於治療及診斷與類澱粉蛋白相關的類澱粉變性、病症及異常如阿茲海默氏症(Alzheimer's disease)之方法及組合物。

The present invention is related to chimeric and humanized antibody and to methods and compositions for the therapeutic and diagnostic use in the treatment of amyloidosis, a group of disorders and abnormalities associated with amyloid protein such as Alzheimer's disease.

指定代表圖：

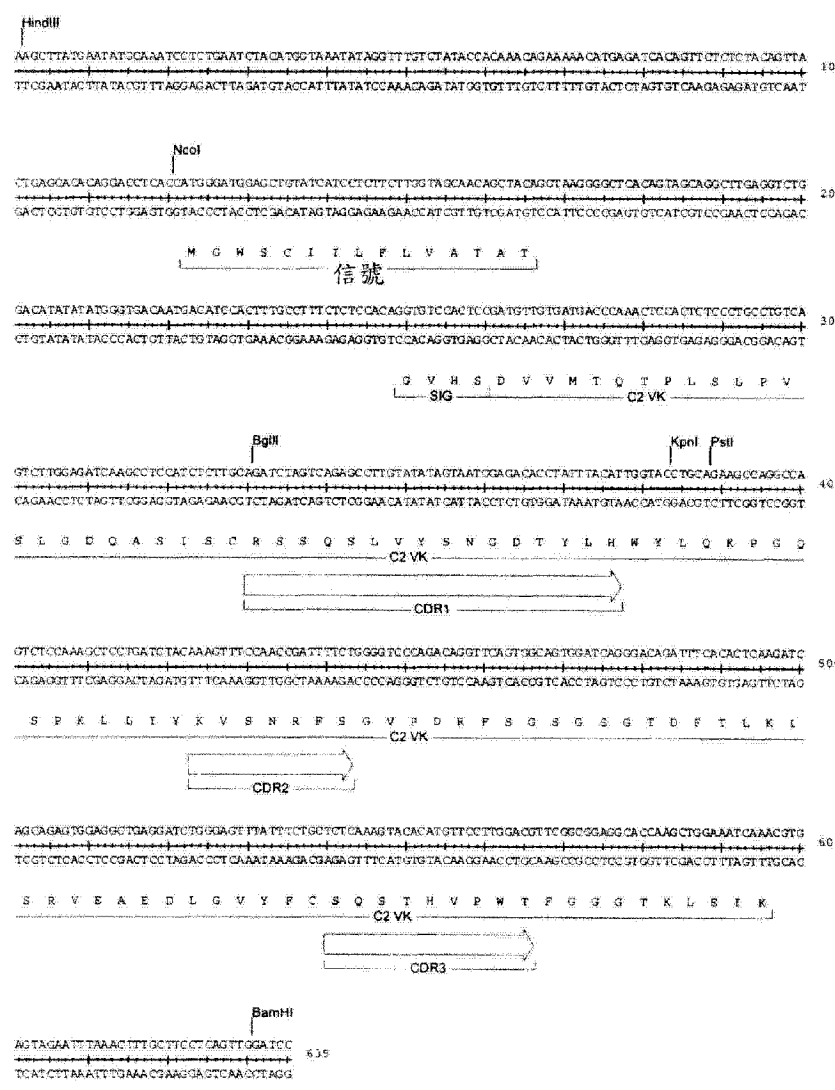


圖 1



【序列表】

<110> 1.瑞士商AC免疫公司 2.美商建南德克公司

<120> 人類化抗體

<130> M1967 EP S3

<140> 096125691

<141> 2007-07-13

<150> 06014730.3 / 06020765.1 / 60/943,499

<151> 2006-07-14 / 2006-10-02 / 2007-06-12

<160> 32

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> 小白鼠

<220>

<223> C2 HuVH AF 4 人類化重鏈可變區(CDR1)

<400> 1

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

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> 小白鼠

<220>

<223> C2 HuVH AF 4 人類化重鏈可變區(CDR2)

<400> 2

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

Gly

<210> 3

<211> 3

<212> PRT

<213> 小白鼠

<220>

<223> C2 HuVH AF 4 人類化重鏈可變區(CDR3)

<400> 3

Gly Asp Tyr
1

<210> 4

<211> 16

<212> PRT
<213> 小白鼠

<220>
<223> C2 HuVK 1 人類化輕鏈可變區(CDR1)

<400> 4

Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Val	Tyr	Ser	Asn	Gly	Asp	Thr	Tyr	Leu	His
1				5					10					15	

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> 小白鼠

<220>
<223> C2 HuVK 1 人類化輕鏈可變區(CDR2)

<400> 5

Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser
1				5		

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> 小白鼠

<220>
<223> C2 HuVK 1 人類化輕鏈可變區(CDR3)

<400> 6

Ser	Gln	Ser	Thr	His	Val	Pro	Trp	Thr
1				5				

<210> 7
<211> 6
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<223> Aβ抗原決定基，區2

<400> 7

Val	Phe	Phe	Ala	Glu	Asp
1				5	

<210> 8
<211> 5
<212> PRT
<213> 智人

<220>

<223> Aβ抗原決定基，區1

<400> 8

His Gln Lys Leu Val
1 5

<210> 9

<211> 6

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Xaa可為Ala、Val、Leu、正白胺酸、Met、Phe或Ile

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> Xaa可為Ala、Val、Leu、Ser或Ile

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> Xaa可為Glu或Asp

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> Xaa可為Glu或Asp

<400> 9

Xaa Phe Phe Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 10

<211> 5

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Xaa可為His、Asn、Gln、Lys或Arg

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa可為Asn或Gln

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(5)
 <223> Xaa可為Ala、Val、Leu、正白胺酸、Met、Phe或Ile

<400> 10

Xaa Xaa Lys Leu Xaa
 1 5

<210> 11
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 智人

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa可為His、Asn、Gln Lys或Arg

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa可為Asn或Gln

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa可為Ala、Val、Leu、正白胺酸、Met、Phe或Ile

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa可為Ala、Val、Leu、Ser或Ile

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa可為Glu或Asp

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa可為Glu或Asp

<400> 11

Xaa Xaa Lys Leu Xaa Phe Phe Xaa Xaa Xaa
 1 5 10

<210> 12
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 人工人類化之 C2 HuVK 1 可變輕鏈

<400> 12

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

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

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

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

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

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

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

<210> 13

<211> 219

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工人類化之 C2 輕鏈

<400> 13

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 14
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工人類化之C2輕鏈恆定區

<400> 14

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

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

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

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

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

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

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

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

<220>
<223> 人工人類化之 C2 HuVH AF 4 可變重鏈

<400> 15

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

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

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

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

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

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

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

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

<220>

<223> 人工人類化之C2重鏈

<400> 16

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	225	230	235	240
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	245	250	255	
Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	260	265	270	
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	275	280	285	
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	290	295	300	
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	305	310	315	320
Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	325	330	335	
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	340	345	350	
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	355	360	365	
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	370	375	380	
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	385	390	395	400
Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	405	410	415	
Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	420	425	430	
Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys										435			

<210> 17
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> 智人

<220>

<223> 經修飾之IG γ -4鏈C區

<400> 17

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly
325

<210> 18
<211> 51
<212> DNA
<213> 小白鼠

<220>
<223> C2 HuVH AF 4 人類化重鏈可變區(CDR2)

<400> 18
agcatcaata gtaatggtgg tagcacctat tatccagaca gtgtgaaggg c 51

<210> 19
<211> 9
<212> DNA
<213> 小白鼠

<220>
<223> C2 HuVH AF 4 人類化重鏈可變區(CDR3)

<400> 19
ggtgactac 9

<210> 20
<211> 49
<212> DNA
<213> 小白鼠

<220>

<223> C2 HuVK 1 人類化輕鏈可變區(CDR1)

<400> 20

agatctagtc agagccttgt atatagtaat ggagacacct atttacatt 49

<210> 21

<211> 635

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工人類化之 C2 Hu VK 1 可變輕鏈

<400> 21

gatattgtga tgacccaatc tccactctcc ctgcctgtca ctcttggtga gcctgcctcc 60

atctcttgca gatctagtca gagccttgta tatagtaatg gagacaccta tttacattgg 120

tacctgcaga agccaggcca gtctccacag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180

tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240

agcagagtgg aggctgagga tgtgggagtt tattactgct ctcaaagtac acatgttcct 300

tggacgttcg gccaaaggcac caaggtggaa atcaaaa 336

<210> 22

<211> 657

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工人類化之C2輕鏈

<400> 22

gatattgtga tgacccaatc tccactctcc ctgcctgtca ctcttggtga gcctgcctcc 60

atctcttgca gatctagtca gagccttgta tatagtaatg gagacaccta tttacattgg 120

tacctgcaga agccaggcca gtctccacag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180

tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240

agcagagtgg aggctgagga tgtgggagtt tattactgct ctcaaagtac acatgttcct 300

tggacgttcg gccaaaggcac caaggtggaa atcaaaaagga ctgtggctgc accatctgtc 360

ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420

ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtggga aggtggataa cgccctccaa 480

tcgggtaact ccagagagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540

agcagcacc tgacgtgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600

gtcaccatc agggcctgag ctgcctcgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt 657

<210> 23
<211> 321
<212> DNA
<213> 智人

<220>
<223> 人工人類化之C2輕鏈恆定區

<400> 23
aggactgtgg ctgcaccatc tgtcttcac tcctccgccat ctgatgagca gttgaaatct 60
ggaactgcct ctgttggtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag 120
tggaaggtgg ataacgcct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180
agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240
aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag 300
agcttcaaca ggggagagtg t 321

<210> 24
<211> 798
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工人類化之 C2 HuVH AF 可變重鏈

<400> 24
gaggtgcagc tggctcgagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatggca tgtcttgggt tcgccaggct 120
ccaggcaagg gtctcgaatt ggtcgcaagc atcaatagta atggtggtag cacctattat 180
ccagacagtg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa ctccctgtac 240
ctgcaaataa acagtctgag agctgaggac accgccgtgt attactgtgc aagtgggtgac 300
tactggggcc aaggcaccac tgtcacagtc tcctca 336

<210> 25
<211> 1317
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工人類化之C2重鏈

<400> 25
gaggtgcagc tggctcgagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatggca tgtcttgggt tcgccaggct 120

```

ccaggcaagg gtctcgaatt ggtcgcaagc atcaatagta atgggtggtag cacctattat 180
ccagacagtg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa ctccctgtac 240
ctgcaaatga acagtctgag agctgaggac accgccgtgt attactgtgc aagtgggtgac 300
tactggggcc aaggcaccac tgtcacagtc tctcagctt ccaccaaggg cccatccgtc 360
ttccccctgg cgccctgctc cagatcgacc tccgagagca cagccgccct gggctgcctg 420
gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc 480
ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag tctcaggac tctactccct cagcagcgtg 540
gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacg aagacctaca cctgcaacgt agatcacaag 600
cccagcaaca ccaagggtga caagagagtt gagtccaaat atgggtcccc gtgtcccca 660
tgcccagcac ctgagttcct ggggggacca tcagtcttcc tgttcccccc aaaaccaag 720
gacactctca tgatctcccg gaccctgag gtcacgtgcg tgggtggtgga cgtgagccag 780
gaagaccccc agctccagtt caactggtac gtggatggcg tggaggtgca taatgccaa 840
acaaagccgc ggagaggagca gttcaacagc acgtaccgtg tggtcagcgt cctcacgcgc 900
ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc 960
ccgtcctcca tcgagaaaac catctccaaa gccaaagggc agccccgaga gccacagggtg 1020
tacaccctgc ccccatccca ggaggagatg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg 1080
gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag 1140
aacaactaca agaccacgcc tcccgctctc gattccgacg gctccttctt cctctacagc 1200
aggctaaccg tggacaagag cagggtggcag gaggggaatg tcttctcatg ctccgtgatg 1260
catgaggctc tgcacaacca ctacacacag aagagcctct ccctgtctct gggtaaa 1317

```

<210> 26
 <211> 981
 <212> DNA
 <213> 智人

<220>

<223> 人工人類化之C2重鏈恆定區

<400> 26

```

gettccacca agggcccatc cgtcttcccc ctggcgccct gctccagatc gacctccgag 60
agcacagccg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacgggtgtcg 120
tggaactcag gcgccttgac cagcggcgtg cacaccttcc cggtgtgctt acagtctctc 180
ggactctact cctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc 240
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtcc 300

```

aaatatgggtc ccccggtgtcc cccatgcccc gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc 360
ttcctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg 420
tgctgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat 480
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac 540
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 600
tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtcc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 660
gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccaggagga gatgaccaag 720
aaccagggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag 780
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctcccggt cctcgattcc 840
gacggctcct tcttctctta cagcaggcta accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg 900
aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc 960
ctctccctgt ctctgggtaa a 981

<210> 27
<211> 112
<212> PRT
<213> 小白鼠

<400> 27

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

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

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

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

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

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

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

<210> 28
<211> 112
<212> PRT
<213> 小白鼠

<400> 28

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

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

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

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

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

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

<210> 29
<211> 336
<212> DNA
<213> 小白鼠

<400> 29

gatgttgtga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60
atctcttgca gatctagtca gagccttgta tatagtaatg gagacaccta ttacattgg 120
tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180
tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattttctgct ctcaaagtac acatgttcct 300
tggacgttcg gtggaggcac caagctagaa atcaaaa 336

<210> 30
<211> 417
<212> DNA
<213> 小白鼠

<400> 30
 atgaagttgc ctggttaggct gttggtgctg atgttctgga ttcctgcttc cagcagtgat 60
 gttgtgatga cccaaactcc actctccctg cctgtcagtc ttggagatca agcctccatc 120
 tcttgcagat ctagtcagag ccttgtatat agtaatggag acacctatctt acattggtac 180
 ctgcagaagc caggccagtc tccaaagctc ctgatctaca aagtttccaa ccgattttct 240
 ggggtcccag acagggttcag tggcagtgga tcagggacag atttcacact caagatcagc 300
 agagtggagg ctgaggatct gggagtttat ttctgctctc aaagtacaca tgttccttgg 360
 acgttcggtg gaggcaccaa gctagaaatc aaacgggctg atgctgcacc aactgta 417

<210> 31
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> 小白鼠

<400> 31
 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggaggggc cctgaaactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatggca tgtcttgggt tcgccagact 120
 ccagacaaga ggctggaatt ggtcgcaagc atcaatagta atggtggtag cacctattat 180
 ccagacagtg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240
 ctgcaaatga gcagtctgaa gtctgaggac acagccatgt attactgtgc aagtgggtgac 300
 tactgggggc aaggctccac tctcacagtc tcctca 336

<210> 32
 <211> 408
 <212> DNA
 <213> 小白鼠

<400> 32
 atgrasttsg ggytcagmtt grttttcctt gcccttattt taaaagggtgt ccaatgtgag 60
 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gagggtcctt gaaactctcc 120
 tgtgcagcct ctggattcac tttcagtagc tatggcatgt cttgggttcg ccagactcca 180
 gacaagaggc tggaattggt cgcaagcatc aatagtaatg gtggtagcac ctattatcca 240
 gacagtgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg 300
 caaatgagca gtctgaagtc tgaggacaca gccatgtatt actgtgcaag tgggtgactac 360
 tggggccaag gctccactct cacagtctcc tcagccaaaa caacaccc 408

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

抗 β -類澱粉抗體或其抗原結合片段、其用途及使用方法

ANTI-BETA-AMYLOID ANTIBODIES OR ANTIGEN-BINDING
FRAGMENTS THEREOF, THE USE AND METHOD OF USE
THEREOF

【技術領域】

本發明係關於用於診斷及治療類澱粉變性症、一組諸如阿茲海默氏症之與類澱粉蛋白相關的病症及異常的方法及組合物。

【先前技術】

類澱粉變性症非單一疾病實體，而係一組各種不同之進行性疾病過程，其特徵在於在一或多個器官或軀體系統中積累之稱為類澱粉的蠟狀澱粉樣蛋白的細胞外組織沈積物。由於類澱粉沈積物累積，其開始干擾器官或軀體系統之正常功能。存在至少15種不同類型之類澱粉變性症。主要形式為無已知先例之原發性類澱粉變性症、繼發於某些其他病狀之繼發性類澱粉變性症及遺傳性類澱粉變性症。

繼發性類澱粉變性症發生在諸如結核病、稱為家族性地中海熱之細菌感染、骨感染(骨髓炎)、類風濕性關節炎、小腸發炎(肉芽腫性回腸炎)、霍奇金氏病(Hodgkin's disease)及麻風之慢性感染或發炎性疾病期間。

類澱粉沈積物包括類澱粉P(五邊形)組份(AP)、與正常血清類澱粉P(SAP)有關之醣蛋白及硫酸化葡糖胺聚糖(GAG)、結締組織之複合糖類。占類澱粉物質之約90%的類澱粉蛋白原纖維包含數種不同類型之蛋白中的一者。該等蛋白能夠摺疊成所謂的" β -褶"片狀原纖維，一種顯示剛果紅之結合位點結合位點而導致類澱粉蛋白之獨特染色特性的獨特蛋白質構型。

許多衰老疾病係基於或與類澱粉樣蛋白相關，且其特徵部分在於造成發病機制之類澱粉或類澱粉樣物質的細胞外沈積物之累積以及疾病進行。該等疾病包括(但不限於)神經性病變，諸如阿茲海默氏症(Alzheimer's Disease, AD)、路易體性癡呆、唐氏綜合症(Down's syndrome)、具有類澱粉變性(荷蘭類型)之遺傳性腦出血；關島帕金森-癡呆複合症(Guam Parkinson-Dementia complex)；其他基於或與類澱粉樣蛋白相關的疾病為進行性核上眼神經麻痺症、多發性硬化；庫賈氏病(Creutzfeldt Jacob disease)、帕金森氏病(Parkinson's disease)、HIV相關性癡呆、ALS(肌萎縮性側索硬化)、成年發作型糖尿病；老年心臟類澱粉變性；內分泌腫瘤及包括黃斑退化之其他疾病。

儘管該等疾病之發病機制可為各種不同發病機制，但其特徵沈積物通常含有許多共有分子成份。此在顯著程度上可歸因於前發炎性途徑之局部活化，藉此導致所活化補體組份、急性期反應物、免疫調節劑及其他發炎性介體之同時沈積(McGeer等人，1994)。

阿茲海默氏症(AD)為神經性病變，認為其主要係由類澱粉斑塊，蛋白之異常沈積物在腦中之積累引起。在患病個體之腦中最常見的類澱粉類型主要包含A β 原纖維。科學證據證明 β -類澱粉蛋白在斑塊中產生及積累之增加導致神經細胞死亡，此造成AD之發生及進展。關鍵腦區域中神經細胞之喪失又導致神經傳遞質減少及記憶損害。主要負責斑塊積聚之蛋白包括類澱粉前驅蛋白(APP)及兩種早衰蛋白(早衰蛋白I及早衰蛋白II)。在大多數細胞中組成型表現且異化之類澱粉前驅蛋白(APP)經酶 β 及 γ 分泌酶之連續裂解使得39至43個胺基酸A β 肽釋放。APP之降解可能增加其在斑塊中之聚集傾向。A β (1-42)片段因其C末端處2個極具疏水性的胺基酸殘基而尤其具有構建聚集體之高傾向。因此咸信A β (1-42)片段主要涉及及負責AD中神經炎斑塊形成之起始且因此咸信其具有高病理可能性。因此需要防止類澱粉斑塊形

成且使AD中現有斑塊擴散之藥劑。

AD症狀顯現緩慢且最初症狀可僅為輕度健忘。在此階段中，個體可忘記近期事件、活動、熟悉的人或事物之名字，且不能解決簡單數學問題。隨著疾病進展，症狀更易於注意到且變得足夠嚴重使患有AD之患者或其家庭成員尋求醫學幫助。AD之中期症狀包括忘記如何做諸如裝扮之簡單任務且逐漸在發言、理解、閱讀或書寫上出現問題。晚期AD患者可變得焦慮或具有攻擊性，可離家走失且最終需要完全監護。

目前，診斷AD之唯一確定方式為在個體死亡後屍檢時鑑定腦組織中之斑塊及纏結。因此，當個體仍活著時醫師僅可作出"可能的"AD診斷。使用現有方法，醫師可使用數種診斷"可能的"AD之工具，在高達90%的時間中正確診斷AD。醫師詢問關於個體之一般健康、過往醫學問題及個體進行日常活動所具有的任何困難之病史的問題。記憶、問題解決、注意力、計數及語言之行為測試提供關於認知退化之資訊，且諸如血液、尿或脊髓液之測試的醫學測試及腦同位素掃描可提供某些其他資訊。

AD之處理係由藥物基及非藥物基治療組成。迄今為止針對改變疾病之根本進程(延遲或逆轉進展)之治療大部分不成功。已展示恢復神經細胞(神經傳遞質)之化學信使中的不足(缺陷)或功能障礙之藥物，詳言之諸如塔克林(tacrine)及雷斯替明(rivastigmine)之膽鹼酯酶抑制劑(ChEI)改善症狀。ChEI阻礙神經傳遞質之酶促降解，藉此增加腦中可用以傳播神經信號之化學信使的量。

對於某些處於疾病早期及中期之患者，藥物塔克林(COGNEX[®], Morris Plains, NJ)、冬尼培啞(donepezil) (ARICEPT[®], Tokyo, JP)、雷斯替明(EXELON[®], East Hanover, NJ)或加蘭他敏(galantamine)(REMINYL[®], New Brunswick, NJ)可有助於在有限時間內

防止某些症狀惡化。已批准將另一藥物美金剛(memantine)(NAMENDA[®], New York, NY)用於治療中度至重度AD。藥物亦可用以解決AD之精神病學表現。某些藥物亦可幫助控制AD之行為症狀，諸如失眠、興奮、精神恍惚、焦慮及抑鬱。治療該等症狀通常使得患者更舒適且對於護理者而言使其監護更容易。令人遺憾地，雖然顯著治療進展顯示此類藥劑始終優於安慰劑，但疾病繼續進展且對心理機能之平均作用僅為輕微的。諸如ChEI的用於AD藥療法之許多藥物亦具有包括胃腸功能失調、肝臟毒性及重量減輕之副作用。

基於或與類澱粉樣蛋白之積累及沈積相關的另一疾病為黃斑退化。

黃斑退化為使得視網膜(在眼後部之薄紙狀組織，其中光敏細胞將視覺信號傳送至腦)中心區域的黃斑退化之常見眼病。敏銳、清晰、"直前"視力係由黃斑處理。黃斑損害導致盲點及模糊或扭曲視力之發生。在美國年齡相關之黃斑退化(AMD)為視覺損害之主要病因，且對於年齡超過65歲者，其為白種人法定失明之主要病因。約1,800,000位年齡在40歲或更大之美國人患有晚期AMD且另有患有中度AMD之7,300,000位患者實質上處於視力損失之風險中。政府估計截至2020年將存在2,900,000位患有晚期AMD之患者。AMD之受害者通常意外且沮喪地發現關於此失明病狀之病因及治療所知甚少。

存在兩種形式之黃斑退化：乾性黃斑退化及濕性黃斑退化。在85%之黃斑退化病例中診斷出黃斑之細胞開始緩慢分解之乾性形式。雙眼通常受乾性AMD侵襲，儘管一隻眼睛可能喪失視力，而另一隻眼睛仍未受侵襲。脈絡膜小疣為視網膜下之黃色沈積物，其為乾性AMD之常見早期體征。當脈絡膜小疣之數目或尺寸增加時，發生晚期乾性AMD或濕性AMD之風險增加。乾性AMD可能在未變成疾病之

濕性形式的情況下進展且導致視力喪失；然而早期乾性AMD亦可能突然變成濕性形式。

儘管濕性形式僅占病例之15%，但其引起90%之失明且視其為晚期AMD(不存在早期或中期濕性AMD)。濕性AMD始終晚於該疾病之乾性形式。當乾性形式惡化時，一些患者開始出現黃斑後生長之異常血管。該等血管極其脆弱且將洩漏體液及血液(因此"濕性"黃斑退化)，導致黃斑之快速損害。

乾性形式之AMD最初常導致輕微視力障礙。詳言之，視力中心可隨後變得模糊且當疾病進展時該區域生長變大。若僅一隻眼睛受到侵襲，則無法注意到症狀。在濕性AMD中，直線可呈現波動且中心視力喪失可迅速發生。

黃斑退化之診斷通常涉及擴張眼科檢查、視覺敏銳度測試及使用所謂的眼底鏡檢查程序來輔助診斷AMD之眼後部檢視，且若疑似濕性AMD，則亦可進行螢光素血管造影法。若乾性AMD達到晚期，則當前無防止視力喪失之治療。然而，抗氧化劑及鋅之特定高劑量配方可延遲或防止中度AMD進展至晚期。Macugen®(哌加他尼(pegaptanib)鈉注射液)、雷射凝固及光動力學療法可控制異常血管生長及黃斑中之出血，此有幫於某些患有濕性AMD之患者；然而已喪失之視力無法藉由該等技術恢復。若視力已喪失，則存在可輔助改善生活品質之低視力助器。

年齡相關之黃斑退化(AMD)之最早體征之一為稱作脈絡膜小疣的細胞外沈積物在視網膜色素上皮(RPE)之基膜與玻璃膜(Bruch's membrane, BM)之間的積累。Anderson等人進行之近期研究已證實脈絡膜小疣含有類澱粉 β (Experimental Eye Research 78 (2004) 243-256)。

正在進行之研究繼續探索可能造成AMD之環境、遺傳及食物

要素的研究。亦探索新穎治療策略，包括視網膜細胞移植、防止或減緩疾病進展之藥物、放射治療、基因治療、可有助於刺激視力的植入視網膜中之電腦晶片及防止黃斑下新血管生長之藥劑。

當開發新藥時考慮之重要因素為目標患者之易用性。出於患者便利性，經口藥物傳遞(尤其錠劑、膠囊及軟凝膠)占所消耗之所有劑型的70%。藥物開發者同意患者較佳經口傳遞而非使其自身經受注射或其他醫學投藥之更侵襲性形式。造成短給藥間隔時間(亦即一天一次或持續釋放)之調配物亦較佳。投與呈口服劑型之抗生素之簡易性引起治療期間患者順應性增加。

需要防止或著手解決與類澱粉變性症相關之併發症的有效方法及組合物，該等併發症為一組與類澱粉斑塊形成相關的疾病及病症，其包括繼發性類澱粉變性症及年齡相關之類澱粉變性症，包括(但不限於)神經性病症，諸如阿茲海默氏症(AD)、路易體性癡呆、唐氏綜合症、具有類澱粉變性(荷蘭類型)之遺傳性腦出血；關島帕金森癡呆複合症；以及基於或與類澱粉樣蛋白相關的其他疾病，諸如進行性核上眼神經麻痺症、多發性硬化；庫賈氏病、帕金森氏病、HIV相關性癡呆、ALS(肌萎縮性側索硬化)、成年發病型糖尿病；老年心臟類澱粉變性；內分泌腫瘤及包括黃斑退化之其他病症。尤其需要能夠抵抗疾病之諸如與類澱粉或類澱粉樣肽之纖維聚集相關之斑塊形成的生理表現之藥劑。

據報導由接種與弗氏完全或不完全佐劑混合之 $A\beta_{1-42}$ 引發的抗類澱粉抗體降低轉殖基因小鼠中對人類阿爾茨海默病之類澱粉負擔(Schenk等人，1999)。將在脂質體中復水之四(十六醯基)化 $A\beta_{1-16}$ 腹腔內接種至NORBA轉殖基因小鼠中引發抗類澱粉抗體之顯著力價，據報導抗類澱粉抗體活體外及活體內溶解類澱粉纖維及斑塊(Nicolau等人，2002)。

Bard等人(2000)首次提出類澱粉斑塊及纖維溶解發生之可能機制，其推斷抗體調理斑塊，其隨後由微神經膠質細胞之巨噬細胞破壞。De Mattos等人，(2001)指出針對 β -類澱粉之中心域的mAb能夠結合且完全螯合血漿類澱粉。其主張循環中該等mAb之存在使腦與血漿之間的A β 之平衡移動，有利於周邊清除及分解代謝而非在腦中之沈積。

