



(12) SØKNAD

(11) 20200433

(13) A1

NORGE

(19) NO

(51) Int Cl.

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 25/16 (2006.01)

A61P 25/18 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20200433	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2007.07.13 PCT/US2007/073594
(22)	Inng.dag	2020.04.08	(85)	Videreføringsdag	2020.04.08
(24)	Løpedag	2007.07.13	(30)	Prioritet	2006.07.14, EP, 06014730.3 2006.10.02, EP, 06020765.1 2007.06.11, US, 60/943,289 2007.06.12, US, 60/943,499
(41)	Alm.tilgj	2009.03.27			
(62)	Avdelt fra	20090156, 2009.01.12			
(71)	Innehaver	Genentech, Inc., 1 DNA Way, CA94080-4990 SOUTH SAN FRANCISCO, USA			
(72)	Oppfinner	AC Immune SA, EPFL-PSE Building B, 1015 LAUSANNE, Sveits Andreas Muhs, Av. Des Cerisiers 39B, 1009 PULLY, Sveits Andrea Pfeifer, Route de Fenil 16A, 1806 ST-LÉGIER, Sveits Maria Pihlgren, Rue du Centre 42A, 1025 ST. SULPICE, Sveits Ryan Watts, 524 Yale Drive, CA94402 SAN MATEO, USA			
(74)	Fullmektig	BRYN AARFLOT AS, Stortingsgata 8, 0161 OSLO, Norge			
(54)	Benevnelse	Humanisert antistoff			
(57)	Sammendrag				

Foreliggende oppfinnelse angår kimært og humanisert antistoff og fremgangsmåter og sammensetninger for terapeutisk og diagnostisk anvendelse ved behandling av amyloidose, en gruppe lidelser og abnormiteter forbundet med amyloidprotein slik som Alzheimers sykdom.

HUMANISERT ANTISTOFF

Foreliggende oppfinnelse angår fremgangsmåter og sammensetninger for diagnose og behandling av amyloidose, en gruppe lidelser og abnormiteter
5 forbundet med amyloid protein slik som Alzheimers sykdom.

Amyloidose er ikke en enkelt sykdomsenhet men heller en mangfoldig gruppe av progressive sykdomsprosesser karakterisert ved ekstracellulære vev avleiringer av et voksaktig, stivelseslignende protein betegnet amyloid, som akkumulerer i ett
10 eller flere organer eller kroppssystemer. Ettersom avleiringene av amyloid akkumulerer, begynner de å påvirke den normale funksjonen av organet eller kroppssystemet. Det finnes minst 15 forskjellige typer av amyloidose. De viktigste formene er primær amyloidose uten kjent forutgående begivenhet, sekundær amyloidose etter en eller annen annen lidelse og arvelig amyloidose.

15

Sekundær amyloidose forekommer under kronisk infeksjon eller inflammatorisk sykdom, slik som tuberkulose, en bakterieinfeksjon betegnet familiær middelhavsfeber, beininfeksjoner (osteomyelitt), revmatoid artritt, inflammasjon i tyntarmen (granulomatøs ileitt), Hodgkins sykdom og leprosi.

20

Amyloide avleiringer omfatter amyloid P (pentagonal)-komponent (AP), et glykoprotein relatert til normal serum amyloid P (SAP) og sulfaterte glykosaminoglykaner (GAG), komplekse karbohydrater av bindevev. Amyloidprotein fibriller, som gjør rede for ca. 90% av amyloid materialet,
25 består av én av mange forskjellige typer av proteiner. Disse proteinene kan foldes til såkalte "beta-pleated" sheet fibriller, en unik proteinkonfigurasjon som fremviser bindingssteder for Kongorød hvilket resulterer i de unike fargings-egenskapene til amyloidproteinet.

30 Mange aldringssykdommer er basert på eller forbundet med amyloid-lignende proteiner og er karakterisert, delvis, ved oppbygging av ekstracellulære avleiringer av amyloid eller amyloidlignende materiale som bidrar til patogenesen, så vel som progresjon av sykdommen. Disse sykdommene omfatter, men er ikke begrenset

til, nevrologiske lidelser slik som Alzheimers sykdom (AD), Lewylegeme demens, Downs syndrom, arvelig hjerneblødning med amyloidose (Dutch type); Guam Parkinson-Demens komplekset. Andre sykdommer som er basert på eller forbundet med amyloidlignende proteiner er progressiv supranukleær parese, multippel sklerose; Creutzfeldt Jakobs-sykdom, Parkinsons sykdom, HIV-relatert demens, ALS (amyotrop lateral sklerose), diabetes med debut i voksen alder; senil hjerteamyloidose; endokrine tumorer og andre, omfattende makuladegenerasjon.

Selv om patogenese av disse sykdommene kan være forskjellige, inneholder deres karakteristiske avleiringer ofte mange felles molekylære bestanddeler. I en betydelig grad, kan dette tilskrives den lokale aktiveringen av pro-inflammatoriske reaksjonsveier som derved fører til samtidig avleiring av aktivert komplement komponenter, akutfase reaktanter, immunmodulatorer og andre inflammatoriske mediatorer (McGeer et al., 1994).

Alzheimers sykdom (AD) er en nevrologisk lidelse primært antatt å være forårsaket av amyloide plakk, en akkumulering av unormal avleiring av proteiner i hjernen. Den vanligste typen av amyloid funnet i hjernen hos rammede individer er sammensatt primært av A β -fibriller. Vitenskapelig bevis demonstrerer at en økning i produksjon og akkumulering av beta-amyloid protein i plakk fører til nervecelledød, hvilket bidrar til utvikling og progresjon av AD. Tap av nerveceller i strategiske hjerneområder forårsaker, i sin tur, reduksjon i neurotransmittere og svekkelse av hukommelse. Proteinene hovedsakelig ansvarlig for oppbygging av plakk omfatter amyloid forløperprotein (APP) og to preseniliner (presenilin I og presenilin II). Sekvensiell kløyving av amyloid forløperproteinet (APP), som blir konstitutivt uttrykt og katabolisert i de fleste celler, ved enzymene β og γ sekretase fører til frigjøring av et 39 til 43 aminosyrers A β -peptid. Nedbrytningen av APP'er øker trolig deres tilbøyelighet til å aggregere i plakk. Det er spesielt A β (1-42)-fragmentet som har en sterk tilbøyelighet til bygge opp aggregater på grunn av to svært hydrofobe aminosyrerester ved dets C-terminale ende. A β (1-42)-fragmentet er derfor antatt å være overveiende involvert i og ansvarlig for initieringen av dannelse av nevritiske plakk ved AD og derfor å ha et høyt patologisk potensiale.

Det er derfor et behov for midler for å forhindre dannelsen av amyloide plakker og for å løse opp eksisterende plakker ved AD.

Symptomene på AD manifesteres langsomt og det første symptomet kan være
5 kun mild glemsomhet. På dette stadiet kan individer glemme nyere hendelser, aktiviteter, navnene på kjente mennesker eller ting og kan være ute av stand til å løse enkle matematiske problemer. Ettersom sykdommen utvikles blir det lettere å legge merke til symptomer og de blir alvorlige nok til å få mennesker med AD eller deres familiemedlemmer til å søke medisinsk hjelp. Symptomer på AD i
10 mellomstadiet omfatter å glemme hvordan enkle oppgaver skal utføres slik som å stelle seg og det utvikles problemer med tale, forståelse, lesing eller skriving. AD-pasienter i senere stadium kan bli urolige eller aggressive, kan gå seg vill og til slutt trenge fullstendig pleie.

15 For øyeblikket er den eneste entydige måten å diagnostisere AD på å identifisere plakker og tangler i hjernevev i en autopsi etter individets død. Derfor kan leger kun foreta en diagnose av "mulig" eller "sannsynlig" AD mens personen fortsatt er i live. Ved anvendelse av vanlige metoder kan leger diagnostisere AD korrekt opptil 90 prosent av tiden ved anvendelse av mange verktøy for å diagnostisere
20 "sannsynlig" AD. Leger stiller spørsmål angående personens generelle helse, tidligere medisinske problemer og historie angående hvilke som helst vanskeligheter personen har med å utføre daglige aktiviteter. Adferdsmessige tester av hukommelse, problemløsning, oppmerksomhet, telling og språk gir informasjon om kognitiv degenerasjon og medisinske tester slik som tester av
25 blod, urin eller spinalvæske og scanning av hjernen kan gi noe ytterligere informasjon.

Behandling av AD består av medikament-baserte og ikke medikament-baserte behandlinger. Behandlinger rettet mot å endre det underliggende forløpet av
30 sykdommen (forsinke eller reversere progresjonen) har hittil vært overveiende mislykket. Medisiner som gjenoppretter mangelen (defekten) eller malfunksjonen, i de kjemiske budbringerne mellom nervecellene (nevrotransmittere), spesielt kolinesterasehemmere (ChEI'er) slik som takrin og rivastigmin, er vist å forbedre

symptomer. ChEI'er hindrer den enzymatiske nedbrytningen av nevrotransmittere for derved å øke mengden av kjemiske budbringere tilgjengelig for å overføre nervesignalene i hjernen.

- 5 For noen mennesker i det tidlige stadiet og mellomstadiet av sykdommen, kan medikamentene takrin (COGNEX®, Morris Plains, NJ), donepezil (ARICEPT®, Tokyo, JP), rivastigmin (EXELON®, East Hanover, NJ) eller galantamin (REMINYL®, New Brunswick, NJ) bidra til å hindre noen symptomer fra å bli verre i en begrenset tidsperiode. Et annet medikament, memantin (NAMENDA®, New York, NY), er godkjent for behandling av moderat til alvorlig AD. Det er også
10 tilgjengelig medisinsk behandling for å takle de psykiatriske manifestasjonene av AD. Likeså kan noen medisiner bidra til å kontrollere adferdsmessige symptomer på AD slik som søvnløshet, rastløshet, vandring, angst og depresjon. Behandling av disse symptomene gjør pasienter mer tilfredse og gjør pleie av dem lettere for omsorgsytere. Uheldigvis, til tross for betydelig behandlingsfremskritt som viser at
15 denne klassen av midler er konsekvent bedre enn et placebo, fortsetter utvikling av sykdommen og den gjennomsnittlige effekten på mental fungering har kun vært beskjeden. Mange av medikamentene anvendt i medisinerings ved AD slik som for eksempel ChEI'er har også bivirkninger som omfatter gastrointestinal dysfunksjon, levertoksisitet og vekttap.
20

En annen sykdom som er basert på eller forbundet med akkumulering og avleiring av amyloidlignende protein er makuladegenerasjon.

- 25 Makuladegenerasjon er en vanlig øyesykdom som forårsaker skade på makula, som er det midtre området av retina (det papirtynne vevet ved bakkant av øyet hvor lysfølsomme celler sender synssignaler til hjernen). Skarpt, klart, "rett fram" syn blir bearbeidet av makula. Skade på makula fører til utvikling av blinde flekker og uskarpt eller fordreid syn. Aldersrelatert makuladegenerasjon (AMD) er en
30 hovedårsak til synssvekkelse i USA og for mennesker med en alder på mer enn 65 er det den ledende årsaken til praktisk blindhet blant kaukasiere. Omtrent 1,8 millioner amerikanere i alderen 40 år og eldre har fremskreden AMD og ytterligere 7,3 millioner mennesker med intermediær AMD er med vesentlig risiko for

synstap. Staten anslår at det i 2020 vil være 2,9 millioner mennesker med fremskreden AMD. Offere for AMD blir ofte overrasket og frustrert over å finne ut hvor lite det er kjent om årsakene til og behandling av denne blindende sykdommen.

5

Det finnes to former for makuladegenerasjon: tørr makuladegenerasjon og våt makuladegenerasjon. Den tørre formen, hvor cellene i makula langsomt begynner å brytes ned, er diagnostisert i 85 prosent av tilfellene av makuladegenerasjon. Begge øynene blir vanligvis rammet av tørr AMD, selv om ett øye kan miste syn mens det andre øyet ikke blir angrepet. Drusen, som er gule nedslag under retina, er vanlig tidlig tegn på tørr AMD. Risiko for å utvikle fremskreden tørr AMD eller våt AMD øker ettersom mengden eller størrelsen av drusen øker. Det er mulig for tørr AMD å avansere og forårsake tap av syn uten å gjøres om til den våte formen av sykdommen; imidlertid er det også mulig for tørr AMD i tidlig stadium å plutselig endres til den våte formen.

Den våte formen, selv om den bare står for 15 prosent av tilfellene, resulterer i 90 prosent av blindheten og anses som fremskreden AMD (det er intet tidlig stadium eller mellomstadium av våt AMD). Våt AMD innledes alltid av den tørre formen av sykdommen. Ettersom den tørre formen forverres starter en unormal blodkarvekst, hos noen mennesker, bak makula. Disse karene er svært skjøre og vil lekket væske og blod (derav "våt" makuladegenerasjon), som forårsaker rask skade på makula.

Den tørre formen av AMD vil initielt ofte forårsake litt uskarpt syn. Det sentrale synet spesielt kan deretter bli uskarpt og dette området vokser seg større ettersom sykdommen utvikles. Ingen symptomer kan merkes dersom kun ett øye blir rammet. Ved våt AMD kan rette linjer virke bølgeformede og tap av sentralt syn kan forekomme raskt.

Diagnose av makuladegenerasjon omfatter typisk en dilatert øye undersøkelse, synsskarphetstest og en undersøkelse av bakkanten av øyet ved anvendelse av en fremgangsmåte betegnet fundoskopi for å bidra til å diagnostisere AMD og - dersom det er mistanke om våt AMD - kan fluoresceinangiografi også utføres.

Dersom tørr AMD når de fremskredne stadiene, finnes det ingen aktuell behandling for å forhindre synstap. Imidlertid kan en spesifikk høydose formel av antioksidanter og sink forsinke eller forhindre intermediær AMD fra å utvikle seg til det fremskredne stadiet. Macugen® (pegaptanib natrium-injeksjon),
5 fotokoagulering med laser og fotodynamisk terapi kan kontrollere den unormale blodkarveksten og blødningen i makula, hvilket er nyttig for noen mennesker som har våt AMD; imidlertid vil syn som allerede er tapt ikke fås tilbake ved disse teknikkene. Dersom synet allerede er tapt, finnes det hjelpemidler for svaksynte som kan bidra til å forbedre livskvaliteten.

10

Ett av de tidligste tegn på aldersrelatert makuladegenerasjon (AMD) er akkumulering av ekstracellulære nedslag kjent som drusen mellom basal lamina av retinalt pigmentert epitel (RPE) og Bruchs membran (BM). Nyere studier utført av Anderson et al. har bekreftet at drusen inneholder amyloid-beta. (Experimental
15 Eye Research 78 (2004) 243-256).

20

Pågående forskning fortsetter med studier for å undersøke miljøbestemte, genetiske og diettære faktorer som kan bidra til AMD. Nye behandlingsstrategier blir også utforsket, omfattende netthinne celle transplantasjoner, medikamenter
20 som vil forhindre eller saktne utviklingen av sykdommen, strålingsterapi, genterapier, en datachip implantert i retina som kan bidra til å stimulere syn og midler som vil forhindre vekst av nye blodkar under makula.

25

En viktig faktor å ta i betraktning ved utvikling av nye medikamenter er enkel bruk
25 for mål-pasientene. Oral medikament-levering, -spesifikt tabletter, kapsler og softgeler-, står for 70% av alle doseringsformer konsumert på grunn av anvendelighet for pasienten. Medikamentutviklere er enige i at pasienter foretrekker oral levering heller enn å utsette seg for injeksjoner eller andre, mer invasive former for medisinsk administrering. Formuleringer som fører til lave
30 doseringsintervaller (dvs. én gang pr. dag eller forlenget frigjøring) er også foretrukket. Enkel administrering av antibiotika i orale doseringsformer resulterer i en økning av pasientens etterlevelse med regimet under behandling.

Det som trenges er effektive fremgangsmåter og sammensetninger for å forhindre eller ta tak i komplikasjonene forbundet med amyloidose, en gruppe sykdommer og lidelser forbundet med dannelse av amyloide plakk omfattende sekundær amyloidose og aldersrelatert amyloidose omfattende, men ikke begrenset til, 5 nevrologiske lidelser slik som Alzheimers sykdom (AD), Lewylegeme demens, Downs syndrom, arvelig hjerneblødning med amyloidose (Dutch type); Guam Parkinson-Demens komplekset; så vel som andre sykdommer som er basert på eller forbundet med amyloidlignende proteiner slik som progressiv supranukleær parese, multippel sklerose; Creutzfeldt Jakobs-sykdom, Parkinsons sykdom, HIV- 10 relatert demens, ALS (amyotrop lateral sklerose), diabetes som debuterer i voksen alder; senil hjerteamyloidose; endokrine tumorer og andre, omfattende makuladegenerasjon. Spesielt er det nødvendig med midler som er i stand til å motvirke de fysiologiske manifestasjonene av sykdommen slik som dannelse av plakk forbundet med aggregering av fibre av amyloid eller amyloid-lignende peptid.

15

Anti-amyloid antistoffer fremkalt ved inokulering av A β ₁₋₄₂ blandet med Freund complete eller incomplete adjuvans ble angitt å redusere mengden av amyloid i transgene mus for human Alzheimers sykdom (Schenk et al., 1999). Intraperitoneal inokulering av tetrapalmitoylert A β ₁₋₁₆ rekonstituert i liposomer i 20 NORBA transgene mus fremkalte signifikante titere av anti-amyloid antistoffer, som ble angitt å solubilisere amyloide fibre og plakk *in vitro* og *in vivo*. (Nicolau et al., 2002).

En mulig mekanisme ved hvilken oppløsning av amyloide plakk og fibre fant sted 25 ble først foreslått av Bard et al., (2000), som konkluderte med at antistoffene opsoniserte plakkene, som deretter ble ødelagt av makrofagene av mikroglia. De Mattos et al., (2001) anga at en mAb rettet mot det sentrale domenet av β -amyloid var i stand til å binde og fullstendig sekvestrere plasma amyloid. De hevdet at tilstedeværelsen av disse mAbs i sirkulasjonen forskjøv likevekten av A β mellom 30 hjerne og plasma, hvilket favoriserer perifer rensing og katabolisme istedenfor avleiring i hjernen.

Forlenget human terapi med gnager-antistoffer kan resultere i en antiglobulin-respons som er detekterbar ved ca. 8-12 dager etter administrering og når en topp ved ca. 20-30 dager. Dersom en slik antiglobulin-respons oppstår, må behandlingen avbrytes etter ikke mer enn ca. 10 dager og ny behandling ved et senere tidspunkt er vanligvis utelukket fordi det vil føre til rask oppstart av en sekundær antiglobulin-respons. Selv om gnager-antistoffer har en betydelig grad av sekvens konservering med den av humane antistoffer, er det mange sekvensforskjeller mellom gnager og humane antistoffer, tilstrekkelig til at gnager-antistoffene er immunogene i mennesker.

10

Dette problemet kan overvinnes ved fremstilling av antistoffer direkte i mennesker eller ved dannelsen av "humaniserte" (også kalt "omformede" antistoffer). Humaniserte antistoffer har en variabel region aminosyresekvens som inneholder de gnager-avledete CDR'ene satt inn mellom humane eller human-lignende struktur ("framework")-sekvenser. Siden spesifisiteten av det humaniserte antistoffet tilveiebringes av de gnager-avledete CDR'ene, skal deres rester anvendes hovedsakelig uendret hvor kun mindre modifikasjoner er tillatt, som ikke påvirker affiniteten og spesifisitet av antistoffet for dets mål-antigen i betydelig grad. Struktur ("framework")-rester kan avledes fra hvilken som helst primat eller, spesielt, fra hvilken som helst human variabel region eller kan være en kombinasjon derav og den resulterende utformede variable regionen ville anses som omformet.

For å maksimere sannsynligheten for at affiniteten vil beholdes i det omformede antistoffet er det viktig å foreta et riktig valg av struktur ("framework")-regionen. Det er kjent at struktur-sekvensene tjener til holde CDR'ene i deres korrekte romlige orientering for interaksjon med antigen og at struktur ("framework")-restene noen ganger til og med kan delta i antigenbinding. For å opprettholde affiniteten av antistoffet for dets antigen er det fordelaktig å velge humane struktur-sekvenser som er mest lik sekvensene av gnager strukturer. Det kan deretter fortsatt være nødvendig å erstatte én eller flere aminosyrer i den humane struktur-sekvensen med den tilsvarende resten i gnager-strukturen for å unngå tap av affiniteten. Denne erstatningen kan støttes av datamaskinmodellering.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer nye fremgangsmåter og sammensetninger omfattende svært spesifikke og svært effektive antistoffer, spesielt kimære antistoffer omfattende fragmenter derav, nærmere bestemt delvis eller fullstendig

5 humaniserte antistoffer omfattende fragmenter derav, som har evne til å spesifikt gjenkjenne og binde til spesifikke epitoper fra et spekter av β -amyloid antigener, som kan presenteres for antistoffet i en monomer, dimer, trimer, osv, en polymer form, i form av et aggregat, fibere, filamenter eller i den kondenserte formen av et plakk. Antistoffene satt i stand ved læren ifølge foreliggende oppfinnelse er

10 spesielt anvendelige for behandling av amyloidose, en gruppe sykdommer og lidelser forbundet med dannelse av amyloide plakk omfattende sekundær amyloidose og aldersrelatert amyloidose omfattende, men ikke begrenset til, nevrologiske lidelser slik som Alzheimers sykdom (AD), Lewylegeme demens, Downs syndrom, arvelig hjerneblødning med amyloidose (Dutch type); Guam

15 Parkinson-Demens komplekset; så vel som andre sykdommer som er basert på eller forbundet med amyloidlignende proteiner slik som progressiv supranukleær parese, multippel sklerose; Creutzfeld Jakobs-sykdom, arvelig hjerneblødning med amyloidose Dutch type, Parkinsons sykdom, HIV-relatert demens, ALS (amyotrop lateral sklerose), diabetes med debut i voksen alder; senil hjerteamyloidose;

20 endokrine tumorer og andre, omfattende makuladegenerasjon, bare for å nevne noen få.

OPPSUMMERING AV OPPFINNELSEN

I én utførelsesform angår oppfinnelsen et kimært antistoff eller et fragment derav

25 eller et humanisert antistoff eller et fragment derav, som gjenkjenner og binder til minst ett distinkt bindingssete, spesielt til minst to distinkte bindingsseter og nærmere bestemt til minst tre distinkte bindingsseter på β -amyloid proteinet hvor nevnte ene, nevnte minst to og nevnte minst tre bindingsseter hver omfatter minst én eller to påfølgende aminosyrerester hovedsakelig involvert i binding av

30 antistoffet.

Spesielt binder det kimære antistoffet eller et fragment derav eller det humaniserte antistoffet eller et fragment derav ifølge oppfinnelsen til minst to, spesielt til minst tre distinkte bindingsseter på β -amyloid proteinet hvor minst to av de tre distinkte bindingssetene omfatter minst to påfølgende aminosyrerester hovedsakelig involvert i bindingen av antistoffet og minst ett av de tre distinkte bindingssetene omfatter minst én aminosyrerest.

De minst to distinkte bindingssetene omfattende minst to påfølgende aminosyrerester hovedsakelig involvert i binding av antistoffet er lokalisert tett i nærheten av hverandre på antigenet, atskilt og/eller flankert av minst én aminosyrerest som ikke er involvert i antistoffbinding eller i en betydelig mindre grad sammenlignet med nevnte minst to påfølgende aminosyrerester, hvilket følgelig danner en konformasjonell diskontinuerlig epitop.

De minst tre distinkte bindingssetene omfattende minst to påfølgende aminosyrerester og minst én aminosyrerest, henholdsvis, som er hovedsakelig involvert i binding av antistoffet er lokalisert tett i nærheten av hverandre på epitopen, atskilt og/eller flankert av minst én aminosyrerest ikke involvert i antistoffbinding eller i en betydelig mindre grad sammenlignet med aminosyrerestene, som er overveiende involvert i binding av antistoffet, hvilket følgelig danner en konformasjonell diskontinuerlig epitop.

Spesielt tilveiebringes et kimært antistoff eller et fragment derav eller et humanisert antistoff eller et fragment derav, som gjenkjenner og binder til minst ett distinkt bindingssete, spesielt til minst to distinkte bindingsseter, nærmere bestemt til minst tre distinkt bindingsseter på β -amyloid proteinet hvor nevnte minst ett eller nevnte minst to distinkte bindingsseter hver omfatter minst to påfølgende aminosyrerester overveiende involvert i binding av antistoffet, hvor de minst to påfølgende aminosyrerestene som representerer et første bindingssete er –Phe-Phe- satt inn innenfor følgende kjernesekvens (SEKV ID NR: 9):

Xaa₃ - Phe – Phe – Xaa₄ – Xaa₅ – Xaa₆, hvor

Xaa₃ er en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av Ala, Val, Leu, norleucin, Met, Phe og Ile;

Xaa₄ er en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av Ala, Val, Leu, Ser og Ile;

5 Xaa₅ er en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av Glu og Asp,

Xaa₆ er en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av Glu og Asp og hvor nevnte aminosyrerester Xaa₃ Xaa₄, Xaa₅ og Xaa₆ ikke er involvert i antistoffbinding eller i en betydelig mindre grad sammenlignet med –Phe-Phe-bindingssetet.

10

I en annen utførelsesform ifølge oppfinnelsen tilveiebringes et kimært antistoff eller et fragment derav, eller et humanisert antistoff eller et fragment derav tilveiebringes, hvor

Xaa₃ er Val eller Leu, men spesielt Val;

15 Xaa₄ er Ala eller Val, men spesielt Ala;

Xaa₅ er Glu eller Asp, men spesielt Glu;

Xaa₆ er Glu eller Asp, men spesielt Asp.

Spesielt tilveiebringes et kimært antistoff eller et fragment derav eller et
20 humanisert antistoff eller et fragment derav, som gjenkjenner og binder til minst ett distinkt bindingssete, spesielt til minst to distinkte bindingsseter, nærmere bestemt til minst tre distinkte bindingsseter på β -amyloid proteinet hvor nevnte distinkte bindingsseter omfatter minst én og minst to påfølgende aminosyrerester, henholdsvis, overveiende involvert i binding av antistoffet, hvor de minst to
25 påfølgende aminosyrerestene som representerer et første bindingssete er –Phe-Phe- og den minst ene aminosyreresten er –His- satt inn innenfor følgende kjernesekvens:

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

30 Xaa₁ er en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av His, Asn, Gln, Lys og Arg

Xaa₃ er en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av Asn og Gln

Xaa₄ er en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av His, Asn, Gln, Lys og Arg

Xaa₅ er en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av Ala, Val, Leu, Ser og Ile;

5 Xaa₆ er en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av Ala, Val, Leu, norleucin, Met, Phe og Ile

Xaa₇ er en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av Ala, Val, Leu og Ile

Xaa₈ er en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av Glu og Asp,

10 Xaa₉ er en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av Glu og Asp og hvor nevnte aminosyrerester Xaa₁, Xaa₃, Xaa₆, Xaa₇, Xaa₈ og Xaa₉, ikke er involvert i antistoffbinding eller i en betydelig mindre grad sammenlignet med –His- og –Phe-Phe- bindingssetet, henholdsvis..

I en annen utførelsesform ifølge oppfinnelsen tilveiebringes et kimært antistoff eller
15 et fragment derav eller et humanisert antistoff eller et fragment derav hvor

Xaa₃ er Gln eller Asn, men spesielt Gln;

Xaa₄ er Lys

Xaa₅ er Leu

Xaa₆ er Val eller Leu, men spesielt Val;

20 Xaa₇ er Ala eller Val, men spesielt Ala;

Xaa₈ er Glu eller Asp, men spesielt Glu; og

Xaa₉ er Asp eller Glu, men spesielt Asp.

I en annen utførelsesform ifølge oppfinnelsen tilveiebringes et kimært antistoff eller
25 et fragment derav, eller et humanisert antistoff eller et fragment derav tilveiebringes, som gjenkjenner og binder til minst ett distinkt bindingssete, spesielt til minst to distinkte bindingsseter, nærmere bestemt til minst tre distinkte bindingsseter på β -amyloid proteinet, hvor nevnte minst ett eller nevnte minst to distinkte bindingsseter hver omfatter minst to påfølgende aminosyrerester
30 hovedsakelig involvert i binding av antistoffet, hvor de minst to påfølgende aminosyrerestene som representerer et andre bindingssete er –Lys-Leu- satt inn innenfor den følgende kjernesekvensen (SEKV ID NR: 10):

Xaa₁ – Xaa₂ - Lys - Leu – Xaa₃ hvor

Xaa₁ er en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av His, Asn, Gln Lys og Arg;

Xaa₂ er en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av Asn og Gln;

Xaa₃ er en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av Ala, Val, Leu, norleucin, Met, Phe og Ile; og hvor nevnte aminosyrerester Xaa₂, Xaa₃, ikke er involvert i antistoffbinding eller i en betydelig mindre grad sammenlignet med – Lys-Leu- bindingssetet.

I en annen utførelsesform ifølge oppfinnelsen tilveiebringes et kimært antistoff eller et fragment derav eller et humanisert antistoff eller et fragment derav, som gjenkjenner og binder til minst ett distinkt bindingssete, spesielt til minst to distinkte bindingsseter, nærmere bestemt til minst tre distinkte bindingsseter på β -amyloid proteinet hvor nevnte distinkte bindingsseter omfatter minst én og minst to påfølgende aminosyrerester, henholdsvis, overveiende involvert i binding av antistoffet, hvor den minst ene og de minst to påfølgende aminosyrene, som er atskilt av minst én aminosyrerest ikke involvert i antistoffbinding eller i en betydelig mindre grad sammenlignet med aminosyrerestene hovedsakelig involvert i binding av antistoffet, er -His- og -Lys-Leu-, henholdsvis, satt inn innenfor følgende kjernesekvens:

His – Xaa₂ - Lys - Leu – Xaa₃– Xaa₄– Xaa₅–Xaa₆- – Xaa₇ — Xaa₈ – hvor

Xaa₂ er en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av Asn og Gln;

Xaa₃ er en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av Ala, Val, Leu, norleucin, Met, Phe og Ile;

Xaa₄ er en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av Ala, Val, Leu, norleucin, Met, Phe og Ile

Xaa₅ er en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av Ala, Val, Leu, norleucin, Met, Phe og Ile

Xaa₆ er en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av Ala, Val, Leu, Ser og Ile;

Xaa₇ er en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av Glu og Asp,

Xaa₈ er en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av Glu og Asp

og hvor nevnte aminosyrerester Xaa₂, Xaa₃, Xaa₆, Xaa₇, Xaa₈, ikke er involvert i antistoffbinding eller i en mindre til betydelig mindre grad sammenlignet med – His- og –Lys-Leu- bindingssetet, henholdsvis.

- 5 I en annen utførelsesform ifølge oppfinnelsen tilveiebringes et kimært antistoff eller et fragment derav eller et humanisert antistoff eller et fragment derav, hvor

Xaa₂ er Gln eller Asn, men spesielt Gln;

Xaa₃ er Val eller Leu, men spesielt Val;

Xaa₄ er Phe

- 10 Xaa₅ er Phe

Xaa₆ er Ala eller Val, men spesielt Ala;

Xaa₇ er Glu eller Asp, men spesielt Glu; og

Xaa₈ er Asp eller Glu, men spesielt Asp.

- 15 I en annen utførelsesform ifølge oppfinnelsen tilveiebringes et kimært antistoff eller et fragment derav, eller et humanisert antistoff eller et fragment derav tilveiebringes, som gjenkjenner og binder til minst to distinkte bindingsseter på β -amyloid proteinet hvor nevnte minst to distinkte bindingsseter hver omfatter minst to påfølgende aminosyrerester overveiende involvert i binding av antistoffet, hvor de minst to påfølgende aminosyrerester er separert av minst én aminosyrerest ikke involvert i antistoffbinding eller i en betydelig mindre grad enn nevnte påfølgende aminosyrerester, som er –Phe-Phe- og –Lys-Leu-, henholdsvis, som representerer et første og andre bindingssete satt inn i følgende kjernesekvens:

Xaa₁ – Xaa₂ - Lys - Leu – Xaa₃ - Phe – Phe - Xaa₄ – Xaa₅ – Xaa₆, hvor

- 25 Xaa₁ er en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av His, Asn, Gln Lys og Arg;

Xaa₂ er en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av Asn og Gln;

Xaa₃ er en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av Ala, Val, Leu, norleucin, Met, Phe og Ile;

- 30 Xaa₄ er en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av Ala, Val, Leu, Ser og Ile;

Xaa₅ er en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av Glu og Asp,

Xaa₆ er en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av Glu og Asp og hvor nevnte aminosyrerester Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄, Xaa₅ og Xaa₆ ikke er involvert i antistoffbinding eller i mindre til betydelig mindre grad sammenlignet med –Lys-Leu- og –Phe-Phe- bindingssettet, henholdsvis.

5

I en annen utførelsesform ifølge oppfinnelsen tilveiebringes et kimært antistoff eller et fragment derav eller et humanisert antistoff eller et fragment derav, som gjenkjenner og binder til minst ett distinkt bindingssete, spesielt til minst to distinkte bindingsseter, nærmere bestemt til minst tre distinkte bindingsseter på β-amyloid proteinet hvor nevnte distinkte bindingsseter omfatter minst én og minst to påfølgende aminosyrerester, henholdsvis, hovedsakelig involvert i binding av antistoffet, hvor den minst ene og de minst to påfølgende aminosyrene er atskilt av minst én aminosyrerest ikke involvert i antistoffbinding eller i en betydelig mindre grad sammenlignet med aminosyrerestene, som er overveiende involvert i binding av antistoffet og hvor nevnte aminosyrerester er –His- og –Phe-Phe- og –Lys-Leu-, henholdsvis, satt inn innenfor følgende kjernesekvens:

His – Xaa₂ - Lys - Leu – Xaa₃ - Phe – Phe - Xaa₄ – Xaa₅ – Xaa₆, hvor
 Xaa₂ er en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av Asn og Gln;
 Xaa₃ er en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av Ala, Val, Leu, norleucin, Met, Phe og Ile;
 Xaa₄ er en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av Ala, Val, Leu, Ser og Ile;
 Xaa₅ er en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av Glu og Asp,
 Xaa₆ er en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av Glu og Asp og hvor nevnte aminosyrerester Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄, Xaa₅, Xaa₆, ikke er involvert i antistoffbinding eller i mindre til betydelig mindre grad sammenlignet med –His-, –Lys-Leu- og –Phe-Phe- bindingssettet, henholdsvis.

I en annen utførelsesform ifølge oppfinnelsen tilveiebringes et kimært antistoff eller et fragment derav eller et humanisert antistoff eller et fragment derav, hvor

Xaa₂ er Gln eller Asn, men spesielt Gln;
 Xaa₃ er Val eller Leu, men spesielt Val;
 Xaa₄ er Ala eller Val, men spesielt Ala;

Xaa₅ er Glu eller Asp, men spesielt Glu; og

Xaa₆ er Asp eller Glu, men spesielt Asp.

I en annen utførelsesform ifølge oppfinnelsen tilveiebringes et kimært antistoff eller
 5 et fragment derav eller et humanisert antistoff eller et fragment derav, som
 gjenkjenner og binder til minst to distinkte bindingssteder på β -amyloid proteinet
 hvor nevnte minst to distinkte bindingssteder hver omfatter minst to påfølgende
 aminosyrerester overveiende involvert i binding av antistoffet, hvor de minst to
 påfølgende aminosyrene er atskilt av minst én aminosyrerest ikke involvert i
 10 antistoffbinding eller i en betydelig mindre grad enn nevnte påfølgende
 aminosyrerester, som er –Phe-Phe- og –Lys-Leu-, henholdsvis, som representerer
 et første og andre bindingssete satt inn i følgende kjernesekvens:

Xaa₁ – Xaa₂ - Lys - Leu – Xaa₃ - Phe – Phe - Xaa₄ – Xaa₅ – Xaa₆, hvor

Xaa₁ er en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av His, Asn, Gln, Lys og
 15 Arg;

Xaa₂ er en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av Asn og Gln;

Xaa₃ er en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av Val, Ala, Leu, Met,
 Phe, norleucin og Ile

Xaa₄ er en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av Ala, Val, Leu og Ile;

20 Xaa₅ er en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av Glu og Asp,

Xaa₆ er en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av Glu og Asp og hvor
 nevnte aminosyrerester Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄, Xaa₅, Xaa₆, ikke er involvert i
 antistoffbinding eller i mindre til betydelig mindre grad sammenlignet med —
 Lys-Leu- og –Phe- Phe bindingssetet, henholdsvis.

25

I en annen utførelsesform ifølge oppfinnelsen tilveiebringes et kimært antistoff eller
 et fragment derav eller et humanisert antistoff eller et fragment derav, hvor

Xaa₁ er His eller Arg, men spesielt His;

Xaa₂ er Gln eller Asn, men spesielt Gln;

30 Xaa₃ er Val eller Leu, men spesielt Val;

Xaa₄ er Ala eller Val, men spesielt Ala;

Xaa₅ er Glu eller Asp, men spesielt Glu; og

Xaa₆ er Asp eller Glu, men spesielt Asp.

I én utførelsesform ifølge oppfinnelsen tilveiebringes et kimært antistoff eller et fragment derav eller et humanisert antistoff eller et fragment derav som gjenkjenner og binder til minst to distinkte bindingssteder på β -amyloid proteinet

5 hvor nevnte minst to distinkte bindingssteder hver omfatter minst to påfølgende aminosyrerester overveiende involvert i binding av antistoffet, som er - Phe - Phe - Ala - Glu -, spesielt - Phe - Phe - Ala -, men spesielt - Phe - Phe - og - Lys - Leu -, henholdsvis og hvor nevnte minst to distinkte bindingssteder fremviser aminosyresekvens -Val - Phe - Phe - Ala - Glu - Asp - vist i SEKV ID NR: 7 og

10 aminosyresekvens His - Gln - Lys - Leu - Val - vist i SEKV ID NR: 8, henholdsvis.

I én utførelsesform ifølge oppfinnelsen tilveiebringes et kimært antistoff eller et fragment derav eller et humanisert antistoff eller et fragment derav, som gjenkjenner og binder til minst ett distinkt bindingssete, spesielt til minst to

15 distinkte bindingssteder, nærmere bestemt til minst tre distinkte bindingssteder på β -amyloid proteinet hvor de nevnte minst ene eller nevnte minst to distinkte bindingssettene omfatter minst én og minst to påfølgende aminosyrerester, henholdsvis, hovedsakelig involvert i binding av antistoffet, som er - Phe - Phe - og - Lys - Leu - og -His-, henholdsvis, hvor nevnte distinkte bindingssteder er satt

20 inn i aminosyresekvensen -Val - Phe - Phe - Ala - Glu- og aminosyresekvensen - His - Gln - Lys - Leu - Val -, henholdsvis.

I en annen utførelsesform ifølge oppfinnelsen omfatter det kimære antistoffet eller et fragment derav eller et humanisert antistoff eller et fragment derav et antigen

25 gjenkjennelses- og bindingssete som gjenkjenner og binder til minst to distinkte bindingssteder på β -amyloid proteinet hvor nevnte minst to distinkte bindingssteder hver omfatter minst to påfølgende aminosyrerester innenfor aminosyresekvensen gitt i SEKV ID NR: 7 og 8, henholdsvis, hvor nevnte påfølgende aminosyrerester, spesielt -Phe- Phe- og -Lys-Leu-, er overveiende involvert i binding av β -amyloid

30 proteinet.

I en ytterligere spesifikk utførelsesform ifølge oppfinnelsen tilveiebringes et antistoff eller et fragment derav ifølge oppfinnelsen, som binder til 4 distinkte bindingssteder på β -amyloid proteinet hvor nevnte 4 distinkt bindingssteder omfatter

2 bindings seter hver omfattende én aminosyrerest og 2 bindings seter hver omfattende to påfølgende aminosyrerester, hvilke rester er overveiende involvert i binding av antistoffet, hvor nevnte 4 distinkte bindings seter er lokalisert i tett nærhet til hverandre på β -amyloid proteinet og hvor nevnte 4 bindings seter er

5 atskilt av minst én aminosyrerest ikke involvert i antistoffbinding eller involvert i binding men i en betydelig mindre grad sammenlignet med nevnte ene aminosyrerest og nevnte to påfølgende aminosyrerester av de 4 distinkte bindings setene således danner en konformasjonell diskontinuerlig epitop.

Spesielt er de første av de to påfølgende aminosyrerestene overveiende involvert i

10 binding av antistoffet –Lys-Leu- og de andre av de minst to påfølgende aminosyrerestene er –Phe-Phe-, den første av enkelt aminosyrerestene er -His- og den andre av enkelt aminosyrerestene er -Asp- satt inn innenfor følgende kjernesekvens:

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

15 hvor

Xaa₁ er en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av His, Asn, Gln, Lys og Arg, men spesielt His;

Xaa₂ er en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av Asn og Gln, men spesielt Gln;

20 Xaa₃ er en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av Ala, Val, Leu, norleucin, Met, Phe og Ile, spesielt Val;

Xaa₄ er en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av Ala, Val, Leu, Ser og Ile, spesielt Ala;

25 Xaa₅ er en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av Glu og Asp, spesielt Glu;

Xaa₆ er en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av Ala, Val, Leu, norleucin, Met, Phe og Ile, spesielt Val; og hvor nevnte aminosyrerester Xaa₁, Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄, Xaa₅, Xaa₆, ikke er involvert i antistoffbinding eller er involvert i binding men i en betydelig mindre grad sammenlignet med –His-, –Asp-, -Lys-

30 Leu og –Phe-Phe- bindings setet.

I én utførelsesform angår oppfinnelsen et antistoff eller et fragment derav ifølge oppfinnelsen, som binder til 4 distinkte bindings seter på β -amyloid proteinet, hvor nevnte 4 distinkte bindings seter omfatter to bindings seter hver omfattende én

aminosyrerest og to bindings seter hver omfattende to påfølgende aminosyrerester, hvor de første av de to påfølgende aminosyrerestene overveiende involvert i binding av antistoffet er –Lys-Leu- og de andre av de minst to påfølgende aminosyrerestene er –Phe-Phe-, den første av enkelt
 5 aminosyrerestene er -His- og den andre av enkelt aminosyrerestene er -Asp- satt inn innenfor følgende kjernesekvens:

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

hvor

Xaa₁ er en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av His, Asn, Gln, Lys og
 10 Arg, men spesielt His;

Xaa₂ er en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av Asn og Gln, men spesielt Gln ;

Xaa₃ er en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av Ala, Val, Leu, norleucin, Met, Phe og Ile, spesielt Val;

15 Xaa₄ er en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av Ala, Val, Leu, Ser og Ile, spesielt Ala;

Xaa₅ er en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av Glu og Asp, spesielt Glu;

20 Xaa₆ er en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av Ala, Val, Leu, norleucin, Met, Phe og Ile, spesielt Val; og hvor nevnte aminosyrerester Xaa₁, Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄, Xaa₅, Xaa₆, ikke er involvert i antistoffbinding eller er involvert i binding men i en betydelig mindre grad sammenlignet med –His-, –Asp-, -Lys-Leu og –Phe-Phe- bindingssetet.

