

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號： 09101288

※ 申請日期： 09.1.11

※IPC 分類：~~E07K~~;**A61K**

G07K14/47 (2006.01),
A61K 39/395 (2006.01),
G01N 33/68 (2006.01),
G01N 33/50 (2006.01),
A61P 25/28 (2006.01),

一、發明名稱：(中文/英文)

阿茲海默氏症及其他神經性失智疾病之診斷及治療

DIAGNOSIS AND TREATMENT OF ALZHEIMER'S DISEASE AND OTHER
NEURODEMENTING DISEASES

二、申請人：(共 2 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

1. 德國馬爾堡菲利普大學
PHILIPPS-UNIVERSITAET MARBURG
2. 德國康斯坦茨大學
UNIVERSITAET KONSTANZ

代表人：(中文/英文)(簽章)

1. 維克 納浩斯
NIENHAUS, VOLKER
2. 希姆特 漢格斯特勒
HENGSTLER, HELMUT

住居所或營業所地址：(中文/英文)

1. 德國馬爾堡市畢根街10號
BIEGENSTRASSE 10, 35037 MARBURG, GERMANY
2. 德國康斯坦茨市大學街10號
UNIVERSITAETSSTRASSE 10, 78464 KONSTANZ, GERMANY

國 籍：(中文/英文)

1. 德國 GERMANY
2. 德國 GERMANY

三、發明人：(共 5 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 理查 杜戴爾
DODEL, RICHARD
2. 麥可 貝奇爾
BACHER, MICHAEL
3. 麥可 普瑞茲拜斯基
PRZYBYLSKI, MICHAEL
4. 洛廬卡 史帝芬斯考
STEFANESCU, RALUCA
5. 瑪瑞利納 曼尼亞
MANEA, MARILENA

國 籍：(中文/英文)

1. 德國 GERMANY
2. 德國 GERMANY
3. 羅馬尼亞 ROMANIA
4. 羅馬尼亞 ROMANIA
5. 羅馬尼亞 ROMANIA

四、聲明事項：

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

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 美國；2007年01月11日；60/884,513
2. 美國；2007年01月11日；60/884,526
3. 歐洲專利機構；2007年01月11日；07000507.9
4. 歐洲專利機構；2007年01月11日；07000521.0
5. 美國；2007年10月22日；60/981,667
6. 美國；2007年10月22日；60/981,675
7. 歐洲專利機構；2007年10月22日；07119002.9
8. 歐洲專利機構；2007年10月22日；07119026.8

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

- 1.
- 2.

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於阿茲海默氏症及其他神經性失智疾病之診斷及治療。

本申請案主張以下的優先權：2007年1月11日申請之美國臨時申請案第60/884,513號、2007年1月11日申請之美國臨時申請案第60/884,526號、2007年10月22日申請之美國臨時申請案第60/981,667號、2007年10月22日申請之美國臨時申請案第60/981,675號、2007年1月11日申請之歐洲專利申請案第07000507.9號、2007年1月11日申請之歐洲專利申請案第07000521.0號、2007年10月22日申請之歐洲專利申請案第07119002.9號、2007年10月22日申請之歐洲專利申請案第07119026.8號，該等案件之全文以引用的方式併入本文中。

【先前技術】

老年群體中癡呆之最常見形式，阿茲海默氏症(AD)(流行率：1000/100,000；>65歲)為發達國家中死亡之第四大誘因。皮質萎縮、神經元喪失、區域特異性澱粉樣蛋白沈積、神經炎斑塊及神經原纖維纏結為AD腦中之主要神經病理學特徵。認為此等改變與臨床上定義AD之認知衰退相關聯。在此等標誌內，神經炎斑塊為澱粉樣蛋白免疫反應性、硫代黃素(thioflavin)陽性、且伴隨有星形膠質細胞增生、小神經膠質細胞增生、細胞支架改變及突觸喪失。斑塊內之神經炎退化程度與癡呆之臨床參數相關。神經炎斑塊為通常以中等至較大數量見於AD腦之邊緣結構及相

關新皮質中之球形多細胞病灶。此等斑塊包含包括大量與非原纖維形式之肽互混之澱粉樣蛋白原纖維的澱粉樣蛋白- β 肽($A\beta$)之胞外沈積物。該等斑塊亦含有可變數量之通常位於極接近原纖維澱粉樣蛋白核心處之活化微神經膠質細胞，以及環繞該核心之反應性星形膠質細胞。

神經炎斑塊之主要組份，即 β -澱粉樣蛋白多肽($A\beta$)係產生自較大前驅蛋白，即澱粉樣蛋白前驅蛋白(APP)(Kang等人，1987；Tanzi等人，1987)。 $A\beta$ 係由正常細胞產生且可作為健康人類血漿及腦脊髓液(CSF)中之循環肽而偵測。儘管未完全瞭解澱粉樣蛋白前驅蛋白(APP)於腦中之生理作用，但APP之誤義突變賦予AD(FAD)之常染色體顯性遺傳且闡明了可能重要之發病機制。認為神經炎斑塊(屍體剖檢中滿足確診AD之神經病理學標準之結構)中 $A\beta$ (APP之39-42胺基酸蛋白水解產物)之積聚為疾病進展之原因。APP之主要 $A\beta$ 裂解產物為 $A\beta(1-42)$ 多肽，但C端(39至41)較短之 $A\beta$ 肽亦係藉由膜中之蛋白水解(γ -分泌酶)裂解產生。 $A\beta(1-42)$ 之N端部分限定於APP之胞外區中，且 $A\beta$ 肽之主要C端部分含於跨膜域內。

與FAD相關之APP中之誤義突變發生於 $A\beta$ 域附近且致使4 kDa $A\beta$ 肽產生之增加。在AD中，已假設 $A\beta$ 之合成增加及/或清除減少可導致澱粉樣蛋白斑塊沈積且隨後導致與疾病相關之神經病理學改變。使用合成 $A\beta$ 肽之活體外研究中展示神經毒性取決於為原纖維狀且主要為 β 摺疊片構型之 $A\beta$ 。

含有 β -澱粉樣蛋白前驅蛋白 (APP) 之神經毒性澱粉樣蛋白肽片段 ($A\beta$) 作為主要產物之胞外斑塊積聚為阿茲海默氏症 (AD) 之特徵之一。儘管將 APP 認作 AD 之關鍵分子，但 APP 之分子 (病理降解) 生理降解及蛋白水解路徑，及 $A\beta$ 肽之細胞相互作用及生物化學結果仍不清楚。儘管缺少關於 $A\beta$ 所衍生之斑塊之形成及沈積的降解路徑及細胞轉運之詳細描述，但對開發基於由 $A\beta(1-42)$ 所產生之具有治療活性的抗體之 AD 免疫法的最近研究已在阿茲海默氏症之轉殖基因小鼠模型中取得了初步成功。若干報導已表明藉由以 $A\beta(1-42)$ 免疫所產生之抗體能夠藉由分解 $A\beta$ 原纖維來抑制 $A\beta$ 斑塊之形成，且改善小鼠空間記憶之損害。轉殖基因 APPV717F 小鼠 (TG 小鼠) 為具有年齡及區域相關 $A\beta(1-40)$ 及 $A\beta(1-42)$ 沈積物之得以良好表徵的 AD 樣斑塊病理學模型 (Games 等人，1995)。最近，Schenk 等人及其他人研究在以預凝集 $A\beta(1-42)$ 免疫或投與對抗 $A\beta$ 之抗體後 APPV717F TG 小鼠體內 $A\beta$ 沈積之改變 (Bard 等人，2000；Schenk 等人，1999)。 $A\beta$ 抗體之免疫及投與顯著削弱澱粉樣蛋白斑塊沈積、神經炎營養不良及星形膠質細胞增生。在此等研究中，小鼠抗人類 $A\beta$ 抗體力價增加為所觀測之斑塊負荷降低所必需。此等發現增加了 $A\beta$ 抗原形成及清除之可能性：抗體複合物可在中樞神經系統內之抗體產生後或藉由外周抗體跨過血腦障壁 (BBB) 轉運來減少腦 $A\beta$ 沈積。此外，被動免疫似乎藉由改變 CNS 與血漿之間的 $A\beta$ 平衡來降低腦 $A\beta$ 負荷 (DeMattos 等人，2001)。值得注意的是，主動或被動

免疫顯著逆轉 APPV717F 小鼠或其他 APP 轉殖基因小鼠之行為及記憶損害 (Dodart 等人, 2002; Janus 等人, 2000; Morgan 等人, 2000)。此等結果顯示免疫可能藉由改變可溶 A β 混合物來預防記憶缺失。因此, 以主動或被動免疫來治療 AD 患者為以 A β 肽之產生、清除及凝集為標靶之若干新興治療方法中之一種。

基於此等結果, 開始使用主動免疫程序 [A β (1-42) 肽及 / 或其預凝集體; 佐劑: QS21] 之臨床試驗來治療患有確定 AD 之患者。不幸地是, 產生嚴重副作用 ("腦膜腦炎"), 且停止臨床試驗。分析在此臨床試驗中以主動免疫治療之 AD 患者子群 (n=30) (Hock 等人, 2002; Hock 等人, 2003)。作者證明 (i) 免疫誘導對抗 A β (1-42) 之抗體的產生, 及 (ii) 在可觀測到抗體產生之患者體內認知衰退與未經治療之對照組相比得以顯著減輕。作者推斷免疫可為 AD 之治療選擇。

最近之研究更詳細地闡明以 A β (1-42) 免疫後產生之抗體之辨識特性。此作用引起由轉殖基因 AD 小鼠體內所產生之抗體所辨識的特異性 A β 抗原決定基之鑑別 (McLaurin 等人, 2002; Przybylski 等人, 2003)。已藉由使用選擇性蛋白水解切除技術 (抗原決定基-切除) 組合高解析度質譜法 (FTICR-MS) 作為具有鑑別抗原決定基之高敏感性及特異性的生物分析工具來獲得此等結果 (Macht 等人 1996; Suckau 等人 1992; Macht 等人 2004; 參見圖 1, 2)。使用經固定 A β 抗原免疫複合物之質譜抗原決定基切除, 鑑別抗原決定基

由A β (1-42)之殘基(4-10) (FRHDSGY)組成。此辨識結構之選擇性係藉由闡明來自AD斑塊之相同抗原決定基，來自A β -基原纖維之A β (1-42)萃取物，化學合成之A β (1-42)及其他包含N端A β 序列之(A β 不相關)多肽來確定(Przybylski等人2003)。

天然產生之抗A β 自體抗體(A β 自體抗體)係由Du等人於來自未經免疫之人類之血液及CSF中鑑別(Du等人，2001)。如免疫沈澱(Du等人，2001)及ELISA所展示，此等抗體特異性辨識人類A β 。此外，該等抗體易於辨識沈積於PDAPP轉殖基因小鼠腦中之合成A β (1-40)以及人類A β 。此外，在A β 自體抗體存在下降低A β 肽之原纖化/低聚合及神經毒性(Du等人，2003)。

此外，已研究患有阿茲海默氏症之患者體內A β 自體抗體濃度與對照組相比是否存在差異。有趣的是，發現兩組之間的顯著差異，致使患有阿茲海默氏症之患者體內對抗A β 之抗體力價實質性降低(大約15-20倍)。此等結果最近已經其他小組證實(Weksler等人，2004)。對抗A β 之抗體亦可於市售靜脈內IgG製劑(IVIgG)中偵測。以此等靜脈內免疫球蛋白製劑治療患有不同神經疾病之患者致使CSF中A β 濃度降低(Dodel等人，2002)。亦於幼年(4個月)APP轉殖基因(TgCRND8)小鼠體內確立A β 自體抗體預防A β 斑塊沈積及給予保護以免於A β 斑塊沈積之實質效應。此外，在利用5名患有AD之患者的預備試驗中，傳遞IVIgG之後總A β 在CSF中顯著降低且在血清中增加(Dodel等人，2004)。在六

個月之觀測時段中，在所研究之五名患者中未觀測到認知退化。此等結果已於包括8個以IVIgG治療之AD患者之近期預備試驗中得以證實(Relkin等人，2006)。

然而，向患有AD之患者投與IVIgG並不方便且與高成本相關聯，因為治療性A β 自體抗體之分數較低。此製劑中絕大多數IgG並不具有A β 特異性且可導致不合乎需要的效應。此外，IVIgG之來源有限，鑒於患有阿茲海默氏症之患者之流行率，其為不可接受之缺點。

偵測及監測AD及其他類似神經性失智疾病之進展之方法並不足夠。目前AD診斷分為三組：(i)測定遺傳危險因素或突變(主要用於FAD情況，但不用於偶發性AD診斷)；(ii)神經成像法；及(iii)基於生物化學/生物標誌之診斷。目前關於開發基於生物標誌之診斷程序之工作主要聚焦於CSF，其主要缺點為該等方法需要精製侵襲性材料。與腦所衍生之生物標誌相關之主要問題為臨床上所檢查之對照物通常亦包括具有臨床前AD病理之患者。此外，目前可用之生物標誌具有低特異性之主要缺點。已注意到於額葉皮質中表現，由腦蛋白質組研究方法鑑別為由AD中假定血腦障壁改變所產生之可能之腦生物標誌的一系列蛋白質之類似缺點。

已主要藉由測定SP及NFT組份(例如A β 肽，A β (1-40)(SEQ ID NO: 1)及A β (1-42))(發現具有高含量)及高磷酸化Tau-蛋白來進行血漿及血清中生物標誌之研究。然而，認為A β 測定之特異性，及於早期及區別診斷中之應用為不確

定的，已描述為已進展之神經退化的標誌之蛋白 Tau 測定亦為相同情況。

因此，對治療及偵測諸如 AD 之神經性失智疾病之改良方法存在需要。

【發明內容】

在一態樣中，提供分離單株人類抗 β 澱粉樣蛋白抗體，其包含一個以上胺基酸序列，該等胺基酸序列係選自由下列序列組成之群的至少兩個一致胺基酸序列：SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10及SEQ ID NO: 11，其中該一個以上胺基酸序列各自係來自不同SEQ ID NO，其中該抗體以比與單體形式 $A\beta$ 結合之親和力高之親和力與二聚形式 $A\beta$ 結合。

在一實施例中，抗體包含兩個以上胺基酸序列，該等胺基酸序列係選自由下列序列組成之群的至少三個一致胺基酸序列：SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10及SEQ ID NO: 11，其中該兩個以上胺基酸序列各自係來自不同SEQ ID NO。在另一實施例中，該抗體包含三個以上胺基酸序列，該等胺基酸序列係選自由下列序列組成之群的至少四個一致胺基酸序列：SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10及SEQ ID NO: 11，其中該三個以上胺基酸序列各自係來自不同SEQ ID NO。在另一實施例中，該抗體包含四個以上胺基酸序列，該等胺基酸序列係選自由下列序列組成之群的至少五個一致胺基酸序列：

SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10及SEQ ID NO: 11，其中該四個以上胺基酸序列各自係來自不同SEQ ID NO。在另一實施例中，該抗體包含來自下列各一致胺基酸序列之胺基酸序列：SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10及SEQ ID NO: 11。

在一實施例中，抗體包含胺基酸序列SEQ ID NO: 33、SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 45作為特定輕鏈CDR，分別為CDR1、CDR2及CDR3，且包含胺基酸序列SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 23及SEQ ID NO: 29作為特定重鏈CDR，分別為CDR1、CDR2及CDR3，而在另一實施例中，抗體包含胺基酸序列SEQ ID NO: 53及SEQ ID NO: 60。在其他實施例中，抗體包含胺基酸序列SEQ ID NO: 145及SEQ ID NO: 60、SEQ ID NO: 53及SEQ ID NO: 60、SEQ ID NO: 51及SEQ ID NO: 60、SEQ ID NO: 52及SEQ ID NO: 60、SEQ ID NO: 146及SEQ ID NO: 60、SEQ ID NO: 53及SEQ ID NO: 148、SEQ ID NO: 55及SEQ ID NO: 61或SEQ ID NO: 145及SEQ ID NO: 62。抗體亦可包含來自下列胺基酸序列之CDR：SEQ ID NO: 145及SEQ ID NO: 60、SEQ ID NO: 53及SEQ ID NO: 60、SEQ ID NO: 51及SEQ ID NO: 60、SEQ ID NO: 52及SEQ ID NO: 60、SEQ ID NO: 146及SEQ ID NO: 60、SEQ ID NO: 53及SEQ ID NO: 148、SEQ ID NO: 55及SEQ ID NO: 61或SEQ ID NO: 145及SEQ ID NO: 62。

在另一態樣中，抗體與包含A β (21-37)之肽結合，而在另一態樣中，抗體遮蔽A β (21-37)殘基使其免於蛋白水解消化。在另一態樣中，當抗體偶合至與NHS活化之6-胺基己酸偶合之瓊脂糖時，該抗體與A β (12-40)或A β (20-37)特異性結合，但不與A β (17-28)、A β (25-35)或A β (31-40)特異性結合。

亦可將本發明之抗 β 澱粉樣蛋白抗體調配為醫藥組合物。

在另一態樣中，預防或治療患者神經性失智疾病之方法包含向該患者投與治療上可接受量之本發明抗 β 澱粉樣蛋白抗體。該等方法可用於預防或治療選自由阿茲海默氏症、唐氏症候群(Down's syndrome)、路易體型癡呆(dementia with Lewy bodies)、額顳葉型癡呆(fronto-temporal dementia)、澱粉樣腦血管病變(cerebral amyloid angiopathy)及澱粉樣變性病組成之群之神經性失智疾病。在一較佳實施例中，神經失智疾病為阿茲海默氏症。

在另一實施例中，本發明之抗 β 澱粉樣蛋白抗體可用於製造用以延緩或預防神經性失智疾病進展之藥劑。

在另一態樣中，提供偵測或量測患者神經性失智疾病進展之方法，其包含(A)量測來自該患者之樣本中對抗第一A β 肽之抗體力價，其中第一A β 肽至少包含A β (30-37)之序列且至多包含A β (12-40)之序列；(B)量測來自該患者之樣本中對抗第二A β 肽之抗體力價，其中該第二A β 肽至少包含A β (4-10)之序列且至多包含A β (1-20)之序列；及(C)比較

來自步驟(A)與(B)之力價。在一些實施例中，第一A β 肽至少包含A β (21-37)之序列。在另一實施例中，該方法另外包含比較患者力價與所測定之正常及AD患者之力價，其中對抗第一A β 肽之較高力價與阿茲海默氏症顯現及/或進展之較低危險相關聯。該等方法亦可包含比較患者力價與所測定之正常及AD患者之力價，其中相對於對抗第二A β 肽之力價，對抗第一A β 肽之較高力價與阿茲海默氏症顯現及/或進展之較低危險相關聯。或者，該等方法可包含比較患者力價與對正常及AD患者所測定之力價，其中對抗第二A β 肽之較高力價與阿茲海默氏症顯現及/或進展之較高危險相關聯。在另一實施例中，該等方法另外包含比較患者力價與對正常及AD患者所測定之力價，其中相對於對抗第一A β 肽之力價，對抗第二A β 肽之較高力價與阿茲海默氏症顯現及/或進展之較高危險相關聯。

亦提供偵測或量測患者神經性失智疾病進展之方法，其包含A)於給定時間點自該患者獲得第一樣本；B)在稍後時間點自該患者獲得第二樣本；C)量測該等第一及第二樣本中對抗至少包含A β (30-37)且至多包含A β (12-40)之抗原決定基之抗體力價；及D)比較該等第一及第二樣本之力價。其他該等方法包含A)在給定時間點自該患者獲得第一樣本；B)在稍後時間點自該患者獲得第二樣本；C)量測該等第一及第二樣本中對抗至少包含A β (4-10)且至多包含A β (1-20)之抗原決定基之抗體力價；及D)比較該等第一及第二樣本之力價。在其他實施例中，該等方法包含A)於給定時

間點自該患者獲得第一樣本；B)在稍後時間點自該患者獲得第二樣本；C)量測該等第一及第二樣本中對抗包含A β (30-37)之抗原決定基之抗體力價；及D)比較該等第一及第二樣本之力價。

在另一態樣中，提供包含下列各物之套組：(A)第一A β 肽，其至少包含A β (30-37)之序列且至多包含A β (12-40)之序列，及(B)第二A β 肽，其中該第二A β 肽至少包含A β (4-10)之序列且至多包含A β (1-20)之序列。

以下圖式形成本發明說明書之一部分且包括該等圖式以進一步展示本發明之某些態樣。參考此等圖式之一或多者結合本文中所呈現之特定實施例之詳述可更佳地理解本發明。

【實施方式】

A β 自體抗體係自AD患者及健康對照者之血清或混合之市售血清免疫球蛋白(IVIgG)分離。測定重鏈及輕鏈可變區之cDNA及胺基酸序列，且於哺乳動物細胞中表現所有可能之重鏈及輕鏈對。發現許多此等配對以比與A β 單體結合之親和力高之親和力與A β 二聚體結合，且展示其中之一者CSL純系7有可能適用於治療AD之生物活性。本發明者進一步發現抗A β (21-47)自體抗體之CDR具有高度同源性。因此，測定一致CDR且將其用以製備適用於預防或治療如AD之神經性失智疾病之人類抗 β 澱粉樣蛋白抗體。本發明者亦令人驚訝地發現AD患者與健康對照者相比對抗

A β (4-10)之抗體力價增加且對抗A β (21-37)之抗體力價降低。因此，本發明者不僅發現用於偵測及量測如AD之神經性失智疾病進展之方式，亦發現用於延遲AD發作或進展之方法。亦提供用於偵測及量測如AD之神經性失智疾病進展之套組。

定義

本文所使用之術語"A β 多肽"定義具有胺基酸序列SEQ ID NO: 01之多肽或其片段。該等片段特別包含具有序列SEQ ID NO: 02之多肽。

本文所使用之術語"抗體"亦包含抗體衍生物及/或片段。該等抗體衍生物或片段保持完整抗體之抗原結合特性，但缺少完整抗體之一些序列，例如Fc域。該等衍生物或片段之實例包括(但不限於)可經由分別以木瓜蛋白酶或胃蛋白酶使抗體酶促消化而獲得之Fab或F(ab')₂片段、單鏈可變片段(scFv)、Fv片段、微型抗體及雙功能抗體。

本文所使用之術語"自體抗體"一般係指針對人體蛋白上之抗原決定基且可見於未以各別抗原預先免疫之人類受檢者血液或腦脊髓液中的抗體。同時，術語"抗A β (21-37)自體抗體"係指與包含A β (21-37)(SEQ ID NO: 2)之A β 肽結合且遮蔽該SEQ ID NO 2使其免於蛋白水解消化之自體抗體。該等抗A β (21-37)自體抗體亦以比與對應A β 單體結合之親和力高之親和力與A β 二聚體結合。

本文所使用之術語"CDR"係指互補判定區。通常可於抗體輕鏈以及重鏈上之可變區中發現該等CDR區中之3者

(CDR1、CDR2、CDR3)。此六個高變區各自可促成抗體之抗原特異性。然而，本文所使用之術語CDR不暗示所提及之分子實際上為抗體。而認為該術語表示有助於本發明之多肽與全長A β 多肽(A β 1-40)之C端部分特異性結合，尤其有助於與A β (21-37)多肽結合之序列。因此，經工程化以與該抗原決定基結合之抗體衍生物或其他多肽亦可展現CDR。

本文所使用之術語"一致CDR"係指藉由根據Kabat編號系統對準兩個或兩個以上給定CDR序列所衍生之單一序列。(參見Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H. M., Gottesman, K. S. & Foeller, C. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest (Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD) NIH出版號91-3442第5版及R. Kontermann, S. Dübel (編), Antibody Engineering; Springer Lab Manual Series; Springer, Heidelberg 2001, 兩者均係以引用的方式併入本文中)。因此，對於"一致CDR"之各胺基酸位置而言，測定可於彼位置處出現之胺基酸一致性。根據Kabat編號來進行CDR命名以及胺基酸插入。

術語"雙功能抗體"係指具有兩個抗原結合位點之小抗體片段，該等片段包含於同一多肽鏈(VH VL)中與輕鏈可變域(VL)連接之重鏈可變域(VH)。藉由使用過短而不容許於同一鏈上兩個結構域之間配對之連接子，迫使該等結構域與另一鏈之互補域配對且產生兩個抗原結合位點。雙功能

抗體於(例如)EP 404,097、WO 93/11161中更充分描述。

本文所使用之術語"抗原決定基"或"抗原決定基肽"一般係指包含衍生自由特異性抗體結合之抗原之分子辨識肽序列或結構的多肽。其為抗原為抗體所特異性辨識之免疫決定基。抗原決定基可包含呈空間或不連續構型之至少5個，較佳至少8個胺基酸。抗原決定基亦可包含多肽鏈之單一區段，該區段包含最小長度為約5個胺基酸之連續線性胺基酸序列。

"Fv"為含有完全抗原辨識及結合位點之最小抗體片段。此區域由緊密非共價締合之一個重鏈可變域及一個輕鏈可變域之二聚體組成。在此構型中，各可變域之三個CDR相互作用以界定VH VL二聚體表面上之抗原結合位點。六個CDR共同賦予抗體以抗原結合特異性。

本文所使用之術語"部分"係指具有獨特功能之多肽部分。該等部分可提供通常不存在於多肽其餘部分中之結構或功能特徵或該特徵由此部分增強。該等功能或結構部分可(例如)提供多肽之結合、穩定或偵測。該部分自身可為多肽或可為向多肽提供所需功能之任何其他化合物。該部分與多肽穩定締合，詳言之，與多肽共價偶合。本文所使用之術語部分不提供關於此部分與多肽自身相比之尺寸之任何資訊。該部分可比與其偶合之多肽小、具有相同尺寸或比與其偶合之多肽大。

本文所使用之術語"單株抗體"係指自大體上均質之抗體群體(亦即構成該群體之個別抗體除可以少量存在之可能

之天然產生的突變以外為相同的)所獲得之抗體。與通常包括針對不同抗原決定基之不同抗體之多株抗體製劑對比，單株抗體具有高度特異性，係針對特異性抗原位點或抗原決定基。

本文所使用之術語"神經性失智疾病"、"失智症"或"AD型神經性失智疾病"係指選自阿茲海默氏症、唐氏症候群、路易體型癡呆、額顳葉型癡呆之疾病以及諸如澱粉樣腦血管病變及澱粉樣變性病之病症。

術語"經寡聚"、"寡聚物"及"寡聚"係指亦包含 $A\beta$ 二聚體、三聚體、四聚體及更高級寡聚物之 $A\beta$ 多聚體，但不指 $A\beta$ 原纖維。

本文所使用之術語"斑塊特異性"抗體係指針對 $A\beta$ 多肽之 $A\beta(4-10)$ 抗原決定基之抗體。

本文所使用之術語"多肽"係指具有至少5個胺基酸殘基之多肽鏈。該術語亦指一個以上多肽鏈之組合，例如四個多肽鏈之組合，諸如IgG抗體。

本文所使用之術語"互補位"或"互補位肽"一般定義衍生自特異性單株或多株抗體之分子辨識肽序列。此辨識肽序列對抗原決定基展現特異性結合特性，且可包含抗體之可變及/或恆定區部分序列。

本文所使用之"與抗原決定基X特異性結合"係指抗體以比其他抗原決定基結合之親和力高之親和力與特定抗原決定基(例如抗原決定基X)結合之特性。

本文中所使用之"與 $A\beta$ 之寡聚結構特異性結合"意謂各別

抗體以比與 A β 單體結構結合之親和力高之親和力與 A β 寡聚結構結合。

A β 抗體之 "治療有效量" 係指於顯著數量之需要該治療之受檢者體內提供投與該抗體所達成之特定藥理反應的劑量。治療有效量可藉由預防或改善所治療之神經性失智疾病之不利病況或症狀來確定。適當劑量將視(例如)疾病類型、階段及嚴重性以及投藥模式而定。應強調，即使熟習此項技術者認為該劑量為 "治療有效量"，但在特定情況下投與特定受檢者之 "治療有效量" 對特定疾病而言可能並非對 100% 之所治療患者有效。

術語 "力價" 表示樣本(通常血液)中特定抗體之量或濃度之量度。

術語 "治療" 及其類似者係指獲得所需藥理及/或生理效應。該效應就完全或部分預防疾病或其症狀而言可為預防性效應及/或就部分或完全穩定或治癒疾病及/或可歸因於該疾病之不利效應而言可為治療性效應。"治療" 涵蓋哺乳動物(尤其人類)疾病之任何治療，且包括：(a) 預防可傾向於罹患該疾病或症狀，但尚未經診斷患病之受檢者出現該疾病或症狀；(b) 抑制該疾病症狀，亦即使其發展停滯；或(c) 緩解該疾病症狀，亦即引起疾病或症狀消退。

抗體

在一態樣中，本發明係關於與抗原決定基 A β (21-37)(SEQ ID NO 2) 特異性結合之多肽。

本發明之多肽可為(例如)與全長 A β 多肽(A β 1-40)之 C 端

部分，尤其與以A β (21-37)(SEQ ID NO: 2)表示之抗原決定基結合之抗體、抗體片段或任何其他多肽。

在一態樣中，本發明多肽尤其在生理條件下(例如pH值為約7.4，PBS中約50至約150 mM之鹽濃度)能夠與包含澱粉樣蛋白 β 之抗原決定基A β (21-37)(SEQ ID NO 2)之多肽特異性結合。在一實施例中，多肽在活體外條件下具有至少約 10^{-5} M，約 10^{-6} M，約 10^{-7} M，約 10^{-8} ，約 10^{-9} M，約 10^{-10} M，約 10^{-11} M，約 10^{-12} M或更高之相對解離常數(相對KD；反應活體外結果，但在活體內條件下不一定為相同值)。舉例而言，多肽與以A β (21-37)(SEQ ID NO: 2)表示之抗原決定基結合之相對解離常數可在約 10^{-8} M至約 10^{-12} M之間，尤其為約1至 50×10^{-9} M。該解離速率常數可易於使用製造商所概述之一般程序或此項技術中已知之其他方法，使用動力學分析技術(諸如表面電漿共振(BIAcore或Biosensor))來測定。

在另一態樣中，令人驚奇地發現對A β (21-37)具特異性之多肽具有高度同源性。因此，提供包含選自一致CDR序列之序列的多肽。因此，在一實施例中，本發明之多肽可包含具有如以一致序列SEQ ID NO: 6至8中之任何者表示之序列之CDR序列。

SEQ ID NO: 6至8表示能夠與SEQ ID NO: 2結合之抗體重鏈CDR區的一致序列。該等一致序列係衍生自源自經本發明者鑑別與SEQ ID NO: 2特異性結合之抗體之序列資訊。詳言之，所鑑別之重鏈CDR區一致序列(亦即SEQ ID

NO: 6至8及SEQ ID No 153至161)及輕鏈CDR區一致序列(亦即SEQ ID NO: 9至11)係源自如實例2A所述分離之天然產生人類抗體。

SEQ ID NO: 6表示重鏈CDR1一致序列，其中

SEQ ID NO: 6位置1處即Kabat位置H31處之胺基酸可為Ser、Gly或Asn；

SEQ ID NO: 6位置2處之胺基酸即Kabat位置8 H32處之胺基酸為Tyr；

SEQ ID NO: 6位置3處之胺基酸即Kabat位置H33處之胺基酸可為Trp或Asp；

SEQ ID NO: 6位置4處之胺基酸即Kabat位置H34處之胺基酸為Met，且

SEQ ID NO: 6位置5處之胺基酸即Kabat位置H35處之胺基酸可為Ser或His；

SEQ ID NO: 153表示較佳之重鏈CDR1一致序列，其中

SEQ ID NO: 153位置1上即Kabat位置H31處之胺基酸可為Asn或Ser，

SEQ ID NO: 153位置2處之胺基酸即Kabat位置8 H32上之胺基酸為Tyr；

SEQ ID NO: 153位置3處之胺基酸即Kabat位置H33處之胺基酸可為Asp或Trp；

SEQ ID NO: 153位置4處之胺基酸即Kabat位置H34處之胺基酸為Met，且

SEQ ID NO: 153位置5處之胺基酸即Kabat位置H35處之胺

基酸可為 His 或 Ser。

SEQ ID NO: 154 表示更佳之重鏈 CDR1 一致序列，其中
SEQ ID NO: 154 位置 1 處即 Kabat 位置 H31 處之胺基酸為
Asn；

SEQ ID NO: 154 位置 2 處之胺基酸即 Kabat 位置 8 H32 處之
胺基酸為 Tyr，

SEQ ID NO: 154 位置 3 處之胺基酸即 Kabat 位置 H33 處之胺
基酸為 Asp，

SEQ ID NO: 154 位置 4 處之胺基酸即 Kabat 位置 H34 處之胺
基酸為 Met，且

SEQ ID NO: 154 位置 5 處之胺基酸即 Kabat 位置 H35 處之胺
基酸為 His。

SEQ ID NO: 155 表示更佳之重鏈 CDR1 一致序列，其中
SEQ ID NO: 155 位置 1 處即 Kabat 位置 H31 處之胺基酸為
Ser；

SEQ ID NO: 155 位置 2 處之胺基酸即 Kabat 位置 8 H32 處之
胺基酸為 Tyr，

SEQ ID NO: 155 位置 3 處之胺基酸即 Kabat 位置 H33 處之胺
基酸可為 Trp 或 Asp，

SEQ ID NO: 155 位置 4 處之胺基酸即 Kabat 位置 H34 處之胺
基酸為 Met，且

SEQ ID NO: 155 位置 5 處之胺基酸即 Kabat 位置 H35 處之胺
基酸為 Ser。

SEQ ID NO: 7 表示重鏈 CDR2 一致序列，其中

SEQ ID NO: 7位置1處之胺基酸即Kabat位置H50處之胺基酸可為Ser或Arg或Glu；

SEQ ID NO: 7位置2處之胺基酸即Kabat位置H51處之胺基酸可為Val或Ile；

SEQ ID NO: 7位置3處之胺基酸即Kabat位置H52處之胺基酸可為Lys或Gly或Asn；

SEQ ID NO: 7位置4處之胺基酸即Kabat位置H52a處之胺基酸可為Gln或無胺基酸；

SEQ ID NO: 7位置5處之胺基酸即Kabat位置H53處之胺基酸可為Asp或Phe或Thr或Arg；

SEQ ID NO: 7位置6處之胺基酸即Kabat位置H54處之胺基酸可為Gly或Phe或Ala或Ser；

SEQ ID NO: 7位置7處之胺基酸即Kabat位置H55處之胺基酸可為Ser或Gly；

SEQ ID NO: 7位置8處之胺基酸即Kabat位置H56處之胺基酸可為Glu或Gly或Arg或Asp或Ala；

SEQ ID NO: 7位置9處之胺基酸即Kabat位置H57處之胺基酸可為Lys或Pro或Ser或Thr或Arg；

SEQ ID NO: 7位置10處之胺基酸即Kabat位置H58處之胺基酸可為Tyr或Leu或Ala或Asn；

SEQ ID NO: 7位置11處之胺基酸即Kabat位置H59處之胺基酸可為Tyr或Ala；

SEQ ID NO: 7位置12處之胺基酸即Kabat位置H60處之胺基酸可為Val或Thr或Ala或Asn；

SEQ ID NO: 7位置13處之胺基酸即Kabat位置H61處之胺基酸可為Asp或Gly或Pro；

SEQ ID NO: 7位置14處之胺基酸即Kabat位置H62處之胺基酸為Ser；

SEQ ID NO: 7位置15處之胺基酸即Kabat位置H63處之胺基酸可為Val或Leu；

SEQ ID NO: 7位置16處之胺基酸即Kabat位置H64處之胺基酸為Lys，且

SEQ ID NO: 7位置17處之胺基酸即Kabat位置H65處之胺基酸可為Gly或Ser。

SEQ ID NO: 156表示較佳之重鏈CDR2一致序列，其中

SEQ ID NO: 156位置1處之胺基酸即Kabat位置H50處之胺基酸可為Arg或Ser或Glu；

SEQ ID NO: 156位置2處之胺基酸即Kabat位置H51處之胺基酸可為Ile或Val；

SEQ ID NO: 156位置3處之胺基酸即Kabat位置H52處之胺基酸可為Gly或Lys或Asn；

SEQ ID NO: 156位置4處之胺基酸即Kabat位置H52a處之胺基酸可為Gln或無胺基酸；

SEQ ID NO: 156位置5處之胺基酸即Kabat位置H53處之胺基酸可為Thr或Asp或Arg；

SEQ ID NO: 156位置6處之胺基酸即Kabat位置H54處之胺基酸可為Ala或Gly或Ser；

SEQ ID NO: 156位置7處之胺基酸即Kabat位置H55處之胺

基酸可為 Gly 或 Ser ；

SEQ ID NO: 156 位置 8 處之胺基酸即 Kabat 位置 H56 處之胺

基酸可為 Arg 或 Asp 或 Glu 或 Ala ；

SEQ ID NO: 156 位置 9 處之胺基酸即 Kabat 位置 H57 處之胺

基酸可為 Thr 或 Arg 或 Lys ；

SEQ ID NO: 156 位置 10 處之胺基酸即 Kabat 位置 H58 處之胺

基酸可為 Asn 或 Tyr ；

SEQ ID NO: 156 位置 11 處之胺基酸即 Kabat 位置 H59 處之胺

基酸為 Tyr ；

SEQ ID NO: 156 位置 12 處之胺基酸即 Kabat 位置 H60 處之胺

基酸可為 Asn、Ala 或 Val ；

SEQ ID NO: 156 位置 13 處之胺基酸即 Kabat 位置 H61 處之胺

基酸可為 Pro 或 Gly 或 Asp ；

SEQ ID NO: 156 位置 14 處之胺基酸即 Kabat 位置 H62 處之胺

基酸為 Ser ；

SEQ ID NO: 156 位置 15 處之胺基酸即 Kabat 位置 H63 處之胺

基酸可為 Leu 或 Val ；

SEQ ID NO: 156 位置 16 處之胺基酸即 Kabat 位置 H64 處之胺

基酸為 Lys，且

SEQ ID NO: 156 位置 17 處之胺基酸即 Kabat 位置 H65 處之胺

基酸可為 Gly 或 Ser。

SEQ ID NO: 157 表示更佳之重鏈 CDR2 一致序列，其中

SEQ ID NO: 157 位置 1 處之胺基酸即 Kabat 位置 H50 處之胺

基酸可為 Arg 或 Glu ；

SEQ ID NO: 157位置2處之胺基酸即Kabat位置H51處之胺基酸為Ile；

SEQ ID NO: 157位置3處之胺基酸即Kabat位置H52處之胺基酸可為Gly或Asn；

SEQ ID NO: 157位置4處之胺基酸即Kabat位置H53處之胺基酸可為Thr或Arg；

SEQ ID NO: 157位置5處之胺基酸即Kabat位置H54處之胺基酸可為Ala或Ser；

SEQ ID NO: 157位置6處之胺基酸即Kabat位置H55處之胺基酸為Gly；

SEQ ID NO: 157位置7處之胺基酸即Kabat位置H56處之胺基酸可為Arg或Asp或Ala；

SEQ ID NO: 157位置8處之胺基酸即Kabat位置H57處之胺基酸可為Thr或Arg；

SEQ ID NO: 157位置9處之胺基酸即Kabat位置H58處之胺基酸可為Asn或Tyr；

SEQ ID NO: 157位置10處之胺基酸即Kabat位置H59處之胺基酸為Tyr；

SEQ ID NO: 157位置11處之胺基酸即Kabat位置H60處之胺基酸可為Asn或Ala；

SEQ ID NO: 157位置12處之胺基酸即Kabat位置H61處之胺基酸可為Pro或Gly；

SEQ ID NO: 157位置13處之胺基酸即Kabat位置H62處之胺基酸為Ser；

SEQ ID NO: 157位置14處之胺基酸即Kabat位置H63處之胺基酸可為Leu或Val；

SEQ ID NO: 157位置15處之胺基酸即Kabat位置H64處之胺基酸為Lys，且

SEQ ID NO: 157位置16處之胺基酸即Kabat位置H65處之胺基酸可為Gly或Ser。

SEQ ID NO: 158表示更佳之重鏈CDR2一致序列，其中

SEQ ID NO: 158位置1處之胺基酸即Kabat位置H50處之胺基酸為Ser；

SEQ ID NO: 158位置2處之胺基酸即Kabat位置H51處之胺基酸為Val；

SEQ ID NO: 158位置3處之胺基酸即Kabat位置H52處之胺基酸為Lys；

SEQ ID NO: 158位置4處之胺基酸即Kabat位置H52a處之胺基酸為Gln；

SEQ ID NO: 158位置5處之胺基酸即Kabat位置H53處之胺基酸為Asp；

SEQ ID NO: 158位置6處之胺基酸即Kabat位置H54處之胺基酸為Gly；

SEQ ID NO: 158位置7處之胺基酸即Kabat位置H55處之胺基酸為Ser；

SEQ ID NO: 158位置8處之胺基酸即Kabat位置H56處之胺基酸為Glu；

SEQ ID NO: 158位置9處之胺基酸即Kabat位置H57處之胺

基 酸 為 Lys ；

SEQ ID NO: 158 位 置 10 處 之 胺 基 酸 即 Kabat 位 置 H58 處 之 胺
基 酸 為 Tyr ；

SEQ ID NO: 158 位 置 11 處 之 胺 基 酸 即 Kabat 位 置 H59 處 之 胺
基 酸 為 Tyr ；

SEQ ID NO: 158 位 置 12 處 之 胺 基 酸 即 Kabat 位 置 H60 處 之 胺
基 酸 為 Val ；

SEQ ID NO: 158 位 置 13 處 之 胺 基 酸 即 Kabat 位 置 H61 處 之 胺
基 酸 為 Asp ；

SEQ ID NO: 158 位 置 14 處 之 胺 基 酸 即 Kabat 位 置 H62 處 之 胺
基 酸 為 Ser ；

SEQ ID NO: 158 位 置 15 處 之 胺 基 酸 即 Kabat 位 置 H63 處 之 胺
基 酸 為 Val ；

SEQ ID NO: 158 位 置 16 處 之 胺 基 酸 即 Kabat 位 置 H64 處 之 胺
基 酸 為 Lys ， 且

SEQ ID NO: 158 位 置 17 處 之 胺 基 酸 即 Kabat 位 置 H65 處 之 胺
基 酸 為 Gly 。

SEQ ID NO: 8 表 示 重 鏈 CDR3 一 致 序 列 ， 其 中

SEQ ID NO: 8 位 置 1 處 之 胺 基 酸 即 Kabat 位 置 H95 處 之 胺 基
酸 可 為 Asp 或 Gly ；

SEQ ID NO: 8 位 置 2 處 之 胺 基 酸 即 Kabat 位 置 H96 處 之 胺 基
酸 可 為 Ala 或 Gly ；

SEQ ID NO: 8 位 置 3 處 之 胺 基 酸 即 Kabat 位 置 H97 處 之 胺 基
酸 可 為 Ser 或 Gly ；

SEQ ID NO: 8位置4處之胺基酸即Kabat位置H98處之胺基酸可為Ser或Arg；

SEQ ID NO: 8位置5處之胺基酸即Kabat位置H99處之胺基酸為Trp；

SEQ ID NO: 8位置6處之胺基酸即Kabat位置H100處之胺基酸可為Tyr或Ala；

SEQ ID NO: 8位置7處之胺基酸即Kabat位置H100a處之胺基酸可為Arg或Pro或Asp；

SEQ ID NO: 8位置8處之胺基酸即Kabat位置H100b處之胺基酸可為Asp或Leu；

SEQ ID NO: 8位置9處之胺基酸即Kabat位置H100c處之胺基酸可為Trp或Gly或Ala；

SEQ ID NO: 8位置10處之胺基酸即Kabat位置H100d處之胺基酸可為Phe或Ala；

SEQ ID NO: 8位置11處之胺基酸即Kabat位置H100e處之胺基酸可為Phe或無胺基酸；

SEQ ID NO: 8位置12處之胺基酸即Kabat位置H101處之胺基酸為Asp，且

SEQ ID NO: 8位置13處之胺基酸即Kabat位置H102處之胺基酸可為Pro或Ile；

SEQ ID NO: 159表示較佳之重鏈CDR3一致序列，其中

SEQ ID NO: 159位置1處之胺基酸即Kabat位置H95處之胺基酸可為Gly或Asp；

SEQ ID NO: 159位置2處之胺基酸即Kabat位置H96處之胺

基 酸 可 為 Ala 或 Gly ；

SEQ ID NO: 159 位 置 3 處 之 胺 基 酸 即 Kabat 位 置 H97 處 之 胺

基 酸 可 為 Gly 或 Ser ；

SEQ ID NO: 159 位 置 4 處 之 胺 基 酸 即 Kabat 位 置 H98 處 之 胺

基 酸 可 為 Arg 或 Ser ；

SEQ ID NO: 159 位 置 5 處 之 胺 基 酸 即 Kabat 位 置 H99 處 之 胺

基 酸 為 Trp ；

SEQ ID NO: 159 位 置 6 處 之 胺 基 酸 即 Kabat 位 置 H100 處 之 胺

基 酸 可 為 Ala 或 Tyr ；

SEQ ID NO: 159 位 置 7 處 之 胺 基 酸 即 Kabat 位 置 H100a 處 之

胺 基 酸 可 為 Pro 或 Arg 或 Asp ；

SEQ ID NO: 159 位 置 8 處 之 胺 基 酸 即 Kabat 位 置 H100b 處 之

胺 基 酸 可 為 Leu 或 Asp ；

SEQ ID NO: 159 位 置 9 處 之 胺 基 酸 即 Kabat 位 置 H100c 處 之

胺 基 酸 可 為 Gly 或 Trp 或 Ala ；

SEQ ID NO: 159 位 置 10 處 之 胺 基 酸 即 Kabat 位 置 H100d 處 之

胺 基 酸 可 為 Ala 或 Phe ；

SEQ ID NO: 159 位 置 11 處 之 胺 基 酸 即 Kabat 位 置 H100e 處 之

胺 基 酸 可 為 Phe 或 無 胺 基 酸 ；

SEQ ID NO: 159 位 置 12 處 之 胺 基 酸 即 Kabat 位 置 H101 處 之

胺 基 酸 為 Asp ， 且

SEQ ID NO: 159 位 置 13 處 之 胺 基 酸 即 Kabat 位 置 H102 處 之

胺 基 酸 可 為 Ile 或 Pro 。

SEQ ID NO: 160 表 示 更 佳 之 重 鏈 CDR3 一 致 序 列 ， 其 中

SEQ ID NO: 160位置1處之胺基酸即Kabat位置H95處之胺基酸為Gly；

SEQ ID NO: 160位置2處之胺基酸即Kabat位置H96處之胺基酸為Ala；

SEQ ID NO: 160位置3處之胺基酸即Kabat位置H97處之胺基酸為Gly；

SEQ ID NO: 160位置4處之胺基酸即Kabat位置H98處之胺基酸為Arg；

SEQ ID NO: 160位置5處之胺基酸即Kabat位置H99處之胺基酸為Trp；

SEQ ID NO: 160位置6處之胺基酸即Kabat位置H100處之胺基酸為Ala；

SEQ ID NO: 160位置7處之胺基酸即Kabat位置H100a處之胺基酸為Pro；

SEQ ID NO: 160位置8處之胺基酸即Kabat位置H100b處之胺基酸為Leu；

SEQ ID NO: 160位置9處之胺基酸即Kabat位置H100c處之胺基酸為Gly；

SEQ ID NO: 160位置10處之胺基酸即Kabat位置H100d處之胺基酸為Ala；

SEQ ID NO: 160位置11處之胺基酸即Kabat位置H100e處之胺基酸為Phe；

SEQ ID NO: 160位置12處之胺基酸即Kabat位置H101處之胺基酸為Asp，且

SEQ ID NO: 160位置13處之胺基酸即Kabat位置H102處之胺基酸為Ile。

SEQ ID NO: 161表示更佳之重鏈CDR3一致序列，其中

SEQ ID NO: 161位置1處之胺基酸即Kabat位置H95處之胺基酸為Asp；

SEQ ID NO: 161位置2處之胺基酸即Kabat位置H96處之胺基酸可為Gly或Ala；

SEQ ID NO: 161位置3處之胺基酸即Kabat位置H97處之胺基酸可為Ser或Gly；

SEQ ID NO: 161位置4處之胺基酸即Kabat位置H98處之胺基酸可為Ser或Arg；

SEQ ID NO: 161位置5處之胺基酸即Kabat位置H99處之胺基酸為Trp；

SEQ ID NO: 161位置6處之胺基酸即Kabat位置H100處之胺基酸可為Tyr或Ala；

SEQ ID NO: 161位置7處之胺基酸即Kabat位置H100a處之胺基酸可為Arg或Asp；

SEQ ID NO: 161位置8處之胺基酸即Kabat位置H100b處之胺基酸可為Asp或Leu；

SEQ ID NO: 161位置9處之胺基酸即Kabat位置H100c處之胺基酸可為Trp或Ala；

SEQ ID NO: 161位置10處之胺基酸即Kabat位置H100d處之胺基酸為Phe；

SEQ ID NO: 161位置11處之胺基酸即Kabat位置H101處之

胺基酸為 Asp，且

SEQ ID NO: 161位置12處之胺基酸即 Kabat位置 H102處之胺基酸可為 Pro 或 Ile。

在另一實施例中，本發明之多肽包含如以 SEQ ID NO: 6 至 8 表示之所有三個各別一致 CDR 序列作為 CDR。

在另一實施例中，本發明之多肽包含如以 SEQ ID NO: 6 至 8 表示之各別一致 CDR 序列中之至少兩者。

在另一實施例中，本發明之多肽包含具有如以一致序列 SEQ ID NO: 6 至 11 中之任何者表示之各別一致序列中的至少兩者之 CDR 序列。

SEQ ID NO: 9 至 11 表示能夠與 SEQ ID NO: 2 結合之抗體輕鏈 CDR 區之一致序列。該等一致序列係衍生自源自經本發明者鑑別與 SEQ ID NO: 2 特異性結合之抗體之序列資訊。詳言之，所鑑別之輕鏈 CDR 區之一致序列係源自如實例 2A 所述分離之天然產生之人類抗體。

SEQ ID NO: 9 表示 κ 輕鏈免疫球蛋白 CDR1 區之 CDR1 一致序列，其中：

SEQ ID NO: 9 位置 1 處之胺基酸即 Kabat 位置 L24 處之胺基酸可為 Arg；

SEQ ID NO: 9 位置 2 處之胺基酸即 Kabat 位置 L25 處之胺基酸可為 Ala 或 Glu；

SEQ ID NO: 9 位置 3 處之胺基酸即 Kabat 位置 L26 處之胺基酸可為 Ser；

SEQ ID NO: 9 位置 4 處之胺基酸即 Kabat 位置 L27 處之胺基

酸可為 Gln；

SEQ ID NO: 9位置5處之胺基酸即 Kabat位置 L28處之胺基酸可為 Ser或 Gly；

SEQ ID NO: 9位置6處之胺基酸即 Kabat位置 L29處之胺基酸可為 Val或 Ile；

SEQ ID NO: 9位置7處之胺基酸即 Kabat位置 L30處之胺基酸可為 Asn或 Arg或 Ser；

SEQ ID NO: 9位置8處之胺基酸即 Kabat位置 L31處之胺基酸可為 Ser或 Asn；

SEQ ID NO: 9位置9處之胺基酸即 Kabat位置 L32處之胺基酸可為 Tyr；

SEQ ID NO: 9位置10處之胺基酸即 Kabat位置 L33處之胺基酸可為 Leu；且

SEQ ID NO: 9位置11處之胺基酸即 Kabat位置 L34處之胺基酸可為 Ala。

SEQ ID NO: 10表示κ輕鏈免疫球蛋白 CDR2區之 CDR2一致序列，其中：

SEQ ID NO: 10位置1處之胺基酸即 Kabat位置 L50處之胺基酸可為 Ala或 Gly或 Lys或 Trp；

SEQ ID NO: 10位置2處之胺基酸即 Kabat位置 L51處之胺基酸可為 Val或 Ala；

SEQ ID NO: 10位置3處之胺基酸即 Kabat位置 L52處之胺基酸可為 Ser或 Ala；

SEQ ID NO: 10位置4處之胺基酸即 Kabat位置 L53處之胺基

酸可為 Thr或 Ser或 Asn或 Ile；

SEQ ID NO: 10位置5處之胺基酸即 Kabat位置L54處之胺基酸可為 Arg或 Leu；

SEQ ID NO: 10位置6處之胺基酸即 Kabat位置L55處之胺基酸可為 Ala或 Gln或 Phe或 Glu，且

SEQ ID NO: 10位置7處之胺基酸即 Kabat位置L56處之胺基酸可為 Thr或 Ser。

SEQ ID NO: 11表示 κ 輕鏈免疫球蛋白 CDR3區之 CDR3一致序列，其中：

SEQ ID NO: 11位置1處之胺基酸即 Kabat位置L89處之胺基酸可為 Gln；

SEQ ID NO: 11位置2處之胺基酸即 Kabat位置L90處之胺基酸可為 Gln；

SEQ ID NO: 11位置3處之胺基酸即 Kabat位置L91處之胺基酸可為 Ala或 Tyr；

SEQ ID NO: 11位置4處之胺基酸即 Kabat位置L92處之胺基酸可為 Gly或 Asn；

SEQ ID NO: 11位置5處之胺基酸即 Kabat位置L93處之胺基酸可為 Ser；

SEQ ID NO: 11位置6處之胺基酸即 Kabat位置L94處之胺基酸可為 Ser或 Phe；

SEQ ID NO: 11位置7處之胺基酸即 Kabat位置L95處之胺基酸可為 Gln或 Pro；

SEQ ID NO: 11位置8處之胺基酸即 Kabat位置L96處之胺基

酸可為 Gly 或 Leu；且

SEQ ID NO: 11 位置 9 處之胺基酸即 Kabat 位置 L97 處之胺基酸可為 Thr。

在一實施例中，本發明之多肽包含如以 SEQ ID NO: 6 至 11 表示之所有三個各別一致 CDR 序列作為輕鏈 CDR。

在一實施例中，本發明之多肽包含選自如以 SEQ ID NO: 9 至 11 表示之所有三個各別一致 CDR 序列之至少兩個輕鏈 CDR。

甚至更佳為包含至少兩個選自所表示之輕鏈一致 CDR 序列 (SEQ ID NO: 9 至 11) 之 CDR 序列或至少兩個所表示之重鏈一致 CDR 序列 (SEQ ID NO: 6 至 8) 或至少一個來自輕鏈之 CDR (SEQ ID NO: 9 至 11) 及至少一個來自重鏈之 CDR (SEQ ID NO: 6 至 8) 的多肽。

在一實施例中，本發明之多肽包含如以 SEQ ID NO: 9 至 11 表示之所有三個各別一致 CDR 序列作為輕鏈 CDR。

甚至更佳為包含至少兩個選自所表示之輕鏈一致 CDR 序列 (SEQ ID NO: 9 至 11) 之 CDR 序列及 / 或至少兩個所表示之重鏈一致 CDR 序列 (SEQ ID NO: 6 至 8) 的多肽。

在一實施例中，提供分離單株抗 β 澱粉樣蛋白抗體，其包含一個以上胺基酸序列，該等胺基酸序列係選自由下列序列組成之群的至少兩個一致胺基酸序列：SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10 及 SEQ ID NO: 11，其中該等一個以上胺基酸序列各自係來自不同 SEQ ID NO，其中該抗體以比與單體形

式A β 結合之親和力高之親和力與二聚形式之A β 結合。

在另一實施例中，本發明之多肽包含如以SEQ ID NO: 13至20表示之序列中之一者作為重鏈上之CDR1，如以SEQ ID NO: 21至27及149表示之序列中之一者作為重鏈上之CDR2；及/或如以SEQ ID NO: 28至32表示之序列中之一者作為重鏈上之CDR3。

在另一實施例中，本發明之多肽包含至少兩個選自重鏈CDR1、CDR2及CDR3以及輕鏈CDR1、CDR2及CDR3之一致序列之一致CDR序列，其中該等一致序列係藉由根據Kabat編號對準以下抗體可變區之序列而衍生：

- a) 對於重鏈之CDR1而言，SEQ ID NO: 56至71及148
- b) 對於重鏈之CDR2而言，SEQ ID NO: 56至71及148
- c) 對於重鏈之CDR3而言，SEQ ID NO: 56至71及148
- d) 對於輕鏈之CDR1而言，SEQ ID NO: 47至55及145至147
- e) 對於輕鏈之CDR2而言，SEQ ID NO: 47至55及145至147
- f) 對於輕鏈之CDR3而言，SEQ ID NO: 47至55及145至147。

SEQ ID NO 13至20表示CDR1序列，SEQ ID NO 21至27及149表示CDR2序列且SEQ ID NO 28至32表示CDR3序列，本發明者發現該等CDR1、CDR2、CDR3序列存在於與A β (1-40)之C端部分結合，尤其與A β (21-37)結合之抗體重鏈上。

在另一實施例中，本發明之多肽包含如以SEQ ID NO: 33至37表示之序列中之一者作為輕鏈上之CDR1，如以

SEQ ID NO: 38至43及150至152表示之序列中之一者作為輕鏈上之CDR2；及/或如以SEQ ID NO: 44至46表示之序列中之一者作為輕鏈之CDR3。

SEQ ID NO 33至37表示CDR1序列，SEQ ID NO 38至43及150至152表示CDR2序列且SEQ ID NO 44至46表示CDR3序列，本發明者發現該等CDR1、CDR2、CDR3序列存在於與A β (1-40)之C端部分結合，尤其與A β (21-37)結合之抗體輕鏈上。

在一較佳實施例中，本發明之多肽於重鏈上包含選自SEQ ID NO: 13至20之CDR1序列，選自SEQ ID NO: 21至27及148之CDR2序列，及/或選自SEQ ID NO: 28至32之CDR3序列，且於輕鏈上包含選自SEQ ID NO: 33至37之CDR1序列，選自SEQ ID NO: 38至43及150至152之CDR2序列，及/或選自SEQ ID NO: 44至46之CDR3序列。

詳言之，本發明之多肽於輕鏈上可包含：

- a) SEQ ID NO: 34作為CDR1，SEQ ID NO: 38作為CDR2及SEQ ID NO: 44作為CDR3，或
- b) SEQ ID NO: 33作為CDR1，SEQ ID NO: 42作為CDR2及SEQ ID NO: 44作為CDR3，或
- c) SEQ ID NO: 37作為CDR1，SEQ ID NO: 43作為CDR2及SEQ ID NO: 46作為CDR3，或
- d) SEQ ID NO: 34作為CDR1，SEQ ID NO: 40作為CDR2及SEQ ID NO: 44作為CDR3，或
- e) SEQ ID NO: 35作為CDR1，SEQ ID NO: 38作為CDR2及

SEQ ID NO: 44作為CDR3，或

f) SEQ ID NO: 33作為CDR1，SEQ ID NO: 41作為CDR2及

SEQ ID NO: 44作為CDR3，或

g) SEQ ID NO: 33作為CDR1，SEQ ID NO: 41作為CDR2及

SEQ ID NO: 45作為CDR3，或

h) SEQ ID NO: 34作為CDR1，SEQ ID NO: 38作為CDR2及

SEQ ID NO: 44作為CDR3，或

i) SEQ ID NO: 36作為CDR1，SEQ ID NO: 39作為CDR2及

SEQ ID NO: 44作為CDR3。

詳言之，本發明之多肽於重鏈上亦可包含：

a) SEQ ID NO: 13作為CDR1，SEQ ID NO: 21作為CDR2及

SEQ ID NO: 28作為CDR3，或

b) SEQ ID NO: 14作為CDR1，SEQ ID NO: 27作為CDR2及

SEQ ID NO: 30作為CDR3，或

c) SEQ ID NO: 13作為CDR1，SEQ ID NO: 26作為CDR2及

SEQ ID NO: 28作為CDR3，或

d) SEQ ID NO: 14作為CDR1，SEQ ID NO: 21作為CDR2及

SEQ ID NO: 30作為CDR3，或

e) SEQ ID NO: 15作為CDR1，SEQ ID NO: 23作為CDR2及

SEQ ID NO: 29作為CDR3，或

f) SEQ ID NO: 15作為CDR1，SEQ ID NO: 22作為CDR2及

SEQ ID NO: 29作為CDR3，或

g) SEQ ID NO: 20作為CDR1，SEQ ID NO: 27作為CDR2及

SEQ ID NO: 31作為CDR3，或

- h) SEQ ID NO: 18作為CDR1，SEQ ID NO: 25作為CDR2及SEQ ID NO: 31作為CDR3，或
- i) SEQ ID NO: 18作為CDR1，SEQ ID NO: 27作為CDR2及SEQ ID NO: 31作為CDR3，或
- j) SEQ ID NO: 14作為CDR1，SEQ ID NO: 27作為CDR2及SEQ ID NO: 31作為CDR3，或
- k) SEQ ID NO: 14作為CDR1，SEQ ID NO: 21作為CDR2及SEQ ID NO: 31作為CDR3，或
- l) SEQ ID NO: 16作為CDR1，SEQ ID NO: 21作為CDR2及SEQ ID NO: 31作為CDR3，或
- m) SEQ ID NO: 19作為CDR1，SEQ ID NO: 21作為CDR2及SEQ ID NO: 32作為CDR3，或
- n) SEQ ID NO: 16作為CDR1，SEQ ID NO: 21作為CDR2及SEQ ID NO: 28作為CDR3，或
- o) SEQ ID NO: 17作為CDR1，SEQ ID NO: 26作為CDR2及SEQ ID NO: 31作為CDR3，或
- p) SEQ ID NO: 14作為CDR1，SEQ ID NO: 24作為CDR2及SEQ ID NO: 28作為CDR3。

甚至更佳為本發明之包含以下各者之多肽：

- a) 在輕鏈上，SEQ ID NO: 34作為CDR1，SEQ ID NO: 38作為CDR2及SEQ ID NO: 44作為CDR3，及在重鏈上，SEQ ID NO: 13作為CDR1，SEQ ID NO: 21作為CDR2及SEQ ID NO: 28作為CDR3，或
- b) 在輕鏈上，SEQ ID NO: 33作為CDR1，SEQ ID NO: 42

作為 CDR2 及 SEQ ID NO: 44 作為 CDR3，及在重鏈上，SEQ ID NO: 14 作為 CDR1，SEQ ID NO: 27 作為 CDR2 及 SEQ ID NO: 30 作為 CDR3。

甚至更佳為本發明之包含具有 SEQ ID NO: 53 序列之可變輕鏈及具有 SEQ ID NO: 60 序列之可變重鏈的多肽，或包含具有 SEQ ID NO: 33、SEQ ID NO: 41 及 SEQ ID NO: 45 之 CDR 序列之輕鏈及具有 SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 23 及 SEQ ID NO: 29 之 CDR 序列之重鏈的多肽。

如本發明者所確定，SEQ ID NO: 47 至 55 及 145 至 147 表示能夠與 A β (1-40) 之 C 端部分特異性結合，尤其與 A β (21-37) 特異性結合之抗體的輕鏈可變區且 SEQ ID NO: 56 至 71 及 148 表示能夠與 A β (1-40) 之 C 端部分特異性結合，尤其與 A β (21-37) 特異性結合之抗體的重鏈可變區。重鏈及輕鏈可變區負責產生抗原特異性。因此，在另一實施例中，本發明之多肽包含選自 SEQ ID NO: 47 至 55 及 145 至 147 之序列，及/或選自 SEQ ID NO: 56 至 71 及 148 之序列。在特別較佳實施例中，本發明之多肽包含 SEQ ID NO: 47 及 SEQ ID NO: 56 或 SEQ ID NO: 48 及 SEQ ID NO: 57。

