

公告本

附件 3：第 92105368 號專利申請案
 中文說明書替換本(含序列表及圖式)
 民國 99 年 4 月 27 日修正

840406

發明專利說明書

99年4月27日修正本

(填寫本書件時請先行詳閱申請書後之申請須知，作※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：92105368 ※ IPC 分類：G01N33/566※ 申請日期：92 年 03 月 12 日 (2006.01)

壹、發明名稱：

(中文) 能辨識 β - 濕粉樣蛋白肽之人類化抗體(英文) Humanized antibodies that recognize beta amyloid peptide貳、發明人(共2人)

發明人 1

姓名：(中文) 顧瑞克 貝西(英文) BASI, GURIQ住居所地址：(中文) 美國加州巴洛艾托羅德路五一四號(英文) 514 Rhodes Drive, Palo Alto, CA 94303,
U.S.A.參、申請人(共2人)

申請人 1

姓名或名稱：(中文) 艾倫法瑪國際有限公司(英文) ELAN PHARMA INTERNATIONAL LIMITED住居所地址：(中文) 愛爾蘭威斯米斯郡艾士隆蒙克斯蘭(或營業所) (英文) Monksland, Athlone, County Westmeath,
Ireland國籍：(中文) 愛爾蘭 (英文) IRELAND代表人：(中文) 1. 威廉 丹尼爾(英文) 1. DANIEL, WILLIAM F.

說明書申請人及發明人續頁

發明人 2

姓 名 : (中文) 喬西 沙登哈

(英文) SALDANHA, JOSE

住居所地址 : (中文) 英國密得塞斯安菲德菲爾布魯克街二十一號

(英文) 21 Fillebrook Avenue, Enfield,
Middlesex EN1 3BD, United Kingdom申請人 2

姓名或名稱 : (中文) 衛斯公司

(英文) WYETH

住居所地址 : (中文) 美國新澤西州馬迪遜吉羅達農場五號

(英文) Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940,
U.S.A.

國 籍 : (中文) 美國 (英文) U.S.A.

代 表 人 : (中文) 蓋爾 馬修

(英文) MATTHEWS, GALE

捌、聲明事項

■主張專利法第二十四條第一項優先權：

【格式請依：受理國家（地區）；日期；案號 順序註記】

1.美國 ; 2002/03/12 ; 60/363,751

■熟習該項技術者易於獲得，不須寄存。

(1)

九、發明說明

【發明所屬之技術領域】

本發明關於能辨識 β -澱粉樣蛋白肽之人類化抗體。

相關的申請案

本申請案申稱先前申請的臨時專利申請案 U.S. Serial No. 60/363,751(申請日期 2002 年 3 月 12 日)，標題 "Humanized Antibodies That Recognize Beta-Amyloid Peptide" 的利益。上述參考文獻全文在此併入參考文獻。

【先前技術】

阿茲海默氏症(AD)是造成老年痴呆症的進行性疾病。參閱 Selkoe, TINS 16:403(1993); Hardy et al., WO 92/13069; Selkoe, J. Neuropathol. Exp. Neurol. 53:438(1994); Duff et al., Nature 373:476(1995); Games et al., Nature 373:523(1995)。大體而言，此疾病可分成二種範疇：發生在老年人(65 歲以上)之遲發型，以及發生在老年之前，即 35 至 60 歲之間的早發型。在此二類型之疾病中，其病理學雖然相同，但早發型的異常性似乎更嚴重且散佈更廣。此疾病之特徵在於至少有二種類型之腦部損害，分別為神經纖維纏結以及老年斑。神經纖維纏結是細胞內相關於 tau 蛋白質的微管沈澱物，其係由二個成對而相互扭曲的絲狀體組成。老年斑(即澱粉樣蛋白斑)是多至 150 微米的不規則神經氈區域，腦組織切片透過顯微鏡的分析可看見其中心有細

(2)

胞外的澱粉樣蛋白沈澱物。腦內澱粉樣蛋白斑堆積亦與唐氏綜合症及其它認知的病症相關。

蛋白斑的主要組份是一種肽，稱為 $A\beta$ 或 β -澱粉樣蛋白肽。 $A\beta$ 肽是一種橫越細胞膜之較大型糖蛋白質，稱為澱粉樣蛋白前驅物蛋白質(APP)的內部片段，有 39-43 個胺基酸，4-kDa 大小。彼是 APP 經不同分泌酶酵素水解之結果， $A\beta$ 主要可分成短型(長度為 40 個胺基酸)，及長型(長度為 42-43 個胺基酸)。APP 厥水性的橫越細胞膜之結構區部位位於 $A\beta$ 之羧基端，具有使 $A\beta$ (尤其是長型)聚集成蛋白斑之能力。腦部中澱粉樣蛋白斑堆積最後會導致神經元細胞的死亡。與此類型神經惡化相關的症狀是阿茲海默氏症。

APP 蛋白質內之許多突變與阿茲海默氏症相關。參閱例如 Goate et al., Nature 349:704}(1991)(纈胺酸⁷¹⁷至異白胺酸)；Chartier Harlan et al. Nature 353:844(1991)(纈胺酸⁷¹⁷至甘胺酸)；Murrell et al., Science 254:97(1991)(纈胺酸⁷¹⁷至苯丙胺酸)；Mullan et al., Nature Genet. 1:345(1992)(雙突變改變離胺酸⁵⁹⁵-甲硫胺酸⁵⁹⁶至天門冬醯胺酸⁵⁹⁵-白胺酸⁵⁹⁶)。該突變似乎可因增加或改變 APP 至 $A\beta$ 之作用而引起阿茲海默氏症，尤其是加工 APP 以增加長型 $A\beta$ (即 $A\beta$ 1-42 以及 $A\beta$ 1-43)之含量。其它基因突變，例如早老因子基因、PS1 以及 PS2，似可間接影響 APP 加工，增加長型 $A\beta$ 之產量(參閱 Hardy, TINS 20:154(1997))。

(3)

使用小鼠模式已可成功地測定澱粉樣蛋白斑在老年痴呆症的顯著性(Games et al., supra, Johnson-Wood et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:1550(1997))。特定言之，當對 PDAPP 導入外來基因的老鼠(表現人類 APP 之突變形式，並在幼年時即產生阿茲海默氏症)注射長型 A β 時，彼可降低老年痴呆症的進展以及增加 A β 肽之抗體效價(Schenk et al., Nature 400, 173(1999))。以上之觀察指出 A β (尤其是長型 A β)是阿茲海默氏症的病因。

據此，須要治療阿茲海默氏症之新療法及試劑，特定言之，能在生理(例如無毒的)劑量下具有治療效應的療法及試劑。

【發明內容】

本發明特色是一種新的免疫試劑，特定言之是預防及治療呈澱粉樣疾病(例如阿茲海默氏症)的治療用抗體試劑。本發明係基於(至少部份)確認及鑑定可專一結合於 A β 肽之單株抗體，且可有效的減少蛋白斑及/或減少與成澱粉樣病症相關的神經炎性失調。分析此抗體的構造及功能可導致設計各種用於預防及/或治療的人類化抗體。

特定言之，本發明的特色是人類化此抗體之變異區，據此提供人類化免疫球蛋白或抗體鏈、完整的人類化免疫球蛋白或抗體、以及功能性免疫球蛋白或抗體片段，尤其是此類抗體之抗原結合片段。

文中亦揭示包含此類特定單株抗體之互補性決定區域的多勝肽、多核苷酸試劑、載體以及適用於編碼該多勝肽

(4)

之宿主。

本發明揭示治療呈澱粉樣疾病或病症(例如阿茲海默氏症)之方法、應用於該用途之藥學組成物及組套。

本發明亦包括確認此類特定單株抗體內產生適當免疫功能的重要殘基的方法，以及在設計治療試劑時確認人類化抗體上可經取代後改良結合親和力及/或降低產生免疫性之殘基的方法。

本發明的特色亦為抗體(例如具有改變致效劑功能的人類化抗體)以及其治療上的用途。

發明之詳細描述

本發明之特色為預防或治療阿茲海默氏症或其它呈澱粉樣疾病之新穎的免疫試劑及方法。本發明係在(至少部份)特徵化單株免疫球蛋白(12B4)，其可有效結合 β 澱粉樣蛋白蛋白質(A β)(例如結合可溶性及/或聚集的 A β)、中介吞噬作用(例如 A β 的聚集)、降低蛋白斑及/或降低(例如病患之)神經炎性失調。本發明進一步的係在測定以及鑑定各種 12B4 免疫球蛋白之一級及二級結構的輕鏈及重鏈以及鑑定對活性及產生免疫性具重要性的殘基。

免疫球蛋白的特色包括在此描述的 12B4 單株免疫球蛋白之各種輕鏈及/或各種重鏈。較佳的免疫球蛋白(例如治療的免疫球蛋白)之特色包括人類化的各種輕及/或人類化的各種重鏈。較佳的各種輕鏈及/或各種重鏈包括取自 12B4 免疫球蛋白之互補性決定區域(CDR)(例如供體免疫球蛋白)以及實質上取自人類受體免疫球蛋白之變異架構

(5)

區域。"取自實質上人類受體免疫球蛋白的"係指取自人類受體序列的主要或關鍵架構殘基，然而在某些殘基位置上可選擇性的用殘基取代以改良人類化免疫球蛋白的活性(例如改變其活性以更緊密的模仿供體免疫球蛋白之活性)或選擇性的降低人類化免疫球蛋白之免疫產生性。

在具體實施例之一中，本發明的特色是人類化免疫球蛋白之輕鏈或重鏈，其係包括12B4變異區之互補性決定區域(CDRs)(即包括序列確認號碼：2之輕鏈變異區序列的一、二或三個CDRs或包括序列確認號碼：4之重鏈變異區序列的一、二或三個CDRs)，以及包括實質上取自人類受體免疫球蛋白輕鏈或重鏈序列之變異架構區域，其限制條件為至少一個架構殘基之殘基返回突變至對應的鼠科動物殘基，其中該返回突變實質上不影響該鏈直接結合A β 之能力。

在另一具體實施例中，本發明的特色是人類化免疫球蛋白之輕鏈或重鏈，其係包括12B4變異區互補性決定區域(CDRs)(例如包括序列確認號碼：2輕鏈變異區序列之一、二或三個CDRs及/或包括序列確認號碼：4重鏈變異區序列之一、二或三個CDRs)，以及包括實質上取自人類受體免疫球蛋白輕鏈或重鏈序列之變異架構區域，其限制條件為至少一個架構殘基係經小鼠12B4之輕鏈或重鏈變異區序列的對應胺基酸殘基取代，該架構殘基係選自：(a)非直接共價鍵結合於抗原的殘基；(b)與CDR相鄰的殘基；(c)與CDR交互作用的殘基(例如以解析結構的同源習知免疫

(6)

球蛋白鏈為基礎模式化輕鏈或重鏈加以確認)；以及(d)參與 VL-VH 界面的殘基。

在另一具體實施例中，本發明的特色是人類化免疫球蛋白之輕鏈或重鏈，其係包括 12B4 變異區 CDRs 以及各種取自人類受體免疫球蛋白輕鏈或重鏈序列之架構區域，其限制條件為至少一個架構殘基係經小鼠 12B4 之輕鏈或重鏈變異區序列的對應胺基酸殘基取代，此架構殘基經變異區三維模式分析後確認能影響輕鏈變異區構像或功能，例如能與抗原交互作用之殘基、接近抗原結合部位之殘基、與 CDR 交互作用之殘基、與 CDR 相鄰的殘基、距 CDR 6 Å 以內之殘基、標準殘基、游標區殘基、鏈間裝填殘基、獨特的殘基、或結構模型表面之糖化位點殘基。

在另一具體實施例中，本發明的特色除了上述之取代以外，至少還取代一個稀有之人類架構殘基。例如，稀有殘基可經各種人類鏈序列在此位置上的共同胺基酸殘基取代。此外，稀有殘基可經同源種系各種鏈序列之對應胺基酸殘基取代。

在另一具體實施例中，本發明的特色是人類化免疫球蛋白，其係包括上述該免疫球蛋白之輕鏈以及重鏈，或抗原-結合片段。在典型的具體實施例中，人類化免疫球蛋白結合(例如專一性結合) β 濘粉樣蛋白肽($A\beta$)之結合親和力至少為 $10^7 M^{-1}$ 、 $10^8 M^{-1}$ 、或 $10^9 M^{-1}$ 。在另一具體實施例中，免疫球蛋白或抗原結合片段包括具有同功型 $\gamma 1$ 之重鏈。在另一具體實施例中，免疫球蛋白或抗原結合片段

(7)

係與可溶性 β 濘粉樣蛋白肽($A\beta$)以及聚集的 $A\beta$ 結合(例如專一結合)。在另一具體實施例中，免疫球蛋白或抗原結合片段可間接中介 β -澗粉樣蛋白肽($A\beta$)之吞噬作用(例如誘發吞噬作用)。在另一具體實施例中，免疫球蛋白或抗原結合片段可通過患者之血腦屏障。在另一具體實施例中，疫球蛋白或抗原結合片段可降低患者之 β 濗粉樣蛋白肽($A\beta$)含量及神經炎性失調。

在另一具體實施例中，本發明的特色是嵌合型免疫球蛋白，其係包括 12B4 變異區(例如序列確認號碼：2 或序列確認號碼：4 之變異區序列)。在另一具體實施例中，免疫球蛋白、或其抗原-結合片段進一步的包括免疫球蛋白 G1 之恆定區。

在此描述之免疫球蛋白尤其適用於預防或治療呈澗粉樣疾病的方法。在具體實施例之一中，本發明的特色是預防或治療呈澗粉樣疾病(例如阿茲海默氏症)的方法，其係包含對病患投用有效劑量的在此描述的人類化免疫球蛋白。在另一具體實施例中，本發明之特色為藥學組成物，其係包括在此描述之人類化免疫球蛋白以及醫藥載體。本發明的特色亦為產生在此描述之免疫球蛋白或免疫球蛋白片段或鏈之分離的核酸分子、載體以及宿主細胞，與產生該免疫球蛋白、免疫球蛋白片段或免疫球蛋白鏈的方法。

本發明進一步的特色是在產生人類化 12B4 免疫球蛋白時，用以確認能取代之 12B4 殘基的方法。例如，確認能取代之變異架構區域殘基的方法包含以經解析的同源免疫球

(8)

蛋白結構模式化 12B4 變異區之三維結構以及分析該模式中能影響 12B4 免疫球蛋白變異區構像或功能之殘基，藉以確認能取代之殘基。本發明進一步的特色係使用序列確認號碼：2 或 序列確認號碼：4 之 變異區序列，或其任何部份，產生 12B4 免疫球蛋白、12B4 免疫球蛋白鏈、或其結構區之三度空間影像。

本發明進一步的特色為具有經改變的致效劑功能(例如結合到致效劑分子，例如補體或致效細胞受體之能力)之免疫球蛋白。特定言之，本發明之免疫球蛋白具有經改變的恆定區(例如 Fc 區域)，其中 Fc 區域內至少有一個胺基酸殘基已被不同殘基或側鏈取代。在具體實施例之一中，此經修飾之免疫球蛋白是 G 型免疫球蛋白，彼在 Fc 區域中至少包含一個代替的胺基酸殘基，因此該免疫球蛋白相較於未經修飾之免疫球蛋白，具有經改變的致效劑功能。在特定的具體實施例中，本發明免疫球蛋白具有經改變的致效劑功能，因此產生免疫性的較低(例如不刺激非所要求的致效細胞之活性、溶解、或與補體結合)，彼具有改良的澱粉樣蛋白清除率性質，及 / 或具有令人滿意的半生期。

在描述本發明之前，為了幫助對本發明之了解，因此對下文所使用之某些術語作出定義。

本文之 "免疫球蛋白" 或 "抗體" (在本文中係可通用) 意指具有由二個重鏈及二個輕鏈組成之四個多勝鍵基本結構之蛋白質，該鏈係經(例如)鏈間雙硫鍵加以穩定，其具有

(9)

專一結合抗原的能力。本文之"單鏈免疫球蛋白"或"單鏈抗體"(在本文中係通用)意指由重鏈及輕鏈組成之二個多勝鍵結構之蛋白質，該鏈例如經鏈間肽連結子加以穩定，其具有專一結合抗原的能力。本文之"結構區"意指重鏈或輕鏈多肽的球狀區域，其係由例如 β -平板及/或鏈內雙硫鍵組成之肽環(例如包含3至4個肽環形)加以穩定。本文中之結構區可進一步的分成"固定的"或"變異"結構區，在"固定的"結構區中各成員之結構區內較無序列變異，而在"變異"結構區中各類成員之結構區內有顯著的變異。在此技藝中抗體或多肽"結構區"經常與抗體或多肽"區域"相互通用。抗體輕鏈的"固定"結構區可與"輕鏈恆定區"、"輕鏈固定結構區"、"CL"區域或"CL"結構區相互通用。抗體重鏈的"固定"結構區可與"重鏈恆定區"、"重鏈固定結構區"、"CH"區域或"CH"結構區相互通用。抗體輕鏈的"變異"結構區可與"輕鏈變異區"、"輕鏈變異結構區"、"VL"區域或"VL"結構區相互通用。抗體重鏈"變異"結構區可與"重鏈恆定區"、"重鏈固定的結構區"、"VH"區域或"VH"結構區相互通用。

本文之"區域"亦可意指一部份或部份之抗體鏈或抗體鏈結構區(例如本文定義之一部份或部份之重鏈或輕鏈或一部份或部份之固定的或變異結構區)，以及該鏈或結構區與更多的不連接的部份。例如輕鏈及重鏈或輕鏈及重鏈變異結構區包括散布在本文定義的"架構區域"或"FRs"間之"互補性決定區域"或"CDRs"。

(10)

免疫球蛋白或抗體可為單體或聚合體的形式，例如 IgM 抗體為五合體的形式及 / 或 IgA 抗體為單體、雙體或多體的形式。本文之 "片段" 意指一部份或部份之抗體或抗體鏈，其所包含之胺基酸殘基比完整的或完全的抗體或抗體鏈少。完整的或完全的抗體或抗體鏈經化學或酵素的處理後可得到片段。片段亦可得自重組方法。典型的片段包括 Fab、Fab'、F(ab')2、Fabc 及 / 或 Fv 片段。本文之 "抗原結合片段" 意指免疫球蛋白或抗體結合抗原或與完整的抗體（即與彼來源之完整的抗體）競爭抗原結合（即專一性結合）的多肽片段。

本文之 "構像" 意指蛋白質或多肽（例如抗體、抗體鏈、結構區或其區域）之三級結構。例如，"輕（或重）鏈構像" 意指輕（或重）鏈變異區之三級結構，以及 "抗體構像" 或 "抗體片段構像" 意指抗體或其片段之三級結構。

"抗體" "專一性結合" 意指抗體對抗原或較佳的抗原決定部位展現可觀的親和力，且較佳者不展現顯著的交互反應性。"可觀的" 或較佳的結合包括結合親和力至少為 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 M⁻¹、或 10^{10} M⁻¹。親和力以大於 10^7 M⁻¹，較佳者大於 10^8 M⁻¹ 者為更佳。上述之中間值亦預期的為本發明範圍且親和力範圍的較佳結合親和力為例如 10^6 至 10^{10} M⁻¹，較佳者 10^7 至 10^{10} M⁻¹，更佳者 10^8 至 10^{10} M⁻¹。"不展現顯著的交互反應性" 的抗體將不太會結合至非令人滿意的物質（例如非令人滿意的蛋白質物質）。例如專一性結合至 A β 的抗體將會結合 A β 但不會與非 A β 蛋白質或

(11)

肽類(例如噬菌斑內包括之非 A β 蛋白質或肽類)有顯著的反應。對較佳的抗原決定部位具專一性的抗體將(例如)不會與相同蛋白質或肽的遠端抗原決定部位有顯著的雜交反應。專一性結合可依據任何確認之決定該結合的技藝方法測定。較佳者，專一結合的檢測法係依據 Scatchard 分析及/或競爭性結合測定。

結合片段係經重組 DNA 技藝、或經酵素或化學方法自完整的免疫球蛋白切除而製成。結合片段包括 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fabc、Fv、單鏈、及單鏈抗體。除了"雙專一性"或"雙功能性"免疫球蛋白或抗體之外，據瞭解免疫球蛋白或抗體之各個結合部位是相同的。"雙專一性"或"雙功能性抗體"是人造的雜化抗體，其具有二種不同的重鏈/輕鏈對，及二種不同的結合部位。雙專一性抗體可用各種方法製作，包括融合瘤融合或聯結 Fab'片段。參閱例如 Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321(1990); Kostelny et al., J. Immunol. 148, 1547-1553(1992)。

本文之"人類化免疫球蛋白"或"人類化的抗體"意指包括至少一個人類化免疫球蛋白或抗體鏈(即至少一個人類化的輕鏈或重鏈)的免疫球蛋白或抗體。本文之"人類化免疫球蛋白鏈"或"人類化的抗體鏈"(即"人類化免疫球蛋白輕鏈"或"人類化免疫球蛋白重鏈")意指一種免疫球蛋白或抗體鏈(即輕鏈或重鏈)，其具有實質上取自人類免疫球蛋白或抗體變異架構區域的變異區以及實質上取自非人類免

(12)

疫球蛋白或抗體的互補性決定區域(CDRs)(例如至少一個CDR，較佳者二個CDRs，更佳者三個CDRs)，且進一步的包括恆定區(例如，在輕鏈是至少一個恆定區或其部份，而在重鏈較佳者是三個恆定區)。本文之"人類化的變異區"(例如"人類化的輕鏈變異區"或"人類化的重鏈變異區")意指包括實質上取自人類免疫球蛋白或抗體的變異架構區域之變異區，以及實質上取自非人類免疫球蛋白或抗體之互補性決定區域(CDRs)。

"實質上取自人類之免疫球蛋白或抗體"或"實質上人類"係指在比對時可校整至人類免疫球蛋白或抗體之胺基酸序列，該區域與人類架構或恆定區序列至少有80-90%相同，較佳者至少90-95%相同，更佳者至少95-99%相同(即具有局部的序列相似性)，允許有例如保留性取代、共識性序列取代、種系取代、返回突變等。引入保留性取代、共識性序列取代、種系取代、返回突變、及其類似者，經常稱為"經最適化"之人類化抗體或鏈。"實質上取自非人類免疫球蛋白或抗體"或"實質上非人類"係指免疫球蛋白或抗體序列與非人類生物體(例如非人類之哺乳動物)至少有80-95%，較佳者至少90-95%，更佳者96%、97%、98%、或99%相同。

據此，人類化免疫球蛋白或抗體之所有區域或殘基，或人類化免疫球蛋白或抗體鏈，除了可能地CDRs之外，實質上與一種或多種天然的人類免疫球蛋白序列其對應的區域或殘基相同。本文之"對應區域"或"對應殘基"意指第

(13)

一種及第二種序列在經過最理想的校整比對後，係與第一種胺基酸或核苷酸序列佔有相同(即相等)位置之第二種胺基酸或核苷酸序列的區域或殘基。

本文之"顯著的特性"係指二種多肽序列，經過最理想的校整(例如經程式 GAP 或 BESTFIT 以預設隙加權)，分享至少 50-60% 之序列相似性，較佳者 60-70% 之序列相似性，更佳者 70-80% 之序列相似性，更佳者至少 80-90% 之相似性，再更佳者至少 90-95% 之相似性，以及最佳者至少 95% 或更多之序列相似性(例如 99% 或更多之序列相似性)。本文之"實質上相同"係指二種多肽序列，經過最理想的校整(例如經程式 GAP 或 BESTFIT 以預設隙加權)，分享至少 80-90% 之序列相似性，較佳者 90-95% 之序列相似性，更佳者至少 95% 或更多之序列相似性(例如 99% 或更多之序列相似性)。在序列比對時，一般是用一個序列作為參考序列，以比較測試序列。當使用序列比對算則時，先將測試及參考序列 輸入電腦，指定次序列坐標(若須要)，以及指序列算則程式參數。然後序列比對算則會基於指定的程式參數計算測試序列相對於參考序列的序列相似性百分比。

最理想的序列校整比對之進行方法可用例如：局部的同源現象算則 (Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482(1981))、同源現象校整算則 (Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443(1970))、搜尋相似性的方法 (Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444(1988))、

(14)

完成電腦化的此類算則(GAP、BESTFIT、FASTA、及TFASTA，Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI)、或目視檢驗(一般而言參閱Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology)。用於決定序列相似性百分比及序列相似性的算則之一個實施例為BLAST算則，其係描述於Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403(1990)。進行BLAST分析之軟體公佈於National Center for Biotechnology Information(可經由National Institutes of Health NCBI internet server網際網路伺服器公開地存取)。雖然自訂的參數亦可使用，一般可是用預設的程式參數以進行序列比對。比對胺基酸序列時，BLAST程式使用的預設值：長度(W)為3、期望值(E)為10、以及BLOSUM62分數基質(參閱Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915(1989))。

較佳者，不同的殘基位置因保留性胺基酸取代而顯示出不同。為了區分成保留性或非守恒性的胺基酸取代，可將胺基酸分成以下數群：第一群(厭水性的側鏈)：leu、met、ala、val、leu、ile；第二群(中性親水性的側鏈)：cys、ser、thr；第三群(酸性的側鏈)：asp、glu；第四群(鹼性的側鏈)：asn、gln、his、lys、arg；第五群(影響鏈方向的殘基)：gly、pro；以及第六群(芳香族側鏈)：trp、tyr、phe。保留性取代包含同群內胺基酸間之取代。非守恒性的取代則是由不同群之胺基酸間之交換所構成。

(15)

較佳者，人類化免疫球蛋白或抗體結合抗原之親和力為對應的非人類化抗體的三、四、或五倍。例如，若非人類化的抗體具有結合親和力為 10^9 M^{-1} ，則人類化的抗體之結合親和力至少為 $3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 、 $4 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 或 $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 。當描述免疫球蛋白或抗體鏈之結合性質時，可基於鏈"直接與抗原(例如 A β)結合"之能力對鏈加以描述。當完整的免疫球蛋白或抗體(或其抗原結合片段)具有專一性結合性質或結合親和力時，則該鏈可"直接地與抗原結合"。若突變可影響(例如減低)完整的免疫球蛋白或抗體(或其抗原結合片段)之結合親和力，而該抗體或其抗原結合片段與缺少該突變之鏈相差至少一個數量級，則該突變(例如返回突變)可實質上影響重鏈或輕鏈直接與抗原結合之能力。若突變可影響(例如減低)完整的免疫球蛋白或抗體(或其抗原結合片段)之結合親和力，而該抗體或其抗原結合片段與缺少該突變之鏈僅相差二、三或四倍，則該突變不會實質上影響重鏈或輕鏈直接與抗原結合之能力。

本文之"嵌合型免疫球蛋白"或抗體意指異區取自第一種物種以及恆定區取自第二種物種之免疫球蛋白或抗體。嵌合型免疫球蛋白或抗體可構築(例如用遺傳工程方法)自屬於不同物種之免疫球蛋白基因片段。本文之"人類化免疫球蛋白"或"人類化的抗體"不預期包含上述定義之嵌合型免疫球蛋白或抗體。雖然人類化免疫球蛋白或抗體是以嵌合的方式建築(即包含一種蛋白質以上之區域)，但彼包括嵌合型免疫球蛋白或抗體所沒有的額外特色(即包含供

(16)

體 CDR 殘基之變異區以及受體架構殘基)。

"抗原"是抗體專一結合的實體(例如蛋白質的實體或肽)。

本文之"抗原決定部位"或"抗原決定位"意指抗原上可與免疫球蛋白或抗體(或其抗原結合片段)專一性結合的位點。抗原決定部位可由疊連群胺基酸或鄰近蛋白質之非疊連群胺基酸所形成。疊連群胺基酸形成的抗原決定部位在變性溶劑的曝露下一般仍可保留，而三級摺疊形成的抗原決定部位用形成變性溶劑處理後一般則會喪失。典型地抗原決定部位包括在獨特的空間構像中的至少 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15 個胺基酸。決定抗原決定部位空間構像)的方法包括，例如：X 射線結晶學以及 2 維核磁共振。參閱例如 Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed.(1996)。

辨識相同抗原決定部位的抗體可用顯示一個抗體阻塞另一抗體結合至目標抗原能力之簡單免疫檢測法(即競爭性的結合測定)加以確認。在測試免疫球蛋白可抑制參考抗體專一性結合至共同的抗原(例如 A β)之測定法中可測定競爭性的結合。許多競爭性結合測定型態已為習知的測定法，例如：直接或間接的固相放射免疫分析法(RIA)、直接地或間接的固相酵素免疫分析法(EIA)、三明治競爭測定(參閱 Stahli et al., Methods in Enzymology 9:242(1983))；直接地固相生物素-卵白素 EIA(參閱

(17)