25 I en spesifikk utførelsesform ifølge oppfinnelsen danner gjenkjennelses- og bindingssetene som definert her tidligere en konformasjonell diskontinuerlig epitop lokalisert i en region av β -amyloid proteinet mellom aminosyrerestene 12 til 24, spesielt mellom restene 14 til 23, nærmere bestemt mellom aminosyrerestene 14 og 20, hvor de minst to distinkte gjenkjennelses- og bindingssetene hver
 30 omfattende minst 2 aminosyrerester, er lokalisert i posisjon 16 og 17 og i posisjon 19 og 20, henholdsvis og hvor det minst ene distinkte gjenkjennelses- og bindingssetet omfattende minst 1 aminosyrerest er lokalisert i posisjon 14, hvilke rester er overveiende involvert i binding av β -amyloid proteinet og hvor nevnte

distinkte gjenkjennelses- og bindings seter er i det minste på én side flankert av aminosyrerester, spesielt restene 21 og 22 og atskilt av én aminosyrerest lokalisert ved posisjon 15 og 18, hvilke aminosyrerester ikke er direkte involvert i binding av antigenet eller, i det minste, i en betydelig mindre grad.

- 5 I enda en annen utførelsesform ifølge oppfinnelsen er nevnte minst tre distinkte gjenkjennelses- og bindings seter flankert på begge sider av aminosyrerester, spesielt restene 12 og 13 og restene 21 og 22 og er atskilt av én aminosyrerest lokalisert i posisjon 15 og 18, hvilke aminosyrerester ikke er direkte involvert i binding av antigenet eller, i det minste, i en betydelig mindre grad.

10

I en spesifikk utførelsesform er nevnte påfølgende aminosyrerester, spesielt –Lys-Leu- i posisjon 16 og 17 og –Phe- Phe- i posisjon 19 og 20, som er overveiende involvert i binding av β -amyloid proteiner, satt inn i følgende kjerneregion:

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

- 15 I en annen spesifikk utførelsesform er nevnte aminosyrerester, spesielt –Lys-Leu- i posisjon 16 og 17 og –Phe- Phe- i posisjon 19 og 20 og –His- i posisjon 14, som er overveiende involvert i binding av β -amyloid proteinet, satt inn i følgende kjerneregion:

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

20

- I en annen utførelsesform ifølge oppfinnelsen tilveiebringes et humanisert antistoff eller et fragment derav som omfatter i den lette kjede og tunge kjede variable regionen, henholdsvis, minst én CDR av ikke-human opprinnelse, spesielt to CDR'er av ikke-human opprinnelse, nærmere bestemt tre CDR av ikke-human opprinnelse, innesluttet i én eller flere human eller primat-avledete struktur ("framework")-regioner og, eventuelt, en konstant region avledet av et antistoff fra human eller primat kilde, hvilket humanisert antistoff eller fragment derav er i stand til å spesifikt gjenkjenne og binde β -amyloid protein, spesielt et β -amyloid monomer peptid, nærmere bestemt et β -amyloid polymer peptid, enda mer
- 25

spesifikt β -amyloid fibre, fibriller eller filamenter isolert eller som del av et β -amyloid plakk, ved en epitop omfattende følgende aminosyresekvens (SEKV ID NR: 11):

- Xaa₁ – Xaa₂ - Lys - Leu – Xaa₃ - Phe – Phe- Xaa₄ – Xaa₅ – Xaa₆, hvor
- 5 Xaa₁ er en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av His, Asn, Gln, men spesielt His;
- Xaa₂ er en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av Asn og Gln, men spesielt Gln; og
- 10 Xaa₃ er en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av Val, Leu og Ile, men spesielt Val;
- Xaa₄ er en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av Ala og Val, men spesielt Ala;
- Xaa₅ er en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av Glu og Asp, men spesielt Glu;
- 15 Xaa₆ er en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av Glu og Asp, men spesielt Asp.

I enda en annen utførelsesform ifølge oppfinnelsen tilveiebringes et humanisert antistoff eller et fragment derav som omfatter i den lette kjede og tunge kjede

20 variable regionen, henholdsvis, minst én CDR av ikke-human opprinnelse, spesielt to CDR'er av ikke-human opprinnelse, nærmere bestemt tre CDR av ikke-human opprinnelse, innesluttet i én eller flere humant eller primat-avledete struktur ("framework")-regioner og, eventuelt, en konstant region avledet av et antistoff fra

25 human eller primat kilde, hvilket humanisert antistoff eller fragment derav er i stand til å spesifikt gjenkjenne og binde β -amyloid protein, spesielt et β -amyloid monomer peptid, nærmere bestemt et β -amyloid polymer peptid, enda mer spesielt β -amyloid fibre, fibriller eller filamenter isolert eller som del av et β -amyloid plakk, ved en epitop omfattende følgende aminosyresekvens:

- His – Xaa₂ - Lys - Leu – Xaa₃ - Phe – Phe- Xaa₄ – Xaa₅ – Xaa₆, hvor
- 30 Xaa₂ er en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av Asn og Gln, men spesielt Gln; og
- Xaa₃ er en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av Val, Leu og Ile, men spesielt Val;

Xaa₄ er en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av Ala og Val, men spesielt Ala;

Xaa₅ er en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av Glu og Asp, men spesielt Glu;

- 5 Xaa₆ er en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av Glu og Asp, men spesielt Glu; og hvor nevnte aminosyrerester Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄, Xaa₅, Xaa₆, ikke er involvert i antistoffbinding eller i mindre grad sammenlignet med –His- og –Lys-Leu- og -Phe-Phe- bindingssetet.

- 10 I en spesifikk utførelsesform ifølge oppfinnelsen, blir CDR'en av ikke-human opprinnelse oppnådd fra et donor antistoff, men spesielt fra et murint donor antistoff, fremkalt mot et antigen-fragment som ikke inneholder nevnte distinkte bindingssete. Dette skiftet i epitop regionen kan i det minste delvis ha blitt forårsaket av anvendelse av en supramolekylær antigen konstruksjon omfattende
- 15 et antigen-peptid svarende til aminosyresekvensen av β -amyloid peptidet, spesielt av β -amyloid peptid A β ₁₋₁₆, modifisert med en hydrofil gruppe slik som for eksempel polyetylenglykol (PEG), hvor nevnte hydrofile gruppe er kovalent bundet til hver av de terminale enden av det antigene peptidet gjennom minst én, spesielt én eller to aminosyrer slik som for eksempel lysin, glutaminsyre og cystein eller
- 20 hvilken som helst annen egnet aminosyre eller aminosyreanalog som er i stand til å tjene som et koblingsorgan for kobling av den hydrofile gruppen til peptid-fragmentet, som beskrevet her nedenfor i immuniseringsprosessen. Når en PEG blir anvendt som den hydrofile gruppen, er de frie PEG terminalene kovalent bundet til fosfatidyletanolamin eller hvilken som helst annen forbindelse egnet til å
- 25 fungere som forankringselementet, for eksempel for å forankre antigen konstruksjonen i dobbeltlaget i et liposom som beskrevet her.

- Spesielt blir CDR'en av ikke-human opprinnelse oppnådd fra et murint donor antistoff som oppviser de karakteristiske egenskapene av ACI-01-Ab7C2 (også
- 30 betegnet "mC2" gjennom hele søknaden) deponert 1. desember 2005 ved "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) i Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Branuschweig, under

bestemmelsene ifølge Budapestkonvensjonen under aksesjonsnummer DSM ACC2750).

I én utførelsesform ifølge oppfinnelsen blir CDR'en av ikke-human opprinnelse
5 oppnådd fra murint donor antistoff ACI-01-Ab7C2 (også betegnet "mC2" gjennom
hele søknaden) deponert 1. desember 2005 ved "Deutsche Sammlung von
Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) i Braunschweig, Mascheroder
Weg 1 B, 38124 Branuschweig, under bestemmelsene ifølge
Budapestkonvensjonen under aksesjonsnummer DSM ACC2750).

10

Også anvendelse av lipid A som del av immuniseringsprotokollen kan ha bidratt til
en forandring i epitop regionen.

I en spesifikk utførelsesform angår oppfinnelsen et humanisert antistoff eller et
15 fragment derav omfattende integrert i human eller primat-avledete struktur
("framework")-regioner minst ett peptid med en aminosyresekvens valgt fra
gruppen av sekvenser bestående av SEKV ID NR: 2 som representerer CDR2 og
SEKV ID NR: 3 som representerer CDR3 fra den tunge kjede variable regionen
(HCVR) og SEKV ID NR: 4 som representerer CDR1 av den lette kjede variable
20 regionen (LCVR).

I en annen utførelsesform angår oppfinnelsen et humanisert antistoff eller et
fragment derav, hvor nevnte humaniserte antistoff omfatter integrert i human eller
primat-avledete tung kjede struktur ("framework")-regioner minst ett peptid med en
25 aminosyresekvens valgt fra gruppen av sekvenser bestående av SEKV ID NR: 2
som representerer CDR2 og SEKV ID NR: 3 som representerer CDR3 fra den
tunge kjede variable regionen (HCVR).

I enda en annen utførelsesform angår oppfinnelsen et humanisert antistoff eller et
fragment derav, hvor nevnte humaniserte antistoff omfatter integrert i human- eller
30 primat-avledete lett kjede struktur ("framework")-regioner et peptid med en
aminosyresekvens ifølge SEKV ID NR: 4 som representerer CDR1 fra den lette
kjede variable regionen (LCVR).

Spesielt angår oppfinnelsen en lett kjede variabel region (LCVR) omfattende integrert i human- eller primat-avledete struktur ("framework")-regioner minst ett peptid med en aminosyresekvens ifølge SEKV ID NR: 4 som representerer CDR1 fra den lette kjede variable regionen (LCVR).

5

I en annen spesifikk utførelsesform angår oppfinnelsen en tung kjede variabel region (HCVR) omfattende integrert i human- eller primat-avledete struktur ("framework")-regioner minst ett peptid med en aminosyresekvens valgt fra gruppen av sekvenser bestående av SEKV ID NR: 2 som representerer CDR2 og
10 SEKV ID NR: 3 som representerer CDR3 fra den tunge kjede variable regionen (HCVR).

Oppfinnelsen angår videre et humanisert antistoff eller et fragment derav, som omfatter integrert i human- eller primat-avledete struktur ("framework")-regioner
15 minst to peptider, hvilke peptider er forskjellige og fremviser en aminosyresekvens valgt fra gruppen av sekvenser bestående av SEKV ID NR:1 som representerer CDR1, SEKV ID NR: 2 som representerer CDR2 og SEKV ID NR: 3 som representerer CDR3 fra den tunge kjede variable regionen (HCVR) og SEKV ID NR: 4 som representerer CDR1, SEKV ID NR: 5 som representerer CDR2 og
20 SEKV ID NR: 6 som representerer CDR3 fra den lette kjede variable regionen (LCVR) hvor samme CDR ikke kan være til stede to ganger i antistoffet. Spesielt, dersom de minst to CDR'ene til stede begge er CDR'er fra lett kjede variabel region (LCVR), må minst én av nevnte CDR'er være CDR1 representert ved SEKV ID NR: 4.

25

Også omfattet av oppfinnelsen er et humanisert antistoff eller et fragment derav omfattende integrert i human- eller primat-avledete tung kjede struktur ("framework")-regioner minst to peptider med en aminosyresekvens valgt fra gruppen av sekvenser bestående av SEKV ID NR: 1 som representerer CDR1,
30 SEKV ID NR: 2 som representerer CDR2 og SEKV ID NR: 3 som representerer CDR3 fra den tunge kjede variable regionen (HCVR), men spesielt et humanisert antistoff eller et fragment derav hvor samme CDR ikke kan være til stede to ganger i antistoffet.

Spesielt angår oppfinnelsen en tung kjede variabel region (HCVR) omfattende integrert i human- eller primat-avledete tung kjede struktur ("framework")-regioner minst to peptider med en aminosyresekvens valgt fra gruppen av sekvenser
 5 bestående av SEKV ID NR: 1 som representerer CDR1, SEKV ID NR: 2 som representerer CDR2 og SEKV ID NR: 3 som representerer CDR3 fra den tunge kjede variable regionen (HCVR).

I en ytterligere utførelsesform angår oppfinnelsen et humanisert antistoff eller et
 10 fragment derav, omfattende integrert i human- eller primat-avledete lett kjede struktur ("framework")-regioner minst to peptider med en aminosyresekvens valgt fra gruppen av sekvenser bestående av SEKV ID NR: 4 som representerer CDR1, SEKV ID NR: 5 som representerer CDR2 og SEKV ID NR: 6 som representerer CDR3 fra den lette kjede variable regionen (LCVR).

15 Spesielt angår oppfinnelsen en lett kjede variabel region (LCVR), som har integrert i human- eller primat-avledete lett kjede struktur ("framework")-regioner minst to peptider med en aminosyresekvens valgt fra gruppen av sekvenser bestående av SEKV ID NR: 4 som representerer CDR1, SEKV ID NR: 5 som representerer
 20 CDR2 og SEKV ID NR: 6 som representerer CDR3 fra den lette kjede variable regionen (LCVR), hvor samme CDR ikke kan være til stede to ganger i antistoffet og, spesielt, minst én av nevnte CDR'er må være CDR1 representert ved SEKV ID NR: 4.

25 Oppfinnelsen angår også et humanisert antistoff eller et fragment derav, omfattende integrert i human- eller primat-avledete tung kjede struktur ("framework")-regioner peptider med en aminosyresekvens ifølge SEKV ID NR: 1 som representerer CDR1, SEKV ID NR: 2 som representerer CDR2 og SEKV ID NR: 3 som representerer CDR3 fra den tunge kjede variable regionen (HCVR),
 30 spesielt i rekkefølgen angitt ovenfor.

Spesielt angår oppfinnelsen en tung kjede variabel region (HCVR) omfattende integrert i human- eller primat-avledete tung kjede struktur ("framework")-regioner

peptider med en aminosyresekvens ifølge SEKV ID NR: 1 som representerer CDR1, SEKV ID NR: 2 som representerer CDR2 og SEKV ID NR: 3 som representerer CDR3 fra den tunge kjede variable regionen (HCVR), spesielt i rekkefølgen angitt ovenfor.

5

Også omfattet av oppfinnelsen er et humanisert antistoff eller et fragment derav omfattende integrert i human- eller primat-avledete lett kjede struktur ("framework")-regioner peptider med en aminosyresekvens ifølge SEKV ID NR: 4 som representerer CDR1, SEKV ID NR: 5 som representerer CDR2 og SEKV ID NR: 6 som representerer CDR3 fra den lette kjede variable regionen (LCVR), spesielt i rekkefølgen angitt ovenfor.

Spesielt angår oppfinnelsen en lett kjede variabel region (LCVR) omfattende integrert i human- eller primat-avledete lett kjede struktur ("framework")-regioner peptider med en aminosyresekvens ifølge SEKV ID NR: 4 som representerer CDR1, SEKV ID NR: 5 som representerer CDR2 og SEKV ID NR: 6 som representerer CDR3 fra den lette kjede variable regionen (LCVR), spesielt i rekkefølgen angitt ovenfor.

Oppfinnelsen angår også et humanisert antistoff eller et fragment derav, som omfatter integrert i human- eller primat-avledete struktur ("framework")-regioner minst tre peptider med en aminosyresekvens valgt fra gruppen av sekvenser bestående av SEKV ID NR: 1 som representerer CDR1, SEKV ID NR: 2 som representerer CDR2 og SEKV ID NR: 3 som representerer CDR3 fra den tunge kjede variable regionen (HCVR) og SEKV ID NR: 4 som representerer CDR1, SEKV ID NR: 5 som representerer CDR2 og SEKV ID NR: 6 som representerer CDR3 fra den lette kjede variable regionen (LCVR), men spesielt et humanisert antistoff eller et fragment derav hvor samme CDR ikke kan være til stede to ganger i antistoffet.

30

I en annen utførelsesform angår oppfinnelsen et humanisert antistoff eller et fragment derav, hvilket antistoff omfatter integrert i human- eller primat-avledete struktur ("framework")-regioner minst fire peptider med en aminosyresekvens valgt

fra gruppen av sekvenser bestående av SEKV ID NR: 1 som representerer CDR1, SEKV ID NR: 2 som representerer CDR2 og SEKV ID NR:3 som representerer CDR3 fra den tunge kjede variable regionen (HCVR) og SEKV ID NR: 4 som representerer CDR1, SEKV ID NR: 5 som representerer CDR2 og SEKV ID NR: 6 som representerer CDR3 fra den lette kjede variable regionen (LCVR), men spesielt et humanisert antistoff eller et fragment derav hvor samme CDR ikke kan være til stede to ganger i antistoffet.

I enda en annen utførelsesform angår oppfinnelsen et humanisert antistoff eller et fragment derav, som omfatter integrert i human- eller primat-avledete struktur ("framework")-regioner minst fem peptider med en aminosyresekvens valgt fra gruppen av sekvenser bestående av SEKV ID NR: 1 som representerer CDR1, SEKV ID NR: 2 som representerer CDR2 og SEKV ID NR:3 som representerer CDR3 fra den tunge kjede variable regionen (HCVR) og SEKV ID NR: 4 som representerer CDR1, SEKV ID NR: 5 som representerer CDR2 og SEKV ID NR: 6 som representerer CDR3 fra den lette kjede variable regionen (LCVR), men spesielt et humanisert antistoff eller et fragment derav hvor samme CDR ikke kan være til stede to ganger i antistoffet.

I enda en annen utførelsesform angår oppfinnelsen et humanisert antistoff eller et fragment derav, som omfatter integrert i human- eller primat-avledete struktur ("framework")-regioner peptider med en aminosyresekvens ifølge SEKV ID NR: 1 som representerer CDR1, SEKV ID NR: 2 som representerer CDR2 og SEKV ID NR: 3 som representerer CDR3 fra den tunge kjede variable regionen (HCVR) og SEKV ID NR: 4 som representerer CDR1, SEKV ID NR: 5 som representerer CDR2 og SEKV ID NR: 6 som representerer CDR3 fra den lette kjede variable regionen (LCVR).

I en spesifikk utførelsesform angår oppfinnelsen et humanisert antistoff, en tung kjede variabel region (HCVR) eller et fragment derav, hvor nevnte humaniserte antistoff, tung kjede variabel region (HCVR) eller fragment derav omfatter integrert i human- eller primat-avledete tung kjede struktur ("framework")-regioner minst et

peptid med en aminosyresekvens ifølge SEKV ID NR: 2 som representerer CDR2 fra den tunge kjede variable regionen (HCVR).

I en annen spesifikk utførelsesform angår oppfinnelsen et humanisert antistoff, en
 5 tung kjede variabel region (HCVR) eller et fragment derav, hvor nevnte humaniserte antistoff, tung kjede variabel region (HCVR) eller fragment derav omfatter integrert i human- eller primat-avledete tung kjede struktur ("framework")-regioner minst et peptid med en aminosyresekvens ifølge SEKV ID NR: 3 som representerer CDR3 fra den tunge kjede variable regionen (HCVR).

10

I en annen spesifikk utførelsesform angår oppfinnelsen et humanisert antistoff, tung kjede variabel region (HCVR) eller et fragment derav, hvilket antistoff, tung kjede variabel region (HCVR) eller fragment derav omfatter integrert i human- eller primat-avledete tung kjede struktur ("framework")-regioner minst to peptider med
 15 en aminosyresekvens ifølge SEKV ID NR: 1 som representerer CDR1 og SEKV ID NR: 2 som representerer CDR2 fra den tunge kjede variable regionen (HCVR).

I en annen spesifikk utførelsesform angår oppfinnelsen et humanisert antistoff, en tung kjede variabel region (HCVR) eller et fragment derav, hvilket antistoff, tung
 20 kjede variabel region (HCVR) eller fragment derav omfatter integrert i human- eller primat-avledete tung kjede struktur ("framework")-regioner minst to peptider med en aminosyresekvens ifølge SEKV ID NR: 1 som representerer CDR1 og SEKV ID NR: 3 som representerer CDR3 fra den tunge kjede variable regionen (HCVR).

I en annen spesifikk utførelsesform angår oppfinnelsen et humanisert antistoff, en tung kjede variabel region (HCVR) eller et fragment derav, hvilket antistoff, tung kjede variabel region (HCVR) eller fragment derav omfatter integrert i human- eller primat-avledete tung kjede struktur ("framework")-regioner minst to peptider med en aminosyresekvens ifølge SEKV ID NR: 2 som representerer CDR2 og SEKV ID
 25 NR: 3 som representerer CDR3 fra den tunge kjede variable regionen (HCVR).

30

I en annen spesifikk utførelsesform angår oppfinnelsen et humanisert antistoff, en lett kjede variabel region (LCVR) eller et fragment derav, hvilket antistoff, lett kjede

variabel region (LCVR) eller fragment derav omfatter integrert i human- eller primat-avledete tung kjede struktur ("framework")-regioner minst to peptider med en aminosyresekvens ifølge SEKV ID NR: 4 som representerer CDR1 og SEKV ID NR: 5 som representerer CDR2 fra den lette kjede variable regionen (LCVR).

5

I en annen spesifikk utførelsesform angår oppfinnelsen et humanisert antistoff, en lett kjede variabel region (LCVR) eller et fragment derav, hvilket antistoff, lett kjede variabel region (LCVR) eller fragment derav omfatter integrert i human- eller primat-avledete tung kjede struktur ("framework")-regioner minst to peptider med
 10 en aminosyresekvens ifølge SEKV ID NR: 4 som representerer CDR1 og SEKV ID NR: 6 som representerer CDR3 fra den lette kjede variable regionen (LCVR).

Ytterligere omfattet av oppfinnelsen er et humanisert antistoff eller et fragment derav, hvor både den tunge kjede variable regionen (HCVR) og den lette kjede
 15 variable regionen (LCVR) fra mus C2 antistoffet hver bidrar med minst én av dens CDR-regioner til de minst to CDR-regionene av det humaniserte antistoffet. Det resulterende humaniserte antistoffet eller et fragment derav kan følgelig omfatte
 -minst en aminosyresekvens ifølge SEKV ID NR: 1 som representerer CDR1 (HCVR) i kombinasjon med en aminosyresekvens ifølge SEKV ID NR: 4 som
 20 representerer CDR1 (LCVR);
 -minst en aminosyresekvens ifølge SEKV ID NR: 2 som representerer CDR2 (HCVR) i kombinasjon med en aminosyresekvens ifølge SEKV ID NR: 4 som representerer CDR1 (LCVR);
 -minst en aminosyresekvens ifølge SEKV ID NR: 3 som representerer CDR3
 25 (HCVR) i kombinasjon med en aminosyresekvens ifølge SEKV ID NR: 4 som representerer CDR1 (LCVR);
 -minst en aminosyresekvens ifølge SEKV ID NR: 1 som representerer CDR1 (HCVR) i kombinasjon med en aminosyresekvens ifølge SEKV ID NR: 5 som representerer CDR2 (LCVR);
 30 -minst en aminosyresekvens ifølge SEKV ID NR: 2 som representerer CDR2 (HCVR) i kombinasjon med en aminosyresekvens ifølge SEKV ID NR: 5 som representerer CDR2 (LCVR);

-minst en aminosyresekvens ifølge SEKV ID NR:2 som representerer CDR2 (HCVR) i kombinasjon med en aminosyresekvens ifølge SEKV ID NR: 6 som representerer CDR3 (LCVR);

5 -minst en aminosyresekvens ifølge SEKV ID NR:1 som representerer CDR1 (HCVR) i kombinasjon med en aminosyresekvens ifølge SEKV ID NR: 6 som representerer CDR3 (LCVR);

-minst en aminosyresekvens ifølge SEKV ID NR: 3 som representerer CDR3 (HCVR) i kombinasjon med en aminosyresekvens ifølge SEKV ID NR: 5 som representerer CDR2 (LCVR);

10 -minst en aminosyresekvens ifølge SEKV ID NR: 3 som representerer CDR3 (HCVR) i kombinasjon med en aminosyresekvens ifølge SEKV ID NR: 6 som representerer CDR3 (LCVR).

I enda en annen utførelsesform angår oppfinnelsen et kimært antistoff eller et
15 fragment derav eller et humanisert antistoff eller et fragment derav som beskrevet her tidligere, hvilket antistoff omfatter en lett kjede og/eller en tung kjede konstant region av human eller primat opprinnelse.

I en ytterligere utførelsesform angår oppfinnelsen et kimært antistoff eller et
20 fragment derav eller et humanisert antistoff eller et fragment derav, hvor minst én, spesielt minst én men ikke mer enn 5, nærmere bestemt minst én men ikke mer enn 4, enda mer spesielt minst én men ikke mer enn 3, men spesielt minst én men ikke mer enn 2, av aminosyrene representative for lett kjede og/eller tung kjede CDR-regionene som gitt i SEKV ID NR: 1 – 6 er endret gjennom en konservativ
25 substitusjon slik at antistoffet opprettholder dets fullstendige funksjonalitet.

Spesielt angår oppfinnelsen et kimært antistoff eller et fragment derav eller et humanisert antistoff eller et fragment derav, hvori i CDR2 av den lette kjede variable regionen (LCVR) som gitt i SEKV ID NR: 5, Lys ved Kabat posisjon 50 er
30 erstattet av en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av Arg, Gln og Glu, spesielt av Arg.

Spesielt angår oppfinnelsen en lett kjede variabel region (LCVR) hvori i CDR2 som gitt i SEKV ID NR: 5, Lys ved Kabat posisjon 50 er erstattet av en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av Arg, Gln og Glu, spesielt av Arg.

I en annen utførelsesform angår oppfinnelsen et kimært antistoff eller et fragment
 5 derav eller et humanisert antistoff eller et fragment derav, hvori i CDR2 av den lette kjede variable regionen (LCVR) som gitt i SEKV ID NR: 5, Ser ved Kabat posisjon 53 blir erstattet av en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av Asn eller Thr, men spesielt av Asn.

10 Spesielt angår oppfinnelsen en lett kjede variabel region (LCVR) hvori i CDR2 som gitt i SEKV ID NR: 5, Ser ved Kabat posisjon 53 er erstattet av en aminosyrerest valgt fra gruppen bestående av Asn eller Thr, men spesielt av Asn.

I én utførelsesform ifølge oppfinnelsen tilveiebringes et kimært antistoff eller et
 15 fragment derav eller et humanisert antistoff eller et fragment derav, hvor den tunge kjede variable regionen (HCVR) har en aminosyresekvens som er 90%, spesielt 95%, nærmere bestemt 98% identisk med sekvensen gitt i SEKV ID NR: 15 og 16, henholdsvis.

20 I en annen utførelsesform ifølge oppfinnelsen tilveiebringes et kimært antistoff eller et fragment derav eller et humanisert antistoff eller et fragment derav, hvor den lette kjede variable regionen (LCVR) har en aminosyresekvens som er 90%, spesielt 95%, nærmere bestemt 98% identisk med sekvensen gitt i SEKV ID NR: 12 og 13, henholdsvis.

25 I enda en annen utførelsesform ifølge oppfinnelsen tilveiebringes et humanisert antistoff eller et fragment derav, hvor minst to, men spesielt tre, av CDR-regionene av den tunge kjede variable regionen (HCVR) har en aminosyresekvens som er 90%, spesielt 95%, nærmere bestemt 98% identisk med den tilsvarende CDR-regionen som gitt i SEKV ID NR: 1 – 3.

30

I en ytterligere utførelsesform ifølge oppfinnelsen tilveiebringes et humanisert antistoff eller et fragment derav, hvor minst to, men spesielt tre, av CDR-regionene av den lette kjede variable regionen (LCVR) har en aminosyresekvens som er

90%, spesielt 95%, nærmere bestemt 98% identisk med den tilsvarende CDR-regionen som gitt i SEKV ID NR: 4 – 6.

I enda en annen utførelsesform angår oppfinnelsen et kimært antistoff eller et
5 fragment derav eller et humanisert antistoff eller et fragment derav ifølge foreliggende oppfinnelse som beskrevet her tidligere hvor den tunge kjede variable regionen (HCVR) har en aminosyresekvens som er 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% eller 99% identisk med sekvensen gitt i SEKV ID NR: 15 og 16, henholdsvis.

10

I enda en annen utførelsesform angår oppfinnelsen et kimært antistoff eller et fragment derav eller et humanisert antistoff eller et fragment derav ifølge foreliggende oppfinnelse som beskrevet her tidligere hvor den lette kjede variable regionen (LCVR) har en aminosyresekvens som er 90%, 91%, 92%, 93%, 94%,
15 95%, 96%, 97%, 98% eller 99% identisk med sekvensen gitt i SEKV ID NR: 12 og 13, henholdsvis.

I enda en annen utførelsesform angår oppfinnelsen et kimært antistoff eller et fragment derav eller et humanisert antistoff eller et fragment derav ifølge
20 foreliggende oppfinnelse som beskrevet her tidligere, hvor minst én, spesielt minst to, men spesielt tre, av CDR-regionene av den tunge kjede variable regionen (HCVR) har en aminosyresekvens som er 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% eller 99% identisk med den tilsvarende CDR-regionen som gitt i SEKV ID NR: 1 – 3.

25

I enda en annen utførelsesform angår oppfinnelsen et kimært antistoff eller et fragment derav eller et humanisert antistoff eller et fragment derav ifølge foreliggende oppfinnelse som beskrevet her tidligere, hvor minst én, spesielt minst to, men spesielt tre, av CDR-regionene av den lette kjede variable regionen
30 (LCVR) har en aminosyresekvens som er 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% eller 99% identisk med den tilsvarende CDR-regionen som gitt i SEKV ID NR: 4 – 6.

I enda en annen utførelsesform angår oppfinnelsen et humanisert antistoff ifølge foreliggende oppfinnelse og som beskrevet her tidligere, hvor minst én av aminosyrene representative for akseptor struktur ("framework")-sekvensene oppnådd fra human kjønnselle V_H og V_K-sekvenser, henholdsvis er endret
 5 gjennom en substitusjon til en aminosyre fra den tilsvarende regionen av murint antistoff ACI-01-Ab7C2 eller en substitusjon konservativ dertil.

Spesielt angår oppfinnelsen en tung kjede variabel region og et humanisert antistoff omfattende denne tung kjede variable regionen, henholdsvis, hvor Trp
 10 ved Kabat posisjon 47 i akseptor struktur ("framework")-sekvensen oppnådd fra human kjønnselle V_H-sekvenser av KABAT undergruppe V_HIII fra den tunge kjede variable regionen er erstattet av en aminosyre valgt fra gruppen bestående av Leu, norleucin, Ile, Val, Met, Ala og Phe, spesielt Leu og Ile, men spesielt Leu slik som vist i SEKV ID NR: 15.

15

Oppfinnelsen angår videre en tung kjede variabel region og et humanisert antistoff omfattende denne tung kjede variable regionen, henholdsvis, hvor Arg ved Kabat posisjon 94 i akseptor struktur ("framework")-sekvensen oppnådd fra human kjønnselle V_H-sekvenser av KABAT undergruppe V_HIII fra den tunge kjede
 20 variable regionen er erstattet av en aminosyre valgt fra gruppen bestående av Ser og Thr, men spesielt av Ser slik som vist i SEKV ID NR: 15...

I enda en annen utførelsesform angår oppfinnelsen en tung kjede variabel region og et humanisert antistoff omfattende denne tung kjede variable regionen, henholdsvis, hvor Trp ved Kabat posisjon 47 i akseptor struktur ("framework")-
 25 sekvensen oppnådd fra human kjønnselle V_H-sekvenser av KABAT undergruppe V_HIII fra den tunge kjede variable regionen er erstattet av en aminosyre valgt fra gruppen bestående av Leu, norleucin, Ile, Val, Met, Ala og Phe, spesielt Leu og Ile, men spesielt Leu og Arg ved Kabat posisjon 94 er erstattet av en aminosyre
 30 valgt fra gruppen bestående av Ser og Thr, men spesielt av Ser slik som vist i SEKV ID NR: 15.

Oppfinnelsen angår videre en lett kjede variabel region og et humanisert antistoff omfattende denne lett kjede variable regionen, henholdsvis, hvor Gln ved Kabat posisjon 45 i akseptor struktur ("framework")-sekvensen oppnådd fra human kjønnselle V_K-sekvenser av KABAT undergruppe V_{KII} fra den lette kjede variable regionen er erstattet av en aminosyre valgt fra gruppen bestående av Lys, Arg, 5 Gln og Asn, spesielt av Lys og Arg, men spesielt av Lys.

Oppfinnelsen angår videre en lett kjede variabel region og et humanisert antistoff omfattende denne lett kjede variable regionen, henholdsvis, hvor Tyr ved Kabat 10 posisjon 87 i akseptor struktur ("framework")-sekvensen oppnådd fra human kjønnselle V_K-sekvenser av KABAT undergruppe V_{KII} fra den lette kjede variable regionen er erstattet av en aminosyre valgt fra gruppen bestående av Phe, Leu, Val, Ile og Ala, spesielt av Leu og Phe, men spesielt av Phe.

15 Oppfinnelsen angår videre en lett kjede variabel region og et humanisert antistoff omfattende denne lett kjede variable regionen, henholdsvis, hvor Lys ved Kabat posisjon 50 i CDR2-regionen oppnådd fra et mus monoklonalt antistoff, spesielt murint antistoff ACI-01-Ab7C2, slik som vist i SEKV ID NR: 12 er erstattet av en aminosyre valgt fra gruppen bestående av Arg, Gln, His og Asn, men spesielt av 20 Arg

I enda en annen utførelsesform angår oppfinnelsen en lett kjede variabel region og et humanisert antistoff omfattende denne lett kjede variable regionen, henholdsvis, hvor Asn ved Kabat posisjon 53 i CDR2-regionen oppnådd fra et mus monoklonalt 25 antistoff, spesielt murint antistoff ACI-01-Ab7C2, slik som vist i SEKV ID NR: 12 er erstattet av en aminosyre valgt fra gruppen bestående av Ala, Val, Leu, Ser og Ile; men spesielt Ser..

I enda en annen utførelsesform angår oppfinnelsen et humanisert antistoff, hvor 30 Trp ved Kabat posisjon 47 i akseptor struktur ("framework")-sekvensen oppnådd fra human kjønnselle V_H-sekvenser av KABAT undergruppe V_{HIII} av den tunge kjede variable regionen er erstattet av en aminosyre valgt fra gruppen bestående av Leu, norleucin, Ile, Val, Met, Ala og Phe, spesielt Leu og Ile, men spesielt Leu

og Arg ved Kabat posisjon 94 i akseptor struktur ("framework")-sekvensen oppnådd fra human kjønnselle V_H-sekvenser av KABAT undergruppe V_{HIII} fra den tunge kjede variable regionen er erstattet av en aminosyre valgt fra gruppen bestående av Ser og Thr, men spesielt av Ser som vist i SEKV ID NR: 15 og Tyr ved Kabat posisjon 87 i akseptor struktur ("framework")-sekvens oppnådd fra human kjønnselle V_K-sekvenser av KABAT undergruppe V_{KII} fra den lette kjede variable regionen er erstattet av en aminosyre valgt fra gruppen bestående av Phe, Leu, Val, Ile og Ala, spesielt av Leu og Phe, men spesielt av Phe.

I enda en annen utførelsesform angår oppfinnelsen en tung kjede variabel region og et humanisert antistoff omfattende denne tung kjede variable regionen, henholdsvis, hvor Trp ved Kabat posisjon 47 i akseptor struktur ("framework")-sekvensen oppnådd fra human kjønnselle V_H-sekvenser av KABAT undergruppe V_{HIII} fra den tunge kjede variable regionen som vist i SEKV ID NR: 15 er erstattet av Leu.

I enda en annen utførelsesform angår oppfinnelsen en tung kjede variabel region og et humanisert antistoff omfattende denne tung kjede variable regionen, henholdsvis, hvor Arg ved Kabat posisjon 94 i akseptor struktur ("framework")-sekvensen oppnådd fra human kjønnselle V_H-sekvenser av KABAT undergruppe V_{HIII} fra den tunge kjede variable regionen er erstattet av Ser slik som vist i SEKV ID NR: 15.

I enda en annen utførelsesform angår oppfinnelsen en tung kjede variabel region og et humanisert antistoff omfattende denne tung kjede variable regionen, henholdsvis, hvor Trp ved Kabat posisjon 47 i akseptor struktur ("framework")-sekvensen oppnådd fra human kjønnselle V_H-sekvenser av KABAT undergruppe V_{HIII} fra den tunge kjede variable regionen er erstattet av Leu og Ile, men spesielt Leu og Arg ved Kabat posisjon 94 i akseptor struktur ("framework")-sekvensen oppnådd fra human kjønnselle V_H-sekvenser av KABAT undergruppe V_{HIII} fra den tunge kjede variable regionen er erstattet med Ser slik som vist i SEKV ID NR: 15..

I enda en annen utførelsesform angår oppfinnelsen en lett kjede variabel region og et humanisert antistoff omfattende denne tung kjede variable regionen, henholdsvis, hvor Tyr ved Kabat posisjon 87 i akseptor struktur ("framework")-sekvensen oppnådd fra human kjønnselle V_K-sekvenser av KABAT undergruppe V_{KII} fra den lette kjede variable regionen er erstattet av Phe.

I enda en annen utførelsesform angår oppfinnelsen en tung kjede variabel region og et humanisert antistoff omfattende denne tung kjede variable regionen, henholdsvis, hvor Trp ved Kabat posisjon 47 i akseptor struktur ("framework")-sekvensen oppnådd fra human kjønnselle V_H-sekvenser av KABAT undergruppe V_{HIII} fra den tunge kjede variable regionen er erstattet av Leu og Ile, men spesielt Leu og Arg ved Kabat posisjon 94 i akseptor struktur ("framework")-sekvensen oppnådd fra human kjønnselle V_H-sekvenser av KABAT undergruppe V_{HIII} fra den tunge kjede variable regionen er erstattet av Ser slik som vist i SEKV ID NR: 15 og Tyr ved Kabat posisjon 87 i akseptor struktur ("framework")-sekvensen oppnådd fra human kjønnselle V_K-sekvenser av KABAT undergruppe V_{KII} fra den lette kjede variable regionen er erstattet av Phe..

I én utførelsesform angår oppfinnelsen en tung kjede variabel region og et humanisert antistoff omfattende denne tung kjede variable regionen, henholdsvis, hvor Trp ved Kabat posisjon 47 i akseptor struktur ("framework")-sekvensen oppnådd fra human kjønnselle V_H-sekvenser av KABAT undergruppe V_{HIII} fra den tunge kjede variable regionen er erstattet av en aminosyre valgt fra gruppen bestående av Leu, norleucin, Ile, Val, Met, Ala og Phe, spesielt Leu og Ile, men spesielt Leu og Arg ved Kabat posisjon 94 er erstattet av en aminosyre valgt fra gruppen bestående av Ser og Thr, men spesielt av Ser slik som vist i SEKV ID NR: 15 og hvor Lys ved Kabat posisjon 50 i CDR2-regionen oppnådd fra et mus monoklonalt antistoff, spesielt murint antistoff ACI-01-Ab7C2, er erstattet av en aminosyre valgt fra gruppen bestående av Arg, Gln, His og Asn, men spesielt av Arg.

I én utførelsesform angår oppfinnelsen en tung kjede variabel region og et humanisert antistoff omfattende den tunge kjede variable regionen, henholdsvis,

hvor Trp ved Kabat posisjon 47 i akseptor struktur ("framework")-sekvensen oppnådd fra human kjønnscekk V_H-sekvenser av KABAT undergruppe V_HIII fra den tunge kjede variable regionen er erstattet av en aminosyre valgt fra gruppen bestående av Leu, norleucin, Ile, Val, Met, Ala og Phe, spesielt Leu og Ile, men
 5 spesielt Leu og Arg ved Kabat posisjon 94 er erstattet av en aminosyre valgt fra gruppen bestående av Ser og Thr, men spesielt av Ser slik som vist i SEKV ID NR: 15 og hvor Asn ved Kabat posisjon 53 i CDR2-regionen oppnådd fra et mus monoklonalt antistoff, spesielt murint antistoff ACI-01-Ab7C2, er erstattet av en aminosyre valgt fra gruppen bestående av Ala, Val, Leu, Ser og Ile; men spesielt
 10 Ser.

I en spesifikk utførelsesform angår oppfinnelsen den lette kjede variable regionen ifølge SEKV ID NR: 12.

15 I en annen spesifikk utførelsesform ifølge oppfinnelsen tilveiebringes et humanisert antistoff, som omfatter den lette kjede variable regionen ifølge SEKV ID NR: 12.

I en spesifikk utførelsesform angår oppfinnelsen den lette kjede variable regionen
 20 omfattende signalsekvenser som vist i SEKV ID NR: 13.

I en annen spesifikk utførelsesform ifølge oppfinnelsen tilveiebringes et humanisert antistoff, som omfatter den fullstendige lette kjede variable regionen omfattende signalsekvenser som vist i SEKV ID NR: 13.

25

I en annen spesifikk utførelsesform ifølge oppfinnelsen tilveiebringes et humanisert antistoff, som omfatter den lette kjede variable regionen ifølge SEKV ID NR: 12 og den lette kjede konstante regionen ifølge SEKV ID NR: 14.

30 I en annen spesifikk utførelsesform ifølge oppfinnelsen tilveiebringes et humanisert antistoff, som omfatter den fullstendige lett kjede variable regionen ifølge SEKV ID NR: 13 og den lette kjede konstante regionen ifølge SEKV ID NR: 14.

I en spesifikk utførelsesform angår oppfinnelsen den tunge kjede variable regionen ifølge SEKV ID NR: 15.

- 5 I en annen spesifikk utførelsesform ifølge oppfinnelsen tilveiebringes et humanisert antistoff, som omfatter den tunge kjede variable regionen ifølge SEKV ID NR: 15.

- 10 I en spesifikk utførelsesform angår oppfinnelsen den tunge kjede variable regionen omfattende signalsekvenser som vist i SEKV ID NR: 16.

- I en annen spesifikk utførelsesform ifølge oppfinnelsen tilveiebringes et humanisert antistoff, som omfatter den fullstendige tung kjede variable regionen omfattende signalsekvenser som vist i SEKV ID NR: 16.

