

公告本

99年1月15日修(更)正奉

發明專利說明書

中文說明書替換本(99年1月)

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：095146304

※ 申請日期：95.12.11

C07K16/18
※IPC 分類：A61K 39/395
A61P 25/28

一、發明名稱：(中文/英文)

可變區域抗體之糖化

ANTIBODY GLYCOSYLATION IN THE VARIABLE REGION

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

瑞士商赫孚孟拉羅股份公司

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG

代表人：(中文/英文)

1. 菲杜林 克勞士納
KLAUSNER, FRIDOLIN2. 丹尼斯 史崔柏
STREBEL, DENISE

住居所或營業所地址：(中文/英文)

瑞士貝士勞市格蘭山查街124號

124 GRENZACHERSTRASSE CH-4070 BASEL, SWITZERLAND

國 籍：(中文/英文)

瑞士 SWITZERLAND

三、發明人：(共 9 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 漢魯迪 羅舒爾
LOETSCHER, HANSRUEDI
2. 瓦特 胡伯
HUBER, WALTER
3. 黛安娜 舒鮑爾
SCHUHBAUER, DIANA
4. 卡爾 威爾
WEYER, KARL
5. 曼佛列 布洛豪斯
BROCKHAUS, MANFRED
6. 本德 波爾曼
BOHRMANN, BERND
7. 漢斯 柯爾
KOLL, HANS
8. 安卓 夏伯瑪
SCHAUBMAR, ANDREAS
9. 柯特 蘭恩
LANG, KURT

國 籍：(中文/英文)

1. 瑞士 SWITZERLAND
2. 瑞士 SWITZERLAND
3. 德國 GERMANY
4. 德國 GERMANY
5. 德國 GERMANY
6. 德國 GERMANY
7. 德國 GERMANY
8. 德國 GERMANY
9. 德國 GERMANY

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項 ☐ 第一款或 ☐ 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

☒ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 歐洲專利機構；2005年12月12日；05027090.9

2.

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.

2.

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☒ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☒ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種經純化抗體分子製劑，其特徵在於至少一個抗原結合位點在重鏈可變區域(V_H)中包含糖化天冬醯胺酸(Asn)。更特定言之，本發明提供一種經純化抗體分子，其可特異性識別 β -A4肽/ $A\beta$ 4且在該重鏈可變區域(V_H)中包含糖化。本發明尤其係關於一種在該重鏈可變區域中包含一或兩個具有糖化天冬醯胺酸(Asn)的糖化抗原結合位點之抗體的混合物，亦即在該重鏈可變區域(V_H)中包含糖化Asn之抗體同功異型物的混合物。本發明亦揭示包含經特異性糖化之抗體同功異型物的組合物或抗體製劑。此外，本發明提供此等抗體之醫藥學及診斷用途。例如，該等抗體同功異型物可用於澱粉樣變性病(amyloidogenesis)或澱粉狀蛋白斑塊形成之醫藥學干擾中及/或用於該等病症之診斷中。

【先前技術】

癡呆症所有病例中約70%歸因於阿茲海默氏症(Alzheimer's disease)，其與對於認知而言關鍵的腦區及神經迴路的選擇性損傷有關。阿茲海默氏症之特徵在於尤其在海馬體之錐形神經元中的神經原纖維纏結及各種主要含有澱粉狀蛋白沈積物的密集核及無害暈圈之澱粉狀蛋白斑塊。

細胞外神經炎斑塊含有大量稱為"澱粉狀蛋白 β "、" A - β "、" $A\beta$ 4"、" β -A4"或" $A\beta$ "之主要纖維樣肽；參見Selkoe

(1994), *Ann. Rev. Cell Biol.* 10, 373-403, Koo (1999), *PNAS* 第 96 卷, 第 9989-9990 頁, US 4,666,829 或 Glenner (1984), *BBRC* 12, 1131。此澱粉狀蛋白 β 來源於"阿茲海默氏前驅體蛋白/ β -澱粉狀蛋白前驅體蛋白"(APP)。APP為整合膜糖蛋白(參見Sisodia (1992), *PNAS*第89卷, 第6075頁)且藉由質膜蛋白酶(即 α -分泌酵素)在A β 序列中經內源性蛋白水解分解(參見Sisodia (1992), 上述引文)。此外, 尤其 β -分泌酵素及 γ -分泌酵素活性之其他分泌酵素活性導致包含39個胺基酸(A β 39)、40個胺基酸(A β 40)、42個胺基酸(A β 42)或43個胺基酸(A β 43)的澱粉狀蛋白- β (A β)之細胞外釋放; 參見Sinha (1999), *PNAS* 96, 11094-1053; Price (1998), *Science* 282, 1078至1083; WO 00/72880或Hardy (1997), *TINS* 20, 154。

應注意, A β 具有若干天然發生之形式, 藉此人類形式則稱為上述A β 39、A β 40、A β 41、A β 42及A β 43。最主要形式A β 42具有以下胺基酸序列(自N-末端起始): DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGGVIA(SEQ ID NO: 3)。在A β 41、A β 40、A β 39中分別缺失C-末端胺基酸A、IA及VIA。在A β 43形式中, 在上述序列(SEQ ID NO: 3)之C-末端包含額外之蘇胺酸殘基。

使A β 40原纖維成核所需之時間顯示為顯著長於使A β 42原纖維成核之時間; 參見Koo, 上述引文及Harper (1997), *Ann. Rev. Biochem.* 66, 385-407。如Wagner (1999), *J. Clin. Invest.* 104, 1239-1332中所評論, 發現A β 42與神經炎斑塊

更頻繁相關且認為其在活體外更具原纖維生成性。亦暗示A β 42在有序非結晶A β 肽之成核依賴性聚合中充當"晶種"；Jarrett (1993), Cell 93, 1055-1058。

不僅自阿茲海默氏病理學而且自罹患其他神經及/或神經退化性失調症的受檢者中瞭解修飾APP加工及/或含有蛋白質沈積物之細胞外斑塊的產生。此等失調症尤其包含：唐氏症候群、荷蘭型遺傳性腦出血併發澱粉樣變性病、帕金森氏症(Parkinson's disease)、ALS(肌肉萎縮性側索硬化)、克雅氏病(Creutzfeldt Jacob disease)、HIV-相關癡呆症及運動神經病。

迄今為止，僅已描述澱粉狀蛋白相關疾病之有限醫藥干擾流程。舉例而言，已論述例如加蘭他敏(galantamine)、雷斯替明(rivastigmine)或多奈哌齊(donepezil)之膽鹼酯酶抑制劑僅對於具有輕度至中度疾病的阿茲海默氏症患者有益。然而，由於此等藥物之膽鹼能作用，亦已報導不利作用。雖然此等膽鹼能增強性治療的確產生一些症狀益處，但對於大部分受治療患者而言，治療反應並不令人滿意。據估計，僅在約5%受治療患者中發生顯著認知性改良且很少有證據證明治療顯著改變此進行性疾病的過程。因此，對更有效治療且尤其可停止或延遲該疾病進程之彼等治療仍存在巨大臨床需要。

同樣，最近亦已使用例如美金剛胺(memantine)之NMDA-受體拮抗劑。然而，亦已報導由於藥理學活性之不利事件。此外，僅認為使用此等NMDA-受體拮抗劑之該治

療為症狀性方法而並非改變疾病之方法。

亦已提議用於治療澱粉狀蛋白相關失調症之免疫調節方法。WO 99/27944揭示包含A β 肽之部分及載體分子之共軛物，藉此該載體分子應增強免疫應答。在WO 00/72880中提及另一活性免疫方法，其中亦使用A β 片段以誘導免疫應答。

亦已在WO 99/27944或WO 01/62801中提議使用一般抗A β 抗體之被動免疫方法，且在WO 02/46237、WO 02/088306及WO 02/088307中已描述針對A β 部分之特異性人化抗體。WO 00/77178描述結合 β -澱粉狀蛋白在水解期間採用之過渡狀態的抗體。WO 03/070760揭示識別A β 肽上兩個不連續胺基酸序列之抗體分子。

WO 03/016466描述一種人化抗A β 抗體，其經修飾以避免在其重鏈中任何可能之糖化，因為Wallick (1988) J. Exp. Med. 168, 1099-1109中已假設抗體可變區域中之糖化。

本發明潛在之技術問題為在澱粉狀蛋白失調症之醫藥管理中提供有效方式及方法，尤其為用於在需要(相應)醫藥干擾之患者體內減少有害澱粉狀蛋白斑塊之方式及方法。

【發明內容】

在一第一態樣中，本發明提供一種經純化抗體分子，其特徵在於在重鏈可變區域(V_H)中至少一個抗原結合位點包含糖化天冬醯胺酸(Asn)。如本文所提供之本發明經純化抗體或抗體組合物尤其係針對A β 及/或A β 片段。如本文所提供之經純化抗體分子且尤其本發明之抗體組合物或抗體

製劑適用於製備用於治療、改善及用於預防與澱粉樣變性病及/或澱粉狀蛋白斑塊形成相關之疾病的醫藥或診斷組合物。該疾病之一實例為阿茲海默氏症。

在本發明上下文中，令人驚奇地發現，其中在重鏈可變區域中至少一個抗原結合位點包含N-連接之糖化的經純化抗體分子尤其適用於(例如)減少澱粉狀蛋白斑塊。此外，在本發明上下文中已發現，如極有效之斑塊結合所說明，如本文所提供之糖化抗體或抗體組合物在活體內跨越血腦障壁/血腦邊界中尤其適用且有效。

此與先前技術之教示完全相反。WO 03/016466揭示經特异性工程化以在重鏈中缺少N-糖化位點之抗體，且其教示在可變區域框架中之糖化對抗體結合親和力具有消極作用。在先前技術中教示，處於重鏈可變CDR2區域之去糖化形式的所述抗A β 抗體在活體外對於合成及純化之A β 肽具有顯著較高之親和力。

因此，本發明係關於一種改良之純化抗體分子或一種抗體製劑，尤其係關於一種針對A β 4/A β 肽(澱粉狀蛋白 β)且活體內高度有效之抗體分子製劑。本發明抗體分子/抗體製劑之改良在於提供在其重鏈中至少一個可變區域(例如，重鏈之該可變區域的CDR2區域)中包含N-糖化之經純化抗體分子。如以上所提及，此與例如WO 03/016466之先前技術相反，WO 03/016466教示在針對(例如)A β 之抗體中須避免該N-糖化。

本發明抗體分子之實例為免疫球蛋白分子，例如IgG分

子。IgG之特徵在於包含兩個重鏈及兩個輕鏈(例如圖14中所說明)且此等分子包含兩個抗原結合位點。該等抗原結合位點包含由部分重鏈(V_H)及部分輕鏈(V_L)組成之"可變區域"。該等抗原結合位點係藉由拼接 V_H 及 V_L 結構域而形成。關於抗體分子或免疫球蛋白分子之一般資訊亦參見通用教科書,例如Abbas "Cellular and Molecular Immunology", W.B. Saunders Company (2003)。

在一態樣中,例如在提供如本發明所表徵之免疫球蛋白分子中,描述一種抗體,其中在對應重鏈可變區域(V_H)中一個抗原結合位點包含糖化天冬醯胺酸(Asn)。該抗體在下文中稱為"單糖化"抗體;亦參見圖14。

在另一態樣中,本發明提供一種免疫球蛋白分子,其中在對應重鏈可變區域(V_H)中兩個抗原結合位點包含糖化天冬醯胺酸(Asn)。該抗體在下文中稱為"雙糖化抗體";參見圖14。

其中在重鏈可變區域(V_H)中無抗原結合位點包含糖化天冬醯胺酸(Asn)之免疫球蛋白在下文中稱為"非糖化抗體"。

單糖化抗體、雙糖化抗體及非糖化抗體可包含一致胺基酸序列或不同胺基酸序列。因此,術語"抗體"包含抗體分子,尤其例如免疫球蛋白之重組產生的抗體分子。然而,如下文所論述,術語"抗體分子"亦包含已知同功異型物及免疫球蛋白之修飾,例如單鏈抗體或單鏈Fv片段(scAB/scFv)或雙特異性抗體構造,該等同功異型物及修飾特徵在於包含至少一個如本文所定義之糖化 V_H 區域。該

同功異型物或修飾之特定實例可為 V_H-V_L 或 V_L-V_H 格式之sc(單鏈)抗體，其中該 V_H 包含本文所述之糖化。亦涵蓋(例如) $V_H-V_L-V_H-V_L$ 、 $V_L-V_H-V_H-V_L$ 、 $V_H-V_L-V_L-V_H$ 格式之雙特异性scFv，其在CDR-2區域中包含本文所述之糖化。

在本發明上下文中，大寫字母之術語"抗體"用於提供更佳的清晰性。然而，在本申請案上下文中亦使用以小寫字母使用之術語"抗體"。"抗體"可交替使用。

上文中單糖化抗體及雙糖化抗體稱為"糖化抗體同功異型物"。特徵在於在重鏈可變區域(V_H)中至少一個抗原結合位點包含糖化天冬醯胺酸(Asn)之經純化抗體分子為一種無選自雙糖化抗體及非糖化抗體之同功異型物或與其在極低程度上相關之單糖化抗體，亦即"經純化單糖化抗體"。在本發明上下文中，雙糖化抗體無選自單糖化抗體及非糖化抗體之同功異型物或與其在極低程度上相關，亦即"經純化雙糖化抗體"。

術語"無或在極低程度上"表示完全不存在各種其他(糖化)同功異型物或以至多10%(例如至多5%、例如至多4%、例如至多3%、例如至多2%、例如至多1%、例如至多0.5%、例如至多0.3%、例如至多0.2%)之濃度存在另一種(糖化)同功異型物。下文及隨附實例中提供此方面之其他資訊。

在本發明上下文中，術語"單糖化抗體"係關於在個別抗體分子(例如，免疫球蛋白，例如IgG，例如IgG1)之一個(V_H)區域中包含N-糖化之抗體分子。舉例而言，該"單糖化形式"在重鏈的一個可變區域上(例如，如下文所定義之

天冬醯胺酸 "Asn 52" 的位置) 包含糖化。如本文所說明，此 "單糖化 IgG1-形式或單糖化同功異型物" 亦可在 Fc-部分的相當保守之糖化位點包含糖化，例如非可變 Fc-部分的天冬醯胺酸 Asn 306。

在本發明含義中之術語 "雙糖化抗體" 包含如本文所定義之在重鏈 (V_H) 區域的兩個可變區域上之糖化。再次，如下文所詳述且如隨附實例中所例示，此 "雙糖化形式" 在兩個重鏈之可變區域上、尤其天冬醯胺酸 Asn 52 位置上包含糖化。如本文所說明，此 "雙糖化 IgG1-形式或雙糖化同功異型物" 亦可在非可變/恆定 Fc-部分的相當保守之糖化位點上 (尤其在所例示之免疫球蛋白位置 306 上) 包含糖化。附圖 14 說明對應的抗體分子。

在本發明上下文中認為在可變區域 (例如，在重鏈兩個可變區域 (兩個 (V_H)-區域)) 中缺乏該轉譯後修飾的抗體為 "非糖化形式"，其在重鏈可變區域中不包含糖化。但是，此 "非糖化形式" 可仍在抗體恆定區域 (C-區域) 中包含糖化，例如且最通常在 Fc-部分之相當保守的糖化位點，尤其如本文所定義之非可變/恆定 Fc-部分中之天冬醯胺酸 (Asn) 306，亦參見 SEQ ID NO: 6。

在重鏈可變區域 (V_H) 中之糖化天冬醯胺酸 (Asn) 可處於互補判定區 2 (CDR2 區域) 中。重鏈可變區域 (V_H) 中之該糖化天冬醯胺酸 (Asn) 可處於如下文所定義之可變區域 52 位置，且如 SEQ ID No. 2 中所示 (或處於亦包含如本文所揭示之抗體重鏈的 Fc-部分之 SEQ ID NO: 6 之位置 52)。

抗體同功異型物亦可在抗體分子的恆定/非可變部分(例如在IgG的Fc-部分，例如在IgG1中的Fc-部分)中包含其他糖化。在Fc-部分中之該糖化係關於相當保守之糖化，其特徵在於位於重鏈Asn306位置，例如根據以下序列：

QVELVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAINA
SGTRTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGKGNTHKP
YGYVRYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP
SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 6)。

亦在下文中描述此序列且CDR、CH-區域、重鏈以及兩個N-糖化位點(N52及N306)指示為：

QVELVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSSYAMS WVRQAPGKGLEWVS
AINASGTRTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
GKGNTHKPYGYVRYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL
GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM
ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 6)。

框架:CDR1、2、3

下劃線: CH1

斜體: 鉸鏈

雙下劃線: CH2

虛下劃線: CH3

粗體 N: N-連接糖化位點

本發明抗體之 IgG-Fc 區域可為包含鏈間二硫鍵結鉸鏈區、糖化 C_H2 結構域、於 C_H2 之天冬醯胺酸 306 (Asn-306) 及非共價配對 C_H3 結構域具有 N-連接之寡糖的同二聚體。於 Asn-306 之糖化的寡糖為複雜雙觸角型且可包含添加有各種外臂糖之核心七糖結構。

寡糖影響或決定 Fc 結構及功能 (Jefferis (1998) Immunol Rev. 163, 50-76)。已討論效應功能、編號特定特異性 IgG-Fc/效應配位基相互作用 (Jefferis (2002) Immunol Lett. 82(1-2), 57-65 及 Krapp (2003) J Mol Biol. 325(5), 979-89)。此保守之 Fc-位置 Asn-306 對應於 Kabat 系統中之 "Asn-297" (Kabat (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interests, 第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda MD.)。

所例示之重鏈可由以下序列編碼：

```
caggtggaattggtggaagcggcgggcgccctggtgcaaccgggaggcagcctgcgtctgagctgcgcggcctccgattt
accttagcagctatgcgatgagctgggtgcgccaagcccctgggaagggtctcgagtgggtgagcgctattaatgcttctgt
actcgctactattatgctgattctgttaagggtcggtttaccatttcacgtgataattcgaaaaacaccctgtatctgcaaatgaacag
cctgcgtgcggaagatacggccgtgtattattgcgcgcgtgtaagggttaatactcataagccttatggttatgttcgttatttgat
```

gtttggggccaaggcaccctggtgacggttagctcagcctccaccaagggtccatcggtcttccccctggcaccctcctcaa
gagcacctctgggggcacagcgccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactc
aggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtctcaggactctactccctcagcagcgtggtgacc
gtgccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaagggtggacaagaaa
gttgagcccagatatctgctgatatctgcaatcttggacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaactcctgg
ggggaccgtcagttcttcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtggtg
gtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaag
ccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgggtggtcagcgtcctaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaa
ggagtacaagtgaagggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagcccc
gagaaccacaggtgtacacctgccccatcccggtgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaag
gcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgc
tgactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgc
tccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatga (SEQ ID NO:
5)。

該重鏈亦可包含(尤其在其重組產生期間)例如"前導序列"之額外序列。對應實例由以下序列編碼：

atgaaacacctgtggttcttctcctgctggtggcagctcccagatgggtcctgtcc (接 著)
caggtggaattggtggaaagcggcggcggcctggtgcaaccgggcggcagcctgcgtctgagctgcgcggcctccgatt
accttagcagctatgcgatgagctgggtgcgccaagccctgggaagggtctcgagtgggtgagcgtattaatgcttctggt
actcgtacttattatgctgattctgtaagggtcgtttaccatttcacgtgataattcgaaaaacaccctgtatctgcaatgaacag
cctgcgtgcggaagatacggcctgtattattgcgcgcgtgtaagggtataactcataagccttatggttatgttcgttatttgat
gtttggggccaaggcaccctggtgacggttagctcagcctccaccaagggtccatcggtcttccccctggcaccctcctcaa
gagcacctctgggggcacagcgccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactc
aggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtctcaggactctactccctcagcagcgtggtgacc

gtgccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaa
gttgagcccaaactctgtgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaactctggggggaccgtcagctctctc
ttcccccaaaaccaaggacacctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtggtggacgtgagccacgaag
acctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtaca
acagcacgtaccgggtggtcagcgtcctcaccgtctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctc
caacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacc
tgcccccatcccggtgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatgc
cgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttct
cctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctg
cacaaccactacacgcagaagagcctctcctgtctccgggtaaatga (SEQ ID NO: 25) 。

對應胺基酸序列將為：

MKHLWFFLLLVAAPRWVLS (接 著)
QVELVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAINA
SGTRTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGKGNTHKP
YGYVRYFDVWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP
SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 26) 。

以上序列亦包含"信號肽"，該信號肽由宿主信號肽酶在
宿主細胞(例如CHO細胞)中產生本發明抗體分子期間的分
泌路徑期間經蛋白水解分解。

或者，該重鏈可由如以下序列所例示之最佳用於重組產生的核酸序列來編碼：

```

1  atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt taagaggtga
51  ttcatggaga aatagagaga ctgagtgatga gtgaacatga gtgagaaaaa
101 ctggatttgt gtggcatttt ctgataacgg tgccttctg tttgcaggtg
151 tccagtgt

```

接著

```

ca ggtggagctg gtggagtctg ggggaggcct ggtccagcct
201 ggggggtccc tgagactctc ctgtgcagcg tctggattca ctttcagtag
251 ctatgccatg agctgggtcc gccaggctcc aggcaagggg ctcgagtggg
301 tgtccgccat aaacgccagc ggtaccgcga cctactatgc agactccgtg
351 aagggccgat tcaccatctc cagagacaat tccaagaaca cgctgtatct
401 gcaaatgaac agcctgagag ccgaggacac ggctgtgtat tactgtgcga
451 gaggcaaggg gaacacccac aagccctacg gctacgtacg ctactttgac
501 gtgtggggcc aaggaaccct ggtcacgcgc tcctcaggtg agtcctcaca
551 acctctctcc tgcggccgca gcttgaagtc tgaggcagaa tcttgtccag
601 ggtctatcgg actcttgtga gaattagggg ctgacagttg atggtgacaa
651 tttcagggtc agtgactgtc tggtttctct gaggtgagac tggaatatag
701 gtcaccttga agactaaaga ggggtccagg ggcttttctg cacaggcagg
751 gaacagaatg tggaacaatg acttgaatgg ttgattcttg tgtgacacca
801 agaattggca taatgtctga gttgcccaag ggtgatctta gctagactct
851 ggggtttttg tcgggtacag aggaaaaacc cactattgtg attactatgc
901 tatggactac tggggccaag gaacctcagt caccgtctcc tcaggtaaga
951 atggcctctc caggtcttta tttttaacct ttgttatgga gttttctgag
1001 cattgcagac taatcttgga tatttgccct gagggagccg gctgagagaa
1051 gttgggaaat aaatctgtct agggatctca gagcctttag gacagattat
1101 ctccacatct ttgaaaaact aagaatctgt gtgatgggtg ttggtggagtc
1151 cctggatgat gggataggga ctttgagggc tcatttgagg gagatgctaa
1201 aacaatccta tggctggagg gatagttggg gctgtagttg gagattttca
1251 gtttttagaa tgaagtatta gctgcaatac ttcaaggacc acctctgtga

```

1301 caaccatttt atacagtatc caggcatagg gacaaaaagt ggagtggggc
 1351 actttcttta gatttgtgag gaatgttcca cactagattg tttaaaactt
 1401 catttggttg aaggagctgt cttagtgatt gagtcaaggg agaaaggcat
 1451 ctagcctcgg tctcaaaagg gtagttgctg tctagagagg tctggtggag
 1501 cctgcaaaaag tccagctttc aaaggaacac agaagtatgt gtatggaata
 1551 ttagaagatg ttgcttttac tcttaagttg gttcctagga aaaatagtta
 1601 aatactgtga ctttaaaatg tgagaggggtt ttcaagtact cattttttta
 1651 aatgtccaaa atttttgtca atcaatttga ggtcttgttt gtgtagaact
 1701 gacattactt aaagtttaac cgaggaatgg gagtgaggct ctctcatacc
 1751 ctattcagaa ctgactttta acaataataa attagttta aaatattttt
 1801 aaatgaattg agcaatgttg agttgagtca agatggccga tcagaaccgg
 1851 aacacctgca gcagctggca ggaagcaggt catgtggcaa ggctatttg
 1901 ggaagggaaa ataaaaccac taggtaaact tgtagctgtg gtttgaagaa
 1951 gtggttttga aacactctgt ccagccccac caaaccgaaa gtccaggctg
 2001 agcaaaacac cacctgggta atttgcattt ctaaaataag ttgaggattc
 2051 agccgaaaact ggagaggtcc tcttttaact tattgagttc aaccttttaa
 2101 ttttagcttg agtagttcta gtttcccaa acttaagttt atcgacttct
 2151 aaaatgtatt tagaattcga gctcggta ca gctttctggg gcaggccagg
 2201 cctgaccttg gctttggggc agggaggggg ctaagggtgag gcagggtggc
 2251 ccagcaggtg cacacccaat gcccatgagc ccagacactg gacgctgaac
 2301 ctgcggaaca gttaagaacc caggggcctc tgcgcctggg ccagctctg
 2351 tcccacaccg cggtcacatg gcaccacctc tcttgagcc tccaccaagg
 2401 gcccatcggc cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc
 2451 acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac
 2501 ggtgtcgtgg aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttcccg
 2551 ctgtcctaca gtcctcagga ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg
 2601 ccctccagca gcttgggcac ccagacctac atctgcaacg tgaatcacia
 2651 gccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tggtagaggg ccagcacagg
 2701 gagggagggg gtctgctgga agccaggctc agcgtcctg cctggacgca
 2751 tcccgctat gcagccccag tccagggcag caaggcaggc cccgtctgcc
 2801 tcttcacccg gagcctctgc ccgccccact catgctcagg gagagggctc
 2851 tctggctttt tcccaggctc tgggcaggca caggctaggt gccctaacc

```

2901  cagggccctgc acacaaaggg gcaggtgctg ggctcagacc tgccaagagc
2951  catatccggg aggaccctgc ccctgaccta agcccacccc aaaggccaaa
3001  ctctccactc cctcagctcg gacaccttct ctctctccag attccagtaa
3051  ctcccaatct tctctctgca gagcccaaatt cttgtgacaa aactcacaca
3101  tgcccaccgt gcccaggtaa gccagcccag gcctcgccct ccagctcaag
3151  gcgggacagg tgccctagag tagcctgcat ccagggacag gccccagccg
3201  ggtgctgaca cgtccacctc catctcttcc tcagcacctg aactcctggg
3251  gggaccgtca gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga
3301  tctcccggac ccctgaggtc acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa
3351  gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa
3401  tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg
3451  tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac
3501  aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca gcccccatcg agaaaaccat
3551  ctccaaagcc aaaggtggga cccgtggggg gcgagggcca catggacaga
3601  ggccggctcg gcccacctc tgccctgaga gtgaccgtg taccaacctc
3651  tgtccctaca gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat
3701  cccgggatga gctgaccaag aaccagggtc gcctgacctg cctggtcaaa
3751  ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc
3801  ggagaacaac tacaagacca cgctcccggt gctggactcc gacggctcct
3851  tcttctctta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg
3901  aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac
3951  gcagaagagc ctctccctgt ccccgggcaa atga (SEQ ID NO: 23)。

```

如上文以 SEQ ID NO: 23 所示之"替代"蛋白序列包含與第一替代序列相同之編碼序列，然而，在例如略不同之染色體組組織中，例如額外之內含子及略不同之"前導序列"/"信號序列"。如上文所示，該"前導序列"亦可包含(額外)内含子。熟習此項技術者可藉由習知方法容易地推論在本文所示序列中對應之外顯子/内含子結構。

本文所述之例示抗體亦可包含一輕鏈，該輕鏈可包含或

具有以下胺基酸序列：

DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRA
TGVPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFATYYCLQIYNMPITFGQGTKVEIKRTVAA
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
NO: 8),

其可由以下核酸序列編碼：

gatatcgtgctgaccagagcccgccgacccctgagcctgtctccggcggaacgtgcgaccctgagctgcagagcgagcca
gagcgtgagcagcagctatctggcgtggtaccagcagaaaccagggtcaagcaccgcgtctattaatttatggcgcgagcagc
cgtgcaactgggggtcccgccgctgttagcggctctggatccggcacggattttaccctgaccattagcagcctggaacctgaa
gactttgcgacttattatgccttcagattataatatgcctattacctttggccagggtacgaaagttgaaattaaacgtacgggtg
ctgcaccatctgtcttcattctcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgtgcctgctgaataacttctat
cccagagaggccaaagtacagtggaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtggtcacagagcagga
cagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcct
gcgaagtcacccatcagggcctgagctcgccgtcacaagagcttaacaggggagagtgttag (SEQ ID NO:
7)。

本文所述例示抗體之"輕鏈"亦可包含一"前導序列"，其
尤其適用於技術生產。對應序列可為(或(例如)在載體系統
中可包含)以下序列：

atggtgtgcagaccaggtcttcatttctctgttgctctggatctctgggtgcctacggg (接 著)
gatatcgtgctgaccagagcccgccgacccctgagcctgtctccggcggaacgtgcgaccctgagctgcagagcgagcca
gagcgtgagcagcagctatctggcgtggtaccagcagaaaccagggtcaagcaccgcgtctattaatttatggcgcgagcagc
cgtgcaactgggggtcccgccgctgttagcggctctggatccggcacggattttaccctgaccattagcagcctggaacctgaa
gactttgcgacttattatgccttcagattataatatgcctattacctttggccagggtacgaaagttgaaattaaacgtacgggtg

ctgcaccatctgtcttcattctcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttggtgcctgctgaataacttctat
cccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcagga
cagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcct
gcgaagtcacccatcagggcctgagctcgccgctcacaagagcttcaacaggggagagtgttag (SEQ ID NO:
27)。

該序列編碼以下胺基酸序列：

MVLQTQVFISLLLWISGAYG (接 著)
DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRA
TGVPARFSGSGSGTDFTLTISILEPEDFATYYCLQIYNMPITFGGGTKVEIKRTVAA
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ
ID NO: 28)。

或者，該輕鏈亦可由如以下序列所例示之最佳用於重組
產生之核酸序列來編碼：

1 atggacatga gggtcctcgc tcagctcctg gggctcctgc tgctctgttt
51 cccaggtaag gatggagaac actagcagtt tactcagccc aggggtgctca
101 gtactgcttt actattcagg gaaattctct tacaacatga ttaattgtgt
151 ggacatttgt ttttatgttt ccaatctcag gcgccagatg t

接著

gatatcgtg
201 ttgacgcagt ctccagccac cctgtctttg tctccagggg aaagagccac
251 cctctcctgc cgggccagtc agagtgttag cagcagctac ttagcctggg
301 accagcagaa acctggccag gcgccaggc tcctcatcta tggcgcatcc
351 agcagggcca ctggcgtgcc agccaggttc agtggcagtg ggtctgggac
401 agacttcact ctcaccatca gcagcctgga gcctgaagat ttcgcgacct
451 attactgtct gcagatttac aacatgccta tcacgttcgg ccaagggacc



501 aaggtgga aa tcaaacgtga gtagaattta aactttgcgg ccgcctagac
 551 gtttaagtgg gagatttgga ggggatgagg aatgaaggaa cttcaggata
 601 gaaaagggct gaagtcaagt tcagctccta aaatggatgt gggagcaaac
 651 tttgaagata aactgaatga cccagaggat gaaacagcgc agatcaaaga
 701 ggggcctgga gctctgagaa gagaaggaga ctcatccgtg ttgagtttcc
 751 acaagtactg tcttgagttt tgcaataaaa gtgggtagc agagttgagt
 801 gagccgtagg ctgagttctc tcttttgtct cctaagtttt tatgactaca
 851 aaaatcagta gtatgtcctg aaataatcat taagctgttt gaaagtatga
 901 ctgcttgcca tgtagatacc atgtcttgct gaatgatcag aagaggtgtg
 951 actcttattc taaaatttgt cacaaaatgt caaatgaga gactctgtag
 1001 gaacgagtcc ttgacagaca gctcaagggg ttttttccct ttgtctcatt
 1051 tctacatgaa agtaaatttg aaatgatctt ttttattata agagtagaaa
 1101 tacagttggg tttgaactat atgttttaat ggccacgggt ttgtaagaca
 1151 tttggtcctt tgttttccca gttattactc gattgtaatt ttatatcgcc
 1201 agcaatggac tgaaacgggc cgcaacctct tctttacaac tgggtgacct
 1251 cgcggctgtg ccagccattt ggcgttcacc ctgccgctaa gggccatgtg
 1301 aacccccgcg gtagcatccc ttgctccgcg tggaccactt tcctgaggca
 1351 cagtgatagg aacagagcca ctaatctgaa gagaacagag atgtgacaga
 1401 ctacactaat gtgagaaaaa caaggaaagg gtgacttatt ggagatttca
 1451 gaaataaaat gcatttatta ttatattccc ttattttaat tttctattag
 1501 ggaattagaa agggcataaa ctgctttatc cagtgttata ttaaaagctt
 1551 aatgtatata atcttttaga ggtaaaatct acagccagca aaagtcatgg
 1601 taaatattct ttgactgaac tctactaaa ctctctaaa ttatatgtca
 1651 tattaactgg ttaaattaat ataaatttgt gacatgacct taactgggta
 1701 ggtaggatat ttttcttcat gcaaaaatat gactaataat aatttagcac
 1751 aaaaatattt cccaatactt taattctgtg atagaaaaat gtttaactca
 1801 gctactataa tcccataatt ttgaaaacta tttattagct tttgtgtttg
 1851 acccttcctt agccaaaggc aactatttaa ggacccttta aaactcttga
 1901 aactacttta gagtcattaa gttatttaac cacttttaac tactttaaaa
 1951 tgatgtcaat tcccttttaa ctattaattt attttaaggg gggaaaggct
 2001 gtcataaatt ctattgtttt tcttggtaaa gaactctcag ttttcgtttt
 2051 tactacctct gtcacccaag agttggcatc tcaacagagg ggactttccg

```

2101 agaggccatc tggcagttgc ttaagatcag aagtgaagtc tgccagttcc
2151 tcccaggcag gtggcccaga ttacagttga cctgttctgg tgtggctaaa
2201 aattgtccca tgtggttaca aaccattaga ccagggctctg atgaattgct
2251 cagaatatatt ctggacaccc aaatacagac cctggcttaa ggccctgtcc
2301 atacagtagg tttagcttgg ctacacccaaa ggaagccata cagaggctaa
2351 tatcagagta ttcttggaag agacaggaga aaatgaaagc cagtttctgc
2401 tcttacctta tgtgcttgtg ttcagactcc caaacatcag gagtgtcaga
2451 taaactggtc tgaatctctg tctgaagcat ggaactgaaa agaattagtg
2501 ttcagggaag aaaggcaata gaaggaagcc tgagaatacg gatcaattct
2551 aaactctgag ggggtcggat gacgtggcca ttctttgcct aaagcattga
2601 gtttactgca aggtcagaaa agcatgcaaa gccctcagaa tggctgcaaa
2651 gagctccaac aaaacaattt agaactttat taaggaatag ggggaagcta
2701 ggaagaaact caaaacatca agattttaaa tacgcttctt ggtctccttg
2751 ctataattat ctgggataag catgctgttt tctgtctgtc cctaacatgc
2801 cctgtgatta tccgcaaaca acacacccaa gggcagaact ttgttactta
2851 aacaccatcc tgtttgcttc tttcctcagg aactgtggct gcaccatctg
2901 tcttcactct cccgccatct gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct
2951 gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc agagaggcca aagtacagtg
3001 gaaggtggat aacgccctcc aatcggttaa ctcccaggag agtgtcacag
3051 agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg
3101 agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca
3151 tcagggcctg agctcgcccg tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt
3201 ag (SEQ ID NO: 24)。

```

對於例示輕鏈之以上"序列"亦具有略微不同之染色體組結構。此"替代序列"包含不同及/或額外之內含子。因此，此處所應用之描述"重鏈"的實施例已進行必要修正。

在本發明上下文中，術語"抗體分子"係關於完全免疫球蛋白分子(例如 IgMs、IgD、IgE、IgA 或 IgG，例如 IgG1、IgG2、IgG2b、IgG3 或 IgG4)以及係關於該等免疫球蛋白分子的部分(例如 Fab-片段、Fab'-片段、F(ab)2-片段、嵌合

F(ab)₂或嵌合Fab'片段、嵌合Fab-片段或經分離V_H-或CDR-區域(該經分離之V_H-或CDR-區域在對應"框架"中(例如)經整合或經工程化))。術語"抗體分子"亦包含雙功能抗體及包含作為連接至至少一個抗原結合部分/肽之媒劑的抗體Fc結構域之分子，例如WO 00/24782中所述之肽體(peptibody)。因此，且在本發明上下文中，術語"重鏈可變區域(V_H)"並不限於完全免疫球蛋白中之可變區域，而亦係關於該重鏈可變區域(V_H)的對應部分，例如單獨或與CDR1、2及/或3或可變區域之對應"框架"組合之CDR。因此，本發明之抗體分子亦可為包含作為抗原結合位點之CDR或給定糖化重鏈可變區域(V_H)之至少一個CDR的抗體構造。本發明抗體構造中之該重鏈可變區域(V_H)的該對應部分如本文所定義經糖化，例如在抗原結合位點包含糖化天冬醯胺酸(Asn)。重鏈可變區域(V_H)之該"經分離部分"的實例為本文所例示之SEQ ID NO: 12中所包含之CDR2區域(或由如SEQ ID NO: 11中所示之核酸序列編碼)。

此外，術語"抗體分子"係關於經修飾及/或經改變之抗體分子，例如嵌合、人化或完全人化抗體。

該"完全人化抗體"分子亦經表徵且描述為"完全人類"抗體。所有此等抗體可藉由此項技術中已知之方法而產生。舉例而言，藉由噬菌體呈現技術，可由於使用活體外熟化(其為完全人類免疫球蛋白γ亞類-1框架(IgG1)之用途)而產生重組抗體分子，如由Knappik (2000) J Mol Biol. 296(1), 57-86及Rauchenberger (2003) J Biol Chem. 278(40), 38194-

205所述。

如隨附實例中所證明，術語抗體係關於(例如)IgG分子且係關於(例如)IgG1。該術語亦係關於經修飾或經改變之單株或多株抗體，以及係關於經重組或合成而產生/合成之抗體。該術語亦係關於完整抗體以及係關於其抗體片段/部分，例如經分離之輕鏈及重鏈、Fab、Fab/c、Fv、Fab'、F(ab')₂。術語"抗體分子"亦包含抗體衍生物、雙功能抗體及例如單鏈Fv(scFv)或抗體融合蛋白之抗體構造。亦涵蓋包含糖化V_H結構域(例如，如本文所定義之糖化V_H-CDR)之催化性及/或蛋白水解性抗體。術語"抗體分子"亦係關於重組產生之抗體分子/抗體構造，其除一種特異性(例如，針對A β /A β)以外可包含另一或進一步之特異性。該等構造可包含(但不限於)"雙特異性"或"三特異性"構造。關於本發明術語"抗體分子"之其他細節在下文中提供。

如上文所指出，亦涵蓋在至少一個抗原結合位點(例如，在本文所定義之一/該重鏈的至少一個可變區域)中包含本文所定義之糖化且經糖化之單鏈抗體、嵌合抗體、CDR接枝抗體、二價抗體構造、抗體融合蛋白、交叉選殖抗體或合成抗體。當(例如)產生單鏈抗體時，本文所定義之"重鏈可變區域"並不限於重鏈本身，而意謂亦係關於來源於完全抗體重鏈(例如完全免疫球蛋白，例如IgG)之對應部分。該等部分亦可為單獨或與其對應框架一起之對應CDR。此外，在本發明上下文中，亦涵蓋免疫球蛋白基因

之遺傳變異體。例如，免疫球蛋白重G鏈亞類1(IgG1)之遺傳變異體可在CH1結構域中包含G1m(17)或G1m(3)異型基因標記，或在CH3結構域中包含G1m(1)或G1m(非-1)異型基因標記。此處較佳使用Gm(17)(z)及Gm(1)(a)異型之IgG1。本發明之抗體分子亦包含經修飾或突變之抗體，例如具有增強或衰減之Fc-受體結合或補體活化之突變IgG。在一實施例中，根據本發明所提供之抗體為完全人化抗體或"完全人類"抗體。

因此，本發明之抗體亦可包含交叉選殖之抗體，亦即包含來自如本文所述之一或多個親本抗體或親和力最佳化抗體的不同抗體區域(例如，CDR-區域)之抗體。此等交叉選殖之抗體可為在例如IgG-框架(例如(人類)IgG1-、IgG2a或IgG2b-框架)之若干不同框架中的抗體。舉例而言，該抗體框架為哺乳動物(例如人類)框架。輕鏈及重鏈上之該等結構域具有相同之通式結構，且每一結構域各自包含四個框架區，其序列相對保守且由三個稱為互補判定區(CDR1-3)的高變結構域連接。

如本文所用之"人類框架區"係關於與天然產生之人類免疫球蛋白的框架區大體上一致(約85%或以上，或通常90-95%或以上)之框架區。抗體框架區(例如組份輕鏈及重鏈之經合併框架區)用於定位且對準CDR。CDR係造成結合至抗原之抗原決定基的主要原因。應注意，不僅本文所述之交叉選殖抗體可存在於較佳(人類)抗體框架中，而且亦可將包含來自如本文所述抗體的CDR之抗體分子引入免疫球

蛋白框架中。框架實例包括 IgG1、IgG2a 及 IgG2b。最佳為人類框架及人類 IgG1 框架，尤其例如 SEQ ID NO: 6 中所示抗體之重鏈。

在一實施例中，抗體同功異型物可在重鏈可變區域中包含 **CDR1**，該 **CDR1** 包含以下胺基酸：

GFTFSSYAMS (SEQ ID NO: 10)。

該 **CDR1** 可由以下核酸序列編碼：

ggatttaccttagcagctatgcgatgagc (SEQ ID NO: 9)。

抗體同功異型物可在重鏈可變區域中包含以下 **CDR2**：

AINASGTRTYYADSVKG (SEQ ID NO: 12)。

(N：完全重鏈 ASN-52 上之 N-連接的糖化位點)

該 **CDR2** 可由以下核酸序列編碼：

gctattaatgcttctgtactcgtacttattatgctgattctgttaagggt (SEQ ID NO: 11)。

根據本發明之 N-糖化(例如)包含於該 CDR2 區域中，且位於重鏈可變區域之對應 Asn52 上，該可變區域 (V_H) 由 SEQ ID NO: 1 中所示之核酸分子編碼且具有如 SEQ ID NO: 2 中所示之胺基酸序列。

此外，抗體同功異型物可在其重鏈可變區域中包含 **CDR3**，該 **CDR3** 包含以下胺基酸序列：

GKGNT HKPYGYVRYFDV (SEQ ID NO: 14)。

該 **CDR3** 可由以下核酸序列編碼：

ggtaagggttaactcataagccttatgggtatgttcgtattttgatgtt (SEQ ID NO: 13)。

抗體同功異型物可包含一輕(L)鏈，其可由以下 CDR 表徵：



CDR1 : RASQSVSSSYLA(SEQ ID NO: 16) ,

agagcgagccagagcggtgagcagcagctatctggcg (SEQ ID NO: 15) ;

CDR2 : GASSRAT(SEQ ID NO: 18) ,

ggcgcgagcagccgtgcaact (SEQ ID NO: 17) ;

CDR3 : LQIYNMPI(SEQ ID NO: 20) ,

cttcagattataatatgcctatt (SEQ ID NO: 19) 。

抗體同功異型物可在例如非可變Fc-部分Asn 306的相當保守糖化位點(對應於Kabat系統的"Asn297"(Kabat (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Bethesda, Md.: National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine))之抗體重鏈胺基酸序列中包含額外的可能糖化位點(在此項技術中已知包含Asn-X-Ser/Thr單元), 該重鏈為或包含如上文所提供之序列, 亦即SEQ ID NO: 6(如由SEQ ID NO: 5編碼)。

在本發明之一實施例中, 該等抗體同功異型物之特徵在於在重鏈可變區域(V_H)中至少一個抗原結合位點包含糖化天冬醯胺酸(Asn), 該 V_H 由以下序列編碼:

(a)包含如SEQ ID NO: 1中所示核苷酸序列之核酸分子:

CAGGTGGAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAACCGGGCGGCA
GCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCCTCCGATTACCTTTAGCAGCTATGCGA
TGAGCTGGGTGCGCCAAGCCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGCT
ATTAATGCTTCTGGTACTCGTACTTATTATGCTGATTCTGTTAAGGGTCGTT
TTACCATTTCACGTGATAATTCGAAAAACACCCTGTATCTGCAAATGAACA
GCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTGGTAAGGGT

AATACTCATAAGCCTTATGGTTATGTTCGTTATTTTGATGTTTGGGGCCAA
GGCACCTGGTGACGGTTAGCTCA (SEQ ID NO: 1) ;

(b) 編碼具有如 SEQ ID NO: 2 中所示胺基酸序列的多肽之核酸分子：

QVELVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAINA
SGTRITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGKGNTHKP
YGYVRYFDVWGQGT LVTSS (SEQ ID NO: 2：粗體 "N" 表示本文所定義之重鏈可變區域位置 52 上的 Asn)；

(c) 與 (a) 或 (b) 的核酸分子雜交且編碼可結合至如以下胺基酸序列所示 β -A4 肽 / A β 4 的多肽之核酸分子：

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGG
VVIA (SEQ ID NO: 3)

或其片段，其包含至少 15 個胺基酸；

(d) 與 (a) 或 (b) 的核酸分子雜交且編碼可結合至如以下胺基酸序列所示 β -A4 肽 / A β 4 上的至少兩個區域或結合至包含至少 15 個胺基酸之 SEQ ID NO. 3 片段的至少兩個區域的多肽之核酸分子：

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGG
VVIA (SEQ ID NO: 3)

藉此 β -A4 肽 A β 4 或其該片段上之該兩個區域包含 SEQ ID No. 3 之位置 3 至 6 及位置 18 至 26 上的胺基酸；或

(e) 經退化為如 (a) 至 (d) 中任一項所定義之核酸序列的核酸序列。

熟習此項技術者知曉以下事實：術語 "與 (a) 或 (b) 的核酸

分子雜交且編碼可結合至如本文所用之 β -A4肽/A β 4上至少兩個區域的多肽之核酸分子"係關於一雙鏈核酸分子的編碼鏈，藉此使非編碼鏈與(a)及(b)之以上識別的核酸分子雜交。