Kirkland et al., J. Immunol. 137:3614(1986))；直接標記的固相測定、直接標記的固相三明治測定(參閱 Harlow and Lane, Antibodies:A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press(1988))；使用 I-125 直接標記的固相 RIA(參閱 Morel et al., Mol. Immunol. 25(1):7(1988))；直接地固相生物素-卵白素 EIA(Cheung et al., Virology 176:546(1990))；以及直接標記的 RIA(Moldenhauer et al., Scand. J. Immunol. 32:77(1990))。典型地，該測定包含使用結合至固體表面之純化的抗原或帶有此類抗原的細胞、未標記的測試免疫球蛋白以及標記的參考免疫球蛋白。在測試免疫球蛋白存在下決定標記物結合至固體表面或細胞的含量以測量競爭性的抑制。通常測試免疫球蛋白係過量的存在於測試中。通常當競爭抗體過量的存在時，將至少抑制 50-55%、55-60%、60-65%、65-70%、70-75% 或更多的參考抗體專一性結合至共同的抗原。

抗原決定部位亦可被免疫細胞(例如 B 細胞及 / 或 T 細胞)確認。可用活體外測定法決定抗原決定部位之細胞辨視作用，其係測定³H-胸腺嘧啶併入計量抗原依存的增殖、細胞激動素分泌、抗體分泌、或抗原-依存的殺死作用(細胞毒性的 T 淋巴細胞測定)。

在人類澱粉樣蛋白前驅物蛋白質(APP)中可發現典型的抗原決定部位或抗原決定位，但較佳者是在 APP 的 A β 肽中發現抗原決定位。APP 有多重異構形式，例如 APP⁶⁹⁵、APP⁷⁵¹以及 APP⁷⁷⁰。

(18)

APP 內的胺基酸係依據 APP⁷⁷⁰的異構形式序列編號(參閱例如 GenBank Accession No. P05067)。A_β(在此亦稱為 β 濘粉樣蛋白肽以及 A-β)肽是 APP 內部 39-43 個胺基酸的大約 4-kDa 的片段(A_β 39、A_β 40、A_β 41、A_β 42 以及 A_β 43)。例如 A_β 40是由 APP 之殘基 672-711組成，A_β 42是由 APP 之殘基 673-713 of APP 組成。APP 經不同分泌酵素在活體或原位中進行蛋白質水解後，發現 A_β 是"短型"(長度為 40 個胺基酸)，以及"長型"(長度介於 42-43 個胺基酸)。在此描述的較佳抗原決定部位或抗原決定位，位於 A_β 肽的 N-端內以及包括 A_β 胺基酸 1-10 的殘基，較佳者為 A_β 42 的殘基 1-3、1-4、1-5、1-6、1-7 或 3-7。額外的抗原決定部位或抗原決定位包括 A_β 的殘基 2-4、5、6、7 或 8，A_β 的殘基 3-5、6、7、8 或 9，或 A_β 42 的殘基 4-7、8、9 或 10。當抗體結合至具有特定殘基的抗原決定部位(例如 A_β 3-7)時，意指抗體專一性結合至內含特定殘基的多肽(即例如 A_β 3-7)。該抗體不必然地要與 A_β 3-7 上的每個殘基接觸。A_β 3-7 上每個單一的胺基酸取代或刪除不必然地可顯著的影響結合親和力。

本文之"呈澗粉樣疾病"包括與不溶的澗粉樣蛋白細纖維形成或儲存任何疾病。典型的呈澗粉樣疾病包括(但非限於)：全身性澗粉樣變性、阿茲海默氏症、成長後開始發作的糖尿病、帕金森氏病、杭丁頓氏舞蹈病、額顳骨的痴呆症、及與蛋白質感染素相關的可傳染的海綿狀體腦脊髓炎病變(人類的庫魯症以及 Creutzfeldt-Jacob 疾病)以及

(19)

羊的搔癢症以及牛的 BSE)。不同呈澱粉樣疾病之定義或其特徵在於儲存之細纖維的多肽成份之本質。例如可用 β -澱粉樣蛋白蛋白質儲存之澱粉樣蛋白的多肽成份(例如野生型、變型、或縮短型 β -澱粉樣蛋白蛋白質)特徵化阿茲海默氏症的病患或病人。據此，阿茲海默氏症是例如患者或病患的腦部"其特徵在於 A β 沈澱"或"與 A β 沈澱相關的疾病"之疾病的實施例。本文之" β -澱粉樣蛋白蛋白質"、" β -澱粉樣蛋白肽"、" β -澱粉樣蛋白"、"A β "以及"A β 肽"在此可相互通用。

"產生免疫性的藥劑"或"抗原"是指投用至哺乳動物後能誘發免疫反應對抗本身之藥劑，其可視需要併入佐劑。

本文之"治療"定義成對病患施用或投用治療劑，或對取自具有疾病、疾病症狀或病室之遺傳傾向的病患之分離組織或細胞株施用或投用治療劑，以治療、治癒、緩和、減輕、改變、痊癒、改善、改良或影響疾病、疾病症狀或疾病之遺傳傾向。

本文之"有效劑量"或"有效劑量"的定義是充分的達成或至少局部地達成所要求的效應之劑量。本文之"治療上有效劑量"的定義是充分的治療或至少局部地遏止疾病以及患有該疾病之病患的併發症之劑量。有效劑量將取決於感染之嚴重性以及病人自身免疫系統的一般狀態。

本文之"病患"包括得到預防性的或治療性的治療之人類以及其他哺乳動物的病患。

"可溶性"或"解離的" A β 意指非凝聚或非聚集的 A β

(20)

多肽，包括單體型可溶性與寡聚型可溶性 A β 多肽(例如可溶性 A β 二聚物、三聚物、及其類似者)。“不溶的”A β 意指凝聚的 A β 多肽，例如經非共價鍵結合之 A β 。據相信 A β (例 A β 42)是經由於至少部份地存在於肽 C-端(APP 橫越細胞膜之結構區部份)的厭水性殘基而聚集。在活體內可在生物的體液例如腦脊髓液及/或血清發現可溶性 A β 。此外，經由純淨的 DMSO 在音波振盪下溶解冷凍乾燥的肽可製備成可溶性 A β 。生成的溶液可用離心(例如 14,000×g, 4°C、10分鐘)去除任何不溶的微粒。

本文之“致效劑功能”意指抗體(例如 IgG 抗體)Fc 區域之活性以及包括例如抗體結合致效劑分子(例如補體及/或 Fc 受體)之能力，其可控制抗體的數個免疫功能，例如對致效細胞之活性、溶解、補體-調節的活性、抗體清除率、及抗體半生期。

本文之“致效劑分子”意指能結合至抗體(例如 IgG 抗體)Fc 區域之分子包括(但非限於)補體蛋白或 Fc 受體。

本文之“致效細胞”意指能結合至抗體(例如 IgG 抗體)Fc 部份(典型地經致效細胞表面表現的 Fc 受體)之細胞，包括(但非限於)淋巴細胞例如抗原呈現細胞以及 T 細胞。

本文之“Fe 區域”意指 IgG 抗體的 C-端區域，特定言之為該 IgG 抗體重鏈之 C-端區域。雖然 IgG 重鏈 Fc 區域的邊界可略變化，典型地 Fc 區域是定義成 IgG 重鏈之胺基酸殘基 Cys226 至 羥基端。

本文之“Kabat 編號”除非另行說明，是定義成使用 EU

(21)

指數（參見 Kabat et al. : Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.(1991)，全文在此併入參考文獻），對 IgG 重鏈抗體的殘基編號。

本文之 "Fc 受體" 或 "FcR" 意指結合至抗體 Fc 區域之受體。結合至抗體(例如 IgG 抗體)Fc 區域之代表性的 Fc 受體包括(但非限於)Fc_yRI、Fc_yRII、及 Fc_yRIII 次級受體，包括對偶基因的變型以及此類受體替代接合的形式。Fc 受體之回顧可參見 Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92(1991); Capel et al., Immunomethods 4:25-34(1994)；以及 de Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126:330-41(1995)。

I. 免疫及治療試劑

本發明的免疫及治療試劑包含或由在此定義之免疫原或抗體、或其功能的或抗原結合片段組成。基本的抗體構造單位是習知的包含次單體之四合體。各四合體由二對相同的多勝鍵組成，各對具有一個"輕"(約 25 kDa)以及一個"重"鍵(約 50-70 kDa)。各鍵的胺基端部份包括約 100 至 110 或更多個胺基酸之變異區，其可辨視抗原。各鍵的羧基端部份為恆定區，其具有致效劑功能。

輕鍵可分成 κ 或 λ ，長度約為 230 個殘基。重鍵可分成 γ 、 μ 、 α 、 δ 、或 ε ，長度約為 450-600 個殘基，以及抗體之同功型可分別定義成 IgG、IgM、IgA、IgD 以及 IgE。重及輕鍵可摺疊成結構區。本文之"結構區"意指蛋

(22)

白質的球狀區域，例如免疫球蛋白或抗體。免疫球蛋白或抗體結構區包括例如3或四個經 β -平板穩定的肽環以及鏈間之雙硫鍵。完整的輕鏈具有例如二個結構區(VL以及CL)以及完整的重鏈具有例如四或五個結構區(VH、CH1、CH2、及CH3)。

輕鏈及重鏈內，變異及恆定區用大約12個或更多個胺基酸之"J"區域相聯，重鏈亦包括約多10個胺基酸之"D"區域。參閱 Fundamental Immunology(Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y.(1989), Ch. 7，全文在此并入參考文獻。

各輕/重鏈對之變異區可形成抗體結合部位。因此，完整的抗體具有二個結合部位。除了雙功能或雙專一性抗體之外，此二結合部位均相同。所有鏈均展現具有相對守恆之架構區域(FR)的一般結構並聯結著三個高變異區(亦稱為互補性決定區域或CDR)。天然的鏈或重組製作的鏈可與前導序列一起表現，經細胞的加工作用移除前導序列後可產生成熟的鏈。亦可用非天然前導序列重組的製作成熟的鏈，以增進分泌或改變特定鏈的加工。

經架構區域校準之各對取自二個鏈的CDR，可結合至專一性的抗原決定部位。從N-端至C-端，此輕鏈及重鏈包含FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3以及FR4結構區。在此技藝中"FR4"亦稱為變異重鏈之D/J區域以及變異輕鏈之J區域。各結構區胺基酸的編號係依據Kabat之定義(Sequences of Proteins of Immunological

(23)

Interest, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 and 199)。另一定義構造的方法可參見 Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901(1987); Nature 342:878(1989); and J. Mol. Biol. 186:651(1989)(以下統稱 "Chothia et al." 以及全文在此并入參考文獻)。

A. A_β 抗體

本發明治療劑包括專一性結合至 A_β 或澱粉樣蛋白斑之其它成份的抗體。較佳的抗體是單株抗體。一些該抗體可專一性結合至 A_β 的聚集形式而不會結合至可溶性形式。一些該抗體可專一性結合至可溶性形式而不會結合至聚集的形式。一些該抗體可結合至聚集的以及可溶性形式。用於治療方法的抗體，較佳者具有完整的恆定區或至少可與 Fc 受體交互作用之充分的恆定區。較佳的抗體可有效的刺激經 Fc-調節的蛋白斑中 A_β 之吞噬作用。人類同功型 IgG1 是較佳的，因為它是與吞噬細胞(例如位於腦部之巨噬細胞或微神經膠質細胞)的 FcRI 受體具有最高親和力的人類同功型抗體。人類的 IgG1 相當於鼠科動物的 IgG2a，如此後者係適用於在老年痴呆症的動物(例如小鼠)模式中測試活體內功效。亦可用雙專一性 Fab 片段，其中抗體的一臂具有 A_β 的專一性，另一臂具有 Fc 受體的專一性。較佳的抗體結合至 A_β 的結合親和力大於(或等於)10⁶、10⁷、10⁸、10⁹、或 10¹⁰ M⁻¹(包括此類數值中間值的親和力)。

A_β 內單株抗體結合的專一性抗原決定部位可為構像

(24)

的或非構像的抗原決定部位。可使用導入外來基因的動物模式程序(描述於實施例)測試抗體的預防性及治療性功效。較佳的單株抗體結合至 A β 內殘基 1-10 的抗原決定部位(天然 A β N-端的第一個殘基指定為 1)，更佳者結合至 A β 內殘基 3-7 的抗原決定部位。在一些方法中，可使用對不同抗原決定部位具結合專一性的多重單株抗體，例如共同投用對 A β 內殘基 3-7 的抗原決定部位具有專一性的抗體及對 A β 內殘基 3-7 的抗原決定部位之外具有專一性的抗體。該抗體可連續地或同時的投用。亦可用對抗 A β 濘粉樣蛋白成份以外之抗體(例如投用或共同投用)。

可用例如形成噬菌體顯示基因庫(其中不同成員顯示不同 A β 次序列)，測定抗體對抗原決定部位之專一性。然後選擇噬菌體顯示基因庫中與測試抗體專一結合的成員。分離該序列之家族。典型地，該家族含有共同的核心序列，以及不同成員有不同長度的鄰接序列。顯示能專一結合至抗體之最短核心序列即定義為抗體抗結合的原決定部位。抗體亦可用已測定過抗原決定部位專一性的抗體經由競爭測定測試抗原決定部位之專一性。例如，與 12B4 抗體競爭結合 A β 的抗體，可結合至與 12B4 相同或相似的抗原決定部位(即 A β 之殘基 3-7)。篩選抗體的抗原決定部位專一性可用於預測治療的功效。例如經測定可結合至 A β 殘基 1-7 的抗原決定部位之抗體，可有效的依據本發明方法預防及治療阿茲海默氏症。

專一性結合至 A β 較佳片段而不結合 A β 其它區域的

(25)

抗體，相對於結合至其它區域的單株抗體或結合至完整 A_β 的多株血清有許多優點。第一，在相等質量劑量下，專一性結合至較佳片段的抗體之劑量含有可有效清除澱粉樣蛋白斑的較高抗體莫耳濃度劑量。第二，專一性結合至較佳片段的抗體可誘發清除反應對抗澱粉樣蛋白沈澱物而不會誘發清除反應對抗完整的 APP 多肽，從而降低可能產生的副作用。

1. 非人類 抗體之生產

本發明的特色是非人類抗體，例如對本發明較佳的 A_β 抗原決定部位具有專一性的抗體。該抗體可用於調製本發明的各種治療組成物，較佳者提供互補性決定區域以產生人類化的或嵌合型的抗體(詳細描述於下)。用 A_β 對動物進行免疫可產生非人類單株抗體，例如：鼠科動物、天竺鼠、靈長類動物、兔子或大白鼠。亦可用包含 A_β 或 A_β 產生免疫性的片段之較長多肽或抗 A_β 抗體特異型的抗體。參閱 上述 Harlow & Lane supra 之參考文獻，全文在此并入參考文獻。該抗原可得自天然的來源、肽合成或重組表現。該抗原視需要可與運載蛋白融合或複合後投用(敘述如下)。視需要該抗原可與佐劑投用。本文之"佐劑"意指當與抗原併用後可增加抗原之免疫反應的化合物，但當單獨投用時則不會對抗原產生免疫反應。佐劑可增加數個機制之免疫反應，包括徵募淋巴細胞、刺激 B 及/或 T 細胞、以及刺激巨噬細胞。可使用下述許多類型之佐劑。免疫實驗動物宜使用完全的 Freund's 佐劑接著使用不完

(26)

全的佐劑。

一般係用兔子或天竺鼠製作多株的抗體。製備多株的抗體用於例如被動性的保護作用，其進行方法如下。將125隻非導入外來基因的老鼠用100微克A_β 1-42、加上CFA/IF A 佐劑進行免疫反應，以及在4-5個月後安樂死。收集免疫小鼠的血液。從血液中分離IgG。用親和層析法局部地純化具有抗原專一性的抗體。每隻小鼠平均得到約0.5-1毫克之抗原專一性的抗體，總共得到60-120毫克。

一般用小鼠製作單株抗體。對小鼠注射A_β片段或較長的形式、製備融合瘤以及篩選產生可專一性結合至A_β的抗體之融合瘤可製備對抗A_β片段之單株的抗體。可視需要篩選結合至A_β專一性區域或所要求的片段，而不結合至其它A_β非重疊片段之抗體。後一篩選可經決定抗體對A_β肽刪除突變體集合之結合以及決定結合至抗體的刪除突變體而加以完成。結合可用例如西方轉濱法或ELISA加以評估。顯示專一性結合至抗體的最小片段即可定義抗體之抗原決定部位。此外，抗原決定部位的專一性可經競爭測定(測試及參考抗體競爭對A_β之結合)加以測定。若測試以及參考抗體可相互競爭，則彼可結合至相同的抗原決定部位或近到結合一個抗體可干擾其他抗體結合之抗原決定部位。該抗體較佳的同功型是小鼠同功型IgG 2a或其它物種相當的同功型。小鼠同功型IgG 2A相當於人類同功型IgG 1(例如人類IgG 1)。

2. 嵌合型以及人類化的抗體

(27)

本發明的特色亦是 β 澱粉樣蛋白肽專一性嵌合型及 / 或人類化的抗體(即嵌合型及 / 或人類化免疫球蛋白)。嵌合型及 / 或人類化的抗體與提供起始材料構築嵌合型或人類化抗體的小鼠或其它非人類抗體具有相同或相似的結合專一性及親和力。

A. 嵌合型抗體之產生

本文之"嵌合的抗體"意指經遺傳工程從不同物種之免疫球蛋白基因片段構築輕鏈及重鏈基因之抗體。例如鼠單株抗體的變異(V)片段基因可為相聯至人類例如 IgG1 以及 IgG4 的恒定的(C)片段。較佳者為人類同功型 IgG1。如此有代表性的嵌合型抗體為雜種蛋白質，其係由小鼠抗體之 V 或抗原結合結構區以及人類抗體之 C 或致效劑結構區組成。

B. 人類化抗體的產生

本文之"人類化的抗體"意指包含至少一個包含實質上取自人類抗體(稱為受體免疫球蛋白或抗體)鏈變異區架構殘基的鏈以及至少一個取自小鼠抗體(稱為供體免疫球蛋白或抗體)實質上之互補性決定區域的抗體。參閱，Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029-10033(1989)、US 5,530,101、US 5,585,089、US 5,693,761、US 5,693,762、Selick et al.、WO 90/07861、及 Winter, US 5,225,539(全文在此并入參考文獻)。恆定區(若有的話)亦實質上或完全地取自人類免疫球蛋白。

若人類的變異結構區架構與小鼠變異架構(原本的

(28)

CDRs)有相同或相似的構像，則將小鼠 CDRs 取代成人類變異結構區架構最能保留正確的空間定向。經由得到人類抗體變異結構區，可使其架構序列與原本鼠科動物 CDRs 之變異架構結構區之序列展現高度相似性。重及輕鏈變異架構區域可源自相同或不同的人類抗體序列。人類抗體序列可為天然人類抗體序列或可為許多人類抗體的共識性序列。參閱 Kettleborough et al., Protein Engineering 4:773(1991); Kolbinger et al., Protein Engineering 6:971(1993) 以及 Carter et al., WO 92/22653。

確認鼠科動物供體免疫球蛋白及適當的人類受體免疫球蛋白之互補性決定區域後，下一步驟則是測定此類成份中是否有任何殘基應經取代以最適化產生的人類化抗體的性質。一般而言，用人類胺基酸殘基取代鼠科動物胺基酸殘基應能將副作用減至最低，因為引入鼠科動物殘基會增加抗體之風險，引起人類之人類-抗-小鼠-抗體(HAMA)反應。進行決定免疫反應之技藝確認方法為監視特定病患或於臨床試驗期間的 HAMA 反應。投用人類化抗體的病人可在該治療開始時及治療期間進行產生免疫性評估。測量病患血清樣品之 HAMA 反應(例如偵測抗人類化的治療的試劑抗體)，係使用在此技藝中習知的方法，包括表面電漿共振技藝(BIACORE)及/或固相 ELISA 分析。

可根據某些人類變異區架構殘基之胺基酸對 CDR 構像及/或結合至抗原的可能影響而選擇彼進行取代。非天然的併列鼠科動物 CDR 區域與人類變異架構區域可產生

(29)

非天然的構像限制，除非經某些胺基酸殘基取代的校正否則會導致結合親和力流失。

取代胺基酸殘基之選擇係用電腦模式(部份地)加以測定。在此將描述產生免疫球蛋白分子三度空間影像之電腦硬體及軟體。一般而言，製作分子模式是從免疫球蛋白鏈或其結構區經解析的構造開始。將要進行模式化的鏈與解析三維結構的鏈或結構區，進行胺基酸序列相似性比較，以及選擇顯示最大測試序列相似性之鏈或結構區作為構築分子模式的起點。選擇至少50%序列相似性，較佳者係選擇至少60%、70%、80%、90%序列相似性或90%以上之鏈或結構區進行模式化。解析後的起始構造經修飾後可允許與免疫球蛋白鏈或結構區，以及與起始結構中有實際差異的胺基酸被模式化。然後將經修飾之構造組裝成免疫球蛋白組合物。

最後，用能量最小化以及證實所有原子相互地位於適當的距離之內以及鍵長及角度位於化學可接受的限制之內加以精煉模式。

選擇取代之胺基酸殘基，亦可經檢驗特定位置胺基酸之特性，或以經驗觀察取代或誘變特定胺基酸的效應加以測定(部份地)。例如，當鼠科動物變異區架構殘基與選擇的人類變異區架構殘基胺基酸不同時，通常人類架構胺基酸應經小鼠抗合理預測之相等的體架構胺基酸取代：

- (1)直接經非共價鍵結合抗原的胺基酸，
- (2)相鄰CDR區域的胺基酸，

(30)

(3) 與 CDR 區域交互作用(例如經電腦模式測定在 CDR 區域內約 3-6 Å)之其它胺基酸，或

(4) 參與 VL-VH 界面的胺基酸。

"直接經非共價鍵結合抗原的"殘基包括在架構區域位置之胺基酸，其有良好的或然率直接與依據建立的化學力(例如：氫鍵、凡得瓦爾力、疏水性交互作用等)位於抗原上的胺基酸交互作用。

CDR 以及架構區域定義於上述之 Kabat et al. 或 Chothia et al.。當架構殘基(定義於上述 Kabat et al.)構成構造的環形殘基(定義於上述 Chothia et al.)，可選擇存在於小鼠抗體之胺基酸對人類化的抗體進行取代。"相鄰 CDR 區域的"殘基包括位置立即相鄰人類化免疫球蛋白鏈一級序列之一個或多個 CDR 的胺基酸殘基，例如位置立即相鄰至 CDR(定義如 Kabat)，或 CDR(定義如 Chothia)的殘基(參閱例如 Chothia and Lesk JMB 196:901(1987))。此類胺基酸尤其是可能與 CDR 之胺基酸交互作用，並可扭曲供體 CDR 及降低親和力(若其係選自受體)。此外，相鄰的胺基酸可與抗原直接交互作用(Amit et al., Science, 233:747(1986)，全文在此併入參考文獻)且從供體選擇此類胺基酸可令人滿意的保持所有在原始抗體中提供親和力的抗原接觸點。

"其它與 CDR 區域交互作用"的殘基包括那些經二級結構分析測定顯示空間性定向足以影響 CDR 區域的殘基。具體實施例之一中，"其它與 CDR 區域交互作用"的殘

(31)

基係經供體免疫球蛋白三度空間模式(例如電腦產生之模式)分析加以確認。三度空間模式(典型之原始的供體抗體)顯示 CDR 外面之某些胺基酸緊鄰 CDRs，且極易經氫鍵、凡得瓦爾力、疏水性交互作用力等與 CDR 胺基酸交互作用。在那些胺基酸位置上，可選擇供體免疫球蛋白的胺基酸(而不是受體免疫球蛋白的胺基酸)。依據此標準之胺基酸一般而言具有之側鏈原子與 CDR 內之某些原子相距約為 3 埃單位(Å)之內且必須含有可依據建立的化學力(例如上述)可與 CDR 原子交互作用之原子。

當原子可形成氫鍵，其原子核之間相距 3 Å，但原子不形成一種鍵結，其凡得瓦爾表面之間相距 3 Å。因此，在後者之實例中原子核必須相距約 6 Å 之內(3 Å 加上凡得瓦爾半徑之總和)才可考慮原子能交互作用。在許多案例中原子核將相距 4 或 5 至 6 Å。在決定胺基酸是否可與 CDR 交互作用時，不宜考慮 CDR 部份之重鏈 CDR2 的最後 8 個胺基酸，因為基於結構之觀點，此 8 個胺基酸更像是架構的部份。

能與 CDR 胺基酸交互作用之胺基酸，可用另一方法確認。各架構胺基酸溶劑可接近的表面積可用二種方法計算：(1)完整的抗體，以及(2)假設的分子其係由移除 CDR 的抗體組成。此類數目之間顯著的差別約為 10 埃平方或更多，顯示架構胺基酸接近溶劑至少部份被 CDR 阻塞，因此該胺基酸係與 CDR 接觸。胺基酸之溶劑可接近的表面積，可根據抗體三度空間之模式使用技藝上已知的算則(

(32)

例如 Connolly, J. Appl. Cryst. 16:548(1983)以及 Lee and Richards, J. Mol. Biol. 55:379(1971), 全文在此併入參考文獻)計算。架構胺基酸亦可偶爾與 CDR 間接的交互作用, 其係經影響另一架構胺基酸之構像因而接觸到 CDR。

已知架構上許多位置之胺基酸能與許多抗體之 CDR 交互作用 (Chothia and Lesk, *supra*, Chothia et al., *supra* and Tramontano et al., J. Mol. Biol. 215:175(1990), 全文在此併入參考文獻)。注意, 已知輕鏈位置 2、48、64 及 71 以及重鏈 26-30、71 以及 94(依據 Kabat 編號)的胺基酸為能與許多抗體之 CDR 交互作用。輕鏈置 35 以及重鏈 93 及 103 之胺基酸亦可能與 CDR 交互作用。在所有此類編號的位置, 當供體胺基酸與受體胺基酸彼此不同時, 人類化免疫球蛋白宜選擇供體胺基酸(而不是受體胺基酸)。另一方面, 某些殘基能與 CDR 區域交互作用, 例如有時可選擇受體免疫球蛋白輕鏈之前 5 個胺基酸而不喪失人類化免疫球蛋白之親和力。

"參與 VL-VH 界面"之殘基或"裝填殘基"包括介於 VL 及 VH 界面間之殘基, 定義於例如 Novotny and Haber, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:4592-66(1985) 或上述之 Chothia et al. 一般而言, 人類化的抗體中應保有獨特的裝填殘基(若彼與人類架構殘基不同)。

一般而言, 符合上述標準之一個或多個胺基酸已被取代。在某些具體實施例中, 所有或大部份符合上述標準之胺基酸已被取代。偶爾, 特定的胺基酸是否符合上述標準

(33)

仍有一些模糊，所以製作另一變型免疫球蛋白時有的帶有特定的取代，其他的則否。如此製作之另一變型免疫球蛋白，可用在此描述之任何測定測試所要求的活性，以及選擇較佳的免疫球蛋白。

通常人類化抗體的 CDR 區域實質上相同，以及更通常的是與供體抗體對應的 CDR 區域相同。雖然不是必要，但有時可能用一個或多個保留性胺基酸取代 CDR 殘基而不影響產生的人類化免疫球蛋白之結合親和力。保留性取代的組合預期為，例如 gly, ala ; val, ile, leu ; asp, glu ; asn, gin ; ser, thr ; lys, arg ; 以及 phe, tyr 。

其他種取代候選者為人類免疫球蛋白在此位置獨特的或 "稀少的" 人類受體架構胺基酸。此類胺基酸可經小鼠供體抗體相等位置之胺基酸或經更有代表性的人類免疫球蛋白相等位置之胺基酸取代。例如，當人類受體免疫球蛋白架構區域此位置之胺基酸是稀有的胺基酸以及供體免疫球蛋白對應的胺基酸與此位置之人類免疫球蛋白序列相同時則適宜進行此取代；或當此位置之受體免疫球蛋白之胺基酸以及供體免疫球蛋白對應的胺基酸相對的至其它人類序列亦為稀有的胺基酸時則適宜進行此取代。此類標準可輔助確保人類架構中非典型的胺基酸不會破壞抗體結構。此外，經有代表性的人類抗體之供體抗體胺基酸取代獨特的人類受體胺基酸，可製作降低產生免疫性之人類化抗體。

本文之 "稀少的" 意指發生在此序列位置之胺基酸約少

(34)

於代表性序列樣本之 20% 但通常約少於 10%，本文之 "共同的" 意指發生之胺基酸約大於代表樣本序列之 25% 但通常大於約 50%。例如，所有人類之輕鏈及重鏈變異區序列可分別區分成序列 "亞類"，其係相互同源以及在某些關鍵性的位置具有相同胺基酸(上述之 Kabat et al.)。當在人類序列之中決定人類受體序列胺基酸是否為 "稀少的" 或 "共同的" 胺基酸時，經常宜僅考慮受體序列中相同亞類之人類序列。

額外的取代候選者是人類受體架構胺基酸，其為上述 Chothia et al. 定義確認之 CDR 區域的一部份。額外的取代候選者是人類受體架構胺基酸，其以 AbM 及 / 或接觸之定義確認的 CDR 區域之一部份。

額外的取代候選者為受體架構殘基，其係相應於稀有的或獨特的供體架構殘基。稀有的或獨特的供體架構殘基為鼠科動物抗體此位置稀有的或獨特的(本文之定義)。鼠科動物抗體中，亞類之測定可依據 Kabat 及確認不同共識性之殘基位置。此類供體特定的差異可為增進鼠科動物序列活性的軀體突變點。保留預測可影響結合的獨特殘基，而預測為不重要的結合殘基可經取代。