以齧齒動物抗體進行的延長之人類治療可引起抗球蛋白反應，其在投藥約8-12天後可偵測到且在約20-30天達到峰值。若遭遇該抗球蛋白反應，則至多約10天後必須停止治療，且通常杜絕以後某天之再治療，因為其將導致繼發性抗球蛋白反應之快速發作。儘管齧齒動物抗體與人類抗體共有相當程度之序列保守性，但在齧齒動物與人類抗體之間存在許多足以使齧齒動物抗體在人類中具有免疫原性之序列差異。

該問題可藉由直接在人類中產生抗體或藉由形成"人類化"抗體(亦稱作'重塑'抗體)來克服。人類化抗體具有含有散布於人類或人類樣構架序列中之源自齧齒動物之CDR的可變區胺基酸序列。由於人類化抗體之特異性係由源自齧齒動物之CDR提供，因此僅在容許少量修飾之情況下基本上不變地使用其殘基，該等修飾並不明顯干擾抗體對其目標抗原之親和力及特異性。構架殘基可源自自任何靈長類或尤其任何人類可變區或可為其之組合，且所得經設計之可變區將視為經重塑的。

為使親和力將保持於該重塑抗體中之可能性最大化，重要的係合理選擇構架區。眾所周知構架序列係用來將CDR固持於其恰當空間定向中以與抗原相互作用，且構架殘基有時甚至可參與抗原結合。為保持抗體對其抗原之親和力，選擇與齧齒動物構架之序列最相似的人類構架序列係有利的。接著可能仍需要以齧齒動物構架中之相應殘基

替換人類構架序列中之一或多個胺基酸以避免親和力損失。該替換可藉由電腦模擬來輔助。

本發明提供新穎方法及組合物，其包含高度特異性且高效之抗體、尤其嵌合抗體(包括其片段)、更尤其部分或完全人類化抗體(包括其片段)，其具有特異性地識別且與一系列 β -類澱粉抗原之特定抗原決定基結合之能力， β -類澱粉抗原可呈單體、二聚、三聚等多聚形式、聚集體、纖維、長絲形式或斑塊縮合形式遞呈至抗體。本發明之教示能夠實現之抗體尤其適用於治療類澱粉變性症，一組與類澱粉斑塊形成相關的疾病及病症，其包括繼發性類澱粉變性症及年齡相關之類澱粉變性症，包括(但不限於)神經性病症，諸如阿茲海默氏症(AD)、路易體性癡呆、唐氏綜合症、具有類澱粉變性(荷蘭類型)之遺傳性腦出血；關島帕金森癡呆複合症；以及基於或與類澱粉樣蛋白相關的其他疾病，諸如進行性核上眼神經麻痺症、多發性硬化；庫賈氏病、具有荷蘭類型類澱粉變性之遺傳性腦出血、帕金森氏病、HIV相關性癡呆、ALS(肌萎縮性側索硬化)、成年發病型糖尿病；老年心臟類澱粉變性；內分泌腫瘤及包括黃斑退化之其他病症等等。

【發明內容】

在一實施例中，本發明係關於嵌合抗體或其片段，或人類化抗體或其片段，其識別且與 β -類澱粉蛋白上之至少一個特定結合位點、特別是至少兩個特定結合位點、且更特別是至少三個特定結合位點結合，其中該一個，該至少兩個及該至少三個結合位點各包含至少一或兩個顯著涉及抗體結合的連續胺基酸殘基。

詳言之，本發明之嵌合抗體或其片段，或人類化抗體或其片段與 β -類澱粉蛋白上之至少兩個、特別是至少三個特定結合位點結合，其中該三個特定結合位點之至少兩者包含至少兩個顯著涉及抗體結合的連續胺基酸殘基，且該三個特定結合位點之至少一者包含至少一個

胺基酸殘基。

該包含至少兩個顯著涉及抗體結合的連續胺基酸殘基之至少兩個特定結合位點位在抗原上彼此緊密接近處，由至少一個未涉及抗體結合的胺基酸殘基分隔及/或側接或者由至少一個與該至少兩個連續胺基酸殘基相比以顯著較低程度，因此形成構形非連續性抗原決定基。

該分別包含顯著涉及抗體結合之至少兩個連續胺基酸殘基及至少一個胺基酸殘基之至少三個特定結合位點位在抗原決定基上彼此緊密接近處，由至少一個未涉及抗體結合的胺基酸殘基分隔及/或側接或者由至少一個與該至少兩個連續胺基酸殘基相比以顯著較低程度，因此形成構形非連續性抗原決定基。

特言之，本發明提供嵌合抗體或其片段，或人類化抗體或其片段，其識別且與 β -類澱粉蛋白上之至少一個特定結合位點、特別是至少兩個特定結合位點、更特別是至少三個特定結合位點結合，其中該至少一個或該至少兩個特定結合位點各包含至少兩個顯著涉及抗體結合之連續胺基酸殘基，其中該至少兩個連續胺基酸殘基表示第一結合位點其為嵌入以下核心序列(SEQ ID NO: 9)中之-Phe-Phe-：

Xaa₃-Phe-Phe-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆，其中：

Xaa₃為選自由Ala、Val、Leu、正白胺酸、Met、Phe及Ile組成之群的胺基酸殘基；

Xaa₄為選自由Ala、Val、Leu、Ser及Ile組成之群的胺基酸殘基；

Xaa₅為選自由Glu及Asp組成之群的胺基酸殘基；

Xaa₆為選自由Glu及Asp組成之群的胺基酸殘基，且其中該等胺基酸殘基Xaa₃、Xaa₄、Xaa₅及Xaa₆未涉及抗體結合或以與-Phe-Phe-結合位點相比顯著較低之程度。

本發明之另一實施例提供嵌合抗體或其片段，或人類化抗體或

其片段，其中：

Xaa₃為Val或Leu，但尤其為Val；

Xaa₄為Ala或Val，但尤其為Ala；

Xaa₅為Glu或Asp，但尤其為Glu；

Xaa₆為Glu或Asp，但尤其為Asp。

詳言之，提供嵌合抗體或其片段，或人類化抗體或其片段，其識別且與β-類澱粉蛋白上之至少一個特定結合位點、尤其至少兩個特定結合位點、更尤其至少三個特定結合位點結合，其中該等特定結合位點分別包含顯著涉及於抗體結合中之至少一個及至少兩個連續胺基酸殘基，其中該表示第一結合位點之至少兩個連續胺基酸殘基為嵌入以下核心序列中之-Phe-Phe-，且該至少一個胺基酸殘基為嵌入以下核心序列中之-His-：

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

其中：

Xaa₁為選自由His、Asn、Gln、Lys及Arg組成之群的胺基酸殘基；

Xaa₃為選自由Asn及Gln組成之群的胺基酸殘基；

Xaa₄為選自由His、Asn、Gln、Lys及Arg組成之群的胺基酸殘基；

Xaa₅為選自由Ala、Val、Leu、Ser及Ile組成之群的胺基酸殘基；

Xaa₆為選自由Ala、Val、Leu、正白胺酸、Met、Phe及Ile組成之群的胺基酸殘基；

Xaa₇為選自由Ala、Val、Leu及Ile組成之群的胺基酸殘基；

Xaa₈為選自由Glu及Asp組成之群的胺基酸殘基；

Xaa₉為選自由Glu及Asp組成之群的胺基酸殘基；且其中該等胺基酸殘基Xaa₁、Xaa₃、Xaa₆、Xaa₇、Xaa₈及Xaa₉未或以分別與

-His-及-Phe-Phe-結合位點相比之較低至顯著較低程度涉及於抗體結合中。

在本發明之另一實施例中，提供嵌合抗體或其片段，或人類化抗體或其片段，其中：

Xaa₃為Gln或Asn，但尤其為Gln；

Xaa₄為Lys；

Xaa₅為Leu；

Xaa₆為Val或Leu，但尤其為Val；

Xaa₇為Ala或Val，但尤其為Ala；

Xaa₈為Glu或Asp，但尤其為Glu；且

Xaa₉為Asp或Glu，但尤其為Asp。

在本發明之另一實施例中，提供嵌合抗體或其片段，或人類化抗體或其片段，其識別且與 β -類澱粉蛋白上之至少一個特定結合位點、尤其至少兩個特定結合位點、更尤其至少三個特定結合位點結合，其中該至少一個或該至少兩個特定結合位點各包含至少兩個顯著涉及於抗體結合中之連續胺基酸殘基，其中該表示第二結合位點之至少兩個連續胺基酸殘基為嵌入以下核心序列(SEQ ID NO: 10)中之-Lys-Leu-：

Xaa₁-Xaa₂-Lys-Leu-Xaa₃，其中：

Xaa₁為選自由His、Asn、Gln、Lys及Arg組成之群的胺基酸殘基；

Xaa₂為選自由Asn及Gln組成之群的胺基酸殘基；

Xaa₃為選自由Ala、Val、Leu、正白胺酸、Met、Phe及Ile組成之群的胺基酸殘基；且其中該等胺基酸殘基Xaa₂、Xaa₃未或以與-Lys-Leu-結合位點相比之較低至顯著較低程度涉及於抗體結合中。

在本發明之另一實施例中，提供嵌合抗體或其片段，或人類化抗體或其片段，其識別且與 β -類澱粉蛋白上之至少一個特定結合位點、尤其至少兩個特定結合位點、更尤其至少三個特定結合位點結合，其中該等特定結合位點分別包含顯著涉及於抗體結合中之至少一個及至少兩個連續胺基酸殘基，其中該至少一個及至少兩個藉由至少一個未或以與顯著涉及於抗體結合中之胺基酸殘基相比之顯著較低程度涉及於抗體結合中的胺基酸殘基分開之連續胺基酸分別為嵌入以下核心序列中之-His-及-Lys-Leu-：

His-Xaa₂-Lys-Leu-Xaa₃-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆--Xaa₇--Xaa₈-，其中：

Xaa₂為選自由Asn及Gln組成之群的胺基酸殘基；

Xaa₃為選自由Ala、Val、Leu、正白胺酸、Met、Phe及Ile組成之群的胺基酸殘基；

Xaa₄為選自由Ala、Val、Leu、正白胺酸、Met、Phe及Ile組成之群的胺基酸殘基；

Xaa₅為選自由Ala、Val、Leu、正白胺酸、Met、Phe及Ile組成之群的胺基酸殘基；

Xaa₆為選自由Ala、Val、Leu、Ser及Ile組成之群的胺基酸殘基；

Xaa₇為選自由Glu及Asp組成之群的胺基酸殘基；

Xaa₈為選自由Glu及Asp組成之群的胺基酸殘基；

且其中該等胺基酸殘基Xaa₂、Xaa₃、Xaa₆、Xaa₇、Xaa₈未或以分別與-His-及-Lys-Leu-結合位點相比之較低至顯著較低程度涉及於抗體結合中。

在本發明之另一實施例中，提供嵌合抗體或其片段，或人類化抗體或其片段，其中：

Xaa₂為Gln或Asn，但尤其為Gln；

Xaa₃為Val或Leu，但尤其為Val；

Xaa₄為 Phe ；

Xaa₅為 Phe ；

Xaa₆為 Ala或 Val ，但尤其為 Ala ；

Xaa₇為 Glu或 Asp ，但尤其為 Glu ；且

Xaa₈為 Asp或 Glu ，但尤其為 Asp 。

在本發明之另一實施例中，提供嵌合抗體或其片段，或人類化抗體或其片段，其識別且與 β -類澱粉蛋白上之至少兩個特定結合位點結合，其中該至少兩個特定結合位點各包含至少兩個顯著涉及於抗體結合中之連續胺基酸殘基，其中該至少兩個連續胺基酸係由至少一個未或以與該等連續胺基酸殘基相比之顯著較低程度涉及於抗體結合中的胺基酸殘基分開，其分別為 -Phe-Phe- 及 -Lys-Leu- ，表示嵌入以下核心序列中之第一及第二結合位點：

Xaa₁-Xaa₂-Lys-Leu-Xaa₃-Phe-Phe-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆，其中：

Xaa₁為選自由 His 、 Asn 、 Gln 、 Lys 及 Arg 組成之群的胺基酸殘基；

Xaa₂為選自由 Asn 及 Gln 組成之群的胺基酸殘基；

Xaa₃為選自由 Ala 、 Val 、 Leu 、 正白胺酸 、 Met 、 Phe 及 Ile 組成之群的胺基酸殘基；

Xaa₄為選自由 Ala 、 Val 、 Leu 、 Ser 及 Ile 組成之群的胺基酸殘基；

Xaa₅為選自由 Glu 及 Asp 組成之群的胺基酸殘基；

Xaa₆為選自由 Glu 及 Asp 組成之群的胺基酸殘基；且其中該等胺基酸殘基 Xaa₂ 、 Xaa₃ 、 Xaa₄ 、 Xaa₅ 及 Xaa₆ 未或以分別與 -Lys-Leu- 及 -Phe-Phe- 結合位點相比之較低至顯著較低程度涉及於抗體結合中。

在本發明之另一實施例中，提供嵌合抗體或其片段，或人類化抗體或其片段，其識別且與 β -類澱粉蛋白上之至少一個特定結合位

點、尤其至少2個特定結合位點、更尤其至少三個特定結合位點結合，其中該等特定結合位點分別包含顯著涉及於抗體結合中之至少一個及至少兩個連續胺基酸殘基，其中該至少一個及至少兩個連續胺基酸係由至少一個未或以與該等顯著涉及於抗體結合中之胺基酸殘基相比之顯著較低程度涉及於抗體結合中的胺基酸殘基分開，且其中該等胺基酸殘基分別為嵌入以下核心序列中之 -His- 及 -Phe-Phe- 及 -Lys-Leu- 。

His-Xaa₂-Lys-Leu-Xaa₃-Phe-Phe-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆，其中：

Xaa₂為選自由Asn及Gln組成之群的胺基酸殘基；

Xaa₃為選自由Ala、Val、Leu、正白胺酸、Met、Phe及Ile組成之群的胺基酸殘基；

Xaa₄為選自由Ala、Val、Leu、Ser及Ile組成之群的胺基酸殘基；

Xaa₅為選自由Glu及Asp組成之群的胺基酸殘基；

Xaa₆為選自由Glu及Asp組成之群的胺基酸殘基；且其中該等胺基酸殘基Xaa₂、Xaa₃、Xaa₄、Xaa₅、Xaa₆未或以分別與-His-、-Lys-Leu-及-Phe-Phe-結合位點相比之較低至顯著較低程度涉及於抗體結合中。

在本發明之另一實施例中，提供嵌合抗體或其片段，或人類化抗體或其片段，其中：

Xaa₂為Gln或Asn，但尤其為Gln；

Xaa₃為Val或Leu，但尤其為Val；

Xaa₄為Ala或Val，但尤其為Ala；

Xaa₅為Glu或Asp，但尤其為Glu；且

Xaa₆為Asp或Glu，但尤其為Asp。

在本發明之另一實施例中，提供嵌合抗體或其片段，或人類化抗體或其片段，其識別且與β-類澱粉蛋白上之至少兩個特定結合位點

結合，其中該至少兩個特定結合位點各包含至少兩個顯著涉及於抗體結合中之連續胺基酸殘基，其中該至少兩個連續胺基酸係由至少一個未或以與該等連續胺基酸殘基相比之顯著較低程度涉及於抗體結合中的胺基酸殘基分離，該等連續胺基酸殘基分別為 -Phe-Phe- 及 -Lys-Leu-，表示嵌入以下核心序列中之第一及第二結合位點：

Xaa₁-Xaa₂-Lys-Leu-Xaa₃-Phe-Phe-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆，其中：

Xaa₁為選自由His、Asn、Gln、Lys及Arg組成之群的胺基酸殘基；

Xaa₂為選自由Asn及Gln組成之群的胺基酸殘基；

Xaa₃為選自由Val、Ala、Leu、Met、Phe、正白胺酸及Ile組成之群的胺基酸殘基；

Xaa₄為選自由Ala、Val、Leu及Ile組成之群的胺基酸殘基；

Xaa₅為選自由Glu及Asp組成之群的胺基酸殘基；

Xaa₆為選自由Glu及Asp組成之群的胺基酸殘基；且其中該等胺基酸殘基Xaa₂、Xaa₃、Xaa₄、Xaa₅、Xaa₆未或以分別與-Lys-Leu-及-Phe-Phe結合位點相比之較低至顯著較低程度涉及於抗體結合中。

在本發明之另一實施例中，提供嵌合抗體或其片段，或人類化抗體或其片段，其中：

Xaa₁為His或Arg，但尤其為His；

Xaa₂為Gln或Asn，但尤其為Gln；

Xaa₃為Val或Leu，但尤其為Val；

Xaa₄為Ala或Val，但尤其為Ala；

Xaa₅為Glu或Asp，但尤其為Glu；且

Xaa₆為Asp或Glu，但尤其為Asp。

在本發明之一實施例中，提供嵌合抗體或其片段，或人類化抗

體或其片段，其識別且與 β -類澱粉蛋白上之至少兩個特定結合位點結合，其中該至少兩個特定結合位點各包含至少兩個顯著涉及於抗體結合中之連續胺基酸殘基，其為**-Phe-Phe-Ala-Glu-**、尤其**-Phe-Phe-Ala-**，但尤其分別為 **-Phe-Phe-**及**-Lys-Leu-**，且其中該至少兩個特定結合位點分別顯示展示於SEQ ID NO: 7中之胺基酸序列**-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-**及展示於SEQ ID NO :8中之胺基酸序列**His-Gln-Lys-Leu-Val-**。

在本發明之一實施例中，提供嵌合抗體或其片段，或人類化抗體或其片段，其識別且與 β -類澱粉蛋白上之至少一個特定結合位點、尤其至少兩個特定結合位點、更尤其至少三個特定結合位點結合，其中該至少一個或該至少兩個特定結合位點分別包含顯著涉及於抗體結合中之至少一及至少兩個連續胺基酸殘基，其分別為**-Phe-Phe-**及**-Lys-Leu-**，及**-His-**，其中該等特定結合位點分別嵌入胺基酸序列**-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-**及胺基酸序列**His-Gln-Lys-Leu-Val-**中。

在本發明之另一實施例中，嵌合抗體或其片段，或人類化抗體或其片段包含抗原識別及結合位點，其識別且與 β -類澱粉蛋白上之至少兩個特定結合位點結合，其中該至少兩個特定結合位點分別在SEQ ID NO: 7及8中所給之胺基酸序列內各包含至少兩個連續胺基酸殘基，其中該等連續胺基酸殘基(尤其**-Phe-Phe-**及**-Lys-Leu-**)顯著涉及於 β -類澱粉蛋白之結合中。

在本發明之另一特定實施例中，提供本發明之抗體或其片段，其與 β -類澱粉蛋白上之4個特定結合位點結合，其中該4個特定結合位點包括2個各包含1個胺基酸殘基之結合位點及2個各包含兩個連續胺基酸殘基之結合位點，該等殘基顯著涉及於抗體之結合中，其中該4個特定結合位點在 β -類澱粉蛋白上緊密接近彼此定位，且其中該4個結合位點係由至少一個未涉及於抗體結合中，或涉及於但以與4個特定結合位點之該一個胺基酸殘基及該兩個連續胺基酸殘基相比之顯著

較低程度涉及於結合中的胺基酸殘基分開，因此形成構形非連續抗原決定基。

詳言之，顯著涉及於抗體之結合中的該兩個連續胺基酸殘基之第一者為-Lys-Leu-，且該至少兩個連續胺基酸殘基之第二者為-Phe-Phe-，單一胺基酸殘基之第一者為-His-且單一胺基酸殘基之第二者為-Asp-，其嵌入以下核心序列中：

-Xaa₁-His-Xaa₂-Lys-Leu-Xaa₃-Phe-Phe-Xaa₄-Xaa₅-Asp-Xaa₆

其中：

Xaa₁為選自由His、Asn、Gln、Lys及Arg組成之群的胺基酸殘基，但尤其為His；

Xaa₂為選自由Asn及Gln組成之群的胺基酸殘基，但尤其為Gln；

Xaa₃為選自由Ala、Val、Leu、正白胺酸、Met、Phe及Ile組成之群的胺基酸殘基，但尤其為Val；

Xaa₄為選自由Ala、Val、Leu、Ser及Ile組成之群的胺基酸殘基，但尤其為Ala；

Xaa₅為選自由Glu及Asp組成之群的胺基酸殘基，但尤其為Glu；

Xaa₆為選自由Ala、Val、Leu、正白胺酸、Met、Phe及Ile組成之群的胺基酸殘基，尤其為Val；且其中該等胺基酸殘基Xaa₁、Xaa₂、Xaa₃、Xaa₄、Xaa₅、Xaa₆未涉及於抗體結合中或涉及於但以與-His-、-Asp-、-Lys-Leu及-Phe-Phe-結合位點相比之顯著較低程度涉及於結合中。

在一實施例中，本發明係關於本發明之抗體或其片段，其與β-類澱粉蛋白上之4個特定結合位點結合，其中該4個特定結合位點包括兩個各包含一個胺基酸殘基之結合位點及兩個各包含兩個連續胺基酸殘基之結合位點，其中顯著涉及於抗體結合中之該兩個連續胺基酸殘基之第一者為-Lys-Leu-，且該至少兩個連續胺基酸殘基之第二者為-

Phe-Phe-，該單個胺基酸殘基之第一者為-His-且該單個胺基酸殘基之第二者為-Asp-，其嵌入以下核心序列中：

-Xaa₁-His-Xaa₂-Lys-Leu-Xaa₃-Phe-Phe-Xaa₄-Xaa₅-Asp-Xaa₆

其中：

Xaa₁為選自由His、Asn、Gln、Lys及Arg組成之群的胺基酸殘基，但尤其為His；

Xaa₂為選自由Asn及Gln組成之群的胺基酸殘基，但尤其為Gln；

Xaa₃為選自由Ala、Val、Leu、正白胺酸、Met、Phe及Ile組成之群的胺基酸殘基，尤其為Val；

Xaa₄為選自由Ala、Val、Leu、Ser及Ile組成之群的胺基酸殘基，尤其為Ala；

Xaa₅為選自由Glu及Asp組成之群的胺基酸殘基，尤其為Glu；

Xaa₆為選自由Ala、Val、Leu、正白胺酸、Met、Phe及Ile組成之群的胺基酸殘基，尤其為Val；且其中該等胺基酸殘基Xaa₁、Xaa₂、Xaa₃、Xaa₄、Xaa₅、Xaa₆未涉及於抗體結合中或涉及於但以與-His-、-Asp-、-Lys-Leu及-Phe-Phe-結合位點相比之顯著較低程度涉及於結合中。

在本發明之一特定實施例中，如本文中先前所定義之識別及結合位點形成位於β-類澱粉蛋白之介於胺基酸殘基12至24、尤其介於殘基14至23、更尤其介於胺基酸殘基14與20之間的區域中之構形非連續抗原決定基，其中該至少兩個各包含至少2個胺基酸殘基之不同識別及結合位點分別位於位置16及17及位置19及20，且其中該包含至少1個胺基酸殘基之至少一個不同識別及結合位點位於位置14，該等殘基顯著涉及於β-類澱粉蛋白之結合中，且其中該等不同識別及結合位點至少位於以胺基酸殘基、尤其殘基21及22側接之一側，且係由位於位置15及18之胺基酸殘基分開，該等胺基酸殘基不直接或至少在大體上

較低程度上涉及於抗原之結合中。

在本發明之另一實施例中，該至少三個不同識別及結合位點在兩側與胺基酸殘基、尤其殘基12及13及殘基21及22側接，且由一個位於位置15及18之胺基酸殘基分開，該等胺基酸殘基不直接涉及於或至少在大體上較小程度上涉及於抗原之結合中。

在一特定實施例中，將該等顯著涉及於β-類澱粉蛋白之結合中的連續胺基酸殘基、尤其位置16及17之-Lys-Leu-及位置19及20之-Phe-Phe-嵌入以下核心區中：

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

在另一特定實施例中，將該等顯著涉及於β-類澱粉蛋白之結合中的胺基酸殘基、尤其位置16及17之-Lys-Leu-及位置19及20之-Phe-Phe-及位置14之-His-嵌入以下核心區中：

Val-	His-	His-	Gln-	Lys-	Leu-	Val-	Phe-	Phe-	Ala-	Glu-	Asp-	Val-	Gly-
12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25

在本發明之另一實施例中，提供人類化抗體或其片段，其在輕鏈及重鏈可變區中分別包含至少一個非人類來源之CDR，尤其兩個非人類來源之CDR、更尤其三個非人類來源之CDR，其嵌入一或多個源自人類或靈長類之構架區及視情況源自人類或靈長類源抗體之恆定區中，該人類化抗體或其片段能夠特異性地識別且與β-類澱粉斑塊之分離中的或作為β-類澱粉斑塊之一部分的β-類澱粉蛋白、尤其β-類澱粉單體肽、更尤其β-類澱粉聚合肽、甚至更尤其β-類澱粉纖維、原纖維或長絲在包含下列胺基酸序列(SEQ ID NO: 11)之抗原決定基處結合：

Xaa₁-Xaa₂-Lys-Leu-Xaa₃-Phe-Phe-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆，其中：

Xaa₁為選自由His、Asn、Gln組成之群的胺基酸殘基，但尤其為His；

Xaa₂為選自由Asn及Gln組成之群的胺基酸殘基，但尤其為Gln；
且

Xaa₃為選自由Val、Leu及Ile組成之群的胺基酸殘基，但尤其為Val；

Xaa₄為選自由Ala及Val組成之群的胺基酸殘基，但尤其為Ala；

Xaa₅為選自由Glu及Asp組成之群的胺基酸殘基，但尤其為Glu；

Xaa₆為選自由Glu及Asp組成之群的胺基酸殘基，但尤其為Asp。

在本發明之另一實施例中，提供人類化抗體或其片段，其在輕鏈及重鏈可變區中分別包含至少一個非人類來源之CDR，尤其兩個非人類來源之CDR、更尤其三個非人類來源之CDR，其嵌入一或多個源自人類或靈長類之構架區及視情況源自人類或靈長類源抗體之恆定區中，該人類化抗體或其片段能夠特異性地識別且與β-類澱粉斑塊之分離中的或作為β-類澱粉斑塊之一部分的β-類澱粉蛋白、尤其β-類澱粉單體肽、更尤其β-類澱粉聚合肽、甚至更尤其β-類澱粉纖維、原纖維或長絲在包含下列胺基酸序列(SEQ ID NO: 11)之抗原決定基處結合：

His-Xaa₂-Lys-Leu-Xaa₃-Phe-Phe-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆，其中：

Xaa₂為選自由Asn及Gln組成之群的胺基酸殘基，但尤其為Gln；
且

Xaa₃為選自由Val、Leu及Ile組成之群的胺基酸殘基，但尤其為Val；

Xaa₄為選自由Ala及Val組成之群的胺基酸殘基，但尤其為Ala；

Xaa₅為選自由Glu及Asp組成之群的胺基酸殘基，但尤其為Glu；

Xaa₆為選自由Glu及Asp組成之群的胺基酸殘基，但尤其為Glu；

且其中該等胺基酸殘基Xaa₂、Xaa₃、Xaa₄、Xaa₅、Xaa₆未或以與

-His-及-Lys-Leu-及-Phe-Phe-結合位點相比之較低程度涉及於抗體結合中。

在本發明之一特定實施例中，非人類來源之CDR係獲自對抗不含該等特定結合位點之抗原片段而培養的供體抗體，但尤其獲自鼠類供體抗體。如本文中於以下免疫方法中所描述，抗原決定基區中之此移位可至少部分由使用包含對應於經諸如聚乙二醇(PEG)的親水性部分修飾之 β -類澱粉肽、尤其 β -類澱粉肽A β_{1-16} 之胺基酸序列的抗原肽之超分子抗原構築體引發，其中該親水性部分經由至少一個、尤其一或兩個胺基酸(諸如離胺酸、麩胺酸及半胱胺酸或對於偶合親水性部分與肽片段而言能夠充當連接器件之任何其他合適之胺基酸或胺基酸類似物)與抗原肽之各末端共價結合。當PEG係用作親水性部分時，游離PEG末端與磷脂醯乙醇胺或適於充當錨定元件之任何其他化合物共價結合以(例如)將抗原構築體嵌入如本文中所述之脂質體之雙分子層中。

詳言之，非人類來源之CDR係獲自鼠類供體抗體，其顯示"德國微生物菌種保藏中心(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSMZ)"於Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig依據布達佩斯條約(Budapest Treaty)之條款以寄存編號DSM ACC2750於2005年12月1日寄存的ACI-01-Ab7C2(在本申請案通篇中亦稱作"mC2")之特徵特性。