SEQ ID NO: 47 至 55 及 145 至 147 之輕鏈各自可與 SEQ ID NO: 56 至 71 及 148 之重鏈中之任一者組合。因此提供包含以下各者之抗 β 澱粉樣蛋白抗體：SEQ ID NO: 47 及 SEQ ID NO: 56；SEQ ID NO: 47 及 SEQ ID NO: 57；SEQ ID NO: 47 及 SEQ ID NO: 58；SEQ ID NO: 47 及 SEQ ID NO: 59；SEQ ID NO: 47 及 SEQ ID NO: 60；SEQ ID NO: 47 及 SEQ

ID NO: 61 ; SEQ ID NO: 47及SEQ ID NO: 62 ; SEQ ID NO: 47及SEQ ID NO: 63 ; SEQ ID NO: 47及SEQ ID NO: 64 ; SEQ ID NO: 47及SEQ ID NO: 65 ; SEQ ID NO: 47及SEQ ID NO: 66 ; SEQ ID NO: 47及SEQ ID NO: 67 ; SEQ ID NO: 47及SEQ ID NO: 68 ; SEQ ID NO: 47及SEQ ID NO: 69 ; SEQ ID NO: 47及SEQ ID NO: 70 ; SEQ ID NO: 47及SEQ ID NO: 71 ; SEQ ID NO: 47及SEQ ID NO: 148 ; SEQ ID NO: 48及SEQ ID NO: 56 ; SEQ ID NO: 48及SEQ ID NO: 57 ; SEQ ID NO: 48及SEQ ID NO: 58 ; SEQ ID NO: 48及SEQ ID NO: 59 ; SEQ ID NO: 48及SEQ ID NO: 60 ; SEQ ID NO: 48及SEQ ID NO: 61 ; SEQ ID NO: 48及SEQ ID NO: 62 ; SEQ ID NO: 48及SEQ ID NO: 63 ; SEQ ID NO: 48及SEQ ID NO: 64 ; SEQ ID NO: 48及SEQ ID NO: 65 ; SEQ ID NO: 48及SEQ ID NO: 66 ; SEQ ID NO: 48及SEQ ID NO: 67 ; SEQ ID NO: 48及SEQ ID NO: 68 ; SEQ ID NO: 48及SEQ ID NO: 69 ; SEQ ID NO: 48及SEQ ID NO: 70 ; SEQ ID NO: 48及SEQ ID NO: 71 ; SEQ ID NO: 48及SEQ ID NO: 148 ; SEQ ID NO: 49及SEQ ID NO: 56 ; SEQ ID NO: 49及SEQ ID NO: 57 ; SEQ ID NO: 49及SEQ ID NO: 58 ; SEQ ID NO: 49及SEQ ID NO: 59 ; SEQ ID NO: 49及SEQ ID NO: 60 ; SEQ ID NO: 49及SEQ ID NO: 61 ; SEQ ID NO: 49及SEQ ID NO: 62 ; SEQ ID NO: 49及SEQ ID NO: 63 ; SEQ ID NO: 49及SEQ ID NO: 64 ; SEQ ID NO: 49及SEQ ID NO: 65 ; SEQ ID NO: 49及SEQ

ID NO: 66 ; SEQ ID NO: 49 及 SEQ ID NO: 67 ; SEQ ID NO: 49及 SEQ ID NO: 68 ; SEQ ID NO: 49及 SEQ ID NO: 69 ; SEQ ID NO: 49及 SEQ ID NO: 70 ; SEQ ID NO: 49及 SEQ ID NO: 71 ; SEQ ID NO: 49及 SEQ ID NO: 148 ; SEQ ID NO: 50及 SEQ ID NO: 56 ; SEQ ID NO: 50及 SEQ ID NO: 57 ; SEQ ID NO: 50及 SEQ ID NO: 58 ; SEQ ID NO: 50及 SEQ ID NO: 59 ; SEQ ID NO: 50及 SEQ ID NO: 60 ; SEQ ID NO: 50及 SEQ ID NO: 61 ; SEQ ID NO: 50及 SEQ ID NO: 62 ; SEQ ID NO: 50及 SEQ ID NO: 63 ; SEQ ID NO: 50及 SEQ ID NO: 64 ; SEQ ID NO: 50及 SEQ ID NO: 65 ; SEQ ID NO: 50及 SEQ ID NO: 66 ; SEQ ID NO: 50及 SEQ ID NO: 67 ; SEQ ID NO: 50 及 SEQ ID NO: 68 ; SEQ ID NO: 50及 SEQ ID NO: 69 ; SEQ ID NO: 50及 SEQ ID NO: 70 ; SEQ ID NO: 50及 SEQ ID NO: 71 ; SEQ ID NO: 50及 SEQ ID NO: 148 ; SEQ ID NO: 51及 SEQ ID NO: 56 ; SEQ ID NO: 51及 SEQ ID NO: 57 ; SEQ ID NO: 51及 SEQ ID NO: 58 ; SEQ ID NO: 51 及 SEQ ID NO: 59 ; SEQ ID NO: 51及 SEQ ID NO: 60 ; SEQ ID NO: 51及 SEQ ID NO: 61 ; SEQ ID NO: 51及 SEQ ID NO: 62 ; SEQ ID NO: 51及 SEQ ID NO: 63 ; SEQ ID NO: 51及 SEQ ID NO: 64 ; SEQ ID NO: 51及 SEQ ID NO: 65 ; SEQ ID NO: 51及 SEQ ID NO: 66 ; SEQ ID NO: 51及 SEQ ID NO: 67 ; SEQ ID NO: 51及 SEQ ID NO: 68 ; SEQ ID NO: 51及 SEQ ID NO: 69 ; SEQ ID NO: 51及 SEQ ID NO: 70 ; SEQ ID NO: 51及

SEQ ID NO: 71 ; SEQ ID NO: 51及SEQ ID NO: 148 ; SEQ ID NO: 52及SEQ ID NO: 56 ; SEQ ID NO: 52及SEQ ID NO: 57 ; SEQ ID NO: 52及SEQ ID NO: 58 ; SEQ ID NO: 52及SEQ ID NO: 59 ; SEQ ID NO: 52及SEQ ID NO: 60 ; SEQ ID NO: 52及SEQ ID NO: 61 ; SEQ ID NO: 52及SEQ ID NO: 62 ; SEQ ID NO: 52及SEQ ID NO: 63 ; SEQ ID NO: 52及SEQ ID NO: 64 ; SEQ ID NO: 52及SEQ ID NO: 65 ; SEQ ID NO: 52及SEQ ID NO: 66 ; SEQ ID NO: 52及SEQ ID NO: 67 ; SEQ ID NO: 52及SEQ ID NO: 68 ; SEQ ID NO: 52及SEQ ID NO: 69 ; SEQ ID NO: 52及SEQ ID NO: 70 ; SEQ ID NO: 52及SEQ ID NO: 71 ; SEQ ID NO: 52及SEQ ID NO: 148 ; SEQ ID NO: 53及SEQ ID NO: 56 ; SEQ ID NO: 53及SEQ ID NO: 57 ; SEQ ID NO: 53及SEQ ID NO: 58 ; SEQ ID NO: 53及SEQ ID NO: 59 ; SEQ ID NO: 53及SEQ ID NO: 60 ; SEQ ID NO: 53及SEQ ID NO: 61 ; SEQ ID NO: 53及SEQ ID NO: 62 ; SEQ ID NO: 53及SEQ ID NO: 63 ; SEQ ID NO: 53及SEQ ID NO: 64 ; SEQ ID NO: 53及SEQ ID NO: 65 ; SEQ ID NO: 53及SEQ ID NO: 66 ; SEQ ID NO: 53及SEQ ID NO: 67 ; SEQ ID NO: 53及SEQ ID NO: 68 ; SEQ ID NO: 53及SEQ ID NO: 69 ; SEQ ID NO: 53及SEQ ID NO: 70 ; SEQ ID NO: 53及SEQ ID NO: 71 ; SEQ ID NO: 53及SEQ ID NO: 148 ; SEQ ID NO: 54及SEQ ID NO: 56 ; SEQ ID NO: 54及SEQ ID NO: 57 ; SEQ ID NO: 54及SEQ ID NO: 58 ; SEQ ID NO: 54及

SEQ ID NO: 59 ; SEQ ID NO: 54及SEQ ID NO: 60 ; SEQ ID NO: 54及SEQ ID NO: 61 ; SEQ ID NO: 54及SEQ ID NO: 62 ; SEQ ID NO: 54及SEQ ID NO: 63 ; SEQ ID NO: 54及SEQ ID NO: 64 ; SEQ ID NO: 54及SEQ ID NO: 65 ; SEQ ID NO: 54及SEQ ID NO: 66 ; SEQ ID NO: 54及SEQ ID NO: 67 ; SEQ ID NO: 54及SEQ ID NO: 68 ; SEQ ID NO: 54及SEQ ID NO: 69 ; SEQ ID NO: 54及SEQ ID NO: 70 ; SEQ ID NO: 54及SEQ ID NO: 71 ; SEQ ID NO: 54及SEQ ID NO: 148 ; SEQ ID NO: 55及SEQ ID NO: 56 ; SEQ ID NO: 55及SEQ ID NO: 57 ; SEQ ID NO: 55及SEQ ID NO: 58 ; SEQ ID NO: 55及SEQ ID NO: 59 ; SEQ ID NO: 55及SEQ ID NO: 60 ; SEQ ID NO: 55及SEQ ID NO: 61 ; SEQ ID NO: 55及SEQ ID NO: 62 ; SEQ ID NO: 55及SEQ ID NO: 63 ; SEQ ID NO: 55及SEQ ID NO: 64 ; SEQ ID NO: 55及SEQ ID NO: 65 ; SEQ ID NO: 55及SEQ ID NO: 66 ; SEQ ID NO: 55及SEQ ID NO: 67 ; SEQ ID NO: 55及SEQ ID NO: 68 ; SEQ ID NO: 55及SEQ ID NO: 69 ; SEQ ID NO: 55及SEQ ID NO: 70 ; SEQ ID NO: 55及SEQ ID NO: 71 ; SEQ ID NO: 55及SEQ ID NO: 148 ; SEQ ID NO: 145及SEQ ID NO: 56 ; SEQ ID NO: 145及SEQ ID NO: 57 ; SEQ ID NO: 145及SEQ ID NO: 58 ; SEQ ID NO: 145及SEQ ID NO: 59 ; SEQ ID NO: 145及SEQ ID NO: 60 ; SEQ ID NO: 145及SEQ ID NO: 61 ; SEQ ID NO: 145及SEQ ID NO: 62 ; SEQ ID NO: 145及SEQ ID NO: 63 ; SEQ ID

NO: 145及SEQ ID NO: 64 ; SEQ ID NO: 145及SEQ ID NO:
65 ; SEQ ID NO: 145及SEQ ID NO: 66 ; SEQ ID NO: 145
及SEQ ID NO: 67 ; SEQ ID NO: 145及SEQ ID NO: 68 ;
SEQ ID NO: 145及SEQ ID NO: 69 ; SEQ ID NO: 145及SEQ
ID NO: 70 ; SEQ ID NO: 145及SEQ ID NO: 71 ; SEQ ID
NO: 145及SEQ ID NO: 148 ; SEQ ID NO: 146及SEQ ID
NO: 56 ; SEQ ID NO: 146及SEQ ID NO: 57 ; SEQ ID NO:
146及SEQ ID NO: 58 ; SEQ ID NO: 146及SEQ ID NO:
59 ; SEQ ID NO: 146及SEQ ID NO: 60 ; SEQ ID NO: 146
及SEQ ID NO: 61 ; SEQ ID NO: 146及SEQ ID NO: 62 ;
SEQ ID NO: 146及SEQ ID NO: 63 ; SEQ ID NO: 146及SEQ
ID NO: 64 ; SEQ ID NO: 146及SEQ ID NO: 65 ; SEQ ID
NO: 146及SEQ ID NO: 66 ; SEQ ID NO: 146及SEQ ID NO:
67 ; SEQ ID NO: 146及SEQ ID NO: 68 ; SEQ ID NO: 146
及SEQ ID NO: 69 ; SEQ ID NO: 146及SEQ ID NO: 70 ;
SEQ ID NO: 146及SEQ ID NO: 71 ; SEQ ID NO: 146及SEQ
ID NO: 148 ; SEQ ID NO: 147及SEQ ID NO: 56 ; SEQ ID
NO: 147及SEQ ID NO: 57 ; SEQ ID NO: 147及SEQ ID NO:
58 ; SEQ ID NO: 147及SEQ ID NO: 59 ; SEQ ID NO: 147
及SEQ ID NO: 60 ; SEQ ID NO: 147及SEQ ID NO: 61 ;
SEQ ID NO: 147及SEQ ID NO: 62 ; SEQ ID NO: 147及SEQ
ID NO: 63 ; SEQ ID NO: 147及SEQ ID NO: 64 ; SEQ ID
NO: 147及SEQ ID NO: 65 ; SEQ ID NO: 147及SEQ ID NO:
66 ; SEQ ID NO: 147及SEQ ID NO: 67 ; SEQ ID NO: 147

及 SEQ ID NO: 68 ; SEQ ID NO: 147及 SEQ ID NO: 69 ;
SEQ ID NO: 147及 SEQ ID NO: 70 ; SEQ ID NO: 147及 SEQ
ID NO: 71 ; 或 SEQ ID NO: 147及 SEQ ID NO: 148 。

在較佳實施例中，抗 β 澱粉樣蛋白抗體包含 SEQ ID NO:
145及 SEQ ID NO: 60 ; SEQ ID NO: 53及 SEQ ID NO: 60 ;
SEQ ID NO: 51及 SEQ ID NO: 60 ; SEQ ID NO: 52及 SEQ
ID NO: 60 ; SEQ ID NO: 146及 SEQ ID NO: 60 ; SEQ ID
NO: 53及 SEQ ID NO: 148 ; SEQ ID NO: 55及 SEQ ID NO:
61 ; SEQ ID NO: 145及 SEQ ID NO: 62 ; SEQ ID NO: 54及
SEQ ID NO: 60 ; SEQ ID NO: 54及 SEQ ID NO: 61 ; SEQ
ID NO: 54及 SEQ ID NO: 148 ; SEQ ID NO: 145及 SEQ ID
NO: 148 ; or SEQ ID NO: 146及 SEQ ID NO: 61 。

此外，SEQ ID NO 72至74表示能夠與 $A\beta(1-40)$ 之C端部
分特異性結合，尤其與 $A\beta(21-37)$ 特異性結合之抗體的輕
鏈恆定區且 SEQ ID NO 75至77表示能夠與 $A\beta(1-40)$ 之C端
部分特異性結合，尤其與 $A\beta(21-37)$ 特異性結合之抗體的
重鏈恆定區。因此，在另一實施例中，本發明之多肽可包
含選自 SEQ ID NO: 72至74之序列，及/或選自 SEQ ID NO:
75至77之序列。詳言之，本發明之多肽可包含選自 SEQ ID
NO: 72或73之序列，及選自 SEQ ID NO 75至77之序列。

能夠與 $A\beta(1-40)$ 之C端部分特異性結合，尤其與 $A\beta(21-37)$ 特異性結合之抗體輕鏈之由可變區及恆定區組成的完
整序列係以 SEQ ID NO: 78至93表示。

因此，在本發明之另一實施例中，本發明之多肽包含選

自 SEQ ID NO: 78至93之序列。

能夠與 A β (1-40)之C端部分特異性結合，尤其與 A β (21-37)特異性結合之抗體重鏈之由可變區及恆定區組成的完整序列係以 SEQ ID NO: 94至137表示。因此，在本發明之另一實施例中，本發明之多肽包含選自 SEQ ID NO: 94至137之序列。

在一甚至更佳之實施例中，本發明之多肽包含以 SEQ ID NO: 78表示之序列及以 SEQ ID NO: 94表示之序列或以 SEQ ID NO: 80表示之序列及以 SEQ ID NO: 97表示之序列。相同情況適用於各別鏈及其組合之類似同功異型物(如可自圖 23a獲得)。

亦可鑑別構架區之一致序列。若將重鏈及輕鏈之可變區胺基酸序列分別根據 Kabat 規則排比，則可以類似於以上關於 CDR 區所述之方式比較位於 CDR1 之 N 端，CDR1 與 CDR2 之間，CDR2 與 CDR3 之間及 CDR3 之 C 端的所謂構架區，且可產生本發明抗體構架之一致序列。

需注意，本發明者發現能夠與 A β (1-40)之C端部分特異性結合，尤其與 A β (21-37)特異性結合之抗體 κ 輕鏈之約 18 個胺基酸殘基的 N 端序列為良好保守的。其適用於源自 IVIgG 製劑之抗體以及適用於源自患者血清之抗體。在圖 31 中，描述該等序列，另外亦將其表示為 SEQ ID NO: 138 至 143。設想此等抗體之 κ 輕鏈 N 端之保守性質可促成抗原特異性及/或當與 A β 肽結合時對斑塊形成之預防。因此，在一較佳實施例中，本發明之多肽包含如以 SEQ ID NO:

44一致序列所表示之序列，尤其如以SEQ ID NO: 138至143表示之序列。

在另一實施例中，本發明多肽與寡聚形式之 β -澱粉樣蛋白多肽特異性結合。作為非限制性實例，多肽可與寡聚形式之 $A\beta(1-40)$ 或寡聚形式之 $A\beta(12-20)$ 或寡聚形式之 $A\beta(21-37)$ 結合。在一態樣中，當在4°C下，在10 mM磷酸鈉，150 mM NaCl(pH值為7.4)中培育隔夜時，本發明多肽能夠與寡聚形式之 $A\beta(1-40)$ 特異性結合。

在另一態樣中，本發明自體抗體以比與對應 $A\beta$ 單體結合之親和力高之親和力與 $A\beta$ 二聚體結合。

一般而言，結合親和力為抗體-抗原組合之量度且係關於當和與任何其他抗原決定基之結合比較時給定抗體與一抗原決定基結合之選擇性。此優先或選擇性結合可定量為結合親和力或力價。計算抗體親和力之方法於此領域中為熟知的。參見例如Practical Immunology，第3章，Frank C. Hay & Olwyn M.R. Westwood, Blackwell Publishing (2002)；Measuring Immunity: Basic Biology及Clinical Assessment，第16章，Michael T. Lotze & Angus W. Thomson (編), Academic Press (2005)，兩者均係以引用的方式併入本文中。

在一較佳實施例中，當本發明之多肽為抗體時，該抗體可為單株抗體。單株抗體具有展現較低交叉反應性之優點。

在另一較佳實施例中，本發明之多肽包含與 $A\beta(21-$

37)(SEQ ID NO: 2)結合之抗體衍生物及/或片段。此項技術中所熟知，可將抗體(例如)以蛋白酶進行酶處理以獲得保持完整抗體之抗原結合特性，但缺少Fc域之抗體片段。該等片段(例如)為Fab或F(ab')₂片段，其可分別經由木瓜蛋白酶或胃蛋白酶來酶消化抗體而獲得。另一抗體片段為抗體之單鏈可變片段(scFv)，亦即抗體之重鏈及輕鏈可變區經由短可撓性連接子(通常為絲胺酸、甘胺酸)之融合。通常，該嵌合分子儘管移除恆定區且引入連接肽，但仍保持原抗體之特異性。單鏈可變片段可藉由使編碼該融合蛋白之各別核酸基因工程化而獲得。該片段之優點為其僅由單多肽鏈組成，該單多肽鏈比包含至少4個需要正確組裝以充分起作用之多肽鏈之全抗體更容易在人造表現系統中表現且適當摺疊。

若本發明之多肽為抗體，則人類抗體由於其於人體內之低免疫原性而為較佳。然而，抗體或其片段可源自適用於產生抗體之任何物種。詳言之，非人類抗體可源自小鼠、雞、兔、大鼠、驢、駱駝、單峰駱駝、鯊魚及羊駝。駱駝、單峰駱駝、鯊魚及羊駝之抗體具有以下優點，即此等動物具有僅由均二聚體組成之抗體。因此，該等多肽具有與以上關於單鏈可變片段所述類似之表現及組裝優點。

在另一較佳實施例中，抗體、其衍生物或片段為人類化抗體、其衍生物或片段，亦即儘管其抗原結合域或部分為非人類來源，但抗體、其衍生物或片段之其餘部分為人類來源。在另一較佳實施例中，抗體、其衍生物或片段為嵌

合抗體，亦即儘管其可變域或部分為非人類來源，但恆定域為人類來源。兩個實施例用於降低由於非人類來源蛋白域免疫原特性之副作用之目的。在一甚至更佳之實施例中，與澱粉樣蛋白- β 肽(1-40)(SEQ ID NO: 1)之抗原決定基A β (21-37)(SEQ ID NO: 2)結合之多肽為僅包含與該抗原決定基結合之抗體互補位之抗體衍生物或片段。該互補位之實例為(例如)包含經由插入序列或經由合成連接子連接之重鏈及輕鏈之各別CDR域的胺基酸序列之多肽。

在一態樣中，本發明抗體涵蓋特異性抗A β (21-37)自體抗體之對偶基因變異體，經保守性修飾之變異體，及次要重組修飾體。抗體之胺基酸序列變異體可藉由將適當核苷酸改變引入編碼DNA或藉由肽合成來製備。該等變異體包括(例如)抗體胺基酸序列內殘基之缺失及/或插入及/或取代。進行缺失、插入及取代之任何組合以達成最終構築體，其限制條件為該最終構築體具有所需特徵。胺基酸改變亦可改變抗體之後轉譯過程，諸如改變糖基化位點之數量或位置。

胺基酸序列插入可包括(例如)長度在一個殘基至含有一百個或一百個以上殘基之多肽範圍內之胺基端及/或羧基端融合，以及單一或多個胺基酸殘基之序列內插入。末端插入之實例包括具有N端甲硫胺醯基殘基之抗體或與抗原決定基標籤或補救受體抗原決定基融合之特異性結合劑或抗體(包括抗體片段)。其他插入變異體包括(例如)在N端或C端與增加抗體血清半衰期之多肽融合。

其他類型之變異體為胺基酸取代變異體。此等變異體在抗體分子中移除至少一個胺基酸殘基且在其位置上插入一不同殘基。基於常見側鏈特性將天然產生之殘基分組：

(1) 疏水性：正白胺酸、met、ala、val、leu、ile；

(2) 中性親水性：cys、ser、thr；

(3) 酸性：asp、glu；

(4) 鹼性：asn、gin、his、lys、arg；

(5) 影響鏈方位之殘基：gly、pro；及

(6) 芳香性：trp、tyr、phe。

保守取代涉及將一胺基酸以其種類中之另一成員置換。非保守取代涉及將此等種類之一之成員以另一種類之成員置換。保守取代之實例包括以 val、leu 或 ile 置換 ala；以 lys、gln 或 asn 置換 arg；以 gln、his、asp、lys 或 gln 置換 asn；以 glu 或 asn 置換 asp；以 ser 或 ala 置換 cys；以 asn 或 glu 置換 gln；以 asp 或 gln 置換 glu；以 ala 置換 gly；以 asn、gln、lys 或 arg 置換 his；以 leu、val、met、ala 或 phe 置換 ile；以正白胺酸、ile、val、met、ala 或 phe 置換 leu；以 arg、gly、asn 置換 lys；以 leu、phe 或 ile 置換 met；以 leu、val、ile、ala 或 tyr 置換 phe；以 ala 置換 pro；以 thr 置換 ser；以 ser 置換 thr；以 tyr 或 phe 置換 trp；以 trp、phe、thr 或 ser 置換 tyr；及以 ile、leu、met、phe、ala 或正白胺酸置換 val。

一般亦可以絲胺酸來取代與維持特異性結合劑或人類化或變異抗體之適當構型無關之任何半胱胺酸殘基來改良分

子之氧化穩定性且預防異常交聯。相反而言，可將半胱胺酸鍵添加至特異性結合劑或抗體中來改良其穩定性(尤其當抗體為諸如Fv片段之抗體片段時)。

亦可(例如)藉由使見於抗體中之一或多個碳水化合物部分缺失，及/或添加一或多個不存在於抗體中之糖基化位點來產生具有相對於母抗體經改質之糖基化模式之變異糖基化變異體。包括抗體之多肽之糖基化通常為N連接糖基化或O連接糖基化。N連接係指將碳水化合物部分連接至天冬醯胺酸殘基之側鏈上。三肽序列天冬醯胺酸-X-絲胺酸及天冬醯胺酸-X-蘇胺酸(其中X為除脯胺酸以外之任何胺基酸)為用於碳水化合物部分與天冬醯胺酸側鏈之酶連接之辨識序列。多肽中此等三肽序列中任一者之存在產生潛在糖基化位點。因此，可藉由改變胺基酸序列使其含有此等三肽序列中之一或多者來將N連接之糖基化位點添加至抗體中。O連接糖基化係指將糖N-乙醯半乳胺糖、半乳糖或木糖中之一者與羥基胺基酸連接，最常見之羥基胺基酸為絲胺酸或蘇胺酸，儘管亦可使用5-羥基脯胺酸或5-羥基離胺酸。可藉由於抗體序列中插入或取代一或多個絲胺酸或蘇胺酸殘基來將O連接糖基化位點添加至特異性結合劑或抗體中。

用以增加血清半衰期之修飾亦可為合乎需要的，例如藉由合併或添加補救受體結合抗原決定基(例如藉由使適當區域突變或藉由將抗原決定基併入肽標籤中，接著(例如)藉由DNA或肽合成將肽標籤與抗體於任一端或中部融合，

參見例如 WO 96/32478)；或添加分子，諸如 PEG 或其他水可溶聚合物，包括多醣聚合物。

抗體之製備

多株抗體

多株抗體較佳藉由多次皮下(sc)或腹膜內(ip)注射相關抗原及佐劑而於動物體內產生。或者，可將抗原直接注射至動物淋巴結中(參見 Kilpatrick 等人，Hybridoma, 16:381-389, 1997)。可藉由使用雙功能劑或衍生劑(例如馬來醯亞胺苯甲醯基磺琥珀醯亞胺酯(經由半胱胺酸殘基接合)、N-羥基琥珀醯亞胺(經由離胺酸殘基)、戊二醛、琥珀酸酐或此項技術中已知之其他試劑)將相關抗原與在待免疫之物種中具免疫原性之蛋白質(例如，匙孔螺血氫蛋白、血清白蛋白、牛甲狀腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制劑)接合而獲得改良之抗體反應。

藉由將(例如)100 µg 蛋白質或接合物(對於小鼠而言)與 3 體積佛氏完全佐劑(Freund's complete adjuvant)組合且將溶液於多個部位皮內注射而使動物對抗原、免疫原性接合物或衍生物免疫。一個月後，藉由於多個部位皮下注射而以佛氏完全佐劑中 1/5 至 1/10 原始量之肽或接合物使動物加強免疫。在加強免疫注射後 7-14 天時，對動物進行採血且檢定血清之抗體力價。對動物加強免疫直至力價平穩。較佳地，以相同抗原但經由不同交聯試劑接合之接合物來對動物加強免疫。接合物亦可於重組細胞培養物中以蛋白融合物形式製成。又，諸如礬之凝集劑適用以增強免疫反應。

單株抗體

單株抗體可使用 Kohler 等人，Nature, 256:495(1975) 首先描述之融合瘤法或藉由重組 DNA 法製成。在融合瘤法中，使小鼠或其他適當宿主動物(諸如大鼠、倉鼠或獼猴) 免疫以引出產生或能夠產生將與用於免疫之蛋白特異性結合之抗體的淋巴細胞。或者，可使淋巴細胞在活體外免疫。接著使用合適融合劑(諸如聚乙二醇)使淋巴細胞與骨髓瘤細胞融合以形成融合瘤細胞 (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 第 59-103 頁 (Academic Press, 1986))。使如此製備之融合瘤細胞接種且生長於較佳含有一或多種抑制未經融合親本骨髓瘤細胞生長或存活之物質之合適培養基中。舉例而言，若親本骨髓瘤細胞缺乏酶次黃嘌呤鳥嘌呤磷酸核糖基轉移酶(HGPRT 或 HPRT)，則融合瘤之培養基通常將包括次黃嘌呤、胺基蝶呤及胸苷(HAT 培養基)，該等物質防止 HGPRT 缺乏細胞之生長。

較佳骨髓瘤細胞為彼等有效融合，支持由所選擇之抗體產生細胞穩定高量產生抗體且對培養基敏感之細胞。亦描述用於產生人類單株抗體之人類骨髓瘤及小鼠-人類雜骨髓瘤細胞株 (Kozbor, J. Immunol., 133: 3001 (1984) ; Brodeur 等人, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 第 51-63 頁 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。例示性小鼠骨髓瘤細胞株包括彼等源自可自 Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. USA 購得之 MOP-21 及 M.C.-11 小鼠腫瘤及可自美國菌種保

存中心(American Type Culture Collection), Rockville, MD USA購得之SP-2或X63-Ag8-653細胞之骨髓瘤細胞株。檢定使融合瘤細胞生長之培養基中針對抗原之單株抗體之產生。較佳地，由融合瘤細胞產生之單株抗體之結合特異性係藉由免疫沈澱或藉由活體外結合檢定(諸如放射性免疫檢定(RIA)或酶聯免疫吸附檢定(ELISA))來測定。單株抗體之結合親和力可(例如)藉由BIAcore或Scatchard分析來測定(Munson等人, Anal. Biochem., 107:220 (1980))。

鑑別產生具有所需特異性、親和力及/或活性之抗體之融合瘤細胞後，可使該等純系藉由限制稀釋程序次選殖且藉由標準方法生長(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 第59-103頁(Academic Press, 1986))。用於此目的之合適培養基包括(例如)D-MEMO或RPMI 1640培養基。此外，融合瘤細胞可在活體內如動物體內之腹水腫瘤生長。藉由習知免疫球蛋白純化程序(諸如蛋白質A瓊脂糖、羥基磷灰石層析法、凝膠電泳法、透析或親和力層析法)將次純系所分泌之單株抗體自培養基、腹水或血清合適地分離。

抗體之重組產生

所關注之免疫球蛋白之胺基酸序列可藉由直接蛋白質定序來測定且合適編碼核苷酸序列可根據通用密碼子表來設計。

或者，可使用習知程序(例如藉由使用能夠與編碼單株抗體之重鏈及輕鏈之基因特異性結合的寡核苷酸探針)將

編碼單株抗體之DNA自融合瘤細胞分離且定序。序列測定一般將需要分離所關注之基因或cDNA之至少一部分。通常，其需要選殖編碼單株抗體之DNA或mRNA。使用標準技術來進行選殖(參見例如 Sambrook 等人(1989)Molecular Cloning: A Laboratory Guide, 第1-3卷, Cold Spring Harbor Press, 其係以引用的方式併入本文中)。舉例而言, 可藉由反轉錄聚A+ mRNA, 較佳膜相關mRNA來建構cDNA庫, 且使用對人類免疫球蛋白多肽基因序列具特異性之探針來篩檢庫。在一較佳實施例中, 使用聚合酶鏈反應(PCR)來擴增編碼所關注之免疫球蛋白基因區段(例如輕鏈可變區段)之cDNA(或全長cDNA之部分)。可易於將經擴增之序列選殖至任何合適之載體(例如表現載體、微基因載體或噬菌體呈現載體)中。應瞭解, 所使用之特定選殖方法並非絕對的, 只要其可能測定所關注之免疫球蛋白多肽之一些部分的序列即可。

用於選殖及定序之一個RNA來源為藉由自轉殖基因小鼠獲得B細胞且將B細胞與永生細胞融合而產生之融合瘤。使用融合瘤之優點為其可易於篩檢, 且選擇產生所關注之人類單株抗體之融合瘤。或者, 可將RNA自經免疫動物之B細胞(或全脾)分離。當使用除融合瘤以外之來源時, 可能需要篩檢編碼具有特異性結合特徵之免疫球蛋白或免疫球蛋白多肽之序列。該篩檢之一種方法為使用噬菌體呈現技術。噬菌體呈現係描述於(例如)Dower等人, WO 91/17271; McCafferty等人, WO 92/01047及Caton及

Koprowski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6450-6454(1990)中，該等文獻各自係以引用的方式併入本文中。在使用噬菌體呈現技術之一實施例中，將來自經免疫之轉殖基因小鼠之cDNA(例如總脾cDNA)分離，使用PCR來擴增編碼免疫球蛋白多肽之一部分(例如CDR區)之cDNA序列，且將經擴增之序列插入噬菌體載體中。藉由標準技術(諸如淘選)來鑑別編碼所關注之肽(例如具有所需結合特徵之可變區肽)之cDNA。

接著測定經擴增或選殖之核酸之序列。通常，測定編碼免疫球蛋白多肽之整個可變區之序列，然而，有時僅可變區之一部分需要定序，例如CDR編碼部分。通常，經定序部分之長度將為至少30個鹼基，且更通常將對編碼至少約三分之一長度或至少約一半長度之可變區的鹼基定序。

可對自cDNA庫分離之純系，或當使用PCR時在次選殖經擴增之序列後，或藉由對經擴增之區段進行直接PCR定序來進行定序。使用標準技術來進行定序(參見例如 Sambrook 等人(1989) Molecular Cloning: A Laboratory Guide, 第1-3卷, Cold Spring Harbor Press及 Sanger, F. 等人(1977)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467, 其係以引用的方式併入本文中)。藉由比較經選殖之核酸序列與公開之人類免疫球蛋白基因及cDNA序列，熟習此項技術者根據經定序之區域可易於確定(i)融合瘤免疫球蛋白多肽(包括重鏈之同型)之生殖系區段使用及(ii)重鏈及輕鏈可變區之序列，包括由N區添加及體細胞突變過程產生之序

列。免疫球蛋白基因序列資訊之一個來源為 National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, MD。

經分離後，可將DNA可操作性連接至表現控制序列或置放於表現載體中，接著將該等表現載體轉染至不另外產生免疫球蛋白之宿主細胞(諸如大腸桿菌(*E. coli*)細胞、猴COS細胞、中國倉鼠卵巢(CHO)細胞或骨髓瘤細胞)中以引導重組宿主細胞中單株抗體之合成。

表現控制序列表示特定宿主有機體中可操作性連接編碼序列之表現所必需之DNA序列。適用於原核生物之控制序列(例如)包括啟動子，視情況之操縱子序列及核糖體結合位點。已知真核細胞利用啟動子、多聚腺苷酸化信號及強化子。

當使核酸與另一核酸序列功能相關時，其經可操作性連接。舉例而言，若前序列或分泌前導子表現為參與多肽分泌之前蛋白，則其DNA與該多肽之DNA可操作性連接；若啟動子或強化子影響編碼序列之轉錄，則其與該序列可操作性連接；或若核糖體結合位點經定位以便於轉譯，則其係與編碼序列可操作性連接。一般而言，可操作性連接意謂經連接之DNA序列為相連的且在分泌前導子之情況下為相連的且在閱讀相中。然而，強化子不一定為相連的。連接可藉由在便利的限制位點接合而完成。若不存在該等位點，則可根據習知實務來使用合成寡核苷酸接附子或連接子。

細胞、細胞株及細胞培養物通常可互換使用，且所有該等名稱包括子代。無論轉移數量如何，轉化株及經轉化之細胞亦包括初級主題細胞及源自其之培養物。亦瞭解，由於故意或無意突變，所有子代之DNA含量可能並非精確相同。包括具有與經初始轉化之細胞中所篩檢之功能或生物活性相同的功能或生物活性之突變子代。

亦提供編碼特異性抗體，視情況與由宿主細胞所辨識之控制序列可操作性連接之經分離核酸，包含該等核酸之載體及宿主細胞，及用於產生抗體之重組技術，其可包含培養宿主細胞使得核酸得以表現，且視情況自宿主細胞培養物或培養基回收抗體。

此項技術中已知各種載體。載體組份可包括下列各物中之一或多者：信號序列(其例如可引導抗體之分泌)、複製起點、一或多個選擇性標誌基因(其例如可賦予抗生素或其他藥物抗性、補足營養缺陷或供應培養基中不可獲得之關鍵養分)、強化子元素、啟動子及轉錄終止序列，其皆為此項技術中所熟知的。

合適宿主細胞包括原核生物、酵母或較高等真核細胞。合適原核生物包括真細菌(Eubacteria)，諸如革蘭氏陰性或革蘭氏陽性有機體，例如腸內菌(Enterohacteriaceae)，諸如埃希氏菌(Escherichia)(例如大腸桿菌)、腸桿菌(Enterobacter)、伊文氏桿菌(Erwinia)、克雷伯氏菌(Klebsiella)、變形桿菌屬(Proteus)、沙門氏菌(Salmonella)(例如鼠傷寒沙門氏桿菌(Salmonella

typhimurium))、沙雷氏菌 (*Serratia*)(例如黏質沙雷菌 (*Serratia marcescans*))及志賀氏菌 (*Shigella*)以及桿菌 (*Bacilli*)(諸如枯草桿菌 (*B. subtilis*)及地衣芽孢桿菌 (*B. licheniformis*))、假單胞菌 (*Pseudomonas*)及鏈黴菌 (*Streptomyces*)。除原核生物以外，真核微生物(諸如纖維狀真菌或酵母)為抗體編碼載體之合適選殖或表現宿主。釀酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)或常見麵包酵母 (*baker's yeast*)在低等真核宿主微生物中為最常用的。然而，通常可使用許多其他種屬、物種及菌株，諸如畢赤酵母 (*Pichia*)，例如甲醇酵母 (*P. pastoris*)、粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)；刻魯維拉菌 (*Kluyveromyces*)、耶氏酵母 (*Yarrowia*)；假絲酵母 (*Candida*)；裏氏木黴 (*Trichoderma reesia*)；粗糙脈孢菌 (*Neurospora crassa*)；許旺酵母 (*Schwanniomyces*)，諸如西方許旺酵母 (*Schwanniomyces occidentalis*)；及絲狀真菌，諸如脈孢菌 (*Neurospora*)、青黴菌 (*Penicillium*)、彎頸黴菌 (*Tolyocladium*)及曲黴菌 (*Aspergillus*)宿主，諸如構巢麴黴 (*A. nidulans*)及黑曲黴菌 (*A. niger*)。

用於表現糖基化抗體之合適宿主細胞係源自多細胞有機體。無脊椎動物細胞之實例包括植物及昆蟲細胞。已鑑別許多來自諸如草地黏蟲 (*Spodoptera frugiperda*)(毛蟲)、埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*)(蚊子)、白紋伊蚊 (*Aedes albopictus*)(蚊子)、黑腹果蠅 (*Drosophila melanogaster*)(果蠅)及家蠶 (*Bombyx mori*)之宿主的桿狀病毒株及變異體及相應容許

昆蟲宿主細胞。用於轉染該等細胞之各種病毒株可公開獲得，例如苜蓿銀紋夜蛾(*Autographa californica*)NPV之L-I變異體及家蠶NPV之Bm-5病毒株。

然而，最感興趣者為脊椎動物細胞且培養物(組織培養物)中脊椎動物細胞之繁殖為常規的。適用之哺乳動物宿主細胞株之實例為中國倉鼠卵巢細胞，包括CHOK1細胞(ATCC CCL61)及中國倉鼠卵巢細胞/-DHFR(DXB-11、DG-44；Urlaub等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980))；由SV40轉化之猴腎CV1株系(COS-7，ATCC CRL 1651)；人類胚胎腎株系(經次選殖以於懸浮培養物中生長之293或293細胞，[Graham等人，J. Gen Virol. 36: 59 (1977)]；幼倉鼠腎細胞(BHK、ATCC CCL 10)；小鼠塞爾托利細胞(Sertoli cell)(TM4，Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251 (1980))；猴腎細胞(CV1 ATCC CCL 70)；非洲綠猴腎細胞(VERO-76，ATCC CRL- 1587)；人類子宮頸癌瘤細胞(HELA，ATCC CCL 2)；犬腎細胞(MDCK，ATCC CCL 34)；布法羅大鼠(buffalo rat)肝細胞(BRL 3A，ATCC CRL 1442)；人類肺細胞(WI38，ATCC CCL 75)；人類肝腫瘤細胞(Hep G2，HB 8065)；小鼠乳腺腫瘤(MMT 060562，ATCC CCL51)；TRI細胞(Mather等人，Annals N.Y Acad. Sci. 383: 44-68 (1982))；MRC 5細胞及FS4細胞。

可在各種培養基中培養宿主細胞。市售之培養基，諸如Ham氏F10(Sigma)、最低必需培養基((MEM), Sigma)、

RPMI-1640(Sigma)及達爾伯克氏改良伊格爾氏培養基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)((DMEM), Sigma)適用於培養宿主細胞。此外，描述於Ham等人，Meth. Enz. 58: 44 (1979)；Barnes等人，Anal. Biochem. 102: 255 (1980)；美國專利第4,767,704號、第4,657,866號、第4,927,762號、第4,560,655號或第5,122,469號、WO90103430、WO 87/00195、或美國專利公開案第30,985號中之任何培養基均可用作宿主細胞之培養基。若需要，可以激素及/或其他生長因子(諸如胰島素、運鐵蛋白或表皮生長因子)、鹽(諸如氯化鈉、鈣鹽、鎂鹽及磷酸鹽)、緩衝劑(諸如HEPES)、核苷酸(諸如腺苷及胸苷)、抗生素(諸如Gentamycin™藥物)、微量元素(定義為通常以微莫耳範圍內之最終濃度存在之無機化合物)及葡萄糖或等效能量來源來補充此等培養基中之任何者。亦可包括熟習此項技術者已知之適當濃度之任何其他必需補充物。培養條件(諸如溫度、pH值及其類似者)為彼等先前用於經選擇用於表現之宿主細胞之條件，且將為熟習此項技術者顯而易見。

培養宿主細胞後，抗體可於周質空間中細胞內產生，或可直接分泌至培養基中。若抗體係如第一步驟細胞內產生，則(例如)藉由離心或超濾來移除微粒碎片(宿主細胞或經溶解之片段)。

可使用(例如)羥基磷灰石層析法，陽離子或陰離子交換層析法或較佳親和力層析法，使用所關注之抗原或蛋白質

A或蛋白質G作為親和力配位體來純化抗體組合物。蛋白質A可用以純化基於人類 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 或 $\gamma 4$ 重鏈之抗體(Lindmark等人, J. Immunol. Meth. 62: 1-13 (1983))。蛋白質G係推薦用於所有小鼠同型及人類 $\gamma 3$ (Guss等人, 20 EMBO J. 5: 1567-1575 (1986))。親和力配位體所連接之基質為最通常之瓊脂糖, 但亦可使用其他基質。機械穩定基質, 諸如受控微孔玻璃或聚(苯乙烯二乙烯基)苯容許比可以瓊脂糖所達成者快之流動速率及比其短之加工時間。當抗體包含CH3域時, Bakerbond ABX™樹脂(J. T. Baker, Phillipsburg, 25 NJ.)適用於純化。視待回收之特異性結合劑或抗體而定, 其他蛋白質純化技術(諸如乙醇沈澱、逆相HPLC、色譜聚焦、SDS-PAGE及硫酸銨沈澱)亦為可行的。

手邊具有本專利申請案資訊之熟習此項技術者將易於知曉如何進行本發明之方法。一個實例為以具有SEQ ID NO: 2序列之多肽塗覆瓊脂糖管柱, 隨後與源自該樣本之免疫球蛋白部分(抗體部分)一起培育, 進行洗滌步驟且隨後對與管柱結合之A β (21-37)特異性抗體進行溶離。對於本發明之分離法而言, 包含A β 多肽之胺基酸序列之多肽(其中A β 多肽之序列至少具有SEQ ID NO: 2之序列且至多具有SEQ ID NO: 4之序列)額外包含諸如標籤或標誌之部分, 尤其生物素、抗生蛋白鏈菌素、GST、HIS、STREP-標籤、Myc、HA、聚-L-離胺酸、聚-L-離胺酸-L-丙胺酸共聚物、聚-Aib(α -胺基異丁酸)、聚- β -丙胺酸、聚-L-丙胺酸、聚-D-離胺酸、聚-D-離胺酸-D-丙胺酸共聚物、聚-D-丙胺

酸或聚-L-胺基酸與聚-D-胺基酸之組合。此等標誌可提供此多肽與載體之便利化結合。溶離(亦即將本發明之多肽與載體分離)可(例如)藉由應用至pH值為2之短期pH值改變,藉由添加過量之包含SEQ ID NO: 2之序列的多肽,或藉由增加溶離緩衝劑之鹽含量來達成。此外,將多肽自受檢者血清分離或自市售IVIgG製劑分離之非限制性實例係於本發明申請案之實例部分更詳細給出。

抗體不僅可源自人類受檢者,亦可源自動物。除以類似於上述方法之方法將預先存在之抗A β (21-37)自體抗體自該動物之血液分離以外,可額外以包含A β 多肽之胺基酸序列之多肽使該等動物免疫,其中該A β 多肽之序列至少具有SEQ ID NO: 2之序列且至多具有SEQ ID NO: 4之序列。若干輪免疫後,可藉由常規方法自動物血液中獲得相應的產生A β 特異性抗體之B細胞。

若需要,則可(例如)藉由將細胞自動物之脾分離且藉由以愛巴病毒(Epstein Barr Virus)轉染使其永生或藉由將細胞與骨髓瘤細胞融合(融合瘤技術)來將該等B細胞純系(人類或動物來源)轉化為細胞株。融合瘤技術特別適用於大量產生抗體。

或者,(若合適)可藉由習知多肽合成,藉由活體外轉譯或藉由合成多肽及蛋白質之任何其他方式直接合成本發明多肽。熟習此項技術者熟悉眾多適當的技術且能夠容易地將其應用於本發明標的物。

此外,與澱粉樣蛋白- β (1-40)(SEQ ID NO: 1)之抗原決定

基 A β (21-37)(SEQ ID NO: 2)結合之多肽可源自除抗體以外之其他蛋白質。舉例而言，抗運載蛋白(anticalin)可經工程化以與某些抗原決定基結合，亦即與以SEQ ID NO: 2表示之抗原決定基結合。抗運載蛋白為一類基於脂質運載蛋白支架之經工程化之配位體結合蛋白。使用環狀區之靶向突變及生物化學選擇技術，可產生低分子量物質及巨分子蛋白靶之具有新穎配位體特異性之變異體(參見DE 199 26 068；Schlehuber等人，J. Mol. Biol. (2000)，297 (5)第1105-1120頁；Expert Opin Biol Ther. 2005，5(11)，第1453-62頁)。該多肽與A β C端部分，尤其與A β (21-37)之結合亦可提供對A β 肽聚合之抑制且因此提供治療及/或預防阿茲海默氏症及其他神經性失智疾病之有效方式。

亦可經由重組表現系統獲得本發明之多肽。為表現本發明之多肽，必需產生各別核酸表現構築體。因此，本發明亦係關於具有編碼本發明之多肽，尤其編碼上述抗體、其衍生物或片段中之一者之輕鏈或重鏈，或編碼本發明之另一蛋白質(諸如與A β (21-37)結合之抗運載蛋白的序列之核酸。該核酸可(例如)藉由(例如)經由質譜法，經由Edman定序或熟習此項技術者已知之任何其他蛋白質定序法來鑑別上述肽中之一者之胺基酸序列而獲得。根據遺傳編碼，核酸序列可源自胺基酸序列。較佳地，使所產生之核酸序列關於所關注各別表現系統之密碼子使用最佳化。或者，可分離表現該抗體之細胞(見上文)且對編碼對A β 之C端具特異性之抗體重鏈及輕鏈的基因座或mRNA進行定序。對於

某些表現系統而言，此核酸序列可能需經調適以提供最佳密碼子使用。手邊具有上述核酸序列之熟習此項技術者將能夠容易地產生用於合適表現系統之表現構築體。因此，本發明亦係關於提供本發明多肽之表現之表現構築體，且係關於表現本發明之多肽或其片段之分離細胞。表現構築體(亦即載體)包括質體、黏質體、病毒(噬菌體、動物病毒及植物病毒)、附加體及人造染色體(例如YAC)。熟習此項技術者能夠藉由標準重組技術建構載體。該細胞可為(例如)骨髓瘤細胞、中國倉鼠卵巢細胞、敘利亞倉鼠卵巢細胞、人類胚胎腎細胞、昆蟲細胞(桿狀病毒系統)或經本發明之表現載體轉化之轉殖基因植物細胞(參見Schillberg等人，Cell Mol Life Sci. 2003 60(3):第433-445頁)或內因性表現本發明之多肽之細胞(融合瘤)。本發明重組多肽之表現不限於真核細胞，且亦可於原核生物體內表現。可藉由此項技術中所熟知之純化方式自任何該細胞獲得本發明之重組多肽。

在一較佳實施例中，本發明之多肽為抗體或其片段且視情況經兩個表現載體(亦即一個輕鏈表現載體及一個重鏈表現載體)編碼。

為於多肽片段A β (21-37)內結合，抗體或其片段首先需要完整抗原結合域(可變域)。該抗體恆定區對於抗原結合而言通常並非絕對的。因此，熟習此項技術者清楚，若本發明之多肽為抗體或其片段，則此抗體/片段可具有選自由IgG、IgM、IgA、IgD及IgE組成之群之任何給定同型，

包括此等同型之所有各別子類。若本發明之多肽在免疫細胞或融合瘤細胞中表現為抗體，則該同型可藉由額外表現或投與活化誘發之胞嘧啶核苷脫胺酶及投與熟習此項技術者已知之刺激因子來轉換。

在一實施例中，將本發明之多肽與預防斑塊凝集及/或致使毒性A β 寡聚物分裂之物質化學偶合或融合。該物質可為(例如)裂解用於實驗表徵本發明之抗原決定基之澱粉樣蛋白 β 多肽的蛋白酶，亦即絲胺酸-蛋白酶，如胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶；或Lys-C蛋白酶、Arg-C蛋白酶、Asp-N-蛋白酶，亦非特異性蛋白酶，諸如蛋白酶-K、嗜熱菌蛋白酶、枯草桿菌蛋白酶。

本發明亦係關於將本發明多肽自樣本分離之方法，該方法包含以下步驟：

- a) 將包含A β 多肽胺基酸序列之多肽與樣本一起培育，其中A β 多肽之序列至少具有SEQ ID NO: 2(亦即A β (21-37))之序列且至多具有SEQ ID NO: 4(亦即A β (12-40))之序列，該多肽係固定於載體上。
- b) 將該樣本與載體分離。
- c) 將與步驟a)之多肽結合之本發明多肽與載體分離。

在一替代方法中，本發明之多肽可藉由將樣本與包含A β 多肽之胺基酸序列之多肽一起培育來獲得，其中在與載體一起培育之前，A β 多肽序列至少具有SEQ ID NO: 2之序列且至多具有SEQ ID NO: 4之序列。因此，本發明亦係關於將本發明多肽自樣本分離之方法，該方法包含以下步驟：

- a) 將包含A β 多肽之胺基酸序列之多肽與樣本一起培育，其中A β 多肽序列至少具有SEQ ID NO: 2之序列且至多具有SEQ ID NO: 4之序列，及隨後
- b) 將該樣本與對步驟a)之多肽具有結合親和力之載體一起培育，及
- c) 將該樣本與載體分離，及，
- d) 將與步驟a)之多肽結合之本發明多肽與載體分離。

此項技術中熟知獲得上述多肽之策略及技術，亦即經由於所關注之細胞株中基因工程化及表現各別多肽。本發明之抗體片段不必在實體上源自完整抗體，且亦可藉由習知方式經基因工程化。

上述多肽可(例如)藉由篩檢源自人類受檢者血液之抗體與SEQ ID NO 1之胺基酸21至37(亦即SEQ ID NO: 2)的結合能力而獲得。

治療方法

在另一態樣中，本發明係關於上述本發明多肽於人類醫學及獸醫學中之用途。

詳言之，本發明之多肽可用於製造用來治療及/或預防下列疾病之進展的藥劑：阿茲海默氏症、唐氏症候群、路易體型癡呆、額顳葉型癡呆、澱粉樣腦血管病變及/或澱粉樣變性病。

此外，本發明係關於包含A β 肽之胺基酸序列之多肽的用途，其中該A β 肽至少具有SEQ ID NO: 2之序列且至多具有SEQ ID NO: 4之序列，該包含A β 肽之胺基酸序列之多肽係

用於人類醫學及獸醫學，特別係用於製造供治療及/或預防下列疾病之藥劑：阿茲海默氏症、唐氏症候群、路易體型癡呆、額顳葉型癡呆、澱粉樣腦血管病變及澱粉樣變性病。

在本發明中，本發明者鑑別由自AD患者以及健康對照個體之血清分離之A β 自體抗體所辨識的兩個A β 抗原決定基序列。發現健康對照個體之A β 自體抗體特異性辨識A β 序列之C端部分，亦即A β (21-37)(SEQ ID NO: 2)。此外，AD患者具有分數增加之辨識A β 多肽之A β (4-10)部分(SEQ ID NO: 3)的抗體，同時具有分數降低之辨識A β 多肽之A β (21-37)部分之抗體。此外，本發明者發現在不罹患AD之健康個體體內，針對A β 之特異性C端抗原決定基(亦即A β (21-37))之A β 自體抗體量與結合A β (4-10)之A β 自體抗體量的比率遠高於AD患者。與此抗原決定基之結合似乎抑制斑塊之形成且因此延遲AD之發作或進展。其提供藉由向人類受檢者或動物投與藥劑之新治療方法之基礎，該等藥劑與該抗原決定基結合且藉此預防A β 肽之凝集。其延遲阿茲海默氏症之發作及/或進展，且因此提供有價值的治療性/預防性藥物。

本發明者咸信其已鑑別一類隨時間由進化選擇之靶向A β 之毒性寡聚物的天然人類抗體作為人體防止神經性失智疾病之天然方式。預期該等抗體不具有病理效應，諸如彼等藉由與血管中A β 或相關肽結合而誘發之效應(Pfeifer等人，Science, 298:1379；Herzig等人，Nat Neuroscence,

7:954-960 (2004))。

因此，本發明亦係關於上述多肽用於製造用以治療及/或預防下列疾病之進展之藥劑的用途：神經性失智疾病、阿茲海默氏症、唐氏症候群、路易體型癡呆、額顳葉型癡呆、澱粉樣腦血管病變及澱粉樣變性病。上述疾病之治療/預防係藉由預防A β 斑塊形成而提供。視各別疾病之階段而定，其產生對疾病之預防(尚未發作)或治療(疾病發作後)，(例如)藉由預防斑塊之進一步形成。在一較佳實施例中，調配用於治療及/或預防患者腦中斑塊之藥劑。

或者，如以上已指出，本發明亦係關於包含A β 多肽之胺基酸序列之多肽(其中A β 多肽至少具有SEQ ID NO: 2之序列且至多具有SEQ ID NO: 4之序列)用於製造供治療下列疾病之藥劑之用途：阿茲海默氏症、唐氏症候群、路易體型癡呆、額顳葉型癡呆、澱粉樣腦血管病變及/或澱粉樣變性病。在該情形中，此抗原決定基用於使人類或動物受檢者主動免疫以增強對抗A β (21-37)之內因性抗體產生。該免疫法亦可利用DNA疫苗，其具有避免投與A β 蛋白片段之優點。因此，本發明亦係關於編碼包含A β 多肽之胺基酸序列之多肽的核酸分子，其中A β 多肽至少具有SEQ ID NO: 2之序列且至多具有SEQ ID NO: 4之序列。因此，本發明亦係關於此核酸序列用於製造供治療及/或預防下列疾病之藥劑的用途：阿茲海默氏症、唐氏症候群、路易體型癡呆、額顳葉型癡呆、澱粉樣腦血管病變或澱粉樣變性病。

醫藥調配物之投與及製備

可將抗A β 抗體調配為包含適用於所需傳遞法之載體之醫藥組合物。合適載體包括任何材料，該材料在與抗體組合時保持A β 之高親和力結合且不與受檢者之免疫系統反應。實例包括(但不限於)許多標準醫藥載體中之任何者，諸如無菌磷酸鹽緩衝生理食鹽水溶液、抑菌水及其類似物。可使用各種水性載體，例如水、緩衝水、0.4%生理食鹽水、0.3%甘胺酸及其類似物，且該等水性載體可包括進行適度化學改質或其類似者用於增強穩定性之其他蛋白質，諸如白蛋白、脂蛋白、球蛋白等。

調配物中例示性抗體濃度可在約0.1 mg/ml至約180 mg/ml或約0.1 mg/ml至約50 mg/ml，或約0.5 mg/ml至約25 mg/ml，或約2 mg/ml至約10 mg/ml之範圍內。可製備(例如)pH值在約4.5至約6.5，或約4.8至約5.5，或約5.0範圍內之pH值緩衝溶液中之抗體的水性調配物。適用於此範圍內之pH值之緩衝劑實例包括(例如)乙酸鹽(例如乙酸钠)、琥珀酸鹽(諸如琥珀酸鈉)、葡糖酸鹽、組胺酸、檸檬酸鹽及其他有機酸緩衝劑。視(例如)緩衝劑及所需調配物等張性而定，緩衝劑濃度可為約1 mM至約200 mM，或約10 mM至約60 mM。

調配物中可包括亦可穩定抗體之張力劑。例示性張力劑包括糖醇，諸如甘露糖醇、蔗糖或海藻糖。較佳地，水性調配物為等張的，儘管高滲或低滲溶液可為合適的。調配物中糖醇之例示性濃度可在約1%至約15% w/v之範圍內。

亦可向抗體調配物中添加界面活性劑以降低所調配抗體之凝集及/或使調配物中微粒之形成最小化及/或降低吸附。例示性界面活性劑包括非離子界面活性劑，諸如聚山梨醇酯(例如聚山梨醇酯 20 或聚山梨醇酯 80)或泊洛沙姆(poloxamer)(例如泊洛沙姆 188)。例示性界面活性劑濃度可在約 0.001% 至約 0.5%，或約 0.005% 至約 0.2%，或約 0.004% 至約 0.01% w/v 之範圍內。

在一實施例中，調配物含有以上所鑑別之試劑(亦即抗體、緩衝劑、多元醇及界面活性劑)且基本上不含一或多種防腐劑，諸如苯醇、苯酚、間甲酚、氯丁醇及苄索氯銨。在另一實施例中，調配物中可包括(例如)約 0.1% 至約 2%，或約 0.5% 至約 1% 範圍內之濃度之防腐劑。調配物中可包括一或多種其他醫藥學上可接受之載體、賦形劑或穩定劑，諸如描述於 Remington's Pharmaceutical Sciences 第 16 版，Osol, A. 編(1980)中之彼等載體、賦形劑或穩定劑，其限制條件為其不會不利地影響所需調配物特徵。可接受之載體、賦形劑或穩定劑在所採用之劑量及濃度下對接受者無毒性且包括：額外緩衝劑；共溶劑；抗氧化劑，包括抗壞血酸及甲硫胺酸；螯合劑，諸如 EDTA；金屬錯合物(例如 Zn-蛋白質錯合物)；生物可降解聚合物，諸如聚酯；及/或成鹽抗衡離子，諸如鈉。

藉由以凍乾調配物或水溶液之形式將具有所需純度之抗體與可選之生理上可接受之載體、賦形劑或穩定劑(Remington's Pharmaceutical Sciences 第 16 版，Osol, A. 編

(1980))混合來製備抗體治療性調配物以供儲存。可接受之載體、賦形劑或穩定劑在所採用之劑量及濃度下對接受者無毒性，且包括緩衝劑，諸如磷酸鹽、檸檬酸鹽及其他有機酸；抗氧化劑，包括抗壞血酸及甲硫胺酸；防腐劑(諸如十八基二甲基苄基氯化銨；氯化六羥季銨；氯化苯甲煙銨、苄索氯銨；苯酚、丁醇或苄醇；對羥基苯甲酸烷酯，諸如對羥基苯甲酸甲酯或對羥基苯甲酸丙酯；兒茶酚；間苯二酚；環己醇；3-戊醇；及間甲酚)；低分子量(小於約10個殘基)之多肽；蛋白質，諸如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水性聚合物，諸如聚乙炔吡咯啉酮；胺基酸，諸如甘胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺酸、組胺酸、精胺酸或離胺酸；單糖、雙糖及其他碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖、麥芽糖或糊精；螯合劑，諸如EDTA；糖，諸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇；成鹽抗衡離子，諸如鈉；金屬錯合物(例如Zn-蛋白質錯合物)；及/或非離子界面活性劑，諸如TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇(PEG)。

在一實施例中，合適調配物含有等張緩衝劑(諸如磷酸鹽、乙酸鹽及TRIS緩衝劑)以及調節張力且穩定化之張力劑(諸如糖醇、山梨糖醇、蔗糖或氯化鈉)。該張力劑之一實例為5%山梨糖醇或蔗糖。此外，調配物視情況可包括界面活性劑以便防止凝集且用於穩定在0.01至0.02% w/v。調配物之pH值可在4.5-6.5或4.5至5.5之範圍內。抗體醫藥調配物之其他例示性描述可見於US 2003/0113316及美國

專利第6,171,586號中，其各自之全文係以引用的方式併入本文中。

本文中之調配物(若需要)亦可含有一種以上之活性化合物用於所治療之特定適應症，較佳為具有彼此無不利影響之互補活性之彼等化合物。舉例而言，可能需要進一步提供免疫抑制劑。該等分子合適地以對於所欲目的有效之量組合存在。

活性成份亦可包封於以下各者中：(例如)藉由凝聚技術，或藉由界面聚合製備之微囊(分別例如羥甲基纖維素或明膠微囊及聚-(甲基丙烯酸甲酯)微囊)；膠狀藥物傳遞系統(例如脂質體、白蛋白微球體、微乳液、奈米粒子及奈米膠囊)；或巨乳液或微細胞。該等技術係揭示於Remington's Pharmaceutical Sciences第16版，Osol, A.編(1980)中。

亦涵蓋懸浮液及晶體形式之抗體。製造懸浮液及晶體形式之方法為熟習此項技術者所已知。

待用於活體內投與之調配物必須為無菌的。可藉由習知，熟知之殺菌技術對本發明組合物殺菌。舉例而言，殺菌易於藉由經由無菌濾膜過濾來完成。所得溶液可經包裝以供使用或在無菌條件下過濾且凍乾，投與前將經凍乾之製劑與無菌溶液組合。通常採用冷凍乾燥法以使多肽穩定以供長期儲存，尤其當多肽在液體組合物中相對不穩定時更為如此。凍乾週期通常包含三個步驟：冷凍、初級乾燥及次級乾燥；Williams及Polli, Journal of Parenteral

Science and Technology，第38卷，第2期，第48-59頁(1984)。在冷凍步驟中，使溶液冷卻直至其經充分冷凍。溶液中之大量水在此階段形成冰。冰在初級乾燥階段中昇華，其係藉由使用真空使腔室壓力降低至冰之蒸氣壓力以下來進行。最終，在降低之腔室壓力及升高之存放溫度下於次級乾燥階段移除所吸附之水或結合水。該方法產生稱為凍乾餅塊之材料。其後，可在使用前將餅塊復水。

凍乾材料之標準復水實務為添加回一體積純水(通常等效於在凍乾期間所移除之體積)，儘管有時將抗菌劑之稀溶液用於產生供非經腸投與之藥物；Chen, Drug Development及Industrial Pharmacy，第18卷，第11及12期，第1311-1354頁(1992)。

在一些情況下已指出賦形劑係用作冷凍乾燥產物之穩定劑；Carpenter等人，Developments in Biological Standardization，第74卷，第225-239頁(1991)。舉例而言，已知賦形劑包括糖醇(包括甘露糖醇、山梨糖醇及甘油)；糖(包括葡萄糖及蔗糖)；及胺基酸(包括丙胺酸、甘胺酸及麩胺酸)。

此外，糖醇及糖通常係用以保護多肽使其免受冷凍及乾燥所誘發之損害且增強以乾燥狀態儲存期間之穩定性。一般而言，糖，尤其雙糖在冷凍乾燥過程中及儲存期間皆為有效的。已報導其他種類之分子(包括單糖及雙糖)及聚合物(諸如PVP)亦為凍乾產物之穩定劑。