15

- I en annen spesifikk utførelsesform ifølge oppfinnelsen tilveiebringes et humanisert antistoff, som omfatter den tunge kjede variable regionen ifølge SEKV ID NR: 15 og den tunge kjede konstante regionen ifølge SEKV ID NR: 17.

- 20 I en annen spesifikk utførelsesform ifølge oppfinnelsen tilveiebringes et humanisert antistoff, som omfatter den tunge kjede variable regionen ifølge SEKV ID NR: 16 og den tunge kjede konstante regionen ifølge SEKV ID NR: 17.

- I én utførelsesform hemmer det humaniserte antistoffet ifølge oppfinnelsen og som beskrevet her, ved ko-inkubasjon med et A β monomer peptid som har minst 30, spesielt minst 35, nærmere bestemt minst 38, enda mer spesielt minst 40 aminosyrerester og/eller et A β polymer oppløselig amyloid-peptid omfattende en rekke av nevnte A β monomer enheter, men spesielt med et A β ₁₋₄₂ monomer og/eller en A β polymer oppløselig amyloid-peptid omfattende en rekke av nevnte A β ₁₋₄₂ monomer enheter, spesielt ved et molar konsentrasjon-forhold av antistoff til
 25 A β ₁₋₄₂ på opptil 1:1000, spesielt på opptil 1:500, nærmere bestemt på opptil 1:300, enda mer spesielt på opptil 1:200, men spesielt ved et molar konsentrasjon-forhold på mellom 1:10 og 1:100, aggregering av A β monomereren til
 30 høymolekylære polymere fibriller.

Spesielt blir ko-inkuberingen av antistoffet ifølge oppfinnelsen med amyloid monomere og/eller polymere oppløselige amyloid-peptider utført i 24 timer til 60 timer, spesielt i 30 timer til 50 timer, nærmere bestemt i 48 timer, men spesielt 24
 5 timer, ved en temperatur på mellom 28°C og 40°C, spesielt på mellom 32°C og 38°C, nærmere bestemt ved 37°C.

I en spesifikk utførelsesform ifølge oppfinnelsen blir ko-inkubering med amyloid monomere og/eller polymere oppløselige amyloid-peptider utført i 24 timer ved en
 10 temperatur på 37°C.

Spesielt binder antistoffet, spesielt det humaniserte antistoffet ifølge oppfinnelsen omfattende hvilket som helst funksjonelt ekvivalent antistoff eller funksjonelle deler derav, til A β ₁₋₄₂ monomer peptid og/eller A β polymer oppløselig amyloid-peptid
 15 omfattende en rekke av nevnte A β ₁₋₄₂ monomere enheter og hemmer, ved ko-inkubering med A β ₁₋₄₂ monomer peptid og/eller A β polymer oppløselig amyloid-peptid omfattende en rekke av nevnte A β ₁₋₄₂ monomere enheter, aggregering av A β monomerene og/eller polymerene til høymolekylære polymere fibriller.

I én utførelsesform hemmer antistoffet, spesielt det humaniserte antistoffet ifølge
 20 oppfinnelsen omfattende hvilket som helst funksjonelt ekvivalent antistoff eller funksjonelle deler derav aggregering av A β monomerene og/eller A β oppløselige polymerer omfattende en rekke av nevnte A β monomere enheter til høymolekylære polymere fibriller med minst 50%, spesielt med minst 60%, spesielt med minst 65%, nærmere bestemt med minst 75%, enda mer bestemt
 25 med minst 80%, men spesielt med minst 85%-90% eller mer sammenlignet med de respektive amyloid-peptid monomerene inkubert i buffer (kontroll), ved et molar konsentrasjon-forhold av antistoff til A β ₁₋₄₂ på opptil 1:1000, spesielt ved et molar konsentrasjon-forhold på mellom 1:10 og 1:100, men spesielt ved et molar konsentrasjon-forhold på 1:10.

30 I en spesifikk utførelsesform ifølge oppfinnelsen hemmer antistoffet, spesielt det humaniserte antistoffet ifølge oppfinnelsen omfattende hvilket som helst

funksjonelt ekvivalent antistoff eller funksjonelle deler derav, aggregering av A β monomerene og/eller A β oppløselige polymerer omfattende en rekke av nevnte A β monomere enheter til høymolekylære polymere fibriller med minst 30% ved et molar konsentrasjon-forhold av antistoff til A β 1-42 på 1:100.

- 5 I en annen spesifikk utførelsesform ifølge oppfinnelsen hemmer antistoffet, spesielt det humaniserte antistoffet ifølge oppfinnelsen omfattende hvilket som helst funksjonelt ekvivalent antistoff eller funksjonelle deler derav aggregering av A β monomerene og/eller A β oppløselige polymerer omfattende en rekke av nevnte A β monomere enheter til høymolekylære polymere fibriller med minst 80%
10 ved et molar konsentrasjon-forhold av antistoff til A β 1-42 på 1:10.

Binding av antistoffene ifølge oppfinnelsen og som beskrevet her til amyloidogene monomere og/eller polymere peptider men, spesielt, til den amyloide formen (1-42) fører til hemming av aggregeringen av monomere og/eller polymere amyloidogene peptider til høymolekylære fibriller eller filamenter. Gjennom
15 hemming av aggregering av amyloidogene monomere og/eller polymere peptider kan antistoffene ifølge foreliggende oppfinnelse forebygge eller saktne dannelse av amyloide plakk, spesielt den amyloide formen (1-42), som er kjent å bli uoppløselig ved endring av sekundær konformasjon og å være den viktigste delen av amyloide plakk i hjerner hos syke dyr eller mennesker.

- 20 Potensialet for inhibering av aggregering for antistoffet ifølge oppfinnelsen kan bestemmes ved hvilken som helst egnet metode kjent på området, spesielt ved tetthetsgradient-ultrasentrifugering fulgt av en SDS-PAGE sedimenterings-analyse på en forhåndsdannet gradient og/eller ved en tioflavin T (Th-T) fluorescerende analyse.

- 25 I én utførelsesform angår oppfinnelsen et antistoff, spesielt et humanisert antistoff som beskrevet her omfattende hvilket som helst funksjonelt ekvivalent antistoff eller funksjonelle deler derav, hvilket antistoff, ved ko-inkubering, spesielt ved et molar konsentrasjon-forhold på mellom 1:5 og 1:1000, spesielt på mellom 1:10 og 1:500, nærmere bestemt ved et forhold på 1:10 til 1:300, enda mer bestemt ved et
30 forhold på mellom 1:10 og 1:100, med forhåndsformede høymolekylære polymere amyloide fibriller eller filamenter dannet ved aggregering av A β monomere

peptider som har minst 30, spesielt minst 35, nærmere bestemt minst 38, enda nærmere bestemt minst 40 aminosyrerester og, men spesielt A β ₁₋₄₂ monomere peptider, er i stand til å oppløse de forhåndsformede polymere fibrillene eller filamentene med minst 20%, spesielt med minst 30%, nærmere bestemt med minst 35%%, enda mer bestemt med minst 40%, men spesielt med minst 50% eller mer.

I en spesifikk utførelsesform ifølge oppfinnelsen blir aggregerings hemming og oppløsnings ("disaggregation")-potensialet av antistoffet, henholdsvis, bestemt ved tetthetsgradient ultrasentrifugering fulgt av en SDS-PAGE sedimenterings-analyse på en forhåndsformet gradient.

I en annen spesifikk utførelsesform ifølge oppfinnelsen blir aggregerings hemming og oppløsnings-potensialet av antistoffet, henholdsvis, bestemt ved tioflavin T (Th-T) fluorescerende analyse.

I en annen spesifikk utførelsesform blir antistoffet ifølge oppfinnelsen ko-inkubert med amyloid forhåndsformede høymolekylære polymere amyloide fibriller eller filamenter i 12 timer til 36 timer, spesielt i 18 timer til 30 timer, nærmere bestemt i 24 timer ved en temperatur på mellom 28°C og 40°C, spesielt på mellom 32°C og 38°C, nærmere bestemt ved 37°C.

Spesielt blir inkuberingen sammen med forhåndsformede høymolekylære polymere amyloide fibriller eller filamenter utført i 24 timer ved en temperatur på 37°C.

I en spesifikk utførelsesform ifølge oppfinnelsen er antistoffet, spesielt det humaniserte antistoffet ifølge oppfinnelsen omfattende hvilket som helst funksjonelt ekvivalent antistoff eller funksjonelle deler derav, i stand til å oppløse ("disaggregation") de forhåndsformede polymere fibrillene eller filamentene med minst 24% ved et molar konsentrasjon-forhold av antistoff til A β ₁₋₄₂ på 1:100.

I en annen spesifikk utførelsesform ifølge oppfinnelsen er antistoffet, spesielt det humaniserte antistoffet ifølge oppfinnelsen omfattende hvilket som helst funksjonelt ekvivalent antistoff eller funksjonelle deler derav i stand til å oppløse de

forhåndsformede polymere fibrillene eller filamentene med minst 32% ved et molar konsentrasjon-forhold av antistoff til A β ₁₋₄₂ på 1:10.

Gjennom oppløsning av amyloidogene polymere fibriller eller filamenter er antistoffene ifølge foreliggende oppfinnelse i stand til å forebygge eller sakte
5 dannelsen av amyloide plakk hvilket fører til en lindring av symptomene forbundet med sykdommen og en forsinkelse eller reversering av dens progresjon.

Følgelig er det en ytterligere utførelsesform ifølge oppfinnelsen å tilveiebringe et antistoff, spesielt et humanisert antistoff, omfattende hvilket som helst funksjonelt ekvivalent antistoff eller funksjonelle deler derav som beskrevet her, hvilket
10 antistoff er i stand til å redusere den totale mengden av A β i hjernen hos et dyr, spesielt et pattedyr, men spesielt et menneske som lider av en sykdom eller lidelse som fører til økt konsentrasjon av A β i hjernen.

I en annen utførelsesform angår oppfinnelsen et humanisert antistoff ifølge
15 oppfinnelsen og som beskrevet her tidligere, hvilket antistoff er "bi-effektivt" ved at det oppviser både en egenskap med hemming av aggregering så vel som en oppløsnings egenskap, spesielt paret med en høy grad av konformasjonell sensitivitet.

20 Spesielt angår oppfinnelsen et kimært antistoff eller et fragment derav eller et humanisert antistoff eller et fragment derav ifølge oppfinnelsen og som beskrevet her tidligere, hvilket antistoff, ved inkubering sammen med amyloid monomere og/eller polymere oppløselige amyloid-peptider, spesielt med β -amyloid monomere peptider slik som for eksempel A β monomere peptider 1-39; 1-40, 1-41 eller 1-42
25 og/eller ett polymer oppløselig β -amyloid peptid omfattende en rekke nevnte A β monomere enheter, men spesielt med et A β ₁₋₄₂ monomer og/eller et A β polymer oppløselig amyloid-peptid omfattende en rekke nevnte A β ₁₋₄₂ monomere enheter, hemmer aggregering av A β monomerene til høymolekylære polymere fibriller eller filamenter og, i tillegg, ved inkubering sammen med forhåndsformede
30 høymolekylære polymere amyloide fibriller eller filamenter dannet ved aggregering av amyloid monomere peptider, spesielt β -amyloid monomere peptider slik som for eksempel A β monomere peptider 1-39; 1-40, 1-41 eller 1-42, men spesielt A β ₁₋₄₂

monomere peptider, er i stand til å oppløse de forhåndsformede polymere fibrillene eller filamentene.

I et annet aspekt angår oppfinnelsen et kimært antistoff eller et fragment derav
 5 eller et humanisert antistoff eller et fragment derav ifølge foreliggende oppfinnelse
 og som beskrevet her tidligere, hvilket antistoff er i stand til å indusere en
 overgang av β -sheet konformasjonen mot en α -heliks og/eller en ikke-repetitiv
 struktur ("random coil")-konformasjon, men spesielt en ikke-repetitiv struktur-
 konformasjon, enda nærmere bestemt en ikke-repetitiv struktur-konformasjon ved
 10 en gitt lokalisering i molekylet, spesielt i omgivelsene til Tyr 10 og Val12 av A β -
 proteinet, som fører til en økning av "random coil"-konformasjonen på bekostning
 av β -sheet-konformasjonen og en forbedret solubilisering av de forhåndsformede
 høymolekylære polymere amyloid fibrillene eller filamentene. Spesielt blir
 reduksjonen av β -sheet konformasjonen minst 30%, spesielt til minst 35% og
 15 nærmere bestemt minst 40% og mer sammenlignet med de respektive
 forhåndsformede amyloid polymere fibrillene eller filamentene inkubert i buffer
 (kontroll).

Antistoffets potensiale med hensyn til å indusere en overgang i
 20 sekundærstrukturen blir bestemt ved faststoff- ^{13}C NMR spektroskopi men,
 spesielt, ved å måle integral intensitetene av konformasjonene av Tyr 10 og Val 12
 C β i A β_{1-42} -peptidet.

I en ytterligere utførelsesform ifølge oppfinnelsen tilveiebringes et kimært antistoff
 25 eller et fragment derav eller et humanisert antistoff eller et fragment derav ifølge
 foreliggende oppfinnelse og som beskrevet her tidligere omfattende minst én lett
 kjede eller et fragment derav eller minst én tung kjede eller et fragment derav,
 hvor nevnte antistoff eller fragment binder til en A β -monomer med en høy
 bindingsaffinitet med en K_D i et område på mellom minst ca. 1×10^{-7} M til minst ca.
 30 1×10^{-12} M, spesielt på minst ca. 1×10^{-8} M til minst ca. 1×10^{-11} M, nærmere
 bestemt på minst ca. 1×10^{-9} M til minst ca. 1×10^{-10} M, enda mer spesielt på
 minst ca. 1×10^{-8} M til minst ca. 2×10^{-8} M, men, fortrinnsvis, ikke oppviser noen
 signifikant kryssreaktivitet med amyloid forløperprotein (APP).

I en annen utførelsesform ifølge oppfinnelsen tilveiebringes et kimært antistoff eller et fragment derav eller et humanisert antistoff eller et fragment derav ifølge foreliggende oppfinnelse og som beskrevet her tidligere, omfattende minst én lett
 5 kjede eller et fragment derav eller minst én tung kjede eller et fragment derav, hvor nevnte antistoff eller fragment binder til en A β -fiber, fibrill eller filament med en høy bindingsaffinitet med en K_D i et område på mellom minst ca. 1×10^{-7} M til minst ca. 1×10^{-12} M, spesielt på minst ca. 1×10^{-8} M til minst ca. 1×10^{-11} M, nærmere bestemt på minst ca. 1×10^{-9} M til minst ca. 1×10^{-10} M, enda mer
 10 spesielt på minst ca. 2×10^{-9} M til minst ca. 5×10^{-9} M, men, fortrinnsvis, ikke viser noen signifikant kryssreaktivitet med amyloid forløperprotein (APP).

I en annen utførelsesform oppviser antistoffet ifølge oppfinnelsen og som beskrevet her tidligere eller et fragment derav, en bindingsaffinitet til en A β -fiber, fibrill eller filament som er minst 2 ganger, spesielt minst 4 ganger, spesielt minst
 15 10 ganger, spesielt minst 15 ganger, nærmere bestemt minst 20 ganger, men spesielt minst 25 ganger høyere enn bindingsaffiniteten til en A β -monomer.

I enda en annen utførelsesform tilveiebringes et kimært antistoff eller et fragment
 20 derav eller et humanisert antistoff eller et fragment derav som beskrevet her tidligere, hvilket antistoff hovedsakelig binder til aggregert A β , omfattende A β -plakk, i mammalsk, spesielt human hjerne men, fortrinnsvis, ikke viser noen signifikant kryssreaktivitet med amyloid forløperprotein (APP).

I et annet aspekt ved oppfinnelsen tilveiebringes det kimære antistoffet eller et fragment derav eller et humanisert antistoff eller et fragment derav som beskrevet
 25 her tidligere, hvilket antistoff hovedsakelig binder til oppløselig polymer amyloid, spesielt amyloid β (A β), omfattende A β -monomerer, i mammalsk, spesielt human hjerne men, fortrinnsvis, ikke viser noen signifikant kryssreaktivitet med amyloid
 30 forløperprotein (APP).

Videre tilveiebringes et kimært antistoff eller et fragment derav eller et humanisert antistoff eller et fragment derav ifølge oppfinnelsen og som beskrevet her tidligere,

hvilket antistoff betydelig reduserer mengden av A β plakk i mammalsk, spesielt human hjerne. Dette kan oppnås ved enten å binde antistoffet til plakket eller ved å forskyve likevekten mellom amyloid, spesielt amyloid β (A β), i dens uoppløselige og aggregerte tilstand mot dens oppløselige form ved å oppløse fibre til løselige poly- og monomere former ved å indusere en forandring i konformasjon og binde og stabilisere de oppløste og solubiliserte amyloide formene, spesielt amyloid β (A β) former, i vevet og/eller kroppsvæskene, spesielt hjernen. Gjennom aktiviteten av antistoffet ifølge oppfinnelsen blir perifer rensing og katabolisme følgelig favorisert heller enn avleiring innenfor vevet og/eller kroppsvæskene, spesielt hjernen. Den fordelaktige effekten av antistoffet ifølge oppfinnelsen kan følgelig oppnås uten binding av antistoffet til plakket.

Gjennom denne stabiliserende aktiviteten, er antistoffet ifølge oppfinnelsen i stand til å nøytralisere de toksiske effektene av polymerene og mindre aggregert oppløselig amyloid-protein, spesielt amyloid β (A β) protein, i vevet og/eller kroppsvæskene. I en spesifikk utførelsesform ifølge oppfinnelsen kan antistoffet ifølge oppfinnelsen følgelig oppnå dets fordelaktige effekter uten nødvendigvis å binde aggregert amyloid-beta i hjernen.

I et ytterligere aspekt ifølge oppfinnelsen tilveiebringes et humanisert antistoff eller et fragment derav ifølge foreliggende oppfinnelse og som beskrevet heri tidligere, omfattende minst én lett kjede eller et fragment derav eller minst én tung kjede eller et fragment derav som omfatter minst én, spesielt to og nærmere bestemt tre CDR-regioner oppnådd fra et mus donor antistoff, spesielt fra mus antistoff ACI-01-Ab7C2 (betegnet "mC2" og hC2 for det humaniserte C2-antistoffet, gjennom hele søknaden) deponert 1. desember 2005 ved "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) i Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig, under aksjonsnummer DSM ACC2750, hvor nevnte antistoff eller fragment derav har en affinitet til A β -antigenet som er minst 5 ganger, spesielt minst 8 ganger, nærmere bestemt minst 10 ganger, men spesielt minst 15 ganger høyere enn den av mus donor antistoffet.

Antistoffet ifølge foreliggende oppfinnelse kan, i én utførelsesform, være et helt antistoff (f.eks. med to fullengde lette kjeder og to fullengde tunge kjeder) av hvilken som helst isotype og subtype (f.eks., IgM, IgD, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgA1 og IgA2); men spesielt et antistoff av IgG4-isotypen; alternativt kan det, i
5 en annen utførelsesform, være et antigenbindende fragment (f.eks. Fab, F(ab')₂ og Fv) av et helt antistoff.

Oppfinnelsen angår følgelig også antigenbindende fragmenter av antistoffene beskrevet her. I én utførelsesform ifølge oppfinnelsen er fragmentet valgt fra
10 gruppen bestående av et Fab-fragment, et Fab'-fragment, et F(ab)₂-fragment og et Fv-fragment, omfattende produktene av et Fab immunglobulin ekspresjonsbibliotek og epitopbindende fragmenter av hvilke som helst av antistoffene og fragmentene nevnt ovenfor.

15 I en annen utførelsesform er antistoffet eller antigen-bindende fragment ifølge oppfinnelsen konjugert til polyetylenglykol. I enda en annen utførelsesform er den konstante regionen av antistoffet ifølge oppfinnelsen modifisert for å redusere minst én konstant region-mediert biologisk effektorfunksjon relativt til et umodifisert antistoff. I enda en annen utførelsesform omfatter antistoffet eller antigen-
20 bindende fragment ifølge oppfinnelsen en Fc-region som har en endret effektorfunksjon.

Oppfinnelsen angår videre et nukleotidmolekyl omfattende en nukleotidsekvens som koder for et kimært antistoff eller et fragment derav eller et humanisert
25 antistoff eller et fragment derav ifølge oppfinnelsen og som beskrevet her tidligere.

Spesielt angår oppfinnelsen et nukleotidmolekyl omfattende en nukleotidsekvens som koder for en strekning av påfølgende aminosyremolekyler som gitt i SEKV ID NR: 2 og 3, henholdsvis eller den komplementære sekvensen, som representerer
30 de komplementaritetsbestemmende regionene (CDR'ene) 2 og 3 av den tunge kjede variable regionen (HCVR).

Nærmere bestemt angår oppfinnelsen et nukleotidmolekyl omfattende en nukleotidsekvens som koder for en strekning av påfølgende aminosyremolekyler som gitt i SEKV ID NR: 4 eller den komplementære sekvensen, som representerer de komplementaritetsbestemmende regionene (CDR'ene) 1 av den lette kjede variable regionen (LCVR).

I en annen utførelsesform ifølge oppfinnelsen tilveiebringes et nukleotidmolekyl omfattende en nukleotidsekvens som gitt i SEKV ID NR: 18 og SEKV ID NR: 19 eller den komplementære sekvensen, som koder for aminosyresekvensen av CDR 2 og CDR 3, henholdsvis, av den tunge kjede variable regionen (HCVR).

I en annen utførelsesform ifølge oppfinnelsen tilveiebringes et nukleotidmolekyl omfattende en nukleotidsekvens som gitt i SEKV ID NR: 20 eller den komplementære sekvensen, som koder for nukleotidsekvensen av CDR 1 av den lette kjede variable regionen (LCVR).

I en annen utførelsesform ifølge oppfinnelsen tilveiebringes et nukleotidmolekyl omfattende en nukleotidsekvens ifølge SEKV ID NR: 21 eller den komplementære sekvensen, som koder for lett kjede variabel region.

I en annen utførelsesform ifølge oppfinnelsen tilveiebringes et nukleotidmolekyl omfattende en nukleotidsekvens ifølge SEKV ID NR: 22 eller den komplementære sekvensen, som koder for den fullstendige lette kjede variable regionen inkludert signalsekvenser.

I en annen utførelsesform ifølge oppfinnelsen tilveiebringes et nukleotidmolekyl omfattende en nukleotidsekvens som koder for den lette kjede variable regionen ifølge SEKV ID NR: 22 og den lette kjede konstante regionen ifølge SEKV ID NR: 23. Oppfinnelsen omfatter også den komplementære tråden av nevnte nukleotidmolekyl.

I en annen utførelsesform ifølge oppfinnelsen tilveiebringes et nukleotidmolekyl omfattende en nukleotidsekvens ifølge SEKV ID NR: 24 som koder for den tunge

kjede variable regionen. Oppfinnelsen omfatter også den komplementære tråden av nevnte nukleotidmolekyl.

5 I en annen utførelsesform ifølge oppfinnelsen tilveiebringes et nukleotidmolekyl omfattende en nukleotidsekvens ifølge SEKV ID NR: 25 som koder for den fullstendige tung kjede variable regionen inkludert signalsekvenser. Oppfinnelsen omfatter også den komplementære tråden av nevnte nukleotidmolekyl.

10 I en annen utførelsesform ifølge oppfinnelsen tilveiebringes et nukleotidmolekyl omfattende en nukleotidsekvens som koder for den tunge kjede variable regionen ifølge SEKV ID NR: 25 og den tunge kjede konstante regionen ifølge SEKV ID NR: 26. Oppfinnelsen omfatter også den komplementære tråden av nevnte nukleotidmolekyl.

15 Også omfattet ifølge foreliggende oppfinnelse er en nukleotidsekvens som hybridiserer til én av de ovenfor beskrevne antistoff-kodende nukleotidsekvensene ifølge oppfinnelsen, spesielt til den komplementære tråden derav, enten isolert eller som del av større nukleotidmolekyl.

20 Spesielt angår oppfinnelsen en nukleotidsekvens som hybridiserer under konvensjonelle hybridiseringsbetingelser, spesielt under stringente hybridiseringsbetingelser, til hvilken som helst av nukleotidsekvensene gitt i SEKV ID NR: 18-26 og 29 - 32, spesielt til den komplementære tråden derav.

25 I en annen utførelsesform ifølge oppfinnelsen tilveiebringes en ekspresjonsvektor omfattende nukleinsyremolekylet ifølge oppfinnelsen og som nevnt her tidligere.

I en annen utførelsesform ifølge oppfinnelsen tilveiebringes en celle omfattende en ekspresjonsvektor omfattende nukleinsyren ifølge oppfinnelsen og som nevnt heri
30 tidligere.

I enda en annen utførelsesform angår oppfinnelsen en sammensetning omfattende antistoffet ifølge oppfinnelsen, men spesielt et kimært antistoff eller et

fragment derav eller et humanisert antistoff eller et fragment derav ifølge oppfinnelsen og som beskrevet her tidligere omfattende hvilket som helst funksjonelt ekvivalent antistoff eller hvilket som helst derivat eller funksjonelle deler derav, i en terapeutisk effektiv mengde, spesielt en sammensetning som er
5 en farmasøytisk sammensetning eventuelt ytterligere omfattende en farmasøytisk akseptabel bærer.

I en annen utførelsesform ifølge oppfinnelsen omfatter nevnte sammensetning antistoffet i en terapeutisk effektiv mengde.

10

Ytterligere omfattet av oppfinnelsen er en blanding omfattende et antistoff, spesielt et monoklonalt antistoff ifølge oppfinnelsen, men spesielt et kimært antistoff eller et fragment derav eller et humanisert antistoff eller et fragment derav ifølge oppfinnelsen og som beskrevet her tidligere omfattende hvilket som helst
15 funksjonelt ekvivalent antistoff eller hvilket som helst derivat eller funksjonelle deler derav, i en terapeutisk effektiv mengde og, eventuelt, en ytterligere biologisk aktiv substans og/eller en farmasøytisk akseptabel bærer og/eller et fortynningsmiddel og/eller et tilsetningsmiddel.

20 Spesielt angår oppfinnelsen en blanding, hvor den ytterligere biologisk aktive substansen er en forbindelse anvendt ved medisinsk behandling av amyloidose, en gruppe sykdommer og lidelser forbundet med amyloid eller amyloidlignende protein slik som A β -proteinet involvert i Alzheimers sykdom.

25 I en annen utførelsesform ifølge oppfinnelsen kan den andre biologisk aktive substansen eller forbindelsen også være et terapeutisk middel som kan anvendes ved behandling av amyloidose forårsaket av amyloid β eller kan anvendes ved medisinsk behandling av andre nevrologiske lidelser.

30 Den andre biologisk aktive substansen eller forbindelsen kan utøve sin biologiske effekt ved samme eller en lignende mekanisme som antistoffet ifølge oppfinnelsen eller ved en relatert virkningsmekanisme eller ved et mangfold av relaterte og/eller ikke relaterte virkningsmekanismer.

Generelt kan den andre biologisk aktive forbindelsen omfatte nøytron transmisjon enhancere, psykoterapeutiske medikamenter, acetylcholinesterasehemmere, kalsiumkanalblokkere, biogene aminer, benzodiazepin beroligende midler, acetylcholin syntese, lagring eller frigjørings fremmere, acetylcholin postsynaptiske reseptor-agonister, monoamin oksidase-A eller -B inhibitorer, N-metyl-D-aspartat glutamat reseptorantagonister, ikke-steroide anti-inflammatoriske medikamenter, antioksidanter og serotonergisk reseptorantagonister.

Nærmere bestemt angår oppfinnelsen en blanding omfattende minst én forbindelse valgt fra gruppen bestående av forbindelser effektive mot oksidativt stress, anti-apoptotiske forbindelser, metall-chelatorer, inhibitorer av DNA-reparasjon slik som pirenzepin og metabolitter, 3-amino-1-propansulfonsyre (3APS), 1,3-propandisulfonat (1,3PDS), α -sekretase aktivatorer, β - og γ -sekretase-inhibitorer, tau-proteiner, neurotransmitter, β -sheet avbrytere ("breakers"), attraktanter for amyloid-beta rensende / depleterende cellulære komponenter, inhibitorer av N-terminalt trunkert amyloid-beta omfattende pyroglutamated amyloid-beta 3-42, anti-inflammatoriske molekyler eller kolinesterasehemmere (ChEI'er) slik som takrin, rivastigmin, donepezil og/eller galantamin, M1-agonister og andre medikamenter omfattende hvilket som helst amyloid eller tau modifierende medikament og næringssupplement, og næringssupplement, sammen med et antistoff ifølge foreliggende oppfinnelse og, eventuelt, en farmasøytisk akseptabel bærer og/eller et fortynningsmiddel og/eller et tilsetningsmiddel.

25

Oppfinnelsen angår videre en blanding, hvor forbindelsen er en kolinesterasehemmer (ChEI'er), spesielt en blanding, hvor forbindelsen er én valgt fra gruppen bestående av takrin, rivastigmin, donepezil, galantamin, niacin og memantin.

30

I en ytterligere utførelsesform kan blandingene ifølge oppfinnelsen omfatte niacin eller memantin sammen med et antistoff ifølge foreliggende oppfinnelse og,

eventuelt, en farmasøytisk akseptabel bærer og/eller et fortynningsmiddel og/eller et tilsetningsmiddel.

I enda en annen utførelsesform ifølge oppfinnelsen tilveiebringes blandinger som
 5 omfatter "atypiske antipsykotika" slik som for eksempel klozapin, ziprasidon, risperidon, aripiprazol eller olanzapin for behandling av positive og negative psykotiske symptomer omfattende hallusinasjoner, vrangforestillinger, tankeforstyrrelser (manifestert ved tydelig inkoherens, avsporing, flyktighet ("tangentiality") og bisarr eller desorganisert atferd, så vel som anhedoni,
 10 "flattened affect", apati og sosial tilbaketrekning, sammen med et antistoff, spesielt et monoklonalt antistoff ifølge oppfinnelsen, men spesielt et kimært antistoff eller et fragment derav eller et humanisert antistoff eller et fragment derav ifølge oppfinnelsen og som beskrevet her og, eventuelt, en farmasøytisk akseptabel bærer og/eller et fortynningsmiddel og/eller et tilsetningsmiddel.

15

I en spesifikk utførelsesform ifølge oppfinnelsen omfatter sammensetningene og blandingene ifølge oppfinnelsen og som beskrevet her tidligere antistoffet og den biologisk aktive substansen, henholdsvis, i en terapeutisk effektiv mengde.

20 Andre forbindelser som hensiktsmessig kan anvendes i blandinger i kombinasjon med antistoffet ifølge foreliggende oppfinnelse er beskrevet i WO 2004/058258 (se spesielt sidene 16 og 17) omfattende terapeutisk medikament-mål (side 36-39), alkansulfonsyrer og alkanolsvovelsyrer (sidene 39-51), kolinesterasehemmere (sidene 51-56), NMDA reseptorantagonister (sidene 56-58), østrogener (sidene
 25 58-59), ikke-steroid anti-inflammatoriske medikamenter (sidene 60-61), antioksidanter (sidene 61-62), peroksisom proliferator-aktivert reseptor (PPAR) agonister (sidene 63-67), kolesterolsenkende midler (sidene 68-75); amyloid inhibitorer (sidene 75-77), inhibitorer av amyloid dannelse (sidene 77-78), metall-chelatorer (sidene 78-79), antipsykotika og antidepressiva (sidene 80-82),
 30 næringssupplementer (sidene 83-89) og forbindelser som øker tilgjengeligheten av biologisk aktive substanser i hjernen (se sidene 89-93) og prodroger (sidene 93 og 94), hvilket dokument er inntatt her ved referanse.

I en annen utførelsesform angår oppfinnelsen en blanding omfattende antistoffet, spesielt et monoklonalt antistoff ifølge oppfinnelsen, men spesielt et kimært antistoff eller et fragment derav eller et humanisert antistoff eller et fragment derav ifølge oppfinnelsen og som beskrevet her tidligere og/eller den biologisk aktive substansen i en terapeutisk effektiv mengde.

Oppfinnelsen angår videre anvendelse av et antistoff, spesielt et monoklonalt antistoff ifølge oppfinnelsen, men spesielt et kimært antistoff eller et fragment derav eller et humanisert antistoff eller et fragment derav ifølge oppfinnelsen og som beskrevet her tidligere og/eller en funksjonell del derav og/eller en farmasøytisk sammensetning eller en blanding omfattende nevnte antistoff, for fremstilling av et medikament for behandling eller lindring av virkningene av amyloidose, en gruppe sykdommer og lidelser forbundet med dannelse av amyloide plakk omfattende sekundær amyloidose og aldersrelatert amyloidose slik som sykdommer omfattende, men ikke begrenset til, nevrologiske lidelser slik som Alzheimers sykdom (AD), Lewylegeme demens, Downs syndrom, arvelig hjerneblødning med amyloidose (Dutch type); Guam Parkinson-Demens komplekset; så vel som andre sykdommer som er basert på eller forbundet med amyloidlignende proteiner slik som progressiv supranukleær parese, multippel sklerose; Creutzfeldt Jakobs-sykdom, Parkinsons sykdom, HIV-relatert demens, ALS (amyotrop lateral sklerose), diabetes med debut i voksen alder; senil hjerteamyloidose; endokrine tumorer og andre, omfattende makuladegenerasjon.

Også omfattet av foreliggende oppfinnelse er en fremgangsmåte for fremstilling av et antistoff, spesielt et monoklonalt antistoff ifølge oppfinnelsen, men spesielt et kimært antistoff eller et fragment derav eller et humanisert antistoff eller et fragment derav ifølge oppfinnelsen og som beskrevet her tidligere og/eller en funksjonell del derav og/eller en farmasøytisk sammensetning eller en blanding omfattende nevnte antistoff og/eller en funksjonell del derav, spesielt i en terapeutisk effektiv mengde, for anvendelse ved en fremgangsmåte for forebygging, behandling eller lindring av virkningene av amyloidose, en gruppe sykdommer og lidelser forbundet med dannelse av amyloide plakk omfattende sekundær amyloidose og aldersrelatert amyloidose slik som sykdommer

omfattende, men ikke begrenset til, nevrologiske lidelser slik som Alzheimers sykdom (AD), Lewylegeme demens, Downs syndrom, arvelig hjerneblødning med amyloidose (Dutch type); Guam Parkinson-Demens komplekset; så vel som andre sykdommer som er basert på eller forbundet med amyloidlignende proteiner slik

5 som progressiv supranukleær parese, multippel sklerose; Creutzfeldt Jakobs-sykdom, Parkinsons sykdom, HIV-relatert demens, ALS (amyotrop lateral sklerose), diabetes som debuterer i voksen alder; senil hjerteamyloidose; endokrine tumorer og andre, inkludert makuladegenerasjon omfattende formulering av et antistoff, spesielt et monoklonalt antistoff ifølge oppfinnelsen,

10 men spesielt et kimært antistoff eller et fragment derav eller et humanisert antistoff eller et fragment derav ifølge oppfinnelsen i en farmasøytisk akseptabel form.

Ytterligere omfattet av foreliggende oppfinnelse er en fremgangsmåte for forebygging, behandling eller lindring av virkningene av amyloidose, en gruppe

15 sykdommer og lidelser forbundet med dannelse av amyloide plakk omfattende sekundær amyloidose og aldersrelatert amyloidose slik som sykdommer omfattende, men ikke begrenset til, nevrologiske lidelser slik som Alzheimers sykdom (AD), Lewylegeme demens, Downs syndrom, arvelig hjerneblødning med amyloidose (Dutch type); Guam Parkinson-Demens komplekset; så vel som andre

20 sykdommer som er basert på eller forbundet med amyloidlignende proteiner slik som progressiv supranukleær parese, multippel sklerose; Creutzfeldt Jakobs-sykdom, Parkinsons sykdom, HIV-relatert demens, ALS (amyotrop lateral sklerose), diabetes med debut i voksen alder; senil hjerteamyloidose; endokrine tumorer og andre, omfattende makuladegenerasjon ved administrering av et

25 antistoff og/eller en funksjonell del derav, men spesielt et humanisert antistoff og/eller en funksjonell del derav eller en sammensetning eller blanding omfattende et slikt antistoff og/eller en funksjonell del derav, til et dyr eller et menneske rammet av en slik lidelse omfattende administrering av antistoffet i en terapeutisk effektiv mengde.

30

Det er også et formål ifølge oppfinnelsen å tilveiebringe en fremgangsmåte for behandling av amyloidose, en gruppe sykdommer og lidelser forbundet med dannelse av amyloide plakk omfattende sekundær amyloidose og aldersrelatert

amyloidose omfattende, men ikke begrenset til, nevrologiske lidelser slik som Alzheimers sykdom (AD), spesielt en sykdom eller lidelse karakterisert ved et tap av kognitiv hukommelseskapasitet ved å administrere til et dyr, spesielt et pattedyr eller et menneske, et antistoff, spesielt en farmasøytisk sammensetning ifølge
5 oppfinnelsen og som beskrevet her.

I en spesifikk utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen en fremgangsmåte for å beholde eller øke kognitiv hukommelses kapasitet men, spesielt, for å restituere kognitiv hukommelses kapasitet hos et dyr, spesielt et pattedyr eller et menneske,
10 som lider av hukommelsessvikt ved å administrere til et dyr, spesielt et pattedyr eller et menneske, et antistoff, spesielt en farmasøytisk sammensetning ifølge oppfinnelsen og som beskrevet her før.

Det er et ytterligere formål med oppfinnelsen å tilveiebringe en terapeutisk
15 sammensetning og en fremgangsmåte for fremstilling av en slik sammensetning så vel som en fremgangsmåte for behandling av amyloidose, en gruppe sykdommer og lidelser forbundet med dannelse av amyloide plakk omfattende sekundær amyloidose og aldersrelatert amyloidose omfattende, men ikke begrenset til, nevrologiske lidelser slik som Alzheimers sykdom (AD), spesielt en
20 sykdom eller lidelse karakterisert ved et tap av kognitiv hukommelses kapasitet, ved anvendelse av et antistoff ifølge oppfinnelsen og som beskrevet heri tidligere.

Spesielt angår oppfinnelsen behandling av et dyr, spesielt et pattedyr eller et menneske, som lider av en amyloidassosiert lidelse karakterisert ved et tap av
25 kognitiv hukommelses kapasitet som fører til bibehold av kognitiv hukommelseskapasitet.

Oppfinnelsen angår videre en fremgangsmåte for diagnostisering av en amyloidassosiert sykdom eller lidelse hos en pasient omfattende å detektere
30 immunspesifikk binding av et antistoff eller et aktivt fragment derav til en epitop av amyloidproteinet i en prøve eller *in situ* som omfatter trinnene

- (a) bringe prøven eller en spesifikk kroppsdel eller kroppsoverflate mistenkt å inneholde amyloidprotein i kontakt med et antistoff, spesielt et

monoklonalt antistoff ifølge oppfinnelsen, men spesielt et kimært antistoff eller et fragment derav eller et humanisert antistoff eller et fragment derav ifølge oppfinnelsen og som beskrevet her tidligere og/eller en funksjonell del derav, hvilket antistoff binder en epitop av amyloidproteinet;

- 5 (b) tillate antistoffet og/eller en funksjonell del derav, å binde til amyloidproteinet for å danne et immunologisk kompleks;
- (c) detektere dannelsen av det immunologiske komplekset; og
- (d) korrelere nærvær eller fravær av det immunologiske komplekset med nærvær eller fravær av amyloidprotein i prøven eller den spesifikke
- 10 kroppsdel eller området.

Også omfattet er en fremgangsmåte for å bestemme omfanget av amyloidogent plakk mengde i et vev og/eller kroppsvæsker omfattende

- (a) oppnå en prøve representativ for vevet og/eller kroppsvæskene som
- 15 undersøkes;
- (b) teste nevnte prøve for tilstedeværelse av amyloidprotein med et antistoff, spesielt et monoklonalt antistoff ifølge oppfinnelsen, men spesielt et kimært antistoff eller et fragment derav eller et humanisert antistoff eller et fragment derav ifølge oppfinnelsen og som beskrevet
- 20 her tidligere og/eller en funksjonell del derav;
- (c) bestemme mengden av antistoff bundet til proteinet; og
- (d) beregne mengden av plakk i vevet og/eller kroppsvæskene.

Spesielt angår oppfinnelsen en fremgangsmåte for å bestemme omfanget av

25 amyloidogent plakk mengde i et vev og/eller kroppsvæsker, hvor dannelsen av det immunologiske komplekset i trinn c) blir bestemt slik at tilstedeværelse eller fravær av det immunologiske komplekset korrelerer med tilstedeværelse eller fravær av amyloidprotein.

I en annen utførelsesform ifølge oppfinnelsen tilveiebringes et testsett for

30 deteksjon og diagnose av amyloidassosierte sykdommer og lidelser omfattende et antistoff, spesielt et monoklonalt antistoff ifølge oppfinnelsen, men spesielt et kimært antistoff eller et fragment derav eller et humanisert antistoff eller et

fragment derav ifølge oppfinnelsen og som beskrevet her tidligere og/eller en funksjonell del derav.

5 Spesielt angår oppfinnelsen et testsett for deteksjon og diagnose av amyloidassosierte sykdommer og lidelser omfattende en beholder som inneholder ett eller flere antistoffer ifølge foreliggende oppfinnelse og/eller en funksjonell del derav og instruksjoner for anvendelse av antistoffene med det formål å binde til amyloidprotein for å danne et immunologisk kompleks og detektere dannelse av det immunologiske komplekset slik at tilstedeværelse eller fravær av det
10 immunologiske komplekset korrelerer med tilstedeværelse eller fravær av amyloidprotein.

I et annet aspekt tilveiebringer oppfinnelsen et antistoff omfattende en variabel region som angitt i SEKV ID NR: 27 eller en variant derav. I én utførelsesform, en cellelinje som uttrykker antistoffet.

15 I et annet aspekt tilveiebringer oppfinnelsen et antistoff-gen omfattende en variabel region som angitt i SEKV ID NR: 29 eller en variant derav. I én utførelsesform uttrykker en cellelinje antistoffet.

I et annet aspekt tilveiebringer oppfinnelsen en fremgangsmåte for å oppløse forhåndsformede beta-amyloid fibre, omfattende å interagere et hC2-antistoff med
20 forhåndsformede beta-amyloid fibre.

I et annet aspekt tilveiebringer oppfinnelsen et humanisert antistoff eller et fragment derav i henhold til hvilke som helst av de foregående kravene, hvor nevnte antistoff eller fragment derav beskytter neuroner fra Abeta-indusert nedbrytning.

25 I et annet aspekt tilveiebringer oppfinnelsen en fremgangsmåte for å forebygge Abeta-indusert degradering av nevroner omfattende å behandle nevroner med en effektiv mengde av et humanisert antistoff eller et fragment derav i henhold til beskrivelsen her.