如上文所指出，包含本文定義之Asn-糖化的經純化抗體分子可尤其經表徵且描述為其中含糖化Asn之可變區域包含於選自由以下各物組成之群的重鏈中之抗體分子：

(a)由SEQ ID NO: 5、23或25中所示之核酸分子編碼的重鏈多肽；

(b)具有SEQ ID NO: 6或26中所示之胺基酸序列的重鏈多肽；

(c)由與(a)的核酸分子雜交且編碼可結合至如以下胺基酸序列中所示之 β -A4肽/A β 4的多肽之核酸分子編碼之重鏈多肽：

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGG
VVIA(SEQ ID NO: 3)

或其包含至少15個胺基酸之片段；或

(d)由與(a)的核酸分子雜交且編碼可結合至如以下胺基酸序列中所示之 β -A4肽/A β 4上之至少兩個區域或結合至包含至少15個胺基酸之SEQ ID NO. 3片段的至少兩個區域的多肽之核酸分子所編碼的重鏈多肽：

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGG
VVIA(SEQ ID NO: 3)

藉此 β -A4肽 A β 4或其該片段上之該兩個區域包含位置3至

6及位置18至26上的胺基酸。

以上識別的抗體(例如本發明之例示抗體)亦可包含具有以下胺基酸序列之L-鏈：

DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQ
KPGQAPRLLIYGASSRATGVPARFSGSGSGTDFTLTISL
EPEDFATYYCLQIYNMPITFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
GNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYAC
EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 22)

或(例如)由以下核酸序列編碼的L-鏈：

gatatcgtgctgaccagagccccggcgaccctgagcctgtctccggcggaacgtgcgaccctgagctgcagagcgagcca
gagcgtgagcagcagctatctggcgtgtaccagcagaaaccaggtcaagcaccgcgtctattaatttatggcgcgagcagc
cgtgcaactggggtcccggcgcgttttagcggctctggatccggcacggattttaccctgaccattagcagcctggaacctgaa
gactttgcgacttattattgccttcagattataatatgcctattacctttggccagggtacgaaagtgaattaaacgtacggtgg
ctgcaccatctgtcttcattctccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgtgcctgctgaataacttctat
cccagagaggccaaagtacagtgaaggtggataacgcctccaatcgggtaactcccaggagagtgacacagagcagga
cagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcct
gcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgctacaaagagcttcaacaggggagagtgtag (SEQ ID NO:
21)。

如上文所指出，在重鏈中包含本文所定義Asn-糖化之經純化抗體分子可另外包含選自由以下各物組成之群的輕鏈：

(a)由如SEQ ID NO: 7、21、24或27中所示之核酸分子所編碼的輕鏈多肽；

(b)具有如 SEQ ID NO: 8、22或28中所示之胺基酸序列的輕鏈多肽；

(c)由與(a)的核酸分子雜交且編碼可結合至如以下胺基酸序列中所示之 β -A4肽/A β 4的多肽之核酸分子編碼之輕鏈多肽：

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA(SEQ ID NO: 3)

或其包含至少15個胺基酸之片段；或

(d)由與(a)的核酸分子雜交且編碼可結合至如以下胺基酸序列中所示之 β -A4肽/A β 4上之至少兩個區域或結合至包含至少15個胺基酸之SEQ ID NO. 3片段的至少兩個區域的多肽之核酸分子所編碼的輕鏈多肽：

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA(SEQ ID NO: 3)

在核酸分子/DNA序列之情況下，本文所用之術語"雜交"可係關於在嚴格或非嚴格條件下的雜交。若未經另外指定，則該等條件較佳為非嚴格的。該雜交條件可根據習知實驗流程建立，例如描述於 Sambrook, Russell "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (2001); Ausubel, "Current Protocols in Molecular Biology", Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989) 或 Higgins 及 Hames(編)"Nucleic acid hybridization, a practical approach" IRL Press Oxford, Washington DC, (1985)中。條件的設定為熟習此項技術者

所熟知且可根據此項技術中所述之實驗流程來確定。因此，僅偵測特異性雜交之序列通常將要求嚴格雜交且諸如於65°C下0.1×SSC、0.1% SDS之洗滌條件。對於偵測同源性或非精確互補序列之非嚴格雜交條件可設定為於65°C下6×SSC、1% SDS。眾所周知，探針長度及待測定核酸之組成構成雜交條件之其他參數。應注意，可經由包括及/或取代用於抑制雜交實驗中背景的替代阻斷試劑來達成以上條件之變化。典型阻斷試劑包括鄧哈特氏試劑(Denhardt's reagent)、BLOTTO、肝素、變性鮭魚精DNA及市售專用調配物。由於相容性之問題，包括特異性阻斷試劑可需要改變上述雜交條件。雜交核酸分子亦包含上述分子之片段。該等片段可表示編碼非功能抗體分子或其非功能片段，或編碼本文所定義之CDR且長度為至少12個核苷酸、較佳至少15個、更佳至少18個、更佳至少21個核苷酸、更佳至少30個核苷酸、甚至更佳至少40個核苷酸且最佳至少60個核苷酸之核酸序列。此外，與任何上述核酸分子雜交的核酸分子亦包括此等分子之互補片段、衍生物及對偶基因變異體。另外，雜交複合物係指兩個核酸序列之間藉由在互補G與C鹼基之間及互補A與T鹼基之間形成氫鍵的複合物；此等氫鍵可藉由鹼基堆疊相互作用而進一步穩定化。該兩個互補核酸序列氫鍵處於反平行組態。可在溶液中形成雜交複合物(例如Cot或Rot分析)或可在存在於溶液中之一個核酸序列與固定於固體支撐物(例如細胞所固定之膜、濾紙、晶片、大頭針或玻璃載片)上的另一個核酸序列之間

形成雜交複合物。術語互補或互補性係指在許可的鹽及溫度條件下聚核苷酸藉由鹼基配對之天然結合。舉例而言，序列"A-G-T"結合至互補序列"T-C-A"。兩個單鏈分子之間的互補性可為"部分的"，其中僅一些核酸結合，或當在單鏈分子之間存在完全互補性時，其可為完全的。核酸鏈之間的互補度對核酸鏈之間的雜交效率及強度具有顯著影響。此在視核酸鏈之間的結合而定之擴增反應中尤其重要。

術語"雜交序列"較佳係指展示與如上所述編碼抗體分子之核酸序列具有至少40%序列一致性、較佳至少50%、更佳至少60%、甚至更佳至少70%、尤其較佳至少80%、尤其更佳至少90%、甚至尤其更佳至少95%且最佳至少97%一致性的序列。此外，術語"雜交序列"較佳係指編碼與上文所述抗體分子之胺基酸序列具有至少40%序列一致性、較佳至少50%、更佳至少60%、甚至更佳至少70%、尤其較佳至少80%、尤其更佳至少90%、甚至尤其更佳至少95%且最佳至少97%一致性的抗體分子之序列。

根據本發明，在兩個或兩個以上核酸或胺基酸序列之情況下，術語"一致"或"一致性百分比"係指，當在比較窗口上或如使用此項技術中已知的序列比對演算法或藉由手動對準及視覺檢查所量測之指定區域上比較及對準最大對應度時，相同或具有相同的胺基酸殘基或核苷酸之指定百分比(例如60%或65%一致性，較佳70-95%一致性、更佳至少95%一致性)之兩個或兩個以上序列或子序列。認為具有

(例如)60%至95%或更高序列一致性之序列大體上一致。該定義亦應用於測試序列之互補性。較佳地，所述一致性存在於長度為至少約15至25個胺基酸或核苷酸之區域上，更佳存在於長度為約50至100個胺基酸或核苷酸之區域上。彼等熟習此項技術者將瞭解如何使用諸如此項技術中已知之基於CLUSTALW電腦程式(Thompson Nucl. Acids Res. 2 (1994), 4673-4680)或FASTDB(Brutlag Comp. App. Biosci. 6 (1990), 237-245)的彼等演算法之演算法測定序列之間的一致性百分比。

雖然FASTDB演算法通常不考慮序列中之內部非配對缺失或添加(亦即其計算中的差距)，但此可經手動修正以避免高估一致性%。然而，CLUSTALW在其一致性計算中確實考慮序列間隔。對於彼等熟習此項技術者而言，同樣可用BLAST及BLAST 2.0演算法(Altschul, Nucl. Acids Res. 25 (1997), 3389-3402; Altschul, J. Mol. E.第36卷(1993), 290-300; Altschul, J. Mol. Biol. 215 (1990), 403-410)。核酸序列的BLASTN程式使用字長(W)為11、期望值(E)為10、M=5、N=4作為默認值且比較兩個鏈。對於胺基酸序列而言，BLASTP程式使用字長(W)為3、期望值(E)為10作為默認值。BLOSUM62計分矩陣(Henikoff Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89, (1989), 10915)使用對準(B)為50、期望值(E)為10、M=5、N=4，且比較兩個鏈。

此外，本發明亦係關於與上述雜交分子的序列相比，其序列退化之核酸分子。當根據本發明使用時，術語"由於

遺傳密碼而退化"意謂由於遺傳密碼冗餘，不同核苷酸序列編碼相同胺基酸。

為確定給定抗體序列中之胺基酸殘基或核苷酸殘基是否對應於任何(例如)SEQ ID NOS: 1、5、23及25中之胺基酸序列或核苷酸序列中的特定位置，熟習此項技術者可使用此項技術中熟知之方式及方法(例如對準)手動或藉由使用諸如下文另外結合術語"雜交"之定義及同源度而提及之彼等電腦程式的電腦程式。

舉例而言，可使用代表 Basic Local Alignment Search Tool BLAST(Altschul (1997)，上述引文；Altschul (1993)，上述引文；Altschul (1990)，上述引文)之BLAST 2.0來搜尋局部序列對準。如上文所論述，BLAST產生核苷酸及胺基酸序列之對準以確定序列類似度。因為對準之局部性質，BLAST尤其適用於確定精確匹配或識別類似序列。BLAST演算法結果之基本單位為高分值片段對(High-scoring Segment Pair, HSP)。HSP由兩個任意但相等長度的序列片段組成，其對準局部最大且對其而言，對準分值符合或超過由使用者設定的臨限值或截止分值。BLAST方法用於尋找介於查詢序列與資料庫序列之間的HSP，以評估所發現之任何配對的統計學意義且僅報導滿足使用者所選擇之顯著性臨限值的彼等配對。參數E建立用於報導配對資料庫序列的具有統計學意義之臨限值。E理解為在整個資料庫搜尋的情況下，HSP(或HSP組)之偶然發生率(chance occurrence)的預期頻率上限。配對滿足E之任何資

料庫序列均在程式輸出中報導。

使用 BLAST(Altschul (1997), 上述引文; Altschul (1993), 上述引文; Altschul (1990), 上述引文)之類似電腦技術用於在諸如 GenBank 或 EMBL 之核苷酸資料庫中搜尋一致或相關分子。此分析比基於多重膜之雜交快得多。另外, 可改變電腦搜尋的敏感性以確定任何特定配對是否精確或類似。搜尋係基於定義如下之產物分值:

$$\frac{\% \text{序列一致性} \times \% \text{最大 BLAST 分值}}{100}$$

且其考慮兩個序列之間的類似度及配對序列的長度。舉例而言, 當產物分值为 40 時, 配對將精確在 1-2% 誤差內; 且為 70 時, 配對將為精確的。儘管較低分值可識別相關分子, 但通常藉由選擇顯示介於 15 與 40 之間的產物分值之彼等來識別類似分子。如此項技術中已知, 可產生序列對準之程式的另一實例為 CLUSTALW 電腦程式 (Thompson, Nucl. Acids Res. 2 (1994), 4673-4680) 或 FASTDB (Brutlag Comp. App. Biosci. 6 (1990), 237-245)。

在一實施例中, 本發明提供其中 V_H 區域中 Asn 上之糖化係選自由以下各物組成之群的糖化抗體同功異型物:

- (a) 無核心岩藻糖化之雙觸角複合型糖結構;
- (b) 雙觸角混合型糖結構;
- (c) 雙觸角寡甘露糖型糖結構; 及
- (d) 如附圖 5 或附圖 27 中所提供之任何該等結構之雙觸角結構。

在本發明抗體之一實施例中，對應糖結構不包含核心岩藻糖化。

對應N-糖化可主要由無核心岩藻糖化的雙觸角複合型($\geq 75\%$ ；主要為80-90%)及經高達80%觸角高度唾液酸化之糖結構組成。微小糖結構分別屬於雙觸角混合型及寡甘露糖型($\leq 25\%$)且亦顯示於附圖5及27中。可變區域之糖化結構對由來自蛋白(胺基酸多肽)之N-糖苷酶F的分解具有抗性。

在一實施例中，主要複合雙觸角糖結構之進一步特徵在於：

- 含有一或兩個連接至一個或另一觸角或連接至兩個觸角的唾液酸。該唾液酸為N-乙酰基神經胺糖酸型且最可能以 α -2,3-鍵結合至 β -1,4-連接之半乳糖末端。
- 缺乏核心岩藻糖化，亦即缺乏以 α -1,6-鍵連接至糖鏈還原端之最內部N-乙酰基-葡糖胺的岩藻糖殘基。

在一實施例中，該混合糖結構之進一步特徵在於：

- 含有作為雙觸角結構之一臂的複合型觸角(連接至核心糖結構之乳糖胺基單元(GlcNAc-Gal))。此臂主要含有連接至 β -1,4-連接之半乳糖末端的N-乙酰基神經胺糖酸。
- 具有一至高達3個連接至核心糖結構的額外甘露糖次單元作為另一觸角。
- 缺乏核心岩藻糖化，亦即缺乏以 α -1,6-鍵連接至糖鏈還原端之最內部N-乙酰基-葡糖胺的岩藻糖殘基。

在一實施例中，該寡甘露糖型糖結構之進一步特徵在

於：

- 在完整糖結構(亦即包括3個存在於典型N-連接核心糖結構中之支鏈甘露糖次單元之糖結構)中含有4個(Man4→GlcNAc2)、5個(Man5→GlcNAc2)或6個(Man6→GlcNAc2)甘露糖次單元。
- 缺乏核心岩藻糖化，亦即缺乏以 α -1,6-鍵連接至糖鏈還原端之最內部N-乙酰基-葡糖胺的岩藻糖殘基。

在本發明之另一實施例中，提供一種包含特徵在於重鏈可變區域(V_H)中一個抗原結合位點包含糖化天冬醯胺酸(Asn)之抗體分子及特徵在於重鏈可變區域(V_H)中兩個抗原結合位點包含糖化天冬醯胺酸(Asn)之抗體分子的組合物，亦即一種包含單糖化抗體及雙糖化抗體之組合物，且其在下文中稱為抗體組合物。術語抗體組合物亦係關於包含包括至少一個如本文所定義之糖化 V_H 區域或該 V_H 區域之至少一個糖化CDR的分子之組合物，藉此該等分子尤其可為免疫球蛋白或免疫球蛋白同功異型物及如上所述之修飾。舉例而言，該組合物亦可包含包括糖化、 V_H -來源的CDR區域之單鏈抗體(scFvs)或雙特異性分子。

下文提供關於本發明抗體組合物之進一步定義。

抗體組合物並不或僅在極低程度上包含"在 V_H 中非糖化之"抗體分子，亦即在可變區域、尤其重鏈可變部分(V_H)中不包含本文所定義之糖化的抗體。

在本發明上下文中，且尤其在本文所提供之抗體混合物的情況下，術語"並不或僅在極低程度上包含非糖化抗體

分子"意謂該抗體組合物包含少於10%，例如少於5%、例如少於4%、例如少於3%、例如少於2%、例如少於1%、例如少於0.5或更少之本文所揭示之非糖化同功異型物。

因此，在一實施例中，本發明提供一種包含單糖化及/或雙糖化抗體(該糖化位於重鏈可變區域中)且缺乏在可變區域中無糖化之抗體分子的抗體製劑。

又，術語"缺乏在可變區域中無糖化之抗體分子"係關於包含至多10%、例如至多5%、例如至多4%、例如至多3%、例如至多2%、例如至多1%、例如至多0.5%、例如至多4%、例如至多3%、例如至多2%、例如至多1%、例如至多0.5%、例如至多0.3%、例如至多0.2%之如本文所述非糖化同功異型物的抗體製劑/抗體混合物/抗體池。

在一實施例中，本發明提供一種不包含多於0.5%其可變區域非糖化(例如重鏈可變區域非糖化)之抗體同功異型物的組合物。

如上文指出，在本發明之一實施例中，提供一種單及雙糖化抗體(例如免疫球蛋白)之混合物，該混合物缺乏在可變區域中無糖化之抗體分子。在本發明上下文中，認為在可變區域中(例如，在重鏈的兩個可變區域(兩個(V_H)-區域)中)缺乏該轉譯後修飾的抗體為"非糖化形式"，其在重鏈可變區域中不包含糖化。但是，此"非糖化形式"可仍在抗體恆定區域(C-區域)中包含糖化，例如且最通常在Fc-部分之相當保守的糖化位點，尤其如本文所定義之非可變/恆定Fc-部分中之天冬醯胺酸(Asn)306。

糖化抗體同功異型物本身或作為單糖化及雙糖化同功異型物之組合為用於治療阿茲海默氏症(AD)及例如唐氏症候群、荷蘭型遺傳性腦出血併發澱粉樣變性病、帕金森氏症、ALS(肌肉萎縮性側索硬化)、克雅氏病、HIV-相關癡呆症及運動神經病之其他澱粉狀蛋白相關失調症的極為有用且有利之治療性抗體製劑。糖化抗體同功異型物本身或作為單糖化及雙糖化同功異型物之組合亦為獨特之診斷性工具。

如本文所述之兩種糖化同功異型物在活體內均顯示改良且高效之腦穿透。可在PS2APP小鼠(一種AD-相關澱粉樣變性病之小鼠模型)中證明有效腦穿透且特異性結合至澱粉狀蛋白- β 斑塊。

此外，可偵測藉由具有顯著降低之非特異性黏性之活體外免疫組織化學染色對本徵性人類澱粉狀蛋白- β 斑塊的改良特異性。如隨附實例中所證明，人類澱粉狀蛋白- β 斑塊的一致染色之最小有效濃度經測定為10 ng/ml。

如隨附實例中所證明，經不同糖化之抗體(例如免疫球蛋白)的分離及表徵揭示：重鏈可變區域之糖化對抗原結合至A β 肽、診斷價值、藥理學概況及功能活性具有令人吃驚的影響。純化抗體分子可經受MS-分析、結合研究(Biacore)及結合至可溶性A β 之抗原決定基定位(Pepspot分析)、凝集A β 之解離及活體內及活體外結合至 β -澱粉狀蛋白斑塊之顯微分析。

在本發明之一實施例中，經純化抗體或抗體組合物可特

異性識別 β -A4肽/A β 4。

因此且如本文所述，在一特定實施例中，經純化抗體或抗體組合物係關於可特異性識別A β /A β 4之兩個區域(N-末端區域及中心/中部部分)的抗體或抗體組合物。

根據本發明，術語"特異性識別"意謂抗體分子可與如本文所定義之 β -A4兩個區域各自的至少兩個胺基酸特異性相互作用及/或與其結合。該術語係關於抗體分子的特異性，亦即係關於其辨別如本文所定義之 β -A4肽的特異性區域與 β -A4肽另一不相關區域或另一非APP-相關蛋白/肽/(不相關)測試肽之能力。因此，實驗上可藉由此項技術中已知之方法及如本文所揭示及描述之方法測試特異性。該等方法包含(但不限於)西方墨點法(Western blot)、ELISA-、RIA-、ECL-、IRMA-測試及肽掃描。該等方法亦包含如(尤其)隨附實例中所說明之 K_D -值的測定。常規使用肽掃描(pepspot檢定)來定位多肽抗原中之線性抗原決定基。多肽之一級序列在活化纖維素上連續合成，其中肽彼此重疊。藉由此項技術中已知之化學發光反應或類似方式，由待測試其偵測或識別特異性抗原/抗原決定基之能力的抗體識別特定多肽係藉由常規的顏色顯影(二級抗體與酶或染料，例如辣根過氧化物酶或4-氯萘酚或過氧化氫)來計分。尤其在化學發光反應或使用二級螢光抗體的情況下，反應可定量。若抗體與某組重疊肽反應，則可推斷對於反應而言必需之胺基酸的最小序列；參見根據本發明所提供之說明性實例。

相同檢定可揭露出反應性肽的兩個相隔叢集，其顯示抗原多肽中不連續(亦即構形抗原決定基)之識別性(Geysen (1986), Mol. Immunol. 23, 709-715)。

除 pepspot 檢定之外，可進行標準 ELISA 檢定。如隨附實例所證明，可將小分子六肽偶合至蛋白，並塗佈至免疫盤，且與待測試抗體反應。可藉由標準顏色顯影(例如二級抗體與辣根過氧化物酶及四甲基聯苯胺與過氧化氫)進行計分。在某些孔中的反應係由在(例如)450 nm 下之光學密度來計分。典型背景(陰性反應)為 0.1 OD，典型陽性反應為 1 OD。此意謂陽性/陰性差異(比率)大於 10 倍。在以下隨附實例中給出進一步細節。另外，下文說明測定"特異性識別"本文所定義之 β -A4 肽兩個區域之特異性及能力的定量方法。

術語 " β -A4 肽之兩個區域"係關於與(例如)SEQ ID No. 3(β -A4 肽)的 N-末端胺基酸 3 至 6 及胺基酸位置 18 至 24 之中心/中部抗原決定基有關的兩個區域。如隨附實例中所證明，尤其本文所提供及例示之雙糖化抗體 A 同功異型物(參見隨附實例)偵測 A β 分子之兩部分，第一部分包含 N-末端中之胺基酸 1 至 10 及第二部分包含 A β 中心/中部部分之胺基酸 17 至 26(如 SEQ ID No.3 中所示)。因此，在本文所提供且包含如本文所提供之該等抗體之單以及雙糖化同功異型物的抗體混合物中，該兩個區域亦可略微放寬，則包含(例如)胺基酸 1 至 10(或至 11 或至 12)或其更短部分及胺基酸 17 至 26(或胺基酸 16 至 27)或胺基酸 17 至 26 之間包含之更短部



分(例如胺基酸19至26或20至26)。在本發明上下文中，術語" β -A4肽"係關於上文所述之 $A\beta 39$ 、 $A\beta 41$ 、 $A\beta 43$ ，尤其係關於 $A\beta 40$ 及 $A\beta 42$ 。 $A\beta 42$ 亦描述於隨附SEQ ID NO: 3中。應注意，術語" β -A4肽的兩個區域"亦係關於"抗原決定基"及/或"抗原決定子"，其包含本文所定義之 β -A4肽的兩個區域或其部分。根據本發明， β -A4肽之該兩個區域在 β -A4肽的一級結構上由至少一個胺基酸，例如至少兩個胺基酸、例如至少三個胺基酸、例如至少四個胺基酸、例如至少五個胺基酸、例如至少六個胺基酸分開(在胺基酸序列水平上)。如本文所示及如隨附實例中所證明，本發明抗體/抗體分子偵測如本文所定義之 β -A4肽的兩個區域或與其相互作用及/或與其結合，藉此該兩個區域由至少一個胺基酸分開(在胺基酸序列的一級結構水平上)，且其中將該兩個區域/"抗原決定基"分開之序列可包含七個以上胺基酸、8個以上胺基酸、10個以上胺基酸或甚至約14個胺基酸。

術語" β -A4肽之兩個區域"亦係關於由該兩個區域或其部分組成之構形抗原決定基或不連續抗原決定基；亦參見Geysen (1986)，上述引文。在本發明上下文中，構形抗原決定基係定義為在一級序列中分開之兩個或兩個以上離散胺基酸序列，當該多肽折疊為天然蛋白時其在表面上集中(Sela, (1969) Science 166, 1365及Laver, (1990) Cell 61, 553-6)。如下文所揭示，涵蓋本發明之抗體分子與由如本文所述 β -A4的兩個區域構成及/或包含該兩個區域的構形

抗原決定基特異性結合/相互作用。認為本發明之"抗體分子"包含對(a)包含 β -A4之胺基酸1至11(或其部分)的胺基酸長度及(b)包含 β -A4之胺基酸16至27(或其部分)的胺基酸長度之同時及獨立雙重特異性(SEQ ID NO. 3)。此等長度之片段或部分包含至少兩個、在大多數情況下至少三個胺基酸。

抗體分子(例如免疫球蛋白)尤其可以三個系統來表現：a)在含有伊波病毒(Epstein barr virus)核抗原(HEK 293 EBNA, Invitrogen)之經瞬時轉染的人類胚胎腎細胞中，b)在經瞬時轉染的中國倉鼠卵巢細胞(CHO)中及c)在經穩定轉染的CHO細胞株(CHO K1及CHO K1 SV, Lonza Biologics)中。三種不同的抗體分子(非、單或雙糖化)可藉由特異性純化步驟分離，包含如下詳述之蛋白A純化、陽離子交換層析以及尺寸管柱分離。

在本發明之一實施例中，抗體分子係在(例如)CHO-細胞中或HEK 293細胞中(較佳為CHO-細胞)重組產生。在一特定實施例中，可在CHO-細胞中表現後獲得以上識別之糖化圖案。CHO-細胞為此項技術中所極為熟知且尤其包含如實驗部分所用之CHO-細胞，例如CHO K1或CHO K1 SV細胞。常用之HEK 293細胞為HEK 293 EBNA。

經糖化之本發明抗體的重組表現係如實例中所示在真核表現系統中(尤其在CHO-細胞中)進行。然而，可涵蓋其他表現細胞，亦即真核細胞。真核細胞包含(例如)真菌或動物細胞。合適真菌細胞之實例為酵母細胞，例如釀酒酵母

屬之彼等酵母細胞(例如釀酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)種)。合適動物細胞為(例如)昆蟲細胞、脊椎動物細胞，例如哺乳動物細胞(例如 NSO、MDCK、U2-OSHela、NIH3T3、MOLT-4、Jurkat、PC-12、PC-3、IMR、NT2N、Sk-n-sh、CaSki、C33A)。亦可涵蓋人類細胞株。此等宿主細胞(例如 CHO-細胞)向本發明之抗體分子提供轉譯後修飾，包括前導肽或信號序列移除、折疊及 H(重)及 L(輕)鏈組裝，且最重要的是於正確位點(亦即重鏈可變區域中)使分子糖化。在例如 CHO 細胞中重組產生期間，由宿主信號肽酶在分泌路徑期間將該信號肽或前導序列蛋白水解分解。此項技術中已知之其他合適細胞株可自例如 American Type Culture Collection(ATCC)之細胞株保藏處獲得。根據本發明，另外涵蓋一級細胞/細胞培養物可充當宿主細胞。該等細胞尤其來源於昆蟲(例如果蠅或蜚蠊種之昆蟲)或哺乳動物(例如人類、豬、小鼠或大鼠)。該等宿主細胞亦可包含來自及/或來源於例如神經母細胞瘤細胞株之細胞株的細胞。

因此，使用重組表現系統製備本發明之抗體分子。如上文所指出，該系統之一實例為使用中國倉鼠卵巢(CHO)細胞之哺乳動物表現系統。此等系統可與麩醯胺酸合成酶(GS)系統一起使用(WO 87/04462; WO 89/01036; Bebbington, 1992, Biotechnology (N Y), 10, 169-75)。此系統包含以編碼 GS 酶之基因及所要抗體基因轉染 CHO 細胞。接著選擇在無麩醯胺酸的培養基中生長且亦經受使用甲硫胺酸磺醯亞

胺(MSX)之GS酶抑制的CHO細胞。為存活，該等細胞將擴增GS酶表現且伴隨mAb之表現。

另一可能的表現系統為CHO dhfr-系統，其中CHO細胞缺乏二氫葉酸還原酶(dhfr-)且生長依賴於胸苷及次黃嘌呤。親本CHO dhfr-細胞株經抗體及dhfr基因轉染，因此使得可選擇dhfr+表型之CHO細胞轉型子。在缺乏胸苷及次黃嘌呤下進行選擇。可藉由使用甲胺喋呤(MTX)擴增來增加抗體基因之表現。此藥物為dhfr酶之直接抑制劑且使得可分離經充分擴增其dhfr基因複本數目且因此擴增抗體基因以在此等條件下存活之抗性細胞群落。

可藉由一種包含以下步驟之方法來製備經純化抗體分子(例如免疫球蛋白)：

- (a) 在例如CHO或HEK 293細胞之哺乳動物細胞中重組表現編碼如上文所定義之抗體分子的異源性核酸分子；
及
- (b) 藉由包含以下步驟之方法純化該經重組表現之抗體分子：
 - (b1) 蛋白A管柱純化；
 - (b2) 離子交換管柱純化，例如陽離子交換層析；及視情況
 - (b3) 尺寸排阻管柱純化。

該純化實驗流程可包含其他步驟，例如其他濃縮步驟(例如透濾)或分析步驟(例如包含分析管柱)。該方法/製程亦可包含病毒失活步驟及/或病毒移除步驟(例如經由過濾/

奈米過濾)。亦涵蓋且可行的是重複某些特定步驟(例如可進行兩個離子交換層析步驟)或省略某些步驟(例如尺寸排阻層析)。

蛋白A為一種結合至大部分IgG1同型之Fc區域的基團特異性配位基。其由一些金黃素葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)菌株合成且可自其分離並偶合至層析珠粒。若干類型凝膠製劑為市售的。

可使用之蛋白A管柱的實例為MabSelect(Trademark)管柱。理想的是，該管柱以25 mM Tris/HCl、25 mM NaCl、5 mM EDTA平衡，將細胞培養物上清液裝載至管柱上，以1 M Tris/HCl pH 7.2洗滌管柱且使用100 mM乙酸於pH 3.2下溶離抗體。

陽離子交換層析利用固定相中帶正電的基團與移動相中的樣本之間的相互作用。當使用弱陽離子交換劑(例如CM Toyopearl 650[®])時，進行以下層析步驟：在以100 mM乙酸pH 4預平衡、裝載蛋白A溶離液且以100 mM乙酸pH 4洗滌後，藉由應用250 mM乙酸鈉(pH 7.8-8.5)及500 mM乙酸鈉(pH 7.8-8.5)之步驟溶離且分餾抗體。對於第一步驟而言，通常溶離雙糖化同功異型物溶離份及單糖化同功異型物溶離份之混合物，通常使用第二步驟溶離非糖化同功異型物溶離份。

可藉由鹽步驟自強陽離子交換劑(例如SP Toyopearl 650)溶離抗體：在以50 mM乙酸pH 5.0平衡管柱、裝載pH 4之蛋白A溶離液後，進行使用50 mM乙酸及210 mM氯化鈉之

第一溶離步驟。接著應用 50 mM 乙酸及 350 mM 氯化鈉之第二溶離步驟。通常藉由第一鹽步驟溶離雙糖化同功異型物溶離份與單糖化同功異型物溶離份之混合物，通常藉由第二鹽步驟溶離非糖化同功異型物。

另外，該抗體亦可藉由鹽梯度自強陽離子交換管柱(例如 SP-Sepharose[®])溶離：在平衡、裝載且於 pH 4.5 下洗滌管柱後，應用 50 mM MES pH 5.8 至 50 mM MES / 1 M 氯化鈉 pH 5.8 之鹽梯度。本文中通常分別溶離雙糖化同功異型物、單糖化同功異型物及非糖化同功異型物溶離份。可彙集以下雙糖化同功異型物餾份及單糖化同功異型物餾份以得到產物池及/或所要抗體混合物。

雙-及單糖化抗體分子(例如免疫球蛋白)之混合物的進一步純化可藉由尺寸排阻層析來進行。適用管柱之實例為 Superdex 200[®] 管柱。電泳緩衝液之實例包括組胺酸/氯化鈉，例如 10 mM 組胺酸/125 mM 氯化鈉/pH 6 及磷酸鹽緩衝生理食鹽水(PBS)。

替代純化步驟為以穿流模式進行陰離子交換層析，接著濃縮/透濾。Q Sepharose[®] 為用於陰離子交換步驟的樹脂之實例。舉例而言，來自 SP 層析之溶離液可以 37.5 mM Tris/HCl pH 7.9 稀釋三倍且流經以 25 mM Tris/83 mM 乙酸鈉預平衡之 Q-瓊脂糖管柱。收集穿流物，調整至 pH 5.5 且使用(例如)Hydrosart 30 kD[®] 膜藉由超濾作用濃縮。接著可經(例如)10 體積 20 mM 組胺酸/HCl pH 5.5 透濾濃縮物。

以上引用之純化實驗流程亦可包含一額外步驟(c)分析層

析步驟，例如使用單-S HR5/5管柱。然而，亦涵蓋例如透濾之(例如)用於濃縮抗體分子之其他步驟。

在本發明之一實施例中，提供一種包含如本文所述之抗體分子或如藉由以上提供之方法所製備之抗體分子的組合物、抗體製劑或抗體池。在本發明之該實施例中，該組合物包含單或雙糖化抗體。在另一實施例中，該組合物包含(在重鏈可變區域中)單及雙糖化抗體且該組合物來源於在可變區域中缺乏糖化之抗體分子。在此實施例之情況下，術語"抗體池"係關於一種(在重鏈可變區域中)單及雙糖化抗體之混合物，該等抗體可個別經分離且接著合併為一種混合物。

本文所提供之該等抗體混合物或抗體池可包含50%如本文所定義之單糖化抗體及50%如本文所定義之雙糖化抗體。然而，亦涵蓋30/70至70/30之比率。而熟習此項技術者應瞭解，本發明之抗體混合物中亦涵蓋其他比率。舉例而言，10/90或90/10、20/80或80/20以及40/60或60/40亦可用於本發明上下文中。如該等實例中亦證明，本發明抗體混合物中包含如上文所定義之雙糖化及單糖化抗體，其尤為有用之比率為40/60至45/55之比率。

本文所提供之組合物尤其適用於診斷性組合物或醫藥組合物中。

因此，本發明提供診斷性組合物或醫藥組合物，其包含：

- (a) 如上文所定義之抗體分子，其包含一個具有糖化Asn之抗原結合位點；

- (b) 如上文所定義之抗體分子，其包含兩個具有糖化 Asn 之抗原結合位點；或最佳地
- (c) 抗體分子(a)與(b)之組合。

如本文所提供之包含包括一個具有糖化 Asn 之抗原結合位點的抗體分子且包括兩個具有糖化 Asn 之抗原結合位點的抗體分子之組合(c)缺乏非糖化(關於重鏈可變區域)同功異型物。如上文所指出，術語"缺乏非糖化(關於重鏈可變區域)同功異型物"係關於其中在該組合物中少於5%、例如少於4%、少於3%、少於2%、少於1%或甚至少於0.5%的抗體種類在重鏈可變區域中為非糖化之組合/抗體池/抗體製劑。如該等實例中所證明，該等組合/抗體池/抗體製劑可幾乎不包含(少於0.5%)非糖化同功異型物。可藉由此項技術中已知之方法容易地測定給定抗體組合物中給定糖化同功異型物(如本文所定義，例如重鏈可變區域中之糖化，尤其參見附圖14)的百分比及/或量。此等方法包含(但不限於)質譜法、SDS-PAGE分析、離子交換、HPLC、ELISA及其類似方法。

如所隨附實例中所示，以使用來自AD患者的人類腦組織的冷凍切片之免疫組織化學染色實驗在活體外證明藉由本發明之抗體特異性且敏感性免疫修護本徵性阿茲海默氏 β -澱粉狀蛋白斑塊。亦與來自以A β 接種的患者之人類抗A β 抗體一起證明來自腦薄片之 β -澱粉狀蛋白斑塊的有效染色(Hock, 2002, Nature Medicine, 8, 1270-1275)。此外，亦在以人類 β -澱粉狀蛋白斑塊負荷為特徵之轉基因動物模型中

證明免疫修護。(Richards, 2003, J. Neuroscience, 23, 8989-9003)在類似動物模型中已證明：此斑塊結合導致其清除且隨後改良疾病相關症狀，而已討論包含Fc-依賴性製程(Bard, 2000, Nature Medicine, 6, 916-919; Wilcock, 2003, Neurobiology Disease, 15, 11-20; Wilcock, 2004, J. Neuroscience, 24, 6144-6151)。此外，報導抗A β 抗體與 β -澱粉狀蛋白斑塊之有效結合與減緩疾病進程相關(Hock, 2002, Nature Medicine, 8, 1270-1275; Hock, 2003, Neuron, 38, 547-554)。人類腦組織之此分析及事後分析暗示：人類之斑塊清除中在機制上涉及微神經膠質細胞之吞噬作用(Nicoll, 2003, Nature Medicine, 9, 448-452)。因此，本發明之抗體或尤其包含於醫藥組合物中之抗體為人類IgG1，其為造成人類中FcR-依賴性製程之主要原因。本發明抗體/本發明混合物之有效 β -澱粉狀蛋白斑塊免疫修護暗示該藥物對於清除人類中已存在之 β -澱粉狀蛋白斑塊及預防其形成之被動免疫而言將為有效的。

另外，抗體較佳應穿越血腦障壁以達到其目的地。對於例如人類IgG之大尺寸分子而言，此製程大量降低，使得僅約0.1至0.2%之抗體血漿濃度可達到CSF。斑塊清除之機制仍為爭論之主題，其可涉及對A β 肽之周邊效應(Dodart, 2002, Nature Neuroscience, 5: 452-457)。因此，所產生之治療性抗體或本發明單及雙糖化(在重鏈可變區域)抗體之對應發明性混合物亦具有在活體外解聚A β 多聚體而不涉及Fc-依賴性製程且結合至CSF中之可溶性A β 單體及寡聚體

的特性，因為中和可溶性單體A β 肽或寡聚體A β 肽(例如凝集中間物)亦可有助於總體澱粉狀蛋白減少效應(Du, 2003, Brain, 126: 1-5)。

可以固體或液體形式且尤其以散劑、錠劑、溶液或氣溶膠之形式投與本發明之組合物。該組合物可包含一或多種本發明之抗體/抗體分子，最佳為如本文所提供之單及雙糖化抗體之混合物。

較佳的是該醫藥組合物視情況包含醫藥學上可接受之載劑及/或稀釋劑。本文所揭示之醫藥組合物可尤其適用於治療神經及/或神經退化性失調症。該等失調症包含(但不限於)阿茲海默氏症、肌肉萎縮性側索硬化(ALS)、荷蘭型遺傳性腦出血併發澱粉樣變性病、唐氏症候群、HIV-癡呆症、帕金森氏症及與老化相關之神經元失調症。尤其涵蓋本發明之醫藥組合物作為澱粉狀蛋白斑塊形成之有效抑制劑或作為澱粉狀蛋白斑塊解聚合之有效刺激劑。因此，本發明提供包含本發明化合物之醫藥組合物，其用於治療澱粉狀蛋白原性疾病/失調症。術語"澱粉狀蛋白原性疾病/失調症"包括與澱粉狀蛋白原纖維及/或病理學APP蛋白水解的形成或沈積相關或由其引起之任何疾病。例示性澱粉狀蛋白原性疾病包括(但不限於)阿茲海默氏症(AD)、唐氏症候群、與路易體(Lewy body)形成相關之癡呆症、具有癡呆症之帕金森氏症、輕度認知障礙、大腦澱粉狀蛋白血管病變及血管型癡呆症。不同澱粉狀蛋白原性疾病由澱粉蛋白沈積物多肽組份之性質來定義及/或表徵。舉例而言，澱

粉狀- β 蛋白之特徵在於在具有阿茲海默氏症之受檢者中發現澱粉狀蛋白沈積物。

合適醫藥學載劑、賦形劑及/或稀釋劑之實例為此項技術中所熟知且包括磷酸鹽緩衝生理食鹽水溶液、水、諸如油/水乳液之乳液、各種類型之濕潤劑、無菌溶液等。包含該等載劑之組合物可藉由熟知習知方法調配。合適載劑可包含任何材料，當與抗A β 特異性結合劑或抗體組合時，其保持A β 之高親和力結合且與受檢者之免疫系統無反應性，該等載劑包括賦形劑、界面活性劑、張力劑及其類似物；參見Remington's Pharmaceutical Sciences (1980)第16版，Osol, A.編。可以合適劑量對受檢者投與此等醫藥組合物。合適組合物之投與可藉由不同方式來實現，例如藉由非經腸、皮下、腹膜內、局部、支氣管內、肺內及鼻內投藥，且對於局部治療而言若需要，則病灶內投藥。非經腸投藥包括腹膜內、肌肉內、皮內、皮下、靜脈內或動脈內投藥。尤其較佳的是藉由注射及/或傳遞至腦動脈或直接傳遞至腦組織中來進行該投藥。本發明之組合物亦可直接投與至靶位點，例如藉由基因槍傳遞至外部或內部靶位點(例如腦)。

藉由使具有所要純度的抗體與可選之生理學上可接受之載劑、賦形劑、穩定劑、界面活性劑、緩衝液及/或張力劑混合來製備包含本文所述糖化抗體之醫藥組合物。可接受之載劑、賦形劑及/或穩定劑在所用劑量及濃度下對接受者為非毒性的，且包括諸如磷酸鹽、檸檬酸鹽及其他有

機酸之緩衝液；包括抗壞血酸、麩胱甘肽、半胱胺酸、甲硫胺酸及檸檬酸之抗氧化劑；防腐劑(例如乙醇、苺醇、苯酚、間甲酚、對氯-間甲酚、對羥基苯甲酸甲酯或丙酯、氯化苯甲烴銨或其組合)；諸如精胺酸、甘胺酸、鳥胺酸、離胺酸、組胺酸、麩胺酸、天冬胺酸、異白胺酸、白胺酸、丙胺酸、苯丙胺酸、酪胺酸、色胺酸、甲硫胺酸、絲胺酸、堅果糖及其組合之胺基酸；單糖、雙糖及其他碳水化合物；低分子量(低於約10個殘基)多肽；諸如明膠或血清白蛋白之蛋白質；諸如EDTA之螯合劑；諸如海藻糖、蔗糖、乳糖、葡萄糖、甘露糖、麥芽糖、半乳糖、果糖、山梨糖、棉子糖、葡糖胺、N-甲基葡糖胺(所謂"葡甲胺")、半乳胺糖及神經胺糖酸之糖；及/或諸如吐溫(Tween)、Brij、普流尼克(Pluronic)、Triton-X或聚乙二醇(PEG)之非離子性界面活性劑。

該醫藥組合物可為液體形式、凍乾形式或自凍乾形式復水之液體形式，其中該凍乾製劑將在投藥之前以無菌溶液復水。將凍乾組合物復水之標準程序為回添一定體積(通常與凍乾期間移除之體積相等)之純水，然而包含抗菌劑之溶液亦可用於產生用於非經腸投藥的醫藥組合物；亦參見Chen (1992) Drug Dev Ind Pharm 18, 1311-54。

醫藥組合物中之例示抗體濃度可在約1 mg/mL至約200 mg/mL或約50 mg/mL至約200 mg/mL或約150 mg/mL至約200 mg/mL之範圍內。出於清晰原因，強調如本文所指示之濃度係關於在液體或自固體形式精確復水的液體中之濃

度。

抗體之水性調配物可在pH-緩衝溶液中製備，例如在約4.0至約7.0，或約5.0至約6.0或者約5.5之pH下。適用於此範圍內pH之緩衝液實例包括磷酸鹽-、組胺酸-、檸檬酸鹽-、琥珀酸鹽-、乙酸鹽-緩衝液及其他有機酸緩衝液。視(例如)緩衝液及調配物所要張力而定，緩衝液濃度可為約1 mM至約100 mM或約5 mM至約50 mM。

可將張力劑包括於抗體調配物中以調變調配物之張力。例示性張力劑包括氯化鈉、氯化鉀、甘油及來自胺基酸、糖以及其組合之群的任何組份。水性調配物較佳為等張的，儘管高張性或低張性溶液亦合適。術語"等張"表示溶液具有與其所比較之一些其他溶液(例如生理鹽溶液及血清)相同的張力。可以約5 mM至約350 mM之量、尤其105 mM至305 mM之量使用張力劑。

亦可將界面活性劑添加至抗體調配物中以降低所調配抗體之凝集性及/或使調配物中微粒之形成最小化及/或減少吸附。例示性界面活性劑包括聚氧乙烯脫水山梨糖醇脂肪酸酯(吐溫)、聚氧乙烯烷基醚(Brij)、烷基苯基聚氧乙烯醚(Triton-X)、聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物(泊洛沙姆(Poloxamer)、普流尼克)及十二烷基硫酸鈉(SDS)。較佳聚氧乙烯脫水山梨糖醇-脂肪酸酯為聚山梨醇酯20(以Tween 20™之商標售出)及聚山梨醇酯80(以Tween 80™之商標售出)。較佳聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物為以Pluronic® F68或Poloxamer 188™之名稱售出之彼等共聚物。較佳聚氧乙烯

烷基醚為以 Brij™ 之商標售出之彼等醚。界面活性劑之例示濃度可在約 0.001% 至約 1% w/v 範圍內。

亦可添加凍乾保護劑以保護不穩定活性成份(例如蛋白質)免受凍乾製程期間的不穩定條件影響。舉例而言，已知凍乾保護劑包括糖(包括葡萄糖及蔗糖)、多元醇(包括甘露糖醇、山梨糖醇及甘油)及胺基酸(包括丙胺酸、甘胺酸及麩胺酸)。通常以約 10 mM 至 500 nM 之量使用凍乾保護劑。

在一實施例中，調配物含有以上識別之藥劑(亦即糖化抗體、界面活性劑、緩衝液、穩定劑及/或張力劑)且基本上無一或多種防腐劑，例如乙醇、苧醇、苯酚、間甲酚、對氯-間甲酚、對羥基苯甲酸甲酯或丙酯、氯化苯甲烴銨及其組合。在另一實施例中，可將防腐劑(例如)以約 0.001 至約 2%(w/v)之濃度包括於該調配物中。

在一實施例中，本發明之抗體調配物為適於非經腸投藥之液體或凍乾調配物，其可包含：

- 約 1 至約 200 mg/mL 之本文所述糖化抗體或抗體組合物，
- 約 0.001 至約 1% 之至少一種界面活性劑；
- 約 1 至約 100 mM 之緩衝液；
- 視情況約 10 至約 500 mM 之穩定劑及/或約 5 至約 305 mM 之張力劑；
- 於約 4.0 至約 7.0 之 pH 下。