對於注射而言，醫藥調配物及/或藥劑可為適用於以上

述適當溶液復水之粉末。其實例包括(但不限於)冷凍乾燥粉末、旋轉乾燥粉末或噴霧乾燥粉末、非晶形粉末、顆粒、沈澱物或微粒。對於注射而言，調配物可視情況含有穩定劑、pH值改質劑、界面活性劑、生物可用性改質劑及其組合。

可製備持續釋放製劑。持續釋放製劑之合適實例包括含有抗體之固體疏水性聚合物之半透基質，該等基質係呈成形物品之形式，例如薄膜或微囊。持續釋放基質之實例包括聚酯、水凝膠(例如聚(2-羥乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇))、聚交酯(美國專利第3,773,919號)、L-麩胺酸與 γ 乙基-L-麩胺酸酯之共聚物、不可降解乙烯-乙酸乙烯酯、可降解乳酸-乙醇酸共聚物，諸如Lupron Depot™(包含乳酸-乙醇酸共聚物及乙酸亮丙瑞林(leuprolide acetate)之可注射微球體)及聚-D-(-)-3-羥基丁酸。儘管諸如乙烯-乙酸乙烯酯及乳酸-乙醇酸之聚合物能夠釋放分子歷時超過100天，但某些水凝膠釋放蛋白質歷時較短之時段。當經囊封之抗體保持於體內歷時較長之時間時，其可由於暴露於3 TC之濕度下而變性或凝集，導致生物活性喪失及免疫原性或其他功能特性有可能改變。視所涉及之機制而定可設計用於穩定化之合理策略。舉例而言，若發現凝集機制為經由硫-二硫互換形成分子間S-S鍵，則穩定化可藉由修飾硫氫基殘基，由酸性溶液凍乾，控制水分含量，使用適當添加劑且研製特定聚合物基質組合物來達成。

如本文所述可將本發明之調配物設計為短效，快速釋

放，長效或持續釋放調配物。因此，亦可調配醫藥調配物以達成受控釋放或緩慢釋放。

可視疾病病況、受檢者年齡、體重、一般健康狀況、性別及飲食、給藥時間間隔、投藥途徑、排泄速率及藥物組合來調節特定劑量。含有有效量之以上劑型中之任何者完全在常規實驗之範圍內，且因此完全在本發明之範疇內。

特異性結合劑或抗體係藉由任何合適之方式投與，包括非經腸、皮下、腹膜內、肺內及鼻內且若為局部治療所需要，則為病灶內投與。非經腸輸液包括靜脈內、動脈內、腹膜內、肌肉內、皮內或皮下投與。此外，特異性結合劑或抗體合適地藉由脈動輸液，特別以衰減劑量之特異性結合劑或抗體脈動輸液而投與。較佳地，部分視投藥為短暫或長期投藥而定，給藥係藉由注射，最佳靜脈內或皮下注射給予。涵蓋其他投藥法，包括局部投與，尤其為經皮、經黏膜、直腸、口服或局部投與(例如經由緊鄰所需部位置放之導管)。最佳地，抗體係經靜脈內於生理溶液中以0.01 mg/kg至100 mg/kg之間範圍內之劑量，以每日至每週至每月之頻率(例如每天、每隔一天、每三天或每週2、3、4、5或6次)，較佳以0.1至45 mg/kg、0.1至15 mg/kg或0.1至10 mg/kg範圍內之劑量，以每週2或3次之頻率，或達至45 mg/kg，每月一次而投與。

對腦投藥

此項技術中已知實現對腦投與化合物之各種方法。舉例而言，化合物可藉由直接腦室內或鞘內注射，較佳經由緩

慢輸液以使對腦實質衝擊最小化而投與。亦可使用腦中緩慢釋放植入物或(若藥物為多肽)所植入之產生藥物之重組細胞來傳遞所需藥物。血腦障壁(BBB)可伴隨藥物投與而被滲透以許可藥物跨過BBB移動。滲透劑包括諸如高滲甘露糖醇之滲透劑，或另一種滲透劑，諸如緩激肽、烷基甘油、超音、電磁輻射或副交感神經支配。

或者，可利用受體介導之轉運來對腦投藥。此項技術中已知直接跨過BBB之肽及蛋白質可用作容許治療劑在傳遞至血流中之後跨過BBB之選擇性治療劑的載體(Pan等人，Brain Research Reviews, 46:32-43, 2004；Misra等人，J. Pharm. Pharmaceut. Sci., 6:252-273, 2003；Begley, Pharmacol Ther. 2004年10月;104(1):29-45；Poduslo，美國申請公開案第2003/0082191號；Poduslo等人，Biochem., 43:6064-6075, 2004)。舉例而言，Poduslo, WO 03/020212描述抗體與澱粉樣蛋白 β 蛋白片段接合，接著由低密度脂蛋白受體相關蛋白-1(BBB處之轉運體)吸收。跨過BBB之肽之其他實例包括與運鐵蛋白受體(BBB處之轉運體)結合之運鐵蛋白；運鐵蛋白受體之單株抗體，諸如OX26；細胞穿透肽，諸如TAT轉導域、穿膜肽(penetratin)或Syn B1；及與低密度脂蛋白受體相關蛋白-2(BBB處之另一種轉運體)結合之RAP(參見Pan等人，J Cell Sci. 2004 Oct 1;117(Pt 21):5071-8)。

受體所介導之對腦之藥物傳遞可採用嵌合肽技術，其中將不可轉運之藥物與BBB轉運載體接合。後者可為經歷活

體內受體介導之穿過BBB之轉胞吞作用的經修飾蛋白或受體特異性單株抗體。以化學連接子、抗生物素蛋白-生物素技術、聚乙二醇連接子或脂質體促進藥物與轉運載體之接合。以嵌合肽技術將多種治療物質傳遞至腦，包括基於肽之藥物、反義治療物質(包括肽核酸(PNA))及併入脂質體內之小分子。或者，可將藥物囊封於脂質體或奈米粒子中，接著將其與BBB轉運載體連接。

與其他藥劑一起投與

抗體可與其他抗澱粉樣蛋白基因治療劑同時投與。同時投與包括於不同時間且以不同途徑投與兩種不同治療劑，只要在藥劑發揮其治療效應期間存在一些時間重疊即可。

此項技術中已知之例示性抗澱粉樣蛋白劑包括其他抗澱粉樣蛋白 β 抗體；此項技術中已知的降低澱粉樣蛋白積聚之病原效應之消炎藥(例如NSAID及Cox-2抑制劑)；降低膽固醇藥； β -分泌酶抑制劑；或降低歸因於投與A β 抗體之炎性反應或允許監測抗A β 抗體之副作用之消炎藥。

本發明之藥劑之投與可經由任何常見途徑達成。儘管靜脈途徑為較佳實施例，但涵蓋其他投藥途徑。其包括口服、經鼻、經頰、經直腸、經陰道或局部投藥途徑。或者，投與可藉由正位、皮內、皮下、肌肉內或腹膜內投與。

在另一較佳實施例中，調配包含本發明之多肽之本發明藥劑以與用於各別疾病之第二藥劑組合投與。該等治療物質之實例為乙醯膽鹼酯酶抑制劑或NMDA(N-甲基-D-天冬

胺酸鹽)受體拮抗劑。可在第二藥劑投與之前、同時或之後投與本發明之藥劑。

在另一態樣中，本發明係關於治療及/或預防下列疾病之方法：阿茲海默氏症、唐氏症候群、路易體型癡呆、額顳葉型癡呆、澱粉樣腦血管病變或澱粉樣變性病，其包含向有此需要之受檢者投與上述本發明多肽中之一或多者。

本發明亦係關於包含A β 多肽之胺基酸序列之多肽用於將本發明多肽自樣本分離的用途，其中A β 多肽序列至少具有SEQ ID NO: 2(亦即A β (21-37))之序列，且至多具有SEQ ID NO: 4(亦即A β (12-40))之序列。

偵測及量測疾病進展

肽

在另一態樣中，提供適用於偵測及/或量測阿茲海默氏症及其他神經性失智疾病進展之A β 肽。

本發明者鑑別由自AD患者以及健康對照個體血清分離之A β 自體抗體所辨識的兩個A β 抗原決定基序列。發現健康對照個體之A β 自體抗體特異性辨識A β 序列之C端部分，亦即A β (21-37)(SEQ ID NO: 2)或包含A β (21-37)之任何其他序列。此外，AD患者具有分數增加之辨識A β 多肽之N端，尤其A β (4-10)抗原決定基(SEQ ID NO: 3)之抗體，同時具有分數降低之辨識A β 多肽之C端，尤其A β (21-37)抗原決定基或包含A β (21-37)之任何其他序列的抗體。其提供藉由測定A β 抗體之新穎早期AD診斷法之基礎，其中對於受檢者疾病進展之預後而言，升高之A β 自體抗體(A β 21-37)含

量為正性指示，亦即"健康"，而升高之"斑塊特異性" $A\beta(4-10)$ 抗體含量為負性指示，亦即"患病"。

因此在一態樣中，本發明係關於包含 $A\beta$ 肽之胺基酸序列之多肽，其中 $A\beta$ 肽至少具有SEQ ID NO: 2之序列且至多具有SEQ ID NO: 4之序列。

具有如上所列出之 $A\beta$ 序列之本發明多肽可為(例如)澱粉樣蛋白 β 自身之 $A\beta(21-37)$ 片段。其他可能之實施例包含(例如) $A\beta(20-37)$ 、 $A\beta(12-37)$ 、 $A\beta(12-40)$ (SEQ ID NO: 4)、 $A\beta(20-40)$ 、 $A\beta(21-40)$ 等。此多肽片段可與其他部分接合。其意謂本發明之多肽除 $A\beta(21-37)$ 部分以外亦可包含其他多肽序列或非多肽結構或部分。與 $A\beta$ 多肽片段連接之部分可促進本發明方法之效能。在其他態樣中， $A\beta$ 多肽可形成寡聚物。該等寡聚物之實例包括(但不限於)寡聚形式之 $A\beta(1-40)$ 或寡聚形式之 $A\beta(12-30)$ 或寡聚形式之 $A\beta(21-37)$ 。

因此，在一較佳實施例中，本發明之多肽額外包含諸如標籤或標誌之其他部分，其尤其有利於多肽與載體之連接。詳言之，該等標籤可提供多肽於以各別拮抗劑塗覆之載體上的固定。該等部分之實例為生物素、抗生蛋白鏈菌素、GST、HIS、STREP-標籤、Myc、HA、聚-L-離胺酸、聚-L-離胺酸-L-丙胺酸共聚物、聚-Aib(α -胺基異丁酸)、聚- β -丙胺酸、聚-L-丙胺酸、聚-D-離胺酸、聚-D-離胺酸-D-丙胺酸共聚物、聚-D-丙胺酸或聚-L-胺基酸與聚-D-胺基酸之組合。如一些本發明方法中所使用，包含SEQ ID NO

3之序列且至多包含SEQ ID NO: 5之序列之多肽亦可包含該等額外部分。

可將上述肽標誌與分別具有(例如)SEQ ID NO 2或3序列之多肽直接融合。若標誌/標籤與(例如)A β (21-37)肽之間需要較高可撓性，則可引入連接子。該等連接子可(例如)為聚甘胺酸或聚丙胺酸連接子。可將生物素(非肽物質)與本發明多肽共價連接。自先前技術已知眾多可能用於固定本發明多肽之標誌與載體之組合。

在一較佳實施例中，具有(例如)SEQ ID NO: 2之序列之上述多肽的區域不為 β 摺疊構型。已展示A β 之 β 摺疊片構型為產生神經毒性之原因。因此，健康個體體內之A β (21-37)抗體特別辨識A β (21-37)區或包含A β (21-37)之任何其他序列(若其為無規線圈或 α 螺旋構型)。因此，在另一較佳實施例中，上述具有SEQ ID NO: 2之序列或包含A β (21-37)之任何其他序列的多肽之區域側接有胺基酸序列，其防止或減少具有SEQ ID NO: 2之序列之多肽區之 β 摺疊形成。較佳地，該等側接胺基酸序列位於緊密接近於A β 序列段(例如具有SEQ ID NO: 2之序列)之N端及/或C端處，及/或該等側接胺基酸序列包含寡聚肽，該等寡聚肽包含(例如)L-丙胺酸、D-丙胺酸、Aib(α -胺基異丁酸)、 β -丙胺酸、D-纈胺酸、L-甘胺酸、D-甘胺酸及/或相關疏水性胺基酸。特別較佳之側接胺基酸序列為寡聚肽，諸如-(L-丙胺酸)_n-、-(D-丙胺酸)_n-、-(Aib)_n-、-(β -丙胺酸)_n-、-(D-纈胺酸)_n-、-(L-甘胺酸)_n-、-(D-甘胺酸)_n-，其中n較佳在約2

至約6之範圍內。該等側接區亦確保本發明多肽之抗原決定基A β (21-37)不以 β 摺疊構型存在，且因此可為樣本中之A β (21-37)自體抗體接近。在一些實施例中， β -澱粉樣蛋白多肽為寡聚形式。

然而，在特定實施例中，本發明之多肽為不具有除A β (20-37)、A β (12-37)、A β (12-40)、A β (20-40)或A β (21-40)序列以外之其他序列之最小多肽。詳言之，寡聚形式之該等多肽為本發明之較佳實施例。

然而，需瞭解亦可使用除上述多肽以外之其他多肽來實踐本發明方法，該等其他多肽與第一單株抗體特異性結合；該第一抗體能夠與以SEQ ID NO 2表示之序列或包含A β (21-37)之任何其他序列特異性結合，但該等多肽不與第二單株抗體特異性結合，該第二單株抗體不能與以SEQ ID NO 3表示之序列特異性結合。

在一較佳實施例中，本發明之多肽係藉由習知多肽合成法直接合成(亦參見實例5)。類似方法適用於產生包含A β 肽之胺基酸序列之多肽，其中該A β 肽至少具有SEQ ID NO: 3之序列且至多具有SEQ ID NO: 5之序列。

或者，亦可藉由活體外轉譯或經由重組表現系統來獲得本發明之多肽。為表現本發明之多肽，必需產生各別核酸表現構築體。熟習此項技術者將清楚地發現若干建構具有編碼本發明多肽之核酸序列之適當表現系統的方式。隨後使該構築體於合適宿主細胞中表現且分離多肽。亦可將上述標誌及/或標籤用於此純化步驟。

本發明者在AD患者血清中發現額外分數的針對A β 肽之N端抗原決定基之抗體，該等抗體不存在或僅以少量存在於健康個體中。因此，偵測到該等抗體指示AD之診斷、階段及/或進展。為區分A β (21-37)(一方面)與A β (4-10)或針對A β 之N端部分之其他抗體，可將包含A β 肽之胺基酸序列之多肽用於該等診斷法及檢定中，其中A β 肽至少具有SEQ ID NO: 3之序列(A β (4-10))且至多具有SEQ ID NO: 5之序列(A β (1-20))。

在一實施例中，本發明係關於包含A β 肽之胺基酸序列之多肽，其中A β 肽至少具有SEQ ID NO: 2之序列且至多具有SEQ ID NO: 4之序列。

因此本發明之多肽至少包含與SEQ ID NO: 1之胺基酸21至胺基酸37範圍內之A β 肽胺基酸序列相同之序列段。在本文中此肽序列分別係以SEQ ID NO: 2或A β (21-37)表示。本發明之多肽亦可展現A β 肽序列中超出A β (21-37)序列之較長序列段。然而，本發明之多肽所包含之A β 肽序列段的長度不應超過A β 肽之胺基酸12至胺基酸40(本文中亦表示為SEQ ID NO: 4或A β (12-40))的範圍。其確保本發明多肽之A β 序列段不包含與見於患有AD患者體內之斑塊特異性A β 抗體結合相關之胺基酸序列。本發明之多肽亦可包含其他胺基酸序列。舉例而言，可將標籤、標誌、結合域、活化域或類似功能部分與A β 序列段融合(例如)以提供本發明之多肽與某些表面之較佳結合。類似地，可修飾本發明之多肽以達成某些目的，諸如與螢光團或發色團、生物素或其

類似物共價偶合。在某些情況下，本發明之多肽之非A β 序列段提供A β (21-37)序列段之結構穩定化，從而防止或減少此區域中之 β 摺疊構型之形成。

在另一實施例中，本發明多肽與寡聚形式之 β -澱粉樣蛋白多肽特異性結合。作為非限制性實例，多肽可與寡聚形式之A β (1-40)或寡聚形式之A β (12-40)或寡聚形式之A β (21-37)結合。在一態樣中，當在4°C下，在10 mM磷酸鈉、150 mM NaCl(pH值為7.4)中在攪拌下培育隔夜時，本發明多肽能夠與寡聚形式之A β (1-40)特異性結合。

在一較佳實施例中，上述多肽額外包含諸如標籤或標誌之一或多個部分，尤其生物素、抗生蛋白鏈菌素、GST、HIS、STREP-標籤、Myc、HA、聚-L-離胺酸、聚-L-離胺酸-L-丙胺酸共聚物、聚-Aib(α -胺基異丁酸)、聚- β -丙胺酸、聚-L-丙胺酸、聚-D-離胺酸、聚-D-離胺酸-D-丙胺酸共聚物、聚-D-丙胺酸或聚-L-胺基酸與聚-D-胺基酸之組合。

在一較佳實施例中，上述具有SEQ ID NO: 2之序列或包含A β (21-37)之任何其他序列之多肽的區域不為 β 摺疊構型。在一甚至更佳之實施例中，此區域為無規線圈或展現 α 螺旋構型。

在另一較佳實施例中，上述具有(例如)SEQ ID NO: 2之序列或包含A β (21-37)之任何其他序列之多肽的區域側接有胺基酸序列，其防止或減少具有(例如)SEQ ID NO: 2之序列或包含A β (21-37)之任何其他序列的A β 多肽區之 β 摺疊

形成，詳言之其中該等側接胺基酸序列位於緊密接近於A β 序列之N端及/或C端處且該等側接胺基酸序列含有包含下列各物之寡聚肽：例如L-丙胺酸、D-丙胺酸、Aib(α -胺基異丁酸)、 β -丙胺酸、D-纈胺酸、L-甘胺酸、D-甘胺酸及/或相關疏水性胺基酸。特別較佳之側接胺基酸序列為寡聚肽，諸如-(L-丙胺酸)_n-、-(D-丙胺酸)_n-、-(Aib)_n-、-(β -丙胺酸)_n-、-(D-纈胺酸)_n-、-(L-甘胺酸)_n-、-(D-甘胺酸)_n-，其中n較佳在約2至約6之範圍內。在一些實施例中， β -澱粉樣蛋白多肽為寡聚形式。

此外，本發明係關於本發明之多肽及/或包含A β 肽之胺基酸序列之多肽用於診斷檢定的用途，其中A β 肽至少具有SEQ ID NO: 3之序列且至多具有SEQ ID NO: 5之序列。用於該等診斷檢定之方法係於以下例示。

方法

在另一態樣中，本發明係關於診斷神經性失智疾病之方法，該方法包含以下步驟：

- a) 將固定於載體上之本發明多肽與源自受檢者之樣本一起培育，隨後
- b) 將該樣本與載體分離，及，
- c) 偵測與步驟a)之經固定多肽結合之多肽。

本發明亦係關於診斷神經性失智疾病之方法，該方法包含以下步驟：

- a) 將本發明多肽與源自受檢者之樣本一起培育，及隨後
- b) 將該樣本與對本發明多肽具有結合親和力之載體一起培

育，

c) 將該樣本與載體分離，及，

d) 偵測與本發明多肽(該多肽係與載體結合)結合之多肽。

在另一態樣中，本發明係關於診斷神經性失智疾病之方法，其利用至少包含與SEQ ID NO: 1之胺基酸4至胺基酸10範圍內之A β 肽胺基酸序列相同之序列段的多肽或蛋白質。在本文中此肽序列分別係以SEQ ID NO: 3或A β (4-10)或N端肽表示。該多肽亦可展現A β 肽序列中超出A β (4-10)序列之較長序列段。然而，該多肽所包含之A β 肽序列段的長度較佳不應超過A β 肽之胺基酸1至胺基酸20(本文中亦表示為SEQ ID NO: 5或A β (1-20))的範圍。其確保本發明多肽之A β 序列段不包含與見於健康個體體內且針對A β (21-37)之A β 自體抗體之結合相關的胺基酸。如已關於本發明多肽所述，N端多肽除A β 序列段以外亦可包含其他胺基酸序列、部分及修飾。

因此，本發明亦係關於診斷神經性失智疾病之方法，該方法包含以下步驟：

- a) 將固定於載體上之多肽與源自受檢者之樣本一起培育，其中該多肽包含A β 肽之胺基酸序列，其中該A β 肽至少具有SEQ ID NO: 3之序列且至多具有SEQ ID NO: 5之序列，隨後
- b) 將該樣本與載體分離，及，
- c) 偵測與步驟a)之經固定多肽結合之多肽。

本發明亦係關於診斷神經性失智疾病之方法，該方法包

含以下步驟：

- a) 將多肽與源自受檢者之樣本一起培育，其中該多肽包含A β 肽之胺基酸序列，其中該A β 肽至少具有SEQ ID NO: 3之序列且至多具有SEQ ID NO: 5之序列，及隨後
- b) 將該樣本與對包含A β 肽之胺基酸序列之多肽具有結合親和力的載體一起培育，其中該A β 肽至少具有SEQ ID NO: 3之序列且至多具有SEQ ID NO: 5之序列，
- c) 將該樣本與載體分離，及，
- d) 偵測與多肽(該多肽包含A β 肽之胺基酸序列，其中該A β 肽至少具有SEQ ID NO: 3之序列且至多具有SEQ ID NO: 5之序列，該多肽係與載體結合)結合之多肽。

本發明亦係關於診斷神經性失智疾病之方法，該方法包含以下步驟：

- a) 將固定於載體上之本發明多肽與源自受檢者之含細胞樣本一起培育，
- b) 將該樣本與載體分離，及，
- c) 偵測與步驟a)之經固定多肽結合之細胞。

本發明亦係關於診斷神經性失智疾病之方法，該方法包含以下步驟：

- a) 將本發明多肽與源自受檢者之含細胞樣本一起培育，及隨後
- b) 將該樣本與對本發明多肽具有結合親和力之載體一起培育，
- c) 將該樣本與載體分離，及，

d) 偵測與本發明多肽結合之細胞，該多肽係與載體結合。

本發明亦係關於診斷神經性失智疾病之方法，該方法包含以下步驟：

a) 將固定於載體上之多肽與源自受檢者之含細胞樣本一起培育，其中該多肽包含A β 肽之胺基酸序列，其中該A β 肽至少具有SEQ ID NO: 3之序列且至多具有SEQ ID NO: 5之序列，

b) 將該樣本與載體分離，及，

c) 偵測與步驟a)之經固定多肽結合之細胞。

本發明亦係關於診斷神經性失智疾病之方法，該方法包含以下步驟：

a) 將多肽與源自受檢者之含細胞樣本一起培育，其中該多肽包含A β 肽之胺基酸序列，其中該A β 肽至少具有SEQ ID NO: 3之序列且至多具有SEQ ID NO: 5之序列，及隨後

b) 將該樣本與對包含A β 肽之胺基酸序列之多肽具有結合親和力的載體一起培育，其中該A β 肽至少具有SEQ ID NO: 3之序列且至多具有SEQ ID NO: 5之序列，

c) 將該樣本與載體分離，及，

d) 偵測與多肽結合之細胞，該多肽包含A β 肽之胺基酸序列，其中該A β 肽至少具有SEQ ID NO: 3之序列且至多具有SEQ ID NO: 5之序列，該多肽係與載體結合。

在本發明之另一實施例中，包含A β 肽之胺基酸序列之多肽(其中該A β 肽具有SEQ ID NO: 3之序列且至多具有SEQ

ID NO: 5之序列)可包含如上所述之諸如標籤或標誌之額外部分，尤其生物素、抗生蛋白鏈菌素、GST、HIS、STREP-標籤、Myc、HA、聚-L-離胺酸、聚-L-離胺酸-L-丙胺酸共聚物、聚-Aib(α -胺基異丁酸)、聚- β -丙胺酸、聚-L-丙胺酸、聚-D-離胺酸、聚-D-離胺酸-D-丙胺酸共聚物、聚-D-丙胺酸或聚-L-胺基酸與聚-D-胺基酸之組合。在一較佳實施例中，除包涵A β 序列之序列段以外，本發明多肽與包含A β 肽之胺基酸序列之多肽相同，其中該A β 肽具有SEQ ID NO: 3之序列且至多具有SEQ ID NO: 5之序列。

在採用本發明多肽之本發明方法之一較佳實施例中，在培育步驟中存在溶劑，其防止或減少具有(例如)SEQ ID NO: 2之序列之多肽區的 β 摺疊形成。較佳溶劑可為用以穩定肽構型且防止或減少 β 摺疊形成之三氟乙醇(TFE)、六氟-異丙醇或類似溶劑。較佳地，溶劑存在於包含(例如)5-10 mM磷酸鹽緩衝劑及150 mM NaCl之水溶液中。在一甚至更佳實施例中，水溶液中TFE、六氟-異丙醇及其類似物之濃度在約1至約5%之範圍內，較佳在約1%至約2%之範圍內。

在一較佳實施例中，本發明方法包含額外步驟，其中在偵測步驟前進行至少一個洗滌步驟。

在關於細胞偵測之本發明方法之一較佳實施例中，該等方法係以親和力層析法，尤其免疫親和力層析法之形式進行。

受檢者樣本中與本發明多肽(例如A β (21-37)或包含

A β (21-37)之任何其他序列)結合之多肽(例如抗體)的量為對受檢者狀態關於AD顯現及/或進展之指示。針對A β (21-37)序列段之多肽之濃度愈高，則保護能力愈高且AD顯現及/或進展之危險愈低。受檢者樣本中針對A β (4-10)抗原決定基之多肽(例如抗體)的量亦為對受檢者狀態關於AD顯現及/或進展之指示。然而在此情況下，情形相反。針對A β (4-10)序列段之多肽濃度愈高，則AD顯現及/或進展之危險愈高。因此出於診斷原因，本發明之偵測法可個別進行，且亦可組合進行以提供更具體診斷。

因此，在本發明之另一實施例中，採用本發明多肽之本發明方法係與採用包含A β 肽之胺基酸序列之多肽(其中該A β 肽至少具有SEQ ID NO: 3之序列且至多具有SEQ ID NO: 5之序列)的本發明方法組合進行。採用本發明多肽之方法可與第二方法同時、在其之前或之後進行。

亦可藉由間接方法來診斷神經性失智疾病。本發明之方法(利用本發明多肽或包含A β 肽之胺基酸序列之多肽，其中該A β 肽至少具有SEQ ID NO: 3之序列且至多具有SEQ ID NO: 5之序列)係與類似方法組合，該類似方法與本發明方法之不同之處僅在於利用包含具有A β (1-40)或A β (1-42)長度之多肽之多肽，亦即全長A β 肽而非本發明方法所利用之較短A β 序列段。在該情形下，彼此獨立地進行兩種方法且比較該等方法之結果。為說明此概念，給出以下實例：

- 1) 利用A β 全長多肽序列之方法於樣本中產生針對全長A β 之所有多肽(或分別產生該等多肽之細胞)的量(結果A)。

2) 另一方面，利用本發明多肽之本發明方法於樣本中產生針對本發明多肽(諸如 A β (21-37)或包含 A β (21-37)之任何其他序列)之所有多肽(或分別產生該等多肽之細胞)的量(結果 B)。

3) 熟習此項技術者現在可易於藉由將結果 A 減去結果 B 而推斷出樣本中針對 A β 之 N 端抗原決定基，尤其針對抗原決定基 A β (4-10)之多肽的量。

類似地，樣本中針對本發明多肽(諸如 A β (21-37)或包含 A β (21-37)之任何其他序列)之多肽(或分別產生該等多肽之細胞)的量可藉由將以全長 A β 獲得之結果減去以包含 A β 肽胺基酸序列之多肽(其中該 A β 肽至少具有 SEQ ID NO: 3 之序列且至多具有 SEQ ID NO: 5 之序列，例如 A β (4-10))獲得之結果而獲得。

因此，本發明亦係關於診斷神經性失智疾病之方法，其中本發明之方法包含以下步驟：

- i) 進行如上所列出之本發明之第一方法，
- ii) 進行本發明之第二方法，其限制條件為待於該第二方法之步驟 a) 中培育之多肽包含 A β 肽之全長胺基酸序列，及
- iii) 比較自步驟 i) 獲得之結果與步驟 ii) 之結果。

熟習此項技術者應瞭解，對於以上方法而言，步驟 i) 係於步驟 ii) 之前、同時或之後進行無關緊要。

在一實施例中，待於本發明方法中偵測之多肽為抗體，尤其為 A β (21-37)自體抗體或 A β (4-10)自體抗體。

在一較佳實施例中，進行本發明方法來診斷阿茲海默氏

症、唐氏症候群、路易體型癡呆、額顳葉型癡呆、澱粉樣腦血管病變及/或澱粉樣變性病。

在另一態樣中，本發明係關於包含本發明多肽之載體。在一較佳實施例中，載體額外包含第二多肽，該第二多肽包含A β 肽之胺基酸序列，其中第二多肽之A β 肽至少具有SEQ ID NO: 3之序列且至多具有SEQ ID NO: 5之序列。

根據本發明且用於本發明方法之載體可為能夠結合多肽之任何合適材料，諸如珠粒，尤其磁性珠粒或瓊脂糖珠粒；膜，尤其聚偏二氟乙烯或硝化纖維膜；玻璃；瓊脂糖基質；金表面；合成表面，尤其微量滴定盤。對於某些實施例而言，載體表面可以(例如)能夠與上述標籤及標誌結合之藥劑塗覆。

偵測

本發明方法中可採用多種檢定來偵測或量測對抗所關注A β 肽之抗體力價。例示性檢定包括(但不限於)ELISA、ELISPOT、西方墨點法(Western-Blot)、點漬墨法(Dot Blot)、蛋白晶片(Protein-Chip)、表面電漿共振檢定、免疫沈澱或免疫共沈澱或親和力層析法，尤其免疫親和力層析法。

在一較佳實施例中，步驟c)或d)中分別包含偵測多肽之本發明方法表示ELISA。在此情況下，載體例如為微量滴定盤。樣本與載體之分離係藉由將樣本液體自微量滴定盤移除及/或藉由於培育後洗滌微量滴定盤而達成。較佳地，此情形下結合之多肽為抗體且此抗體可(例如)經由與

(例如)鹼性磷酸酶(AP)偶合之二級抗體，且添加AP受質致使受質變為(例如)可為光學設備所偵測之有色化合物來偵測。熟習此項技術且熟悉ELISA技術者已知ELISA概念之若干變型，其亦可應用於本發明方法。

或者，在另一較佳實施例中，步驟c)或d)中分別包含偵測多肽之本發明方法表示ELISPOT檢定。在此情況下，載體為例如硝化纖維盤。在此情形下將載體與樣本一起培育之步驟提供足夠時間以供樣本中之細胞產生足夠量之抗體。樣本與載體之分離係藉由將樣本液體自硝化纖維盤移除及/或藉由於培育後洗滌硝化纖維盤而達成。較佳地，經結合之多肽為抗體且此抗體可(例如)經由與(例如)鹼性磷酸酶(AP)偶合之二級抗體，且添加AP受質(諸如BCIP/NBT(溴-氯-吡啶基磷酸鹽/硝基四唑藍))致使受質變為(例如)可在視覺上偵測或可由光學設備偵測之深紫色染色來偵測。熟習此項技術且熟悉ELISPOT技術者已知ELISPOT概念之若干變型，其亦可應用於本發明方法。

在另一實施例中，步驟c)或d)中分別包含偵測多肽之本發明方法表示西方墨點法或點漬墨法檢定。在此情況下，載體為例如硝化纖維膜。對於西方墨點法而言，硝化纖維膜上固定有用於本發明方法步驟a)之多肽或對用於本發明方法步驟a)之多肽具有結合親和力之物質。硝化纖維或類似膜(PVDF等)自身可提供對用於本發明方法步驟a)之多肽的結合親和力。樣本與載體之分離係藉由將樣本液體自硝化纖維膜移除及/或藉由於培育後洗滌硝化纖維膜而達

成。較佳地，經結合之多肽為抗體且此抗體(例如)經由(例如)與辣根過氧化酶偶合之經標記之二級抗體，且隨後進行發光反應及偵測來偵測。熟習此項技術且熟悉西方墨點點/點漬墨法技術者已知西方墨點法/點漬墨法概念之若干變型，其亦可應用於本發明方法。

在另一實施例中，步驟c)或d)中分別包含偵測多肽之本發明方法表示蛋白晶片，亦即蛋白微陣列。在此情況下，載體為(例如)經官能化以結合蛋白質之玻璃表面。樣本與載體之分離係藉由將樣本液體自玻璃載體移除及/或藉由於培育後洗滌玻璃載體而達成。較佳地，經結合之多肽為抗體且此抗體係經由與(例如)可藉由光學設備偵測之螢光染料偶合的經標記二級抗體偵測。熟習此項技術且熟悉蛋白晶片技術者已知蛋白晶片概念之若干變型，其亦可應用於本發明方法。

在另一實施例中，步驟c)或d)中分別包含偵測多肽之本發明方法表示表面電漿共振分析。在此情況下，載體為(例如)金屬表面，諸如金表面。樣本與載體之分離係藉由將樣本液體自金屬載體移除及/或藉由於培育後洗滌金屬載體而達成。較佳地，經結合之多肽為抗體且抗體之結合係經由以光學設備以特定入射角量測反射光強度而偵測。熟習此項技術且熟悉電漿共振分析技術者已知表面電漿共振概念之若干變型，其亦可應用於本發明方法。

在另一實施例中，步驟c)或d)中分別包含偵測多肽之本發明方法表示拉下(pull down)實驗或免疫沈澱實驗。在此

情況下，載體可由瓊脂糖珠粒組成。將此等瓊脂糖珠粒(例如)以麩胱甘肽(用於拉下檢定)或以抗體(免疫沈澱檢定)塗覆。樣本與載體之分離係藉由將樣本液體自瓊脂糖珠粒移除及/或藉由於培育後洗滌瓊脂糖珠粒而達成。較佳地，經結合之多肽為抗體或此抗體係經由隨後對所沈澱蛋白質錯合物進行西方墨點法分析來偵測。熟習此項技術且熟悉拉下/免疫沈澱技術者已知此等概念之若干變型，其亦可應用於本發明方法。一個該變型為應用免疫共沈澱方法，其中載體僅對用於本發明方法步驟a)之多肽具有間接結合親和力。

在另一實施例中，步驟c)或d)中分別包含偵測多肽之本發明方法係以親和力層析法形式進行。在此情況下，載體為基質，例如習知層析管柱中之瓊脂糖，該基質與用於本發明方法步驟a)之多肽或對用於本發明方法步驟a)之多肽具有結合親和力的物質連接。將樣本與載體一起培育包含樣本需要通過管柱之時間框。樣本與載體之分離係藉由將樣本液體自管柱溶離及/或藉由於培育後洗滌管柱而達成。較佳地，經結合之多肽為抗體且此抗體(例如)係藉由(例如)以具有高鹽含量之緩衝劑溶離所結合之抗體且隨後(例如)藉由直接光學測定或藉由隨後之西方墨點法或類似分析來偵測所溶離之多肽而偵測。熟習此項技術且熟悉親和力層析法技術者已知親和力層析法概念之若干變型，其亦可應用於本發明方法。一個該變型為應用免疫親和力層析法，其中載體經針對用於本發明方法步驟a)之多肽之抗

體塗覆。

在一實施例中，步驟c)或d)中分別包含偵測細胞之本發明方法係以親和力層析法形式進行。在此情況下，例如以瓊脂糖塗覆之磁性珠粒表示載體，該載體與用於本發明方法步驟a)之多肽或對用於本發明方法步驟a)之多肽具有結合親和力的物質連接。樣本與載體之分離係藉由將樣本液體自管柱溶離及/或藉由於培育後洗滌管柱而達成。與基質結合之細胞為(例如)B細胞或T細胞，該等細胞可於細胞自基質溶離後(例如)藉由流式細胞儀偵測。熟習此項技術且熟悉親和力層析法及流式細胞儀技術者已知此等概念之若干變型，其亦可應用於本發明方法。

因此，在特別較佳實施例中，本發明方法可以ELISA、ELISPOT、西方墨點法、蛋白晶片、表面電漿共振檢定、免疫沈澱或免疫共沈澱或親和力層析法，尤其免疫親和力層析法進行。該等方法為診斷檢定之所有例示。ELISA或親和力層析法之實例可見於實例部分。在基於表面電漿共振(SPR)之診斷程序中，A β 抗原決定基特異性抗體之偵測及定量及結合動力學分析可藉由下列方法進行：將(i)經生物素標記A β (21-37)-肽或A β (4-10)-肽與以抗生物素蛋白/抗生蛋白鏈菌素塗覆之SPR晶片表面結合或將(ii)A β (21-37)-肽或A β (4-10)-肽以含有N端硫醇基之羧酸間隔子結合至金晶片表面；隨後結合且測定A β 自體抗體。熟習此項技術者易於知曉如何將本發明方法併入上述此等標準技術及程序中之一者中。

需瞭解，儘管本發明方法可以上述偵測技術(ELISA、ELISPOT、西方墨點法、點漬墨法、蛋白晶片、表面電漿共振檢定、免疫沈澱、親和力層析法等)中之一者本身之形式來進行，但亦可能將此等偵測技術組合或僅將其應用於本發明之偵測步驟，亦即分別之步驟c)或d)，而其他步驟可以其他形式進行。亦為熟習此項技術者顯而易見，本發明方法之偵測步驟中所獲得之資訊/信號可提供對此資訊/信號定量之基礎。

在一些情況下，若替代偵測多肽(例如抗體)或除偵測多肽(例如抗體)以外，偵測產生該等多肽之細胞，則可能具有更高診斷價值。舉例而言，若AD患者體內產生A β (21-37)自體抗體之細胞總數低於健康個體，或若各別產生細胞之抗體所分泌之抗體量降低，則其可具有重要性。視結果而定，其可產生不同治療方法。因此，本發明亦係關於偵測與本發明多肽結合或與包含A β 肽胺基酸序列之多肽結合之產生多肽的細胞，其中A β 肽至少具有SEQ ID NO: 3之序列且至多具有SEQ ID NO: 5之序列。

本發明所使用之固定多肽就此而言係指與載體偶合之多肽。偶合可為共價偶合或非共價偶合，其可直接偶合至載體或經由連接子/連接物質偶合至載體。若固定以非共價方式進行，則載體或連接物質展現對本發明多肽之特異性結合親和力，且反之亦然。結合親和力係指物質(尤其多肽)與其他物質締合且形成穩定特異性二聚或多聚錯合物之特性。該等締合通常依靠凡得瓦爾鍵(van der Waals

bond)或氫鍵。

培育步驟用於結合對之兩個搭配物(亦即彼此具有結合親和力)可藉此締合且形成穩定錯合物之目的。培育步驟之溫度可不同，但通常在約0°C至約40°C，較佳約4°C至約37°C，甚至更佳約4°C、約16°C、約21°C或約37°C。溫度愈高，則培育時間可能愈短。舉例而言，若培育溫度為4°C，則其應持續至少12 h或隔夜，而對於在37°C下培育而言，通常1 h足夠。若合適，則可在方法之前以合適阻斷劑阻斷載體，降低非特異性結合事件之可能性。阻斷劑可為(例如)奶粉、BSA、胎牛血清或任何其他阻斷試劑。

可藉由若干方式來進行與本發明之固定多肽或包含A β 肽胺基酸序列之多肽結合的多肽，其中A β 肽至少具有SEQ ID NO: 3之序列且至多具有SEQ ID NO: 5之序列。一種可能方法為(例如)經由質譜方式(例如MALDI-TOF、ESI-MS、MS-FTICR)來鑑別。為達成此目的，首先藉由蛋白質G親和力層析法將免疫球蛋白自(例如)AD患者之血清樣本中分離，且隨後(例如)藉由A β 抗原決定基層析法分別分離A β 自體抗體及A β 斑塊特異性抗體。接著將抗體(例如)固定於如實例中所述之瓊脂糖載體上。接著於全長A β 多肽(例如A β (1-40)或A β (1-42))結合後鑑別特異性A β 抗原決定基(A β (21-37)及A β (4-10))，隨後使用蛋白酶、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、Glu-C蛋白酶、Asp-N蛋白酶中之一或數者來進行蛋白水解抗原決定基切除質譜分析。洗滌親和力結合之A β 抗原決定基直至在上清液中偵測不到信號後，將特異

性 A β 抗原決定基藉由以通常 0.1% 三氟乙酸處理而自管柱溶離且藉由其質子化分子離子之精確測定而鑑別；後種分子離子質量精確性完全足以鑑別，但可藉由碰撞誘發之破碎及片段離子之聯合 MS 分析進一步確定。

對於某些實施例而言，可應用以螢光染料或部分(例如 GFP)標記，或以能夠將無色受質轉化為合適染料或螢光產物之酶活性物質(諸如辣根過氧化酶、鹼性磷酸酶、 β -半乳糖酶或其他相關酶)標記之二級抗體。偵測亦可藉由偵測所佔據之結合位點量，亦即利用在移除樣本後與載體一起培育之經標記 A β (21-37)抗體來完成。在此情形下，經結合之 A β (21-37)量為先前所結合之多肽量之指標。後續結合之 A β (21-37)抗體的量愈低，則樣本中所含有之 A β (21-37)結合多肽愈多。所述偵測實例並不被視為具限制性，因為熟習此項技術者將可輕易知曉複數種可用於本發明之偵測法。

通常，與本發明方法之步驟 c) 或 d) 中分別偵測之固定多肽結合之多肽將為抗體，詳言之分別為 A β (21-37)自體抗體或 A β (4-10)自體抗體。然而，人體內之其他物質亦可與(例如)A β (21-37)或 A β (4-10)多肽結合。

同樣，藉由熟習此項技術者已知之標準技術來完成偵測與本發明多肽結合或與包含 A β 肽胺基酸序列之多肽結合之產生多肽的細胞，其中該 A β 肽至少具有 SEQ ID NO: 3 之序列且至多具有 SEQ ID NO: 5 之序列。一個實例為經由流式細胞儀分析。另一種方法為將細胞溶解、分離 DNA/RNA

且隨後使特定核苷酸序列PCR擴增。除此以外，在先前技術中亦存在複數種已公開之可用以在本發明方法中偵測細胞之其他可能性。

在一較佳實施例中，分別用於本發明方法之樣本或含有樣本之細胞係源自受檢者之血液、血漿、尿或腦脊髓液(CSF)。在一甚至更佳之實施例中，含有樣本之細胞係源自血液且細胞為B細胞系。該樣本，亦即受檢者可為人類、齧齒動物、牛、豬、犬或禽類來源。詳言之，樣本或含有樣本之細胞可源自人類、小鼠、大鼠、兔、牛、豬、犬、雞等。

源自受檢者之樣本係源自受檢者之組織或體液。受檢者可為健康個體，亦即不患有AD者，或患有神經性失智疾病之"患者"。在較佳實施例中，分別用於本發明方法之樣本或含有樣本之細胞係獲自受檢者之血液、血漿、尿或腦脊髓液(CSF)。在一甚至更佳之實施例中，含有樣本之細胞係獲自血液且細胞為B細胞系。該樣本，亦即受檢者可為人類、齧齒動物、牛、豬、犬或禽類來源。詳言之，樣本或含有樣本之細胞可源自人類、小鼠、大鼠、兔、牛、豬、犬、雞等。該等樣本之可能製備程序由先前技術熟知。

在採用本發明多肽之本發明方法之一較佳實施例中，在培育步驟中存在溶劑，其防止或減少具有SEQ ID NO: 2之序列之多肽區的 β 摺疊形成。如上所述，已展示 $A\beta$ 之 β 摺疊片構型為產生神經毒性的原因。因此，健康個體體內之

A β (21-37)抗體特別辨識A β (21-37)區或包含A β (21-37)之任何其他序列(若其為無規線圈或 α 螺旋構型)。類似於側接胺基酸序列，溶劑可影響本發明多肽之構型狀態。詳言之，TFE、六氟-異丙醇等可用於本發明方法，例如用於培育步驟中以防止或減少重要抗原決定基A β (21-37)之 β 摺疊構型，從而保持其易為健康個體中A β (21-37)自體抗體接近。較佳地，TFE係以約1%至約5%，較佳約1%至約2%範圍內之濃度存在。

在一較佳實施例中，本發明方法包含額外步驟，其中在偵測步驟前以洗滌溶液進行至少一個洗滌步驟。洗滌步驟可增加稍後偵測信號之特異性且減少背景信號。較佳地，洗滌溶液為水。更佳地，使用如PBS或TBS之緩衝劑來確保恆定pH值。洗滌溶液可含有少量清潔劑以增加信號特異性。若信號特異性較低，則洗滌溶液中鹽濃度或清潔劑濃度可增加。

在本發明之另一實施例中，採用本發明多肽(亦即A β (21-37)多肽)之本發明方法係與採用包含A β 肽之胺基酸序列之多肽(其中A β 肽至少具有SEQ ID NO: 3之序列且至多具有SEQ ID NO: 5之序列，亦即A β (4-10))的本發明方法組合進行。採用本發明多肽之方法可與第二方法同時、在其之前或之後進行。比較A β (21-37)特異性多肽豐度與A β (4-10)特異性多肽豐度將提供更詳細的AD階段及進展評定。

本發明方法中之偵測步驟提供量化與A β (21-37)或A β (4-

10)結合之多肽量之可能性。所測定之值為AD階段及進展之量度。舉例而言，若人類受檢者血清含有約1至100 ng/ μ l A β (21-37)特異性多肽及/或約0 ng/ μ l(亦即低於偵測限)A β (4-10)特異性多肽，則認為該人類受檢者就AD而言為健康的。關於健康個體可達到年齡為20至35歲之人之血清中各別多肽的平均濃度。對照而言，例如若受檢者血清含有約0.01至5 ng/ μ l A β (4-10)特異性多肽，較佳約0.05至1 ng/ μ l，或甚至更佳約0.01 ng/ μ l，或若血清中斑塊特異性多肽濃度比A β (21-37)特異性多肽濃度之比率升高至0以上，較佳若其高於0.001、0.002、0.003、0.004、0.005、0.010、0.015、0.020、0.030或甚至高於0.050，則該受檢者可患有神經性失智疾病或有產生神經性失智疾病之危險。隨著年齡增長，人體內所產生之免疫球蛋白量自然降低。因此，在特定情況下，可能需要在評估以本發明方法所獲得之結果前考慮受檢者年齡。詳言之，若(例如)年齡約20至約35歲之人之血清含有約30至100 ng/ μ l或更多A β (21-37)特異性多肽，則可認為其為健康的，而血清中"僅"含有2至5 ng/ μ l A β (21-37)特異性多肽之年齡約70至約80歲之受檢者仍可認為其就AD而言同樣為健康的。

在一較佳實施例中，進行本發明方法來診斷神經性失智疾病、阿茲海默氏症、唐氏症候群、路易體型癡呆、額顳葉型癡呆、澱粉樣腦血管病變及/或澱粉樣變性病。所有疾病具有共同點，即A β 自體抗體及A β 斑塊特異性抗體之濃度受如以上關於AD所給出之各別疾病影響。

在另一態樣中，本發明係關於包含本發明多肽之載體。在一較佳實施例中，該載體額外包含第二多肽，該第二多肽包含A β 肽之胺基酸序列，其中第二多肽之A β 肽至少具有SEQ ID NO: 3之序列且至多具有SEQ ID NO: 5之序列。

根據本發明且用於本發明方法之載體可為能夠結合多肽之任何合適材料，諸如珠粒，尤其磁性珠粒或瓊脂糖珠粒；膜，尤其聚偏二氟乙烯或硝化纖維膜；玻璃；瓊脂糖基質；金表面；合成表面，尤其微量滴定盤。對於某些實施例而言，載體表面可以(例如)能夠與上述標籤及標誌結合之藥劑塗覆。熟習此項技術者將易於知曉可應用於本發明方法之各種不同載體及可能之塗料。

套組

在另一態樣中，本發明係關於診斷神經性失智疾病之套組，其中該套組包含本發明多肽。在一實施例中，套組含有包含A β 肽之胺基酸序列的第二多肽，其中第二多肽之A β 肽至少具有SEQ ID NO: 3之序列且至多具有SEQ ID NO: 5之序列。在另一實施例中，套組包含載體，尤其上述載體。在另一實施例中，套組含有至少包含A β (30-37)之序列且至多包含A β (12-40)之序列的第一A β 肽及至少包含A β (4-10)之序列且至多包含A β (1-20)之序列的第二A β 肽。該等套組可用於(例如)醫院及療養院中之常規診斷(例如)以監測AD進展或監測AD療法之有效性。

在另一態樣中，本發明係關於診斷神經性失智疾病之套組，其中該套組包含本發明多肽。

在一較佳實施例中，上述套組含有包含A β 肽之胺基酸序列的第二多肽，其中第二多肽之A β 肽至少具有SEQ ID NO: 3之序列且至多具有SEQ ID NO: 5之序列。在一甚至更佳實施例中，該套組包含載體，尤其上述載體。

該套組可包括一或多個用於A β 肽之容器。在一些實施例中，該套組含有獨立的容器、分隔物或隔室用於A β 肽及資訊材料。舉例而言，各A β 肽可含於瓶、小瓶或注射器中，且資訊材料可含於塑膠套管或包裝中。在其他實施例中，套組之獨立元件係含於單一未經分隔之容器內。舉例而言，各肽係含於附有標籤形式之資訊材料之瓶、小瓶或注射器中。

以下實例解釋本發明，但不認為其具有限制性。除非有不同說明，否則使用如(例如) Sambrock及 Russel, 2001, Molecular cloning: A Laboratory Manual, 第3版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York所述之分子生物標準法。

實例：

實例1A β 抗體自AD患者之分離

藉由抗原決定基特异性親和力層析法將血清A β 抗體自AD患者免疫分離係在瓊脂糖-G5A β (4-10)親和力基質管柱上進行。將瓊脂糖-G5A β (4-10)親和力基質以10 ml PBS(5 mmol L⁻¹ Na₂HPO₄, 150 mmol L⁻¹ NaCl, pH值為7.5)洗滌且使用300 μ l PBS轉移至1.7 ml小瓶中。添加800 μ l(1 μ g/ μ l)兩種不同A β 自體抗體(自阿茲海默氏症患者血清中分

離)且將樣本在4°C下緩慢旋轉隔夜。將懸浮液轉移至0.8 ml微管柱(Mobitec, Gottingen, Germany)提供在無顯著材料損失下廣泛洗滌之可能性。收集最先2 ml作為溢流溶離份。以20 ml PBS洗滌管柱且收集最後1 ml用於一維電泳。將親和力結合之IgG以6×0.5 ml 0.1% TFA溶離;輕微震盪管柱15'且將所釋放之抗體分子收集於微反應杯中。將樣本凍乾且儲存直至1D-SDS-PAGE分析(展示於圖5中)。

亦使用A β (4-10)抗原決定基管柱來測試來自所研究之所有年齡範圍之健康對照者的血清樣本中斑塊-抗體(N端抗原決定基)之存在。在所有經研究之樣本中,非AD對照樣本無可偵測之斑塊特異性抗體。

實例2抗A β (21-37)自體抗體自健康個體之分離

A. 抗A β (21-37)自體抗體之親和力分離及純化

將抗A β (21-37)自體抗體自(i),市售之血清免疫球蛋白及(ii)健康個體(HI)血清分離。如下所述,抗體之分離係藉由採用固定於Ultralink-碘基乙醯基-固相載體上之N-半胱胺醯基-A β (12-40)管柱之程序,藉由A β 抗原決定基特異性親和力層析法來進行。

N-半胱胺醯基-A β (12-40)(H-CVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV-COOH)係於半自動肽合成器EPS-221(INTAVIS, Langenfeld, Germany)上,使用NovaSyn TGR樹脂(0.23 mmol/g偶合能力)上之9-芴基甲氧基羰基/第三丁基(Fmoc/tBu)化學物質,藉由固相肽合成來合成。使用以下側鏈保護之胺基酸衍生物:

Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Asn(Trt)-OH、Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH、Fmoc-Asp(O*t*Bu)-OH、Fmoc-Glu(O*t*Bu)-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-His(Trt)-OH、Fmoc-Cys(Trt)-OH。合成係根據以下方案進行：(i)DMF洗滌；(ii)以DMF中之2% DBU，2%哌啶進行Fmoc去保護(5+10 min)；(iii)DMF洗滌；(iv)偶合5當量之Fmoc胺基酸：PyBOP：DMF中NMM(40 min)；(v)偶合5莫耳當量之Fmoc胺基酸：PyBOP：DMF中NMM(40 min)；(vi)DMF洗滌(3×1 min)。由於A β 之C端序列之疏水性特徵，故在整個合成中採用各胺基酸之雙偶合。合成週期完成後，使用含有95% TFA、2.5%三異丙基矽烷及2.5%去離子水之混合物使肽自樹脂裂解歷時3 h。在冷凍乾燥前，將粗產物以冷第三丁基甲基醚沈澱，以乙醚洗滌三次且溶解於10%乙酸(水溶液)中。肽之純化係藉由半製備性HPLC進行；隨後藉由HPLC及MALDI-TOF質譜分析表徵確保肽之分子均質性。

i)CysA β (12-40)於Ultralink碘基乙醯基凝膠上之固定

由於A β (12-40)序列含有兩個內部離胺酸殘基，該等離胺酸殘基可能於使用胺基之固定程序中引起副反應，故使用與A β -N端連接之半胱胺酸殘基來製備特異性親和力管柱以藉由經由半胱胺醯基-S-硫醚鍵固定來確保肽分子於管柱支撐物上均勻定向。吡內酯活化之支撐物於十六基-間隔子末端含有碘基乙醯基(UltraLink; Perbio, Bonn, Germany)，該碘基乙醯基與半胱胺醯基-硫氫基反應以產生穩定硫醚鍵從而降低位阻且提供最大抗體結合能力。對

於 Cys-A β (12-40) 之共價連接而言，將 3.7 mg 肽溶解於 50 mM Tris、5 mM EDTA-Na 偶合緩衝劑 (pH 值為 8.5) 中至 0.37 mg/ml 之最終濃度。將溶液添加至 1 ml 經排乾之 Ultralink-碘基乙醯基凝膠中且在 25°C 下在輕微混合下進行偶合反應歷時 1 小時，隨後在不混合下反應 30 min 之時間。將 0.5 ml Cys-A β (12-40) 偶合之支撐物之等分試樣填充在管柱 (2.5 ml, MoBiTec, Göttingen, Germany) 中，使溶液排乾。將管柱以 3 ml 偶合緩衝劑洗滌，且藉由於偶合緩衝劑中與 1 ml 50 mM L-半胱胺酸·HCl 反應阻斷凝膠上之非特異性結合位點歷時 2×45 min。隨後，將管柱以 5 ml 1 M NaCl 及 5 ml 0.1 M 磷酸鈉、0.15 M NaCl (pH 值為 7.2) 洗滌，且儲存在 4°C 下。將凝膠支撐物 (0.5 ml) 使用 5 ml PBS 轉移至 15 ml Falcon 小瓶中且與 5 ml IVIgG 混合。在 4°C 下輕微震盪隔夜後，使用排出液將懸浮液轉移至管柱中以將基質完全沖洗回管柱中。將管柱以 10 ml PBS 洗滌 8 次，隨後以 10 ml 超純水進行 2 個洗滌週期。將親和力結合抗體以 10×0.5 ml 0.1% 三氟乙酸 (TFA) 自管柱溶離。隨後用於結構表徵及親和力研究之 IgG 分離及製備係使用兩種不同方案進行：

(a) 第一程序涉及使用 0.5 M NaH₂PO₄ (pH 值為 8) 將所收集之各溶離份調節至中性 pH 值以維持用於親和力研究之抗體完整性。將經結合抗體以 10×0.5 ml 0.1 M 甘胺酸緩衝劑 (pH 值為 2.8) 自管柱溶離。將各溶離份收集於含有 35 μ l pH 值為 9 之 1 M Tris-HCl 之微反應管中。為維持抗體之完整性，在溶離後即刻藉由添加適量之 Tris-HCl 或甘胺酸緩衝

劑來調節中性pH值。為使管柱再生以供進一步使用，將管柱以10 ml pH值為6.8之10 mM磷酸鈉緩衝劑洗滌一次，隨後以10 ml含有1 M氯化鈉之PBS進行兩個洗滌週期，且最終以10 ml PBS進行兩個洗滌週期。藉由BCA法(Pierce; Perbio, Bonn, Germany)來測定蛋白質濃度。此程序產生單一確定抗體之溶離。

(b)將經結合抗體以10×0.5 ml pH值為2.8之0.1 M甘胺酸緩衝劑自管柱溶離。對於藉由凝膠電泳分離而言，親和力結合抗體之溶離並非藉由隨後之pH值調節來進行以便降低進行等電聚焦之樣本的鹽含量。凝膠電泳分離提供一組確定之抗體帶(參見圖12之編號)。

ii) 抗體定量

溶離份中抗體濃度係藉由Micro BCA™蛋白質檢定套組法(Pierce; Perbio, Bonn, Germany)測定。使用Micro BCA™套組內供應之2 mg/ml牛白蛋白之儲備溶液來製備40-0.5 µg/ml範圍內的新鮮標準稀釋液。將抗體於溶離份1至6之間溶離，其中最高濃度在溶離份1及3中。對於各組10個溶離份之定量而言，製備新鮮白蛋白標準稀釋液。以ELISA讀取器於562 nm下讀取結果。

B. 經由抗原決定基切除測定由抗Aβ(21-37)自體抗體辨識之抗原決定基

使用100 µg Aβ(21-37)自體抗體於500 µl 0.2 M NaHCO₃/0.5 M NaCl(pH值為8.3)中之溶液固定如實例2A所述自健康個體血清分離之自體抗體，將其添加至經正羥基

琥珀醯亞胺基 (NHS) 活化之 6-胺基己酸偶合之瓊脂糖 (Sigma, St Louis, USA) 中，且使其在 20°C 下結合 60 min，隨後轉移至微毛細管 (MoBiTec, Goettingen, Germany) 上。將管柱以 6 ml 阻斷緩衝劑 (0.1 M 乙醇胺，0.5 M NaCl，pH 值 = 8.3) 洗滌五次，且在阻斷步驟之間以 6 ml 洗滌緩衝劑 (0.2 M NaOAc，0.5 M NaCl，pH 值 = 4) 洗滌，其中各自為每秒一滴。接著，將管柱於阻斷緩衝劑中培育 1 h，隨後進行另一洗滌步驟：以 6 ml 洗滌緩衝劑 (0.2 M NaOAc，0.5 M NaCl，pH 值 = 4) 及 6 ml 阻斷緩衝劑 (0.1 M 乙醇胺，0.5 M NaCl，pH 值 = 8.3) 交替洗滌七次。最終，將管柱以 20 ml PBS (5 mM Na₂HPO₄，150 mM NaCl，pH 值為 7.5) 洗滌。接著，以每莫耳經偶合抗體約兩莫耳肽之莫耳比施加待分析之肽。接著，將管柱以 10 ml PBS 洗液洗滌，且接著以 10 ml 雙去鹽 H₂O (MilliQ) 洗滌以移除經非特異性結合之肽。接著，藉由施加 500 µl 0.1% TFA 且將其於輕微攪動下培育 15 分鐘來完成溶離。接著溶離含有特異性結合肽之 TFA 溶液且再次施加 TFA 溶液 2 至 4 次。將此等溶離物混合且凍乾，接著以 MS 量測。

在室溫 (20-25°C) 下，藉由將 PBS 中 2-5 µg Aβ 抗原以每莫耳經偶合抗體約兩莫耳肽之莫耳比施加至如以上章節所述產生之抗體微管柱上歷時 60 min 來進行抗原決定基切除。洗滌後，在 37°C 下在管柱上以 200 µl PBS 中 0.2 µg 蛋白酶進行消化歷時 2 h。移除未經結合之肽且使用 500 µl 0.1% 三氟乙酸使抗原決定基自抗體解離。在 20°C 下培育 15 分鐘

後，重複此步驟5次，將抗原決定基溶離物凍乾且於10 μ l 0.1% TFA或MALDI溶劑(3:2 AcCN : 0.1% TFA較佳)中復水以供質譜分析。

以類似方式進行抗原決定基萃取，然而首先以未經結合之抗原來進行蛋白水解消化且將蛋白水解消化物直接施加於抗體管柱上。如圖6所示，發現羧基端A β (21-37)序列經特異性辨識(蛋白水解遮蔽)，而A β 之N端殘基易進行裂解。因此，自健康個體分離之A β 自體抗體所結合之經萃取抗原決定基展現A β (21-37)之胺基酸序列。因此，將本發明抗體稱作A β (21-37)自體抗體。

圖3展示類似實驗，其中展示針對A β (4-10)之斑塊特異性抗體能夠遮蔽胺基酸F4、R5、D7使其免於蛋白水解消化。

使用如實例2A所述自IVIgG純化之A β (21-37)自體抗體進一步研究本發明抗體之特異性。亦評估抗A β 抗體ACA(基於美國專利7,195,761，參見實例5)。將抗體與如下所指定之不同部分A β 肽一起培育且如以上於實例2B中所述洗滌。如上經由MS分析溶離概況。

圖34(a-d)展示此實驗配置中本發明抗體與A β (12-40)及A β (20-37)特異性結合，但不與A β (25-35)、A β (17-28)或A β (31-40)結合。

圖34(b)展示僅A β (21-37)自體抗體與A β (12-40)多肽特異性結合，而非抗體A11。

圖34(c)展示A β (21-37)抗體不與A β 多肽A β (25-35)、

A β (17-28)或A β (31-40)結合。

圖 34(d)至 34(l)展示經固定 ACA 抗體與經固定 A β (21-37)自體抗體均與 A β (1-40)結合且與 A β (12-40)結合，但僅經固定 A β (21-37)自體抗體與 A β (20-37)特異性結合而 ACA 抗體不與其結合。無經固定之抗體與 A β (17-28)結合。此外，經固定抗體 ACA 不與 A β (4-10)結合。

因此，本發明抗體為獨特的，因為其特徵為在以上所指定之實驗條件下其與 A β (12-40)及 A β (20-37)特異性結合，而其不與 A β (25-35)、A β (17-28)或 A β (31-40)結合。

A β 自體抗體抗原決定基之結構及構型特性、結合親和力及特異性係以下列方法進一步表徵：研究包含 A β (21-37)抗原決定基序列之合成肽；及使用丙胺酸序列突變、H-D 交換及高解析度質譜法、不同溶劑中之 ELISA 研究及 CD 光譜構型分析進行精細結構映射。側接有寡-甘胺酸及寡-(D-Ala)間隔基團之經生物素標記 A β (21-37)肽及肽衍生物係藉由根據先前關於 A β 肽所述之程序之固相肽合成來合成且係藉由逆相 HPLC 純化且係由 MALDI 及 ESI 質譜法就分子均質性進行表徵 (Manea 等人，2004；Mezo 等人，2004)。比較性結合研究係使用 ELISA 系統，以包含不同 C 端序列長度之 A β 抗原決定基肽來進行 (參見下文，3)。此等結果確立包含殘基 30-37 之 A β 羧基端序列末端之抗體親和力的基本功能；此部分序列與 β 摺疊形成及 A β 凝集重要相關。因此，於 A β (12-40) 中獲得完全結合親和力。對照而言，縮短之 A β (20-30) 肽展示幾乎完全消除之親和力。H-D 平衡交

換後肽質譜研究展示僅A β 序列(20-30)肽主鏈氫發生快速氘合併，但殘基(30-37)僅有少數主鏈氘化，其暗示此部分中因構型或凝集效應而遮蔽增加。抗原決定基肽A β (20-37)與辨識N端A β (1-16)肽之抗體(斑塊特異性單株及多株抗體)之對照結合研究不展示任何結合親和力。