其他種取代候選者為發生在受體架構區域之非種系殘基。例如，當受體抗體鏈(即與供體抗體鏈分享顯著的序列相似性之人類抗體鏈)校整至種系抗體鏈(同樣地與供體鏈分享顯著的序列相似性)時，受體鏈架構與種系鏈架構之間不配對之殘基可經種系序列對應的殘基取代。

(35)

除了以上討論的特定胺基酸取代之外，人類化免疫球蛋白架構區域通常在常實質上相同，以及更通常的是與彼源自之人類抗體架構區域相同。當然了，許多架構區域之胺基酸對抗體之專一性或親和力少有或沒有直接地貢獻。因此，許多架構殘基個別地保留性取代是可耐受而未可觀的改變產生的人類化免疫球蛋白的專一性或親和力。因此，在具體實施例之一中人類化免疫球蛋白變異架構區域與人類變異架構區域序列或該序列之共識性序列共享至少85%之序列相似性。在另一具體實施例中，人類化免疫球蛋白變異架構區域與人類變異架構區域序列或該序列之共識性序列共享至少90%，較佳者95%，更佳者96%、97%、98%或99%之序列相似性。然而一般而言該取代是不必要的。

人類化的抗體較佳者展現與抗原專一性結合親和力至少為 10^7 、 10^8 、10或 $10^{10} M^{-1}$ 。通常人類化的抗體與抗原結合親和力之上限在供體免疫球蛋白的三、四或五倍之內。通常結合親和力之下限亦在供體免疫球蛋白的三、四或五倍之內。此外，其結合親和力與無取代的人類化抗體(例如具有供體CDR及受體FR，但無FR取代之抗體)相似。在該實例中，優選的抗體(經取代)之結合較佳者比未經取代的抗體至少大二至三倍，或大三至四倍。比對時，可測定各種抗體之活性，例如經BIACORE(即用未標記的試劑進行表面電漿共振)或競爭性的結合測定。

C. 產生人類化的12B4抗體

(36)

本發明較佳的具體實施例的特色是對抗 A β N-端的人類化抗體，特定言之，應用在此描述的方法進行治療及/或診斷。產生人類化的抗體尤佳的起始材料為 12B4。12B4對 A β 之 N-端具有專一性以及已展示可間接中介澱粉樣蛋白斑之吞噬作用(例如誘發吞噬作用)。編碼 12B4 抗體重及輕鏈變異區之選殖及 cDNA 定序描述於實施例 I。

經電腦比對小鼠變異區胺基酸序列與習知的人類抗體序列確認適當的人類受體抗體序列。分別地進行重及輕鏈之比對，但原理相似。特定言之，經使用 NCBI BLAST(經 National Institutes of Health NCBI 網際網路伺服器公開存取)以各鼠科動物架構序列詢問 Kabat 資料庫以確認人類抗體其架構序列與鼠科動物 VL 及 VH 架構區域展現高度序列相似性之各種結構區。具體實施例之一中，選擇與鼠科動物供體序列共享大於 50% 序列相似性之受體序列。較佳者，選擇共享 60%、70%、80%、90% 或以上之受體抗體序列。

電腦比較 12B4 後揭露 12B4 輕鏈與人類輕鏈次型 κ II 顯示最大的序列相似，12B4 重鏈與人類重鏈次型 II 顯示最大的序列相似，如上述之 Kabat et al. 定義。因此，人類架構區域之輕鏈及重鏈宜源自此類次型，或該次型共識性序列之人類抗體。與 12B4 對應的區域顯示最大的序列相似的較佳輕鏈人類變異區為 Kabat ID 號碼 005036 之抗體。與 12B4 對應的區域顯示最大的序列相似的較佳重鏈人類變異區為 Kabat ID 號碼 000333 之抗體，Genbank 寄存編號

(37)

AAB35009 之抗體、及 Genbank 寄存編號之抗體，以 Kabat ID 號碼 000333 之抗體為最佳的抗體。

接著選擇取代的殘基如下。當 12B4 變異架構區域與以及相當之人類變異架構區域之胺基酸不同時，人類架構胺基酸通常應經以下合理預期之相當的小鼠胺基酸取代：

- (1) 直接經非共價鍵結合抗原的胺基酸，
- (2) 相鄰 CDR 區域、在上述 Chothia et al. 提出之另一定義的 CDR 區域之一部份、或其它與 CDR 區域交互作用(例如約 CDR 區域 3\AA 內)的胺基酸，或
- (3) 參與 VL-VH 界面的胺基酸。

電腦模式化 12B4 抗體重及輕鏈變異區，以及人類化之 12B4 抗體描述於實施例 IV。簡言之，三度空間模式之產生係基於最接近的解析鼠科動物抗體重及輕鏈構造。此模式可經一系列能量最小化步驟以減少不利的原子接觸以及最適化靜電的及凡得瓦交互作用進一步的精煉。

在此描述的抗體之三度空間構造資料可公開得自例如 Research Collaboratory for Structural Bioinformatics' Protein Data Bank(PDB)。PDB 可經網際網路自由存取，描述於 Berman et al.(2000) Nucleic Acids Research, 28:235-242。電腦模式化可鑑定與 CDR-交互作用之殘基。電腦模式之 12B4 結構可作為預測經人類架構構造取代的內含 12B4 互補性決定區域之抗體的三維結構之起始點。可構築額外的模式以代表進一步引入取代胺基酸的結構。

一般而言，須要取代符合上述標準之一個、大多數或

(38)

所有的胺基酸。據此，本發明的人類化抗體通常將含有至少對應至1、2、3或更多個12B4選擇位置殘基之取代的人類輕鏈架構殘基。人類化抗體通常將含有至少對應至1、2、3或更多個12B4選擇位置殘基之取代的人類重鏈架構殘基。

然而偶爾，特定的胺基酸是否符合上述標準仍有一些模糊，所以製作另一變型免疫球蛋白時有的帶有特定的取代，其他的則否。例如用鼠科動物殘基取代時將引進在人類免疫球蛋白特定的位置為稀有的殘基，其可用含或不含特定的取代時之活性令人滿意的對抗體進行測試。若含或不含取代者之活性(例如結合親和力及/或結合專一性)大約相同，則以未取代之抗體為較佳，因為其引起之預期的在此描述之HAMA反應將較小。

其他的取代候選者為人類免疫球蛋白在此位置獨特的人類受體架構胺基酸。此類胺基酸可經更有代表性的人類免疫球蛋白相當位置之胺基取代。此外，當該胺基酸為有代表性的人類免疫球蛋白在相當位置之胺基酸時，則可在小鼠12B4相當位置可引入此人類架構區域胺基酸。

其它的取代候選者為發生在架構區域之非種系殘基。將12B4與習知的種系序列進行電腦比較時可確認與重鏈或輕鏈具有最大程度序列相似性之種系序列。對準架構區域與種系序列將透露可選擇那一個殘基可用對應的種系殘基取代。在選擇性輕鏈受體架構中可選擇與此類種系序列不配對之殘基並用對應的種系殘基加以取代。

(39)

表 1 總結 12B4VH 以及 VL 區域之序列分析。該表列出可作為電腦模式化 12B4 抗體及額外的人類抗體之額外的小鼠以及人類構造與可用於進行選擇性胺基酸取代之種系序列。表 1 亦提出稀有的小鼠殘基。比較供體 VL 及 / 或 VH 序列與其它亞類成員供體 VL 及 / 或 VH 序列之序列(依據 Kabat)可確認稀有的小鼠殘基以及確認不同共識性的殘基位置。此類供體專一性差異可為增進活性的軀體突變位點。接近結合部位之獨特的或稀有的殘基可能與抗原接觸，所以是小鼠殘基中要保留的殘基。然而，若獨特的小鼠殘基並非重要的結合殘基，則宜使用對應的受體殘基，因為人類化的抗體中小鼠殘基可創造產生免疫性的新抗原決定部位。在供體序列獨特的殘基實質上是對應的受體序列共同的殘基之情況下，較佳的殘基是受體的殘基。

(40)

表 1.12 B4V 區域序列之摘要

鏈	VL	VH
小鼠亞類	II	Ib
人類亞類	II	II
稀有的胺基酸 (頻率 %)	K107(0.542%)	T3,L11,L12,F24, S41,N75,D83,A85
Chothia 標準的 分類	L1：-分類4[lrmf] L2：分類1[1lmk] L3：分類1[1tet]	H1：分類[lggi] H2：-分類1
最接近的小鼠 Mab 經解析的 結構	2PCP(2.2Å)	1ETZ(2.6Å)
模式化模版之同 源現象	94%	80%
人類架構 seq	KABID 005036	1-KABID 000333 2-AAB35009/1F7 3-AAD53816
Hu Fr 之參考種 系	A3/x 12690 & A19/X63397	1:VH439/AB019439 /BAA75036.1 2:VH25/AB019440/ BAA75057.1

本文之參考 Kabat ID 序列可公開取得，例如得自
 Northwestern University Biomedical Engineering

(41)

Department's Kabat Database of Sequences of Proteins of Immunological Interest。在此描述的抗體之三度空間構造資料可公開取自例如 Research Collaboratory for Structural Bioinformatics' Protein Data Bank(PDB)。PDB可經網際網路自由存取，描述於 Berman et al.(2000) Nucleic Acids Research, p235-242。本文之參考種系基因序列可公開的取得，例如得自收集 Ig h 、Ig κ 以及 Ig λ 種系 V 基因之 National Center for Biotechnology Information(NCBI)序列資料庫(位於 National Institutes of Health(NIH)之 National Library of Medicine(NLM)的部門)。可用 IgG BLASTTM 搜尋 NCBI" Ig 種系基因"資料庫之同源現象。

在較佳的具體實施例中，本發明的人類化的抗體含有(i)包含各種結構區、包含鼠科動物 12B4 VLCDR 及人類受體架構、至少一個殘基經對應的 12B4 殘基取代的架構之輕鏈以及(ii)包含 12B4 VHCDR 及人類受體架構、至少一個，較佳者二、三、四、五、六、七、八、或九個殘基經對應的 12B4 殘基取代的架構、以及可視需要至少一個，較佳者二或三個殘基經對應的人類 種系殘基取代的重鏈。

在尤較佳的具體實施例中，本發明的人類化抗體具有在此描述的構造特色，並進一步的具有至少一個(較佳者二、三、四個或所有)下列活性：(1)結合可溶性 A β ；(2)結合聚集的 A β 1-42(例如經 ELISA 測定)；(3)結合蛋白斑中之 A β (例如染色 AD 及/或 PDAPP 斑)；(4)當相較於嵌

(42)

合型 12B4(例如具有鼠科動物變異區序列以及人類恆定區序列之 12B4)以二至三倍的較高的結合親和力結合 A_β；(5)間接中介 A_β 之吞噬作用(例如在此描述的體外吞噬作用檢測法)；以及(6)通過血腦屏障(例如於在此描述之 PDAPP 動物模式中顯示短期之腦定域作用)。

在另一具體實施例中，本發明的人類化抗體在此描述的構造特色可結合 A_β 或具有足以引起至少一個下列活體內效應之親和力：(1)降低 A_β 蛋白斑含量；(2)預防蛋白斑形成；(3)降低可溶性 A_β 之含量；(4)降低與成澱粉樣病症相關的神經病理學；(5)減輕或改善至少一個與成澱粉樣病症相關的生理症狀；及/或(6)改良認知的功能。

在另一具體實施例中，本發明的人類化抗體具有在此描述的構造特色，並專一性結合至包含 A_β 殘基 3-7 之抗原決定部位。

在另一較佳的具體實施例中，本發明的人類化抗體具有在此描述的構造特色結合至 A_β 之 N-端抗原決定部位(例如結合至 A_β 氨基酸 3-7 之抗原決定部位)，以及能降低(1)A_β 肽之含量；(2)A_β 蛋白斑之含量；以及(3)與成澱粉樣病症相關的神經性負擔或神經炎性失調。

說明如上之活性可利用任何各種在此描述或在此技藝中之測定方法(例如結合測定、吞噬作用檢測法等)進行測定。活性測定可為活體內測定(例如使用標記的測定成份及/或影像技藝)或活體外測定(例如使用源自患者之樣品或檢體)。活性測定可直接的或間接的測定。在某些較佳的

(43)

具體實施例中，可測定神經終點(例如澱粉樣蛋白負擔量、神經負擔等)。該測試終點可使用非侵入性偵測方法測定活著的病患(例如對阿茲海默氏症之動物模式或人類病患例如進行免疫療法)。此外該測試終點可在病患死後測定。動物模式及/或人類病患死後之該測試終點測定可用於評估各種藥劑(例如人類化的抗體)之療效以用於相似的免疫治療的用途。其它較佳的具體實施例中，上述神經病理的活性或測試終點可作為指示劑以評估行為或神經參數。

3. 產生變異區

概念性的選擇 CDR 以及人類化免疫球蛋白的架構成份後，可用各種方法產生該免疫球蛋白。因為編碼之退化現象，許多核酸序列可編碼各免疫球蛋白之胺基酸序列。經全新固相 DNA 合成或 PCR 誘變先前製備的所要求的多核苷酸變型可製作所要求的核酸序列。寡核苷酸調節的誘變是製備目標多肽 DNA 之取代、刪除及插入變型的較佳方法。參閱 Adelman et al., DNA 2:183(1983)。簡言之，將所要求的突變之寡核苷酸編碼與單鏈 DNA 模版雜交可改變多肽 DNA。雜化後，使用 DNA 聚合酶合成該模版含寡核苷酸引子之全部的第二互補股，以及在目標多肽 DNA 編碼選擇的改變。

4. 選擇恆定區

將描述如上製作之抗體各種片段(例如嵌合的或人類化的抗體之重及輕鏈變異區)一般聯結到至少部份之疫球

(44)

蛋白恆定區(Fc 區域)(一般為人類免疫球蛋白)。人類恆定區 DNA 序列可依據熟知的方法分離自各種人類細胞，但較佳者為永生的 B 細胞(參閱上述之 Kabat et al. 及 Liu et al., WO87/02671)(全文在此并入參考文獻)。最初抗體將含有輕鏈及重鏈恆定區。重鏈恆定區通常包括 CH1、樞紐、CH2、CH3、及 CH4 區域。本文之抗體包括具有所有恆定區型態之抗體，包括 IgM、IgG、IgD、IgA 以及 IgE，以及任何之同功型，包括 IgG1、IgG2、IgG3 以及 IgG4。當要求抗體(例如人類化的抗體)展現細胞毒性的活性時，固定的結構區通常固定上固定的結構區，一般為 IgG1 之固定結構區。較佳者為人類同功型 IgG1。輕鏈恆定區可為 λ 或 κ 。人類化的抗體可包含一種以上分類或同功型之序列。表現的抗體可為內含二個輕及二個重鏈之四合體、分離之重鏈、輕鏈、Fab、Fab'F(ab')2、以及 Fv、或重及輕鏈各種結構區經由間隔物聯結的單鏈抗體。

5. 表現 重組抗體

嵌合型以及人類化的抗體一般是用重組表現製作。將編碼人類化的輕鏈及重鏈變異區之核酸(可視需要聯結至恆定區)插入表現載體。輕鏈及重鏈可選殖入相同或不同的表現載體。編碼免疫球蛋白鏈之 DNA 片段可操作地聯結的至表現載體之控制序列以確保免疫球蛋白多勝肽之表現。表現控制序列包括(但非限於)：啓動子(例如天然的相關的或異性的啓動子)、訊息序列、強化子元件、及轉錄終止序列。較佳之表現控制序列是能轉形或轉染真核宿

(45)

主細胞載體內之真核的啓動子系統。載體一旦併入適當的宿主後，將宿主維持在適於高水準表現核苷酸序列之條件下，並收集及純化雜交反應抗體。

此類表現載體一般可在宿主生物體中以附加體的方式或是以宿主染色體 DNA 的整體部份進行複製。通常表現載體含有選擇 標識(例如 氨比西林抗性、潮黴素抗性、四環素抗性、康黴素抗性或新黴素抗性)以偵測到轉形入所要求的 DNA 序列的細胞(參閱例如 Itakura et al., US 專利 4,704,362)。

大腸桿菌是一種原核的宿主，尤其是可用於選殖本發明之多核苷酸(例如 DNA 序列)。其它適用的微生物的宿主包括芽孢桿菌，例如：枯草芽孢桿菌，以及其他腸桿菌，例如：沙門桿菌、沙雷氏菌屬、及各種假單胞菌。在此類原核的宿主中，亦可使用含有與宿主細胞相容的表現控制序列(例如複製起始點)之表現載體。此外，可存在有任何數量之各種習知的啓動子，例如乳糖啓動子系統、色胺酸(*trp*)啓動子系統、 β -內醯胺酶啓動子系統、或噬菌體 λ 之啓動子系統。一般啓動子將可控制表現，可視需要含操作子序列，以及具有核糖體結合部位序列及其類似者，啓動及完成轉錄及轉譯作用。

亦可用其它微生物，例如酵母菌進行表現。釀酒酵母菌是較佳的酵母菌宿主，適當的載體具有所要求的表現控制序列(例如啓動子)、複製起始點、終止序列及其類似者。有代表性的啓動子包括 3-磷酸甘油酸激酶以及其他醣解

(46)

酵素。其他可誘發的酵母菌啓動子包括乙醇脫氫酶、異細胞色素 C、及利用麥芽糖及半乳糖之酵素的啓動子。

除了微生物，亦可用哺乳動物組織的培養細胞以表現及產生本發明(例如編碼免疫球蛋白或其片段之多核苷酸)之多勝肽。參閱 Winnacker, From Genes to Clones, VCH Publishers, N.Y., N.Y.(1987)。真核細實質上較佳，因為在此技藝中已發展出許多能分泌異性的蛋白質(例如完整的免疫球蛋白)的適當宿主細胞株，包括 CHO 細胞株、各種 Cos 細胞株、HeLa 細胞，較佳之骨髓癌細胞株、或轉形的 B 細胞或融合瘤。較佳者為非人類細胞。此類細胞之表現載體可包括表現控制序列，例如複製起始點、啓動子、及強化子(Queen et al., Immunol. Rev. 89:49(1986))，以及必須的加工資料位點，例如核糖體結合部位、RNA 剪接位、聚腺苷酸化作用位點、及轉錄的終止子序列。較佳的表現控制序列是源自免疫球蛋白基因、SV40、腺病毒、牛乳頭狀瘤病毒、巨細胞病毒等之啓動子。參閱 Co et al., JJ finmunol.148:1149(1992)。

此外，編碼抗體之序列可併入導入基因，引入導入外來基因動物的基因組以及後續的表現在導入外來基因動物的牛奶中(參閱例如 Deboer et al., US 5,741,957, Rosen, US 5,304,489，以及 Meade et al., US 5,849,992)。適當的導入基因包括輕及/或重鏈操作聯結乳腺專一性基因(例如酪蛋白或 β 乳球蛋白之啓動子及強化子的編碼序列。

內含重要的聚核苷酸序列(例如重及輕鏈之編碼序列

(47)

以及表現控制序列)載體可取決於宿主細胞之型態用已知的方法轉移入宿主細胞。例如原核細胞通常利用氯化鈣轉染作用，而其他細胞宿主可使用磷酸鈣處理、電穿透作用、轉脂作用、生物投射或病毒性的轉染作用。(參閱一般而言 Sambrook et al., Molecular Cloning:A Laboratory Manual(Cold Spring Harbor Press, 2nd ed., 1989)(全文在此并入參考文獻)。其它用以轉形哺乳動物的細胞之方法包括使用凝聚胺、原生質體融合、脂球體、電穿透作用、及顯微注射(參閱上述之 Sambrook et al.)。為了產生基因轉殖動物，導入基因可微注射入受精的卵母細胞，或可併入胚胎幹細胞的基因組，並將該細胞之細胞核轉移入除去細胞核的卵母細胞。

當重及輕鏈分別的選殖入表現載體時，可共轉染載體以表現及組裝完整的免疫球蛋白。一旦表現後，可依據技藝之標準方法(包括硫酸銨沉澱、親和力管柱、管柱層析法、HPLC 純化、膠體電泳及其類似者，參閱 Scopes, Protein Purification(Springer-Verlag, N.Y.,(1982))純化本發明的全部抗體、其二聚物、個別地輕鏈及重鏈、或其它免疫球蛋白形式。在醫藥學的用途上，較佳者為至少約 90 至 95% 均一性之相當純的免疫球蛋白，以及最佳者為 98 至 99% 或更多之均一性。

6. 抗體片段

本發明範圍亦包括抗體片段。在具體實施例之一中提供非人類片段，及/或嵌合型抗體。在另一具體實施例中

(48)

提供人類化的抗體片段。一般此類片段與抗原專一性結合之親和力至少為 10^7 ，以及更典型者為 10^8 或 $10^9 M^{-1}$ 。人類化的抗體片段包括分離之重鏈、輕鏈、Fab、Fab'F(ab')₂、Fabc、及 Fv。片段之製作係經重組 DNA 技藝，或經酵素的或化學的分離自完整的免疫球蛋白。

7. 在動物模式中測試抗體的治療功效

將一組 7-9 個月大的 PDAPP 小鼠各自注射 0.5 毫克之 PBS 的多株抗 -A β 或專一性抗 -A β 單株抗體。將所有抗體製劑純化至低內毒素之含量。對小鼠注射 A β 片段或較長的形式，製備融合瘤以及篩選產生可專一性結合至 A β 所要求的片段且不結合至其它 A β 非重疊片段的融合瘤以製備對抗 A β 片段之單株的抗體。

將小鼠進行腹腔內注射 4 個月，維持血液循環中抗體濃度經 ELISA 測量效價大於 1/1000(經 ELISA 定義之 A β 42 或其它抗原)。監測效價並將小鼠在注射 6 個月後安樂死。驗屍進行組織化學、A β 之含量以及毒理學分析。每組十隻小鼠。

8. 篩選抗體之清除活性

本發明亦提供方法，該方法篩選抗體清除澱粉樣蛋白儲存物或任何其它抗原、或相關的生物物質所要求的清除活性。為了篩選對抗澱粉樣蛋白儲存物之一活性，將阿茲海默氏症病患或具有老年痴呆症病理學特徵的動物模式的腦組織樣本與帶有 Fc 受體的吞噬細胞(例如微神經膠質細胞)接觸，以及在活體外之培養液中進行抗體測試。吞噬

(49)

菌細胞可為初級的培養細胞或細胞株，可源自鼠科動物（例如 BV-2 或 C8-B4 細胞）或人類（例如 THP-1 細胞）。在一些方法中，在顯微鏡載玻片上合併各成份以增進微觀的監測。在一些方法中，在微孔盤同時進行多重反應。在該方法中，用不同的小的顯微鏡載玻片覆蓋可不同的孔，或可用非微觀的偵測方法，例如用 ELISA 偵測 A_β。較佳者，測定一系列活體外反應混合物的澱粉樣蛋白儲存物含量，從進行反應前之基線值開始，於反應期間測試一個或多個測試值。抗原可用染色偵測，例如用螢光標記的 A_β 或其它澱粉樣蛋白斑成份之抗體。用於染色之抗體可或不可與測試清除活性的抗體相同。相對於基線，反應期間澱粉樣蛋白沈澱物降低可顯示測試抗體有清除的活性。該抗體可能可用於預防或治療老年痴呆症以及其他呈澱粉樣疾病。尤其適用於預防或治療老年痴呆症以及其他呈澱粉樣疾病的抗體包括能清除緊密及擴散之澱粉樣蛋白斑的抗體，例如本發明之 12B4 抗體、或其嵌合型或人類化的版本。

可用同功的方法以篩選具有清除其它生類型物物質活性的抗體。該測定可用以偵測對抗實際上任何生物物質的清除活性。典型地生物物質在人類或動物疾病中具有一些角色。生物物質可為組織樣本或分離形式。若為組織樣本，該組織樣本宜未經固定，以允許接近組織樣本成份並避開固定對成份之構像所造成之干擾。此測定可測試之組織樣品實施例包括癌症組織、前癌症組織、內含良性的生長物之組織例如疣或黑痣、感染病理微生物的組織、浸潤發

(50)

炎性細胞的組織、細胞之間帶有病理介質(例如纖維蛋白化的心包炎)的組織、帶有異常抗原的組織、以及傷疤組織。可用之分離生物物質的實施例包括 A_β、病毒性的抗原或病毒、蛋白多糖、其它病理微生物的抗原、腫瘤抗原、以及黏連分子。該抗原可得自天然的來源、重組表現或化學的合成等。將組織樣本或分離生物物質與帶有 Fc 受體的吞噬細胞(例如單核白血球或微神經膠質細胞)接觸，並在培養液中測試抗體。在測試中抗體可直接的對抗生物物質或與生物物質相關的抗原。後一情況下，測試的目標是生物物質與抗原是否被吞噬。通常，雖然不必然地，抗體以及生物物質(有時與相關的抗原)在添加入吞噬細胞之前相互接觸。然後監測生物物質及/或相關的抗原殘留在培養液中之濃度(若有的話)。降低培養液中抗原或相關的生物物質之量或濃度，意指抗體與具吞噬細胞具有對抗抗原及/或相關的生物物質之清除反應(參閱例如實施例 N)。

9. 嵌合的/人類化的抗體其具有改變致效劑之功能

包含恆定區(Fc 區域)的上述本發明抗體，亦可令人滿意的改變分子致效劑之功能。一般而言，抗體之致效劑功能位於分子固定的或 Fc 區域，其可間接中介各種致效劑分子(例如補體蛋白或 Fc 受體)之結合。補體與 Fc 區域之結合是重要的，例如調理以及溶解細胞病原體以及活化發炎反應。抗體結合至 Fc 受體，例如致效細胞之表面可觸發許多重要的以及各樣的生物的反應，包括例如卷吞及破

(51)

壞塗覆抗體的病原體或顆粒、清除免疫複合體、經殺手細胞溶解塗覆抗體的目標細胞(即抗體依存的經細胞調節的細胞毒性，或ADCC)、釋放發炎性的調控物、胎盤轉移抗體、及控制免疫球蛋白產生。

據此，取決於特定的治療的或診斷的用途，須要上述的免疫功能，或僅選擇性的免疫功能。改變抗體之Fc區域，可達成各種分子致效劑功能之特色，包括提高或抑制各種免疫系統反應，具有診斷以及治療有利的效應。

本發明製作的抗體可僅與某些Fc受體類型反應，例如本發明抗體可經修飾刪除或改變抗體Fc區域之Fc受體結合部位以僅結合至某些Fc受體，或視需要完全缺少Fc受體結合。其它本發明抗體Fc區域令人滿意的改變歸納於下。使用一般Kabat編號系統指定Fc區域(例如IgG抗體)上改變之胺基酸殘基(例如胺基酸取代)以使致效能達成所要求的改變。亦可使用編號系統比較各種抗體(例如小鼠抗體)以觀察到所要求的致效劑功能，然後可系統化的用遺傳工程改造本發明的人類、人類化、或嵌合型抗體。

例如已觀察到抗體(例如IgG抗體)可分成三群，分別與Fc受體(例如人類單核白血球Fc受體(FcγRI))展現強度、中間、或弱結合。比較此類不同親和力群之胺基-酸序列，可確認樞紐聯結區域之單核白血球結合部位(Leu234-Ser239)。此外，人類FcγRI受體可結合單體人類IgG1以及小鼠IgG2a，但結合小鼠IgG2b則弱100倍。比較此類

(52)

蛋白質樞紐聯結區域之序列顯示強烈的結合劑中序列 234至238，即 Leu-Leu-Gly-Gly-Pro 在小鼠 γ 2b(即弱結合劑)變成 Leu-Glu-Gly-Gly-Pro。據此，若須要降低 Fcyl 受體之結合的話，可在人類抗體樞紐序列作對應的改變。據瞭解其它改變亦可達成相同或相似的結果。例如，取代側鏈具有不適當的官能基之特定的殘基、或引入帶電價的官能基(例如 Glu 或 Asp)或例如芳香族非極性殘基(例如 Phe、Tyr、或 Trp)可改變 FcyRI 結合親和力。

此類改變亦可適用至鼠科動物、人類、及老鼠系統，使不同免疫球蛋白之間具有序列同源現象。據顯示將人類 IgG3(結合至人類 FcyRI 受體)之 Leu 235改變成 Glu 可破壞突變者與受體之交互作用。如此製作適當的突變可打開或關閉此受體之結合部位。

相鄰的或接近樞紐聯結區域位點之突變(例如殘基 234、236或237用 Ala 取代)顯示改變殘基 234、235、236、及 237至少可影響 FcyRI 受體之親和力。據此，本發明抗體亦可有改變的 Fc 區域，相較於未經修飾之抗體其係改變 FcyRI 之結合親和力。該抗體一般係修飾胺基酸殘基 234、235、236、或 237。

相似的方法可改變其它 Fc 受體之親和力，用不同方法控制免疫反應。

在進一步的實施例中，可改變結合補體之 C1成份後 IgG 抗體之水解性質。

補體系統的第一個成份 C1包含三個共同緊密結合的

(53)