在一較佳實施例中，本發明之非經腸調配物為一種液體或凍乾調配物，其包含：

- 約1至約200 mg/mL之本文所述糖化抗體或抗體組合物，
- 0.04%吐溫20 w/v，
- 20 mM L-組胺酸，
- 250 mM蔗糖，
- 於pH 5.5下。

在一更佳實施例中，根據本發明之非經腸調配物亦包含一種凍乾調配物，其包含：

- 15 mg/mL之本文所述糖化抗體或抗體組合物，
- 0.04%吐溫20 w/v，
- 20 mM L-組胺酸，
- 250 mM蔗糖，
- 於pH 5.5下；

或

- 75 mg/mL之本文所述糖化抗體或抗體組合物，
- 0.04%吐溫20 w/v，
- 20 mM L-組胺酸，
- 250 mM蔗糖，
- 於pH 5.5下；

或

- 75 mg/mL之本文所述糖化抗體或抗體組合物，
- 0.02%吐溫20 w/v，
- 20 mM L-組胺酸，
- 250 mM蔗糖，
- 於pH 5.5下；

或

- 75 mg/mL之本文所述糖化抗體或抗體組合物，
- 0.04%吐溫 20 w/v，
- 20 mM L-組胺酸，
- 250 mM海藻糖，
- 於 pH 5.5 下；

或

- 75 mg/mL之本文所述糖化抗體或抗體組合物，
- 0.02%吐溫 20 w/v，
- 20 mM L-組胺酸，
- 250 mM海藻糖，
- 於 pH 5.5 下。

在另一更佳實施例中，根據本發明之非經腸調配物亦包含一種液體調配物，其包含：

- 7.5 mg/mL之本文所述糖化抗體或抗體組合物，
- 0.022%吐溫 20 w/v，
- 120 mM L-組胺酸，
- 250 125 mM蔗糖，
- 於 pH 5.5 下；

或

- 37.5 mg/mL之本文所述糖化抗體或抗體組合物，
- 0.02%吐溫 20 w/v，
- 10 mM L-組胺酸，
- 125 mM蔗糖，

- 於 pH 5.5 下 ；

或

- 37.5 mg/mL之本文所述糖化抗體或抗體組合物，

- 0.01%吐溫 20 w/v，

- 10 mM L-組胺酸，

- 125 mM蔗糖，

- 於 pH 5.5 下 ；

或

- 37.5 mg/mL之本文所糖化抗體或抗體組合物，

- 0.02%吐溫 20 w/v，

- 10 mM L-組胺酸，

- 125 mM海藻糖，

- 於 pH 5.5 下 ；

或

- 37.5 mg/mL之本文所述糖化抗體或抗體組合物，

- 0.01%吐溫 20 w/v，

- 10 mM L-組胺酸，

- 125 mM海藻糖，

- 於 pH 5.5 下 ；

或

- 75 mg/mL之本文所述糖化抗體或抗體組合物，

- 0.02%吐溫 20 w/v，

- 20 mM L-組胺酸，

- 250 mM海藻糖，

- 於 pH 5.5 下；

或

- 75 mg/mL 之本文所述糖化抗體或抗體組合物，

- 0.02% 吐溫 20 w/v，

- 20 mM L-組胺酸，

- 250 mM 甘露糖醇，

- 於 pH 5.5 下；

或

- 75 mg/mL 之本文所述糖化抗體或抗體組合物，

- 0.02% 吐溫 20 w/v，

- 20 mM L-組胺酸，

- 140 mM 氯化鈉，

- 於 pH 5.5 下；

或

- 150 mg/mL 之本文所述糖化抗體或抗體組合物，

- 0.02% 吐溫 20 w/v，

- 20 mM L-組胺酸，

- 250 mM 海藻糖，

- 於 pH 5.5 下；

或

- 150 mg/mL 之本文所述糖化抗體或抗體組合物，

- 0.02% 吐溫 20 w/v，

- 20 mM L-組胺酸，

- 250 mM 甘露糖醇，

- 於 pH 5.5 下；
- 或
- 150 mg/mL 之本文所述糖化抗體或抗體組合物，
- 0.02% 吐溫 20 w/v，
- 20 mM L-組胺酸，
- 140 mM 氯化鈉，
- 於 pH 5.5 下。

在本發明中，在例示調配物上下文中之術語"本文所述糖化抗體"可包含本文所定義之單糖化抗體、本文所定義之雙糖化抗體以及其混合物。

將由主治醫師及臨床因素決定給藥方式。如醫藥技術中所熟知，對於任一患者而言，劑量將取決於諸多因素，包括患者尺寸、體表面積、年齡、待投與之特定化合物、性別、投藥時間及途徑、一般健康狀況及同時投與之其他藥物。蛋白質醫藥活性物質每劑量可以每 kg 體重 1 ng 與 20 mg 之間(例如每 kg 體重 0.1 mg 至 10 mg 之間，例如每 kg 體重 0.5 mg 至 5 mg 之間)的量存在；然而，亦涵蓋低於或高於此例示範圍的劑量，尤其考慮上述因素。若療法為連續灌輸，則其應在每分鐘每公斤體重 1 μ g 至 10 mg 範圍內。

如本文所述之醫藥組合物可經調配為短期作用、快速釋放、長期作用或持續釋放。因此，該等醫藥組合物亦可適用於緩慢釋放或用於受控釋放。

可使用此項技術中已知之方法來製備持續釋放製劑。持續釋放製劑之合適實例包括含有該抗體的固體疏水性聚合

物的半滲透性基質，其中基質為成形物品(例如膜或微膠囊)的形式。持續釋放基質之實例包括L-麩胺酸及L-麩醯胺酸乙酯、非可降解乙烯乙酸乙烯酯、水凝膠、聚乳酸交酯、可降解乳酸-乙醇酸共聚物及聚-D-(-)-3-羥基丁酸之聚酯共聚物。在持續釋放製劑中所包含抗體的生物活性之可能損失及免疫原性之可能改變可藉由使用適當添加劑藉由控制水份含量及藉由產生特定聚合物基質組合物來預防。

可藉由定期評估監控進程。該等組合物，亦即本發明之單-及/或雙糖化抗體或其混合物可局部或全身投藥。應注意，周邊投與之抗體可進入中樞神經系統，尤其參見Bard (2000), Nature Med. 6, 916-919。用於非經腸投藥的製劑包括無菌水性或非水性溶液、懸浮液及乳液。非水性溶劑之實例為丙二醇、聚乙二醇、諸如橄欖油之植物油及諸如油酸乙酯之可注射有機酯。水性載劑包括水、酒精/水溶液、乳液或懸浮液，包括生理食鹽水及緩衝介質。非經腸媒劑包括氯化鈉溶液、林格氏右旋糖(Ringer's dextrose)、右旋糖及氯化鈉、乳酸鹽化林格氏或不揮發性油。靜脈內媒劑包括流體及養份補充液、電解質補充液(例如基於林格氏右旋糖之彼等補充液)及其類似物。亦可存在防腐劑及其他添加劑，例如抗微生物劑、抗氧化劑、螯合劑及惰性氣體及其類似物。此外，視醫藥組合物之意欲用途而定，本發明之醫藥組合物可包含其他藥劑。該藥劑可為作用於中樞神經系統之藥物，例如神經保護性因子、膽鹼酯酶抑制劑、M1蕁毒鹼受體促效劑、激素、抗氧化劑、炎

症抑制劑等。尤其較佳的是該等醫藥組合物包含其他藥劑，例如神經傳遞素及/或神經傳遞素的取代分子、維生素E或 α -硫辛酸。

尤其(但不限於)生物化學家、生物學家、化學家、藥劑師及該等專業人員群體之熟習此項技術者可易於工作及產生上述醫藥組合物。同樣，例如主治醫師之熟習此項技術之醫藥人員應瞭解該等醫藥組合物可如何投與至需要以本文所定義之醫藥組合物治療的患者。該投藥可包含全身投藥，例如經由灌輸及/或注射。然而，亦涵蓋本發明化合物及/或化合物混合物直接投與至腦。舉例而言，該化合物或化合物混合物或化合物調配物可藉由直接心室內或胸腔內注射投與至腦，較佳經由緩慢灌輸以最小化對腦實質組織的影響。亦可使用在腦中緩慢釋放植入物。亦涵蓋的是：(例如)藉由使用產生如本文所定義抗體之植入式重組細胞來利用基因治療方法。此等"重組細胞"應可在本文所述抗體、尤其本發明之抗A β 抗體的可變區域/部分中提供本文所定義之糖化。但如上文所指出，本發明抗體/抗體混合物之一優勢在於其穿越血腦障壁且結合至澱粉狀蛋白斑塊的能力。下文所述本發明之醫藥組合物可用於治療各種迄今為止未知或與病理學APP凝集或病理學APP加工相關或對其具有依賴性的疾病。其尤其可用於治療阿茲海默氏症及其中澱粉狀蛋白- β 的細胞外沈積物呈現起作用的其他疾病。其可理想地用於人類，儘管本文所述之方法、用途及組合物亦涵蓋動物治療。

在本發明之一較佳實施例中，如上文所揭示之本發明組合物為一種診斷性組合物，其另外視情況包含用於偵測之合適方式。該診斷性組合物包含至少一種本發明之前述化合物，亦即本文所述之糖化抗體。

該診斷性組合物可包含本發明之化合物，尤其為本發明之糖化抗體分子、溶解形式/液相，但其亦涵蓋結合至/黏附至及/或連接至固體支撐物的該等化合物。

固體支撐物可與本文所定義之診斷性組合物組合使用，或本發明之化合物可直接結合至該固體支撐物。該等支撐物為此項技術中所熟知，且尤其包含市售管柱材料、聚苯乙烯珠粒、乳膠珠粒、磁性珠粒、膠狀金屬顆粒、玻璃及/或矽晶片及表面、硝化纖維素條帶、膜、薄片、杜雷塞(duracyte)、反應盤之孔及壁、塑料管等。本發明之化合物(尤其本發明之抗體)可結合至諸多不同載劑。熟知載劑之實例包括玻璃、聚苯乙烯、聚氯乙稀、聚丙烯、聚乙烯、聚碳酸酯、葡聚糖、耐綸、葡呖喃聚糖、天然及改質纖維素、聚丙烯醯胺、瓊脂糖及磁鐵礦。出於本發明之目的，載劑之性質可為可溶性或不溶性。已在上文識別且在下文中進一步提及用於標記之適當標記及方法。固定/固化本發明之該(等)化合物的合適方法已熟知且包括(但不限於)離子性、疏水性、共價相互作用及其類似方法。

尤其較佳的是本發明之診斷性組合物用於偵測及/或量化APP及/或APP-加工產物(例如澱粉狀蛋白- β)或用於偵測及/或量化病理學及/或(遺傳性)經修飾APP-分裂面。

如隨附實例中所說明，本發明之糖化抗體分子尤其可用作藉由間接免疫螢光偵測阿茲海默氏症患者腦切片中之本徵性人類澱粉狀蛋白斑塊的診斷性試劑。

較佳的是，待用於診斷性組合物中之本發明的該等化合物經可偵測性標記。可使用各種技術來標記生物分子，其為熟習此項技術者所熟知且認為在本發明之範疇內。一般熟習此項技術者已知多種不同標記及標記方法。可用於本發明的標記類型之實例包括酶、放射性同位素、膠狀金屬、螢光化合物、化學螢光化合物及生物螢光化合物。

通常使用之標記尤其包含螢光染料(例如，螢光素、若丹明(rhodamine)、Texas Red等)、酶(例如辣根過氧化物酶、 β -半乳糖苷酶、鹼性磷酸酶)、放射性同位素(例如 ^{32}P 或 ^{125}I)、生物素、地高辛(digoxigenin)、膠狀金屬、化學-或生物螢光化合物(例如二氧環丁烷、魯米諾(luminol)或吖啶鎢(acridinium))。例如酶或生物素基團的共價偶合、碘化、磷酸化、生物素化等之標記程序為此項技術中所熟知。

偵測方法包含(但不限於)自動放射攝影術、螢光顯微法、直接及間接酶促反應等。通常使用之偵測檢定包含放射性同位素或非放射性同位素方法。此等方法尤其包含西方墨點法(Westernblotting)、覆蓋檢定、RIA(放射免疫檢定)及IRMA(免疫放射免疫測定檢定)、EIA(酶免疫檢定)、ELISA(酶聯免疫吸收檢定)、FIA(螢光免疫檢定)及CLIA(化學螢光免疫檢定)。

此外，本發明提供一種本發明之糖化抗體分子或由本發明方法所產生之抗體分子或本文所提供單及雙糖化抗體混合物之用途，其係用於製備用於預防、治療及/或診斷與澱粉樣變性病及/或澱粉狀蛋白-斑塊形成相關的疾病之醫藥或診斷組合物。另外較佳的是本文所述化合物，尤其本發明之抗體分子用於預防及/或治療與經修飾或異常APP-加工及/或澱粉樣變性病相關之神經病理學。例如處於(工程化)免疫球蛋白格式的抗體分子，例如處於IgG框架中的抗體，尤其處於IgG1-框架中的抗體或處於嵌合抗體格式的抗體(尤其完全人化抗體或完全抗體)、雙特異性抗體、單鏈Fv(scFv)或雙特異性scFv及其類似物用於製備本文所提供之醫藥組合物。但本文所提供之抗體分子及混合物亦適用於如隨附實例中所證明之診斷設定，因為本發明之抗體分子特異性與A β 4及/或澱粉狀蛋白沈積物/斑塊特異性相互作用或對其進行偵測。

因此，本發明化合物之一種發明性用途在於用於製備用於需要改善的神經失調症之醫藥組合物，例如藉由崩解 β -澱粉狀蛋白斑塊、藉由澱粉狀蛋白(斑塊)清除或藉由對 β -澱粉狀蛋白斑塊形成之被動免疫。如隨附實例中所說明，本發明抗體分子尤其適用於預防A β 凝集及用於已形成澱粉狀蛋白凝集之解聚合。因此，本發明之糖化抗體或如本文所述單及雙糖化抗體之混合物將用於減少病理學澱粉狀蛋白沈積物/斑塊、用於清除澱粉狀蛋白斑塊/斑塊前驅體以及用於神經元保護。尤其涵蓋本發明之抗體分子用於活體

內預防澱粉狀蛋白斑塊以及活體內清除已存在之澱粉狀蛋白斑塊/沈積物。此外，本發明之抗體分子或混合物可用於針對A β 肽及A β (亦即澱粉狀蛋白- β 斑塊)凝集之被動免疫方法。可尤其藉由包含Fc-部分的本發明抗體之醫藥用途達成A β 4/A β 4沈積物之清除。抗體之該Fc-部分可尤其適用於Fc-受體介導之免疫應答，例如吸引巨噬細胞(吞噬細胞及/或微神經膠質細胞)及/或輔助細胞。對於Fc-部分相關免疫反應的介導而言，本發明之抗體分子較佳處於(人類)IgG1-框架中。如本文所論述，待以本發明之抗體分子或抗體混合物治療的受檢者較佳為人類受檢者。亦涵蓋用於本發明抗體分子之其他框架，例如IgG2a-或IgG2b-框架。處於IgG2a及IgG2b格式之免疫球蛋白框架尤其涵蓋於小鼠設定中，例如用於本發明抗體分子之科學用途，例如用於對表現(人類)野生型或突變APP、APP-片段及/或A β 4的轉基因小鼠之測試。

以上所引用之與澱粉樣變性病及/或澱粉狀蛋白-斑塊形成相關之疾病包含(但不限於)癡呆症、阿茲海默氏症、運動神經病、帕金森氏症、ALS(肌肉萎縮性側索硬化)、羊騷癢病、HIV-相關癡呆症以及克雅氏病、荷蘭型遺傳性腦出血併發澱粉樣變性病、唐氏症候群及與老化相關之神經元失調症。本文所提供之本發明抗體分子及組合物亦可適用於改善及或預防與澱粉樣變性病及/或澱粉狀蛋白斑塊形成相關之炎症進程。

因此，本發明亦提供一種治療、預防及/或延遲神經及/

或神經退化性失調症之方法，其包含向罹患該神經及/或神經退化性失調症之受檢者及/或向對該神經及/或神經退化性失調症易感之受檢者投與有效量之如本文所提供之抗體分子或本發明單及/或雙糖化抗體混合物及/或如上文所定義之組合物的步驟。如本文所提供之治療可包含單獨或以共療法治療之形式(亦即與其他藥物或藥品組合)投與本發明之化合物/組合物。

如本文所用之術語"治療"涵蓋向有此需要之患者投與如本文所述之單及/或雙糖化抗體(或其混合物)。該患者可為人類患者，在一實施例中為罹患與病理學APP加工相關之失調症或對其易感的人類。因此，如本文所用之術語"治療"包含預防性以及治療性投與本文所提供之化合物或化合物混合物。

一種欲以本文所提供之化合物及組合物治療之失調症為阿茲海默氏症。診斷具有可能性阿茲海默氏症的患者係基於 National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke/Alzheimer's Disease and Related Disorders Association關於此診斷之標準(NINCDS/ADRDA標準)Mckhann等人，1984。

在本發明上下文中，亦涵蓋本文所提供之化合物及/或組合物在"共療法"設定中(例如在例如阿茲海默氏症之APP-相關失調症的情況下)之醫藥用途。在此情況中，涵蓋與諸如美金剛胺、多奈瑞澤(donepezil)、雷斯替明或加蘭他敏之核準藥品的共療法。

在另一實施例中，本發明提供一種包含至少一種如本文所定義之糖化抗體分子或如本文所提供之發明性單及/或雙糖化方法的混合物之套組。有利的是，本發明之套組另外視情況包含(a)緩衝液、儲存溶液及/或進行醫藥、科學或診斷檢定及目的所需之保留試劑或材料。此外，本發明套組部分可個別以小瓶或瓶包裝或以容器或多容器單元組合包裝。

本發明之套組可有利(尤其)用於進行本發明之方法且可用於本文提及之各種應用，例如作為診斷套組、作為研究工具或醫療工具。另外，本發明之套組可含有適於科學、醫療及/或診斷目的之偵測的構件。套組之製造較佳按照熟習此項技術者已知之標準程序。

【實施方式】

實例

以下非限制性實例說明本發明。

實例1：經由選殖技術產生抗體A

根據本發明，經由通常選殖技術產生IgG1分子。抗體A在其編碼序列及其所表現之胺基酸序列中的特徵在於其重鏈可變區域(V_H)。由DNA序列編碼之重鏈之對應實例如下：

```
caggtggaattggtggaaagcggcggcgccctggtgcaaccgggcggcagcc
tgcgtctgagctgcgcggcctccggatttacctttagcagctatgcgatgagctgggt
gcgccaagcccctgggaagggtctcgagtgggtgagcgctattaatgcttctggtac
tcgtacttattatgctgattctgttaagggtcgttttaccatttcacgtgataattcgaaa
```

aacaccctgtatctgcaaataaacagcctgcgtgcggaagatacggccgtgtattatt
 gcgcgcgtggtaagggtataactcataagccttatggttatgttcgttattttgatgttt
 ggggccaaaggcaccctgggtgacgggttagctcagcctccaccaagggtccatcggtc
 ttccccctggcaccctcctccaagagcacctctggggggcacagcggccctgggctg
 cctgggtcaaggactacttccccgaaccgggtgacgggtgtcgtggaaactcaggcgcctt
 gaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctcaggactctactcct
 cagcagcgtgggtgaccgtgccctccagcagcttggggcaccagacctacatctgca
 acgtgaatcacaagcccagcaaacaccaagggtggacaagaaagttgagcccagatat
 cgtgcgatatcgtgcaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgccagcac
 ctgaactcctgggggggaccgtcagttcttcttccccccaaaaccaaggacaccc
 tcatgatctcccggaccctgaggtcacatgcgtgggtgggtggacgtgagccacgaa
 gaccctgaggtcaagttcaactgggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaa
 gacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgggtgggtcagcgtcctc
 accgtcctgcaccaggactgggtgaatggcaaggagtacaagtgcagggtctccaa
 caaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccc
 cgagaaccacaggtgtacacctgcccccatcccgggatgagctgaccaagaacca
 ggtcagcctgacctgcctgggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagt
 ggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggac
 tccgacgggtccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcag
 caggggaaacgttcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacag
 cagaagagcctctccctgtctccgggtaaatga (SEQ ID NO: 5) ,

且其編碼以下免疫球蛋白H-鏈：

QVELVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR
 QAPGKGLEWVSAINASGTRTYADSVKGRFTISRDNISKNT

LYLQMNSLRAEDTAVYYCARGKGNT HKPYGYVRYFDVW
 GQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD
 YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
 SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC
 PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED
 PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
 HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
 TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
 YKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHE
 ALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 6)。

相同重鏈亦可由包含額外"前導序列"之序列編碼，如以下序列所示：

atgaaacacctgtggttcttctcctgctggtggcagctcccagatgggtcctgtcc
 caggtggaattggtggaaagcggcgggcggtgcaaccggcgaggcagcctgctgtgag
 ctgcgcggcctccggatttacctttagcagctatgcgatgagctgggtgcgccaagccccctggg
 aagggtctcgagtgggtgagcgctattaatgcttctggtactcgtacttattatgctgattctgtta
 agggctcgttttaccatttcacgtgataattcgaaaaacaccctgtatctgcaaatgaacagcctgc
 gtgcggaagatacggccgtgtattattgcgcgcgtggtaagggttaatactcataagccttatggt
 tatgttcgttattttgatgtttggggccaaggcaccctggtgacggttagctcagcctccaccaag
 ggtccatcgggtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctggggggcacagcggccctg
 ggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccgggtgacgggtgctggaactcaggcgccctg
 accagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtctcaggactctactccctcagcagcg
 tggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcc
 cagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaattcttgtagacaaaactcacacatgccc

accgtgcccagcacctgaactcctggggggaccgtcagttcttcttcccccaaaacccaag
gacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtgggtgggtggacgtgagccacgaa
gaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaag
ccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgggtggtcagcgtcctcaccgtcctgcacca
ggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagccccat
cgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagcccgagaaccacaggtgtacaccctgcccc
catcccggtgatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaggcttctatcc
cagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacg
cctcccggtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagca
gggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacac
gcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatga (SEQ ID NO: 25)。

對應胺基酸序列將為：

MKHLWFFLLLVAAPRWVLS
QVELVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGL
EWVSAINASGTRTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDT
AVYYCARGKGNTHKPYGYVRYFDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFP
LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
(SEQ ID NO: 26)。

類似地，抗體A之輕鏈由以下核苷酸序列編碼：

gatatcgtgctgaccagagcccgggcgaccctgagcctgtctccggggcgaacgt
gcgaccctgagctgcagagcgagccagagcgtgagcagcagctatctggcgtggt
accagcagaaaccaggtcaagcaccgcgtctattaatttatggcgcgagcagccgt
gcaactgggggtcccgggcgcggttttagcggctctggatccggcacggattttaccctg
accattagcagcctggaacctgaagactttgcgacttattattgccttcagatttataat
atgcctattacccttggccaggggtacgaaagttgaaattaaacgtacgggtggctgcac
catctgtcttcattcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttg
tgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggata
acgccctccaatcgggtaactcccaggagagtggtcacagagcaggacagcaagga
cagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaa
caciaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaa
gagcttcaacaggggagagtgtag (SEQ ID NO: 7) ,

且其編碼以下胺基酸序列(L-鏈)：

DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQK
PGQAPRLLIYGASSRATGVPARFSGSGSGTDFTLTSSLEPE
DFATYYCLQIYNMPITFGQGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS
SPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 8)。

又，此處亦可使用"前導序列"，且對應序列將為：

atgggtgttcagaccaggtcttcatttctctgttgctctggatctctggtgcctacggg
gatatcgtgctgaccagagcccgggcgaccctgagcctgtctccggggcgaacgtgcgaccctg
agctgcagagcgagccagagcgtgagcagcagctatctggcgtggtaccagcagaaaccagg

tcaagcaccgcgtctattaatttatggcgcgagcagccgtgcaactgggggtcccggcgcggtttta
 ggggctctggatccggcacggattttaccctgaccattagcagcctggaacctgaagactttgcg
 acttattattgccttcagatttataatatgcctattacctttggccagggtacgaaagttgaaattaa
 acgtacgggtggctgcaccatctgtcttcattcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaac
 tgccctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtgggaaggtgg
 ataacgcccctccaatcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagc
 acctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctac
 gcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacagggggagag
 tgttag (SEQ ID NO: 27)。

此序列編碼以下胺基酸序列：

MVLQTQVFISLLLWISGAYG
 DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKP
 GQAPRLLIYGASSRATGVPARFSGSGSGTDFTLTSSLEPED
 FATYYCLQIYNMPITFGQGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
 LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV
 TEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
 PVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 28)。

如 WO 03/070760 中所揭示，以上此等序列已知來自
 MAB31。

然而，例示抗體A之重及輕鏈亦可由如下所示之序列編
 碼：

a) 重鏈：

atggagtttgggctgagctgggttttcctcgttgctcttttaagaggtgattcat
 ggagaaatagagagactgagtgtgagtgaacatgagtgagaaaaactggatt

tgtgtggcattttctgataacgggtgtccttctgtttgcaggtgtccagtgtcaggt
 ggagctgggtggagtctgggggaggcctgggtccagcctgggggggtccctgag
 actctcctgtgtgcagcgtctggattcaccttcagtagctatgccatgagctgggt
 ccgccaggctccaggcaaggggctcgagtgggtgtccgccataaacgccag
 cgggtacccgcacctactatgcagactccgtgaaggggccgattcaccatctcca
 gagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaataaacagcctgagagccga
 ggacacggctgtgtattactgtgcgagaggcaaggggaacacccacaagcc
 ctacggctacgtacgtactttgacgtgtggggccaaggaaccctggtcacc
 gtctcctcaggtgagtcctcacaacctctctcctgcggccgcagcttgaagtct
 gaggcagaatcttgtccagggtctatcggactcttgtgagaattaggggctga
 cagttgatgggtgacaatttcagggtcagtgactgtctggtttctctgaggtgag
 actggaatatagggtcaccttgaagactaaagaggggtccaggggcttttctgc
 acaggcagggaacagaatgtggaacaatgacttgaatggttgattcttgtgtg
 acaccaagaattggcataatgtctgagttgccaagggtgatcttagctagact
 ctgggggtttttgtcgggtacagaggaaaaaccactattgtgattactatgctat
 ggactactgggggtcaaggaacctcagtcaccgtctcctcaggtaagaatggc
 ctctccagggtctttattttaacctttgttatggagttttctgagcattgcagacta
 atcttggatatttgccctgagggagccggctgagagaagttgggaaataaatc
 tgtctagggatctcagagcctttaggacagattatctccacatctttgaaaaact
 aagaatctgtgtgatgggtgttggtggagtccttggtgatgggatagggacttt
 ggaggctcatttgaggagatgctaaaacaatcctatggctggagggatagtt
 ggggctgtagttggagattttcagtttttagaatgaagtattagctgcaatactt
 caaggaccacctctgtgacaacctttatacagtatccaggcataggggacaa
 aaagtggagtgggggcactttctttagatttgtgaggaatgttccacactagatt

gtttaaaacttcatttgttgaaggagctgtcttagtgattgagtcaggga
aaggcatctagcctcgggtctcaaaagggtagttgctgtctagagaggtctggt
ggagcctgcaaaagtcagctttcaaaggaacacagaagtatgtgtatggaat
attagaagatgttgcttttactcttaagttggttcctaggaaaaatagttaatac
tgtgactttaaaatgtgagaggggtttcaagtactcattttttaaatgtccaaaat
tttgtcaatcaatttgaggctcttggttggtagaactgacattacttaaagtttaa
ccgaggaatgggagtgaggctctctcataccctattcagaactgacttttaaca
ataataaattaagtttaaaatatttttaaatgaattgagcaatgttgagttgagtc
aagatggccgatcagaaccggaacacctgcagcagctggcaggaagcaggt
catgtggcaaggctatttggggaagggaataaaaaccactaggtaaacttgt
agctgtggtttgaagaagtggttttgaaacactctgtccagccccaccaaacc
gaaagtcaggctgagcaaaacaccacctgggtaatttgcatctctaaaataa
gttgaggattcagccgaaactggagaggtcctcttttaacttattgagttcaac
cttttaatttttagcttgagtagttctagtttcccaaacttaagtttatcgacttcta
aaatgtatttagaattcgagctcgggtacagctttctggggcaggccaggcctg
accttggtttggggcagggaggggggctaagggtgaggcaggtggcgccagc
aggtgcacaccaatgcccattgagcccagacactggacgctgaacctcgcg
gacagttaagaaccaggggcctctgcgcctggggcccagctctgtcccacac
cgcggtcacatggcaccacctctcttgagcctccaccaagggcccatcggt
cttccccctggcaccctctccaagagcacctctggggggcacagcggccctg
ggctgcctgggtcaaggactacttccccgaaccggtgacgggtgtcgtggaact
caggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctc
aggactctactccctcagcagcgtgggtgaccgtgcctccagcagcttgggc
accagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaagggtgg

acaagaaagttggtgagaggccagcacaggaggagggtgtctgctggaa
gccaggctcagcgctcctgcctggacgcacatcccggtatgcagccccagtc
agggcagcaaggcaggccccgtctgcctcttcacccggagcctctgccgc
cccactcatgctcaggagagggtcttctggcttttcccaggctctgggcag
gcacaggctaggtgcccctaaccaggccctgcacacaaaggggcagggtgc
tgggctcagacctgccaagagccatatccgggaggacctgcccctgacct
agccccccccaaaggccaaactctccactccctcagctcggacaccttctct
ctcccagattccagtaactcccaatcttctctctgcagagcccaaacttgtga
caaaactcacacatgcccaccgtgcccaggtaagccagcccaggcctcgcc
ctccagctcaaggcgggacagggtgccctagagtagcctgcacccagggaca
ggccccagccgggtgctgacacgtccacctccatctcttctcagcacctgaa
ctcctggggggaccgtcagttcttcttccccccaaaaccaaggacacct
catgatctcccggaaccttgaggtcacatgcgtgggtgggtggacgtgagccac
gaagacctgagggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggagggtgcata
atgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtacctgtgg
tcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaa
gtgcaagggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctcc
aaagccaaagggtgggaccctgtggggtgagaggccacatggacagaggcc
ggctcggccccacctctgccttgagagtgaccgtgtaccaacctctgtccct
acagggcagccccgagaaccacagggtgtacacctgcccccatcccggtat
gagctgaccaagaaccagggtcagcctgacctgcctgggtcaaaggcttctatc
ccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaaacaac
tacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctacag
caagctcacccgtggacaagagcagggtggcagcaggggaacgttctctcatg

ctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctcc
ctgtccccgggcaaata (SEQ ID NO: 23) ;

b) 輕 鏈 :

atggacatgagggctcctcgctcagctcctggggctcctgctgctctgtttccca
ggtaaggatggagaacactagcagtttactcagcccaggggtgctcagtactg
ctttactattcagggaattctcttacaacatgattaattgtgtggacatttgttt
tatgtttccaatctcaggcgccagatgtgatatcgtgttgacgcagtctccagc
caccctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctctcctgcccgggccagtc
agagtgttagcagcagctacttagcctggtaccagcagaaacctggccagggc
gcccaggctcctcatctatggcgcatccagcagggccactggcgtgccagcc
aggttcagtggcagtgggtctgggacagacttcactctcaccatcagcagcct
ggagcctgaagatttcgcgacctattactgtctgcagatttacaacatgcctat
cacgttcggccaagggaaccaagggtggaaatcaaacgtgagtagaatttaaac
tttgcggccgcctagacgtttaagtgggagatttggaggggatgaggaatga
aggaacttcaggatagaaaagggtgaagtcaagttcagctcctaaaatggat
gtgggagcaaacctttgaagataaactgaatgaccagaggatgaaacagcgc
agatcaaagagggggcctggagctctgagaagagaaggagactcatccgtgtt
gagtttccacaagtactgtcttgagttttgcaataaaagtgggatagcagagtt
gagtgagccgtaggctgagttctctctttgtctcctaagttttatgactacaaa
aatcagtagtatgtcctgaaataatcattaagctgtttgaaagtatgactgcttg
ccatgtagataccatgtcttgctgaatgatcagaagaggtgtgactcttattcta
aaatttgtcacaaaatgtcaaaatgagagactctgtaggaacgagtccttgac
agacagctcaaggggttttttctttgtctcatttctacatgaaagtaaatttga
aatgatcttttttattataagagtagaatacagttgggtttgaactatatgttta

atggccacgggttttgtaagacatttgggtcctttgttttcccagttattactcgattg
 taattttatatcgccagcaatggactgaaacgggtccgcaacctcttctttacaac
 tgggtgacctcgcggtgtgccagccatttggcggttcacctgcccgttaagg
 gccatgtgaacccccgcggtagcatcccttgctccgctggaccactttcctg
 aggcacagtgataggaacagagccactaatctgaagagaacagagatgtga
 cagactacactaatgtgagaaaaacaaggaaaggggtgacttattggagatttc
 agaaataaaatgcatttattattatattcccttattttaattttctattagggaatta
 gaaagggcataaactgctttatccagtgttatattaaaagcttaatgtatataat
 ctttagaggtaaaatctacagccagcaaaagtcatggtaaataattctttgactg
 aactctcactaaactcctctaaattatgtcatattaactggttaaattaatataa
 atttgtgacatgaccttaactggttaggtaggatattttcttcatgcaaaaatat
 gactaataataatttagcacaaaaatatttcccaataactttaattctgtgatagaa
 aaatgtttaactcagctactataatcccataattttgaaaactatttattagctttt
 gtgtttgaccttccctagccaaaggcaactatttaaggaccttttaaaactctt
 gaaactacttttagagtcattaagttatttaaccacttttaattactttaaaatgatg
 tcaattcccttttaactattaatttattttaaggggggaaaggctgctcataattct
 attgtttttcttggttaaagaactctcagttttcgtttttactacctctgtcacccaa
 gagttggcatctcaacagagggggactttccgagaggccatctggcagttgctt
 aagatcagaagtgaagtctgccagttcctcccaggcaggtggcccagattac
 agttgacctgttctgggtgtggctaaaaattgtcccatgtggttacaaaccattag
 accaggggtctgatgaattgctcagaatatttctggacacccaaatacagacct
 ggcttaaggccctgtccatacagtaggttttagcttggctacaccaaaggaagc
 catacagaggctaatatcagagtattcttgggaagagacaggagaaaatgaaa
 gccagtttctgctcttaccttatgtgcttgtgttcagactcccaaacatcaggag

tgtcagataaactggtctgaatctctgtctgaagcatggaactgaaaagaatgt
 agtttcagggaagaaaggcaatagaaggaagcctgagaatacggatcaattc
 taaactctgaggggggtcggatgacgtggccattctttgcctaaagcattgagtt
 tactgcaagggtcagaaaagcatgcaaagccctcagaatggctgcaaagagct
 ccaacaaaacaatttagaactttattaaggaatagggggaagctaggaagaa
 actcaaaacatcaagattttaatacgttcttggtctccttgctataattatctg
 ggataagcatgctgttttctgtctgtccctaacatgccctgtgattatccgcaa
 caacacacccaagggcagaactttgttacttaaacaccatcctgtttgcttctt
 cctcaggaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagc
 agttgaaatctggaactgcctctgttggtgtgcctgctgaataacttctatcccag
 agaggccaaagtacagtggaagggtggataacgccctccaatcgggtaactcc
 caggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcag
 cagcacctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgc
 ctgccaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaac
 aggggagagtgttag (SEQ ID NO: 24) 。

實例 1.1 載體構造

抗體 A 之序列來源於初次篩檢 MorphoSys HuCAL 庫 (亦即一種合成噬菌體展示庫) 後的第 2 次成熟循環。抗體 A 之 DNA 最初提供於來自 MorphoSys, Germany 的載體 pMorph 中, 且對應於 WO 03/070760 附錄第 6/43 頁中圖 2 中的 Fab 表現載體。在出於本發明目的之載體構造中, 編碼載體 pEE6.1 及 pEE 14.4 (均可購自 Lonza Biologics) 以獲得在一個載體中具有兩個鏈之構造, 參見附圖 1; 參見 WO 87/04462 及 WO 89/01036 使用插入 pCR 2.1 Topo TA 的引子

ACGTAAGCTTGCCGCCACCATGGTGTTCAG(有義，HindIII；SEQ ID NO. 29)及引子ACGTGAATTCCTAAACTTCCCTGTT(反義，EcoRI；SEQ ID NO. 30)，藉由PCR自載體MS-Roche #7.9.H7_Ig_κ鏈(如WO 03/070760中所述)分離Ig κ鏈，且插入物經完全測序。藉由HindIII/EcoRI消化自pCR Topo 2.1移除Ig κ鏈插入物，且作為HindIII/EcoRI插入物將其接合至載體pEE14.4中。

Ig γ 1重鏈係藉由PCR以引子ACGTAAGCTTGCCGCC CCATAAACACCTG(有義，HindIII；SEQ ID NO: 31)及引子ACGTGAATTCTCATTTACCCGGAGACAG(反義，EcoRI；SEQ ID NO: 32)自載體pMorph MS-Roche #.9.H7_IgG1選殖出來，插入至pCR 2.1 Topo TA，且該插入物係經完全測序。藉由HindIII/EcoRI消化，自pCR Topo 2.1移除Ig γ1重鏈插入物，且作為HindIII/EcoRI插入物將其接合至載體pEE 6.4。藉由NotI/SalI消化，自pEE 6.4 IgG1移除重鏈表現序列盒，且將經分離之片段插入經SalI/NotI消化之pEE14.4 κ中，產生最終雙基因構造pEE 14.4 mAb-31。

實例1.2：CHO細胞之轉染及抗體A之表現

根據標準實驗流程進行轉染。宿主細胞株CHO K1源自於Lonza Biologics工作細胞庫(WCB)# 028-W2 (Lonza, 2002, 1-179)而宿主細胞株CHO K1 SV則源自Lonza Biologics主細胞庫(MCB)#269-M(Lonza, 2002, 1-187)。

藉由脂質體轉染(Fugene, Roche Diagnostics)，以含有重

及 κ 輕鏈基因的載體 pEE 14.4 MAb31轉染源自於 WCB # 028-W2之附著型 CHO K1細胞。在 DMEM、GS補充物(均為 JRH Biosciences)、10% 透析 FCS(PAA Laboratories, CoS#R0-CEP 2001-083-Rev 00)及 50 μ M 甲硫胺酸磺醯亞胺(來自 Sigma之 MSX)中選擇轉染分離物。2週後,挑選細胞群落且將其轉移至 96孔板中且以 ELISA測試抗體產生。藉由系列限制稀釋選殖出 4個具有抗體 A最高表現之細胞群落,以獲得單一細胞來源的培養物,其中一週後衍生 82個純系且將其擴增。

選擇此等純系其中之一作為在附著狀態下具有每天每個細胞 48 pg之最高比率生產率的純系。藉由限制稀釋將其進一步次選殖以獲得以高穩定性表現抗體 A之良好生產細胞(Pu, (1998) Mol Biotechnol, 10, 17-25)。另外,藉由電穿孔以載體 pEE 14.4 MAb31轉染 CHO K1細胞之懸浮變異體(源自 MCB #269-M的 CHO K1 SV細胞)。如前選擇轉染物,且藉由限制稀釋使所得純系經受單細胞選殖,產生若干抗體 A之高生產細胞純系。

實例 1.3：將表現抗體 A之純系調適為懸浮培養物

在 DHI培養基中使用不同蛋白水解產物測定 CHO K1純系之最佳生長特性：將細胞最終調適為 DHI培養基 w/o 麩醯胺酸(Invitrogen),其為各自比例為 1:1:2(v:v:v)之 DMEM、Ham 氏 F12 及 IMDM 之混合物, (Schlaeger and Shumpp, 1992, J Immunol Methods, 146, 11-20)其具有以下修飾：大豆及米水解產物：0.2%大豆 HyPep 1510 及 0.2%米 HyPep

5603(Kerry Bioscience)、0.03%普流尼克F68 (Invitrogen)、25 μ M MSX(Sigma)及5%透析FCS(PAA實驗室)。逐漸降低FCS濃度直至細胞確實在無血清培養基DHI培養基中指數生長。對於若干重組細胞純系而言，冷凍無血清DHI培養基中之初級菌種庫。

將來自含有10%透析FCS之DMEM中的CHO K1 SV純系調適為在兩步驟程序中以25 μ M MSX(Gibco-Invitrogen)化學界定的CD-CHO培養基中之懸浮培養物。(Lonza)在CD-CHO中產生細胞庫。視情況，可將CHO細胞之任何其他無血清及無蛋白之培養基用於懸浮培養物且作為表現抗體之基質。

實例2：抗體A之產生

抗體A之產生(藉由進料分批醱酵)

在如下震盪燒瓶或旋轉培養物中自儲備培養物製備用於醱酵之CHO純系：

在標稱體積為50-75 ml的100 ml震盪燒瓶或旋轉器中，將各純系之冷凍小瓶融化於含有25 μ M MSX之各自培養基中。

接著以1:5之連續分裂擴增細胞以在震盪燒瓶或旋轉器中達到400-500 ml體積之儲備培養物。用於接種醱酵槽之細胞可來源於融化後長達90天之此等儲備培養物。菌種培養由2 L震盪燒瓶或旋轉器中之2個1000 ml步驟組成，接著接種10 L醱酵槽作為另一容器。或者，10 L醱酵槽本身可充當進料分批容器或充當100 L進料分批醱酵槽之接種

物。MSX存在於培養基中以供選擇直至10 L醱酵槽接種(其中排除MSX)。

醱酵製程：

第0天：以 $3-4 \times 10^5$ /ml細胞(自種子培養基1:4-1:5分裂)起始

第2-3天：開始進料，細胞密度應大於 1.5×10^6 /ml。

進料：每天以2%連續或單次進料。

在整個醱酵過程中藉由離子交換層析法監控抗體A之同功異型物組合物(參見下文)。

第14-18天：當細胞生存力開始降低(50%)且達到期望效價時，藉由離心及/或過濾收穫細胞上清液且過濾殺菌。將其無菌儲存且如下一部分中所述進一步加工。

根據標準實驗流程進行醱酵，參見(例如)Werner, (1993), *Arzneimittelforschung*, 43, 1242-9 或 Rendall, (2003), *Proceedings of the 18th ESACT meeting*, 2003年5月11-14日, 1, 701-704。

實例3：抗體A之純化

純化製程係基於三個層析步驟及一個透濾步驟：蛋白A親和力層析、陽離子交換層析、陰離子交換層析及使用100 kD膜透濾。凝膠類型及管柱尺寸為1 l MabSelect(GE Healthcare, Art. 17-5199, 管柱直徑9 cm, 床長度18 +/- 2 cm); 0.4 l CM-Toyopearl 650 M(Toso Bioscience, Art. 007972, 小離子容量=每毫升85微當量, 直徑5.0 cm, 床長度20 +/- 2 cm); 1.3 l Q-Sepharose FF(GE Healthcare,

Art. 17-0510-04)，直徑 9 cm，床長度 20 +/- 2 cm。於室溫下運行管柱。將溶離份儲存於 2-8°C 下。於 280 nm 下偵測。將面積為 0.1 m² 之 Biomax 100 超濾模組 (Millipore Corp. Art. P2B100A01) 用於濃縮及透濾。

蛋白 A 層析

使用純水製備以下溶液：

溶液 A (平衡緩衝液)：25 mM Tris、25 mM NaCl、5 mM EDTA，以 HCl 調節至 pH 7.1 +/- 0.1；

溶液 B (洗滌緩衝液 1)：100 mM 乙酸，以 NaOH 調節至 pH 4.5 +/- 0.1；

溶液 C (溶離緩衝液)：100 mM 乙酸，以 NaOH 調節至 pH 3.2 +/- 0.1；

溶液 D (洗滌緩衝液 2)：100 mM 乙酸、75 mM NaCl，pH 3 +/- 0.1；

溶液 E：(再生緩衝液)：2 M 鹽酸胍、100 mM Tris，以 HCl 調節至 pH 7.5 +/- 0.1；

溶液 F (儲存緩衝液)：200 mM 甲醇、100 mM 乙酸，以氫氧化鈉調節至 pH 5.0 +/- 0.1。

首先以 3 倍床體積之溶液 A 平衡管柱。

接著將其以澄清細胞培養物上清液 (45 l, 386 mg/l 抗體) 裝填，

以 5 倍床體積之溶液 A 洗滌，

以 3 倍床體積之溶液 B 洗滌，

以 3.5 倍床體積溶液 C 溶離且收集溶離液，

以3倍管柱體積之溶液D洗滌且

以2倍管柱體積之溶液E再生

以3倍床體積之溶液A平衡

且以床體積之緩衝液F洗滌以供儲存。

對於所有層析步驟而言使用100 cm/h之線性流動速率。

管柱負載為每公升Mabselect凝膠17.4公克抗體且同功異型物總混合物之產率為96%。

病毒失活

使用純水製備以下溶液：

溶液G(調節溶液)：2 M乙酸鈉。

藉由添加濃乙酸或2 M乙酸鈉(溶液G)將蛋白A溶離液之pH調節至3.5至3.7之間的pH。將其攪拌15 min，接著藉由添加2 M乙酸鈉(溶液G)調節至pH 4 +/- 0.1。

陽離子交換層析

使用純水製備以下溶液：

溶液H(平衡緩衝液)：100 mM乙酸，以NaOH調節至pH 4.0 +/- 0.1；

溶液I(溶離緩衝液1)：250 mM乙酸鈉，不進行pH調節，pH 7.8-8.5；

溶液J：(溶離緩衝液2)：500 mM乙酸鈉，不進行pH調節，pH 7.8-8.5；

溶液K(再生溶液)：0.5 M氫氧化鈉；

溶液L(儲存緩衝液)：0.01 M氫氧化鈉。

首先將管柱以2倍床體積之溶液K再生，接著以5倍床體

積之溶液H平衡。

接著將其以蛋白A溶離液之等分試樣裝填且以1倍床體積之溶液H洗滌。

最後將其以6倍床體積之溶液I溶離。在此步驟中，溶離雙糖化及單糖化同功異型物之混合物。在下一步驟中，使用3倍床體積之溶液J溶離非糖化同功異型物。

使用後，將管柱以2倍床體積之溶液K再生，在此緩衝液中儲存24 h，且接著再次以2倍床體積之溶液K洗滌。對於儲存而言，將其以3倍床體積之溶液L洗滌。

圖3中顯示實例層析圖。

如下所述藉由分析性IEX分析層析之溶離份。

對於所有層析步驟使用100 cm/h之線性流動速率。

管柱負載為每公升CM-Toyopearl 650 M中14.3公克抗體，且對於雙糖化及單糖化同功異型物之混合物而言產率為79%，且對於非糖化同功異型物而言產率為6.2%。