C. 經純化抗A β (21-37)自體抗體之親和力評估

為評定經親和力純化抗體之品質，使用親和力純化管柱之溢流物(經固定A β 12-40)作為對照來進行ELISA。在20°C下，將96孔培養盤以每孔200 ng於PBS緩衝劑中之A β (1-40)培育2小時。將培養盤以200 μ l含有0.05%吐溫20之PBS洗滌4次且以於PBS緩衝劑中含有0.05%吐溫20之5% BSA阻斷2小時。接著使用IVIgG溢流物作為對照，將培養盤在20°C下在輕微震盪下以5% BSA，0.05%吐溫20中如實例2A所述獲得之親和力純化抗體培育2小時。洗滌後，將抗人類辣根過氧化酶(HRP)接合抗體添加至孔中且培育1小時。添加受質OPD後，於450 nm下測定光學密度。藉由競爭性ELISA來測定親和力，其中K_d值在約 8×10^{-9} M至約 15×10^{-9} M之範圍內。

D. 用於抗A β (21-37)自體抗體序列測定之電泳分離

藉由等電聚焦如實例2A所述獲得之抗A β (21-37)自體抗體進行之電泳分離係藉由1D-SDS-PAGE及2D-SDS-PAGE進行。使樣本於6 M尿素、30%甘油、2% w/v SDS、0.05 M Tris-HCl(pH值為8.8)、1% DTT及痕量溴酚藍中平衡30 min，接著於除以4.5%(w/v)碘乙醯胺置換DTT以外相同之

溶液中平衡 30 min。以 Multiphor II 水平電泳系統 (Amersham Pharmacia Biotech) 使用 17 cm 經固定 pH 值梯度 (IPG) 膠條 (pH 值範圍 3-10, 線性) 來進行等電聚焦 (IEF)。以 Bio-Rad Protean II xi 細胞垂直電泳系統, 使用 1.5 mm 厚度之 10% SDS-PAGE 凝膠來進行二維分離。將 IPG 膠條於含有溶解於 7 M 尿素、2 M 硫脲、4% CHAPS、0.3% DTT、pH 值為 3-10 之 2% Servalyt 及痕量溴酚藍中用於庫馬斯 (Coomassie) 染色之約 100 μ g 凍乾抗 A β (21-37) 自體抗體及用於銀染色之 30 μ g 凍乾抗 A β (21-37) 自體抗體的溶液中再水合隔夜。使用凝膠內再水合法施加樣本。在 20°C 下, 使含有樣本之經再水合之膠條在第一維中跑膠約 30 kVh。

將置放於垂直凝膠上之膠條以 SDS 電泳緩衝劑 (25 mM Tris-HCl, 192 mM 甘胺酸及 0.1% w/v SDS) 中 1% 瓊脂糖覆蓋且使其在每凝膠 25 mA 下進行電泳歷時 30 min 且在每凝膠 40 mA 下進行電泳直至追蹤染料到達凝膠之陽極端。於 SDS-PAGE 凝膠中分離後, 將蛋白質藉由銀染色或藉由敏感膠體庫馬斯染色觀測且使用 GS-710 經校準之成像密度計 (Bio-Rad) 掃描 (參見圖 12 及 13)。

重鏈與輕鏈分離

抗體輕鏈與重鏈之分離係使用 1D 凝膠電泳進行。在反覆攪動、超音波處理及離心下將樣本 (50-200 μ g) 溶解於樣本緩衝劑 (4% SDS、25% 甘油、50 mM Tris 緩衝劑、0.02% 庫馬斯藍、6 M 尿素, pH 值 6.8) 中以確保抗體之最大溶解。在 20°C 下, 藉由與 1000 倍莫耳過量之二硫蘇糖醇 (DTT) 反

應 90 min 來進行二硫橋之還原。隨後在 20°C 下，藉由與 3 倍莫耳過量之碘基乙醯胺 (IAA)/DTT 濃縮物反應 60 min 來進行經還原之半胱胺醯基-硫氫基之烷基化。藉由每帶施加約 20 µg 抗體，使用 BIO-RAD Protean-(II) 電泳細胞在 12% 丙烯醯胺凝膠上進行重鏈與輕鏈帶之 1D-SDS-PAGE 分離。使用來自 Bio-Rad 之 PDQuest 軟體來使 1-D 及 2-D 凝膠成像且進行分析。凝膠經染色及掃描後，使用 PDQuest 軟體之獨立演算法來降低背景雜訊水平、凝膠假影及影像之水平或垂直拖尾。接著使用 PDQuest 軟體自動偵測於 2-D 凝膠上分離之蛋白點且用於比較不同凝膠。偵測約 20 個帶作為辨別點，其中藉由質譜分析來分析且鑑別 16 個重鏈點及 15 個輕鏈點。

E. 抗 Aβ(21-37) 自體抗體序列測定之分析策略及方法之概述

藉由以下互補及部分重疊方法的組合進行涵蓋重鏈及輕鏈胺基酸序列之抗體之初級結構測定，CDR 序列、二硫鍵及 N 端序列及其變型之測定及多樣性(圖 10 中之概述)：

(i) 對抗體帶進行 1D-電泳分離及漬墨後，對完整蛋白質、重鏈及輕鏈進行直接 Edman N 端序列測定(N 端及 CDR1 可變域)；

(ii) 重鏈及輕鏈之 1D 電泳分離，隨後進行經分離蛋白帶之胰蛋白酶消化，胰蛋白酶肽之 HPLC 分離及肽片段之 Edman 序列測定(可變序列及 CDR 區)；

(iii) 使用從頭定序與來自 NCBI 資料庫搜尋程序之序列測定之組合，對藉由 HPLC 分離之蛋白水解肽進行 LC-ESI-

MS/MS序列測定(可變序列及CDR區)；

(iv)使用高解析度MALDI-FTICR-MS聯合資料庫搜尋；藉由進行兩個或兩個以上資料庫搜尋程序(例如Mascot, Profound搜尋引擎)對來自抗體-同功異型物之2D凝膠電泳分離之蛋白水解消化肽進行質譜序列指定；恆定域及部分可變序列域；

(v)使用MALDI-TOF-MS對經HPLC分離之蛋白水解肽進行質譜分析(恆定區序列)；此外，在不伴以及伴以二硫橋還原下使用蛋白水解肽片段之MALDI-MS(MALDI-TOF及MALDI-FTICR-MS)來指定及確證正確之二硫鍵；

(vi)2D凝膠電泳分離後，藉由蛋白水解肽混合物之MALDI-MS(MALDI-TOF-及MALDI-FTICR-MS)來進行抗體-同功異型物之重鏈及輕鏈連接性指定，其中最初省略二硫蘇糖醇(DTT)還原步驟，提供等電聚焦步驟期間的完整二硫鍵連接之抗體。接著於第二電泳步驟中進行二硫鍵還原及烷基化。

F. 抗A β (21-37)自體抗體序列之詳述

測定藉由親和力純化自由兩個健康成人個體(男性，30歲)分離之a)血清-IVIgG，及b)血清-IgG分離之抗A β (21-37)自體抗體的胺基酸序列。以圖29、30及32中之結構細節指定來展示完全抗體，重鏈及輕鏈(如上所述以二硫鍵鑑別)之序列測定。在圖25至30中所描述之實驗細節中，用於由互補及重疊部分序列完成序列測定之不同互補法係以用於以下各者之不同加底線代碼來展示：(i)Edman N端蛋白質

序列測定；及(ii-v)使用Edman定序、LC-MS/MS、MALDI-TOF-MS及高解析度MALDI-FTICR-MS及蛋白水解肽混合物在2D電泳分離後之MALDI-FTICR-MS對藉由HPLC分離之蛋白水解肽的序列測定。此外，已於重鏈序列中標註於Cys-224(HC-LC)、Cys-230及Cys-233(HC)處鑑別之胱胺酸殘基內部二硫鍵及重鏈-輕鏈二硫鍵。除直接指定半胱胺酸殘基之序列位置以外，藉由自胰蛋白酶、未經還原肽混合物(未圖示)及隨後經DTT還原之肽之質譜分子量測定來確證二硫鍵，展示與由參考IgG1結構之結晶資料(PDB 1IG, Brookhaven蛋白質結構資料庫)所預測之二硫鍵指定之同源性比較完全一致。

由血清IVIgG抗體，鑑別各別可變區之12個重鏈同功異型物及5個輕鏈同功異型物之序列；輕鏈序列包含4 κ 及1 λ 鏈序列。對於大部分胺基酸序列而言，序列資料彼此對應且係藉由至少兩種互補重疊部分序列測定來彼此確定。將所有抗體序列鑑別為IgG₁子類分子。

重鏈及輕鏈序列之顯著結果為鑑別恆定域中若干單一胺基酸變化，其各自係藉由若干互補質譜法及藉由HPLC分離之胰蛋白酶肽之Edman定序來確定。藉由胰蛋白酶肽(297-304)(EEQYNSTYR)之Edman序列測定來確定N-301處之N糖基化位點；此肽於定序週期-5中提供空白。以PNGaseF N-去糖基化後，此肽產生序列測定，N-301；此外，去糖基化肽之MALDI-FTICR-MS分析提供正確分子質量之鑑別。此外，非糖基化Fc序列變化係藉由N301A之突變及藉

由部分非糖基化N之存在來鑑別。

所測定之輕鏈及重鏈之可變序列係概述於圖25及26中，其包含12個序列變異體(重鏈)及5個(輕鏈)。重鏈中之序列變化遠頻繁於輕鏈中之序列變化，例外為N端序列，其展示輕鏈有若干序列變化，但重鏈完全均質。N端序列係藉由蛋白質之直接Edman序列分析，胰蛋白酶N端肽之Edman定序及經HPLC分離之N端肽之LC-MS/MS定序的組合來測定。與輕鏈N端突變相比，典型特徵為單一均一重鏈N端重鏈(1-20)。輕鏈N端突變係藉由使用NCBI資料庫進行blast同源搜尋來確證。

將所測定之重鏈及輕鏈區之CDR序列域概述於圖24 a至d中。與可變域內所鑑別之突變相一致，藉由鑑別達至7個CDR1、CDR2及CDR3序列發現重鏈序列之較高多樣性；同時測定輕鏈CDR1及CDR2域及兩個CDR3序列變異體之4及5個序列。使用重鏈及輕鏈CDR之逐步檢查，所有CDR序列與Kabat規則一致匹配(Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H. M., Gottesman, K. S. & Foeller, C. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest (Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD) NIH出版號91-3442第5版及R. Kontermann, S. Dübel (編), Antibody Engineering; Springer Lab Manual Series; Springer, Heidelberg 2001;)。所鑑別之CDR序列使得一致序列之衍生成為可能。

G. 序列測定之實驗程序之詳述

i) 序列測定之蛋白質樣本製備

將自如實例2A中所述獲得之血清IVIgG分離之抗A β (21-37)自體抗體凍乾且以1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 之濃度溶解於變性緩衝劑(6 M尿素；50 mM Tris, pH值=7.5)中。在30°C下, 以1000倍莫耳過量之DTT進行二硫橋之還原歷時2小時。隨後以3000倍莫耳過量之碘基乙醯胺藉由在20°C下在柔光中反應1小時來進行游離硫醇基之烷基化。隨後將樣本凍乾, 之後藉由1D-凝膠電泳來分離重鏈與輕鏈。

ii) N端Edman蛋白質序列分析

自動胺基酸序列分析係用與140C微梯度HPLC系統、785A可程式化吸光率偵測器及610A資料分析系統連接之Applied Biosystems 494 HT Procise定序器來進行。所使用之所有溶劑及試劑具有分析超級純度(Applied Biosystems Europe, Darmstadt, Germany供應)。

所有分析中採用以下試劑及材料(Applied Biosystems)：

漬墨緩衝劑：25 mM Tris-HCl、192 mM甘胺酸、0.1% SDS、20%甲醇；PVDF膜：ProBlott, Applied Biosystems；濾紙：GB005(Schleicher & Schuell)；漬墨器：PeqLab PerfectBlue Tank-Elektroblotter Web M；染色溶液：50%甲醇中之0.1%庫馬斯藍R-250；退色溶液：50%含水甲醇。

如4)所述將抗體還原、烷基化且藉由1D-SDS-PAGE分離為重鏈及輕鏈組份。電泳分離後即刻將新鮮凝膠於轉移緩衝劑中平衡10 min。將PVDF膜(10 \times 10 cm, 凝膠尺寸)於甲

醇(分析級, Normapur)中濕潤1 min且接著於轉移緩衝劑中平衡20 min。將兩片濾紙剪成凝膠尺寸(10×10 cm), 且將濾紙浸泡於轉移緩衝劑中。

如下組裝漬墨夾層: 將濕潤濾紙置放於漬墨盒之陽極(+)側。將經平衡之PVDF膜置放於濾紙之上。將經平衡之凝膠置放於轉移膜之上。將另一濕潤濾紙置放於凝膠之上。注意不使夾層組份之間包括氣泡。接著將盒封閉且浸沒於漬墨槽中。

以恆定電流1 mA/cm²進行漬墨歷時4小時。蛋白質轉移完成後, 將PVDF膜以MilliQ水洗滌兩次歷時15 min以移除SDS及甘胺酸。接著將PVDF膜以甲醇洗滌1 min且接著染色1 min。將經染色之膜以退色溶液洗滌直至蛋白點自背景清晰可見。接著使膜在空氣中乾燥。將蛋白點切除, 且置放於Eppendorf管中且儲存在4°C下。序列分析前, 將點以100%甲醇洗滌直至完全退色。將蛋白點置放於定序器濾筒中且使用標準PL PVDF蛋白法(PVDF漬墨蛋白質之脈衝式液體定序法, Applied Biosystems)定序。

iii)凝膠電泳分離後抗體之蛋白水解消化

如4)所述, 將重鏈與輕鏈藉由1D-凝膠電泳使用12%分離凝膠及5%堆疊凝膠分離且以膠狀庫馬斯藍染色。

對於凝膠內蛋白水解消化及隨後之胰蛋白酶之HPLC分離及質譜分析而言, 將凝膠帶剪除且在25°C下藉由添加MilliQ水中60%乙腈退色歷時20分鐘。移除上清液且將凝膠點凍乾至乾燥後, 添加1 ml 50 mM NH₄HCO₃之溶液以

供再水合且將其於25°C下培育20 min。重複此程序兩次且在4°C下以蛋白酶溶液(50 mM NH_4HCO_3 中之12.5 ng/ μl 胰蛋白酶)進行最終之再水合歷時45 min。接著在37°C下將凝膠點在1 ml 50 mM NH_4HCO_3 中培育12小時，且將蛋白片段以1 ml於水中之60%乙腈溶離三次歷時1小時。將溶離物凍乾至乾燥且在HPLC及MS分析前即刻溶解。

對於2D電泳後之蛋白質鑑別/序列及資料庫分析、藉由LC-MS/MS之序列測定及蛋白水解肽之Edman N端序列測定而言，將凝膠點切除，使其於乙腈中進行脫水且在真空中移除乙腈後於真空離心機中乾燥。蛋白水解消化之樣本製備係如上所述藉由以足以覆蓋凝膠片之體積之50 mM NH_4HCO_3 中10 mM二硫蘇糖醇(DTT)還原來進行，且將蛋白質在56°C下進行1小時。冷卻至室溫後，將含有DTT之溶液以相同體積之55 mM碘基乙醯胺於50 mM NH_4HCO_3 中之溶液置換。在室溫下在黑暗中在不定時震盪(渦旋)下培育45 min後，將凝膠片以50-100 μl 50 mM NH_4HCO_3 洗滌10 min且藉由添加相同體積之乙腈再次脫水。接著將液相移除且將凝膠片於真空離心機中完全乾燥。

根據文獻程序將經切除之凝膠片以胰蛋白酶手動或自動(使用DigestPro 96自動操作機(Intavis Bioanalytical Instruments, Langenfeld, Germany))消化。對於手動凝膠內消化及隨後之質譜分析而言，將點切除且藉由在25°C下添加MilliQ水中60%乙腈而使其退色歷時20 min。移除上清液且將凝膠點凍乾後，添加50 mM NH_4HCO_3 之溶液以供再

水合且將其於25°C下培育20 min。重複此程序兩次且接著在4°C下以蛋白酶溶液(50 mM NH_4HCO_3 中之12.5 ng/ μl 胰蛋白酶)進行最終之再水合歷時45 min。在37°C下，將凝膠點於50 mM NH_4HCO_3 中培育12 h，且以水中60%乙腈將蛋白水解肽溶離3-4小時。將溶離物凍乾至乾燥且於MALDI-MS分析前即刻溶解於5 μl 乙腈/水中0.1%三氟乙酸(2:1)中。

用於隨後之質譜分析之自動凝膠內消化係以DigestPro 96自動操作機(Intavis Bionalytical Instruments)來進行。DigestPro 96為市售之消化自動操作機系統，其係由裝備有含有溫度調控鋁反應器區塊之模組之Gilson 221XL自動操作機組成。區塊可容納達至96個蛋白樣本且係安裝於軌道上，使得其可由自動操作機臂移動至洗滌位置或樣本收集位置。將蛋白凝膠片自2D-PAGE凝膠切除且裝載於清潔96孔PCR培養盤中，該培養盤含有貫入孔底部之小洞。將培養盤以由蓋子及四個安裝螺桿固持於適當位置之聚矽氧膜覆蓋。聚矽氧膜中之洞允許由經特定設計之分配針傳遞試劑。此針具有傳遞氮壓至反應孔之第二外通道。針定位允許由2.6巴之氮壓將液體傳遞至小瓶或自反應器排出。如下所述之整個凝膠內消化過程係於自動操作機平台上實施且係由DigestPro 96軟體(4.02版；INTAVIS)控制。簡言之，將凝膠片以50 μl 50 mM NH_4HCO_3 洗滌四次且於各步驟後以100 μl 乙腈脫水。最後之收縮步驟後，將50 μl 酶緩衝劑(50 mM NH_4HCO_3 中之12.5 ng/ μl 胰蛋白酶，pH值約為

8)添加至管中。將酶引至凝膠片中歷時30 min。隨後，添加50 μ l 50 mM NH_4HCO_3 溶液來覆蓋凝膠片，且在37°C下6小時後萃取肽。以50 μ l NH_4HCO_3 進行第一次萃取，隨後以50 μ l 10%甲酸進行三次萃取；在萃取之間，如上所述將凝膠片以乙腈脫水。接著將所收集之萃取物於真空離心機中乾燥且在MS分析前即刻再溶解於5 μ l MALDI-MS溶液(乙腈:水中0.1%三氟乙酸，2:1)或5 μ l ESI-MS溶液(甲醇:水:乙酸，50:48:2(v/v/v))中。對於凝膠內去糖基化而言，使凝膠片於去糖基化緩衝劑中膨脹，該去糖基化緩衝劑係藉由混合100 μ L市售之N糖苷酶F(PNGase F)製劑(Roche, Mannheim, Germany)與100 μ L 0.1 M碳酸氫銨緩衝劑以提供每毫升100單位之最終酶濃度來製備。若所有液體皆為凝膠片所吸收，則將其他消化緩衝劑(但不含有PNGase F)添加至樣本中以保持樣本在37°C下培育隔夜期間濕潤。為避免在MALDI-MS分析中可能為PNGase F相關肽所干擾，藉由以0.1 M碳酸氫銨中0.1% SDS洗滌凝膠片(四次，各自250 μ L歷時1小時)而在蛋白水解前移除糖苷酶。丟棄所有洗滌溶液且將SDS藉由以50:45:5(v/v/v)甲醇:水:乙酸培育(30 min)且使用0.1 M碳酸氫銨中50%乙腈洗滌三次(各自30 min)而移除。丟棄所有洗液，且接著將凝膠塞於真空離心機中乾燥。對於以EndoH糖苷酶進行凝膠內去糖基化而言，使用相同程序。

接著使用來自Millipore(Eschborn, Germany)之ZipTip[®] C18吸管尖來進行ZipTip清除程序。ZipTip吸管尖為有樹脂預

先填充於10 μl 吸管尖之狹窄端中之微管柱。ZipTip吸管尖含有 C_{18} 或 C_4 逆相材料用於濃縮及純化肽及蛋白質樣本。將ZipTip C_{18} 吸管尖應用於肽及低分子量蛋白質，而將ZipTip C_4 吸管尖應用於較高分子量蛋白質。根據製造商說明進行完全ZipTip程序。簡言之，其基本上由五個步驟組成：濕潤；ZipTip吸管尖之平衡；肽及蛋白質與吸管尖之結合；洗滌；及溶離。

iv) 蛋白水解肽之HPLC分離

所有分析HPLC分離係以BIO-RAD(Muenchen, Germany)2700 HPLC系統使用Vydac C_4 管柱(250 \times 4.6 mm I.D.)及5 μm 二氧化矽(300 Å孔徑)進行。以1 mL/min之流動速率進行線性梯度溶離(0 min 0%溶劑B；5 min 0%溶劑B；135 min 65%溶劑B，150 min 100%溶劑B，160 min 100% B)，其中溶離劑A係由水中0.1%三氟乙酸(TFA)組成且溶離劑B係由乙腈:水(80:20, v/v)中之0.1% TFA組成。將通常為50 μg 等分試樣之蛋白水解肽樣本溶解於200 μL 溶離劑A中。肽之偵測一般係使用BIO-RAD可變波長吸光率偵測器在220 nm下進行。

v) 蛋白水解肽之N端Edman序列測定

在序列分析前，將胰蛋白酶肽如上所述藉由HPLC分離，且凍乾且儲存在 -20°C 下。用於序列測定之樣本支撐物係由玻璃纖維過濾器(Applied Biosystems)組成，該過濾器經30 μL BioBreneTM Plus(Applied Biosystems)溶液(100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Biobrene及水中6.66 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ NaCl)處理，且係使用標

準過濾器預循環法進行預循環(3次循環)。對於序列分析而言，將經凍乾之HPLC溶離份於15 μ L含有0.1% TFA之於水中之20%(v/v)乙腈中復水。將經復水之肽溶液以5 μ l之等分試樣施加於預循環之玻璃纖維過濾器上以確保儘可能接近玻璃纖維過濾器中心分布，每次施加之後在Ar氣流下乾燥1 min。

所有序列分析係於如上所述之Applied Biosystems 494 HT Procise定序器/140C Microgradient系統以及785A可程式化吸光率偵測器及610A資料分析系統上進行。所使用之所有溶劑及試劑係來自Applied Biosystems。用於分析蛋白水解肽之一般方法為標準脈衝式液體法。

vi)藉由蛋白水解肽之ESI-LC-MS/MS進行序列測定

藉由HPLC分離之胰蛋白酶肽(參見上文)之所有序列測定係以裝備有奈米ESI/LC離子來源系統之Bruker Esquire-3000+離子井LC-MS/MS系統(Bruker Daltonics, Bremen, Germany)進行。將蛋白水解肽之HPLC溶離份收集於1 ml Eppendorf杯中且凍乾至乾燥且儲存在 -20°C 下直至LC/MS分析。將HPLC溶離份溶解於16 μ l含有水:乙腈(9:1, v/v)中1%甲酸之溶劑混合物中。將樣本在 20°C 下超音波降解處理5 min且在13000 rpm/min下離心3 min。將樣本內容物轉移至裝備有內部微瓶(0.1 ml)之2 ml螺旋帽小瓶中且置放於LC/MS盤中。藉助於自動注射系統將3 μ l樣本等分試樣注射於C-18微管柱上，且採用下表中所列出之溶離梯度(LC-MS梯度)。樣本自注射環流入管柱中且接著被引入電

噴霧界面且經由離子光學元件進入離子井中。以時間之函數記錄總離子電流(TIC)，且使用資料分析軟體(Bruker Daltonics)將其轉換為質譜。自第一次LC/MS運作產生之質譜選擇待用於MS/MS分析之最強離子。對於所鑑別之各前驅物離子而言，在相同梯度條件(參見表格)下進行獨立LC-MS/MS運作。抽汲系統起動後，使用前驅物質量、分離寬度及碎裂振幅之規定於Esquire控制窗中開始母離子之分離及碎裂。以時間之函數來記錄對應於離子碎片之總離子電流(TIC)；若在運作期間使單一母離子碎裂，則TIC含有單峰。前驅物離子之MS/MS譜係以資料分析軟體藉由使半峰寬處之脈衝平均化產生。將MS/MS譜內所含之碎片之m/z值及其強度輸出至資料分析檔案類型(副檔名為*.mgf)中。將檔案上載至MS/MS Mascot搜尋引擎中使用以下搜尋參數進行NCBI nr資料庫搜尋：分類，智人；允許之漏失裂解，-1；肽搜尋容許度，2 Da；MS/MS容許度，0.8 Da；固定修飾，胺甲醯胺基甲基(半胱胺酸)；可變修飾，Met氧化。所展示之結果含有圖表形式之Mowse機率計分，提供對於各擊中結果產生之肽序列及蛋白質。若給定前驅物之碎片離子的結果產生來自免疫球蛋白重鏈或輕鏈之肽的直接鑑別計分，則認為所獲得之肽序列為正確的肽序列。若對於給定前驅物及其MS/MS譜未直接獲得鑑別計分，則使用來自資料分析軟體之指定功能，藉由從頭定序來確定肽序列。此功能將兩個碎片之間的質量差異指定為特定胺基酸之質量。若由從頭程序獲得之肽序列資料與藉

由NCBI資料庫搜尋獲得之序列相同，則認為序列結果為正確的。若對於特定前驅物離子進行之資料庫搜尋不提供任何免疫球蛋白肽片段，則對應前驅物離子指定為未經鑑別的。

LC-MS/MS梯度溶離參數表

時間(min)	溶劑A	溶劑B
0	80	20
3	80	20
6	50	50
16	20	80
18	2	98
20	2	98
22	98	2
24	98	2

vii) 蛋白水解肽之MALDI-TOF質譜法

MALDI-TOF MS分析係以裝備有氮UV雷射($\lambda=337$ nm)、26樣本SCOUT來源、視訊系統及用於譜獲取及工具控制之XMASS資料系統之Bruker Biflex線性TOF質譜儀(Bruker Daltonics, Bremen, Germany)來進行。將 α -氘基-4-羥基-肉桂酸(HCCA)於乙腈：水中0.1% TFA(2:1 v/v)中之飽和溶液用作基質。對於所有MALDI-MS分析而言，將0.8 μ L基質溶液與0.8 μ L樣本溶液(藉由HPLC分離之蛋白水解肽混合物或胰蛋白酶肽)於不鏽鋼MALDI靶上混合且使其乾燥。譜獲取係以20 kV之加速電壓(V_{acc})及1.5 kV之偵測器電壓進行。外部校正係使用牛胰島素(5734.5 Da)、經氧化牛胰島素B鏈(3496.9)、人類神經調壓素(1673.9 Da)、人類血管緊張素I(1297.5 Da)、人類緩激肽(1061.2)及人類血管緊張

素 II(1047.2 Da)之單一質子化離子信號之平均質量來進行。

viii) 蛋白水解肽之 MALDI-FT-ICR-MS

MALDI-FTICR 質譜分析係以裝備有主動屏蔽 7T 超導磁體 (Magnex, Oxford, UK)、圓柱體無限 ICR 分析器單元及具有脈衝式碰撞氣體之外部 Scout 100 全自動 X-Y 靶階段 MALDI 來源之 Bruker APEX II FTICR 工具 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) 來進行。脈衝式氮雷射係在 337 nm 下操作。

以 2,5-二羥基苯甲酸 (DHB) 於乙腈/水中 0.1% TFA(2:1 v/v) 中之 100 mg/mL 溶液用作基質來進行肽樣本分析。將 0.5 μ L 基質溶液與 0.5 μ L 樣本溶液 (胰蛋白酶肽或肽混合物) 之等分試樣於不鏽鋼 MALDI 靶上混合且使其乾燥。外部校正係使用牛胰島素 (5730.609 Da)、經氧化牛胰島素 B 鏈 (3494.651)、人類神經調壓素 (1672.917 Da)、人類血管緊張素 I (1296.685 Da)、人類緩激肽 (1060.569) 及人類血管緊張素 II (1046.542 Da) 之單一質子化離子信號之單一同位素質量來進行。譜之獲取及處理係以 XMASS 軟體 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) 來進行。

MALDI-FTICR-MS/MS 分析係以裝備有 SORI-CID (持續偏共振碰撞誘發解離) 解離、IRMPD (紅外線多光子光解離) 儀器以使肽及蛋白離子碎裂之 Bruker ApexII FTICR-MS 工具來進行 (Damoc 等人, 2003)。使藉由 MALDI 離子化所形成之離子截獲於分析器單元中, 且藉由使用適當頻率及振

幅經由施加合適激勵脈衝自ICR單元中排出具有較高及較低質量之所有離子來進行前驅物離子之分離。採用以下實驗條件：相關清掃衰減：8-10 dB；排出安全帶：500-1000 Hz。對於SORI-CID而言，以自回旋加速器頻率稍微偏共振之頻率(500-1000 Hz)對前驅物離子施加低振幅rf-激勵歷時250 msec。保持較低激勵振幅使得離子從不離開單元中心太遠。施加此激勵的同時，藉由允許碰撞氣體(氫)穿過脈衝閥歷時20-80 msec來升高分析器單元中之壓力(10^{-8} 毫巴)。在此等條件下，前驅物離子經受許多低能量碰撞，該等碰撞緩慢活化離子直至其達到其解離臨限。

對於IRMPD(紅外線多光子解離)實驗而言，使用25 W持續波CO₂雷射(10.6 μ m, Synard, Mukilteo, WA, USA)將質量選擇離子光解離。將雷射功率設定為50%臨限值且將雷射輻射時間設定為50-200 msec。

對於2D-凝膠電泳後蛋白水解肽混合物之蛋白質鑑別及序列測定(恆定區序列)而言，採用以下(可公開獲得)之資料庫搜尋引擎。

Mascot-來自Matrix Science Ltd., London之肽質量指紋及MS/MS離子搜尋。

ProFound-來自Rockefeller及New York Universities之肽質量指紋。

MS-Fit-來自University of California, San Francisco (UCSF)之肽質量指紋。

MS-Tag-來自University of California, San Francisco

(UCSF)之MS/MS離子搜尋。

實例3藉由ELISA測定抗原-抗體複合物之解離常數

藉由Kim等人(1990)方法之修正來測定 K_d 值。對於測定而言，首先自藉由如實例9B所述之間接ELISA獲得之初始校正曲線產生所採用之抗體濃度。

1)對於間接ELISA而言，在 20°C 下以每孔150微升之抗生蛋白鏈菌素來塗覆微量滴定盤歷時2小時。將孔以磷酸鹽緩衝生理食鹽水(PBS)(Na_2HPO_4 5 mM, NaCl 150 mM, pH值為7.5)中0.05%(v/v)吐溫20清潔劑洗滌一次。於PBS中製備濃度在 1×10^{-6} 與 10^{-8} M之間的生物素標記-(G)₅-A β (12-40)肽，且以每孔100微升之體積將其沈積在孔中。將孔在 20°C 溫度下培育2小時，隨後進行4次洗滌步驟且以阻斷緩衝劑(PBS中BSA 5% w/v, 0.05%吐溫-20 v/v)阻斷2小時。將抗A β (12-40)抗體以阻斷緩衝劑稀釋至 1.4×10^{-7} 與 10^{-9} M之間的濃度，且以每孔100微升添加。將微量盤在 20°C 下培育2小時且接著以Covabuffer(含有2 M NaCl 、0.083 M MgSO_4 及0.05%吐溫-20之0.15 M PBS, pH值為7.2)洗滌。在 20°C 下將孔以與過氧化酶接合之小鼠抗人類IgG(1:5,000)培育45 min。以含有0.1 M檸檬酸鹽-磷酸鹽、0.1% OPD及0.006%過氧化氫之1,2-苯二胺(OPD)新製溶液來偵測抗體結合。使用ELISA盤式讀取器(Victor², Perkin Elmer Life/A analytical Sciences, Boston, MA)以時間之函數在450 nm下監測酶反應。對於各抗體及抗原濃度而言，製備且量測三個重複孔。觀測寬濃度範圍內吸光率與抗體濃

度之間的正比性。使用此濃度範圍來選擇 K_d 測定之初始濃度。初始濃度係選擇在光學密度對抗體濃度之曲線的線性區域內。

2)對於 K_d 值之測定而言，應用以下條件。將各種濃度(1×10^{-6} M至 4.8×10^{-10} M)之抗原， $A\beta(12-40)$ 肽與恆定濃度之源自初步ELISA校正之抗體混合。培育係使用聚丙烯試管在PBS中5% BSA，0.05%吐溫20中進行以使抗體因吸附於微反應管壁上之損耗降至最低。2小時後，將100 μ l各混合物轉移至事先塗覆有生物素標記-(G)₅- $A\beta(12-40)$ (1 μ M)且經阻斷之微量滴定盤之孔中且培育30 min。接著藉由上述間接ELISA來量測游離抗體之濃度。藉由使用Sips座標繪製實驗資料曲線來獲得 K_d 值。

測定 $A\beta(12-40)$ 肽之 $A\beta$ 抗體複合物之以下平均 K_d 值：

- | | |
|---------------------------|-----------------------|
| a)血清IVIG；經純化： | 8×10^{-9} M |
| b)血清Ab A(健康人類個體；年齡超過30歲)： | 14×10^{-9} M |
| c)血清Ab B(健康人類個體；年齡超過30歲)： | 18×10^{-9} M |

由於已於文獻中估計形成 $A\beta$ 原纖維/凝集物之結合/解離常數之範圍在 10^{-6} M(所測定)之範圍內，故確定抗體之結合為特異性結合。對於IgG抗體而言，已測定各種寡肽及多肽抗原及抗原決定基之典型 K^d 值在 10^{-8} 至 10^{-9} M之範圍內。

實例4由親和力純化之IVIgG抗體抑制斑塊形成

使人類神經母細胞瘤細胞(SH-Sy5y)於補充有10%胎牛血清、10 mM HEPES、4 mM麩醯胺酸及盤尼西林(penicillin)

(每毫升200單位)、鏈黴素(200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)之RPMI 1640培育基中生長。將細胞以每孔30,000個細胞之密度於96孔微量滴定盤中培育隔夜。移除培養基後，將細胞以PBS洗滌，且將毒性A β 寡聚物(2 μM 之最終濃度)以100 μl 新鮮培養基之體積添加至7.5 μM 或15 μM 抗A β (21-37)自體抗體中或不具有抗A β (21-37)自體抗體。使用與凝膠偶合之A β (1-40)(使用實例2A中所述之偶合化學)，藉由以親和力層析法自市售之IVIgG純化抗體來獲得經親和力純化之IVIgG抗體。4小時之培育後進行MTT測試。圖4展示A β 所介導之毒性(灰色條)幾乎為經親和力純化之IVIgG(黑色條)所完全拮抗。

實例4中所使用之可溶毒性A β 寡聚物可藉由在室溫下將1.0 mg A β 溶解於400 μL HFIP中歷時10-20 min來製備。接著將100 μl 所得無晶種A β 溶液添加至矽化Eppendorf管中之900 μL DD H $_2$ O中。在室溫下培育10-20 min後，將樣本以14000 x G離心15 min且將上清液溶離份(pH值為2.8-3.5)轉移至新矽化管中且使其經受輕微N $_2$ 流歷時5-10 min以蒸發HFIP。接著在22 $^{\circ}\text{C}$ 下，使用經Teflon塗覆之微攪拌桿在500 RPM下攪拌樣本歷時24-48小時。以6-12小時之時間間隔取等分試樣(10 μl)以用於藉由原子力顯微法或電子顯微法觀測。

實例5抗A β (21-37)自體抗體之重組表現

A.用於瞬間表現之哺乳動物表現載體建構

使用CSL純系7之輕鏈可變區(SEQ ID NO: 53)及CSL純系7之重鏈可變區(SEQ ID NO: 60)的胺基酸序列來藉由

GENEART AG(Regensburg, Germany)合成編碼此等序列之cDNA構築體。亦設計輕鏈及重鏈cDNA構築體以含有獨特側接限制酶位點以允許分別選殖入人類輕鏈及重鏈恆定區上游之哺乳動物表現載體中。亦以Kozak轉譯起始序列，即 ATG 起始密碼子及信號肽(MESQTQVLMSELLFWVSGTCG- 輕 鏈 及 MGWSWIFLFLVSGTGGVLS-重鏈)使構築體工程化。

使用標準分子生物技術，將重鏈可變區選殖入哺乳動物表現載體pcDNA3.1(+)-hIgG1中，其係基於經修飾以包括人類IgG1恆定區及可變區插入位點下游之末端終止密碼子之pcDNA3.1(+)-hIgG1表現載體(Invitrogen)。將輕鏈可變區選殖入表現載體pcDNA3.1(+)-hκ中，其係基於經修飾以包括人類κ恆定區及可變區插入位點下游之終止密碼子之pcDNA3.1(+)-hκ表現載體。

CSL純系7亦經工程化為"鼠化"形式以便於鼠類動物模型中重複使用。將重鏈可變區選殖入哺乳動物表現載體pcDNA3.1(+)-mIgG2a中，其係基於經修飾以包括鼠類IgG2a恆定區及可變區插入位點下游之末端終止密碼子之pcDNA3.1(+)-mIgG2a表現載體(Invitrogen)。將輕鏈可變區選殖入表現載體pcDNA3.1(+)-mκ中，其係基於經修飾以包括鼠類κ恆定區及可變區插入位點下游之終止密碼子之pcDNA3.1(+)-mκ表現載體。如下所述使鼠化CSL純系7表現及純化。

B.細胞培養

自 Genechoice Inc. 獲得適應無血清懸浮液之 293-T 細胞。將細胞於補充有盤尼西林 / 鏈黴素 / 兩性黴素 B 試劑 (Invitrogen) 之 FreeStyle™ 表現培養基 (Invitrogen) 中培養。在轉染之前，將細胞維持在 37°C 之具有 8% CO₂ 氣氛之加濕培育器中。

C. 瞬間轉染

使用 293-T 細胞瞬間轉染純系 7 表現質體係根據製造商說明使用 293fectin 轉染試劑 (Invitrogen) 來進行。將輕鏈表現載體與重鏈表現載體組合且以 293-T 細胞共轉染。將細胞 (1000 ml) 以每毫升 1×10^6 個活細胞之最終濃度轉染且在 2/10 Wave 生物反應器系統 2/10 或 20/50 (Wave Biotech/GE Healthcare) 上於 Cellbag 2L (Wave Biotech/GE Healthcare) 中以 8% CO₂ 氣氛，在 37°C 下培育 5 天。培養條件為以 8° 之角每分鐘搖擺 35 次。在轉染後 4 小時添加 Pluronic® F-68 (Invitrogen) 至 0.1% v/v 之最終濃度。轉染後 24 小時，將細胞培養物以 Tryptone N1 (Organotechnie, France) 補充至 0.5% v/v 之最終濃度。藉由以 2500 rpm 離心收集細胞培養物上清液，且接著使其在純化前通過 0.45 μM 過濾器 (Nalgene)。

D. 蛋白質表現之分析

5 天後，將 20 μl 培養物上清液於 4-20% Tris-甘胺酸 SDS 聚丙烯醯胺凝膠上電泳且藉由以庫馬斯藍試劑染色來觀測抗體。

E. 抗體純化

在 4°C 下使用蛋白質 A 親和力層析法純化 CSL 純系 7 單株抗體，其中將 MabSelect 樹脂 (5 ml, GE Healthcare, UK) 裝填至 30 ml Poly-Prep 空管柱 (Bio-Rad, CA) 中。首先將樹脂以 10 管柱體積之無熱原質 GIBCO 蒸餾水 (Invitrogen, CA) 洗滌以移除儲存乙醇且接著以 5 管柱體積之無熱原質磷酸鹽緩衝生理食鹽水 (PBS) (GIBCO PBS, Invitrogen, CA) 平衡。將經過濾之改良性細胞培養基 (1 L) 藉由重力饋料裝載於樹脂上。接著將樹脂以 5 管柱體積之無熱原質 PBS 洗滌以移除非特異性蛋白質。將經結合之抗體以 2 管柱體積之 pH 值為 2.8 之 0.1 M 甘胺酸 (Sigma, MO) 溶離至含有 0.2 管柱體積之 pH 值為 8.0 之 2 M Tris-HCl (Sigma, MO) 以中和低 pH 值的溶離份。在 4°C 下，於 12 ml Slide-A-Lyzer 盒 MW 截止 3.5 kD (Pierce, IL) 中將所溶離之抗體相對 5 L PBS 透析 18 小時。藉由使用 Ultraspec 3000 (GE Healthcare, UK) 分光光度計於 280 nm 處量測吸光率來測定抗體濃度。藉由 SDS-PAGE 分析抗體純度，其中將還原樣本緩衝劑 (Invitrogen, CA) 中之 2 µg 蛋白質裝載於 Novex 10-20% Tris 甘胺酸凝膠 (Invitrogen, CA) 上，且於具有 Tris 甘胺酸 SDS 電泳緩衝劑之 XCell SureLock 迷你槽 (Invitrogen, CA) 中施加 150 V 之恆定電壓歷時 90 分鐘，隨後根據製造商說明使用庫馬斯染色觀測。

上述技術可用以表現及純化任何本發明抗體。在隨後之實驗中，將輕鏈 SEQ ID NO: 47、48、50 至 55 及 145 至 147 選殖入表現載體 pcDNA3.1(+)-hκ 中且與選殖入表現載體

p cDNA3.1(+)-hIgG1中之重鏈SEQ ID NO: 56至71及148共轉染。進行涵蓋所有可能之輕鏈與重鏈抗體對之總共187個瞬間轉染。以下42個輕鏈與重鏈抗體對(SEQ ID NO)表現用於純化及分析之足夠抗體：47/56、50/60、50/61、50/62、50/67、50/68、50/69、50/148、51/60、51/61、51/62、51/68、51/148、52/60、52/148、53/60、53/68、53/148、54/60、54/61、54/62、54/67、54/68、54/69、54/148、55/60、55/61、55/62、55/67、55/68、55/69、55/148、145/60、145/61、145/62、145/68、145/148、146/60、146/61、146/62、146/68及146/148。

該等方法亦可用以產生包含所選擇之個別序列之完全人類抗 β 澱粉樣蛋白抗體，該等個別序列係基於各別CDR之一致序列，諸如SEQ ID NO: 6至11及SEQ ID NO: 153至161，或各別CDR之單一序列，諸如(a)重鏈SEQ ID NO: 13至20之CDR I，b)重鏈SEQ ID NO: 21至27之CDR2，c)重鏈SEQ ID NO: 28至32之CDR3，d)輕鏈SEQ ID NO: 33至37之CDR1，e)輕鏈SEQ ID NO: 38至43及SEQ ID NO: 53之CDR2，f)輕鏈SEQ ID NO: 44至46之CDR3，g)可變重鏈SEQ ID NO: 56至71，及h)可變輕鏈SEQ ID NO: 47至55。

對於在吾人之研究中用作對照抗體(ACA)而言，吾人亦選殖人類化266抗體之輕鏈及重鏈可變區序列，已知該人類化266抗體與含於澱粉樣蛋白 β 肽位置13-28內之抗原決定基結合。此等序列係自美國專利第US 7,195,761 B2號中獲得。特定言之，使用上述方法，將266人類化輕鏈可變

區 (US 7,195,761 B2, SEQ ID NO: 11) 及 266 人類化重鏈可變區 (US 7,195,761 B2, SEQ ID NO: 12) 之基因合成，選殖入表現載體中，瞬間表現及純化。

實例 6 重組表現之抗 A β (21-37) 自體抗體及親和力純化之 IVIgG 與寡聚形式之 A β 的結合

於相對於抗 A β (21-37) 單株抗體 (mab) CSL 純系 7 及相對於如實例 4 所述親和力純化之 IVIgG 之免疫沈澱檢定中分析於胺基端含有額外半胱胺酸之合成澱粉樣蛋白 β 1-40 肽 (PSL GmbH Heidelberg) (A β 1-40.Cys)。採用 PBS 作為陰性對照。

特定言之，評估 mab CSL 純系 7 是否使單體或寡聚物形式之合成肽免疫沈澱。即刻 (0 h) 使用再懸浮 (1 mg/ml) 於磷酸鹽緩衝生理食鹽水 (PBS: 10 mM 磷酸鈉, 150 mM NaCl, pH 值為 7.4) 中之肽或使其在 37°C, 900 rpm 下進行寡聚 (15 h) 且以小等分試樣儲存在 -80°C 下直至使用。對於免疫沈澱而言，在 4°C 下，將 30 μ l 蛋白質 G 珠粒 (GE Healthcare) 之等分試樣與 5 μ g 抗體 mab CSL 純系 7 或根據實例 2 (A β 1-40 管柱) 純化之 5 μ g 抗 A β (21-37) 自體抗體、2 μ g A β 1-40.Cys 及 1.5 ml PBS 一起培育隔夜。收集經固定之抗體/肽。以 PBS 洗滌 (五次) 後，在 95°C 下，藉由添加 1 \times 非還原 NuPAGE LDS 樣本緩衝劑 (Invitrogen) 將肽溶離 10 min。藉由於 NuPAGE 4-12% Bis-Tris 凝膠 (Invitrogen) 上電泳及根據供應商 (Invitrogen) 藉由西方墨點法於硝化纖維膜上西方轉移來完成蛋白質分離。將膜以 1 \times Roti-Block (Roth) 阻斷且接著依次與一次抗體，1:6000 Bam90.1 (抗 A β) (Sigma)

及二級抗體，HRP接合之山羊抗小鼠抗體(Pierce)一起培育。使用 SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate(Thermo Scientific/Pierce)作為化學發光受質。

結果展示 mab CSL 純系 7(參見圖 33)及親和力純化之 IVIgG(參見圖 37)與寡聚形式之 A β 1-40 結合。詳言之，將 mab CSL 純系 7 或親和力純化之 IVIgG 與單體(0 h)或寡聚(15 h)形式之 A β 1-40，Cys 沈澱寡聚形式之肽共培育。與寡聚形式之 A β 結合之更多結果可見於實例 12D 中。

實例 7 肽合成

根據市售之材料及公開之文獻程序，於含有聚苯乙烯-聚乙二醇樹脂及在酸性條件下可裂解之 Rink-醯胺連接子的 NovaSyn TGR 樹脂上藉由固相肽合成(SPPS)來合成肽生物素-G₅-FAEDVGSNKGA-NH₂(生物素-G₅-A β 20-30)及生物素-G₅-FAEDVGSNKGAIIGLMVG-NH₂(生物素-G₅-A β 20-37)。自始至終使用 9-芴基甲氧基羰基/第三丁基(Fmoc/tBu)化學以供使用半自動經濟型肽合成儀 EPS-221(ABIMED, Germany)合成。使用以下側鏈保護之胺基酸衍生物：Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Asn(Trt)-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Asp(OtBu)-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH。

合成係根據以下一般方案進行：(i)DMF洗滌(3×1 min)，(ii)以 DMF 中之 2% DBU，2% 吡啶進行 Fmoc 去保護(15 min)，(iii)DMF洗滌(6×1 min)，(iv)偶合 5 當量 Fmoc 胺基酸：PyBOP：DMF 中 NMM(40-60 min)，(v)DMF洗滌(3×1

min)。對於具有疏水性C端部分之A β (20-37)合成而言，採用各胺基酸之雙偶合。於樹脂上使用D-(+)-生物素來進行N端之生物素標記。合成完成後，在室溫下使用TFA、三乙基矽烷及去離子水混合物(95:2.5:2.5，V/V/V)使肽自樹脂裂解歷時3 h。合成肽係於例如ELISA中使用。

實例8 A β (21-37)之胺基酸定序

所鑑別(經分離之A β 抗原決定基A β (4-10)及A β (21-37))或使用(例如合成A β (21-37))之所有抗原決定基之序列測定係藉由以下方式進行：

- a) Edman定序；
- b) ESI- Tandem MS/MS-定序，及
- c) 藉助於IRMPD碎裂進行FTICR-MS分析及碎裂。

自動胺基酸序列分析係於與型號140C微梯度系統、785A可程式化吸光率偵測器及610A資料分析系統連接之Applied Biosystems型號494 Procise定序器上進行。

所使用之所有溶劑及試劑具有最高分析級純度(Applied Biosystems)。所使用之定序法為脈衝式液體。將凍乾之樣本溶解於10 μ L 0.1% TFA中。為確保儘可能接近玻璃纖維過濾器中心分布，以2 μ L等分試樣施加樣本，每次施加後在氫流下乾燥。

實例9 ELISA

ELISA係用於測定：

- (a) 自IVIgG分離之抗A β 自體抗體混合物中之斑塊特異性抗A β (4-10)抗體

- (b) 來自人類血清之抗 A β 自體抗體與 A β (21-37) 肽、A β (12-40) 肽及 A β (1-40) 肽的結合
- (c) 自 IVIgG 分離及來自個別人類血清 (AD 血清及健康個體血清) 之抗 A β 自體抗體與 A β (1-40) 肽的結合及與 A β (21-37) 抗原決定基肽的結合
- (d) 重組表現之 A β (21-37) 自體抗體 (CSL 純系 7) 與 A β 部分序列的結合

A. A β (4-10) 抗體之 ELISA

在此實驗中，抗體 (使用 Cys-A β (1-40) 抗原管柱自 IVIgG 分離之抗 A β 抗體) 之標準稀釋液係與用作塗覆抗原之生物素-G5A β (4-10) 肽之 12 次連續稀釋液組合使用。在室溫下將 96 孔 ELISA 培養盤以每孔 150 微升抗生蛋白鏈菌素溶液 (於 PBS 中之 $c=5 \mu\text{g/mL}$) 塗覆 2 小時。以 PBS-T (pH 值 = 7.5 之 PBS 中 0.05% 吐溫-20 v/v) 將孔洗滌四次後，添加每孔 100 微升經生物素標記之抗原決定基肽 (pH 值 = 7.5 之 PBS 中 $50 \mu\text{M}$ 至 $0.024 \mu\text{M}$ 之 12 次連續稀釋液) 且將其在室溫下培育 2 小時。其後，將培養盤以每孔 200 微升之 PBS-T 洗滌四次，且以 PBS 中 5% BSA，0.05% 吐溫-20 (每孔 200 微升，在 RT 下培育 2 h) 阻斷非特異性吸附位點。接著，向各孔中添加每孔 100 微升自 IVIgG 分離之抗 A β 自體抗體 (於 PBS 中 5% BSA，0.05% 吐溫-20 中製備之 1:150 稀釋液)。其後，將培養盤在室溫下培育兩小時且隨後以 PBS-T 洗滌六次。向各孔中添加 100 μL 於 5% BSA，0.05% 吐溫-20 中稀釋 5000 倍之過氧化酶山羊抗人類 IgG 且將培養盤在室溫下培育一小時，接

著將其以PBS-T洗滌三次且以pH值=5之0.05 M磷酸鈉-檸檬酸鈉緩衝劑洗滌一次。添加100 μ L於受質緩衝劑(磷酸鹽-檸檬酸鹽)中 $c=1$ mg/mL之鄰苯二胺二鹽酸鹽(OPD)，其中每10 mL受質緩衝劑含有2 μ L 30%過氧化氫。於Wallac 1420 Victor2 ELISA培養盤上量測450 nm下之吸光率。

B.藉由間接ELISA測定人類血清中之抗體

在室溫下將96孔ELISA培養盤以每孔100微升A β 1-40肽(於pH值為7.5之PBS緩衝劑中， $c=2.5$ μ g/mL)塗覆2 h。其後，將培養盤以每孔200微升之洗滌緩衝劑(PBS-T；含有0.05%吐溫-20之PBS)洗滌四次，且在室溫下以阻斷緩衝劑(PBS中5% BSA，0.1%吐溫-20)阻斷2 h。以PBS-T洗滌兩次後，添加最初以1:33.3稀釋之血清，接著將其以阻斷緩衝劑連續稀釋3倍，且在室溫下培育2 h。接著，將培養盤以PBS-T洗滌八次，且向培養盤中添加於阻斷緩衝劑中以1:5000稀釋之與辣根過氧化酶接合之山羊抗人類IgG，且將其於RT下培育1 h。將培養盤以PBS-T洗滌四次，且以pH值=5之0.05 M磷酸鈉-檸檬酸鈉緩衝劑洗滌兩次。添加100 μ L於受質緩衝劑(磷酸鹽-檸檬酸鹽)中 $c=1$ mg/mL之鄰苯二胺二鹽酸鹽(OPD)，其中每10 mL受質緩衝劑含有2 μ L 30%過氧化氫。於Wallac 1420 Victor2 ELISA培養盤上量測450 nm下之吸光率。使用供校正之BSA參考曲線，使用市售之蛋白質定量套組Pierce micro-BCA，以1 μ g/ μ l儲備溶液進行A β 抗體定量。所獲得之結果係於圖8中說明。所給定之百分比說明來自兩次獨立ELISA測定之IVIgG中A β

抗體濃度。以A β (21-37)親和力層析獲得類似結果。相反而言，以A β (4-10)肽之親和力層析不產生可偵測量之與N端抗原決定基結合之多肽。因此，對於健康個體而言以A β (1-40)獲得之結果相當於以A β (21-37)獲得之彼等結果。

C. 自IVIgG分離及來自個別人類血清之抗A β 自體抗體與A β 1-40肽的結合

在室溫下將96孔ELISA培養盤以每孔100微升A β 1-40肽(於pH值為7.5之PBS緩衝劑中c=2.5 μ g/mL)塗覆2 h。其後，將培養盤以每孔200微升之洗滌緩衝劑(PBS-T；含有0.05%吐溫-20之PBS)洗滌四次，且在室溫下以阻斷緩衝劑(PBS中5% BSA)阻斷2 h。將培養盤以每孔200微升之PBS-T洗滌兩次後，添加每孔100微升之一次抗體(自IVIgG分離或來自個別人類血清之多株抗A β 自體抗體)(於阻斷緩衝劑中製備之8次連續稀釋液，1:250至1:32000之稀釋液)且將其於室溫下培育2 h。接著將培養盤以每孔200微升PBS-T洗滌四次且添加於阻斷緩衝劑中稀釋2000倍之二級抗體(HRP山羊抗人類IgG，c=1 μ g/ μ L)(每孔100微升，在室溫下培育2 h)。將培養盤以每孔200微升PBS-T洗滌三次且以每孔200微升pH值=5之檸檬酸鹽-磷酸鹽緩衝劑洗滌一次後，添加100 μ L於受質緩衝劑(磷酸鹽-檸檬酸鹽)中c=1 mg/mL之鄰苯二胺二鹽酸鹽(OPD)，其中每10 mL受質緩衝劑含有2 μ L 30%過氧化氫。於Wallac 1420 Victor² ELISA培養盤上量測450 nm下之吸光率。

D. 重組表現之A β (21-37)自體抗體(CSL純系7)與A β 部分序

列的結合

藉由以下間接ELISA比較肽生物素-G₅-Aβ(1-40)、生物素-G₅-Aβ(12-40)及生物素-G₅-Aβ(4-10)與重組表現之Aβ(21-37)自體抗體(CSL純系7)之結合：在室溫下將96孔ELISA培養盤以每孔150微升抗生蛋白鏈菌素溶液(於pH值為7.4之PBS中c=2.5 μg/mL)塗覆2小時。以每孔200微升PBS-T(pH值=7.4之PBS中0.05%吐溫-20 v/v)將孔洗滌四次後，添加每孔100微升經生物素標記之抗原決定基肽(pH值=7.5之PBS中1 μM)且將其於室溫下培育2小時。其後，將培養盤以每孔200微升之PBS-T洗滌四次，且以PBS中5% BSA，0.1%吐溫-20(每孔200微升，在RT下隔夜)阻斷非特异性吸附位點。接著將培養盤以每孔200微升之PBS-T洗滌一次。接著，將於PBS中5% BSA，0.1%吐溫-20，1% DMSO中製備之CSL純系7之8次連續稀釋液添加至孔中。其後，將培養盤在室溫下培育兩小時且隨後以PBS-T洗滌六次。向各孔中添加100 μL於5% BSA，0.1%吐溫-20中稀釋5000倍之過氧化酶山羊抗人類IgG且將培養盤在室溫下培育一小時，接著將其以每孔200微升PBS-T洗滌三次且以pH值=5之0.05 M磷酸鈉-檸檬酸鈉緩衝劑洗滌一次。添加100 μL於受質緩衝劑(磷酸鹽-檸檬酸鹽)中c=1 mg/mL之鄰苯二胺二鹽酸鹽(OPD)，其中每10 mL受質緩衝劑含有2 μL 30%過氧化氫。於Wallac 1420 Victor² ELISA培養盤上量測450 nm下之吸光率。以於缺少生物素標記肽之孔中培育之抗體稀釋液來量測檢定之背景信號。

重組表現之抗A β (21-37)自體抗體CSL純系7(參見實例5)係如上所述，使用生物素-G₅-A β (1-40)、生物素-G₅-A β (12-40)及生物素-G₅-A β (4-10)來評估。圖39展示CSL純系7與A β (1-40)及A β (12-40)結合，但不與A β (4-10)結合。

實例10由本發明抗體防止原纖維形成

將1 mg A β 1-40(PSL Heidelberg)以100 μ l三氟乙酸0.1%(TFA)溶解於LoBind管(Eppendorf)中且在室溫下培育1小時。將溶液以PBS稀釋至1 mM A β 1-40。向100 μ l A β 纖維形成樣本中添加抗體至1.3 μ M之最終濃度。

檢查以下抗體：

- 如實例4所述親和力純化之IVIgG
- 重組抗體CSL純系7(如實例5所述)
- 抗體ACA(美國專利7,195,761 B2)
- 陰性對照CSL360(CSL360為嵌合抗體且當使用生物感應器或ELISA分析測試時不展示與A β (1-40)結合)。

在37°C下於加熱塊上進行培育隔夜。製備pH值為9.2之甘胺酸緩衝劑中2.5 mM 硫代黃素 T(THT)溶液。將100 μ l A β 纖維形成樣本轉移至黑色96孔培養盤(Greiner)中且添加50 μ M THT。24小時後，以Tecan InfiniTE M200培養盤讀取器量測樣本之螢光(激勵450 nm，發射490 nm)。一次量測表示平均25次閃爍。

如圖40所示，所有經測試之A β 抗體展示與陰性對照相比約20%之原纖維化抑制。

實例11來自AD患者與年齡匹配之健康對照者之血清結合

檢定

A：點漬墨法

將新鮮再懸浮於PBS緩衝劑中(樣本-0h)或進行寡聚(樣本-15h)之 $A\beta_{1-15Cys-}$ 及 $A\beta_{1-40Cys-}$ (兩種肽均在N端具有半胱氨酸)之墨點施加於硝化纖維膜(每3微升0.5微克點)。

將膜在室溫下以Roti-Block(Roth)阻斷1 h且接著在4°C下，於20 ml阻斷試劑(RotiBlock)中與10 μ g初級抗體(6E10, Bam90.1, IVIG, CSL-7, ACA)、AD血清(AD1)及來自健康人類個體之血清(K4)一起培育隔夜。在室溫下完成與二級抗體(抗人類HRP：1:100,000；抗小鼠HRP：1:6,000)之培育1 h。根據製造商說明將SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate(Thermo Scientific/Pierce)用作化學發光受質。記錄X線薄膜上之信號歷時10 s-5 min。

如圖41所示，所有對照抗體皆展示對預期抗原決定基之特異性(6E10= $A\beta(1-17)$ ，Bam90.1= $A\beta(13-28)$)。經純化之抗體CSL純系7、抗 $A\beta(21-37)$ 自體抗體(根據實例4純化)、ACA(參見實例5)，以及來自AD血清及健康個體之抗體與 $A\beta_{1-40}$ 寡聚物結合(樣本15h)。僅6E10及AD血清與 $A\beta_{1-15}$ 結合，但不與健康患者之對照血清結合。

又，CSL純系7及如實例4所述自IVIgG純化之 $A\beta(21-37)$ 自體抗體展現與凝集/寡聚形式之 $A\beta(A\beta(1-40)$ 15h，與 $A\beta_{1-40}$ 0h相反)的優先結合。比較而言，對照抗體6E10、Bam90.1及ACA不展示該優先性，而是等同地與兩種 $A\beta$ 結

合。

表 1：點漬墨法分析之概述資料

肽	6E10	Bam90.1	CSL-純 系7	親和力純化之 IVIgG	ACA	血清 AD1	血清 K4
A β 1-40, 0 h	++	++	(trace)	-	+++	-	-
A β 1-40, 15h	++	++	++	+	+++	++	++
A β 1-15, 0h	++	-	-	-	-	+	-
A β 1-15, 15h	++	-	-	-	-	+	-

B：ELISA

將來自血清樣本 (AD1 及年齡匹配健康人類個體，參見以上實例 11A) 之 IgG 在根據製造商說明於蛋白質 G (Pierce) 上純化後裝載於 A β (1-16) 親和力管柱 (根據實例 1 製備) 上，以 PBS 及 pH 值為 6.8 之 10 mM 磷酸鈉洗滌且以 pH 值為 2.8 之 100 mM 甘胺酸溶離。

如實例 9D 所述，將溶離物於經生物素-G₅-A β (4-10) 塗覆之培養盤上以 ELISA 分析。

結果展示與對於來自年齡匹配之健康人類個體之對照樣本所偵測的信號相比，AD 患者血清中 A β (4-10) 抗體之力價較高 (參見圖 42)。

結果表示早期實驗，該實驗暗示至少對於所測試之單一 AD1 血清而言，存在 A β (4-10) 自體抗體，但其量低，具有低親和力，或可能兩者皆有。若此等結果經驗證，則其表明將需要超敏感檢定程序以允許程序變為常規。

實例 12 ELISA、Biacore 及西方墨點法中重組表現之 A β (21-37) 自體抗體之結合特徵

表 2：ELISA 及 Biacore 中重組表現之 A β (21-37) 自體抗體之

結合特徵

抗體	EIA	BIACORE	西方墨點分析
ACA	++++	++++	與所有種類結合
53/60	++++	++++	二聚體結合
53/60	++++	++++	二聚體結合
50/60	+	+++	nt
50/61	+	++	nt
50/62	-	-	nt
50/67	-	-	nt
50/68	-	-	nt
50/69	-	NT	nt
50/148	-	+	nt
47/56	-	-	nt
51/60	++++	+++	二聚體結合
51/61	+	+	nt
51/62	-	-	nt
51/68	-	+	nt
51/148	+	+	nt
52/60	++++	++++	二聚體結合
52/148	+	++	nt
53/68	-	-	nt
53/148	++++	++++	nt
54/60	++	+++	nt
54/61	++	++	二聚體結合
54/62	-	-	nt
54/67	-	未俘獲	nt
54/68	-	-	nt
54/69	-	未俘獲	nt
55/60	+	++	nt
55/61	+++	+++	二聚體結合
55/62	-	-	nt
55/67	-	未俘獲	nt
55/68	-	-	nt
55/69	-	-	nt
55/148	+	+	nt
145/60	+++++	++++	nt

145/61	-	-	nt
145/62	+++	+	nt
145/68	-	-	nt
145/148	++	++	nt
146/60	++++	++++	nt
146/61	++	++	nt
146/62	+	-	nt
146/68	+/?	-	nt
146/148	+	+++	nt
54/148	++	+	nt

+/- ELISA及生物感應器結合之定性評定，其中增加(+)表示ELISA及生物感應器之結合力價增加，表示解離速率或締合速率之改良，其暗示抗體具有相對較高之親和力。

(-) 表示不與經固定之抗體結合

Nt 表示未經測試

於基於與澱粉樣蛋白 β 肽之結合之ELISA測試表現免疫球蛋白之所有抗體。如下所述將生物感應器資料基於抗體與cys二聚體肽之定性親和力結合評定分等級。

以較高量表現且於ELISA或Biacore或西方墨點法中展示結合之抗體為本發明之較佳實施例。未能以較高量表現或於下述任何檢定中不結合並不一定意謂若增進表現或採用更敏感之偵測法此等抗體將不具有功能性。