I et annet aspekt tilveiebringer oppfinnelsen anvendelse av et humanisert antistoff eller et fragment derav i henhold til beskrivelsen heri for fremstilling av et medikament for forebygging av degenerasjon av neuroner ved eksponering for Abeta-oligomer.

5

Disse og andre formål, trekk og fordeler ifølge foreliggende oppfinnelse vil bli tydelig etter en gjennomgang av den følgende detaljerte beskrivelsen av den fremlagte utførelsesformen og de tilhørende kravene.

10

KORT BESKRIVELSE AV FIGURER OG SEKVENSER

Figur 1 (Eksempel 2): Ekspresjonskassett av mus lett kjede variabel region av det kimære antistoffet

15 Figur 2 (Eksempel 2): Ekspresjonskassett av mus tung kjede variabel region av det kimære antistoffet

Figur 3 (Eksempel 5,2): Sammenligning av mus tung kjede variabel region med den nærmeste murine kjønnselle-sekvensen

Figur 4 (Eksempel 8): Aktivitet av rensede humaniserte C2-antistoffer

20 Figur 5 (Eksempel 9): Bindingsaktivitet av antistoffer fremstilt ved transient ekspresjon av C2 modifiserte CDRL2-konstruksjoner sammen med C2 kimær tung kjede, sammenlignet med kimært antistoff C2ChVHAF/ChVK, fremstilt ved transient transfeksjon og rensset antistoff.

25 Figur 6 (Eksempel 11): Resultater av Immunhistokjemisk bindings-analyse med kimært antistoff AF og humanisert antistoff H4K1.

Figur 7 (Eksempel 12): Funksjonalitet av mC2 ved Amyloide fibre

Figur 8 (Eksempel 12): Bindingsaffinitet av humanisert C2 i ELISA.

30 Figur 9 (Eksempel 14): Konformasjon-spesifikk binding av mC2 til forskjellige klasser av amyloidprotein. Pellet fremstilling i forklaringsteksten til denne figuren angir A β ₁₋₄₂ fibre, supernatant fremstilling angir amyloid monomerer.

Figur 10: Humaniserte C2 VK-sekvenser sammenlignet med murin sekvens og human akseptor-sekvenser DPK15 OG J_K1

Figur 11: Humanisert C2 VH-sekvenser sammenlignet med murin sekvens og human akseptor-sekvenser DP54 og J_H6

Figur 12: Fullstendig DNA og proteinsekvens av lett kjede variabel region av C2 humanisert antistoff, C2HuVK1

5 Figur 13: Fullstendig DNA og proteinsekvens av lett kjede konstant region (human C Kappa) av humanisert C2-antistoff

Figur 14: Fullstendig DNA og proteinsekvens av tung kjede konstant region (human IgG4 ser228-pro) av humanisert C2 antistoff

Figur 15A-C (Eksempel 15): Resultater av Epitopkartleggings-forsøk

10 Figur 16 (Eksempel 13): Resultater av aggregerings-analyse eksperimenter

Figur 17 (Eksempel 13): Resultater av oppløsnings-analyse eksperimenter

Figur 18: (Eksempel 16): Resultater av neuroproteksjon-forsøk med humanisert antistoff C2.

- | | | |
|----|----------------|---|
| 15 | SEKV ID NR: 1 | Aminosyresekvens av C2 HuVH AF 4 humanisert tung kjede variabel region (CDR1) |
| | SEKV ID NR: 2 | Aminosyresekvens av C2 HuVH AF 4 humanisert tung kjede variabel region (CDR2) |
| 20 | SEKV ID NR: 3 | Aminosyresekvens av C2 HuVH AF 4 humanisert tung kjede variabel region (CDR3) |
| | SEKV ID NR: 4 | Aminosyresekvens av C2 HuVK 1 humanisert lett kjede variabel region (CDR1) |
| | SEKV ID NR: 5 | Aminosyresekvens av C2 HuVK 1 humanisert lett kjede variabel region (CDR2) |
| 25 | SEKV ID NR: 6 | Aminosyresekvens av C2 HuVK 1 humanisert lett kjede variabel region (CDR3) |
| | SEKV ID NR: 7 | Aminosyresekvens av A β -epitop region 2 |
| | SEKV ID NR: 8 | Aminosyresekvens av A β -epitop region 1 |
| | SEKV ID NR: 9 | Aminosyresekvens av A β -epitop region 2 modifisert |
| 30 | SEKV ID NR: 10 | Aminosyresekvens av A β -epitop region 1 modifisert |
| | SEKV ID NR: 11 | Aminosyresekvens av Epitop region modifisert fullstendig |
| | SEKV ID NR: 12 | Aminosyresekvens av C2 HuVK 1 humanisert lett kjede variabel region |

- SEY ID NO: 13 Aminosyresekvens av C2 humanisert lett kjede
- SEKV ID NR: 14 Aminosyresekvens av humanisert C2 lett kjede konstant region
- SEKV ID NR: 15 Aminosyresekvens av C2 HuVH AF 4 humanisert tung kjede variabel region
- 5 SEKV ID NR: 16 Aminosyresekvens av C2 humanisert tung kjede
- SEKV ID NR: 17: Aminosyresekvens av IG GAMMA-4 KJEDE C REGION – modifisert
- SEKV ID NR: 18: Nukleotidsekvens av CDR2 av C2 HuVH AF 4 humanisert tung kjede variabel region
- 10 SEKV ID NR: 19: Nukleotidsekvens av CDR3 av C2 HuVH AF 4 humanisert tung kjede variabel region
- SEKV ID NR: 20: Nukleotidsekvens av CDR1 av C2 HuVK 1 humanisert lett kjede variabel region
- SEKV ID NR: 21: Nukleotidsekvens av C2 HuVK 1 humanisert lett kjede variabel region
- 15 SEKV ID NR: 22: Nukleotidsekvens av C2 humanisert lett kjede
- SEKV ID NR: 23: Nukleotidsekvens av C2 humanisert lett kjede konstant region
- SEKV ID NR: 24: Nukleotidsekvens av C2 HuVH AF 4 humanisert tung kjede variabel region
- 20 SEKV ID NR: 25: Nukleotidsekvens av C2 humanisert tung kjede
- SEKV ID NR: 26: Nukleotidsekvens av C2 humanisert tung kjede konstant region
- SEKV ID NR: 27: Aminosyresekvens av Mus C2 lett kjede variabel region
- SEKV ID NR: 28: Aminosyresekvens av Mus C2 tung kjede variabel region
- SEKV ID NR: 29: Nukleotidsekvens av Mus C2 lett kjede variabel region
- 25 SEKV ID NR: 30: Nukleotidsekvens av Mus C2 lett kjede
- SEKV ID NR: 31: Nukleotidsekvens av Mus C2 tung kjede variabel region
- SEKV ID NR: 32: Nukleotidsekvens av Mus C2 tung kjede

DEFINISJONER

- Betegnelsene “polypeptid”, “peptid” og “protein”, som anvendt her, kan benyttes
- 30 om hverandre og er definert til å bety et biomolekyl sammensatt av aminosyrer bundet av en peptidbinding.

Betegnelsene "en", "et" og "den" som anvendt her er definert til å bety "én eller flere" og omfatter flertallsformen dersom ikke sammenhengen er upassende.

Uttrykket "sykdommer og lidelser som er forårsaket av eller forbundet med amyloid eller amyloidlignende proteiner" omfatter, men er ikke begrenset til, sykdommer og lidelser forårsaket av tilstedeværelse eller aktivitet av amyloidlignende proteiner i monomer, fibrill eller polymer tilstand eller hvilken som helst kombinasjon av de tre. Slike sykdommer og lidelser omfatter, men er ikke begrenset til, amyloidose, endokrine tumorer og makuladegenerasjon.

Betegnelsen "amyloidose" angir en gruppe sykdommer og lidelser forbundet med dannelse av amyloide plakk omfattende, men ikke begrenset til, sekundær amyloidose og aldersrelatert amyloidose slik som sykdommer omfattende, men ikke begrenset til, nevrologiske lidelser slik som Alzheimers sykdom (AD), omfattende sykdommer eller lidelser karakterisert ved et tap av kognitiv hukommelses kapasitet slik som for eksempel mild kognitiv svekkelse (MCI), Lewylegeme demens, Downs syndrom, arvelig hjerneblødning med amyloidose (Dutch type); Guam Parkinson-Demens komplekset; så vel som andre sykdommer som er basert på eller forbundet med amyloidlignende proteiner slik som progressiv supranukleær parese, multippel sklerose; Creutzfeld Jakobs-sykdom, Parkinsons sykdom, HIV-relatert demens, ALS (amyotrop lateral sklerose), inklusjonslegememyositt (IBM), diabetes som debuterer i voksen alder og senil hjerTEAMYLOIDOSE; og forskjellige øyesykdommer omfattende makuladegenerasjon, drusen-relatert optisk nevropati og katarakt som skyldes beta-amyloid avleiring.

Betegnelsene "detektering" eller "detektert" som anvendt her betyr anvendelse av kjente teknikker for deteksjon av biologiske molekyler slik som immunokjemiske eller histologiske metoder og refererer til kvalitativ eller kvantitativ bestemmelse av tilstedeværelsen eller konsentrasjonen av biomolekylet som undersøkes.

"Polymer oppløselig amyloid" angir multiple aggregerte monomerer av amyloid-peptider eller av amyloidlignende peptider eller av modifiserte eller trunkerte amyloid-peptider eller av andre derivater av amyloid-peptider som danner oligomere eller polymere strukturer som er oppløselige i pattedyr eller

menneskekroppen nærmere bestemt i hjernen, men spesielt multiple aggregerte monomerer av amyloid β ($A\beta$) eller av modifiserte eller trunkerte amyloid β ($A\beta$)-peptider eller av derivater derav, som er oppløselige i pattedyr eller menneskekroppen nærmere bestemt i hjernen.

5

“Amyloid β , $A\beta$ eller β -amyloid” er en betegnelse kjent på området og angir amyloid β -proteiner og peptider, amyloid β forløperprotein (APP), så vel som modifikasjoner, fragmenter og hvilke som helst funksjonelle ekvivalenter derav. Spesielt menes det med amyloid β som anvendt her hvilket som helst fragment fremstilt ved proteolytisk kløyving av APP men spesielt de fragmentene som er involvert i eller forbundet med amyloid patologier omfattende, men ikke begrenset til, $A\beta_{1-38}$, $A\beta_{1-39}$, $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-41}$, $A\beta_{1-42}$ og $A\beta_{1-43}$.

Strukturen og sekvensene av amyloid β -peptidene som nevnt ovenfor er velkjent for fagfolk på området og fremgangsmåter for fremstilling av nevnte peptider eller for å ekstrahere dem fra hjerne og andre vev er beskrevet, for eksempel i Glenner og Wong, Biochem Biophys Res Comm 129, 885-890 (1984). Videre er amyloid β -peptider også kommersielt tilgjengelige i forskjellige former.

Med “isolert” menes et biologisk molekyl fritt for i det minste noen av komponentene med hvilke det naturlig forekommer.

Betegnelsene “antistoff” eller “antistoffer” som anvendt her er betegnelser kjent på området og er forstått å referere til molekyler eller aktive fragmenter av molekyler som binder til kjente antigener, spesielt til immunglobulinmolekyler og til immunologisk aktive deler av immunglobulinmolekyler, dvs. molekyler som inneholder et bindingssete som spesifikt binder et antigen. Et immunglobulin er et protein omfattende ett eller flere polypeptider hovedsakelig kodet for av immunglobulin kappa og lambda, alfa, gamma, delta, epsilon og mu konstant region-gener, så vel som mangfoldige immunglobulin variabel region gener. Lette kjeder er klassifisert som enten kappa eller lambda. Tunge kjeder er klassifisert som gamma, mu, alfa, delta eller epsilon, som igjen definerer immunglobulinklassene, IgG, IgM, IgA, IgD og IgE, henholdsvis. Også

underklasser av den tunge kjeden er kjent. For eksempel kan IgG tunge kjeder hos mennesker kan være hvilken som helst av IgG1, IgG2, IgG3 og IgG4 underklasse. Immunglobulinet ifølge oppfinnelsen kan være av hvilken som helst klasse (IgG, IgM, IgD, IgE, IgA og IgY) eller underklasse (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 og IgA2) av immunglobulin-molekyl.

Som anvendt her betyr "spesifikt binder" i referanse til et antistoff at antistoffet binder til dets mål-antigen med større affinitet enn det gjør til et strukturelt ulikt antigen(er).

10

En typisk immunglobulin strukturell enhet er kjent å omfatte en tetramer. Hver tetramer er sammensatt av to identiske par av polypeptidkjeder, hvor hvert par har én "lett" (ca. 25 kD) og én "tung" kjede (ca. 50-70 kD). Den N-terminale enden av hver kjede definerer en variabel region på ca. 100 til 110 eller flere aminosyrer primært ansvarlig for antigen-gjenkjennelse. Betegnelsene variabel lett kjede (V_L) og variabel tung kjede (V_H) refererer til disse lette og tunge kjedene henholdsvis.

15

Antistoffer finnes som fullengde intakte antistoffer eller som flere velkarakteriserte fragmenter fremstilt ved kløyving med forskjellige peptidaser eller kjemikalier. Følgelig kløyver for eksempel pepsin et antistoff nedenfor disulfid-bindingene i hengselsregionen for å produsere $F(ab')_2$, en dimer av Fab som i seg selv er en lett kjede bundet til V_H-CH_1 ved en disulfidbinding. $F(ab')_2$ kan reduseres under milde betingelser for å bryte disulfid-bindingen i hengselsregionen hvilket derved omdanner $F(ab')_2$ -dimeren til en Fab'-monomer. Fab'-monomeren er i hovedsakelig et Fab-fragment med del av hengselsregionen (se Fundamental Immunology, W. E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1993), for en mer detaljert beskrivelse av andre antistofffragmenter). Selv om forskjellige antistofffragmenter er definert i form av kløyving av et intakt antistoff, vil fagfolk forstå at hvilke som helst av en rekke antistofffragmenter kan syntetiseres de novo enten kjemisk eller ved anvendelse av rekombinant DNA-metodikk. Følgelig omfatter betegnelsen antistoff, som anvendt her, også antistofffragmenter enten fremstilt ved modifikasjon av hele antistoffer eller syntetisert de novo eller antistoffer og fragmenter oppnådd ved anvendelse av rekombinant DNA-metoder.

25

30

“Antistoffer” er ment innenfor omfanget av foreliggende oppfinnelse å omfatte monoklonale antistoffer, polyklonale antistoffer, kimære, enkeltkjede, bispesifikke, simianized, humane og humaniserte antistoffer så vel som aktive fragmenter derav. Eksempler på aktive fragmenter av molekyler som binder til kjente
 5 antigener omfatter separerte lette og tunge kjeder, Fab, Fab/c, Fv, Fab' og F(ab')₂ fragmenter, omfattende produktene av et Fab immunglobulin ekspresjonsbibliotek og epitopbindende fragmenter av hvilke som helst av antistoffene og fragmentene nevnt ovenfor.

10 Disse aktive fragmentene kan avledes fra et antistoff ifølge foreliggende oppfinnelse ved flere teknikker. For eksempel kan monoklonale antistoffer spaltes med et enzym, slik som pepsin og underlegges HPLC gelfiltrering. Den passende fraksjonen inneholdende Fab-fragmenter kan deretter oppsamles og konsentreres ved membran filtrering og lignende. For ytterligere beskrivelse av generelle
 15 teknikker for isolering av aktive fragmenter av antistoffer, se for eksempel Khaw, B. A. et al. J. Nucl. Med. 23:1011-1019 (1982); Rousseaux et al. Methods Enzymology, 121:663-69, Academic Press, 1986.

Rekombinant fremstilte antistoffer kan være konvensjonelle fullengde antistoffer,
 20 aktive antistoffragmenter kjent fra proteolytisk kløyving, unike aktive antistoffragmenter slik som Fv eller enkeltkjede Fv (scFv), domene-deleterte antistoffer og lignende. Et Fv-antistoff er ca. 50 Kd i størrelse og omfatter de variable regionene av den lette og tunge kjeden. Et enkeltkjede Fv ("scFv")-polypeptid er en kovalent bundet VH::VL heterodimer som kan uttrykkes fra en
 25 nukleinsyre omfattende VH- og VL-kodende sekvenser enten forbundet direkte eller forbundet ved en peptid-kodende linker. Se Huston, et al. (1988) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883. Flere strukturer for omdannelse av de naturlig aggregerte, men kjemisk separerte lette og tunge polypeptidkjedene fra en antistoff V-region til et scFv-molekyl som vil foldes til en tredimensjonal struktur
 30 hovedsakelig lik strukturen av et antigen-bindende sete. Se, f.eks. U.S. Patenter nr. 5,091,513, 5,132,405 og 4,956,778.

Kombinerings-setet refererer til den delen av et antistoffmolekyl som deltar i antigenbinding. Det antigenbindende setet blir dannet ved aminosyrerester av de N-terminale variable ("V") regionene av de tunge ("H") og lette ("L") kjedene. Antistoff variable regioner omfatter tre svært divergente strekninger referert til som

5 "hypervariable regioner" eller "komplementaritetsbestemmende regioner" (CDR'er) som er satt inn imellom mer konserverte flankerende strekninger kjent som "struktur ("framework")-regioner" (FR'er). I et antistoffmolekyl er de tre hypervariable regionene av en lett kjede (LCDR1, LCDR2 og LCDR3) og de tre hypervariable regionene av en tung kjede (HCDR1, HCDR2 og HCDR3) anordnet i

10 forhold til hverandre i tredimensjonalt rom for å danne en antigenbindende overflate eller lomme. Antistoff kombinerings sete representerer derfor aminosyrener som danner CDR'ene av et antistoff og hvilke som helst struktur ("framework")-rester som danner bindingssete lommen.

15 Identiteten av aminosyrerestene i et spesielt antistoff som danner kombinerings setet kan bestemmes ved anvendelse av metoder velkjent på området. For eksempel kan antistoff CDR'er identifiseres som de hypervariable regionene opprinnelig definert av Kabat et al. (se "Sequences of Proteins of Immunological Interest," E. Kabat et al., U.S. Department of Health and Human Services;

20 Johnson, G og Wu, TT (2001) Kabat Database and its applications: future directions. Nucleic Acids Research, 29: 205-206; <http://immuno.bme.nwa.edu>). Posisjonene av CDR'ene kan også identifiseres som de strukturelle løkke-strukturene opprinnelig beskrevet av Chotia og andre, (se Chotia og Lesk, J. Mol. Biol. 196, 901 (1987), Chotia et al., Nature 342, 877 (1989) og Tramontano et al.,

25 J. Mol. Biol. 215, 175 (1990)). Andre metoder omfatter "AbM definisjonen" som er et kompromiss mellom Kabat og Chotia og er avledet ved anvendelse av Oxford Molecular's AbM antistoff modellering programvare (nå Accelrys) eller "kontakt definisjon" for CDR'er ved Macallum et al., ("Antibody-antigen interactions: contact analysis and binding site topography," J Mol Biol. 1996 Okt 11;262(5):732-45). Det

30 følgende diagrammet identifiserer CDR'er basert på forskjellige kjente definisjoner.

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

Generelle retningslinjer ved hvilke en kan identifisere CDR'er i et antistoff fra kun
 15 sekvens er som følger:

LCDR1:

Start - Omtrent rest 24.
 Rest før er alltid en Cys.
 20 Rest etter er alltid en Trp. Typisk blir TRP etterfulgt av TYR-GLN, men kan også
 følges av LEU-GLN, PHE-GLN eller TYR-LEU.
 Lengde er 10 til 17 rester.

LCDR2:

25 Start - 16 rester etter slutten av L1.
 Sekvens før er generelt ILE-TYR, men også kan være VAL-TYR, ILE-LYS eller
 ILE-PHE.
 Lengde er generelt 7 rester.

LCDR3:

30 Start – generelt 33 rester etter slutten av L2.
 Rest før er en Cys.
 Sekvens etter er PHE-GLY-X-GLY.
 Lengde er 7 til 11 rester.

HCDR1:

Start – ved omtrent rest 26 (fire rester etter en CYS) [Chotia / AbM definisjon]
Kabat definisjon starter 5 rester senere.

5 Sekvens før er CYS-X-X-X.

Rester etter er en TRP, typisk fulgt av VAL, men også fulgt av ILE eller ALA.

Lengde er 10 til 12 rester under AbM-definisjon mens Chotia-definisjon utelukker de siste 4 restene.

10 HCDR2:

Start - 15 rester etter slutten av Kabat /AbM-definisjon av CDR-H1.

Sekvens før typisk LEU-GLU-TRP-ILE-GLY (SEKV ID NR. 1), men flere variasjoner er mulig.

Sekvens etter er LYS/ARG-LEU/ILE/VAL/PHE/THR/ALA-THR/SER/ILE/ALA

15 Lengde er 16 til 19 rester under Kabat-definisjon (AbM-definisjon slutter 7 rester tidligere).

HCDR3:

Start –33 rester etter slutten av CDR-H2 (to rester etter en CYS).

20 Sekvens før er CYS-X-X (typisk CYS-ALA-ARG).

Sekvens etter er TRP-GLY-X-GLY.

Lengde er 3 til 25 rester.

Identiteten av aminosyrerestene i et bestemt antistoff som er utenfor CDR'ene,
25 men ikke desto mindre danner del av kombinerings setet ved at de har en sidekjede som er del av kanten av kombinerings setet (dvs. det er tilgjengelig for binding gjennom kombinerings setet), kan bestemmes ved anvendelse av metoder velkjent på området slik som molekylær modellering og røntgenkrystallografi. Se f.eks. Riechmann et al., (1988) Nature, 332:323-327.

30

Kimære antistoffer er de hvor én eller flere regioner av antistoffet er fra én dyreart og én eller flere regioner av antistoffet er fra en ulik dyreart. Et foretrukket kimært

antistoff er ett som omfatter regioner fra et primat immunglobulin. Et kimært antistoff for human klinisk anvendelse er typisk forstått å ha variable regioner fra et ikke-humant dyr, f.eks. en gnager, med de konstante regionene fra et menneske. I motsetning til dette anvender et humanisert antistoff CDR'er fra det ikke-humane antistoffet med de fleste eller alle de variable struktur ("framework")-regionene fra 5 og alle de konstante regionene fra et humant immunglobulin. Et humant kimært antistoff er typisk forstått å ha de variable regionene fra en gnager. Et typisk humant kimært antistoff har humane tunge konstante regioner og human lett kjede konstante regioner, og hvor de variable regionene av både de tunge og lette 10 kommer fra et gnager antistoff. Et kimært antistoff kan omfatte noen endringer av en nativ aminosyresekvens av de humane konstante regionene og den native gnager variabel region sekvensen. Kimære og humaniserte antistoffer kan fremstilles ved metoder velkjente på området omfattende CDR grafting-metoder (se f.eks. U.S. Patenter nr. 5,843,708; 6,180,370; 5,693,762; 5,585,089; 15 5,530,101), kjede shuffling strategier (se f.eks. U.S. Patent nr. 5,565,332; Rader et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1998) 95:8910-8915), molekylær modellerings-strategier (U.S. Patent nr. 5,639,641) og lignende.

Et "humanisert antistoff" som anvendt her i tilfellet av et to kjede-antistoff er ett hvor minst én kjede er humanisert. En humanisert antistoffkjede har en variabel 20 region hvor én eller flere av struktur ("framework")-regionene er humane. Et humanisert antistoff som er en enkeltkjede er én hvor kjeden har en variabel region hvor én eller flere av struktur-regionene er humane. De ikke-humane delene av den variable regionen av den humaniserte antistoff-kjeden eller fragment derav er avledet fra en ikke-human kilde, spesielt et ikke-humant 25 antistoff, typisk av gnager opprinnelse. Det ikke-humane bidraget til det humaniserte antistoffet er typisk gitt i form av minst én CDR-region som er satt inn blant struktur-regioner avledet fra ett (eller flere) human(e) immunglobulin(er). I tillegg kan struktur støtte-rester endres for å bevare bindingsaffinitet.

30 Det humaniserte antistoffet kan videre omfatte konstante regioner (f.eks., minst én konstant region eller del derav, i tilfellet av en lett kjede og fortrinnsvis tre

konstante regioner i tilfellet av en tung kjede). De konstante regionene av et humanisert antistoff dersom til stede er generelt humane.

Metoder for å oppnå "humaniserte antistoffer" er velkjent for fagfolk på området.
 5 (se f.eks. Queen et al., Proc. Natl Acad Sci USA, 86:10029-10032 (1989),
 Hodgson et al., Bio/Technology, 9:421 (1991)).

Et "humanisert antistoff" kan også oppnås ved en ny metode for genetisk konstruksjon som muliggjør fremstilling av affinitets modnede human-lignende
 10 polyklonale antistoffer i store dyr slik som for eksempel kaniner og mus. Se f.eks. U.S. Pat nr. 6,632,976.

Betegnelsen konstant region (CR) som anvendt her angir konstant region gener av immunglobulinet. Konstant region-genene koder for den delen av antistoffmolekylet som overbringer effektorfunksjoner. For kimære humane
 15 antistoffer og humaniserte antistoffer, blir typisk ikke-humane (f.eks., murine), konstante regioner erstattet med humane konstante regioner. De konstante regionene av de aktuelle kimære eller humaniserte antistoffene er typisk avledet fra humane immunglobuliner. Den tunge kjede konstante regionen kan velges fra hvilken som helst av de fem isotypene: alfa, delta, epsilon, gamma eller mu.
 20 Videre er tunge kjeder av forskjellige subklasser (slik som IgG subklassene av tunge kjeder) ansvarlig for forskjellig effektorfunksjoner og følgelig kan, ved å velge den ønskede tung kjede konstante regionen, antistoffer med ønsket effektorfunksjon fremstilles. Konstante regioner som kan anvendes innenfor omfanget av foreliggende oppfinnelse er gamma 1 (IgG1), spesielt en Fc-region av
 25 gamma 1 (IgG1)-isotypen, gamma 3 (IgG3) og spesielt gamma 4 (IgG4). Den lette kjede konstante regionen kan være av kappa eller lambda-typen, fortrinnsvis av kappa-typen. I én utførelsesform er den lette kjede konstante regionen den humane kappa konstante kjeden (Heiter et al. (1980) *Cell* 22:197-207) og den tunge konstante kjeden er human IgG4 konstant kjede.

30

Betegnelsen "monoklonalt antistoff" er også velkjent på området og angir et antistoff som er produktet av en enkelt klonet antistoffproduserende celle. Monoklonale antistoffer blir typisk fremstilt ved å fusjonere en antistoff-

produserende B-celle som normalt ikke lever lenge med en hurtigvoksende celle, slik som kreftcelle (noen ganger referert til som en “udødelig” celle). Den resulterende hybride cellen eller hybridomet, mangfoldiggjøres raskt, hvilket danner en klon som produserer antistoffet.

5

For formålet ifølge foreliggende oppfinnelse skal “monoklonalt antistoff” også forstås å omfatte antistoffer som er produsert av en original klon som enda ikke har nådd fullstendig monoklonalitet.

- 10 “Funksjonelt ekvivalent antistoff” er forstått innenfor omfanget av foreliggende oppfinnelse å referere til et antistoff som hovedsakelig har minst én viktig funksjonell egenskap felles med et antistoff nevnt ovenfor og her beskrevet omfattende: bindingsspesifisitet til β -amyloid proteinet, spesielt til $A\beta_{1-42}$ proteinet og nærmere bestemt til 16-21 epitop-regionen av $A\beta_{1-42}$ -proteinet,
- 15 immunoreaktivitet *in vitro*, hemming av aggregering av $A\beta_{1-42}$ -monomerene til høymolekylære polymere fibriller og/eller oppløsning av forhåndsdannede $A\beta_{1-42}$ polymere fibriller og/eller en β -sheet brytende egenskap, og lindrer virkningene av amyloidose, en gruppe sykdommer og lidelser forbundet med dannelse av amyloide plakk omfattende sekundær amyloidose og aldersrelatert amyloidose slik
- 20 som sykdommer omfattende, men ikke begrenset til, nevrologiske lidelser slik som Alzheimers sykdom (AD), Lewylegeme demens, Downs syndrom, arvelig hjerneblødning med amyloidose (Dutch type); Guam Parkinson-Demens komplekset; så vel som andre sykdommer som er basert på eller forbundet med amyloidlignende proteiner slik som progressiv supranukleær parese, multippel
- 25 sklerose; Creutzfeldt Jakobs-sykdom, Parkinsons sykdom, HIV-relatert demens, ALS (amyotrop lateral sklerose), diabetes som debuterer i voksen alder; senil hjerteamyloidose; endokrine tumorer og andre, omfattende makuladegenerasjon, når administrert profylaktisk eller terapeutisk. Antistoffene kan være av hvilken som helst klasse slik som IgG, IgM eller IgA, osv eller hvilken som helst
- 30 underklasse slik som IgG1, IgG2a, osv og andre underklasser nevnt her ovenfor eller kjent på området, men spesielt av IgG4-klassen. Videre kan antistoffene fremstilles ved hvilken som helst metode, slik som fagdisplay eller produseres i hvilken som helst organisme eller cellelinje, omfattende bakterier, insekt, pattedyr

eller annen type av celle eller cellelinje som produserer antistoffer med ønskede egenskaper, slik som humaniserte antistoffer. Antistoffene kan også dannes ved å kombinere en Fab-andel og en Fc-region fra forskjellige arter.

5 Betegnelsen "hybridisere" som anvendt angir konvensjonelle hybridiseringsbetingelser, fortrinnsvis hybridiseringsbetingelser hvor 5xSSPE, 1% SDS, 1xDenhardts løsning blir anvendt som en løsning og/eller hybridiseringstemperaturer er mellom 35°C og 70°C, fortrinnsvis 65°C. Etter hybridisering blir vasking fortrinnsvis utført først med 2xSSC, 1% SDS og deretter
 10 med 0,2xSSC ved temperaturer mellom 35°C og 70°C, fortrinnsvis ved 65°C (angående definisjonen av SSPE, SSC og Denhardts løsning se Sambrook et al. loc. cit.). Stringente hybridiseringsbetingelser som for eksempel beskrevet i Sambrook et al, supra, er spesielt foretrukket. Spesielt foretrukne stringente hybridiseringsbetingelser er for eksempel til stede dersom hybridisering og vasking
 15 finner sted ved 65°C som angitt ovenfor. Ikke-stringente hybridiseringsbetingelser, for eksempel med hybridisering og vasking utført ved 45°C er mindre foretrukket og ved 35°C enda mindre.

"Homologi" mellom to sekvenser blir bestemt ved sekvensidentitet. Dersom to
 20 sekvenser som skal sammenlignes med hverandre avviker i lengde, relaterer sekvensidentitet fortrinnsvis til prosentdelen av nukleotidrestene av den kortere sekvensen som er identisk med nukleotidrestene av den lengre sekvensen. Sekvensidentitet kan bestemmes konvensjonelt med anvendelse av dataprogrammer slik som Bestfit-programmet (Wisconsin Sequence Analysis
 25 Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive Madison, WI 53711). Bestfit anvender lokal homologi algoritmen ifølge Smith og Waterman, Advances in Applied Mathematics 2 (1981), 482-489, for å finne det segmentet som har den høyeste sekvensidentiteten mellom to sekvenser. Ved anvendelse av Bestfit eller et annet sekvens-
 30 sammenstillings program for å bestemme hvorvidt en bestemt sekvens har for eksempel 95% identitet med en referansesekvens ifølge foreliggende oppfinnelse, blir parametrene fortrinnsvis justert slik at prosentdelen av identitet blir beregnet over hele lengden av referansesekvensen og at homologi gap på opptil 5% av det

totale antallet av nukleotidene i referansesekvensen er tillatt. Ved anvendelse av Bestfit får de såkalte valgfrie parametrene fortrinnsvis være ved deres forhåndsinnstilte ("standard") verdier. Avvikene som viser seg ved sammenligning av en gitt sekvens med de ovenfor beskrevne sekvensene ifølge oppfinnelsen kan
 5 være forårsaket for eksempel av addisjon, delesjon, substitusjon, insersjon eller rekombinasjon. En slik sekvenssammenligning kan fortrinnsvis også utføres med programmet "fasta20u66" (versjon 2,0u66, September 1998 ved William R. Pearson og University of Virginia; se også W.R. Pearson (1990), *Methods in Enzymology* 183, 63-98, vedlagte eksempler og <http://workbench.sdsc.edu/>). For
 10 dette formål kan "standard" parameter-innstillinger anvendes.

Antistoffet ifølge oppfinnelsen kan være et immunglobulin eller antistoff, som er forstått å ha alle dets bindings seter identiske (dersom multivalent) eller kan, alternativt, være et "bispesifikt" eller "bifunksjonelt antistoff".

15

Et "bispesifikt" eller "bifunksjonelt antistoff" er et kunstig hybrid antistoff som har to forskjellige tung/lett kjede-par og to forskjellige bindings seter. Bispesifikke antistoffer kan fremstilles ved en rekke metoder omfattende fusjon av hybridomer eller binding av Fab'-fragmenter. Se, f.eks., Songsivilai & Lachmann, *Clin. Exp.*
 20 *Immunol.* 79:315-321 (1990); Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 148, 1547-1553 (1992).

Betegnelsen "fragment" angir en del eller andel av et antistoff eller antistoffkjede omfattende færre aminosyrerester enn et intakt eller fullstendig antistoff eller antistoffkjede. Fragmenter kan oppnås via kjemisk eller enzymatisk behandling av
 25 et intakt eller fullstendig antistoff eller antistoffkjede. Fragmenter kan også oppnås ved rekombinante metoder. Eksempler på fragmenter omfatter Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc og/eller Fv-fragmenter. Betegnelsen "antigenbindende fragment" refererer til et polypeptidfragment av et immunglobulin eller antistoff som binder antigen eller konkurrerer med intakt antistoff (dvs., med det intakte antistoffet fra hvilket det ble
 30 avledet) om antigenbinding (dvs., spesifikk binding).

Bindende fragmenter blir fremstilt ved rekombinant DNA-teknikker eller ved enzymatisk eller kjemisk spalting av intakte immunglobuliner. Bindende fragmenter omfatter Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc, Fv, enkeltkjeder og enkeltkjede antistoffer.

- 5 "Fragment" refererer også til et peptid eller polypeptid omfattende en aminosyresekvens på minst 5 påfølgende aminosyrerester, minst 10 påfølgende aminosyrerester, minst 15 påfølgende aminosyrerester, minst 20 påfølgende aminosyrerester, minst 25 påfølgende aminosyrerester, minst 40 påfølgende aminosyrerester, minst 50 påfølgende aminosyrerester, minst 60 påfølgende amino rester, minst 70 påfølgende aminosyrerester, minst påfølgende 80 aminosyrerester, minst påfølgende 90 aminosyrerester, minst påfølgende 100 aminosyrerester, minst påfølgende 125 aminosyrerester, minst 150 påfølgende aminosyrerester, minst påfølgende 175 aminosyrerester, minst påfølgende 200 aminosyrerester eller minst påfølgende 250 aminosyrerester av
- 10 aminosyresekvensen av et annet polypeptid. I en spesifikk utførelsesform beholder et fragment av et polypeptid minst én funksjon av polypeptidet.
- 15

- Betegnelsen "antigen" refererer til en enhet eller fragment derav som kan binde til et antistoff. Et immunogen refererer til et antigen som kan fremkalle en immunrespons i en organisme, spesielt et dyr, nærmere bestemt et pattedyr
- 20 omfattende et menneske. Betegnelsen antigen omfatter regioner kjent som antigene determinanter eller epitoper som refererer til en andel av antigenet (som blir kontaktet eller som spiller en betydelig rolle med hensyn til å støtte en kontaktrest i antigenet ansvarlig for antigenisitet eller antigene determinanter.

25

Som anvendt her betyr betegnelsen "oppløselig" delvis eller fullstendig oppløst i en vandig løsning.

- Dessuten som anvendt her refererer betegnelsen "immunogen" til substanser som fremkaller produksjon av antistoffer, T-celler og andre reaktive immunceller rettet
- 30 mot et antigen av immunogenet.

En immunrespons oppstår når et individ produserer tilstrekkelig antistoffer, T-celler og andre reaktive immunceller mot administrerte immunogene sammensetninger ifølge foreliggende oppfinnelse til å moderere eller lindre lidelsen som skal behandles.

5

Betegnelsen immunogenisitet som anvendt her refererer til et mål for evnen av et antigen til å fremkalle en immunrespons (humoral eller cellulær) når administrert til en mottager. Foreliggende oppfinnelse angår metoder som reduserer immunogenisiteten av de aktuelle humane kimære eller humaniserte antistoffene.

10

Humanisert antistoff med redusert immunogenisitet refererer til et humanisert antistoff som har redusert immunogenisitet i forhold til det parentale antistoffet, f.eks. det murine antistoffet.

15

Humanisert antistoff som hovedsakelig beholder bindingsegenskapene av det parentale antistoff refererer til et humanisert antistoff som beholder evnen til å spesifikt binde antigenet gjenkjent av det parentale antistoffet anvendt for å produsere slikt humanisert antistoff. Fortrinnsvis vil det humaniserte antistoffet fremvise samme eller hovedsakelig samme antigen-bindende affinitet og aviditet

20

som det parentale antistoffet. Ideelt vil affiniteten av antistoffet ikke være mindre enn 10% av affiniteten av det parentale antistoffet, mer foretrukket ikke mindre enn ca. 30% og mest foretrukket vil affiniteten ikke være mindre enn 50% av det parentale antistoffet. Metoder for analyse av antigen-binding affinitet er velkjent på området og omfatter analyser av halv-maksimal binding, konkurranseforsøk og

25

Scatchard-analyse. Egnede antigen bindingsforsøk er beskrevet i foreliggende søknad.

30

En "tilbakemutasjon" er en mutasjon innført i en nukleotidsekvens som koder for et humanisert antistoff, mutasjonen resulterer i en aminosyre svarende til en aminosyre i det parentale antistoffet (f.eks., donor antistoff, for eksempel et murint antistoff). Visse struktur ("framework")-rester fra det parentale antistoffet kan beholdes under humaniseringen av antistoffene ifølge oppfinnelsen for å hovedsakelig beholde bindingsegenskapene av det parentale antistoffet, samtidig

som potensiell immunogenisitet av det resulterende antistoffet begrenses. I én utførelsesform ifølge oppfinnelsen er det parentale antistoffet av mus opprinnelse. For eksempel endrer tilbakemutasjonen en human struktur ("framework")-rest til en parental murin rest. Eksempler på struktur-rester som kan bli tilbake-mutert

5 omfatter, men er ikke begrenset til, kanioniske rester, grenseflate pakkings rester, uvanlige parentale rester som er nær bindingssetet, rester i "Vernier Zone" (som danner en plattform på hvilken CDR'ene støttes) (Foote & Winter, 1992, *J. Mol. Biol.* 224, 487-499) og de nær CDR H3.

10 Som anvendt her refererer en "konservativ endring" til endringer som er hovedsakelig konformasjonelt eller antigenet nøytrale, gir minimale endringer i tertiærstrukturen av de mutante polypeptidene eller gir minimale endringer i antigenene determinanter av de mutante polypeptidene, henholdsvis, sammenlignet med det native proteinet. Når det henvises til antistoffene og antistofffragmentene

15 ifølge oppfinnelsen, betyr en konservativ endring en aminosyresubstitusjon som ikke gjør at antistoffet blir ute av stand til å binde til den aktuelle reseptoren. Fagfolk på området vil være i stand å forutsi hvilke aminosyresubstitusjoner som kan foretas, mens en høy sannsynlighet for at de er konformasjonelt og antigenet nøytrale forfektes. Slik veiledning er gitt, for eksempel i Berzofsky, (1985) *Science*

20 229:932-940 og Bowie *et al.* (1990) *Science* 247:1306-1310. Faktorer som må tas i betraktning som påvirker sannsynligheten for å opprettholde konformasjonell og antigen nøytralitet omfatter, men er ikke begrenset til: (a) substitusjon av hydrofobe aminosyrer er mindre egnet til å påvirke antigenisitet fordi hydrofobe rester er mer egnet til å være lokalisert i et proteins indre; (b) substitusjon av

25 fysiokjemisk like aminosyrer er mindre egnet til å påvirke konformasjon fordi den substituerte aminosyren strukturelt etterligner den native aminosyren; og (c) endring av evolusjonsmessig konserverte sekvenser er mer egnet til å påvirke konformasjon negativt ettersom slik konservering indikerer at aminosyresekvensene kan ha funksjonell betydning. Fagfolk på området vil være i

30 stand til å bedømme endringer i proteinkonformasjon ved anvendelse av velkjente forsøk, slik som, men ikke begrenset til mikrokomplement fiksering metoder (Wasserman *et al.* (1961) *J. Immunol.* 87:290-295; Levin *et al.* (1967) *Meth. Enzymol.* 11:928-936) og gjennom bindingsstudier ved anvendelse av

konformasjonsavhengige monoklonale antistoffer (Lewis *et al.* (1983) *Biochem.* 22:948-954).

Videre refererer betegnelsen "terapeutisk effektiv mengde" til mengden av antistoff
 5 som, når administrert til et menneske eller dyr, er tilstrekkelig til å føre til en terapeutisk effekt i nevnte menneske eller dyr. Den effektive mengden bestemmes lett av fagfolk på området ved rutinemessige fremgangsmåter.

Som anvendt her refererer betegnelsene "behandle," "forhindre," "forebygge," og
 10 "forebygging" til å forhindre tilbakekomst eller begynnelse av ett eller flere symptomer på en lidelse i et individ som følger som et resultat av administrering av et profylaktisk eller terapeutisk middel.

Konstruksjon av humaniserte antistoffer

15 Foreliggende oppfinnelse kan lettere forstås ved referanse til den følgende detaljerte beskrivelsen av spesifikke utførelsesformer omfattet her. Selv om foreliggende oppfinnelse er beskrevet med referanse til spesifikke detaljer ifølge visse utførelsesformer, derav, er det ikke ment at slike detaljer skulle anses som begrensninger av omfanget av oppfinnelsen.