使用 Q-Sepharose FF之穿流層析

使用純水製備以下溶液：

溶液M(稀釋緩衝液)：37.5 mM Tris，以乙酸調節至pH 7.9 +/- 0.1；

溶液N(調節溶液)：2 M Tris；

溶液O(平衡緩衝液)：83 mM乙酸鈉、25 mM Tris，pH 7.5 +/- 0.1；

溶液P(再生緩衝液1)：0.5 M NaOH/1 M NaCl；

溶液Q(再生緩衝液2)：0.2 M乙酸/1 M NaCl；

溶液R(儲存緩衝液)：0.01 M NaOH。

將來自CMT管柱之溶離液(酸性)首先以溶液M以1：3稀釋，且接著以溶液N調節至pH 7.5。

首先將管柱以2倍床體積之溶液O平衡，且接著將來自CMT管柱之經稀釋溶離液經該管柱處理且收集穿流物。將產物以溶液O自該管柱洗掉，直至280 nm下之吸收低於0.1(收集穿流物)。

首先將管柱以1.5倍床體積之溶液P再生，儲存1 h且接著再以1.5倍床體積之溶液P再生。接著將管柱以2倍床體積之溶液Q再生，且以3倍床體積之溶液R洗滌並儲存。

對於所有層析步驟使用100 cm/h之線性流動速率。

管柱負載為每公升Q Sepharose FF中3.5公克抗體，且對於雙糖化及單糖化同功異型物之混合物而言產率為91%。

透濾

使用純水製備以下溶液：

溶液S(透濾緩衝液)：20 mM組胺酸，以HCl調節至pH 5.5。

過濾器固持器Pellicon 2(Millipore Corp.)裝備有1個超濾模組型Biomax 100(Millipore Corp.，面積=0.1 m²，Art. P2B100A01)。使用裝備有聚矽氧管之WATSON-MARLOW 501 U泵來抽吸。以緩衝液O沖洗系統，且接著在1 h內於4-11°C下將來自QS層析之3.8公升(每公升1.1公克抗體)穿流物(以濃乙酸調節至pH 5.5)濃縮至250-300 ml。接著進行對3公升緩衝液S(約10體積)之透濾(V=常數)(4-11°)。最後

使用 Millipac 20過濾器 (Millipore Corp.)將產物無菌過濾。
超濾/透濾步驟之產率為91%。產物濃度為15 mg/ml。可將
產物於-70℃冷凍。

用於溶離份分析之分析性IEX方法

管柱：Mono-S HR 5/5(GE Healthcare, Art. 17-0547-01)；

緩衝液1：50 mM嗎啉基乙磺酸，以氫氧化鈉調節至pH
5.8；

緩衝液2：50 mM嗎啉基乙磺酸、1 M NaCl，以氫氧化鈉
調節至pH 5.8；

流動速率：1 ml/min；

偵測：280 nm；

樣本負載：36-72 μ；

梯度：	時間	%緩衝液2
	0 min	0
	1	0
	25	63
	27	63
	28	0
	35	0。

圖2中給出實例層析圖。

產率

步驟	同功異型物	步驟產率
MabSelect(蛋白A)	所有同功異型物之混合物	96%
CM-Toyopearl 650 M	單糖化抗體A與雙糖化抗體A之混合物 非糖化抗體A之含量<0.5%	79%
	非糖化抗體A	6.2%
Q-Sepharose FF	單糖化抗體A與雙糖化抗體A之混合物 非糖化抗體A之含量<0.5%	91%
濃縮及透濾	單糖化抗體A與雙糖化抗體A之混合物 非糖化抗體A之含量<0.5%	91%

實例 4：藉由 SDS-PAGE 表徵抗體 A 同功異型物

使用標準實驗流程進行 SDS-PAGE 分析，使用 4-12% NuPage 梯度 Bis-Tris 凝膠 (Invitrogen) 及標記 MARK12 (Invitrogen) 作為對照。每孔裝載 1-3 μg 來自醱酵之經蛋白 A 純化的上清液 (Prod 01、02、03) 或旋轉培養物 (所有其他道)。還原條件下之分析在重鏈分子量範圍內產生對應峰 1 之單能帶 (雙糖化抗體 A)，對應峰 2 之雙能帶 (單糖化抗體 A) 及對應峰 3 之單能帶 (非糖化抗體 A)。峰 2 之兩個帶的分子量分別對應於峰 1 及峰 2 的分子量。

使用若干例如以下之表現系統獲得類似結果：HEK 293 EBNA 細胞中之瞬時轉染，CHO 細胞中之瞬時轉染及 CHO 細胞中之穩定表現。

實例 5：藉由質譜 (MS) 分析表徵抗體 A 同功異型物。

藉由電灑離子化法質譜法 (ESI-MS) 測定所有抗體 A 同功異型物之完全抗體質譜圖。

為此，在非還原條件下製備抗體A之樣本。藉由G25凝膠過濾將樣本去鹽化至2%甲酸及40%乙腈中，且在來自Waters的Q-Tof2或LCT-質譜儀器具中用於ESI-MS分析。

藉由分子質量獲得分離，其中非糖化抗體A與單糖化抗體A之間的差異為1623。對於來自該胺基酸序列之非糖化抗體A而言期望質量為145,987 Da，其非常符合145,979 Da之實驗測定質量。類似地，如圖4中所指示，單及雙糖化抗體A同功異型物相差1624 Da。在分子質量中所觀察之差異與下文更詳細描述之N-糖化圖案相符。

實例6：抗體A之Asn-52糖化結構

Asn52為重鏈可變部分之序列aaa-aaa-Asn-Ala-Ser-aaa-aaa的部分，其對應於N-糖化一致序列Asn-aaa-Ser/Thr。Asn52之N-連接糖化由抗體A同功異型物之胰蛋白酶肽繪圖及含有Asn52之肽HC/T4的質譜評估來證實。在非糖化抗體A之胰蛋白酶肽圖中，出現質量專一對應於非糖化HC/T4肽之肽，其指示Asn52未經糖化，而在單或雙糖化抗體A中，偵測到肽之質量對應於含有N-連接糖結構之HC/T4。

為進一步證實重鏈胰蛋白酶肽HC/T4中一致序列之糖化，自糖化抗體A同功異型物之肽圖分離糖化HC/T4肽，且在以N-糖苷酶F培育前後藉由MALDI-質譜法分析。在N-糖苷酶F處理之前，獲得對應於含有N-連接糖結構的HC/T4肽之質量。然而，如所期望若藉由N-糖苷酶F自天冬醯胺酸移除糖鏈(Asn至Asp轉化)，則以N-糖苷酶F處理

之HC/T4肽的質量對應於期望為非糖化HC/T4+1 Da之質量。

此外，在連接至Asn52的糖結構處存在N-乙醯基-神經胺糖酸指示存在N-連接之複合型及混合型糖結構。為此，在藉由變性及還原分離HC及LC且去鹽後，以N-糖苷酶F(其移除Asn306之N-糖，但不移除Asn52之N-糖)處理糖化抗體A同功異型物，且使用或不使用神經胺糖酸酶並分析。對於HC而言，由兩種方法獲得之質量相差約291 Da或582 Da，對應於一個或2個唾液酸。自此，亦作出結論：複合型及/或混合型N-連接糖係連接至Asn52。

此Asn-52糖化，亦即N-糖化，主要由無核心岩藻糖化且以高達80%含有N-乙醯基-神經胺糖酸的複合型觸角高度唾液酸化之雙觸角複合型($\geq 75\%$ ；主要80-90%)的糖結構組成。少數糖結構分別屬於雙觸角混合型及寡甘露糖型($\leq 25\%$)(圖5或圖27)。對於所有Asn52糖化結構而言，共同的是對由N-糖苷酶F自完整抗體A分解之抗性。

實例7：抗體A之Asn306糖化結構

如上文所指出，連接至重鏈(HC)Fc-部分中之天冬醯胺酸306(Asn306)的抗體A含有由複合雙觸角寡糖鏈組成之抗體型糖化。熟知抗體含有該複合雙觸角寡糖鏈之不同同功異型物，其在末端半乳糖苷化程度、唾液酸化程度及核心岩藻糖化程度方面不同。另外，已知在Fc-所在糖鏈中缺乏核心岩藻糖化之程度對於抗體之活體內功效而言為重要的，因為普遍接受核心岩藻糖化之程度調節抗體之效應功

能。

對於抗體A主體而言，發現在Fc-所在糖鏈中連接至Asn306的抗體典型變異體(Routier (1997), Glycoconjugate 14(2), 201-207; Raju (2003), BioProcess International, 44-52)與末端半乳糖苷化及核心岩藻糖化相關。

末端半乳糖苷化(G0 : G1 : G2結構)程度之非均質性經測定為約35-40% G0-結構、約45% G1-結構及約15-20% G2-結構(關於該等結構之圖解說明，參見圖6或圖27)。

缺乏核心岩藻糖化(亦即缺乏連接至核心糖結構最內部N-乙酰基-葡糖胺的岩藻糖單元)之Fc-糖結構含量對於抗體而言可能為重要的，因為存在或不存在此岩藻糖單元可調節抗體與效應細胞Fc-受體之結合，藉此影響此等細胞之活性。

對於抗體A而言，於Asn 306處缺乏核心岩藻糖化之糖鏈同功異型物的相對含量係藉由如下所述兩種不同方法來測定：

A)完全糖化HC之質譜法：

在6 M鹽酸胍及250 mM TCEP存在下使抗體A樣本變性且還原為輕鏈(LC)及糖化HC。將經還原樣本去鹽於2%甲酸及40%乙腈中，且在來自Waters之Q-Tof2或LCT-質譜儀中用於ESI-MS分析。自所獲得之m/z光譜，自所選擇之單一m/z狀態藉由含有各個寡糖同功異型物之糖化HC的峰高計算各個寡糖同功異型物之相對含量。對於缺乏核心岩藻糖化的糖結構之相對含量的計算而言，缺乏核心岩藻糖之

G0-結構(G0-Fuc)的峰高係指G0+(G0-Fuc)的總和。

根據關於糖化HC及關於HC所獲得的質譜差異指定各自碳水化合物結構，在對照實驗中其寡糖結構藉由在MS-分析前以N-糖苷酶F培育而移除。

B)藉由HPEAC-PAD層析分析所釋放之寡糖：

在磷酸鈉緩衝液中於pH 7.2下將抗體A樣本以N-糖苷酶F培育以自Asn306釋放寡糖鏈(在所使用條件下於Asn52處之糖結構未自完整之未變性抗體移除)。藉由離心過濾自抗體A蛋白分離所釋放之糖鏈，且於強鹼性pH(pH 13)下使用乙酸鈉梯度於來自BioLC系統中之Dionex的Carbo Pac PA200管柱進行分析。所使用之管柱可自岩藻糖化寡糖鏈解析非岩藻糖化之寡糖鏈。藉由與經Carbo Pac PA200管柱分析之合適寡糖標準比較滯留時間且藉由分別測定由MALDI質譜所分離且收集之峰的莫耳質量，將所獲得之各個峰指定為各自之碳水化合物結構。對於缺乏核心岩藻糖化之糖結構之相對含量的計算而言，形成缺乏核心岩藻糖之所有結構的面積%總和。

若干批次(雙及單糖化抗體A同功異型物之組合)及純化抗體A同功異型物之分析分別揭示，連接寡糖鏈之非岩藻糖化Asn306之含量分別在約14%-27%(由MS量測)及6%-26%(由HPAEC-PAD量測)之範圍內。

實例8：藉由表面電漿共振(SPR)測定抗體A組合物及同功異型物(例如本發明之非、單或雙糖化抗體)活體外結合至A β 1-40及A β 1-42纖維之K_D值。

藉由表面電漿共振 (SPR) 線上量測抗體 A 與纖維狀 A β 之結合，且如下測定分子相互作用之親和力：Biacore2000 及 Biacore3000 器具均用於此等量測。藉由在 37°C 以 200 μ g/ml 之濃度在 10 mM 乙酸鈉緩衝液 (pH 4.0) 中將合成肽培育三天而活體外產生 A β 1-40 及 A β 1-42 纖維。電子顯微鏡分析證實兩種肽之纖維狀結構，A β 1-40 主要顯示較短 (<1 微米) 且 A β 1-42 主要為較長 (>1 微米) 纖維。假設此等纖維較非晶形凝集物與未結構化沉澱物之不良界定混合物更確切代表人類 AD 腦中之凝集 A β 肽。如製造商使用手冊 (BIAApplication Handbook, version AB, Biacore AB, Uppsala, 1998) 中所述，將該等纖維 1:10 稀釋及直接偶合至 CM5。

此偶合程序包括一活化步驟及一固化步驟，在活化步驟期間藉由使表面與 N-羥基琥珀醯亞胺及 1-乙基-1-(3-二胺基丙基)-碳化二醯亞胺鹽酸鹽之水性混合物接觸將表面之羧酸基團轉移至化學反應性琥珀醯亞胺酯基團中，且在固化步驟期間於 200-350 共振單位下使經活化表面與溶解於 10 mM 乙酸鹽緩衝液 (pH 4.5) 中之纖維接觸 (1 共振單位 (RU) 約對應於每平方毫米 1 皮克之表面負載)。接著在 200 nM $\geq$ C $\geq$ 0.15 nM 之濃度範圍內使負載纖維之表面與抗體溶液接觸。在締合期 (在與緩衝液接觸期間) 及解離期 (與緩衝液之後續接觸) 期間所監控之典型的時間依賴性反應曲線 (聽力閾值 (sensogram) 顯示於圖 7 中)。

抗體 A 同功異型物結合至 A β 1-40 及 A β 1-42 纖維之 K_D 值在

下表中給出。簡言之，使用濃度依賴性平衡結合反應，藉由 Scatchard 型分析計算 K_D 值。可以兩種方式獲得此等平衡結合常數。

由於在低抗體濃度下之極緩慢締合過程，達成平衡之接觸間隔極長(圖 7)。然而，該等接觸間隔仍可在 Biacore 器具上實現，且實驗平衡反應可經受 Scatchard 分析。

亦可藉由將較短時間依賴性締合曲線外推至無窮大而獲得平衡結合資料。接著將此等理論上所獲得之平衡結合水平再次用於測定 K_D 值。

與測定平衡感應器反應之方式不同，獲得曲線 Scatchard 圖。自曲線 Scatchard 圖，對於來源於第二親和力成熟循環之抗體 A 同功異型物而言，得到較高(二價)及較低(一價)親和力相互作用。此兩種親和力代表下表所指示範圍之較低及較高 K_D 值：

		1-40 高親和力 K_D 值 (nM)	1-40 低親和力 K_D 值 (nM)
抗體 A 組合物(單及雙 糖化抗體 A 之混合物)	外推	0.49	27.25
	stdev	0.10	8.40
	平衡	0.41	21.00
雙糖化 抗體 A	外推	1.43	18.51
	stdev	0.02	22.33
	平衡	1.54	29.00
單糖化 抗體 A	外推	0.25	7.55
	stdev	0.02	2.06
	平衡	0.12	11.10
非糖化 抗體 A	外推	0.19	1.99
	stdev	0.03	0.15
	平衡	0.42	2.82

上表顯示如由表面電漿共振所測定，由抗體A同功異型物與A β 1-40小纖維之相互作用所形成之低親和力錯合物(一價)及高親和力錯合物(二價)之 K_D 值。給出藉由使用外推平衡反應(標記為"外推")測定的 K_D 及藉由使用實驗上測定的平衡反應(標記為"實驗")測定的 K_D 值。至少六次測定外推值且給出標準偏差。基於實驗及外推平衡感應器反應之 K_D 值等於由此等標準偏差給出之限定值範圍內之值。

實例9：藉由使用十肽之pepspot分析對抗體A組合物及同功異型物(例如本發明之非、單或雙糖化抗體)進行抗原決定基繪圖

抗原決定基(抗原決定子)可為線性的或構形的。本文所述之雙重抗原決定基特異性由抗體與兩種非連續線狀肽之反應性定義。

用於定義特異性抗原決定基識別之抗原決定基繪圖方法係基於其中將六肽共軛物塗佈於微量滴定盤上之ELISA技術，或基於pepspot技術。後者技術使得可藉由對於蛋白對PVDF膜之西方墨點法而言通常已知的實驗流程來偵測及量化抗體。

所應用之抗原決定基繪圖技術經設計為特異性偵測線性抗原決定基，而其不可用於繪製例如不連續或構形抗原決定基之空間上更為複雜的抗原決定基。可用於構形或不連續抗原決定基繪圖之技術，例如結構域掃描及組合肽陣列需要長達36個胺基酸(結構域)之長肽或各自由12個胺基酸組成之經合併肽。

因此，認為所應用之技術除涉及不連續或不連續分散抗原決定基之構形抗原決定基以外，對於線性抗原決定基而言為特異性的。

總之，所表示之資料顯示在本文所定義之A β 肽內的兩個區域類似於獨立線性抗原決定基，同時基於單一六聚或十聚A β -肽上所研究抗體之獨特雙重抗原決定基特異性來識別。

將包含A β (1-42)之以下胺基酸序列分為43個具有1個胺基酸讀框轉移之重疊十肽。該等號碼係指來自A β 1-40序列之必需胺基酸，其必須存在於十肽中以達成抗體之最佳結合。

ISEVKM¹DAEF RHDSGYEVHH QKLVFFAEDV
GSNKGAIIGL MVGGVVI⁴²ATV IV(SEQ ID NO: 4)。因此，DAEF RHDSGYEVHH QKLVFFAEDV GSNKGAIIGL MVGGVVIA(SEQ ID NO: 3)表示A β 4/ β -A4肽之胺基酸1至42。

合成43個十肽，其中N-末端乙醯基化及C-末端共價連接至一商業供應商(Jerini BioTools, Berlin)之纖維素薄片("pepspot")。在一搖動平臺上將纖維素薄片以單株抗體(1 μ g/ml)在阻斷緩衝液(50 mM Tris·HCl、140 mM NaCl、5 mM NaEDTA、0.05% NP40(Fluka)、0.25%明膠(Sigma)、1%牛血清白蛋白鎰份V(Sigma)，pH 7.4)中培育2小時。在一搖動平臺上將薄片以TBS(10 mM Tris·HCl，150 mM NaCl，pH 7.5)洗滌3次歷時3分鐘。接著將其壓至濾紙上，

以陰極緩衝液濕潤(25 mM Tris鹼、40 mM 6-胺基己酸、0.01% SDS、20%甲醇)且轉移至半乾墨點法堆疊，其中肽側面向等尺寸之PVDF膜(Biorad)。

半乾墨點法堆疊由較肽薄片略大之新鮮濕潤的濾紙(Whatman No.3)組成：

3張以陰極緩衝液濕潤的紙

該肽薄片

一張以甲醇濕潤的PVDF膜薄片

3張以陽極緩衝液1(30 mM Tris鹼，20%甲醇)濕潤的紙

3張以陽極緩衝液2(0.3 mM Tris鹼，20%甲醇)濕潤的紙

在陰極與陽極之間以 0.8 mA/cm^2 之電流密度進行轉移，歷時一小時，其足以將抗體自纖維素薄片完全溶離且將其轉移至PVDF膜上。將PVDF膜浸沒於阻斷緩衝液中歷時10分鐘。以1:10'000之稀釋將以螢光染料IRdye800(Rockland編號#609-132-123)標記的山羊抗人類IgG(H+L)添加至Odyssey阻斷緩衝液(Li-Cor)中，且以PBS，0.05%吐溫20進一步1:1稀釋。將膜在一搖動平臺上培育1小時。將其以TBST(具有0.005%吐溫20之TBS)洗滌 3×10 分鐘。將膜乾燥且使用長波長螢光掃描儀(Odyssey)掃描800 nm螢光，如圖8中所示。

藉由以針刺標記PVDF膜達成抗體反應性點之精確指定。所討論抗體之抗原決定基係定義為反應性肽中的最小胺基酸序列。在各點上整合螢光密度且記錄為相對螢光單位(RFU)。出於比較目的，除對於偵測而言使用抗小鼠Ig

代替抗人類Ig以外，以相同形式分析兩種小鼠單株抗體(BAP-1，其等價於對N-末端結構域具有特異性之抗體6E10(Kim (1998))，及BAP-44，其等價於對中間結構域具有特異性之抗體4G8(Kim (1998)))。

應注意，如pepspot及ELISA分析所指示，一價Fab片段之親和力成熟及轉化為全長IgG1抗體通常導致抗原決定基識別序列之一些擴寬。此可係關於在由親和力成熟導致之抗體-抗原相互作用區域中增加更多接觸點，或係關於與最小抗原決定基之更強結合，以使得亦可偵測到相鄰胺基酸之弱相互作用。後者可為當以全長IgG抗體探測A β -衍生肽時之情況。如下表中所說明，當比較親本Fab與對應完全成熟IgG抗體時，N-末端及中間抗原決定基之識別序列延長高達三個胺基酸。然而，須謹記：該等十肽係經修飾以供在C-末端胺基酸共價連接，且因此由於位阻，此胺基酸不易於接近全長抗體。若為此情況，則最後C-末端胺基酸不顯著有助於抗原決定基識別序列，且必須在如本發明所用之pepspot分析中考慮最小識別序列於C-末端可能減少一個胺基酸。

抗體	胺基酸位置	胺基酸位置
雙糖化抗體A	3-4 (1-10)	18-24 (17-26)
單糖化抗體A	4-5 (3-11)	20-26
非糖化抗體A	3-4	20-24
抗體A組合物(單及雙糖化抗體A同功異型物之混合物(1:1))	3-5 (3-11)	19-26
BAP-44(小鼠單株)		19-21
BAP-1(小鼠單株)	4-6	

上表係關於使全長IgG抗體結合至一纖維素薄片上之十肽的pepspot分析。該等號碼係指A β 1-40序列中之胺基酸位置，其必須存在於十肽中以達成抗體之結合。以括號指示抗原決定基的進一步延伸，以指示達成最大結合所需之側接胺基酸。

實例10：使用誘導生物素標記A β 自凝集A β 釋放之抗體A同功異型物(例如，本發明之非、單或雙糖化抗體)的解聚合檢定

測試抗體A同功異型物誘導凝集A β 解離之潛能的實驗設置如下：

在以抗體A同功異型物處理前，首先將生物素標記A β 1-40併入預成形A β 1-40/A β 1-42纖維中。如下所述使用一採用抗生蛋白鏈菌素-POD共軛物之檢定量測生物素標記A β 之釋放。

當在水性緩衝液中培育若干天時，合成A β 自發凝集且形成類似於在阿茲海默氏症患者腦中之澱粉狀蛋白沈積物中所見之纖維狀結構的纖維狀結構。以下活體外檢定適於量測生物素標記A β 併入預成形A β 凝集物或自其釋放，以分析抗A β 抗體及諸如白蛋白之其他A β -結合蛋白的A β -中和潛能(Bohrmann (1999) J. Biol. Chem. 274, 15990-15995)。如由所併入之生物素標記A β 1-40的釋放所量測，抗體A同功異型物誘導凝集A β 之解聚合作用。

實驗程序：

於37°C下以A β 1-40及A β 1-42(各2 μ M，每孔100 μ l)之1:1

混合物塗佈 NUNC Maxisorb 微量滴定盤 (MTP) 歷時三天。在此等條件下，將高度凝集之纖維狀 A β 吸收及固化於孔表面。接著移除塗料溶液且於室溫將該等盤乾燥 2-4 小時。經乾燥盤可儲存於 -20°C 下。為併入生物素標記 A β ，於 37°C 下將經塗佈盤以含有 0.05% NaN₃ 之 TBS 中以每孔 200 μ l 之 20 nM 生物素標記 A β 1-40 培育隔夜。在以 3 $\times$ 每孔 300 μ l 之 T-PBS 洗滌盤後，添加已在含有 0.05% NaN₃ 之 TBS 中連續稀釋之抗體且於 37°C 下培育 3 小時。洗滌盤且分析生物素標記 A β 1-40 之存在。在以 300 μ l T-PBS 洗滌 3 次後，添加經在含有 1% BSA 之 T-PBS 中以 1:1000 稀釋的抗生蛋白鏈菌素-POD 共軛物 (Roche Molecular Biochemicals)，且於室溫下將其培育 2 小時。將該等孔以 T-PBS 洗滌三次且每孔添加 100 μ l 新鮮製備之四甲基-聯苯胺 (TMB) 溶液。[TMB 溶液之製備：10 ml 30 mM 檸檬酸 pH 4.1 (以 KOH 調節) + 0.5 ml TMB (1 ml 丙酮 + 9 ml 甲醇中之 12 mg TMB) + 0.01 ml 35% H₂O₂]。藉由每孔添加 100 μ l 之 1 N H₂SO₄ 停止反應且於 450 nm 下在微量滴定盤讀取器中讀取吸光度。

如附圖 9 中所證明，如併入的生物素標記 A β 1-40 之釋放所量測，抗體 A 同功異型物誘導凝集 A β 之解離作用。抗體 A 同功異型物及小鼠單株抗體 BAP-1 具有類似活性 (圖 9)，而 BAP-2、BAP-17 及 4G8 抗體在自固化 A β 塊釋放生物素標記 A β 中明顯較不有效 (資料未顯示)。BAP-1 可藉由其與細胞表面全長 APP 之反應性而自糖化抗體 A 同功異型物明顯分化。具有該等特性之抗體 (例如 BAP-1) 不適用於治療性

應用，因為可誘導可能之自體免疫反應。有趣的是，注意到BAP-2，雖然其對於暴露於凝集A β 中的胺基酸殘基4-6之特異性在此檢定中具有顯著較低活性，此指示並非所有N-末端特異性抗體在自預成形凝集物釋放A β 中推理上同樣有效。在此檢定中，BAP-17(C-末端-特異性)及4G8(胺基酸殘基16-24-特異性)之相對低效率係由於在凝集A β 中此兩種抗原決定基之隱含性質。於此處所使用濃度之BSA對凝集A β 無作用。

與雙糖化同功異型物相比，單糖化同功異型物發揮活體外解聚凝集A β 肽之較高能力，此在活體內亦可為相關的。

實例 11：自人類腦脊髓液(CSF)捕獲可溶性A β 之抗體A組合物且包含同功異型物(本發明之單及雙糖化抗體)

藉由免疫沉澱(IP)及半定量西方墨點法(WB)分析測定自人類CSF樣本捕獲可溶性A β 之能力。實驗程序：

根據以下流程進行人類CFS樣本之免疫沉澱：

70 μ l	人類CSF
20 μ l	培育緩衝液(50 mM Tris、140 mM NaCl、5 mM EDTA、0.05% NP-40、1% BSA、0.25% 明膠、0.25%奶粉，pH 7.2
10 μ l	來自儲備溶液之抗體A同功異型物(1000-10 μ g/ml)
100 μ l	

於4°C下將溶液保持一小時。添加40 μ l蛋白G Sepharose 珠粒(Amersham Biosciences #17-0618-01；以PBS，50%漿

料洗滌)且於4°C下在旋轉器上培育2小時。在4°C下於500 g離心3分鐘後，移除上清液且將200 µl PBS添加至該等珠粒中，將其轉移至 Millipore 過濾管 0.45 µm(Millipore #UFC3OHVNB)且在4°C下於500 g離心3分鐘。再將200 µl PBS添加至珠粒中，渦旋且在4°C下於2000 g離心3分鐘。添加具有DTT之45 µl樣本緩衝液1×NuPage且於70°C下保持10分鐘，接著在4°C下於2000 g離心3分鐘。

對於SDS-PAGE而言，按照標準且以MES緩衝液系統進行，將18 µl蛋白G溶離液與Aβ₁₋₄₂(Bachem)一起塗覆至NuPage凝膠10% Bis-Tris凝膠，直接作為樣品緩衝液中之內部標準。

於室溫下將凝膠轉移至Hybond C外膜(半乾系統Novex)乾膜3'。將膜轉移至經預熱PBS中且於600 W下在微波中加熱3 min。使用SuperBlock溶液(Pierce)進行阻斷歷時1小時且使用T-PBS(PBS中之0.1%吐溫20)中之5%奶粉(Bio Rad)額外再阻斷1小時。

於4°C下在旋轉器上使用抗Aβ抗體W02抗體(1:1500-1:2000，來自The Genetics, Inc. Zürich, Switzerland)培育隔夜，接著以T-PBS洗滌3次歷時5 min，且於室溫下以T-PBS中1:5000之抗小鼠IgG-HRP(Dako)培育2小時。再以T-PBS歷時5 min洗滌3次後，於室溫下以LumiLight Plus培育5分鐘。將西方墨點法數位化且藉由具有一α Innotech數位攝影機系統(Digital Camera System)之密度計進行分析。

如圖10中所證明，如由免疫沉澱及西方墨點法實驗所證

明，抗體A組合物(包含單及雙糖化抗體A同功異型物)在人類CSF中有效結合至可溶性A β 。應注意，在此檢定中，單糖化抗體A在捕獲可溶性A β 中比雙糖抗體A更有效(圖10)。

實例12：藉由抗體A組合物及同功異型物(例如，本發明之非、單或雙糖化抗體)對人類澱粉狀蛋白斑塊進行活體外染色

藉由使用間接免疫螢光之免疫組織化學分析測試糖化抗體A同功異型物使來自具有嚴重阿茲海默氏症患者的腦切片所獲得之本徵性人類 β -澱粉狀蛋白斑塊染色之能力。證明本徵性人類 β -澱粉狀蛋白斑塊之特異性及敏感性染色。

來自由確診為阿茲海默氏症之患者死後獲得的顳葉皮質之未經固定組織的冷凍切片係由間接免疫螢光來標記。連續兩步驟培育係用於偵測結合抗體A同功異型物，此係藉由共軛至Cy3(#109-165-003，批號49353，Jackson Immuno Research)之經親和力純化的山羊抗人類(GAH) IgG (H+L)揭示。對照包括無關人類IgG1抗體(Sigma)及單獨二級抗體，其均給出陰性結果。

在10 ng/ml之抗體A濃度下，敏感性且特異性偵測及一致揭示所有類型之 β -澱粉狀蛋白斑塊(圖11)。

對於高達1 μ g/ml之糖化抗體A同功異型物濃度而言，證明本徵性人類澱粉狀蛋白- β 斑塊之特異性及敏感性染色。

在10 μ g/ml之濃度下，觀察到背景染色，最顯著為以非糖化抗體A同功異型物染色。在活體外切片製程後，非糖

化同功異型物發揮出在玻璃載片表面或所暴露之幾乎所有組織組份表面所觀察到之相當大的非特異性黏性。此似乎係由於涉及離子性及/或疏水性相互作用的非特異性結合。

實例 13：在阿茲海默氏症小鼠模型中藉由抗體 A 進行活體內 β -澱粉狀蛋白斑塊裝飾

在 PS2APP 雙重轉基因小鼠中 (Richards (2003), J. Neuroscience, 23, 8989-9003), 以單劑量研究測試糖化抗體 A 同功異型物之活體內免疫裝飾 β -澱粉狀蛋白斑塊的能力。亦即以每隻小鼠 1 mg 之劑量投與糖化抗體 A 同功異型物, 且 3 天後以磷酸鹽緩衝生理食鹽水灌注動物及將腦在乾冰上冷凍且製備冷凍切片。

兩種糖化同功異型物均顯示經改良及高度有效之活體內腦穿透(如與非糖化形式相比)。在 PS2APP 小鼠(一種 AD-相關澱粉狀變性病之小鼠模型)中證明有效腦穿透及與澱粉狀蛋白- β 斑塊的特異性結合。

使用未經固定的冷凍切片, 藉由具有圖 12 中所示共軛至 Cy3(#109-165-003, Jackson Immuno Research)的山羊抗人類 IgG(H+L)之經單標記間接免疫螢光, 或接著藉由以 BAP-2-Alexa488 免疫共軛物複染色以目測組織中存在之所有 β -澱粉狀蛋白斑塊類型之位置及分佈來評估結合至 β -澱粉狀蛋白斑塊之抗體的存在。

免疫螢光染色方法係用於偵測結合抗體 A。在黏著至經預冷玻璃載片後, 使切片在 PBS 中水合且以在 -20°C 下預冷

之100%丙酮處理2 min。以PBS洗滌兩次歷時2分鐘。以含有1% BSA之PBS或藉由在Ultra V阻斷液(LabVision)中連續培育5 min，接著PBS洗滌且在具有10%正常綿羊血清之強阻斷溶液(BioGenex)中培養20 min來進行對非特異性結合位點之阻斷。在以具有10%正常綿羊血清之PBS洗滌後，於室溫下將載片以濃度為15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之共軛至Cy3(#109-165-003，批號49353，Jackson Immuno Research)的經親和力純化的山羊抗人類(GAH)IgG(H+L)培育1小時。澱粉狀蛋白斑塊之複染色係藉由在室溫下以濃度為0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之BAP-2(一種共軛至Alexa 488的抗Ab小鼠單株抗體)培育1小時來進行。藉由在50 mM乙酸銨中的4 mM CuSO_4 中培育來中止脂褐質的自發螢光。在雙蒸餾水中沖洗載片且以每載片500 μl PBS洗滌2次後，將螢光裝配培養基(S3023 Dako)嵌入載片。

藉由共焦雷射顯微法及用於藉由IMARIS及COLOCALIZATION軟體(Bitplane, Switzerland)定量分析上局部化的影像製程進行成像。

在每隻小鼠1 mg單一劑量後，發現糖化抗體A同功異型物穿透血腦障壁，且在三天後活體內有效免疫裝飾/結合所有 β -澱粉狀蛋白斑塊。代表性影像顯示於圖12中。此與在澱粉狀蛋白斑塊處不可偵測之非糖化形式明顯相反。

實例14：對抗體A同功異型物與HEK293細胞表面上表現之澱粉狀蛋白前驅體蛋白(APP)之結合的研究：

流式細胞儀之方法為此項技術中所熟知。由流式細胞儀

所量測之螢光相對單位(例如 FL1-H)指示各抗體之細胞表面結合。與未經轉染之 HEK293 細胞相比，經 APP 轉染之 HEK293 的螢光轉移指示與細胞表面 APP 之不良反應。舉例而言，與未經轉染之 HEK293 細胞(圖 13，虛線，右手面板)相比，抗 N-末端結構域之抗體 BAP-1 及 BAP-2 顯示在 HEK293/APP 中 FL-1 信號之顯著移位(圖 13，粗線、右手面板)。類似地，BAP-44 抗體(對於中間 A- β 抗原決定基而言為特異性的)顯示類似尺寸移位。相反，所有抗體 A 同功異型物(圖 13 左手面板)(對於 N-末端及中間 A- β 抗原決定基而言為特異性的)在螢光中未顯示顯著移位。由於不同細胞尺寸及表面特性，未經轉染之 HEK293 細胞具有與經 APP 轉染細胞相比較高之基礎螢光。與 Cellquest Pro 套裝軟體組合使用 FACScan 器具(均為 Becton Dickinson)。

抗體 A 同功異型物對細胞表面 APP 缺乏反應性(圖 13)。

實例 15：阿茲海默氏症小鼠模型中之 A β 斑塊沈積物的形態量測分析

使用接受以抗體 A 組合物或抗體 A 同功異型物之五個月處理的 PS2APP 小鼠腦之定量電腦輔助影像分析，研究在各個腦區(丘腦、新皮層、海馬體及海馬支腳)中抗體 A 組合物或抗體 A 同功異型物在活體內減少澱粉狀變性病的能力。

因此，PS2APP 轉基因雄性小鼠經靜脈內注射以抗體 A 組合物或抗體 A 同功異型物及媒劑。將 75 隻 5-6-月齡 PS2APP 小鼠分為五組(A-E)，各由 15 隻小鼠組成。自第 0 天開始，

各小鼠經由尾部靜脈藉由團式靜脈注射接受0.1 mL媒劑(0 mg/kg)或抗體A製劑(20 mg/kg)。PS2APP小鼠之A、B、C、D及E組分別接受媒劑(組胺酸緩衝生理食鹽水)、包含如上所定義之單糖化抗體A及雙糖化抗體A且缺乏非糖化抗體A之抗體A組合物、雙糖化抗體A、單糖化抗體A及非糖化抗體A。

藉由注射抗CD-4抗體(雜合純系GK 1.5，如可購自ATCC)誘導對所投與人類抗A β 抗體之免疫耐受性。抗藥物抗體之監控指示，經抗體處理之動物在處理16週後僅產生中等免疫反應，且可偵測之抗體為低親和力者，或僅產生少量(資料未顯示)。

處理5個月後犧牲小鼠。將未經固定之腦徑向切片，包括丘腦、海馬體形成及皮層區域。自各腦半球如下製備50個切片：自側水平約1.92起始，獲得5個連續系列之5 $\times$ 10 μ m及5 $\times$ 20 μ m切片。連續切片之間不存在間隙，產生750 μ m之總組織使用。因此，切片系列大約於側水平1.20上終止(Paxinos及Franklin, 2003)。對於定量形態量測分析而言，使用每個第10個切片。

將切片以濃度為5 μ g/ml之雙糖化抗體A同功異型物染色以供澱粉狀蛋白沈積。以5 μ g/ml之濃度使用共軛至Alexa-488螢光團的小鼠單株抗體(BAP-2)對A β 之染色顯示可比性結果，但對神經元具有顯著細胞內及背景染色，其干擾下述影像加工程序。對於偵測而言，於室溫下以15 μ g/ml之濃度使用共軛至Cy3(#109-165-003，批號49353，Jackson

Immuno Research)之經親和力純化的山羊抗人類(GAH)IgG (H+L)歷時1小時。在每載片以500 μ l PBS洗滌2次後，將螢光裝配培養基(S3023, Dako)嵌入載片。

使用 GenePix Personal 4100A 微陣列掃描儀 (Axon Instruments, 現為 Molecular Devices, CA, USA) 獲取影像。使用藉助於電腦輔助影像分析之無偏形態量測方法，使用兩個參數(亦即由澱粉狀蛋白- β 斑塊覆蓋之面積百分比及澱粉狀蛋白- β 斑塊之數目)量測澱粉狀蛋白- β 斑塊負載及數目。使用 MCID M7 Elite 軟體 (Imaging Research Inc., St. Catharines/Ontario, Canada) 進行斑塊負載及數目之量化。藉由細節提取過濾器，接著藉由目標強調過濾器增強所掃描之影像。接著將所得影像二進制化，根據染色密度調節臨限值。在原始參考影像上識別人造製品、血管及邊緣效應，接著自二進制影像將其移除。在參考影像上畫出所關注區域的輪廓。為進行最後量化，接著在二進制化影像中量測此等區域之面積及由斑塊佔領的面積以及斑塊數目。忽略單一像素。使用常用之試算表軟體 (Microsoft Excel, Redmond/WA, U.S.A) 進行計算。將斑塊尺寸分為在 <100 至 $>1000 \mu\text{m}^2$ 範圍內之11個組。使用雙尾、異方差t-測試進行統計學評估。

為進行比較及統計學評估，自一組未經處理之6月齡 PS2APP 小鼠 (15隻動物) 起始的研究，測定澱粉狀變性病 (澱粉狀蛋白- β 斑塊病理學) 之基線。結果在圖15至18中以顯著水平描繪 (*: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$; ***: $p \leq 0.001$)。

在丘腦區中澱粉狀蛋白斑塊之減少最為顯著(圖15)。對於經抗體處理之組測定總澱粉狀蛋白- β 斑塊表面之平均減少：對於抗體A組合物而言為64%，對於雙糖化抗體A而言為70%，對於單糖化抗體A而言為81%，且對於非糖化抗體A而言為44%。發現在總澱粉狀蛋白- β 斑塊數目之平均減少方面，對於抗體A組合物而言為70%，對於雙糖化抗體A而言為78%，對於單糖化抗體A而言為82%，且對於非糖化抗體A而言為36%。應注意，對於非糖化抗體A而言顯著性較低，且觀察到之變化相當大。

新皮層區連同胼胝體中之澱粉狀蛋白斑塊減少描繪於圖16中。對於經抗體處理之組測定總澱粉狀蛋白- β 斑塊表面之平均減少：對於抗體A組合物而言為19%，對於雙糖化抗體A而言為27%，對於單糖化抗體A而言為30%，且對於非糖化抗體A而言為10%。發現在總澱粉狀蛋白- β 斑塊數目之平均減少方面，對於抗體A組合物而言為40%，對於雙糖化抗體A而言為46%，對於單糖化抗體A而言為42%，且對於非糖化抗體A而言11%。

在整個海馬區中之澱粉狀蛋白斑塊減少描繪於圖17中。對於經抗體處理之組測定總澱粉狀蛋白- β 斑塊表面之平均減少：對於抗體A組合物而言為12%，對於雙糖化抗體A而言為24%，對於單糖化抗體A而言為24%，且對於非糖化抗體A而言為6%。發現在總澱粉狀蛋白- β 斑塊數目之平均減少方面，對於抗體A組合物而言為36%，對於雙糖化抗體A而言為46%，對於單糖化抗體A而言為37%，且對於非糖化

抗體A而言為3%。

在海馬支腳(澱粉狀變性病之高度易感區)中澱粉狀蛋白斑塊減少顯示於圖18中。對於經抗體處理之組測定總澱粉狀蛋白- β 斑塊表面之平均減少：對於抗體A組合物而言為2%，對於雙糖化抗體A而言為12%，對於單糖化抗體A而言為5%，且對於非糖化抗體A而言為1%。發現在總澱粉狀蛋白- β 斑塊數目之平均減少方面，對於抗體A組合物而言為22%，對於雙糖化抗體A而言為36%，對於單糖化抗體A而言為13%，且對於非糖化抗體A而言為1%。抗體A組合物及主要N-糖化同功異型物s(雙糖化抗體A及單糖化抗體A)顯示減少澱粉狀蛋白- β 斑塊負載及斑塊數目之相當有效性。斑塊負載減少在具有低度或中度澱粉狀變性病之區域中為最為顯著且統計學上最顯著。

總而言之，發現在以抗體A組合物處理後，澱粉狀蛋白- β 斑塊數目之減少為統計學上顯著的，且在所有經量測腦區中兩者均包含抗體A之Asn52糖化同功異型物。與此相反，在以抗體A之非糖化同功異型物(如本發明所詳述，其在純化後自抗體A組合物排除)處理後，在丘腦中發現對澱粉狀蛋白- β 斑塊數目僅具有微小作用，且在其他所研究之腦區中未發現對澱粉狀蛋白- β 斑塊數目具有顯著作用。

吾等亦研究與斑塊尺寸相關之斑塊清除效能。一般而言，發現對於小澱粉狀蛋白- β 斑塊之清除而言，所測試之人類抗A β 抗體的有效性最為顯著。在所有腦區中均觀察到此現象(圖15C、16C、17C及18C)。相反，對於抗體A之非



糖化同功異型物而言，僅觀察到極小或不顯著之趨勢。

抗體 A 及主要 Asn52 糖化同功異型物之比較分析證明減少斑塊負載之可觀能力，而非糖化同功異型物對斑塊減少無顯著作用。

實例 16：抗體 A 組合物活體內結合至澱粉狀蛋白- β 斑塊之藥物動力學。

比較兩個給藥頻率以研究包含如上所定義之單糖化抗體 A 及雙糖化抗體 A 且缺乏非糖化抗體 A 之抗體 A 組合物的結合動力學。

因此，對 PS2APP 轉基因雄性小鼠經由尾部靜脈以兩週間隔 4 次以 0.05、0.1 及 0.3 mg/kg 之量，或以每月間隔 3 次以 0.075、0.15 及 0.45 mg/kg 之量靜脈內注射抗體 A 組合物。為進行比較，以兩週間隔投與一次及兩次 0.1 mg/kg，且以每月間隔投與兩次 0.15 mg/kg。投藥後，所有小鼠在最後投藥兩週後犧牲。製備未經固定之 PS2APP 腦組織用於根據 Paxinos 及 Franklin 在橫向約 1.92 與 1.2 mm 之間徑向切片，該腦組織包括丘腦、海馬形成及皮層區域。使用冷凍切片機將腦以 40 μ m 切片。

免疫螢光試管內免疫染色方法用於偵測結合抗體 A 組合物抗體。因此，於室溫下將腦切片且以濃度為 15 μ g/ml 之偵測抗體（一種共軛至 Cy3(#109-165-003, 批號 49353, Jackson Immuno Research)的經親和力純化之山羊抗人類 (GAH) IgG (H+L)) 培育 1 小時。澱粉狀蛋白- β 斑塊之複染色係藉由在室溫下以濃度為 0.5 μ g/ml 之 BAP-2(一種共軛至

Alexa488 螢光團的抗 A β 之小鼠單株抗體) 培育 1 小時來進行。

使用如上所述 TCS SP2 AOBS 共焦雷射掃描顯微鏡記錄接近小腦的枕骨皮層中之影像。使用 IMARIS 軟體 (Bitplane, Switzerland) 進行電腦輔助影像加工。除需要不同增益設置以供線性信號記錄的兩個最高劑量 0.3 及 0.45 mg/kg 以外，對於較低劑量而言，首先使用軟體之收穫功能 (crop function) 選擇斑塊之影像。在澱粉狀蛋白- β 斑塊位點之結合 GAH-Cy3 讀出臨限值 (T) 後，使用 SURPASS 功能來選擇正體素。對於較低及較高劑量組而言，臨限值設置分別為 19 及 12。作為澱粉狀蛋白- β 斑塊特異性之對照，在以經共軛至 Alexa488 的小鼠單株 BAP2 染色的斑塊之影像雙重標記後，比較 GAH-Cy3 染色之影像，且以不同通道記錄。

使用 IMARIS MeasurementPro 軟體模組對定量描述所有影像進行描述性統計。自低劑量組中所選之澱粉狀蛋白- β 斑塊測定平均體素螢光強度 (MVI) 值，或自高劑量組中之影像測定總信號。基線 MVI (B) 係由於器具雜訊、組織散射信號及脂褐質之自發螢光。為進行背景修正，藉由在除澱粉狀蛋白- β 斑塊以外的區域內量測平均信號強度來測定 B，且隨後自所有經量測影像之 MVI 減去 B ($MVI - B = S$)。與斑塊上之平均強度相似的信號強度 (S) 值由來自每小鼠及劑量組之每一腦切片的 3 至 4 個影像而獲得。對於相容性而言，將信號強度正規化為由先前研究所獲得之參考樣本。