A：A β 肽製備

將經凍乾之1 mg A β 蛋白片段1-40(A β (1-40))肽(Sigma)再懸浮於200 μ l 1,1,1,3,3,3-六氟-2-丙醇(HFIP)(Sigma)中，至1.5 ml Eppendorf管中製成等分試樣且凍乾隔夜。將製成等分試樣之A β (1-40)肽以1 mg/ml以二甲亞砜(DMSO, ICN)再

懸浮且儲存在4°C下。此物質稱作A β 1-40單體。

為使A β (1-40)肽寡聚，將A β (1-40)單體於1 X PBS(137 mM NaCl, 10 mM磷酸鹽, 2.7 mM KCl)中稀釋至0.1 mg/ml，且在37°C下培育3至6天，且接著儲存在4°C下，此物質稱作A β (1-40)寡聚物。

將具有N端半胱氨酸殘基之A β 蛋白片段1-40肽(A β (1-40 Cys))自凍乾狀態以5.9 mg/ml再懸浮於ddH₂O中，且儲存在-80°C下。接著將A β (1-40 Cys)肽於1 X PBS中稀釋至0.1 mg/ml，且儲存在4°C下，此物質稱作A β (1-40 Cys)寡聚物。

B: 抗 β 澱粉樣蛋白抗體ELISA方案

在4°C下，在Nunc Maxisorb 96孔培養盤上將A β (1-40)單體、A β (1-40)寡聚物、A β (1-40 Cys)寡聚物及使用牛血清白蛋白(Sigma)或抗蛋白酶(Sigma)之對照培養盤以1 μ g/ml固定於PBS(每孔50微升)中隔夜。將孔以350 μ l洗滌緩衝劑(1 X PBS, 0.05%(v/v)吐溫-20(Sigma))洗滌一次。接著將孔在室溫下以阻斷緩衝劑(PBS中2%(w/v)Difco脫脂牛奶(BD)，每孔50-150微升)阻斷2小時且以350 μ l洗滌緩衝劑洗滌一次。

將初級抗體以於抗體緩衝劑(PBS中1%(w/v)牛血清白蛋白(Sigma), 0.05%吐溫-20(Sigma))中100 μ g/ml之起始濃度於V形底孔96孔培養盤(Nunc)中以1:2連續稀釋。

以1 μ g/ml之起始濃度分析對照抗體(例如6E10 mAb(Sigma)及ACA)。

將100 μl 初級抗體以連續稀釋轉移至Nunc Maxisorb培養盤中且在室溫下培育2-3小時。將孔以350 μl 洗滌緩衝劑快速洗滌三次。

添加1:1000於抗體緩衝劑(每孔50微升)中之二級抗體綿羊抗人類IgG-HRP及綿羊抗小鼠IgG-HRP(Chemicon)，且在室溫下培育30分鐘。

接著將孔以350 μl 洗滌緩衝劑洗滌三次，且以TMB受質(Millipore, Australia)(每孔50微升)使培養盤顯影5分鐘。以2 M磷酸(每孔25 μl)停止反應且於Wallac Victor 2培養盤讀取器中在450 nm下，0.1秒讀取培養盤。

C：A β (1-40)與重組表現之A β (21-37)自體抗體之相互作用的生物感應器分析

肽樣本製備：

用於對所俘獲單株抗體進行分析之肽製備係如以上"A β 肽製備"部分中所描述。

生物感應器免疫球蛋白俘獲表面製備：

使用人類抗體俘獲套組(Biacore, Sweden)根據製造商說明以5 $\mu\text{l}/\text{min}$ 之流動速率製備抗人類免疫球蛋白生物感應器晶片，其中在NHS/ECD固定期間具有6分鐘之接觸時間。在所有通道上達成大約10000個共振單位。

俘獲條件：

所有抗體係以20 $\mu\text{l}/\text{min}$ 之流動速率俘獲(0.1 mg/ml BSA, Hepes緩衝生理食鹽水中25 $\mu\text{g}/\text{ml}$)歷時2 min。在所有實驗中，流槽1用作使用人類IgG1對照抗體(Chemicon,

Australia)之基線扣除對照通道。

使用其餘3個通道來俘獲對照抗體(ACA)或人類單株抗體以測試肽結合。接著以30 $\mu\text{l}/\text{min}$ 之流動速率，於所有通道上同時分析與俘獲抗體之肽結合(60 μl)，且使其解離300-600秒，隨後根據說明書使用5 μl 3M MgCl_2 注射液自感應器表面解吸附。

使所有樣本冷卻，隨後在12 $^{\circ}\text{C}$ 下使用與生物感應器2000(GE, Sweden)連接之Multitemp(GE, Sweden)分析。

對所有單株抗體進行第二次對照實驗，其中在抗體俘獲後直接注射60 μl 0.1 mg/ml BSA，Hepes緩衝生理食鹽水之注射液以考慮人類單株抗體自經固定之俘獲抗體的解離。將此結果自使用BIA評估軟體(GE, Sweden)，使用肽產生之資料手動扣除。

在所有實驗中，在0.1 mg/ml BSA，Hepes緩衝生理食鹽水中20-50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 下分析 $A\beta(1-40 \text{ Cys})$ 寡聚物。分析前，將 $A\beta(1-40)$ 單體自100% DMSO中1 mg/ml儲備液稀釋至0.1 mg/ml BSA，Hepes緩衝生理食鹽水中10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

圖43至45展示此分析所獲得之結果。而ACA對照抗體展示與 $A\beta(1-40)$ 單體及 $A\beta(1-40 \text{ Cys})$ 寡聚物之等同結合，多數本發明抗體展示與 $A\beta(1-40 \text{ Cys})$ 寡聚物之優先結合。

D：抗 β 澱粉樣蛋白抗體N-三羥甲基甘胺酸(Tricine)SDS-PAGE及西方墨點法方案

將Novex預製10-20% N-三羥甲基甘胺酸凝膠10孔(Invitrogen)以每孔0.5 μg 肽(20 μl 中)裝載(0.5 μg / 20 μl =25

μg/ml)。

分子量標誌之製備：將 20 μl 2X N-三羥甲基甘胺酸樣本緩衝劑-非還原 (TSB-NR)(300 mM Tris-HCl, pH 值為 8.45, 24% 甘油, 8% SDS, 0.005% 庫馬斯藍 G, 0.005% 酚紅) 添加至 20 μl 預染色標誌 (Bio-Rad) 中且每孔使用 20 μl。

樣本之製備：

100 μl 1X TSB-NR 裝載樣本係如下製備：

肽：

	儲備液	稀釋液	100 μl
Aβ 1-40 單體	1.0 mg/ml	1/40	2.5 μl + 47.5 μl ddH ₂ O + 50 μl 2X TSB-NR
Aβ 1-40 寡聚物	0.1 mg/ml	1/4	25 μl + 25 μl ddH ₂ O + 50 μl 2X TSB-NR
Aβ 1-40 Cys 寡聚物	0.1 mg/ml	1/4	25 μl + 25 μl ddH ₂ O + 50 μl 2X TSB-NR

將各凝膠如下以 10 色帶格式安裝，使得各測試抗體兩側為分子量標誌色帶及空白緩衝劑色帶。為簡單起見，對分子量位置作標誌。

- 1) 預染色標誌
- 2) Aβ 1-40 單體
- 3) Aβ 1-40 寡聚物
- 4) Aβ 1-40 Cys 寡聚物
- 5) 1X TSB-NR
- 6) 預染色標誌
- 7) Aβ 1-40 單體
- 8) Aβ 1-40 寡聚物
- 9) Aβ 1-40 Cys 寡聚物

10) 1X TSB-NR

將另一凝膠如上進行跑膠且藉由庫馬斯及深紫染色對蛋白質進行染色。較低敏感性之庫馬斯展示肽主要為色帶2及3中之單體及色帶4中之二聚體(或分別為圖47及48中標記為1、2及3之色帶7、8及9)。較高敏感性深紫揭示各色帶中之寡聚物梯級，其與mab 6E10及ACA之染色圖案一致。

N-三羥甲基甘胺酸凝膠係於具有含有N-三羥甲基甘胺酸SDS電泳緩衝劑(0.1 M Tris鹼，0.1 M N-三羥甲基甘胺酸，0.1% SDS)之內及外緩衝劑腔室之XCell SureLock 迷你槽(Invitrogen)中跑膠。施加125 V歷時90分鐘來完成電泳分離。

接著使用XCell SureLock迷你槽(Invitrogen)中之XCell II漬墨模組(Invitrogen)，按照膜濾紙夾層(Invitrogen)將凝膠轉移至硝化纖維。以冷卻之1X Tris-甘胺酸轉移緩衝劑(12 mM Tris鹼，96 mM甘胺酸，20%甲醇)填充內部XCell II漬墨模組腔室，且以冷卻之蒸餾水填充外腔室。

藉由施加25 V歷時1.5小時來達成轉移且隨後將硝化纖維膜在4°C下，於50 ml阻斷緩衝劑(PBS中2%(w/v)Difco脫脂牛奶(BD)中阻斷隔夜。

將初級抗體、對照抗體6E10及ACA以於10 ml，1%(w/v)PBS中之牛血清白蛋白(Sigma)，0.05%吐溫-20(Sigma)中0.5 µg/ml添加至膜中，且以10-20 µg/ml添加重組Aβ(21-37)，且將其於震盪下培育2-3小時。將膜以50 ml

洗滌緩衝劑(1X PBS, 0.05%(v/v)吐溫-20(Sigma))洗滌3次歷時10分鐘。以於10 ml緩衝劑(如上)中0.5 µg/ml添加二級抗體, 綿羊抗人類IgG-HRP及綿羊抗小鼠IgG-HRP(Chemicon), 且將其與膜一起在震盪下培育30分鐘。

將膜以50 ml洗滌緩衝劑洗滌3次歷時10分鐘且隨後於Amersham Hyperfilm ECL(GE Lifesciences)上, 以ECL Plus(Perkin-Elmer)顯影。

圖48: 當使用以上方案信號在偵測臨限以下時, 將膜以洗滌緩衝劑洗滌3次且接著另外在RT下以生物素標記之抗人類IgG1(Sigma純系8c/6-39, 1:2000)探測30-60分鐘。接著將膜如上洗滌。接著添加抗生蛋白鏈菌素過氧化酶(1:4000, Chemicon)歷時30分鐘且再次洗滌膜。此額外步驟擴增信號且產生使用如上所述之ECL受質偵測。圖48中使用經擴增之偵測系統。

不將如以西方墨點分析所探測之相當凝膠轉移至硝化纖維。將一半根據製造商說明以庫馬斯藍(Novex, Invitrogen)染色且使另一半根據製造商說明進行深紫高蛋白敏感性染色(GE, Sweden)。

實例13斑塊沈積(Taconic小鼠)

斑塊評估

材料:

將3 µm厚之鼠腦組織切片安置於來自Mentzel Glas之顯微鏡載片上且以6F3D抗體免疫染色(參見方案: 免疫組織化學)。

透射光顯微鏡：Eclipse 80i，含有Plan Achromat物鏡，2×-40×放大倍率；Nikon Instruments Europe, Nikon GmbH, Duesseldorf, Germany

成像軟體：NIS-Elements BR軟體2.3版，Nikon；Nikon Instruments Europe, Nikon GmbH, Duesseldorf, Germany

數位視鏡：2Megapixel數位相機，Nikon(Nikon Instruments Europe, Nikon GmbH, Duesseldorf, Germany)。

Excel軟體 (Microsoft Office 2003, Microsoft Corp. Redmont, USA.)

方法：

使用上述相機以40×放大倍率拍攝數位RGB照片。藉由記錄定義強度臨限、最小及最大直徑之每一步驟，排除(例如)脈管("中間有孔洞之目標物")以確保每一分析之參數相等來建立宏。藉由應用量測框來界定所關注之區域。在此區域內，使用上述標準來鑑別擬合於宏所提供之方案內之"目標物"(像素叢集)。由用於扣除背景之軟體建立二元圖片。每個位置分析五個獨立場(獨立評估皮質及海馬形成)。由軟體匯總五個分析值資料且提供小統計分析，如每量測面積之斑塊數目，斑塊面積份額及量測面積百分比。將每一目標物之詳細資料輸入excel檔案以供進一步分析。

場數目	1			
目標物數目	7			
每場之目標物	7			
量測面積	33152,5[μm^2]			

面積分數	0,000211146/[μm^2]			
	0,152147			
特徵	平均值	標準偏差	最小值	最大值
面積	720,58	1438,5	0,072697	4222,5
Eq直徑	19,112	23,499	0,30424	73,323
周長	106,58	169,48	0,94227	514,37
寬度	7,5773	5,9398	0,20097	17,626
圓	0,70335	0,24485	0,20055	1
量測面積	33152	0	33152	33152

特別重要者為"面積分數"，因為其等於斑塊面積(作標誌面積)佔量測面積(總面積)之百分比。

所量測之特徵：

面積

面積為主要尺寸標準。在未經校正之系統中，其表示像素數目；在經校正系統中，其表現真實面積(以 μm^2 給出)。

面積分數

面積分數為分區段影像面積與量測面積之比率(定義為：所選擇之場之平方單位)。

面積分數=面積/量測面積

圓度

僅有圓之圓度等於"1"；所有其他形狀係以小於"1"之圓度值表徵。其為導出形狀量度，係由面積及周長計算。此特徵適用於檢查形狀特徵。

圓度= $4 * \pi * \text{面積} / \text{周長}^2$

Eq直徑

當量直徑(Eq直徑)為源自面積之尺寸特徵。其測定與所量測目標物具有相同面積之圓之直徑。

Eq 直徑 = $\sqrt{(4 * \text{面積} / \pi)}$

每面積之目標物

每平方單位所選場(量測面積)中之目標物數目

周長

周長為總邊度量度。其包括外邊界及內邊界(若目標物內存在孔洞)。周長係使用 Crofton 氏公式，由 0、45、90 及 135 度方向上之四個投影計算。

周長 = $\pi * (\text{Pr}0 + \text{Pr}45 + \text{Pr}90 + \text{Pr}135) / 4$

寬度

寬度為適用於狹長或較薄結構之導出特徵。其係基於桿模型且係根據下式計算：

寬度 = 面積 / 長度

【圖式簡單說明】

圖 1：用於質譜抗原決定基鑑別之抗原決定基切除及抗原決定基萃取之原則。具有原生二硫鍵結之抗體免疫球蛋白一般對內切蛋白酶(例如胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、AspN-蛋白酶)之蛋白水解消化具有高度抗性，且包含抗原決定基-互補位相互作用結構之抗原多肽之抗原決定基區域一般受保護而免於免疫複合物中之蛋白水解降解，而游離未結合區易進行消化。因此，接著在蛋白水解移除且沖洗去未結合結構後仍與抗體結合之抗原決定基序列自抗體解離且藉由質譜法鑑別。已發現電噴霧離子化(ESI)及基質輔助雷射脫附離子化(MALDI)為適用之質譜法，且已成功地應用於抗原決定基鑑別。"TFA" 意謂三氟乙酸。

"MALDI-MS"代表基質輔助雷射脫附離子化質譜法。

圖2：游離可溶A β 肽之蛋白水解肽片段之質譜鑑別。在不藉由抗體結合複合下，由胰蛋白酶消化A β (1-40)引起形成根據蛋白水解裂解特異性所預期之所有肽片段(A β (1-5)、A β (6-16)、A β (17-28)、A β (17-40)、A β (1-16))。質譜分析係藉由高解析度MALDI-傅立葉轉換-離子回旋加速器共振(MALDI-Fouriertransform-ion cyclotron resonance)(MALDI-FTICR-MS)來進行，該MALDI-FTICR-MS提供約100,000質量解析度下離子完全同位素解析及通常1-5 ppm之質量測定精確度的譜。所有FTICR-MS譜係由裝備有Apollo II電噴霧/奈米電噴霧多埠離子來源及具有脈衝式碰撞氣體之外部Scout 100全自動X-Y靶階段MALDI來源的Bruker(Bruker Daltonik, Bremen, Germany)Apex II 7T FT-ICR質譜儀獲得。脈衝式氮雷射係在337 nm下操作。由雷射發射所產生之離子在15 V下於六極器中積聚0.5-1 sec，且在-7 V下萃取至分析器單元中。將2,5-二羥基苯甲酸(DHB, Aldrich, Germany)於乙腈：水中0.1% TFA(2:1)中之100 mg/ml 溶液用作基質。將0.5 μ l樣本溶液於不鏽鋼MALDI樣本靶上混合且使其乾燥。典型ESI條件為約2 kV針電壓及100 nA噴霧電流。使離子於六極器中積聚2 sec且接著將其轉移至圓柱體ICR單元中。"ppm"代表每百萬份中之份數。"m/z"表示質荷比。

圖3：藉由MALDI-FTICR-MS之澱粉樣蛋白斑塊特異性抗體之抗原決定基鑑別：由在以A β (1-42)或A β (1-42)所衍

生之凝集體使轉殖基因小鼠主動免疫後產生之斑塊特異性抗體辨識的N端A β 抗原決定基之質譜鑑別。將經固定，純化之抗體與A β (1-40)、A β (1-42)一起培育且免疫複合物經受由蛋白酶胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、Glu-C蛋白酶及Asp-N-蛋白酶之抗原決定基切除。左側譜展示胰蛋白酶消化後仍保持結合之片段A β (1-16)，右側譜展示使用Glu-C蛋白酶抗原決定基切除後之A β (1-11)。所展示之A β 序列中展示之黑色小箭頭表示藉由抗原決定基切除所鑑別之裂解，灰色粗箭頭表示A β 上發現於抗體結合後經遮蔽之基質裂解位點。相同A β (4-10)抗原決定基序列係以作為抗原結合之可溶A β 斑塊及基原纖維鑑別且係來自小鼠抗A β (1-16)肽單株抗體 (Bachem-Peninsula Laboratories, San Francisco)。

圖 4：如實例 4 所述，在存在或不存在抗 A β (21-37) 自體抗體下 A β 寡聚物對人類神經母細胞瘤細胞 (SH-Sy5y) 之毒性。OD：光學密度。

圖 5：如實例 1 所述，藉由 A β (12-40) 抗原決定基特異性親和力層析法分離之多株血清抗 A β (21-37) 自體抗體自 AD 患者 (AD77) 之 1D-凝膠電泳分離。KDa：以千道爾頓計之分子量。IgG：免疫球蛋白 G。DTT：二硫蘇糖醇。

圖 6：藉由抗原決定基切除質譜法鑑別 A β (21-37) 作為由人類抗 A β (21-37) 自體抗體辨識之抗原決定基。上圖展示 A β (1-40) 序列，其中以黑色箭頭表示不同蛋白酶之裂解。在使用鏈黴蛋白酶進行抗原決定基切除後鑑別以 A β 序列上

方之實心黑色箭頭表示之肽片段；藉由使用胰蛋白酶及 Glu-C-蛋白酶 (R5、E11、K16) 進行抗原決定基切除發現以 $A\beta$ 序列下之黑色虛線箭頭表示之肽片段；注意 Arg-5 在具有斑塊特異性抗體之免疫複合物中經完全遮蔽，而在具有抗 $A\beta(21-37)$ 自體抗體之免疫複合物中完全裂解。發現於游離 $A\beta$ 中所觀測到之以折斷箭頭表示的裂解位置在抗 $A\beta(21-37)$ 自體抗體結合後經遮蔽 (Glu-C：E22、D23；胰蛋白酶：K28)。此處展示經鏈黴蛋白酶部分消化 (2 小時) 後之 MALDI-MS 分析以供說明。

圖 7：自藉由 $A\beta(4-10)$ 抗原決定基特異性層析法分離之阿茲海默患者血清 $A\beta$ 自體抗體分離辨識 N 端 $A\beta(4-10)$ 抗原決定基之 "斑塊特異性" 抗體。IgG 代表免疫球蛋白 G。AD 表示阿茲海默氏症。親和力管柱：G5 $A\beta(4-10)$ 。KDa：以千道爾頓計之分子量。

圖 8：辨識 $A\beta(4-10)$ 抗原決定基之斑塊特異性、斑塊分解 $A\beta$ 抗體及辨識 $A\beta(21-37)$ 羧基端抗原決定基之抗 $A\beta(21-37)$ 自體抗體的分子辨識機制。

圖 9： $A\beta(12-40)$ 抗原決定基特異性親和力管柱之結構及用於分離抗 $A\beta(21-37)$ 自體抗體之實驗程序。Cys- $A\beta(12-40)$ ：與半胱氨酸偶合之 $A\beta(12-40)$ 肽。

圖 10：用於親和力分離之抗 $A\beta(21-37)$ 自體抗體之序列測定的分析流程及實驗程序：N-端蛋白質序列分析；恆定區序列之 2D-電泳分離、凝膠內蛋白水解消化及高解析度 FTICR-MS 鑑別；肽片段之蛋白水解消化及 HPLC 分離，隨

後 a)Edman 序列測定； b)LC-MS/MS 序列測定； c)恆定區部分序列之 MALDI-TOFMS 鑑別； 恆定 / 可變部分序列之 MALDI-FTICR-MS 鑑別。

圖 11：用於指定血清 IVIgG 抗 A β (21-37) 自體抗體之重鏈與輕鏈序列對之實驗程序的分析流程。

圖 12：自 IVIgG 分離之多株抗 A β (21-37) 自體抗體之 2 維 SDS 凝膠電泳分離；關於 A β 抗體同功異型物之鑑別及序列測定參見圖 22 (a-c)。DTT：二硫蘇糖醇。CHAPS：3-[(3-膽鹼胺基丙基)-二甲基-銨基]-1-丙烷磺酸酯。

圖 13：血清 IVIgG 抗 A β (21-37) 自體抗體之重鏈與輕鏈之 1D-SDS-PAGE 分離。a) 還原 (10000 \times DTT)； b) 烷基化 (3 \times 碘乙醯胺 / DTT)。LMW：低分子量蛋白質標準。

圖 14：經 HPLC 分離之抗 A β (21-37) 自體抗體重鏈與輕鏈的 1D-凝膠電泳分離以供 Edman 序列測定。LMW：低分子量蛋白質標準。

圖 15：PVDF 膜上血清 IVIgG 抗 A β (21-37) 自體抗體重鏈及輕鏈之 1D-凝膠電泳分離及漬墨以供 Edman 序列測定。

圖 16：重鏈胰蛋白酶肽之 HPLC 分離。對經分離之肽溶解份進行 a)Edman 序列分析， b)LC-MS/MS 序列測定， c)直接 MALDI-TOF-MS 及 d)MALDI-FTICR-MS 分析。

圖 17：輕鏈胰蛋白酶肽之 HPLC 分離。對經分離之肽溶解份進行 a)Edman 序列分析， b)LC-MS/MS 序列測定， c)直接 MALDI-TOF-MS 及 d)及 MALDI-FTICR-MS 分析。

圖 18(a-d)：經 HPLC 分離之重鏈胰蛋白酶肽、血清

IVIG_G1_HC(1)_1 c(348-359; EPQVYTLPPSR)之Edman序列測定。18a：標準。18b：殘基1。18c：殘基9。18d：殘基11。

圖 19(a-c)：重鏈胰蛋白酶 HPLC 肽、溶離份 27 (a) 及 HPLC 溶離份 39、重鏈 CDR1 肽 v (20-30) 之 LC-MS/MS 序列測定。圖 19a 展示總離子色譜，且以紅色環繞 1.3-2.1 min 溶離時間分離之肽溶離份。(b) 於 1.3-2.1 min 分離之肽溶離份之 ESI-質譜；(c) 所選擇之帶雙電荷前驅物離子之 MS/MS 碎片離子分析， m/z 482.2。

圖 20(a, b)：胰蛋白酶 HPLC 肽之 MALDI-TOF-MS 鑑別。a) 胰蛋白酶肽，溶離份 50，重鏈(138-151)之鑑別，莫耳質量 1423；b) 溶離份 75 中分離之肽，重鏈(375-396)之鑑別，莫耳質量 2544 Da。

圖 21(a-c)：來自 HPLC 溶離份 47、66 及 96 之重鏈恆定區胰蛋白酶肽之 MALDI-FTICR-質譜鑑別。(a) 溶離份 47 中分離之 3 種肽(於分子離子峰上表示)，(349-359)、(349-364)、(137-151) 的鑑別；(b) 溶離份 66 中之 2 種肽，(260-278) 及 (279-292) 的鑑別；(c) 溶離份 96 中之肽(306-321) 的鑑別。

圖 22(a-c)：如圖 12 所說明，自進行凝膠內胰蛋白酶消化之 2D-凝膠帶分離之包含血清 IVIgG1 重鏈恆定區的序列之 MALDI-FT-ICR 鑑別；點 4 重鏈(22a)、點 12 重鏈(22b) 及點 13 重鏈(22c)。序列測定係使用 NCBI 資料庫以 5-10 ppm 之質量精確性臨限進行。

圖 23a 至 c：給出關於經鑑別且定序之對 A β 肽之 C 端部分具特異性，尤其對 A β (21-37) 具特異性的抗體之概述之表。該表提供抗體鏈樣本之名稱、樣本來源、經定序之免疫球蛋白鏈之類型、經驗證之輕鏈與重鏈之相互作用(表示連接形式之搭配物鏈的名稱)以及個別免疫球蛋白鏈之確證同功異型物，及對於 CDR1、CDR2 及 CDR3 鑑別之 CDR 序列類型。圖 23a：IVIG_(1)_A'；IVIG_(2)_B'；IVIG_(3)；IVIG_(4)_A；IVIG_(5)_B；IVIG_(6)；IVIG_(7)；IVIG_(8)；血清_(9)；血清_(10)；血清_(11)；圖 23b：IVIG_(12)；IVIG_(13)；IVIG_(14)；IVIG_(15)；IVIG_(16)；IVIG_(17)；IVIG_(18)；IVIG_(19)；IVIG_(20)；IVIG_(21)。圖 23c：血清_(22)；血清_(23)；血清_(24)；血清_(25)。

圖 24a 至 q：表示所有經定序抗體鏈之經鑑別之 CDR 類型及對應一致序列的表。CDR 編號與圖 23 中所使用之 CDR 編號相對應。圖 24a：重鏈 CDR；圖 24b：輕鏈(λ 鏈以及 κ 鏈)CDR；圖 24c：重鏈 CDR1 之 CDR 一致序列；圖 24d：重鏈 CDR2 之 CDR 一致序列；圖 24e：重鏈 CDR3 之 CDR 一致序列；圖 24f： κ 輕鏈 CDR1 之 CDR 一致序列；圖 24g： κ 輕鏈 CDR2 之 CDR 一致序列；圖 24h： κ 輕鏈 CDR3 之 CDR 一致序列；圖 24i：重鏈 CDR1 之較佳一致序列；圖 24j：重鏈 CDR1 之更佳一致序列；圖 24k：重鏈 CDR1 之更佳一致序列。圖 24l：重鏈 CDR2 之較佳一致序列；圖 24m：重鏈 CDR2 之更佳一致序列；圖 24n：重鏈 CDR2 之更佳一致序

列；圖 24o：重鏈 CDR3 之較佳一致序列；圖 24p：重鏈 CDR3 之更佳一致序列；圖 24q：重鏈 CDR3 之更佳一致序列。

圖 25a 至 l：來自血清 IVIgG 之抗 A β (21-37) 自體抗體及個別血清抗 A β (21-37) 自體抗體之輕鏈可變區序列的胺基酸序列(關於序列概述，參見圖 23)。所採用之定序法之代碼(Edman；Edman-蛋白 N 端；MALDI-TOF-MS；MALDI-FTICR-MS；LC-MS/MS)及 CDR 序列之註解係於各序列底部指出。CDR 係以方框表示。

圖 25a：樣本 IVIG_(1)_A' 之輕鏈 κ 可變區之胺基酸序列 (SEQ ID NO: 47)。

圖 25b：樣本 IVIG_(2)_B' 之輕鏈 κ 可變區之胺基酸序列 (SEQ ID NO: 48)。

圖 25c：樣本 IVIG_(3) 之輕鏈 λ 可變區之胺基酸序列 (SEQ ID NO: 49)。

圖 25d：樣本 IVIG_(6) 之輕鏈 κ 可變區之胺基酸序列 (SEQ ID NO: 50)。

圖 25e：樣本 IVIG_(7) 之輕鏈 κ 可變區之胺基酸序列 (SEQ ID NO: 51)。

圖 25f：樣本 IVIG_(8) 之輕鏈 κ 可變區之胺基酸序列 (SEQ ID NO: 52)。

圖 25g：樣本血清_(9) 之輕鏈 κ 可變區之胺基酸序列 (SEQ ID NO: 53)。

圖 25h：樣本血清_(10) 之輕鏈 κ 可變區之胺基酸序列

(SEQ ID NO: 54)。

圖 25i：樣本血清_(11)之輕鏈 κ 可變區之胺基酸序列(SEQ ID NO: 55)。

圖 25j：樣本血清_(9)之輕鏈 κ 可變區之胺基酸序列(SEQ ID NO: 145)。

圖 25k：樣本血清_(9)之輕鏈 κ 可變區之胺基酸序列(SEQ ID NO: 146)。

圖 25l：樣本血清_(9)之輕鏈 κ 可變區之胺基酸序列(SEQ ID NO: 147)。

圖 26a 至 q：來自血清 IVIgG 之抗 A β (21-37) 自體抗體及個別血清抗 A β (21-37) 自體抗體之重鏈可變區序列的胺基酸序列(關於序列概述，參見圖 23)。所採用之定序法之代碼 (Edman；Edman-蛋白 N 端；MALDI-TOF-MS；MALDI-FTICR-MS；LC-MS/MS) 及 CDR 序列之註解係於各序列底部指出。CDR 係以方框表示。

圖 26a：樣本 IVIG_(4)_A 之重鏈可變區之胺基酸序列 (SEQ ID NO: 56)。

圖 26b：樣本 IVIG_(5)_B 之重鏈可變區之胺基酸序列 (SEQ ID NO: 57)。

圖 26c：樣本 IVIG_(12) 之重鏈可變區之胺基酸序列 (SEQ ID NO: 58)。

圖 26d：樣本 IVIG(13) 之重鏈可變區之胺基酸序列 (SEQ ID NO: 59)。

圖 26e：樣本 IVIG_(14) 之重鏈可變區之胺基酸序列 (SEQ

ID NO: 60)。

圖 26f：樣本 IVIG_(15)之重鏈可變區之胺基酸序列 (SEQ ID NO: 61)。

圖 26g：樣本 IVIG_(16)之重鏈可變區之胺基酸序列 (SEQ ID NO: 62)。

圖 26h：樣本 IVIG_(17)之重鏈可變區之胺基酸序列 (SEQ ID NO: 63)。

圖 26i：樣本 IVIG_(18)之重鏈可變區之胺基酸序列 (SEQ ID NO: 64)。

圖 26j：樣本 IVIG_(19)之重鏈可變區之胺基酸序列 (SEQ ID NO: 65)。

圖 26k：樣本 IVIG_(20)之重鏈可變區之胺基酸序列 (SEQ ID NO: 66)。

圖 26l：樣本 IVIG_(21)之重鏈可變區之胺基酸序列 (SEQ ID NO: 67)。

圖 26m：樣本血清_(22)之重鏈可變區之胺基酸序列 (SEQ ID NO: 68)。

圖 26n：樣本血清_(23)之重鏈可變區之胺基酸序列 (SEQ ID NO: 69)。

圖 26o：樣本血清_(24)之重鏈可變區之胺基酸序列 (SEQ ID NO: 70)。

圖 26p：樣本血清_(25)之重鏈可變區之胺基酸序列 (SEQ ID NO: 71)。

圖 26q：樣本 IVIG_(14)之重鏈可變區之胺基酸序列 (SEQ

ID NO: 148)。

圖 27a 至 c：抗 A β (21-37) 自體抗體鏈之 κ 及 λ 輕鏈恆定區之胺基酸序列。V192L 處之 LC- κ -恆定區序列突變係以粗體字表示。

圖 27a：同功異型物 1 之恆定區輕鏈 κ 之完全胺基酸序列 (SEQ ID NO: 72)。

圖 27b：同功異型物 2 之恆定區輕鏈 κ 之完全胺基酸序列 (SEQ ID NO: 73)。

圖 27c：恆定區輕鏈 λ 之完全胺基酸序列 (SEQ ID NO: 74)。

圖 28a 至 c：所鑑別之 IVIgG 抗 A β (21-37) 自體抗體重鏈之恆定區的胺基酸序列及序列同功異型物。於 F300Y、N301A(N-糖基化位點)、F304Y、G331A、D360E、L362M、S368T 及 V401M 處鑑別之胺基酸突變係以粗體字表示。N-301ST 處之 N-糖基化一致序列及位點係以帶陰影方框及粗體灰色字來表示。

圖 28a：同功異型物 1 之恆定區重鏈之完全胺基酸序列 (SEQ ID NO: 75)。

圖 28b：同功異型物 2 之恆定區重鏈之完全胺基酸序列 (SEQ ID NO: 76)。

圖 28c：同功異型物 3 之恆定區重鏈之完全胺基酸序列 (SEQ ID NO: 77)。

圖 29a 至 p：來自血清 IVIgG 及個別血清之抗 A β (21-37) 自體抗體輕鏈之完全胺基酸序列(關於樣本概述參見圖 23)。

所採用之定序法之代碼 (Edman ; Edman- 蛋白 N 端 ; MALDI-TOF-MS ; MALDI-FTICR-MS ; LC-MS/MS) 及 CDR 序列之註解係於各序列底部指出。CDR 係以方框表示。發現具有單一位點突變之恆定區序列中可變序列域及單一胺基酸殘基係以粗體字表示。

圖 29a : 樣本 IVIG_(1)_A' , 恆定區同功異型物 1 之輕鏈 κ 之完全胺基酸序列 (SEQ ID NO: 78)。

圖 29b : 樣本 IVIG_(1)_A' , 恆定區同功異型物 2 之輕鏈 κ 之完全胺基酸序列 (SEQ ID NO: 79)。

圖 29c : 樣本 IVIG_(2)_B' , 恆定區同功異型物 1 之輕鏈 κ 之完全胺基酸序列 (SEQ ID NO: 80)。

圖 29d : 樣本 IVIG_(2)_B' , 恆定區同功異型物 2 之輕鏈 κ 之完全胺基酸序列 (SEQ ID NO: 81)。

圖 29e : 樣本 IVIG_(3) 之輕鏈 λ 之完全胺基酸序列 (SEQ ID NO: 82)。

圖 29f : 樣本 IVIG_(6) , 恆定區同功異型物 1 之輕鏈 κ 之完全胺基酸序列 (SEQ ID NO: 83)。

圖 29g : 樣本 IVIG_(6) , 恆定區同功異型物 2 之輕鏈 κ 之完全胺基酸序列 (SEQ ID NO: 84)。

圖 29h : 樣本 IVIG_(7) , 恆定區同功異型物 1 之輕鏈 κ 之完全胺基酸序列 (SEQ ID NO: 85)。

圖 29i : 樣本 IVIG_(7) , 恆定區同功異型物 2 之輕鏈 κ 之完全胺基酸序列 (SEQ ID NO: 86)。

圖 29j : 樣本 IVIG_(8) , 恆定區同功異型物 1 之輕鏈 κ 之完

全胺基酸序列 (SEQ ID NO: 87)。

圖 29k：樣本 IVIG_(8)，恆定區同功異型物 2 之輕鏈 κ 之完全胺基酸序列 (SEQ ID NO: 88)。

圖 29l：樣本血清_(9)，恆定區同功異型物 1 之輕鏈 κ 之完全胺基酸序列 (SEQ ID NO: 89)。

圖 29m：樣本血清_(9)，恆定區同功異型物 2 之輕鏈 κ 之完全胺基酸序列 (SEQ ID NO: 90)。

圖 29n：樣本血清_(10)，恆定區同功異型物 1 之輕鏈 κ 之完全胺基酸序列 (SEQ ID NO: 91)。

圖 29o：樣本血清_(11)，恆定區同功異型物 1 之輕鏈 κ 之完全胺基酸序列 (SEQ ID NO: 92)。

圖 29p：樣本血清_(11)，恆定區同功異型物 2 之輕鏈 κ 之完全胺基酸序列 (SEQ ID NO: 93)。

圖 30-1 至 30-44：來自血清 IVIgG 及個別血清之抗 $A\beta(21-37)$ 自體抗體重鏈之完全胺基酸序列 (關於樣本概述參見圖 23)。所採用之定序法之代碼 (Edman；Edman-蛋白 N 端；MALDI-TOF-MS；MALDI-FTICR-MS；LC-MS/MS) 及 CDR 序列之註解係於各序列底部指出。CDR 係以方框表示。發現具有單一位點突變之恆定區序列中可變序列域及單一胺基酸殘基係以粗體字表示。N-糖基化位點，N-301 係以粗體灰色字表示。

圖 30-1：樣本 IVIG_(4)_A，恆定區同功異型物 1 之重鏈之完全胺基酸序列 (SEQ ID NO: 94)。

圖 30-2：樣本 IVIG_(4)_A，恆定區同功異型物 2 之重鏈

之完全胺基酸序列(SEQ ID NO: 95)。

圖 30-3：樣本 IVIG_(4)_A，恆定區同功異型物 3 之重鏈之完全胺基酸序列(SEQ ID NO: 96)。

圖 30-4：樣本 IVIG_(5)_B，恆定區同功異型物 1 之重鏈之完全胺基酸序列(SEQ ID NO: 97)。

圖 30-5：樣本 IVIG_(5)_B，恆定區同功異型物 2 之重鏈之完全胺基酸序列(SEQ ID NO: 98)。

圖 30-6：樣本 IVIG_(5)_B，恆定區同功異型物 3 之重鏈之完全胺基酸序列(SEQ ID NO: 99)。

圖 30-7：樣本 IVIG_(12)_B，恆定區同功異型物 1 之重鏈之完全胺基酸序列(SEQ ID NO: 100)。

圖 30-8：樣本 IVIG_(12)_B，恆定區同功異型物 2 之重鏈之完全胺基酸序列(SEQ ID NO: 101)。

圖 30-9：樣本 IVIG_(12)_B，恆定區同功異型物 3 之重鏈之完全胺基酸序列(SEQ ID NO: 102)。

圖 30-10：樣本 IVIG_(13)，恆定區同功異型物 1 之重鏈之完全胺基酸序列(SEQ ID NO: 103)。

圖 30-11：樣本 IVIG_(13)，恆定區同功異型物 2 之重鏈之完全胺基酸序列(SEQ ID NO: 104)。

圖 30-12：樣本 IVIG_(13)，恆定區同功異型物 3 之重鏈之完全胺基酸序列(SEQ ID NO: 105)。

圖 30-13：樣本 IVIG_(14)，恆定區同功異型物 1 之重鏈之完全胺基酸序列(SEQ ID NO: 106)。

圖 30-14：樣本 IVIG_(14)，恆定區同功異型物 2 之重鏈之

完全胺基酸序列 (SEQ ID NO: 107)。

圖 30-15：樣本 IVIG_(14)，恆定區同功異型物 3 之重鏈之完全胺基酸序列 (SEQ ID NO: 108)。

圖 30-16：樣本 IVIG_(15)，恆定區同功異型物 1 之重鏈之完全胺基酸序列 (SEQ ID NO: 109)。

圖 30-17：樣本 IVIG_(15)，恆定區同功異型物 2 之重鏈之完全胺基酸序列 (SEQ ID NO: 110)。

圖 30-18：樣本 IVIG_(15)，恆定區同功異型物 3 之重鏈之完全胺基酸序列 (SEQ ID NO: 111)。

圖 30-19：樣本 IVIG_(16)，恆定區同功異型物 1 之重鏈之完全胺基酸序列 (SEQ ID NO: 112)。

圖 30-20：樣本 IVIG_(16)，恆定區同功異型物 2 之重鏈之完全胺基酸序列 (SEQ ID NO: 113)。

圖 30-21：樣本 IVIG_(16)，恆定區同功異型物 3 之重鏈之完全胺基酸序列 (SEQ ID NO: 114)。

圖 30-22：樣本 IVIG_(17)，恆定區同功異型物 1 之重鏈之完全胺基酸序列 (SEQ ID NO: 115)。

圖 30-23：樣本 IVIG_(17)，恆定區同功異型物 2 之重鏈之完全胺基酸序列 (SEQ ID NO: 116)。

圖 30-24：樣本 IVIG_(17)，恆定區同功異型物 3 之重鏈之完全胺基酸序列 (SEQ ID NO: 117)。

圖 30-25：樣本 IVIG_(18)，恆定區同功異型物 1 之重鏈之完全胺基酸序列 (SEQ ID NO: 118)。

圖 30-26：樣本 IVIG_(18)，恆定區同功異型物 2 之重鏈之

完全胺基酸序列 (SEQ ID NO: 119)。

圖 30-27：樣本 IVIG_(18)，恆定區同功異型物 3 之重鏈之完全胺基酸序列 (SEQ ID NO: 120)。

圖 30-28：樣本 IVIG_(19)，恆定區同功異型物 1 之重鏈之完全胺基酸序列 (SEQ ID NO: 121)。

圖 30-29：樣本 IVIG_(19)，恆定區同功異型物 2 之重鏈之完全胺基酸序列 (SEQ ID NO: 122)。

圖 30-30：樣本 IVIG_(19)，恆定區同功異型物 3 之重鏈之完全胺基酸序列 (SEQ ID NO: 123)。

圖 30-31：樣本 IVIG_(20)，恆定區同功異型物 1 之重鏈之完全胺基酸序列 (SEQ ID NO: 124)。

圖 30-32：樣本 IVIG_(20)，恆定區同功異型物 2 之重鏈之完全胺基酸序列 (SEQ ID NO: 125)。

圖 30-33：樣本 IVIG_(20)，恆定區同功異型物 3 之重鏈之完全胺基酸序列 (SEQ ID NO: 126)。

圖 30-34：樣本 IVIG_(21)，恆定區同功異型物 1 之重鏈之完全胺基酸序列 (SEQ ID NO: 127)。

圖 30-35：樣本 IVIG_(21)，恆定區同功異型物 2 之重鏈之完全胺基酸序列 (SEQ ID NO: 128)。

圖 30-36：樣本 IVIG_(21)，恆定區同功異型物 3 之重鏈之完全胺基酸序列 (SEQ ID NO: 129)。

圖 30-37：樣本血清_(22)，恆定區同功異型物 1 之重鏈之完全胺基酸序列 (SEQ ID NO: 130)。

圖 30-38：樣本血清_(22)，恆定區同功異型物 2 之重鏈之

完全胺基酸序列 (SEQ ID NO: 131)。

圖 30-39：樣本血清_(23)，恆定區同功異型物 1 之重鏈之完全胺基酸序列 (SEQ ID NO: 132)。

圖 30-40：樣本血清_(23)，恆定區同功異型物 2 之重鏈之完全胺基酸序列 (SEQ ID NO: 133)。

圖 30-41：樣本血清_(24)，恆定區同功異型物 1 之重鏈之完全胺基酸序列 (SEQ ID NO: 134)。

圖 30-42：樣本血清_(24)，恆定區同功異型物 3 之重鏈之完全胺基酸序列 (SEQ ID NO: 135)。

圖 30-43：樣本血清_(24)，恆定區同功異型物 1 之重鏈之完全胺基酸序列 (SEQ ID NO: 136)。

圖 30-44：樣本血清_(24)，恆定區同功異型物 3 之重鏈之完全胺基酸序列 (SEQ ID NO: 137)。

圖 31：說明本發明之經定序抗體之 κ 輕鏈 N 端保守性質的表。表示 6 種類型之由 18 個胺基酸殘基組成之 N 端序列，其係於本發明抗體之 κ 輕鏈序列中鑑別。

圖 32a 及 b：HC-LC- κ 及 HC-LC- λ 連接之抗 A β (21-37) 自體抗體之內二硫鍵及間二硫鍵的機制。HC 內二硫鍵為 C21-C96、C148-C204、C265-C325、C371-C429；LC- κ -內二硫鍵為 C23-C89、C135-C195；LC- λ -內二硫鍵為 C22-C92、C142-C201；HC-HC 間二硫鍵為 C230-C230、C233-C33；HC-LC- κ -間二硫鍵及 HC-LC- λ -間二硫鍵分別為 C224-C215 及 C224-C219。32a：IVIgG_LC(1)_HC(1)；32b：IVIG_HC(1)_LC λ (3)。

圖 33：展示重組抗 A β (21-37)自體抗體 CSL-純系 7 使如實例 6 所述寡聚形式之 A β 1-40 免疫沈澱之西方墨點法。使用抗體 Bam 90.1 (Sigma Aldrich 目錄號 A8978，與 A β (13-28) 結合) 來偵測免疫沈澱之 A β 。

圖 34a：A β 自體抗體之抗原決定基辨識特異性之分子確證。說明 3 個合成 A β 多肽 A β (4-10)、A β (20-30) 及 A β (20-37) 對藉由 MALDI 質譜法自健康 (非 AD 對照個體) 供體 (A 及 B) 之血清分離之抗 A β -自體抗體的親和力。如實例 2A (A β 12-40) 中所述，將經親和力純化之抗體固定於 NHS-瓊脂糖上。質譜分析 (肽混合物之 MALDI-MS，上方) 後將等莫耳混合物 (合成 A β 肽於 pH 值為 7 之 PBS 緩衝水溶液中之 5 μ mol 混合物) 與抗體結合。洗滌溶離份之上清液之 MALDI-MS 揭示 N 端 A β (4-10) 抗原決定基信號為主要離子 (確證缺少 N 端 A β 結合，中間)，且繼續洗滌直至無法偵測到 MS 信號。以 0.1% 三氟乙酸溶離後，鑑別 A β (20-37) 肽為能夠與自體抗體結合之唯一多肽 (下方)。所有 MS 測定均係以 Bruker Bilflex MALDI-TOF 質譜儀進行。

圖 34b：展示 A β 自體抗體之抗原決定基特異性之質譜圖。將根據實例 2A 自 IVIgG 純化之經固定 A β (21-37) 自體抗體與合成 A β (12-40) 多肽一起培育。如上經由 MS 分析溶離概況。資料展示 A β (21-37) 自體抗體與 A β (12-40) 多肽特異性結合。

圖 34c：展示 A β 自體抗體之抗原決定基特異性之質譜圖。將自 IVIgG 純化之經固定 A β (21-37) 自體抗體與合成 A β

多肽 A β (25-35)、A β (17-28)及 A β (31-40)一起培育。資料展示 A β (21-37)自體抗體不與 A β 部分多肽結合。

圖 34d 至 34i：展示 A β 自體抗體之抗原決定基特異性之質譜圖。將自 IVIgG 純化之經固定 A β (21-37)自體抗體及固定抗體 ACA(參見實例 5)與合成多肽 A β (4-10)、A β (17-28)、A β (12-40)及 A β (20-37)一起培育。資料展示經固定 ACA 抗體及經固定 A β (21-37)自體抗體均與 A β (1-40)結合且與 A β (12-40)結合，但僅經固定 A β (21-37)自體抗體與 A β (20-37)特異性結合。經固定抗體均不結合 A β (17-28)。此外，展示經固定抗體 ACA 不與 A β (4-10)結合。

圖 35：用於測定抗 A β (21-37)自體抗體之血清 ELISA。BSA 為牛血清白蛋白。HRP 為辣根過氧化酶。OPD 為鄰苯二胺。IgG 代表免疫球蛋白 G。

圖 36：A β 自體抗體(來自 IVIgG)之 ELISA 測定。IVIgG 代表靜脈內 IgG 製劑。ELISA 係以塗覆於 96 孔培養盤上之 A β (1-40)進行，且添加 A β -抗體之稀釋液且以抗人類辣根過氧化酶接合二級抗體測定。A β 抗體定量係使用用於校正之 BSA 參考曲線以 1 μ g/ μ l 儲備溶液進行。所表示之百分比代表來自兩個獨立 ELISA 測定之 IVIgG 中 A β 抗體濃度。

圖 37：展示根據實例 4 之親和力純化之 IVIgG 使如實例 6 所述之寡聚形式 A β 1-40 免疫沈澱之西方墨點法。使用抗體 Bam 90.1(Sigma Aldrich 目錄號 A8978，與 A β (13-28)結合)來偵測免疫沈澱之 A β 。

圖 38：表示用於如實例 13 所述之 AD 動物模型之每抗體

的平均總斑塊面積之條形圖。黑色柱形表示皮質中之斑塊面積，且白色條形表示海馬區中之斑塊面積。使用 Nikon NIS Elements 軟體，於所治療動物之經免疫染色腦切片照片上量測斑塊面積。將所量測之經 CSL 360 或 CSL 純系 7 治療之動物 (N=2) 的斑塊面積取平均值 (就兩隻動物而言) 以與經親和力純化 IVIgG 治療之動物 (N=1) 比較。

圖 39：展示如實例 9D 所論述抗 A β (21-37) 自體抗體 CSL-純系 7 與 A β (1-40) 結合且與 A β (12-40) 肽結合，但不與 A β (4-10) 結合之 ELISA 資料。

圖 40：3 種不同 A β 特異性抗體：A β 親和力管柱純化之人類 IVIgG (如實例 4 所述)、人類單株 A β 自體抗體 CSL 純系 7 (如實例 5 所述)，及對抗中端 A β 肽序列形成之人類化鼠單株抗體 (AK ACA，如實例 5 所述) 抑制如藉由實例 10 所述之 THT 螢光染色所量測之 A β 原纖維形成的效應。THT 檢定之螢光性與原纖維 Ab 成比例且係用以評定原纖維形態。將在非特異性人類單株 (CSL360) 存在下培育之 A β (1-40) 之螢光性設定為 100%。

圖 41：如實例 11A 中所述之點漬墨法分析。如實例 11A 所述，將樣本以對照抗體 (6E10, Bam90.1, CSL 純系 7, 親和力純化之 IVIG, ACA)、來自 AD 患者之血清 (AD1)、來自年齡匹配之健康人類個體之血清 (K4) 測試。

圖 42：將來自血清樣本 (一個 AD 陽性樣本及一個年齡匹配對照樣本) 之 IgG 在於蛋白質 G (Pierce) 上純化後裝載於 A β (1-16) 管柱上，以 pH 值為 2.7 之 100 mM 甘胺酸洗滌且溶

離。如實例11B中所述，以生物素-G₅-A β (4-10) ELISA分析溶離物。

圖 43：如實例 12C 中所述，與跟 A β (1-40) 單體之結合相反，重組 A β (21-37) 自體抗體 55/61、146/61 及對照抗體 ACA 與 A β (1-40 Cys) 二聚體之結合。

圖 44：如實例 12C 中所述，與跟 A β (1-40) 單體之結合相反，重組 A β (21-37) 自體抗體 54/61、47/56、51/60 及 53/60 與 A β (1-40 Cys) 二聚體之結合。

圖 45：如實例 12C 中所述，與跟 A β (1-40) 單體之結合相反，重組 A β (21-37) 自體抗體 146/60、52/60、53/148 及 145/60 與 A β (1-40 Cys) 二聚體之結合。

圖 46： β 澱粉樣蛋白肽之 N-三羥甲基甘胺酸凝膠蛋白質質墨點分析。使用如 Novex 凝膠手冊 (Invitrogen) 中所述之標準庫馬斯染色技術及較高敏感性之深紫試劑來進行 β 澱粉樣蛋白肽之蛋白質觀測。深紫 (GE, Sweden) 係使用 Typhoon 掃描儀根據製造商說明來觀測。

圖 47：如實例 12D 所述，比較抗體 6E10、ACA 及 CSL 純系 7 與 A β (1-40 二聚體) 對 A β (1-40) 單體、A β (1-40) 寡聚物及 A β (1-40 Cys) 寡聚物之結合的西方墨點法。

圖 48：如實例 12D 所述，比較重組 A β (21-37) 自體抗體與 A β (1-40 Cys) 寡聚物對 A β (1-40) 單體之結合的西方墨點法。

五、中文發明摘要：

本發明係關於與A β 肽之C端抗原決定基結合及與寡聚形式之該A β 肽結合之多肽，獲得該等多肽之方法及該等多肽於人類醫學及獸醫學中之用途，尤其於治療及預防阿茲海默氏症(Alzheimer's Disease)及其他神經性失智疾病之用途。本發明亦提供一種偵測或量測神經性失智疾病之進展之方法。

六、英文發明摘要：

The present inventions relate to polypeptides binding to a C-terminal epitope of A β -peptide and to oligomeric forms of the A β -peptide, methods of obtaining such polypeptides, and use of said polypeptides in human and veterinary medicine, in particular for treatment and prophylaxis of Alzheimer's Disease and other neurodementing diseases. Methods of detecting or measuring the progression of a neurodementing disease also are provided.

十、申請專利範圍：

1. 一種經分離單株人類抗 β 澱粉樣蛋白抗體，其包含一個以上胺基酸序列，該等胺基酸序列係選自由下列序列組成之群之至少兩個一致胺基酸序列：SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10及SEQ ID NO: 11，其中該一個以上胺基酸序列各自係來自不同SEQ ID NO，其中該抗體以比與單體形式A β 結合之親和力高之親和力與二聚形式A β 結合。
2. 如請求項1之抗體，其中該抗體包含兩個以上胺基酸序列，該等胺基酸序列係選自由下列序列組成之群之至少三個一致胺基酸序列：SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10及SEQ ID NO: 11，其中該兩個以上胺基酸序列各自係來自不同SEQ ID NO。
3. 如請求項1之抗體，其中該抗體包含三個以上胺基酸序列，該等胺基酸序列係選自由下列序列組成之群之至少四個一致胺基酸序列：SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10及SEQ ID NO: 11，其中該三個以上胺基酸序列各自係來自不同SEQ ID NO。
4. 如請求項1之抗體，其中該抗體包含四個以上胺基酸序列，該等胺基酸序列係選自由下列序列組成之群之至少五個一致胺基酸序列：SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10及SEQ

- ID NO: 11，其中該四個以上胺基酸序列各自係來自不同 SEQ ID NO。
5. 如請求項1之抗體，其中該抗體包含來自以下各一致胺基酸序列之胺基酸序列：SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10及 SEQ ID NO: 11。
 6. 如請求項1之抗體，其中該抗體包含胺基酸序列 SEQ ID NO: 33、SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 45作為特異性輕鏈 CDR分別為 CDR1、CDR2及 CDR3，且包含 SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 23及 SEQ ID NO: 29作為特異性重鏈 CDR分別為 CDR1、CDR2及 CDR3。
 7. 如請求項1之抗體，其中該抗體包含胺基酸序列 SEQ ID NO: 53及 SEQ ID NO: 60。
 8. 如請求項1之抗體，其中該抗體包含胺基酸序列 SEQ ID NO: 145及 SEQ ID NO: 60、SEQ ID NO: 53及 SEQ ID NO: 60、SEQ ID NO: 51及 SEQ ID NO: 60、SEQ ID NO: 52及 SEQ ID NO: 60、SEQ ID NO: 146及 SEQ ID NO: 60、SEQ ID NO: 53及 SEQ ID NO: 148、SEQ ID NO: 55及 SEQ ID NO: 61，或 SEQ ID NO: 145及 SEQ ID NO: 62。
 9. 如請求項1之抗體，其中該抗體包含來自下列胺基酸序列之 CDR：SEQ ID NO: 145及 SEQ ID NO: 60、SEQ ID NO: 53及 SEQ ID NO: 60、SEQ ID NO: 51及 SEQ ID NO: 60、SEQ ID NO: 52及 SEQ ID NO: 60、SEQ ID NO: 146

及SEQ ID NO: 60、SEQ ID NO: 53及SEQ ID NO: 148、
SEQ ID NO: 55及SEQ ID NO: 61，或SEQ ID NO: 145及
SEQ ID NO: 62。

10. 如請求項1之抗體，其中該抗體與包含A β (21-37)之肽結合。
11. 如請求項1之抗體，其中該抗體遮蔽A β (21-37)殘基使其免於蛋白水解消化。
12. 如請求項1之抗體，其中當該抗體與NHS活化之6-胺基己酸偶合之瓊脂糖偶合時，該抗體與A β 部分多肽A β (12-40)或A β (20-37)特異性結合，但不與A β (17-28)、A β (25-35)或A β (31-40)特異性結合。
13. 如請求項12之抗體，其中該抗體遮蔽A β (21-37)殘基使其免於蛋白水解消化。
14. 一種醫藥組合物，其包含如請求項1之抗體。
15. 一種如請求項1至13之抗體的用途，其係用於製造用以延緩或預防神經性失智疾病進展之藥劑。
16. 如請求項15之用途，其中該神經性失智疾病係選自由阿茲海默氏症(Alzheimer's disease)、唐氏症候群(Down's syndrome)、路易體型癡呆(dementia with Lewy bodies)、額顳葉型癡呆(fronto-temporal dementia)、澱粉樣腦血管病變(cerebral amyloid angiopathy)及澱粉樣變性病組成之群。
17. 如請求項15之用途，其中該神經性失智疾病為阿茲海默氏症。

18. 一種偵測或量測患者神經性失智疾病之進展的方法，其包含：

(A)量測來自該患者之樣本中對抗第一A β 肽之抗體力價，其中該第一A β 肽至少包含A β (30-37)之序列且至多包含A β (12-40)之序列；

(B)量測來自該患者之樣本中對抗第二A β 肽之抗體力價，其中該第二A β 肽至少包含A β (4-10)之序列且至多包含A β (1-20)之序列；及

(C)比較來自步驟(A)與(B)之力價。

19. 如請求項18之方法，其中該神經性失智疾病係選自由阿茲海默氏症、唐氏症候群、路易體型癡呆、額顳葉型癡呆、澱粉樣腦血管病變及澱粉樣變性病組成之群。

20. 如請求項18之方法，其中該神經性失智疾病為阿茲海默氏症。

21. 如請求項18之方法，其中該第一A β 肽至少包含A β (21-37)之序列。

22. 如請求項18之方法，其另外包含比較該等患者力價與對正常及AD患者所測定之力價，其中對抗該第一A β 肽之較高力價與阿茲海默氏症顯現及/或進展之較低危險相關聯。

23. 如請求項18之方法，其另外包含比較該等患者力價與對正常及AD患者所測定之力價，其中相對於對抗該第二A β 肽之力價，對抗該第一A β 肽之較高力價與阿茲海默氏症顯現及/或進展之較低危險相關聯。

24. 如請求項18之方法，其另外包含比較該等患者力價與對正常及AD患者所測定之力價，其中對抗該第二A β 肽之較高力價與阿茲海默氏症顯現及/或進展之較高危險相關聯。
25. 如請求項18之方法，其另外包含比較該等患者力價與對正常及AD患者所測定之力價，其中相對於對抗該第一A β 肽之力價，對抗該第二A β 肽之較高力價與阿茲海默氏症顯現及/或進展之較高危險相關聯。
26. 一種偵測或量測患者神經性失智疾病之進展的方法，其包含：
- A)於給定之時間點量測獲自該患者之第一樣本中及在稍後時間點量測獲自該患者之第二樣本中對抗至少包含A β (30-37)且至多包含A β (12-40)之抗原決定基之抗體力價；及
 - B)比較該等第一及第二樣本之力價。
27. 一種偵測或量測患者神經性失智疾病之進展的方法，其包含：
- A)於給定之時間點量測獲自該患者之第一樣本中及在稍後時間點量測獲自該患者之第二樣本中對抗至少包含A β (4-10)且至多包含A β (1-20)之抗原決定基之抗體力價；及
 - B)比較該等第一及第二樣本之力價。
28. 一種偵測或量測患者神經性失智疾病之進展的方法，其包含：