在本發明之一實施例中，非人類來源之CDR係獲自"德國微生物菌種保藏中心"於Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig依據布達佩斯條約之條款以寄存編號DSM ACC2750於2005年12月1日寄存之鼠類供體抗體ACI-01-Ab7C2(在本申請案通篇中亦稱作"mC2")。脂質A作為免疫方案之部分的使用亦可造成抗原決定基區之移位。

在一特定實施例中，本發明係關於人類化抗體或其片段，其包含整合至源自人類或靈長類之構架區中的至少一種肽，其具有選自由表示重鏈可變區(HCVR)之CDR2之SEQ ID NO: 2及表示重鏈可變區(HCVR)之CDR3之SEQ ID NO: 3及表示輕鏈可變區(LCVR)之CDR1之SEQ ID NO: 4組成的序列之群的胺基酸序列。

在另一實施例中，本發明係關於人類化抗體或其片段，其中該人類化抗體包含整合至人類或靈長類衍生之重鏈構架區中的至少一種肽，其具有選自由表示重鏈可變區(HCVR)之CDR2之SEQ ID NO: 2及表示重鏈可變區(HCVR)之CDR3之SEQ ID NO: 3組成的序列之群的胺基酸序列。

在另一實施例中，本發明係關於人類化抗體或其片段，其中該人類化抗體包含整合至源自人類或靈長類之輕鏈構架區中的肽，其具有表示輕鏈可變區(LCVR)之CDR1的SEQ ID NO: 4之胺基酸序列。

詳言之，本發明係關於包含整合至源自人類或靈長類之構架區中之至少一種肽的輕鏈可變區(LCVR)，該肽具有表示輕鏈可變區(LCVR)之CDR1的SEQ ID NO: 4之胺基酸序列。

在另一特定實施例中，本發明係關於包含整合至源自人類或靈長類之構架區中的至少一種肽之重鏈可變區(HCVR)，該肽具有選自由表示重鏈可變區(HCVR)之CDR2之SEQ ID NO: 2及表示重鏈可變區(HCVR)之CDR3之SEQ ID NO: 3組成的序列之群的胺基酸序列。

本發明進一步係關於人類化抗體或其片段，其包含整合至源自人類或靈長類之構架區中的至少兩種肽，該等肽不同且顯示選自由以下各物組成之序列之群的胺基酸序列：表示重鏈可變區(HCVR)之CDR1之SEQ ID NO: 1、表示重鏈可變區(HCVR)之CDR2之SEQ ID NO: 2及表示重鏈可變區(HCVR)之CDR3之SEQ ID NO: 3；及表示輕鏈可變區(LCVR)之CDR1之SEQ ID NO: 4、表示輕鏈可變區(LCVR)之

CDR2之SEQ ID NO: 5及表示輕鏈可變區(LCVR)之CDR3之SEQ ID NO: 6，其中相同CDR不能在抗體中出現兩次。詳言之，若存在之至少兩個CDR皆為輕鏈可變區(LCVR)之CDR，則該等CDR中之至少一者須為由SEQ ID NO: 4表示之CDR1。

本發明亦包含人類化抗體或其片段，其包含整合至源自人類或靈長類之重鏈構架區中的至少兩種肽，該等肽具有選自由表示重鏈可變區(HCVR)之CDR1之SEQ ID NO: 1、表示重鏈可變區(HCVR)之CDR2之SEQ ID NO: 2及表示重鏈可變區(HCVR)之CDR3之SEQ ID NO: 3組成的序列之群的胺基酸序列，但尤其包含其中相同CDR不能在抗體中出現兩次之人類化抗體或其片段。

詳言之，本發明係關於包含整合至源自人類或靈長類之構架區中的至少兩種肽之重鏈可變區(HCVR)，該等肽具有選自由表示重鏈可變區(HCVR)之CDR1之SEQ ID NO: 1、表示重鏈可變區(HCVR)之CDR2之SEQ ID NO: 2及表示重鏈可變區(HCVR)之CDR3之SEQ ID NO: 3組成的序列之群的胺基酸序列。

在另一實施例中，本發明係關於人類化抗體或其片段，其包含整合至源自人類或靈長類之輕鏈構架區中的至少兩種肽，其具有選自由表示輕鏈可變區(LCVR)之CDR1之SEQ ID NO: 4、表示輕鏈可變區(LCVR)之CDR2之SEQ ID NO: 5及表示輕鏈可變區(LCVR)之CDR3之SEQ ID NO: 6組成的序列之群的胺基酸序列。

詳言之，本發明係關於輕鏈可變區(LCVR)，其具有整合至源自人類或靈長類之輕鏈構架區中的至少兩種肽，該等肽具有選自由表示輕鏈可變區(LCVR)之CDR1之SEQ ID NO: 4、表示輕鏈可變區(LCVR)之CDR2之SEQ ID NO: 5及表示輕鏈可變區(LCVR)之CDR3之SEQ ID NO: 6組成的序列之群的胺基酸序列，其中相同CDR不能在抗體中出現兩次，尤其該等CDR之至少一者須為由SEQ ID NO: 4表示之

CDR1。

本發明亦係關於人類化抗體或其片段，其包含整合至源自人類或靈長類之重鏈構架區中的肽，其具有尤其以上文指示之順序的表示重鏈可變區(HCVR)之CDR1之SEQ ID NO: 1、表示重鏈可變區(HCVR)之CDR2之SEQ ID NO: 2及表示重鏈可變區(HCVR)之CDR3之SEQ ID NO: 3的胺基酸序列。

詳言之，本發明係關於包含整合至源自人類或靈長類之重鏈構架區中的肽之重鏈可變區(HCVR)，該等肽具有尤其以上文指示之順序的表示重鏈可變區(HCVR)之CDR1之SEQ ID NO: 1、表示重鏈可變區(HCVR)之CDR2之SEQ ID NO: 2及表示重鏈可變區(HCVR)之CDR3之SEQ ID NO: 3的胺基酸序列。

本發明亦包含人類化抗體或其片段，其包含整合至源自人類或靈長類之輕鏈構架區中的肽，該等肽具有尤其以上文指示之順序的表示輕鏈可變區(LCVR)之CDR1之SEQ ID NO: 4、表示輕鏈可變區(LCVR)之CDR2之SEQ ID NO: 5及表示輕鏈可變區(LCVR)之CDR3之SEQ ID NO: 6的胺基酸序列。

詳言之，本發明係關於包含整合至源自人類或靈長類之輕鏈構架區中的肽之輕鏈可變區(LCVR)，該等肽具有尤其以上文指示之順序的表示輕鏈可變區(LCVR)之CDR1之SEQ ID NO: 4、表示輕鏈可變區(LCVR)之CDR2之SEQ ID NO: 5及表示輕鏈可變區(LCVR)之CDR3之SEQ ID NO: 6的胺基酸序列。

本發明亦係關於人類化抗體或其片段，其包含整合至源自人類或靈長類之構架區中的至少三種肽，其具有選自由以下各物組成之序列之群的胺基酸序列：表示重鏈可變區(HCVR)之CDR1之SEQ ID NO: 1、表示重鏈可變區(HCVR)之CDR2之SEQ ID NO: 2及表示重鏈可變區(HCVR)之CDR3之SEQ ID NO: 3；及表示輕鏈可變區(LCVR)之

CDR1之SEQ ID NO: 4、表示輕鏈可變區(LCVR)之CDR2之SEQ ID NO: 5及表示輕鏈可變區(LCVR)之CDR3之SEQ ID NO: 6，但尤其係關於其中相同CDR不能在抗體中出現兩次之人類化抗體或其片段。

在另一實施例中，本發明係關於人類化抗體或其片段，該抗體包含整合至源自人類或靈長類之構架區中的至少4種肽，其具有選自由以下各物組成之序列之群的胺基酸序列：表示重鏈可變區(HCVR)之CDR1之SEQ ID NO: 1、表示重鏈可變區(HCVR)之CDR2之SEQ ID NO: 2及表示重鏈可變區(HCVR)之CDR3之SEQ ID NO: 3；及表示輕鏈可變區(LCVR)之CDR1之SEQ ID NO: 4、表示輕鏈可變區(LCVR)之CDR2之SEQ ID NO: 5及表示輕鏈可變區(LCVR)之CDR3之SEQ ID NO: 6，但本發明尤其係關於其中相同CDR不能在抗體中出現兩次之人類化抗體或其片段。

在另一實施例中，本發明係關於人類化抗體或其片段，其包含整合至源自人類或靈長類之構架區中的至少5種肽，其具有選自由以下各物組成之序列之群的胺基酸序列：表示重鏈可變區(HCVR)之CDR1之SEQ ID NO: 1、表示重鏈可變區(HCVR)之CDR2之SEQ ID NO: 2及表示重鏈可變區(HCVR)之CDR3之SEQ ID NO: 3；及表示輕鏈可變區(LCVR)之CDR1之SEQ ID NO: 4、表示輕鏈可變區(LCVR)之CDR2之SEQ ID NO: 5及表示輕鏈可變區(LCVR)之CDR3之SEQ ID NO: 6，但本發明尤其係關於其中相同CDR不能在抗體中出現兩次之人類化抗體或其片段。

在其他實施例中，本發明係關於人類化抗體或其片段，其包含整合至源自人類或靈長類之構架區中的肽，該等肽具有表示重鏈可變區(HCVR)之CDR1的SEQ ID NO: 1、表示重鏈可變區(HCVR)之CDR2的SEQ ID NO: 2及表示重鏈可變區(HCVR)之CDR3的SEQ ID NO: 3；及表示輕鏈可變區(LCVR)之CDR1的SEQ ID NO: 4、表示輕鏈可變區

(LCVR)之CDR2的SEQ ID NO: 5及表示輕鏈可變區(LCVR)之CDR3的SEQ ID NO: 6之胺基酸序列。

在一特定實施例中，本發明係關於人類化抗體、重鏈可變區(HCVR)或其片段，其中該人類化抗體、重鏈可變區(HCVR)或其片段包含整合至源自人類或靈長類之重鏈構架區中的至少一種肽，其具有表示重鏈可變區(HCVR)之CDR2的SEQ ID NO: 2之胺基酸序列。

在另一特定實施例中，本發明係關於人類化抗體、重鏈可變區(HCVR)或其片段，其中該人類化抗體、重鏈可變區(HCVR)或其片段包含整合至源自人類或靈長類之重鏈構架區中的至少一種肽，其具有表示重鏈可變區(HCVR)之CDR3的SEQ ID NO: 3之胺基酸序列。

在另一特定實施例中，本發明係關於人類化抗體、重鏈可變區(HCVR)或其片段，該人類化抗體、重鏈可變區(HCVR)或其片段包含整合至源自人類或靈長類之重鏈構架區中的至少兩種肽，其具有表示重鏈可變區(HCVR)之CDR1的SEQ ID NO: 1及表示重鏈可變區(HCVR)之CDR2的SEQ ID NO: 2之胺基酸序列。

在另一特定實施例中，本發明係關於人類化抗體、重鏈可變區(HCVR)或其片段，該抗體、重鏈可變區(HCVR)或其片段包含整合至源自人類或靈長類之重鏈構架區中的至少兩種肽，其具有表示重鏈可變區(HCVR)之CDR1的SEQ ID NO: 1及表示重鏈可變區(HCVR)之CDR3的SEQ ID NO: 3之胺基酸序列。

在另一特定實施例中，本發明係關於人類化抗體、重鏈可變區(HCVR)或其片段，該抗體、重鏈可變區(HCVR)或其片段包含整合至源自人類或靈長類之重鏈構架區中的至少兩種肽，其具有表示重鏈可變區(HCVR)之CDR2的SEQ ID NO: 2及表示重鏈可變區(HCVR)之CDR3的SEQ ID NO: 3之胺基酸序列。

在另一特定實施例中，本發明係關於人類化抗體、輕鏈可變區

(HCVR)或其片段，該抗體、輕鏈可變區(HCVR)或其片段包含整合至源自人類或靈長類之重鏈構架區中的至少兩種肽，其具有表示輕鏈可變區(HCVR)之CDR1的SEQ ID NO: 4及表示輕鏈可變區(HCVR)之CDR2的SEQ ID NO: 5之胺基酸序列。

在另一特定實施例中，本發明係關於人類化抗體、輕鏈可變區(HCVR)或其片段，該抗體、輕鏈可變區(HCVR)或其片段包含整合至源自人類或靈長類之重鏈構架區中的至少兩種肽，其具有表示輕鏈可變區(HCVR)之CDR1的SEQ ID NO: 4及表示輕鏈可變區(HCVR)之CDR3的SEQ ID NO: 6之胺基酸序列。

本發明進一步包含人類化抗體或其片段，其中小鼠C2抗體之重鏈可變區(HCVR)與輕鏈可變區(LCVR)各向人類化抗體之至少兩個CDR區貢獻其至少一個CDR區。因此所得人類化抗體或其片段可包含：

- 與表示CDR1(LCVR)之SEQ ID NO: 4的胺基酸序列組合之表示CDR1(HCVR)之SEQ ID NO: 1的至少一個胺基酸序列；
- 與表示CDR1(LCVR)之SEQ ID NO: 4的胺基酸序列組合之表示CDR2(HCVR)之SEQ ID NO: 2的至少一個胺基酸序列；
- 與表示CDR1(LCVR)之SEQ ID NO: 4的胺基酸序列組合之表示CDR3(HCVR)之SEQ ID NO: 3的至少一個胺基酸序列；
- 與表示CDR2(LCVR)之SEQ ID NO: 5的胺基酸序列組合之表示CDR1(HCVR)之SEQ ID NO: 1的至少一個胺基酸序列；
- 與表示CDR2(LCVR)之SEQ ID NO: 5的胺基酸序列組合之表示CDR2(HCVR)之SEQ ID NO: 2的至少一個胺基酸序列；
- 與表示CDR3(LCVR)之SEQ ID NO: 6的胺基酸序列組合之表示CDR2(HCVR)之SEQ ID NO: 2的至少一個胺基酸序列；
- 與表示CDR3(LCVR)之SEQ ID NO: 6的胺基酸序列組合之表示

CDR1(HCVR)之SEQ ID NO: 1的至少一個胺基酸序列；

- 與表示CDR2(LCVR)之SEQ ID NO: 5的胺基酸序列組合之表示
CDR3(HCVR)之SEQ ID NO: 3的至少一個胺基酸序列；

- 與表示CDR3(LCVR)之SEQ ID NO: 6的胺基酸序列組合之表示
CDR3(HCVR)之SEQ ID NO: 3的至少一個胺基酸序列；

在另一實施例中，本發明係關於如本文先前所述之嵌合抗體或其片段，或人類化抗體或其片段，該抗體包含人類或靈長類來源之輕鏈及/或重鏈恆定區。

在另一實施例中，本發明係關於嵌合抗體或其片段，或人類化抗體或其片段，其中表示如SEQ ID NO: 1-6中所給出的輕鏈及/或重鏈CDR區的至少1、尤其至少1而不大於5、更尤其至少1而不大於4、甚至更尤其至少1而不大於3、但尤其至少1而不大於2個胺基酸經由保守性取代而改變使得抗體保持其全部功能。

本發明尤其係關於嵌合抗體或其片段，或人類化抗體或其片段，其中在如SEQ ID NO: 5中所給出之輕鏈可變區(LCVR)的CDR2中，Kabat位置50處之Lys經選自由Arg、Gln及Glu組成之群的胺基酸殘基、尤其經Arg置換。

本發明尤其係關於輕鏈可變區(LCVR)，其中在如SEQ ID NO: 5中所給出之CDR2中，Kabat位置50處之Lys經選自由Arg、Gln及Glu組成之群的胺基酸殘基、尤其經Arg置換。

在另一實施例中，本發明係關於嵌合抗體或其片段，或人類化抗體或其片段，其中在如SEQ ID NO: 5中所給出之輕鏈可變區(LCVR)的CDR2中，Kabat位置53處之Ser經選自由Asn或Thr組成之群的胺基酸殘基、但尤其經Asn置換。

本發明尤其係關於輕鏈可變區(LCVR)，其中在如SEQ ID NO: 5所給出之CDR2中，Kabat位置53處之Ser經選自由Asn或Thr組成之群

的胺基酸殘基、但尤其經Asn置換。

在本發明之一實施例中，提供嵌合抗體或其片段，或人類化抗體或其片段，其中重鏈可變區(HCVR)具有與SEQ ID NO: 15及16中分別給出之序列90%、尤其95%、更尤其98%一致的胺基酸序列。

在本發明之另一實施例中，提供嵌合抗體或其片段，或人類化抗體或其片段，其中輕鏈可變區(LCVR)具有與SEQ ID NO: 12及13中分別給出之序列90%、尤其95%、更尤其98%一致的胺基酸序列。

在本發明之另一實施例中，提供人類化抗體或其片段，其中重鏈可變區(HCVR)之至少兩個、但尤其三個CDR區具有與如SEQ ID NO: 1-3中給出之相應CDR區90%、尤其95%、更尤其98%一致的胺基酸序列。

在本發明之另一實施例中，提供人類化抗體或其片段，其中輕鏈可變區(LCVR)之至少兩個、但尤其三個CDR區具有與如SEQ ID NO: 4-6中給出之相應CDR區90%、尤其95%、更尤其98%一致的胺基酸序列。

在另一實施例中，本發明係關於如本文先前所述的本發明之嵌合抗體或其片段，或人類化抗體或其片段，其中重鏈可變區(HCVR)具有與SEQ ID NO: 15及16中分別給出之序列90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致的胺基酸序列。

在另一實施例中，本發明係關於如本文先前所述的本發明之嵌合抗體或其片段，或人類化抗體或其片段，其中輕鏈可變區(LCVR)具有與SEQ ID NO: 12及13中分別給出之序列90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致的胺基酸序列。

在另一實施例中，本發明係關於如本文先前所述的本發明之嵌合抗體或其片段，或人類化抗體或其片段，其中重鏈可變區(HCVR)之至少一個、尤其至少兩個、但尤其三個CDR區具有與SEQ ID NO:

1-3中給出之相應CDR區90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致的胺基酸序列。

在另一實施例中，本發明係關於如本文先前所述的本發明之嵌合抗體或其片段，或人類化抗體或其片段，其中輕鏈可變區(LCVR)之至少一個、尤其至少兩個、但尤其三個CDR區具有與如SEQ ID NO: 4-6中給出之相應CDR區90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致的胺基酸序列。

在另一實施例中，本發明係關於根據本發明且如本文先前所述之人類化抗體，其中至少一個表示分別獲自人類生殖系V_H及V_K序列之受體構架序列之胺基酸經由取代為來自鼠類抗體ACI-01-Ab7C2之相應區的胺基酸或其保守取代而改變。

本發明尤其分別係關於重鏈可變區及包含該重鏈可變區之人類化抗體，其中獲自重鏈可變區之KABAT亞群V_HIII的人類生殖系V_H序列之受體構架序列中的Kabat位置47之Trp經選自由Leu、正白胺酸、Ile、Val、Met、Ala及Phe組成之群的胺基酸置換，尤其Leu及Ile，但尤其諸如展示於SEQ ID NO: 15中之Leu置換。

本發明進一步分別係關於重鏈可變區及包含該重鏈可變區之人類化抗體，其中獲自重鏈可變區的KABAT亞群V_HIII之人類生殖系V_H序列的受體構架序列中Kabat位置94之Arg經選自由Ser及Thr組成之群的胺基酸置換，而尤其經諸如展示於SEQ ID NO: 15中之Ser置換。

在另一實施例中，本發明分別係關於重鏈可變區及包含該重鏈可變區之人類化抗體，其中獲自重鏈可變區的KABAT亞群V_HIII之人類生殖系V_H序列之受體構架序列中Kabat位置47之Trp經選自由Leu、正白胺酸、Ile、Val、Met、Ala及Phe組成之群的胺基酸，尤其Leu及Ile，而尤其Leu置換，且Kabat位置94之Arg經選自由Ser及Thr組成之群的胺基酸置換、而尤其經諸如展示於SEQ ID NO: 15中之Ser置換。

本發明進一步分別係關於輕鏈可變區及包含該輕鏈可變區之人類化抗體，其中獲自輕鏈可變區之KABAT亞群V_KII的人類生殖系V_K序列之受體構架序列中Kabat位置45之Gln經選自由Lys、Arg、Gln及Asn組成之群的胺基酸置換，尤其經Lys及Arg，而尤其經Lys置換。

本發明進一步分別係關於輕鏈可變區及包含該輕鏈可變區之人類化抗體，其中獲自輕鏈可變區的KABAT亞群V_KII之人類生殖系V_K序列之受體構架序列中Kabat位置87之Tyr經選自由Phe、Leu、Val、Ile及Ala組成之群的胺基酸置換，尤其經Leu及Phe，而尤其經Phe置換。

本發明進一步分別係關於輕鏈可變區及包含該輕鏈可變區之人類化抗體，其中獲自小鼠單株抗體、尤其諸如展示於SEQ ID NO: 12中之鼠類抗體ACI-01-Ab7C2的CDR2區中Kabat位置50之Lys經選自由Arg、Gln、His及Asn組成之群的胺基酸置換，而尤其經Arg置換。

在另一實施例中，本發明分別係關於輕鏈可變區及包含該輕鏈可變區之人類化抗體，其中獲自小鼠單株抗體、尤其諸如展示於SEQ ID NO: 12中之鼠類抗體ACI-01-Ab7C2的CDR2區中Kabat位置53之Asn經選自由Ala、Val、Leu、Ser及Ile組成之群的胺基酸置換，而尤其經Ser置換。

在另一實施例中，本發明係關於人類化抗體，其中獲自重鏈可變區之KABAT亞群V_HIII的人類生殖系V_H序列之受體構架序列中Kabat位置47之Trp經選自由Leu、正白胺酸、Ile、Val、Met、Ala、及Phe組成之群的胺基酸置換，尤其經Leu及Ile，而尤其經Leu置換置換，且獲自重鏈可變區之KABAT亞群V_HIII的人類生殖系V_H序列之受體構架序列中Kabat位置94之Arg經選自由Ser及Thr組成之群的胺基酸置換，而尤其經如SEQ ID NO: 15中所示之Ser置換，且獲自輕鏈可變區之KABAT亞群V_KII的人類生殖系V_K序列之受體構架序列中Kabat位置87

之Tyr經選自由Phe、Leu、Val、Ile及Ala組成之群的胺基酸置換，尤其經Leu及Phe，而尤其經Phe置換。

在另一實施例中，本發明分別係關於重鏈可變區及包含該重鏈可變區之人類化抗體，其中獲自如SEQ ID NO: 15中所示之重鏈可變區的KABAT亞群V_HIII的人類生殖系V_H序列之受體構架序列中Kabat位置47之Trp經Leu置換。

在另一實施例中，本發明分別係關於重鏈可變區及包含該重鏈可變區之人類化抗體，其中獲自重鏈可變區之KABAT亞群V_HIII的人類生殖系V_H序列之受體構架序列中Kabat位置94之Arg經諸如展示於SEQ ID NO: 15中之Ser置換。

在另一實施例中，本發明分別係關於重鏈可變區及包含該重鏈可變區之人類化抗體，其中獲自重鏈可變區之KABAT亞群V_HIII的人類生殖系V_H序列之受體構架序列中Kabat位置47之Trp經Leu及Ile置換，而尤其經Leu置換，且獲自重鏈可變區之KABAT亞群V_HIII的人類生殖系V_H序列之受體構架序列中Kabat位置94之Arg經諸如展示於SEQ ID NO: 15中之Ser置換。

在另一實施例中，本發明分別係關於輕鏈可變區及包含該輕鏈可變區之人類化抗體，其中獲自輕鏈可變區之KABAT亞群V_KII的人類生殖系V_K序列之受體構架序列中Kabat位置87之Tyr經Phe置換。

在另一實施例中，本發明分別係關於重鏈可變區及包含該重鏈可變區之人類化抗體，其中獲自重鏈可變區之KABAT亞群V_HIII的人類生殖系V_H序列之受體構架序列中Kabat位置47之Trp經Leu及Ile置換，而尤其經Leu置換，且獲自重鏈可變區之KABAT亞群V_HIII的人類生殖系V_H序列之受體構架序列中Kabat位置94之Arg經諸如展示於SEQ ID NO: 15中之Ser置換，且獲自輕鏈可變區之KABAT亞群V_KII的人類生殖系V_K序列之受體構架序列中Kabat位置87之Tyr經Phe置換。

在一實施例中，本發明分別係關於重鏈可變區及包含該重鏈可變區之人類化抗體，其中獲自重鏈可變區之KABAT亞群V_HIII的人類生殖系V_H序列之受體構架序列中Kabat位置47之Trp經選自由Leu、正白胺酸、Ile、Val、Met、Ala及Phe組成之群的胺基酸置換，尤其經Leu及Ile，而尤其經Leu置換，且Kabat位置94之Arg經選自由Ser及Thr組成之群的胺基酸置換，而尤其經諸如展示於SEQ ID NO: 15中之Ser置換，且其中獲自小鼠單株抗體、尤其鼠類抗體ACI-01-Ab7C2之CDR2區中Kabat位置50之Lys經選自由Arg、Gln、His及Asn組成之群的胺基酸置換，而尤其經Arg置換。

在一實施例中，本發明分別係關於重鏈可變區及包含該重鏈可變區之人類化抗體，其中獲自重鏈可變區之KABAT亞群V_HIII的人類生殖系V_H序列之受體構架序列中Kabat位置47之Trp經選自由Leu、正白胺酸、Ile、Val、Met、Ala及Phe組成之群的胺基酸置換，尤其經Leu及Ile，而尤其經Leu置換，且Kabat位置94之Arg經選自由Ser及Thr組成之群的胺基酸置換，而尤其經諸如展示於SEQ ID NO: 15中之Ser置換，且其中獲自小鼠單株抗體、尤其鼠類抗體ACI-01-Ab7C2之CDR2區中Kabat位置53之Asn經選自由Ala、Val、Leu、Ser及Ile組成之群的胺基酸置換，而尤其經Ser置換。

在一特定實施例中，本發明係關於SEQ ID NO: 12之輕鏈可變區。

在本發明之另一特定實施例中，提供包含SEQ ID NO: 12之輕鏈可變區之人類化抗體。

在一特定實施例中，本發明係關於包括如SEQ ID NO: 13中所示之信號序列的輕鏈可變區。

在本發明之另一特定實施例中，提供包含包括如SEQ ID NO: 13中所示之信號序列的完整輕鏈可變區之人類化抗體。

在本發明之另一特定實施例中，提供包含SEQ ID NO: 12之輕鏈可變區及SEQ ID NO: 14之輕鏈恆定區的人類化抗體。

在本發明之另一特定實施例中，提供包含SEQ ID NO: 13之完整輕鏈可變區及SEQ ID NO: 14之輕鏈恆定區的人類化抗體。

在一特定實施例中，本發明係關於SEQ ID NO: 15之重鏈可變區。

在本發明之另一特定實施例中，提供包含SEQ ID NO: 15之重鏈可變區的人類化抗體。

在一特定實施例中，本發明係關於包括如SEQ ID NO: 16中所示之信號序列的重鏈可變區。

在本發明之另一特定實施例中，提供包含包括如SEQ ID NO: 16中所示之信號序列的完整重鏈可變區之人類化抗體。

在本發明之另一特定實施例中，提供包含SEQ ID NO: 15之重鏈可變區及SEQ ID NO: 17之重鏈恆定區的人類化抗體。

在本發明之另一特定實施例中，提供包含SEQ ID NO: 16之重鏈可變區及SEQ ID NO: 17之重鏈恆定區的人類化抗體。

在一實施例中，根據本發明且如本文所述之人類化抗體與具有至少30、尤其至少35、更尤其至少38、甚至更尤其至少40個胺基酸殘基之A β 單體肽及/或包含複數個該等A β 單體單元之A β 聚合型可溶類澱粉肽，但尤其與A β ₁₋₄₂單體及/或包含複數個該等A β ₁₋₄₂單體單元之A β 聚合型可溶類澱粉肽，尤其在抗體：A β ₁₋₄₂至多1:1000、尤其至多1:500、更尤其至多1:300、甚至更尤其至多1:200之莫耳濃度比率下，而尤其在介於1:10與1:100之間的莫耳濃度比率下一起培育後，抑制A β 單體向高分子聚合型原纖維之聚集。