20

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer nye fremgangsmåter og sammensetninger omfattende svært spesifikke og svært effektive antistoffer som har evne til å spesifikt gjenkjenne og binde til spesifikke epitoper fra et spekter av β -amyloid antigener. Antistoffene satt i stand ved læren ifølge foreliggende oppfinnelse er
 25 spesielt anvendelige for behandling av amyloidose, en gruppe sykdommer og lidelser forbundet med dannelse av amyloide plakk omfattende sekundær amyloidose og aldersrelatert amyloidose omfattende, men ikke begrenset til, neurologiske lidelser slik som Alzheimers sykdom (AD), Lewylegame demens, Downs syndrom, arvelig hjerneblødning med amyloidose (Dutch type); Guam
 30 Parkinson-Demens komplekset; så vel som andre sykdommer som er basert på eller forbundet med amyloidlignende proteiner slik som progressiv supranukleær parese, multipel sklerose; Creutzfeldt Jakobs-sykdom, arvelig hjerneblødning med

amyloidose Dutch type, Parkinsons sykdom, HIV-relatert demens, ALS (amyotrop lateral sklerose), diabetes med debut i voksen alder; senil hjerteamyloidose; endokrine tumorer og andre, omfattende makuladegenerasjon, bare for å nevne noen få.

5

En fullstendig humanisert eller omformet variabel region ifølge foreliggende oppfinnelse kan dannes innenfor omfanget av oppfinnelsen ved først å utforme en variabel region aminosyresekvens som inneholder ikke-humane, spesielt gnager-avledete CDR'er, men spesielt CDR'er avledet fra murint antistoff ACI-01-Ab7C2 (betegnet "mC2" gjennom hele søknaden og deponert den 1. desember 2005 ved 10 "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) i Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Branuschweig, under bestemmelsene ifølge Budapestkonvensjonen under aksjonsnummer DSM ACC2750) omgitt av human-avledete struktur ("framework")-sekvenser. De ikke- 15 humant, spesielt de gnager-avledete CDR'ene, som kan oppnås fra antistoffet ifølge foreliggende oppfinnelse, gir den ønskede spesifisiteten. Følgelig skal disse restene inkluderes i utformingen av den omformede variable regionen hovedsakelig uendret. Enhver modifikasjon skulle følgelig begrenses til et minimum og betraktes nøye for endringer i spesifisiteten og affiniteten av 20 antistoffet. På den annen side kan struktur ("framework")-rester i teorien avledes fra hvilken som helst human variabel region.

For å danne et omformet antistoff som fremviser en akseptabel eller en til og med forbedret affinitet, skulle humane struktur ("framework")-sekvenser velges, som er 25 like egnet for å danne en omformet variabel region og for å beholde antistoff-affinitet.

For å oppnå dette målet, ble beste tilpasning-strategien utviklet. Ettersom det er kjent at struktur ("framework")-sekvensene tjener til å holde CDR'ene i deres 30 korrekte romlige orientering for interaksjon med antigen og at struktur-rester noen ganger til og med kan delta i antigen-binding, har denne strategien som mål å begrense endringer som kan påvirke den tredimensjonale strukturen av antistoffet negativt ved å avlede den humane struktur-sekvensen anvendt for antistoff

omforming fra den humane variable regionen som er mest homolog eller lik den ikke-humant, spesielt den gnager-avledete variable regionen. Dette vil også maksimere sannsynligheten for at affinitet vil bli beholdt i det omformede antistoffet.

5

På sitt enkleste nivå omfatter "beste tilpasning"-strategien å sammenligne donor gnager V-regionen med alle kjente humane V-region aminosyresekvenser og deretter velge ut den mest homologe for å gi akseptor struktur ("framework")-regioner for bruk ved humanisering. I realiteten er det mange andre faktorer som
 10 skulle tas i betraktning og som kan påvirke det endelige valget av akseptor struktur-regioner. Predikeringer ved molekylær modellering kan anvendes i dette henseende før ethvert eksperimentelt arbeid i et forsøk på å maksimere affiniteten til det resulterende omformede antistoffet. Hovedsakelig er målet for modelleringen å forutsi hvilke nøkkel-rester (om noen) fra den mest homologe
 15 humane strukturen ("framework") som skulle være igjen som hos gnageren for å oppnå den beste affiniteten i det omformede antistoffet.

I én utførelsesform ifølge oppfinnelsen kan CDR'ene oppnås fra mus monoklonalt antistoff, spesielt fra mus monoklonalt antistoff ACI-01-Ab7C2 (betegnet "mC2"
 20 gjennom hele søknaden) beskrevet i søknad EP 05 02 7092,5, som er til behandling samtidig med denne, innlevert 12,12,2005, idet beskrivelsen i denne er inntatt her ved referanse.

Hybridomceller FP-12H3-C2, som produserer mus monoklonalt antistoff ACI-01-
 25 Ab7C2 (betegnet "mC2" og hC2 for det humaniserte C2 antistoffet, gjennom hele søknaden) ble deponert den 1. desember 2005 i søknad nr. EP05027092,5, som er til behandling samtidig som denne, ved "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) i Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig, under bestemmelsene ifølge
 30 Budapestkonvensjonen under aksjonsnummer DSM ACC2750.

Mus antistoffet kan fremkalles mot en supramolekylær antigen-konstruksjon omfattende et antigen-peptid svarende til aminosyresekvensen av β -amyloid-

peptidet, spesielt av β -amyloid-peptid $A\beta_{1-15}$, $A\beta_{1-16}$ og $A\beta_{1-16(\Delta 14)}$, modifisert med en hydrofob gruppe slik som for eksempel palmitinsyre eller en hydrofil gruppe slik som for eksempel polyetylenglykol (PEG) eller en kombinasjon av begge, hvor den hydrofobe og hydrofile gruppen, henholdsvis, er kovalent bundet til hver av de terminale endene av antigen-peptidet gjennom minst én, spesielt én eller to aminosyrer slik som for eksempel lysin, glutaminsyre og cystein eller hvilken som helst annen egnet aminosyre eller aminosyreanalog som er i stand til å tjene som et koblingsanordning for kobling av den hydrofobe og hydrofile gruppen til peptidfragmentet. Når en PEG blir anvendt som den hydrofile gruppen, er de frie PEG terminale endene kovalent bundet til fosfatidyletanolamin eller hvilken som helst annen forbindelse egnet til å fungere som forankringselement, for eksempel for å forankre den antigene konstruksjonen i dobbeltlaget av et liposom.

Spesielt kan et mus antistoff fremkalles mot en supramolekylær antigen konstruksjon omfattende et antigen-peptid svarende til aminosyresekvensen av β -amyloid-peptid $A\beta_{1-16}$ modifisert med en hydrofil gruppe slik som for eksempel polyetylenglykol (PEG) hydrofil gruppe er kovalent bundet til hver av de terminale endene av antigen-peptidet gjennom minst én, spesielt én eller to aminosyrer slik som for eksempel lysin, glutaminsyre og cystein eller hvilken som helst annen egnet aminosyre eller aminosyreanalog som er i stand til å tjene som en koblingsanordning for kobling av den hydrofobe og hydrofile gruppen til peptidfragmentet. Når en PEG blir anvendt som den hydrofile gruppen, er de frie PEG terminale endene kovalent bundet til fosfatidyletanolamin eller hvilken som helst annen forbindelse egnet til å fungere som forankringselement, for eksempel for å forankre den antigene konstruksjonen i dobbeltlaget av et liposom.

I en utførelsesform ifølge oppfinnelsen tilveiebringes et kimært antistoff eller et fragment derav eller et humanisert antistoff eller et fragment derav som omfatter i den variable regionen minst én CDR av ikke-human opprinnelse satt ned i én eller flere humant eller primat-avledete struktur ("framework")-regioner og kombinert med en konstant region avledet fra en human eller primat kilde antistoff, hvilket kimært antistoff eller et fragment derav eller et humanisert antistoff eller et

fragment derav er i stand til å spesifikt gjenkjenne og binde β -amyloid monomer peptid.

CDR'ene inneholder de restene som mest sannsynlig binder antigen og som må
 5 beholdes i det omformete antistoffet. CDR'er er definert ved sekvens i henhold til
 Kabat *et al.*, Sequence of Proteins of Immunological Interest, 5th Utgave, The
 United States Department of Health and Human Services, The United States
 Government Printing Office, 1991. CDR'er lar seg dele inn i kanoniske klasser
 (Chotia *et al.*, 1989 *Nature*, 342, 877-883) hvor nøkkel-rester i stor grad bestemmer
 10 den strukturelle konformasjonen av CDR-løkken. Disse restene blir nesten alltid
 beholdt i det omformede antistoffet.

Ved fremgangsmåten for fremstilling av et humanisert antistoff ifølge oppfinnelsen,
 blir aminosyresekvensene av C2 tung kjede og lett kjede variable regioner (V_H og
 15 V_K) sammenlignet med gnager antistoff V_H og V_K -sekvenser i NCBI og Kabat-
 databasene.

Den nærmeste matchen av mus kjønnscelle genet til C2 V_K er bb1, Locus
 MMU231201, (Schable *et al.*, 1999). En sammenligning viser at to aminosyrer
 20 atskiller seg fra denne kjønnscelle-sekvensen, begge lokalisert innenfor CDRL1.
 Modne murine antistoffer med lignende, men ikke identisk, sekvens kan finnes.
 Mange har en identisk CDRL2 og identisk CDRL3, men CDRL1 av C2 synes å
 være unik. Sammenligning med human kjønnscelle V_K -sekvenser viser at gener
 fra undergruppe V_{KII} er den beste matchen for C2 V_K (Cox *et al.*, 1994). C2 V_K kan
 25 følgelig anvises til Kabat undergruppe MuV_{KII} . Sekvens.

DPK15 sammen med den humane J-regionen HuJ_K1 kan velges for å tilveiebringe
 akseptor struktur ("framework")-sekvensene for den humaniserte V_K .

30 Restene ved grenseflaten mellom de variable lette og tunge kjedene har blitt
 definert (Chotia *et al.*, 1985 *J. Mol. Biol.*, 186, 651-663). Disse blir vanligvis beholdt
 i det omformede antistoffet. Phe i posisjon 87 av mus C2 V_K er uvanlig ved
 grenseflaten, hvor en Tyr er mer vanlig i V_{KII} undergruppen, hvilket indikerer at

denne struktur ("framework")-resten kan være viktig for antistoff-aktivitet. Tyr 87 er til stede i den humane kjønnselle og humanisert C2VK.

De humaniserte V_K-sekvensene kan følgelig utformes slik at C2HuVK1 består av mus C2 V_K CDR'er med strukturer ("framework") fra DPK 15 og human J_K1. I en spesifikk utførelsesform ifølge oppfinnelsen, kan murine rester være substituert i den humane struktur-regionen i posisjonene 45 og/eller 87. I CDR2-regionen som kan oppnås fra et mus monoklonalt antistoff, spesielt murint antistoff ACI-01-Ab7C2, kan aminosyresubstitusjoner foretas ved Kabat-posisjonene 50 og/eller 53. Rest 45 kan medvirke til å støtte konformasjonen av CDR'ene. Rest 87 er lokalisert ved grenseflaten av V_H og V_K-domenene. Derfor kan disse restene være kritiske for opprettholdelse av antistoffbinding.

Den nærmeste matchen av mus kjønnselle-gen til C2 V_H AF er VH7183, Locus AF120466, (Langdon *et al*, 2000). Sammenligning med human kjønnselle V_H-sekvenser viser at gener fra undergruppe V_HIII er den beste matchen for C2 V_H. C2 V_H AF kan anvises til Kabat undergruppe MuV_HIIID. Sekvens DP54 sammen med den humane J-regionen HuJ_H6 kan velges for å tilveiebringe akseptor struktur ("framework")-sekvensene for den humaniserte V_H.

Sammenligningen viser at det er ni aminosyreforskjeller mellom C2 V_H-sekvensene og den humane akseptor kjønnselle-sekvensen DP54 og J_H6, hvor de fleste er lokalisert innenfor CDRH2. Modne murine antistoffer med identisk eller lignende (én rest forskjellig) CDRH1 eller med lignende CDRH2 (én rest forskjellig) er funnet, men ingen med alle tre CDR'er identisk med C2 V_H AF. CDRH3 av C2-antistoff er ualminnelig kort, bestående av kun tre rester. Imidlertid er andre antistoffer funnet i databasen med CDRH3 av denne lengden. Rest 47 av C2 V_H er Leu heller enn den mer vanlige Trp og rest 94 er Ser heller enn den normale Arg, hvilket indikerer at disse struktur ("framework")-restene kan være viktig for antistoff-aktivitet.

30

Forskjellige humaniserte V_H-sekvenser kan utformes. C2HuVH1 består av C2 V_H AF CDR'er med strukturer ("framework") fra DP54 og HuJ_H6. I en spesifikk utførelsesform ifølge oppfinnelsen, kan murine rester være substituert i den

humane struktur-regionen i posisjonene 47 eller 94 eller begge. Rest 47 i struktur 2 slutter kontakt både med CDR'ene og med V_K-domenet. Rest 94 kan medvirke til å støtte konformasjonen av CDR'ene. Derfor kan disse restene være kritiske for opprettholdelse av antistoff-binding.

5

Det kan utformes forskjellige HCVR og LCVR-regioner som omfatter de ikke-humane CDR'ene som kan oppnås fra donor antistoffet, for eksempel et murint antistoff, satt inn i de native eller modifiserte humant eller primat-avledete struktur ("framework")-regionene. Modifikasjonen kan spesielt angå en utveksling av én eller flere aminosyrerester innenfor struktur-regionen ved ikke-humane rester, spesielt murine rester, mer vanlig funnet i denne posisjonen i de respektive subgruppene eller ved rester som har lignende egenskaper som de mer vanlig funnet i denne posisjonen i de respektive subgruppene.

15 Modifikasjonen av struktur ("framework")-regionen tjener struktur-sekvensene til å holde CDR'ene i deres korrekte romlige orientering for interaksjon med antigen og struktur-rester kan noen ganger til og med delta i antigenbinding. I én utførelsesform ifølge oppfinnelsen blir det tatt skritt for å ytterligere tilpasse de valgte humane struktur-sekvensene for å gjøre dem mest lik sekvensene av gnager strukturene for å maksimere sannsynligheten for at affinitet vil bli beholdt i 20 det omformede antistoffet.

Følgelig kan murine rester i den humane struktur ("framework")-regionen substitueres. Spesielt kan murine rester substitueres i den humane struktur-regionen av den tunge kjede variable (HCVR) regionen i posisjonene 47 eller 94 25 eller begge og i den humane struktur-regionen av den lette kjede variable (LCVR) regionen i posisjonene 45 og/eller 87. I CDR2-regionen som kan oppnås fra et mus monoklonalt antistoff, spesielt murint antistoff ACI-01-Ab7C2, kan aminosyresubstitusjoner foretas ved Kabat-posisjonene 50 og/eller 53.

30

Restene funnet i de ovenfor angitte posisjonene i den humane struktur ("framework")-regionen kan byttes ut med murine rester mer vanlig funnet i denne posisjonen i de respektive subgruppene. Spesielt kan Trp ved Kabat posisjon 47 i

den humant eller primat-avledete struktur-regionen av tung kjede variabel region som vist i SEKV ID NR: 15 erstattes av en Leu eller av en aminosyrerest som har lignende egenskaper og av hvilken substitusjon fører til endringer som er hovedsakelig konformasjonelt eller antigenet nøytrale, hvilket gir minimale endringer i tertiærstrukturen av mutant polypeptidene eller gir minimale endringer i antigenene determinanter. Spesielt kan Trp ved Kabat posisjon 47 i det humant eller primat-avledete struktur ("framework")-regionen av den tunge kjede variable regionen som vist i SEKV ID NR: 15 videre erstattes av en aminosyre valgt fra gruppen bestående av norleucin, Ile, Val, Met, Ala og Phe, spesielt av Ile.

Alternative konservative substitusjoner kan omfattes hvilke er konformasjonelt og antigenet nøytrale.

Arg ved Kabat-posisjon 94 i den humant eller primat-avledete struktur ("framework")-regionen av tung kjede variabel region som vist i SEKV ID NR: 15 kan erstattes av Ser eller av en aminosyrerest som har lignende egenskaper og av hvilken substitusjon fører til endringer som er hovedsakelig konformasjonelt eller antigenet nøytrale, hvilket gir minimale endringer i tertiærstrukturen av mutant polypeptidene eller gir minimale endringer i antigenene determinanter. Spesielt kan Arg ved Kabat posisjon 94 i det humant eller primat-avledete struktur-regionen av tung kjede variabel region som vist i SEKV ID NR: 15 alternativt erstattes av Thr.

20

I en annen utførelsesform ifølge oppfinnelsen, kan begge restene erstattes i det humaniserte antistoffet.

Gln ved Kabat posisjon 45 i den humant eller primat-avledete struktur ("framework")-regionen av lett kjede variabel region som vist i SEKV ID NR: 12 kan erstattes av Lys eller av en aminosyrerest som har lignende egenskaper og av hvilken substitusjon fører til endringer som er hovedsakelig konformasjonelt eller antigenet nøytrale, hvilket gir minimale endringer i tertiærstrukturen av mutant polypeptidene eller gir minimale endringer i antigenene determinanter. Spesielt kan Gln ved Kabat posisjon 45 i den humant eller primat-avledete struktur-regionen av lett kjede variabel region som vist i SEKV ID NR: 12 erstattes av en aminosyre valgt fra gruppen bestående av Arg, Gln og Asn, spesielt av Arg.

30

Leu ved Kabat posisjon 50 i den humant eller primat-avledete struktur ("framework")-regionen av lett kjede variabel region som vist i SEKV ID NR: 12 kan erstattes av Lys eller av en aminosyrerest som har lignende egenskaper og av hvilken substitusjon fører til endringer som er hovedsakelig konformasjonelt eller
 5 antigenet nøytrale, hvilket gir minimale endringer i tertiærstrukturen av mutant polypeptidene eller gir minimale endringer i antigenene determinanter. Spesielt kan Leu ved Kabat posisjon 50 i den humant eller primat-avledete struktur-regionen av den lette kjede variable regionen som vist i SEKV ID NR: 12 erstattes av en aminosyre valgt fra gruppen bestående av Arg, Gln og Asn, spesielt av Arg.

10

Asn ved Kabat posisjon 53 i den humant eller primat-avledete struktur ("framework")-regionen av lett kjede variabel region som vist i SEKV ID NR: 12 kan erstattes av His og Gln eller av en aminosyrerest som har lignende egenskaper og av hvilken substitusjon fører til endringer som er hovedsakelig
 15 konformasjonelt eller antigenet nøytrale, hvilket gir minimale endringer i tertiærstrukturen av mutant polypeptidene eller gir minimale endringer i antigenene determinanter. Spesielt kan Asn ved Kabat posisjon 53 i den humant eller primat-avledete struktur-regionen av lett kjede variabel region som vist i SEKV ID NR: 12 erstattes av en aminosyre valgt fra gruppen bestående av Gln, His, Lys og Arg.

20

Thr ved Kabat posisjon 87 i den humant eller primat-avledete struktur ("framework")-regionen av lett kjede variabel region som vist i SEKV ID NR: 12 kan erstattes av Phe eller av en aminosyrerest som har lignende egenskaper og av hvilken substitusjon fører til endringer som er hovedsakelig konformasjonelt
 25 eller antigenet nøytrale, hvilket gir minimale endringer i tertiærstrukturen av mutant polypeptidene eller gir minimale endringer i antigenene determinanter. Spesielt kan Tyr ved Kabat posisjon 87 i den humant eller primat-avledete struktur-regionen av lett kjede variabel region som vist i SEKV ID NR: 12 erstattes av en aminosyre valgt fra gruppen bestående av Leu, Val, Ile og Ala, spesielt av Leu.

30

Den således oppnådde variable regionen omfattende minst én CDR av ikke-human opprinnelse satt inn i én eller flere humant eller primat-avledete struktur ("framework")-regioner kan deretter kombineres med en konstant region avledet

fra et antistoff fra human eller primat kilde, spesielt med human IgG4 eller κ konstante regioner henholdsvis. IgG4 konstant region kan modifiseres ved, for eksempel endring av Serin i posisjon 228 i hengselsregionen til Prolin (HulG4 Ser-Pro). Denne mutasjonen stabiliserer interkjede disulfidbindingen og forhindrer
 5 dannelsen av halve molekyler som kan forekomme i native human IgG4 fremstillinger. IgG4 konstant region kan ytterligere modifiseres ved delelesjon av det terminale Lys i posisjon 439 som vist i SEKV ID NR: 16.

De modifiserte variable regionene kan konstrueres ved metode kjent på området
 10 slik som for eksempel overlappende PCR rekombinasjon. Ekspresjonskassetten for det kimære antistoffet, C2 ChV_H AF og C2 ChV_K, kan anvendes som templat for mutagenese av struktur ("framework")-regionene til de nødvendige sekvensene. Sett av mutagene primer-par blir syntetisert omfattende regionene som skal endres. De humaniserte V_H og V_K ekspresjonskassetten fremstilt kan
 15 klones inn i passende kloningsvektorer kjent på området slik som for eksempel pUC19. Etter at hele DNA-sekvensen er bekreftet å være korrekt for hver V_H og V_K, kan de modifiserte tung og lett kjede V-region-genene skjæres ut fra kloningsvektoren som ekspresjonskassetter. Disse kan deretter overføres til passende ekspresjonsvektorer slik som pSVgpt og pSVhyg som omfatter human
 20 IgG4 Ser-Pro eller κ konstante regioner henholdsvis.

EKSPRESJONSVEKTORER

Ekspresjonsvektor pSVgpt er basert på pSV₂gpt (Mulligan og Berg, 1980) og omfatter ampicillin-resistensgenet for seleksjon i bakterieceller, gpt-genet for seleksjon i pattedyrceller, murin tung kjede immunglobulin enhancer-regionen,
 25 genomisk sekvens som koder for konstant region-genet og SV40 poly A-sekvenser. Tung kjede variabel region for ekspresjon blir insertert som et HindIII til BamHI-fragment.

Ekspresjonsvektor pSVhyg omfatter ampicillin resistensgenet for seleksjon i
 30 bakterieceller, hyg-genet for seleksjon i pattedyrceller, murin tung kjede immunglobulin enhancer-regionen, genomisk sekvens som koder for kappa konstant region-genet og omfatter kappa enhancer og SV40 poly A-sekvensene.

Lett kjede variabel region for ekspresjon blir insertert som et *HindIII* til *BamHI*-fragment.

DNA-sekvensen skal deretter bekreftes å være korrekte for de humaniserte V_H og V_K i ekspresjonsvektorene.

For antistoffproduksjon kan de humaniserte tung og lett kjede ekspresjonsvektorene innføres i passende produksjons cellelinjer kjent på området slik som for eksempel NS0-celler. Innføring av ekspresjonsvektorene kan oppnås ved kotransfeksjon via elektroporering eller hvilken som helst annen egnet transformasjonsteknologi tilgjengelig på området. Antistoffproduserende cellelinjer kan deretter selekteres og ekspanderes og humaniserte antistoffer renses. De rensede antistoffene kan deretter analyseres ved standardteknikker slik som SDS-PAGE.

15 **ANTISTOFF MED FORBEDRET AFFINITET, SPESIFISITET, STABILITET**

CDRL2-sekvensen ("KVSNRFS") av mus C2-antistoffet kan modifiseres litt uten å påvirke antistoffaktivitet negativt. Konservative substitusjoner kan foretas gjennom å skifte ut K i posisjon 50 med R og N i posisjon 53 med S. De to alternative CDRL2-sekvensene er derfor "RVSNRFS" og "KVSSRFS", henholdsvis. Disse blir inkorporert i den murine V_K -sekvens uten noen andre endringer, som C2 VK-R og C2 VK-S, henholdsvis.

Affiniteten, spesifisiteten og stabiliteten av et antistoff ifølge oppfinnelsen som beskrevet her tidligere eller et fragment derav kan modifiseres ved endring av dets glykosyleringsprofil eller mønster hvilket resulterer i forbedrede terapeutiske verdier.

For å oppnå denne endringen i glykosyleringsmønsteret, kan vertsceller konstrueres slik at de er i stand til å uttrykke et foretrukket spekter av en glykoprotein-modifiserende glykosyl transferase-aktivitet som øker komplekse N-bundne oligosakkarider som bærer halvert ("bisecting") GlcNAc. Videre kan modifiserte glykoformer av glykoproteiner oppnås, for eksempel antistoffer,

omfattende hele antistoff-molekyler, antistofffragmenter eller fusjonsproteiner som omfatter en region ekvivalent med Fc-regionen av et immunglobulin, som har en forbedret Fc-mediert cellulær cytotoxiskitet.

- 5 Metoder for å oppnå antistoffer med modifisert glykosyleringsmønster er kjent for fagfolk på området og beskrevet, for eksempel i EP1071700, US2005272128, Ferrara et al (2006) J Biol Chem 281(8), 5032-5036; Ferrara et al (2006) Biotechnology and Bioengineering 93(5), 851-861.

10 **FARMASØYTISK FORMULERING OG ADMINISTRERING**

Antistoffene ifølge oppfinnelsen, men spesielt et monoklonalt antistoff ifølge oppfinnelsen, kan fremstilles i en fysiologisk akseptabel formulering og kan omfatte en farmasøytisk akseptabel bærer, fortynningsmiddel og/eller
 15 tilsetningsmiddel ved anvendelse av kjente teknikker. For eksempel blir antistoffet ifølge oppfinnelsen og som beskrevet her tidligere omfattende hvilket som helst funksjonelt ekvivalent antistoff eller funksjonelle deler derav, spesielt, det monoklonale antistoffet omfattende hvilket som helst funksjonelt ekvivalent antistoff eller funksjonelle deler derav kombinert med en farmasøytisk akseptabel
 20 bærer, fortynningsmiddel og/eller tilsetningsmiddel for å danne en terapeutisk sammensetning. Egnede farmasøytiske bærere, fortynningsmidler og/eller tilsetningsmidler er velkjent på området og omfatter for eksempel fosfatbufret saltoppløsning, vann, emulsjoner slik som olje/vann emulsjoner, forskjellige typer av fuktemidler, sterile løsninger, osv.

25

Formulering av den farmasøytiske sammensetningen ifølge oppfinnelsen kan gjennomføres i henhold til standard metodikk kjent for fagfolk på området.

Sammensetningene ifølge foreliggende oppfinnelse kan administreres til et individ
 30 i form av et fast stoff, væske eller aerosol i en egnet, farmasøytisk effektiv dose. Eksempler på faste sammensetninger omfatter piller, kremer og implanterbare doseenheter. Piller kan administreres oralt. Terapeutiske kremer kan administreres topisk. Implanterbare doseenheter kan administreres lokalt, for eksempel ved et sete for tumor eller kan implanteres for systematisk frigjøring av

den terapeutiske sammensetningen, for eksempel subkutan. Eksempler på flytende sammensetninger omfatter formuleringer tilpasset for injeksjon intramuskulært, subkutan, intravenøst, intra-arterielt og formuleringer for topisk og intraokulær administrering. Eksempler på aerosol-formuleringer omfatter inhalator
5 formuleringer for administrering til lungene.

Sammensetningene kan administreres ved standard administreringsmetoder. Generelt kan sammensetningen administreres ved topisk, oral, rektal, nasal, interdermal, intraperitoneal eller parenteral (for eksempel intravenøs, subkutan
10 eller intramuskulær) administreringsvei. I tillegg kan sammensetningen innføres i matrikser for forlenget frigjøring slik som bionedbrytbare polymerer, hvor polymerene blir implantert i nærheten av der hvor levering er ønsket, for eksempel ved setet for en tumor. Fremgangsmåten omfatter administrering av en enkelt dose, administrering av gjentatte doser i forutbestemt tidsintervaller og langvarig
15 administrering i en forutbestemt tidsperiode.

En matriks for forlenget frigjøring, som anvendt her, er en matriks fremstilt av materialer, vanligvis polymerer som er nedbrytbare ved enzymatisk eller syre/base hydrolyse eller ved oppløsning. Straks den er innsatt i kroppen innvirker enzymer
20 og kroppsvæsker på matriksen. Matriksen for forlenget frigjøring blir ønskelig valgt av biokompatible materialer slik som liposomer, polylaktider (polylaktid syre), polyglykolid (polymer av glykolsyre), polylaktid ko-glykolid (kopolymerer av melkesyre og glykolsyre), polyanhydrider, poly(orto)estere, polypeptider, hyaluronsyre, kollagen, chondroitinsulfat, karboksylsyrer, fettsyrer, fosfolipider,
25 polysakkarider, nukleinsyrer, polyaminosyrer, aminosyrer slik fenylalanin, tyrosin, isoleucin, polynukleotider, polyvinyl propylen, polyvinylpyrrolidon og silikon. En foretrukket bionedbrytbar matriks er en matriks av én av enten polylaktid, polyglykolid eller polylaktid ko-glykolid (kopolymerer av melkesyre og glykolsyre).

30 Det er velkjent for fagfolk innenfor det aktuelle området at dosen av sammensetningen vil avhenge av forskjellige faktorer slik som for eksempel lidelsen som behandles, den spesielle sammensetningen anvendt og andre kliniske faktorer slik som vekt, størrelse, kjønn og den generelle helsetilstanden til

pasienten, kroppsoverflateareal, den spesielle forbindelsen eller sammensetningen som skal administreres, andre medikamenter som administreres samtidig og administreringsveien.

- 5 Sammensetningen kan administreres i kombinasjon med andre sammensetninger omfattende en biologisk aktiv substans eller forbindelse, spesielt minst én forbindelse valgt fra gruppen bestående av forbindelser mot oksidativt stress, anti-apoptotiske forbindelser, metallchelatorer, inhibitorer av DNA-reparasjon slik som pirenzepin og metabolitter, 3-amino-1-propansulfonsyre (3APS), 1,3-
10 propandisulfonat (1,3PDS), α -sekretase aktivatorer, β - og γ -sekretase inhibitorer, tau-proteiner, neurotransmitter, β -sheet avbrytere, attraktanter for amyloid-beta rensende / depleterende cellulære komponenter, inhibitorer av N-terminalt trunkert amyloid-beta omfattende pyroglutamated amyloid-beta 3-42, anti-inflammatoriske molekyler, "atypiske antipsykotika" slik som for eksempel klozapin, ziprasidon,
15 risperidon, aripiprazol eller olanzapin eller kolinesterasehemmere (ChEI'er) slik som takrin, rivastigmin, donepezil og/eller galantamin, M1-agonister og andre medikamenter omfattende hvilket som helst amyloid eller tau-modifiserende medikament og næringssupplementer slik som for eksempel vitamin B12, cystein, en forløper for acetylcholin, lecitin, cholin, Ginkgo biloba, acetyl-L-carnitin,
20 idebenon, propentofyllin eller et xantin-derivat, sammen med et antistoff ifølge foreliggende oppfinnelse og, eventuelt, en farmasøytisk akseptabel bærer og/eller et fortynningsmiddel og/eller et tilsetningsmiddel og fremgangsmåter for behandling av sykdommer.
- 25 Proteinholdig farmasøytisk aktivt materiale kan være til stede i mengder på mellom 1 ng og 10 mg pr. dose. Generelt skulle regimet for administrering være innenfor området på mellom 0,1 μ g og 10 mg av antistoffet ifølge oppfinnelsen, spesielt i et område på 1,0 μ g til 1,0 mg og nærmere bestemt i et område på mellom 1,0 μ g og 100 μ g, hvor alle individuelle tall som omfattes innenfor disse områdene også er
30 del av oppfinnelsen. Dersom administreringen finner sted gjennom kontinuerlig infusjon kan en mer passende dose være i området på mellom 0,01 μ g og 10 mg enheter pr. kg. kroppsvekt pr. time hvor alle individuelle tall som ligger innenfor disse områdene også er del av oppfinnelsen.

Administrering vil generelt være parenteral, f.eks. intravenøst. Preparater for parenteral administrering omfatter sterile vandig eller ikke-vandige løsninger, suspensjoner og emulsjoner. Ikke-vandige løsningsmidler omfatter uten å være
5 begrenset dertil, propylenglykol, polyetylenglykol, vegetabilsk olje slik som olivenolje og injiserbare organiske estere slik som etyloleat. Vandige løsningsmidler kan velges fra gruppen bestående av vann, alkohol/vandige løsninger, emulsjoner eller suspensjoner omfattende saltoppløsning og bufrede media. Parenterale konstituenten omfatter natriumklorid-løsning, Ringer's
10 dekstrose, dekstrose og natriumklorid, lactated Ringer's eller faste oljer. Intravenøse konstituenten omfatter væske og næringsmiddel fornyere, elektrolytt etterfyllere (slik som de basert på Ringer's dekstrose) og andre. Konserveringsmidler kan også være til stede slik som for eksempel antimikrobielle midler, antioksidanter, chelaterende midler, inerte gasser, osv.

15

Den farmasøytiske sammensetningen kan videre omfatte proteinholdige bærere slik som for eksempel serumalbumin eller immunglobulin, spesielt av human opprinnelse. Ytterligere biologisk aktive midler kan være til stede i den farmasøytiske sammensetningen ifølge oppfinnelsen avhengig av den tilsiktede
20 anvendelsen.

Når målet for binding er lokalisert i hjernen, tillater visse utførelsesformer ifølge oppfinnelsen antistoffet eller aktivt fragment derav å krysse blod-hjerne-barrieren. Visse neurodegenerative sykdommer er forbundet med en økning i permeabilitet
25 av blod-hjerne-barrieren, slik at antistoffet eller aktivt fragment derav lett kan innføres til hjernen. Når blod-hjerne-barrieren forblir intakt, finnes det mange kjente metoder på området for å transportere molekyler gjennom den, omfattende, men ikke begrenset til, fysiske metoder, lipidbaserte metoder og reseptor og kanalbaserte metoder.

30

Fysiske metoder for transport av antistoffet eller aktivt fragment derav gjennom blod-hjerne-barrieren omfatter, men er ikke begrenset til, omgåelse av blod-hjerne-barrieren fullstendig eller ved å danne åpninger i blod-hjerne-barrieren. Metoder

- for omgåelse omfatter, men er ikke begrenset til, direkte injeksjon inn i hjernen (se f.eks. Papanastassiou et al., Gene Therapy 9: 398-406 (2002)) og implantering av en leveringsanordning i hjernen (se f.eks. Gill et al., Nature Med. 9: 589-595 (2003); og Gliadel Wafers™, Guildford Pharmaceuticals). Metoder for å danne
- 5 åpninger i barrieren omfatter, men er ikke begrenset til, ultralyd (se f.eks. U.S. Patent Publikasjon nr. 2002/0038086), osmotisk trykk (f.eks. ved administrering av hypertonisk mannitol (Neuwelt, E. A., Implication of the Blood-Brain Barrier and its Manipulation, Vol 1 & 2, Plenum Press, N.Y. (1989))), permeabilisering ved, f.eks. bradykinin eller permeabilizer A-7 (se f.eks. U.S. Patenter nr. 5,112,596,
- 10 5,268,164, 5,506,206 og 5,686,416) og transfeksjon av neuroner som befinner seg på begge sider av blod-hjerne-barrieren med vektorer inneholdende gener som koder for antistoffet eller antigenbindende fragment (se f.eks. U.S. Patent Publikasjon nr. 2003/0083299).
- 15 Lipid-baserte metoder for å transportere antistoffet eller aktivt fragment derav over blod-hjerne-barrieren omfatter, men er ikke begrenset til, innkapsling av antistoffet eller aktivt fragment derav i liposomer som blir koblet til antistoff-bindende fragmenter som binder til reseptorer på det vaskulære endotel av blod-hjerne-
- 20 antistoffet eller aktivt fragment derav i lavtetthets lipoproteinpartikler (se f.eks. U.S. Patentsøknad Publikasjon nr. 20020025313), og belegge antistoffet eller aktivt fragment derav i apolipoprotein E (se f.eks. U.S. Patentsøknad Publikasjon nr. 20040131692).
- Reseptor og kanal-baserte metoder for å transportere antistoffet eller aktivt
- 25 fragment derav gjennom blod-hjerne-barrieren omfatter, men er ikke begrenset til, anvendelse av glukokortikoid blokkere for å øke permeabiliteten av blod-hjerne-barrieren (se f.eks. U.S. Patentsøknad Publikasjoner nr. 2002/0065259, 2003/0162695 og 2005/0124533); aktivere kaliumkanaler (se f.eks. U.S. Patentsøknad Publikasjon nr. 2005/0089473), hemme ABC medikament
- 30 transportører (se f.eks. U.S. Patentsøknad Publikasjon nr. 2003/0073713); belegge antistoffer med et transferrin og modulere aktiviteten av den ene eller de flere transferrin reseptorene (se f.eks. U.S. Patentsøknad Publikasjon nr.

2003/0129186) og "cationizing" av antistoffene (se f.eks. U.S. Patent nr. 5,004,697).

DETEKSJON/ DIAGNOSE

5 I en ytterligere utførelsesform tilveiebringer foreliggende oppfinnelse fremgangsmåter og sett for deteksjon og diagnose av amyloidassosierte sykdommer eller lidelser. Disse fremgangsmåtene omfatter kjente immunologiske metoder vanlig anvendt for detektering eller kvantifisering av substanser i biologiske prøver eller i en *in situ* tilstand.

10

Diagnose av en amyloidassosiert sykdom eller lidelse hos en pasient kan oppnås ved å detektere immunspesifikk binding av et monoklonalt antistoff eller et aktivt fragment derav til en epitop av amyloidproteinet i en prøve eller *in situ*, som omfatter å bringe prøven eller en spesifikk kroppsdel eller kroppsoverflate mistenkt
15 å inneholde amyloidproteinet i kontakt med et antistoff som binder en epitop av amyloidproteinet, tillate antistoffet å binde til amyloidproteinet for å danne et immunologisk kompleks, detektere dannelsen av det immunologiske komplekset og korrelere nærvær eller fravær av det immunologiske komplekset med nærvær eller fravær av amyloidprotein i prøven eller spesifikk kroppsdel eller område.

20

Biologiske prøver som kan anvendes ved diagnostisering av en amyloidassosiert sykdom eller lidelse er for eksempel væsker slik som serum, plasma, spytt, gastrisk sekresjon, slim, cerebrospinalvæske, lymfevæske og lignende eller vev eller celleprøver oppnådd fra en organisme slik som nerve, hjerne, hjerte- eller
25 vaskulært vev. For å bestemme nærvær eller fravær av amyloidproteinet i en prøve kan hvilken som helst immunanalyse kjent for fagfolk på området. (Se Harlow og Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1988 555-612) anvendes slik som for eksempel analyser som anvender indirekte deteksjonsmetoder ved anvendelse av sekundære reagenser for
30 deteksjon, ELISA og immunopresipitering og agglutinerings analyse. En detaljert beskrivelse av disse analysene er for eksempel gitt i WO96/13590 ved Maertens og Stuyver, Zrein et al. (1998) og WO96/29605.

For *in situ* diagnose kan antistoffet eller hvilken som helst aktiv og funksjonell del derav administreres til organismen som skal diagnostiseres ved metoder kjent på området slik som for eksempel intravenøs, intranasal, intraperitoneal, intracerebral, intraarteriell injeksjon slik at en spesifikk binding mellom antistoffet ifølge oppfinnelsen og en eptitop-region på amyloidproteinet kan finne sted. Antistoff/antigen-komplekset kan detekteres gjennom et merke bundet til antistoffet eller et funksjonelt fragment derav.

10 Immunanalysene anvendt i diagnostiske anvendelser er typisk avhengig av merkede antigener, antistoffer eller sekundære reagenser for deteksjon. Disse proteinene eller reagensene kan være merket med forbindelser generelt kjent for fagfolk på området omfattende enzymer, radioisotoper og fluorescerende, luminiserende og kromogene substanser omfattende fargede partikler, slik som
15 kolloidalt gull og latekskuler. Av disse kan radioaktiv merking anvendes for nesten alle typer av forsøk og med flest variasjoner. Enzym-konjugerte merker er spesielt anvendelige når radioaktivitet må unngås eller når kick resultater er nødvendig. Fluorokromer gir, selv om det kreves kostbart utstyr for anvendelse av dem, en svært sensitiv deteksjonsmetode. Antistoffer anvendelige i disse forsøkene
20 omfatter monoklonale antistoffer, polyklonale antistoffer og affinitetsrensede polyklonale antistoffer.

Alternativt kan antistoffet være merket indirekte ved omsetning med merkede substanser som har affinitet for immunglobulin, slik som protein A eller G eller andre antistoffer. Antistoffet kan være konjugert til en andre substans og
25 detekteres med en merket tredje substans som har affinitet for den andre substansen konjugert til antistoffet. For eksempel kan antistoffet være konjugert til biotin og antistoff-biotin-konjugatet detekteres ved anvendelse av merket avidin eller streptavidin. Tilsvarende kan antistoffet være konjugert til et haptent og antistoff-haptent-konjugatet detekteres ved anvendelse av merket anti-haptent
30 antistoff.

Fagfolk på området vil kjenne til disse og andre egnede merker som kan anvendes i henhold til foreliggende oppfinnelse. Bindingen av disse merkene til antistoffer

eller fragmenter derav kan gjennomføres ved anvendelse av standard teknikker vanlig kjent for fagfolk på området. Typiske teknikker er beskrevet av Kennedy, J. H., et al., 1976 (Clin. Chim. Acta 70:1-31) og Schurs, A. H. W. M., et al. 1977 (Clin. Chim Acta 81:1-40). Koblingsteknikker nevnt i den sistnevnte er glutaraldehyd-
5 metoden, periodat-metoden, dimaleimid-metoden og andre, som alle er inntatt her ved referanse.

Vanlige immunoanalyser anvender en dobbelt antistoff-metode for å detektere tilstedeværelsen av en analytt, hvor. Antistoffet er merket indirekte ved reaktivitet
10 med et andre antistoff som er merket med et detekterbart merke. Det andre antistoffet er fortrinnsvis ett som binder til antistoffer fra dyret fra hvilket det monoklonale antistoffet er avledet. Med andre ord, dersom det monoklonale antistoffet er et mus antistoff, så er det merkede, andre antistoffet et anti-mus antistoff. For det monoklonale antistoffet som skal anvendes i forsøket beskrevet
15 nedenfor, er dette merket fortrinnsvis en antistoff-belagt kule, spesielt en magnetisk kule. For det polyklonale antistoffet som kan anvendes i immunanalysen beskrevet her, er merket fortrinnsvis et detekterbart molekyl slik som en radioaktiv, fluorescerende eller en elektrokjemiluminescent substans.