A)於給定之時間點量測獲自該患者之第一樣本中及在稍後時間點量測獲自該患者之第二樣本中對抗包含A β (30-37)之抗原決定基之抗體力價；及

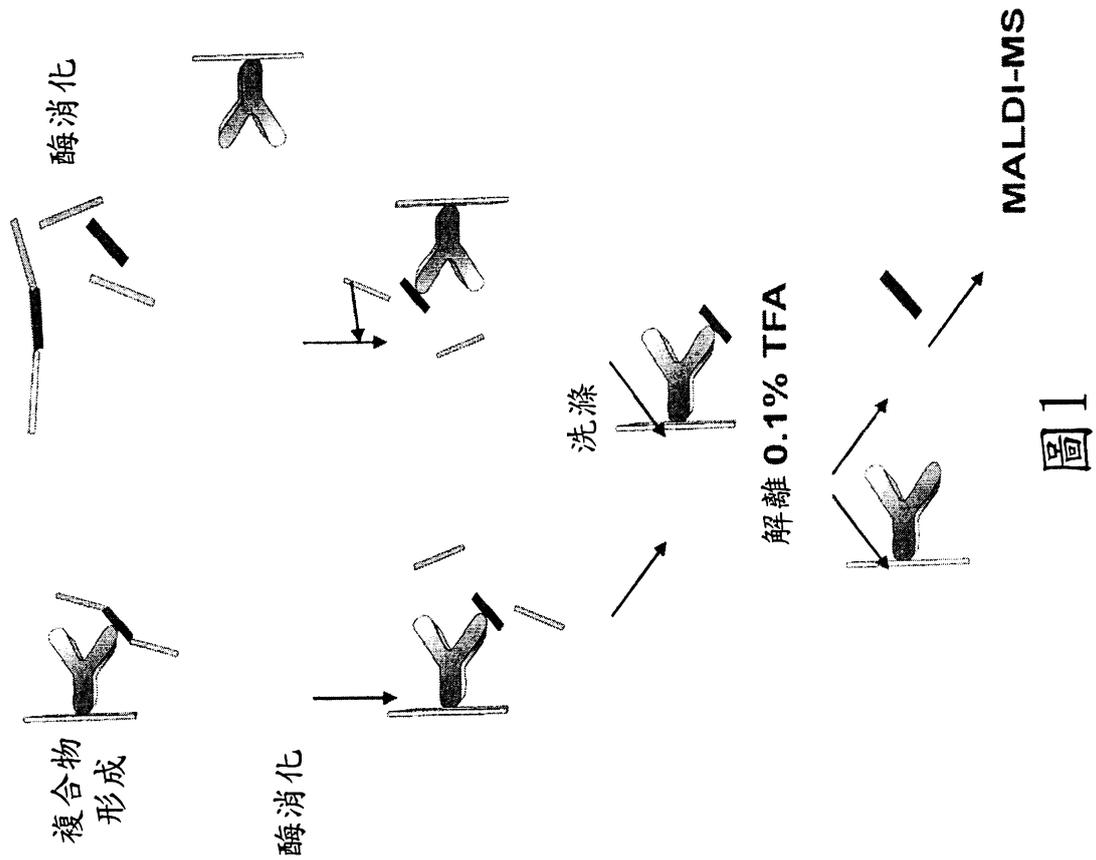
B)比較該等第一及第二樣本之力價。

29. 一種套組，其包含：

(A)第一A β 肽，其至少包含A β (30-37)之序列且至多包含A β (12-40)之序列；及

(B)第二A β 肽，其中該第二A β 肽至少包含A β (4-10)之序列且至多包含A β (1-20)之序列。

十一、圖式：





[M+H]⁺ _{calc.} = 4327.1664
 [M+H]⁺ _{exp.} = 4326.9567
 $\Delta m = 4$. ppm

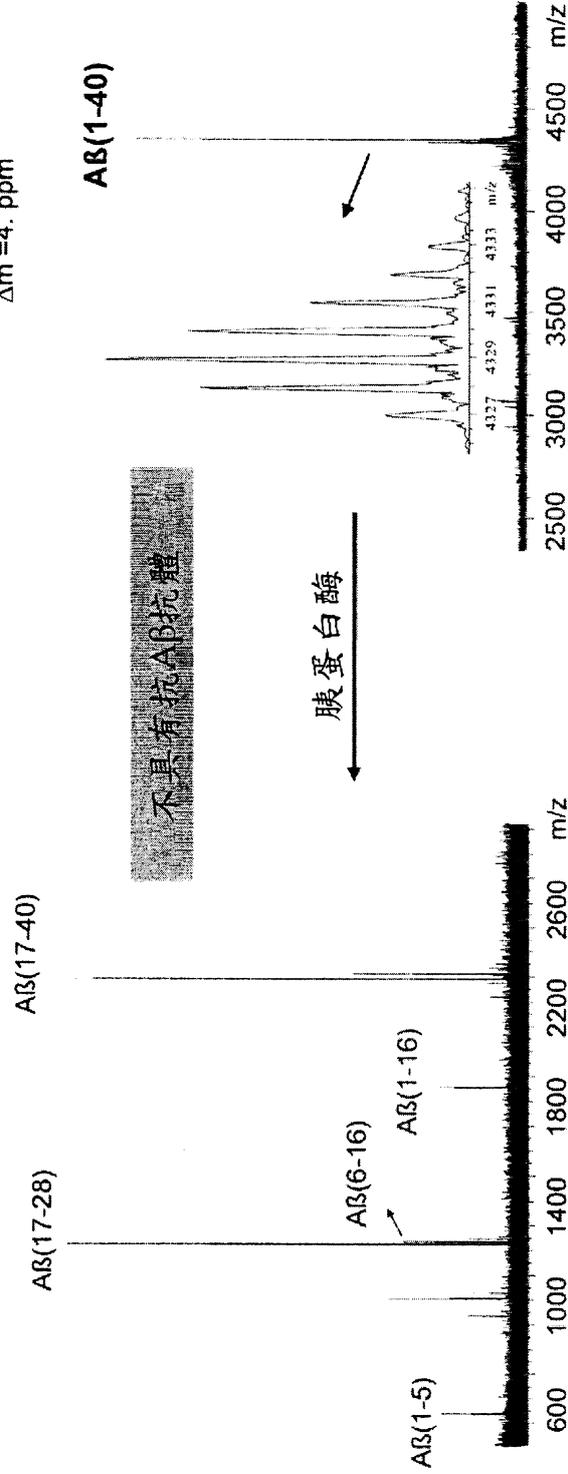


圖2

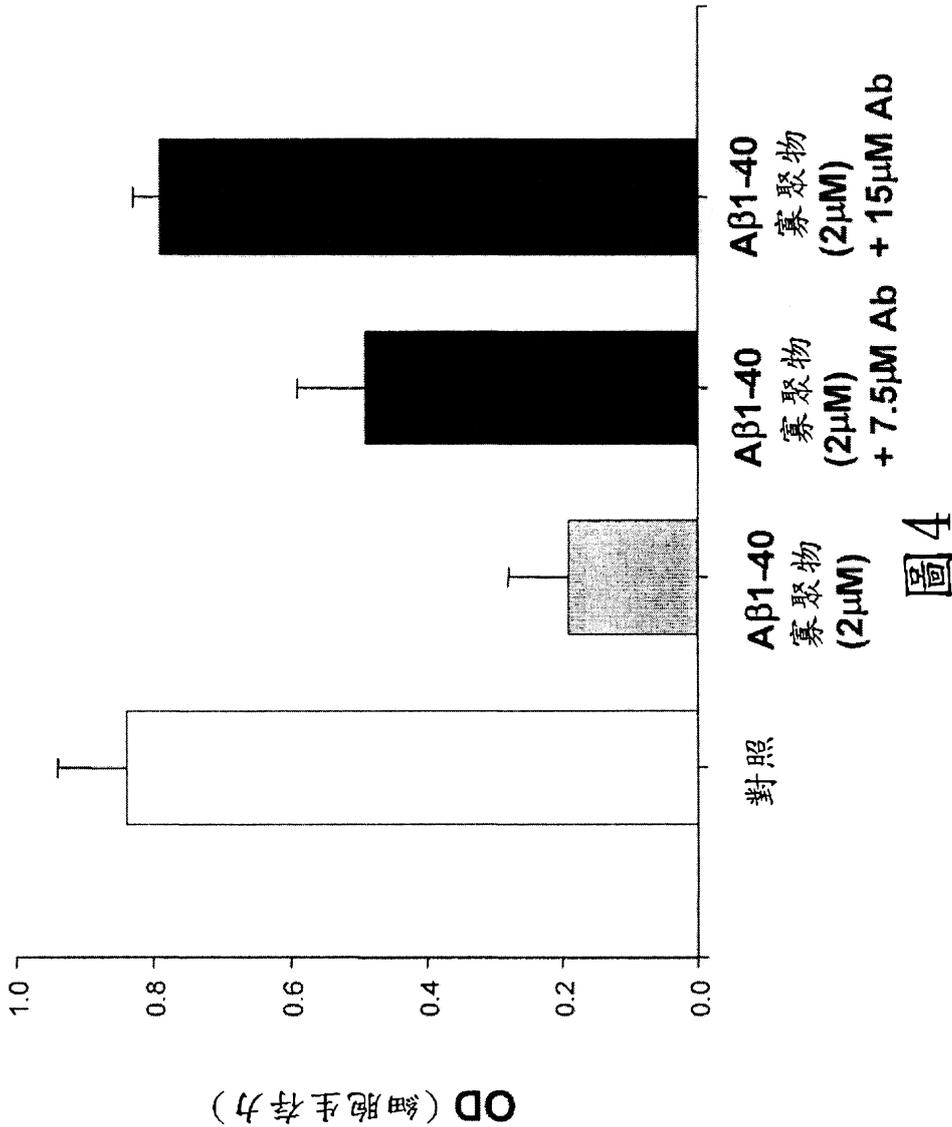


圖4

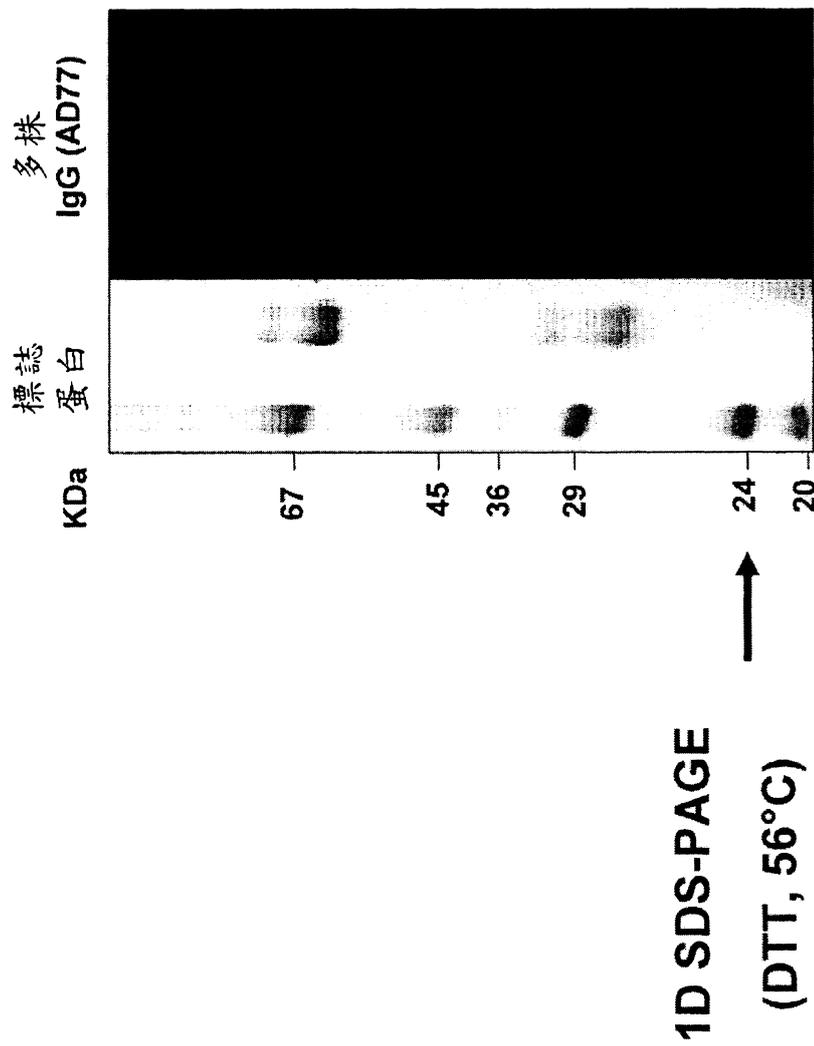
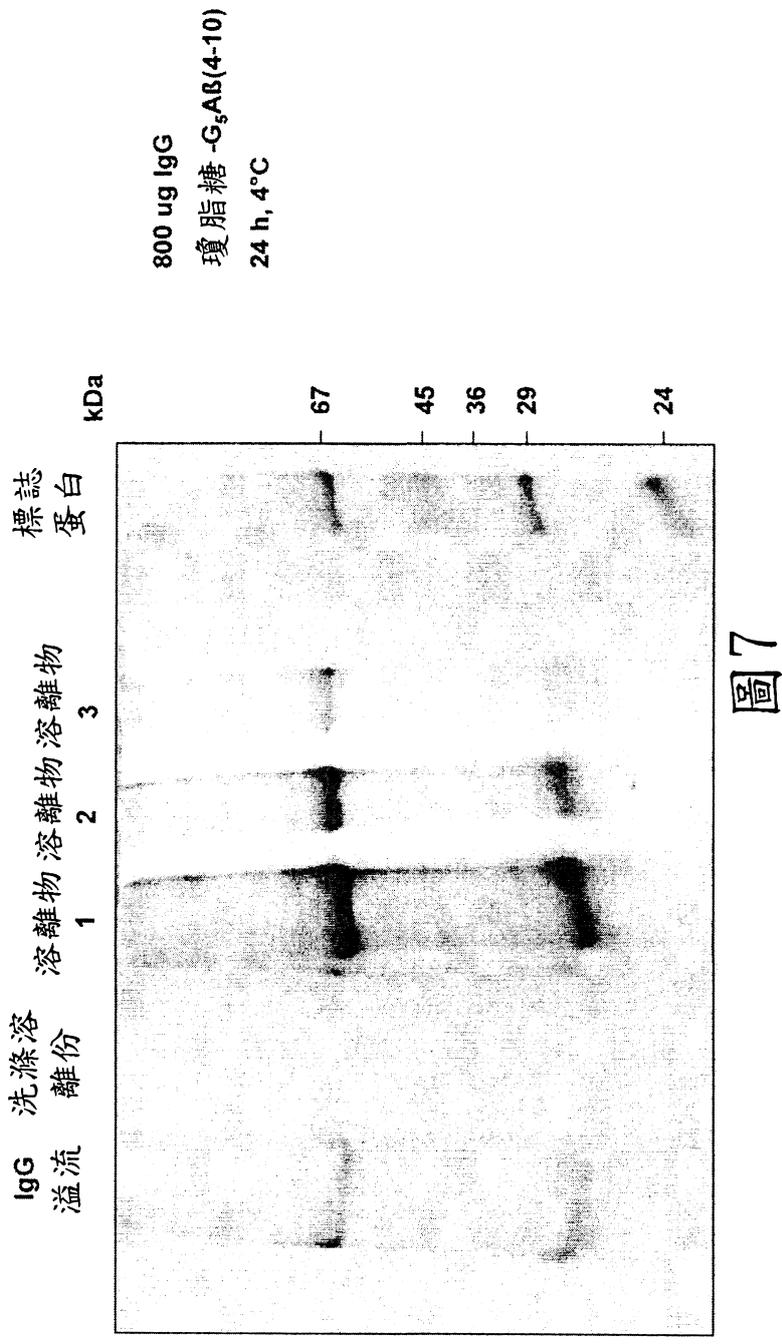
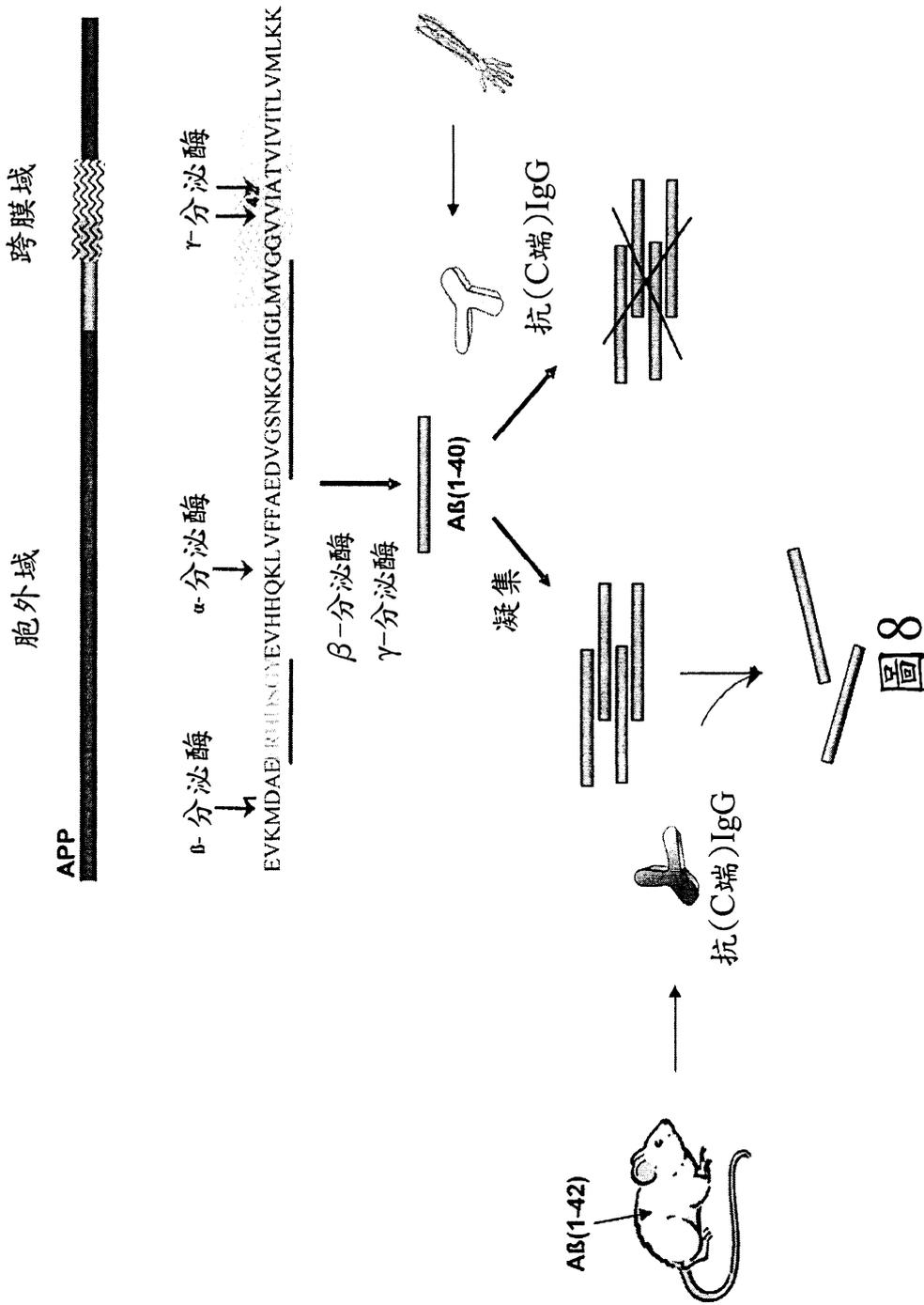
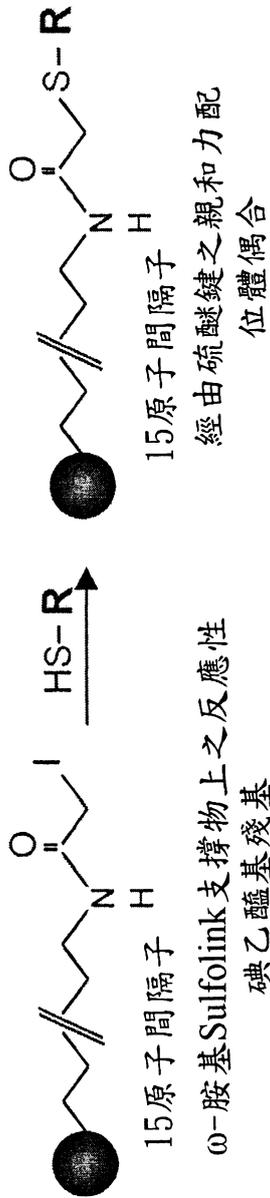


圖5







R: Cys-Aβ(12-40)

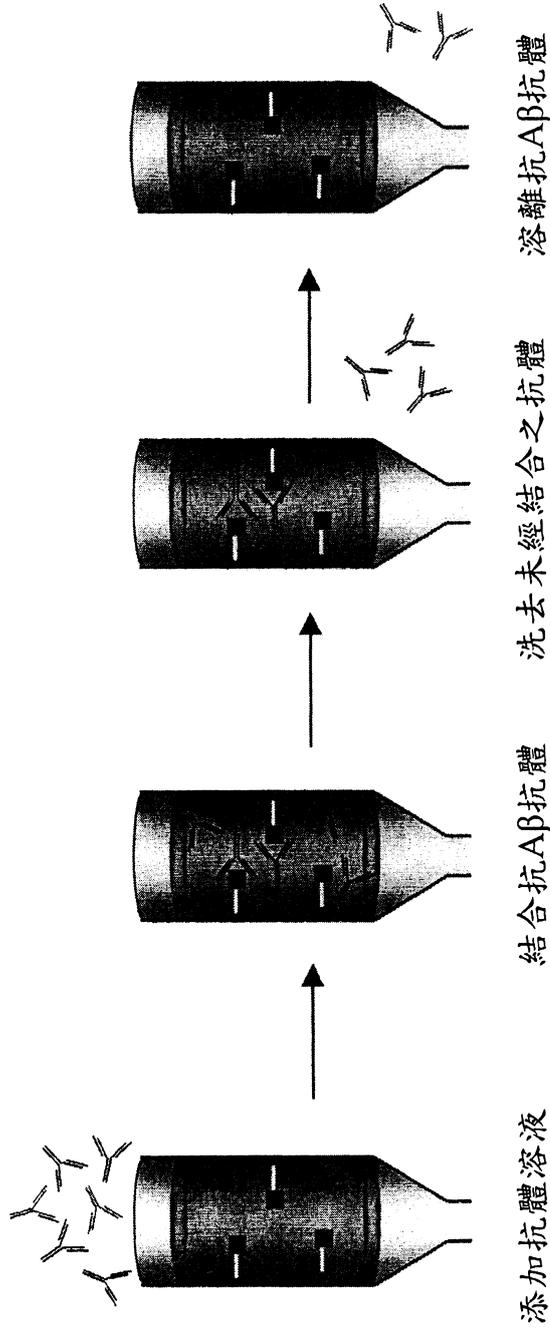


圖9

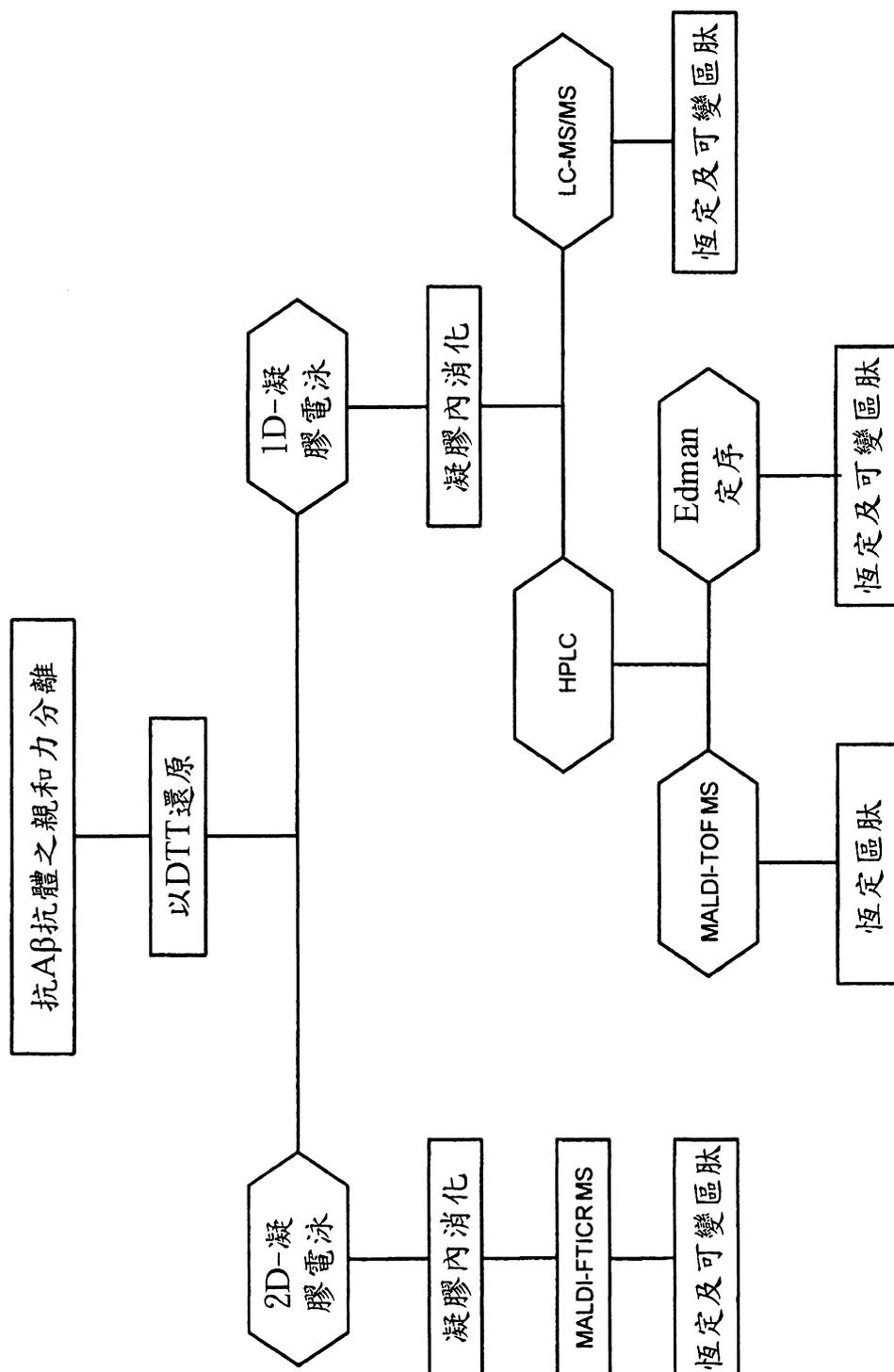


圖10

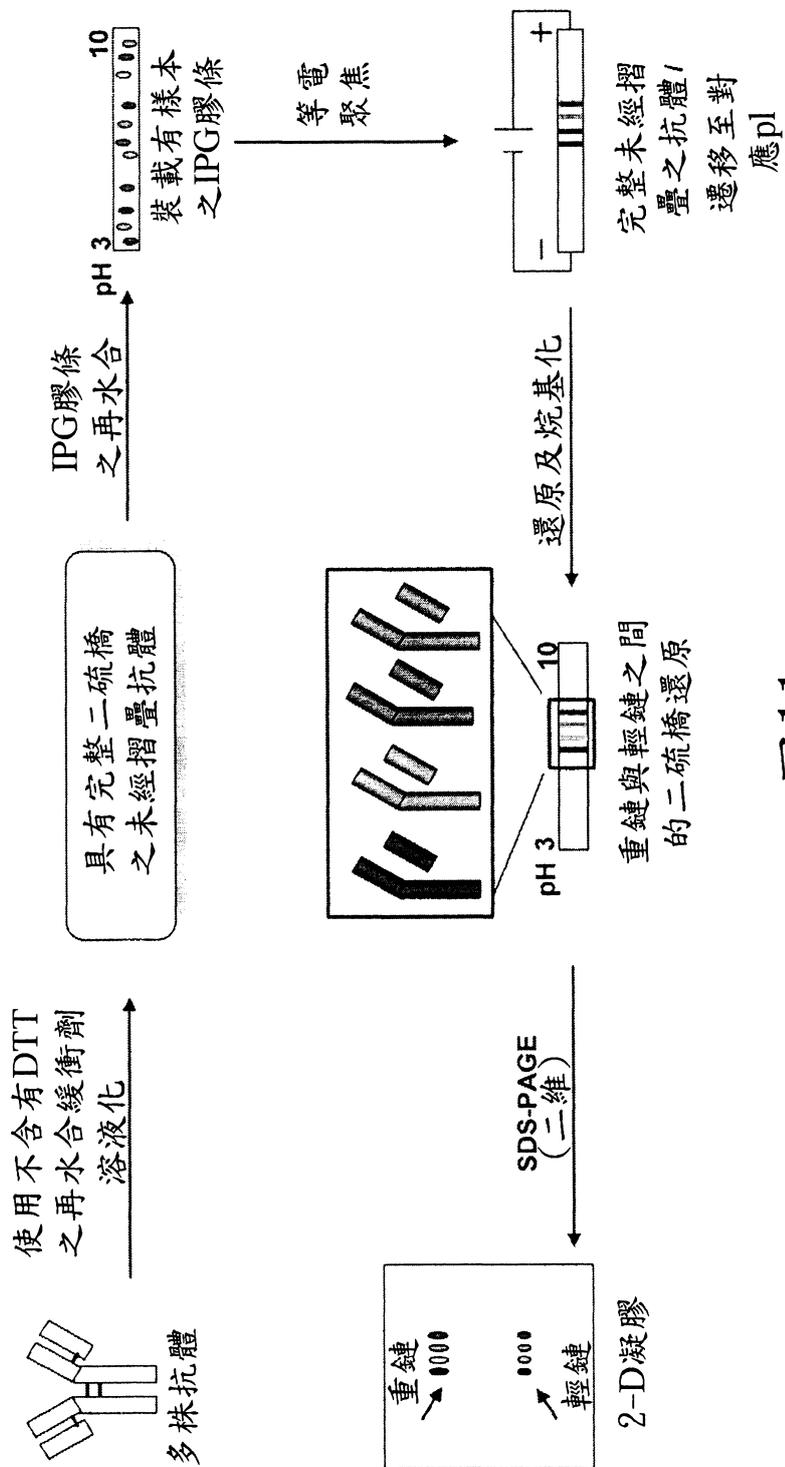


圖11

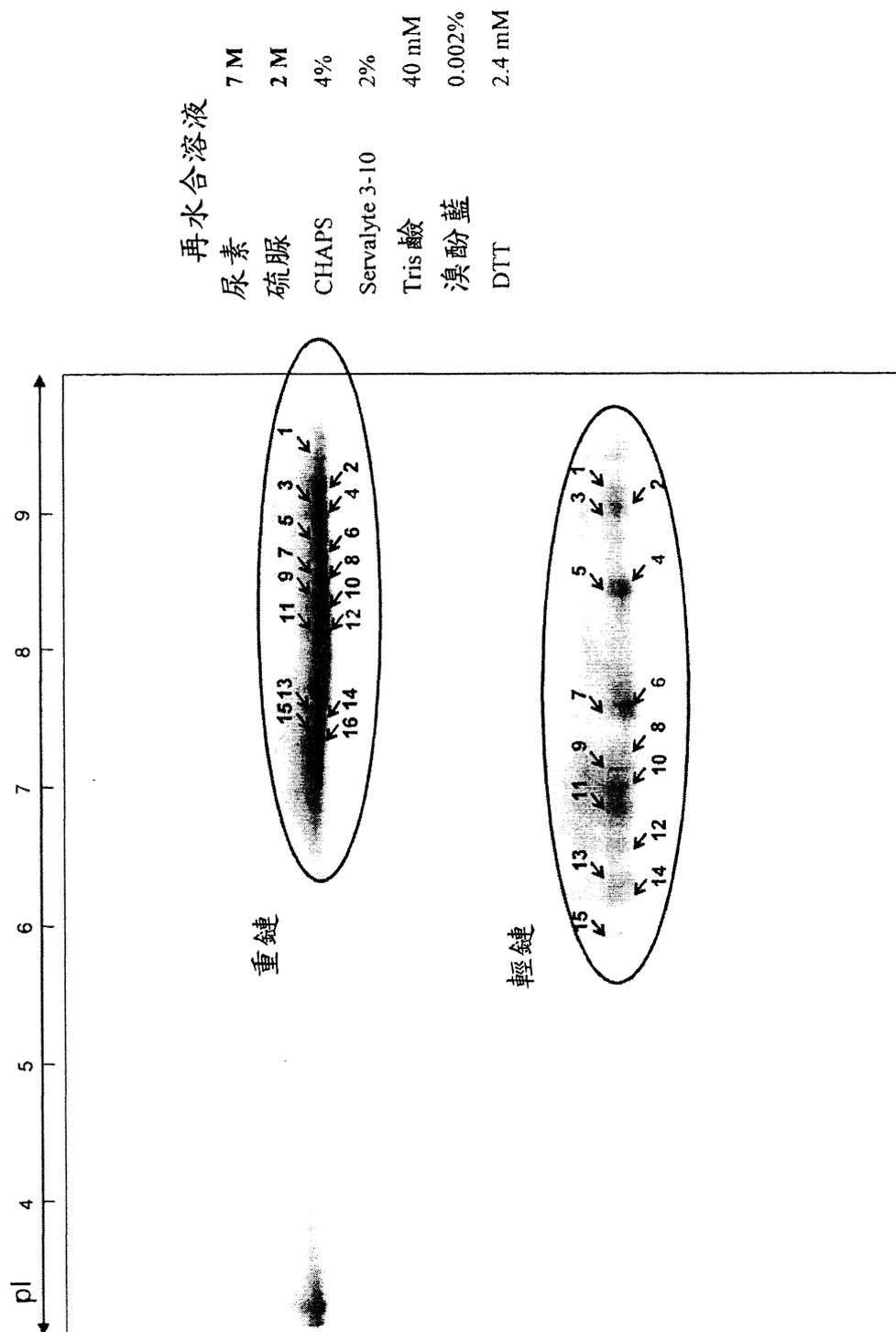


圖12

a) 還原 (10000x DTT); b) 烷基化 (3x 碘基乙醯胺 / DTT)

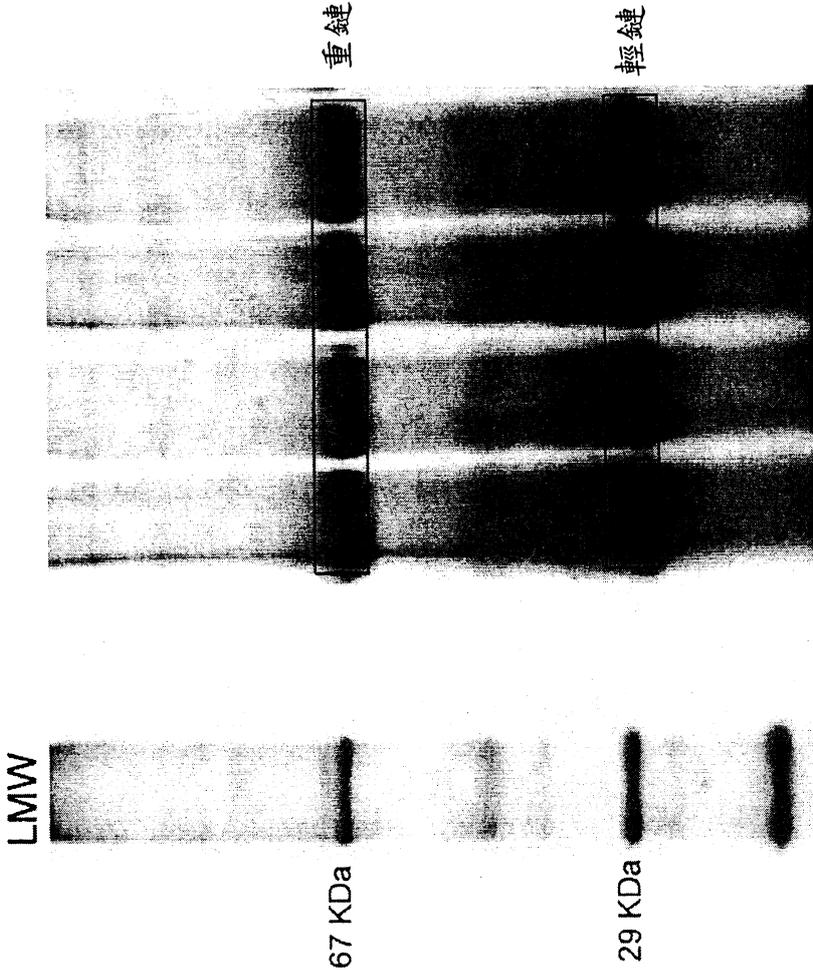


圖13

20 µg IVIG_AB 抗體還原/烷基化 : DTT/碘基乙醯胺
分析 HPLC/C4-RP 管柱

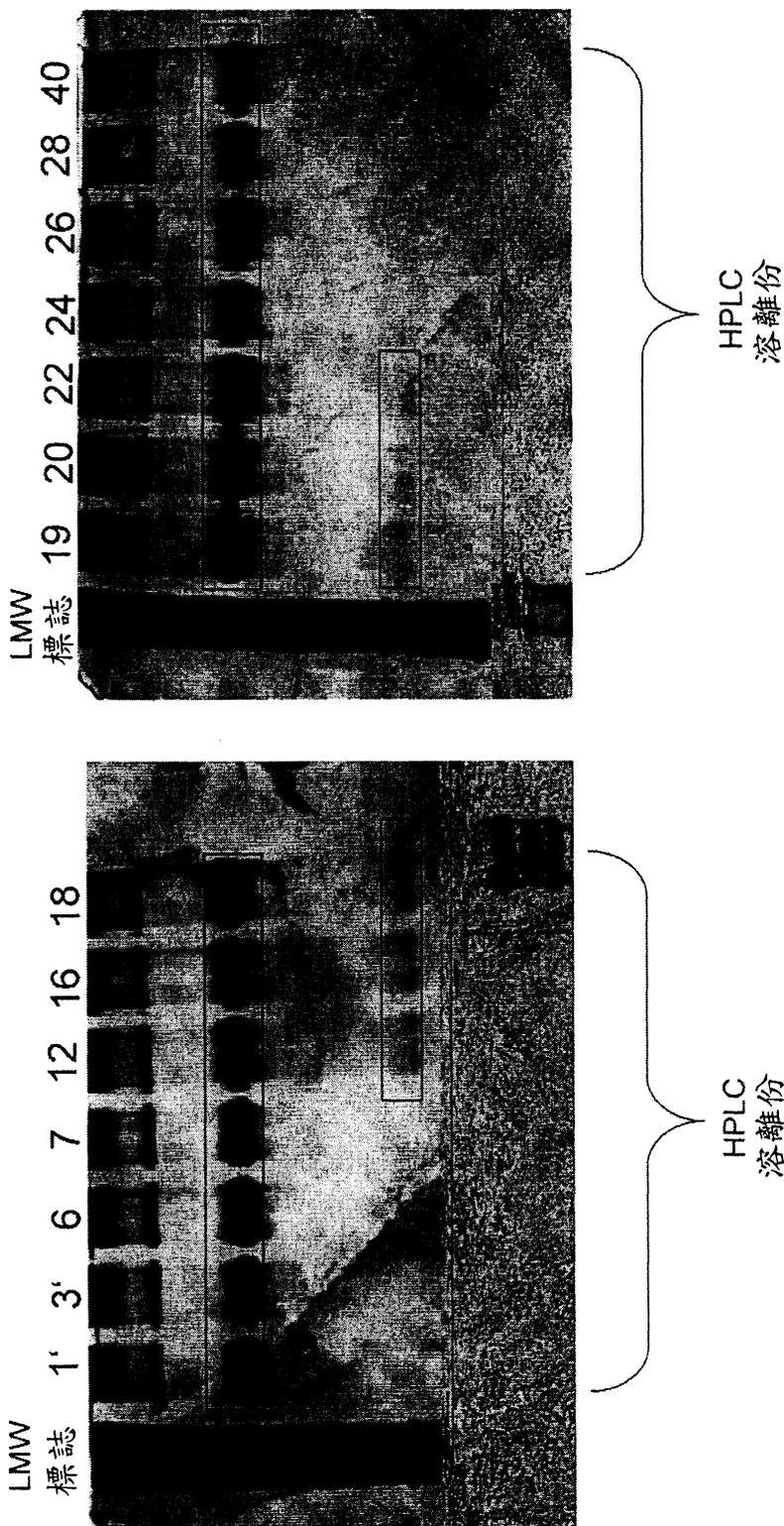
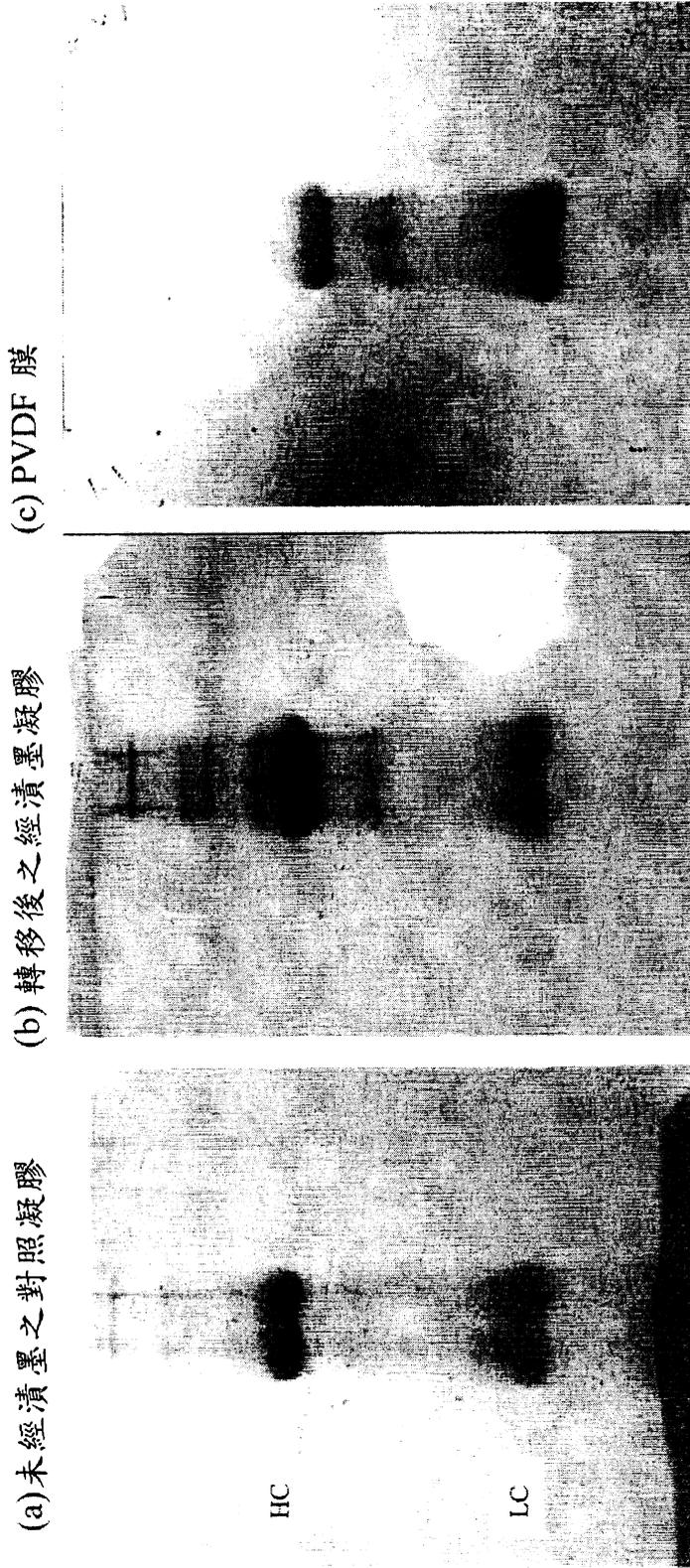
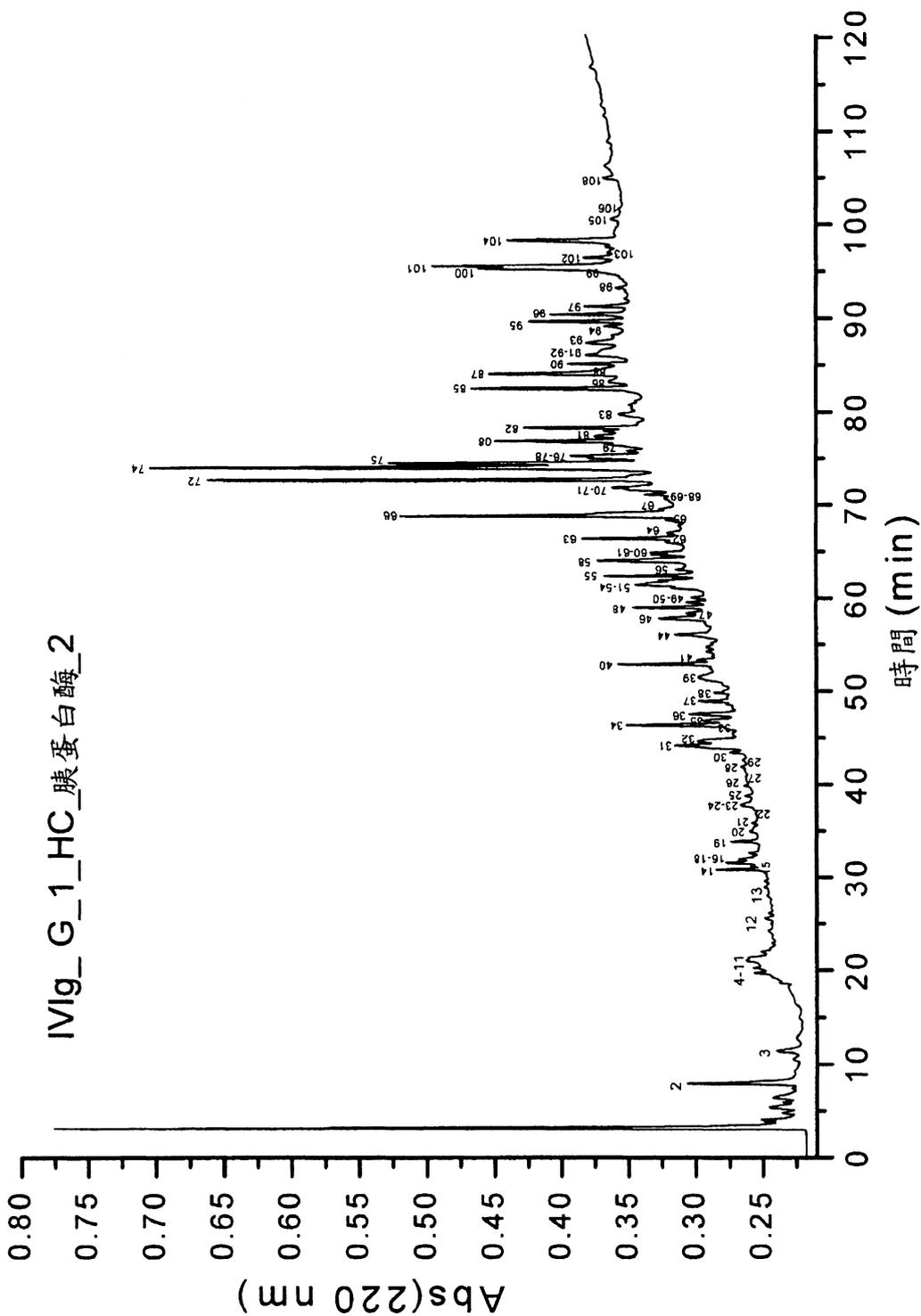


圖14



3小時半乾電漬墨/Tris甘胺酸緩衝

圖15



時間 (min)

圖16

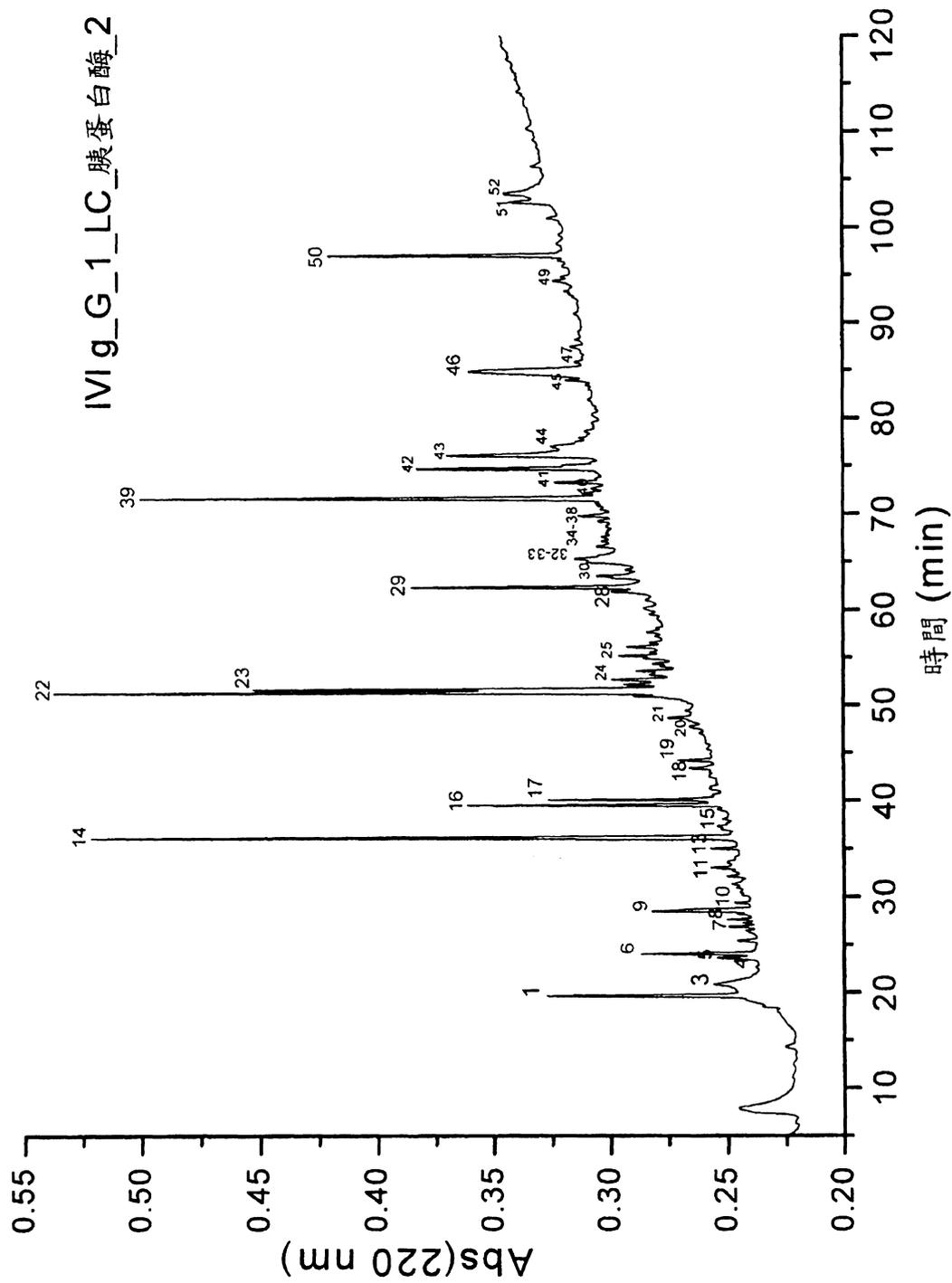


圖17

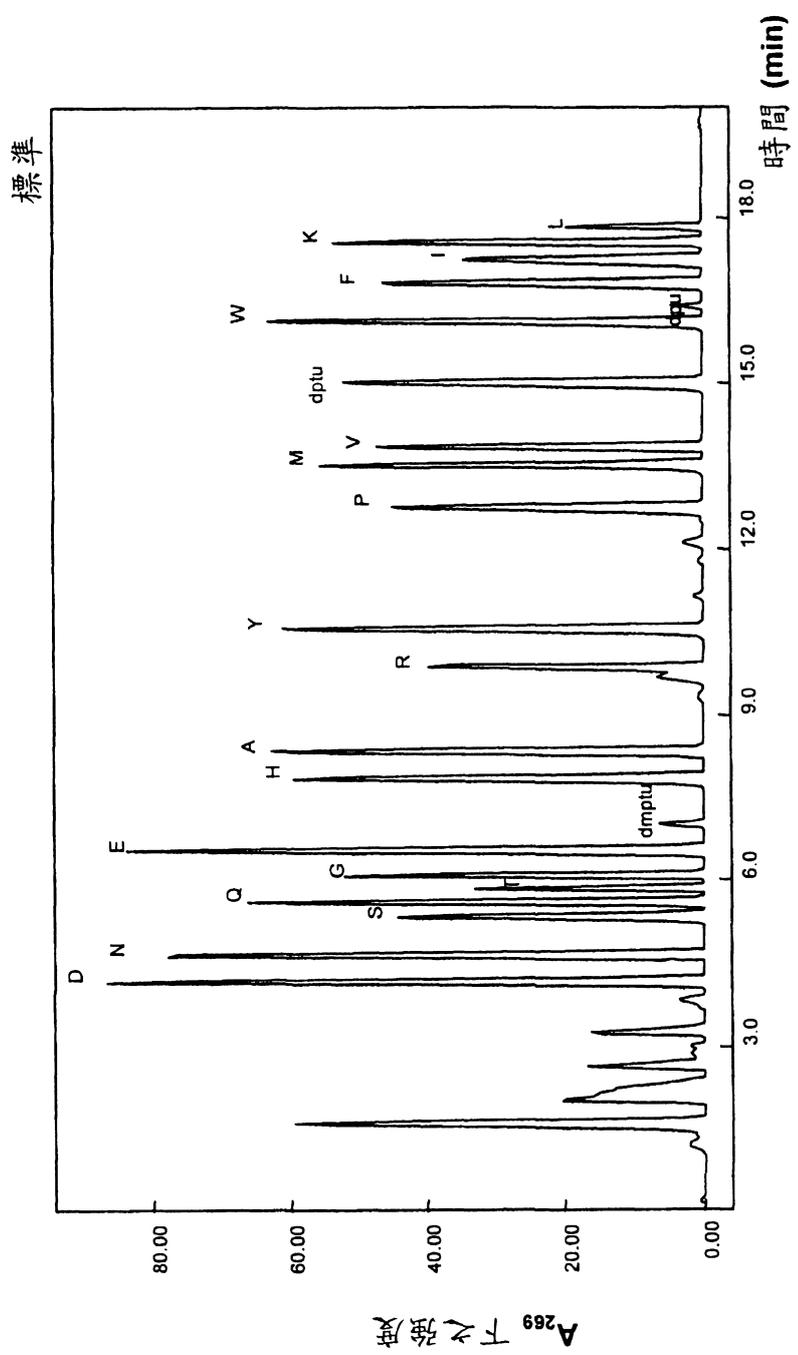


圖18a

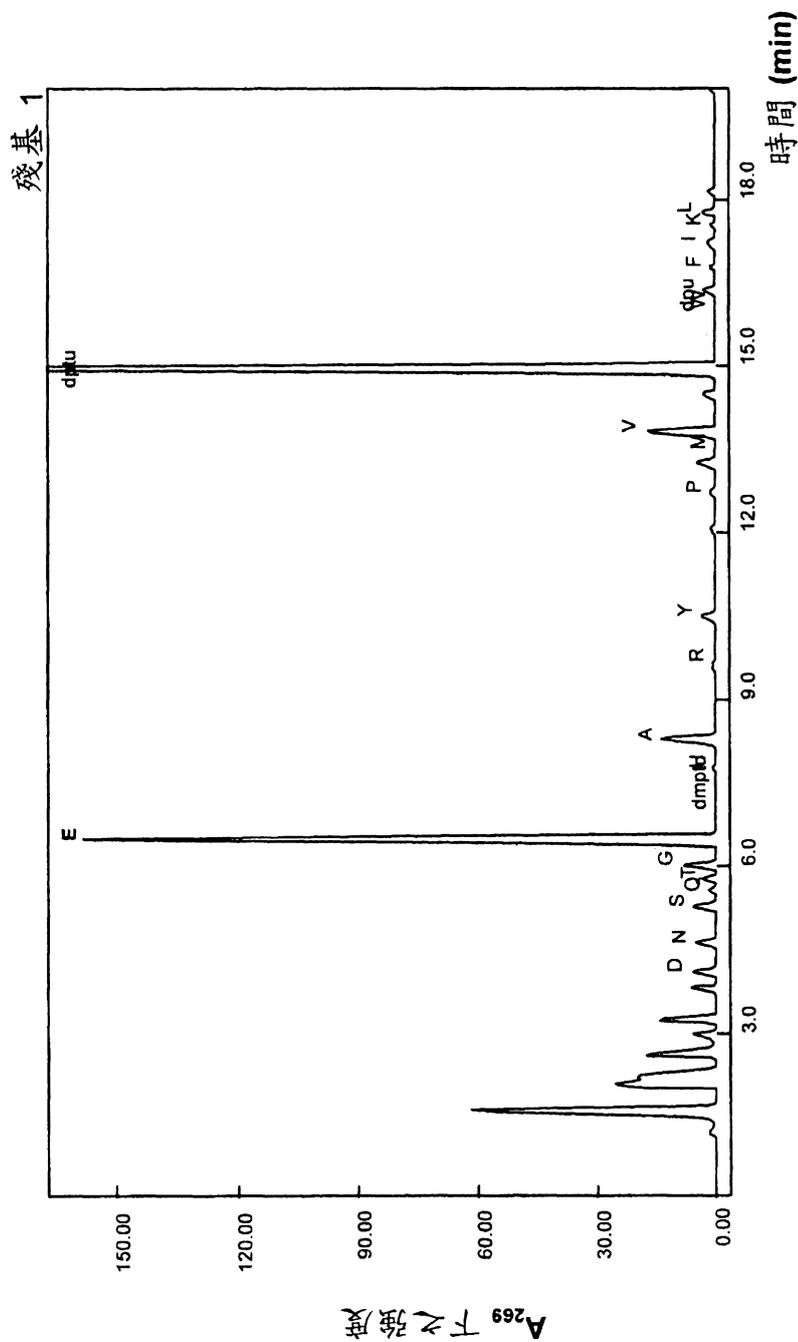


圖18b

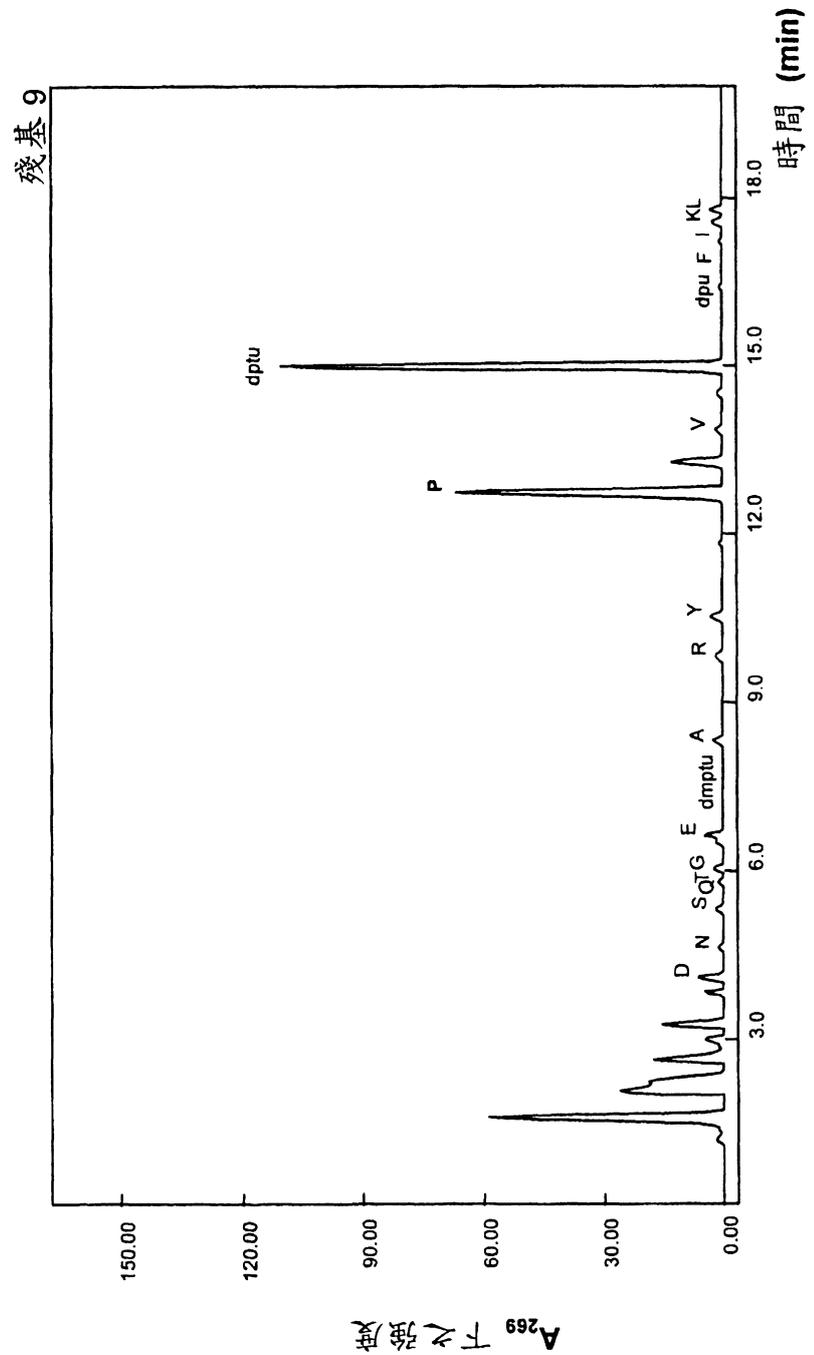


圖18c

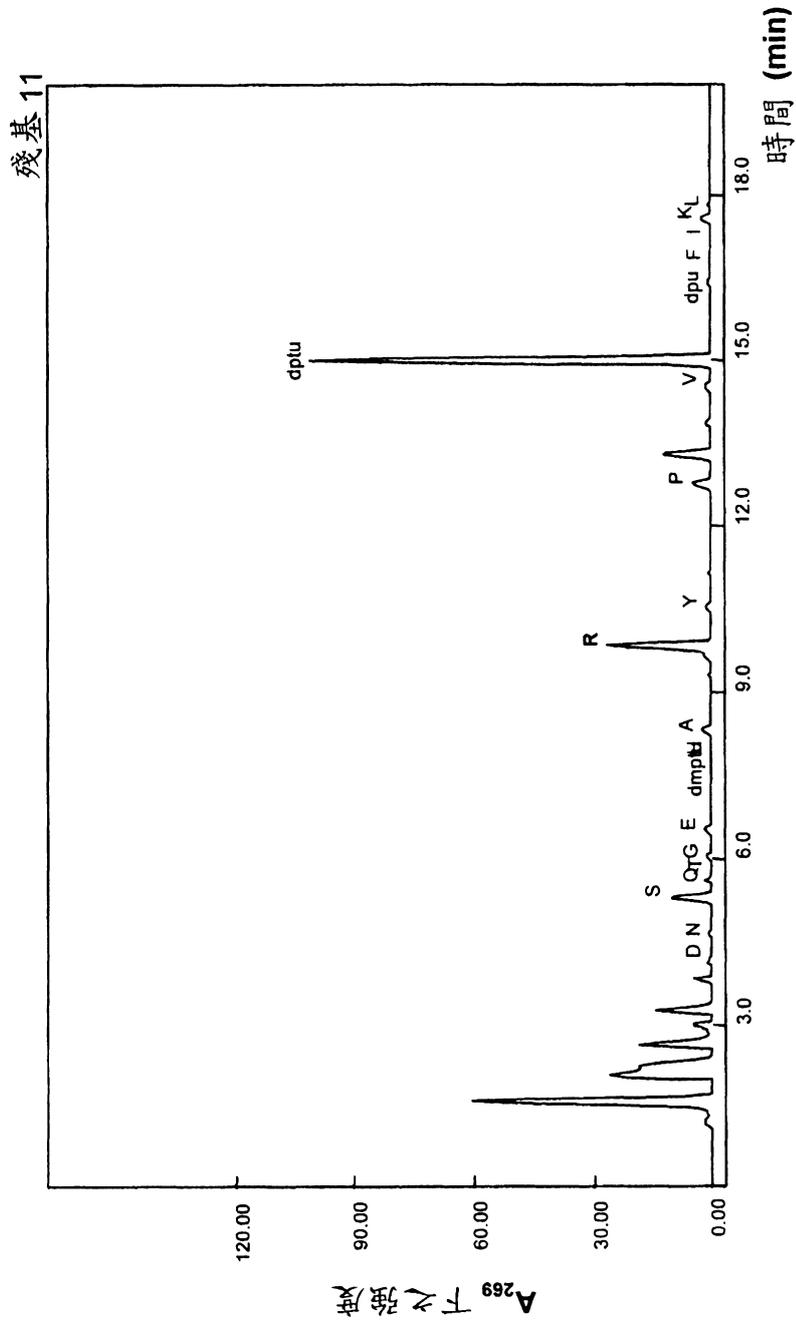


圖18d

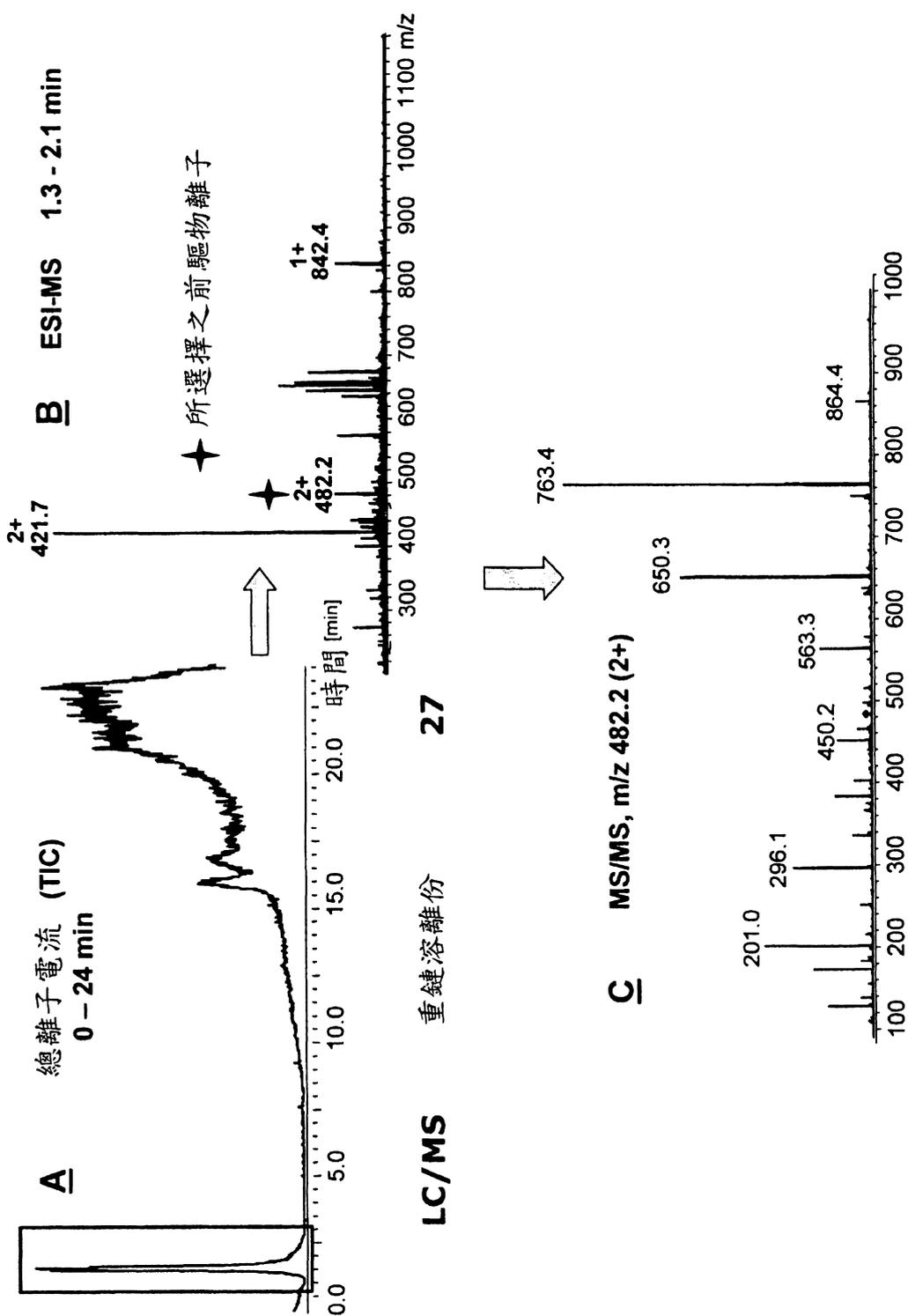


圖19a

血清_IVIG_G1_HC(3)_10, V (20-30) - CDR 1, 溶離份 39

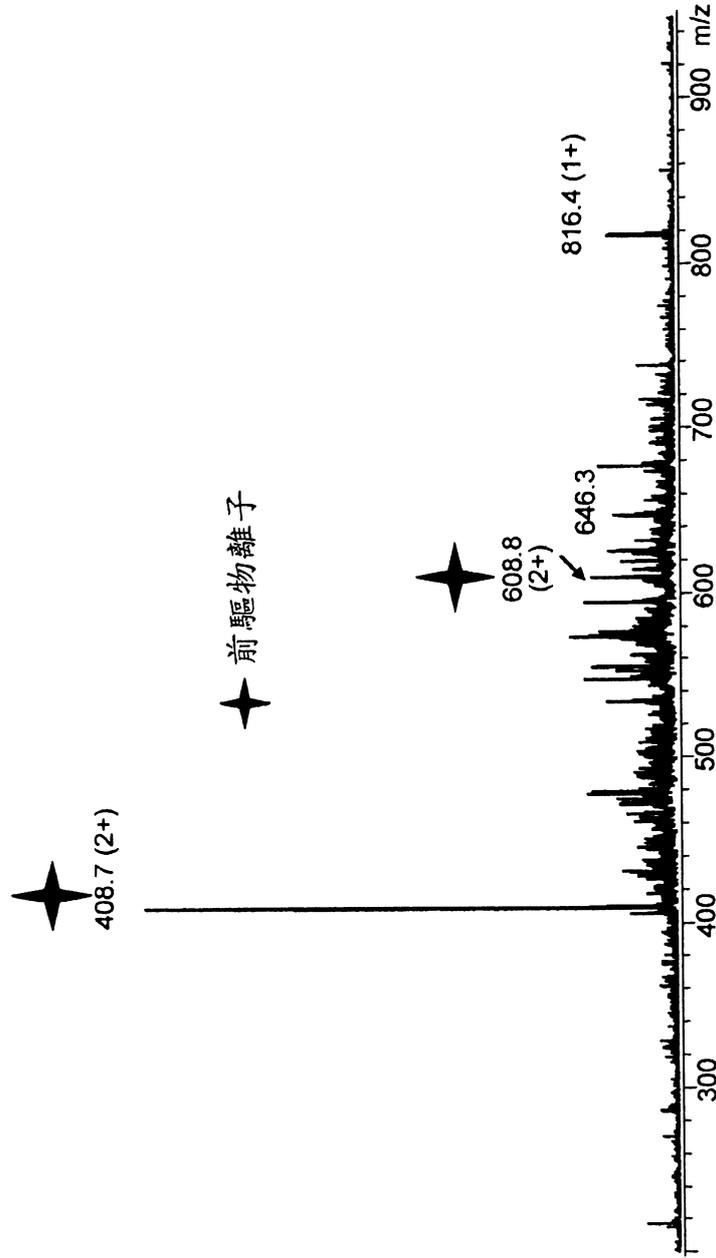


圖19b

血清_IVIG_G1_HC(3)_10, v(20-30) - CDR 1, 溶離份 39

NCBIInr 搜尋

LSCAASGFTFR
Ig 可變區

從頭鑑別

Y₉Y₈Y₇Y₆Y₅Y₄Y₃Y₂Y₁
L-S-C-A-A-S-G-F-T-F-R

508.7

MS/MS, m/z 608.8 (2+) M_r (exp) 1215.6

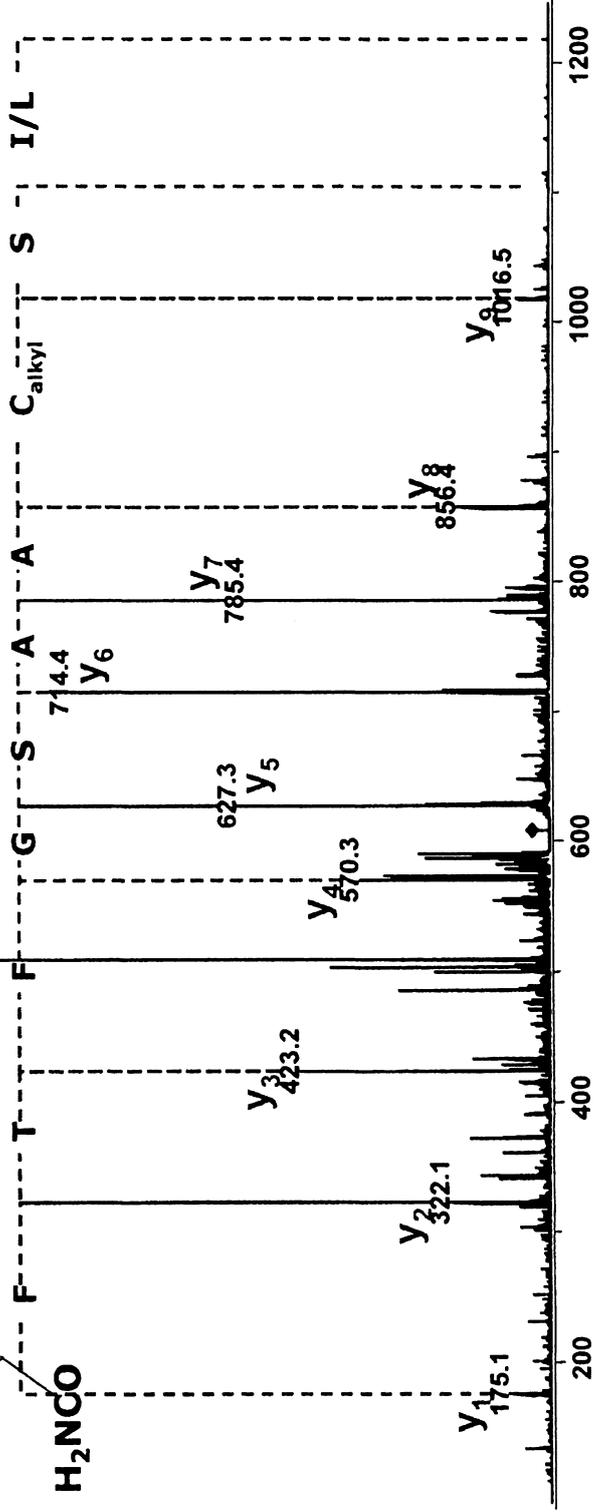


圖19c

MALDI-TOF-MS / 溶離份 50
血清 IVIG_G1_HC(2)_1 c(138-151)