詳言之，在介於28°C與40°C、尤其介於32°C與38°C之間的溫度下，更尤其在37°C下與類澱粉單體及/或聚合型可溶類澱粉肽一起培

育本發明之抗體歷時24小時至60小時、尤其歷時30小時至50小時、更尤其歷時48小時、而尤其24小時。

在本發明之一特定實施例中，在37°C之溫度下歷時24小時完成與類澱粉單體及/或聚合型可溶類澱粉肽一起培育。

詳言之，抗體、尤其包括任何功能上等效抗體或其功能部分之本發明之人類化抗體與A β ₁₋₄₂單體肽及/或包含複數個該等A β ₁₋₄₂單體單元之A β 聚合型可溶類澱粉肽結合，且與A β ₁₋₄₂單體肽及/或包含複數個該等A β ₁₋₄₂單體單元之A β 聚合型可溶類澱粉肽一起共同培育後抑制A β 單體及/或聚合物向高分子聚合型原纖維之聚集。

在一實施例中，在抗體：A β ₁₋₄₂至多1:1000之莫耳濃度比率下、尤其在介於1:10與1:100之間的莫耳濃度比率下、而尤其在1:10之莫耳濃度比率下，與在緩衝液中培育之個別類澱粉肽單體(對照)相比，抗體、尤其包括任何功能上等效抗體或其功能部分之本發明之人類化抗體抑制至少50%、尤其至少60%、尤其至少65%、更尤其至少75%、甚至更尤其至少80%、但尤其至少85%-90%或更高之A β 單體及/或包含複數個該等A β 單體單元之A β 可溶性聚合物向高分子聚合型原纖維之聚集。

在本發明之一特定實施例中，在1:100之抗體：A β ₁₋₄₂莫耳濃度比率下，抗體、尤其包括任何功能上等效抗體或其功能部分之本發明之人類化抗體抑制至少30%之A β 單體及/或包含複數個該等A β 單體單元之A β 可溶性聚合物向高分子聚合型原纖維的聚集。

在本發明之另一特定實施例中，在1:10之抗體：A β ₁₋₄₂莫耳濃度比率下，抗體、尤其包括任何功能上等效抗體或其功能部分之本發明之人類化抗體抑制至少80%之A β 單體及/或包含複數個該等A β 單體單元之A β 可溶性聚合物向高分子聚合型原纖維的聚集。

根據本發明且如本文所述之抗體與類澱粉樣單體及/或聚合型

肽，而尤其與類澱粉形式(1-42)之結合造成單體及/或聚合型類澱粉樣肽向高分子原纖維或長絲之聚集受抑。經由抑制類澱粉樣單體及/或聚合型肽之聚集，根據本發明之抗體能夠防止或減慢類澱粉斑塊、尤其類澱粉形式(1-42)之形成，已知類澱粉形式(1-42)藉由改變第二構形而變得不溶，且為患病動物或人類之腦中類澱粉斑塊之主要部分。

可藉由在此項技術中已知的任何合適之方法、尤其藉由密度梯度超速離心，接著預成型梯度之SDS-PAGE沈降分析及/或藉由硫黃素T(Th-T)螢光檢定來測定本發明之抗體之聚集抑制潛力。

在一實施例中，本發明係關於抗體、尤其如本文所述包括任何功能上等效抗體或其功能部分之人類化抗體，該抗體尤其在介於1:5與1:1000、尤其介於1:10與1:500之間的莫耳濃度比率下，更尤其在1:10至1:300之比率下，甚至更尤其在介於1:10與1:100之比率下，與藉由具有至少30、尤其至少35、更尤其至少38、甚至更尤其至少40個胺基酸殘基之A β 單體肽，且尤其A β ₁₋₄₂單體肽聚集所形成之預成型高分子聚合型類澱粉原纖維或長絲共同培育後，能夠使該等預成型聚合型原纖維或長絲解聚至少20%、尤其至少30%、更尤其至少35%、甚至更尤其至少40%，但尤其至少50%或以上。

在本發明之一特定實施例中，藉由密度-梯度超速離心，接著預成型梯度之SDS-PAGE沈降分析法分別測定該抗體之聚集抑制及解聚潛力。

在本發明之另一特定實施例中，藉由硫黃素T(Th-T)螢光檢定分別測定該抗體之聚集抑制及解聚潛力。

在另一特定實施例中，在介於28°C與40°C、尤其介於32°C與38°C、更尤其37°C之溫度下將本發明之抗體與類澱粉預成型高分子聚合型類澱粉原纖維或長絲一起共同培育12小時至36小時、尤其18小時至30小時、更尤其24小時。

詳言之，在37℃之溫度下與預成型高分子聚合型類澱粉原纖維或長絲一起共同培育24小時。

在本發明之一特定實施例中，在1:100之抗體： $A\beta_{1-42}$ 莫耳濃度比率下，抗體、尤其包括任何功能上等效抗體或其功能部分之本發明之人類化抗體能夠將預成型聚合型原纖維或長絲解聚至少24%。

在本發明之另一特定實施例中，在1:10之抗體： $A\beta_{1-42}$ 莫耳濃度比率下，抗體、尤其包括任何功能上等效抗體或其功能部分之本發明之人類化抗體能夠將預成型聚合型原纖維或長絲解聚至少32%。

經由類澱粉樣聚合型原纖維或長絲之解聚，根據本發明之抗體能夠防止或減慢類澱粉斑塊形成，其使得與疾病相關之症狀緩解且使得其進展延遲或逆轉。

因此，本發明之另一實施例提供抗體、尤其包括任何功能上等效抗體或其功能部分之如本文所述的人類化抗體，該抗體能夠降低患有導致腦中 $A\beta$ 濃度增加之疾病或病狀的動物、尤其哺乳動物、而尤其人類腦中 $A\beta$ 之總量。

在另一實施例中，本發明係關於根據本發明且如本文先前所述之人類化抗體，該抗體為雙有效性抗體，此係由於其顯示聚集抑制特性以及解聚特性，尤其與高度構形敏感性成對。

本發明尤其係關於根據本發明且如本文先前所述之嵌合抗體或其片段，或人類化抗體或其片段，該抗體與類澱粉單體及/或聚合型可溶類澱粉肽、尤其與諸如 $A\beta$ 單體肽1-39、1-40、1-41或1-42之 β -類澱粉單體肽及/或包含複數個該等 $A\beta$ 單體單元之聚合型可溶 β -類澱粉肽，而尤其與 $A\beta_{1-42}$ 單體及/或包含複數個該等 $A\beta_{1-42}$ 單體單元之 $A\beta$ 聚合型可溶類澱粉肽一起共同培育後，抑制 $A\beta$ 單體向高分子聚合型原纖維或長絲之聚集，且此外，在與藉由類澱粉單體肽、尤其諸如 $A\beta$ 單體肽1-39、1-40、1-41或1-42之 β -類澱粉單體肽，而尤其 $A\beta_{1-42}$ 單體

肽聚集所形成之預成型高分子聚合型類澱粉原纖維或長絲一起培育後，能夠將預成型聚合型原纖維或長絲解聚。

在另一態樣中，本發明係關於根據本發明且如本文先前所述之嵌合抗體或其片段，或人類化抗體或其片段，該抗體能夠誘導 β 摺疊構形向 α -螺旋及/或無規捲曲構形、尤其無規捲曲構形、甚至更尤其在分子中尤其在A β 蛋白之Tyr 10及Val12之環境中所給位置處的無規捲曲構形之轉變，其在損耗 β 摺疊構形的情況下使得無規捲曲構形增加且使得預成型高分子聚合型類澱粉原纖維或長絲之溶解得以改善。詳言之，與在緩衝液中培育之個別預成型類澱粉聚合型原纖維或長絲(對照)相比， β 摺疊構形減少合計至少30%、尤其至少35%、且更尤其至少40%及更多。

藉由固態 ^{13}C NMR光譜學，尤其藉由量測A β_{1-42} 肽中Tyr 10及Val 12 C β 之構形的積分強度來測定抗體誘導第二結構轉變之潛力。

在本發明之另一實施例中，提供根據本發明且如本文先前所述之嵌合抗體或其片段，或人類化抗體或其片段，其包含至少一個輕鏈或其片段或至少一個重鏈或其片段，其中該抗體或片段以高結合親和力與A β 單體結合，其中 K_D 範圍係介於至少約 1×10^{-7} M至至少約 1×10^{-12} M、尤其至少約 1×10^{-8} M至至少約 1×10^{-11} M、更尤其至少約 1×10^{-9} M至至少約 1×10^{-10} M、甚至更尤其至少約 1×10^{-8} M至至少約 2×10^{-8} M之間，但其較佳並不展示與類澱粉前驅蛋白(APP)的任何顯著交叉反應性。

在本發明之另一實施例中，提供根據本發明且如本文中先前所描述之嵌合抗體或其片段，或人類化抗體或其片段，其包含至少一個輕鏈或其片段或至少一個重鏈或其片段，其中該抗體或片段以高結合親和力與A β 纖維、原纖維或長絲結合，其中 K_D 範圍係介於至少約 1×10^{-7} M至至少約 1×10^{-12} M、尤其至少約 1×10^{-8} M至至少約 1×10^{-11}

M、更尤其至少約 1×10^{-9} M至至少約 1×10^{-10} M、甚至更尤其至少約 2×10^{-9} M至至少約 5×10^{-9} M之間，但其較佳並不展示與類澱粉前驅蛋白(APP)的任何顯著交叉反應性。

在另一實施例中，根據本發明且如本文先前所述之抗體或其片段顯示對A β 纖維、原纖維或長絲之結合親和力比對A β 單體之結合親和力高至少2倍、尤其至少4倍、尤其至少10倍、尤其至少15倍、更尤其至少20倍、但尤其至少25倍。

在另一實施例中，提供如本文先前所述之嵌合抗體或其片段，或人類化抗體或其片段，該抗體大體上與哺乳動物、尤其人類腦中的包括A β 斑塊之聚集的A β 結合，但其較佳並不展示與類澱粉前驅蛋白(APP)的任何顯著交叉反應性。

在本發明之另一態樣中，提供如本文先前所述之嵌合抗體或其片段，或人類化抗體或其片段，該抗體大體上與哺乳動物、尤其人類腦中的可溶聚合型類澱粉、尤其包括A β 單體之類澱粉 β (A β)結合，但其較佳並不展示與類澱粉前驅蛋白(APP)的任何顯著交叉反應性。

進一步提供根據本發明且如本文先前所述之嵌合抗體或其片段，或人類化抗體或其片段，該抗體顯著降低哺乳動物、尤其人類腦中A β 斑塊負擔。此舉可藉由以下操作來實現：使抗體與組織及/或體液、尤其腦中之斑塊結合或經由誘導構形移位使纖維解聚成可溶性聚合形式及單體形式且結合並使解聚及溶解之類澱粉形式、尤其類澱粉 β (A β)形式穩定而使平衡自不溶性及聚集態之類澱粉(尤其類澱粉 β (A β))向其可溶性形式移動。經由本發明之抗體之活性，使得有利於周邊清除及分解代謝，而非沈積於組織及/或體液、尤其腦內。因此，可在未使抗體與斑塊結合之情況下獲得本發明之抗體之有利作用。

經由此穩定活性，本發明之抗體能夠中和組織及/或體液中聚合

型及較低聚集度之可溶性類澱粉蛋白、尤其類澱粉 β (A β)蛋白的毒性作用。在本發明之一特定實施例中，本發明之抗體可因此在不必結合腦中聚集之類澱粉 β 的情況下實現其有利作用。

在本發明之另一態樣中，提供根據本發明且如本文先前所述之人類化抗體或其片段，其包含併入至少一個、尤其兩個且更尤其三個獲自以下各者之CDR區的至少一個輕鏈或其片段或至少一個重鏈或其片段：小鼠供體抗體、尤其"德國微生物菌種保藏中心(DSMZ)"於Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig以寄存編號DSM ACC2750於2005年12月1日寄存之小鼠抗體ACI-01-Ab7C2(在本申請案通篇對於人類化C2抗體稱為"mC2"及hC2)，其中該抗體或其片段對A β 抗原具有比小鼠供體抗體大至少5倍、尤其至少8倍、更尤其至少10倍、但尤其至少15倍之親和力。

在一實施例中，本發明之抗體可為任何同型及亞型之全抗體(例如具有兩個全長輕鏈及兩個全長重鏈)(例如IgM、IgD、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgE、IgA1及IgA2)；但尤其IgG4同型抗體；或者在另一實施例中，其可為全抗體之抗原結合片段(例如Fab、F(ab')₂及Fv)。

本發明因此亦係關於本文所述之抗體之抗原結合片段。在本發明之一實施例中，該片段係選自由以下片段組成之群：Fab片段、Fab'片段、F(ab)₂片段及Fv片段，其包括Fab免疫球蛋白表現文庫之產物及上述任一抗體及片段之抗原決定基結合片段。

在另一實施例中，本發明之抗體或抗原結合片段與聚乙二醇結合。在另一實施例中，本發明抗體之恆定區經修飾以相對於未經修飾之抗體降低至少一個恆定區所介導之生物效應功能。在另一實施例中，本發明之抗體或抗原結合片段包含具有改變之效應功能的Fc區。

本發明進一步係關於包含編碼根據本發明且如本文先前所揭示之嵌合抗體或其片段或人類化抗體或其片段之核苷酸序列的核苷酸分

子。

詳言之，本發明係關於包含編碼分別如SEQ ID NO: 2及3中所給出的鄰近胺基酸分子之延伸的核苷酸序列，或表示重鏈可變區(HCVR)之互補決定區(CDR)2及3之互補序列的核苷酸分子。

更詳言之，本發明係關於包含編碼如SEQ ID NO: 4中所給出之鄰近胺基酸分子之延伸的核苷酸序列或表示輕鏈可變區(LCVR)之互補決定區(CDR)1之互補序列的核苷酸分子。

在本發明之另一實施例中，提供包含如SEQ ID NO: 18及SEQ ID NO: 19中所給出之核苷酸序列或分別編碼重鏈可變區(HCVR)之CDR 2及CDR 3的胺基酸序列之互補序列的核苷酸分子。

在本發明之另一實施例中，提供包含如SEQ ID NO: 20中所給出之核苷酸序列或編碼輕鏈可變區(LCVR)之CDR 1之核苷酸序列的互補序列之核苷酸分子。

在本發明之另一實施例中，提供包含SEQ ID NO: 21之核苷酸序列或編碼輕鏈可變區之互補序列的核苷酸分子。

在本發明之另一實施例中，提供包含SEQ ID NO: 22之核苷酸序列或編碼包括信號序列之完整輕鏈可變區之互補序列的核苷酸分子。

在本發明之另一實施例中，提供包含編碼SEQ ID NO: 22之輕鏈可變區及SEQ ID NO: 23之輕鏈恆定區的核苷酸序列之核苷酸分子。本發明亦包含該核苷酸分子之互補鏈。

在本發明之另一實施例中，提供包含編碼重鏈可變區之SEQ ID NO: 24之核苷酸序列的核苷酸分子。本發明亦包含該核苷酸分子之互補鏈。

在本發明之另一實施例中，提供包含編碼包括信號序列之完整重鏈可變區的SEQ ID NO: 25之核苷酸序列的核苷酸分子。本發明亦包含該核苷酸分子之互補鏈。

在本發明之另一實施例中，提供包含編碼SEQ ID NO: 25之重鏈可變區及SEQ ID NO: 26之重鏈恆定區的核苷酸序列之核苷酸分子。本發明亦包含該核苷酸分子之互補鏈。

本發明亦包含在較大核苷酸分子之分離中或作為其部分，與本發明之上述編碼抗體之核苷酸序列雜交、尤其與其互補鏈雜交之核苷酸序列。

本發明尤其係關於在習知雜交條件下、尤其在嚴格雜交條件下，與SEQ ID NO: 18-26及29-32中所給出之核苷酸序列、尤其與其互補鏈雜交的核苷酸序列。

在本發明之另一實施例中，提供包含根據本發明且如本文先前所提及之核酸分子的表現載體。

在本發明之另一實施例中，提供包含表現載體之細胞，該表現載體包含根據本發明且如本文先前所提及之核酸。

在另一實施例中，本發明係關於包含治療有效量的本發明之抗體、但尤其包括任何功能上等效抗體或其任何衍生物或功能部分的根據本發明且如本文先前所述之嵌合抗體或其片段或人類化抗體或其片段的組合物，尤其為視情況進一步包含醫藥學上可接受之載劑的醫藥組合物之組合物。

在本發明之另一實施例中，該組合物包含治療有效量之抗體。

本發明進一步包含一種混合物，其包含治療有效量之抗體、尤其本發明之單株抗體、但尤其包括任何功能上等效抗體或其任何衍生物或功能部分的根據本發明且如本文先前所述之嵌合抗體或其片段或人類化抗體或其片段及視情況之其他生物活性物質及/或醫藥學上可接受之載劑及/或稀釋劑及/或賦形劑。

詳言之，本發明係關於一種混合物，其中其他生物活性物質為用於類澱粉變性症、一組與諸如涉及阿茲海默氏症之A β 蛋白的類澱

粉或類澱粉樣蛋白相關之疾病及病症之藥療法的化合物。

在本發明之另一實施例中，其他生物活性物質或化合物亦可為可用於治療由類澱粉 β 所致的類澱粉變性症之治療劑，或其可用於其他神經性病症之藥療法。

其他生物活性物質或化合物可藉由與本發明之抗體相同或類似的機制或藉由無關作用機制或藉由多種相關及/或無關作用機制發揮其生物效應。

其他生物活性化合物通常可包括中子透射增強劑，精神病治療藥物，乙醯化膽鹼脂酶抑制劑，鈣通道阻斷劑，生物胺，苯并二氮吡鎮定劑，乙醯膽鹼合成、儲存或釋放增強劑、乙醯膽鹼突觸後受體促效劑、單胺氧化酶-A或單胺氧化酶-B抑制劑、N-甲基-D-天冬胺酸羧胺酸受體拮抗劑、非類固醇消炎藥物、抗氧化劑及含血清素受體拮抗劑。

更詳言之，本發明係關於包含至少一種選自由以下各物組成之群的化合物以及本發明之抗體及視情況之醫藥學上可接受之載劑及/或稀釋劑及/或賦形劑的混合物：有效對抗氧化應力之化合物、抗細胞凋亡化合物、金屬螯合劑、諸如派侖西平(pirenzepin)及代謝物之DNA修復抑制劑、3-胺基-1-丙烷磺酸(3APS)、1,3-丙烷二磺酸鹽(1,3PDS)、 α -分泌酶活化劑、 β 及 γ 分泌酶抑制劑、 τ 蛋白、神經傳遞質、 β 摺疊斷裂劑、清除/消耗細胞組份之類澱粉 β 之引誘劑、包括焦穀胺酯化類澱粉 β 3-42之N末端截短之類澱粉 β 抑制劑、消炎分子或膽鹼酯酶抑制劑(ChEI)(諸如塔克林(tacrine)、雷斯替明(rivastigmine)、冬尼培唑(donepezil)及/或加蘭他敏(galantamine))、M1促效劑及其他藥物，包括任何類澱粉或 τ 修飾藥物及營養補充劑，及營養補充劑。

本發明進一步係關於其中化合物為膽鹼酯酶抑制劑(ChEI)之混合物，尤其其中化合物為選自由塔克林、雷斯替明、冬尼培唑、加蘭他

敏、煙鹼酸及美金剛(memantine)組成之群的混合物。

在另一實施例中，本發明之混合物可包含煙鹼酸或美金剛以及本發明之抗體及視情況之醫藥學上可接受之載劑及/或稀釋劑及/或賦形劑。

在本發明之另一實施例中，提供包含"非典型抗精神病藥物"以及抗體、尤其本發明之單株抗體、但尤其根據本發明且如本文先前所述的嵌合抗體或其片段或人類化抗體或其片段及視情況之醫藥學上可接受之載劑及/或稀釋劑及/或賦形劑之混合物，該等非典型抗精神病藥物係諸如氯氮平(clozapine)、齊拉西酮(ziprasidone)、利培酮(risperidone)、阿立哌唑(aripiprazole)或奧氮平(olanzapine)，其係用於治療包括以下之陽性及陰性精神病症狀：幻覺、錯覺、思維障礙(表現為思維顯著不連貫、思維出軌、答非所問)及行為怪異或紊亂，以及快感缺乏、情感平穩、冷漠及社交退縮。

在本發明之一特定實施例中，根據本發明且如本文先前所述之組合物及混合物分別包含治療有效量之抗體及生物活性物質。

其他可適當地以與根據本發明之抗體組合之混合物來使用的化合物係描述於WO 2004/058258(參見尤其第16及17頁)中，其包括治療藥物目標(第36-39頁)、鏈烷磺酸及烷醇硫酸(第39-51頁)、膽鹼酯酶抑制劑(第51-56頁)、NMDA受體拮抗劑(第56-58頁)、雌激素(第58-59頁)、非類固醇消炎藥物(第60-61頁)、抗氧化劑(第61-62頁)、過氧化體增殖劑活化受體(PPAR)促效劑(第63-67頁)、膽固醇降低劑(第68-75頁)；類澱粉抑制劑(第75-77頁)、類澱粉形成抑制劑(第77-78頁)、金屬螯合劑(第78-79頁)、抗精神病及興奮劑(第80-82頁)、營養補充劑(第83-89頁)及增加生物活性物質在腦中之利用度的化合物(參見第89-93頁)及前藥(第93及94頁)，其文獻以引用的方式併入本文中。

在另一實施例中，本發明係關於包含治療有效量的抗體、尤其

本發明之單株抗體、但尤其根據本發明且如本文先前所述之嵌合抗體或其片段或人類化抗體或其片段及/或生物活性物質的混合物。

本發明進一步係關於抗體、尤其本發明之單株抗體、但尤其根據本發明或如本文先前所述之嵌合抗體或其片段或人類化抗體或其片段及/或其功能部分及/或包含該抗體之醫藥組合物或混合物的用途，其係用於製備用以治療或減輕類澱粉變性症、一組與類澱粉斑塊形成相關之包括繼發性類澱粉變性症及年齡相關之類澱粉變性症的疾病及病症之影響的藥物，諸如包括(但不限於)以下之疾病：神經性病變，諸如阿茲海默氏症(AD)、路易體性癡呆、唐氏綜合症、具有類澱粉變性(荷蘭類型)之遺傳性腦出血；關島帕金森-癡呆複合症；以及其他基於或與類澱粉樣蛋白相關的疾病，諸如進行性核上眼神經麻痺症、多發性硬化；庫賈氏病、帕金森氏病、HIV相關性癡呆、ALS(肌萎縮性側索硬化)、成年發病型糖尿病；老年心臟類澱粉變性；內分泌腫瘤及其他包括黃斑退化之疾病。

本發明亦包含用於製備抗體、尤其本發明之單株抗體、但尤其根據本發明且如本文先前所述的嵌合抗體或其片段或人類化抗體或其片段及/或其功能部分及/或包含該尤其以治療有效量之抗體及/或其功能部分的醫藥組合物或混合物之方法，該等物質係用於防止、治療或減輕類澱粉變性症、一組與類澱粉斑塊形成相關之包括繼發性類澱粉變性症及年齡相關的類澱粉變性症之疾病及病症之影響的方法中，諸如包括(但不限於)以下之疾病：神經性病變，諸如阿茲海默氏症(AD)、路易體性癡呆、唐氏綜合症、具有類澱粉變性(荷蘭類型)之遺傳性腦出血；關島帕金森-癡呆複合症；以及其他基於或與類澱粉樣蛋白相關的疾病，諸如進行性核上眼神經麻痺症、多發性硬化；庫賈氏病、帕金森氏病、HIV相關性癡呆、ALS(肌萎縮性側索硬化)、成年發病型糖尿病；老年心臟類澱粉變性；內分泌腫瘤及包括黃斑退化

之其他疾病，該方法包含以醫藥學上可接受之形式調配抗體、尤其本發明之單株抗體、但尤其本發明之嵌合抗體或其片段或人類化抗體或其片段。

本發明進一步包含用於防止、治療或減輕類澱粉變性症、一組與類澱粉斑塊形成相關之包括繼發性類澱粉變性症及年齡相關類澱粉變性症的疾病及病症之影響的方法，諸如包括(但不限於)以下之疾病：神經性病症，諸如阿茲海默氏症(AD)、路易體性癡呆、唐氏綜合症、具有類澱粉變性(荷蘭類型)之遺傳性腦出血；關島帕金森-癡呆複合症；以及其他基於或與類澱粉樣蛋白相關的疾病，諸如進行性核上眼神經麻痺症、多發性硬化；庫賈氏病、帕金森氏病、HIV相關性癡呆、ALS(肌萎縮性側索硬化)、成年發病型糖尿病；老年心臟類澱粉變性；內分泌腫瘤及包括黃斑退化之其他疾病，該方法藉由向患該病症之動物或人類投與抗體及/或其功能部分、但尤其人類化抗體及/或其功能部分或包含該抗體及/或其功能部分之組合物或混合物，該方法包含投與治療有效量之抗體。

本發明之一目標亦為提供藉由向動物、尤其哺乳動物或人類投與抗體、尤其根據本發明且如本文所述之醫藥組合物來治療類澱粉變性症、一組與類澱粉斑塊形成相關之包括繼發性類澱粉變性症及年齡相關之類澱粉變性症(包括(但不限於)神經性病症，諸如阿茲海默氏症(AD))的疾病及病症、尤其特徵在於認知記憶容量喪失之疾病或病狀的方法。

在一特定實施例中，本發明提供藉由向動物、尤其哺乳動物或人類投與抗體、尤其根據本發明且如本文先前所述之醫藥組合物來保持或增加患有記憶損傷之動物、尤其哺乳動物或人類之認知記憶容量，尤其恢復認知記憶容量的方法。

本發明之另一目標提供治療組合物及製備該組合物之方法以及

使用根據本發明且如本文先前所述之抗體來治療以下各病的方法：類澱粉變性症、一組與類澱粉斑塊形成相關之包括繼發性類澱粉變性症及年齡相關類澱粉變性症(包括(但不限於)神經性病變，諸如阿茲海默氏症(AD))的疾病及病症、尤其特徵在於認知記憶容量喪失之疾病或病狀。

本發明尤其係關於患有特徵在於認知記憶容量喪失之類澱粉相關病狀之動物、尤其哺乳動物或人類的治療，其使得認知記憶容量保持。

本發明進一步係關於診斷患者之類澱粉相關疾病或病狀之方法，其包含在樣品中或原位偵測抗體或其活性片段與類澱粉蛋白之抗原決定基的免疫特異性結合，該方法包括以下步驟：

(a) 使懷疑含有類澱粉蛋白之樣品或特定軀體部分或軀體區域與抗體、尤其本發明之單株抗體、但尤其根據本發明且如本文先前所述的嵌合抗體或其片段或人類化抗體或其片段及/或其功能部分接觸，該抗體結合類澱粉蛋白之抗原決定基；

(b) 使抗體及/或其功能部分與類澱粉蛋白結合以形成免疫複合體；

(c) 偵測該免疫複合體之形成；及

(d) 將免疫複合體之存在或缺失與樣品或特定軀體部分或區域中類澱粉蛋白之存在或缺失相關聯。

亦包含測定組織及/或體液中類澱粉樣斑塊負擔之程度的方法，其包含：

(a) 獲得表示研究中之組織及/或體液之樣品；

(b) 以抗體、尤其本發明之單株抗體、但尤其根據本發明且如本文先前所述之嵌合抗體或其片段或人類化抗體或其片段及/或其功能部分測試該樣品之類澱粉蛋白之存在；

- (c) 確定與蛋白結合之抗體之量；及
- (d) 計算組織及/或體液中之斑塊負擔。

本發明尤其係關於確定組織及/或體液中類澱粉樣斑塊負擔之程度的方法，其中測定步驟c)中免疫複合體之形成使得免疫複合體之存在或缺失與類澱粉蛋白質之存在或缺失相關聯。

在本發明之另一實施例中，提供用於偵測及診斷類澱粉相關疾病及病症之測試套組，其包含抗體、尤其本發明之單株抗體、但尤其根據本發明且如本文先前所述的嵌合抗體或其片段或人類化抗體或其片段及/或其功能部分。