20 Et alternativt dobbelt antistoff-system ofte referert til som hurtig format-systemer fordi de er tilpasset raske bestemmelse av tilstedeværelse av en analytt, kan også anvendes innenfor omfanget av foreliggende oppfinnelse. Systemet krever høy affinitet mellom antistoffet og analytten. I henhold til én utførelsesform av oppfinnelsen, blir tilstedeværelsen av amyloidproteinet bestemt ved anvendelse
25 av et par av antistoffer, hvert spesifikt for amyloidprotein. Ett av nevnte par av antistoffer er referert til her som et "detektor antistoff" og det andre av nevnte par av antistoffer er referert til her som et "oppfangning ("capture") antistoff". Det monoklonale antistoffet ifølge foreliggende oppfinnelse kan anvendes som enten et oppfangning antistoff eller et detektor antistoff. Det monoklonale antistoffet ifølge
30 foreliggende oppfinnelse kan også anvendes som både oppfangning og detektor antistoff, sammen i et enkelt forsøk. I en utførelsesform av oppfinnelsen anvendes følgelig dobbelt antistoff sandwich-metoden for deteksjon av amyloidprotein i en prøve av biologisk væske. I denne metoden blir analytten (amyloidprotein)

fastlkemt mellom detektor antistoffet og oppfangning antistoffet, hvor oppfangings antistoffet er irreversibelt immobilisert på en fast bærer. Detektor antistoffet ville inneholde et detekterbart merke, for å identifisere tilstedeværelse av antistoffet-analytt-sandwich og følgelig tilstedeværelse av analytten.

5

Eksempler på fastfase substanser omfatter, men er ikke begrenset til, mikrotiterplater, prøverør av polystyren, magnetiske, plast eller glasskuler og slides som er velkjent på området radioimmunanalyse og enzym immunoassay. Metoder for kobling av antistoffer til fastfaser er også velkjent for fagfolk på området. Senere har en rekke porøse materialer slik som nylon, nitrocellulose, celluloseacetat, glassfiber og andre porøse polymerer blitt anvendt som faste bærere.

Foreliggende oppfinnelse angår også et diagnostisk sett for detektering av amyloidprotein i en biologisk prøve omfattende en sammensetning som definert ovenfor. Videre angår foreliggende oppfinnelse det sistnevnte diagnostiske settet som, i tillegg til en sammensetning som definert ovenfor også omfatter en deteksjonsreagens som definert ovenfor. Betegnelsen "diagnostisk sett" refererer generelt til hvilket som helst diagnostisk sett kjent på området. Nærmere bestemt refererer sistnevnte betegnelse til et diagnostisk sett som beskrevet i Zrein et al. (1998).

Det er enda et annet formål med foreliggende oppfinnelse å tilveiebringe nye immunprober og testsett for deteksjon og diagnose av amyloid-assosierte sykdommer og lidelser omfattende antistoffer ifølge foreliggende oppfinnelse. For immunprober, er antistoffene direkte eller indirekte bundet til et egnet rapportørmolekyl, f.eks. et enzym eller et radionuklid. Test-settet omfatter en beholder som inneholder ett eller flere antistoffer ifølge foreliggende oppfinnelse og instruksjoner for anvendelse av antistoffene med det formål å binde til amyloidprotein for å danne et immunologisk kompleks og detektere dannelsen av det immunologiske komplekset slik at tilstedeværelse eller fravær av det immunologiske komplekset er i samsvar med tilstedeværelse eller fravær av amyloidprotein.

EKSEMPLER

Materialer

Utvikling og fremstilling av mus monoklonalt antistoff ACI-01-Ab7C2 (betegnet
 5 “mC2” og hC2 for det humaniserte C2-antistoffet, gjennom hele søknaden) er
 beskrevet i søknad EP 05 02 7092,5 som er til behandling samtidig som denne,
 innlevert 12.12.2005, idet beskrivelsen i denne er inntatt her ved referanse.

Hybridomceller FP-12H3-C2, som produserer mus monoklonalt antistoff ACI-01-
 10 Ab7C2 (betegnet “mC2” og hC2 for det humaniserte C2-antistoffet, gjennom hele
 søknaden) ble deponert 1. desember 2005 i den samtidige søknaden nr
 EP05027092,5, ved “Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
 GmbH (DSMZ) i Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig,
 under bestemmelsene ifølge Budapestkonvensjonen under aksjesjonsnummer
 15 DSM ACC2750.

Hybridomceller ble dyrket i Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) supplert
 med 10% føtalt bovint serum og antibiotika (Penicillin/Streptomycin). Isotypen av
 antistoffet produsert ble kontrollert og funnet å være mus IgG2b/kappa, som
 20 forventet.

Analyse

En ELISA for binding til Amyloid Beta ga et pålitelig mål for styrken av C2-
 antistoffer. Positive kontroll-antistoffer, murint FP-12H3-C2 antistoff (Genovac Lot
 25 Nr: AK379/01) og standard Chemicon antistoff 1560 (Lot nr: 0508008791).

Valg av humane konstante regioner

Ettersom immunsystem rekruttering ikke er ønskelig for den kliniske antistoff-
 kandidaten, var den valgte humane konstante regionen for den tunge kjeden
 30 human IgG4, modifisert for å endre Serin i posisjon 228 i hengselsregionen til
 Prolin (HulG4 Ser-Pro). Denne mutasjonen stabiliserer interkjede
 disulfidbindingen og forhindrer dannelse av halve molekyler som kan forekomme i
 native humane IgG4 fremstillinger. Antistoffet uttrykt fra produksjons-cellelinjene vil

også ha fjernet det terminale lysinet. Sekvensene av humane konstante regioner HulG4 Ser-Pro og human Kappa er gitt i SEKV ID NR: 17 og 14, henholdsvis.

5 Eksempel 1 Kloning og sekvensering av antistoff variable regioner

Totalt RNA ble fremstilt fra 3×10^6 hybridomceller (i T175 kolbe) ved anvendelse av Qiagen RNeasy mini kit (Kat Nr: 74104). RNA ble eluert i 50 μ l vann og kontrollert på en 1,2% agarosegel. Det kondisjonerte mediet fra cellene ble beholdt og en prøve anvendt for testing i antistoffaktivitet-analysen.

10

V_H og V_K cDNA'er ble fremstilt ved anvendelse av revers transkriptase med mus IgG og κ konstant region primere. Første tråd cDNA'ene ble amplifisert ved PCR ved anvendelse av et stort sett av signalsekvens-primere. De amplifiserte DNA'ene ble rensset på gel og klonet inn i vektoren pGem® T Easy (Promega). V_H og V_K-klonene oppnådd ble screenet for inserts av den forventede størrelsen ved PCR og DNA-sekvensen av selekterte kloner bestemt ved automatisert DNA-sekvensering. Lokaliseringene av de komplementaritetsbestemmende regionene (CDR'er) i sekvensene ble bestemt med referanse til andre antistoffsekvenser (Kabat EA *et al.*, 1991). Nummereringskonvensjonen ifølge Kabat for antistoff variable regioner blir anvendt gjennom hele foreliggende søknad; følgelig kan nummere av rester skille seg fra det bestemte lineære nummereringen.

20

DNA-sekvensen og utledet aminosyresekvens for mC2 V_K er vist i SEKV ID NR: 29 og 27, henholdsvis. Fire kloner ga denne identiske produktive sekvensen. En ikke-produktiv avvikende V_K-sekvens som oppstår fra hybridom fusjonspartneren ble også funnet i flere kloner.

25

For mC2 V_H, ble to forskjellige produktive sekvenser isolert. mC2 V_H AF-sekvensen (se SEKV ID NR: 30) ble funnet i totalt 29 kloner, med 14 enkelt basepar-endringer i individuelle kloner. mC2 V_H B-sekvensen ble funnet i totalt 8 kloner. Fem av disse representerte majoritet sekvensen, hvor de andre 3 klonene er variasjoner av denne. Det er mulig at disse lignende V_H B-sekvensene oppsto

30

som en artefakt av PCR-amplifisering. En ikke-produktiv avvikende V_H ble også oppnådd fra C2-hybridomet og blir tilskrevet defekt V-D-J joining.

For å bestemme hvilken som er den korrekte aktive mC2 V_H , ble to kimære
 5 antistoffer fremstilt med de to forskjellige V_H -sekvensene, AF og B, kombinert med mC2 V_K , som skal testes for korrekt antistoff-aktivitet.

Eksempel 2 Konstruksjon av gener for kimært antistoff

10

Et humant kimært antistoff i dets mest vanlige form består av humane konstante regioner bundet til murine (eller andre ikke-humane) variable regioner. Et kimært antistoff tilveiebringer et svært anvendelig verktøy, først for bekreftelse for at de korrekte variable regionene er identifisert, for det andre for anvendelse som et
 15 kontrollantistoff i antigen bindingsforsøk med samme effektor-funksjoner og ved anvendelse av samme sekundære deteksjonsreagenser som et humanisert eller konstruert antistoff og kan også anvendes for å undersøke de farmakokinetiske og andre egenskaper av de humane konstante regionene med referanse til det bestemte målet for antistoffet.

20

To kimære tung kjede ekspresjonsvektorer ble konstruert bestående av mC2 V_H AF eller mC2 V_H B variable regioner bundet til Hulg4 (Ser-Pro) konstant region i ekspresjonsvektoren *pSVgpt*. Dette er basert på *pSV₂gpt* (Mulligan og Berg, 1980) og omfatter ampicillin resistensgenet for seleksjon i bakterieceller, *gpt*-genet for
 25 seleksjon i pattedyrceller, murin tung kjede immunglobulin enhancer-regionen, genomisk sekvens som koder for konstant region genet og SV40 poly A-sekvenser. Den tunge kjede variable regionen for ekspresjon blir insertert som et *HindIII* til *BamHI*-fragment.

30

En kimær lett kjede vektor ble konstruert bestående av C2 V_K bundet til human C Kappa konstant region i ekspresjonsvektoren *pSVhyg*. (Hieter PA et al, 1980) *pSVhyg* omfatter ampicillin resistensgenet for seleksjon i bakterieceller, *hyg*-genet for seleksjon i pattedyrceller, murin tung kjede immunglobulin enhancer-regionen,

genomisk sekvens som koder for kappa konstant region-genet og omfatter kappa enhancer og SV40 poly A-sekvenser. Den lette kjede variable regionen for ekspresjon blir insertert som et *HindIII* til *BamHI*-fragment.

- 5 Ekspresjonskassetter for de murine C2 VH og VK-sekvensene ble konstruert ved tilføyelse av 5' flankerende sekvens omfattende leder signalpeptidet, leder intron og den murine immunglobulin promoteren og 3' flankerende sekvens omfattende setet for spleising og intronsekvens, ved anvendelse av vektorene VH-PCR1 og VK-PCR1 som templat (Riechmann et al., 1988). DNA-sekvensen ble bekreftet
- 10 å være korrekt for VH og VK i de kimære ekspresjonsvektorene. DNA og aminosyresekvensene av VH og VK-genene i ekspresjonskassetene er vist i Figurene 1 og 2.

Eksempel 3 Ekspresjon av kimære antistoffer

15

3.1 Ekspresjon i stabile cellelinjer

- Vertscellelinjen for antistoff-ekspresjon var NS0, et ikke-immunglobulin-produserende mus myelom, oppnådd fra European Collection of Animal Cell Cultures, Porton UK (ECACC Nr 85110503). De tung og lett kjede
- 20 ekspresjonsvektorene ble ko-transfektet inn i NS0-celler ved elektroporering. Kolonier som uttrykker *gpt*-genet ble selektert i Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplert med 10% føtalt bovint serum (FBS), 0,8 µg/ml mykofenolsyre og 250 µg/ml xantin. Transfektete celle kloner ble screenet for produksjon av humant antistoff ved ELISA for human IgG. Cellelinjer som utskiller antistoff ble ekspandert
- 25 og de som produserer mest ble selektert og frosset ned i flytende nitrogen. De best produserende cellelinjene for hvert antistoff ble ekspandert i medium som ovenfor men med kun 5% FBS. Kimære antistoffer ble rensset ved anvendelse av Prosep®-A (Bioprocessing Ltd). Konsentrasjonen ble bestemt ved ELISA for humant IgG κ -antistoff. Antistoffene ble også analysert ved SDS-PAGE.

30

3.2 Transient ekspresjon av kimære antistoffer

For å påskynde testingen av de forskjellige kimære antistoffene ble transient ekspresjon anvendt for å raskt produsere små mengder av celle supernatant

inneholdende rekombinant antistoff for testing. mC2 V_H og V_K ekspresjonskassetene ble overført til vektorer basert på pcDNA3,1 (Invitrogen) for transient ekspresjon. Den tunge kjede vektoren omfattet en human IgG konstant region. Den lette kjede vektoren omfattet en human kappa konstant region. Både

5 mC2 V_H AF og mC2 V_H B ble transfektert med mC2 V_K inn i human embryonisk nyre (HEK 298)-celler med Lipofectamin 2000 reagens (Invitrogen Kat Nr: 11668) i henhold til protokollen levert av produsenten. Kondisjonert medium ble høstet fra celler 3 dager etter transfeksjon. Mengden av antistoff produsert ble bestemt ved ELISA for humant IgG_K antistoff.

10

Eksempel 4 Aktivitet av kimære C2 antistoffer

4.1 Aktivitet av kimære C2 antistoffer produsert ved transient transfeksjon

15 Prøver av kondisjonert medium fra transient transfeksjon for de to ulike kimære antistoffene ble testet i ELISA for binding til Amyloid beta. Resultatene indikerer klart at C2 V_H AF er den korrekte sekvensen. Det C2 V_H AF/C2 V_K kimære antistoffet binder godt i analysen, men C2 V_H B/C2 V_K viser ingen binding i det hele tatt. Chemicon 1560 murint kontroll-antistoff fremviste god binding, men

20 binding ved det rensede murine C2-antistoffet gitt var lav. Det skal bemerkes at et ulikt sekundært antistoff ble anvendt for de murine antistoffene med mus konstante regioner sammenlignet med de kimære antistoffene med humane konstante regioner, slik at resultatene ikke er direkte sammenlignbare. Kondisjonert medium fra C2 hybridomet ble senere funnet å gi et godt resultat i

25 forsøket.

4.2 Aktivitet av rensede kimære C2 antistoffer

De to forskjellige C2 kimære antistoffene ble rensset fra stabile NS0-cellelinjer som beskrevet og testet ved anvendelse av Amyloid Beta ELISA. Resultatene oppnådd

30 er i henhold til resultatene oppnådd med transient uttrykt antistoff. C2 ChVH AF/ChVK antistoffet binder godt i ELISA og C2 ChVH B/ChVK-antistoffet binder ikke i det hele tatt.

Eksempel 5 Utforming av humanisert C2 antistoff-gener

mC2 V_H og V_K aminosyresekvensene ble sammenlignet med gnager antistoff V_H
 5 og V_K-sekvenser i NCBI og Kabat-databasene.

5.1 Lett kjede variabel region

Den nærmeste matchen av mus kjønnselle genet til mC2 V_K er bb1, Locus MMU231201, (Schable *et al*, 1999). Bare to aminosyrer atskiller seg fra denne
 10 kjønnselle-sekvensen, begge lokalisert innenfor CDRL1. Modne murine antistoffer med lignende, men ikke identisk, sekvens er funnet. Mange har en identisk CDRL2 og identisk CDRL3, men CDRL1 av mC2 synes å være unik. mC2 V_K kan anvises til Kabat undergruppe MuV_KII. Posisjon 87 av mC2 V_K er F heller enn Y som er mer vanlig i undergruppen, hvilket indikerer at denne struktur
 15 ("framework")-resten kan være viktig for antistoff-aktivitet. Sammenligning med human kjønnselle V_K-sekvenser viser at gener fra undergruppe V_KII er den beste matchen for mC2 V_K (Cox *et al*, 1994). Sekvens DPK15 sammen med den humane J-regionen HuJk1 ble valgt for å tilveiebringe akseptor struktur-sekvensene for den humaniserte V_K.

20

Fire humaniserte V_K-sekvenser ble utformet. C2HuVK1 består av mC2 V_K CDR'er med strukturer ("framework") fra DPK 15 og human Jk1. I versjonene 2, 3 og 4 har murine rester blitt substituert i strukturen i posisjonene 45 eller 87 eller begge.
 Rest 45 kan medvirke til å støtte konformasjonen av CDR'ene. Rest 87 er
 25 lokalisert ved grenseflaten av V_H og V_K-domenene. Derfor kan disse restene være kritiske for opprettholdelse av antistoffbinding .

Posisjonene og endringer som er gjort i lett kjede struktur ("framework")-regionene er vist i Tabell 6. En sammenligning av de humaniserte sekvensene med mC2 V_K sekvens og med DPK15 og human Jk1

30

5.2 Tung kjede variabel region

Den nærmeste matchen av mus kjønnselle genet til mC2 V_H AF er VH7183, Locus AF120466, (Langdon *et al*, 2000). Sammenligningen er vist i Figur 3. Ni

- aminosyrer skiller seg fra denne kjønnselle-sekvensen, de fleste lokalisert innenfor CDR2. Modne murine antistoffer med identisk eller lignende (én rest forskjellig) CDR1 eller med lignende CDR2 (én rest forskjellig) er funnet, men ingen med alle tre CDR'er identisk med mC2 V_H AF. CDR3 av mC2 antistoff er
- 5 ualminnelig kort, bestående av kun tre rester. Imidlertid er andre antistoffer funnet i databasen med CDR3 av denne lengden. mC2 V_H AF kan anvises til Kabat undergruppe MuV_HIID. Rest 47 av mC2 V_H er L heller enn den mer vanlige W og rest 94 er S heller enn den normale R, hvilket indikerer at disse struktur ("framework")-restene kan være viktig for antistoff-aktivitet. Sammenligning med
- 10 human kjønnselle V_H-sekvenser viser at gener fra undergruppe V_HIII er den beste matchen for mC2 V_H. Sekvens DP54 sammen med den humane J-regionen HuJ_H6 ble valgt for å gi akseptor struktur ("framework")-sekvensene for den humaniserte V_H.
- 15 Fire humaniserte V_H-sekvenser ble utformet. C2HuVH1 består av mC2 V_H AF CDR'er med strukturer ("framework") fra DP54 og HuJ_H6. I versjonene 2, 3 og 4 har murine rester blitt substituert i strukturen i posisjonene 47 eller 94 eller begge. Rest 47 i struktur 2 slutter kontakt både med CDR'ene og med V_K-domenet. Rest 94 kan medvirke til å støtte konformasjonen av CDR'ene. Derfor kan disse restene
- 20 være kritiske for opprettholdelse av antistoffbinding. Posisjonene og endringer som er gjort i tung kjede struktur ("framework")-regionene er vist i Tabell 7.

25 **Eksempel 6 Konstruksjon av humanisert antistoff-gener**

- De modifiserte variable regionene ble konstruert ved metoden for overlapping PCR rekombinasjon. Ekspresjonskassetene for det kimære antistoffet, C2 ChV_H AF og C2 ChV_K, ble anvendt som templat for mutagenese av struktur
- 30 ("framework")-regionene til de nødvendige sekvensene. Sett av mutagene primer-par ble syntetisert omfattende regionene som skal endres. De humaniserte V_H og V_K ekspresjonskassetene fremstilt ble klonet inn i pUC19 og hele DNA-sekvensen ble bekreftet å være korrekt for hver V_H og V_K. De modifiserte tung og

lett kjede V-region genene ble skåret ut fra pUC19 som *HindIII* til *BamHI* ekspresjonskassetter. Disse ble overført til ekspresjonsvektorene pSVgpt og pSVhyg som omfatter human IgG4 Ser-pro eller κ konstante regioner henholdsvis, som for kimært antistoff-vektorene. DNA-sekvensen ble bekreftet å være korrekt
 5 for de humaniserte V_H og V_K i ekspresjonsvektorene.

Eksempel 7 Ekspresjon av humaniserte antistoffer

10

7.1 Ekspresjon av stabile cellelinjer

De humaniserte tung og lett kjede ekspresjonsvektorene ble ko-transfektet inn i NS0-celler ved elektroporering, som for ekspresjon av kimære antistoffer. Antistoff-produserende cellelinjer ble selektert og ekspandert og humaniserte
 15 antistoffer rensset, nøyaktig som for det kimære antistoffet. De rensede antistoffene ble analysert ved SDS-PAGE.

7.2 Transient ekspresjon av humaniserte antistoffer

For å påskynde testing av de forskjellige humaniserte V_H og V_K -konstruksjonene,
 20 ble de C2 humaniserte V_H og V_K ekspresjonskassetene også overført til vektorene for transient ekspresjon beskrevet i avsnitt 7,2. De fire humaniserte C2 V_K -konstruksjonene ble kotransfektet med den kimære C2 V_H -konstruksjonen inn i HEK293-celler. Tilsvarende ble de fire humaniserte C2 V_H -konstruksjonene kotransfektet med den kimære C2 V_K konstruksjonen inn i HEK293-celler.
 25 Kondisjonert medium ble høstet fra celler tre dager etter transfeksjon. Mengden av antistoff produsert ble bestemt ved ELISA for humant IgG κ -antistoff.

Eksempel 8 Aktivitet av humaniserte C2-antistoffer

30

8.1 Aktivitet av humaniserte C2-antistoffer produsert ved transient transfeksjon

Prøver av kondisjonert medium fra den transiente transfeksjonen ble testet i Amyloid Beta ELISA. Resultatene oppnådd indikerer tydelig at de humaniserte VH-konstruksjonene C2 HuVH AF versjonene 2 og 4 er funksjonelle når kombinert med den kimære C2 kappa kjeden og er sammenlignbar med det kimære C2-antistoffet i analysen. I motsetning til dette fremviser antistoffene inneholdende C2 HuVH AF versjonene 1 og 3 kombinert med den kimære C2 kappa kjeden ingen binding i det hele tatt i forsøket. Dette indikerer at substitusjonen av den murine resten i posisjon 94 er essensiell for antistoff-aktivitet. Antistoffer inneholdende den kimære C2 tunge kjeden kombinert med de fire humaniserte C2 kappa kjedene viste alle god binding, sammenlignbar med det kimære antistoffet, i ELISA.

8.2 Aktivitet av rensede humaniserte C2 antistoffer

Åtte forskjellige humaniserte C2-antistoffer omfattende alle kombinasjoner av to humaniserte tunge kjeder og fire humaniserte lette kjeder ble rensset fra stabile NS0-cellelinjer som beskrevet og testet ved anvendelse av Amyloid Beta ELISA (Figur 4).

Resultatene oppnådd indikerer tydelig at C2 HuVH4 antistoffer fungerer bedre i forsøket enn C2 HuVH2-antistoffer. Av C2 HuVH2-antistoffene viser C2 HuVH2/HuVK3 best bindingsaktivitet, men denne er omtrent 2 ganger redusert sammenlignet med det kimære kontroll-antistoffet C2 ChVHAF/ChVK. C2 HuVH2/HuVK2 aktivitet er fire til fem ganger redusert sammenlignet med kontrollen. Aktivitetene av antistoffene omfattende C2HuVH4 med de fire forskjellige humaniserte lette kjedene er lignende. Den høyeste aktiviteten er observert for C2HuVH4/HuVK1 og alle fire antistoffer er nær kimært antistoff kontrollen i forsøket.

Eksempel 9 Modifikasjoner av CDRL2

9.1 Utforming av lett kjede med modifisert CDR 2

Som angitt ovenfor har mange antistoffer samme CDRL2-sekvens ("KVSNRFS")
 5 som C2-antistoffet. Det ble besluttet å teste hvorvidt CDRL2 kunne modifiseres litt
 uten å påvirke antistoff-aktivitet negativt. To konservative substitusjoner ble valgt:
 R for K i posisjon 50 og S for N i posisjon 53. De to alternative CDRL2-
 sekvensene er derfor "RVSNRFS" og "KVSSRFS". Disse ble inkorporert i den
 murine V_K-sekvensen uten noen andre endringer, som mC2 VK-R og mC2 VK-S
 10 henholdsvis.

9.2 Transient ekspresjon av modifisert CDRL2 antistoff

De to C2 lett kjede konstruksjonene med modifisert CDRL2 beskrevet i avsnitt
 11,2,1 ble klonet inn i lett kjede vektoren for transient ekspresjon. Hver ble
 15 kotransfektet med den kimære C2 V_H-vektoren inn i HEK293-celler. Kondisjonert
 medium ble høstet fra celler tre dager etter transfeksjon. Mengden av antistoff
 produsert ble bestemt ved ELISA for humant IgG_K-antistoff.

9.3 Aktivitet av C2 antistoff med modifisert CDRL2

20 Prøver av kondisjonert medium fra transient transfeksjon av mC2 V_KS med
 modifisert CDRL2 kombinert med mC2 V_H ble testet i Amyloid Beta ELISA. (Figur
 5) Både VK-R og VK-S antistoffene er sammenlignbare med det kimære C2-
 antistoffet, hvilket indikerer at de individuelle modifikasjonene av CDRL2 valgt ikke
 tydelig påvirker aktiviteten av antistoffet i forsøket.

25

Eksempel 10 Bestemmelse av affinitet

For å bedømme bindingsspesifisiteten og affiniteten av mus (ACI-01-Ab-7-C2)
 30 kimære (AF) og humaniserte antistoffer (H4K1; H4K4), ble BIACORE.RTM.
 analyse utført ved anvendelse av amyloid beta 1-42 monomerer og fibre som
 antigen immobilisert på en CM5-chip. BIACORE.RTM.-teknologi anvender
 endringer i refraktiv indeks ved overflatelaget ved binding av antistoffet til

antigenet immobilisert på laget. Binding blir detektert ved overflate plasmon resonans (SPR) av laserlys som bøyes av fra overflaten. Analyse av signal kinetikken "on rate" og "off rate" tillater skjelning mellom uspesifikk og spesifikk interaksjon. Konsentrasjonen av antistoff anvendt var i området 0,05 μM til 1,0 μM .

Tabell 1: Bindingsspesifisitet og affinitet av mus (ACI-01-Ab-7-C2) kimære (AF) og humaniserte antistoffer (H4K1; H4K4) for amyloid beta 1-42 monomerer og fibre

	Monomerer			Fibre		
	$k_a(1/\text{Ms})$	$k_d(1/\text{s})$	KD (M)	$k_a(1/\text{Ms})$	$k_d(1/\text{s})$	KD (M)
Mus ACI-01-Ab-7-C2	1,8E+04	2,7E-03	1,5E-07	2,4E+04	9,9E-04	4,1E-08
kimær AF	4,7E+04	9,5E-04	2E-08	5,1E+04	3,3E-04	6,5E-09
humanisert H4K1	5,0E+04	9,5E-04	1,9E-08	4,9E+04	2,3E-04	4,7E-09
humanisert H4K4	2,5E+04	4,4E-04	1,8E-08	1,3E+05	3,0E-04	2,3E-09

Eksempel 11 Immunhistokjemisk bindingsforsøk

11.1 Human hjerne-snitt

Hjerner fra friske, ikke-demente pre-AD og AD-pasienter ble oppnådd fra Universitetsklinik i Bonn etter etisk godkjenning. Hjerner ble fiksert i formaldehyd og hippocampus-området ble dehydratisert, innleiret i parafin og 5 μm snitt ble kuttet med en mikrotom. Parafinsnitt ble lagret ved RT inntil anvendelse. For friskt materiale, ble 5 μm cryosnitt kuttet med en kryostat og snitt lagret ved -80°C inntil anvendelse.

11.2 Immunhistokjemi

Parafinsnitt ble avparafinisert og rehydrert ved bading av slides i xylen fulgt av 100% etanol, 90% etanol og 70% etanol. Bakgrunn ble redusert ved 30 minutters inkubering i 10% H_2O_2 , 10% metanol i vann. Gjenervervelse av antigen ble oppnådd ved inkubering av objektglassene i 100% maursyre i 3 minutter. Etter 3 vaskinger i Tris-bufret saltoppløsning (TBS, pH 7,5), ble uspesifikk merking blokkert ved en 2 times inkubering av objektglassene i 10 % BSA, 0,25% Triton X-100 i TBS. Etter vasking (3 vaskinger i TBS) ble blokkering av endogene

antistoffer foretatt ved tilsetning av en ikke-merket anti-human IgG (Biomeda) og inkubering av objektglassene i fuktige kammere natten over ved RT. Etter ytterligere 3 vaskinger ble det primære humane anti amyloid antistoffet tilsatt til objektglassene og inkubert i ytterligere 24 timer ved RT. Etter vasking ble et

5 alkalisk fosfatase-merket sekundært anti humant IgG (Sigma) tilsatt til objektglassene og inkubert i 2 timer ved RT. Etter vasking ble objektglassene utviklet med "Liquid permanent Red (Dakocytomation) vasket med vann og lufttørket før montering med permanent monteringsmedia (corbitbalsam).

10 Kryosnitt ble fiksert i metanol i 30 minutter ved -80°C og bakgrunn redusert ved tilsetning av H₂O₂ til den kalde metanolen til en endelig konsentrasjon på 10% og inkubering i 30 minutter ved RT. Etter 3 vaskinger i Tris-bufret saltoppløsning (TBS, pH7,5), ble uspesifikk merking blokkert ved en 2 timers inkubering av objektglassene i 10 % BSA, 0,25% Triton X 100 i TBS som ovenfor og samme

15 merkingsprosedyre som ovenfor ble utført.

Snitt ble undersøkt med et Leica DMLB mikroskop og fotografert ved anvendelse av et Leica DC500 kamera og Leica FireCam1,2,0 programvare.

20 Begge humane antistoffer A og C merket plakk i hjerner fra pasienter med AD sykdom (Figur 6). Både diffuse plakk og plakk med kjerne ble merket. Videre kunne diffuse plakk hos ikke-demente pre-AD pasienter også detekteres ved A og C-antistoffene. Amyloid i cerebral amyloid angiopati (CAA) ble merket med begge antistoffene og noe merking av neuroner som kan svare til intracellulært amyloid

25 ble også detektert. Ingen merking ble sett i kontrollhjerner fra frisk pasient. Plakk kunne detekteres i parafinsnitt forbehandlet med maursyre men ingen plakk ble merket i parafinsnitt uten forbehandling med maursyre og i kryosnitt fiksert i metanol. Det humane antistoff B detekterte ikke plakk i parafinsnitt og mus antistoffet merket ikke hverken parafin eller kryosnitt av humane hjerner.

30

Forkortelser:

A = binding kimært antistoff AF (IgG4) (mC2ChVHAF)

B = ikke-binding kimært antistoff B (IgG4) (mC2VHB)

C = binding humanisert antistoff H4K1 (IgG4) (HuVH4/HuVK1)

Mus = ACI-01-Ab-C2 mus antistoff (IgG2b)

5 **Eksempel 12 Funksjonalitet av mC2 på amyloide fibre**

12.1 Modifikasjon av konformasjon av A β 1-42 fibre og initiering av oppløsning etter binding av mC2-antistoffet

For å evaluere mekanismen ved hvilken antistoffet er i stand til å oppløse
 10 forhåndsformede beta-amyloid (A β 1-42) fibre ble en hode-hode sammenligning av
 Tioflavin-T (Th-T) fluorescerende analyse utført som måler oppløsning og faststoff
 Kjernemagnetisk resonans (NMR) av U-¹³C Tyrosin10 og Valin12-merket A β 1-42
 peptid for analyse av sekundær konformasjon (Figur 7A). mC2-antistoffet
 solubiliserte 35,4 % av de forhåndsformede A β 1-42 fibrene og induserte samtidig
 15 en forskyvning av sekundær konformasjon fra beta sheet til ikke-repetitiv struktur
 ("random coil"). Reduksjonen i populasjonen av beta sheet-konformasjonen med
 hensyn til random coil er i størrelsesorden 35% og er derfor i nær
 overensstemmelse med den målt ved anvendelse av fluorescens Th-T analyse
 (Figur 7B). Disse data indikerer at bindingen av mC2-antistoffet initierer en
 20 overgang av den sekundære strukturen som potensielt forårsaker en
 destabilisering av det parallelle intermolekylære arrangementet av beta sheets
 hvilket fører til et brudd i langstrakte fibre til mindre fragmenter.

12.2 Konformasjonsavhengig bindingsaffinitet av mC2 antistoff

25 Siden det er velkjent i den vitenskapelige litteraturen at en andel av antistoff-
 antigen bindingsenergien kan anvendes for energiavhengig modifikasjon av
 konformasjonen av et antigen (Blond og Goldberg, 1987), ble et sammenlignings
 forsøk av bindingsaffiniteten av C2-antistoffet med hele A β 1-42 proteinet og med et
 mindre, ni aminosyrers langt, peptid omfattende antistoffets epitop utført (Figur 8).
 30 For denne sammenligningen ble affinitetene av det humaniserte antistoffet C2
 analysert ved ELISA ved anvendelse av biotinylerte peptider som dekker den
 fullstendige aminosyresekvensen av C2's epitop (produsert av Mimotopes og
 anskaffet fra ANAWA Trading SA) og et biotinylert fullstendig A β 1-42 peptid

(Bachem). Analysen ble utført i henhold til produsentens (Mimotopes) instruksjoner. Som vist i Figur 8 og Tabell 2 binder antistoffet med en 36,0% høyere affinitet til peptidet omfattende dets spesifikke epitop (aminosyrene 13-21 av A β ₁₋₄₂ sekvensen) enn til hele A β ₁₋₄₂-proteinet. Det er derfor foreslått at forskjellen i bindingsaffinitet energi ble anvendt til den energikrevende overgangen av den sekundære konformasjonen av amyloidproteinet for å presentere antigenet i en mer akseptabel posisjon for antistoff-interaksjonen. Dette forklarer hvorfor affiniteten til antistoffet er lavere for det native (hele amyloidproteinet) enn for den isolerte subenheten.

10

Tabell 2

	O.D	
	Amyloid beta 13-21	Amyloid beta1-42
hC2	1,225	0,9005
Kontroll IgG	0,171	0,196

Eksempel 13 Effekter av anti-amyloid hC2 på aggregering av amyloid beta 1-42-peptid

15

For å bedømme evnen av det humaniserte anti-human amyloid beta monoklonale antistoffet hC2 til å mediere anti-aggregering og oppløsnings-effekter på amyloid beta (A β) ble en tioflavin T spektrofluorescens analyse utført.

13,1 Analyse av hemming av aggregering

20

A β ₁₋₄₂ lyofilisert pulver ble rekonstituert i heksafluorisopropanol (HFIP) til 1 mM. Peptid-løsningen ble ultralydbehandlet i 15 min ved romtemperatur, omrørt natten over og alikvoter dannet i ikke-silikoniserte mikrosentrifugerør. HFIP ble deretter inndampet under en strøm av argon. Den resulterende peptid-filmen ble vakuum-tørket i 10 min og lagret ved -80°C inntil anvendt.

25

For analyse av den antistoff-medierte inhiberingen av A β ₁₋₄₂ aggregering ble hC2-antistoffet forhåndsfortynnet i PBS og en analyseløsning inneholdende de følgende komponentene ble fremstilt i et ikke-silikonisert inkuberingsrør: 3,3 eller

0,33 μM forhåndsfortynnet antistoff, 10 μM tioflavin T, 33 μM A β 1-42 og 8,2% DMSO. Derfor var de endelige molforholdene av antistoff til A β 1-42 1:10 og 1:100. Passende kontrolløsninger ble også fremstilt. Løsningene ble deretter inkubert i 24 timer ved 37°C og spektrofluorescensen (relative fluorescensenheter; RFU) avlest i seks replikater i sorte 384-brønns plater (Perkin-Elmer) i et Perkin-Elmer FluorCount spektrofluormeter. Spektrofluorescensen ble deretter målt og % oppløsning beregnet som beskrevet nedenfor.

13,2 Oppløsning-forsøk

For analyse av antistoffmediert oppløsning av forhånds-aggregert A β 1-42, ble et lavmolekylvekt A β 1-42, fremstilt som beskrevet ovenfor, dannet som en 110 μM løsning i 27% DMSO og 1x PBS. Denne løsningen ble deretter tillatt å aggregere ved 37°C i 24 timer hvorefter følgende ble tilsatt: 3,3 eller 0,33 μM forhåndsfortynnet antistoff og 10 μM tioflavin T. Dette resulterte i et molart forhold på 1:10 og 1:100 antistoff til A β 1-42. Denne løsningen ble deretter inkubert i ytterligere 24 timer ved 37°C. Spektrofluorescensen ble deretter målt og % oppløsning beregnet som beskrevet nedenfor.

13,3 Beregning

Hemming av aggregering eller oppløsning blir uttrykt som gjennomsnittlig % hemming eller oppløsning, henholdsvis, $\pm$ standardfeil for gjennomsnittet (SEM) i henhold til følgende ligning:

$$\% \text{ inhibering} = \frac{(\text{RFU av pos ktrl} - \text{RFU av neg ktrl}) - (\text{RFU av prøve med A}\beta\text{1-42} - \text{RFU av prøve uten A}\beta\text{1-42})}{(\text{RFU av pos kontroll} - \text{RFU av neg kontroll})} \times 100\%$$

25

13,4 Resultat

13.4.1 Inhibering av A β 1-42 aggregering

Hemming av A β 1-42 aggregering ved anvendelse av hC2-antistoffet er vist i Tabell 3 og Figur 11. Ved et antistoff til A β 1-42 molart forhold på 1:100 ble det beregnet

gjennomsnitt av hemmingen på 30% (2 uavhengige forsøk), mens hemmingen ved et 1:10 molart forhold var 80% (2 uavhengige forsøk; se Tabell 3).

Tabell 3. hC2-mediert hemming av A β 1-42 aggregering ved et 1:100 og 1:10 antistoff til A β 1-42 molforhold.

Antistoff	Molart forhold (antistoff til A β 1-42)	
	1:100	1:10
hC2	30,0 $\pm$ 4,1%	80,4 $\pm$ 6,9%

13.4.2 Oppløsning av forhånds-aggregert A β 1-42

Oppløsning av forhånds-aggregert A β 1-42 ved anvendelse av hC2-antistoffet er vist i Tabell 4 og Figur 12. Ved et antistoff til A β 1-42 molart forhold på 1:100 ble det beregnet gjennomsnitt av hemmingen på 24%, mens oppløsningen ved et 1:10 molart forhold var 32% (3 uavhengige forsøk; se Tabell 4).

Tabell 4. hC2-mediert oppløsning av forhånds-aggregert A β 1-42 ved et 1:100 og 1:10 antistoff til A β 1-42-molare forhold.

Antistoff	Molart forhold (antistoff til A β 1-42)	
	1:100	1:10
hC2	23,9 $\pm$ 4,4%	31,9 $\pm$ 3,5%

Ved anvendelse av tioflavin T analysen kan de bifunksjonelle egenskapene av det anti-A β humaniserte antistoffet hC2 demonstreres, dvs. til å hemme aggregering av A β 1-42 til patogen protofibrill konformasjon og i tillegg til å oppløse forhånds-dannede A β 1-42 protofibriller. hC2 hemmet A β 1-42 aggregering ved 80% ved et antistoff til A β 1-42 molart forhold på 1:10. Evnen av hC2 til å oppløse forhånds-aggregerte protofibriller av A β 1-42 ved et molart forhold på 1:10 ble vist å være 32%.

Eksempel 14: Konformasjons-spesifikk binding av mC2 til forskjellige klasser av Amyloidprotein

5 For å evaluere spesifisiteten av mC2 til forskjellige stadier av polymerisert amyloidprotein, monomer, polymer oppløselig og fibrill amyloid, ble en ELISA belagt med disse forskjellige stadiene av polymer beta-amyloid gjennomført (Figur 9). Monomerer ble fremstilt i henhold til en modifisert metode publisert av (Klein, 2002), oppløselig polymer amyloid beta i henhold til (Barghorn et al., 2005), mens
10 fibre ble oppført ved inkubering av amyloid (Bachem, Sveits) med en endelig konsentrasjon på 1µg/µl i Tris/HCl pH 7,4 ved 37°C i 5 dager fulgt av et sentrifugeringstrinn (10,000 rpm i 5 minutter). Deretter ble amyloid polymerer belagt på ELISA-plater med en endelig konsentrasjon på 55µg/ml og bindingsaffinitet ELISA ved anvendelse av et anti-mus IgG monoklonalt antistoff
15 (Jackson) merket med alkalisk fosfat ble utført. Som vist i Tabell 5 binder mC2-antistoffet med høyere affinitet til oppløselig polymer amyloid beta enn til fibre og med den laveste til monomerer. Disse data indikerer at antistoffets binding er påvirket av amyloid epitopen og av konformasjonen av de forskjellige amyloid aggregatene.

20 Tabell 5 Konformasjonsspesifikk binding av mC2 til Amyloid monomerer, oligomerer og fibre

mC2	O.D		
Ab Kons. (ug/ml)	Oligomer	Fibre	Monomerer
0,625	2,806	1,620	1,155
0,312	1,724	0,989	0,649
0,156	1,036	0,631	0,397
0,078	0,652	0,499	0,333

Eksempel 15: Epitopkartlegging av AC Immune's monoklonale antistoff hC2

25

Epitopkartlegging av det humaniserte monoklonale antistoffet hC2 ble utført ved ELISA ved anvendelse av tre forskjellige peptidbiblioteker. Ett bibliotek omfattet totalt 33 biotinylerede peptider som dekker den fullstendige aminosyre (aa)-

sekvensen av A β 1-42 (produsert av Mimotopes og anskaffet fra ANAWA Trading SA), det andre biblioteket inneholder biotinylerte peptider som anvender peptid 12 (aa12-20 av A β) fra det første peptidbiblioteket og substituerer hver aa i sekvensen med en alanin (se tabell 8 nedenfor) og det tredje biblioteket
 5 inneholder biotinylerte peptider 13, 14 eller 15 (aa 13-21, 14-22 eller 15-23 av A β) og substituerer i hvert tilfelle de siste aminosyrene til en alanin eller til et glysin for aa 21 som allerede er en alanin (se tabell 9 nedenfor). Et biotinylert fullstendig A β 1-42 peptid ble anvendt som positiv kontroll (Bachem). Epitopkartlegging ble utført i henhold til produsentens (Mimotopes) instruksjoner. I korthet ble
 10 streptavidin-belagte plater (NUNC) blokkert med 0,1% BSA i PBS natten over ved 4°C. Etter vasking med PBS-0,05% Tween 20, ble plater belagt i 1 time ved RT med de forskjellige peptidene fra biblioteket, fortynnet i 0,1% BSA, 0,1% Natriumazid i PBS til en endelig konsentrasjon på 10 μ M. Etter vasking ble plater inkubert i 1 time ved RT med hC2-antistoffet eller et ikke A β bindende kimært
 15 IgG4 antistoff fortynnet til 200 ng/ml i 2% BSA, 0,1% Natriumazid i PBS. Plater ble vasket igjen og inkubert med alkalisk fosfatase konjugert geit anti human IgG i 1 time ved RT. Etter endelig vasking ble plater inkubert med fosfatase-substrat (pNPP) og avlest ved 405 nm ved anvendelse av en ELISA plateleser.

20 Det ble vist at det humaniserte monoklonale antistoffet hC2 bandt spesifikt til peptidene 12,13,14,15 og 16 av det første peptidbiblioteket. Disse peptidene omfatter aa 12-20, 13-21, 14-22, 15-23 og 16-24 henholdsvis av A β 1-42, hvilket indikerer at epitopen ligger i region 12-24 av A β . Et andre bibliotek med alanin-substitusjoner ble anvendt for å bestemme den kritiske aa for binding til A β 12-20
 25 (VHHQKLVFF). Bindingen av hC2 antistoff er fullstendig tapt når aminosyrene 16, 17, 19 eller 20 er substituert med en alanin, hvilket indikerer at disse aa er absolutt kritiske for binding av antistoffet til A β . Bindingen av hC2-antistoffet går delvis tapt når aa 15 og 18 er substituert.