1424.3

STSESTAALGCLVK

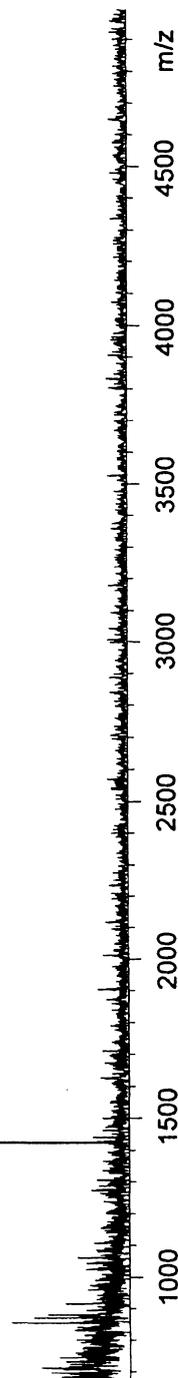


圖 20a

MALDI-TOF-MS HPLC/ 溶離份 75
Serum IVIG_G1_HC(1)_1 c(375-396)

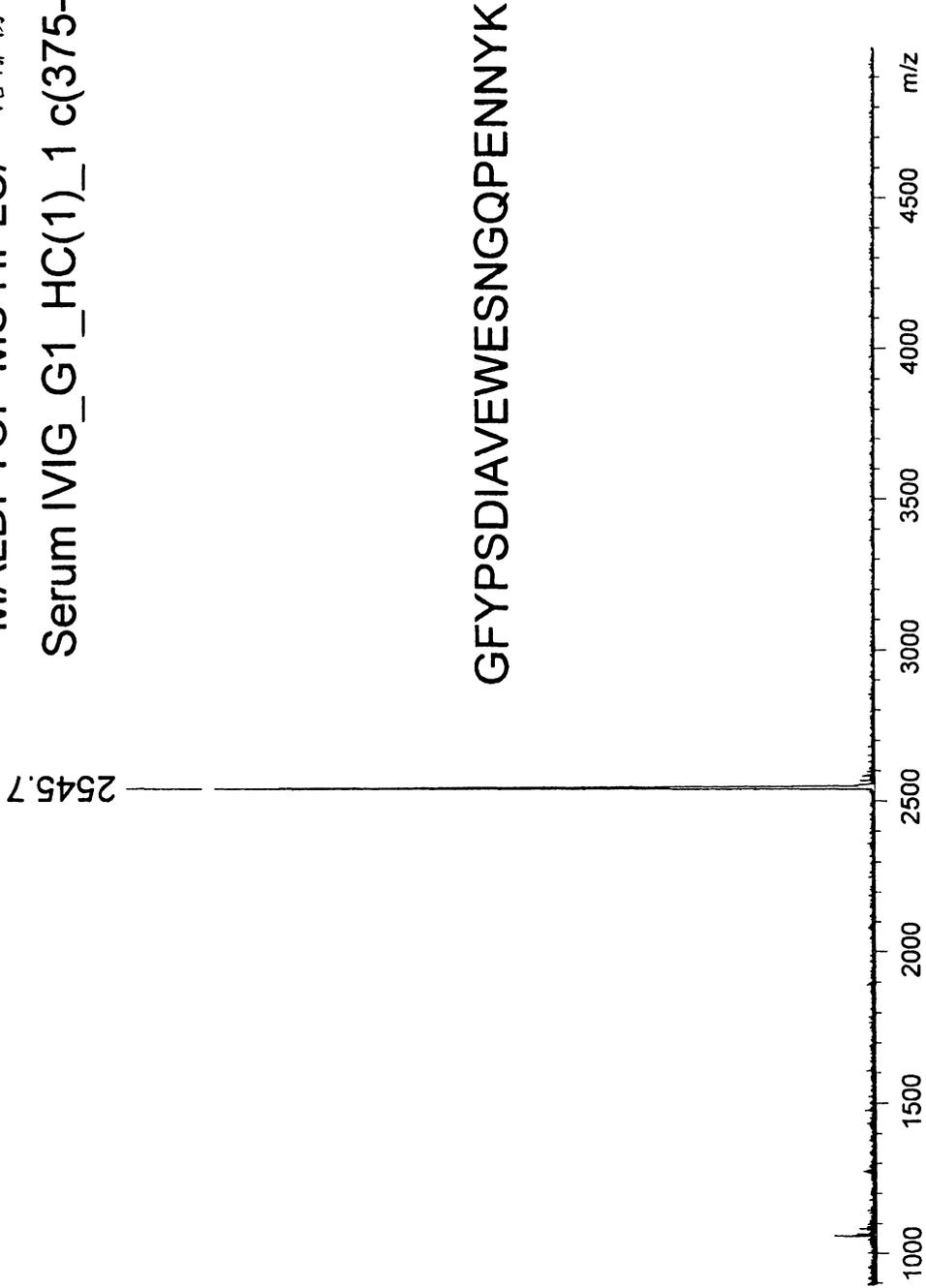


圖20b

血清 IVIG_G1_HC(1)_1 c(349-359)
血清 IVIG_G1_HC(1)_1 c(349-364)
血清 IVIG_G1_HC(1)_1 c(137-151)

MALDI-FTICR-MS /HPLC 溶離份 47

STSGGTAALGCLVK EPQVYTLPPSRDELTK

816.4351

EPQVYTLPPSR

1286.6738
1321.6761

1872.9640

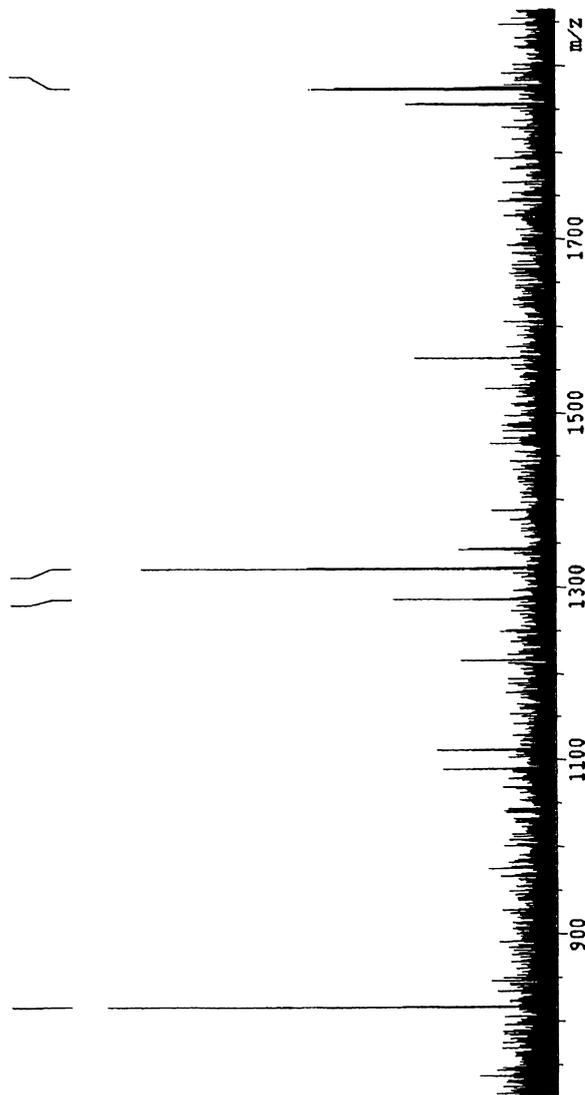


圖 21a

MALDI-FTICR-MS /HPLC 溶離份 66

TPEVTCVWVDVSHEDPEVK

FNWYVDGVEVHNAK

血清 IVIG_G1_HC(1)_1 c(260-278)

血清 IVIG_G1_HC(1)_1 c(279-292)

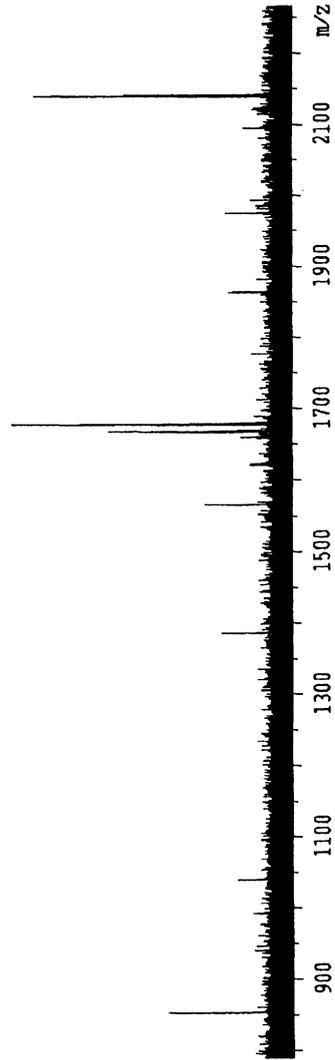
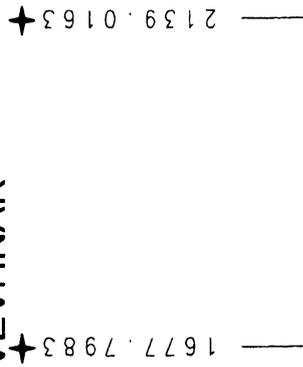


圖21b

MALDI-FTICR-MS /HPLC 溶離份 96
VSVLTVLHQDWLNGK
血清 IVIG_G1_HC(1)_1 c(306-321)

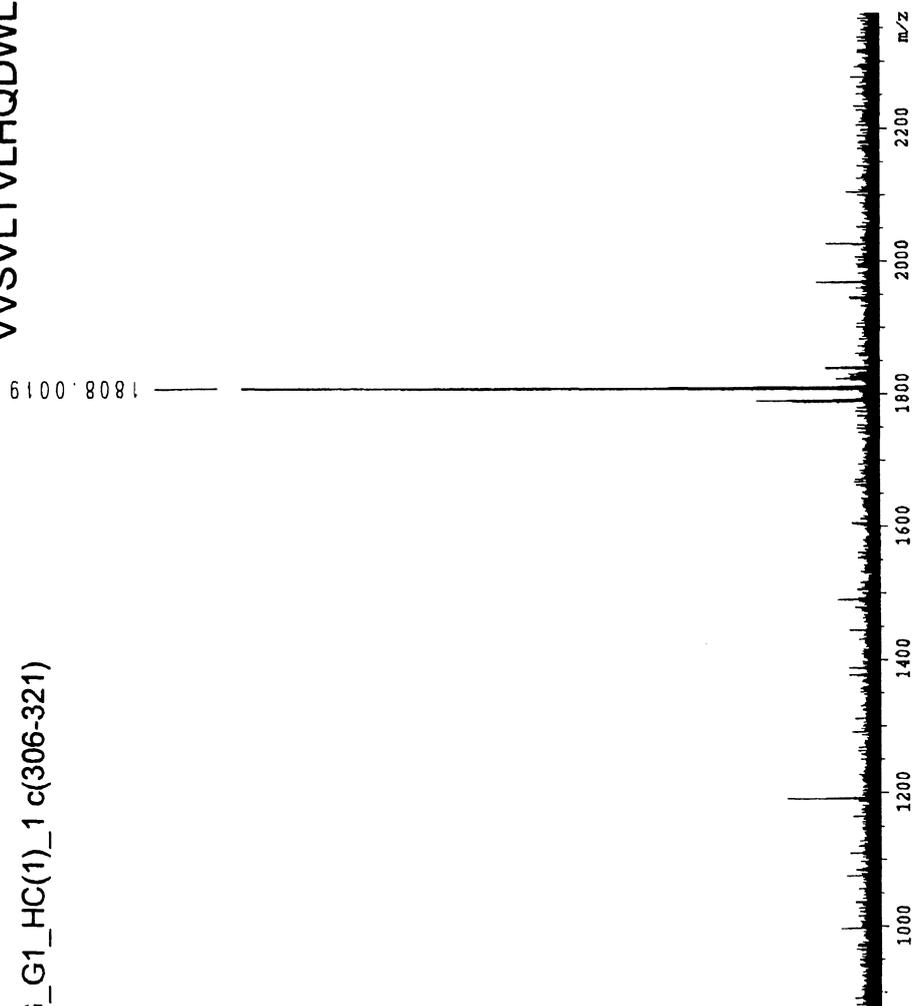
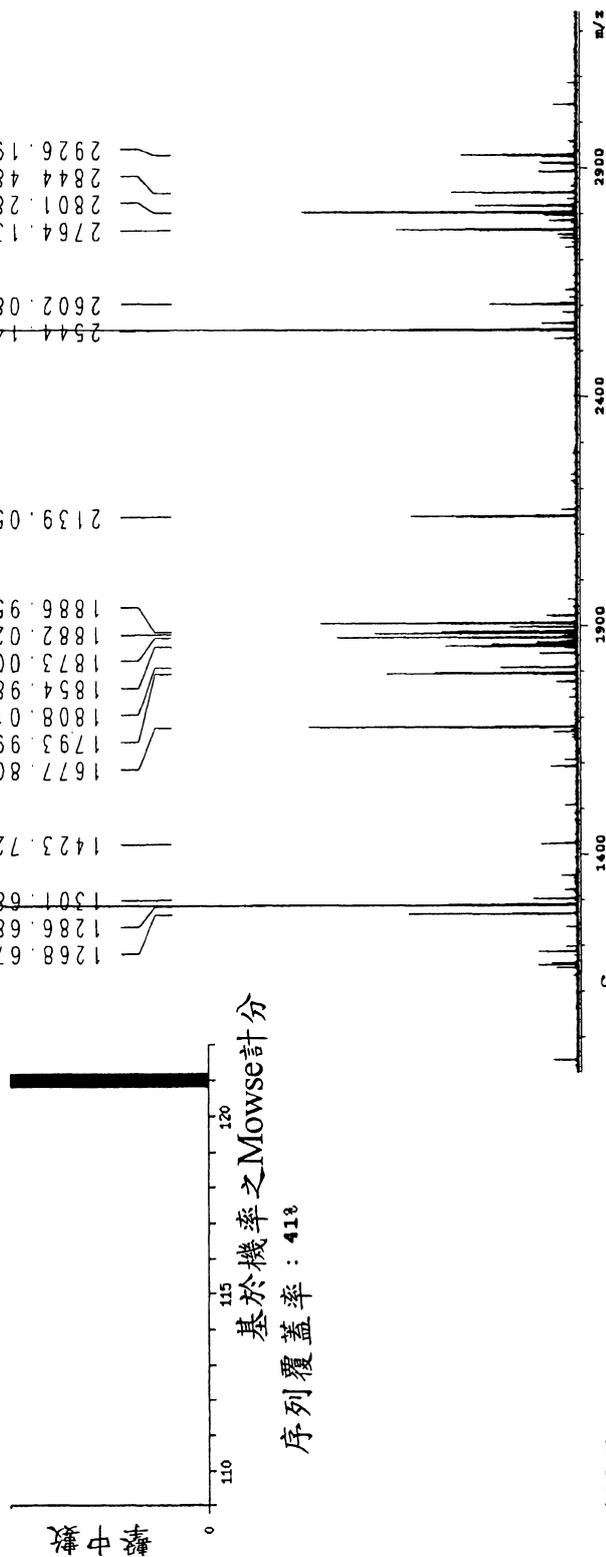


圖21c

1. gi1184747 質量: 36525 計分: 121 期望值: 1.1e-07 匹配查詢: 8
 免疫球蛋白γ-1重鏈恆定區 (智人)



基於機率之Mowse計分
 序列覆蓋率: 41%

測得值	Mi(期望值)	Mi(計算值)	δ	漏失	序列
2844.4825	2843.4752	2843.4502	0.0250	0	K.THTCPCPAPELJGGPSVFLFPPPK.D IVIG_G1_HC1_C(227-252)
2139.0577	2138.0504	2138.0201	0.0303	0	R.TREVTCVVVDVSHEDPEVK.F IVIG_G1_HC1_C(260-278)
1677.8027	1676.7954	1676.7946	0.0008	0	K.FWVYDGVVEVHNAK.T IVIG_G1_HC1_C(279-292)
1808.0110	1807.0037	1806.9992	0.0046	0	R.VVSVLTVLHQDWLNGK.E IVIG_G1_HC1_C(306-321)
1286.6897	1285.6824	1285.6666	0.0158	0	R.EPQVYTLPPSR.D IVIG_G1_HC1_C(349-359)
1873.0026	1871.9953	1871.9629	0.0325	1	R.EPQVYTLPPSRDELTK.N IVIG_G1_HC1_C(349-364)
2544.1448	2543.1375	2543.1240	0.0135	0	K.GFYPSDIAVENESNGQPENNYK.T IVIG_G1_HC1_C(375-396)
2801.2859	2800.2786	2800.2598	0.0188	0	R.WQDQNVFSCSVHREALHNNHYTQK.S IVIG_G1_HC1_C(421-443)

圖22a

qi127728681

質量: 52436

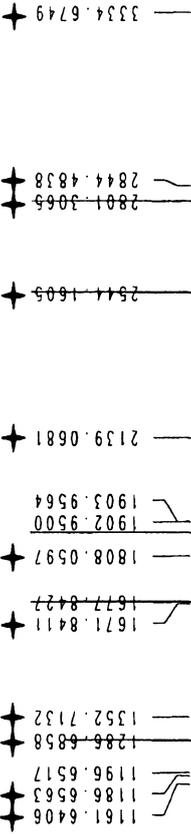
計分: 117

期望值: 2.9e-07

匹配查詢: 12

抗狂犬病 SOJA 免疫球蛋白重鏈

智人



測得值	Mr(期望值)	Mr(計算值)	δ	漏失	序列
1352.7132	1351.7059	1351.6918	0.0141	0	K.NTLYLQMNLSR.A IVIG_G1_HC1_V(77-87)
1186.6563	1185.6490	1185.6393	0.0097	0	K.GPSVFPLAPSSK.S IVIG_G1_HC1_V(126-137)
3334.6749	3333.6676	3333.6348	0.0328	1	K.SCDKTHTCPCPCAPPELLGGPSVFLFPPPK.D
2844.4838	2843.4765	2843.4502	0.0263	0	K.THTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPPK.D IVIG_G1_C(227-252)
2139.0681	2138.0608	2138.0201	0.0407	0	R.TPEVTCVVVDVSHEDPEVK.F IVIG_G1_HC1_C(306-317)
1671.8411	1670.8338	1670.8012	0.0326	1	K.TKPREEQYNSTYR.V IVIG_G1_HC1_C(293-305)
1808.0263	1807.0190	1806.9992	0.0199	0	R.VVSVLTVLHQDWLNGK.E IVIG_G1_HC1_C(306-317)
1286.6858	1285.6785	1285.6666	0.0119	0	R.EPQVYTLPPSR.E IVIG_G1_HC1_C(349-359)
1904.9659	1903.9586	1903.9349	0.0237	1	R.EPQVYTLPPSR.E IVIG_G1_HC1_C(349-359)
1161.6406	1160.6333	1160.6223	0.0110	0	K.NQVSLTCLVK.G IVIG_G1_HC1_C(365-374)
2544.1605	2543.1532	2543.1240	0.0292	0	K.GFYPSDIAVENESNGQPENNYK.T IVIG_G1_H(375-396)
2801.3065	2800.2992	2800.2598	0.0394	0	R.WQOQNVFSCSVMHHEALHNHYTQK.S IVIG_G1_H(421-443)

圖 22b

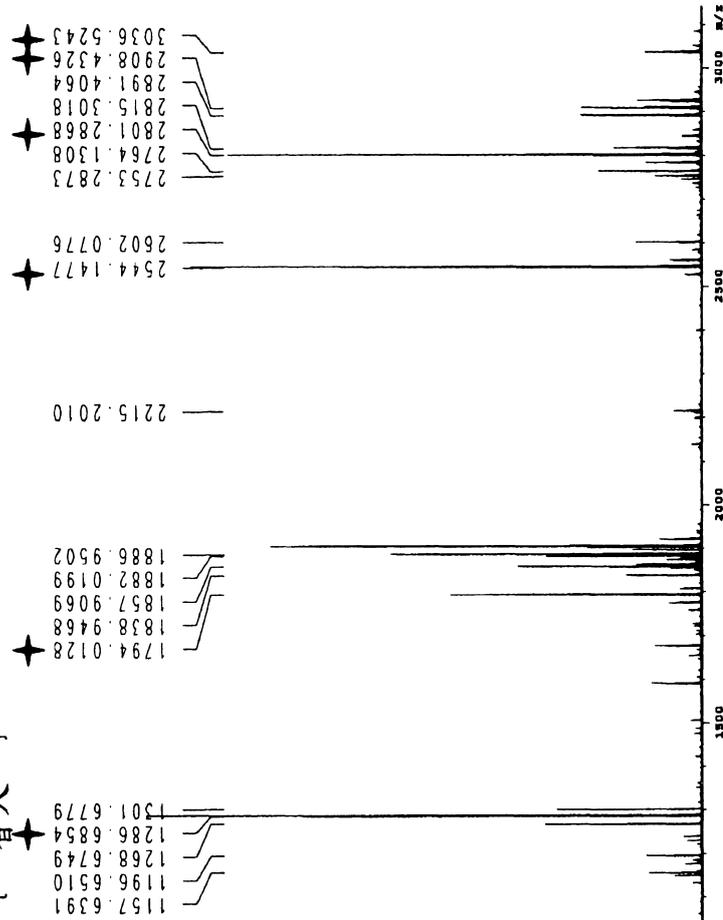
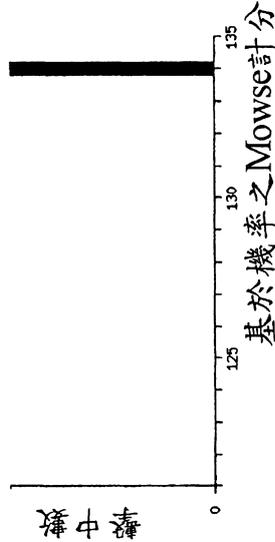
gi125987833

質量: 36357 計分: 134 期望值: 5.9e-09

匹配查詢: 6

免疫球蛋白γ 2重鏈恆定區

[智人]



測得值	Mr(期望值)	Mr(計算值)	δ	漏失	序列
3036.5243	3035.5170	3035.4893	0.0277	1	R.KCCVECPCPAPPVAGRSVFLEFRPKK.D
2908.4326	2907.4253	2907.3943	0.0310	0	K.CCCECPCPAPPVAGRSVFLEFRPKK.D
1794.0128	1793.0055	1792.9835	0.0220	0	R.VVSVLTVVHQDWLNGK.E
1286.6854	1285.6781	1285.6666	0.0115	0	R.EPQVYTLPPSR.E
2544.1477	2543.1404	2543.1240	0.0164	0	K.GFYPSDIAVEMESNGQRENNYK.T
2801.2868	2800.2795	2800.2598	0.0197	0	R.WQGGNVFSCSVMEALHNNHYTQK.5

圖 22c

名稱	來源	類型 ¹	連接/ 恆定區同功異型物	CDRs		
				CDR1	CDR2	CDR3
IVIG_(1)_A'	IVIgG	LCK	IVIG_(4)_A / 1, 2	2	1	1
IVIG_(2)_B'	IVIgG	LCK	IVIG_(5)_B / 1, 2	1	5	1
IVIG_(3)	IVIgG	LC λ	IVIG_(4)_A / 1	5	6	3
IVIG_(4)_A	IVIgG	HC	IVIG_(1)_A' 及 IVIG_(3) / 1, 2, 3	1	1	1
IVIG_(5)_B	IVIgG	HC	IVIG_(2)_B' / 1, 2, 3	2	7	3
IVIG_(6)	IVIgG	LCK	---- / 1, 2	2	3	1
IVIG_(7)	IVIgG	LCK	---- / 1, 2	3	1	1
IVIG_(8)	IVIgG	LCK	---- / 1, 2	1	4	1
血清_(9)	血清 ²	LCK	---- / 1, 2	1	4	2
血清_(10)	血清 ³	LCK	---- / 1	2	1	1
血清_(11)	血清 ³	LCK	---- / 1, 2	4	2	1

¹k, kappa, λ , lambda, 輕鏈 ; HC, 重鏈

²PI_1, 患者_1 (Ü-30-A)

³PI_2, 患者_2 (Ü-30-B)

圖 23a

名稱	來源	類型 ¹	連接/ 恆定區同功異型物	CDRs		
				CDR1	CDR2	CDR3
IVIG_(12)	IVIgG	HC	----	1	6	1
IVIG_(13)	IVIgG	HC	----	2	1	3
IVIG_(14)	IVIgG	HC	----	3	3	2
IVIG_(15)	IVIgG	HC	----	3	2	2
IVIG_(16)	IVIgG	HC	----	8	7	4
IVIG_(17)	IVIgG	HC	----	6	5	4
IVIG_(18)	IVIgG	HC	----	6	7	4
IVIG_(19)	IVIgG	HC	----	2	7	4
IVIG_(20)	IVIgG	HC	----	2	1	4
IVIG_(21)	IVIgG	HC	----	4	1	4

¹ HC, 重鏈

圖23b

名稱	來源	類型 ¹	恆定區同功異型物 連接/	CDRs		
				CDR1	CDR2	CDR3
血清_(22)	血清 ²	HC	---- / 1, 2	7	1	5
血清_(23)	血清 ²	HC	---- / 1, 2	4	1	1
血清_(24)	血清 ³	HC	---- / 1, 3	5	6	4
血清_(25)	血清 ²³	HC	---- / 1, 3	2	4	1

¹ HC, 重鏈
² PI₁, 患者₁ (Ü-30-A)
³ PI₂, 患者₂ (Ü-30-B)

圖23c

CDR1	CDR2	CDR3
(1) SYWMS (SEQ ID NO:13)	(1) SVKQDGSEKYYVDSVKG (SEQ ID NO:21)	(1) DASSWYRDWFDP (SEQ ID NO:28)
(2) GYWMS (SEQ ID NO:14)	(2) RIGTAGDRYYAGSVKG (SEQ ID NO:22)	(2) GAGRWAPLGAFDI (SEQ ID NO:29)
(3) NYDMH (SEQ ID NO:15)	(3) RIGTAGRTNYPNPSLKG (SEQ ID NO:23)	(3) DGSSWYRDWFDP (SEQ ID NO:30)
(4) SYWMH (SEQ ID NO:16)	(4) SVKQFFSGKYYAGSVKG (SEQ ID NO:24)	(4) DGSSWYRDWFDP (SEQ ID NO:31)
(5) NYWMS (SEQ ID NO:17)	(5) SVKQFFGSAATGSVKG (SEQ ID NO:25)	(5) DAGRWADLAFDI (SEQ ID NO:32)
(6) SYDMS (SEQ ID NO:18)	(6) SVKQFFSGPLATGSVKG (SEQ ID NO:26)	
(7) SYDMS (SEQ ID NO:19)	(7) SVKQDGSEKYYVDSVKG (SEQ ID NO:27)	
(8) SYWMS (SEQ ID NO:20)	(8) EINRSGATNYPNPSLKS (SEQ ID NO:149)	

圖 24a

CDR1	CDR2	CDR3
(1) RESQGIRNYLA (SEQ ID NO:33)	(1) GASTRAT (SEQ ID NO:38)	(1) QQYGSSQGT (SEQ ID NO:44)
(2) RASQSVNSYLA (SEQ ID NO:34)	(2) AASIRAT (SEQ ID NO:39)	(2) QQANSFPLT (SEQ ID NO:45)
(3) RESQGIRNYLA (SEQ ID NO:35)	(3) GAASRAT (SEQ ID NO:40)	
(4) RASQSVSSYLA (SEQ ID NO:36)	(4) KASSLQS (SEQ ID NO:41)	
	(5) AASSRAT (SEQ ID NO:42)	
	(6) AASTLQS (SEQ ID NO:150)	
	(7) KVSNRFS (SEQ ID NO:151)	
	(8) WASTRES (SEQ ID NO:152)	
LC _λ	LC _λ	LC _λ
(5) TLSSEHSTYTIE (SEQ ID NO:37)	(9) VKSDGSH (SEQ ID NO:43)	(3) GESHTIDGQC (SEQ ID NO:46)

圖24b

	H31	H32	H33	H34	H35
SEQ ID NO: 13	S	Y	W	M	S
SEQ ID NO: 14	G	Y	W	M	S
SEQ ID NO: 15	N	Y	D	M	H
SEQ ID NO: 16	S	Y	W	M	H
SEQ ID NO: 17	N	Y	W	M	S
SEQ ID NO: 18	S	Y	D	M	S
SEQ ID NO: 19	S	Y	D	M	S
SEQ ID NO: 20	S	Y	W	M	S
來自 SEQ ID NO: 56	S	Y	W	M	S
來自 SEQ ID NO: 57	G	Y	W	M	S
來自 SEQ ID NO: 58	S	Y	W	M	S
來自 SEQ ID NO: 59	G	Y	W	M	S
來自 SEQ ID NO: 60	N	Y	D	M	H
來自 SEQ ID NO: 61	N	Y	D	M	H
來自 SEQ ID NO: 62	S	Y	W	M	S
來自 SEQ ID NO: 63	S	Y	D	M	S
來自 SEQ ID NO: 64	S	Y	D	M	S
來自 SEQ ID NO: 65	G	Y	W	M	S
來自 SEQ ID NO: 66	G	Y	W	M	S
來自 SEQ ID NO: 67	S	Y	W	M	H
來自 SEQ ID NO: 68	S	Y	D	M	S
來自 SEQ ID NO: 69	S	Y	W	M	H
來自 SEQ ID NO: 70	N	Y	W	M	S
來自 SEQ ID NO: 71	G	Y	W	M	S
來自 SEQ ID NO: 148	N	Y	D	M	H
SEQ ID NO: 6	H31	H32	H33	H34	H35
	S	Y	W	M	S
	G	Y	W	M	S
	N	Y	W	M	H

圖24c

SEQ ID NO: 21	H50	H51	H52	H52a	H53	H54	H55	H56	H57	H58	H59	H60	H61	H62	H63	H64	H65
	S	V	K	Q	D	G	S	E	K	Y	Y	V	D	S	V	K	G
	R	I	G		T	A	G	D	R	Y	Y	A	G	S	V	K	G
	R	I	G	Q	F	A	G	R	T	N	Y	N	P	S	L	K	G
	S	V	K	Q	F	F	S	G	K	Y	A	A	G	S	V	K	G
	S	V	K	Q	F	F	S	G	S	A	A	T	G	S	V	K	G
	S	V	K	Q	F	F	S	E	P	L	A	T	G	S	V	K	G
	S	V	K	Q	D	G	S	A	K	Y	Y	V	D	S	V	K	G
	E	I	N	.	R	S	G	A	T	N	Y	N	P	S	L	K	S
來自SEQ ID NO: 56	S	V	K	Q	D	G	S	E	K	Y	Y	V	D	S	V	K	G
來自SEQ ID NO: 57	S	V	K	Q	D	G	S	E	K	Y	Y	V	D	S	V	K	G
來自SEQ ID NO: 58	S	V	K	Q	F	F	S	E	K	Y	Y	V	D	S	V	K	G
來自SEQ ID NO: 59	S	V	K	Q	F	F	S	E	K	Y	Y	V	D	S	V	K	G
來自SEQ ID NO: 60	S	V	K	Q	D	A	G	R	T	N	Y	N	P	S	L	K	G
來自SEQ ID NO: 61	S	V	K	Q	T	A	G	D	R	Y	Y	A	G	S	V	K	G
來自SEQ ID NO: 62	S	V	K	Q	D	F	S	E	K	Y	Y	V	D	S	V	K	G
來自SEQ ID NO: 63	S	V	K	Q	F	G	S	E	K	Y	Y	V	D	S	V	K	G
來自SEQ ID NO: 64	S	V	K	Q	D	G	S	E	K	Y	Y	V	D	S	V	K	G
來自SEQ ID NO: 65	S	V	K	Q	D	G	S	E	K	Y	Y	V	D	S	V	K	G
來自SEQ ID NO: 66	S	V	K	Q	D	G	S	E	K	Y	Y	V	D	S	V	K	G
來自SEQ ID NO: 67	S	V	K	Q	D	G	S	E	K	Y	Y	V	D	S	V	K	G
來自SEQ ID NO: 68	S	V	K	Q	D	G	S	E	K	Y	Y	V	D	S	V	K	G
來自SEQ ID NO: 69	S	V	K	Q	D	G	S	E	K	Y	Y	V	D	S	V	K	G
來自SEQ ID NO: 70	S	V	K	Q	F	F	S	E	K	Y	Y	V	D	S	V	K	G
來自SEQ ID NO: 71	S	V	K	Q	F	F	S	E	K	Y	Y	V	D	S	V	K	G
來自SEQ ID NO: 148	E	I	N	.	R	S	G	A	T	N	Y	N	P	S	L	K	S
SEQ ID NO: 7	H50	H51	H52	H52a	H53	H54	H55	H56	H57	H58	H59	H60	H61	H62	H63	H64	H65
	S	V	K	Q	D	G	S	E	K	Y	Y	V	D	S	V	K	G
	R	I	G	.	F	F	G	E	K	Y	Y	A	G	S	V	K	G
	E	N	N	R	T	A	S	R	P	L	A	T	G	S	L	K	S

圖 24d

	L24	L25	L26	L27	L28	L29	L30	L31	L32	L33	L34
SEQ ID NO: 33	R	E	S	Q	G	I	R	N	Y	L	A
SEQ ID NO: 34	R	A	S	Q	S	V	N	S	Y	L	A
SEQ ID NO: 35	R	E	S	Q	G	I	R	N	Y	L	A
SEQ ID NO: 36	R	A	S	Q	S	V	S	S	Y	L	A
來自 SEQ ID NO: 47	R	A	S	Q	S	V	N	S	Y	L	A
來自 SEQ ID NO: 48	R	E	S	Q	G	I	R	N	Y	L	A
來自 SEQ ID NO: 50	R	A	S	Q	S	V	N	S	Y	L	A
來自 SEQ ID NO: 51	R	E	S	Q	G	I	R	N	Y	L	A
來自 SEQ ID NO: 52	R	E	S	Q	G	I	R	N	Y	L	A
來自 SEQ ID NO: 53	R	E	S	Q	G	I	R	N	Y	L	A
來自 SEQ ID NO: 54	R	A	S	Q	S	V	N	S	Y	L	A
來自 SEQ ID NO: 55	R	A	S	Q	S	V	S	S	Y	L	A
來自 SEQ ID NO: 145	R	E	S	Q	G	I	R	N	Y	L	A
來自 SEQ ID NO: 146	R	E	S	Q	G	I	R	N	Y	L	A
來自 SEQ ID NO: 147	R	E	S	Q	G	I	R	N	Y	L	A
SEQ ID NO: 9	R	A	S	Q	S	V	N	S	Y	L	A
	E				G	I	R	N			
							S				

圖24f

	L50	L51	L52	L53	L54	L55	L56
SEQ ID NO: 38	G	A	S	T	R	A	T
SEQ ID NO: 39	A	A	S	I	R	A	T
SEQ ID NO: 40	G	A	S	S	R	A	T
SEQ ID NO: 41	K	A	S	S	L	Q	S
SEQ ID NO: 42	A	A	S	S	R	A	T
SEQ ID NO:150	A	A	S	T	L	Q	S
SEQ ID NO:151	K	V	S	N	R	F	S
SEQ ID NO:152	W	A	S	T	R	E	S
來自SEQ ID NO: 47	G	A	S	T	R	A	T
來自SEQ ID NO: 48	A	A	S	S	R	A	T
來自SEQ ID NO: 50	G	A	S	S	R	A	T
來自SEQ ID NO: 51	G	A	S	T	R	A	T
來自SEQ ID NO: 52	A	A	S	T	L	Q	S
來自SEQ ID NO: 53	K	A	S	S	L	Q	S
來自SEQ ID NO: 54	G	A	S	T	R	A	T
來自SEQ ID NO: 55	A	A	S	I	R	A	T
來自SEQ ID NO: 145	A	A	S	T	L	Q	S
來自SEQ ID NO: 146	K	V	S	N	R	F	S
來自SEQ ID NO: 147	W	A	S	T	R	E	S
	L50	L51	L52	L53	L54	L55	L56
SEQ ID NO: 10	G	A	S	S	R	A	T
	W	V	A	T	L	Q	S
	A			I		F	
	K			N		E	

圖24g

	L89	L90	L91	L92	L93	L94	L95	L96	L97
SEQ ID NO: 44	Q	Q	Y	G	S	S	Q	G	T
SEQ ID NO: 45	Q	Q	A	N	S	S	F	P	L
來自SEQ ID NO: 47	Q	Q	Y	G	S	S	Q	G	T
來自SEQ ID NO: 48	Q	Q	Y	G	S	S	Q	G	T
來自SEQ ID NO: 50	Q	Q	Y	G	S	S	Q	G	T
來自SEQ ID NO: 51	Q	Q	Y	G	S	S	Q	G	T
來自SEQ ID NO: 52	Q	Q	Y	G	S	S	Q	G	T
來自SEQ ID NO: 53	Q	Q	A	N	S	F	P	L	T
來自SEQ ID NO: 54	Q	Q	Y	G	S	S	Q	G	T
來自SEQ ID NO: 55	Q	Q	Y	G	S	S	Q	G	T
來自SEQ ID NO: 145	Q	Q	A	N	S	F	P	L	T
來自SEQ ID NO: 146	Q	Q	A	N	S	F	P	L	T
來自SEQ ID NO: 147	Q	Q	A	N	S	F	P	L	T
SEQ ID NO: 11	Q	Q	A	G	S	S	F	P	L
	L89	L90	L91	L92	L93	L94	L95	L96	L97
	Q	Q	A	G	S	S	F	P	L
			Y						

圖24h

	H31	H32	H33	H34	H35
來自 SEQ ID NO: 60	N	Y	D	M	H
來自 SEQ ID NO: 61	N	Y	D	M	H
來自 SEQ ID NO: 62	S	Y	W	M	S
來自 SEQ ID NO: 68	S	Y	D	M	S
來自 SEQ ID NO: 148	N	Y	D	M	H
	H31	H32	H33	H34	H35
SEQ ID NO: 153	N	Y	D	M	H
	S		W		S

圖24i

	H31	H32	H33	H34	H35
來自 SEQ ID NO: 60	N	Y	D	M	H
來自 SEQ ID NO: 61	N	Y	D	M	H
來自 SEQ ID NO: 148	N	Y	D	M	H
SEQ ID NO: 154	H31	H32	H33	H34	H35
	N	Y	D	M	H

圖24j

	H31	H32	H33	H34	H35
來自 SEQ ID NO: 62	S	Y	W	M	S
來自 SEQ ID NO: 68	S	Y	D	M	S
SEQ ID NO: 155	S	Y	W	M	S
			D		

圖24k

H50	H51	H52	H53	H54	H55	H56	H57	H58	H59	H60	H61	H62	H63	H64	H65	
來自 SEQ ID NO: 60	R	I	G	T	A	G	R	T	N	Y	N	P	S	L	K	G
來自 SEQ ID NO: 61	R	I	G	T	A	G	D	R	Y	A	G	S	V	K	G	
來自 SEQ ID NO: 148	E	I	N	R	S	G	A	T	N	Y	N	P	S	L	K	S
SEQ ID NO: 157	H50	H51	H52	H53	H54	H55	H56	H57	H58	H59	H60	H61	H62	H63	H64	H65
R	I	G	T	A	G	R	T	N	Y	N	P	S	L	K	K	G
E	N	R	S	D	R	Y	A	G	V	S						

圖 24m

	H50	H51	H52	H52a	H53	H54	H55	H56	H57	H58	H59	H60	H61	H62	H63	H64	H65
來自																	
SEQ ID																	
NO: 62	S	V	K	Q	D	G	S	E	K	Y	Y	V	D	S	V	K	G
來自																	
SEQ ID																	
NO: 68	S	V	K	Q	D	G	S	E	K	Y	Y	V	D	S	V	K	G
	H50	H51	H52	H52a	H53	H54	H55	H56	H57	H58	H59	H60	H61	H62	H63	H64	H65
SEQ ID																	
NO: 158	S	V	K	Q	D	G	S	E	K	Y	Y	V	D	S	V	K	G

圖24n

來自SEQ ID NO: 60	H95	H96	H97	H98	H99	H100	H100a	H100b	H100c	H100d	H100e	H101	H102
	G	A	G	R	W	A	P	L	G	A	F	D	I
來自SEQ ID NO: 61	G	A	G	R	W	A	P	L	G	A	F	D	I
來自SEQ ID NO: 62	D	G	S	S	W	Y	R	D	W	F	D	D	P
來自SEQ ID NO: 68	D	A	G	R	W	A	D	L	A	F	D	D	I
來自SEQ ID NO: 148	G	A	G	R	W	A	P	L	G	A	F	D	I
SEQ ID NO: 159	H95	H96	H97	H98	H99	H100	H100a	H100b	H100c	H100d	H100e	H101	H102
	G	A	G	R	W	A	P	L	G	A	F	D	I
	D	G	S	S	Y	R	D	D	W	F	-	D	P

圖240

	H95	H96	H97	H98	H99	H100	H100a	H100b	H100c	H100d	H100e	H101	H102
來自SEQ ID NO: 60	G	A	G	R	W	A	P	L	G	A	F	D	I
來自SEQ ID NO: 61	G	A	G	R	W	A	P	L	G	A	F	D	I
來自SEQ ID NO: 148	G	A	G	R	W	A	P	L	G	A	F	D	I
	H95	H96	H97	H98	H99	H100	H100a	H100b	H100c	H100d	H100e	H101	H102
SEQ ID NO: 160	G	A	G	R	W	A	P	L	G	A	F	D	I

圖24p

	H95	H96	H97	H98	H99	H100	H100a	H100b	H100c	H100d	H101	H102
來自SEQ ID NO: 62	D	G	S	S	W	Y	R	D	W	F	D	P
來自SEQ ID NO: 68	D	A	G	R	W	A	D	L	A	F	D	I
	H95	H96	H97	H98	H99	H100	H100a	H100b	H100c	H100d	H101	H102
SEQ ID NO: 161	D	G	S	S	W	Y	R	D	W	F	D	P
		A	G	R		A	D	L	A			I

圖24q

1 EIVLTQSPAT LSLSPGERVT ITCRASQSVN SYLAWYQOKP GQAPRLLIY

50 GASTRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYSSQGTFG

100 PGTKVDIKR

SEQ ID NO: 47

Edman, N 端 ; MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS = CDRs

圖 25a

1 EIVLTQSPAT LSLSPGERVT ITCRESQGIR NYLAWYQQKP GQAPRLLIY

 50 AASRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYCSSQCTFG

 100 PGTKVDIKR

SEQ ID NO: 48

Edman, N端, MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS = CDRs

圖 25b

1 LPVLTQPPSA SALLGASIKL TCILSSSEHST YVLEWYQORP GRSPQYIMKY
 51 RSDCSH SKGD GIPDRFMGSS SGADRYLTFS NLQSDDEAEY HCGESHYIDG
 101 QCWFFGGGTK L

SEQ ID NO: 49

Edman, N端 ; MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS [] = CDRs
 圖 25C

1 DIQMTQSPAT LSLSPGERAA LSCRASQSVN SYLAWYQQKP GQAPRLLIY
 50 GAASRAIGIP ARFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYVYQQ QYGSQQGTFG
 100 PGTKVDIKR

SEQ ID NO: 50

Edman, N 端 : MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS = CDRs

圖 25d

1 EIVLTQSPAT LSLSPGERVT ITCRESQGIR NYLAWYQQKP GQAPRLLIY

 50 GASTRAIGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSTGTFG

 100 PGTKVDIKR

SEQ ID NO: 51

Edman, N 端 ----- MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS  = CDRs

圖 25e

1 EIVMTQSPAT LSLSPGERVT ITCRESQGIR NYLAWYQOKP GQAPRLLIY

 50 AASTLQSGVP SRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYVCO QYGSQGTFG

 100 PGTKVDIKR

SEQ ID NO: 52

Edman, N端, MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS = CDRs

圖 25f

1 DVVMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRESQGIR NYLAWYQQKP GKAPKLLIYK

51 ASSLQSGVPS RFGSLLGGK AALTLGVQP EDFATYYCQ QANSEPLTFGG

101 GTKVEIKR

SEQ ID NO: 53

Edman, N 端 ; MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS = CDRs
圖 25g

1 DIVLTQSPAT LSLSPGERVT ITCRASQSVN SYLAWYQOKP GQAPRLLIY

 50 GASTRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSQGTFG

 100 PGTKVDIKR

SEQ ID NO: 54

Edman, N 端 MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS = CDRs

圖 25h

1 DIQMTQSPGT LSLSPGERAA LSCRASQSVS SYLAWYQKP GQAPRLLIY

 50 AASTRAAGIP DRFSGGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSQGTFG

 100 PGTKVDIKR

SEQ ID NO: 55

Edman, N 端 MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS = CDRs

圖 25i

1 DVVMTQSPSS LSASVDRVT ITCRESQGIR NYLAWYQQKP GKAPKLLIYA

51 ASTLQSGVPS RFGSLLGGK AALTLGVQP EDFATYYCQ QANSPFLTFGG

101 GTKVEIKR

SEQ ID NO: 145

Edman, N端, MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS = CDRs

圖 25j

1 DVVMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRESQGIR NYLAWYQQKP GKAPKLLIYK

51 VSNRFSGVPS RFSGSLLGK AALTLSGVQP EDFATYYCQ QANSEPLIFGG

101 GTKVEIKR

SEQ ID NO: 146

Edman, N 端 MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS = CDRs

圖 25k

1 DVVMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRESQGIR NYLANWYQQKP GKAPKLLLIY

51 ASTRESGVPS RFSGSLLGGK AALTLSGVQP EDFATYYCQ QANSFPLIFGG

101 GTKVEIKR

SEQ ID NO: 147

Edman, N端; MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS = CDRs

圖 251

1 EVQLVESGGG VVQPGGSLRL SCAASGFTFR SYWMSWVRQA PGKGLEWVAS
 51 MKQDGSEKYY VDSVKGRFTI SRDTSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARD
 101 SSWYRDWEDE WGQGTIVTVS

SEQ ID NO: 56

Edman, N端, MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS = CDRs

圖 26a

1 EVQLVESGGG VVQPGGSLRL **SCAASGFTFR** **GYWMSWVROA** PGKGLEWVA**S**
 51 **VKQDGEKYYVDSVKGRFTI** SRDTSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYC**ARDG**
 101 **SSWYRDWFEF** WGQGTLLVTVS

SEQ ID NO: 57

Edman, N 端 ; MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS  = CDRs
 圖 26b

1 EVQLVESGGG VVQPGGSLRL SCAASGFTFR SYWMSWVRQA PGKGLEWVAS
 51 VKQFFSGPLA TGSYKGRFTI SRD~~NAKNTLY~~ LQMNSLRAED TAVYYCARD~~A~~
 101 SSWYRDWEDF WGQGTLLVTVS

SEQ ID NO: 58

Edman, N 端 ; MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS  = CDRs
 圖 26c

1 EVQLVESGGG VVQPGGSLRL SCAASGFTFR  WVRQA PGKGLEWVA 
 51  VSDVGRPTI SRDNAKNQFS LKLSVTAAD TAVYYCAR 
 101  WGQGTLLVSVS

SEQ ID NO: 59

Edman, N 端  MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS  = CDRs
 圖 26d

1 EVQLVESGGG VVQPGGSLRL SCAASGFTFR  NYDMHWVRQG IGKGLEWVGR
 51  LGTAGRINYN FSLKGRFTIS RENAKDSLIL QMNSLRVGDA AVYYCAR
 101  RWAPLGAFDT WGQGTLLIVS

SEQ ID NO: 60

Edman, N 端 ; MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS  = CDRs
 圖 26e

1 EVQLVESGGG VVQPGGSLRL SCAASGFTFR NYDMHWVRQG IGKGLVWVSR
 51 IGTAGDRYYA GSVKGRFTIS RENAKDSLIL QMNSLRVGD AVYYCARGAG
 101 RWAPLGAFDI WGQGLIVS

SEQ ID NO: 61

Edman, N 端 : MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS = CDRs

圖 26f

1 EVQLVESGGG VVQPGGSLRL SCAASGFTFS  SYWISWVRQA PGKGLEWVA 

51  VKODGSEPKY VDSVKG  RFTI SRDNAKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAR 

101  SSWYRDWIDE  WGQGTLVTVS

SEQ ID NO: 62

Edman, N 端 ; MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS  = CDRs

圖 26g

1 EVQLVESGGG VVQPGGSLRL SCAASGFTFR **SYDMSWVRQA** PGKGLEWVA**S**
 51 **VKQFFSGSAA** TGSVKGRFTI SRD**NAKNTLY** LQM**NSLRAED** TAVYYC**ARDG**
 101 **SSWYRDWFD**E **WGQ**TLLVTVS

SEQ ID NO: 63

Edman, N 端 ; MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS  = CDRs
 圖 26h

1 EVOLVESGGG_VVOPGGSLRL_SCAA**SGETER**SYDMSWVRQA_PGKLEWVNS
 51 **VKODGSEKYY**YDSVNGRPTI_SRDNAKNQLS_LKLSVTAAD_TAVYYCARDG
 101 **SSWYRDWEDF**WGQGLVTVS

SEQ ID NO: 64

Edman, N 端 ; MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS = CDRs
 圖 26i

1 EVQLVESGGG VVQPGGSLRL SCAASGFTFR  WVRQA PGKGLEWVA 

51  VSDVNGRLTL SVDTSKNQFS LKLSSTAAD TAVYYCARD 

101  WGQGLVSVS

SEQ ID NO: 65

Edman, N端 ; MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS  = CDRs

圖 26j

1 EVQLVESGGG VVQPGGSLRL SCAASGFTFR  GYVNSWVRQA PGKGLEWVA 

51  VVQDGSFKYY VDSVKG  RVTI SVETSKNQFS LKLSVTAAD TAVYYCARD 

101  SSWYRDWEDR  WGQGTILVSVS

SEQ ID NO: 66

Edman, N端 ; MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS  = CDRs

圖 26k

1 EVQLVESGGG VVQPGGSLRL SCAASGFTFR  WVRQA PGKGLEWVA 
 51  VDSVKG RVTI SLDTSKNQFS LKLSSTAAD TAVYYCAR 
 101  WGQGTLSVVS

SEQ ID NO: 67

Edman, N 端 ; MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS  = CDRs

圖 261

1 EVQLVESGGG VVQPGGSLRL SCAASGITFR  SYDMSWVRQA PGKGLEWVA
 51  VSDVKGKRFIV SRDIAKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDA
 101  WGQGLVTVS

SEQ ID NO: 68

Edman, N 端 : MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS  = CDRs
 圖 26m

1 EVQLVESGGG VVQPGGSLRL SCAASGFTFR ██████████SYNHHWVRQA PGKGLEWVAS
 51 VKQDGSNKY VDSYKGRVTI TADRAKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDG
 101 SSWYRDWFDK ██████████WGQGLVTVS

SEQ ID NO: 69

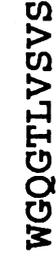
Edman, N 端 ██████████ MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS ██████████ = CDRs
 圖 26n

1 EVQLVESGGG VVQPGGSLRL SCAASGFTFR NYWMSWVRQA PGKGLEWVAS
 51 VKQFFSGPLA TGSVKGRFTI SRDTSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDG
 101 SSWYRDWEDE WGQGTLVTVS

SEQ ID NO: 70

Edman, N 端 ; MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS = CDRs

圖 260

1 EVOLVESGGG_VVOPGGSLRL_SCAASGETER_  WVRQA_PGKGLEWVA 
 51  SVETSKNQFS_LKLSVTAAD_TAVYCARDA 
 101  WGQGLVSVS 

SEQ ID NO: 71

Edman, N 端 ; MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS  = CDRs

圖 26p

1 EVQLVESGGG VVQPGGSLRL SCAASGFTFR  WVRQG IGKGLEWVQR
 51  RFTIS RENAKDSLVL QMNSLRVGDV AVYYCARQ
 101  WGQGTIVS

SEQ ID NO: 148

Edman, N 端 : MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS  = CDRs
 圖 269

101 T VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPREAKVQWK

 151 VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYLSSTL TLSKADYEKH KVYACEVTHQ

 201 GLSSPVTKSF NRGEC

SEQ ID NO: 72

Edman, N 端, MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS

圖 27a

101 T VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT ASVVCLLNMF YPREAKVQWK

 151 VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYLSSTL TLSKADYEKH KLYACEVTHQ

 201 GLSSPVTKSF NRGEC

SEQ ID NO: 73

Edman, N 端 -----; MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS

圖 27b

101 TVLGQPKAA PSVTLFFPSS EELQANKATL VCLISDFYPG

 151 AVTVAWKADS SPVKAGVETT TPSKQSNKY AASSYLSLTP EQWKSHRSYS

 201 CQVTHEGSTV EKTVAPECS

SEQ ID NO: 74

Edman, N 端 ; MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS

圖 27c

101 SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV

 151 KDYFPEPTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TWPSSSLGTQ

 201 TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKCDKTHTC PPCAPELLG GPSVFLFPPK

 251 PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF

 301 FRVVSVL TVLHQDWLNG KEYCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP

 351 QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP

 401 VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQOGNVFSCS VMHEALHNHY TQKLSLSPG

 451 K

SEQ ID NO: 75

 = N糖基化

Edman, N端, MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS

圖 28a

101 SASTKGPVSF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV

 151 KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTO

 201 TYTCNV~~DH~~KP SNTKVDKKVE PKSCDKTHC PPCAPELLG GPSVFLFPPK

 251 PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY

 301 ~~MS~~RVVSVL TVVHQDWLNG KEYCKVSNK GLPAPIEKTI SKAKGQPREP

 351 QVYTLPPSRE EMTKNQVTLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTPP

 401 MLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG

 451 K

SEQ ID NO: 76

 = N 糖基化

Edman, N 端, MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS

圖 28b

101 SASTKGPVSF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV

 151 KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TWPSSSLGTQ

 201 TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSCDKTHTC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK

 251 PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF

 301 FRVSVL TVLHQDWLNG KEYCKVSNK GLPAPIEKTI SKAKGQPREP

 351 QYITLPPSRD ELTKNQSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP

 401 VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG

 451 K

SEQ ID NO: 77

 = 無 N
 糖基化

Edman, N端 ; MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS

圖28c

1 EIVLTQSPAT LSLSPGERVT I T **TRASQSVN SYLAWYQQKP** GQAPRLLIY

 50 **GASTRAIGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYIQQ** **QYGSSQGT**FG

 100 PGTKVDIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT ASV**MLL**NNF YPREAKVQWK

 150 VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYLSSTL TLSKADYEKH K**YVAC**EVTHQ

 200 GLSSP**TKSF** ^{HC-LC}NR**GE****C**

SEQ ID NO: 78

Edman, N 端 ; MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS  = CDRs

圖 29a

1 EIVLTQSPAT LSLSPGERVT ITCRASQSVN SYLAWYQOKP GQAPRLLIY
 50 GASTRAIGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYVYQO QYCSSQGTFG
 100 PGTKVDIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPREAKVQWK
 150 VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSSL TLISKADYEKH KLYACEVTHQ
 200 GLSSPVTKSF NRGEC

SEQ ID NO: 79

Edman, N 端 ; MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS = CDRs

圖 29b

1 EIVLTQSPAT LSLSPGERVT I**Q**RES**Q**GIR NYLAWY**Q**QKP GQAPRLLIY
 50 **A**ASSR**A**TGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVY**Y****Q** QYGS**S**Q**G**T**F**G
 100 PGTKVDIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT ASV**V****Q**LLNNF YPREAKVQWK
 150 VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYLSSTL TLSKADYEKH KVYA**Q**EVTHQ
 200 GLSSP**V**TKSF NR**G**F**Q**^{HCAC}

SEQ ID NO: 80

Edman, N 端 ; MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS  = CDRs

圖 29c

1 EIVLTQSPAT LSLSPGERVT ITCRESQGIR NYLAWYQQKP GQAPRLLIY
 50 AASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYQCQ QYGSSTQGFPG
 100 PGTKVDIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPREAKVQWK
 150 VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYLSSTL TLSKADYEKH KLYACEVTHQ
 200 GLSSPVTKSF NRGEC

SEQ ID NO: 81

Edman, N端 ; MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS
 圖 29d = CDRs

1 LPVLTQPPSA SALLGASIKL  YVYVYQORP GRSPQYIMKY
 51  KSDGSHSKGD GIPDRFMGSS SGADRYLTFS NLQSDDEAEY  HCBESHYLDG
 101  QVWFGGGTK LTVLGQPKAA PSVTLFPPSS EELQANKATL VOLISDFYPG
 151 AVTVAWKADS SPVKAGVETT TPSKQSNKY AASSYLSLTP EOWKSHRSYS
 201  QVTHEGSTV EKTVAPTHES^{HCLC}