本發明尤其係關於用於偵測及診斷類澱粉相關疾病及病症之測試套組，其包含容納一或多種根據本發明之抗體及/或其功能部分的容器，及使用該等抗體用於以下目的之說明書：與類澱粉蛋白結合以形成免疫複合體且偵測免疫複合體之形成使得免疫複合體之存在或缺失與類澱粉蛋白之存在或缺失相關聯。

在另一態樣中，本發明提供包含如SEQ ID NO: 27中所述之可變區或其變異體的抗體。在一實施例中，細胞株表現該抗體。

在另一態樣中，本發明提供包含如SEQ ID NO: 29中所述之可變區或其變異體的抗體基因。在一實施例中，細胞株表現該抗體。

在另一態樣中，本發明提供用於將預成型 β -類澱粉纖維解聚之方法，其包含使hC2抗體與預成型 β -類澱粉纖維相互作用。

在另一態樣中，本發明提供如前述請求項中任一項之人類化抗體或其片段，其中該抗體或其片段保護神經元免於Abeta誘發之退化。

在另一態樣中，本發明提供預防Abeta誘發之神經元退化的方法，其包含以有效量之根據本發明之人類化抗體或其片段治療神經元。

在另一態樣中，本發明提供根據本發明之人類化抗體或其片段之用途，其係用於製備用以預防暴露於Abeta寡聚物後神經元退化之藥劑。

回顧下列所揭示實施例之實施方式及附加申請專利範圍後，本發明之該等及其他目標、特徵及優勢將顯而易見。

【圖式簡單說明】

圖1(實例2)：嵌合抗體之小鼠輕鏈可變區之表現卡匣

圖2(實例2)：嵌合抗體之小鼠重鏈可變區之表現卡匣

圖3(實例5.2)：小鼠重鏈可變區與最接近鼠類生殖系序列之比較

圖4(實例8)：純化之人類化C2抗體之活性

圖5(實例9)：與藉由瞬時轉染及純化抗體產生之嵌合抗體C2ChVHAF/ChVK相比，藉由瞬時表現聯合C2嵌合重鏈的經C2修飾之CDRL2構築體產生的抗體之結合活性

圖6(實例11)：嵌合抗體AF及人類化抗體H4K1之免疫組織化學結合檢定之結果

圖7(實例12)：類澱粉纖維上mC2之官能基。A)經PBS(左，用作對照)或ACI-7-C2(右)培育24小時且隨後凍乾的經U-¹³C Tyr10及Val12標記之類澱粉β1-42纖維的¹³C CPMAS光譜與適配之比較。Val12 Cβ之兩種構形的適配以綠色(摺疊)及藍色(無規捲曲)展示。c33 ppm之峰對應於纖維之β摺疊構形，而30 ppm之峰為無規捲曲構形之結果。B) Val 12 Cβ之兩種構形的擬合參數之比較。兩種構形之所擬合化學位移相當類似，但積分強度極其不同，反映初始β摺疊構形降低約35% (1-(53.5/81.7))。此與自螢光量測所獲得之值極其接近一致。

圖8(實例12)：ELISA中人類化C2之結合親和力

圖9(實例14)：mC2與不同類型之類澱粉蛋白的構形特異性結合。此圖之圖例中顆粒製劑係指Aβ₁₋₄₂纖維，上清液製劑係指類澱粉

單體

圖10：與鼠類序列及人類受體序列DPK15 AND J_κ1相比之人類化C2 VK序列

圖11：與鼠類序列及人類受體序列DP54 AND J_H6相比之人類化C2 VH序列

圖12：C2人類化抗體C2HuVK1之輕鏈可變區之完整DNA及蛋白序列

圖13-1至13-5：人類化C2抗體之輕鏈恆定區(人類C_κ)之完整DNA及蛋白序列

圖14-1及14-2：人類化C2抗體之重鏈恆定區(人類IgG4 ser228-pro)之完整DNA及蛋白序列

圖15A-C(實例15)：抗原決定基定位實驗之結果。A) hC2結合Aβ 1-42肽文庫之肽12、13、14、15及16。藉由ELISA分析hC2與Aβ 1-42之摺疊肽之結合。與完整Aβ 1-42之結合及與非結合嵌合抗體(對照抗體)之結合分別係用作陽性及陰性對照。肽編號對應於Aβ 1-42序列中之肽起始之胺基酸。結果表示為OD。B) hC2與Aβ 12-20之結合完全依賴於aa 16、17、19及20且部分依賴於aa 14、15及18。藉由ELISA分析hC2與Aβ 12-20及經丙胺酸取代之Aβ 12-20的結合。與完整Aβ 1-42之結合係用作陽性對照。編號對應於經丙胺酸取代之aa。結果表示為OD。C) hC2與Aβ 15-23之結合依賴於aa 23且部分依賴於aa 21且略微依賴於aa 22。藉由ELISA分析hC2與Aβ 13-21、14-22或15-23及與13-21G21、14-22A22或15-23A23之結合。與完整Aβ 1-42之結合係用作陽性對照。結果表示為OD。

圖16(實例13)：聚集檢定實驗之結果

圖17(實例13)：解聚檢定實驗之結果

圖18(實例16)：人類化抗體C2之神經保護實驗的結果。

【實施方式】**定義**

如本文中所用，術語"多肽"、"肽"及"蛋白"可互換且經定義為意謂由經肽鍵連接之胺基酸組成的生物分子。

如本文中所用，術語"一"及"該"經定義以意謂"一或多個"且除非上下文認為不當，否則包括複數。

用語"由類澱粉或類澱粉樣蛋白所致或與其相關之疾病及病症"包括(但不限於)由以單體、原纖維或聚合態或該三種之任一組合的類澱粉樣蛋白的存在或其活性所致的疾病及病症。該等疾病及病症包括(但不限於)類澱粉變性症、內分泌腫瘤及黃斑退化。

術語"類澱粉變性症"係指一組與類澱粉斑塊形成相關的疾病及病症，其包括(但不限於)繼發性類澱粉變性症及年齡相關之類澱粉變性症，諸如包括(但不限於)諸如阿茲海默氏症(AD)之神經性病變的疾病，包括特徵在於認知記憶容量喪失之疾病或病狀，諸如輕度認知障礙(MCI)、路易體性癡呆、唐氏綜合症、具有類澱粉變性(荷蘭類型)之遺傳性腦出血；關島帕金森-癡呆複合症；以及其他基於或與類澱粉樣蛋白相關的疾病，諸如進行性核上眼神經麻痺症、多發性硬化；庫賈氏病、帕金森氏病、HIV相關性癡呆、ALS(肌萎縮性側索硬化)、包涵體肌炎(IBM)、成年發病型糖尿病及老年心臟類澱粉變性；及各種眼疾，包括黃斑退化、脈絡膜小疣相關之光學神經病及因 β 類澱粉沈積所致之白內障。

如本文中所用，術語"偵測"意謂使用諸如免疫化學或組織學方法之已知技術來偵測生物分子，且係指定性或定量確定研究中之生物分子的存在或濃度。

"聚合型可溶類澱粉"係指形成在哺乳動物或人體中、更尤其在腦中可溶之寡聚或聚合型結構之類澱粉肽或類澱粉樣肽或經修飾或截短

之類澱粉肽或類澱粉肽之其他衍生物的多重聚集單體，但尤其係指類澱粉 β (A β)或經修飾或截短之類澱粉 β (A β)肽或其衍生物之多重聚集單體，其在哺乳動物或人體中、更尤其在腦中可溶。

"類澱粉 β 、A β 或 β -類澱粉"為此項技術中公認之術語且係指類澱粉 β 蛋白及肽、類澱粉 β 前驅蛋白(APP)以及其修飾物、片段及任何功能等效物。如本文中所用，類澱粉 β 尤其意謂APP蛋白水解裂解產生之任何片段，但尤其彼等涉及或與類澱粉病理相關的片段，包括(但不限於)A β ₁₋₃₈、A β ₁₋₃₉、A β ₁₋₄₀、A β ₁₋₄₁、A β ₁₋₄₂及A β ₁₋₄₃。

如上所述之類澱粉 β 肽之結構及序列為熟習此項技術者所熟知，且產生該等肽或自腦及其他組織中提取其之方法係描述於(例如)Glenner及Wong, Biochem Biophys Res Comm 129, 885-890 (1984)中。此外，類澱粉 β 肽亦以各種形式市售。

"經分離"意謂不含至少某些天然存在之組份的生物分子。

如本文中所用，術語"抗體"為此項技術公認之術語且應理解為係指與已知抗原、尤其免疫球蛋白分子及免疫球蛋白分子之免疫活性部分結合的分子或分子之活性片段，亦即含有特異性結合抗原之結合位點的分子。免疫球蛋白為包含一或多個大體上由免疫球蛋白 κ 及 λ 、 α 、 γ 、 Δ 、 ϵ 及 μ 恆定區基因以及無數免疫球蛋白可變區基因編碼之多肽的蛋白。輕鏈係歸類為 κ 或 λ 。重鏈係歸類為 γ 、 μ 、 α 、 Δ 或 ϵ ，其又分別定義免疫球蛋白種類IgG、IgM、IgA、IgD及IgE。亦已知重鏈之亞類。例如，人類之IgG重鏈可為IgG1、IgG2、IgG3及IgG4亞類中之任一者。本發明之免疫球蛋白可為免疫球蛋白分子之任何種類(IgG、IgM、IgD、IgE、IgA及IgY)或亞類(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2)。

如本文中所用，關於抗體之"特異性地結合"意謂抗體與其目標抗原以比其與在結構上不同抗原之親和力更大的親和力結合。

已知典型免疫球蛋白結構單位包含四聚體。各四聚體包含兩個相同多肽鏈對，每一對具有一"輕"(約25 kD)及一"重"鏈(約50-70 kD)。各鏈之N末端定義主要負責抗原識別之約100至110或更多胺基酸之可變區。術語可變輕鏈(V_L)及可變重鏈(V_H)分別係指該等輕鏈及重鏈。

抗體以全長完整抗體或以經各種肽酶或化學物消化產生之許多良好表徵之片段形式存在。因此，例如胃蛋白酶在鉸鏈區中二硫鍵下消化抗體以產生 $F(ab')_2$ ，本身為經由二硫鍵與 V_H-CH_1 結合之輕鏈的Fab之二聚體。可在溫和條件下還原 $F(ab')_2$ 以破壞鉸鏈區中之二硫鍵，藉此將 $F(ab')_2$ 二聚體轉化成Fab'單體。Fab'單體基本上為具有鉸鏈區之部分的Fab片段(對於其他抗體片段之更詳細描述參見Fundamental Immunology, W. E. Paul編，Raven Press, N.Y. (1993))。儘管依據完整抗體之消化定義各種抗體片段，熟習此項技術者應理解可在化學上或藉由使用重組DNA方法重新合成多種抗體片段之任一者。因此，如本文中所用術語抗體亦包括藉由修飾全抗體或重新合成產生的抗體片段，或藉由使用重組DNA方法獲得之抗體及片段。

意欲在本發明範疇內之"抗體"包括單株抗體、多株抗體、嵌合抗體、單鏈抗體、雙特異性抗體、猿化抗體、人類及人類化抗體以及其活性片段。與已知抗原結合的分子活性片段之實例包括經分離之輕鏈及重鏈、Fab、Fab/c、Fv、Fab'及 $F(ab')_2$ 片段，包括上述抗體及片段中之任一者的Fab免疫球蛋白表現文庫及抗原決定基結合片段之產物。

該等活性片段可藉由若干技術源自於本發明之抗體。例如，單株抗體可經諸如胃蛋白酶之酶裂解且經受HPLC凝膠過濾。可隨後收集含有Fab片段之適當部分且藉由膜過濾及其類似方法來濃縮。對於抗體之活性片段之分離的通用技術之進一步描述參看實例Khaw, B. A.

等人。J. Nucl. Med. 23:1011-1019 (1982)；Rousseaux等人。Methods Enzymology, 121:663-69, Academic Press, 1986。

重組製備之抗體可為習知全長抗體、已知自蛋白水解消化之活性抗體片段、諸如Fv或單鏈Fv(scFv)之獨特活性抗體片段、域缺失抗體及其類似物。Fv抗體在尺寸上為約50 Kd且包含輕鏈及重鏈可變區。單鏈Fv("scFv")多肽為共價連接之VH::VL雜二聚體，其可自包括直接連接或藉由編碼肽之連接子連接的VH及VL編碼序列之核酸來表現。參見Huston，等人。(1988) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883。若干結構將天然聚集但經化學分離之輕鏈及重鏈多肽鏈自抗體V區轉化至scFv分子中，該分子將摺疊成大體上與抗原結合位點之結構相似的三維結構。參見，例如美國專利第5,091,513號、第5,132,405號及第4,956,778號。

結合位點係指參與抗原結合之抗體分子的部分。藉由重("H")及輕("L")鏈之N末端可變("V")區之胺基酸殘基來形成抗原結合位點。抗體可變區包含三個高度散開之延伸，其係稱為"高變區"或"互補決定區"(CDR)，其經插入稱為"構架區"(FR)的更保守之側接延伸之間。在一抗體分子中，輕鏈(LCDR1、LCDR2及LCDR3)之三個高變區及重鏈(HCDR1、HCDR2及HCDR3)之三個高變區相對於彼此排列在三維空間中以形成抗原結合表面或袋。因此抗體結合位點表示構成抗體之CDR的胺基酸及構成結合位點袋之任何構架殘基。

可使用在此項技術中熟知之方法確定構成結合位點之特定抗體中胺基酸殘基之身份。例如，抗體CDR可經鑑別為最初由Kabat等人(參見"Sequences of Proteins of Immunological Interest"E. Kabat等人，美國衛生和人類服務部(U.S. Department of Health and Human Services)；Johnson, G及Wu, TT (2001) Kabat Database and its applications: future directions. Nucleic Acids Research, 29: 205-206；

<http://immuno.bme.nwa.edu>)定義之高變區。CDR之位置亦可經鑑別為最初由Chothia及其他人描述之結構性環結構(參見Chothia及Lesk, J. Mol. Biol. 196, 901 (1987), Chothia等人, Nature 342, 877 (1989)及Tramontano等人, J. Mol. Biol. 215, 175 (1990))。其他方法包括"AbM定義", 其為Kabat與Chothia之折衷, 且使用Oxford Molecular之AbM抗體模型軟體(目前Accelrys)獲得, 或包括Macallum等人("Antibody-antigen interactions: contact analysis and binding site topography" J Mol Biol. 1996 Oct 11;262 (5): 732-45)之CDR之"接觸定義"。下表基於各種已知定義來鑑別CDR。

環	Kabat	AbM	Chothia	接觸
----	-----	-----	-----	-----
L1	L24--L34	L24--L34	L24--L34	L30--L36
L2	L50--L56	L50--L56	L50--L56	L46--L55
L3	L89--L97	L89--L97	L89--L97	L89--L96
H1	H31--H35B	H26--H35B	H26--H32..34	H30--H35B
(Kabat編號)				
H1	H31--H35	H26--H35	H26--H32	H30--H35
(Chothia編號)				
H2	H50--H65	H50--H58	H52--H56	H47--H58
H3	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H93--H101

可單獨自序列鑑別抗體中之CDR的通用準則係如下：

LCDR1：

起始-大約殘基24。

之前的殘基始終為Cys。

之後的殘基始終為Trp。TRP後通常為TYR-GLN，但其後亦可為LEU-GLN、PHE-GLN或TYR-LEU。

長度為10至17個殘基。

LCDR2：

起始-L1末端後之16個殘基。

之前的序列通常為ILE-TYR，但亦可為VAL-TYR、ILE-LYS或ILE-PHE。

長度通常為7個殘基。

LCDR3：

起始-通常L2之33個殘基。

之前的殘基為Cys。

之後的序列為PHE-GLY-X-GLY。

長度為7至11個殘基。

HCDR1：

起始-在大約殘基26(CYS後之4個殘基)[Chothia/AbM定義] Kabat定義開始隨後之5個殘基。

之前的序列為CYS-X-X-X。

之後的殘基為TRP，其後通常為VAL，但其後亦可為ILE或ALA。

在AbM定義下長度為10至12個殘基，而Chothia定義排除最後4個殘基。

HCDR2：

起始-CDR-H1之Kabat/AbM定義之末端後的15個殘基

之前的序列通常為LEU-GLU-TRP-ILE-GLY(SEQ ID NO. 1)，但若干變體亦為可能的。

之後的序列為 LYS/ARG-LEU/ILE/VAL/PHE/THR/ALA-THR/SER/ILE/ALA。

在Kabat定義下(AbM定義結束先前之7個殘基)長度為16至19個殘基。

HCDR3：

起始-CDR-H2(CYS後之兩個殘基)之末端後的33個殘基。

之前的序列為CYS-X-X(通常CYS-ALA-ARG)。

之後的序列為TRP-GLY-X-GLY。

長度為3至25個殘基。

在特定抗體中，可使用在此項技術中熟知之諸如分子模型及X-射線晶體繞射的方法測定處於CDR外部但儘管如此因具有為結合位點之內層的一部分之側鏈(亦即其可用以經由結合位點鍵聯)構成部分結合位點的胺基酸殘基之身份。參見例如 Riechmann 等人，(1988) Nature, 332: 323-327。

嵌合抗體為彼等其中抗體之一或多個區來自一個動物物種及抗體之一或多個區來自不同動物物種者。較佳之嵌合抗體為包括來自靈長類免疫球蛋白之區域者。人類臨床使用之嵌合抗體通常經理解為具有來自例如齧齒動物之非人類動物之可變區，其中恆定區來自人類。與此相反，人類化抗體使用來自非人類抗體之CDR，其中大多數或所有可變構架區且所有恆定區來自人免疫球蛋白。人類嵌合抗體通常應理解為具有來自齧齒動物之可變區。典型人類嵌合抗體具有人類重鏈恆定區及人類輕鏈恆定區，其中重鏈及輕鏈之可變區來自齧齒動物抗體。嵌合抗體可包括某些人類恆定區及原生齧齒動物可變區序列之原生胺基酸序列的變化。可藉由在此項技術中熟知之包括CDR接枝法(參見例如美國專利第5,843,708；6,180,370；5,693,762；5,585,089；5,530,101號)、鏈改組策略(參見例如美國專利第5,565,332號；Rader 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1998) 95:8910-8915)、分子模型策略(美國專利第5,639,641號)等之方法製備嵌合及人類化抗體。

如本文中所用，在兩鏈抗體之情況下，"人類化抗體"為其中至少一個鏈經人類化者。人類化抗體鏈具有其中一或多個構架區來自人類之可變區。為單鏈之人類化抗體為其中該鏈具有可變區者，該可變區

中一或多個構架區來自人類。人類化抗體鏈或其片段之可變區之非人類部分係源自於非人類來源、尤其非人類抗體、通常齧齒動物來源。對人類化抗體之非人類貢獻通常以至少一間置在衍生自一(或多個)人免疫球蛋白的構架區中的CDR區域之形式提供。另外，可改變構架支撐殘基以保存結合親和力。

該人類化抗體可進一步包含恆定區(例如，在輕鏈情況下至少一個恆定區或其部分，且在重鏈情況下，較佳三個恆定區)。人類化抗體之恆定區(若存在)通常為人類恆定區。

獲得"人類化抗體"之方法為熟習此項技術者所熟知(參見例如 Queen 等人，Proc. Natl Acad Sci USA, 86:10029-10032 (1989)；Hodgson 等人，Bio/Technology, 9:421 (1991))。

亦可藉由能夠在諸如兔及小鼠之大型動物中產生親和力成熟人類樣多株抗體之新穎遺傳工程方法獲得"人類化抗體"。參見，例如美國專利第6,632,976號。

如本文中所用，術語恆定區(CR)係指免疫球蛋白之恆定區基因。恆定區基因編碼賦予效應功能之抗體分子之部分。對於嵌合人類抗體及人類化抗體，通常非人類(例如鼠類)恆定區經人類恆定區取代。本發明之嵌合或人類化抗體之恆定區通常係源自人免疫球蛋白。重鏈恆定區可選自5種同型中之任一者： α 、 Δ 、 ϵ 、 γ 或 μ 。此外，各種亞類之重鏈(諸如重鏈之IgG亞類)負責不同效應功能且因此藉由選擇所需重鏈恆定區，可產生具有所需效應功能之抗體。可用於本發明範疇內之恆定區為 $\gamma 1$ (IgG1)、尤其 $\gamma 1$ (IgG1)同型之Fc區、 $\gamma 3$ (IgG3)且尤其 $\gamma 4$ (IgG4)。輕鏈恆定區可為 κ 或 λ 型，較佳 κ 型。在一實施例中，輕鏈恆定區為人類 κ 恆定鏈(Heiter等人(1980) Cell 22:197-207)且重鏈恆定鏈為人類IgG4恆定鏈。

在此項技術中亦充分認可術語"單株抗體"且係指為單選殖之抗體

產生細胞的產物之抗體。通常藉由將通常短期、抗體產生B細胞與諸如癌細胞(有時稱為"永生"細胞)之快速生長細胞融合來製造單株抗體。所得雜交細胞或融合瘤快速繁殖，得到產生抗體之純系。

出於本發明之目的，"單株抗體"亦應理解為包含由尚未達到完全單株化之母體純系產生的抗體。

在本發明之範疇內"功能等效抗體"應理解為係指大體上與上述且本文中所描述之抗體共有至少一種主要功能特性的抗體，該功能特性包含：當預防地或治療地投與時，與 β -類澱粉蛋白、尤其與 $A\beta_{1-42}$ 蛋白、且更尤其與 $A\beta_{1-42}$ 蛋白之16-21抗原決定基區的結合特異性；活體外免疫反應性；抑制 $A\beta_{1-42}$ 單體向高分子聚合型原纖維之聚集；及/或預成型 $A\beta_{1-42}$ 聚合型原纖維之解聚作用；及/或 β 摺疊破壞特性；及減輕類澱粉變性症、一組與類澱粉斑塊形成相關的包括繼發性類澱粉變性症及年齡相關類澱粉變性症之疾病及病症之作用，諸如包括(但不限於)以下之疾病，神經性病症，諸如阿茲海默氏症(AD)、路易體性癡呆、唐氏綜合症、具有類澱粉變性(荷蘭類型)之遺傳性腦出血；關島帕金森癡呆複合症；以及其他基於或與類澱粉樣蛋白相關之疾病，諸如進行性核上眼神經麻痺症、多發性硬化；庫賈氏病、帕金森氏病、HIV相關性癡呆、ALS(肌萎縮性側索硬化)、成年發病型糖尿病；老年心臟類澱粉變性；內分泌腫瘤及包括黃斑退化之其他疾病。該等抗體可為任何種類，諸如IgG、IgM或IgA等，或任何亞類，諸如IgG1、IgG2a等，及本文中上文提及或在此項技術中已知之其他亞類，但尤其IgG4類。此外，可藉由諸如噬菌體呈現之任何方法產生抗體，或在任何生物體或細胞株中產生，包括細菌、昆蟲、哺乳動物或產生諸如人類化抗體之具有所需特徵的抗體之其他類型之細胞或細胞株。該等抗體亦可藉由組合不同物種之Fab部分及Fc區來形成。

如所用之術語"雜交"係指習知雜交條件，較佳 $5\times$ SSPE、1%

SDS、1×Denhardts溶液用作溶液及/或雜交溫度介於35℃與70℃之間，較佳為65℃的雜交條件。雜交後，較佳首先以2×SSC、1% SDS且隨後以0.2×SSC在介於35℃與70℃之間的溫度下、較佳在65℃下進行洗滌(關於SSPE、SSC及Denhardts溶液之定義，參見在上述引文中之Sambrook等人)。例如描述於上文Sambrook等人之嚴格雜交條件尤其較佳。若雜交及洗滌發生在如上所指出之65℃下，則存在(例如)尤其較佳之嚴格雜交條件。例如在45℃下進行之雜交及洗滌的非嚴格雜交條件為次佳且在35℃下之非嚴格雜交條件為甚至更次佳。

藉由序列一致性測定兩個序列之間的"同源性"。若待彼此比較之兩個序列長度不同，則序列一致性較佳係關於與較長序列之核苷酸殘基相同的較短序列之核苷酸殘基的百分數。可藉助於諸如Bestfit程式(Wisconsin Sequence Analysis Package，用於Unix之第8版，Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive Madison, WI 53711)之電腦程式以習知方式來測定序列一致性。Bestfit利用Smith及Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2 (1981), 482-489之局部同源性算法，以發現兩個序列之間具有最高序列一致性之區段。當使用Bestfit或另一序列比對程式來測定特定序列是否與本發明之參考序列具有(例如)95%一致性時，參數較佳經調節使得計算參考序列之整個長度的一致性百分數且使得允許參考序列中核苷酸總數之至多5%之同源性缺口。當使用Bestfit時，所謂的可選參數較佳保留為其預置("默認")值。給定序列與上述本發明序列之比較中出現的偏差可由(例如)添加、刪除、取代、插入或重組引起。較佳亦可以程式"fasta20u66"進行該序列比較(1998年9月 William R. Pearson 及 University of Virginia 之 2.0u66 版；亦參見 W.R. Pearson (1990), *Methods in Enzymology* 183, 63-98，附加實例及 <http://workbench.sdsc.edu/>)。出於此目的，可使用"默認"參數設置。

本發明之抗體可為免疫球蛋白或抗體，其經理解為具有各相同之結合位點(若多價)，或另外可為"雙特異性"或"雙功能抗體"。

"雙特異性"或"雙功能抗體"為具有兩個不同重鏈/輕鏈對及兩個特定結合位點之人工雜交抗體。可藉由包括融合瘤融合或Fab'片段鍵聯之多種方法產生雙特異性抗體。參見例如 Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321 (1990)；Kostelny等人，J. Immunol. 148, 1547-1553 (1992)。

術語"片段"係指抗體或抗體鏈之包含比完整或完全抗體或抗體鏈更少之胺基酸殘基的部分。可經由化學或酶促處理完整或完全抗體或抗體鏈獲得片段。亦可藉由重組方法獲得片段。例示性片段包括 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fabc及/或Fv片段。術語"抗原結合片段"係指免疫球蛋白或抗體結合抗原或與完整抗體(亦即與衍生其之完整抗體)競爭抗原結合(亦即特異性結合)的多肽片段。

藉由重組DNA技術或藉由酶促或化學裂解完整免疫球蛋白來產生結合片段。結合片段包括Fab、Fab'、F(ab')₂、Fabc、Fv、單鏈及單鏈抗體。

"片段"亦係指包含另一多肽之胺基酸序列的至少5個鄰接胺基酸殘基、至少10個鄰接胺基酸殘基、至少15個鄰接胺基酸殘基、至少20個鄰接胺基酸殘基、至少25個鄰接胺基酸殘基、至少40個鄰接胺基酸殘基、至少50個鄰接胺基酸殘基、至少60個鄰接胺基酸殘基、至少70個鄰接胺基酸殘基、至少80個鄰接胺基酸殘基、至少90個鄰接胺基酸殘基、至少100個鄰接胺基酸殘基、至少125個鄰接胺基酸殘基、至少150個鄰接胺基酸殘基、至少175個鄰接胺基酸殘基、至少200個鄰接胺基酸殘基或至少250個鄰接胺基酸殘基之肽或多肽。在一特定實施例中，多肽之片段保持該多肽之至少一種功能。

術語"抗原"係指可與抗體結合之實體或片段。免疫原係指可引發

生物體、尤其動物、更尤其包括人類之哺乳動物之免疫反應的抗原。術語抗原包括稱為抗原決定子或抗原決定基的區域，其係指抗原之一部分(其接觸或在支持負責抗原性或抗原決定子之抗原中存在之接觸中起重要作用)。

如本文中所用，術語"可溶性"意謂部分或完全溶解於水溶液中。

亦如本文中所用，術語"免疫原性"係指針對免疫原之抗原引發抗體、T細胞及其他反應性免疫細胞產生的物質。

當個體對抗所投與的本發明之免疫原性組合物而產生足夠抗體、T細胞及其他反應性免疫細胞時，免疫反應發生以緩解或減輕待治療病症。

如本文中所用，術語免疫原性係指當向受體投與抗原時引發免疫反應(體液性或細胞)之能力的量測。本發明係關於降低本發明之人類嵌合或人類化抗體之免疫原性的方法。

免疫原性降低之人類化抗體係指相對於親本抗體、例如鼠類抗體顯示降低之免疫原性的人類化抗體。

大體上保留親本抗體之結合特性的人類化抗體係指保留特異性結合由用以產生人類化抗體之親本抗體所識別的抗原之能力的該人類化抗體。人類化抗體較佳將顯示親本抗體的相同或大體上相同之抗原結合親和力及結合性。理想地，抗體之親和力將不低於親本抗體親和力之10%、更佳不低於約30%且最佳親和力將不低於親本抗體之50%。用於檢定抗原結合親和力之方法為在此項技術中所熟知且包括半最大結合檢定、競爭檢定及Scatchard分析。合適之抗原結合檢定係描述於本申請案中。