作為參考，在投與0.25 mg/kg之單一劑量後，使用PS2APP小鼠腦切片。量測端點為給藥一週後。

將所有經量測強度值正規化為在以0.25 mg/kg(給藥一週後量測)之抗體A組合物的單一劑量給藥後所獲得之澱粉狀蛋白-β斑塊的平均強度(參見下表)。對於免疫陽性澱粉狀蛋白-β斑塊之平均相對螢光強度而言，在對每一劑量組之3隻動物免疫染色且量測其平均信號強度後藉由CLSM獲得正規化值。僅在較低劑量組中觀察到無可偵測抗體A組合物來源的抗體A之斑塊，此最可能係由於抗體A組合物來源的抗體A之有限或部分佔有斑塊表面，其可在切片製程期間丟失。因此，對於比較分析而言，僅包括免疫陽性斑塊。

PS2APP轉基因小鼠中抗體A組合物之多次靜脈內(團式)投藥後，每一劑量組之平均相對螢光強度顯示於下表中：

劑量-間隔/注射	免疫陽性抗體A組合物 澱粉狀蛋白-β斑塊之正規化平均螢光強度		抗體A組合物 免疫陰性 澱粉狀蛋白-β斑塊之百分比
	%	SD	%
0.25 mg-單一 ¹	100	6	0
0.05 mg-雙週/4 ×	53	2	58
0.075 mg-每月/3 ×	57	6	39
0.15 mg-每月/2 ×	106	6	19
0.1 mg-雙週/1 ×	59	8	45
0.1 mg-雙週/2 ×	83	26	21
0.1 mg-雙週/4 ×	88	12	2
0.15 mg-每月/3 ×	93	19	1
0.3 mg-雙週/4 ×	148	24	0
0.45 mg-每月/3 ×	184	20	0

¹實驗值表示正規化為自單次給藥0.25 mg/kg一週後所獲得之值的強度值。

圖 19 關於 0.1 mg/kg 之連續雙週劑量的數目顯示抗體 A 組合物之結合。兩次應用後，平均強度顯示增加，但免疫染色之程度可觀改變且因此未達到顯著程度。4 次注射後，澱粉狀蛋白- β 斑塊經更均質免疫染色，但平均強度僅略微增加。總而言之，雙週應用之資料明顯指示與應用次數相關之斑塊結合增加的趨勢。

圖 20 關於 0.15 mg/kg 之連續每月劑量的數目顯示抗體 A 組合物之結合。有趣的是，在應用 2 及 3 次後獲得可比性含量。並非期望此為必要的，且此可指示早期效應之起始，其有助於在例如延遲性小神經膠質細胞活化之清除機制中的時間依賴性差異。

關於所投與劑量之抗體 A 組合物的結合功效顯示於圖 21 及 22 中。0.05、0.1 及 0.3 mg/kg 之雙週劑量(圖 21)及 0.075、0.15 及 0.45 mg/kg 之每月劑量(圖 22)明確顯示劑量關係。亦顯著的是，反應並非線性的，且例如小神經膠質細胞之顯葉延遲性活化之額外因素可有助於所觀察之非線性。

因此可得出結論：結合至小鼠 A β 斑塊之抗體 A 組合物為劑量相關的，其指示多劑量為累積性的。

實例 17：對抗原依賴性細胞吞噬作用之分析。

為測定抗體 A 組合物-介導之吞噬細胞效應，將來自 AD 腦薄片之本徵性 A β 斑塊以不同濃度之包含如上所定義之單糖化抗體 A 及雙糖化抗體 A 且缺乏非糖化抗體 A 之抗體 A 組合物預培育，且將其暴露於存活人類初級單核細胞。

自嚴重AD病例(Braak階段IV)製備來自枕骨皮質區之未經固定的人類AD腦組織切片。在添加活細胞之前，將切片以PBS再次水合歷時5分鐘。藉由以所定義之濃度在PBS中培育1小時來應用抗體A組合物抗體。在以PBS洗滌後添加活細胞。在具有來自含有10,000 U/ml盤尼西林(penicillin)及10,000 mg/ml鏈黴素(Gibco #15140-122)之儲備溶液的1%抗生素溶液之RPMI 1640(Gibco #61870-044)培養基中以每毫升0.8及 1.5×10^6 個之濃度使用經預刺激之人類初級單核細胞，且於37°C下將其以5%二氧化碳培育2至4天。製備經預刺激的人類初級單核細胞之方法為此項技術中所熟知，例如藉由使用例如巨噬細胞集落刺激因子(M-CSF)之刺激因子。

培育後，溫和移除培養基且藉由以PBS中之2%甲醛化學固定10分鐘來保存切片。藉由於室溫下以濃度為10 mg/ml之BAP-2(一種共軛至Alexa488螢光團(Molecular Probes: A-20181，單株抗體標記套組)之抗A β 的小鼠單株抗體)培育1小時來進行殘餘A β 斑塊負載之染色。

藉由量測殘餘經染色A β 斑塊之免疫螢光測定對斑塊移除物之量化。將影像記錄於Leica TCS SP2 AOBS共焦雷射掃描顯微鏡上。除在其中代替使用針孔設定為3之HCPL Fluotar 10 $\times$ /0.30目標的一個實施例中之外，於4 Airy之針孔設定下使用HCX PL FL 20 $\times$ /0.40修正目標於488 nm之激發波長下記錄一個光學層。對於所有影像而言，器具設定保持恆定以使得可進行相關定量比較。尤其調節雷射能

量、增益及偏移以使得可在動態範圍內監控信號強度。對於各抗體A組合物濃度而言，於可比位置處記錄來自連續切片之灰色物質區以最小化可能來自斑塊負載中之解剖學差異的波動。在不存在所有抗體A組合物濃度之細胞的情況下，量測抗體A組合物與偵測抗體BAP-2之潛在競爭性結合。使用不相關之人類IgG1(Serotec, PHP010)抗體作為額外對照。使用IMARIS軟體(Bitplane, Switzerland)進行影像分析。藉由強度臨限產生結合至該等斑塊之代表BAP-2目標之BAP-2陽性像素的等值面。使用SurpassPro軟體模組之"等值面功能"計算表面積及總螢光強度值。資料表述為自一個腦切片的5個灰物質區所獲得之平均染色面積及總染色強度值。信號基線由器具雜訊構成，且發現組織散射信號為可忽略的，且因此並不從總強度信號減去。

如圖23中所示，抗體A組合物之定量效應係藉由指示來自人類AD腦切片的A β 斑塊之吞噬作用增加之A β 斑塊染色中的降低來觀測。在以100 ng/ml抗體A組合物預培育40小時後，免疫組織化學揭示明顯可見可染色A β 斑塊的降低。作用極為顯著，且於1及5 mg/ml之抗體A組合物濃度下，A β 斑塊由細胞吞噬作用大體上及增加性地清除，僅殘留5 mg/ml之少量A β 斑塊。表述為相同實驗之面積及強度的基於免疫反應性信號的定量量測顯示於圖24中。

或者，使用A β 共軛之螢光聚苯乙烯珠粒測定抗體A組合物介導之吞噬細胞效應。因此，將螢光珠粒(3 μ m，Fluoresbrite carboxy YG, Polysciences Inc.)與A β 偶合。簡

言之，藉由懸浮液將珠粒洗滌2次且將其於偶合緩衝液(50 mM MES緩衝液，pH 5.2，1% DMSO)中離心。將離心塊(約10 μ l)懸浮於200 μ l偶合緩衝液中且藉由添加20 μ l偶合緩衝液中的20% EDC(乙基-二胺基丙基-碳化二醯亞胺，Pierce)溶液活化。即刻添加20 μ g A β (1-40)或A β (1-42)(於0.1%氫氧化銨中，Bachem)起始偶合反應。培育一夜後，以3 $\times$ 0.5 ml 10 mM Tris.HCl pH 8.0及3 $\times$ 0.5 ml儲存緩衝液(10 mM Tris.HCl pH 8.0，0.05% BSA，0.05% NaN₃)洗滌該等珠粒。將1%懸浮液儲存於4 $^{\circ}$ C下直至使用。作為陰性對照，將Fluoresbrite carboxy NYO(紅色螢光)珠粒與所有-D胺基酸A β (1-40)偶合(於0.1%氫氧化銨中，Bachem)。

使鼠類單核細胞/巨噬細胞(細胞株P388D1)在C24透明組織培養基叢集或C96黑色微定量盤中生長至約50%融合。培養基為具有5% FBS、麩醯胺酸及抗生素之IMEM。為阻斷非特異性淨化劑受體，將10 ml福可達(fuoidan)(Fluka，於水中10 mg/ml)添加至200 ml培養物體積中且將其培育2小時。以連續稀釋添加抗體A組合物且將其預培育30分鐘。添加螢光A β 珠粒懸浮液(20 μ l)且將其培育3小時以使得可進行吞噬作用。將附著細胞以冰冷EDTA劇烈洗滌1次且以PBS劇烈洗滌2次以自細胞表面移除附著凝集物。藉由在Zeiss Axiovert 405下視覺檢驗來監控該等殘餘珠粒，或藉由使用具有444 nm(Exc)及485 nm(Em)過濾器設定之微定量盤螢光計(Fluoroscanner，Labsystems)來量化。

抗體A組合物對藉由P388D1細胞偶合至螢光A β 珠粒之合

成A β 凝集物的吞噬作用之定量效應顯示於圖25中。抗體A組合物劑量反應之定量測定顯示於圖26中。兩個獨立實驗揭示對於EC50而言30至200 ng/ml之範圍及對於MEC而言10至60 ng/ml之範圍。所觀察之變異性可能係由培育化學計量之差異(亦即珠粒與細胞之比率)所引起。在濃度>200 ng/ml以上所觀察之珠粒吞噬作用的降低係由於單價抗體與有限抗原的相互作用。

因此可得出結論：抗體A組合物以劑量相關方式有效地誘導來自AD腦組織切片之A β 斑塊的吞噬作用。

【圖式簡單說明】

圖1顯示重鏈及輕鏈序列插入位點之質體圖。A：顯示pEE 6.4 Mab31 IgG之圖；B：顯示pEE 14.4 Mab31 κ 之圖；及C：顯示pEE 14.4 Mab31之圖。

圖2分析層析圖之實例

圖3文中所述CMT管柱之層析圖。雙糖化及單糖化同功異型物以雙峰1溶離，非糖化同功異型物以峰2溶離。

圖4抗體A同功異型物之完整IgG ESI-MS分析。主峰之分子質量以Da為單位表示。A：非糖化抗體A；B：單糖化抗體A；C：雙糖化抗體A。

圖5所推論抗體N-糖化圖案之流程。僅部分發生之結構由括弧表示。A：複合型；B：混合型；C：寡甘露糖型；GlcNAc=N-乙醯基-葡糖胺；Man=甘露糖；Gal=半乳糖；Fuc=果糖；NeuAc=N-乙醯基-神經胺糖酸。

圖6自MS及HPAEC-PAD分析推論之抗體A Asn306之碳水

化合物結構的圖解表示。僅部分發生之結構以括弧表示。
 GlcNAc=N-乙醯基-葡糖胺；Man=甘露糖；Gal=半乳糖；
 Fuc=果糖；NeuAc=N-乙醯基-神經胺糖酸。

圖7抗體A同功異型物結合至固化纖維狀A β 40(Biacore感應器晶片)。抗體濃度60 nM。所有同功異型物混合物之結合曲線(亦即純化前)亦如所指示顯示。

圖8藉由pepspot分析對抗體A組合物進行抗原決定基繪圖。A)所指示單一重疊十肽點之pepspot信號；B)單一重疊十肽點之信號密度的密度計分析。

圖9解聚合檢定。抗體A組合物及抗體A同功異型物誘導生物素化A β 自凝集A β 釋放。

圖10抗體A組合物且包含抗體A同功異型物自人類腦脊髓液(CSF)捕獲可溶性A β 。來自以2池分析的阿茲海默氏症患者之4個CSF樣本的平均值。兩個免疫沉澱法，接著每池進行西方墨點法，其中藉由西方墨點法之密度測定法量化所捕獲之A β 。給定系列西方墨點法之最高A β 值取作100%。

圖11以抗體A同功異型物活體外間接免疫螢光染色人類澱粉狀蛋白斑塊。在以10 ng/ml抗體A濃度染色後，高度敏感性及特異性偵測試管內本徵性人類 β -澱粉狀蛋白斑塊。對於(A)抗體A組合物；(B)雙糖化抗體A；(C)單糖化抗體A；及(D)非糖化抗體A而言，藉由山羊抗人類(H+L)-Cy3揭示結合抗體A。定標線條=80 μ m。

圖12以共焦顯微法所揭示之糖化抗體A同功異型物活體

內免疫-裝飾PS2APP轉基因小鼠斑塊。免疫裝飾揭示在單次給藥1 mg抗體A同功異型物3天後抗體A同功異型物之活體內結合。關於雙糖化(A)、單糖化(B)及非糖化(C)抗體A同功異型物顯示抗體A同功異型物分佈的各自影像。定標線條=80 μm 。

圖13抗A β 抗體與細胞表面APP之結合分析。藉由流式細胞儀分析結合至經人類APP-轉染之HEK293細胞及未經轉染之對照細胞的抗體。

圖14抗體A非-、單-及雙糖化抗體分子(免疫球蛋白)之流程。

圖15以抗體A組合物(其包含單及雙糖化抗體A)、雙糖化及單糖化抗體A同功異型物(每週靜脈內20 mg/kg)或媒劑處理5個月後的丘腦區中之總斑塊表面(A)、總斑塊數目(B)及斑塊數目及尺寸分佈(C)。統計值係基於"媒劑" (p-值： $* \leq 0.05$ ， $** \leq 0.01$ ， $*** \leq 0.001$)

圖16以抗體A組合物(其包含單及雙糖化抗體A)、雙糖化及單糖化抗體A同功異型物(每週靜脈內20 mg/kg)或媒劑處理5個月後的皮質及胼胝體區中之總斑塊表面(A)、總斑塊數目(B)及斑塊數目及尺寸分佈(C)。統計值係基於"媒劑" (p-值： $* \leq 0.05$ ， $** \leq 0.01$ ， $*** \leq 0.001$)

圖17以抗體A組合物(其包含單及雙糖化抗體A)、雙糖化及單糖化抗體A同功異型物(每週靜脈內20 mg/kg)或媒劑處理5個月後的海馬區中之總斑塊表面(A)、總斑塊數目(B)及斑塊數目及尺寸分佈(C)。統計值係基於"媒劑" (p-值：

* ≤ 0.05 , ** ≤ 0.01 , *** ≤ 0.001)

圖 18 以抗體 A 組合物(其包含單及雙糖化抗體 A)、雙糖化及單糖化抗體 A 同功異型物(每週靜脈內 20 mg/kg)或媒劑處理 5 個月後的腦下腳區中之總斑塊表面(A)、總斑塊數目(B)及斑塊數目及尺寸分佈(C)。統計值係基於"媒劑" (p-值 : * ≤ 0.05 , ** ≤ 0.01 , *** ≤ 0.001)

圖 19 向 PS2APP 小鼠以 0.1 mg/kg 兩週一次給藥(其中 1、2 及 4 次靜脈內施用)後對結合至澱粉狀蛋白- β 斑塊之經免疫染色抗體 A 組合物之螢光密度的量測。最後注射後 2 週時進行分析。

圖 20 向 PS2APP 小鼠以 0.15 mg/kg 每月一次給藥(其中 2 及 3 次靜脈內施用)後對結合至澱粉狀蛋白- β 斑塊之經免疫染色抗體 A 組合物之螢光密度的量測。最後注射後 2 週時進行分析。

圖 21 向 PS2APP 小鼠以 0.05、0.1 及 0.30 mg/kg 兩週一次注射 4 次後對結合至澱粉狀蛋白- β 斑塊之經免疫染色抗體 A 組合物之螢光密度的量測，此表明劑量相關性澱粉狀蛋白斑塊結合。最後注射後 2 週時進行分析。

圖 22 向 PS2APP 小鼠以 0.075、0.15 及 0.45 mg/kg 每月一次注射 3 次後對結合至澱粉狀蛋白- β 斑塊之經免疫染色抗體 A 組合物之螢光密度的量測，此表明劑量相關性澱粉狀蛋白斑塊結合。最後注射後 2 週時進行分析。

圖 23 以指定濃度之抗體 A 組合物與存活已分化初級人類巨噬細胞(每毫升 80 萬個細胞)一起培育 40 小時後，以抗 A β

鼠類單株抗體(BAP-2)相對於A β 染色人類AD腦切片。結果顯示澱粉狀蛋白負載減少，其指示抗體A組合物對澱粉狀蛋白- β 斑塊的抗原依賴性細胞吞噬作用。定標線條=300 μm 。

圖24當以每毫升80萬個細胞培育時抗體A組合物對來自人類AD腦切片之澱粉狀蛋白- β 斑塊的劑量反應。(A)顯示總斑塊面積且(B)顯示染色密度。

圖25以0、0.1、1及10 $\mu\text{g/ml}$ 抗體A組合物培育之P388D1細胞的螢光顯微圖(分別為A至D)。

圖26使用A β 共軛螢光珠子及P388D1細胞對抗體A組合物的劑量反應之定量量測(以相對螢光單位(RFU)顯示)。兩個獨立實驗指示抗體A組合物功效的主要範圍。

圖27顯示抗體A在重鏈恆定區域(Asn 306；起始二行)中及重鏈可變區域(Asn 52；第三及第四行)中之不同多糖結構的表格。

序列表

<110> 瑞士商赫孚孟拉羅股份公司
<120> 可變區域抗體之糖化
<130> K1314 TW S3
<140> 095146304
<141> 2006/12/11
<150> EP 05 02 7090.9
<151> 2005-12-12
<160> 32
<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 378
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 抗體A之VH-區域

<400> 1
caggtggaat tgggtgaaag cggcgggcggc ctggtgcaac cgggcggcag cctgcgtctg 60
agctgcgcgg cctccggatt taccttttagc agctatgcga tgagctgggt gcgccaagcc 120
cctgggaagg gtctcgagt ggtgagcgct attaatgctt ctggtactcg tacttattat 180
gctgattctg ttaagggtcg ttttaccatt tcacgtgata attcgaaaaa caccctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgcggaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtggtaag 300
ggtaatactc ataagcctta tggttatgtt cgttattttg atgtttgggg ccaaggcacc 360
ctggtgacgg ttagctca 378

<210> 2
<211> 126
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 抗體A之VH-區域

<400> 2

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Lys Gly Asn Thr His Lys Pro Tyr Gly Tyr Val Arg Tyr
100 105 110

Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 3
<211> 42
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> A-β

<400> 3

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

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
35 40

<210> 4
<211> 52
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 包含肽序列之A-β

<400> 4

Ile Ser Glu Val Lys Met Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr
1 5 10 15

Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser
20 25 30

Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
35 40 45

Thr Val Ile Val
50

<210> 5
<211> 1391
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223>具有抗體A的Fc-區域之重鏈

<400> 5
caggtggaat tgggtgaaag cggcggcggc ctggtgcaac cgggcggcag cctgcgtctg 60
agctgcgcgg cctccggatt tacctttagc agctatgcga tgagctgggt gcgccaagcc 120
cctgggaagg gtctcgagtg ggtgagcgct attaatgctt ctggtactcg tacttattat 180
gctgattctg ttaagggtcg ttttaccatt tcacgtgata attcgaaaa caccctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgcggaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtggtaag 300
ggtaatactc ataagcctta tggttatgtt cgttattttg atgtttgggg ccaaggcacc 360
ctggtgacgg ttagctcagc ctccaccaag ggtccatcgg tcttccccct ggcaccctcc 420
tccaagagca cctctggggg cacagcggcc ctgggctgcc tgggtcaagga ctacttcccc 480
gaaccggtga cgggtgctgt gaactcaggc gccctgacca gcggcgtgca caccttcccc 540
gctgtcctac agtcctcagg actctactcc ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc 600
agcttgggca cccagacctc catctgcaac gtgaatcaca agcccagcaa caccaagggtg 660
gacaagaaag ttgagcccag atatcgtgcg atatcgtgca atcttgtgac aaaactcaca 720
catgcccacc gtgcccagca cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc 780
caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg 840
acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc 900
ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgg gtggtcagcg 960
tcctcacctg cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca 1020

```

acaaagccct cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag 1080
aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc 1140
tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg 1200
ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccggtgt ggactccgac ggctccttct 1260
tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat 1320
gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tccctgtctc 1380
cgggtaaata a 1391

```

<210> 6
 <211> 456
 <212> PRT
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 具有抗體A的Fc-區域之重鏈

<400> 6

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

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

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

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

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

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

Ala	Arg	Gly	Lys	Gly	Asn	Thr	His	Lys	Pro	Tyr	Gly	Tyr	Val	Arg	Tyr
			100					105					110		

Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser
		115					120							125	

Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	130	135	140	
Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	145	150	155	160
Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	165	170	175	
His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	180	185	190	
Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	195	200	205	
Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	210	215	220	
Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	225	230	235	240
Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	245	250	255	
Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	260	265	270	
Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	275	280	285	
Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	290	295	300	
Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	305	310	315	320
Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	325	330	335	
Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	340	345	350	
Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr				

355

360

365

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
370 375 380

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
385 390 395 400

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
405 410 415

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
420 425 430

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
435 440 445

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 7
<211> 648
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 抗體A之輕鏈

<400> 7
gatatcgtgc tgaccagag cccggcgacc ctgagcctgt ctccgggcca acgtgcgacc 60
ctgagctgca gagcgagcca gagcgtgagc agcagctatc tggcgtggta ccagcagaaa 120
ccaggtcaag caccgcgtct attaatattat ggcgcgagca gccgtgcaac tgggggtcccg 180
gcgcgttttta gcggctctgg atccggcacg gattttaccc tgaccattag cagcctggaa 240
cctgaagact ttgcgactta ttattgcctt cagatttata atatgcctat tacctttggc 300
cagggtagca aagttgaaat taaacgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420
tatccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 480
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacctg 540
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag 600
ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgttag 648

<210> 8
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 抗體A之輕鏈

<400> 8

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Ile Tyr Asn Met Pro
 85 90 95

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

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 165 170 175

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 9
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人造序列

<220>
 <223> CDR1重鏈

<400> 9
 ggatttacct ttagcagcta tgcgatgagc

30

<210> 10
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人造序列

<220>
 <223> CDR1重鏈

<400> 10

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

<210> 11
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> 人造序列

<220>
 <223> CDR2重鏈

<400> 11
 gctattaatg cttctggtac tcgtacttat tatgctgatt ctgttaaggg t

51

<210> 12
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人造序列

<220>
 <223> CDR2重鏈

<400> 12

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

1 5 10 15

Gly

<210> 13
<211> 51
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> CDR3重鏈

<400> 13
ggtaagggtataactcataa gccttatggt tatgttcggt attttgatgt t 51

<210> 14
<211> 17
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> CDR3重鏈

<400> 14

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

Val

<210> 15
<211> 36
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> CDR1輕鏈

<400> 15
agagcgagcc agagcgtgag cagcagctat ctggcg 36

<210> 16
<211> 12
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> CDR1輕鏈

<400> 16

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

<210> 17
<211> 21
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223>CDR2輕鏈

<400> 17
ggcgcgagca gccgtgcaac t

21

<210> 18
<211> 7
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223>CDR2輕鏈

<400> 18

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 19
<211> 24
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223>CDR3輕鏈

<400> 19
cttcagattt ataatatgcc tatt

24

<210> 20
<211> 8
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223>CDR3輕鏈

<400> 20

Leu Gln Ile Tyr Asn Met Pro Ile
1 5

<210> 21



<211> 648
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223>抗體A之輕鏈

<400> 21
gatatcgtgc tgacccagag cccggcgacc ctgagcctgt ctccgggcga acgtgcgacc 60
ctgagctgca gagcgagcca gagcgtgagc agcagctatc tggcgtggta ccagcagaaa 120
ccagggtcaag caccgcgtct attaatattat ggcgcgagca gccgtgcaac tgggggtccc 180
gcgcgtttta gcggtctctg atccggcacg gatatttacc tgaccattag cagcctggaa 240
cctgaagact ttgcgactta ttattgcctt cagatttata atatgcctat tacctttggc 300
cagggtacga aagttgaaat taaacgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttccc 360
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420
tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg cctccaatc gggtaactcc 480
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacctg 540
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag 600
ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtggttag 648

<210> 22
<211> 215
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223>抗體A之輕鏈

<400> 22

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu

[illegible]

<210>	23
<211>	3984
<212>	DNA
<213>	人造序列

<220>
<223> 編碼具有抗體A的Fc-區域之重鏈的替代序列

```
<400> 23
atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt taagaggtga ttcattggaga 60
aatagagaga ctgagtgtga gtgaacatga gtgagaaaaa ctggatttgt gtggcatttt 120
ctgataacgg tgtccttctg tttgcagggtg tccagtgctca ggtggagctg gtggagtctg 180
ggggaggcct ggtccagcct ggggggtccc tgagactctc ctgtgcagcg tctggattca 240
ccttcagtag ctatgccatg agctgggtcc gccaggctcc aggcaagggg ctcgagtggg 300
```



tgtccgccat aaacgccagc ggtaccgcga cctactatgc agactccgtg aagggccgat	360
tcaccatctc cagagacaat tccaagaaca cgctgtatct gcaaatgaac agcctgagag	420
ccgaggacac ggctgtgtat tactgtgcca gaggcaaggg gaacacccac aagccctacg	480
gctacgtacg ctactttgac gtgtggggcc aaggaaccct ggtcaccgtc tcctcaggtg	540
agtcctcaca acctctctcc tgcggccgca gcttgaagtc tgaggcagaa tcttgtccag	600
ggctctatcg actcttctga gaattagggg ctgacagttg atggtgacaa tttcagggtc	660
agtgactgtc tggtttctct gaggtgagac tggaatatag gtcaccttga agactaaaga	720
gggggtccagg ggcttttctg cacaggcagg gaacagaatg tggaacaatg acttgaatgg	780
ttgattcttg tgtgacacca agaattggca taatgtctga gttgcccaag ggtgatctta	840
gctagactct ggggtttttg tcgggtacag aggaaaaacc cactattgtg attactatgc	900
tatggactac tggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc tcaggtaaga atggcctctc	960
caggtcttta tttttaacct ttgttatgga gttttctgag cattgcagac taatcttgga	1020
tatttgccct gagggagccg gctgagagaa gttgggaaat aaatctgtct agggatctca	1080
gagccttttag gacagattat ctccacatct ttgaaaaact aagaatctgt gtgatgggtg	1140
tggtggagtc cctggatgat gggataggga ctttgagggc tcatttgagg gagatgctaa	1200
aacaatccta tggctggagg gatagttggg gctgtagttg gagattttca gtttttagaa	1260
tgaagtatta gctgcaatac ttcaaggacc acctctgtga caaccatttt atacagtatc	1320
caggcatagg gacaaaaagt ggagtggggc actttcttta gatttgtgag gaatgttcca	1380
cactagattg tttaaaactt catttgttgg aaggagctgt cttagtgatt gagtcaaggg	1440
agaaaggcat ctagcctcgg tctcaaaagg gtagttgctg tctagagagg tctggtggag	1500
cctgcaaaag tccagctttc aaaggaacac agaagtatgt gtatggaata ttagaagatg	1560
ttgcttttac tcttaagttg gttcctagga aaaatagtta aatactgtga ctttaaaatg	1620
tgagaggggt ttcaagtact ctttttttta aatgtccaaa atttttgtca atcaatttga	1680
ggctcttgtt gtgtagaact gacattactt aaagtttaac cgaggaatgg gagtgaggct	1740
ctctcatacc ctattcagaa ctgactttta acaataataa attagttta aaatattttt	1800
aaatgaattg agcaatgttg agttgagtca agatggccga tcagaaccgg aacacctgca	1860
gcagctggca ggaagcaggt catgtggcaa ggctatttgg ggaagggaaa ataaaaccac	1920
taggtaaact tgtagctgtg gtttgaagaa gtgggttttga aacactctgt ccagccccac	1980

caaaccgaaa	gtccaggctg	agcaaaacac	cacctgggta	atttgcat	ctaaaataag	2040
ttgaggattc	agccgaaact	ggagaggtcc	tcttttaact	tattgagttc	aaccttttaa	2100
tttttagcttg	agtagttcta	gtttcccaa	acttaagttt	atcgacttct	aaaatgtatt	2160
tagaattcga	gctcgttaca	gctttctggg	gcaggccagg	cctgaccttg	gctttggggc	2220
agggaggggg	ctaaggtgag	gcaggtggcg	ccagcaggtg	cacacccaat	gcccattgagc	2280
ccagacactg	gacgctgaac	ctcgcggaca	gttaagaacc	caggggcctc	tgcgctggg	2340
cccagctctg	tcccacaccg	cggtcacatg	gcaccacctc	tcttgagcc	tccaccaagg	2400
gcccattcgt	cttccccctg	gcacctcct	ccaagagcac	ctctgggggc	acagcggccc	2460
tgggctgcct	ggtcaaggac	tacttccccg	aaccggtgac	ggtgtcgtgg	aactcaggcg	2520
cctgaccag	cggcgtgcac	accttccccg	ctgtcctaca	gtcctcagga	ctctactccc	2580
tcagcagcgt	ggtgaccgtg	ccctccagca	gcttgggcac	ccagacctac	atctgcaacg	2640
tgaatcacia	gcccagcaac	accaaggtgg	acaagaaagt	tggtgagagg	ccagcacagg	2700
gagggagggg	gtctgctgga	agccaggctc	agcgtcctg	cctggacgca	tcccggctat	2760
gcagccccag	tccagggcag	caaggcaggc	cccgtctgcc	tcttcacccg	gagcctctgc	2820
ccgccccact	catgctcagg	gagagggctc	tctggctttt	tccaggctc	tgggcaggca	2880
caggctaggt	gcccctaacc	caggccctgc	acacaaaggg	gcaggtgctg	ggctcagacc	2940
tgccaagagc	catatccggg	aggacctgc	ccctgacctc	agcccacccc	aaaggccaaa	3000
ctctccactc	cctcagctcg	gacaccttct	ctctcccag	attccagtaa	ctcccaatct	3060
tctctctgca	gagcccaa	cttgtgacaa	aactcacaca	tgcccaccgt	gcccaggtaa	3120
gccagcccag	gcctcgcct	ccagctcaag	gcgggacagg	tgccctagag	tagcctgcat	3180
ccagggacag	gccccagccg	ggtgctgaca	cgtccacctc	catctcttcc	tcagcacctg	3240
aactcctggg	gggaccgtca	gtcttctct	tcccccaaa	acccaaggac	acctcatga	3300
tctcccggac	ccctgaggtc	acatgcgtgg	tggtggacgt	gagccacgaa	gacctgagg	3360
tcaagttcaa	ctggtacgtg	gacggcgtgg	aggtgcataa	tgccaagaca	aagccgcggg	3420
aggagcagta	caacagcacg	taccgtgtgg	tcagcgtcct	caccgtcctg	caccaggact	3480
ggctgaatgg	caaggagtac	aagtgcagg	tctccaacaa	agccctccca	gcccccatcg	3540
agaaaaccat	ctccaaagcc	aaaggtggga	cccgtggggg	gcgagggccca	catggacaga	3600
ggccggctcg	gcccacccctc	tgccctgaga	gtgaccgctg	taccaacctc	tgtccctaca	3660
gggcagcccc	gagaaccaca	ggtgtacacc	ctgcccccat	cccgggatga	gctgaccaag	3720

```

aaccagggtca gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 3780
tgaggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 3840
gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc accgtggaca agagcagggtg gcagcagggg 3900
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 3960
ctctccctgt ccccgggcaa atga 3984

```

```

<210> 24
<211> 3202
<212> DNA
<213> 人造序列

```

```

<220>
<223> 編碼抗體A之輕鏈的替代序列

```

```

<400> 24
atggacatga gggctcctcgc tcagctcctg gggctcctgc tgctctgttt cccaggtaag 60
gatggagaac actagcagtt tactcagccc aggggtgctca gtactgcttt actattcagg 120
gaaattctct tacaacatga ttaattgtgt ggacatttgt ttttatgttt ccaatctcag 180
gcgccagatg tgatatcgtg ttgacgcagt ctccagccac cctgtctttg tctccagggg 240
aaagagccac cctctcctgc cgggccagtc agagtgttag cagcagctac ttagcctggt 300
accagcagaa acctggccag gcgccaggc tcctcatcta tggcgcatcc agcagggcca 360
ctggcgtgcc agccaggttc agtggcagtg ggtctgggac agacttcact ctcacatca 420
gcagcctgga gcctgaagat ttgcgcacct attactgtct gcagatttac aacatgccta 480
tcacgttcgg ccaagggacc aaggtggaaa tcaaacgtga gtagaattta aactttgcgg 540
ccgcctagac gtttaagtgg gagatttgga ggggatgagg aatgaaggaa cttcaggata 600
gaaaagggtc gaagtcaagt tcagctccta aaatggatgt gggagcaaac tttgaagata 660
aactgaatga cccagaggat gaaacagcgc agatcaaaga ggggcctgga gctctgagaa 720
gagaaggaga ctcatccgtg ttgagtttcc acaagtactg tcttgagttt tgcaataaaa 780
gtgggatagc agagttgagt gagccgtagg ctgagttctc tcttttgtct cctaagtttt 840

tatgactaca aaaatcagta gtatgtcctg aaataatcat taagctgttt gaaagtatga 900
ctgcttgcca tgtagatacc atgtcttgct gaatgatcag aagaggtgtg actcttattc 960
taaaatttgt cacaaaatgt caaaatgaga gactctgtag gaacgagtcc ttgacagaca 1020
gctcaagggg tttttttcct ttgtctcatt tctacatgaa agtaaaattg aaatgatctt 1080
ttttattata agagtagaaa tacagttggg tttgaactat atgttttaat ggccacgggt 1140

```

ttgtaagaca tttgggtcctt tgttttccca gttattactc gattgtaatt ttatatcgcc	1200
agcaatggac tgaaacggtc cgcaacctct tctttacaac tgggtgacct cgcggtctgtg	1260
ccagccattt ggcgttcacc ctgccgctaa gggccatgtg aacccccgcg gtagcatccc	1320
ttgctccgcg tggaccactt tcctgaggca cagtgatagg aacagagcca ctaatctgaa	1380
gagaacagag atgtgacaga ctacactaat gtgagaaaaa caaggaaagg gtgacttatt	1440
ggagatttca gaaataaaat gcatttatta ttatattccc ttattttaat tttctattag	1500
ggaattagaa agggcataaa ctgctttatc cagtgttata ttaaagctt aatgtatata	1560
atctttttaga ggtaaaatct acagccagca aaagtcattg taaatattct ttgactgaac	1620
tctcactaaa ctctctaaa ttatatgtca tattaactgg ttaaattaat ataaatttgt	1680
gacatgacct taactgggta ggtaggatat ttttcttcat gcaaaaatat gactaataat	1740
aatttagcac aaaaatattt cccaatactt taattctgtg atagaaaaat gtttaactca	1800
gctactataa tcccataatt ttgaaaacta tttattagct tttgtgttg acccttcct	1860
agccaaaggc aactatttaa ggacccttta aaactcttga aactacttta gagtcattaa	1920
gttatttaac cacttttaat tactttaaaa tgatgtcaat tcccttttaa ctattaattt	1980
attttaaggg gggaaaggct gtcataatt ctattgtttt tcttggtaaa gaactctcag	2040
ttttcgtttt tactacctct gtcaccaag agttggcatc tcaacagagg ggactttccg	2100
agaggccatc tggcagttgc ttaagatcag aagtgaagtc tgccagttcc tcccaggcag	2160
gtggcccaga ttacagttga cctgttctgg tgtggctaaa aattgtccca tgtgggtaca	2220
aaccattaga ccagggctctg atgaattgct cagaatattt ctggacaccc aaatacagac	2280
cctggcttaa ggccctgtcc atacagtagg tttagcttgg ctacaccaa ggaagccata	2340
cagaggctaa tatcagagta ttcttggaag agacaggaga aaatgaaagc cagtttctgc	2400
tcttacctta tgtgcttgtg ttcagactcc caaacatcag gagtgtcaga taaactggtc	2460
tgaatctctg tctgaagcat ggaactgaaa agaattgagt ttcagggaag aaaggcaata	2520
gaaggaagcc tgagaatacg gatcaattct aaactctgag ggggtcggat gacgtggcca	2580
ttctttgcct aaagcattga gtttactgca aggtcagaaa agcatgcaaa gccctcagaa	2640
tggctgcaaa gagctccaac aaaacaattt agaactttat taaggaatag ggggaagcta	2700
ggaagaaact caaaacatca agattttaaa tacgcttctt ggtctccttg ctataattat	2760
ctgggataag catgctgttt tctgtctgtc cctaacatgc cctgtgatta tccgcaaaca	2820
acacacccaa gggcagaact ttgttactta aacaccatcc tgtttgcttc tttcctcagg	2880

```

aactgtggct gcaccatctg tcttcattctt cccgccatct gatgagcagt tgaaatctgg 2940
aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc agagaggcca aagtacagtg 3000
gaaggtggat aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag agtgtcacag agcaggacag 3060
caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg agcaaagcag actacgagaa 3120
acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg agctcgcccc tcacaaagag 3180
cttcaacagg ggagagtgtt ag 3202

```

```

<210> 25
<211> 1428
<212> DNA
<213> 人造序列

```

```

<220>
<223> 具有抗體A的Fc區域且具有前導序列之重鏈

```

```

<400> 25
atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt cctgtcccag 60
gtggaattgg tggaaagcgg cggcggcctg gtgcaaccgg gcggcagcct gcgtctgagc 120
tgcgcggcct ccggatttac cttagcagc tatgcgatga gctgggtgcg ccaagcccct 180
gggaagggtc tcgagtgggt gagcgctatt aatgcttctg gtactcgtag ttattatgct 240
gattctgtta agggtcgttt taccatttca cgtgataatt cgaaaaacac cctgtatctg 300
caaatgaaca gcctgcgtgc ggaagatacg gccgtgtatt attgcgcgcg tggttaagggt 360
aatactcata agccttatgg ttatgttcgt tattttgatg tttggggcca aggcaccctg 420
gtgacggtta gctcagcctc caccaagggt ccatcggtct tccccctggc accctcctcc 480
aagagcacct ctgggggcac agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa 540
ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggtc 600
gtcctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc 660
ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac 720
aagaaagttg agcccaaadc ttgtgacaaa actcacacat gcccaccgtg cccagcacct 780
gaactcctgg ggggaccgtc agtcttcctc tccccccaa aaccaagga caccctcatg 840
atctcccga cccctgaggt cacatgcgtg gtggtggacg tgagccacga agaccctgag 900
gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg 960
gaggagcagt acaacagcac gtaccgggtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac 1020

```

```

tggctgaatg gcaaggagta caagtgaag gtctccaaca aagccctccc agcccccatc 1080
gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc 1140
ccatcccggg atgagctgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc 1200
tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag 1260
accacgcctc cctgtctgga ctccgacggc tccttcttcc tctacagcaa gctcacctg 1320
gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg 1380
cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc ctgtctccgg gtaaata 1428

```

<210> 26
 <211> 475
 <212> PRT
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 具有抗體A的Fc區域且具有前導序列之重鏈

<400> 26

```

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1           5           10           15

```

```

Val Leu Ser Gln Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
          20           25           30

```

```

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
          35           40           45

```

```

Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
          50           55           60

```

```

Glu Trp Val Ser Ala Ile Asn Ala Ser Gly Thr Arg Thr Tyr Tyr Ala
65           70           75           80

```

```

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
          85           90           95

```

```

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
          100          105          110

```

```

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Lys Gly Asn Thr His Lys Pro Tyr Gly Tyr
          115          120          125

```

```

Val Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

```

130					135					140					
Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser
145					150					155					160
Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp
				165					170					175	
Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr
			180					185					190		
Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr
		195					200					205			
Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln
	210					215						220			
Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp
225					230					235					240
Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro
				245					250					255	
Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro
			260					265					270		
Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr
		275					280					285			
Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn
	290					295					300				
Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg
305					310					315					320
Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val
				325					330					335	
Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser
			340					345					350		
Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys
		355					360					365			

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
370 375 380

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
385 390 395 400

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
405 410 415

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
420 425 430

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
435 440 445

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
450 455 460

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470 475

<210> 27
<211> 708
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223>具有前導序列之抗體A輕鏈

<400> 27
atggtgttgc agaccaggt cttcatttct ctgttgctct ggatctctgg tgcctacggg 60
gatatcgtgc tgaccagag cccggcgacc ctgagcctgt ctccgggcga acgtgcgacc 120
ctgagctgca gagcgagcca gagcgtgagc agcagctatc tggcgtggta ccagcagaaa 180
ccaggtcaag caccgcgtct attaatattat ggcgcgagca gccgtgcaac tgggggtccc 240
gcgcgtttta gcggtctctg atccggcacg gattttaccc tgaccattag cagcctggaa 300
cctgaagact ttgcgactta ttattgcctt cagatttata atatgcctat tacctttggc 360
cagggtagca aagttgaaat taaacgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttccc 420
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 480
tatccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg cctccaatc gggtaactcc 540
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacctg 600

acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 660
ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtggttag 708

<210> 28
<211> 235
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223>具有前導序列之抗體A輕鏈

<400> 28

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
35 40 45

Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
50 55 60

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Val Pro
65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Ile
100 105 110

Tyr Asn Met Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
115 120 125

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
130 135 140

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
145 150 155 160

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
165 170 175

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
180 185 190

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
195 200 205

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
210 215 220

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 29
<211> 31
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223>MS-Roche #7.9.H7_Ig_κ有義引子

<400> 29
acgtaagctt gccgccacca tgggtgttgca g 31

<210> 30
<211> 28
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223>MS-Roche #7.9.H7_Ig_κ反義引子

<400> 30
acgtgaattc ctaacactct cccctgtt 28

<210> 31
<211> 31
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223>MS-Roche #7.9.H7_IgG1有義引子

<400> 31
acgtaagctt gccgccacca tgaaacacct g 31

<210> 32
<211> 28
<212> DNA
<213> 人造序列



<220>

<223> MS-Roche #7.9.H7_IgG1反義引子

<400> 32

acgtgaattc tcatttaccc ggagacag

28

五、中文發明摘要：

本發明係關於一種經純化抗體分子製劑，其特徵在於重鏈可變區域(V_H)至少一個抗原結合位點包含糖化天冬醯胺酸(Asn)。更特定言之，本發明提供一種抗體分子，其可特異性識別 β -A4肽/ $A\beta$ 4。本發明尤其係關於抗體混合物，其包含在該重鏈可變區域中具有一或兩個糖化天冬醯胺酸(Asn)的糖化抗原結合位點，亦即在該重鏈可變區域(V_H)中包含糖化Asn之抗體同功異型物的混合物。本發明亦揭示包含經特異性糖化之抗體同功異型物的組合物或抗體製劑。此外，本發明提供此等抗體之醫藥學及診斷用途。例如，該等抗體同功異型物可用於澱粉樣變性病(amyloidogenesis)或澱粉狀蛋白斑塊形成之醫藥學干擾及/或用於該等病症之診斷。

六、英文發明摘要：

十、申請專利範圍：

1. 一種經純化抗體分子，其可特異性識別 β -A4肽/A β 4，其中該抗體分子之特徵在於該抗體分子至少一個抗原結合位點在重鏈可變區域(V_H)中包含糖化天冬醯胺酸(Asn)，其中該重鏈可變區域(V_H)之糖化天冬醯胺酸(Asn)係處於SEQ ID NO: 2之位置52或SEQ ID NO: 6之位置52，且其中該V_H係由以下序列編碼：

(a)包含如SEQ ID NO: 1所示核苷酸序列之核酸分子：

```

CAGGTGGAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGT
GCAACCGGGCGGCA
GCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCCTCCGGATTTACCT
TTAGCAGCTATGCG
ATGAGCTGGGTGCGCCAAGCCCCTGGGAAGGGTCT
CGAGTGGGTGAGCG
CTATTAATGCTTCTGGTACTCGTACTTATTATGCTG
ATTCTGTTAAGGGTC
GTTTTACCATTTCACGTGATAATTCGAAAAACACCC
TGTATCTGCAAATG
AACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGTATTA
TTGCGCGCGTGGTA
AGGGTAATACTCATAAGCCTTATGGTTATGTTTCGTT
ATTTTGATGTTTGGG
GCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA；
  
```

(b)編碼具有如SEQ ID NO: 2所示胺基酸序列的多肽之核

酸分子：

QVELVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSW
VRQAPGK
GLEWVSAINASGTRTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSL
RAEDTAVYYCARGKGNTHKPYGYVRYFDVWGQGT
LVTSS (SEQ ID NO. 2)；

- (c)可與(a)或(b)之核酸分子於高度嚴格條件下雜交，且編碼可結合至如以下胺基酸序列所示之 β -A4肽/A β 4或可結合至包含至少15個胺基酸之其片段的多肽之核酸分子：

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMV
GGVVIA (SEQ ID NO: 3)

- (d)可與(a)或(b)之核酸分子於高度嚴格條件下雜交，且編碼可結合至如以下胺基酸序列所示 β -A4肽/A β 4上的至少兩個區域或可結合至包含至少15個胺基酸之SEQ ID NO. 3片段的至少兩個區域的多肽之核酸分子：

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMV
GGVVIA (SEQ ID NO: 3)

藉此該 β -A4肽A β 4或其該片段上之兩個區域包含位置3至6上及位置18至26上之胺基酸；或

- (e)經退化為如(a)至(d)中任一項所定義之核酸序列的核酸序列。

2. 如請求項1之經純化抗體分子，其中該重鏈可變區域(V_H)

中之糖化天冬醯胺酸(Asn)係處於CDR2區域。

3. 如請求項1之經純化抗體分子，其中該 β -A4肽/A β 4具有以下序列：

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGG
VVIA (SEQ ID NO: 3)