已知的蛋白質 C1q、C1r 以及 C1s。據顯示 C1q 負責此三個蛋白質之複合體與抗體之結合。

據此，重鏈胺基酸殘基 318、320、及 322 中至少有一個被改變成具有不同側鏈殘基之改變 CH2結構區的抗體，可改變抗體與 C1q 之結合活性。重鏈殘基編號為 EU 指數（參閱上述之 Kabat et al.）。其它適當的改變，例如降低或去除 C1q 與抗體專一性結合，包括將任何一個殘基 318(Glu)、320(Lys) 以及 322(Lys) 改變成 Ala。

此外，在此類殘基製作突變，據顯示只要殘基 318 具有氫鍵側鏈及殘基 320 以及 322 均有正電價的側鏈則可保留與 C1q 之結合。

在三個特定的殘基中將任何一個殘基取代成側鏈具有不適當的官能性之殘基，則可徹底破壞 C1q 結合活性。不是僅有將離子的殘基用 Ala 代替才可破壞 C1q 之結合。亦可用其它經烷基取代的非離子殘基，例如 Gly、Ile、Leu、或 Val、或該芳香族非極性殘基 (Phe、Tyr、Trp 以及 Pro) 代替三個特定的殘基中的任何一個殘基，均可破壞 C1q 之結合。此外，亦可使用極性非離子殘基 Ser、Thr、Cys、及 Met 代替殘基 320 以及 322 (但不是 318) 以破壞 C1q 之結合。

亦值得注意的是殘基的離子或非離子極性側鏈將能夠與 Glu 殘基以相似的鍵結形成方法形成氫鍵。因此，318(Glu) 殘基用極性殘基代替可進行修飾但不破壞 C1q 結合活性。

(54)

亦知用 Ala 取代殘基 297(Asn)可去除水解活性而僅稍微地降低(約倍弱)對 C1q 之親和力。此改變破壞糖基化作用位點，而補體活化須要碳水化合物之存在。此位點之任何其它取代亦將破壞糖基化作用位點。

本發明亦提供改變致效劑功能之抗體，其中抗體具有經修飾之樞紐區域。經修飾之樞紐區域可包含源自不同抗體種類或源自 CH1結構區次分類抗體之完整的樞紐區域。例如，IgG 抗體的固定結構區(CH1)可附著至 IgG4 抗體之樞紐區域。此外，新樞紐區域可包含部份之天然樞紐或源自天然樞紐區域的重複單位。在實施例之一中，天然的樞紐區域係將一個或多個半胱胺酸殘基轉換成中性的殘基(例如丙胺酸)，或將適當位置的殘基轉換成半胱胺酸殘基而加以改變。該改變可使用蛋白質化學技藝，較佳者為在此描述之遺傳工程技藝進行。

在本發明的具體實施例之一中，抗體樞紐區域半胱胺酸殘基之數目降低，例如降低至一個半胱胺酸殘基。此修飾之優點是可促進抗體，例如雙專一性抗體分子以及 Fc 部份已經致效劑或報導分子取代之抗體分子的組裝，因為僅必須形成一個二硫鍵。此修飾亦提供專一性目標使樞紐區域附著至另一樞紐區域或致效劑或報導分子(直接的或間接的)例如經化學的方法。

相反地，可增加抗體樞紐區域半胱胺酸殘基之數目，例如比至少正常發生的半胱胺酸殘基多一個。增加半胱胺酸殘基之數目可穩定相鄰的樞紐間之交互作用。此修飾之

(55)

另一優點可增進至致效劑或報導分子使用半胱胺酸硫醇基附著至改變的抗體，例如放射性標記的抗體。

據此，本發明提供交換樞紐區域之抗體（特定言之 IgG），及/或增加或降低樞紐區域半胱胺酸殘基之數目以改變致效劑功能（參閱例如美國專利第5,677,425號，全文在此併入參考文獻）。測定改變之抗體的致效劑功能係使用在此描述之測定或其它確認的技藝。

重要的是，產生的抗體可用一種或多種測定以評估相較於起始抗體之任何生物活性的改變。例如，改變Fc區域之抗體結合補體或Fc受體之能力可使用揭示於在之測定與任何確認技藝測定評估。

產生本發明抗體可用任何適當的技術進行，包括在此描述之技藝與熟悉此技藝的專業人士習知的技藝。可合成例如適當的蛋白質序列，例如抗體形成部份或所有相關的固定的結構區，例如Fc區域（即CH₂，及/或CH₃結構區），以及包括適當改變殘基抗體，然後化學地相聯至抗體分子適當的位置。

較佳者用遺傳工程技藝產生改變型抗體。較佳的技藝包括例如製備適當的引子應用於聚合酶連鎖反應（PCR），在編碼至少部份之IgG重鏈（例如Fc或恆定區，例如CH₂、及/或CH₃）的DNA序列上改變一個或多個殘基。然後將此片段操作地聯結至抗體的其餘部份，例如抗體變異區以及細胞表現須要的調控元。

本發明亦包括用以轉形細胞株之載體，用於產生轉形

(56)

載體之載體、轉形載體轉形的細胞株、製備的載體轉形的細胞、以及其生產方法。

較佳者，產生改變 Fc 區域(即改變致效劑功能)之抗體的轉形細胞株是永生的哺乳動物細胞株(例如 CHO 細胞)。

雖然較佳之用於產生改變 Fc 區域抗體的細胞株者是哺乳動物的細胞株，此外亦可使用任何其它適當的細胞株，例如細菌的細胞株或酵母菌細胞株。

B. 編碼免疫劑以及治療劑之核酸

亦可投用編碼抗體及其成份鏈之核酸作為被動免疫法誘發對抗澱粉樣蛋白沈澱物之免疫反應。該核酸可啓 DNA 或 RNA。編碼抗原的核酸片段一般聯結至調控元，例如啓動子以及強化子，其可允許 DNA 片段在預期的病患目標細胞中表現。在血液細胞中表現(令人滿意的誘發免疫反應)時，適於直接表現的啓動子以及強化子元件係取自輕鏈或重鏈免疫球蛋白基因或為 CMV V 主要的中間物早期啓動子以及強化子。經常載體選殖入聯結的調控元與編碼序列。投藥用雙鏈抗體時，二種鏈可選殖入相同或分離的載體。

可得到的許多病毒性的載體系統包括反轉錄病毒的系統(參閱例如 Lawrie and Tumin, Cur. Opin. Genet. Develop. 3:102-109(1993))；腺病毒的載體(參閱例如 Bett et al., J Virol. 67:5911(1993))；腺病毒相關的病毒載體(參閱例如 Zhou et al., J. Exp. Med. 179:1867(1994))、取自

(57)

水痘家族病毒性的載體，包括牛痘病毒以及雞痘病毒、取自 α 病毒屬的病毒性載體，例如源自 Sindbis 和 Semliki Forest 病毒（參閱例如 Dubensky et al., J. Virol. 70:508(1996)）、Venezuelan 馬科動物腦炎病毒（參閱 Johnston et al., US 5,643,576）以及桿狀病毒，例如水泡性口炎病毒（參閱 Rose, 6,168,943）以及乳突瘤病毒（Ohe et al., Human Gene Therapy 6:325(1995); Woo et al., WO 94/12629 and Xiao & Brandsma, Nucleic Acids. Res. 24, 2630-2622(1996)）。

編碼抗原 DNA，或內含抗原 DNA 的載體，可包裝入脂球體。適當的脂質以及相關的類似物描述於 Eppstein et al.、US 5,208,036、Feigner et al.、US 5,264,618、Rose、US 5,279,833、以及 Epand et al.、US 5,283,185。載體以及抗原 DNA 編碼亦可吸附或聯結微粒載體，其實施例包括聚甲基丙烯酸甲酯聚合物以及聚丙內酯以及聚(丙交酯-共乙交酯)，參閱例如 McGee et al., J. Micro Encap.(1996)。

基因療載體或裸露的多勝肽（例如 DNA）可藉由對個別病患活體內遞送投用，一般係經全身性投藥（例如靜脈內的、腹腔內的、鼻腔的、胃、皮膚內的、肌肉內的、次真皮的、或顱內的灌入）或塗覆方式（參閱例如 Anderson et al.、US 5,399,346）。本文之“裸露的多核苷酸”意指不與膠體材料複合的多核苷酸。裸露的多核苷酸有時是選殖入質體載體。該載體可進一步的包括促進劑例如布比瓦辛

(58)

(bupivacine)(Weiner et al., US 5,593,972)。DNA 亦可使用基因槍投用。參閱上述的 Xiao & Brandsma。將編碼抗原的 DNA 沈澱在微金屬圓珠之表面。微拋體用衝擊波或擴張氮氣加速，並穿過數層細胞組織。適當的裝置是例如，由 Agricetus, Inc. Middleton WI 製作之 Accel™ 基因傳輸裝置。此外，可簡單地用化學或機械的刺激將 DNA 點在皮膚上，裸露的 DNA 可經由皮膚進入血流(參閱 Howell et al., WO 95/05853)。

在進一步的變體中，編碼免疫原之載體可運送至體外的細胞，例如植入個別病患的細胞(例如淋巴細胞、骨髓塊、組織活體檢查)或全適型供血者血液幹細胞，接著將細胞再植入病患，之後通常選擇帶有併入載體之細胞。

II. 預防及治療的方法

本發明係關於治療老年痴呆症的以及其它呈澱粉樣疾病，其係以對病患產生有利治療的反應(例如誘發吞噬 A β 、降低蛋白斑、抑制蛋白斑形成、降低神經炎性失調、改進認知的功能、及/或逆轉、治療或預防認知的衰退)之條件投用治療性免疫試劑(例如人類化免疫球蛋白)於 A β 的專一性抗原決定部位，以預防或治療呈澱粉樣疾病。本發明亦關於使用揭示的免疫試劑(例如人類化免疫球蛋白)製作治療或預防呈澱粉樣疾病之藥劑。

特色之一中，本發明提供 of 預防或治療病患腦部與 A β 澱粉樣蛋白沈澱物相關的疾病之方法。該疾病包括阿茲海默氏症、唐氏綜合症以及認知的受損。發生後者時可

(59)

含或不含其它呈澱粉樣疾病之特性。本發明的一些方法能投用有效劑量專一性結合至澱粉樣蛋白儲存物成份的抗體至病患。該方法尤其是可用於預防或治療人類病患之阿茲海默氏症。典型的方法能投用有效劑量結合至 $A\beta$ 的抗體。較佳的方法能投用有效劑量專一性結合至 $A\beta$ 殘基 1-10 的抗原決定部位之抗體，例如專一性結合至 $A\beta$ 殘基 1-3 的抗原決定部位之抗體，專一性結合至 $A\beta$ 殘基 1-4 的抗原決定部位之抗體，專一性結合至 $A\beta$ 殘基 1-5 的抗原決定部位之抗體，專一性結合至 $A\beta$ 殘基 1-6 的抗原決定部位之抗體，專一性結合至 $A\beta$ 殘基 1-7 的抗原決定部位之抗體，或專一性結合至 $A\beta$ 殘基 3-7 的抗原決定部位之抗體抗體。在另一特色中，本發明之特色係投用結合至包含 $A\beta$ 自由 N-端殘基之抗原決定部位的抗體。在另一特色中，本發明之特色係投用結合至包含 $A\beta$ 殘基 1-10 之抗原決定部位其中 $A\beta$ 之殘基 1 及 / 或 $A\beta$ 之殘基 7 為天門冬氨酸的抗體。在另一特色中，本發明之特色係投用專一性結合至 $A\beta$ 而不結合至全長澱粉樣蛋白前驅物蛋白質 (APP) 的抗體。在另一特色中，抗體同功型為人類 IgG1。

在另一特色中，本發明之特色係投用結合至病患澱粉樣蛋白儲存物的抗體以及誘發對抗澱粉樣蛋白儲存物之清除反應。例如，該清除反應為經 Fc 受體調節的吞噬作用。

本發明治療劑為相當純的形式不含不利的污染物。此係指藥劑一般至少約有 50% w/w (重量 / 重量) 之純度，且實

(60)

質上不含干擾蛋白質及污染物。有時藥劑至少約 80% w/w，更佳者至少 90 或 約 95% w/w 純度。然而使用習見的蛋白質純化技藝，至少可得到 99% w/w 均質的肽類。

此方法可用於無症狀的及目前顯示疾病症狀之病人。用於該方法之抗體可為人類、人類化的、嵌合的或非人類抗體，或其片段(例如抗原結合片段)以及可為在此描述的單株或多株抗體。在另一特色中，本發明之特色係投用製備自人類以 A_β 肽免疫的抗體，人類可為抗體治療的病患。

在另一特色中，本發明之特色是投用含醫藥載體作為藥學組成物之抗體。此外，投用至病患的抗體可為投用至少編碼一個抗體鏈之多核苷酸。多核苷酸在病患中可表現產生抗體鏈。視需要，多核苷酸可編碼抗體之重及輕鏈。多核苷酸在病患中可表現產生重及輕鏈。典型的具體實施例中，係監測病患血液中投用抗體之水準。

如此本發明可滿足治療上長期的需要以預防或改善神經病理學，以及一些病患相關於阿茲海默氏症的認知受損。

A. 能治療的病人

能治療的病人包括有疾病風險但無症狀之個人，與目前顯示症狀之病人。以阿茲海默氏症為例，實際上任何人只要活得夠久都有患有阿茲海默氏症之風險。因此，本發明方法可預防上地投用至一般的族群而不須要任何病患之風險評估。本發明方法尤其是可用於已知有阿茲海默氏症

(61)

風險的個人。該類個人包括有親屬經歷此疾病之個人，以及經基因或生化的標識分析測定有風險之個人。阿茲海默氏症風險之遺傳標記包括 APP 基因之突變，尤其是在位置 717 以及位置 670 及 671 之突變分別稱為 Hardy 及 Swedish 突變(參閱上述之 Hardy)。其它風險標識為早老因子基因、PS1 以及 PS2、以及 ApoE4 突變，AD、高膽固醇血症或動脈粥樣硬化之家族病史。目前確認阿茲海默氏症之病人的標準是特徵化的痴呆症，以及存在說明如上述之風險因子。此外，有許多診斷測試可檢驗 AD 病人。此類診斷包括測量 CSF tau 以及 A β 42 之含量。tau 上升且 A β 42 之含量減低意味著有 AD 之存在。ADRDA 標準(討論實施例)亦可用以診斷阿茲海默氏症的病人。

在無症狀的病患中，治療可始於任何年齡(例如：10、20、30)。然而通常須要等病患到達 40、50、60 或 70 歲才開始治療。一般治療是於一段期間內投用多重劑量。於一段期間內測定抗體之含量可監測治療成效。若反應下跌則可加強劑量。對可能產生唐氏綜合症病患，可在產前對母親投用治療劑或於分娩之後立即治療。

B. 治療療程以及劑量

在預防性的應用上，可對易感的病患，或有阿茲海默氏症風險的病患投用充分劑量的藥學組成物或藥劑，以排除或降低風險，降低嚴重性，或遲延疾病的啓動，包括疾病的生化、組織的及 / 或行症狀，其併發症以及於發展疾病期間呈現之中間物病理的表現型。在治療的用途上，可

(62)

對可疑的病患，或已患有該疾病的病患投用充分劑量的組成物或藥劑以治療、或至少局部地遏止疾病症狀(生化的、組織的及/或行爲的)，包括其併發症以及於發展疾病期間呈現之中間物病理的表現型。

在一些方法中，可對未發展出特徵化之老年痴呆症病理學的病人投用藥劑以降低或消除肌肉認知的受損。完成治療的或預防性的治療之適當量的定義為治療上或預防上地有效劑量。在預防性的以及治療的療程中，通常投用數個藥劑劑量直到達成充分的免疫反應為止。本文之"免疫反應"或"免疫的反應"包括發展直接對抗接受患者抗原之體液的(抗體中介的)及/或細胞的(經抗原專一性T細胞或其分泌產物所調節)反應。該反應可為主動反應，即經投用抗原加以誘發，或被動反應，即投用免疫球蛋白或抗體或先導型T-細胞加以誘發。一般要監測免疫反應，若免疫反應起始終止時則給予重覆的劑量。

本發明組成物治療上述描述症狀之有效劑量取決於許多不同因子而變化，包括投藥方法、目標位點、病患的生理狀態、病患是否是人類或動物、投用的其它藥物、以及是否為預防性的或治療性的治療。通常，病患是人類，但非人類哺乳動物包括導入外來基因的哺乳動物亦可治療。治療劑量須要滴定以最適化安全性及功效。

在抗體被動免疫法中，劑量範圍約0.0001至100毫克/公斤，以及更通常約0.01至5毫克/公斤(例如0.02毫克/公斤、0.25毫克/公斤、0.5毫克/公斤、0.75毫克/公斤、1毫

(63)

克/公斤、2毫克/公斤等)之宿主體重。例如劑量可為1毫克/公斤體重或10毫克/公斤體重或介於110毫克/公斤之內，較佳者至少為1毫克/公斤。上述範圍之中間劑量亦預期的為本發明範圍。病患可每日、隔天、每週一次或依據任何其它實驗分析流程測定，投用該劑量。典型的治療能長期的投用多重劑量，例如至少六個月。其他的治療療程是每二週或每個月一次或每3至6月投藥一次。典型的劑量流程包括連續投用1-10毫克/公斤或15毫克/公斤，隔天投用30毫克/公斤或每週一次投用60毫克/公斤。在一些方法中，可同時投用兩種或多種不同結合專一性的單株抗體，在各例中，各抗體投用劑量在本發明的範圍之內。

抗體通常是多重投用。單一劑量之投藥間隔可為每週一次、每月一次或每年一次。投藥間隔亦可不規則，經測量病患血液中 $A\beta$ 抗體之含量而決定。在一些方法中，調整劑量以達成血漿抗體濃度為1-1000微克/毫升以及在一些方法中為25-300微克/毫升。此外，抗體可以延釋調配物投用，其係較不須要經常投藥。投用頻率的變化取決於在病患中抗體之半生期。一般而言，人類化的抗體顯示較長的半生期、依次是嵌合型抗體以及非人類抗體。

投藥之劑量以及頻率可取決於是否為預防性的或治療性的治療而變化。在預防性的應用中，將內含本抗體或其混合物之組成物投用至無疾病狀態之病患以增進病人的抗性。該劑量之定義為"預防性的有效劑量"。在此用途中，精確的劑量再一次取決於病人的健康狀況狀態以及一般的

(64)

免疫力，但一般而言介於 0.1 至 25 毫克 / 劑量，尤其是 0.5 至 2.5 毫克 / 劑量。於長期間相對不頻繁的投藥間隔可投用相對低劑量。一些病人可在有生之年繼續接受治療。

在治療的應用中，有時須要在相對地的投藥間隔內投用相對地高劑量（例如約 1 至 200 毫克 抗體 / 劑量，5 至 25 毫克之劑量更常用）直到降低或終止疾病進展，較佳者直到病患顯示部份的或完全的改善疾病症狀。因此本專利可在預防性的療程中投用。

編碼抗體核酸之劑量約 10 毫微克至 1 克、100 毫微克至 100 毫克、1 微克至 10 毫克、或 30-300 微克 DNA / 病患。感染性的病毒性載體劑量之變化為 10-100（或更多）病毒粒子 / 劑量。

治療劑可非經腸的、塗覆的、靜脈內的、口服的、皮下的、動脈內的、顱內的、腹腔內的、鼻腔內的或肌肉內的投用以進行預防性的及 / 或治療性的治療。產生免疫性的藥劑最有代表性的投藥路徑是皮下的路徑，雖然其它路徑同樣有效。其次最常見的路徑是肌肉內的注射。此類型之注射最常見的是在臂或腿肌肉進行。在一些方法中，將藥劑直接的注射入沈澱物堆積的特定組織，例如顱內的注射。肌肉內的注射或靜脈內的灌入是抗體較佳的投藥方法。在一些方法中，特定的治療的抗體是直接的注射入頭蓋骨。在一些方法中，抗體用延釋組成物或裝置（例如 MedipadTM 裝置）投用。

本發明藥劑可視需要結合其它至少可部份有效的治

(65)

療呈澱粉樣疾病之藥劑投用。

在老年痴呆症的以及唐氏綜合症中，澱粉樣蛋白沈澱物發生在腦部，本發明藥劑亦可併用其它增加本發明藥劑通過血腦屏障之藥劑投用。本發明藥劑亦可結合其它增進治療劑接近目標細胞或組織之藥劑(例如脂球體等)投用。共投用此藥劑可降低治療劑劑量(例如治療的抗體或抗體鏈)之須求以達成所要求的效應。

C. 藥學組成物

本發明藥劑經常以藥學組成物的型式投用，其係包含活性的治療劑以及各種其它醫藥學上可接受的成份。參閱 Remington's Pharmaceutical Science (15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania (1980))。較佳的形式取決於投藥的預期模式以及治療的用途。組成物亦可包括(取決於所要求的調配物)醫藥學上可接受的、無毒的載體或稀釋劑，其定義為通常用以調配投藥至動物或人類之藥學組成物的載劑。選擇的稀釋劑是以不影響組合的生物活性為原則。該稀釋劑的實施例為蒸餾水、磷酸鹽緩衝的生理食鹽水、林格氏溶液、葡萄糖溶液、及 Hank's 溶液。此外，藥學組成物或 調配物亦可包括其它載體、佐劑、或無毒性的、無治療的、無免疫產生性的穩定劑等。

藥學組成物亦可包括大的、緩慢代謝的大分子例如蛋白質、多糖例如聚乙醯殼多醣、聚乳酸、聚乙醇酸以及共聚物(例如膠乳功能化的瓊脂糖(TM)、瓊脂糖、纖維素、

(66)

及其類似者)、聚合的胺基酸、胺基酸共聚物、及脂質聚集物(例如油滴或脂球體)。此外，此類載體可作為免疫刺激藥劑(即佐劑)。

在不經腸道的方法給藥時，本發明藥劑可以注射投用內含物質之生理上可接受的稀釋劑與醫藥載體(可為滅菌之液體例如水、油類、生理食鹽水、甘油、或乙醇)之溶液或懸浮液。此外，組成物中可存在輔助的物質，例如溼化劑或乳化劑、表面活性劑、酸鹼度緩衝物質及其類似者。藥學組成物的其它成份為石油、起源自動物、蔬菜、或合成的例如花生油、大豆油、及礦物油。一般而言，乙二醇類例如丙二醇或聚乙二醇為較佳的液體載體，尤其是用於注射溶液。抗體可以儲藏處注射或植入物製劑的形式投用，其可用該方法調製成容許有效成份延期釋放。典型的組成物包含5毫克/毫升之單株抗體，調製於50毫莫耳濃度L-組織胺酸、150毫莫耳濃度NaCl、酸鹼度用HCl調至6.0之水溶性緩衝液。

組成物一般是製備成注射液(液體溶液或懸浮液)；亦可製備成在注射之前適用於溶於或懸浮於溶液或液懸浮、液體載劑之固體形式。製劑亦可乳化或封包於脂球體或微顆粒例如：聚丙內酯、聚糖內酯、或共聚物以增強以上討論之佐劑效應(參閱 Langer, Science 249:1527(1990)以及 Hanes, Advanced Drug Delivery Reviews 28:97(1997))。本發明藥劑可以儲藏處注射或植入物製劑的形式投用，其可用該方法調製成容許有效成份延期釋放或搏動的釋放。

(67)

適用於其它投藥模式的額外調配物包括口服的、鼻腔內的、以及肺部的、栓劑、以及經皮用途的調配物。栓劑、結合劑以及載體包括，例如：聚伸烷基乙二醇類或三酸甘油酯；該栓劑可形成中內含 0.5% 至 10%，較佳者 1%-2% 有效成份之混合物。口服的調配物包括賦形劑，例如醫藥級的甘露糖醇、乳糖、澱粉、硬脂酸鎂、糖精鈉、纖維素、及碳酸鎂。此類組成物之形式為溶液、懸浮液、藥片、藥丸、膠囊、延釋調配物或粉末以及含有 10%-95%，較佳者 25%-70% 之有效成份。

塗覆的施用可產生經皮的或皮膚內的傳輸。塗覆的投藥時可共同投用霍亂毒素或解毒的衍生物或次單體其或其它相似的細菌毒素藥劑以增加效應（參閱 Glenn et al., Nature 391, 851(1998)）。可使用混合物成份或化學交聯得到的聯結分子或表現融合型蛋白達成共同投用之目的。

此外，可 使用皮膚路程或使用轉移體達成經皮的傳輸 (Paul et al., Eur. J. Immunol. 25:3521(1995); Cevc et al., Biochem. Biophys. Acta 1368:201-15(1998))。

III. 監測治療療程

本發明提供監測患有或易感老年痴呆症的病患治療療程的方法，即監測投用病患的治療療程。該方法可用以監視症候性病人的治療治療以及無症狀病患的預防性治療。特定言之，該方法係用於監測被動免疫法（例如測量投用抗體之水準）。

一些方法能決定基線值，例如在投用藥劑前病患抗體

(68)

之水準或輪廓，以及比較治療後之輪廓或水準的數值。水準或輪廓訊息之數值顯著的增加(即在相同樣本之重覆測定中大於試驗誤差，用該測定平均值的一個標準差表示)代表正性治療結果(即投用藥劑達成所要求的反應)。若免疫反應數值不顯著的改變、或減低則為負性的治療結果。

在其它方法中，控制組數值(即平均值以及標準差)之水準或輪廓係測定自控制組族群。一般控制組族群的個體未經過前治療。病患於投用治療劑之後將實測數值之水準或輪廓與控制組數值相比較。相對於控制組數值顯著增加(例如大於一個平均值的標準差)的訊息代表正性或充分的治療結果。缺少顯著的增加或降低訊息代表負性的或不充分的治療結果。一般而言相對於控制組數值其數增加則繼續投用藥劑。如前述，達成相對於控制組數值平台代表可停止治療投藥或降低劑量及/或頻率。

在其它方法中，控制組數值之水準或輪廓(例如平均值及標準差)係測定自進行治療劑治療之控制組族群的個體，在治療之反應下其含量或輪廓已達平台。將病患實測數值之含量或輪廓與控制組數值相比較。若病患之測量水準與控制組數值顯著的不同(例如大於一個標準差)，則可停止治療。若病患之測量水準顯著的低於控制組數值，則繼續投用藥劑。若病患之測量水準持續低於控制組數值，則要改變治療方式。

在其它方法中，對目前未接受治療但以前已進行過

(69)

治療療程之病患，監測其抗體之含量或輪廓以測定是否須要在中斷後重新開始治療。病患之測量水準或輪廓與已進行過治療療程之病患的可數值相比較。相對於以前的測量其數值顯著的降低(即大相同樣本重覆測定之誤差)是代表可恢復治療。此外，病患測量數值可與控制組數值(平均值加上標準差)相比較以測定病人族群於進行治療之後的效果。此外，病患實測數值可與無疾病症狀預防上地處理的病人族群，或治療處理顯示改善疾病特性之治療族群的病人之控制組數值相比較。所有此類案例中，相對於控制水平顯著的降低(即大於一個標準差)是表示病患應恢復治療。

分析之組織樣本一般為病患之血液、血漿、血清、黏液流體或腦脊髓液。分析樣本的例如 $A\beta$ 肽抗體之含量或輪廓，例如人類化的抗體之含量或輪廓。偵測專一性對抗 $A\beta$ 之抗體的 ELISA 方法描述於實施例。在一些方法中，投用抗體之水準或輪廓係使用清除測定加以測定，例如在此描述之活體外吞噬作用檢測法。在該方法中將病患之測試組織樣本與澱粉樣蛋白沈澱物(例如取自 PDAPP 小鼠)以及帶有 Fc 受體之吞噬細胞接觸。然後監測後續澱粉樣蛋白儲存物的清除。

清除反應之存在及程度代表抗體有效的清除測試病患的組織樣本中之 $A\beta$ 之存在性及水準。

被動免疫後之抗體輪廓一般顯示抗體濃度之立即吸收峰接著以指數型式衰變。不須進一步的劑量，在數天至數

(70)

月(取決於投用抗體之半生期)期間衰退至前處理之含量。

在一些方法中，在投藥之前進行病患中 A_β 抗體之基線測量，進行第二個測量測定吸收峰抗體水準，以及在投藥間隔中進行一個或多個進一步的測定監視抗體含量之衰退。當抗體之水準衰退至基線或少於基線預定的吸收峰百分比(例如 50%、25% 或 10%)，則進一步的投用抗體劑量。在一些方法中，吸收峰或後續測量之少於背景值的含量可與其它病患先前測定構成有利的預防性的或治療性的治療療程之參考值相比較。若測量之抗體水準顯著的少於參考值(例如少於平均值減去自治療受益之病人族群參考值的一個標準差)，則要額外的投用抗體劑量。

額外的方法包括經研究人員或醫生以例行的程序監測(於治療療程)任何經技藝確認的生理症狀(例如物理或精神的症狀)，以診斷或監視呈澱粉樣疾病(例如阿茲海默氏症)。例如可監視認知的受損。後者是阿茲海默氏症以及唐氏綜合症症狀但亦可為非此類疾病之症狀。例如，可由病人在 Mini-Mental State Exam 上的分數於治療療程中監測認知的受損。