"回復突變"為引入編碼人類化抗體之核苷酸序列中之突變，該突變得到對應於親本抗體(例如供體抗體，例如鼠類抗體)之胺基酸的胺基酸。在本發明之抗體人類化期間可保留親本抗體之某些構架殘基，

以大體上保留親本抗體之結合特性，而同時將所得抗體之潛在免疫原性最小化。在本發明之一實施例中，親本抗體為小鼠來源。例如，回復突變將人類構架殘基改變成親本鼠類殘基。可回復突變之構架殘基之實例包括(但不限於)規範殘基、介面包裝殘基、靠近結合位點之異常親本殘基、"微調區(Vernier Zone)"之殘基(其形成CDR保持之平臺)(Foote & Winter, 1992, J. Mol. Biol. 224, 487-499)，及彼等接近CDR H3者。

如本文中所用，"保守變化"係指以下變化：與天然蛋白質相比，大體上構形或抗原中性，分別產生突變體多肽之三級結構之最小變化，或產生突變體多肽之抗原決定子之最小變化。當提及本發明之抗體及抗體片段時，保守變化意謂並未使抗體無法結合本發明之受體的胺基酸取代。一般熟習此項技術者將能預測可在保持高構形及抗原中性之可能性的情況下進行胺基酸取代。在(例如)Berzofsky (1985) Science 229:932-940及Bowie等人(1990) Science 247:1306-1310中提供該等準則。認為影響保持構形及抗原中性之可能性的因素包括(但不限於)：(a)疏水性胺基酸取代不太可能影響抗原性，此係由於疏水性殘基更可能位於蛋白質內部；(b)物理化學類似之胺基酸取代不太可能影響構形，此係由於經取代之胺基酸在結構上模擬原生胺基酸；且(c)進化保守序列之改變可能不利地影響構形，由於此保守暗示胺基酸序列可能具有功能重要性。一般熟習此項技術者將能夠使用熟知檢定及經由使用構形依賴型單株抗體(Lewis等人(1983) Biochem. 22:948-954)之結合研究來評估蛋白質構形之變化，該等檢定係諸如(但不限於)微量補體結合法(Wasserman等人(1961) J. Immunol. 87:290-295；Levine等人(1967) Meth. Enzymol. 11:928-936)。

此外，術語"治療有效量"係指當向人類或動物投與時足以引起該人類或動物之治療效應的抗體之量。藉由熟習此項技術者遵循常規程

序易於測定有效量。

如本文中所用，術語"治療"、"預防"係指由投與預防劑或治療劑來預防患者之病症之一或多種症狀復發或發作。

人類化抗體之構築

參考下列包括於本文中之特定實施例的詳細描述可更易於理解本發明。儘管已參考某些實施例之特定細節描述本發明，不希望將該等細節視為對本發明範疇之限制。

本發明提供新穎方法及包含具有特異性地識別且與一系列 β -類澱粉抗原之特定抗原決定基結合之能力的高度特異性及高效抗體之組合物。本發明之教示能夠實現之抗體尤其適用於治療類澱粉變性症，一組與類澱粉斑塊形成相關的疾病及病症，其包括繼發性類澱粉變性症及年齡相關之類澱粉變性症，包括(但不限於)神經性病症，諸如阿茲海默氏症(AD)、路易體性癡呆、唐氏綜合症、具有類澱粉變性(荷蘭類型)之遺傳性腦出血；關島帕金森癡呆複合症；以及基於或與如類澱粉之蛋白相關的其他疾病，諸如進行性核上眼神經麻痺症、多發性硬化；庫賈氏病、具有類澱粉變性荷蘭類型之遺傳性腦出血、帕金森氏病、HIV相關性癡呆、ALS(肌萎縮性側索硬化)、成年發病型糖尿病；老年心臟類澱粉變性；內分泌腫瘤及包括黃斑退化之其他病症等等。

在本發明之範疇內可藉由首先設計含有嵌入人類衍生之構架序列中之非人類、尤其齧齒動物衍生之CDR、但尤其衍生自鼠類抗體ACI-01-Ab7C2(本申請案通篇中稱作"mC2"且由"德國微生物菌種保藏中心(DSMZ)"於Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig依據布達佩斯條約之條款於2005年12月1日寄存，且給予寄存編號DSM ACC2750)的CDR之可變區胺基酸序列來產生根據本發明之充分人類化或重塑之可變區。可獲自根據本發明之抗體的非人

類、尤其齧齒動物衍生之CDR提供所需特異性。因此，該等殘基基本上不變地包括於重塑可變區之設計中。因此任何修飾應均應限制在最小且密切觀察抗體特異性及親和力之改變。另一方面，理論上構架殘基可獲自任何人類可變區。

為產生展示可接受之或甚至改善之親和力的重塑抗體，應選擇均等地適合於產生重塑可變區且保留抗體親和力之人類構架序列。

為實現該目標，開發最佳適配策略。如所知的，構架序列係用來將CDR固定在用於與抗原相互作用之恰當空間定向，且構架殘基有時甚至可參與抗原結合，該策略之目標在於最小化將可負面影響藉由自與非人類、尤其齧齒動物衍生之可變區最同源或相似之人類可變區獲得用於抗體重塑之人類構架序列的抗體三維結構之變化。此舉亦使親和力將保留於重塑抗體中之可能性最大化。

在最簡單程度上，"最佳適配"策略包括比較供體齧齒動物V區與所有已知人類V區胺基酸序列，且隨後選擇最同源者以提供人類化實踐之受體構架區。實際上，存在數種將考慮之其他因素且其可影響受體構架區之最終選擇。任何實驗工作前分子模型化預測可用於此方面以求使所得重塑抗體之親和力最大化。基本上，模型化之目標為預測最同源人類構架之何種關鍵殘基(若存在)將留於齧齒動物中以獲得重塑抗體之最佳親和力。

在本發明之一實施例中，可自小鼠單株抗體、尤其自於2005年12月12日申請之同在申請中之EP 05 02 7092.5所描述的小鼠單株抗體ACI-01-Ab7C2(在整個申請案中稱為"mC2")獲得CDR，該專利之揭示內容以引用的方式併入本文中。

"德國菌種保藏中心"(DSMZ)於Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig依據布達佩斯條約之條款於2005年12月1日寄存同在申請中之申請案第EP05027092.5號之產生小鼠單株抗體ACI-

01-Ab7C2(在整個申請案中對於人類化C2抗體稱為"mC2"及hC2)的融合瘤細胞FP-12H3-C2，且給予寄存編號DSM ACC2750。

可對抗包含對應於 β -類澱粉肽、尤其 β -類澱粉肽 $A\beta_{1-15}$ 、 $A\beta_{1-16}$ 及 $A\beta_{1-16(\Delta 14)}$ 之經諸如棕櫚酸的疏水性部分或諸如聚乙二醇(PEG)的親水性部分或其組合修飾之胺基酸序列的抗原肽之超分子抗原構築體培育小鼠抗體，其中該疏水性及親水性部分分別經由至少一個、尤其一或兩個諸如離胺酸、麩胺酸及半胱胺酸之胺基酸或任何其他合適之胺基酸或能夠充當用於將疏水性及親水性部分偶合至該肽片段的連接器件之胺基酸類似物與抗原肽各末端共價結合。當PEG用作親水性部分時，游離PEG末端與磷脂醯乙醇胺或適於充當錨定元件之任何其他化合物共價結合以(例如)將抗原構築體嵌入脂質體之雙分子層中。

詳言之，小鼠抗體可對抗包含對應於 β -類澱粉肽 $A\beta_{1-16}$ 之經諸如聚乙二醇(PEG)之親水性部分修飾的胺基酸序列之抗原肽的超分子抗原構築體來培養，親水性部分係經由至少一個、尤其一或兩個諸如離胺酸、麩胺酸及半胱胺酸之胺基酸或任何其他合適之胺基酸或能夠充當用於將疏水性及親水性部分偶合至肽片段之連接元件的胺基酸類似物與抗原肽之各末端共價結合。當PEG用作親水性部分時，游離PEG末端與磷脂醯乙醇胺或適於充當錨定元件之任何其他化合物共價結合以(例如)將抗原構築體嵌入脂質體之雙分子層中。

在本發明之一實施例中，提供嵌合抗體或其片段或人類化抗體或其片段，其在可變區中包含至少一個非人類來源之嵌入一或多種源自人類或靈長類之構架區中且與源自人類或靈長類來源抗體之恆定區組合的CDR，該嵌合抗體或其片段或人類化抗體或其片段能夠特異性地識別及結合 β -類澱粉單體肽。

CDR含有最可能結合抗原之殘基且其必須保留於重塑抗體中。由根據Kabat等人，Sequence of Proteins of Immunological Interest，第五

版，The United States Department of Health and Human Services, The United States Government Printing Office, 1991之序列定義CDR。CDR屬於正准類(Chothia等人，1989 Nature, 342, 877-883)，其中關鍵殘基在大程度上決定CDR環之結構構形。該等殘基幾乎總保留於重塑抗體中。

在用於製備本發明之人類化抗體之方法中，C2重鏈及輕鏈可變區(V_H及V_K)之胺基酸序列與NCBI及Kabat數據庫中醫齒動物抗體V_H及V_H序列相當。

C2 V_K之最接近匹配小鼠生殖系基因為bb1，基因座MMU231201(Schable等人，1999)。比較揭示兩種胺基酸與該生殖系序列不同，其皆定位於CDRL1中。可發現具有類似但不同序列之成熟鼠類抗體。數種具有相同CDRL2及相同CDRL3，但C2之CDRL1似乎為獨特的。與人類生殖系V_K序列之比較展示亞群V_KII之基因為C2 V_K之最佳配合(Cox等人，1994)。C2 V_K因此可歸為Kabat亞群MuV_KII序列。

可選擇DPK15與人類J區HuJ_K1以提供人類化V_K之受體構架序列。

已定義可變域輕鏈與重鏈之間介面上之殘基(Chothia等人，1985 J. Mol. Biol., 186, 651-663)。該等殘基通常保留於重塑抗體中。小鼠C2 V_K之位置87處的Phe在該介面處為異常的，其中Tyr更常見於V_KII亞群中，指示此構架殘基對於抗體活性而言可為重要的。Tyr 87存在於人類生殖系及人類化C2V_K中。

因此人類化V_K序列可經設計使得C2HuV_K1由具有來自DPK 15及人類J_K1之構架的小鼠C2 V_K CDR組成。在本發明之一特定實施例中，人類構架區中鼠類殘基可在位置45及/或87處經取代。在獲自小鼠單株抗體、尤其鼠類抗體ACI-01-Ab7C2之CDR2區中，胺基酸取代

可在Kabat位置50及/或53處進行。殘基45可與支撐CDR之構形有關。殘基87係位於V_H與V_K域之介面處。因此，該等殘基對於維持抗體結合可為關鍵的。

C2 V_H AF之最接近匹配小鼠生殖系基因為VH7183、基因座AF120466(Langdon等人，2000)。與人類生殖系V_H序列比較展示亞群V_HIII之基因為C2 V_H之最佳配合。C2 V_H AF可歸為Kabat亞群MuV_HIIID。可選擇序列DP54與人類J區HuJ_H6以提供人類化V_H之受體構架序列。

比較展示在C2 V_H序列與人類受體生殖系序列DP54及J_H6之間存在9個胺基酸差異，多數位於CDRH2中。發現具有相同或類似(一個殘基不同)CDRH1或具有類似CDRH2(一個殘基不同)之成熟鼠類抗體，但具有所有三個CDR之抗體中無一與C2 V_H AF相同。C2抗體之CDRH3為顯著短的，其僅由三個殘基組成。然而，發現數據庫中之其他抗體具有該長度之CDRH3。C2 V_H之殘基47為Leu而非更常見之Trp，且殘基94為Ser而非常見之Arg，指示此等構架殘基對於抗體活性而言可為重要的。

可設計各種人類化V_H序列。C2HuVH1係由具有來自DP54及HuJ_H6之構架的C2 V_H AF CDR組成。在本發明之一特定實施例中，人類構架區中鼠類殘基可在位置47或94或兩者處經取代。構架2中之殘基47與CDR及V_K域接觸。殘基94可與支撐CDR之構形有關。因此，該等殘基對於維持抗體結合可為關鍵的。

不同HCVR及LCVR區可經設計包含可獲自供體抗體、例如鼠類抗體之嵌入原生或經修飾之源自人類或靈長類的構架區中之非人類CDR。修飾可尤其關於藉由非人類殘基、尤其鼠類殘基、更通常個別亞群中此位置處所發現的殘基或藉由與個別亞群中該位置處更通常發現者具有類似特性的殘基交換構架區內的一或多個胺基酸殘基。

構架區構架序列之修飾係用來將CDR固持於其恰當空間定向中以與抗原相互作用，且構架殘基有時甚至可參與抗原結合。在本發明之一實施例中，可採取措施以進一步調適所選人類構架序列以使其與齧齒動物構架之序列最相似以使親和力將保留於重塑抗體中之可能性最大化。

因此，人類構架區中之鼠類殘基可經取代。尤其，重鏈可變區(HCVR)之人類構架區中位置47或94或兩者處及輕鏈可變區(LCVR)之人類構架區中位置45及/或87處之鼠類殘基可經取代。在獲自小鼠單株抗體、尤其鼠類抗體ACI-01-Ab7C2之CDR2區中，胺基酸取代可在Kabat位置50及/或53處進行。

上文人類構架區中所指示位置中所發現的殘基可藉由個別亞群中該位置處更通常發現的鼠類殘基交換。尤其，如SEQ ID NO: 15中所示的重鏈可變區之源自人類或靈長類構架區中Kabat位置47處之Trp可經Leu或具有類似特性之胺基酸殘基置換，且其之取代導致大體上構形或抗原中性之改變，產生突變體多肽三級結構之最小變化或產生抗原決定子之最小變化。尤其，如SEQ ID NO: 15中所示的重鏈可變區之源自人類或靈長類的構架區中Kabat位置47處之Trp可進一步經選自由正白胺酸、Ile、Val、Met、Ala及Phe組成之群的胺基酸，尤其經Ile置換。可涵蓋構形及抗原中性之替代性保守取代。

如SEQ ID NO: 15中所示的重鏈可變區之源自人類或靈長類的構架區中Kabat位置94處之Arg可經Ser或具有類似特性之胺基酸殘基置換，且其之取代導致大體上構形或抗原中性之改變，產生突變體多肽三級結構之最小變化或產生抗原決定子之最小變化。尤其，如SEQ ID NO: 15中所示的重鏈可變區之源自人類或靈長類的構架區中Kabat位置94處之Arg可另外經Thr置換。

在本發明之另一實施例中，人類化抗體中之兩種殘基可經置

換。

如SEQ ID NO: 12中所示的輕鏈可變區之源自人類或靈長類的構架區中Kabat位置45處之Gln可經Lys或具有類似特性之胺基酸殘基置換，且其之取代導致大體上構形或抗原中性之改變，產生突變體多肽三級結構之最小變化或產生抗原決定子之最小變化。尤其，如SEQ ID NO: 12中所示的輕鏈可變區之源自人類或靈長類的構架區中Kabat位置45處之Gln可經選自由Arg、Gln及Asn組成之群的胺基酸，尤其經Arg置換。

如SEQ ID NO: 12中所示的輕鏈可變區之源自人類或靈長類的構架區中Kabat位置50處之Leu可經Lys或具有類似特性之胺基酸殘基置換，且其之取代導致大體上構形或抗原中性之改變，產生突變體多肽三級結構之最小變化或產生抗原決定子之最小變化。尤其，如SEQ ID NO: 12中所示的輕鏈可變區之源自人類或靈長類的構架區中Kabat位置50處之Leu可經選自由Arg、Gln及Asn組成之群的胺基酸，尤其經Arg置換。

如SEQ ID NO: 12中所示的輕鏈可變區之源自人類或靈長類的構架區中Kabat位置53處之Asn可經His及Gln或具有類似特性之胺基酸殘基置換，且其之取代導致大體上構形或抗原中性之改變，產生突變體多肽三級結構之最小變化或產生抗原決定子之最小變化。尤其，如SEQ ID NO: 12中所示的輕鏈可變區之源自人類或靈長類的構架區中Kabat位置53處之Asn可經選自由Gln、His、Lys及Arg組成之群的胺基酸置換。

如SEQ ID NO: 12中所示的輕鏈可變區之源自人類或靈長類的構架區中Kabat位置87處之Thr可經Phe或具有類似特性之胺基酸殘基置換，且其之取代導致大體上構形或抗原中性之改變，產生突變體多肽三級結構之最小變化或產生抗原決定子之最小變化。尤其，如SEQ

ID NO: 12中所示的輕鏈可變區之源自人類或靈長類的構架區中Kabat位置87處之Tyr可經選自由Leu、Val、Ile及Ala組成之群的胺基酸，尤其經Leu置換。

可隨後將因此獲得之包含至少一個非人類來源之嵌入一或多個源自人類或靈長類的構架區中之CDR的可變區與源自人類或靈長類來源抗體之恆定區、尤其分別與人類IgG4或 κ 恆定區組合。IgG4恆定區可經(例如)將鉸鏈區中位置228處之絲胺酸改變為脯胺酸(HuIgG4 Ser-Pro)而經修飾。該突變使鏈間二硫鍵穩定，且防止原生人類IgG4製備中會出現之半分子形成。IgG4恆定區可藉由刪除如SEQ ID NO: 16中所示的位置439處之末端Lys來進一步修飾。

經修飾之可變區可藉由在此項技術中已知的諸如重疊PCR重組之方法來構築。嵌合抗體C2 ChV_H AF及C2 ChV_K之表現卡匣可用作用於將構架區誘變為所需序列之模板。合成包涵待改變區域之誘變引子對之組。所產生之人類化V_H及V_K表現卡匣可選殖至在此項技術中已知之諸如pUC19的適當選殖載體中。在證實全部DNA序列對於各V_H及V_K而言為正確的之後，可自作為表現卡匣之選殖載體切除經修飾之重鏈及輕鏈V區基因。該等可隨後轉移至諸如pSVgpt及pSVhyg之分別包括人類IgG4 Ser-Pro或 κ 恆定區之適當表現載體中。

表現載體

表現載體pSVgpt係基於pSV₂gpt(Mulligan及Berg, 1980)且包括用於在細菌細胞中選擇之胺苄青黴素抗性基因，用於在哺乳動物細胞中選擇之gpt基因、鼠類重鏈免疫球蛋白增強子區、編碼恆定區基因之染色體組序列及SV40聚A序列。將用於表現之重鏈可變區作為HindIII插入BamHI片段中。

表現載體pSVhyg包括用於在細菌細胞中選擇之胺苄青黴素抗性基因，用於在哺乳動物細胞中選擇之hyg基因，鼠類重鏈免疫球蛋白

增強子區、編碼 κ 恆定區基因且包括 κ 增強子之染色體組序列及SV40聚A序列。將用於表現之輕鏈可變區作為*HindIII*插入*BamHI*片段中。

隨後證實對於表現載體中之人類化 V_H 及 V_K ，DNA序列為正確的。

對於抗體產生，人類化重鏈及輕鏈表現載體可引入在此項技術中已知之諸如NS0細胞的適當製造細胞株中。表現載體之引入可藉由經由電穿孔共轉染或此項技術中可用的任何其他合適之轉型技術來實現。可隨後選擇抗體產生細胞株且擴增且純化人類化抗體。可隨後藉由諸如SDS-PAGE之標準技術來分析純化抗體。

具有改良親和力、特異性、穩定性之抗體

可在未不利地影響抗體活性之情況下略微修飾小鼠C2抗體之CDRL2序列("KVSNRFS")。可經由以R交換位置50處之K且以S交換位置53處之N進行保守取代。因此兩種替換性CDRL2序列分別為"RVSNRFS"及"KVSSRFS"。在無其他變化之情況下，將該等序列作為C2 VK-R及C2 VK-S分別併入鼠類 V_K 序列中。

如本文中先前所述的本發明之抗體或其片段之親和力、特異性及穩定性可藉由改變其糖基化圖形或圖案來修飾，得到改善之治療價值。

為實現糖基化圖案之此變化，宿主細胞可經工程化以使得其能夠表現增加攜帶二等分GlcNAc之複合N-連接的寡醣之較佳範圍之醣蛋白修飾之糖基轉移酶活性。此外，可獲得醣蛋白之經修飾糖型，例如包括全抗體分子、抗體片段或融合蛋白之抗體，融合蛋白包括相當於免疫球蛋白之Fc區的區，其具有增強之Fc所介導之細胞毒性。

獲得具有修飾之糖基化圖案的抗體之方法為熟習此項技術者已知且描述於(例如)EP1071700、US2005272128、Ferrara等人(2006) J Biol Chem 281 (8), 5032-5036；Ferrara等人(2006) Biotechnology and

Bioengineering 93 (5), 851-861中。

藥物製劑及投藥

可使用已知技術將本發明之抗體、但尤其本發明之單株抗體製備於生理上可接受之調配物中且其可包含醫藥學上可接受之載劑、稀釋劑及/或賦形劑。例如，將根據本發明且如本文中先前所述之包括任何功能上等效抗體或其功能部分之抗體、尤其包括任何功能上等效抗體或其功能部分之單株抗體與醫藥學上可接受之載劑、稀釋劑及/或賦形劑組合以形成治療組合物。合適之醫藥載劑、稀釋劑及/或賦形劑為在此項技術中熟知的且包括例如磷酸鹽緩衝生理食鹽水溶液、水、諸如油/水乳液之乳液、多種類型之濕潤劑、無菌溶液等。

可根據熟習此項技術者已知之標準方法實現本發明之醫藥組合物之調配。

可以合適的醫藥學上有效劑量將呈固體、液體或氣溶膠形式之本發明之組合物投與受檢者。固體組合物之實例包括丸劑、乳膏劑及可植入性劑量單元。可經口投與丸劑。可局部投與治療乳膏劑。可局部投、例如在腫瘤部位投與植入性劑量單元，或對於系統釋放治療組合物其可(例如)經皮下植入。液體組合物之實例包括適合於肌肉、皮下、靜脈內、動脈內注射之調配物及用於局部及眼內投藥之調配物。氣溶膠調配物之實例包括用於肺內投藥之吸入劑調配物。

可藉由標準投藥途徑投與組合物。一般而言，可藉由局部、經口、經直腸、經鼻、皮間、腹膜內或非經腸(例如靜脈內、皮下或肌肉內)途徑投與該組合物。另外，可將組合物併入諸如可生物降解之聚合物的持續釋放基質中，該等聚合物經植入需要傳遞之位置附近，例如腫瘤部位。該方法包括投與單個劑量、在預定時間間隔投與重複劑量及歷時預定時期持續投藥。

如本文中所用，持續釋放基質為由藉由酶促或酸/鹼水解或藉由

溶解可降解之材料、通常聚合物製成的基質。插入體內後，基質藉由酶及體液發揮作用。期望選擇之持續釋放基質為生物相容性材料，諸如脂質體、聚乳酸交酯(聚乳酸交酯酸)、聚乙交酯(乙醇酸之聚合物)、聚乳酸交酯共乙交酯(乳酸與乙醇酸之共聚物)、聚酸酐、聚(鄰)酯類、多肽、玻糖醛酸、膠原蛋白、硫酸軟骨素、羧酸類、脂肪酸、磷脂、多醣、核酸、聚胺基酸、胺基酸(諸如苯丙胺酸、酪胺酸、異白胺酸)、聚核苷酸、聚乙烯丙烯、聚乙烯吡咯啉酮及聚矽氧。較佳生物可降解基質為聚乳酸交酯、聚乙交酯或聚乳酸交酯共乙交酯(乳酸與乙醇酸之共聚物)中之一者的基質。

熟習此相關技術者熟知組合物之劑量將視以下各種因素而定，諸如所治療病狀、所用特定組合物及其他臨床因素，諸如患者之體重、體型、性別及總體健康狀況，體表面積、待投與之特定化合物或組合物，同時投與之其他藥物及投藥途徑。

可與其他組合物組合投與組合物，其包含生物活性物質或化合物、尤其至少一種選自由以下各物組成之群的化合物：抗氧化應力化合物、抗細胞凋亡化合物、金屬螯合劑、諸如派侖西平及代謝物之DNA修復抑制劑、3-胺基-1-丙烷磺酸(3APS)、1,3-丙烷二磺酸(1,3PDS)、 α -分泌酶活化劑、 β 及 γ 分泌酶抑制劑、 τ 蛋白、神經傳遞質、 β 摺疊斷裂劑、清除/消耗細胞組份之類澱粉 β 的引誘劑、包括焦穀胺酯化類澱粉 β 3-42之N末端截短之類澱粉 β 的抑制劑、消炎分子、"非典型抗精神病藥物"(諸如氯氮平、齊拉西酮、利培酮、阿立哌唑或奧氮平)或膽鹼酯酶抑制劑(ChEI)(諸如塔克林、雷斯替明、冬尼培唑及/或加蘭他敏)、M1促效劑及其他藥物，包括任何類澱粉或 τ 修飾藥物及營養補充劑(諸如維生素B12、半胱胺酸)、乙醯膽鹼之前驅體、卵磷脂、膽鹼、銀杏葉、乙醯基-L-肉鹼、艾地苯醌(idibenone)、丙戊茶鹼(propentofylline)或黃嘌呤衍生物，以及根據本

發明之抗體及視情況之醫藥學上可接受之載劑及/或稀釋劑及/或賦形劑及用於治療疾病之程序。

蛋白質醫藥活性物質所存在之量可介於每劑量1 ng與10 mg之間。通常，投藥範圍應在0.1 µg與10 mg本發明之抗體範圍內、尤其在1.0 µg與1.0 mg範圍內且更尤其在1.0 µg與100 µg範圍內，屬於該等範圍之所有個別數字亦為本發明之一部分。若經由連續輸液進行投藥，則更適當劑量可在0.01 µg與10 mg單位/公斤體重/小時之範圍內，屬於該等範圍之所有個別數字亦為本發明之一部分。

通常非經腸投藥，例如靜脈內投藥。非經腸投藥之製劑包括無菌水性或非水性溶液、懸浮液及乳液。非水性溶劑包括(而不限於)丙二醇、聚乙二醇、諸如橄欖油之植物油及諸如油酸乙酯之可注射性有機酯。水性溶劑可選自由水、醇/水溶液、乳液或懸浮液(包括鹽水及緩衝介質)組成之群。非經腸媒劑包括氯化鈉溶液、林格氏右旋糖、右旋糖及氯化鈉、乳酸化林格氏液或不揮發性油類。靜脈內媒劑包括流體及營養素補充劑、電解質補充劑(諸如彼等基於林格氏右旋糖者)及其他。亦可存在防腐劑，諸如抗菌劑、抗氧化劑、螯合劑、惰性氣體等。

醫藥組合物可進一步包含蛋白質載劑，諸如尤其人類來源之血清白蛋白或免疫球蛋白。視所要用途而定，其他生物活性劑可存在於本發明之醫藥組合物之中。

當結合目標位於腦中時，本發明之某些實施例提供抗體或其活性片段以橫越血腦屏障。某些神經退化性疾病與增加之血腦屏障滲透性相關聯，使得抗體或其活性片段可易於引入腦中。當血腦屏障完整無損時，用於跨過血腦屏障輸送分子的現有數種此項技術中已知方法包括(但不限於)物理方法、脂質基方法及受體與通道基方法。

跨過血腦屏障輸送抗體或其活性片段之物理方法包括(但不限於)