或該序列之至少15個胺基酸的部分，其中該部分包含位置3至6及位置18至26之胺基酸。

4. 如請求項1至3中任一項之經純化抗體分子，其中該包含糖化天冬醯胺酸(Asn)之可變區域係包含於選自由以下重鏈組成之群的重鏈：

(a)由如SEQ ID NO: 5、23或25所示之核酸分子編碼的重鏈多肽；

(b)具有如SEQ ID NO: 6或26所示之胺基酸分子的重鏈多肽；

(c)由可與(a)中所定義之核酸分子於高度嚴格條件下雜交，且編碼可結合至如以下胺基酸序列所示之 β -A4肽/A β 4的多肽之核酸分子編碼之重鏈多肽：

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI
GLMVGGVVIA (SEQ ID NO: 3)

或其包含至少15個胺基酸之片段；或

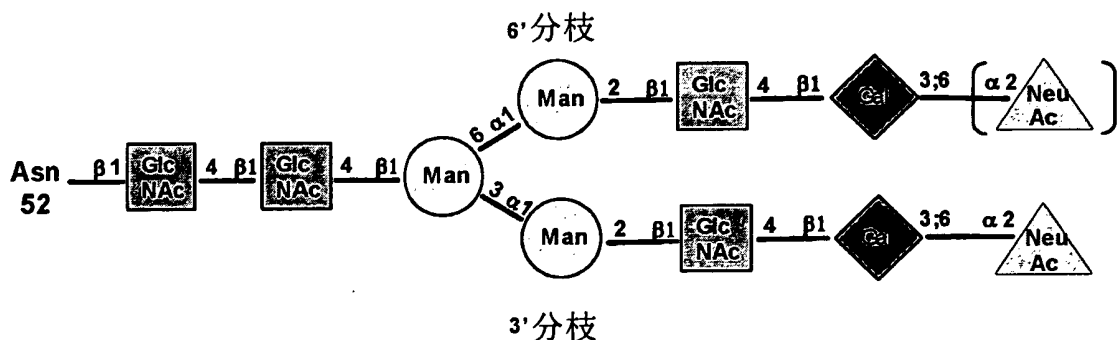
(d)由可與(a)中所定義之核酸分子於高度嚴格條件下雜交，且編碼可結合至如以下胺基酸序列所示之 β -A4肽/A β 4上的至少兩個區域或可結合至包含至少15個胺基酸之SEQ ID NO. 3片段的至少兩個區域的多肽之核酸

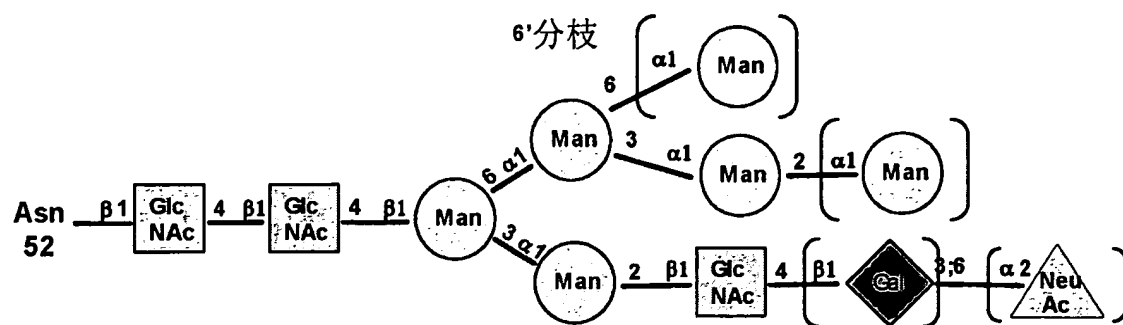
分子編碼的重鏈多肽：

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGGVIA (SEQ ID NO: 3)

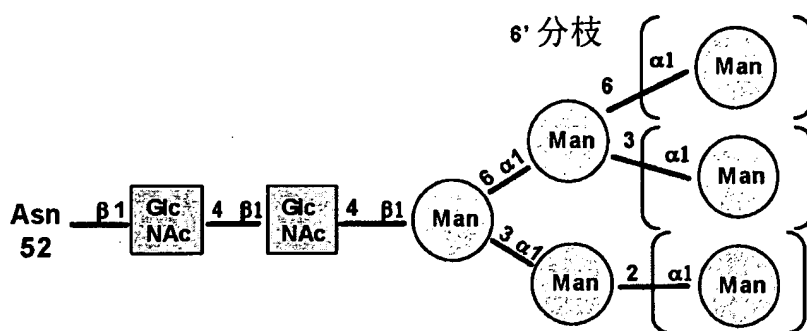
其中 β -A4肽A β 4或其該片段上之兩個區域包含位置3至6及位置18至26上之該等胺基酸。

5. 如請求項1至3中任一項之經純化抗體分子，其中兩個抗原結合位點在該重鏈可變區域(V_H)包含該糖化Asn。
6. 如請求項5之經純化抗體分子，其中該重鏈(V_H)之CDR2區域包含該糖化Asn。
7. 如請求項1至3中任一項之經純化抗體分子，其中該Asn為SEQ ID NO: 2位置52上之Asn或為SEQ ID NO: 6位置52上之Asn。
8. 如請求項1至3中任一項之經純化抗體分子，其中該 V_H 區域中Asn上之糖化作用係選自由以下類型組成之群：
 - (a)雙觸角複合型糖結構；
 - (b)雙觸角混合型糖結構；
 - (c)雙觸角寡甘露糖型糖結構；及
 - (d)如下任一結構的糖雙觸角結構：

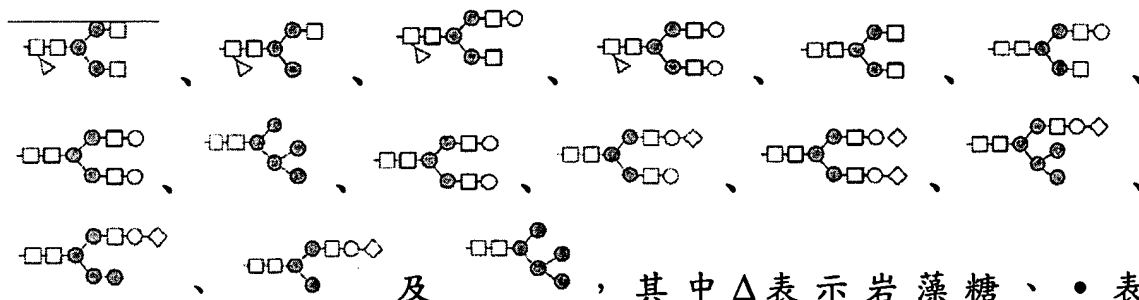




3'分枝



3'分枝



其中 Δ 表示岩藻糖、 $\bullet$ 表示甘露糖、 $\square$ 表示N-乙酰基葡萄糖胺、 $\circ$ 表示半乳糖及 $\diamond$ 表示N-乙酰基神经胺糖酸。

9. 如請求項8之經純化抗體分子，其中該糖結構並不包含核心岩藻糖化作用。
10. 如請求項2或3之經純化抗體分子，其中該CDR-2區域具有如SEQ ID NO：12所示之胺基酸序列。
11. 如請求項1至3中任一項之經純化抗體分子，其係經重組產生。
12. 如請求項1至3中任一項之經純化抗體分子，其係在CHO-

細胞中產生。

13. 如請求項12之經純化抗體分子，其中該CHO細胞為CHO K1或CHO K1 SV。
14. 一種製備如請求項1至13中任一項所定義之抗體分子之方法，其包含以下步驟：
 - (a) 在哺乳動物經培養細胞中，重組性表現編碼如請求項1至10中任一項所定義之抗體分子的異源性核酸分子；
 - (b) 藉由包含以下步驟之方法純化該經重組性表現之抗體分子：
 - (b1) 蛋白A管柱純化；
 - (b2) 離子交換管柱純化；及
 - (b3) 尺寸排阻管柱純化。
15. 如請求項14之方法，其中該離子交換管柱純化包含陽離子交換層析。
16. 如請求項14或15之方法，其另外包含一額外步驟(c)，即一分析層析及/或另一濃縮步驟。
17. 一種組合物，其包含一抗體分子，其中該抗體分子之特徵在於該抗體分子之至少一個抗原結合位點在該重鏈可變區域(V_H)中包含糖化天冬醯胺酸(Asn)，其中該抗體分子為單糖化抗體分子或雙糖化抗體分子，或包含該單糖化抗體分子及該雙糖化抗體分子之混合物之組合物，其中該單糖化抗體分子在該重鏈可變區域中包含糖化天冬醯胺酸(Asn)，且其中該雙糖化抗體分子之兩個抗原結合

位點在該重鏈可變區域(V_H)中包含糖化天冬醯胺酸(Asn)，其中該組合物包含低於5%之非糖化抗體分子，其中該非糖化抗體分子之特徵在於該抗體分子無一抗原結合位點在該重鏈可變區域(V_H)中包含糖化天冬醯胺酸(Asn)。

18. 一種組合物，其包含如請求項1至13中任一項之抗體分子或藉由如請求項14至16中任一項之方法製備之抗體分子。
19. 如請求項17或18之組合物，其為診斷性或醫藥組合物。
20. 一種如請求項1至13中任一項之抗體分子的用途，其係用以製備用於預防及/或治療與澱粉樣變性病及/或澱粉狀蛋白-斑塊形成相關之疾病的醫藥組合物。
21. 一種如請求項17至19中任一項之組合物的用途，其係用以製備用於預防及/或治療與澱粉樣變性病及/或澱粉狀蛋白-斑塊形成相關之疾病的醫藥組合物。
22. 一種如請求項1至13中任一項之抗體分子的用途，其係用以製備用於偵測與澱粉樣變性病及/或澱粉狀蛋白-斑塊形成相關之疾病的診斷套組。
23. 一種如請求項17至19中任一項之組合物的用途，其係用以製備用於偵測與澱粉樣變性病及/或澱粉狀蛋白-斑塊形成相關之疾病的診斷套組。
24. 如請求項20至23中任一項之用途，其中該疾病為癡呆症、阿茲海默氏症、運動神經病、唐氏症候群、克雅氏病(Creutzfeldt Jacob disease)、荷蘭型遺傳性腦出血併發

澱粉樣變性病、與路易體(Lewy body)形成相關之癡呆症、帕金森氏症、HIV-相關癡呆症、ALS或與老化相關之神經元失調症。

25. 一種如請求項1至13中任一項之抗體分子的用途，其係用以製備用於崩解 β -澱粉狀蛋白斑塊之醫藥組合物。
26. 一種如請求項17至19中任一項之組合物的用途，其係用以製備用於崩解 β -澱粉狀蛋白斑塊之醫藥組合物。
27. 一種如請求項1至13中任一項之抗體分子的用途，其係用以製備用於抗 β -澱粉狀蛋白斑塊形成之被動免疫的醫藥組合物。
28. 一種如請求項17至19中任一項之組合物的用途，其係用以製備用於抗 β -澱粉狀蛋白斑塊形成之被動免疫的醫藥組合物。
29. 一種套組，其包含如請求項1至13中任一項之抗體分子。
30. 一種套組，其包含藉由如請求項14至16中任一項之方法製備之抗體分子。
31. 一種套組，其包含如請求項17至19中任一項之組合物。

99年1月5日修(更)正本

公告本

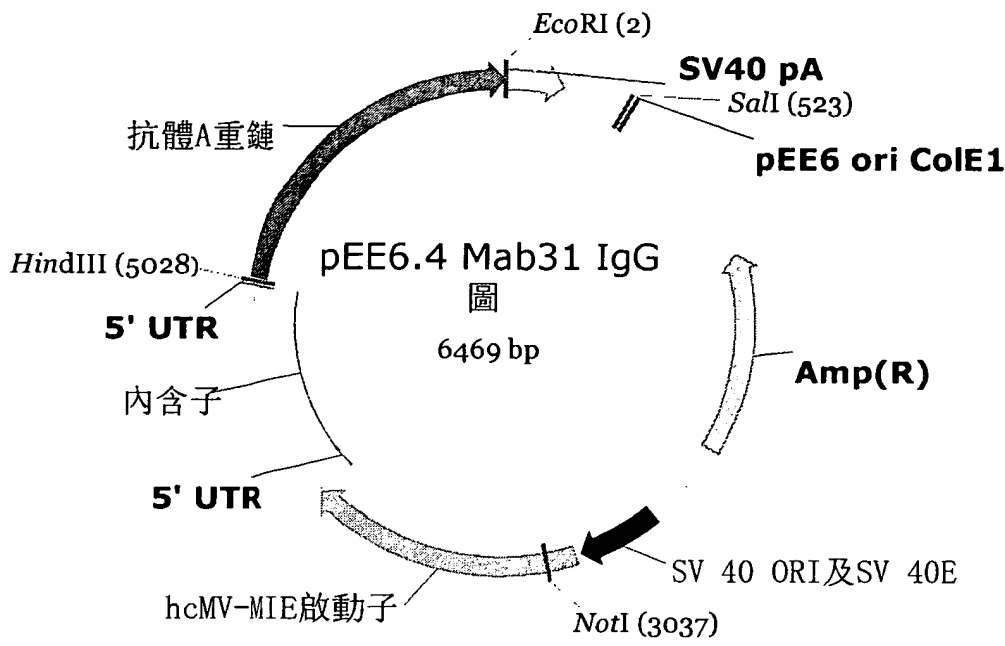


圖1A

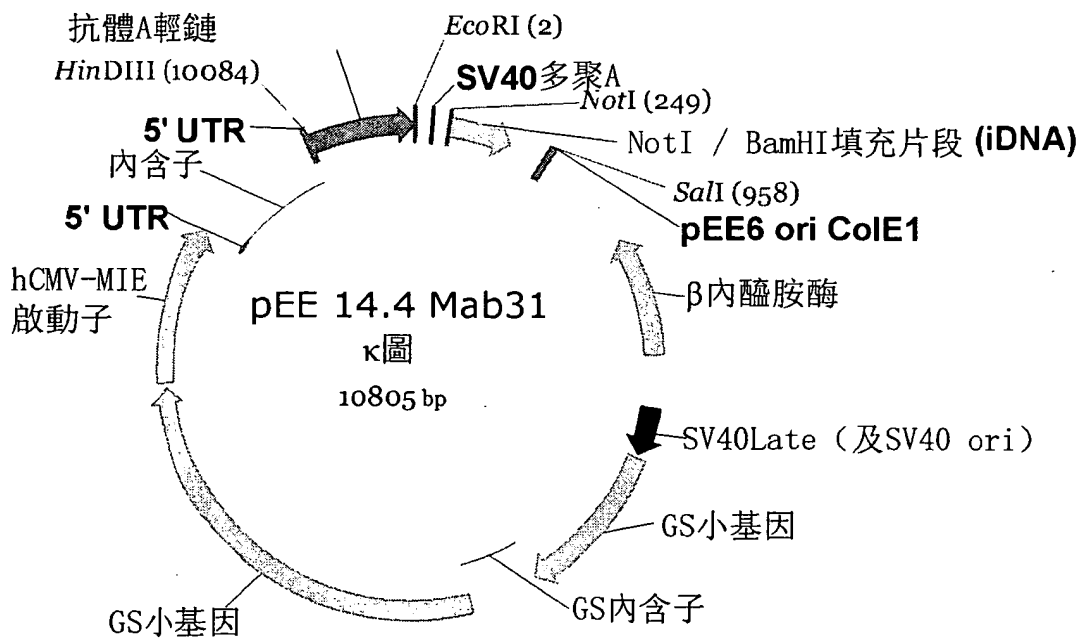


圖1B

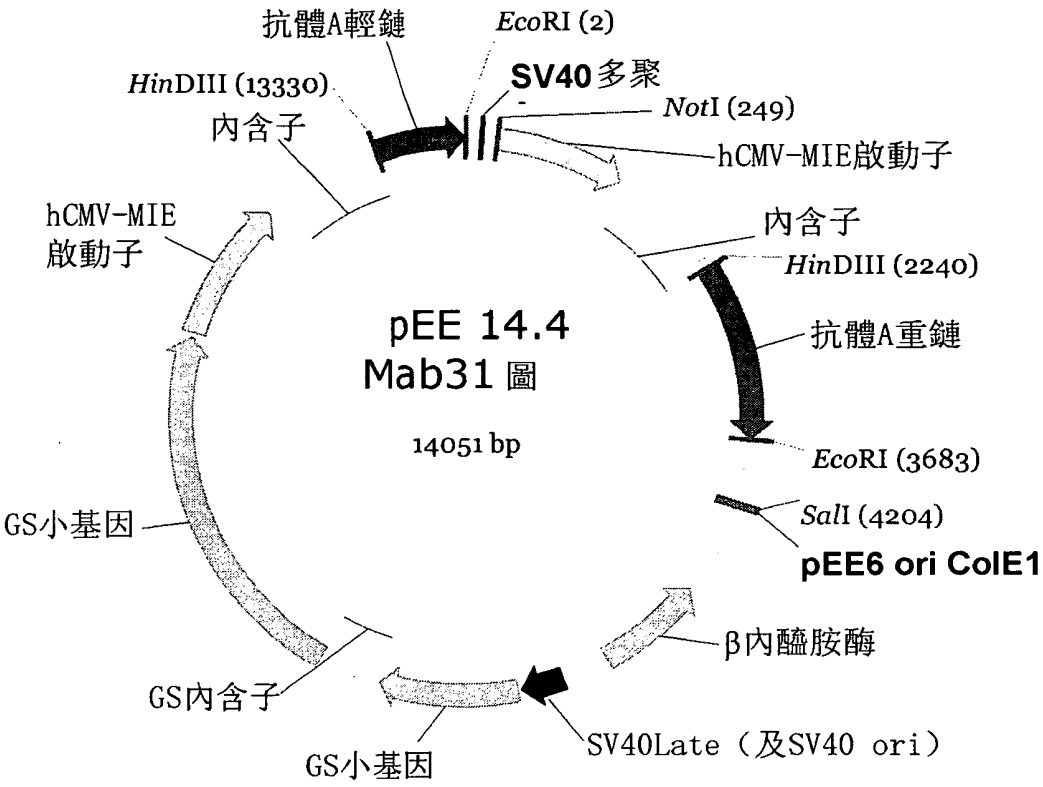


圖1C



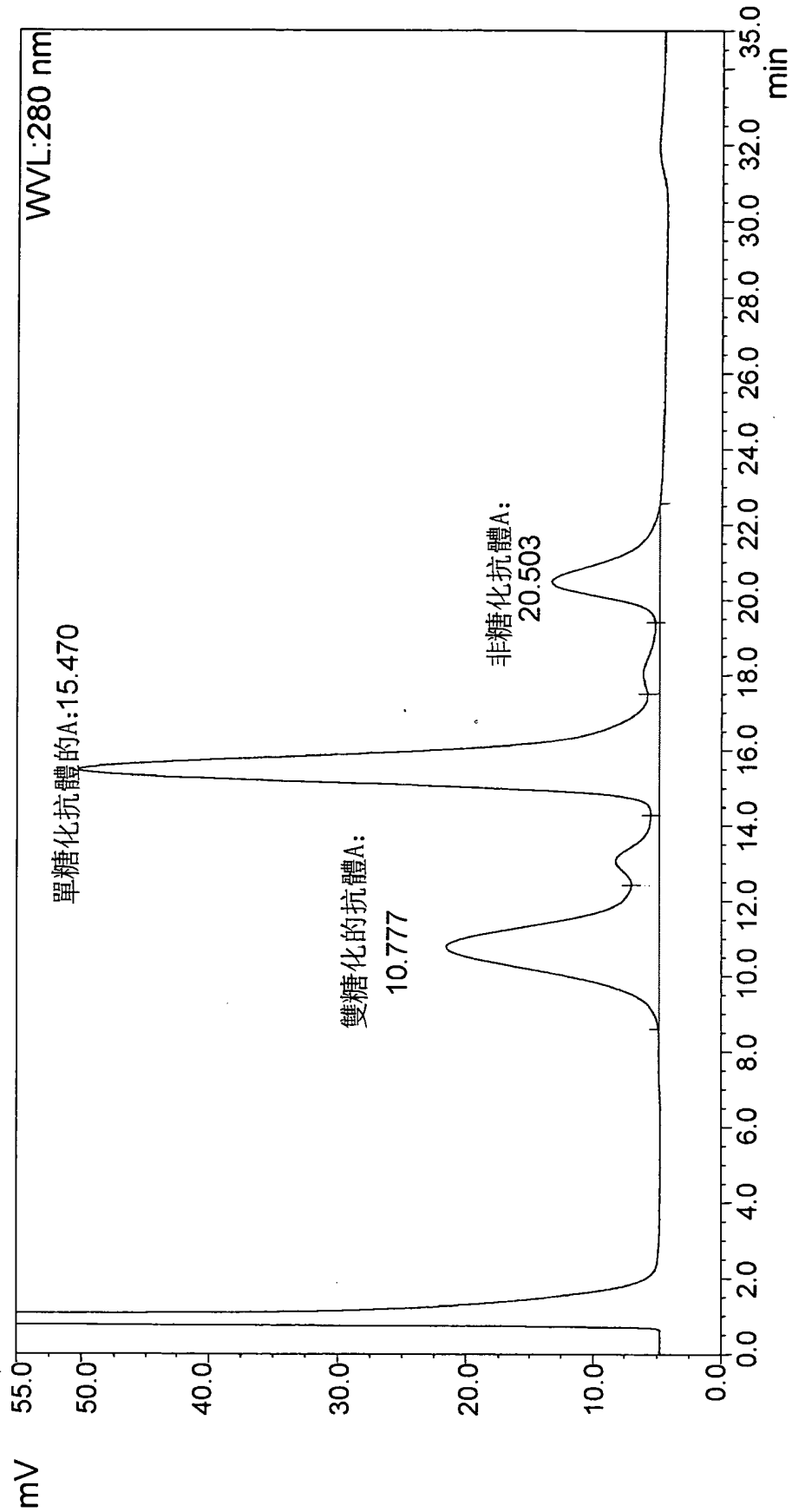


圖2

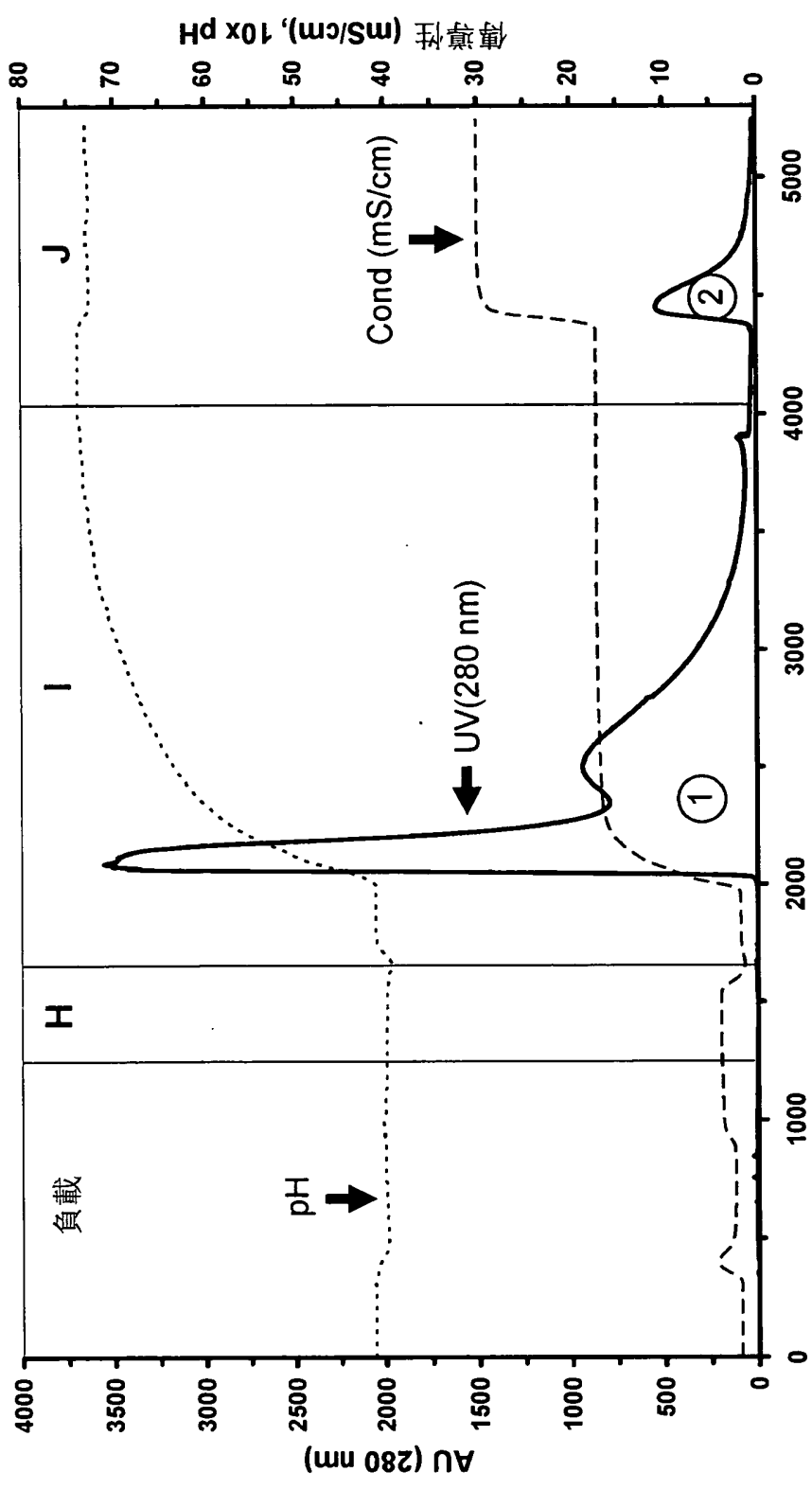


圖3
體積 (mL)



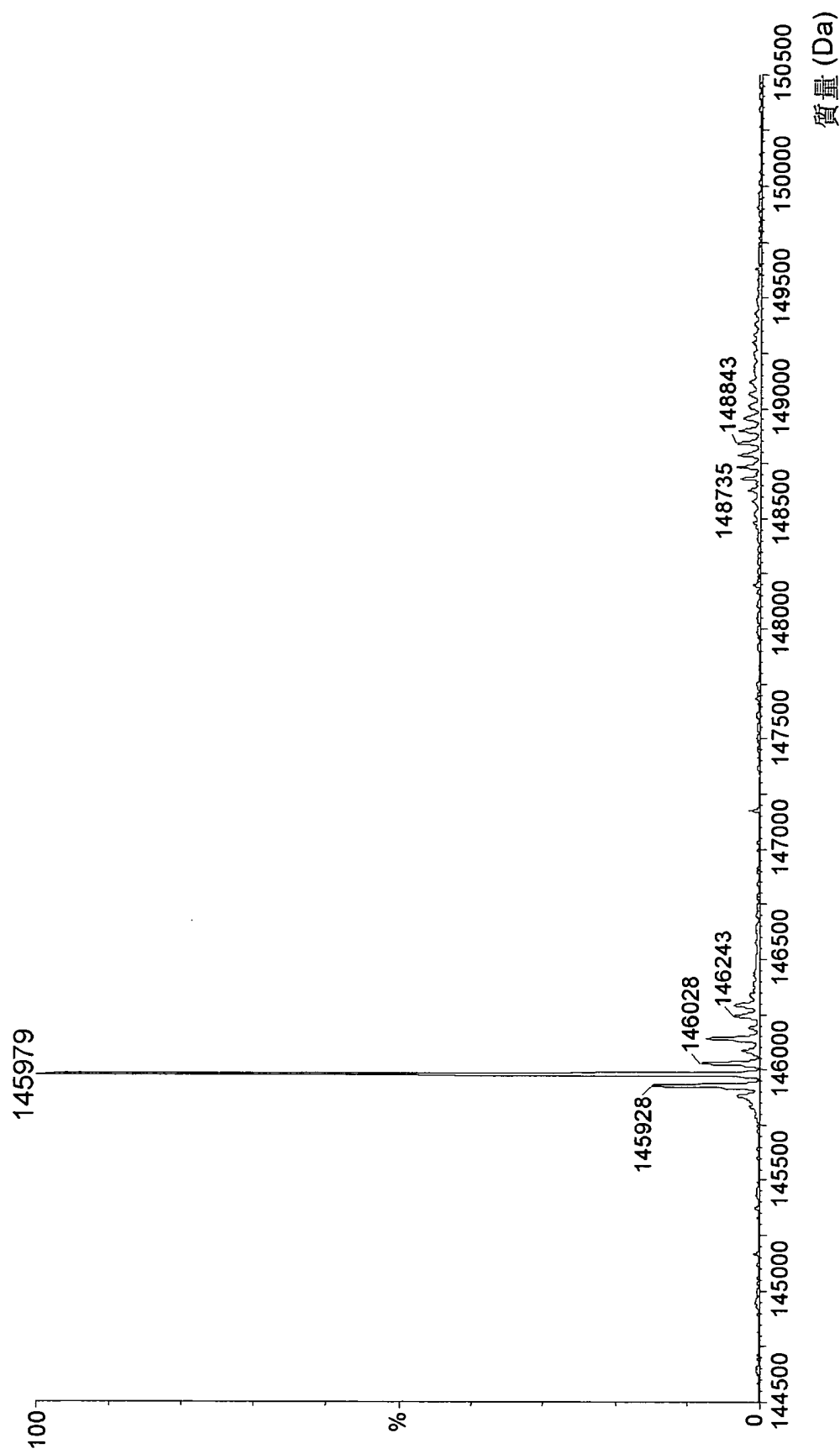


圖 4A

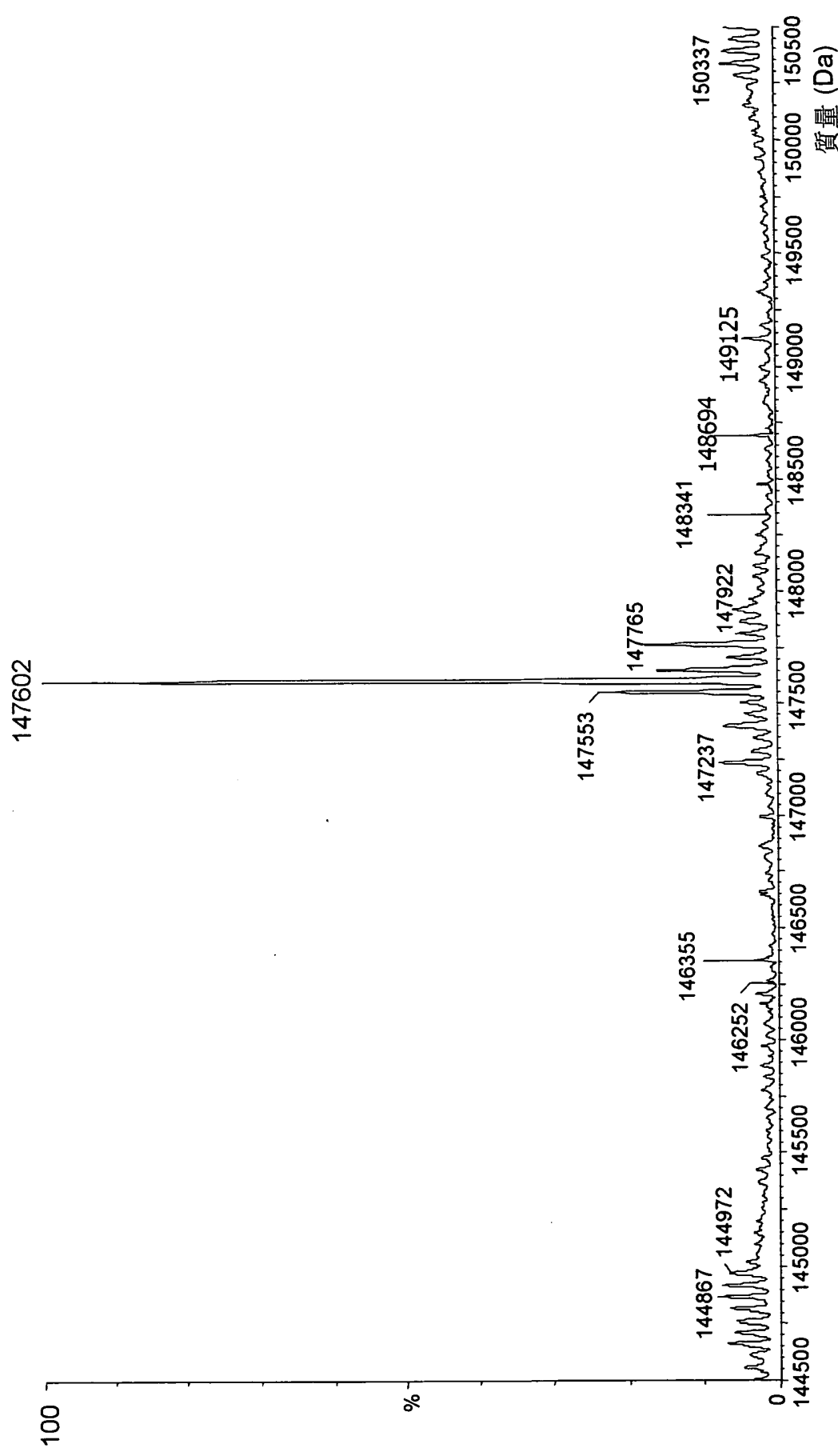


圖4B



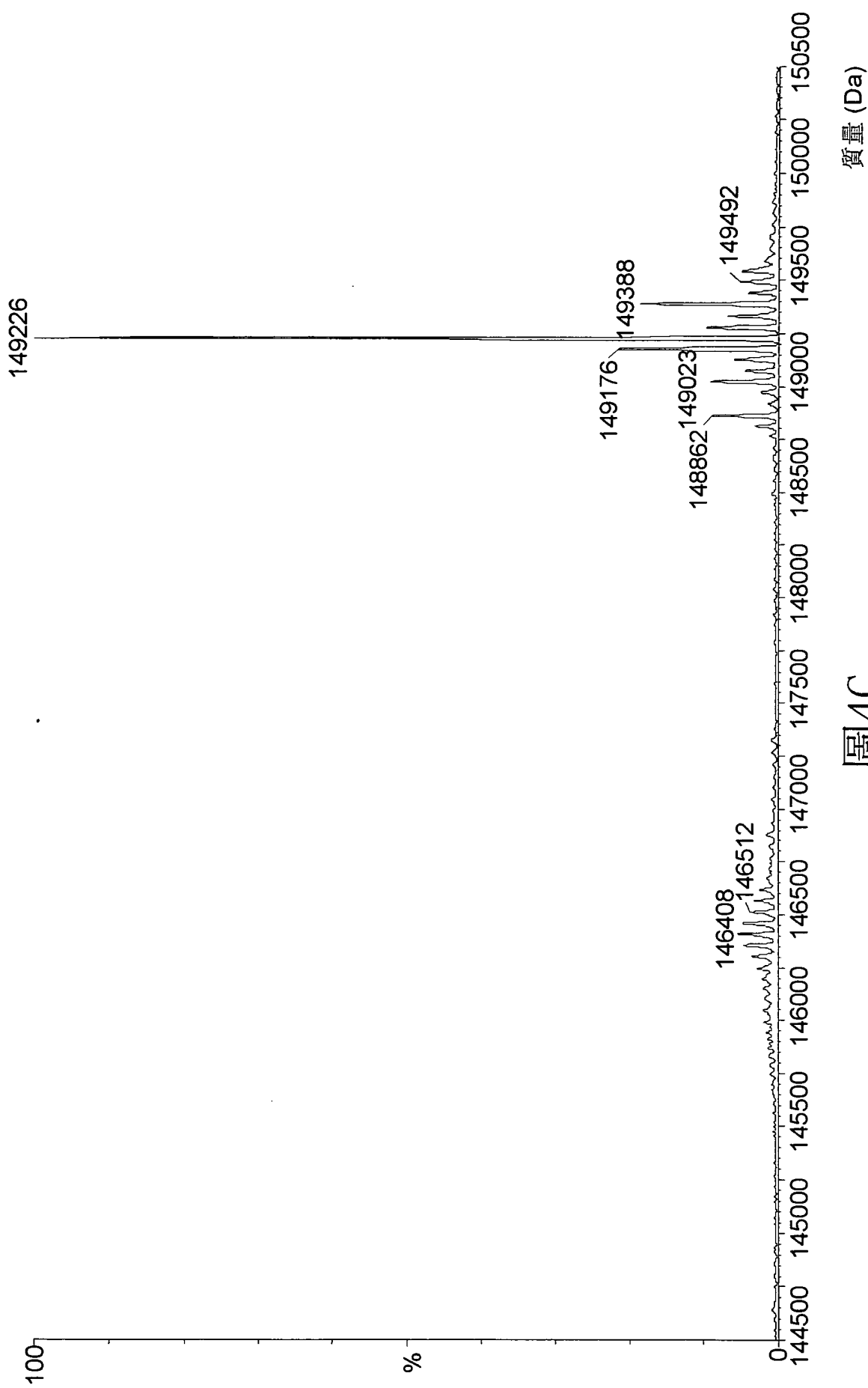
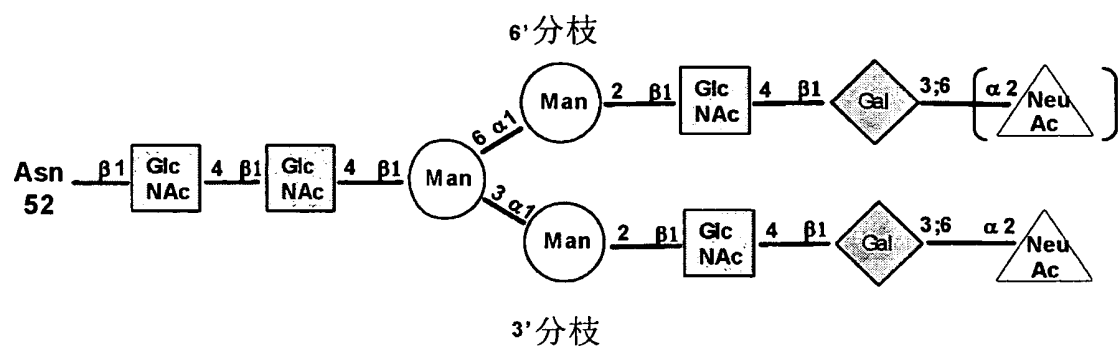
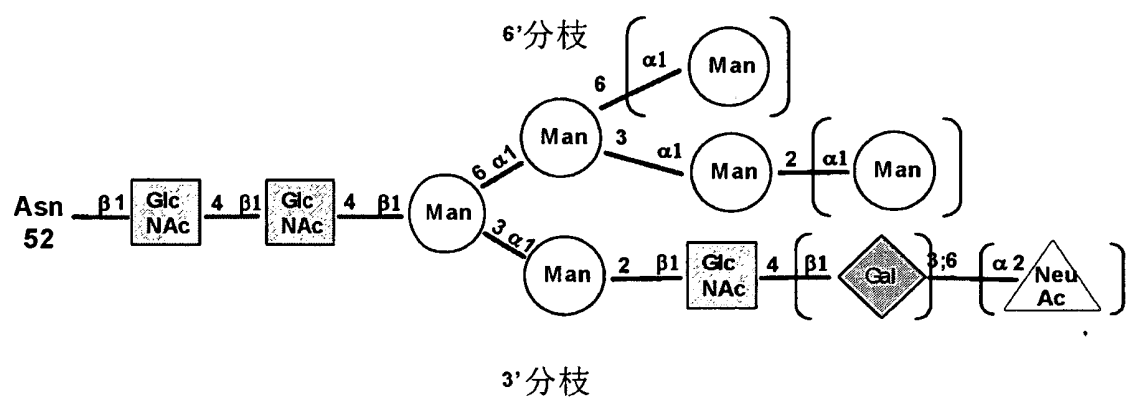


圖 4C

A



B



C

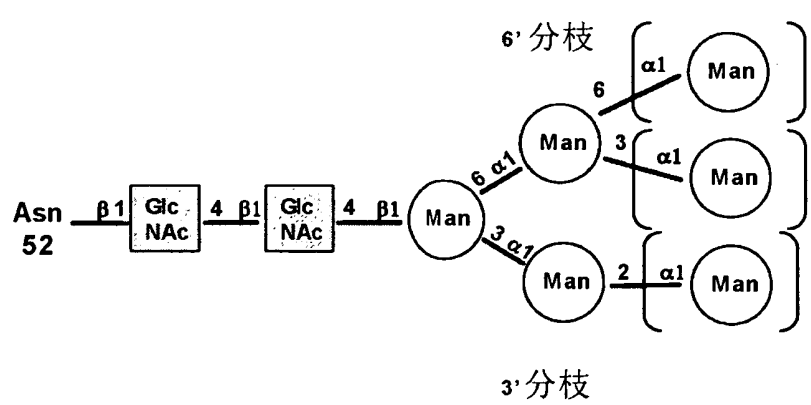


圖5



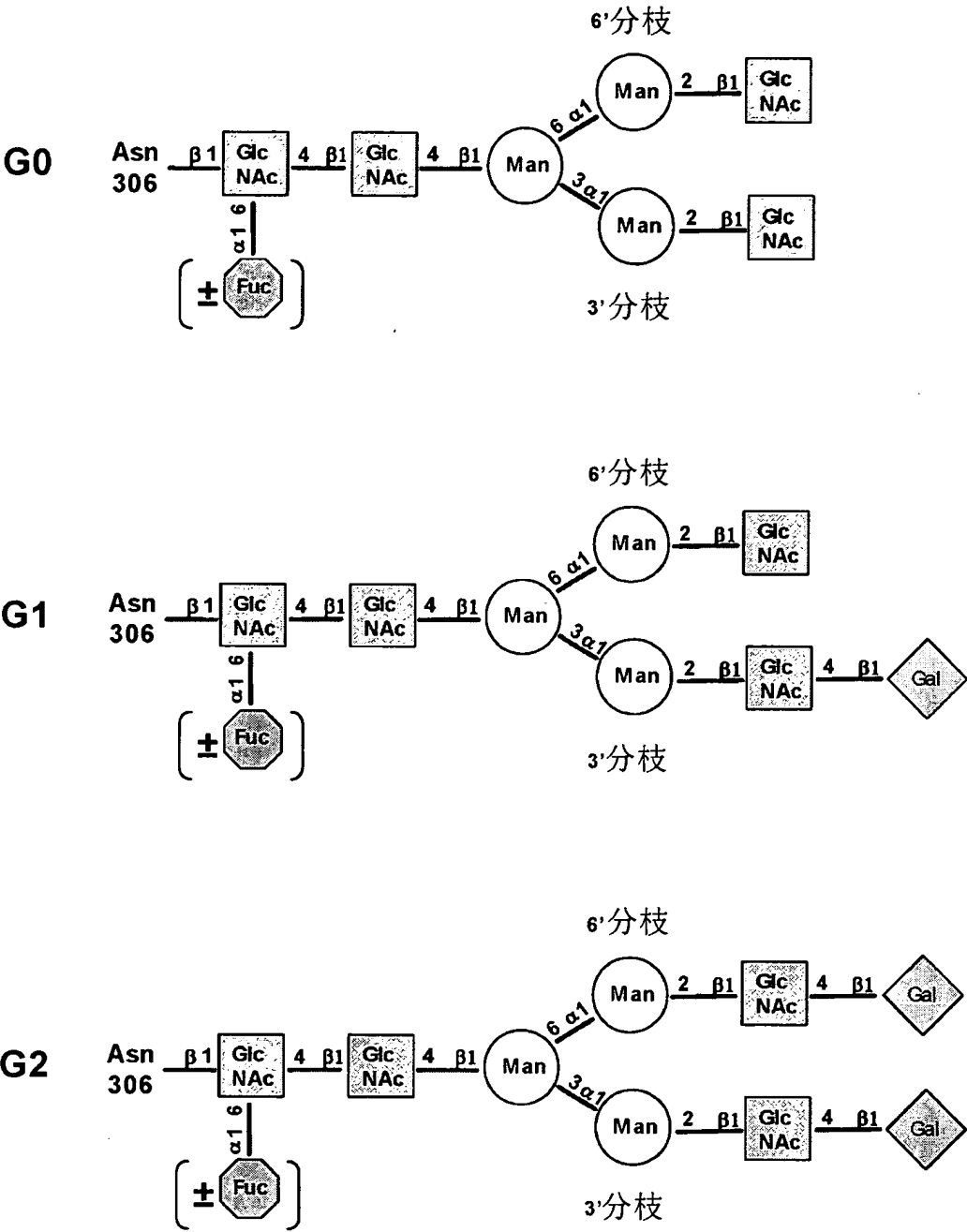


圖6

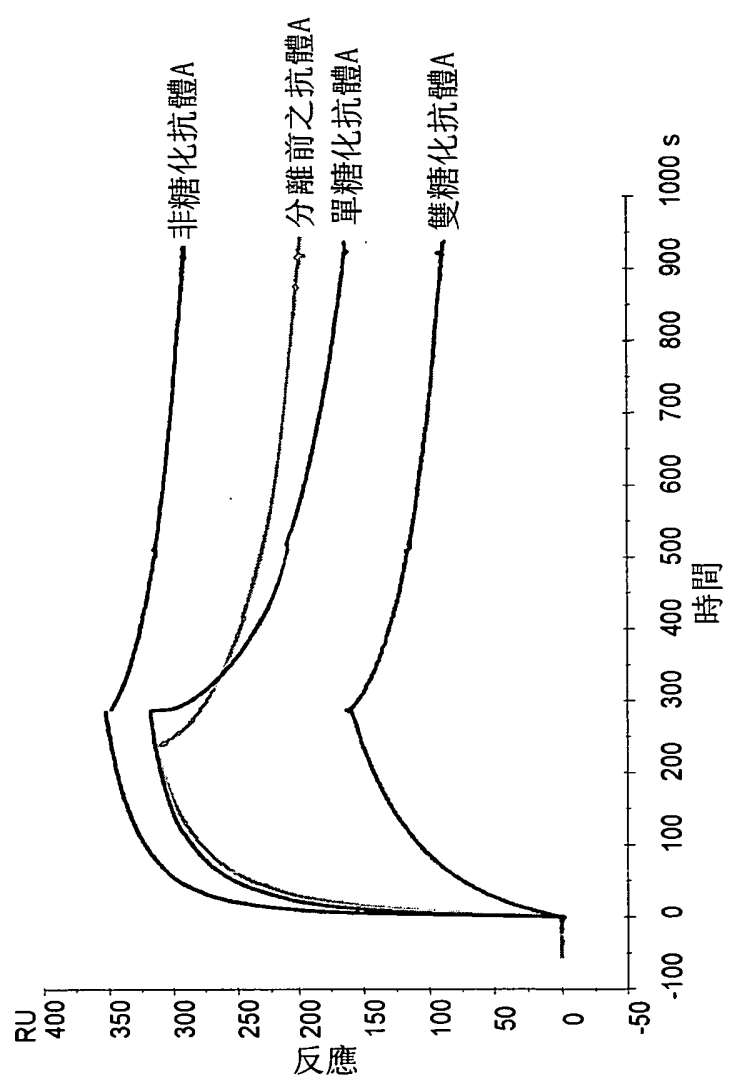
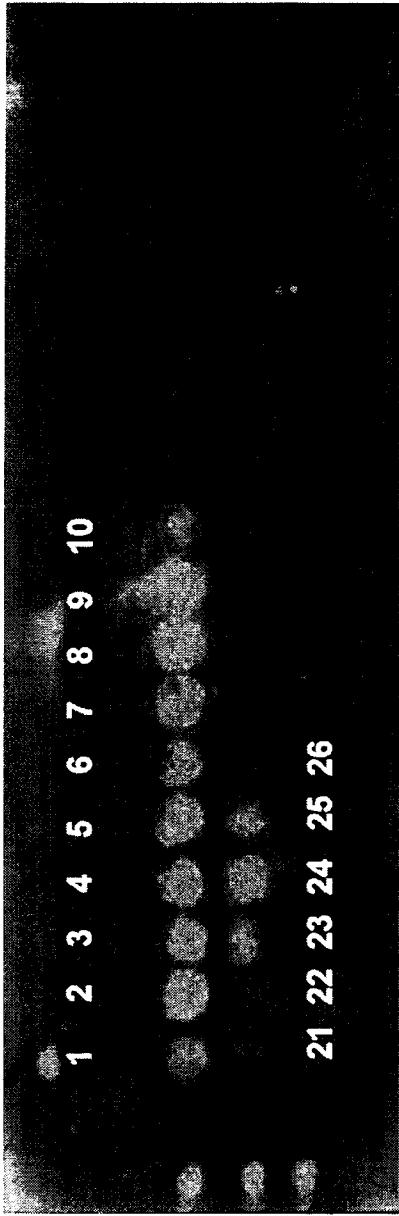