Bindingen gikk også nesten fullstendig tapt når aa 14 ble erstattet av en alanin,
 30 hvilket indikerer at aa 14 også er svært viktig for binding.

Til slutt ble et tredje bibliotek anvendt for å bestemme hvorvidt aa 21, 22 eller 23 er kritisk for binding til epitopen. Bindingen av antistoffet til aa 15-23 ble redusert når aa 23 ble substituert med en alanin, hvilket indikerer at aa 23 også er viktig for

binding. Bindingen gikk delvis tapt når aa 21 ble substituert med et glysin og gikk litt tapt når aa 22 ble erstattet av en alanin.

Eksempel 16: Neuroproteksjon ved hC2 antistoffet

5

Evnen av antistoff hC2 til å beskytte neuroner fra Abeta oligomer-indusert degenerasjon ble bedømt i et in vitro-forsøk. Embryonisk dag 16,5-17,5 mus kortikale neuroner ble isolert, dissosiert og dyrket in vitro i N3-F12 media. Cellene ble dyrket i totalt ni dager og ble føret på dag 3 og på den dagen da Abeta oligomer eller Abeta oligomer pluss anti-Abeta antistoff hC2 ble tilsatt. Ved dag 10 fem ("4 dager Abeta") eller dag seks ("3 dager Abeta"), ble visse brønner av celler behandlet med enten 2 μ M Abeta oligomer alene eller en kombinasjon av 2 μ M Abeta oligomer og 50 μ g/ml anti-Abeta antistoff hC2.

Abeta oligomeren ble fremstilt ved oppløsning av Abeta 1-42 (rPeptid) i HFIP, fra 15 hvilket Abeta peptidene ble alikvotert i 10 μ l alikvoter ved 1 mg/ml og deretter inndampet i en røykhette i 30 minutter og peptidfilmer ble lagret ved -80C inntil anvendelse. Ved anvendelse ble peptidfilmen oppløst i 10 μ l DMSO, deretter 78,6 μ l HAMS F12 og Abeta peptidløsningen ble inkubert ved 4C i 24-48 timer (25 μ M endelig konsentrasjon av Abeta).

20

For kontrollceller ble DMSO-F12 alene tilsatt i samme volum som Abeta-DMSO ved dag 5 og cellene ble dyrket i ytterligere 4 dager uten noen ytterligere behandling. Ved dag 9 ble nevroner fra alle kulturbetingelser fiksert og merket med Tuj1 (et anti-beta-tubulin antistoff), fulgt av merking med sekundære 25 antistoffer merket med FITC for å visualisere mikrotubuli og følgelig nevronele prosesser generelt. Resultatene er vist i Figur 13.

Ubehandlete mus embryoniske kortikale nevroner viste normal morfologi etter ni dagers dyrking (Figur 13, panel lengst til venstre). Behandling av cellene med 30 Abeta oligomer i tre dager induserte degenerasjon av aksoner og forårsaket en reduksjon i det totale antallet av aksoner (Figur 13, nedre midterste panel) og denne effekten var enda tydeligere ved fire dagers behandling (Figur 13, øvre midterste panel). I motsetning til dette lignet cellene behandlet med

kombinasjonen av Abeta oligomer og anti-Abeta antistoff hC2 kontrollceller (Figur 13, øvre og nedre høyre paneler). Disse resultatene indikerer at anti-Abeta antistoff hC2 var i stand til å beskytte embryonisk mus kortikale nevroner fra Abeta oligomer-indusert degenerasjon.

Tabell 6: Posisjoner og endringer foretatt i de humaniserte C2 lett kjede struktur ("framework")-regionene

Posisjon Lett kjede	45	87	50	53
Mus C2V _K	K	F	K	N
Humanisert C2HuV _K 1	Q	Y	K	N
Humanisert C2HuV _K 2	Q	F	K	N
Humanisert C2HuV _K 3	K	Y	K	N
Humanisert C2HuV _K 4	K	F	K	N
Human Kjønnscelle dpk15	Q	Y	L	N
Mus C2V _K -R			R	
Mus C2V _K -S				S

5

Tabell 7: Posisjoner og endringer foretatt i de humaniserte C2 tung kjede struktur ("framework")-regionene

Posisjon Tung kjede	47	94
Mus C2VHAF	L	S
Humanisert C2HuVHAF1	W	R
Humanisert C2HuVHAF2	W	S
Humanisert C2HuVHAF3	L	R
Humanisert C2HuVHAF4	L	S
Human Kjønnscelle DP-54	W	R

10

Totalt ble 8 forskjellige antistoffer konstruert med lette kjeder Humanisert C2HuV_K1, C2HuV_K2, C2HuV_K3, C2HuV_K4 og tunge kjeder C2HuVHAF4 og C2HuVHAF2

15

Tabell 8. Oppsummering av peptider anvendt i det andre biblioteket
aa som er viktig for binding er markert i kursiv og understrekning og aa absolutt kritisk for binding er markert i kursiv og fet skrift.

5

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

15

Tabell 9. Oppsummering av peptider anvendt i det tredje biblioteket.
aa som er viktig for binding er markert i kursiv og understrekning og aa absolutt kritisk for binding er markert i kursiv og fet skrift

20

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

25

Referanseliste

- Barghorn S, Nimmrich V, Striebinger A, Krantz C, Keller P, Janson B, Bahr M,
 5 Schmidt M, Bitner RS, Harlan J, Barlow E, Ebert U, Hillen H (2005) Globular
 amyloid beta-peptide oligomer - a homogenous and stable neuropathological
 protein in Alzheimer's disease. J Neurochem 95:834-847.
- Blond og Goldberg, 1987, PNAS mars 1, 1987 Vol. 84 | nr. 5 | 1147-1151
 10 Cox JPL, Tomlinson IM og Winter G. Eur. J. Immunol. 1994; **24**: 827-836. A
 directory of human germ-line V_K segments reveals a strong bias in their usage.
- Hieter PA, Max EE, Seidman JG, Maizel JV Jr, Leder P. Cloned human and
 15 mouse kappa immunoglobulin constant og J region genes conserve homology in
 functional segments. Cell. 1980 Nov;22(1 Pt 1):197-207.
- Kabat EA, Wu TT, Perry HM, Gottesman KS, Foeller C. Sequences of proteins of
 Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, 1991.
 20 Klein WL (2002) Abeta toxicity in Alzheimer's disease: globular soluble polymeric
 amyloid beta (ADDLs) as new vaccine and drug targets. Neurochem Int 41(5):345-
 352.
- 25 Langdon SD, Inaioki M, Kelsoe G. og Tedder TF. Immunogenetics 2000; **51**: 241-
 245. Germline sequences of V(H)7183 gene family members in C57BL/6 mice
 demonstrate natural selection of particular sequences during recent evolution
- Mulligan RC og Berg P. Science 1980; 209: 1422-1427. Expression of a bacterial
 30 gene in mammalian cells.
- Riechmann L, Clark M, Waldmann H, Winter G, Nature 1988; **332**: 323-327.
 Reshaping human antibodies for therapy.

- Schable KF, Thiebe R, Bensch A, Brensing-Kueppers J, Heim V, Kirschbaum T, Lamm R, Ohnrich M, Pourrajabi S, Roschenthaler F, Schwendinger J, Wichelhaus D, Zocher I og Zachau HG. Eur. J. Immunol. 1999; **29**: 2082-2086. Characteristics of the immunoglobulin V kappa genes, pseudogenes, relics and orphans i the mouse genome.
- 5 Tomlinson IM, Walter G, Marks JD, Llewelyn MB og Winter G. J. Mol. Biol. 1992; **227**: 776-798. The repertoire of human germline V_H sequences reveals about 50 groups of V_H segments with different hypervariable loops

PATENTKRAV

1. Humanisert antistoff eller fragment derav, hvor antistoffet eller fragmentet derav omfatter:

- 5 (A) (i) en tungkjede variabel region (HCVR) som har en aminosyresekvens som er 96%, 97%, 98%, 99% eller 100% identisk med aminosyresekvensen i SEKV ID NR: 15, hvor HCVR omfatter en tungkjede-komplementaritets-bestemmende region 1 (CDR1) som gitt i SEKV ID NR: 1, en tungkjede CDR2 som gitt i SEKV ID NR: 2 og en tungkjede CDR3 som gitt i SEKV ID NR: 3, og (ii) en lettkjede variabel region (LCVR) omfattende en lettkjede CDR1 som gitt i SEKV ID NR: 4, en lettkjede CDR2 som gitt i SEKV ID NR: 5, RVSNRFS eller KVSSRFS og en lettkjede CDR3 som gitt i SEKV ID NR: 6, eller
- 10 (B) (i) en HCVR omfattende en tungkjede CDR1 som gitt i SEKV ID NR: 1, en tungkjede CDR2 som gitt i SEKV ID NR: 2 og en tungkjede CDR3 som gitt i SEKV ID NR: 3, og (ii) en LCVR med en aminosyresekvens som er 96%, 97%, 98%, 99% eller 100% identisk med aminosyresekvensen i SEKV ID NR: 12, hvor LCVR omfatter en lettkjede CDR1 som gitt i SEKV ID NR: 4, en lettkjede CDR2 som gitt i SEKV ID NR: 5, RVSNRFS eller KVSSRFS og en lettkjede CDR3 som gitt i SEKV ID NR: 6,
- 15 hvor antistoffet eller fragmentet derav spesifikt binder seg til β -amyloid-protein.
- 20

2. Humanisert antistoff eller fragment derav ifølge krav 1(A), hvor LCVR har en aminosyresekvens som er 96%, 97%, 98%, 99% eller 100% identisk med aminosyresekvensen i SEKV ID NR: 12.

25

3. Humanisert antistoff eller fragment derav ifølge krav 1(B), hvor HCVR har en aminosyresekvens som er 96%, 97%, 98%, 99% eller 100% identisk med aminosyresekvensen i SEKV ID NR: 15.

- 30 4. Humanisert antistoff eller et fragment derav ifølge hvilket som helst av kravene 1-3, som omfatter:

- i) HCVR som har aminosyresekvensen ifølge SEKV ID NR: 15 eller en aminosyresekvens som er 97%, 98% eller 99% identisk med aminosyresekvensen i SEKV ID NR: 15; eller
- ii) LCVR som har aminosyresekvensen i SEKV ID NR: 12 eller en aminosyresekvens som er 97%, 98% eller 99% identisk med aminosyresekvensen i SEKV ID NR: 12; eller
- iii) HCVR som har aminosyresekvensen i SEKV ID NR: 15 eller en aminosyresekvens som er 97%, 98% eller 99% identisk med aminosyresekvensen i SEKV ID NR: 15 og LCVR med aminosyresekvensen i SEKV ID NR: 12 eller en aminosyresekvens som er 97%, 98% eller 99% identisk med aminosyresekvensen i SEKV ID NR: 12.

5. Humanisert antistoff eller fragment derav ifølge hvilket som helst av kravene 1-3, som omfatter:

- i) en tungkjede som omfatter aminosyresekvensen i SEKV ID NR: 16 eller en aminosyresekvens som er 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% eller 99% identisk med aminosyresekvensen ifølge SEKV ID NR: 16; eller
- ii) en lettkjede som omfatter aminosyresekvensen i SEKV ID NR: 13 eller en aminosyresekvens som er 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% eller 99% identisk med aminosyresekvensen ifølge SEKV ID NR: 13; eller
- iii) en tungkjede som omfatter aminosyresekvensen i SEKV ID NR: 16 eller en aminosyresekvens som er 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% eller 99% identisk med aminosyresekvensen i SEKV ID NR: 16 og en lettkjede som omfatter aminosyresekvensen i SEKV ID NR: 13 eller en aminosyresekvens som er 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96 %, 97%, 98% eller 99% identisk med aminosyresekvensen i SEKV ID NR: 13.

6. Humanisert antistoff eller fragment derav ifølge hvilket som helst av de foregående krav, der antistoffet er av IgG4-isotypen.

7. Humanisert antistoff eller fragment derav ifølge hvilket som helst av de foregående krav, hvor det humaniserte antistoffet eller fragmentet derav er i stand til å inhibere aggregeringen av β -amyloide monomerer til høymolekylære polymere

fibriller og til å splitte fordannede polymerfibriller eller filamenter.

5 8. Humanisert antistoff eller fragment derav ifølge hvilket som helst av de foregående krav, hvor antistoffet eller fragmentet derav binder til en A β -fiber, fibril eller filament med en bindingsaffinitet som er minst 10 ganger, minst 15 ganger, minst 20 ganger, eller minst 25 ganger, høyere enn bindingsaffiniteten til antistoffet eller fragmentet derav til en A β -monomer.

10 9. Humanisert antistoff eller fragment derav ifølge hvilket som helst av de foregående krav, hvor
(a) aminosyren i Kabat-posisjon 47 i framework-regionene i tungkjede variabel-regionen er aminosyren Leu; og/eller
(b) aminosyren i Kabat-posisjon 94 i framework-regionene i tungkjede variabel-regionen er aminosyren Ser; og/eller
15 (c) aminosyren i Kabat-posisjon 87 i framework-regionene i lettkjede variabel-regionen er aminosyren Tyr, Phe, Leu, Val, Ile eller Ala.

20 10. Nukleinsyremolekyl omfattende en nukleotidsekvens som koder for et humanisert antistoffet eller fragment derav ifølge hvilket som helst av kravene 1-9.

11. Ekspresjonsvektor omfattende nukleinsyremolekyl ifølge krav 10.

12. Celle omfattende ekspresjonsvektor ifølge krav 11.

25 13. Sammensetning omfattende humanisert antistoff eller fragment derav ifølge hvilket som helst av kravene 1-9, og videre omfattende en farmasøytisk akseptabel bærer, et fortynningsmiddel og/eller en eksipient.

30 14. Blanding omfattende det humaniserte antistoffet eller fragmentet derav ifølge hvilket som helst av kravene 1-9, og videre omfattende en biologisk aktiv substans, en farmasøytisk akseptabel bærer, et fortynningsmiddel og/eller en eksipient.

15. Blanding ifølge krav 14, omfattende:

(i) en biologisk aktiv substans som er en forbindelse brukt i behandling av amyloidose, eller

(ii) en anti-oksidativt stress-forbindelse; en anti-apoptotisk forbindelse; en metallchelator; en DNA-reparasjonsinhibitor så som pirenzepin og metabolitter; 3-amino-1-propansulfonsyre (3APS); 1,3-propandisulfonat (1,3PDS); α -sekretase-aktivator; en β -sekretase-inhibitor; en γ -sekretase-inhibitor; et tau-protein; en neurotransmitter; en β -sheet breaker; et tiltrekningsmiddel for amyloid beta fjernende/tappende cellulære komponenter; en inhibitor av N-terminal forkortet amyloid beta, så som pyroglutamatert amyloid beta 3-42; et anti-inflammatorisk molekyl; eller en cholinesteraseinhibitor (ChEI) så som takrin, rivastigmin, donepezil og/eller galantamin; en MI-agonist; eller et annet medikament så som et amyloid- eller tau-modifiserende medikament eller kosttilskudd.

16. Humanisert antistoff eller fragment derav som definert i hvilket som helst av kravene 1-9, en sammensetning som definert i krav 13, eller en blanding som definert i krav 14 eller 15 for anvendelse i en fremgangsmåte for behandling eller lindring av effektene av amyloidose i et dyr, så som et pattedyr eller et menneske.

17. Humanisert antistoff eller fragment derav, blanding eller sammensetning for anvendelse ifølge krav 16, hvor amyloidosen er sekundær amyloidose, aldersrelatert amyloidose, nevrologiske forstyrrelser så som Alzheimers sykdom (AD), Lewy body-demens, Downs syndrom, arvelig cerebral blødning med amyloidose (Dutch-type); Guam Parkinson-Demens kompleks; sykdommer basert på eller assosiert med amyloid-lignende proteiner så som progressiv supranukleær parese, multippel sklerose; Creutzfeldt Jacobs sykdom, Parkinsons sykdom, HIV-relatert demens, ALS (amyotrofisk lateral sklerose), type 2 diabetes; senil hjerte amyloidose; endokrine tumorer eller makulær degenerasjon.

18. Humanisert antistoff eller fragment derav, blanding eller sammensetning for anvendelse ifølge krav 17, hvor amyloidosen er Alzheimers sykdom.

19. Humanisert antistoff eller fragment derav, blanding eller sammensetning for anvendelse ifølge krav 16, hvor behandlingen av dyret fører til

i) en økning av den kognitive hukommelseskapasiteten og/eller;

ii) retensjon av kognitive hukommelseskapasiteten; og/eller

5 iii) en fullstendig gjenopprettelse av den kognitive hukommelseskapasiteten.

20. Fremgangsmåte for diagnostikk av en amyloidose hos en pasient, omfattende:

i) å kontakte en prøve, kroppsdel eller kroppsområde inneholdende et amyloid-protein med et humanisert antistoff eller fragment derav ifølge hvilket som helst av
10 kravene 1-9 under betingelser som tillater binding av antistoffet eller fragmentet derav til amyloid-proteinet; og

ii) å detektere antistoffet eller fragmentet derav bundet til proteinet, hvor tilstedeværelse eller fravær av antistoff eller fragment derav bundet til amyloid-proteinet indikerer tilstedeværelse eller fravær av amyloid-protein i nevnte
15 prøve, kroppsdel eller kroppsområde.

21. Fremgangsmåte for bestemmelse av omfanget av amyloidogen plakkbelastning i en vevsprøve eller kroppsfluidprøve omfattende:

(a) å teste en vevsprøve eller en kroppsfluidprøve for tilstedeværelse av amyloidprotein med et humanisert antistoff ifølge et hvilket som helst av kravene 1-9;
20

(b) å bestemme mengden av antistoff eller antistofffragment bundet til proteinet; og

(c) å beregne plakkbelastningen i vevsprøven eller kroppsfluidprøven.

22. Sett for deteksjon og diagnostikk av amyloid-assosierte sykdommer og tilstander omfattende et humanisert antistoff eller fragment derav ifølge hvilket som helst av kravene 1-9, hvor settet omfatter en beholder som inneholder ett eller flere antistoffer eller fragmenter derav ifølge hvilket som helst av kravene 1-9 og instruksjoner for bruk av nevnte antistoffer eller fragmenter derav.
25

23. Humanisert antistoff eller fragment derav som definert i hvilket som helst av kravene 1-9, sammensetning som definert i krav 13, eller blanding som definert i krav 14 eller 15, for anvendelse i en fremgangsmåte for å forhindre degenerasjon
30

av nevroner ved eksponering for β -amyloide oligomerer, eller for anvendelse i en fremgangsmåte for å beskytte nevroner mot β -amyloid-indusert degradering.

- 5 24. Fremgangsmåte for fremstilling av et humanisert antistoff eller fragment derav som definert i hvilket som helst av kravene 1-9, hvor fremgangsmåten omfatter dyrking av cellen ifølge krav 12, og rensing av antistoffet eller fragmentet derav.

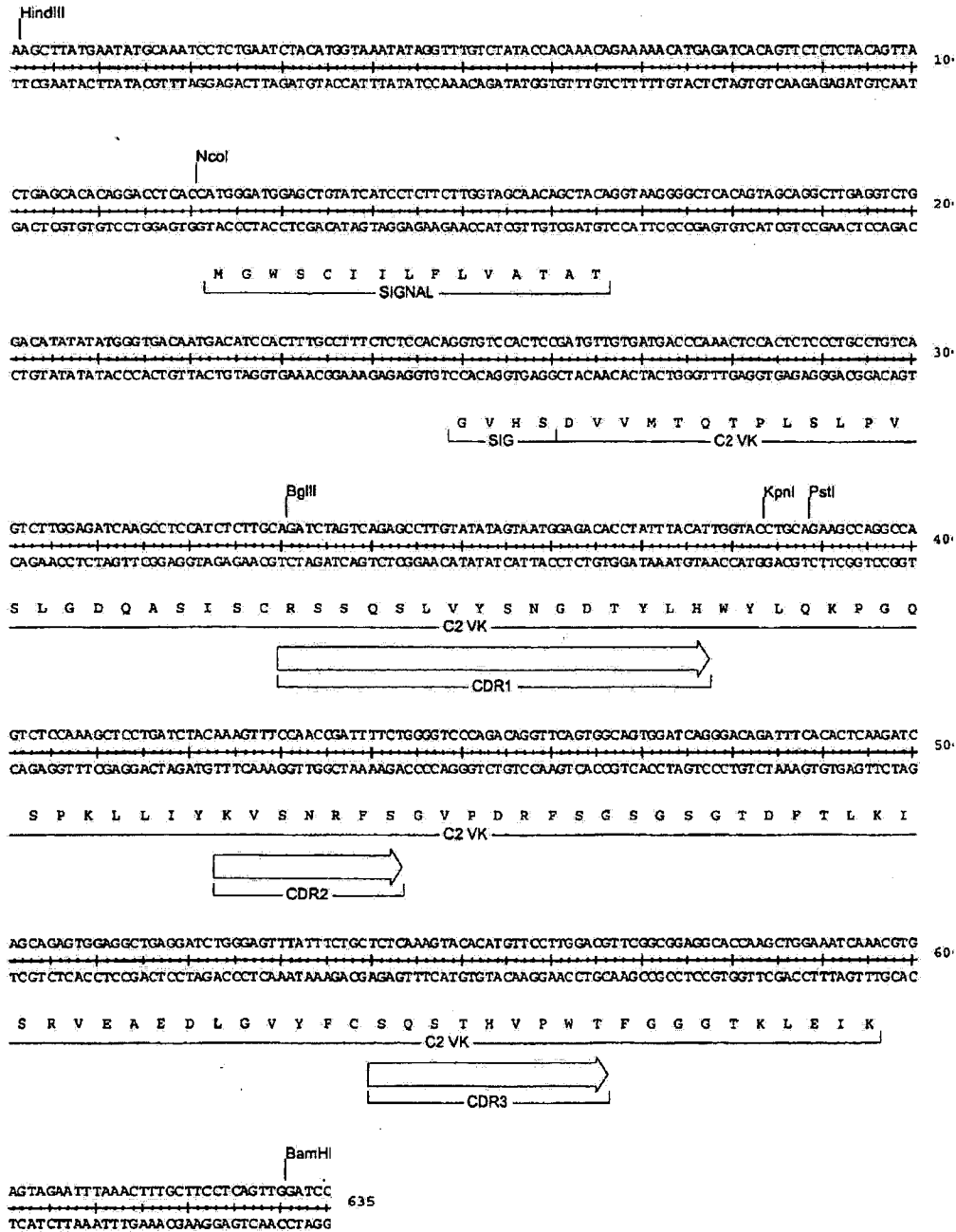


FIG 1
(Eksempel 2)

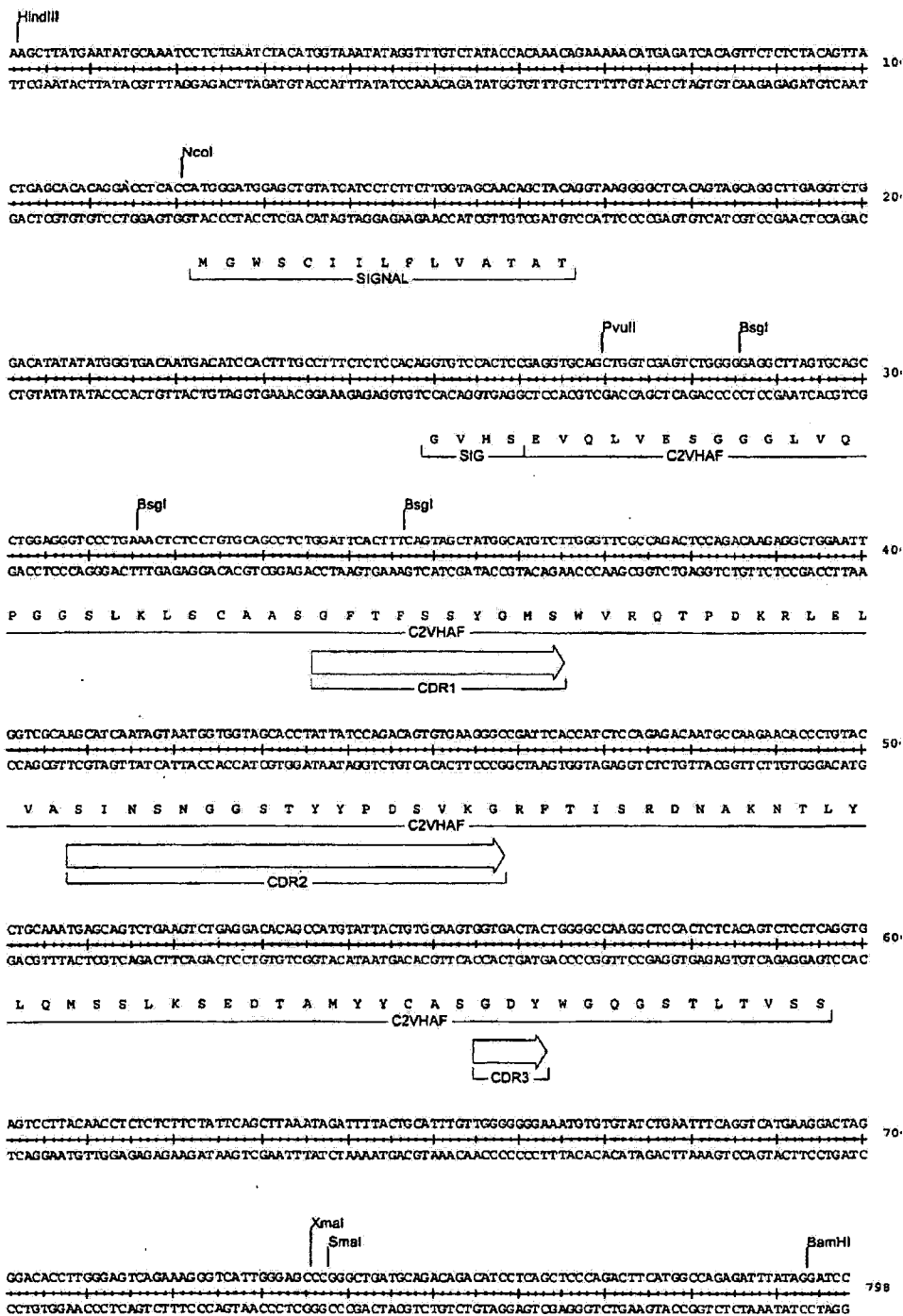


FIG 2
(Eksempel 2)

		10		20		30																								
C2VHAF	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	K	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	
AF120466	E	V	K	L	V	E	S	G	G	L	V	K	P	G	G	S	L	K	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	
		40		50		60																								
C2VHAF	S	Y	G	M	S	W	V	R	Q	T	P	D	K	R	L	E	L	V	A	S	I	N	S	N	G	G	S	T	Y	Y
AF120466	S	Y	G	M	S	W	V	R	Q	T	P	D	K	R	L	E	W	V	A	T	I	S	S	G	G	S	Y	T	Y	Y
		70		80		90																								
C2VHAF	P	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	A	K	N	T	L	Y	L	Q	M	S	S	L	K	S	E	D
AF120466	P	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	A	K	N	T	L	Y	L	Q	M	S	S	L	K	S	E	D
		100		110																										
C2VHAF	T	A	M	Y	Y	C	A	S	G	D	Y	W	G	Q	G	S	T	L	T	V	S	S								
AF120466	T	A	M	Y	Y	C	A	R	R																					

FIG 3
(Eksempel 5,2)

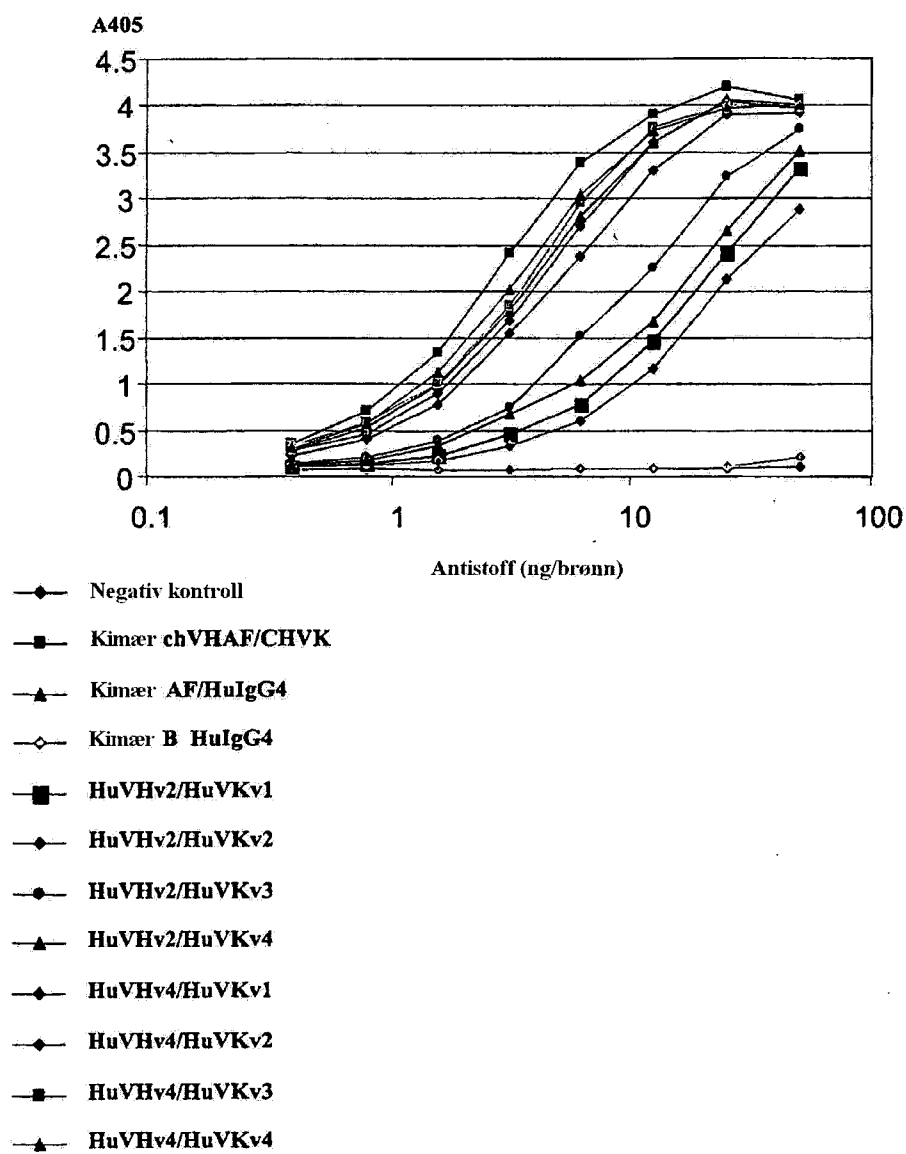


FIG 4
(Eksempel 8)

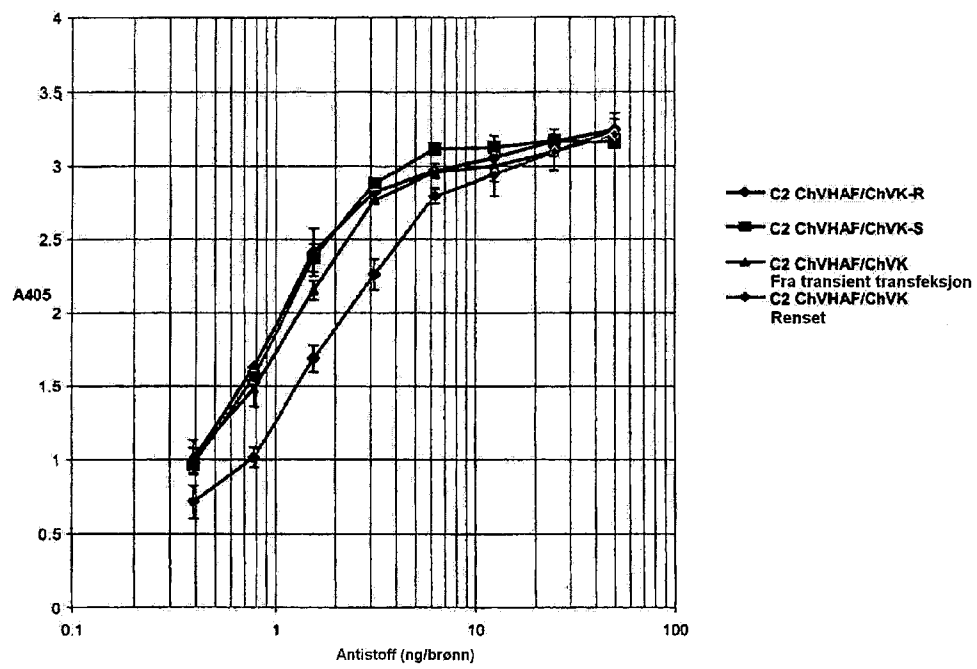


FIG 5
(Eksempel 9)

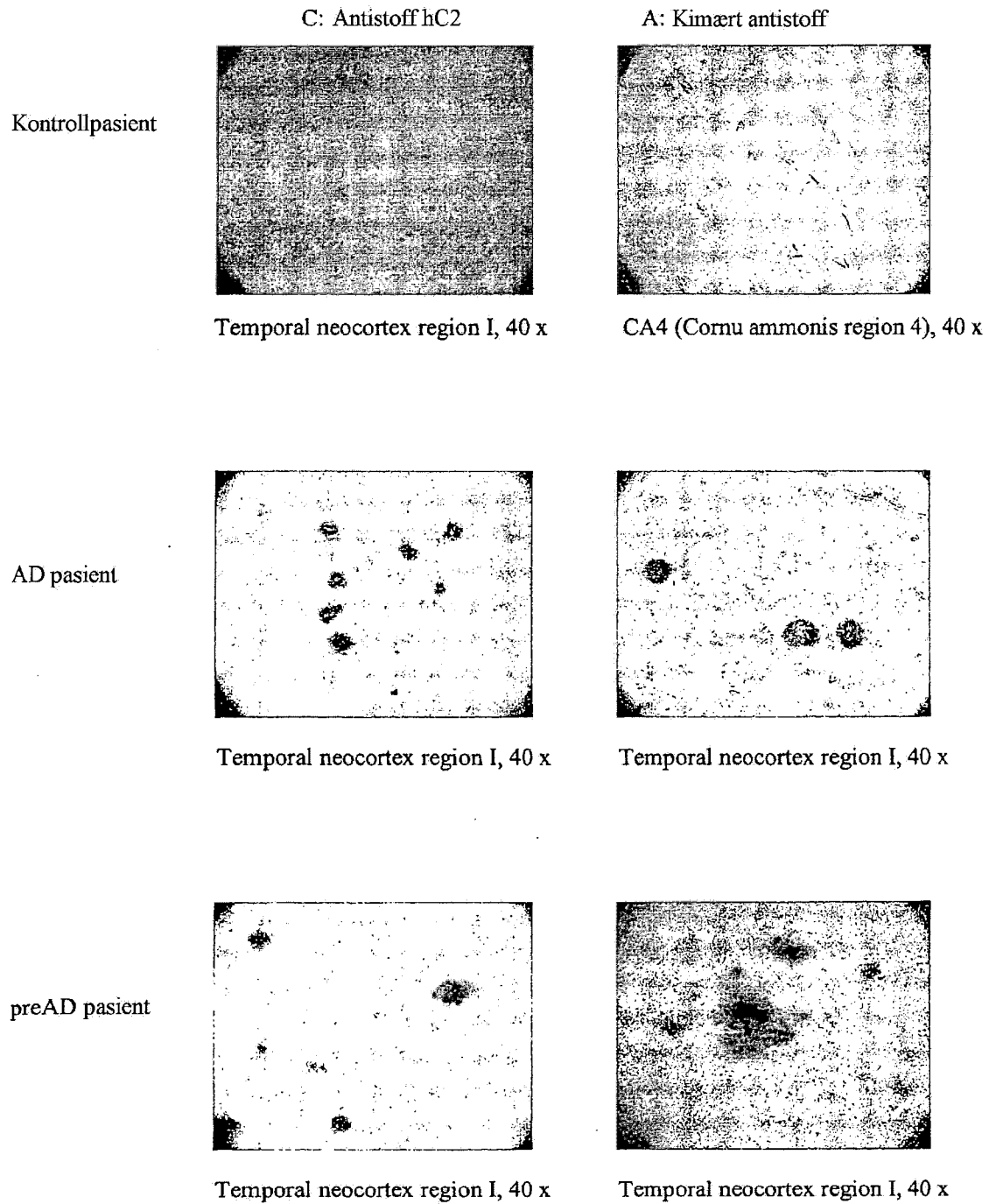
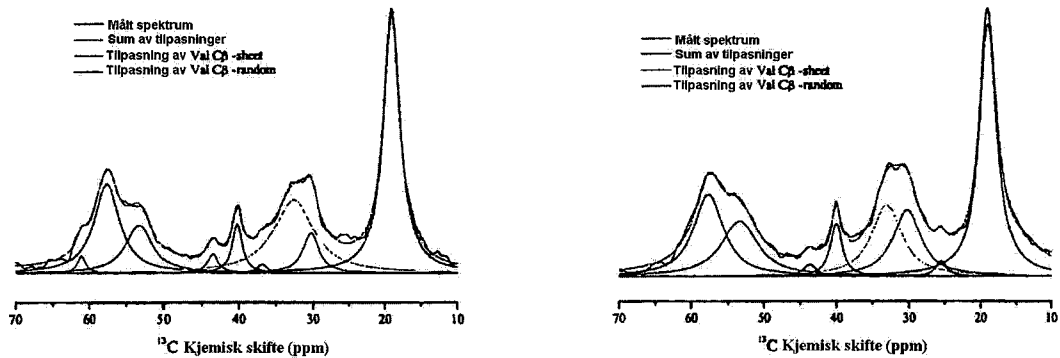


FIG 6 (Eksempel 11)

A)



B)

Resonans	PBS			Mus C2		
	δ ISO (ppm)	FWHH (Hz)	% Integral intensitet	δ ISO (ppm)	FWHH (Hz)	% Integral intensitet
Val C β -sheet	32.60	479	81.7	33.09	366	53.5
Val C β -random	30.27	200	18.3	30.27	340	46.5

A) Sammenligning av ^{13}C CPMAS spektra og tilpasninger for U- ^{13}C Tyr10 og Val12 merkede amyloid β 1-41-fibre inkubert med PBS (venstre; tjente som kontroll) eller ACI-7-C2 (høyre) i 24 timer og deretter lyofolisert. Tilpasningene for de to konformasjonene av Val12 C β er vist i grønt (sheet) og blått (random coil). Toppen ved 33 ppm svarer til beta sheet-konformasjonen av fibre mens den ved 30 ppm er et resultat av random coil-konformasjon.

B): Sammenligning av de tilpassede parametrene for de to konformasjonene av Val 12 C β . De tilpassede kjemiske skiftene for de to konformasjonene er ganske like men integral intensitetene er svært forskjellige, hvilket gjenspeiler en reduksjon i den opprinnelige beta sheet-konformasjonen ved ca. 35% ($1 - (53,5/81,7)$). Dette er i svært nøye overensstemmelse med den verdien vi oppnådde fra fluorescens-målingen.

FIG 7

(Eksempel 12)

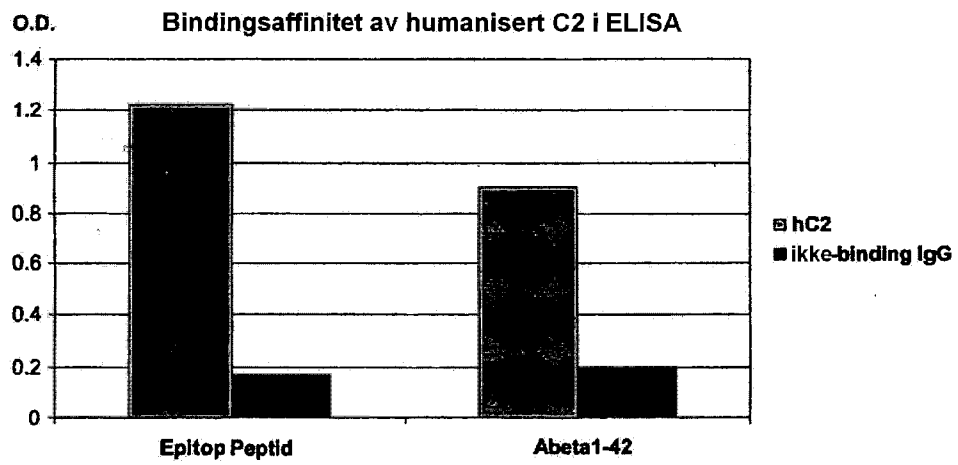


FIG 8
(Eksempel 12)

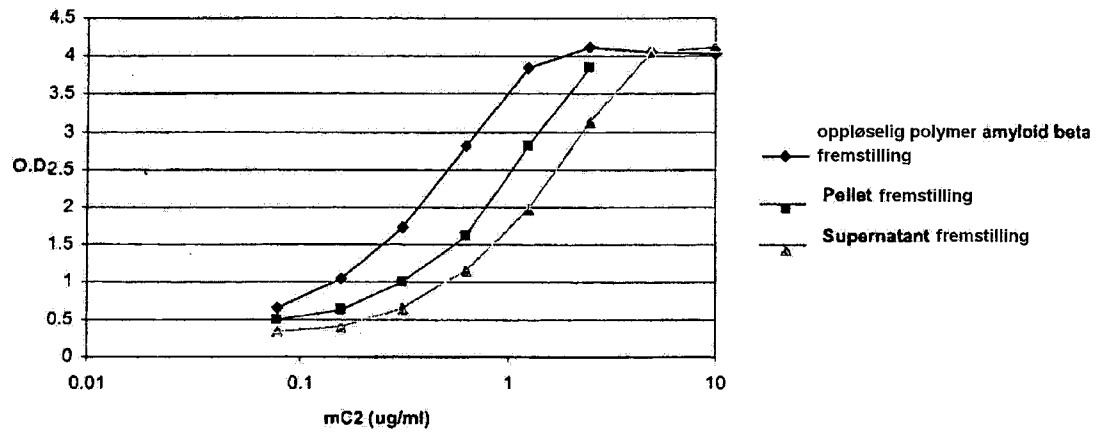


FIG 9
(Eksempel 13)

10/23

		10	20	30																										
C2VK	D	V	V	M	T	Q	T	P	L	S	L	P	V	S	L	G	D	Q	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	S	L	V
C2HuVK1	D	I	V	M	T	Q	S	P	L	S	L	P	V	T	P	G	E	P	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	S	L	V
C2HuVK2	D	I	V	M	T	Q	S	P	L	S	L	P	V	T	P	G	E	P	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	S	L	V
C2HuVK3	D	I	V	M	T	Q	S	P	L	S	L	P	V	T	P	G	E	P	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	S	L	V
C2HuVK4	D	I	V	M	T	Q	S	P	L	S	L	P	V	T	P	G	E	P	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	S	L	V
dpk15	D	I	V	M	T	Q	S	P	L	S	L	P	V	T	P	G	E	P	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	S	L	L
JK1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

		40	50	60																										
C2VK	Y	S	N	G	D	T	Y	L	H	W	Y	L	Q	K	P	G	Q	S	P	K	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	F
C2HuVK1	Y	S	N	G	D	T	Y	L	H	W	Y	L	Q	K	P	G	Q	S	P	Q	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	F
C2HuVK2	Y	S	N	G	D	T	Y	L	H	W	Y	L	Q	K	P	G	Q	S	P	Q	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	F
C2HuVK3	Y	S	N	G	D	T	Y	L	H	W	Y	L	Q	K	P	G	Q	S	P	K	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	F
C2HuVK4	Y	S	N	G	D	T	Y	L	H	W	Y	L	Q	K	P	G	Q	S	P	K	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	F
dpk15	H	S	N	G	Y	N	Y	L	D	W	Y	L	Q	K	P	G	Q	S	P	Q	L	L	I	Y	L	G	S	N	R	A
JK1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

		70	80	90																										
C2VK	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	A	E	D	L	G	V
C2HuVK1	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	A	E	D	V	G	V
C2HuVK2	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	A	E	D	V	G	V
C2HuVK3	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	A	E	D	V	G	V
C2HuVK4	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	A	E	D	V	G	V
dpk15	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	A	E	D	V	G	V
JK1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

		100	110																			
C2VK	Y	F	C	S	Q	S	T	H	V	P	W	T	F	G	G	G	T	K	L	E	I	K
C2HuVK1	Y	Y	C	S	Q	S	T	H	V	P	W	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K
C2HuVK2	Y	F	C	S	Q	S	T	H	V	P	W	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K
C2HuVK3	Y	Y	C	S	Q	S	T	H	V	P	W	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K
C2HuVK4	Y	F	C	S	Q	S	T	H	V	P	W	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K
dpk15	Y	Y	C	M	Q	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	L	Q	T	P
JK1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

FIG 10.