C. 組套

本發明進一步的提供進行上述監測方法的組套。一般該組套含有專一性結合至 A_β 抗體的藥劑。組套亦可包括標記物。為了偵測到 A_β 抗體，標記物一般是標記的抗-特異型抗體的形式。為了偵測到抗體，提供的藥劑可預先結合至固相，例如結合至微滴定盤之微孔。組套一般亦可

(71)

含有使用組套之指示。該指示亦可包括測量標記物之 A β 抗體含量的圖式或其它相關事物之含量。本文之指示意指在任何生產、運輸、販賣、或使用期間，組套中任何附帶的書寫或紀錄材料。例如，本文之指示包含廣告卡、以及小冊子、包裝材料、說明、錄音或錄影卡式塊、電腦磁碟、與直接書寫在組套上的文字。

本發明亦提供診斷的組套，例如研究、偵測及/或診斷的組套(例如進行活體內影像分析的組套)。該組套一般含有結合 A β 抗原決定部位(較佳者於殘基 1-10)之抗體。較佳者，抗體為標記的抗體或可用組套內之二級標記試劑標記。較佳者，組套標示進行預期用途的說明，例如進行活體內影像測定。典型的抗體描述於此。

D. 活體內影像分析

本發明提供病患活體內影像化澱粉樣蛋白沈澱物的方法。該方法適用於診斷或證實阿茲海默氏症之診斷，或易感性。例如，該方法可用於呈現痴呆症症狀之病患。若病患有異常的澱粉樣蛋白沈澱物，則該病患可能患有阿茲海默氏症。該方法亦可用於無症狀的病患。出現澱粉樣蛋白異常的沈澱物意指對未來的症候性的疾病具有易感性。該方法亦可用於監測疾病進展及/或先前已診斷出阿茲海默氏症病人對治療之反應。

該方法可對病患投用試劑(例如結合至 A β 之抗體)，然後於結合之後偵測藥劑。較佳的抗體結合至病患的 A β 沈澱物而不結合全長之 APP 多肽。尤佳的抗體係結合至

(72)

A_β 肽 基 酸 1-10 的 抗 原 決 定 部 位 。 在 一 些 方 法 中 ， 抗 體 結 合 至 A_β 肽 基 酸 7-10 之 抗 原 決 定 部 位 。 該 抗 體 可 結 合 而 不 誘 導 實 質 上 的 清 除 反 應 。 在 其 它 方 法 中 ， 抗 體 結 合 至 A_β 肽 基 酸 1-7 之 抗 原 決 定 部 位 。 該 抗 體 可 結 合 以 及 誘 發 A_β 之 清 除 反 應 。 然 而 使 用 缺 少 全 長 恒 定 區 (例 如 Fabs) 抗 體 片 段 可 避 免 清 除 反 應 反 應 。 在 一 些 方 法 中 ， 相 同 抗 體 可 作 為 治 療 及 診 斷 的 試 劑 。 一 般 而 言 ， 結 合 A_βC- 端 至 殘 基 10 之 抗 原 決 定 部 位 的 抗 體 和 結 合 至 抗 原 決 定 部 位 殘 基 1-10 之 抗 體 不 同 ， 無 強 烈 的 訊 息 ， 可 能 因 為 濘 粉 樣 蛋 白 沈 濘 物 不 會 露 出 C- 端 之 抗 原 決 定 部 位 。 據 此 該 抗 體 較 差 。

診 斷 的 試 劑 可 經 靜 脈 注 射 ， 或 直 接 的 經 頭 內 注 射 投 用 至 腦 部 或 在 頭 頸 鑽 孔 投 用 至 病 患 身 體 。 試 劑 劑 量 應 與 治 療 方 法 之 範 圍 相 同 。 一 般 試 劑 是 標 記 的 ， 雖 然 在 一 些 方 法 中 ， 具 A_β 親 和 力 的 一 級 試 劑 是 未 標 記 的 以 及 使 用 二 級 標 記 藥 劑 結 合 至 一 級 試 劑 。 標 記 之 選 擇 取 決 於 偵 測 裝 置 。 例 如 ， 螢 光 標 記 適 用 於 光 學 偵 測 。 使 用 順 磁 性 的 標 記 適 用 於 斷 層 X 線 檢 驗 的 偵 測 而 非 外 科 手 術 。 放 射 性 的 標 記 亦 可 使 用 PET 或 SPECT 偵 測 。

診 斷 係 比 較 對 應 的 基 線 值 與 標 記 的 基 因 座 之 數 量 、 大 小 、 及 / 或 強 度 。 基 線 值 可 代 表 族 群 中 無 疾 病 個 體 的 平 均 值 。 基 線 值 亦 可 代 表 在 相 同 病 患 以 前 測 定 的 含 量 。 例 如 ， 在 病 患 開 始 治 療 之 前 可 測 定 基 線 值 ， 以 及 然 後 比 較 基 線 值 與 實 測 數 值 。 相 對 於 基 線 訊 息 降 低 數 值 代 表 治 療 之 正 性 反 應 。

(73)

本發明將用下列非限制實施例作更完全的描述。

【實施方式】

實施例

下列序列辨識符號係用於實施例，意指免疫球蛋白鏈變異區核苷酸以及胺基酸序列。

(74)

抗體	VL 核苷酸序列	VL 氨基酸序列	VH 核苷酸序列	VH 氨基酸序列
12B4	序列確認號碼：1	序列確認號碼：2	序列確認號碼：3	序列確認號碼：4
人類化的	序列確認號碼：5	序列確認號碼：6	序列確認號碼：7	序列確認號碼：8
12B4v1				
人類化的	序列確認號碼：5	序列確認號碼：6	序列確認號碼：9	序列確認號碼：10
12B4v2				
人類化的	序列確認號碼：5	序列確認號碼：6	序列確認號碼：11	序列確認號碼：12
12B4v3				

(75)

實施例 I. 小鼠 12B4 變異區之選殖及定序

12B4VH 之選殖以及序列分析。使用融合瘤之傳訊 RNA 以及標準選殖方法學經 RT-PCR 以及 5'RACE 選殖融合瘤細胞 12B4 之 VH 及 VL 區域。源自二種非依存的 cDNA 選殖株，編碼假定 12B4VH 結構區之核苷酸序列(序列確認號碼：3)以及推演之胺基酸序列(序列確認號碼：4)分別列於表 2 及表 3。

表 2：小鼠 12B4VH DNA 序列。

```

ATGGACAGGCTTACTCCTCATTCCTGCTGCTGATTGTCCCTGCATATGTCCTGTCCCCA
GGTTACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGGATATTGCAGCCCTCCCAGACCCTCAGTCTGA
CTTGTCTTCTCTGGGTTTCACTGAGCACTAATGGTATGGGTGTGAGCTGGATTGCT
CAGCCTTCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGCACACATTACTGGGATGAGGACAAGCG
CTATAACCCATCCCTGAAGAGCCGGCTCACAACTCCAAGGATACCTCTAACAAATCAGG
TATTCCTCAAGATACCAATGTGGACACTGCTGATACTGCCACATACTACTGTGCTCGA
AGGAGGATCATCTATGATGTTGAGGACTACTTGACTACTGGGCCAAGGCACCACTCT
CACAGTCTCCTCAG (SEQ ID NO:3)

```

*在下面劃線的是領導肽。

表 3：小鼠 12B4VH 胺基酸序列

```

mdrltssflllivpayvlsqVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLStngmgvsWIR
QPSGKGLEWLAh iywdedkrynp slksRLTISKDT SNNQVFLKITNVDTADTATYYCAR
rr iiydvedyfdyWGQGTTLT VSS (SEQ ID NO: 4)

```

*小寫字型是領導肽以及 CDR。

12B4VL 之選殖以及序列分析。12B4輕鏈各種 VL 區域係用選殖 VH 區域類似的方法加以選殖。源自二種非依存的 cDNA 選殖株，編碼假定 12B2 VL 結構區之核苷酸序列(序列確認號碼：1)以及推演之胺基酸序列(序列確認號碼：2)分別列於表 4 及表 5。

(76)

表 4：小鼠 12B4VL DNA 序列

ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCATGTTCTGGATTCCCTGCTTCCAGCAGTGA
 TGTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTGGAGATCAAGCCTCCA
 TCTCTTGCAGATCTAGTCAGAACATTGTTCATAGTAATGGAAACACCTATTAGAATGG
 TACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTCCAACCGATT
 TTCTGGGTCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTCACACTCAAGA
 TCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGAGTTATTACTGCTTCAAGGTTCACATGTT
 CCGCTCACGTTGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAAC (SEQ ID NO:1)

* 在下面劃線的是領導肽。

表 5：小鼠 12B4VL 氨基酸序列

mklpvrl1l1v1mfwipasssDVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCrssqnivhsngntyleW
 YLQKPGQSPKLLIYkvsnrfSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCf_{qgshv}
 pltFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 2)

* 小寫字型是領導肽以及 CDR。

12B4VL 以及 VH 序列符合 V 區域功能標準從開始的甲硫氨酸至 C-區域含有 ORF 疊連群，以及分享免疫球蛋白 V 區域基因之守恆殘基特徵。從 N-端至 C-端，此輕鏈及重鏈包含 FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 以及 FR4 結構區。各結構區氨基酸之編號係依據上述 Kabat et al. 之規則。

實施例 II：表現嵌合型 12B4 抗體

表現嵌合型 12B4 抗體：將各種重及輕鏈區域分別再構建入編碼 VDJ 或 VJ 接合點接合供體序列下游，以及將重鏈選殖入哺乳動物的表現載體 pCMV-hyl，將輕鏈選殖入 pCMV-hx1。此類載體於插入的變異區卡式塊下游 編碼人類 y1 以及 Ck 恒定區之外子片段。序列驗證後，將重鏈及輕鏈表現載體共轉染 COS 細胞。將各種重鏈質體分

(77)

別與不同嵌合的輕鏈質體共轉染以證實結果之重現性。轉染後 48 小時收集條件化的培養液以及用西方墨點分析測定抗體之產生或用 ELISA 測定與 $A\beta$ 之結合。所有表現的重鏈 + 輕鏈結合物之多重轉染株用山羊抗 - 人類 IgG(H+L) 抗體以西方轉漬法確認。

用 ELISA 測試嵌合型 12B4 抗體與 $A\beta$ 之直接地結合。圖 5 顯示嵌合型 12B4 以高抗體親抗原性結合至 $A\beta$ ，此與嵌合的以及人類化的 3D6(圖 5)相似。(選殖、鑑定及 3D6 之人類化為描述於美國專利申請案序號 10/010,942，全文在此併入參考文獻。)此外，ELISA 競爭性的抑制測定揭露嵌合型 12B4 以及鼠科動物 12B4 抗體對 $A\beta$ 之競爭結合與生物素化的鼠科動物以及嵌合型 3D6 相等。圖 6 顯示在生物素化的鼠科動物 12B4 結合至 $A\beta_{1-42}$ 時，嵌合型 12B4(虛線、空心三角型)對 $A\beta_{1-42}$ 肽競爭結合與其非生物素化的鼠科動物對應部份(固體線、密封的三角型)相等。

實施例 III：mAb 12B4 在 PDAPP 小鼠中對各種神經病理測試終點之功效

此實施例描述鼠科動物 mAb 12B4 在各種神經病理測試終點的功效。描述比較二種 mAbs，12B4 以及 3D6。此二 mAbs 為 IgG2a 同功型以及可結合 AO 肽之 N-端抗原決定部位。

免疫

PDAPP 小鼠是用 mAb 12B4(辨識 $A\beta$ 3-7)或 mAb 3D6(辨識 $A\beta$ 1-5)被動的免疫，二者均為 IgG2a 同功型

(78)

。用 10 毫克 / 公斤 12B4 進行測試。3D6 係投用不同劑量，每個月一次每次 10 毫克 / 公斤、1 毫克 / 公斤以及 10 毫克 / 公斤 (1 x 4)。注射不相關的 IgG'y2 抗體 (TY 11/15) 以及 PBS 作為控制組。用 A_β 肽活化免疫以作為比對。各分析組之動物為 20 及 35 隻。

神經病理的測試終點測定包括澱粉樣蛋白之含量以及神經炎的程度。

● 澱粉樣蛋白之含量

澱粉樣蛋白沈澱物占領額骨皮質的程度係用 3D6 免疫染色及定量的影像分析測定。分析結果展示於表 6。所有免疫療法 (即用 12B4、3D6 (所有測試劑量) 以及 A_β 肽免疫) 均顯著的降低澱粉樣蛋白之含量。

● 神經炎的程度

先前觀察到 10D5 (鼠科動物 IgGy1 同功型單株抗體可確認 12B4 之相同的抗原決定部位) 不能顯著的降低神經炎的程度，顯示 IgGy2a 同功型抗體 (但不是其它同功型) 能降低阿茲海默氏症動物模式之神經炎的程度 (數據未顯示)。經 12B4 與 3D6 (均為 IgG'ca 同功型) 被動免疫法後用抗-APP 抗體 8E5 免疫染色接著定量的影像分析測定 PDAPP 小鼠腦切片神經炎的程度。神經炎性失調之外觀為位於澱粉樣蛋白斑旁之去營養的神經炎 (例如球狀外觀的神經炎)。分析結果展示於表 7。此類數據顯示 12B4 治療可顯著的降低神經炎的程度。相反的 3D6 不會顯著的降低神經炎的程度。

(79)

表 6：頸骨的皮質澱粉樣蛋白之含量

	PBS	TY11/15	12B4	3D6,10毫克/ 克/公斤	3D6,1毫克/ 公斤	3D6,10毫克/ 公斤/4週	活性
N	31	30	33	29	31	32	24
中位數 (%AB)	15.182297	13.303288	2.317222	0.865671	2.286513	1.470956	2.162772
範圍	0.160-31.961	0-61.706	0-14.642	0-7.064	0.077-63.362	0-10.688	0-30.715
p 值 (M-W)		,9425 ns	***<.0001	***<.0001	***<.0001	***<.0001	****.0004
改變 %	N/A	12%	85%	94%	85%	90%	86%

(80)

表7：頸骨的皮質神經炎的程度

	PBS	TY 11/15	12B4	3D6, 10 毫 克/公斤	3D6, 1 毫 克 / 3D6, 10 毫 克 / 3D6, 10 毫 克 / 4週	活性
N	31	30	33	2.9	31	32
中位數 (%NB)	0.3946	0.3958	0.0816	0.4681	0.3649	0.4228
範圍	0-1.3828	0-2.6800	0-0.8127	0-1.3098	0-1.5760	0-1.8215
p 值 (*M-W)	-	.8967 ns	* ** .0002	.9587 ns	.6986 ns	>.9999
% 改變	-	0%	79%	0%	7%	0%
						41%

(81)

上述結果指出 IgG'2a 同功型之 A β 抗體治療可以，但非足以降低神經炎的程度。經顯著的抗原決定部位(即 A β 3-7)結合 A β 亦可降低 PDAPP 小鼠之病理現象。

阿茲海默氏症之 PDAPP 小鼠模式可對熟悉此技藝之專業人士提供鑑定各種神經病理的測試終點之有價質的資料以用於設計適當的人類治療的免疫準則。例如 對人類病患使用 IgG1 次型 12B4 人類化的版本(即相當於小鼠之 IgGy2A 次型)，結合至 A β 殘基 3-7 之抗原決定部位可降低神經炎的程度。

實施例 IV：對抗澱粉樣蛋白沈澱物抗體活性之體外的篩選測定

為了檢視抗體清除蛋白斑之效應，體外的測定係利用初級微神經膠質細胞與 PDAPP 小鼠或人類 AD 腦部未固定的冷凍切片培養。微神經膠質細胞係得自 DBA/2N 小鼠新生兒(1-3天)的大腦皮質。皮質於內含 50 微克/毫升 DNA 酶 I(Sigma)之 HBSS''(Hanks' Balanced Salt Solution, Sigma)中機械地分離。分離細胞用 100 微米細胞濾器(Falcon)過濾，以及在 1000 rpm 下離心 5 分鐘。沈澱塊再懸浮於生長培養液(高葡萄糖 DMEM、10% FBS、25 毫微克/毫升重組鼠科動物 GM-CSF(rmGM-CSF))，以及以 2 個腦/T-75 塑膠培養燒瓶之密度植入細胞。於 7-9 天之後，將燒瓶於軌道的搖動器中在 37°C、200 rpm 下旋轉 2 h。將細胞懸浮液在 1000 rpm 下離心以及再懸浮於測定培養液。

將 10-微米 PDAPP 小鼠或人類 AD 腦部之冷凍切片(

(82)

屍體檢查間隔<3 hr)解凍，覆蓋上聚-離胺酸塗覆的圓形的玻璃蓋玻片以及置於24-孔組織培養板之孔內。將蓋玻片用測定培養液清洗兩次，其係由H-SFM(不含融合瘤-血清之培養液，Gibco BRL)、1%FBS、麩胺醯胺酸、青黴素/鏈黴素、以及5毫克/毫升rmGM-CSF(R&D)組成。加入2x濃度(最終5微克/毫升)對照組或抗-A β 抗體(12B4)反應1小時。然後以 0.8×10^6 細胞/毫升之密度將微神經膠質細胞種入測定培養液。維持在濕化的恒溫箱(37°C ， $5\%\text{CO}_2$)中培養24 hr或更久。培育終止時，培養物用4%低聚乙醛固定以及用0.1%Triton-X100通透。切片依序用生物素化的3D6、抗生蛋白鏈菌素/Cy3共軛聯結物(Jackson ImmunoResearch)染色。外生性微神經膠質細胞用細胞核的染色(DAPI)目視。用倒置的螢光顯微鏡(Nikon, TE300)觀察培養細胞以及用SPOT數位攝影機以SPOT軟體(Diagnostic instruments)截取顯微照片。

當用PDAPP腦切片在無活體內功效之對照組抗體存在下進行測定， β -澱粉樣蛋白斑保持完整以及沒有觀察到吞噬作用。相反的，在3D6或12B4存在下培養細胞的切片中，澱粉樣蛋白沈澱物大幅消失以及微神經膠質細胞中顯示許多內含A β 的吞噬小泡(圖7)。用AD腦切片得到相似的結果；3D6(人類化的版本)以及嵌合型12B4可誘發AD斑的吞噬作用，而對照組IgGI則不起作用。

實施例II以及III中之數據可證實選殖的12B4變異區之功能。

(83)

實施例 V. 12B4之人類化

A. 12B4人類化的抗體，版本1

同源現象/分子模式化。為了確認鼠科動物12B4抗體關鍵構造的架構殘基，以最接近鼠科動物抗體的重及輕鏈產生三度空間模式。在為此目的下，選擇2PCP抗體作模式化12B4輕鏈(PDB ID: 2PCP, Lim et al.(1998)J. Biol. Chem. 273:28576)之模版，以及選擇1ETZ抗體作為模式化重鏈之模版。(PDB ID: 1ETZ, Guddat et al.(2000)J. Mol. Biol. 302:853)。12B4與此類抗體輕鏈及重鏈之胺基酸序列對準揭露2PCP以及1ETZ抗體與12B4分享顯著的序列同源現象。此外，選擇抗體的CDR回路與12B4之CDR回路的標準Chothia構造分類相同。因此，最初選擇2PCP以及1ETZ作抗體解析12B4同源模式化之結構。

基於以上之抗體使用Look & SegMod Modules GeneMine(v3.5)套裝軟體構築12B4變異區第一輪同源現象模式。此軟體是以授權使用執照購買自Molecular Applications Group(Palo Alto, CA)。此套裝軟體之作者為Drs. Michael Levitt以及Chris Lee vitt，經涉及以已知結構的一級序列作模版基於序列同源現象之結構模型自動化步驟，其可增進分子模式化之作業。於Silicon Graphics IRIS工作站於UNIX環境下工作，模式化結構經一系列能量最小化步驟去除不利的原子接觸以及最佳化靜電的及凡得瓦交互作用可自動地精煉。進一步的精煉的模式係使

(84)

用 Quanta®的模式化能力構建。

選擇人類接受體抗體序列。經電腦比對小鼠變異區胺基酸序列與習知的人類抗體序列，確認適當的人類接受體抗體序列。分別進行 12B4 重及輕鏈之比對。特定言之，經使用 NCBI BLAST(經 National Institutes of Health NCBI 網際網路伺服器公開存取)以各鼠科動物架構序列詢問 Kabat 資料庫以確認人類抗體其架構序列與鼠科動物 VL 及 VH 架構區域展現高度序列相似性之各種結構區。

選擇二種候選序列作為接受體序列，其標準如下：
 (1) 與主題序列有同源現象；(2) 與供體序列分享標準的 CDR 構造；以及(3)架構區域內不含任何稀有的胺基酸殘基。VL 選擇的接受體序列是 Kabat ID 號碼(KABID)005036(Genbank 寄存編號 X67904)，以及 VH 是 KABID 000333(Genbank 寄存編號 X54437)。第一版之人類化的 12B4 抗體是利用此類選擇的接受體抗體序列。

取代之胺基酸殘基。如上述，人類化的本發明抗體包含實質上取自人類免疫球蛋白(接受體免疫球蛋白)變異架構區域以及域實質上取自小鼠免疫球蛋白(供體免疫球蛋白)稱為 12B4 之互補性決定區。確認 12B4 互補性決定區域及適當的人類接受體免疫球蛋白之互補性決定區域後，下一步驟是測定是否此類成份中有任何殘基應經取代以最適化產生的人類化抗體的性質。

重新塑造輕鏈 V 區域：

重新塑造輕鏈 V 區域之胺基酸對準展示於圖 1。從相

(85)

當於鼠科動物 V 區域之相同人類亞類選擇受體架構 (Kabid 005036) (沒有獨特的架構殘基)，以及 CDR 與 Chothia 正則結構群屬於同一類。其為單一的回復突變 (12V)，此殘基為標準的分類。重新塑造之 VL 版本 1 為完整的種系。

重新塑造重鏈 V 區域：

重新塑造重鏈 V 區域之胺基酸對準展示於圖 2。從相當於鼠科動物 V 區域之相同人類亞類選擇受體架構 (Kabid 000333) (沒有獨特的架構殘基)，以及 CDR 與 Chothia 正則群屬於同一類。鼠科動物 VH 鏈結構模型化，合併 Kabid 000333 胺基酸對準至鼠科動物序列，在重新塑造之重鏈版本 1 (v1) 中找到 9 個返回 - 突變：L2V、V24F、G27F、129L、148L、G49A、V67L、V71K、& F78V (Kabat 編號)。回復突變在胺基酸對準中用星號標示並展示於圖 2。

在 9 個回復突變中，4 個是由模式所支配，因為該殘基為標準的殘基 (V24F、G27F、129L、& V71K，由固體實心塊表示)，即因為靠近 CDR 殘基所以是可促成抗原結合的架構殘基。在次重要的殘基分類上無須回復突變，界面殘基則涉及 VH-VL 裝填之交互作用 (由空心塊代表)。標定回復突變 (L2V、148L、G49A、V67L、F78V，Kabat 編號) 的其餘 5 個殘基均為游標尺分類 (間接的參與 CDR 構像，由圖 2 中粗的點狀塊表示)。

版本 2 之設計是保留最低數目之非 CDR 鼠科動物殘基。L2V 返回突變引進非種系之改變 (以 VH461 作為種系參

(86)

考)，以及在重鏈版本 2 中消除該返回突變以恢復其種系。在重鏈版本 2 亦恢復其餘的 4 個游標尺分類回復突變 (148L、G49A、V67L、F78V)。如此版本 2 總共含有 5 個非 CDR 鼠科動物殘基 (1 個位於 VL，以及 4 個位於 VH)。版本 3 之設計是恢復 5 個游標尺殘基中的 2 個 (148L，& F78V)，此模式指出彼為較重要的游標尺殘基。因此版本 3 總共含有 7 個非 CDR 鼠科動物殘基。

併入版本 1、2 以及 3 之人類化的 12B4 之改變摘要列於表 8。

(87)

表 8. 人類化的 12B4.v1 中改變之摘要表

改變	VL(111殘基)	VH(123殘基)
Hu->Mu:架構	1/111	9/123
CDR1	8/16	7/7
CDR2	3/7	8/16
CDR3	6/8	10/13
總 Hu->Mu	18/111(16%)	34/123(28%, v2=23%)
Mu->Hu:架構	10/111	16/123
返回突變註解	1. 12V: 標準的位置。	2. 標準的 : V24F 、 G27F 、 129L 、 & V71K 3. 裝填 : 無 4. 游標尺 : L2V* 、 I48L# 、 G49A* 、 V67L* 、 F78V#
受體註解	5. KABID005036/Gen bank Acc#-x67904 6. 取自相同標準構造群供體小鼠的 CDR; 7. 取自 SLE 病患抗 - 心肌磷脂 / ssDNA 之自體抗體	8. KABID000333/Genbank Acc#x54437 9. 取自相同標準構造群供體小鼠的 CDR; 10. 取自 RA 病患之類風濕因子 mAb

*排除 v2 及 v3；

#排除 v2，恢復 v3。

表 9 以及 10 分別提出各種輕鏈及重鏈之 Kabat 編號表

(88)

表 9：輕鏈 Kabat 編號表

<u>KAB</u>			<u>小鼠</u>	<u>HUM</u>	<u>A19</u>	
#	#	類型	<u>12B4</u>	<u>12B4</u>	<u>KABID</u>	<u>株</u>
1	1	FR1	D	D	D	D
2	2		V	V	I	I
						評論 vl、v2以及 v3標 準的返回突變
3	3		L	V	V	V
4	4		M	M	M	M
5	5		T	T	T	T
6	6		Q	Q	Q	Q
7	7		T	S	S	S
8	8		P	P	P	P
9	9		L	L	L	L
10	10		S	S	S	S
11	11		L	L	L	L
12	12		P	P	P	P
13	13		V	V	V	V
14	14		S	T	T	T
15	15		L	P	P	P
16	16		G	G	G	G
17	17		D	E	E	E
18	18		Q	P	P	P
19	19		A	A	A	A
20	20		S	S	S	S
21	21		I	I	I	I
22	22		S	S	S	S
23	23		C	C	C	C

(89)

24	24	CDR1	R	R	R
25	25		S	S	S
26	26		S	S	S
27	27		Q	Q	Q
27A	28		N	S	S
27B	29		I	L	L
27C	30		V	L	L
27D	31		H	H	H
27E	32		S	R	S
28	33		N	Y	N
29	34		G	G	G
30	35		N	Y	Y
31	36		T	N	N
32	37		Y	Y	Y
33	38		L	L	L
34	39		E	D	D
35	40	FR2	W	W	W
36	41		Y	Y	Y
37	42		L	L	L
38	43		Q	Q	Q
39	44		K	K	K
40	45		P	P	P
41	46		G	G	G
42	47		Q	Q	Q
43	48		S	S	S
44	49		P	P	P
45	50		K	Q	Q
46	51		L	L	L
47	52		L	L	L
48	53		I	I	I
49	54		Y	Y	Y
50	55	CDR2	K	K	L
51	56		V	V	G
52	57		S	S	S
53	58		N	N	N
54	59		R	R	R
55	60		F	F	A
56	61		S	S	S

(90)

57	62	FR3	G	G	G
58	63		V	V	V
59	64		P	P	P
60	65		D	D	D
61	66		R	R	R
62	67		F	F	F
63	68		S	S	S
64	69		G	G	G
65	70		S	S	S
66	71		G	G	G
67	72		S	S	S
68	73		G	T	T
69	74		T	T	D
70	75		D	D	F
71	76		F	F	T
72	77		T	T	L
73	78		L	L	K
74	79		K	I	I
75	80		I	S	S
76	81		S	R	R
77	82		R	V	V
78	83		V	V	E
79	84		E	E	A
80	85		A	A	E
81	86		E	E	D
82	87		D	D	V
83	88		L	V	G
84	89		G	G	V
85	90		V	V	Y
86	91		Y	Y	Y
87	92		Y	C	C
88	93		C		
89	94	CDR3	F	F	M
90	95		Q	Q	Q
91	96		G	G	A
92	97		S	S	L
93	98		H	H	Q
94	99		V	V	T
95	100		P	P	P
96	101		L	L	Y
97	102		T	T	T

(91)

98	103	FR4	F	F	F
99	104		G	G	G
100	105		A	Q	Q
101	106		G	G	G
102	107		T	T	T
103	108		K	K	K
104	109		L	L	L
105	110		E	E	E
106	111		L	I	I
106A	112		K	K	K

(92)