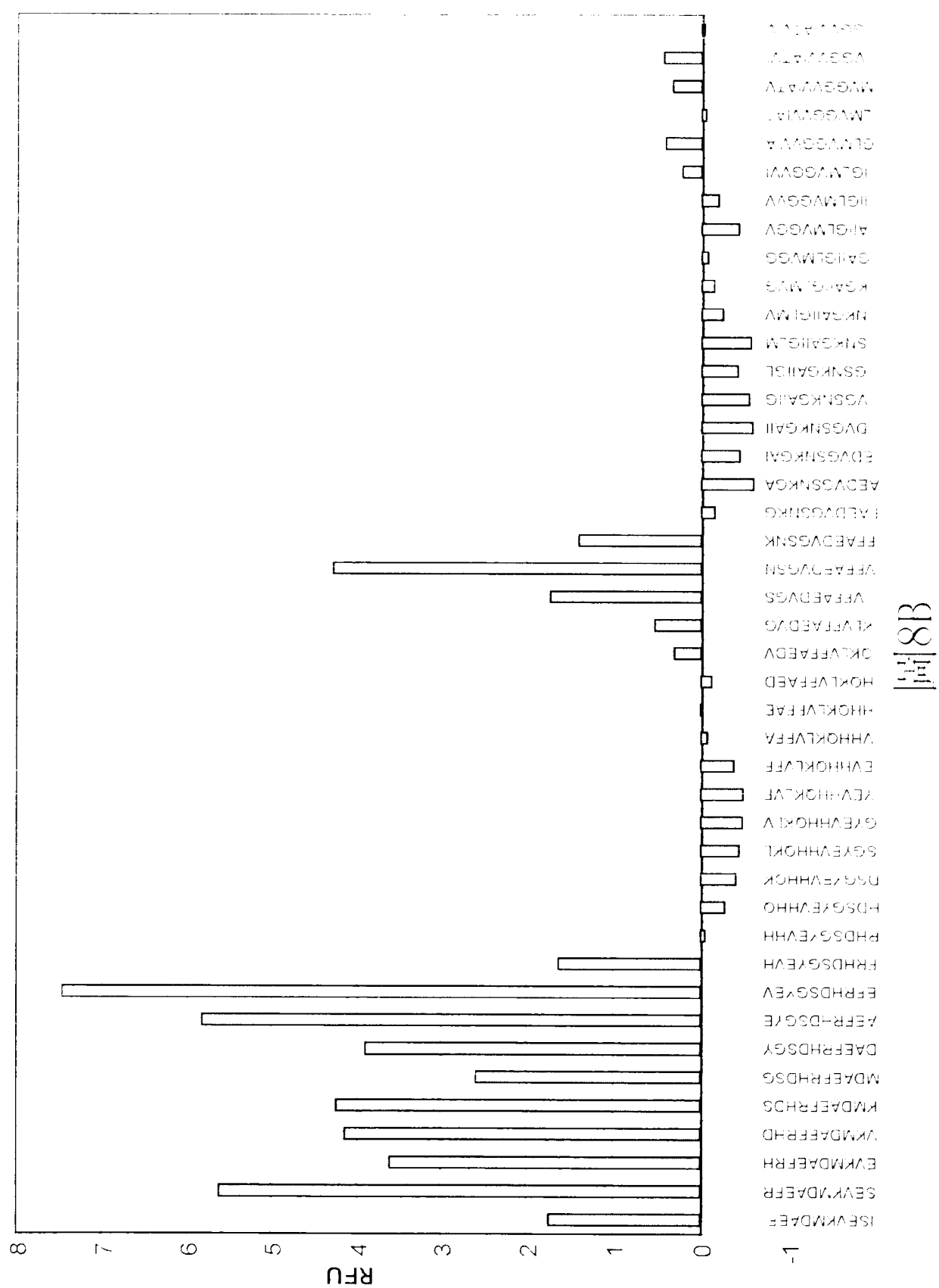
圖7

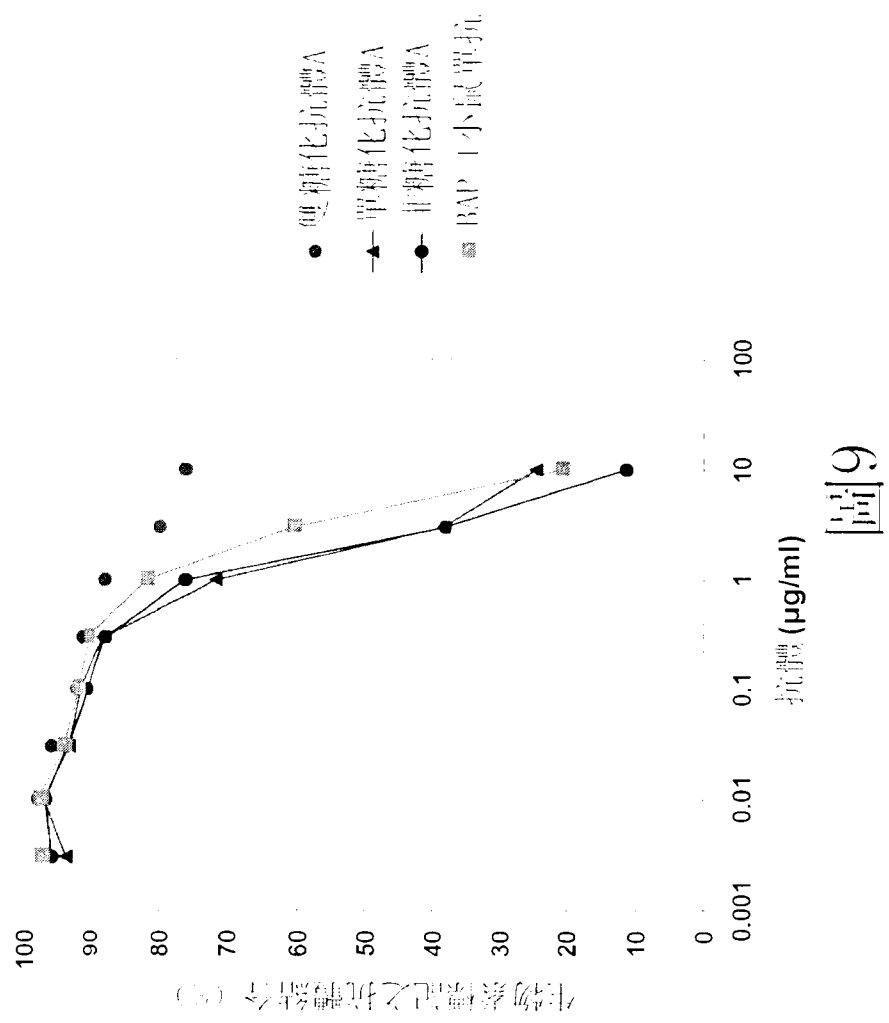




1	ISEVKMDAEF	21	QKLVFFAEDV
2	SEVKMDAEFR	22	KLVFFAEDVG
3	EVKMDAEFRH	23	LVFFAEDVGS
4	VKMDAEFRHD	24	VFFAEDVGSN
5	KMDAEFRHDS	25	FFAEDVGSNK
6	MDAEFRHDS	26	FAEDVGSNK
7	DAEFRHDSGY		
8	AEFRHDSGYE		
9	EFRHDSGYEV		
10	FRHDSGYEVH		

8A





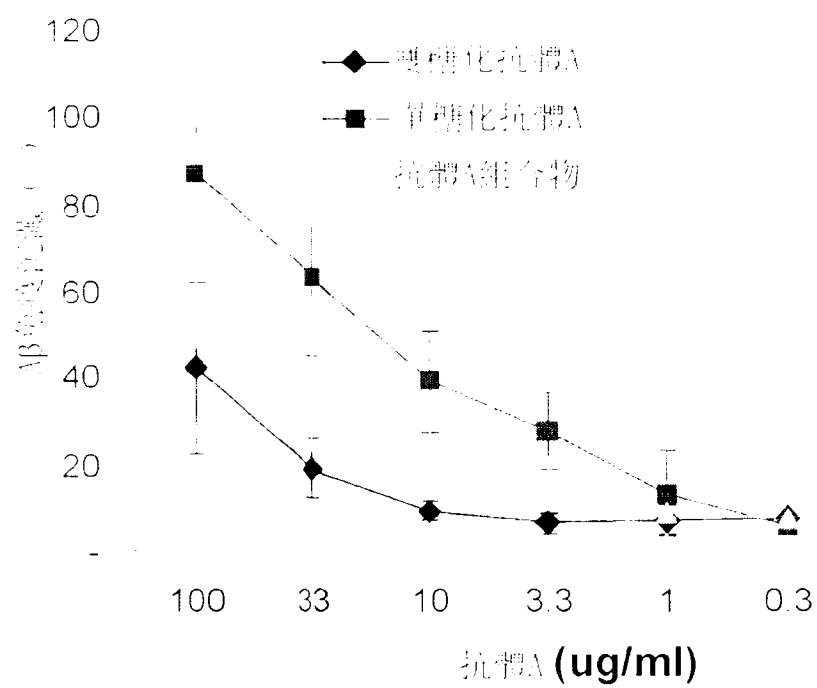


圖 10

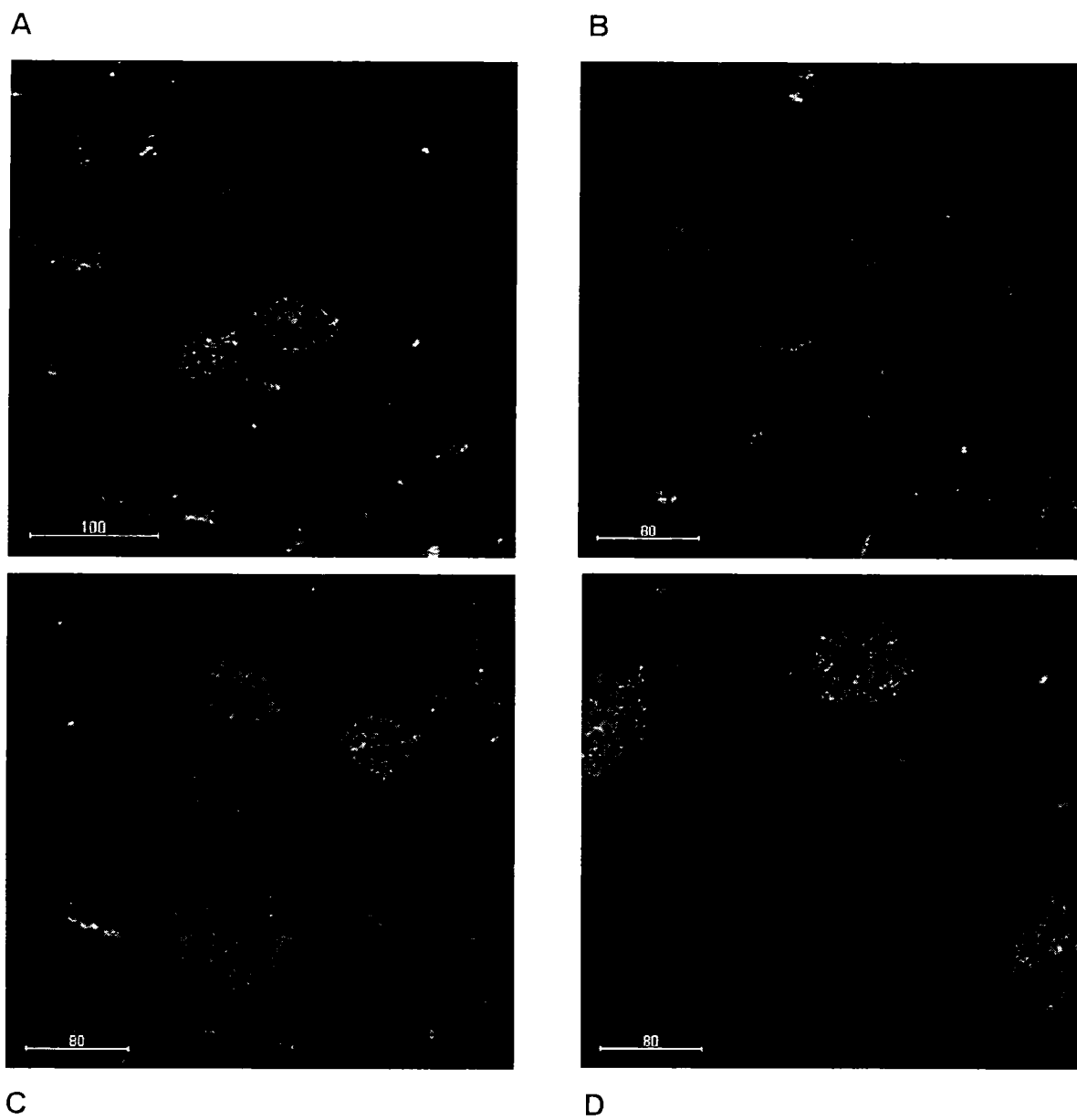


圖 11

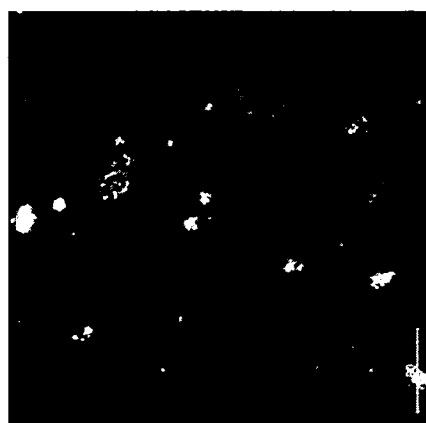
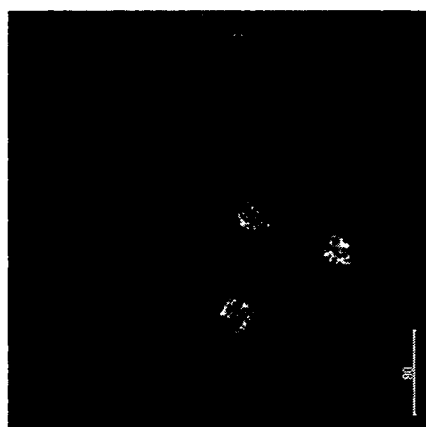


图12

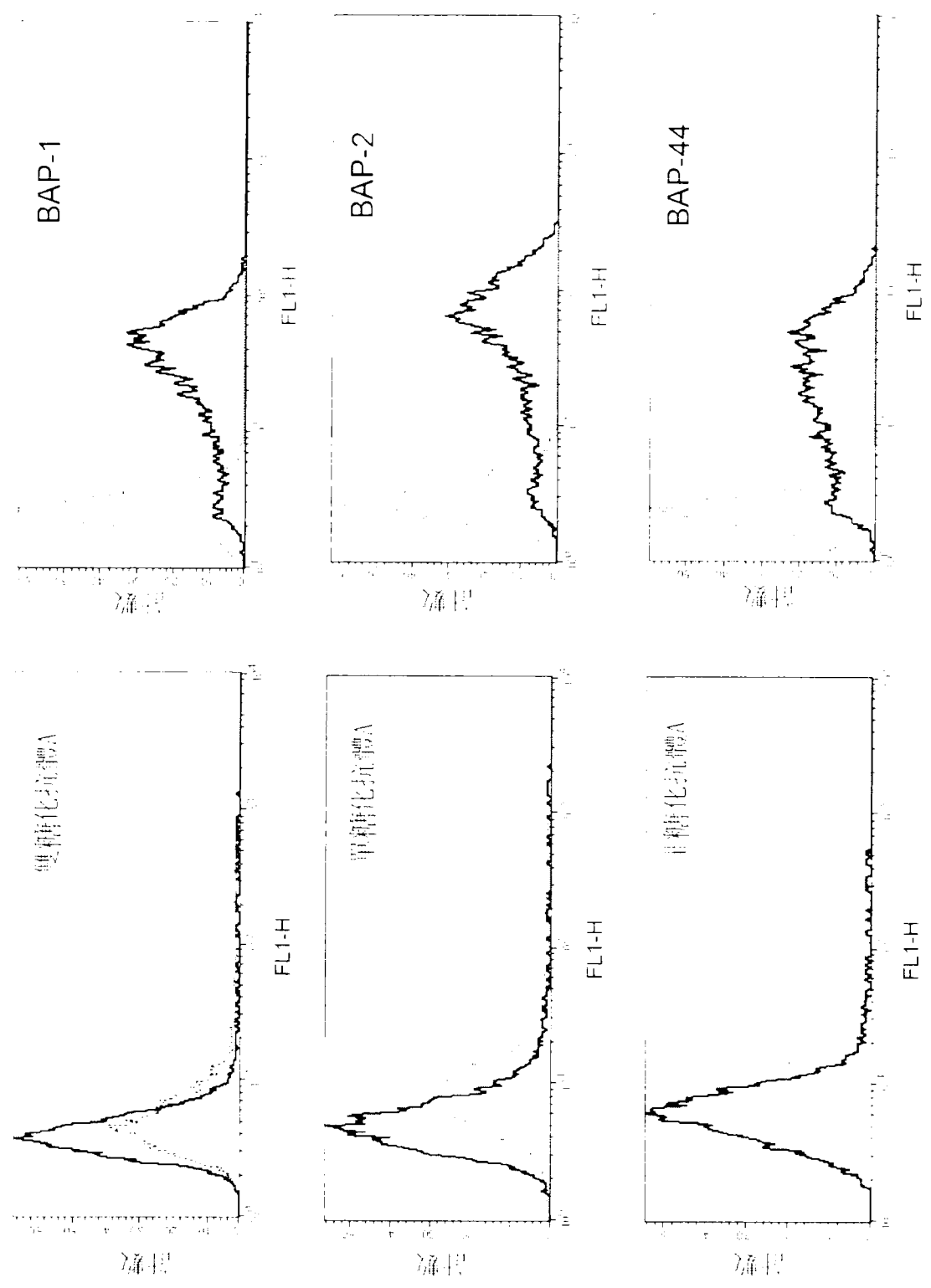
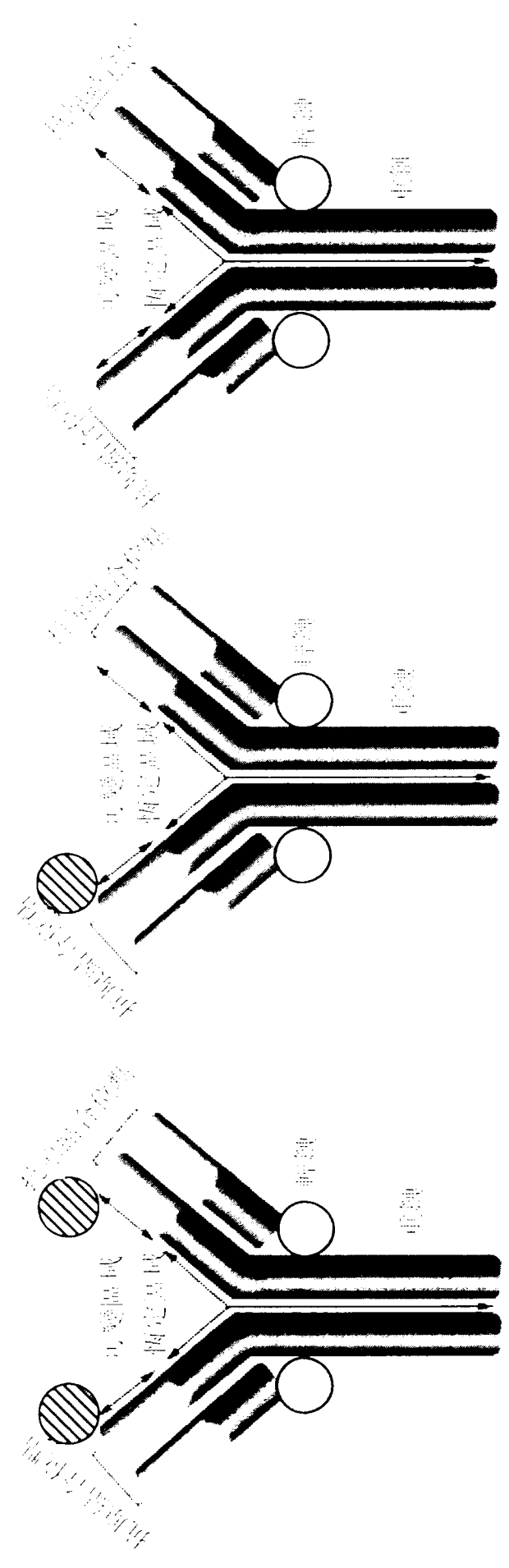


Figure 13



在VIII中於Asn52處不硝化

在VIII中於Asn52處單硝化

在VIII中於Asn52處雙重硝化

- 於支鋼可變區域Asn52處之N 硝化位點
- 於支鋼固定區域Asn306處之N 硝化

圖14

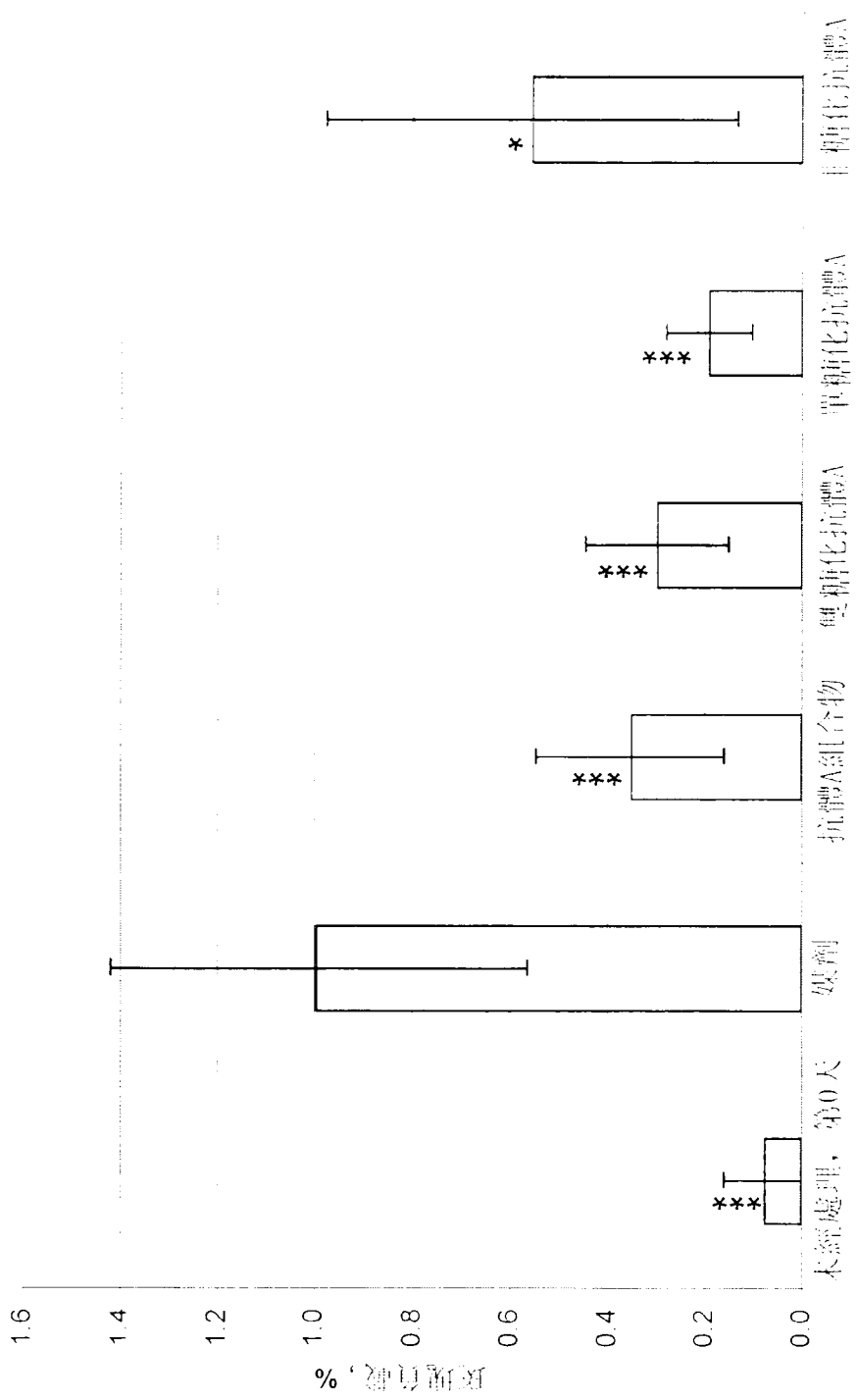


圖15A

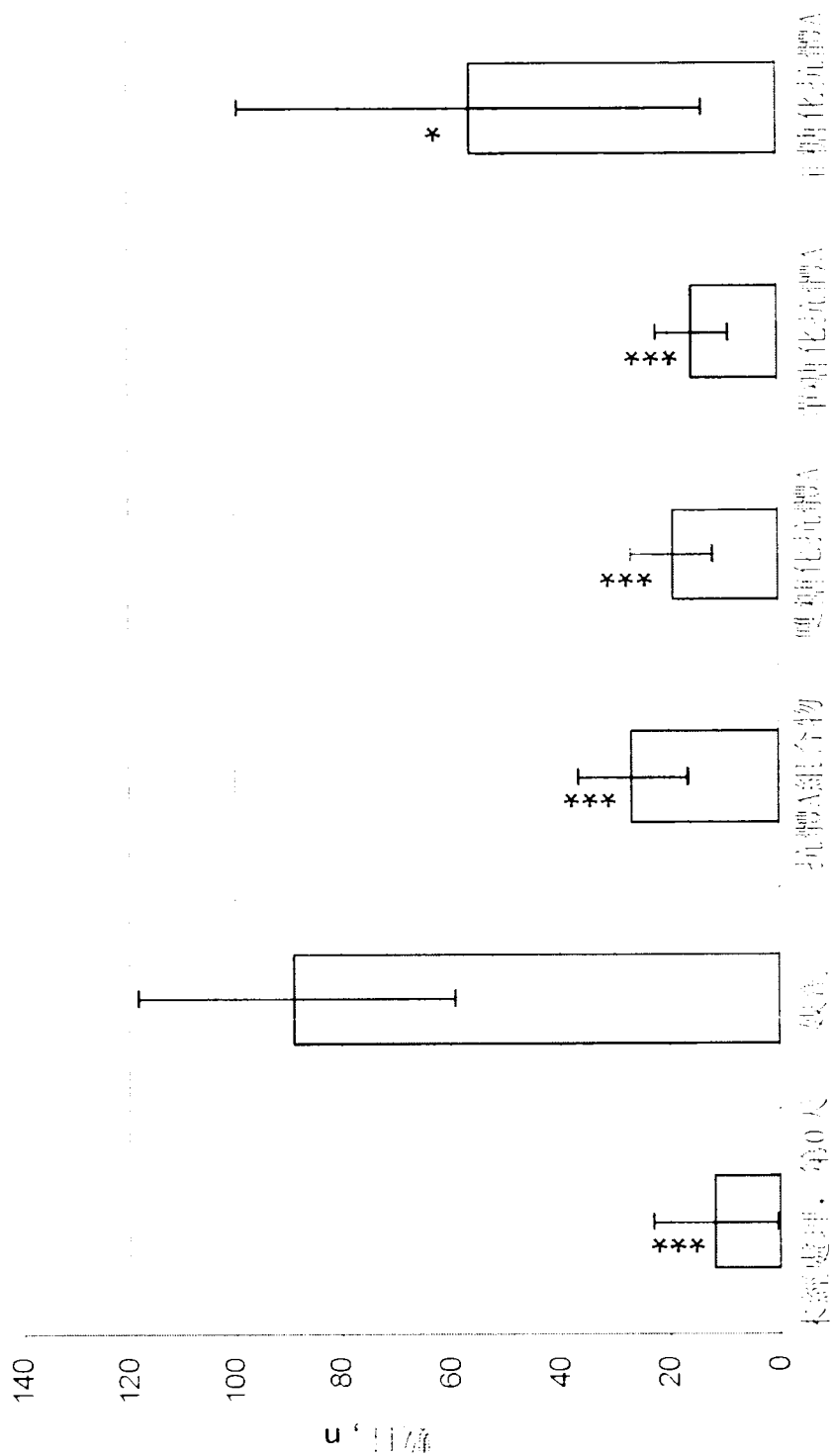


圖 15B

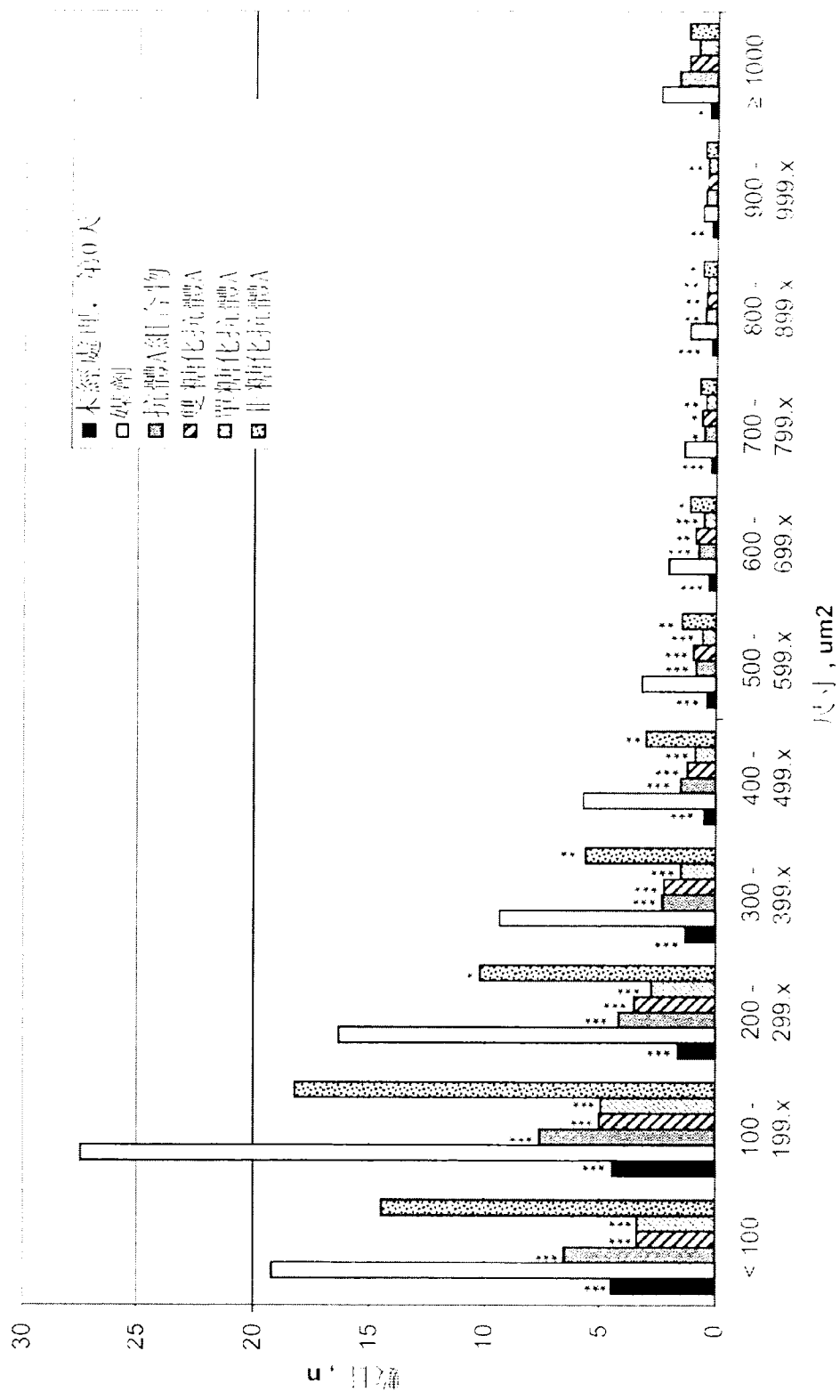


図15C

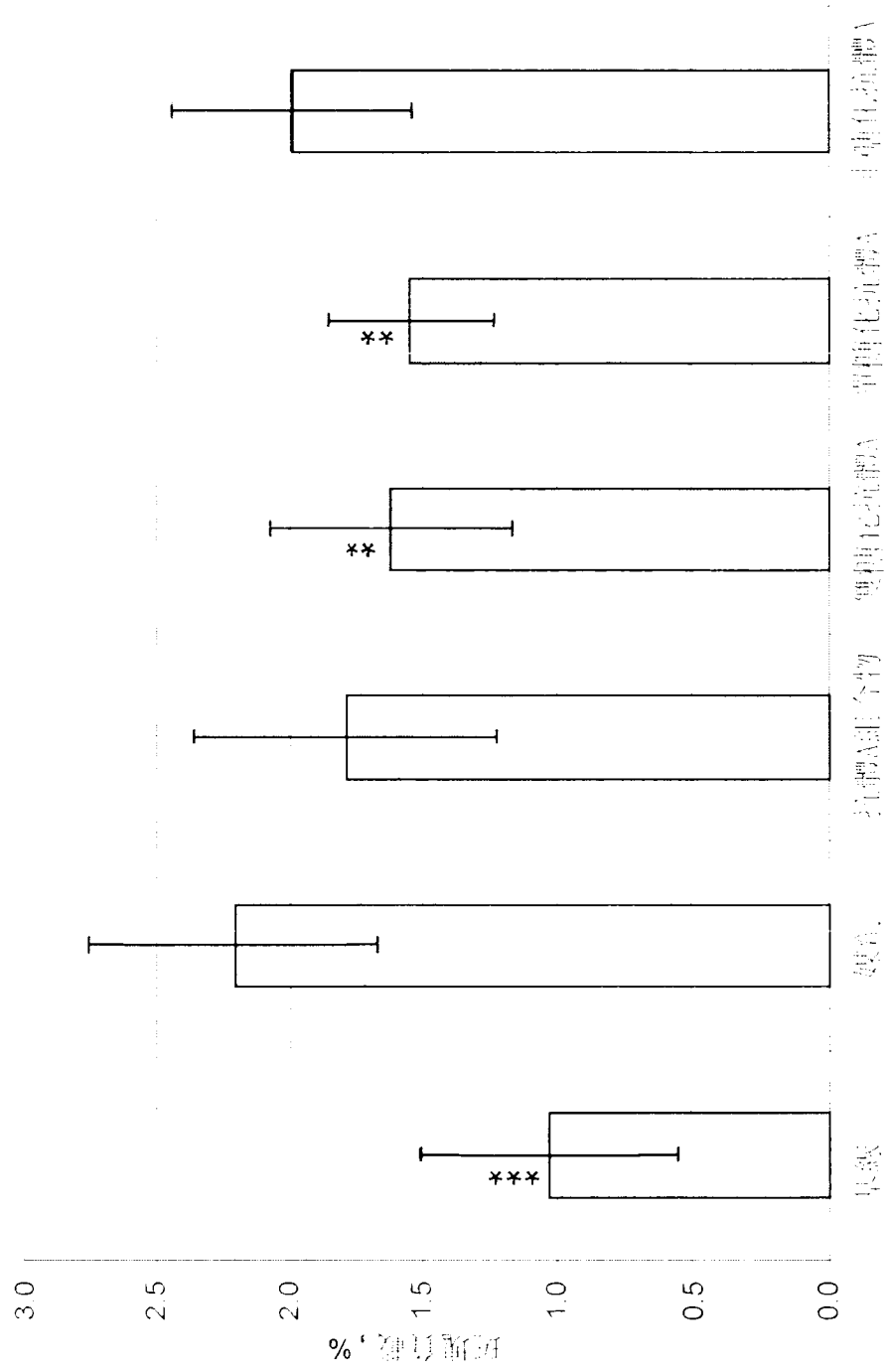


图16A



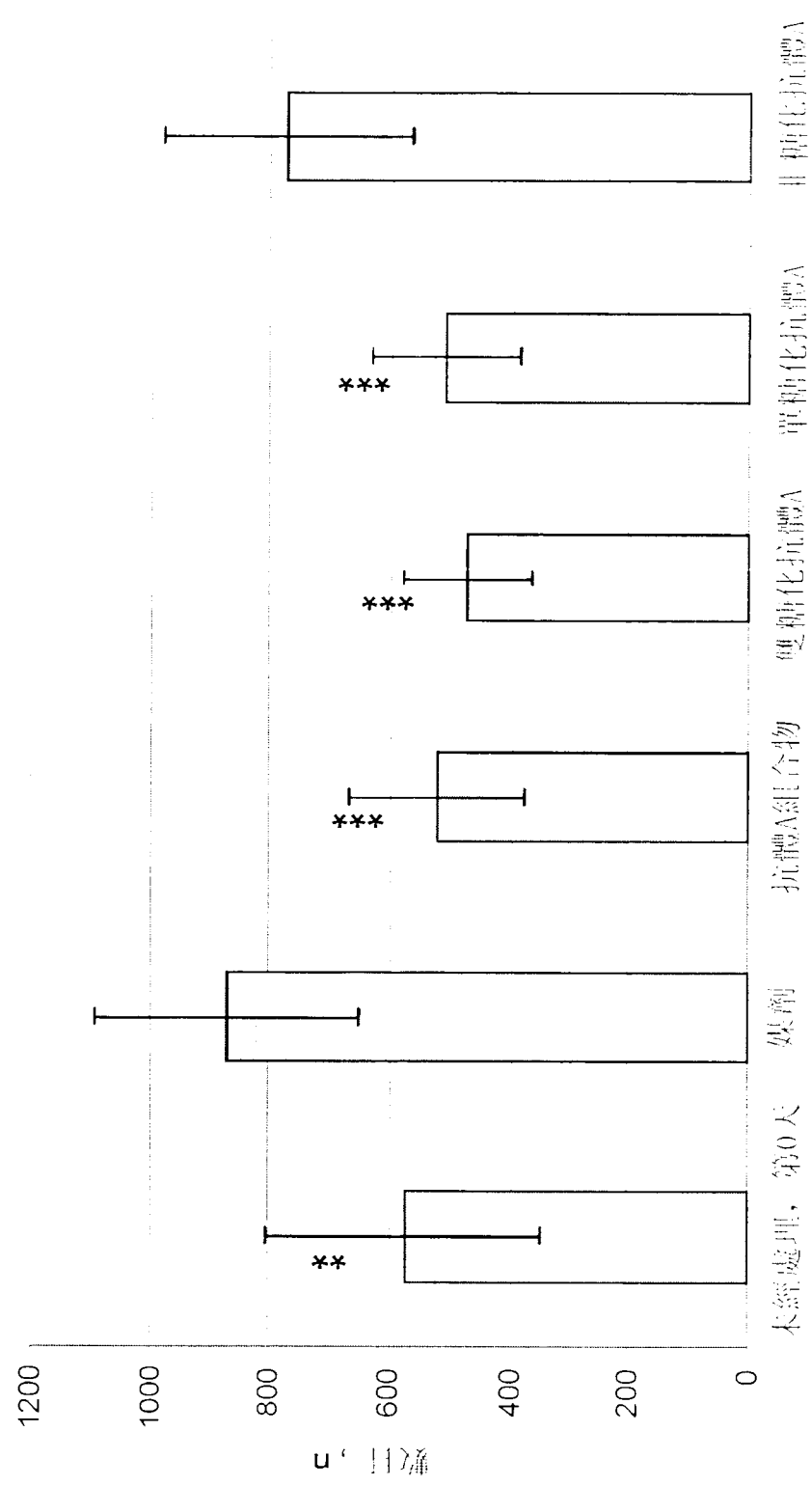
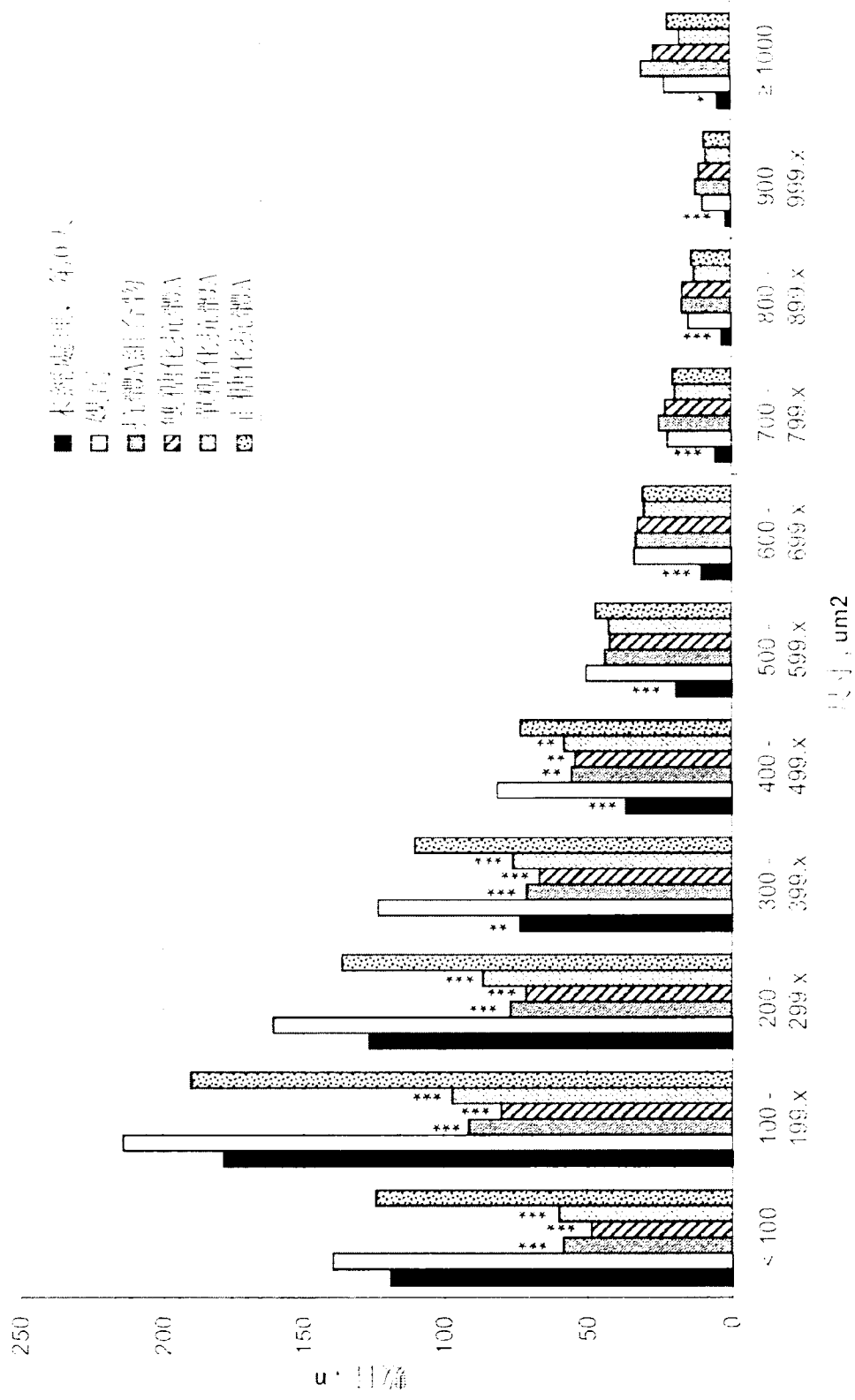