完全繞過血腦屏障或藉由在血腦屏障中建造開口。繞過方法包括(但不限於)直接注入腦(參見，例如Papanastassiou等人，Gene Therapy 9: 398-406 (2002))及在腦中植入傳遞器件(參見，例如Gill等人，Nature Med. 9: 589-595 (2003)；及 Gliadel Wafers™, Guildford Pharmaceutical)。在障壁中建造開口之方法包括(但不限於)超音波(參見，例如美國專利公開案第2002/0038086號)、滲透壓(例如藉由投與高滲甘露糖醇(Neuwelt, E. A., Implication of the Blood-Brain Barrier and its Manipulation, 第1&2卷，Plenum Press, N.Y. (1989)))、藉由(例如)緩激肽或滲透劑A-7滲透(參見，例如美國專利第5,112,596號、第5,268,164號、第5,506,206號及第5,686,416號)及以含有編碼抗體或抗原結合片段之基因的載體跨越血腦屏障之神經元轉染(參見，例如美國專利公開案第2003/0083299號)。

跨過血腦屏障輸送抗體或其活性片段之脂質基方法包括(但不限於)將抗體或其活性片段囊封於與結合血腦屏障之血管內皮上的受體之抗體結合片段偶合的脂質體中(參見例如美國專利申請公開案第20020025313號)且以低密度脂蛋白顆粒(參見例如美國專利申請公開案第20040204354號)或脂蛋白元E(參見例如美國專利申請公開案第20040131692號)包裹抗體或其活性片段。

跨過血腦屏障輸送抗體或其活性片段之受體及通道基方法包括(但不限於)使用糖皮質激素阻斷劑來增加血腦屏障之滲透性(參見例如美國專利申請公開案第2002/0065259號、第2003/0162695號及第2005/0124533號)；活化鉀通道(參見例如美國專利申請公開案第2005/0089473號)、抑制ABC藥物轉運蛋白(參見例如美國專利申請公開案第2003/0073713號)；以運鐵蛋白塗佈抗體且調節該或該等運鐵蛋白受體之活性(參見例如美國專利申請公開案第2003/0129186號)且將該等抗體陽離子化(參見例如美國專利第5,004,697號)。

偵測/診斷

在另一實施例中，本發明提供用於偵測及診斷類澱粉相關疾病或病狀之方法及套組。該等方法包括通常用於偵測或定量在生物樣品中或在原位條件下之物質的已知免疫學方法。

患者之類澱粉相關疾病或病狀的診斷可藉由偵測樣品中或原位偵測單株抗體或其活性片段與類澱粉蛋白之抗原決定基的免疫特異性結合來實現，其包括使懷疑含有類澱粉蛋白之樣品或特定軀體部分或軀體區域與結合類澱粉蛋白之抗原決定基的抗體接觸；允許抗體結合類澱粉蛋白以形成免疫複合體；偵測免疫複合體之形成且將免疫複合體之存在或缺失與樣品或特定軀體部分或區域中類澱粉蛋白之存在或缺失相關。

可用於診斷類澱粉相關疾病或病狀之生物樣品為例如諸如血清、血漿、唾液、胃分泌液、黏液、腦脊髓液、淋巴液及其類似物之液體，或獲自生物體之諸如神經、腦、心臟或脈管組織之組織或細胞樣品。對於測定樣品中類澱粉蛋白之存在或缺失，一般熟習此項技術者已知之任何免疫檢定(參見Harlow及Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1988 555-612)均可使用，諸如使用用於偵測之第二試劑利用間接偵測方法之檢定、ELISA及免疫沈澱及凝集檢定。該等檢定之詳細描述係於(例如)Maertens及Stuyver, Zrein等人(1998)之WO 96/13590及WO 96/29605中給出。

對於原位診斷，可藉由在此項技術中已知之方法將抗體或其任何活性及功能部分投與待診斷之生物體，該等方法係諸如靜脈內、鼻內、腹膜內、腦內、動脈內注射，使得本發明之抗體與類澱粉蛋白上之抗原決定基區之間可發生特異性結合。可經由連接至抗體或其功能片段上之標記偵測抗體/抗原複合體。

用於診斷應用之免疫檢定通常依賴於經標記之抗原、抗體或用於偵測之第二試劑。該等蛋白或試劑可經熟習此項技術者通常已知之化合物標記，該等化合物包括酶、放射性同位素及螢光、發光及發色物質，包括著色顆粒，諸如膠體金及乳膠珠粒。該等標記中，放射性標記可用於幾乎所有類型之檢定且與大多數變體一起使用。當必須避免放射性時或當需要快速結果時，酶結合之標記物尤其適用。儘管螢光染料之使用需要昂貴設備，但其提供極其敏感之偵測方法。適用於該等檢定之抗體包括單株抗體、多株抗體及親和力純化之多株抗體。

或者，抗體可藉由與對免疫球蛋白具有親和力之諸如蛋白A或G或第二抗體之標記物質反應而間接標記。抗體可與第二物質結合且以對與抗體結合之第二物質具有親和力的經標記之第三物質偵測。例如，抗體可與生物素結合且使用經標記之親和素或抗生蛋白鏈菌素偵測抗體-生物素結合物。相似地，抗體可結合至半抗原且使用經標記之抗半抗原抗體偵測抗體-半抗原結合物。

一般熟習此項技術者將已知該等及其他合適之可根據本發明使用的標記物。可使用一般熟習此項技術者通常已知之標準技術實現該等標記物與抗體或其片段之結合。由Kennedy, J. H., 等人, 1976 (Clin. Chim. Acta 70:1-31)及Schurs, A. H. W. M.等人。1977 (Clin. Chim Acta 81:1-40)描述典型技術。後者中所提及之偶合技術為戊二醛方法、高碘酸方法、二馬來醯亞胺方法及其他，所有均以引用的方式併入本文中。

當前的免疫檢定利用雙抗體法來偵測其中分析物之存在。藉由與已經可偵測標記物標記之第二抗體反應間接標記抗體。第二抗體較佳為與衍生單株抗體之動物抗體結合者。換言之，若單株抗體為小鼠抗體，則經標記之第二抗體為抗小鼠抗體。對於欲用於如下所述之檢定之單株抗體，該標記物較佳為經抗體塗佈之珠粒、尤其磁性珠粒。

對於待用於本文中所描述之免疫檢定之多株抗體，該標記物較佳為諸如放射性、螢光之可偵測分子或電化學發光物質。

由於適合於快速測定分析物之存在，通常稱為較快形式系統之替代雙抗體系統亦可用於本發明之範疇內。該系統要求抗體與分析物之間具有高親和力。根據本發明之一實施例，使用一對對類澱粉蛋白各具特異性之抗體測定類澱粉蛋白之存在。本文中該等成對抗體之一稱為"偵測抗體"且本文中該等成對抗體之另一者"捕捉抗體"。本發明之單株抗體可用作捕捉抗體或偵測抗體。本發明之單株抗體亦可在同一單個檢定中用作捕捉與偵測抗體。因此本發明之一實施例使用雙抗體夾層法來偵測生物體液之樣品中的類澱粉蛋白。在該方法中，分析物(類澱粉蛋白質)夾在偵測抗體與捕捉抗體之間，捕捉抗體不可逆地固定於固體支撐物上。偵測抗體將含有可偵測之標記物以鑑別抗體-分析物夾層之存在且因此鑑定分析物之存在。

例示性固體物質包括(但不限於)放射免疫檢定及酵素免疫分析法領域中所熟知的微量滴定盤、聚苯乙烯測試管、磁性、塑料或玻璃珠粒及載片。將抗體偶合至固相之方法亦為熟習此項技術者所熟知。近年來，已所用諸如耐綸、硝化纖維素、乙酸纖維素、玻璃纖維及其他多孔聚合物之若干多孔材料作為固體支撐物。

本發明亦係關於用於偵測生物樣品中之類澱粉蛋白之包含如以上所定義之組合物的診斷套組。此外，本發明係關於後者診斷套組，其除如以上所定義之組合物外亦包含如上所定義之偵測試劑。一般而言，術語"診斷套組"係指在此項技術中已知之任何診斷套組。更特定言之，後者術語係指如Zrein等人(1998)中所述之診斷套組。

本發明之另一目標提供用於偵測及診斷類澱粉相關疾病及病狀的包含本發明之抗體之新穎免疫探針及測試套組。對於免疫探針，抗體直接或間接連接至合適之報導分子，例如酶或放射性核素。該測試

套組包括容納本發明之一或多種抗體之容器及使用該等抗體用於以下目的之說明書：與類澱粉蛋白結合以形成免疫複合體且偵測該免疫複合體之形成，使得該免疫複合體之存在或缺失與類澱粉蛋白質之存在或缺失相關聯。

實例

材料

小鼠單株抗體ACI-01-Ab7C2(在本申請案通篇對於人類化C2抗體稱為"mC2"及hC2)之開發及製備係描述於2005年12月12日提出申請之同在申請中之申請案EP 05 02 7092.5中，其揭示內容以引用的方式併入本文中。

"德國菌種保藏中心(DSMZ)於Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig依據布達佩斯條約之條款於2005年12月1日寄存同在申請中之申請案第EP05027092.5號的產生小鼠單株抗體ACI-01-Ab7C2"(在申請案通篇中對於人類化C2抗體稱為"mC2"及hC2)之融合瘤細胞FP-12H3-C2，且給予寄存編號DSM ACC2750。

在補充有10%胎牛血清及抗生素(青黴素(Penicillin)/鏈黴素(Streptomycin))之達爾伯克(Dulbecco)修飾之伊格爾(Eagle)培養基(DMEM)中培養融合瘤細胞。核查所產生抗體之同型且如所預期地發現其為小鼠IgG2b/κ。

檢定

用於類澱粉β結合之ELISA提供C2抗體效力之可靠量測。陽性對照抗體、鼠類FP-12H3-C2抗體(Genovac批號：AK379/01)，及標準Chemicon抗體1560(批號：0508008791)。

選擇人類恆定區

由於臨床抗體候選者無需免疫系統招募，因此重鏈之所選人類恆定區為人類IgG4，其經修飾以將鉸鏈區位置228之絲胺酸改變為脯

胺酸(HuIgG4 Ser-Pro)。該突變使鏈間二硫鍵穩定，且防止原生人類IgG4製劑中會出現之半分子的形成。自該產生細胞株表現之抗體亦將其末端離胺酸移除。人類恆定區HuIgG4 Ser-Pro及人類 κ 之序列分別於SEQ ID NO: 17及14中給出。

實例1 抗體可變區之選殖及定序

使用Qiagen RNeasy微型套組(目錄號：74104)自 3×10^6 個融合瘤細胞(一個T175燒瓶)製備總RNA。將RNA溶離於50 μ L水中且在1.2%瓊脂糖凝膠上核查。保留自細胞之條件培養基且將樣品用於在抗體活性檢定中測試。

使用具有小鼠IgG及 κ 恆定區引子之逆轉錄酶製備 V_H 及 V_K cDNA。藉由PCR使用大型集合之信號序列引子擴增第一股cDNA。將經擴增之DNA經凝膠純化且選殖至載體pGem®T Easy®(Promega)中。藉由PCR篩檢所獲得之 V_H 及 V_K 純系之預期尺寸的插入物，且藉由自動DNA定序測定所選擇純系之DNA序列。參考其他抗體序列測定序列中互補決定區(CDR)之位置(Kabat EA等人，1991)。在本申請案通篇中使用抗體可變區之Kabat編號規定；因此殘基數目可與嚴格線性數目不同。

mC2 V_K 之DNA序列及所推導出之胺基酸序列分別展示於SEQ ID NO: 29及27中。4個純系得到該相同產生序列。亦於若干純系中發現自融合瘤融合搭配物出現之非產生異常 V_K 序列。

對於mC2 V_H ，分離出兩種不同產生序列。於總共29個純系中發現mC2 V_H AF序列(參見SEQ ID NO: 30)，個別純系中具有14個單鹼基對變化。於總共8個純系中發現mC2 V_H B序列。該等中之5個代表大多數序列，其他3個純系為此之變體。該等類似 V_H B序列可能作為PCR擴增之人工產物出現。非產生異常 V_H 亦獲自C2融合瘤且歸結於缺陷V-D-J連接。

為測定何種為恰當活性mC2 V_H，組合mC2 V_K製備具有兩種不同V_H序列AF及B之兩種嵌合抗體，以測試其恰當抗體活性。

實例2 嵌合抗體基因之構築

以其最常見形式之人類嵌合抗體係由與鼠類(或其他非人類)可變區連接之人類恆定區組成。嵌合抗體提供極其適用之工具，首先用於確認已鑑別之恰當可變區，其次對於在具有相同效應功能且使用與人類化或工程化抗體相同之第二偵測試劑之抗原結合檢定中作為對照抗體，以及可用以參考抗體之特定目標，研究人類恆定區之藥物代謝動力學及其他特性。

構築兩種由與表現載體pSVgpt中之HuIgG4(Ser-Pro)恆定區連接的mC2 V_H AF或mC2 V_H B可變區組成之嵌合重鏈表現載體。此舉係基於pSV₂gpt(Mulligan及Berg, 1980)且包括用於在細菌細胞中選擇之胺苄青黴素抗性基因，用於在哺乳動物細胞中選擇之gpt基因、鼠類重鏈免疫球蛋白增強子區、編碼恆定區基因之染色體組序列及SV40聚A序列。將用於表現之重鏈可變區作為HindIII插入BamHI片段中。

構築由與表現載體pSVhyg(Hieter-PA等人，1980)中之人類C_κ恆定區連接的C2 V_K組成之嵌合輕鏈載體。pSVhyg包括用於在細菌細胞中選擇之胺苄青黴素抗性基因、用於在哺乳動物細胞中選擇之hyg基因、鼠類免疫球蛋白重鏈增強子區域、編碼κ恆定區基因且包括κ增強子之染色體組序列及SV40聚A序列。將用於表現之輕鏈可變區作為HindIII插入BamHI片段中。

藉由使用載體VH-PCR1及VK-PCR1作為模板添加包括前導信號肽、前導內含子及鼠類免疫球蛋白啟動子之5'側接序列及包括剪接位點及內含子序列之3'側接序列來構築鼠類C2 V_H及V_K序列之表現卡匣(Riechmann等人，1988)。證實DNA序列對於嵌合表現載體中之V_H及V_K係正確的。表現卡匣中V_H及V_K基因之DNA及胺基酸序列係展示

於圖1及2中。

實例3 表現嵌合抗體

3.1 在穩定細胞株中表現

抗體表現之宿主細胞株為NS0、一種產生非免疫球蛋白之小鼠骨髓瘤，獲自歐洲動物細胞培養物保藏中心(European Collection of Animal Cell Cultures), Porton UK(ECACC編號85110503)。藉由電穿孔將重鏈及輕鏈表現載體共轉染至NS0細胞中。在補充有10%胎牛血清(FBS)、0.8 µg/ml黴酚酸及250 µg/ml黃嘌呤之達爾伯克修飾之伊格爾培養基(DMEM)中選擇表現gpt基因之群落。藉由ELISA篩檢所轉染細胞株之對於人類IgG人類抗體之產生。擴增分泌抗體之細胞株且選擇最高產生者且在液氮中冷凍。在如上所述但僅具有5% FBS之培養基中擴增各抗體之最佳產生細胞株。使用Prosep®-A(Bioprocessing Ltd)純化嵌合抗體。藉由ELISA測定人類IgGκ抗體之濃度。亦藉由SDS-PAGE分析抗體。

3.2 嵌合抗體之瞬時表現

為加快不同嵌合抗體之測試，瞬時表現係用以迅速產生少量含有用於測試之重組抗體的細胞上清液。將mC2 V_H及V_K表現卡匣轉移至基於pcDNA3.1(Invitrogen)之載體中用於瞬時表現。重鏈載體包括人類IgG恆定區。輕鏈載體包括人類κ恆定區。根據製造商提供之方案以Lipofectamine 2000試劑(Invitrogen目錄編號：11668)將mC2 V_H AF與mC2 V_H B與mC2 V_K一起轉染至人類胚腎(HEK 298)細胞中。轉染3天後自細胞收集條件培養基。藉由ELISA測定對於人類IgGκ抗體所產生抗體之量。

實例4 嵌合C2抗體之活性

4.1 藉由瞬時轉染產生之嵌合C2抗體之活性

在ELISA中測試自瞬時轉染之條件培養基樣品的兩種不同嵌合抗

體與類澱粉 β 之結合。結果明顯指示C2 V_H AF為恰當序列。C2 V_H AF/C2 V_K嵌合抗體在該檢定中良好結合，但C2 V_H B/C2 V_K根本不展示任何結合。Chemicon 1560鼠類對照抗體展示良好結合，但所提供純化之鼠類C2抗體之結合較低。應注意到與具有人類恆定區之嵌合抗體相比，不同二次抗體係用於具有小鼠恆定區之鼠類抗體，因此結果無法直接相比。隨後發現自C2融合瘤之條件培養基在該檢定中得到良好結果。

4.2 純化之嵌合C2抗體之活性

如所述地自穩定NS0細胞株純化兩種不同C2嵌合抗體。且使用類澱粉 β ELISA來測試。所得結果與瞬時表現抗體所得之結果一致。C2 ChV_H AF/ChV_K抗體在ELISA中結合良好且C2 ChV_H B/ChV_K抗體根本不結合。

實例5 設計人類化C2抗體基因

將mC2 V_H及V_K胺基酸序列與NCBI及Kabat數據庫中之齧齒動物抗體V_H及V_K序列相比。

5.1 輕鏈可變區

mC2 V_K之最接近匹配小鼠生殖系基因為bb1，基因座MMU231201(Schable等人，1999)。僅兩個胺基酸與此生殖系序列不同，兩者均位於CDRL1中。發現具有類似但不同序列之成熟鼠類抗體。數種具有相同CDRL2及相同CDRL3，但mC2之CDRL1似乎為獨特的。mC2 V_K可歸為Kabat亞群MuV_KII。mC2 V_K之位置87為F而非在該亞群中更常見之Y，指示該構架殘基對於抗體活性而言可為重要的。與人類生殖系V_K序列之比較展示亞群V_KII之基因為mC2 V_K之最佳配合(Cox等人，1994)。選擇序列DPK15以及人類J區HuJ_K1以提供人類化V_K之受體構架序列。

設計4個人類化V_K序列。C2HuV_K1係由具有來自DPK 15及人類

J_K1之構架的mC2 V_K CDR組成。在形式2、3及4中，鼠類殘基已在構架中在位置45或87或兩者處經取代。殘基45可與支撐CDR之構形有關。殘基87係位於V_H及V_K域之介面處。因此，該等殘基對於維持抗體結合而言可為關鍵的。

輕鏈構架區中已作出之位置及變化係展示於表6中。人類化序列與mC2 V_K序列及與DPK15及人類J_K1之比較

5.2 重鏈可變區

mC2 V_H AF之最接近匹配小鼠生殖系基因為V_H7183、基因座AF120466(Langdon等人，2000)。比較係展示於圖3中。9個胺基酸與此生殖系序列不同，多數位於CDR2中。發現具有相同或類似(一個殘基不同)CDR1或具有類似CDR2(一個殘基不同)之成熟鼠類抗體，但所有三個CDR中無一者與mC2 V_H AF相同。mC2抗體之CDR3為顯著短的，其僅由三個殘基組成。然而，發現數據庫中之其他抗體具有該長度之CDR3。mC2 V_H AF可歸為Kabat亞群MuV_HIIID。mC2 V_H之殘基47為L而非更常見之W，且殘基94為S而非常見之R，其指示此等構架殘基對於抗體活性而言可為重要的。與人類生殖系V_H序列之比較展示亞群V_HIII之基因為mC2 V_H之最佳配合。選擇序列DP54與人類J區域HuJ_H6以提供人類化V_H之受體構架序列。

設計4個人類化V_H序列。C2HuV_H1係由具有來自DP54及HuJ_H6之構架的mC2 V_H AF CDR組成。在形式2、3及4中，鼠類殘基已在構架中在位置47或94或兩者處經取代。構架2之殘基47與CDR及V_K域接觸。殘基94可與支撐CDR之構形有關。因此，該等殘基對於維持抗體結合而言可為關鍵的。

重鏈構架區中已作出之位置及變化係展示於表7中。

實例6 構築人類化抗體基因

藉由重疊PCR重組之方法構築經修飾之可變區。嵌合抗體C2

ChV_H AF及C2 ChV_K之表現卡匣係用作用於將構架區誘變為所需序列之模板。合成包涵待改變區之誘變引子對之組。將所產生之人類化V_H及V_K表現卡匣選殖至pUC19中且證實對於各V_H及V_K全部DNA序列為正確的。將經修飾之重鏈及輕鏈V區基因自pUC19作為HindIII切除至BamHI表現卡匣中。關於嵌合抗體載體，將該等基因轉移至分別包括人類IgG4 Ser-pro或κ恆定區之表現載體pSVgpt及pSVhyg中。證實DNA序列對於表現載體中之人類化V_H及VK為正確的。

實例7 人類化抗體之表現

7.1 在穩定細胞株中表現

關於嵌合抗體之表現，藉由電穿孔將人類化重鏈及輕鏈表現載體共轉染至NS0細胞中。確切地關於嵌合抗體，選擇及擴增抗體產生細胞株且純化人類化抗體。藉由SDS-PAGE分析純化抗體。

7.2 人類化抗體之瞬時表現

為加快不同人類化V_H及V_K構築體之測試，亦將C2人類化V_H及V_K表現卡匣轉移至載體中，用於部分7.2中所述之瞬時表現。將4個人類化C2 V_K構築體與嵌合C2 V_H構築體一起共轉染至HEK293細胞中。相似地，將4個人類化C2 V_H構築體與嵌合C2 V_K構築體一起共轉染至HEK293細胞中。轉染3天後自細胞收集條件培養基。藉由ELISA測定人類IgGκ抗體之所產生抗體之量。

實例8 人類化C2抗體之活性

8.1 藉由瞬時轉染產生之人類化C2抗體之活性

在類澱粉β ELISA中測試來自瞬時轉染之條件培養基樣品。所得結果明顯指示當與嵌合C2 κ鏈組合時，人類化VH構築體C2 HuVH AF形式2及4具有功能性且與該檢定中之嵌合C2抗體可比。與此相反，與嵌合C2 κ鏈組合的含有C2 HuVH AF形式1及3之抗體在該檢定中根本未展示結合。此指示鼠類殘基在位置94之取代對抗體活性而言為必

不可少。在ELISA中含有嵌合C2重鏈、與4個人類化C2 κ 鏈組合的抗體全部展示良好結合，與嵌合抗體可比。

8.2 經純化之人類化C2抗體之活性

如所述自穩定NS0細胞株純化包含兩個人類化重鏈及4個人類化輕鏈之全部組合的8個不同人類化C2抗體，且使用類澱粉 β ELISA來測試(圖4)。

所得結果明顯指示在該檢定中C2 HuVH4抗體比C2 HuVH2抗體效能更佳。C2 HuVH2抗體中，C2 HuVH2/HuVK3展示良好結合活性，但與嵌合對照抗體C2 ChVHAF/ChVK相比此降低約2倍。與對照相比，C2 HuVH2/HuVK2活性降低4至5倍。包含具有4個不同人類化輕鏈之C2HuVH4的抗體之活性係類似的。觀測到C2HuVH4/HuVK1具有最高活性，且在該檢定中所有4個抗體與對照嵌合抗體接近。

實例9 對CDRL2之修飾

9.1 設計具有經修飾之CDR 2的輕鏈

如上所述，許多抗體共有與C2抗體相同的CDRL2序列("KVSNRFS")。決定測試CDRL2是否可在未不利影響抗體活性之情況下略微經修飾。選擇兩個保守取代：R取代位置50之K且S取代位置53之N。因此兩種替代性CDRL2序列為"RVSNRFS"及"KVSSRFS"。在無其他變化之情況下，將該等序列作為mC2 VK-R及mC2 VK-S分別併入鼠類V κ 序列中。

9.2 經修飾之CDRL2抗體之瞬時表現

將兩個11.2.1部分中所描述具有經修飾之CDRL2的C2輕鏈構築體選殖至輕鏈載體中用於瞬時表現。將各者與嵌合C2 V $_H$ 載體一起共轉染至HEK293細胞中。轉染3天後自細胞收集條件培養基。藉由ELISA測定人類IgG κ 抗體之所產生抗體之量。

9.3 具有經修飾之CDRL2之C2抗體的活性

在類澱粉β ELISA中測試自具有與mC2 V_H組合之經修飾之CDRL2的mC2 V_Ks瞬時轉染之條件培養基樣品(圖5)。VK-R與VK-S抗體與嵌合C2抗體可比，指示所選擇CDRL2之個別修飾並不顯著影響檢定中之抗體活性。

實例10 親和力測定

為評估小鼠(ACI-01-Ab-7-C2)嵌合(AF)及人類化抗體(H4K1；H4K4)之結合特異性及親和力，使用類澱粉β 1-42單體及纖維作為固定於CM5晶片上之抗原進行BIAcore.RTM.分析。BIAcore.RTM.技術利用抗體與固定於層上之抗原結合後，該表面層之折射率變化。藉由自表面折射的雷射光之表面電漿共振(SPR)來偵測結合。信號動力學結合速率及分解速率之分析允許在非特異性及特異性相互作用之間辨別。所用抗體之濃度係在0.05 μM至1.0 μM之範圍內。

表 1： 小鼠(ACI-01-Ab-7-C2)嵌合(AF)及人類化抗體(H4K1；H4K4)對類澱粉β 1-42單體及纖維之結合特異性及親和力

	單體			纖維		
	k _a (1/Ms)	k _d (1/s)	KD(M)	k _a (1/Ms)	k _d (1/s)	KD(M)
小鼠ACI-01-Ab-7-C2	1.8E+04	2.7E-03	1.5E-07	2.4E+04	9.9E-04	4.1E-08
嵌合AF	4.7E+04	9.5E-04	2E-08	5.1E+04	3.3E-04	6.5E-09
人類化H4K1	5.0E+04	9.5E-04	1.9E-08	4.9E+04	2.3E-04	4.7E-09
人類化H4K4	2.5E+04	4.4E-04	1.8E-08	1.3E+05	3.0E-04	2.3E-09

實例11 免疫組織化學結合檢定

11.1 人類腦部分

倫理批准後自Bonn之Universitätsklinik獲得健康的非發狂之預AD及AD患者之腦。將腦固定於甲醛中且將海馬區脫水、嵌入石蠟中，以切片機切割5 μm切片。在RT下儲存石蠟切片直至使用。對於新鮮

材料，以冷凍切片機切割5 μm 低溫切片且將切片儲存在 -80°C 下直至使用。

11.2 免疫組織化學

將石蠟切片去石蠟且藉由將載片浸入二甲苯接著100%乙醇、90%乙醇及70%乙醇浴中再水合。藉由在於水中10% H_2O_2 、10%甲醇中培育30分鐘來減去背景。藉由將載片在100%甲酸中培育3分鐘來獲得抗原修復。在Tris緩衝鹽水(TBS, pH 7.5)中洗滌3次後，藉由將載片在於TBS中之10% BSA、0.25% Triton X-100中培育2小時阻斷非特異性標記。洗滌後(於TBS中洗滌3次)，藉由添加非標記之抗人類IgG(Biomed)且將載片在潮濕腔室中在RT下培育隔夜進行內源性抗體之阻斷。再洗滌3次後，將原發性人類抗類澱粉抗體添加至載片且在RT下再培育24小時。洗滌後，將鹼性磷酸酶標記之二次抗人類IgG(Sigma)添加至載片中且在RT下培育2小時。洗滌後，以液態永久紅(Dakocytomation)使載片顯影，以水洗滌且在以永久封固介質(corbitbalsam)封固前風乾。

在 -80°C 下將低溫切片固定於甲醇中30分鐘且藉由將 H_2O_2 添加至冷甲醇中至最終濃度10%且在RT下培育30分鐘減去背景。於Tris緩衝鹽水(TBS, pH7.5)中洗滌3次後，藉由如上所述之將載片在於TBS中之10% BSA、0.25% Triton X 100中培育2小時阻斷非特異標記，且如上所述之進行相同染色程序。

以Leica DMLB顯微鏡檢查切片，且使用Leica DC500攝影機及Leica FireCam1.2.0軟體攝影。

人類抗體A與C標記AD疾病患者之腦斑塊(圖6)。標記擴散與核心斑塊。此外，亦可藉由A及C抗體偵測非發狂預AD患者之擴散斑塊。以2種抗體標記腦類澱粉血管病變(CAA)之類澱粉，且亦偵測可能對應於細胞內類澱粉之神經元之某些染色。健康患者之對照腦上未見標