表 10：重鏈 Kabat 編號表

<u>KAB</u>	<u>#</u>	<u>類型</u>	<u>小鼠</u>	<u>HUM</u>	<u>KABID</u>	<u>VH4-39</u>	<u>VH4-61</u>	<u>評論</u>
<u>#</u>	<u>#</u>	<u>FR1</u>	<u>12B4</u>	<u>12B4</u>	<u>000333</u>	<u>株</u>	<u>株</u>	
1	1		<u>VH</u>	<u>VH</u>				
2	2		V	V	L	L	V	v1 游標尺的返
3	3		T	Q	Q	Q	Q	突變
4	4		L	L	L	L	L	
5	5		K	Q	Q	Q	Q	
6	6		E	E	E	E	E	
7	7		S	S	S	S	S	
8	8		G	G	G	G	G	
9	9		P	P	P	P	P	
10	10		G	G	G	G	G	
11	11		I	L	L	L	L	
12	12		L	V	V	V	V	
13	13		Q	K	K	K	K	
14	14		P	P	P	P	P	
15	15		S	S	S	S	S	
16	16		Q	E	E	E	E	
17	17		T	T	T	T	T	
18	18		L	L	L	L	L	
19	19		S	S	S	S	S	
20	20		L	L	L	L	L	
21	21		T	T	T	T	T	
22	22		C	C	C	C	C	
23	23		S	T	T	T	T	v1、v2 以及 v3 標準的返
24	24		F	F	V	V	V	突變
25	25		S	S	S	S	S	
26	26		G	G	G	G	G	
27	27		F	F	G	G	G	v1、v2 以及 v3 標準的返
								突變
28	28		S	S	S	S	S	v1、v2 以及 v3 標準的返
29	29		L	L	I	I	V	突變
30	30		S	S	S	S	S	

(93)

31	31	CDR1	T	T	R	S	S
32	32		N	G	G	G	G
33	33		G	M	S	S	S
34	34		M	G	H	Y	Y
35	35		G	G	Y	Y	Y
35A	36		V	V	W	W	W
35B	37		S	S	G	S	S
36	38	FR2	W	W	W	W	W
37	39		I	I	I	I	I
38	40		R	R	R	R	R
39	41		Q	Q	Q	Q	Q
40	42		P	P	P	P	P
41	43		S	P	P	P	P
42	44		G	G	G	G	G
43	45		K	K	K	K	K
44	46		G	G	G	G	G
45	47		L	L	L	L	L
46	48		E	E	E	E	E
47	49		W	W	W	W	W
48	50		L	L	I	I	I
49	51		A	A	G	G	G
50	52	CDR2	H	H	S	S	Y
51	53		I	I	I	I	I
52	54		Y	Y	Y	Y	Y
53	55		W	W	Y	Y	Y
54	56		D	D	S	S	S
55	57		E	E	G	G	G
56	58		D	D	N	S	S
57	59		K	K	T	T	T
58	60		R	R	Y	Y	N
59	61		Y	Y	F	Y	Y
60	62		N	N	N	N	N
61	63		P	P	P	P	P
62	64		S	S	S	S	S
63	65		L	L	L	L	L
64	66		K	K	K	K	K
65	67		S	S	S	S	S

僅 v1 及 v3 游標
尺的返回突變
僅 v1 游標尺的返
回突變

(94)

66	68	FR3	R L	R L	R V	R V	R V	僅 v1 游標尺的返回突變
67	69							
68	70		T	T	T	T	T	
69	71		I	I	I	I	I	
70	72		S	S	S	S	S	
71	73		K	K	V	V	V	v1、v2 以及 v3 標準的返回突變
72	74		D	D	D	D	D	
73	75		T	T	T	T	T	
74	76		S	S	S	S	S	
75	77		N	K	K	K	K	
76	78		N	N	N	N	N	
77	79		Q	Q	Q	Q	Q	
78	80		V	V	F	F	F	v1 及 v3 游標尺的返回突變)
79	81		F	S	S	S	S	
80	82		L	L	L	L	L	
81	83		K	K	K	K	K	
82	84		I	L	L	L	L	
82A	85		T	S	S	S	S	
82B	86		N	S	S	S	S	
82C	87		V	V	V	V	V	
83	88		D	T	T	T	T	
84	89		T	A	A	A	A	
85	90		A	A	A	A	A	
86	91		D	D	D	D	D	
87	92		T	T	T	T	T	
88	93		A	A	A	A	A	
89	94		T	V	V	V	V	
90	95		Y	Y	Y	Y	Y	
91	96		Y	Y	Y	Y	Y	
92	97		C	C	C	C	C	
93	98		A	A	A	A	A	
94	99		R	R	R	R	R	

(95)

95	100	CDR3	R	R	L
95A			-	-	G
96	101		R	R	P
97	102		I	I	D
98	103		I	I	D
99	104		Y	Y	Y
100	105		D	D	T
100A	106		V	V	L
100B	107		E	E	D
100C	108		D	D	G
100D	109		Y	Y	-
100E	110		F	F	M
101	111		D	D	D
102	112		Y	Y	V
103	113	FR4	W	W	W
104	114		G	G	G
105	115		Q	Q	Q
106	116		G	G	G
107	117		T	T	T
108	118		T	T	T
109	119		L	V	V
110	120		T	T	T
111	121		V	V	V
112	122		S	S	S
113	123		S	S	S

人類化的抗體較佳者展現與 A β 專一性結合親和力至少為 10^7 、 10^8 、 10 或 10^{10} M $^{-1}$ 。通常人類化的抗體與 A β 結合親和力之上限在 12B4的三、四或五倍之內(即約 10^9 M $^{-1}$)。通常結合親和力之下限亦在 12B4的三、四或五倍之內。組裝以及表現人類化的 12B4VH 以及 VL，版本 1

圖 9a 以圖式呈現 PCR 調節的組裝人類化的 VL.v1 之策略。圖 9a 以圖式呈現 PCR 調節的組裝人類化的 VH.v1 之策略。表 11 為 PCR 調節的組裝 12B4v1 之引子。

(96)

表 11：用於 PCR 中介的組裝人類化的 12B4V 區域 (v1) 的合成寡核苷酸

DNA #	大 小	編 碼	序 列	評論
4 8 8 1	1 3 5	Y e s	gagattaaggcttgcggccaccatGAGGCT CCCTGGCTCAAGTCCTGGATCAGTGGGGATGTT GTGATGACTCAAGTCTCACTCTCCCTGGCG CGTCACCCCTGGAGAGCG	經寡核苷酸等合成的 hum12B4VLv1A 引子 。nts 1>115 12B4VLv1。固定區，正股。加 入 HindIII 位點 +Kozak 共識性序列。
4 8 8 2	1 3 1	N o	序列 確 認 號 碼 : 1 3 AGGAGCTGTGGAGACTGCCCTGGCTTCTG CAGGTACCATTCAAAATAGGTGTTTCCAT TACTATGAACAATGTTCTGACTAGACCTG CAGGAGATGGAGGGCCGGCTCCAGGGGT GACGGCGAGGAGAG	經寡核苷酸等合成的 hum12B4VLv1B 引子。 反股互補 DNA 序列 12B4VLv1。固定區 (85,215)
4 8 8 3	1 3 2	Y e s	序列 確 認 號 碼 : 1 4 TGCGAGAACGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTC CTGATCTACAAAGTTCCAACCGATTTC TGGGTCCCTGACAGGTTCAAGTGGCAGTG GATCAGGCACAGATTTTACACTGAAATC AGCAGACTGGAGGCTG	經寡核苷酸等合成的 hum12B4VLv1C 引子。 nts 185>316 12B4VLv1。固定區，同義股。
4 8 8 4	1 3 0	N o	序列 確 認 號 碼 : 1 5 TgatatggatccactacGTTGATCTCC AGCTTGGTCCCCTGACCGAACGGAGGG AACATGTTGAAACCTTGAAAGCCAGTAATAAA CCCCAACATCCTCAGGCTCCACTCTGCTG ATTTTTCAGTGTAAA	經寡核苷酸等合成的 hum12B4VLv1D 引子。 反股互補 DNA 序列 12B4VLv1。固定區， (286,397)加入接合供體+BamHI 位點。
4 8 8 5	1 4 3	Y e s	序列 確 認 號 碼 : 1 6 gagataaaaggcttgcggccaccATGAAGCA CTCTGGTCTCTCTGCTGGTGGCAG CTCCCAAGATGGTCTGTCAGGTGGCAG CTGCAGGAGCTGGCCAGGACTGGTGA GCCTTCGGAGACCCCTGTCACCTG	經寡核苷酸等合成的 hum12B4VHv1A 引子 。12B4VHv1。固定區，nts 1-122，加入 Kozak 共識性序列，以及 HindIII 位點
			序列 確 認 號 碼 : 1 7	

(97)

4886	137	No	TCCTOATCCCAAATAGATGTTGCCAGCC CTCCAGTCCCTTCCGGGTGCCGG TCCAGCTCACCCATACCTATTAGTGCTC AGGGAAAAACCAAGAGAAAAGTGCAGGGTGA GGACPAGGGTCTCGAAGGCTT	經寡核苷酸等合成的 hum12B4VHv1B 引子 。反股互補 DNA 序列 12B4VHv1。固定區 (94,230)
4887	138	Yes	GTGGCTGGCACACATCTATTGGATGAGC ACAAGGGCTATAACCCATCCCTCAAGAGT CGACTCACCATAATCAAAAGGACACGTCCA GAACCCAGGTATCCCTGAAGCTGAGCTCTG TGACCGCTGCAGAACGGCGT	經寡核苷酸等合成的 hum12B4VHv1C 引子 。12B4VHv1。固定區 nts201-338
4888	139	No	tcatatggatccactcacctGGAGGAGC GTGACCGTGGTCCCTTGCCCCAGTAGTC AAAGTAGTCCTAACATCATAGATGATCC TCCTTCTCGCACAGTAATACACGGCCGTG TCTGCAGGGTCAACAGAGCTCAG	經寡核苷酸等合成的 hum12B4VHv1D 引子 。反股互補 DNA 序列 12B4VHv1。固定區 (307,427)加入接合供體+ BamHI 位點至 3' 端。
4889	22	Yes	gag att aag ctt gcc acc A	序列確認號碼：20
4890	21	No	AGG AGC TGT GGA GAC TGC CCT	序列確認號碼：21
				hum 12B4VLv1 , A+B bak 引子 %A+T = 38.10[8] ; %C+G = 54.55[12] Davis,Botstein,Roth 熔點溫度 64.54°C
				序列確認號碼：22

(98)

4891	20	Yes	TGC AGA AGC CAG GGC AGT CT	hum 12B4VLv1 , C+D 。 引子 %A+T = 40.00[8] ; %C+G = 60.00[12] Davis,Bottstein,Roth 熔點溫度 64.50°C
			序列 單認號碼 : 23	
4892	28	No	tga tat gga tcc act cac GTT TGA TCT C	hum 12B4VLv1 , C+D bak 引子 %A+T = 57.14[16] ; %C+G = 42.86[12] Davis,Bottstein,Roth 熔點溫度 64.61°C
			序列 單認號碼 : 24	
4893	23	Yes	gag ata aag ctt gcc gcc acc AT	hum 12B4VHv1 , A+B 引子 %A+T = 47.83[11] ; %C+G = 52.17[12] Davis,Bottstein,Roth 熔點溫度 64.55°C
			序列 單認號碼 : 25	
4894	24	No	TCC TCA TCC CAA TAG ATG TGT GCC	hum 12B4VHv1 , A+B bak 引子 %A+T = 50.00 [12] ; %C+G = 50.00[12] Davis,Bottstein,Roth 熔點溫度 64.57°C
			序列 單認號碼 : 26	
4895	22	Yes	GTG GCT GGC ACA CAT CTA TTT G	hum 12B4VHv1 , C+D 引子 %A+T = 45.45[10] ; %C+G = 54.55[12] Davis,Bottstein,Roth 熔點溫度 64.54°C
			序列 單認號碼 : 27	
4896	24	No	tca tat gga tcc act cac CTG AGG	hum 12B4VHv1 , C+D 引子 %A+T = 50.00[12] ; %C+G = 50.00[12] Davis, Bottstein, Roth 熔點溫度 64.57°C
			序列 單認號碼 : 28	

(99)

使用標準方法，在分離反應管中將等莫耳比之 VH_{v1A}+VH_{v1B} 以及 VH_{v1C}+VH_{v1D} 的合成片段成對的徐徐冷卻。在 60°C 下使用 PCRA+B 正向以及 A+B 逆向引子徐徐冷卻 25 週期，組裝 A+B 徐冷反應。同樣地，使用 PCRC+D 正向以及 C+D 逆向引子在相同條件下組裝 C+D 徐冷反應。PCR 組裝的 5'A+B 半部，以及 3'C+D 半部，用凝膠純化後進行最終 PCR-調節的組裝。混合 V-區域 A+B 組裝的 5'半部份與 C+D 的 3'半部份、徐冷，以及使用 VH_{v1A}+B 正向引子以及 VH_{v1C}+D 反向引子用 PCR 延伸，完成完整的 V 區域之組裝。以此方法組裝的全長 VH 及 VL 區域用凝膠純化，以及選殖入 pCRScript 進行 DNA 序列鑑定。

人類化的 12B4VL 之核苷酸序列(版本 1)(序列確認號碼：5)以及 12B4VH(版本 1)(序列確認號碼：7)分別列於以下之表 12 以及 13。

表 12. 人類化的 12B4VL_{v1}核苷酸序列。

```

ATGAGGCTCCCTGCTCAGCTCCTGGGGCTGCTAATGCTCTGGGTCTCTGGATCCAGTGG
GGATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCT
CCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAACATTGTTCATAGTAATGGAAACACCTATTTGGAA
TGGTACCTGCAGAACGCCAGGGCAGTCTCACAGCTCCTGATCTACAAAGTTCCAACCG
ATTTCTGGGTCCCTGACAGGTTAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTACACTGA
AAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTATTACTGCTTCAAGGTTCACAT
GTTCCGCTCACGTTGGTCAGGGACCAAGCTGGAGATCAAAC

```

(100)

表 13. 人類化的 12B4 VH₁ 核苷酸序列

ATGAAGCACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTCCCTGTCCCCA
 GGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCCTGTCCCTCA
 CCTGCACCTTCTCTGGTTTCCCTGAGCACTAATGGTATGGGTGTGAGCTGGATCCGG
 CAGCCCCCAGGGAAAGGGACTGGAGTGGCTGGCACACATCTATTGGGATGAGGACAAGCG
 CTATAACCCATCCCTCAAGAGTCGACTCACCATCAAAGGACACGTCCAAGAACCGAG
 TATCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCCTGCAGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA
 AGGAGGATCATCTATGATGTTGAGGACTACTTGACTACTGGGCCAAGGGACCACGGT
 CACCGTCTCCTCAG

B. 人類化的 12B4 版本 2 抗體

第二版本之人類化的 12B4 與係對版本 1 作了以下之取代，除了在殘基 2 將 L 取代成 V 之外，在殘基 48 將 I 取代成 L，在殘基 49 將 G 取代成 A，在殘基 67 將 V 取代成 L 以及在殘基 78 將 F 取代成 V。人類化的 12B4 版本 2 輕鏈及重鏈之核苷酸序列分別為序列確認號碼：5 及 9。人類化的 12B4 版本 2 輕鏈及重鏈之胺基酸序列分別為序列確認號碼：6 及 10。

C. 人類化的 12B4 版本 3 抗體

第三版本之人類化的 12B4 與係對版本 1 作了以下之取代，除了在殘基 2 將 L 取代成 V 之外，在殘基 49 將 G 取代成 A 以及在殘基 67 將 V 取代成 L。人類化的 12B4 版本 3 輕鏈及重鏈之核苷酸序列分別為序列確認號碼：5 及 11。人類化的 12B4 版本 2 輕鏈及重鏈之胺基酸序列分別為序列確認號碼：6 及 12。

實施例 VI. 預防及治療人類病患

為了測定藥物對人類的安全性進行單一劑量的相 I 實驗。將增加劑量治療劑投用至不同病人。起始自約假定功效之 0.01 倍，以及增加三倍直到達成約小鼠有效劑量的 10

(101)

倍。

爲了測定治療的功效進行相 II 實驗。選擇具有早期中期阿茲海默氏症定義(使用阿茲海默氏症以及 AD 相關的病症相聯(ADRDA)標準)之病人。適當的病人分數介於 Mini-Mental State Exam(MMSE)12-26分之範圍。其它選擇標準爲病人於研究期間存活，以及例如同時使用可干擾藥物時無併發症。病患功能之基線評估係使用典型的精神計量，例如 MMSE、及 ADAS，其爲評估病人阿茲海默氏症狀態及功能的高等標度。此類精神標度提供老年痴呆症症狀進展的計量。適當的定性的生命標度亦可用監視治療。疾病進展亦可用 MRI 監測。亦可監測病人血液輪廓，包括測定抗原專一性抗體以及 T-細胞反應。

基線測定後，病人開始接受治療。彼係用盲目方式以治療劑或安慰劑隨機的處理。至少每六個月監測病人一次。相對於安慰劑群，測定治療群的功效顯示顯著降低治療群之疾病進展。

爲了評估病人從非阿茲海默氏症早期記憶流失，有時稱爲與年齡相關的記憶受損(AAMI)或輕微的認知的受損(MCI)轉化至可能的阿茲海默氏症(由 ADRDA 標準所定義)所以進行第二相 II 實驗。轉化成阿茲海默氏症之高風險病人，其係選自經篩選記憶流失早期症候或其它難以與前老年痴呆症的症候學相關的參考族群、阿茲海默氏症家族病史、基因的風險因子、年齡、性別、以及預測高風險阿茲海默氏症的其它特色之非臨床的族群。收集包括 MMSE

(102)

以及 ADAS 與其它為了評估更正常族群而設計的計測法，測定的適當基線分數。此類病患族群可分成適當的集團進行投服安慰劑及藥劑之測試。約六個月投藥間隔後觀測此類病患族群，以及觀察各病患之測試終點是否轉變成可能的阿茲海默氏症(由 ADRDA 標準加以定義)。

雖然前述的發明已為了清楚了解之目的加以詳細的描述，某些修飾明顯的屬於附加的申請專利範圍之範圍。所有引用之出版以及專利文件與本文出現之圖式以及序列表，全文在此并入參考文獻。

從前述的說明將明顯的知道本發明提供許多用途。例如，本發明提供使用任何說明如上之 $A\beta$ 抗體，治療、預防或診斷呈澱粉樣疾病，或製作以彼藥劑或診斷的組成物。

圖形簡述

圖 1A-B 描述小鼠 12B4、人類化的 12B4、Kabat ID 005036 以及種系 A19(X63397)抗體輕鏈胺基酸序列之校整。CDR 區域係點狀化以及頂線化。人類至小鼠的單一返回突變殘基是用星號顯示。重要的陰影化殘基展示於圖片說明。編號係自第一個甲硫胺酸起算，而非使用 Kabat 計數法。

圖 2A-B 描述小鼠 12B4、人類化的 12B4(版本 1)、Kabat ID 000333 以及種系 VH4-39 以及 VH4-61 抗體重鏈胺基酸序列之校整。註解與圖 1 相同。數目起算自第一個甲硫胺酸，而非使用 Kabat 計數法。

(103)

圖 3A-D 係比較人類化的 12B4 VL v1 核苷酸以及胺基酸序列與鼠科動物及人類序列。

圖 4A-D 係比較人類化的 12B4 VH v1 核苷酸以及胺基酸序列與鼠科動物及人類序列。

圖 5 以圖形描述二種非依存型實驗測量嵌合型 12B4、3D6、及嵌合型 3D6 結合至 $A\beta$ 之 ELISA 的結果。其分別為板 A 及 B。

圖 6 以圖形描述競爭型 ELISA 結合，在與 3D6、嵌合型 3D6、及 10D5 相較下證實 12B4 及嵌合型 12B4 的功能活性。嵌合型 12B4(空心三角型)與其非生物素化的鼠科動物對應部份(空心倒置的三角型)在與生物素化的鼠科動物 12B 結合至 $A\beta$ 1-42 肽的競爭上有相等效用。

圖 7 之圖形係說明以體外的吞噬作用檢測法測試在 PDAPP 腦切片中嵌合型 12B4、3D6、及人類 IgG1 中介微神經膠質細胞攝入 $A\beta$ 之能力。

圖 8A-B 以圖形說明測試在 AD 腦切片中嵌合型 12B4、人類化 3D6 及人類 IgG1 媒介微神經膠質細胞攝入 $A\beta$ 的能力之兩個非依存性的體外吞噬作用檢測法之結果。

圖 9 之圖式呈現經 PCR-調節的人類化 12B4(版本 1)之組裝。圖 9A 描述 VL 區域之組裝，圖 9B 描述 VH 區域之組裝。

序列表

<110>艾倫法瑪國際有限公司

衛斯公司

<120>能辨識 β -澱粉樣蛋白肽之人類化抗體

<140>TW 092105368

<141>2003-03-12

<150>US 60/363,751

<151>2002-03-12

<160>28

<170>FASTSEQ 視窗版本 4.0

<210>1

<211>393

<212>DNA

<213>家鼠

<400>1

```

atgaagttgc ctgttaggct gttggtgctg atgttctggta ttcctgcttc cagcagtgtat 60
gttttcatgttcc cccaaactcc actctccctg cctgtcagtc ttggagatca agcctccatc 120
tcttcagat ctatgtcagaa cattgttcat agtaatggaa acaccttattt agaatggtac 180
ctgcagaaac caggccagtc tccaaagctc ctgatctaca aagtttccaa ccgatttct 240
ggggtcccag acaggttcag tggcagtgga tcagggacag atttcacact caagatcagc 300
agagtggagg ctgaggatct gggagtttat tactgcttcc aagggttcaca tggtccgctc 360
acgttcggtg ctgggaccaa gctggagctg aaa
                                         393

```

<210>2

<211>393

<212>DNA

<213>家鼠

<220>

<221>CDS

<222>(1)… … (393)

<400>2

atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct gct	48
Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Met Phe Trp Ile Pro Ala	
1 5 10 15	
tcc agc agt gat gtt ttg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc	96
Ser Ser Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val	
20 25 30	
..	
agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag aac att	144
Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile	
35 40 45	
gtt cat agt aat gga aac acc tat tta gaa tgg tac ctg cag aaa cca	192
Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro	
50 55 60	
ggc cag tct cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct	240
Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser	
65 70 75 80	
ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca	288
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr	
85 90 95	
ctc aag atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat tac tgc	336
Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys	
100 105 110	
ttt caa ggt tca cat gtt ccg ctc acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg	384
Phe Gln Gly Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu	
115 120 125	
..	
gag ctg aaa	393
Glu Leu Lys	
130	

<210>3

<211>426

<212>DNA

<213>家 鼠

<400>3

atggacaggc ttacttcctc attcctgctg ctgattgtcc ctgcataatgt cctgtcccaag 60
 gttactctga aagagtctgg ccctgggata ttgcagccct cccagaccct cagtctgact 120
 tggctttct ctgggttttc actgagact aatggtatgg gtgtgagctg gattcgtcaag 180
 cttcaggaa agggcttggaa gtggctggca cacattact gggatgagga caagcgctat 240
 aacccatccc tgaagagccg gtcacaatc tccaaggata cctctaacaa tcaggtattc 300
 ctcagatca ccaatgtggaa cactgctgat actgccacat actactgtgc tgcaggagg 360
 atcatctatg atgttgagga ctactttgac tactggggcc aaggcaccac tctcacagtc 420
 tcctca 426

<210>4

<211>426

<212>DNA

<213>家鼠

<220>

<221>CDS

<222>(1)…(426)

<400>4

atg gac agg ctt act tcc tca ttc ctg ctg ctg att gtc cct gca tat Met Asp Arg Leu Thr Ser Ser Phe Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr	48
1 5 10 15	
gtc ctg tcc cag gtt act ctg aaa gag tct ggc cct ggg ata ttg cag Val Leu Ser Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln	96
20 25 30	
ccc tcc cag acc ctc agt ctg act tgt tct ttc tct ggg ttt tca ctg Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu	144
35 40 45	
agc act aat ggt atg ggt gtg agc tgg att cgt cag cct tca gga aag Ser Thr Asn Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys	192
50 55 60	
ggt ctg gag tgg ctg gca cac att tac tgg gat gag gac aag cgc tat Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Glu Asp Lys Arg Tyr	240
65 70 75 80	
aac cca tcc ctg aag agc cgg ctc aca atc tcc aag gat acc tct aac Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Asn	288
85 90 95	
aat cag gta ttc ctc aag atc acc aat gtg gac act gct gat act gcc Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Thr Asn Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala	336
100 105 110	
aca tac tac tgt gct cga agg agg atc atc tat gat gtt gag gac tac Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Ile Ile Tyr Asp Val Glu Asp Tyr	384
115 120 125	
ttt gac tac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc tca Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser	426
130 135 140	

<210>5

<211>396

<212>DNA

<213>人造序列

<220>

<223>人類化12B4VLv1

<400>5

```

atgaggctcc ctgctcagct cctggggctg ctaatgcctc gggctctgg atccagtggg 60
gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggccctcc 120
atctcctgca ggtctagtc gaacattgtt catagtaatg gaaacaccta ttggaaatgg 180
tacctgcaga agccaggcgtc gtctccacag ctccatgtatc acaaagtttc caaccgattt 240
tctgggggtcc ctgacaggtt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc 300
agcagagtgg aggctgagga tgttgggggtt tattactgtt ttcaagggttc acatgttccg 360
ctcacgttcg gtcaggggac caaqctaaaaa atcaaa
                                         396

```

<210>6

<211>396

<212>DNA

<213>人造序列

<220>

<221>CDS

<222>(1)…(396)

<223>人類化12B4VHv1

<400>6

```

atg agg ctc cct gct cag ctc ctg ggg ctg cta atg ctc tgg gtc tct      48
Met Arg Leu Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp Val Ser
 1           5           10          15

gga tcc agt ggg gat gtt gtg atg act cag tct cca ctc tcc ctg ccc      96
Gly Ser Ser Gly Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro
 20          25          30

gtc acc cct gga gag ccg gcc tcc atc tcc tgc agg tct agt cag aac     144
Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn
 35          40          45

att gtt cat agt aat gga aac acc tat ttg gaa tgg tac ctg cag aag     192
Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys
 50          55          60

```

cca	ggg	cag	tct	cca	cag	ctc	ctg	atc	tac	aaa	gtt	tcc	aac	cga	ttt		240
Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe		
65				70					75				80				
tct	ggg	gtc	cct	gac	agg	ttc	agt	ggc	agt	gga	tca	ggc	aca	gat	ttt		288
Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe		
85				90				95									
aca	ctg	aaa	atc	agc	aga	gtg	gag	gct	gag	gat	gtt	ggg	gtt	tat	tac		336
Thr	Leu	Lys	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr		
100					105						110						
tgc	ttt	caa	ggt	tca	cat	gtt	ccg	ctc	acg	ttc	ggt	cag	ggg	acc	aag		384
Cys	Phe	Gln	Gly	Ser	His	Val	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys		
115					120					125							
ctg	gag	atc	aaa														396
Leu	Glu	Ile	Lys														
130																	

<210>7

<211>426

<212>DNA

<213>人造序列

<220>

<223>人類化12B4VLv1

<400>7

```

atgaaggcacc tgggttctt ctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt cctgtcccag 60
gtgcagctgc aggagtcggg cccaggactg gtgaagcctt cggagacccct gtccttcacc 120
tgcactttct ctgggttttc cctgagact aatggatgg gtgtgagctg gatccggcag 180
ccccccaggga agggactgga gtggctggca cacatctatt gggatgagga caagcgctat 240
aacccatccc tcaagagtcg actcaccata tcaaaggaca cgtccaaagaa ccaggtatcc 300
ctgaagctga gctctgtgac cgctgcagac acggccgtgt attactgtgc gagaaggagg 360
atcatctatg atgttgagga ctactttgac tactggggcc aagggaccac ggtcaccgtc 420
tcctca
```

426

<210>8

<211>426

<212>DNA

<213>人造序列

<220>

<221>CDS

<222>(1)… … (426)

<223>人類化12B4VHv1

<400>8

atg aag cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gca gct ccc aga tgg	48
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp	
1 5 10 15	
.. gtc ctg tcc cag gtg cag ctg cag gag tcg ggc cca gga ctg gtg aag	96
Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys	
20 25 30	
cct tcg gag acc ctg tcc ctc acc tgc act ttc tct ggt ttt tcc ctg	144
Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu	
35 40 45	
.. agc act aat ggt atg ggt gtg agc tgg atc cgg cag ccc cca ggg aag	192
Ser Thr Asn Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys	
50 55 60	
gga ctg gag tgg ctg gca cac atc tat tgg gat gag gac aag cgc tat	240
Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Glu Asp Lys Arg Tyr	
65 70 75 80	
aac cca tcc ctc aag agt cga ctc acc ata tca aag gac acg tcc aag	268
Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys	
85 90 95	
aac cag gta tcc ctg aag ctg agc tct gtg acc gct gca gac acg gcc	336
Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala	
100 105 110	
.. gtg tat tac tgt gcg aga agg agg atc atc tat gat gtt gag gac tac	384
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Ile Ile Tyr Asp Val Glu Asp Tyr	
115 120 125	
ttt gac tac tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca	426
Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	
130 135 140	

<210>9

<211>426

<212>DNA

<213>人造序列

<220>

<223>人類化12B4VHv2

<400>9

atgaaggcacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt cctgtcccag 60
 ctgcagctgc aggagtccggg cccaggactg gtgaagcctt cggagacccct gtccctcacc 120
 tgcactttct ctggtttttc cctgagact aatggtatgg gtgtgagctg gatccggcag 180
 cccccaggaa agggactgga gtggattggg cacatctatt gggatgagga caagcgctat 240
 aaccctatccc tcaagagtcg agtcaccata tcaaaggaca cgtccaagaa ccagttctcc 300
 ctgaagctga gctctgtgac cgctgcagac acggccgtgt attactgtgc gagaaggagg 360
 atcatctatg atggtgagga ctacttttag tactggggcc aagggaccac ggtcaccgtc 420
 tcctca 426