圖 16B



16C

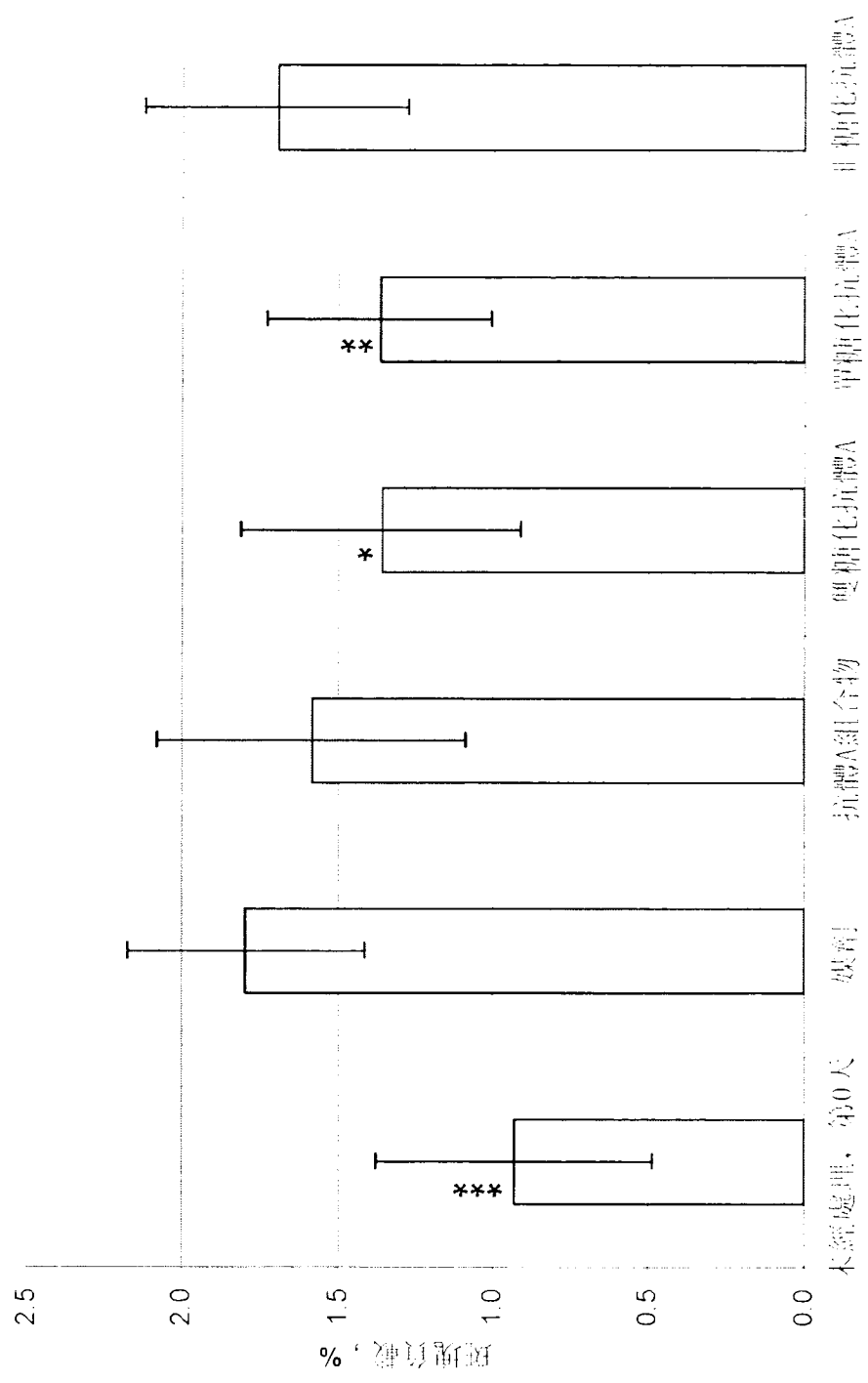


圖17A

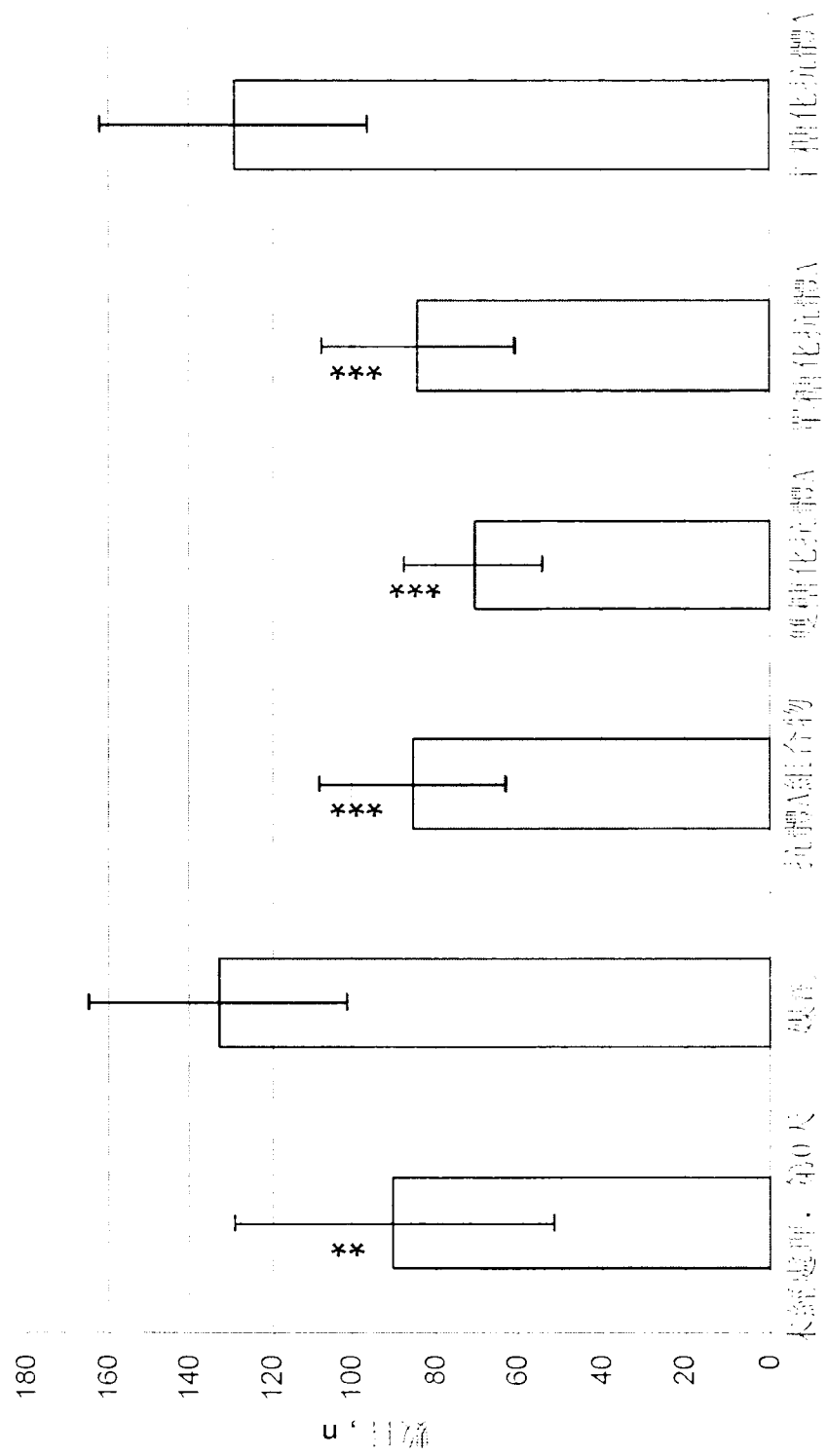


圖 17B

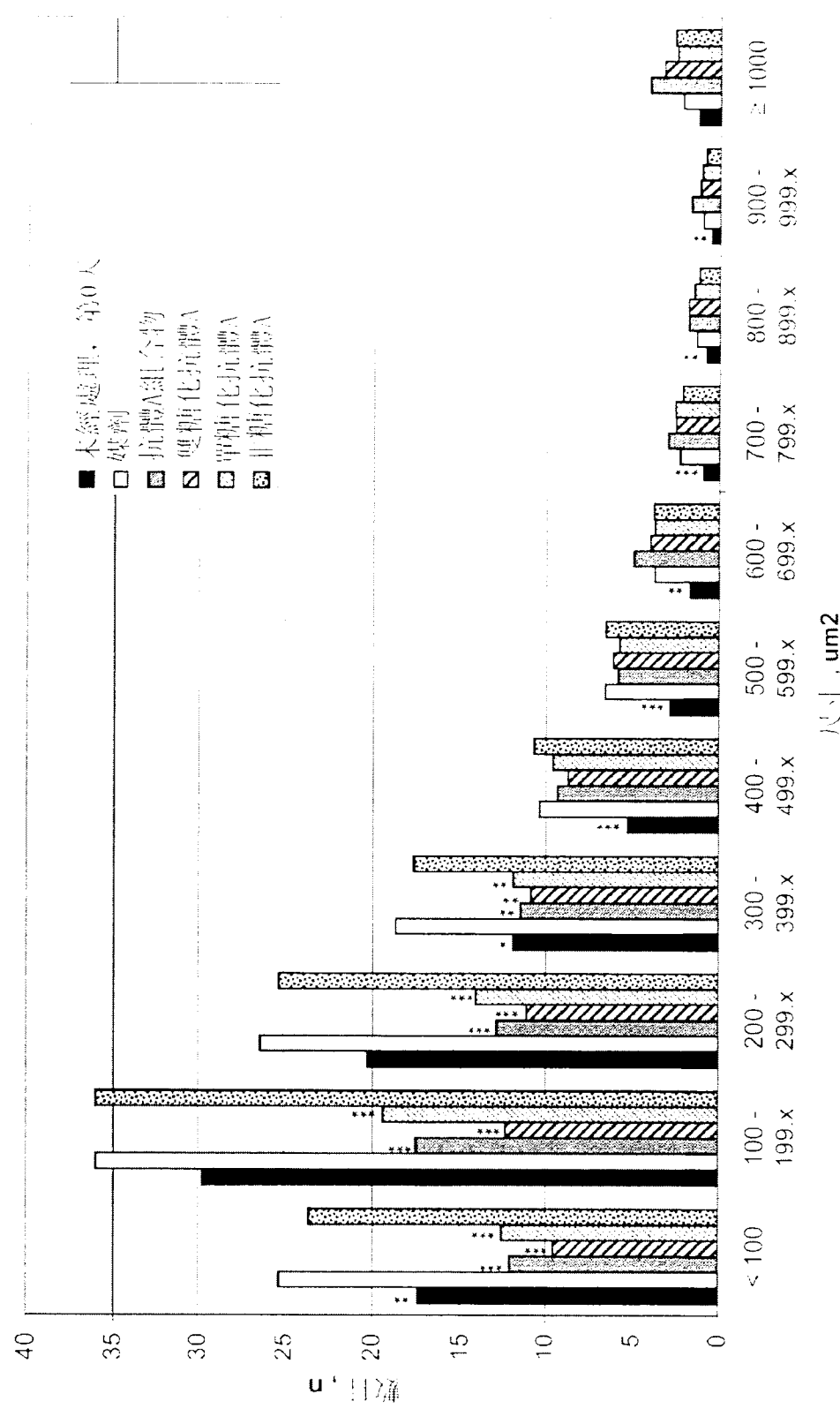


図17C

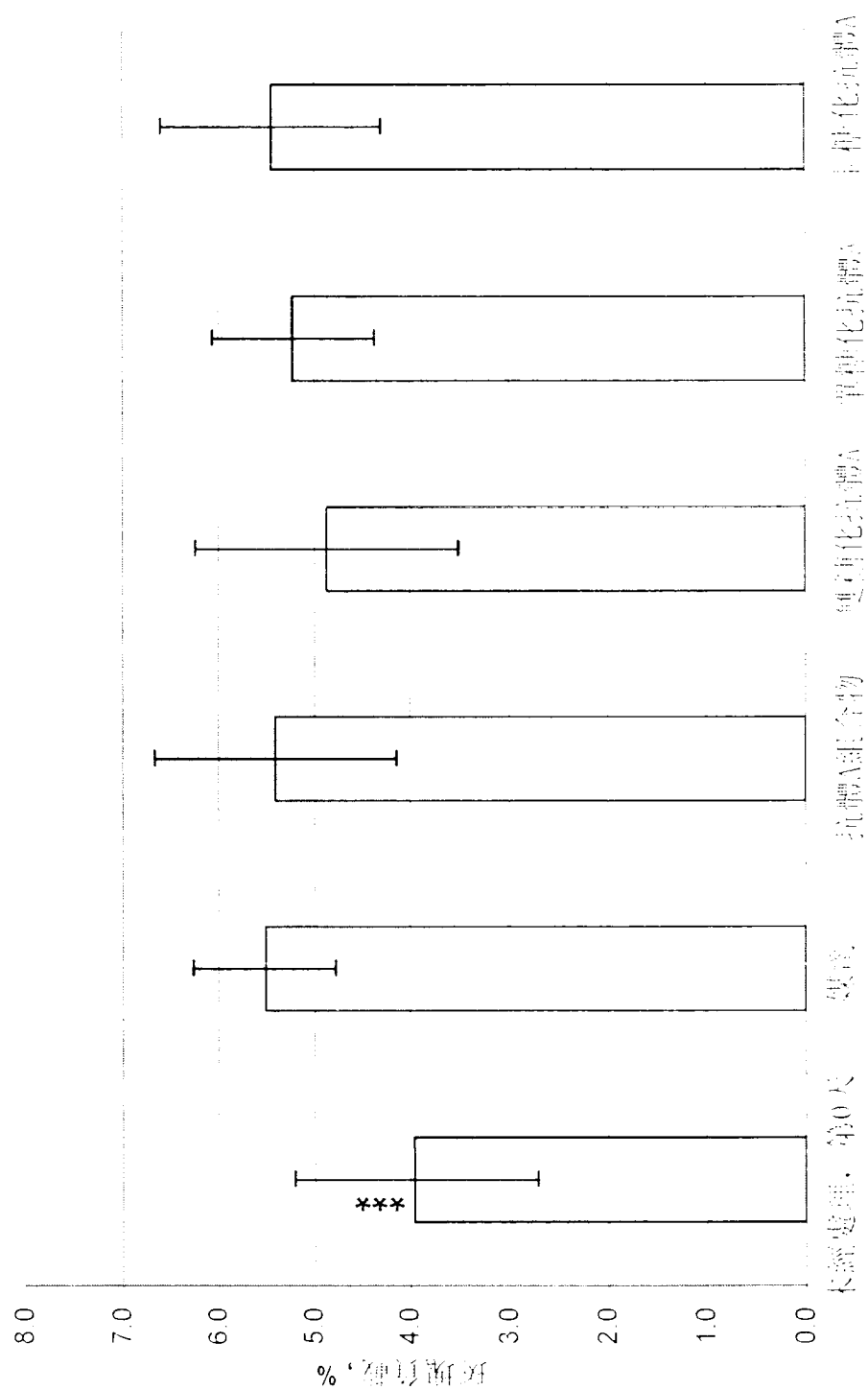


圖 18A

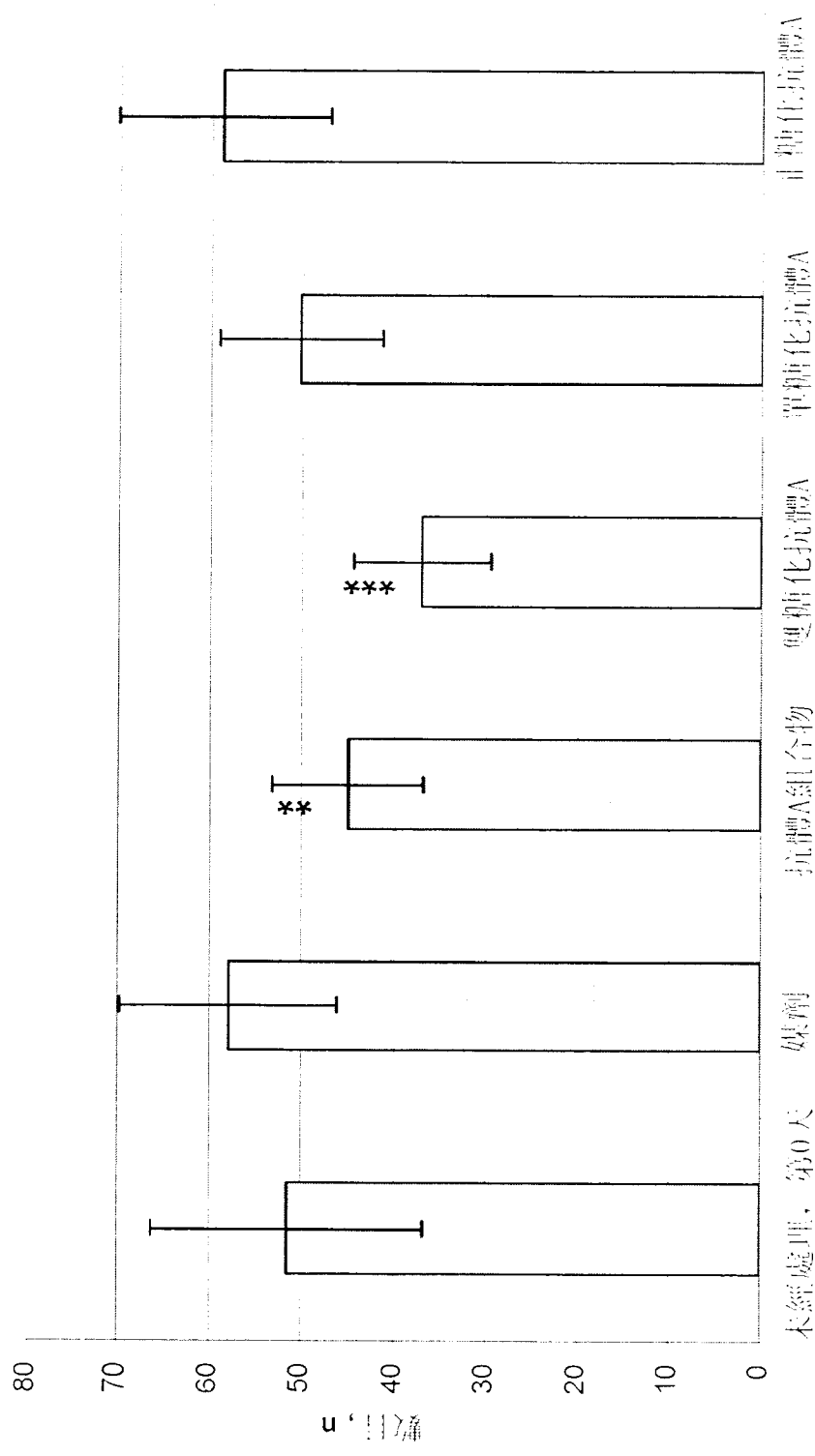


圖18B

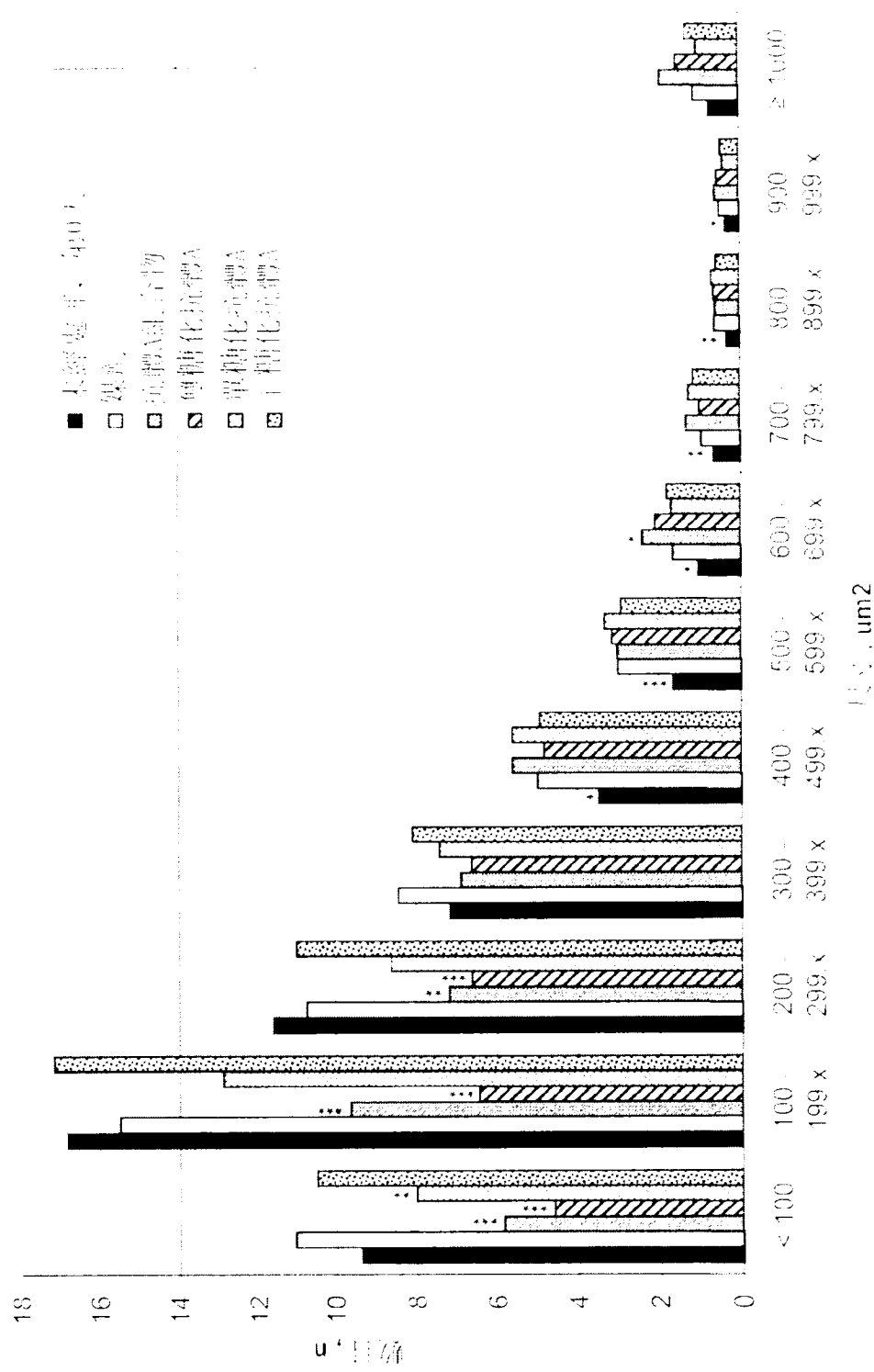


圖 18C

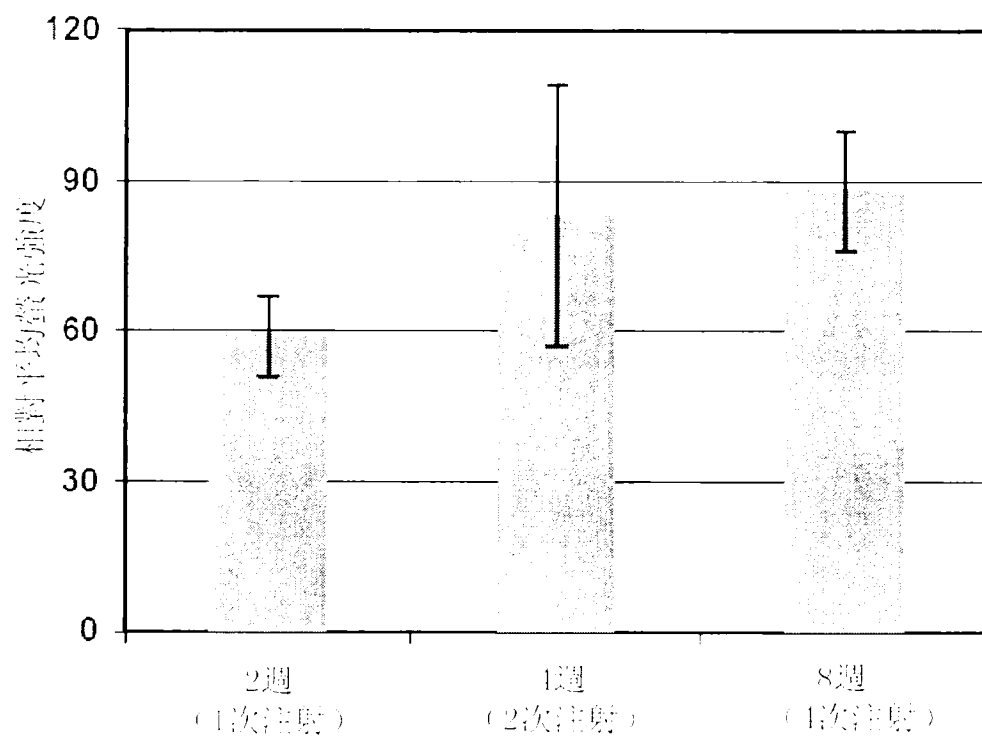
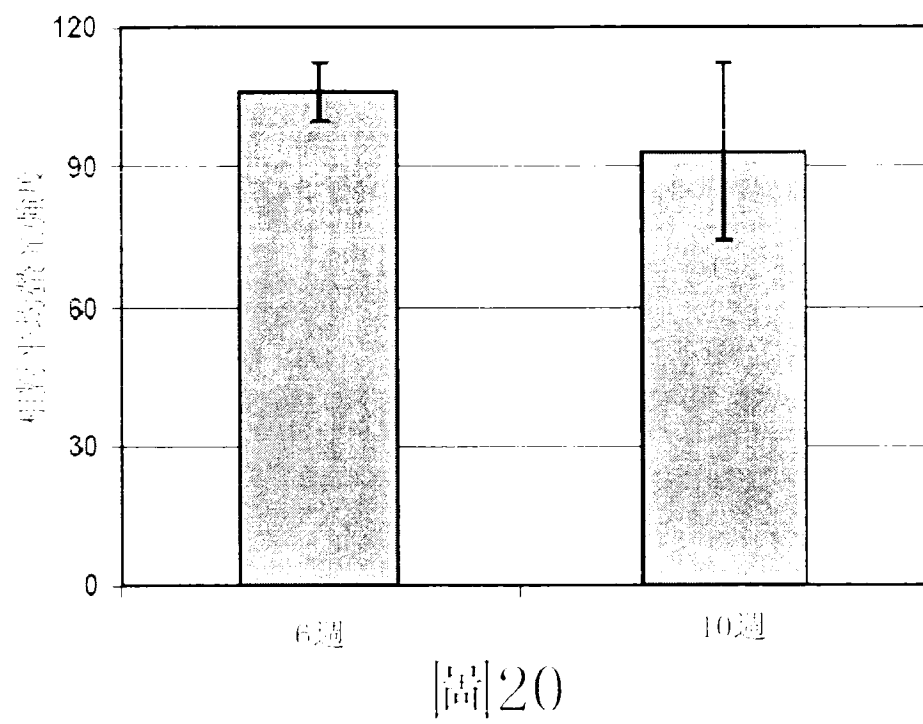


圖 19



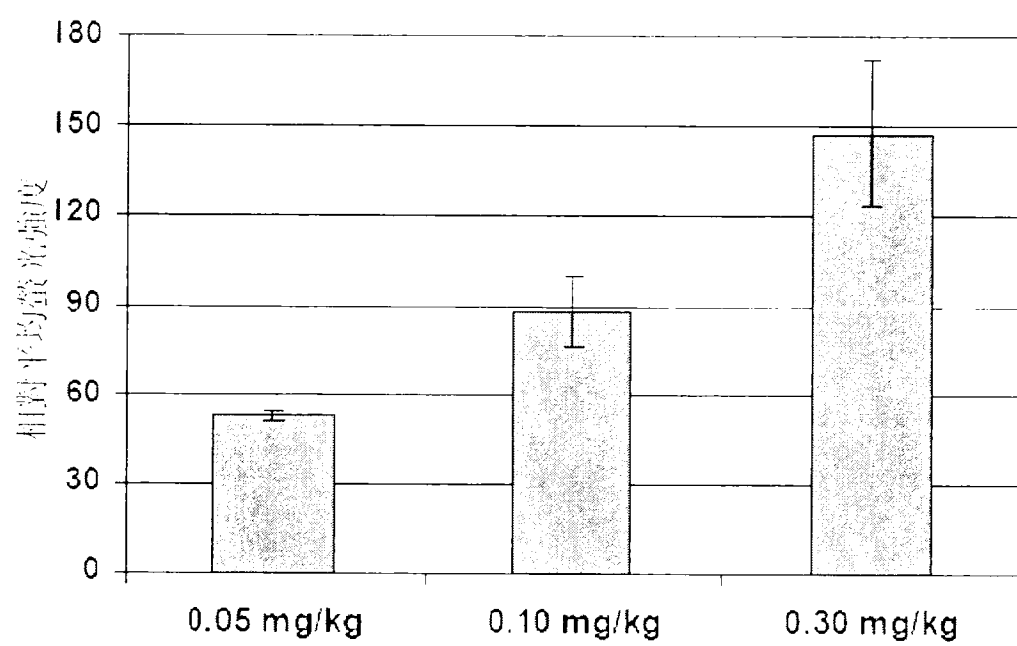


圖21

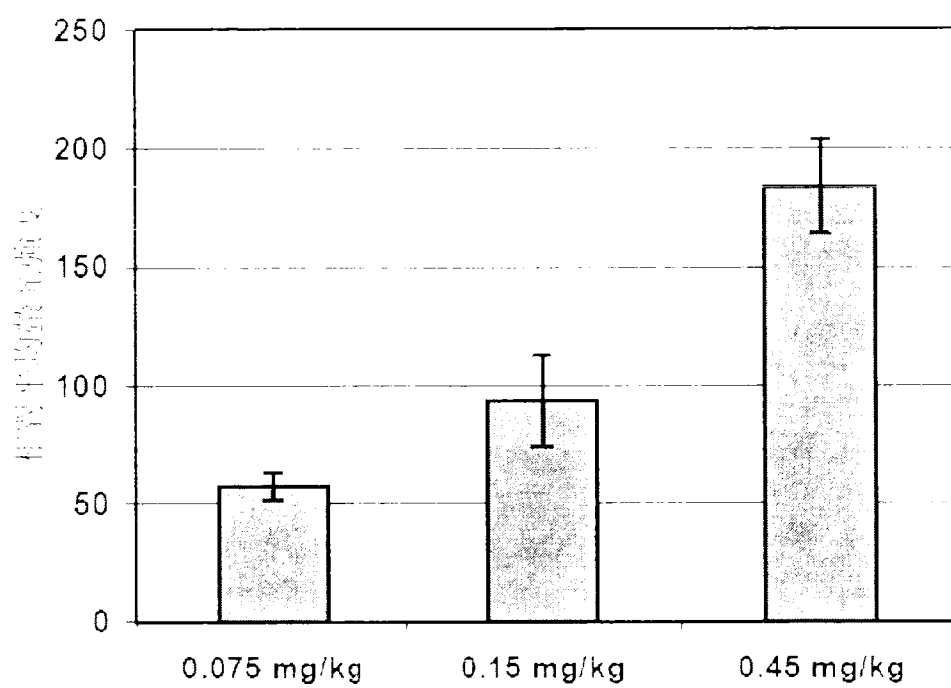


圖22

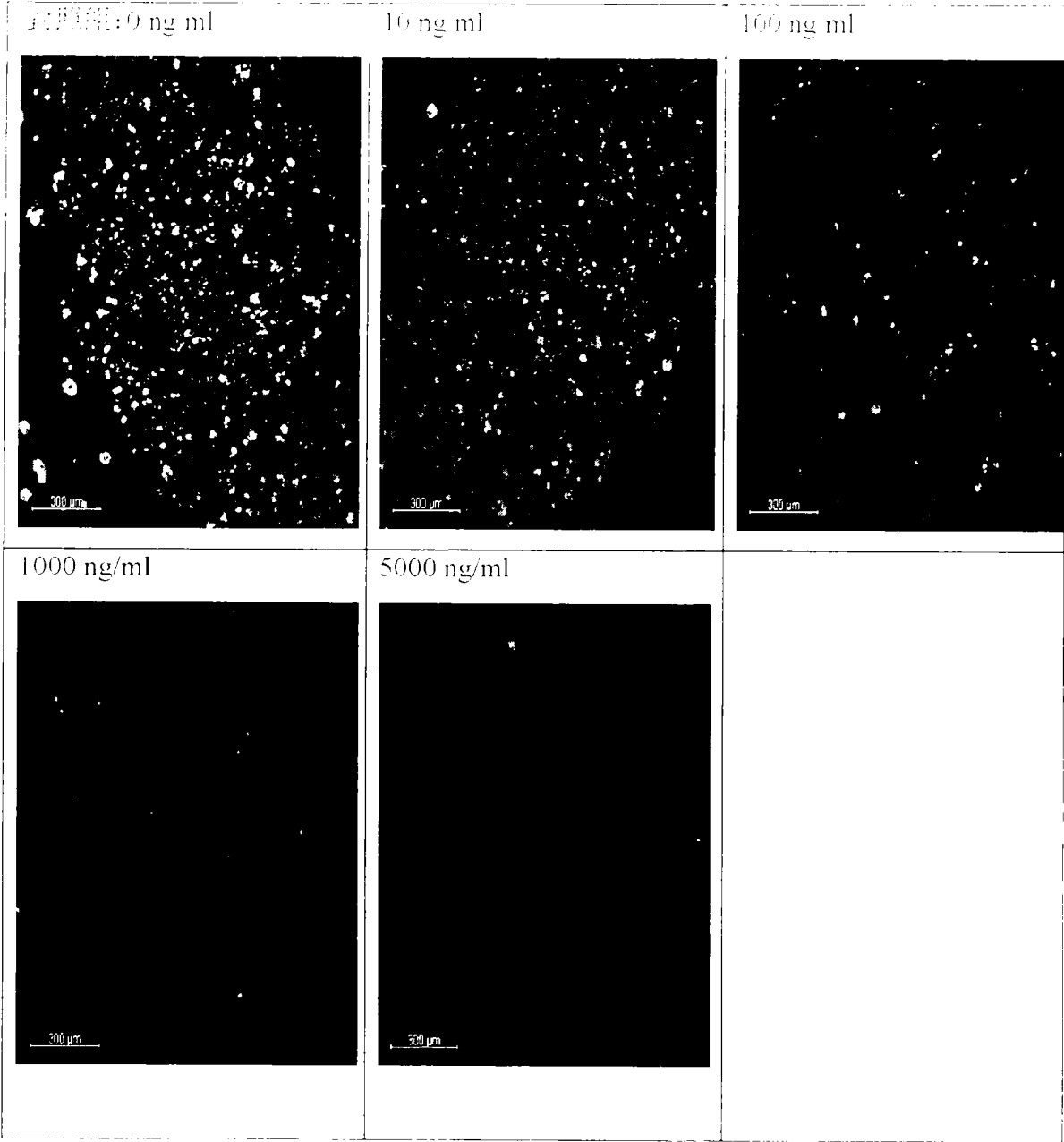


圖23

LM-05-739

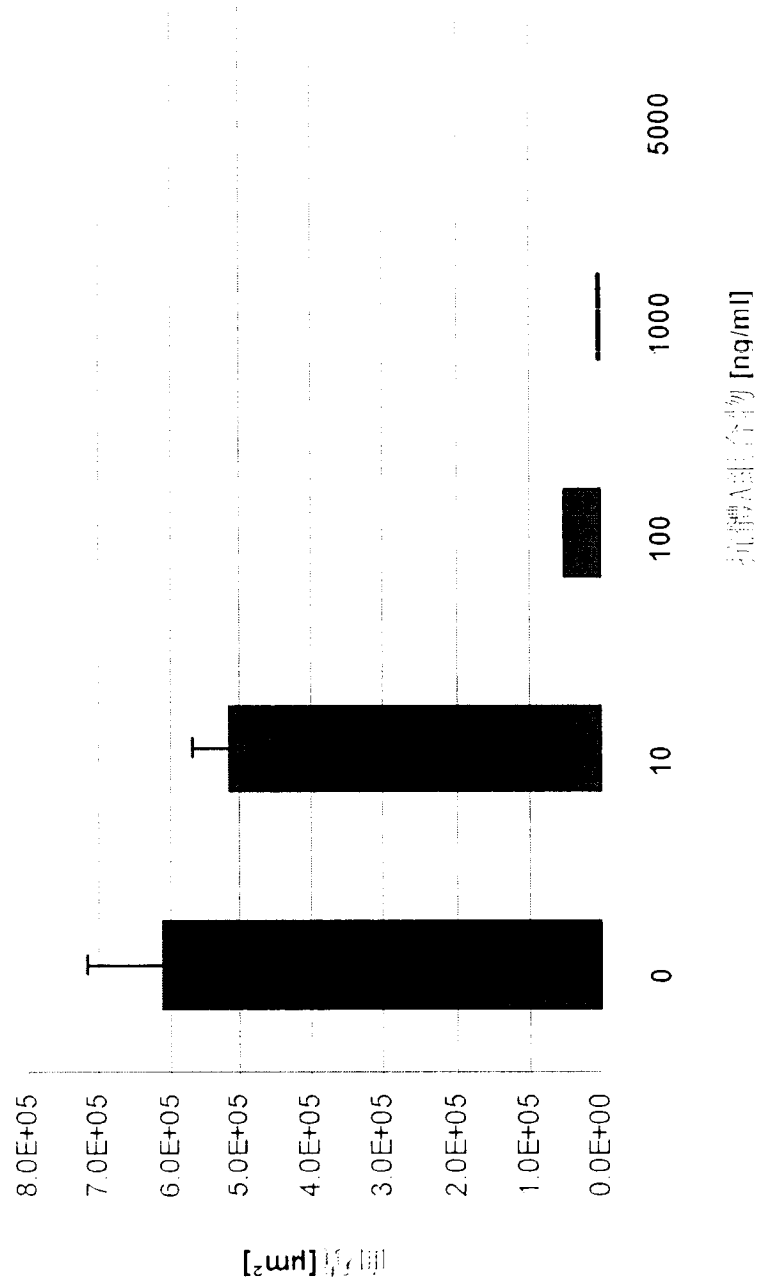


圖 24A

LM-05-739

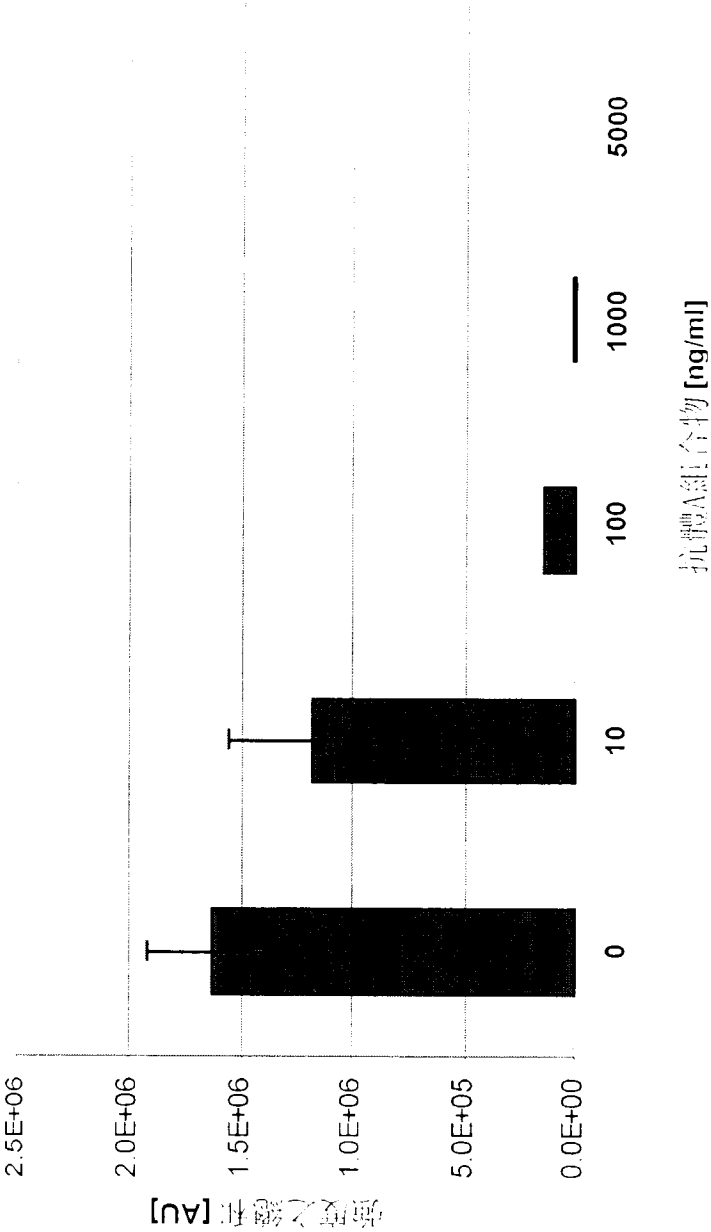


圖24B

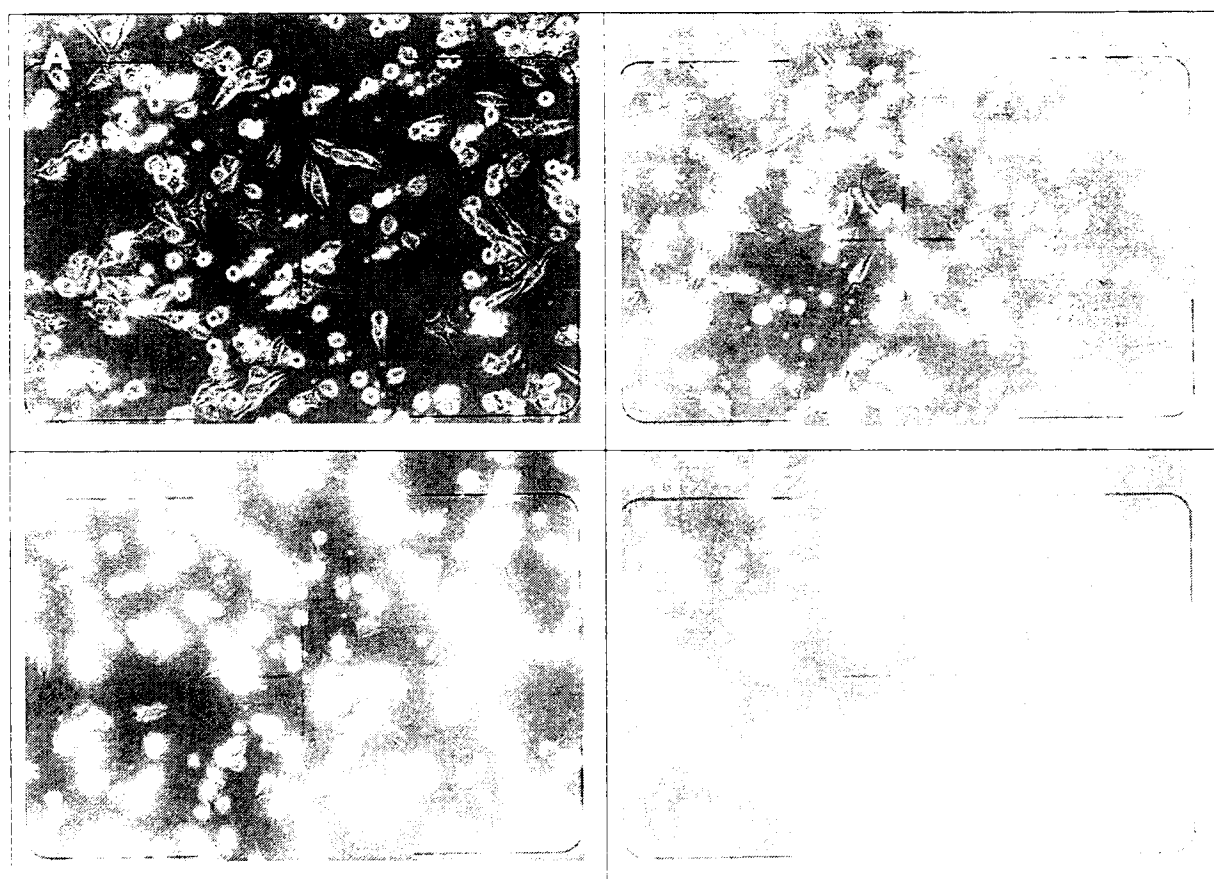


圖25

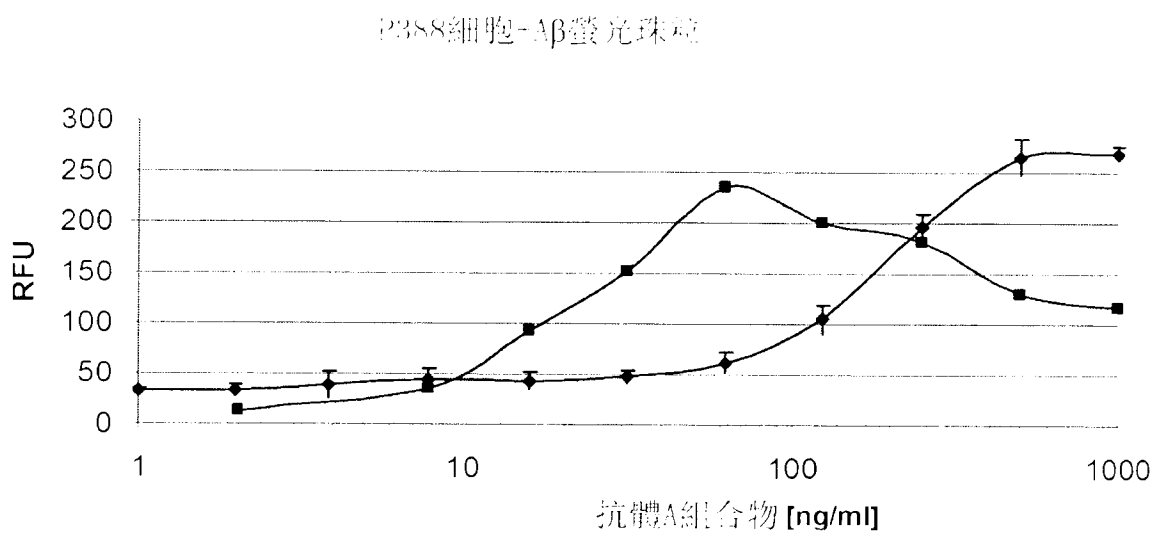


圖26

名稱	結構	名稱	結構
Asn 306_G0		Asn 52_G2_0NANA-F	
Asn 306_G0-GlcNac		Asn 52_G2_1NANA-F	
Asn 306_G1		Asn 52_G2_2NANA-F	
Asn 306_G2		Asn 52_hyb_Man5_1NANA	
Asn 306_G0-F		Asn 52_hyb_Man4_1NANA	
Asn 306_G1-F		Asn 52_hyb_Man3_1NANA	
Asn 306_G2-F		Asn 52_Man5	
Asn 306_Man5			

○ 岩藻糖 △ 甘露糖 ○ \ 乙醯基葡萄糖胺 □ 半乳糖 ○ \ 乙醯基神經氨酸 < "Lx" 表示混合結構

圖27

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(14)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)