	10	20	30
C2VHAF	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L K L S C A A S	G F T F S	
C2HuVHAF1	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S	G F T F S	
C2HuVHAF2	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S	G F T F S	
C2HuVHAF3	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S	G F T F S	
C2HuVHAF4	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S	G F T F S	
DP-54	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S	G F T F S	
HUJH6	- - - - -	- - - - -	- - - - -

	40	50	60
C2VHAF	S Y G M S W V R Q T P D K R L E L V A S I N S N G G S T Y Y		
C2HuVHAF1	S Y G M S W V R Q A P G K G L E W V A S I N S N G G S T Y Y		
C2HuVHAF2	S Y G M S W V R Q A P G K G L E W V A S I N S N G G S T Y Y		
C2HuVHAF3	S Y G M S W V R Q A P G K G L E L V A S I N S N G G S T Y Y		
C2HuVHAF4	S Y G M S W V R Q A P G K G L E L V A S I N S N G G S T Y Y		
DP-54	S Y W M S W V R Q A P G K G L E W V A N I K Q D G S E K Y Y		
HUJH6	- - - - -	- - - - -	- - - - -

	70	80	90
C2VHAF	P D S V K G R F T I S R D N A K N T L Y L Q M S S L K S E D		
C2HuVHAF1	P D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D		
C2HuVHAF2	P D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D		
C2HuVHAF3	P D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D		
C2HuVHAF4	P D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D		
DP-54	V D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D		
HUJH6	- - - - -	- - - - -	- - - - -

	100	110
C2VHAF	T A M Y Y C A S G D Y W G Q G S T L T V S S	
C2HuVHAF1	T A V Y Y C A R G D Y W G Q G T T V T V S S	
C2HuVHAF2	T A V Y Y C A S G D Y W G Q G T T V T V S S	
C2HuVHAF3	T A V Y Y C A R G D Y W G Q G T T V T V S S	
C2HuVHAF4	T A V Y Y C A S G D Y W G Q G T T V T V S S	
DP-54	T A V Y Y C A R	
HUJH6	- - - Y Y Y G M - D V W G Q G T T V T V S S	

FIG 11.

12/23

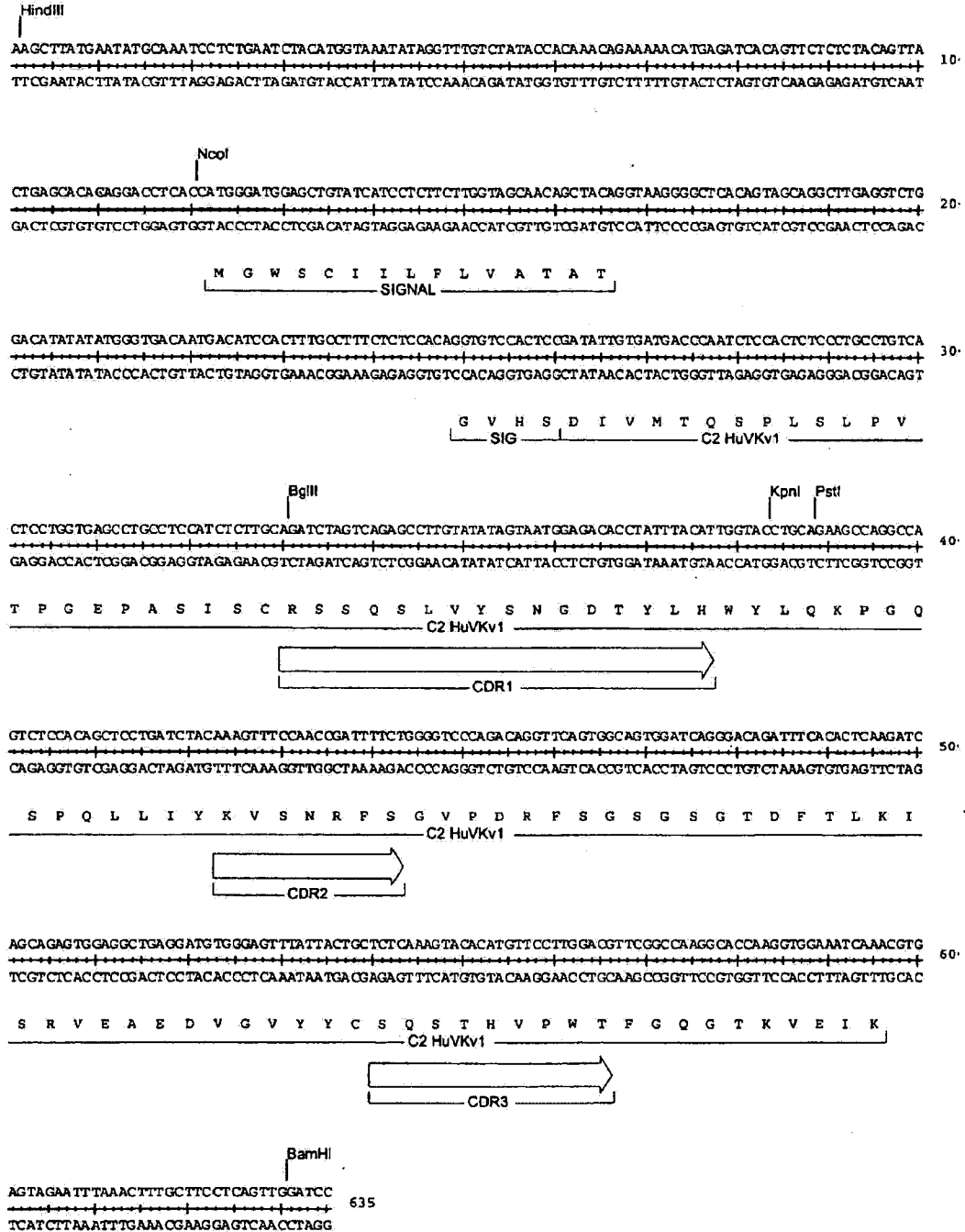


FIG 12

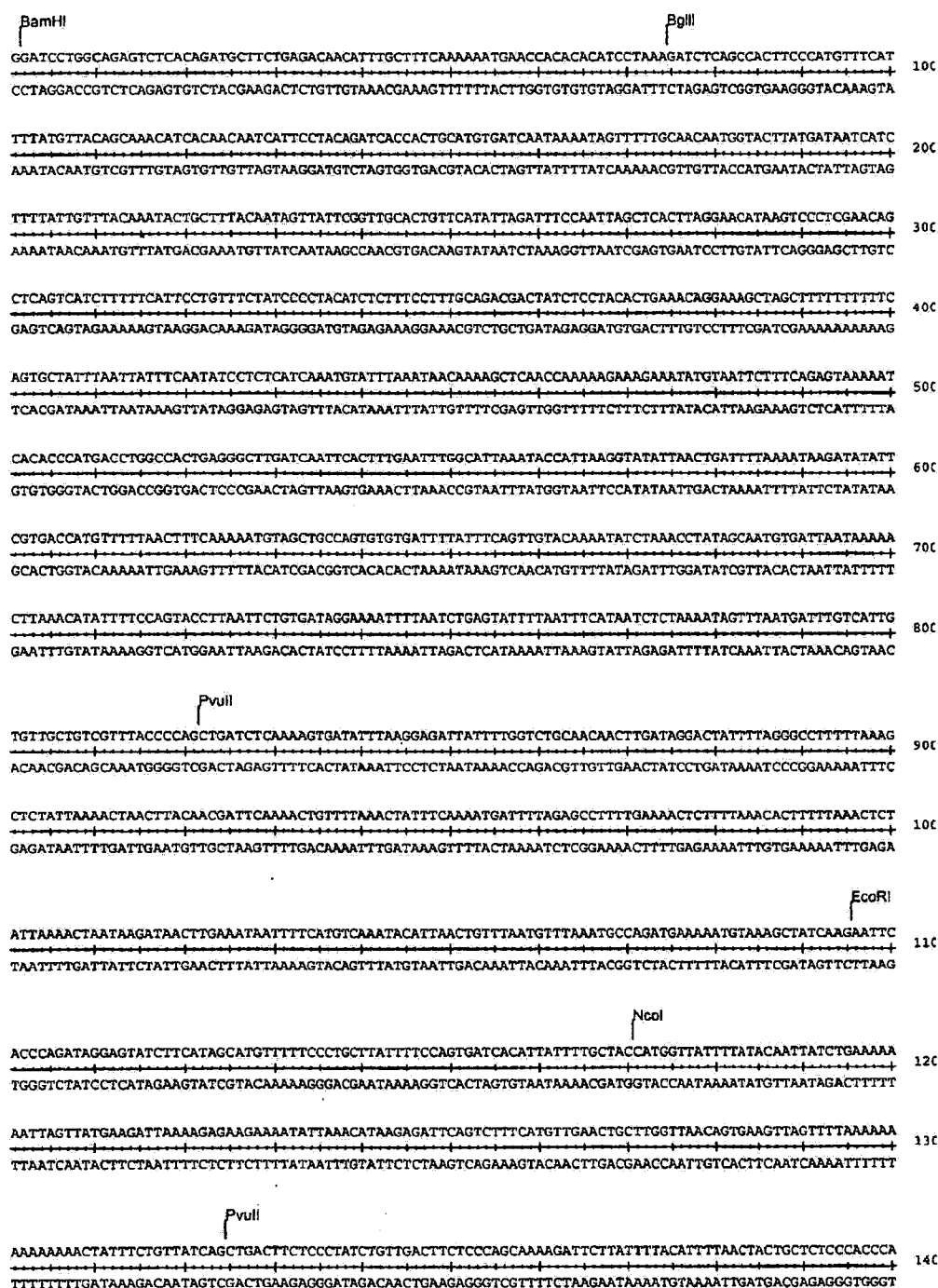


FIG 13-1

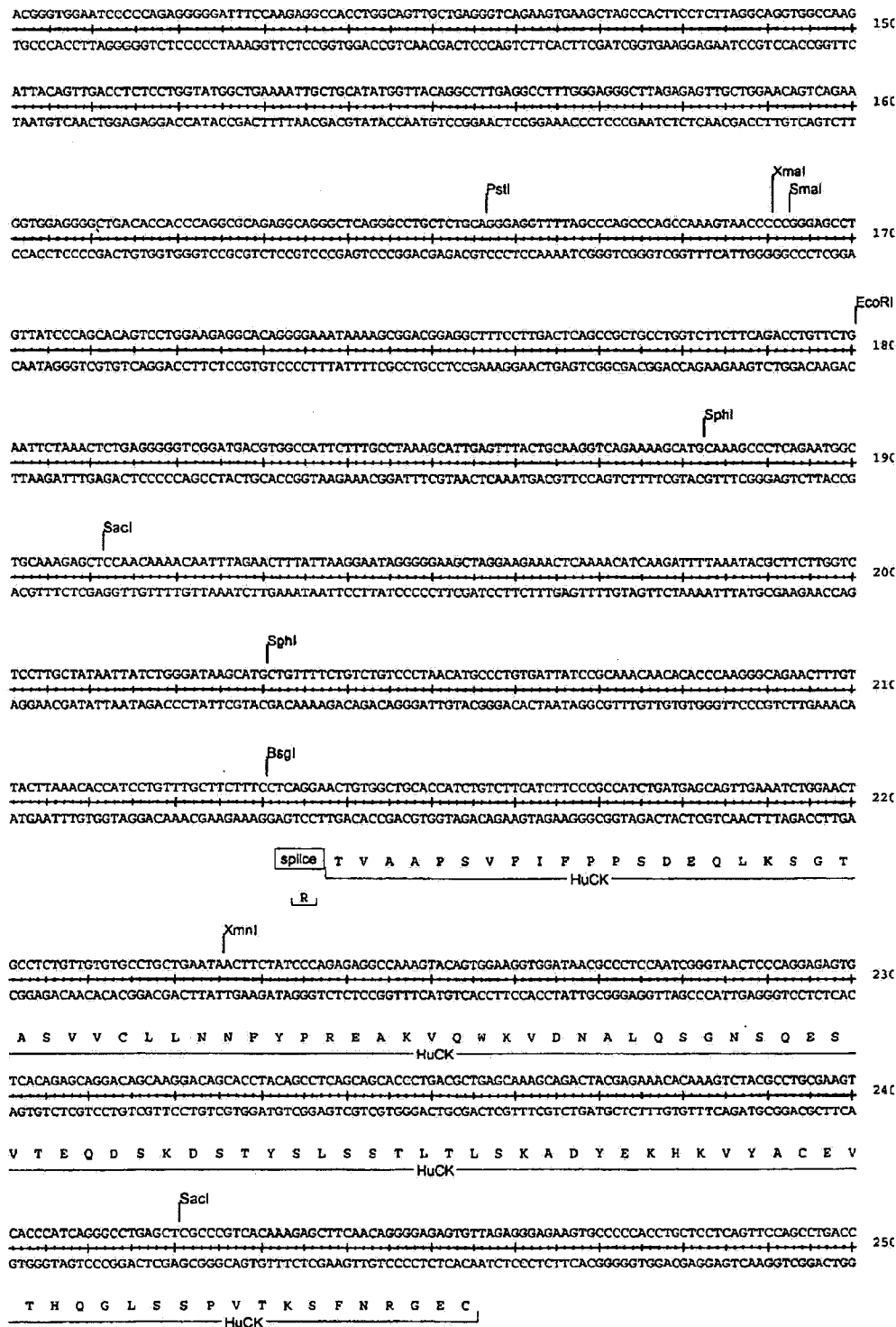


FIG 13-2

CCCTCCCATCCTTTGGCCTCTGACCCCTTTTCCACAGGGACCTACCCCTATTGCGGTCTCCAGCTCATCTTTCACCTCACCCCCCTCCTCCTCTGG
 GGGAGGGTAGGAAACCGGAGACTGGGAAAAGGTGCCCTGGATGGGATAACGCCAGGAGGTCGAGTAGAAAGTGGAGTGGGGGGAGGAGGAGAAAC 26C

CTTTAATTATGCTAATGTGGAGGAGAAATGAATAAAAGTGAATCTTGCACCTGTGGTTTCTCTCTTCTCATTAAATAATTATTATCTGTGTTT
 GAAATTAATACGATTACACCTCCTCTTACTTATTATTCTACTTAGAACGTGGACCAAGAGAGAAAGGAGTAAATTATTAATAATAGACAACAAA 27C

TACCACTACTCAATTTCTTTATAAGGACTAAATATGTAGTCATCTAAGGCGCATAACCATTTATAAAAAATCATCTTCATTTTACCTATC
 ATGGTTGATGAGTTAAAGAGAAATATCCCTGATTATACATCAGTAGGATTCCGCGTATTGGTAAATATTTTAGTAGGAAGTAAGATAAAATGGGATAG 28C

ATCTCTGCAAGACAGTCTCCCTCAAACCCACAAGCCTTCTGTCTCACAGTCCCTGGGCCATGGTAGGAGAGACTTGCTTCTTGTCTTCCCTCT
 TAGGAGACGTTCTGTGAGGAGGGAGTTGGGTGTTCCGAAGACAGGAGTGTCCGGGACCCCGTACCATCCTCTCTGAACCAAGGAACAAAAGGGAGGA 29C

CAGCAAGCCCTCATAGTCTCTTTTAAGGGTGACAGGTCTTACAGTCATATATCTTTGATTCAATTCCTGAGAATCAACCAAGCAAAATTTTCAAAG
 GTGTTCCGGGATATCAGGAAAAATCCCACTGTCCAGAATGTCAATATAGGAACTAAGTTAAGGACTCTTAGTTGTTTCGTTTAAAAAGTTTTC 30C

AAGAAACCTGCTATAAAGAGAAATCATTTCATGCAACATGATATAAAATAACAACAATAAAAGCAATTAAATAACAACAATAAGGAAATGTTTAAAT
 TTCTTTGAGCATATTTCTCTTAGTAAGTAACGTTGTACTATATTTATGTTGTTGTTATTTTCGTTAATTTATTTGTTGTTATCCCTTTACAAATTC 31C

TCATCATGGTACTTAGACTTAATGGAATGTCTGCTTATTACATTTTAAACAGGTACTGAGGAGCTCCTGTGCGCAAGGGCCGTTAGTACTTT
 AGTAGTACCATGAATCTGAATTACCTTACAGTACGGAATAATGTAATAATTTGTCATGACTCCTGAGGACAGACGGTCCCGGCATAACTCATGA 32C

CCACAACCTAATTTAATCCACATATACTGTGAGATTAAAAACATTCATTAAAAATGTTGCAAGGTTCTATAAAGCTGAGAGACAAATATTTCTATAAC
 GGTGTTGGATTAAATAGGTGTGATGACACTCTAATTTTGAAGTAATTTTACAACGTTTCAAGATATTTGACTCTCTGTTTATATAAGATATTG 33C

TCAGCAATCCCACTCTAGATGACTGAGTGTCCCAACCCCAAAAACTATGCAAGAATGTTCAAGCAGCTTTATTTACAAAAGCCAAAAATGGAAA
 AGTCGTTAGGGTGAAGATCTACTGACTCACAGGGGTGGTGGTTTGTGATACGTTCTTACAAGTTTCGTCGAATAAATGTTTCGGTTTTTAACTTT 34C

TAGCCCGATTGTCACCAATAGAATGAGTTATTAACCTGGGTATGTTTATACATTAGAATACCCAATGAGGAGAAATTAACAAGCTACAACTATACCTAC
 ATCGGGCTAACAGGTGTTATCTTCAATTAATTTGACACCATACAAATATGTAATCTTATGGGTACTCCTCTTAATGTTTCGATGTTGATATGGATG 35C

TCACACAGATGAATCTCATAAAAATATGTTACATAAGAGAACTCAATGCAAAAGATATGTTCTGTATGTTTTCATCCATATAAAGTTCAAACCAAGT
 AGTGTTCTACTTAGAGTATTTTATTACAATGTATTTCTTTGAGTTACGTTTCTATACAAGACATACAAAAGTAGGTATTTTCAAGTTTGGTCCA 36C

AAAAAATAAGTTAGAAAATTTGATGGAAATTAATCTTCTGCTGGGGTGGGCGAATAGTGCTGGGAGAGACAAGAAGGGGCTTCTGGGTCTTGGTAA
 TTTTATTCAATCTTTAAACCTACCTTTAATGAGAATCGACCCCAACCGCTCAATCACGGACCTCTTCTGTCTTCCCGAAGACCCAGAACCATT 37C

TGTTCTGTTCTCGTGTGGGTGTGCACTTATGATCTGTGCACTGTTCTGTATACACATTATGCTTCAAAATACTTACATAAAGAACATCTTATACC
 ACAAGACAAGGAGCACACCCCAACAGTCAATACTAGACAGTGACAAGACATATGTGTAATACGAAGTTTATGAGGTATTTCTGTAGAAATATGG 38C

CAGTTAATAGATAGAAGAGAAATAGTAATAGGTCAAGACCATGCAGCTGTAAGTGGGGGGCTGGGATCAAATAGCTACCTGCCTAATCTGCCCTC
 GTCATATCTATCTTCTCTTATTCTATTCAGTTCTGGTACGTCGACCATCACCCCCCGGACCTAGTTTATCGATGGACGGATTAGGAAGGGAG 39C

FIG 13-3

TTGAGCCCTGAATGAGTCTGCCTTCCAGGGCTCAAGGTGCTCAACAAAACAACAGGCCTGCTATTTCTGGCATCTGTGCCCTGTTGGCTAGCTAGGA 40c
 AACTCGGACTTACTCAGACGGAAGGTCCCGAGTTCACGAGTTGTTTGTGTCCGGACGATAAAAGGACCGTAGACACGGGACAAACCGATCGATCCT

 GCACACATACATAGAAATTAATGAAACAGACCTTCAGCAAGGGGACAGAGGACAGAATTAACCTTGGCCAGACACTGGAACCCATGTATGAACACTCA 41c
 CGTGTGTATGTATCTTAATTTACTTTGTCTGGAAGTCGTTCCCTGTCTCCTGTCTTAATTGGAACGGGTCTGTGACCTTTGGGTACATACTTGTGAGT

 CATGTTTGGGAAGGGGAAGGGACATGTAAATGAGGACTCTTCCTCATTCTATGGGCACTCTGGCCCTGCCCTCTCAGCTACTCATCCATCCAACAC 42c
 GTACAAACCTTCCCTTCCCGTGTACATTTACTCCTGAGAAGGAGTAAGATACCCCGTGAGACCGGGACGGGAGAGTCGATGAGTAGGTAGTTGTG

 ACCTTTCTAAGTACCTCTCTCTGCCTACACTCTGAAGGGTTCAGGAGTAACACACAGCATCCCTTCCCTCAAATGACTGACCATCCCTTTGTCTGTC 43c
 TGGAAAGATTCTGAGAGAGACGATGTGAGACTTCCCAAGTCTCATTGATTGTGTCTAGGGAAGGAGTTTACTGACTGGTAGGGAACAGGACG

 TTTGTTTTTCTTCCAGTCAGTACTGGGAAAGTGGGAAGGACAGTCATGAAAAACATACAAAGGACACCTTGCCCTTCTGCCTCTTGAGAATGTTG 44c
 AAACAAAAGAAAGGTCACTCATGACCTTTCACCCCTTCTGTCTAGTACCTTTTGATGATTCTTCTGGAACGGGAAGACGGAGAACTCTTACAAAC

 ATGAGTATCAAATCTTTCAAATCTTGGAGTTTGGTAGGGTGAGACTCAGTAATGTCCCTTCCAATGACATGAACCTTGCTCACTCATCCCTGGGGGCC 45c
 TACTCATAGTTAGAAAGTTTGAACCTCAAACCTCATCCCACTCTGAGTCATTACAGGGAAGGTTACTGTACTTGAACGAGTGAGTAGGACCCCGG

 AAATTGAACAATCAAAGGCAGGCATAATCCAGTTATGAATCAAACCTTCTTCTCAGAAGATAACACTCTGAAGGGAAACCCACCATAACCTAAGCAAG 46c
 TTTAAGTGTAGTTTCCGTCGGTATTAGGTCAATCTTAAGTTTGAAGAAGAGTCTTCTATTGTGAGACTTCCCTTTGGGTGGGTATTGGATTCTGTT

 TGAAGACAGGTGCTGCAGGTGGAATTTGTCTTCAAAAAGGTATGCTCAACTCCTTGCTCTTGGTACTCATAAATGGGTACATAAATGTGACTTTATT 47c
 ACTTCTGTCCACGACGTCCACCTTAACACAGGAAGTTTTCCATACGAGTTGAGAACGAGAACCATGAGTATTTACCCAGTGATTTACACTGAAATAA

 TGGAAATAGGGTCTTTGCAGAGTAATCAAGTCAAATTAGGTCACTGAAATGTTTGTGAGGATCGGTGAAATGGATCATTATATATTGCTGGTG 48c
 ACCTTTATCCAGAAACGCTCCATTAGTTTCACTTTAATCCAGTATGACTTTACAAACACTCCTACGCCACTTTTACCTAGTAAGTATATAACGACCAC

 GGAATATAAAGGGTATAGCTACTCTAGAAAATAGTTGTCACTTTCTTGA AAAAATAAAACAAAGACACCTACCATATGACCCAGGAATTGTACTCTTGT 49c
 CCTTATATTTCCATATCGATGAGATCTTTTATCAACAGTCAAGAACTTTTGTATTGTTTCTGTGGATGGTATACTGGGTCTTAAACATGAGGAAC

 GGAATTTACCCCAAGGAATAAAACTTATGTCCACACAGAACCCATACATGATTGTTACAGCAGCTTTATTGTTGTAGCCAAAGCTAGAAAGAGCCA 50c
 CCTTAAATGGGGTCTTTATTTTGAATACAGGTGTCTTGGGTATGTACTAACAGTGTCTGCGAAATAAACACATCGGTTTCTGATCTTTCTCGGT

 ACCCATCCCTCAATAGGCACTAGCCTAACAAATTTGAATATATCCATGCCATAGAATGCTATGAGGCAATAAAAGGAACGAACTGTTGATACAGAGAA 51c
 TGGGTAGGGAGTTATCCGTTGATCGGATTGTTTAAACATTATATAGGTACGGTATCTTACGATACTCGTTATTTTCTTGTCTTCAAACTATGTCTCTT

 CTGAGTGATTCTGAAGGACTTTCTACTGAGTGAAAAAGCCAATCTGAAGGGTCACATACCATGTGATTCTTTTATGTAACTTGTGAAGTGACAA 52c
 GACCTCACTAAGACTTCTGAAAGATGACTCACTTTTTCGGTTAGACTTTCCAGTGATGTTACACTAAGGAAATACATTGTAAACAACTTCACTGTT

FIG 13-4

XmnI BglII

AATTATAGGCATAGAGAACAGATTCTGGTTGCCAGGGTTAGGGTGGGAGAGAGAGTAGGCGAACTATAAAGGGAGATCTTTGTGATCATGGGA 53C
TTAATATCCCTATCTCTTGCTAAGACCAACGGTCCCAATCCACCACCTCTTCTCTCATCCGCTTTGATATTCCCTCTAGAAACACTAGTACCTT

XbaI

TAAATCTGTATCTTGATTGCAGTGGTAGTTGCAGGCATCTAGACATGTGATAAAATGACATAGAACTGTACACACTTATTTTATCAATGTCAAATCTTG 54C
ATTTAGACATAGAACTAACGTCACCATCAACGTCGGTAGATCTGTACACTATTTTACTGTATCTTGACATGTGTGAATAAAATAGTTACAGTTTAAGAAC

BspI

GTTTTAATATCGTACTGTAATTACGTAAGAAGTAACCAACAGGAGAACTGGGTGCAGGACACATCAGACCTCTGTGCTTTATATCCTGTCTTTGCTACT 55C
CAAAATTATAGCATGACATTAAATGCATTCTTCATTGGTTGTCCTCTTGACCCACGTCCTGTGTAGTCTGGAGACACGAAATATAGGACAGAACGATGA

TTCTGTGAATCTATAATTATTTCCAAATAATTTTTTAAACTTTTTTTTATGCTGGATCG 5561
AAGACACTTAGATATTAATAAAGGTTTATTAAAAAATTGAAAAAATAACGACCTAGC

FIG 13-5

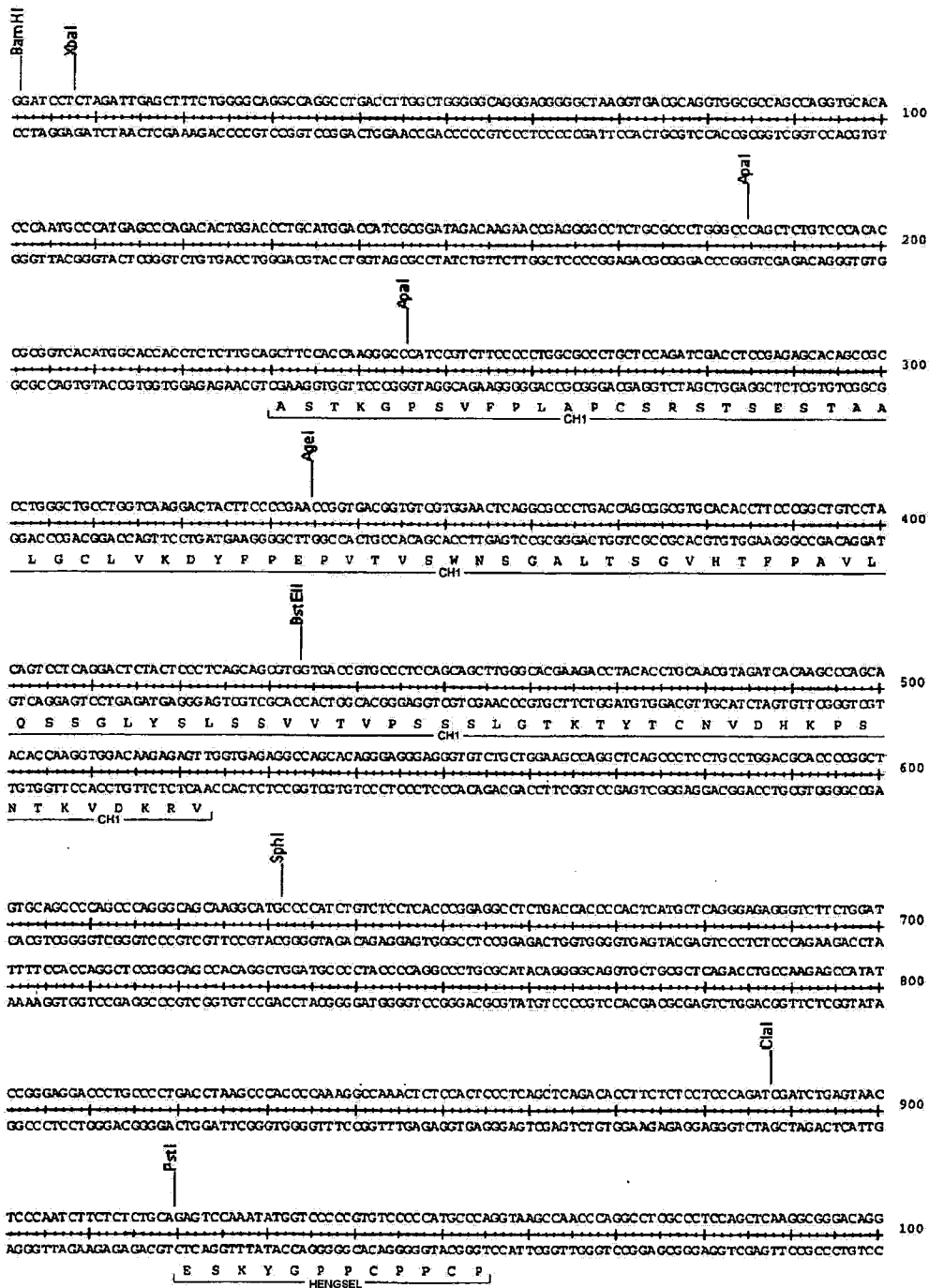
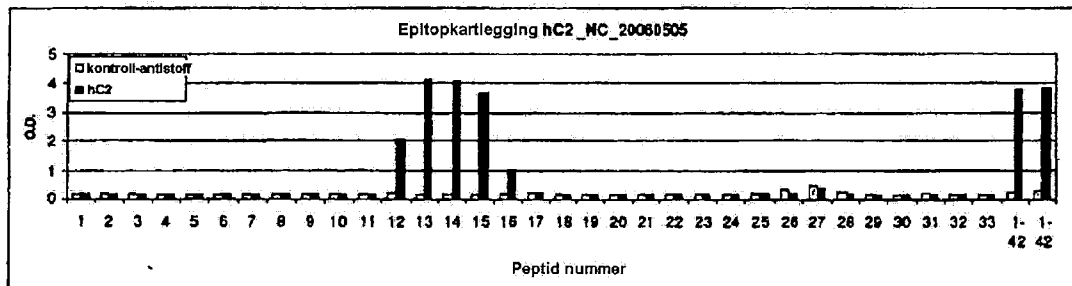
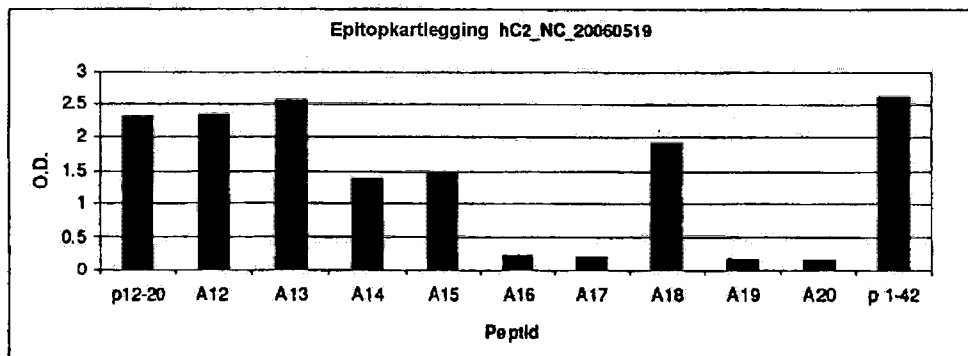


FIG 14 -1

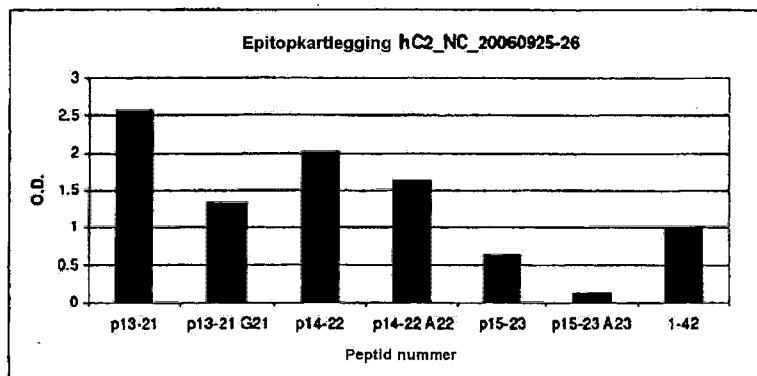
FIG 14 -2



Figur 1. hC2 binder til peptidene 12, 13, 14, 15 og 16 av A β 1-42 peptid-biblioteket. Binding av hC2 til overlappende peptider av A β 1-42 ble analysert ved ELISA. Binding til den fullstendige A β 1-42 og binding av et ikke-bindende kimært antistoff (kontroll-antistoff) ble anvendt som positive og negative kontroller henholdsvis. Peptid nummeret svarer til den aminosyren i A β 1-42-sekvensen ved hvilken peptidet starter. Resultater er uttrykt som OD.



Figur 2. hC2 binding til A β 12-20 er fullstendig avhengig av aa 16, 17, 19 og 20 og delvis avhengig av aa 14, 15 og 18. Binding av hC2 til A β 12-20 og alanin substituert A β 12-20 ble analysert ved ELISA. Binding til den fullstendige A β 1-42 ble anvendt som positiv kontroll. Nummeret svarer til den aa som er substituert med alanin. Resultater er uttrykt som OD.



Figur 3. hC2 binding til A β 15-23 er avhengig av aa 23 og delvis avhengig av aa 21 og litt avhengig av aa 22. Binding av hC2 til A β 13-21, 14-22 eller 15-23 og til 13-21G21, 14-22A22 eller 15-23A23 ble analysert ved ELISA. Binding til den fullstendige A β 1-42 ble anvendt som positiv kontroll. Resultater er uttrykt som OD.

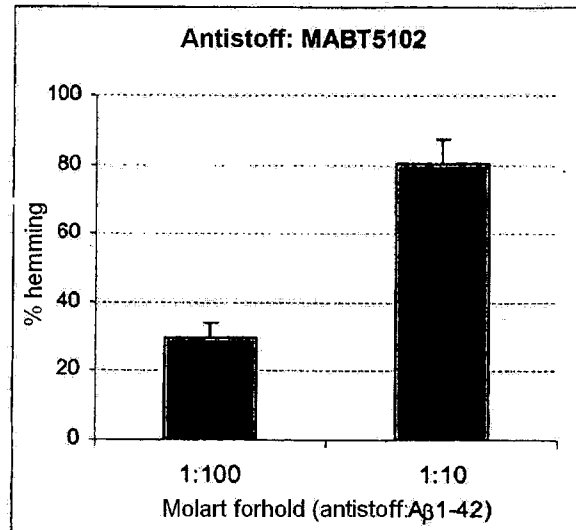


FIG. 16

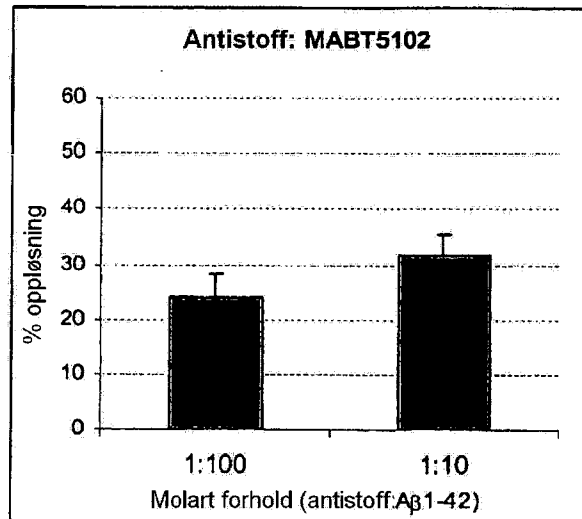


FIG. 17

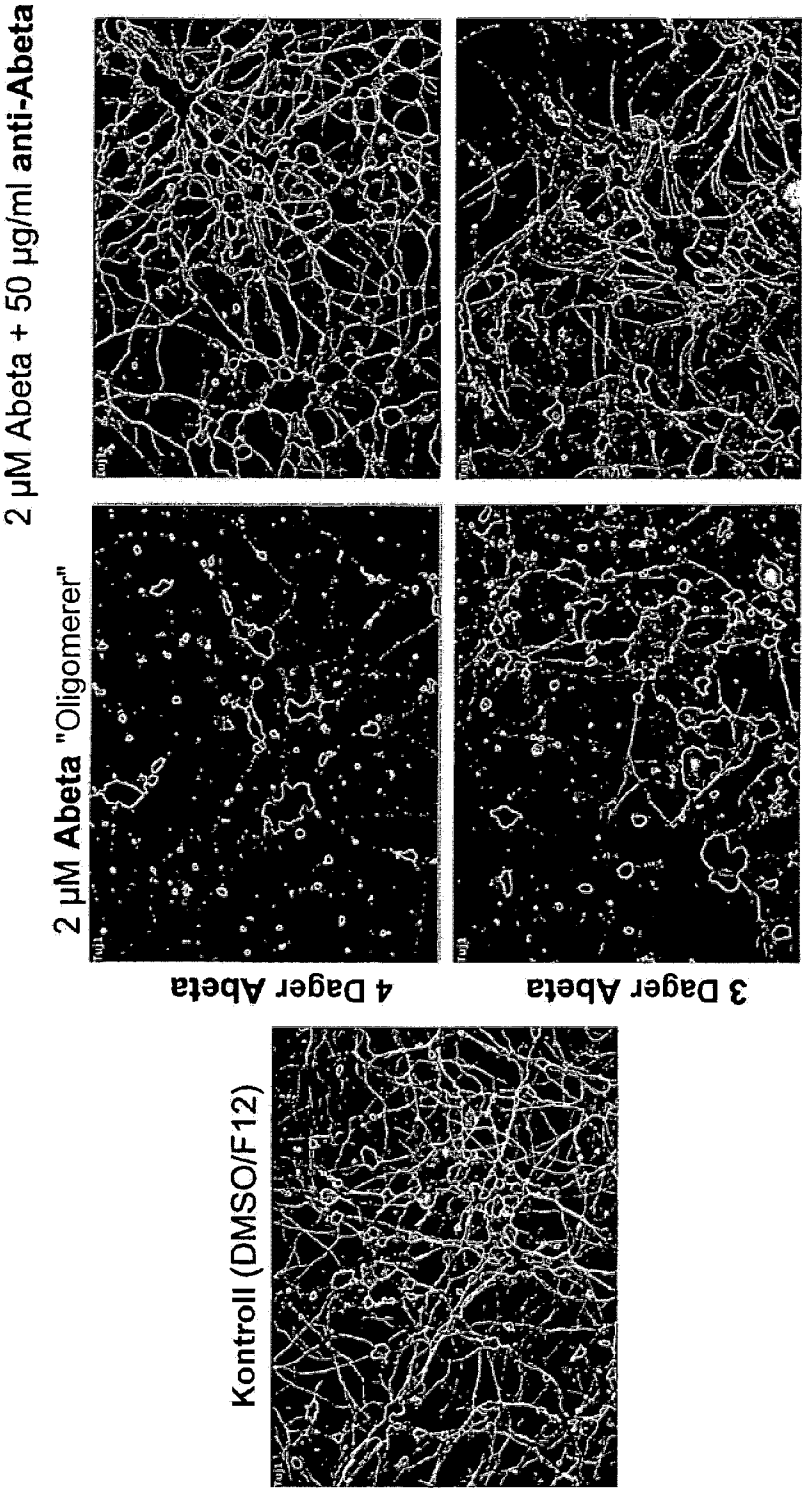


FIG. 18