<210>10

<211>426

<212>DNA

<213>人造序列

<220>

<223>人類化12B4VHv2

<220>

<221>CDS

<222>(1)…(426)

<400>10

atg aag cac ctg tgg ttc ctc ctg ctg gtg gca gct ccc aga tgg	48
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp	
1 5 10 15	

gtc ctg tcc cag ctg cag gag tcg ggc cca gga ctg gtg aag	96
Val Leu Ser Gln Leu Gln Leu Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys	
20 25 30	

cct tcg gag acc ctg tcc ctc acc tgc act ttc tct ggt ttt tcc ctg	144
Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu	
35 40 45	

agc act aat ggt atg ggt gtg agc tgg atc cgg cag ccc cca ggg aag	192
Ser Thr Asn Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys	
50 55 60	

gga ctg gag tgg att ggg cac atc tat tgg gat gag gac aag cgc tat	240
Gly Leu Glu Trp Ile Gly His Ile Tyr Trp Asp Glu Asp Lys Arg Tyr	
65 70 75 80	

aac cca tcc ctc aag agt cga gtc acc ata tca aag gac acg tcc aag	288
Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys	
85 90 95	

aac cag ttc tcc ctg aag ctg agc tct gtg acc gct gca gac acg gcc	336
Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala	
100 105 110	

gtg tat tac tgt gcg aga agg agg atc atc tat gat gtt gag gac tac 384
 Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Ile Ile Tyr Asp Val Glu Asp Tyr
 115 120 125

ttt gac tac tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca 426
 Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140

<210>11

<211>426

<212>DNA

<213>人造序列

<220>

<223>人類化12B4VHv3

<400>11

atgaaggcacc tgtggttctt cctcctgtg gtggcagctc ccagatgggt cctgtcccag 60
 ctgcagctgc aggagtcggg cccaggactg gtgaagcctt cggagaccct gtccctcacc 120
 tgcactttct ctgggttttc cctgagact aatggtatgg gtgtgagctg gatccggcag 180
 cccccaggga agggactgga gtggctgggg cacatctatt gggatgagga caagcgctat 240
 aacccatccc tcaagagtcg agtcaccata tcaaaggaca cgtccaagaa ccaggtatcc 300
 ctgaagctga gctctgtgac cgctgcagac acggccgtgt attactgtgc gagaaggagg 360
 atcatctatg atgttgagga ctactttgac tactggggcc aagggaccac ggtcaccgtc 420
 tcctca 426

<210>12

<211>426

<212>DNA

<213>人造序列

<220>

<223>人類化12B4VHv3

<220>

<221>CDS

<222>(1) · · · (426)

<400>12

atg aag cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gca gct ccc aga tgg Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp	48
1 5 10 15	
gtc ctg tcc cag ctg cag ctg cag gag tcg ggc cca gga ctg gtg aag Val Leu Ser Gln Leu Gln Leu Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys	96
20 25 30	
cct tcg gag acc ctg tcc acc tgc act ttc tct ggt ttt tcc ctg Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu	144
35 40 45	
agc act aat ggt atg ggt gtg agc tgg atc cgg cag ccc cca ggg aag Ser Thr Asn Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys	192
50 55 60	
gga ctg gag tgg ctg ggg cac atc tat tgg gat gag gac aag cgc tat Gly Leu Glu Trp Leu Gly His Ile Tyr Trp Asp Glu Asp Lys Arg Tyr	240
65 70 75 80	
aac cca tcc ctc aag agt cga gtc acc ata tca aag gac acg tcc aag Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys	288
85 90 95	
aac cag gta tcc ctg aag ctg agc tct gtg acc gct gca gac acg gcc Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala	336
100 105 110	
gtg tat tac tgt gcg aga agg agg atc atc tat gat gtt gag gac tac Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Arg Ile Ile Tyr Asp Val Glu Asp Tyr	384
115 120 125	
ttt gac tac tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	426
130 135 140	

<210>13

<211>135

<212>DNA

<213>人造序列

<220>

<223>引子

<400>13

gagattaagg ttggccgccac catgagggttc cctgctcagc tcctggggct gctaattgttc 60
 tgggtctctg gatccagtgg ggatgttgtg atgactcagt ctccactctc cctgcccgtc 120
 accccctggag agccg 135

<210>14

<211>131

<212>DNA

<213>人造序列

<220>

<223>引子

<400>14

```

aggagctgtg gagactgccc tggcttctgc aggtaccatt ccaaataagg 60
ctatgaacaa tggctctgact agacctgcag gagatggagg ccggctctcc aggggtgacg 120
ggcagggaga g 131

```

<210>15

<211>132

<212>DNA

<213>人造序列

<220>

<223>引子

<400>15

```

tgcagaagcc agggcagtct ccacagctcc tgatctacaa agtttccaac cgattttctg 60
gggtccctga caggttcagt ggcagtggat caggcacaga ttttacactg aaaatcagca 120
gagtggaggc tg 132

```

<210>16

<211>130

<212>DNA

<213>人造序列

<220>

<223>引子

<400>16

tgatatggat ccactcacgt ttgatctcca gcttggtccc ctgaccgaac gtgagcggaa 60
 catgtgaacc ttgaaaaggcag taataaacc cAACATCCTC agcctccact ctgctgattt 120
 tcagtgtaaa 130

<210>17

<211>143

<212>DNA

<213>人造序列

<220>

<223>引子

<400>17

gagataaaagc ttgccccac catgaagcac ctgtggttct tcctcctgct ggtggcagct 60
 cccagatggg tcctgtccca ggtgcagctg caggagtcgg gcccaggact ggtgaaggct 120
 tcggagaccc tgcctcac ctg 143

<210>18

<211>137

<212>DNA

<213>人造序列

<220>

<223>引子

<400>18

tcctcatccc aatagatgtg tgccagccac tccagtcct tcctggggg ctgccggatc 60
 cagctcacac ccataccatt agtgctcagg gaaaaaccag agaaagtgcg ggtgagggac 120
 agggtctccg aaggctt 137

<210>19

<211>138

<212>DNA

<213>人造序列

<220>

<223>引子

<400>19

```
gtggctggca cacatctatt gggatgagga caagcgctat aaccatccc tcaagagtgc 60
actcaccata tcaaaggaca cgtccaagaa ccaggtatcc ctgaagctga gctctgtgac 120
cgctgcagac acggccgt                                         138
```

<210>20

<211>139

<212>DNA

<213>人造序列

<220>

<223>引子

<400>20

```
tcatatggat ccactcacct gaggagacgg tgaccgtggc cccttggccc cagtagtcaa 60
agttagtcctc aacatcatag atgatcctcc ttctcgcaca gtaatacacg gccgtgtctg 120
cagcggtcac agagctcag                                         139
```

<210>21

<211>22

<212>DNA

<213>人造序列

<220>

<223>引子

<400>21

```
gagattaagc ttgccgccac ca
```

22

<210>22

<211>21

<212>DNA

<213>人造序列

<220>

<223>引子

<400>22

aggagctgtg gagactgccc t

21

<210>23

<211>20

<212>DNA

<213>人造序列

<220>

<223>引子

<400>23

tgcagaagcc agggcagtct

20

<210>24

<211>28

<212>DNA

<213>人造序列

<220>

<223>引子

<400>24

tgatatggat ccactcacgt ttgatctc

28

<210>25

<211>23

<212>DNA

<213>人造序列

<220>

<223>引子

<400>25

gagataaaagc ttgcggccac cat

23

<210>26

<211>24

<212>DNA

<213>人造序列

<220>

<223>引子

<400>26

tcctcatccc aatagatgtg tgcc

24

<210>27

<211>22

<212>DNA

<213>人造序列

<220>

<223>引子

<400>27

gtggctggca cacatctatt gg

22

<210>28

<211>24

<212>DNA

<213>人造序列

I328116

<220>

<223> 弓 子

<400> 28

tcatatggat ccactcacct gagg

24

肆、中文發明摘要

發明之名稱：能辨識 β -澱粉樣蛋白肽之人類化抗體

本發明提供一種改良的藥劑和方法以治療與病患腦部 $A\beta$ 澱粉樣蛋白沈澱物相關的疾病。較佳的藥劑包括人類化的抗體。

伍、英文發明摘要

發明之名稱：

Humanized antibodies that recognize beta amyloid peptide

The invention provides improved agents and methods for treatment of diseases associated with amyloid deposits of A β in the brain of a patient. Preferred agents include humanized antibodies.

公告本
(1)

拾、申請專利範圍

1. 一種人類化 12B4 抗體或其抗原結合片段，其包含人類化輕鏈變異區和人類化重鏈變異區，該人類化輕鏈變異區包含序列確認號碼：2 的 3 個輕鏈互補決定區域(CDR)且該人類化重鏈變異區包含序列確認號碼：4 的 3 個重鏈 CDR，該人類化 12B4 抗體或其抗原結合片段結合 β 澱粉樣蛋白(A β)的殘基 3-7 之抗原決定部位。

2. 如申請專利範圍第 1 項之人類化抗體或其抗原結合片段，其中該人類化輕鏈變異區架構與源自 Kabat 編號 005036 之人類抗體輕鏈的人類輕鏈變異區架構具有至少 85% 之序列同一性。

Kabat 編號 005036

```
DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHRYGNYLDWYLQKP
GQSPQLLIYLGSNRASGVPDFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV
YYCMQALQTPYTFGQGTKLEIK
```

3. 如申請專利範圍第 1 項之人類化抗體或其抗原結合片段，其中該人類化重鏈變異區架構與源自 Kabat 編號 000333 之人類抗體重鏈的人類重鏈變異區架構具有至少 85% 之序列同一性。

Kabat 編號 000333

```
QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSISRGSHYWGWRQPPGK
GLEWIGSIYYSGNTYFNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSSVTAA
DTAVYYCARLGPDDYTLDGMDVVGQGTIVTVSS
```

(2)

4. 如申請專利範圍第 1 項之人類化抗體或其抗原結合片段，其包含人類化重鏈和人類化輕鏈，其中

(a) 該人類化輕鏈包含 3 個具有源自命名為序列確認號碼：2 之小鼠 12B4 免疫球蛋白輕鏈變異結構區之對應 CDR 的胺基酸序列之 CDR (CDR1、CDR2 及 CDR3) 及 1 個源自人類輕鏈變異區架構序列之變異區架構，唯其依據 Kabat 編號規則，該變異區架構內之 L2 係被存在於小鼠 12B4 免疫球蛋白輕鏈變異區架構之對等位置上的相同胺基酸殘基占據；且

(b) 該人類化重鏈包含 3 個具有源自命名為序列確認號碼：4 之小鼠 12B4 免疫球蛋白重鏈變異結構區之對應 CDR 的胺基酸序列之 CDR (CDR1、CDR2 及 CDR3) 及 1 個源自人類重鏈變異區架構序列之變異區架構，唯其依據 Kabat 編號規則，該變異區架構內之至少 1 個選自 H2、H24、H27、H29、H48、H49、H67、H71 或 H78 之位置係被存在於小鼠 12B4 免疫球蛋白重鏈變異區架構之對等位置上的相同胺基酸殘基占據；且

其中該人類化抗體或其抗原結合片段係以至少 10^7 M^{-1} 之結合親和力專一性結合 β 澱粉樣蛋白 ($A\beta$)。

5. 如申請專利範圍第 4 項之人類化抗體或其抗原結合片段，其中依據 Kabat 編號規則，該人類化輕鏈變異區架構位置 L2 係被 V 占據。

(3)

6. 如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之人類化抗體或其抗原結合片段，其中依據 Kabat 編號規則，該人類化重鏈變異區架構位置 H2、H24、H27、H29、H48、H49、H67、H71 及 H78 係分別被 V、F、F、L、L、A、L、K 及 V 占據。

7. 如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之人類化抗體或其抗原結合片段，其中依據 Kabat 編號規則，該人類化重鏈變異區架構位置 H24、H27、H29 及 H71 係分別被 F、F、L 及 K 占據。

8. 如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之人類化抗體或其抗原結合片段，其中依據 Kabat 編號規則，該人類化重鏈變異區架構位置 H24、H27、H29、H48、H71 及 H78 係分別被 F、F、L、L、K 及 V 占據。

9. 如申請專利範圍第 1 項之人類化抗體或其抗原結合片段，其中該人類化重鏈變異區具有序列確認號碼：8 的胺基酸序列且該人類化輕鏈變異區具有序列確認號碼：6 的胺基酸序列。

10. 如申請專利範圍第 1 項之人類化抗體或其抗原結合片段，其中該人類化重鏈變異區具有序列確認號碼：10 的胺基酸序列且該人類化輕鏈變異區具有序列確認號碼：6 的胺基酸序列。

11. 如申請專利範圍第 1 項之人類化抗體或其抗原結合片段，其中該人類化重鏈變異區具有序列確認號碼：12 的胺基酸序列且該人類化輕鏈變異區具有序列確認號碼：

(4)

6 的胺基酸序列。

12. 如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之人類化抗體或其抗原結合片段，其中該重鏈同型為 $\gamma 1$ 。

13. 如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之人類化抗體或其抗原結合片段，其結合可溶性 β 澱粉樣蛋白 ($A\beta$)。

14. 如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之人類化抗體或其抗原結合片段，其結合聚集的 β 澱粉樣蛋白 ($A\beta$)。

15. 如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之人類化抗體或其抗原結合片段，其媒介 β 澱粉樣蛋白 ($A\beta$) 之吞噬作用。

16. 如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之人類化抗體或其抗原結合片段，其跨越個體之血腦屏障。

17. 如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之人類化抗體或其抗原結合片段，其降低個體之 β 澱粉樣蛋白 ($A\beta$) 斑量。

18. 一種醫藥組成物，其包含如申請專利範圍第 1 至 12 項中任一項之人類化抗體或其抗原結合片段及藥學載體。

19. 一種嵌合型 12B4 抗體或其抗原結合片段，其中 12B4 係一種特徵為含有序列確認號碼：2 之輕鏈變異區及序列確認號碼：4 之重鏈變異區的小鼠抗體。

20. 一種經分離之核酸，其編碼如申請專利範圍第 1

(5)

至 11 項中任一項之人類化重鏈變異區。

21. 一種經分離之核酸，其編碼如申請專利範圍第 1 至 11 項中任一項之人類化輕鏈變異區。

22. 一種經分離之核酸，其分別編碼如申請專利範圍第 1 至 11 項中任一項之人類化重鏈變異區及如申請專利範圍第 1 至 11 項中任一項之人類化輕鏈變異區。

23. 一種載體，其包含如申請專利範圍第 20 至 22 項中任一項之核酸。

24. 一種宿主細胞，其包含如申請專利範圍第 23 項之載體。

25. 一種產製人類化抗體或其抗原結合片段之方法，其包含於致使該抗體或其抗原結合片段產製之條件下培養如申請專利範圍第 24 項之宿主細胞，及自該宿主細胞或培養物分離該抗體或其抗原結合片段。

26. 一種一核酸分子和另一核酸分子於製備供治療哺乳動物之呈澱粉樣疾病的藥物上之用途，該核酸分子編碼包含序列確認號碼：6 之胺基酸序列的免疫球蛋白輕鏈且該另一核酸分子編碼包含選自序列確認號碼：8、序列確認號碼：10 或序列確認號碼：12 之胺基酸序列的免疫球蛋白重鏈，且該等核酸分子係於表現該等免疫球蛋白鏈之條件下供製備藥物。

27. 一種如申請專利範圍第 1 至 12 項中任一項之人類化抗體或其抗原結合片段於製備供預防或治療與 β 澱粉樣蛋白肽有關之呈澱粉樣疾病的藥物上之用途。

(6)

28. 一種如申請專利範圍第 1 至 12 項中任一項之人類化抗體或其抗原結合片段於製備供預防或治療與病患腦部 A_β 濘粉樣蛋白沈澱相關之疾病的藥物上之用途。

29. 如申請專利範圍第 27 或 28 項之用途，其中該疾病是阿茲海默氏症。

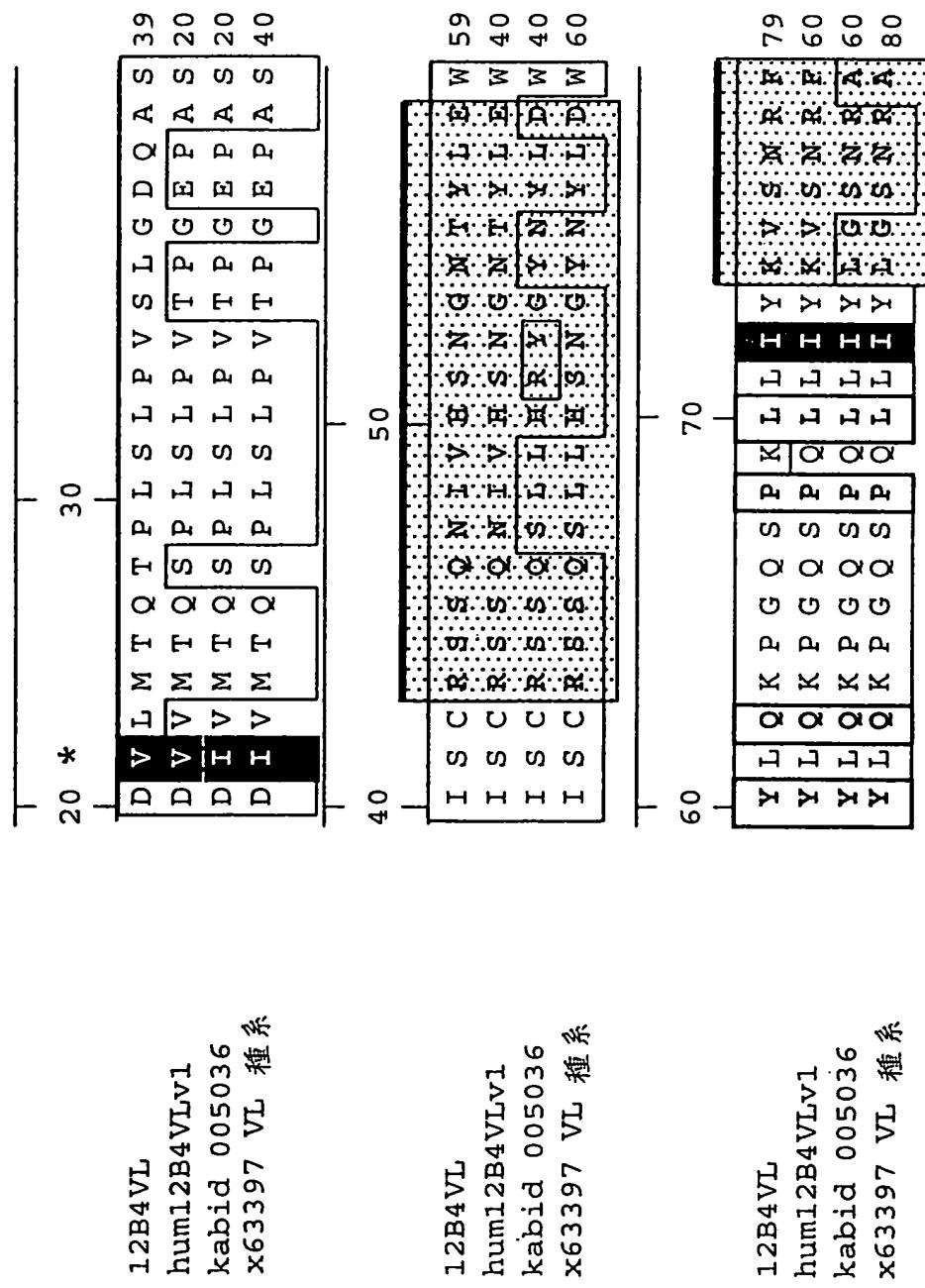
30. 如申請專利範圍第 27 或 28 項之用途，其中劑量係介於 0.01 至 5 毫克 / 公斤體重。

31. 如申請專利範圍第 30 項之用途，其中劑量係 1 毫克 / 公斤體重。

I328116

公告本

840406



* 人類至小鼠
殘基單一的返回突變
裝飾：塊內殘基正確切符合
12B4VH

圖 1A

I328116

12B4VL			
hum12B4VLv1			
kabid 005036			
x63397 VL 種系			

80	90	
		標準的 / CDR
12B4VL		
hum12B4VLv1		
kabid 005036		
x63397 VL 種系		
80	90	
		標準的 / CDR
12B4VL		
hum12B4VLv1		
kabid 005036		
x63397 VL 種系		
100	110	
		CDR 區域
S R V E A E D L G V Y C F Q G S H Y P 119		
S R V E A E D V G V Y C F Q G H Y P 100		
S R V E A E D V G V Y C M Q A L Q T P 100		
S R V E A E D V G V Y C M Q A L Q T P 120		
100	110	
		CDR 區域
S R V E A E D L G V Y C F Q G S H Y P 119		
S R V E A E D V G V Y C F Q G H Y P 100		
S R V E A E D V G V Y C M Q A L Q T P 100		
S R V E A E D V G V Y C M Q A L Q T P 120		
100	110	
		CDR 區域
F F G A G T K L E L K 131		
F F G G T K L E I K 112		
F F G Q G T K L E I K 114		
F F G Q G T K L E I K R T 120		
120	130	
		* 人類至小鼠 殘基單一的返回突變
12B4VL		
hum12B4VLv1		
kabid 005036		
x63397 VL 種系		

裝飾：塊內殘基正確切符合
12B4VH

圖 1B

I328116

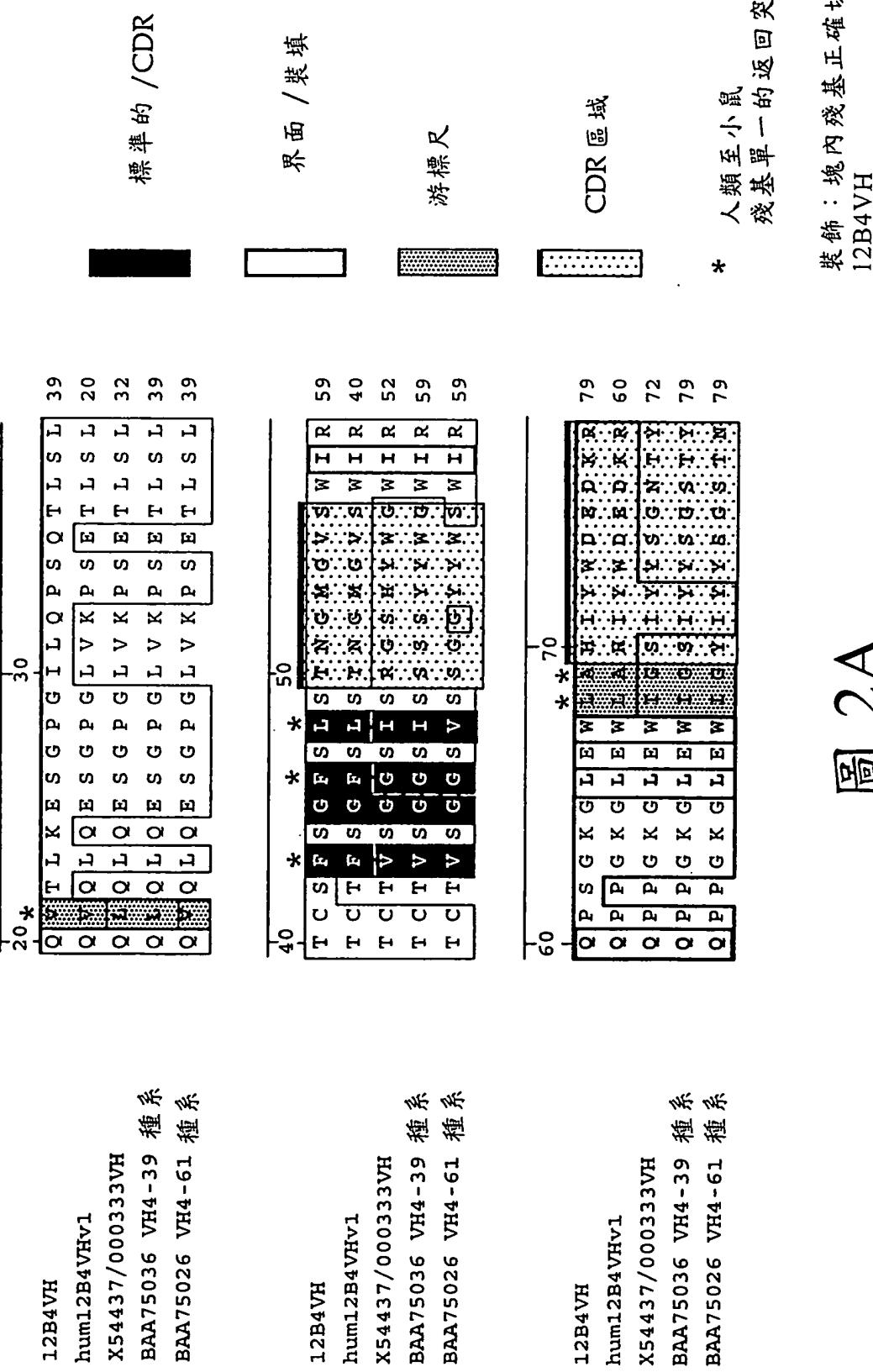


圖 2A

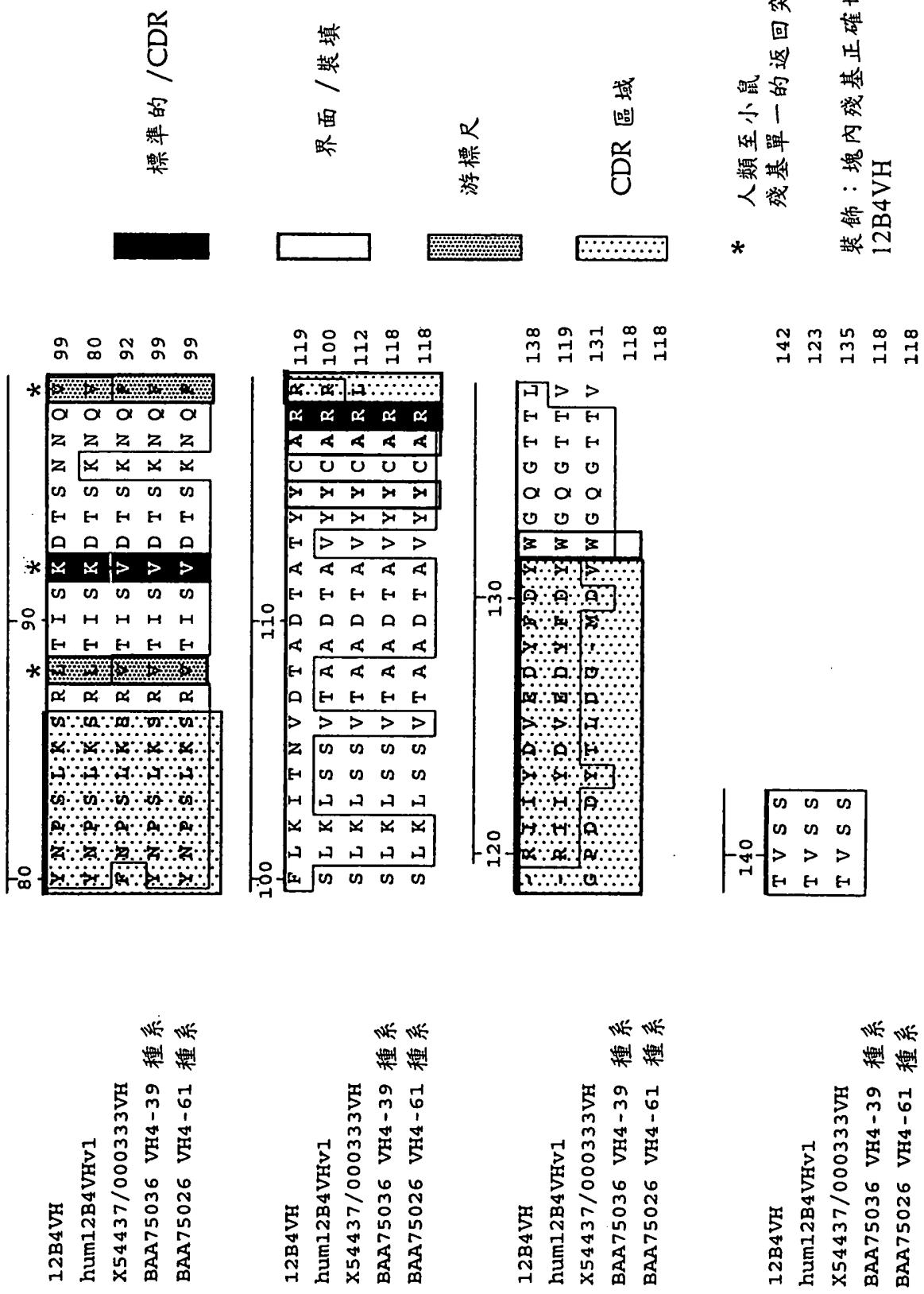


圖 2B

圖 3A

ch12B4VH
12B4VHv1
x63397 VL 種系
x67904 K005036 VL

M	K	L	P	V	R	L	L	-	V	L	M	F	W	I	P	A	S	S	S	85	
ATG	AAG	TTC	CCT	GTT	AGG	CTG	TTG	---	GTG	CTG	ATG	TTC	TGG	ATT	CCT	GCT	TCC	AGC	AGT	85	
M	R	L	P	A	Q	L	L	G	L	L	M	L	W	V	S	G	S	S	G	58	
ATG	AGG	CTC	CTC	GCT	CAG	CTG	CTG	GGG	CTG	CTG	CTA	ATG	CTC	TGG	GTC	TCT	GGA	TCC	AGT	GGG	58
M	R	L	P	A	Q	L	L	G	L	L	M	L	W	V	S	G	S	S	G	67	
ATG	AGG	CTC	CTC	GCT	CAG	CTG	CTG	GGG	CTG	CTG	CTA	ATG	CTC	TGG	GTC	TCT	GGA	TCC	AGT	GGG	67
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-2		