記。可在經甲酸預處理之石蠟切片上偵測斑塊，但在無甲酸預處理之石蠟切片上及固定於甲醇中之低溫切片上斑塊未經標記。人類抗體B並不偵測石蠟切片上之斑塊且小鼠抗體不染色人類腦之石蠟或低溫切片。

縮寫：

A=結合嵌合抗體AF(IgG4)(mC2ChVHAF)

B=非結合嵌合抗體B(IgG4)(mC2VHB)

C=結合人類化抗體H4K1(IgG4)(HuVH4/HuVK1)

小鼠=ACI-01-Ab-C2小鼠抗體(IgG2b)

實例12 mC2對類澱粉纖維之功能性

12.1 A β ₁₋₄₂纖維構形之修飾及mC2抗體結合後解聚之啟始

為評估抗體能夠解聚預成型 β -類澱粉(A β ₁₋₄₂)纖維之機制，進行硫黃素-T(Th-T)螢光檢定之頭接頭比較，量測U-¹³C酪胺酸10及纈胺酸12標記之A β ₁₋₄₂肽的解聚及固態核磁共振(NMR)，分析第二構形(圖7A)。mC2抗體將35.4%之預成型A β ₁₋₄₂纖維溶解且同時誘發 β 摺疊至無規捲曲之第二構形變化。 β 摺疊構形相對於無規捲曲之群體降低為35%水準，且因此與使用螢光Th-T檢定所量測值接近一致(圖7B)。該等數據指示mC2抗體之結合啟始潛在地引起 β 摺疊之平行分子間排列之失穩的二級結構之轉變，影響延長型纖維斷裂成較小片段。

12.2 mC2抗體之構形依賴型結合親和力

由於科學文獻中已熟知抗體-抗原結合能之比例可用於能量依賴型改變抗原之構形(Blond及Goldberg, 1987)，因此進行C2抗體與完全A β ₁₋₄₂蛋白及與較小、9個胺基酸長之包含抗體的抗原決定基之肽的比較實驗(圖8)。對於此比較，藉由ELISA使用涵蓋C2抗原決定基之完整胺基酸序列的生物素化肽(由Mimotopes產生且購自ANAWA Trading SA)及生物素化完整A β ₁₋₄₂肽(Bachem)分析人類化抗體C2之親和力。

根據製造商(Mimotopes)之用法說明書進行分析。如圖8及表2中所證明，抗體以比完全Aβ₁₋₄₂蛋白高36.0%之親和力結合包含其特異性抗原決定基(Aβ₁₋₄₂序列之胺基酸13-21)之肽。因此提議結合親和力能量差異用於類澱粉蛋白質之第二構形之能量消耗轉變以使抗原在更可接受之位置存在用於抗體相互作用。此說明抗體之親和力對於原生(完全類澱粉蛋白質)比所分離亞單元更低之原因。

表2

	O.D	
	類澱粉β 13-21	類澱粉β 1-42
hC2	1.225	0.9005
對照IgG	0.171	0.196

實例13 抗類澱粉hC2對類澱粉β 1-42肽之聚集的影響

為評估人類化抗人類類澱粉β單株抗體hC2介導對類澱粉β(Aβ)之抗聚集及解聚作用之能力，進行硫黃素T光譜螢光檢定。

13.1 抑制聚集檢定

於六氟異丙醇(HFIP)中將Aβ₁₋₄₂凍乾粉復水為1 mM。在室溫下將肽溶液超音波處理15分鐘，攪動隔夜且等分於非矽化微量離心機管中。隨後在氬流下蒸發HFIP。將所得肽薄膜真空乾燥10 min且儲存在-80℃下直至使用。

為檢定抗體所介導之Aβ₁₋₄₂聚集的抑制，將hC2抗體預先稀釋於PBS中，且於非矽化培育管中製備含有下列組份之檢定溶液：3.3或0.33 μM預先稀釋抗體、10 μM硫黃素T、33 μM Aβ₁₋₄₂及8.2% DMSO。因此，抗體以Aβ₁₋₄₂之最終莫耳比為1:10及1:100。亦製備適當對照溶液。隨後在37℃將溶液培育24小時，且在Perkin-Elmer FluoroCount分光螢光計上在黑色384孔滴定盤(Perkin-Elmer)之六個重複中讀取光譜螢光(相對螢光單位；RFU)。隨後量測光譜螢光且如下

所述計算解聚%。

13.2 解聚檢定

為檢定抗體所介導之預聚集Aβ₁₋₄₂之解聚，將如上所述製備之低分子量Aβ₁₋₄₂製成於27% DMSO及1×PBS中之110 μM溶液。隨後允許該溶液在37℃下聚集24小時，此後添加以下各物：3.3或0.33 μM預先稀釋之抗體及10 μM硫黃素T。此舉使得抗體與Aβ₁₋₄₂之莫耳比為1:10及1:100。隨後在37℃下將該溶液再培育24小時。隨後量測光譜螢光且如下所述計算解聚%。

13.3 計算

根據以下方程式，聚集抑制或解聚分別表示為平均抑制或解聚%±平均標準誤差(SEM)：

抑制% =
$$\frac{(\text{陽性對照之RFU} - \text{陰性對照之RFU}) - (\text{具有A}\beta_{1-42}\text{之樣品的RFU} - \text{無A}\beta_{1-42}\text{之樣品的RFU})}{(\text{陽性對照之RFU} - \text{陰性對照之RFU})} \times 100\%$$

13.4 結果

13.4.1 Aβ₁₋₄₂聚集之抑制

使用hC2抗體之Aβ₁₋₄₂聚集之抑制展示於表3及圖16中。在抗體：Aβ₁₋₄₂ 1:100之莫耳比下，平均抑制30%(2個獨立實驗)，而在1:10莫耳比下抑制為80%(2個獨立實驗；參見表3)。

表3.在1:100及1:10抗體：Aβ₁₋₄₂莫耳比下，hC2所介導之Aβ₁₋₄₂聚集之抑制

抗體	莫耳比(抗體：Aβ ₁₋₄₂)	
	1:100	1:10
hC2	30.0±4.1%	80.4±6.9%

13.4.2預聚集Aβ₁₋₄₂之解聚

使用hC2抗體之預聚集Aβ₁₋₄₂之解聚展示於表4及圖17中。在抗體：Aβ₁₋₄₂ 1:100莫耳比下，平均解聚24%，而在1:10莫耳比下解聚為

32%(3個獨立實驗，參見表4)。

表4. hC2所介導之預聚集Aβ₁₋₄₂在1:100及1:10抗體：Aβ₁₋₄₂莫耳比下之解聚

抗體	莫耳比(抗體：Aβ ₁₋₄₂)	
	1:100	1:10
hC2	23.9 ± 4.4%	31.9 ± 3.5%

使用硫黃素T檢定，可證明抗Aβ人類化抗體hC2之雙功能特性，亦即抑制Aβ₁₋₄₂聚集成病原性原纖維體構形及另外使預成型Aβ₁₋₄₂原纖維解聚。在1:10之抗體：Aβ₁₋₄₂莫耳比下，hC2抑制80%之Aβ₁₋₄₂聚集。經展示hC2使預先聚集之Aβ₁₋₄₂之原纖維在1:10莫耳比下解聚的能力為32%。

實例14: mC2與不同類類澱粉蛋白質之構形特異性結合

為評估mC2對不同等級之聚合型類澱粉蛋白質、單體、聚合型可溶性及纖維體類澱粉之特異性，進行以該等不同等級之聚合型β-類澱粉塗佈的ELISA(圖9)。根據由(Klein, 2002)公開之改進方法製備單體、根據(Barghorn等人，2005)製備可溶性聚合型類澱粉β，而藉由在37℃下將最終濃度為於Tris/HCl pH 7.4中1 μg/μl之類澱粉(Bachem, Switzerland)培育5天，接著進行離心步驟(10,000 rpm，歷時5分鐘)來製備纖維。隨後將類澱粉聚合物塗佈於ELISA板上，最終濃度為55 μg/ml且藉由使用經鹼性磷酸酶標記之抗小鼠IgG單株抗體(Jackson)進行結合親和力ELISA。如表5中所證明，mC2抗體以比纖維更高之親和力與可溶性聚合型類澱粉β結合，且以最低親和力與單體結合。該等數據指示抗體之結合受類澱粉抗原決定基及不同類澱粉聚集體之構形影響。

表5 mC2與類澱粉單體、寡聚物及纖維之構形特異性結合

mC2	O.D
-----	-----

Ab濃度 (μg/ml)	寡聚物	纖維	單體
0.625	2.806	1.620	1.155
0.312	1.724	0.989	0.649
0.156	1.036	0.631	0.397
0.078	0.652	0.499	0.333

實例15：AC免疫之單株抗體hC2之抗原決定基定位

藉由ELISA使用三個不同肽文庫進行人類化單株抗體 hC2之抗原決定基定位。一文庫包含總共33個涵蓋Aβ₁₋₄₂之完整胺基酸(aa)序列的生物素標記肽(由Mimotopes產生且購自ANAWA Trading SA)；第二文庫含有使用第一肽文庫之肽12(Aβ之aa12-20)且藉由丙胺酸取代序列中之各aa(參見下文表8)的生物素標記肽；且第三文庫含有生物素標記肽13、14或15(Aβ之aa 13-21、14-22或15-23)且在各情況下將最後胺基酸取代為丙胺酸或對於已為丙胺酸之aa21而言取代為甘胺酸(參見下表9)。生物素化完整Aβ₁₋₄₂肽係用作陽性對照(Bachem)。根據製造商(Mimotopes)之用法說明書進行抗原決定基定位。簡言之，在4℃下以於PBS中0.1% BSA將鏈黴抗生素蛋白塗佈之板(NUNC)阻斷隔夜。以PBS-0.05% Tween 20洗滌後，在RT下以文庫中之稀釋於PBS中0.1% BSA、0.1%疊氮化鈉中為10 μM最終濃度之不同肽將板塗佈1小時。洗滌後，在RT下以於PBS中2% BSA、0.1%疊氮化鈉中稀釋為200 ng/ml之hC2抗體或非Aβ結合嵌合IgG4抗體將板培育1小時。再次洗滌板且在RT下以鹼性磷酸酶結合之山羊抗人類IgG培育1 h。最終洗滌後，以磷酸酯酶受質(pNPP)培育板且使用ELISA板讀取器在405 nm讀取。

展示人類化單株抗體hC2與第一肽文庫之肽12、13、14、15及16特異性結合。該等肽分別包含Aβ₁₋₄₂之aa 12-20、13-21、14-22、15-23及16-24，表明抗原決定基處於Aβ之區域12-24中。具有丙胺酸取代之

第二文庫用以測定對於與A β 12-20(VHHQKLVFF)結合關鍵之aa。當胺基酸16、17、19或20經丙胺酸取代時，hC2抗體之結合完全喪失，指示該等aa對於抗體與A β 之結合絕對關鍵。當aa 15及18經取代時hC2抗體之結合部分喪失。

當aa 14取代為丙胺酸時結合亦幾乎完全喪失，指示aa 14對於結合亦極其重要。

最後，第三文庫係用以測定aa 21、22或23對於與抗原決定基結合是否關鍵。當aa 23將取代為丙胺酸時，抗體與aa 15-23之結合降低，指示aa 23對於結合亦重要。當aa 21經取代為甘胺酸時結合部分喪失，且當aa 22經取代為丙胺酸時略微喪失。

實例16：藉由hC2抗體神經保護

在活體外檢定中評估抗體hC2保護神經元免於Abeta寡聚物誘發之退化的能力。將胚胎第16.5-17.5天之小鼠皮層神經元分離、離解且於N3-F12介質中活體外培養。使細胞總計生長9天，且在第三天及Abeta寡聚物或Abeta寡聚物加抗Abeta抗體hC2添加之日餵食。在第5天(4天Abeta)或第6天(3天Abeta)，僅以2 μ M Abeta寡聚物或組合2 μ M Abeta寡聚物與50 μ g/mL抗Abeta抗體hC2處理某些孔之細胞。

藉由將Abeta 1-42(rPeptide)溶解於HFIP中製備Abeta寡聚物，Abeta肽自其等分成1 mg/ml之10 μ l等分試樣，且隨後在通風櫥中蒸發30分鐘，且將肽薄膜儲存在-80°C直至使用。使用時，將肽薄膜溶解於10 μ l DMSO中，隨後溶解於78.6 μ l HAMS F12中，且在4°C下將Abeta肽溶液培育24-48小時(Abeta最終濃度25 μ M)。

對於對照細胞，在第5天僅添加相同體積之作為Abeta-DMSO的DMSO-F12，且在無任何其他處理之情況下將細胞再培養4天。在第9天，將所有培養條件之神經元且以Tuj1(抗 β 微管蛋白抗體)染色，接著以經FITC標記之第二抗體染色以目測微管，且因此一般而言目測神

經元過程。結果展示於圖18中。

未處理小鼠胚胎皮層神經元在培養9天後展示正常形態學(圖13，最左圖)。以Abeta寡聚物將細胞處理三天誘發軸突退化且導致軸突總數下降(圖13，下部中心圖)且在處理4天後該影響甚至更顯著(圖13，上部中心圖)。與此相反，以Abeta寡聚物與抗Abeta抗體hC2之組合處理的細胞看似與對照細胞相似(圖13，上部及下部右圖)。該等結果指示抗Abeta抗體hC2能夠保護胚胎小鼠皮層神經元免於Abeta寡聚物誘發之退化。

表6：人類化C2輕鏈構架區中所進行之位置及變化

位置輕鏈	45	87	50	53
小鼠C2V _K	K	F	K	N
人類化C2HuV _K 1	Q	Y	K	N
人類化C2HuV _K 2	Q	F	K	N
人類化C2HuV _K 3	K	Y	K	N
人類化C2HuV _K 4	K	F	K	N
人類化生殖系d _{pk} 15	Q	Y	L	N
小鼠C2V _K -R			R	
小鼠C2V _K -S				S

表7：人類化C2重鏈構架區中所進行之位置及變化

位置重鏈	47	94
小鼠C2VHAF	L	S
人類化C2HuVHAF1	W	R
人類化C2HuVHAF2	W	S
人類化C2HuVHAF3	L	R
人類化C2HuVHAF4	L	S
人類化生殖系DP-54	W	R

以輕鏈人類化C2HuV_K1、C2HuV_K2、C2HuV_K3、C2HuV_K4及重鏈C2HuV_HAF4及C2HuV_HAF2構築總共8個不同抗體

表8.第二文庫中所用肽之總結

對於結合重要之aa以斜體標記且加底線強調，對結合絕對關鍵之aa以斜體及粗體標記。

p12-20	V	H	H	Q	K	L	V	F	F
A12	A	H	H	Q	K	L	V	F	F
A13	V	A	H	Q	K	L	V	F	F
A14	V	H	A	Q	K	L	V	F	F
A15	V	H	H	A	K	L	V	F	F
A16	V	H	H	Q	A	L	V	F	F
A17	V	H	H	Q	K	A	V	F	F
A18	V	H	H	Q	K	L	A	F	F
A19	V	H	H	Q	K	L	V	A	F
A20	V	H	H	Q	K	L	V	F	A
aa編號	12	13	14	<u>15</u>	16	17	<u>18</u>	19	20

表9.第三文庫中所用肽之總結。

對結合重要之aa以斜體標記且加底線強調且對結合絕對關鍵之aa以斜體及粗體標記。

p13-21		H	H	Q	K	L	V	F	F	A		
p13-21	G21	H	H	Q	K	L	V	F	F	G		
p14-22			H	Q	K	L	V	F	F	A	E	
p14-22	A22		H	Q	K	L	V	F	F	A	A	
p15-23				Q	K	L	V	F	F	A	E	D
p15-23	A23			Q	K	L	V	F	F	A	E	A
aa編號		13	14	<u>15</u>	16	17	<u>18</u>	19	20	21	22	<u>23</u>

SEQ ID NO: 1：C2 HuVH AF 4人類化重鏈可變區(CDR1)之胺基酸序列；

SEQ ID NO: 2：C2 HuVH AF 4人類化重鏈可變區(CDR2)之胺基酸序列；

SEQ ID NO: 3：C2 HuVH AF 4人類化重鏈可變區(CDR3)之胺基酸序列；

SEQ ID NO: 4：C2 HuVK 1人類化輕鏈可變區(CDR1)之胺基酸序列；

SEQ ID NO: 5：C2 HuVK 1人類化輕鏈可變區(CDR2)之胺基

酸序列；

SEQ ID NO: 6 : C2 HuVK 1人類化輕鏈可變區(CDR3)之胺基

酸序列；

SEQ ID NO: 7 : A β 抗原決定基區2之胺基酸序列；

SEQ ID NO: 8 : A β 抗原決定基區1之胺基酸序列；

SEQ ID NO: 9 : 修飾之A β 抗原決定基區2之胺基酸序列；

SEQ ID NO: 10 : 修飾之A β 抗原決定基區域1之胺基酸序列；

SEQ ID NO: 11 : 修飾之完整抗原決定基區之胺基酸序列；

SEQ ID NO: 12 : C2 HuVK 1人類化輕鏈可變區之胺基酸序

列；

SEQ ID NO: 13 : C2人類化輕鏈之胺基酸序列；

SEQ ID NO: 14 : 人類化C2輕鏈恆定區之胺基酸序列；

SEQ ID NO: 15 : C2 HuVH AF 4人類化重鏈可變區之胺基酸序

列；

SEQ ID NO: 16 : C2人類化重鏈之胺基酸序列；

SEQ ID NO: 17 : 修飾之IG γ -4鏈C區之胺基酸序列；

SEQ ID NO: 18 : C2 HuVH AF 4人類化重鏈可變區之CDR2之

核苷酸序列；

SEQ ID NO: 19 : C2 HuVH AF 4人類化重鏈可變區之CDR3之

核苷酸序列；

SEQ ID NO: 20 : C2 HuVK 1人類化輕鏈可變區之CDR1之核苷

酸序列；

SEQ ID NO: 21 : C2 HuVK 1人類化輕鏈可變區之核苷酸序

列；

SEQ ID NO: 22 : C2人類化輕鏈之核苷酸序列；

SEQ ID NO: 23 : C2人類化輕鏈恆定區之核苷酸序列；

SEQ ID NO: 24 : C2 HuVH AF 4人類化重鏈可變區之核苷酸序列；

SEQ ID NO: 25 : C2人類化重鏈之核苷酸序列；

SEQ ID NO: 26 : C2人類化重鏈恆定區之核苷酸序列；

SEQ ID NO: 27 : 小鼠C2輕鏈可變區之胺基酸序列；

SEQ ID NO: 28 : 小鼠C2重鏈可變區之胺基酸序列；

SEQ ID NO: 29 : 小鼠C2輕鏈可變區之核苷酸序列；

SEQ ID NO: 30 : 小鼠C2輕鏈之核苷酸序列；

SEQ ID NO: 31 : 小鼠C2重鏈可變區之核苷酸序列；

SEQ ID NO: 32 : 小鼠C2重鏈之核苷酸序列。

參考文獻列表

Barghorn S, Nimmrich V, Striebinger A, Krantz C, Keller P, Janson B, Bahr M, Schmidt M, Bitner RS, Harlan J, Barlow E, Ebert U, Hillen H (2005) Globular amyloid beta-peptide oligomer-a homogenous and stable neuropathological protein in Alzheimer's disease. J Neurochem 95:834-847。

Blond及Goldberg, 1987, PNAS 1987年3月1日，第84卷|第5號|1147-1151 Cox JPL, Tomlinson IM及Winter G. Eur. J. Immunol. 1994; 24: 827-836. A directory of human germ-line Vk segments reveals a strong bias in their usage。

Hieter PA, Max EE, Seidman JG, Maizel JV Jr, Leder P. Cloned human and mouse kappa immunoglobulin constant and J region genes conserve homology in functional segments. Cell. 1980 Nov;22(1 Pt 1):197-207。

Kabat EA, Wu TT, Perry HM, Gottesman KS, Foeller C. Sequences of proteins of Immunological Interest, US Department of Health and

Human Services, 1991。

Klein WL (2002) Abeta toxicity in Alzheimer's disease: globular soluble polymeric amyloid beta (ADDLs) as new vaccine and drug targets. *Neurochem Int* 41(5):345-352。

Langdon SD, Inaioki M, Kelsoe G.及Tedder TF. *Immunogenetics* 2000; 51: 241-245. Germline sequences of V(H)7183 gene family members in C57BL/6 mice demonstrate natural selection of particular sequences during recent evolution。

Mulligan RC及Berg P. *Science* 1980; 209: 1422-1427. Expression of a bacterial gene in mammalian cells。

Riechmann L, Clark M, Waldmann H, Winter G, *Nature* 1988; 332: 323-327. Reshaping human antibodies for therapy。

Schable KF, Thiebe R, Bensch A, Brensing-Kueppers J, Heim V, Kirschbaum T, Lamm R, Ohnrich M, Pourrajabi S, Roschenthaler F, Schwendinger J, Wichelhaus D, Zocher I及Zachau HG. *Eur. J. Immunol.* 1999; 29: 2082-2086. Characteristics of the immunoglobulin V kappa genes, pseudogenes, relics and orphans in the mouse genome。

Tomlinson IM, Walter G, Marks JD, Llewelyn MB及Winter G. J. *Mol. Biol.* 1992; 227: 776-798. The repertoire of human germline V_H sequences reveals about 50 groups of V_H segments with different hypervariable loops。



發明摘要

※ 申請案號：103133840 分割案

※ 申請日：96年7月13日

※IPC 分類：C07K 16/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

【發明名稱】

抗 β -類澱粉抗體或其抗原結合片段、其用途及使用方法

ANTI-BETA-AMYLOID ANTIBODIES OR ANTIGEN-BINDING
FRAGMENTS THEREOF, THE USE AND METHOD OF USE
THEREOF

【中文】

本發明係關於嵌合及人類化抗體，及用於治療及診斷與類澱粉蛋白相關的類澱粉變性、病症及異常如阿茲海默氏症(Alzheimer's disease)之方法及組合物。

【英文】

The present invention is related to chimeric and humanized antibody and to methods and compositions for the therapeutic and diagnostic use in the treatment of amyloidosis, a group of disorders and abnormalities associated with amyloid protein such as Alzheimer's disease.

申請專利範圍

1. 一種人工雜交抗體或其抗原決定基結合片段，其包含兩對不同之重/輕鏈對及兩個不同之結合位點，其中第一重/輕鏈對特異性結合 β -類澱粉且該第一重/輕鏈對包含：
 - (i) 重鏈可變區(HCVR)，其包含：包含SEQ ID NO:1之胺基酸序列之HCVR 互補決定區1(CDR 1)、包含SEQ ID NO:2之胺基酸序列之HCVR CDR2及包含SEQ ID NO:3之胺基酸序列之HCVR CDR3，其中該HCVR包含與SEQ ID NO:15之胺基酸序列至少96%一致之胺基酸序列，及
 - (ii) 輕鏈可變區(LCVR)，其包含：包含SEQ ID NO:4之胺基酸序列之LCVR CDR1、包含SEQ ID NO:5之胺基酸序列或具有一個胺基酸取代之SEQ ID NO:5之胺基酸序列之LCVR CDR2及包含SEQ ID NO:6之胺基酸序列之LCVR CDR3，其中該LCVR包含與SEQ ID NO:12之胺基酸序列至少98%一致之胺基酸序列。
2. 如請求項1之人工雜交抗體或其抗原決定基結合片段，其中：
 - (a) 該重鏈可變區的構架區中Kabat位置47處之胺基酸為Leu；及/或
 - (b) 該重鏈可變區的構架區中Kabat位置94處之胺基酸為Ser；及/或
 - (c) 該輕鏈可變區的構架區中Kabat位置87處之胺基酸係選自由Phe及Tyr所組成之群；及/或
 - (d) 該輕鏈可變區的構架區中Kabat位置45處之胺基酸係選自由Lys及Gln所組成之群。
3. 如請求項1之人工雜交抗體或其抗原決定基結合片段，其中該第

一重/輕鏈對包含人類IgG4重鏈恆定區，其中鉸鏈區中位置228處之絲胺酸改變為脯胺酸。

4. 如請求項1之人工雜交抗體或其抗原決定基結合片段，其中該抗體為IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同型，或為突變之IgG4同型。
5. 如請求項1之人工雜交抗體或其抗原決定基結合片段，其中該第一重/輕鏈對包含重鏈恆定區，其包含SEQ ID NO:17之胺基酸序列。
6. 如請求項1之人工雜交抗體或其抗原決定基結合片段，其中該第一重/輕鏈對包含輕鏈恆定區，其包含SEQ ID NO:14之胺基酸序列。
7. 如請求項1之人工雜交抗體或其抗原決定基結合片段，其中該第一重/輕鏈對包含重鏈，其包含SEQ ID NO:16之胺基酸序列或在位置439處缺少C端Lys之SEQ ID NO:16。
8. 如請求項1之人工雜交抗體或其抗原決定基結合片段，其中該第一重/輕鏈對包含之輕鏈，其包含SEQ ID NO:13之胺基酸序列，及重鏈，其包含SEQ ID NO:16之胺基酸序列或在位置439處缺少C端Lys之SEQ ID NO:16。
9. 如請求項1之人工雜交抗體或其抗原決定基結合片段，其中該HCVR包含與SEQ ID NO:15之胺基酸序列一致之胺基酸序列，及該LCVR包含與SEQ ID NO:12之胺基酸序列一致之胺基酸序列。
10. 如請求項1至9中任一項之人工雜交抗體或其抗原決定基結合片段，其中該抗原決定基結合片段為Fab片段、Fab'片段、F(ab)2片段、Fab/c片段或Fv片段。
11. 一種如請求項1至10中任一項之抗體或其抗原決定基結合片段之用途，其係用於製備治療或減輕個體一或多種類澱粉變性症之作用之藥物，其中該類澱粉變性症為阿茲海默氏症(AD)、路易

體性癡呆、唐氏綜合症、或具有類澱粉變性(荷蘭類型)之遺傳性腦出血、進行性核上眼神經麻痺症、多發性硬化、庫賈氏病、帕金森氏病、HIV相關性癡呆、ALS(肌萎縮性側索硬化)、成年發病型糖尿病、老年心臟類澱粉變性、內分泌腫瘤或黃斑退化。

12. 如請求項11之用途，其中該類澱粉變性症為阿茲海默氏症(AD)。
13. 如請求項11之用途，其中該類澱粉變性症為繼發性類澱粉變性症或年齡相關類澱粉變性症。
14. 一種如請求項1至10中任一項之抗體或其抗原決定基結合片段之用途，其係用於製備抑制個體中 β -類澱粉單體聚集成高分子聚合型原纖維或長絲之藥物。
15. 一種如請求項1至10中任一項之抗體或其抗原決定基結合片段之用途，其係用於製備解聚個體中預成型之 β -類澱粉纖維之藥物。
16. 如請求項11至15中任一項之用途，其中該個體為哺乳動物或人類。
17. 如請求項11至15中任一項之用途，其中該藥物係用於靜脈內投與。
18. 如請求項16之用途，其中該藥物係用於靜脈內投與。
19. 如請求項11至15中任一項之用途，其中該藥物係用於皮下投與。
20. 如請求項16之用途，其中該藥物係用於皮下投與。
21. 一種診斷患者之類澱粉相關疾病或病症的方法，其包含以下步驟：
 - (a) 使懷疑含有類澱粉蛋白患者之樣品與如請求項1-10中任一項之人工雜交抗體或其抗原決定基結合片段接觸；
 - (b) 使該抗體或其抗原決定基結合片段結合類澱粉蛋白；及

- (c) 偵測結合至該類澱粉蛋白之抗體或其抗原決定基結合片段，
從而結合至該類澱粉蛋白之抗體或其抗原決定基結合片段之
存在或不存在表示樣品中澱粉蛋白之存在或不存在。
- 22. 一種測定獲自患者之組織樣品及/或體液樣品中類澱粉樣斑塊負
擔程度之方法，其包含以下步驟：
 - (a) 以如請求項1-10中任一項之人工雜交抗體或其抗原決定基結
合片段測試組織樣品或體液樣品中類澱粉蛋白之存在；
 - (b) 偵測結合至類澱粉蛋白之抗體或其抗原決定基結合片段的
量；及
 - (c) 計算該組織樣品或體液樣品中之斑塊負擔。
- 23. 如請求項21或22之方法，其中該患者為哺乳動物或人類。

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（1、2）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

（無元件符號說明）

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

（無）