D	V	L	M	T	Q	T	P	L	S	L	P	V	S	L	G	D	Q	A	S	145
GAT	GTT	TTG	ATG	ACC	CAA	ACT	CCA	CTC	TCC	CTG	CCT	GTC	AGT	CTT	GGA	GAT	CAA	GCC	TCC	145
D	V	V	M	T	Q	S	P	L	S	L	P	V	T	P	G	E	P	A	S	118
GAT	GTT	GTG	ATG	ACT	CAG	TCT	CCA	CTC	TCC	CTG	CCC	GTC	ACC	CCT	GGA	GAG	CCG	GCC	TCC	118
D	I	V	M	T	Q	S	P	L	S	I	P	V	T	P	G	E	P	A	S	127
GAT	ATT	GTG	ATG	ACT	CAG	TCT	CCA	CTC	TCC	CTG	CCC	GTC	ACC	CCT	GGA	GAG	CCG	GCC	TCC	127
D	I	V	M	T	Q	S	P	L	S	L	P	V	T	P	G	E	P	A	S	58
GAT	ATT	GTG	ATG	ACT	CAG	TCT	CCA	CTC	TCC	CTG	CCC	GTC	ACC	CCT	GGA	GAG	CCG	GCC	TCC	58

3B
四

ch12B4VH

12B4VHv1

x63397 VL 種系

X67904 K005036 VL

ch12B4VH

12B4VHv1

x63397 VI 種子

Y67904 K005036 VII

圖 3C

ch12B4VH

12B4VHv1

x63397 VL 種系

x67904 K005036 VL

S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	325
TCT	GGG	GTC	CCA	GAC	AGG	TTC	AGT	GGC	AGT	GGG	ACA	GAT	TTC	ACA	CTC	AAG	ATC	325
S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	298
TCT	GGG	GTC	CCT	GAC	AGG	TTC	AGT	GGC	AGT	GGG	ACA	GAT	TTT	ACA	CTG	AAA	ATC	298
S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	307
TCC	GGG	GTC	CCT	GAC	AGG	TTC	AGT	GGC	AGT	GGG	ACA	GAT	TTT	ACA	CTG	AAA	ATC	307
S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	238
TCC	GGG	GTC	CCT	GAC	AGG	TTC	AGT	GGC	AGT	GGG	ACA	GAT	TTT	ACA	CTG	AAA	ATC	238

ch12B4VH
12B4VHv1
x63397 VL 種系
x67904 K005036 VL

S	R	V	E	A	E	D	L	G	V	Y	Y	C	F	Q	G	S	H	V	P	385
AGC	AGA	GTG	GAG	GCT	GAG	GAT	CTG	GGA	GTT	TAT	TAC	TGC	TTT	CAA	GGT	TCA	CAT	GTT	CCG	385
S	R	V	E	A	E	D	V	G	V	Y	Y	C	F	Q	G	S	H	V	P	358
AGC	AGA	GTG	GAG	GCT	GAG	GAT	GTT	GGG	GTT	TAT	TAC	TGC	TTT	CAA	GGT	TCA	CAT	GTT	CCG	358
S	R	V	E	A	E	D	V	G	V	Y	Y	C	M	Q	A	L	Q	T	P	367
AGC	AGA	GTG	GAG	GCT	GAG	GAT	GTT	GGG	GTT	TAT	TAC	TGC	ATG	CAA	GCT	CTA	CAA	ACT	CCT	367
S	R	V	E	A	E	D	V	G	V	Y	Y	C	M	Q	A	L	Q	T	P	298
AGC	AGA	GTG	GAG	GCT	GAG	GAT	GTT	GGG	GTT	TAT	TAC	TGC	ATG	CAA	GCT	CTA	CAA	ACT	CCG	298

圖 3D

370	L T F G A G T K L E L K H	424
	CTC ACG TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTC GAG CTG AAA C	424
	L T F G Q G T K L E I K H	397
	CTC ACG TTC GGT CAG GGG ACC AAG CTC GAG ATC AAA C	397
		367
		367
		298
		298

ch12B4VH

12B4VHv1

X63397 VL 種系

X67904 K005036 VL

裝飾：塊內殘基正確切符合 12B4VLv1

圖 4A

ch12B4VH

12B4VHv1

X54437 KAB000333 VH

BAA75026 VH4-61 種系

M	D	R	L	T	S	S	F	L	I	V	P	A	Y	V	L	S	Q	79		
ATG	GAC	AGG	CTT	ACT	TCC	TCA	TTC	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	GCA	TAT	GTC	CTG	CAG	79	
M	K	H	L	W	F	F	L	L	V	A	A	P	R	W	V	L	S	Q	58	
ATG	AAG	CAC	CTG	TGG	TTC	TTC	CTC	CTG	CTG	GCA	GCT	CCC	AGA	TGG	GTC	CTG	TCC	CAG	58	
-	-	-	-	-	-	-	-	L	L	V	A	A	P	R	W	V	L	Q	39	
---	---	---	---	---	---	---	---	CTC	CTG	CTG	GCG	GCT	CCC	AGA	TGG	GTC	CTG	TCC	36	
M	K	H	L	W	F	F	L	L	V	A	A	P	R	W	V	L	S	Q	58	
ATG	AAA	CAC	CTG	TGG	TTC	TTC	CTC	CTG	CTG	GCA	GCT	CCC	AGA	TGG	GTC	CTG	TCC	CAG	58	
V	T	T	L	K	E	S	G	P	G	I	L	Q	P	S	Q	T	L	S	139	
GTT	ACT	CTG	AAA	GAG	TCT	GGC	CCT	GGG	ATA	TTG	CAG	CCC	TCC	CAG	ACC	CTC	AGT	CTG	ACT	139
V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S	E	T	L	S	L	118	
GTG	CAG	CTG	CAG	GAG	TCG	GGC	CCA	GGA	CTG	GTG	AAG	CCT	TCG	GAG	ACC	CTG	TCC	CTC	ACC	118
L	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S	E	T	L	S	L	99	
CTG	CAG	CTG	CAG	GAG	TCG	GGC	CCA	GGA	CTG	GTG	AAG	CCT	TCG	GAG	ACC	CTG	TCC	CTC	ACC	99
V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S	E	T	L	S	L	118	
GTG	CAG	CTG	CAG	GAG	TCG	GGC	CCA	GGA	CTG	GTG	AAG	CCT	TCG	GAG	ACC	CTG	TCC	CTC	ACC	118

圖 4B

ch12B4VH	C S F S G F S L S T N G M G V S W I R Q	199
12B4VHV1	TGT TCT TTC TCT GGG TTT TCA CTG AGC ACT AAT GGT ATG GGT GTG AGC TGG ATT CGT CAG	199
X54437 KAB000333 VH	C T F S G F S L S T N G M G V S W I R Q	178
BAA75026 VH4-61 種系	TGC ACT TTC TCT GGT TTT TCC CTG AGC ACT AAT GGT ATG GGT GTG AGC TGG ATT CGG CAG	178
	C T V S G G S I S R G S H Y W G W I R Q	159
	TGC ACT GTC TCT GGT GGC TCC ATC AGC AGA GGT AGT CAC TAC TGG GGC TGG ATC CGG CAG	159
	C T V S G G S V S S G G Y Y W S W I R Q	178
	TGC ACT GTC TCT GGT GGC TCC GTC AGC AGT GGT TAC TAC TGG AGC TGG ATC CGG CAG	178
ch12B4VH	P S G K G L E W L A H I Y W D E D K R Y	259
12B4VHV1	CCT TCA GGA AAG GGT CTG GAG TGG CTG GCA CAC ATT TAC TGG GAT GAG GAC AAG CGC TAT	259
X54437 KAB000333 VH	P P G K G L E W L A H I Y W D E D K R Y	238
BAA75026 VH4-61 種系	CCC CCA GGG AAG GGA CTG GAG TGG CTG GCA CAC ATC TAT TGG GAT GAG GAC AAG CGC TAT	238
	P P G K G L E W I G S I Y Y S G N T Y F	219
	CCC CCA GGG AAG GGC CTG GAG TGG ATT GGG AGT ATC TAT TAT AGT GGG AAC ACC TAC TTT	219
	P P G K G L E W I G Y I Y S G S T N Y	238
	CCC CCA GGG AAG GGA CTG GAG TGG ATT GGG TAT ATC TAT TAC AGT GGG AGC ACC AAC TAC	238

4C

ch12B4VH

12B4VHv1

X54437 KAB000333 VH

BAA75026 VH4-61 種系

ch12B4VH

12B4VHV1

X54437 KAB0003333 VH

DAA/3020 VH4-0 | 程系

圖 4D

	400	430	439
ch12B4VH	I I Y D V E D Y F D Y W G O G T T L T T T V		
12B4VHv1	ATC ATC TAT GAT GTT GAG GAC TAC TTT GAC TAC TGG GGC CAA GGC ACC ACT CTC ACA GTC	439	
X54437 KAB000333 VH	I I Y D V E D Y F D Y W G Q G T T V T V	418	
BAA75026 VH4-61 種系	ATC ATC TAT GAT GTT GAG GAC TAC TTT GAC TAC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC	418	
	P D D Y T L D G M D V W G Q G T T V T V	399	
	CCT GAT GAC TAT ACC CTT GAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC	399	
		355	
ch12B4VH	S S D TCC TCA G	448	
12B4VHv1	S S D TCC TCA G	448	
X54437 KAB000333 VH	S S TCC TCA	427	
BAA75026 VH4-61 種系		427	
		405	
		355	
裝飾：塊內殘基正確切符合 12B4VHv1			

圖 5A

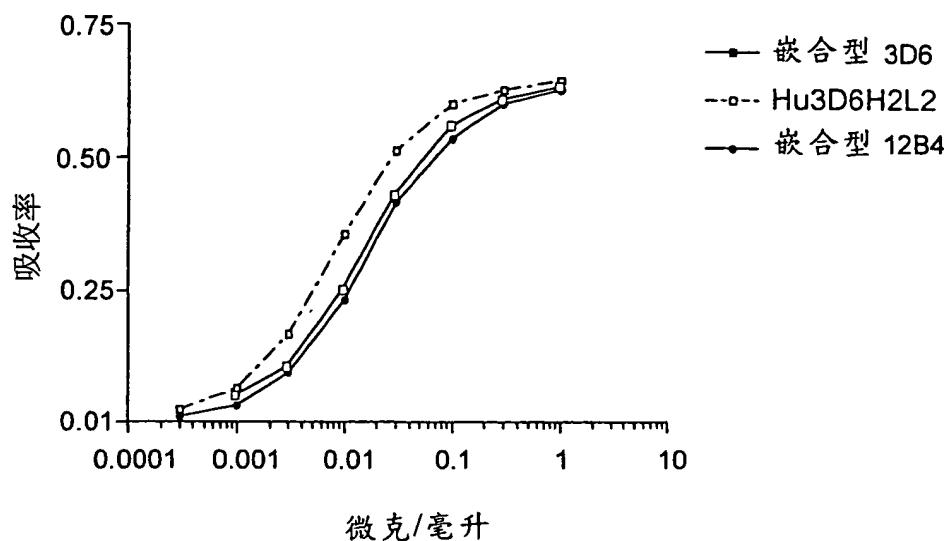


圖 5B

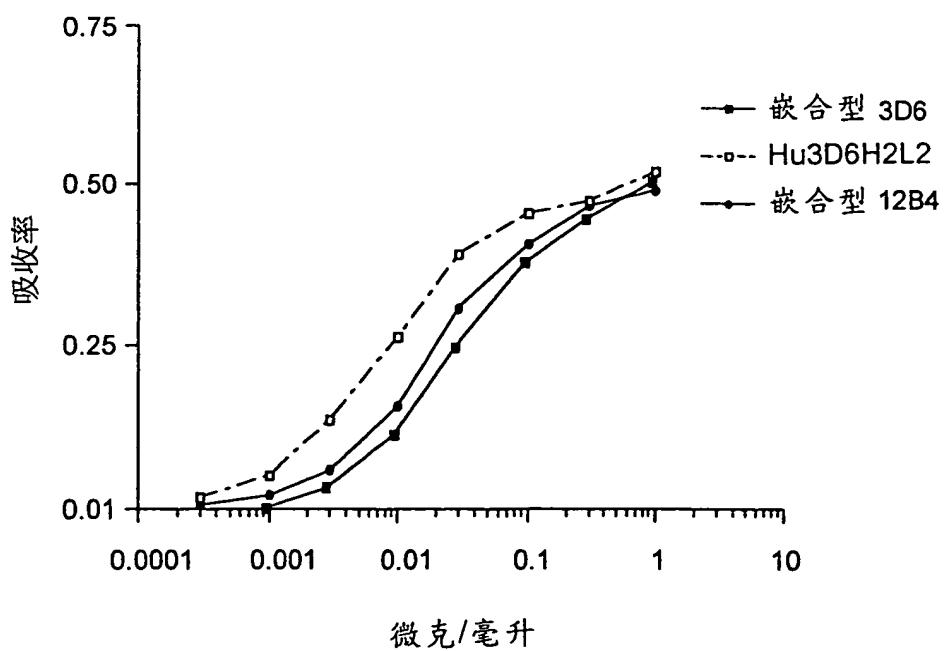
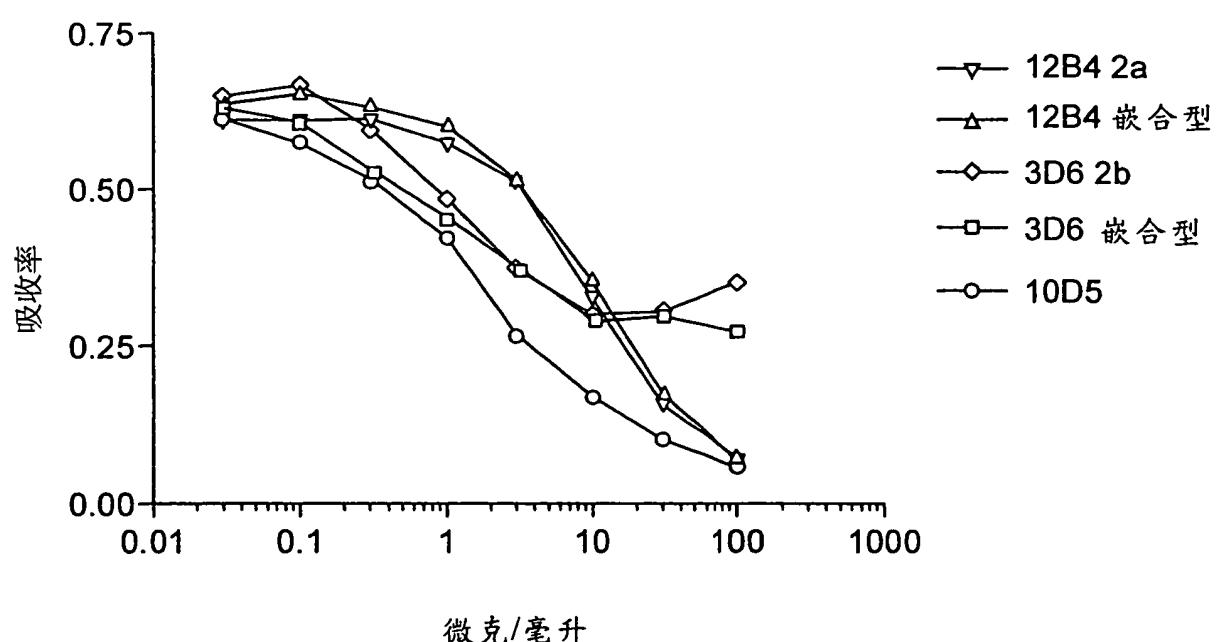


圖 6



I328116

圖 7

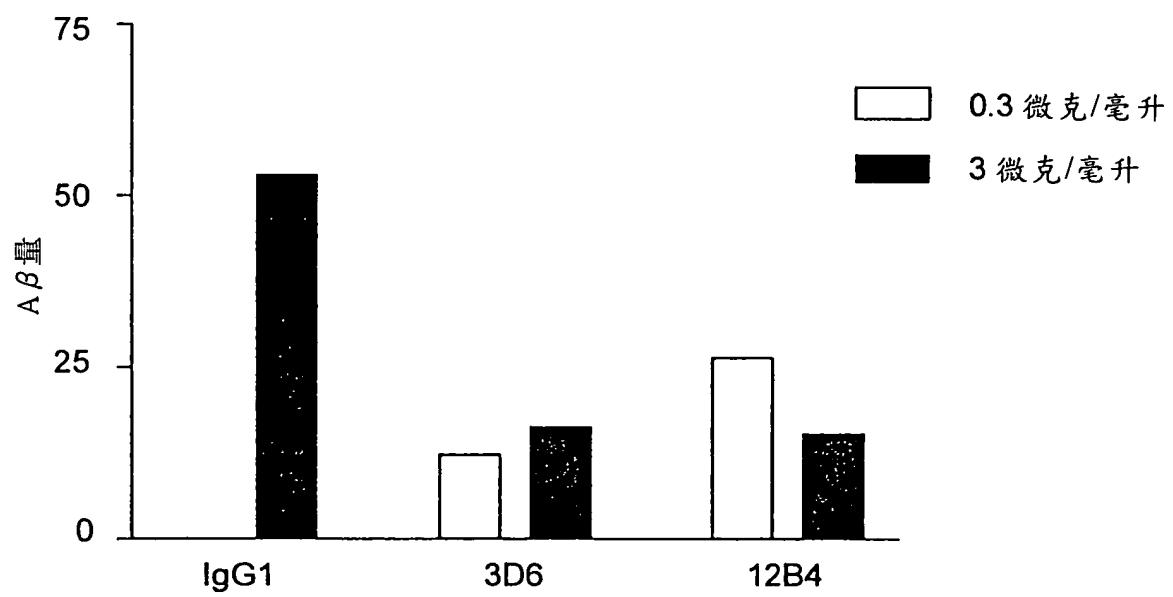


圖 8A

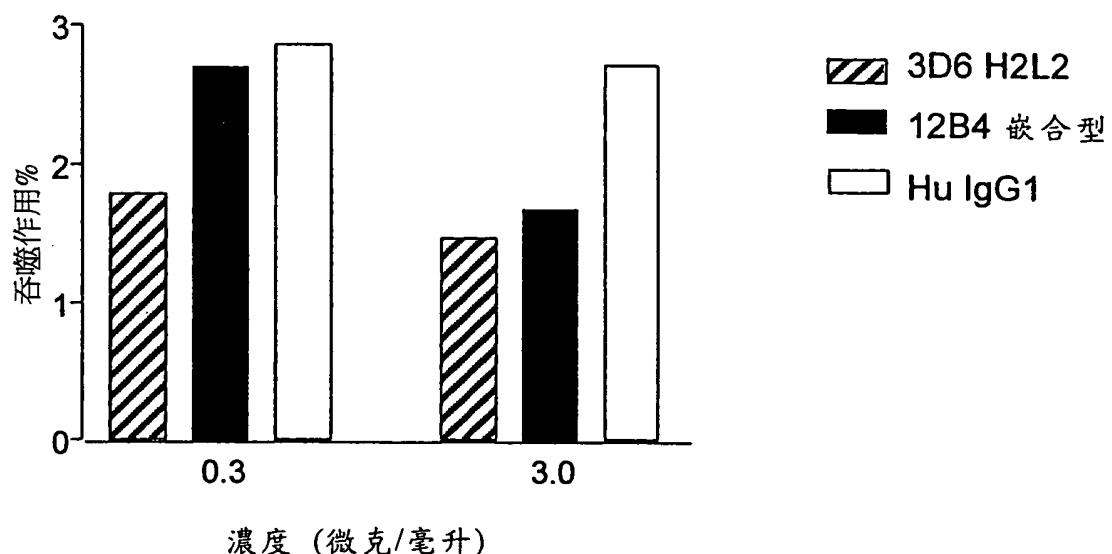


圖 8B

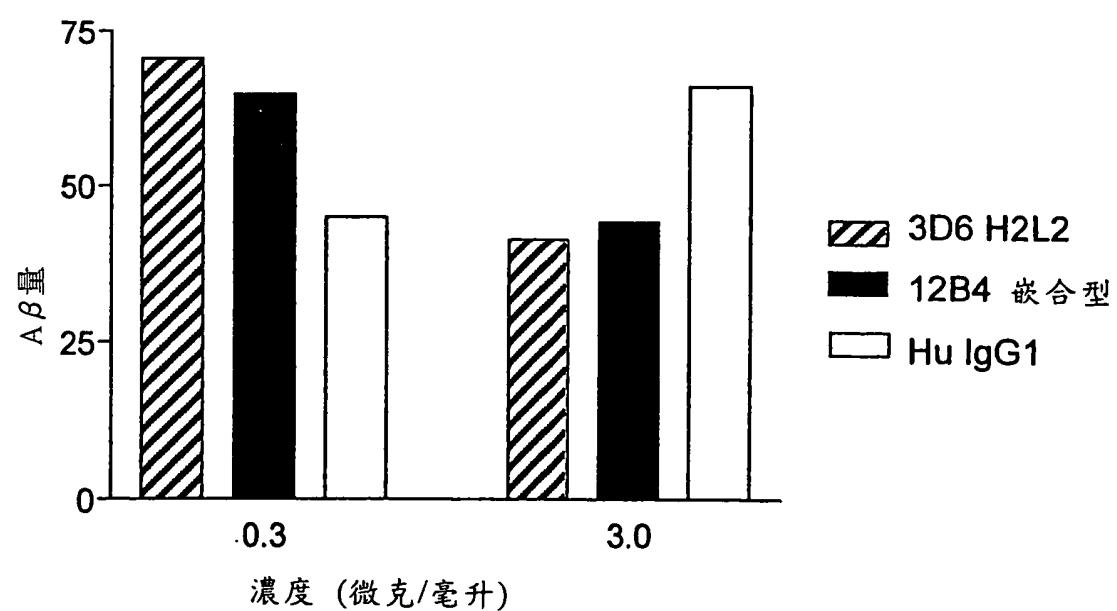


圖 9A

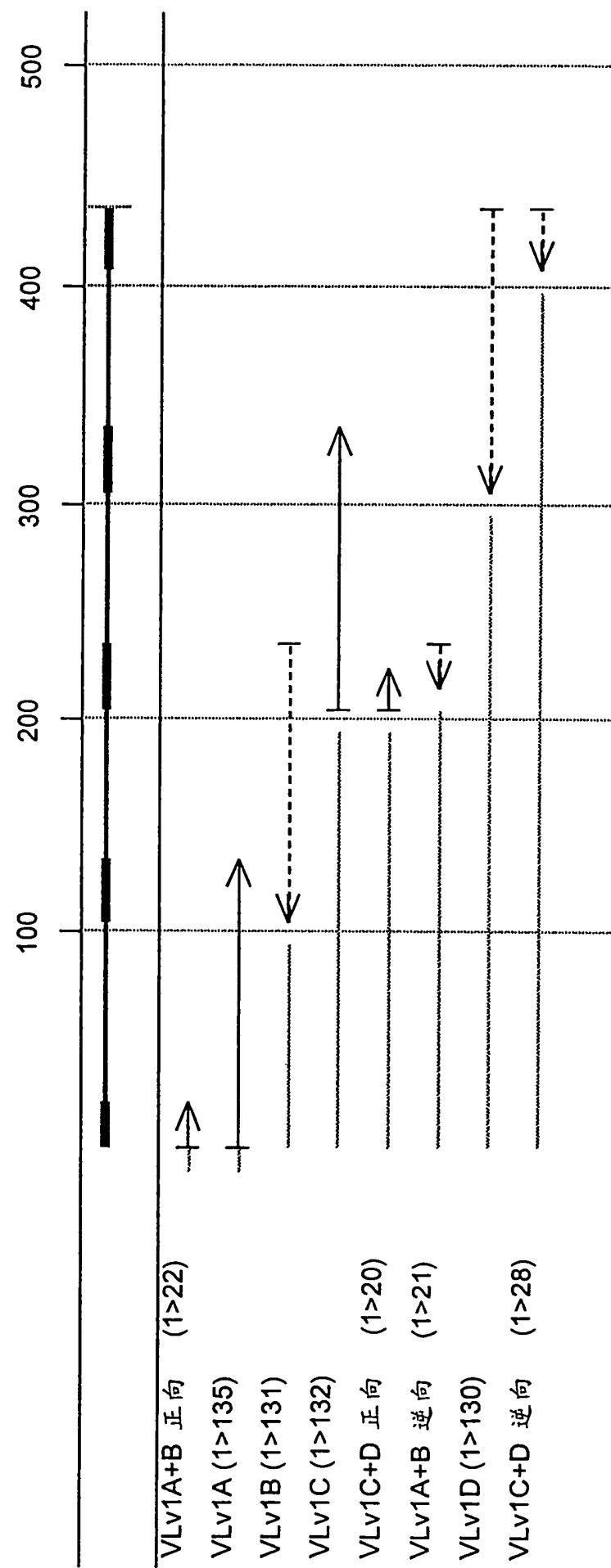
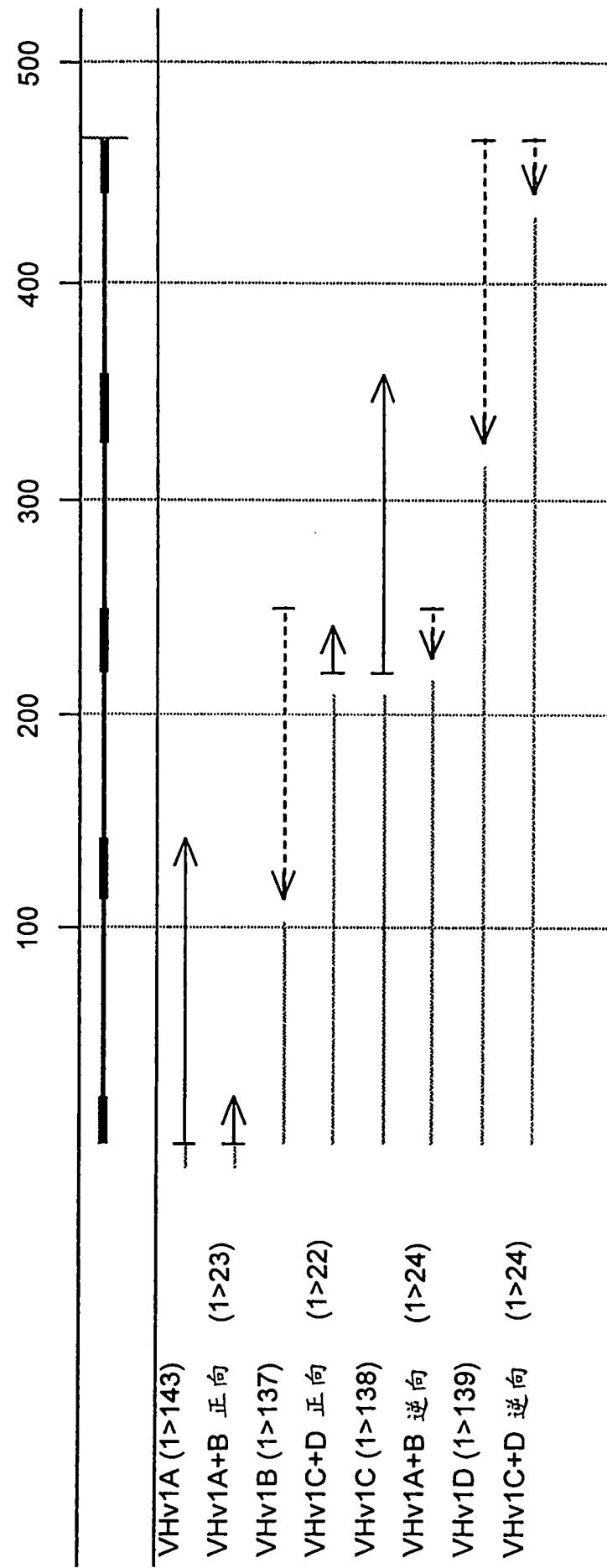


圖 9B



陸、(一)、本案指定代表圖為：第 6 圖

(二)、本代表圖之元件代表符號簡單說明：

無

柒、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無