SEQ ID NO: 82

Edman, N 端 ; MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS  = CDRs

圖 29c

1 DIQMTQSPAT LSLSPGERAA LSCRASQSVN SYLAWYQQKP GQAPRLLIY
 50 GAASRATGIP ARFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYCSSQGTJFG
 100 PGTKVDIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPREAKVQWK
 150 VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSSL TLKADYEKH KUYACEVTHQ
 200 GLSSPVTKSF NRGEC

SEQ ID NO: 83

Edman, N 端 ; MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS  = CDRs

圖 29f

1 DIQMTQSPAT LSLSPGERAA LSCRASQSVN SYLAWYQOKP GQAPRLLIY

50 GAASRAIGIP ARFSGGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYCYQ QYGSQQGTFG

100 PGTKVDIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT ASVCLLNNF YPREAKVQWK

150 VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYLSSTL TLSKADYEKH KLYACEVTHQ

200 GLSSPVTKSF NRGEC

SEQ ID NO: 84

Edman, N 端 MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS = CDRs

圖 29g

1 EIVLTQSPAT LSLSPGERVT ITCRESQGIR NYLAWYQQKP GQAPRLLIY

 50 GASTRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYCGSSQCIFG

 100 PGTKVDIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT ASVVCLLNMF YPREAKVQWK

 150 VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYLSSTL TLSKADYEKH KVIACEVTHQ

 200 GLSSPVTKSF NRGEC

SEQ ID NO: 85

Edman, N 端 ----- MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS ----- = CDRs

圖 29h

1 EIVLTQSPAT LSLSPGERVT ITCRESQGIR NYLAWYQQKP GQAPRLLIY

 50 GASTRATGIP DRFSGSGGT DFTLTISRLE PEDFAVYVQO QYCSSQCTFG

 100 PGTKVDIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPREAKVQWK

 150 VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYLSSTL TLSKADYEKH KLYACEVTHQ

 200 GLSSPVTKSF NRGEC

SEQ ID NO: 86

Edman, N 端 -----, MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS ----- = CDRs

圖 29i

1 EIVMTQSPAT LSLSPGERVT ITCRESQGIR NYLAWYQKQP GQAPRLLIY
 50 AASTLQSGVP SRFSGSGSGT DFTLLISRLE PEDFAVYYCQ QYGGSSQGTFG
 100 PGTKVDIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPREAKVQWK
 150 VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYLSLSTL TLSKADYEKH KVIYACEVTHQ
 200 GLSSPVTKSF NRGEC

SEQ ID NO: 87

Edman, N 端 ; MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS  = CDRs

圖 29j

1 EIVMTQSPAT LSLSPGERVT ITCRESQGIR NYLAWYQQKP GQAPRLLIY

50 AASTLQSGVP SRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYQO QYGSQQCTFG

100 PGTKVDIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT ASVVCLLNMF YPREAKVQWK

150 VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYLSLSTL TLSKADYEKH KLYACEVTHQ

200 GLSSPVTKSF NRGEC

SEQ ID NO: 88

Edman, N 端 ; MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS = CDRs

圖 29k

1 DVVMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRESQGIR NYLAWYQQKP GKAPKLLIYK

51 ASSLQSGVPS RFSGSLLGGK AALTLSGVQP EDFATYYQQ QANSFPLIFGG

101 GTKVEIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPREAKVQWK

151 VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYLSSTL TLSKADYEKH KUYACEVTHQ

201 GLSSPVTKSF NRGEC

SEQ ID NO: 89

Edman, N 端 ; MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS = CDRs

圖 29I

1 DVVMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRESQIR NYLAWYQQKP GKAPKLLIYK

51 ASSLQSGVPS RFGSLLGGK AALTLSGVQP EDFATYYCQ QANSFPLIFGG

101 GTKVEIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPREAKVQWK

151 VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYLSSTL TLSKADYEKH KLYACEVTHQ

201 GLSSPVTKSF NRGEC

SEQ ID NO: 90

Edman, N 端 ; MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS = CDRs

圖 29m

1 DIVLTQSPAT LSLSPGERVT ITCRASQSVN SYIAWYQQKP GQAPRLLIY
 50 GASTRAIGIP DRFSGSGGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSQGTFG
 100 PGTKVDIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPBREAKVQWK
 150 VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYLSLSTL TLSKADYEKH KVIACEVTHQ
 200 GLSSPVTKSF NRGEC

SEQ ID NO: 91

Edman, N 端 ; MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS  = CDRs

圖 29n

1 DIQMTQSPGT LSLSPGERAA LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIY

 50 AASIRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYCYQ QYGSQQGTFG

 100 PGTKVDIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPREAKVQWK

 150 VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYLSLSTL TLSKADYEKH KVIYACEVTHQ

 200 GLSSPVTKSF NRGEC

SEQ ID NO: 92

Edman, N 端 MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS = CDRs

圖 290

1 DIQMTQSPGT LSLSPGERAA LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIY
 50 AASIRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYCSSQGTFFG
 100 PGTKVDIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT ASVCLLNNF YPREAKVQWK
 150 VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYLSSTL TLSKADYEKH KLYACEVTHQ
 200 GLSSPVTKSF NRGEC

SEQ ID NO: 93

Edman, N 端 ; MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS  = CDRs

圖 29p

1 EVQLVESGGG VQPGGSLRL SCAASGFTFR SYMSWVRQA PGKGLEWVAS
 51 VKQDGESEKYY VDSVKGRFTI SRDTSKNTLY LOMNSLRAED TAVYICARDA
 101 SSWYRDWFDK WGQGLTVTS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGLLV
 151 KDYFPEPTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TTPSSSLGTQ
 201 TYI^{HC-LC}QNVNHKP SNTKVDKKVE PKS^{HC}DKTHT^{HC} P^{HC}PAPPELLG GPSVFLFPPK
 251 PKDTLMISRT PEVT^{HC-LC}VVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF
 301 NSTFRVSVL TVLHQDWLNG KEYK^{HC-LC}QKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP
 351 QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT^{HC-LC}LVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP
 401 VLDSGGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFS^{HC-LC}S VMHEALHNY TQKSLSLSPG
 451 K

SEQ ID NO: 94

Edman, N 端 , MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS  = CDRs

圖 30-1

1 EVQLVESGGG VVQPGGSLRL SCAASGFTFR SYMMSWVRQA PGKGLEWVAS
 51 VKQDGSEKYY VDSVKGRFTI SRDTSKNTLY LQMSLRAED TAVYYCARD
 101 SSWYRDWFDK WGQGLTVTS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV
 151 KDYFPEPTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TTPSSSLGTQ
 201 TYTCNVDPKPK SNTKVDKKVE PKSCDKTHC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK
 251 PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY
 301 ~~MS~~RVVSVL TVVHQDWLNG KEYCKVSNK GLPAPIEKTI SKAKGQPREP
 351 QVYTLPPSRE EMTKNQVTLT CLVKGFPYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP
 401 MLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKLSLSPG
 451 K

SEQ ID NO: 95

Edman, N 端 ; MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS = CDRs

圖 30-2

1 EVQLVESGGG VVQPGGSLRL SCAASGFTFR SYWMSWVRQA PGKGLEWVAS
 51 VKQDGSEKYY VDSVKGRFTI SRDTSKNTLY LQMSLRAED TAVYYCARD
 101 SSWYRDWTFDE WGQGLTVTS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV
 151 KDYFPEPTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ
 201 TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSCDKTHTC PPCPAPPELLG GPSVFLFPPK
 251 PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF
 301 ASFRVSVL TVLHQDWLNG KEYCKVSNK GLPAPIEKTI SKAKGQPREP
 351 QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP
 401 VLDSGDGFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFCS VMHEALHNY TQKSLSLSPG
 451 K

 = 無糖基化
 = N

 = CDRs

Edman, N 端 ; MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS

圖 30-3

1 EVQLVESGGG VVQPGGSLRL SCAASGFTFR **GYWMSWVROA** PGKLEWVAS
 51 **VKQDGSEKYYVDSVKGR**FTI SRDTSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYC**ARDG**
 101 **SSWYRDWFDH** WGQGLTVTS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAAL**GLV**
 151 KDYFPEPTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ
 201 TY**I**QNVNHKP SNTKVDKKVE PKS**DKTH**^{HC} P**P**APPELLG GPSVFLFPPK
 251 PKDTLMISRT PEV**T**QVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY
 301 NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KE**Y**QK**Q**VSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP
 351 QVYTLPPSRD ELTKNQVTLT **Q**LVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP
 401 MLDSDSGFFL YSKLTVDKSR WQQGNV**F**SS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG
 451 K _____

SEQ ID NO: 97

Edman, N端 _____, MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS _____ = CDRs

圖 30-4

1 EVQLVESGGG VVQPGGSLRL SQAASGFFFR **GYMMSWVRQA** PGKGLEWVA**Q**
 51 **VKQDGEKYVDSYKGRFTI** SRDTSKNTLY LQMSLRAED TAVYYC**ARDG**
 101 **SSWYRDWFD** WGQGLVTVS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV
 151 KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ
 201 TYTTCNVDPKPK SNTKVDKPKVE PKSCDKTHC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK
 251 PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY
 301 **NSRYRVS**VL TVVHQDWLNG KEYCKVSNK GLPAPIEKTI SKAKGQPREP
 351 QVYTLPPSRE EMTKNQVTLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTPP
 401 MLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKLSLSLSPG
 451 K

SEQ ID NO: 98

Edman, N 端 ; MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS **█** = CDRs

圖 30-5

1 EVQLVESGGG VVQPGGSLRL **SCAASGFTFR** **GYWMSWVRQA** PKGLEWVAS
 51 **VKQDGSEKYYVDSVKGR**FTI SRDTSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYC**ARDG**
 101 **SSWYRDWFD**E **WGQGLTVTS** SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV
 151 KDYFFPEPTV SWNSGALTSG VHTFFAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ
 201 TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSCDKTHTC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK
 251 PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQ**F**
 301 **AS**FRVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK GLPAPIEKTI SKAKGQPREP
 351 QYITLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP
 401 VLDSGDGFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKLSLSLSPG
 451 K

 = 無 N
 糖基化
 = CDRs

SEQ ID NO: 99

Edman, N 端 ; MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS

圖 30-6

1 EVQLVESGGG VVQPGGSLRL SCAASGFTFR **SYWMSWVRQA** PKGLEWVAS
 51 **VKOFFSGPLA** TGSVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARD**A**
 101 **SSWYRDWFDP** WGQGLVTVS SAS^{...}TKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV
 151 KDYFPEPTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TTPSSSLGTQ
 201 TYICNVNHP SNTKVDKKVE PKSCDKTHC PPCAPPELLG GPSVFLFPPK
 251 PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQ**F**
 301 **FRVVS**VL TVLHQDWLNG KEYCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP
 351 QYITLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP
 401 VLDSGDGFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNNHY TQKLSLSLSPG
 451 K

 = N 糖基化

SEQ ID NO: 100

Edman, N 端 ; MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS  = CDRs

圖 30-7

1 EVQLVESGGG VVQPGGSLRL SCAASGFTFR **SYWMSWVRQA** PGKGLEWVAS
 51 **VKQFESGPLA** TGSVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMSLRAED TAVYYCARD**A**
 101 **SSWYRDWEDR** WGQGLTVTS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV
 151 KDYFPEPTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYLSVV TVPSSSLGTQ
 201 TYTCNV~~D~~HKP SNTKVDKKVE PKSCDKTHC PPCAPELLG GPSVFLFPPK
 251 PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY
 301 ~~SR~~RVVSVL TVVHQDWLNG KEYKCKVSNK GLPAPIEKTI SKAKGQPREP
 351 QVYTLPPSRE EMTKNQVTLT CLVKGFPYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTPP
 401 **MLDSDG**SFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG
 451 K

 = N糖基化

SEQ ID NO: 101

 = CDRs

Edman, N端, MALDI-TOF-MS, MS/MS

圖 30-8

1 EVQLVESGGG VVQPGGSLRL SCAASGFTFR SYWMSWVRQA PGKLEWVAIS
 51 VKQFFSGPLA TGSVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMSLRAED TAVYYCARD
 101 SSWYRDWEDE WGQGLTVTS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV
 151 KDYFPEPTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TTPSSSLGTQ
 201 TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSCDKTHC PPCAPPELLG GPSVFLFPPK
 251 PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF
 301 ASFRVSVL TVLHQDWLNG KEYCKVSNK GLPAPIEKTI SKAKGQPREP
 351 QYITLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP
 401 VLDSGDGFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFS CS VMHEALHNNHY TQKLSLSLSPG
 451 K

SEQ ID NO: 102

Edman, N 端 ; MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS = CDRs

 = 無 N 糖基化

 = CDRs

圖 30-9

1 EVQLVESGGG VVQPGGSLRL SCAASGFTFR  GYVNSWVRQA PGKGLEWVAS
 51  VKQDQSEKYY VDSVKGRRPTI SRDNAKNQFS LKLSVTAAD TAVYYCARDG
 101  SSWIRDNFDE WGQGLVSVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV
 151 KDYFPEPTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TTPSSSLGTQ
 201 TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSCDKTHC PPCAPELLG GPSVFLFPPK
 251 PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF
 301  NFRVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP
 351 QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP
 401 VLDSDDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNNHY TQKSLSLSPG
 451 K

 = N 糖基化
 SEQ ID NO: 103

Edman, N 端, MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS  = CDRs

圖 30-10

1 EVQLVESGGG VVQPGGSLRL SCAASGFFTR   PKGLEWVA
 51   LKLSVTAAD TAVYYCARDG
 101  WGQGLVSVS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV
 151 KDYFPEPTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TTPSSSLGTQ
 201 TYTCNVDHKP SNTKVDKKVE PKSCDKTHC PPCAPELLG GPSVFLFPPK
 251 PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY
 301   SKAKGQPREP
 351 QVYTLPPSRE EMTKNQVTLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP
 401 MLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNNHY TQKSLSLSPG
 451 K

 = N 糖基化

SEQ ID NO: 104

Edman, N 端 ; MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS  = CDRs

圖 30-11

1 EVQLVESGGG VVQPGGSLRL SCAASGFTFR  WVRQA PGKGLEWVA 

51  VKDGGSEKTY VDSVKGRRPTI SRDNAKNQFS LKLSSVTAAD TAVYYCAR 

101  SSWYRDWEDR WGQGTLLSVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV

151 KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TTPSSSLGTQ

201 TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSCDKTHTC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK

251 PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF

301  ASFRVSVL TVLHQDWLNG KEYCKVSNK GLPAPIEKTI SKAKGQPREP

351 QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPP

401 VLDSGDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNYH YTKLSLSPG

451 K

SEQ ID NO: 105

 = 無 N
糖基化

Edman, N端 ; MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS  = CDRs

圖 30-12

1 EVQLVESGGG VQPGGSLRL SCAASGFTFR  WVRQG IGKGLEWVGR 
 51   RFTIS RENAKDSLIL QMNSLRVGD AVYYCARCA 
 101  WGQGLIVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV
 151 KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TTPSSSLGTQ
 201 TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSCDKTHTC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK
 251 PKDTLLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF
 301  FRVSVL TVLHQDWLNG KEYCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP
 351 QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTPP
 401 VLDSGGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNY TQKLSLSLSPG
 451 K

 = N糖基化

SEQ ID NO: 106

 = CDRs

Edman, N端, MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS

圖 30-13

1 EVQLVESGGG VVQPGGSLRL SCAASGFTFR  WVRQG IGKGLEWVCG 

51  IGLAGRINYN  ESLKGRFTIS RENAKDSLVL QMNSLRVGDV AVYYCARGAG 

101  RWAPLGAPFDI  WGQGLTIVS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV

151 KDYFPEPVTV SWNSGALTSV VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TTPSSSLGTQ

201 TYTCNVDPKP SNTKVDKKVE PKSCDKTHC PPCAPELLG GPSVFLFPPK

251 PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY

301  NSEYRVVSVL TVVHQDWLNG KEYKCKVSNK GLPAPIEKTI SKAKGQPREP

351 QVYTLPPSRE EMTKNQVTLT CLVKGFPYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP

401 MLDSDSGSFLL YSKLTVDKSR WQOQNVFSCS VMHEALHNNHY TQKSLSLSPG

451 K

 = N糖基化

SEQ ID NO: 107

 = CDRs

Edman, N 端 ; MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS

圖 30-14

1 EVQLVESGGG VVQPGGSLRL SCAASGFTFR  WVRQG IGKGLEWVGR
 51   RYAGRUNYN  PSIKGRFTIS RENAKDSL^{YL} QMNSLRVGDA AVYYCAR**CA**
 101   RNAPLGAFDL WGQGLTIVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV
 151 KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTO
 201 TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSCDKTHC PPCAPELLG GPSVFLFPPK
 251 PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF
 301   FRVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK GLPAPIEKTI SKAKGQPREP
 351 QYITLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP
 401 VLDSGDGFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG
 451 K

 = 無 N
 糖基化

SEQ ID NO: 108

 = CDRs

Edman, N 端 ; MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS

圖 30-15

```

1  EVQLVESGGG VQPGGSLRL SCAASGFTFR NYDMHWVRQ IGKGLVWVSR
-----
51  IGTAGDRYA GSVKGRFTIS RENAKDSLYL QMNSLRVGD AVYYCARGAG
-----
101 RWAPLGFADI WQGGLIVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV
-----
151 KDYFPEPTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TTPSSSLGTQ
-----
201 TYICNVNHPK SNTKVDKKVE PKSCDKTHC PPCAPELLG GPSVFLFPPK
-----
251 PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF
-----
301 FRVSVL TVLHQDWLNG KEYCKVSNK ALPAIEKTI SKAKGQPREP
-----
351 QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP
-----
401 VLDSGDGFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKLSLSLSPG
-----
451 K

```

 = N糖基化

SEQ ID NO: 109

 = CDRs

Edman, N端, MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS/MS

圖30-16

1 EVQLVESGGG VVQPGGSLRL SCAASGFTFR **NYDMHWVRQ** IGKGLVWVSR
 51 **IGTAGDRYA** GSVKGRFTIS RENAKDSL~~YL~~ QMNSLRVGD~~A~~ AVYYCARGAG
 101 **RWAPLCAFDI** WGQGLTIVS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV
 151 KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYLSVV TVPSSSLGTQ
 201 TYTCNV~~DH~~KP SNTKVDKKVE PKSCDKTHC PPCAPELLG GPSVFLFPFK
 251 PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY
 301 ~~NS~~YRVVSVL TVVHQDWLNG KEYKCKVSNK GLPAPIEKTI SKAKGQPREP
 351 QVYTLPPSRE EMTKNQVTLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP
 401 MLDS~~DG~~SFFL YSKLTVDKSR WQ~~Q~~GNVFS~~C~~S VMHEALHNHY TQKLSLSPG
 451 K

 = N糖基化

SEQ ID NO: 110

 = CDRs

Edman, N端, MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS

圖 30-17

1 EVQLVESGGG VVQPGGSLRL SCAASGFTFR **NYDMHWVRQG** IGKGLVWVSR
 51 **IGTAGDRYA** GSVKGRFTIS RENAKDSL^YL QMNSLRVGDA AVYYCARGAG
 101 **RWAPLGARDI** WQGGTLVIVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV
 151 KDYFPEPTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TTPSSSLGTQ
 201 TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSCDKTHC PPCAPELLG GPSVFLFPPK
 251 PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF
 301 **FRVSVL** TVLHQDWLNG KEYCKVSNK GLPAPIEKTI SKAKGQPREP
 351 QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP
 401 VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKLSLSLSPG
 451 K

 = 無 N
 糖基化
 = CDRs

SEQ ID NO: 111

Edman, N 端 ; MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS

圖 30-18

1 EVQLVESGGG VQPGGSLRL SCAASGFTFS  WVRQA PGKLEWVA
 51  YKQCGSEKYY VDSVYKGRFTI SRDNAKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAR
 101  SSWYRDNEDE WGQGLTVTS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV
 151 KDYFPEPTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ
 201 TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSCDKTHTC PPCAPELLG GPSVFLFPPK
 251 PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF
 301  FRVSVL TVLHQDWLNG KEYCKVSNK ALPAIEKTI SKAKQPREP
 351 QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP
 401 VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKLSLSLSPG
 451 K

 = N糖基化

SEQ ID NO: 112

 = CDRs

Edman, N 端 ; MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS

圖30-19

1 EVQLVESGGG VVQPGGSLRL SCAASGFFTS   WVRQA PGKLEWVA 

51   RFTI SRDNAKNTLY LQMNSLRAED TAVYCAR 

101  WGQGLTVTS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV

151 KDYFPEPTV SWNSGALTSV VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTO

201 TYTCNVDHKP SNTKVDKKVE PKSCDKTHC PPCAPELLG GPSVFLFPPK

251 PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY

301  YRVSVL TVVHQDWLNG KEYCKVSNK GLPAIEKTI SKAKGQPREP

351 QVYTLPPSRE EMTKNQVTLT CLVKGFPD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP

401 MLDSGGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKLSLSLSPG

451 K

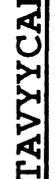
 = N糖基化

SEQ ID NO: 113

 = CDRs

Edman, N端, MALDI-TOF-MS, MS/MS

圖 30-20

1 EVQLVESGGG VVQPGGSLRL SCAASGFTFS  SYWVWRQA PGKGLEWVAS
 51  VKQGSERYV VDSVKGGRFTI SRDNAKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDG
 101  SSNRRDWDDE WQGGLTIVTS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV
 151 KDYFPEPTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TTPSSSLGTQ
 201 TYICNVNHP SNTKVDKKVE PKSCDKTHC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK
 251 PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF
 301  FRVSVL TVLHQDWLNG KEYCKVSNK GLPAPIEKTI SKAKGQPREP
 351 QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTPP
 401 VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKLSLSLSPG
 451 K _____

 = 無 N
 糖基化

SEQ ID NO: 114

Edman, N 端 ; MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS = CDRs

圖 30-21

1 EVQLVESGGG VVQPGGSLRL SCAASGFTFR **SYDMSWVRQA** PGKGLEWVAS
 51 **VKQFFSGSAA** TGSVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDG
 101 **SSWYRDWFEDE** WGQGLTVTS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV
 151 KDYFPEPTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ
 201 TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSCDKTHTC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK
 251 PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF
 301 **NS**FRVSVL TVLHQDWLNG KEYCKVSNK **ALPAPIEKTI** SKAKGQPREP
 351 QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP
 401 VLDSDSGFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKLSLSLSPG
 451 K

 = N 糖基化

SEQ ID NO: 115

 = CDRs

Edman, N 端 ; MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS

圖 30-22

1 EVQLVESGGG VVQPGGSLRL SCAASGFTFR  SYDMSWVRQA PGKGLEWVAS
 51  VKQFFSGSAA TGSVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMNLSRAED TAVYCARDG
 101  SSWYRDWFDL WGQGLVTVS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV
 151 KDYFPEPTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYLSLVV TVPSSSLGTO
 201 TYTCNVDHKP SNTKVDKKVE PKSCDKTHTC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK
 251 PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY
 301  YRVSVL TVVHQDWLNG KEYCKVSNK GLPAPIEKTI SKAKGQPREP
 351 QVYTLPPSRE EMTKNQVTLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP
 401 MLDSDSGFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKLSLSLSPG
 451 K

 = N 糖基化

SEQ ID NO: 116

 = CDRs

Edman, N 端 ; MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS

圖 30-23

1 EVQLVESGGG VVQPGGSLRL SCAASGFTFR  SYDMSWVRQA PKGLEWVA 

51  VKQFFSGSAA TGSVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDG 

101  SSWYRDWFEH  WGQGLTVTS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV

151 KDYFPEPVTV SWNSGALTSV VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TWPSSSLGTQ

201 TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSCDKTHTC PPCAPELLG GPSVFLFPPK

251 PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF

301  ASFRVSVL TVLHQDWLNG KEYCKVSNK GLPAIEKTI SKAKGQPREP

351 QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP

401 VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNYH TQKLSLSLSPG

451 K

 = 無 N
糖基化

SEQ ID NO: 117

 = CDRs

Edman, N 端, MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS

圖 30-24

1 EVQLVESGGG VQPGGSLRL SCAASGFTFR  SWVRQA PGKGLEWVA 

 51  VPDVSKRPTI SRDNAKNQLS LKLSVTAAD TAVYYCARD 

 101  WGQGLTVTS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV

 151 KDYFPEPTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSV TVPSSSLGTQ

 201 TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSCDKTHTC PPCAPELLG GPSVFLFPPK

 251 PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF

 301  FRVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK  ALPAPIEKTI SKAKGQPREP

 351 QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP

 401 VLDSDSGFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNY TQKLSLSLSPG

 451 K

SEQ ID NO: 118

 = N糖基化Edman, N端 ; MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS  = CDRs

圖 30-25

1 EVQLVESGGG VVQPGGSLRL SCAASGFTFR SYDMSWVRQA PGKGLEWVAS
 51 VRQGGSEKYY VDSYKGRPTI SRDNAKNQLS LKLSVTAAD TAVYYCARDG
 101 SSNTRDWDDE WGQGLTVTVS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV
 151 KDYFPEPTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ
 201 TYTCNVDHKP SNTKVDKKVE PKSCDKTHTC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK
 251 PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY
 301 RRVVSVL TVVHQDWLNG KEYKCKVSNK GLPAPIEKTI SKAKGQPREP
 351 QVYTLPPSRE EMTKNQVTLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTPP
 401 MLDSDGSEFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNNHY TQKSLSLSPG
 451 K

 = N糖基化

SEQ ID NO: 119

 = CDRs

Edman, N端 ; MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS

圖 30-26

1 EVQLVESGGG VVQPGGSLRL SCAASGFTFR  SYDMSWVRQA PGKGLEWVA 
 51  VRQDGSERVY VDSVNGRPTI SRDNAKNQLS LKLSSVTAAD TAVYYCARD 
 101  SSNVRDWFDE WGQGLTVTS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV
 151 KDYFPEPTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TTPSSSLGTQ
 201 TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSCDKTHC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK
 251 PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF
 301  ASFRVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK GLPAPIEKTI SKAKGQPREP
 351 QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP
 401 VLDSGDSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG
 451 K

 = 無 N 糖基化

 = CDRs

SEQ ID NO: 120

Edman, N 端 ; MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS

圖 30-27

1 EVQLVESGGG VVQPGGSLRL SCAASGFTFR  GWVRQA PKGLEWVAS
 51  VDSVKGRLTL SVDTSKNQFS LKLSSVTAAD TAVYYCARDG
 101  WGQGLVSVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV
 151 KDYFPEPTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ
 201 TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSCDKTHC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK
 251 PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF
 301  FRVSVL TVLHQDWLNG KEYCKVSNK  ALPAIEKTI SKAKGQPREP
 351 QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP
 401 VLDSGGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKLSLSLSPG
 451 K

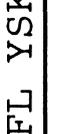
 = N糖基化

SEQ ID NO: 121

 = CDRs

Edman, N 端 ; MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS

圖 30-28

1 EVQLVESGGG VVQPGGSLRL SCAASGFFR   PKGLEWVA 
 51   VDSVKGRLTL SVDTSKNQFS LKLSVTAAD TAVYYCARD 
 101  WGQGLVSVS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV
 151 KDYFPEPTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ
 201 TYTCNVDPKPK SNTKVDKKVE PKSCDKTHC PPCPAPELLG GPSVFLFFPK
 251 PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY
 301  YRVVSVL TVVHQDWLNG KEYKCKVSNK  GLPAPIEKTI SKAKGQPREP
 351 QVYTLPPSRE EMTKNQVTLT CLVKGFPYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP
 401  MLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG
 451 K

 = N糖基化

SEQ ID NO: 122

 = CDRs

Edman, N端 ; MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS

圖 30-29

1 EVQLVESGGG VQPGGSLRL SCAASGFTFR  WVRQA PGKGLEWVA 
 51  VSDVKGRLTL SVDTSKNQFS LKLSVTAAD TAVYYCAR 
 101  WGQGLVSVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV
 151 KDYFPEPTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TTPSSSLGTQ
 201 TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSCDKTHC PPCAPELLG GPSVFLFPPK
 251 PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF
 301  FRVSVL TVLHQDWLNG KEYCKVSNK GLPAPIEKTI SKAKGQPREP
 351 QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTPP
 401 VLDSGDSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNYH TOKLSLSLSPG
 451 K

 = 無 N
糖基化

 = CDRs

SEQ ID NO: 123

Edman, N端 ; MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS

圖 30-30

1 EVQLVESGGG VVQPGGSLRL SCAASGFTFR   WVRQA PGKGLEWVA 
 51    RVTI SVETSKNQFS LKLSVTAAD TAVYCAR 
 101   WGQGLVSVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV
 151 KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TTPSSSLGTQ
 201 TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSCDKTHTC PPCAPELLG GPSVFLFPPK
 251 PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF
 301   FRVWSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP
 351 QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP
 401 VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKLSLSLSPG
 451 K

 = N糖基化

SEQ ID NO: 124

Edman, N 端, MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS  = CDRs

圖30-31

1 EVQLVESGGG VVQPGGSLRL SCAAGFTFR  GWVRQA PGKGLEWVA 
 51  VQDQSEKYY  RVTI SVETSKNQFS IKLSSVTAAD TAVYYCAR 
 101  WGQGLVSVS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV
 151 KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TFPSSSLGTQ
 201 TYTCNVDPKPK SNTKVDKKVE PKSCDKTHTC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK
 251 PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY
 301  YRVVSVL TVVHQDWLNG KEYKCKVSNK GLPAPIEKTI SKAKGQPREP
 351 QVYTLPPSRE EMTKNQVTLT CLVKGFPYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTPP
 401 MLDSDGSEFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG
 451 K

 = N糖基化

SEQ ID NO: 125

Edman, N端, MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS/MS = CDRs

圖 30-32

1 EVQLVESGGG VQPGGSLRL SCAASGFFR  GYNWVWRQA PKGLEWVA 
 51  YRQDGEKYY  VDSVNGRVTI SVETSKNQFS LKLSVTAAD TAVYCARDG 
 101  SSWYRDWFDL  WGQGLVSVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV
 151 KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ
 201 TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSCDKTHTC PPCAPELLG GPSVFLFPPK
 251 PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF
 301  ASFRVSVL TVLHQDWLNG KEYCKVSNK GLPAPIEKTI SKAKGQPREP
 351 QYITLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTPP
 401 VLDSGDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKLSLSLSPG
 451 K

 = 無 N 糖基化

 = CDRs

SEQ ID NO: 126

Edman, N 端, MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS

圖 30-33

1 EVQLVESGGG VVQPGGSLRL SCAASGFTFR  WVRQA PGKGLEWVA 

 51  VDSVNGRVTI SLDTSKNQFS LKLSVTAAD TAVYYCAR 

 101  WGQGLVSVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV

 151 KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TTPSSSLGTQ

 201 TYICNVNPKP SNTKVDKKVE PKCDKTHTC PPCAPELLG GPSVFLFPPK

 251 PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF

 301  FRVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP

 351 QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP

 401 VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKLSLSPG

 451 K

 = N糖基化

SEQ ID NO: 127

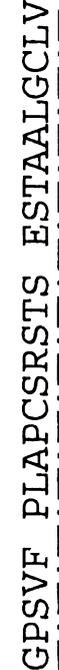
 = CDRs

Edman, N端 ; MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS

圖 30-34

1 EVOLVESGGG VVQPGGSLRL SCAASGFTFR  WVRQA PGKGLEWVA 

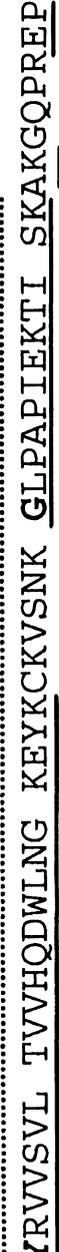
51  VROGSRKYY VDSVKGRTI SLDTSKNQFS LKLSVTAAD TAVYYCAR 

101  WGQGLVSVS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV 

151 KDYFPEPTV SWNSGALTSV VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TWPSSSLGTQ 

201 TYTCNVDHKP SNTKVDKKVE PKSCDKTHTC PPCAPELLG GPSVFLFPPK 

251 PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY 

301  RRVSVL TVVHQDWLNG KEYCKVSNK GLPAPIEKTI SKAKGQPREP 

351 QVYTLPPSRE EMTKNQVTLT CLVKGFPYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP 

401 MLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNY TQKLSLSLSPG 

451 K 

 = N糖基化

SEQ ID NO: 128

 = CDRs

Edman, N端, MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS/MS

圖30-35

1 EVQLVESGGG VVQPGGSLRL SCAASGFTFR  WVRQA PGKGLEWVA
 51 VKQDGSRRVY VDSVGRVTI SLDTSKNQFS LKLSVSTAAD TAVYYCAR
 101 SSVYDQWFD WGQGLVSVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV
 151 KDYFPEPVTV SWNSGALTS VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ
 201 TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSCDKTHC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK
 251 PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF
 301 ASFRVSVL TVLHQDWLNG KEYCKVSNK GLPAPIEKTI SKAKGQPREP
 351 QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP
 401 VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFCS VMHEALHNY TQKLSLSFG
 451 K

Edman, N 端 : MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS
 = 無 N 糖基化
 = CDRs

圖 30-36

1 EVQLVESGGG VVQPGGSLRL SCAASGITFR  SYDMSWVRQA PGKGLEWVA 

51  YVQDGERAY YDSVRRFTV SRDNAKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAR 

101  GWQGTLTVTS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV

151 KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TWPSSSLGTQ

201 TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSCDKTHTC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK

251 PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF

301  FRVVSVL TVLHQDWLNG KEYCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP

351 QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFPYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP

401 VLDSGGFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNY TQKSLSLSPG

451 K

 = N糖基化

SEQ ID NO: 130

 = CDRs

Edman, N端, MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS/MS

圖30-37

1 EVQLVESGGG VVQPGGSLRL SCAASGITFR  SYDMSWVRQA PGKGLEWVA 

 51  VROGSEKVI VDSVNGRFTV SRDNAKNTLY LQMSLRAED TAVYYCARDA 

 101  GRWADIAPDI WGQGLVTVS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV

 151 KDYFPEPTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ

 201 TYTCNVDHKP SNTKVDKKVE PKSCDKTHTC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK

 251 PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY

 301  MSYRVSVL TVVHQDWLNG KEYCKVSNK GLPAPIEKTI SKAKGQPREP

 351 QYITLPPSRE EMTKNQVTLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP

 401 MLDSDGSEFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG

 451 K

 = N糖基化

SEQ ID NO: 131

 = CDRs

Edman, N 端 ; MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS

圖 30-38

1 EVQLVESGGG VQPGGSLRL SCAASGFTFR  SWHWVRQA PGKGLEWVA 
 51  VKQDGRKYY  VPSVGRVTI TADRAKNTLY LQMSLRAED TAVYYCAR 
 101  SSWYRDWFD  WGQGLTVTS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV
 151 KDYFPEPTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TFPSSSLGTQ
 201 TYICNVNHP SNTKVDKKVE PKSCDKTHC PPCAPELLG GPSVFLFPPK
 251 PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF
 301  ~~MS~~FRVSVL TVLHQDWLNG KEYCKVSNK **AL**PAPIEKTI SKAKGQPREP
 351 QYITLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTPP
 401 VLDSGDSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNNHY TQKLSLSLSPG
 451 K

 = N糖基化

SEQ ID NO: 132

Edman, N端, MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS/MS  = CDRs

圖 30-39

1 EVQLVESGGG VVQPGGSLRL SCAASGFTFR  WVRQA PGKGLEWVA 
 51  VDSVNGRVTI TADRAKNTLY LOMNSLRAED TAVYYCAR 
 101  WGQGTLVTVS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV
 151 KDYFPEPTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TTPSSSLGTQ
 201 TYTCNVDPKP SNTKVDKKVE PKSCDKTHTC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK
 251 PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY
 301  MRVSVL TVVHQDWLNG KEYKCKVSNK GLPAPIEKTI SKAKGQPREP
 351 QVYTLPPSRE EMTKNQVTLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTPP
 401 MLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNYH TQKLSLSLSPG
 451 K

 = N 糖基化

SEQ ID NO: 133

 = CDRs

Edman, N端, MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS

圖 30-40

1 EVQLVESGGG VVQPGGSLRL SCAASGFTFR **NYWMSWVRQA** PKGLEWVAS

 51 **VKQFFSGPLA** TGSYKGRFTI SRDTSKNTLY LOMNSLRAED TAVYYCARDG

 101 **SSWYRDWFDL** WGQGLTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV

 151 KDYFPEPTV SWNSGALTSV VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TTPSSSLGTQ

 201 TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKCDKTHTC PPCAPELLG GPSVFLFPPK

 251 PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF

 301 **NS**FRVSVL TVLHQDWLNG KEYCKVSNK **ALPAPIEKTI** SKAKGQPREP

 351 QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP

 401 VLDSDDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG

 451 K

 = N 糖基化

 = CDRs

Edman, N 端, MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS

圖 30-41

1 EVQLVESGGG VQPGGSLRL SCAASGFTFR **NYMMSWVRQA** PKGLEWVAS
 51 **VKOFFSGPLA** TGSVKGRFTI SRDTSKNTLY LOMNSLRAED TAVYYCARDG
 101 **SSWYRDWFDP** WGQGLTVTS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV
 151 KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ
 201 TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSCDKTHTC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK
 251 PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF
 301 **AS**FRVSVL TVLHQDWLNG KEYCKVSNK GLPAPIEKTI SKAKGQPREP
 351 QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP
 401 VLDSDSGFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKLSLSLSPG
 451 K

 = 無 N
 糖基化

SEQ ID NO: 135

 = CDRs

Edman, N 端, MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS

圖 30-42

1 EVQLVESGGG_VVQPGGSLRL_SCAASGFTFR_  WVRQA PGKGLEWVAS
 51  AGSVKGRVTI SVETSKNQFS LKLSVTAAD TAVYYCARDN
 101  WGQGLVSVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV
 151 KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYLSLSSVV TTPSSSLGTQ
 201 TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKCDKTHTC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK
 251 PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF
 301  FRVWSVL TVLHQDWLNG KEYCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP
 351 QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP
 401 VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNYH TQKLSLSLSPG
 451 K

SEQ ID NO: 136

Edman, N 端 ; MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS  = CDRs

圖 30-43

1 EVOLVESGGG_VVQPGGSLRL_SCAASGFTFR  WVRQA_PCKGLEWVA
 51  VKQFSGKY_AGSVNGRVTI SVETSKNQFS_LKLSSTAAD_TAVYCARD
 101  WGQGLVSVS_SASTKGPSVF_PLAPSSKSTS_GGTAALGCLV
 151 KDYFPEPTV_SWNSGALTSG_VHTFPAVLQS_SGLYSLSSVV_TVPSSSLGTQ
 201 TYICNVNHKP_SNTKVDKKVE_PKSCDKTHTC_PPCPAPELLG_GPSVFLFPPK
 251 PKDTLMISRT_PEVTCVVVDV_SHEDPEVKFN_WYVDGVEVHN_AKTKPREEQF
 301  FRVSVL_TVLHQDWLNG_KEYCKVSNK_GLPAPIEKTI_SKAKGQPREP
 351 QVYTLPPSRD_ELTKNQVSLT_CLVKGFYPSD_IAVEWESNGQ_PENNYKTTTP
 401 VLDSDGSFFL_YSKLTVDKSR_WQQGNVFSCS_VMHEALHNHY_TQKSLSLSPG
 451 K

 = 無N糖基化

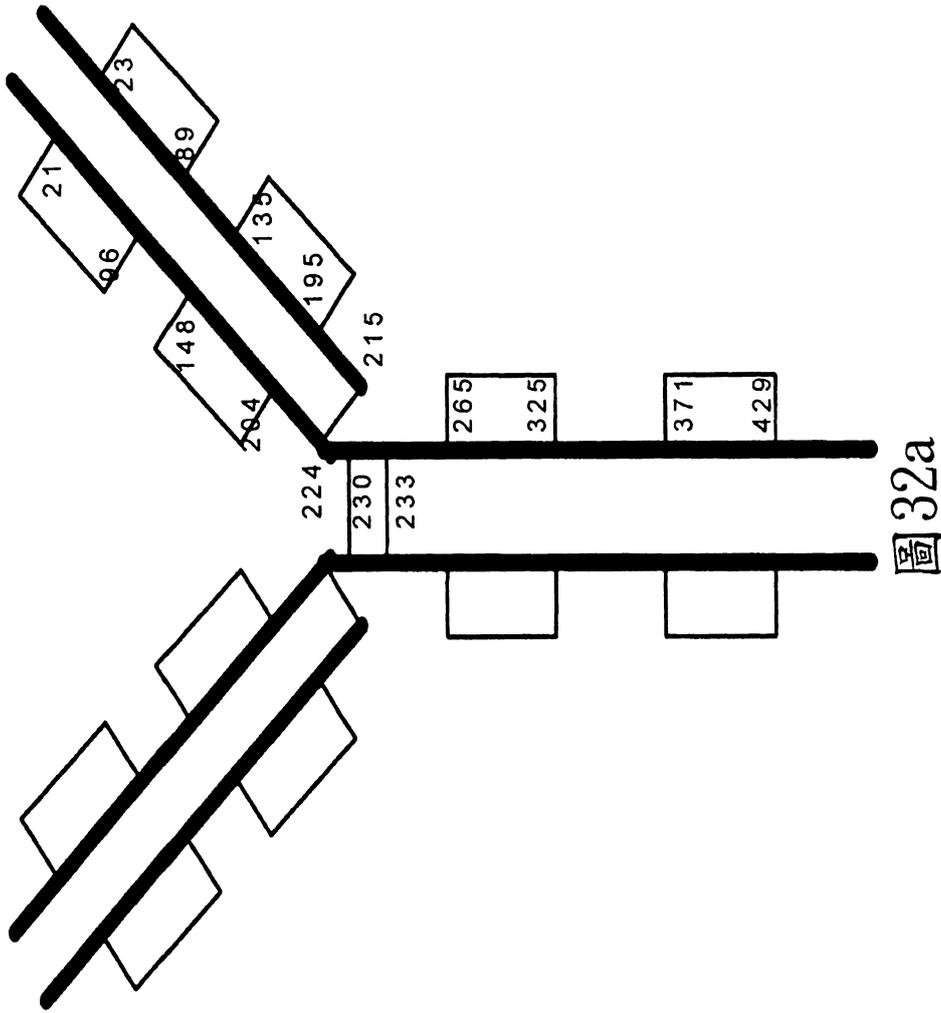
SEQ ID NO: 137

Edman, N端 : MALDI-TOF-MS, MALDI-FTMS, MS / MS  = CDRs

圖30-44

編號	抗體	N 端K輕鏈序列 (1-18 aa)	SEQ ID NO:
1	IVIG_(1)_LC(1)	EI VLTQSPATLSLSPGER	SEQ ID NO: 138
2	IVIG_(8)_LC(5)	EI VMTQSPATLSLSPGER	SEQ ID NO: 139
3	IVIG_(6)_LC(3)	DI QMTQSPATLSLSPGER	SEQ ID NO: 140
4	血清_(9)_PI_1_LC(6)	DV VMTQSPSSLSASVGDR	SEQ ID NO: 141
5	血清_(10)_PI_2_LC(7)	DI VLTQSPATLSLSPGER	SEQ ID NO: 142
6	血清_(11)_PI_2_LC(8)	DI QMTQSPGTLSPGER	SEQ ID NO: 143

圖31



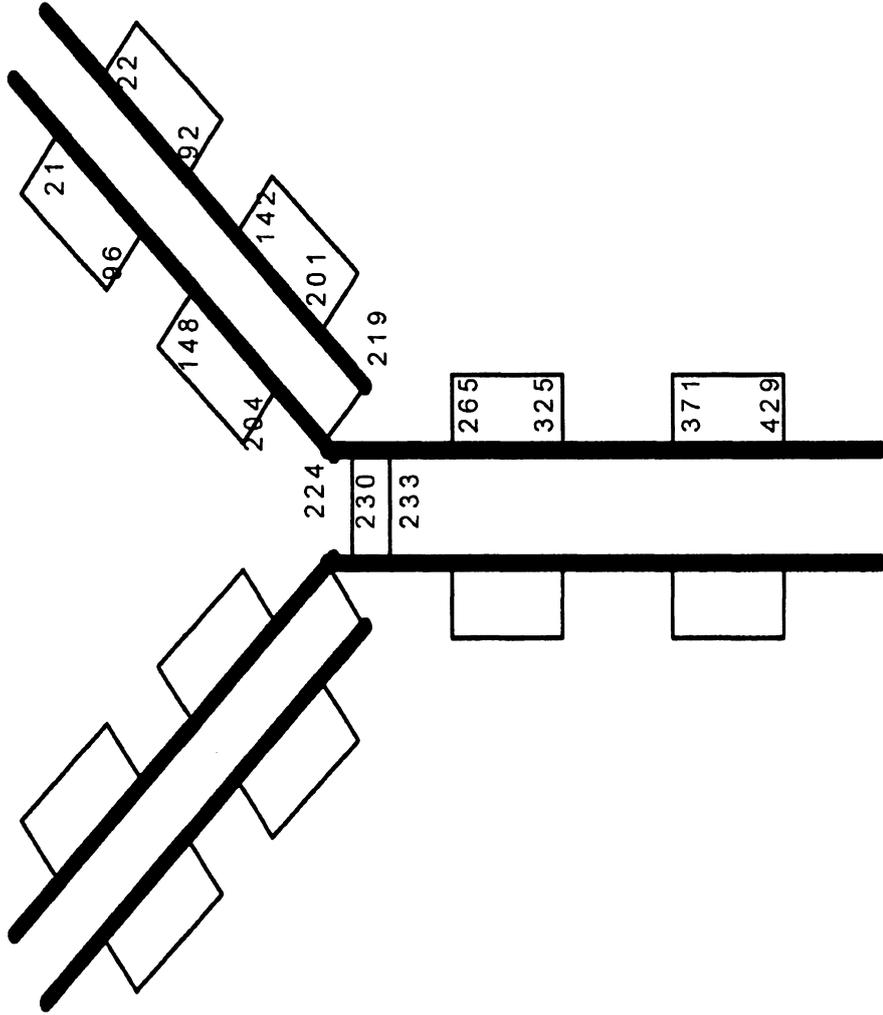


圖 32b

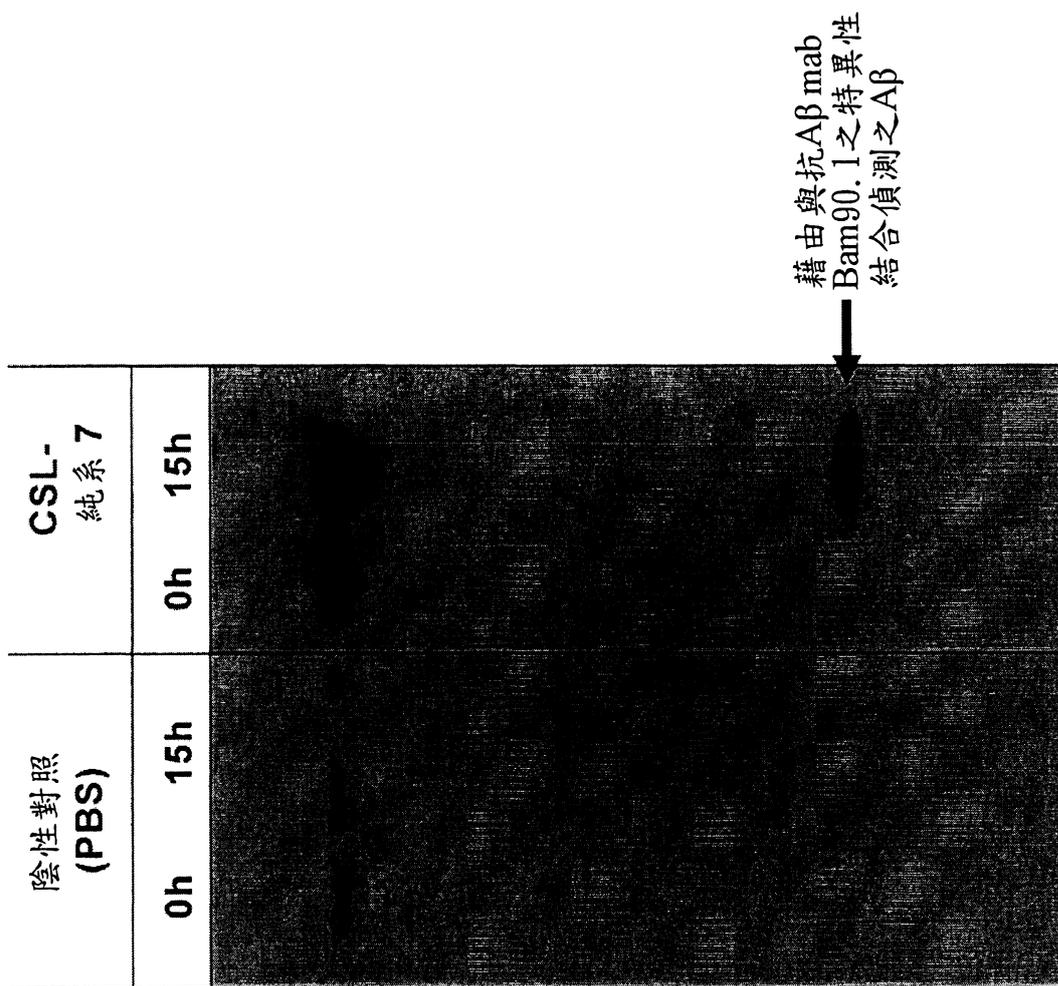


圖 33

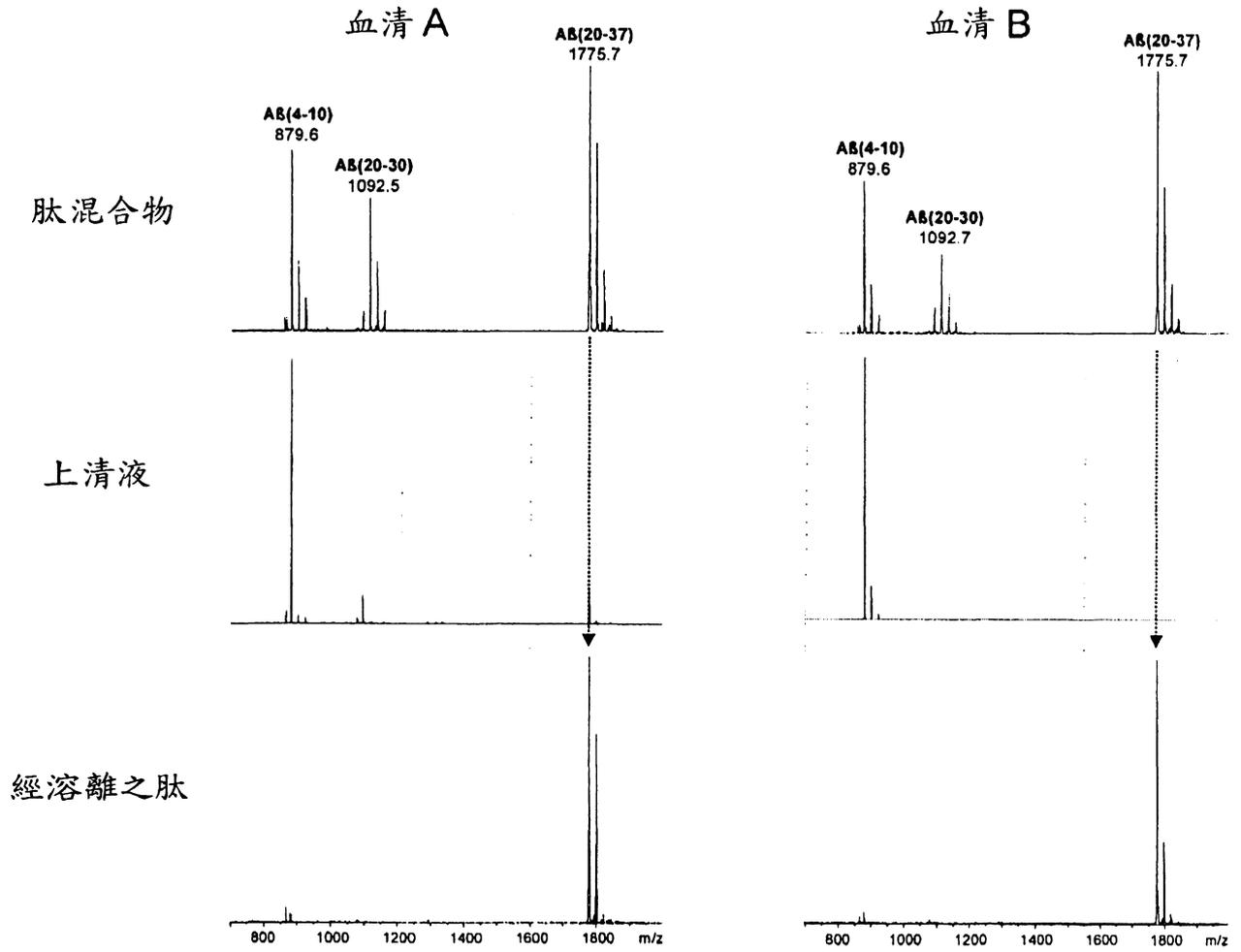
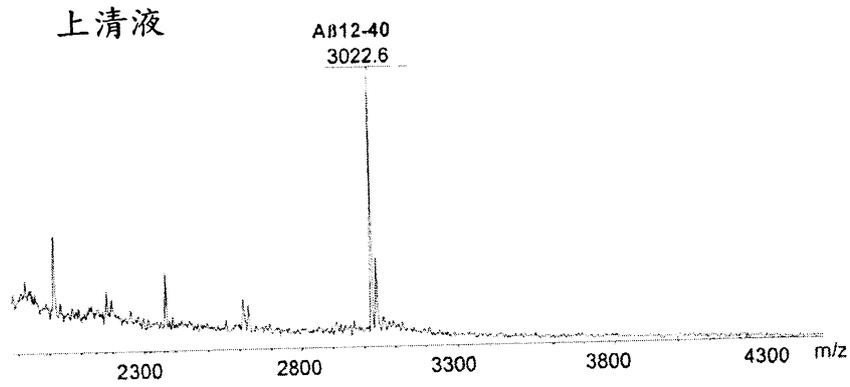
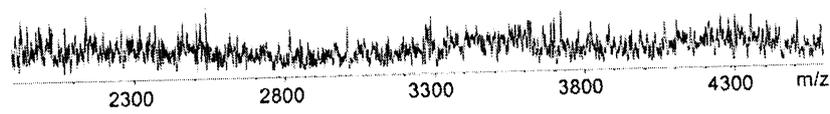


圖 34a



最後之洗滌物



溶離物

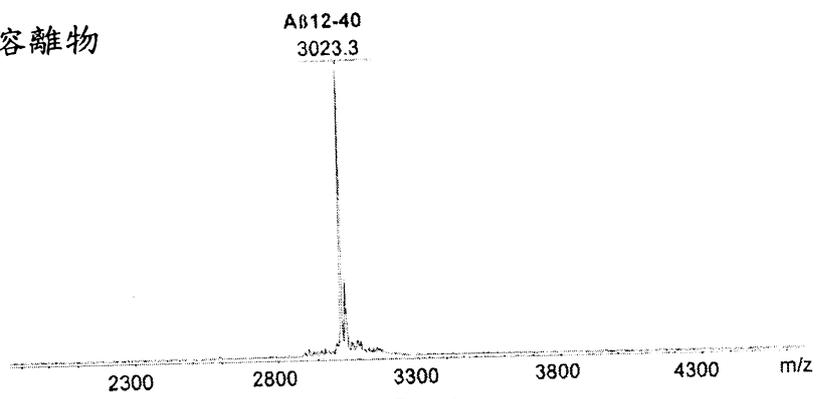
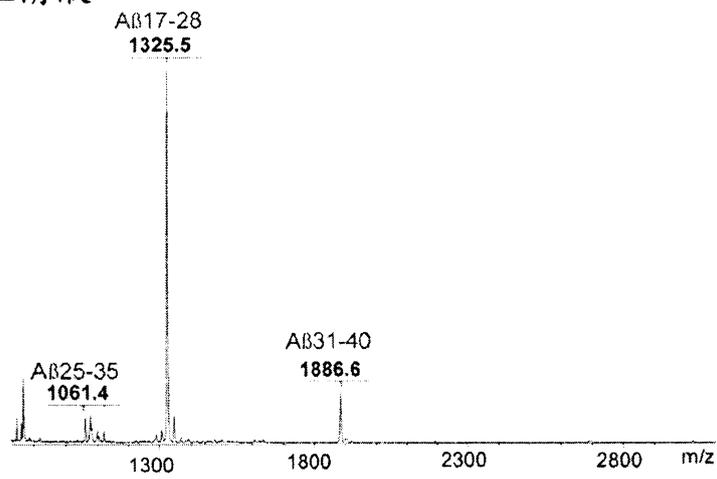


圖 34b

上清液



最後之洗滌物



溶離物

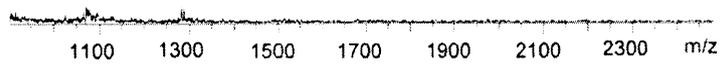
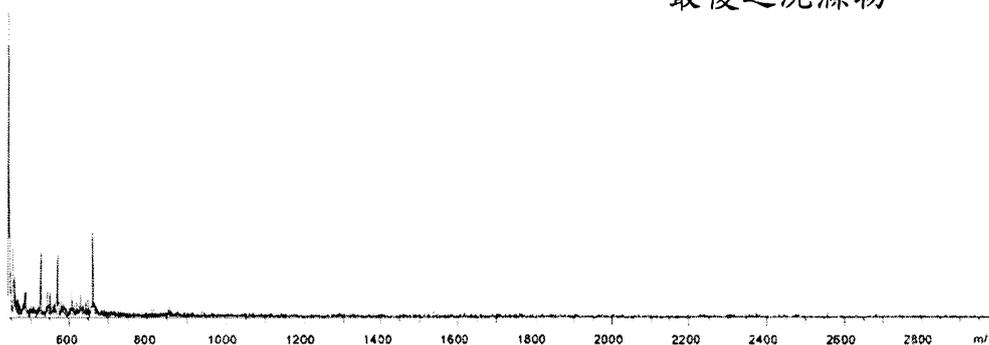
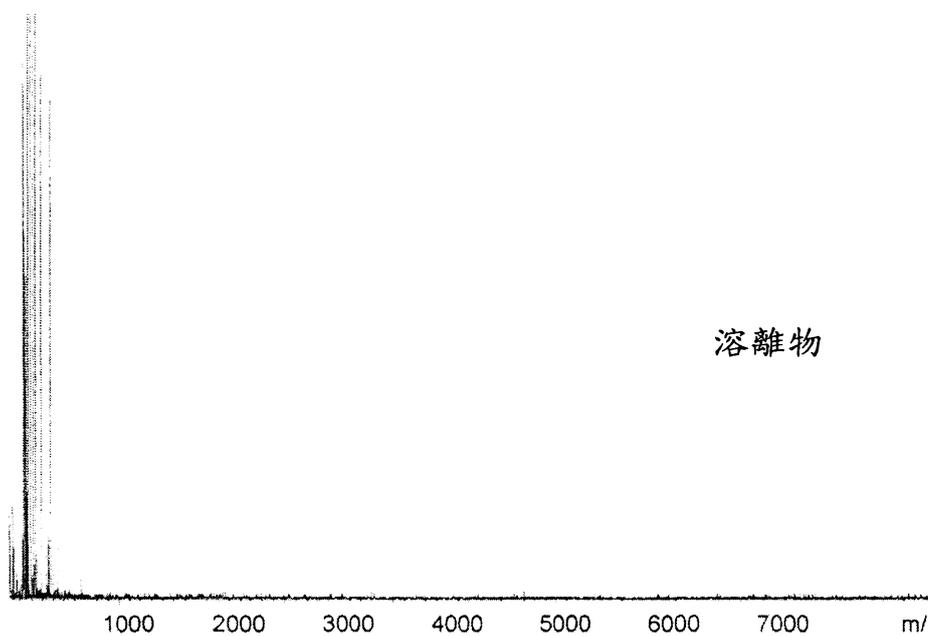


圖34c

最後之洗滌物

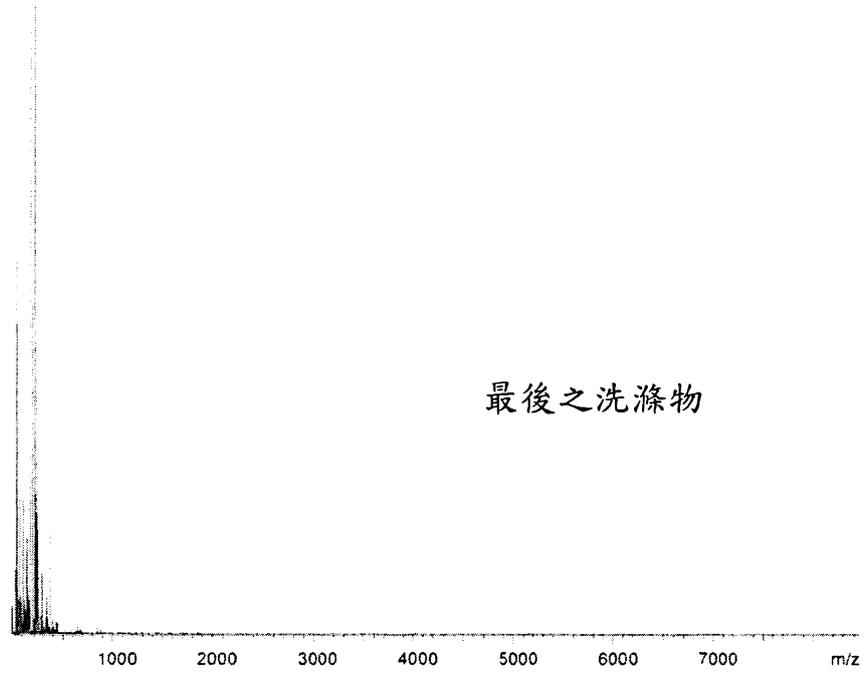


溶離物

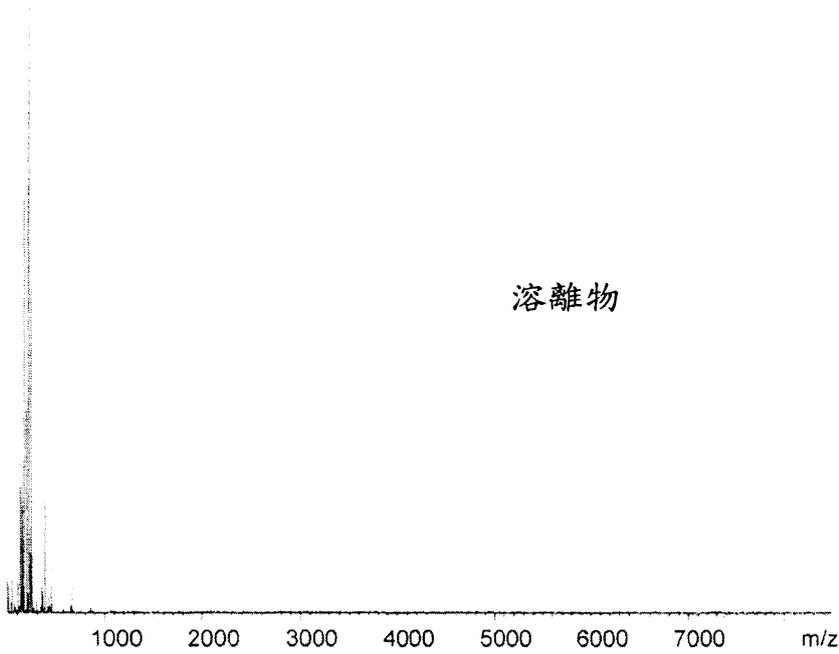


對A β (4-10)無親和力

圖34d



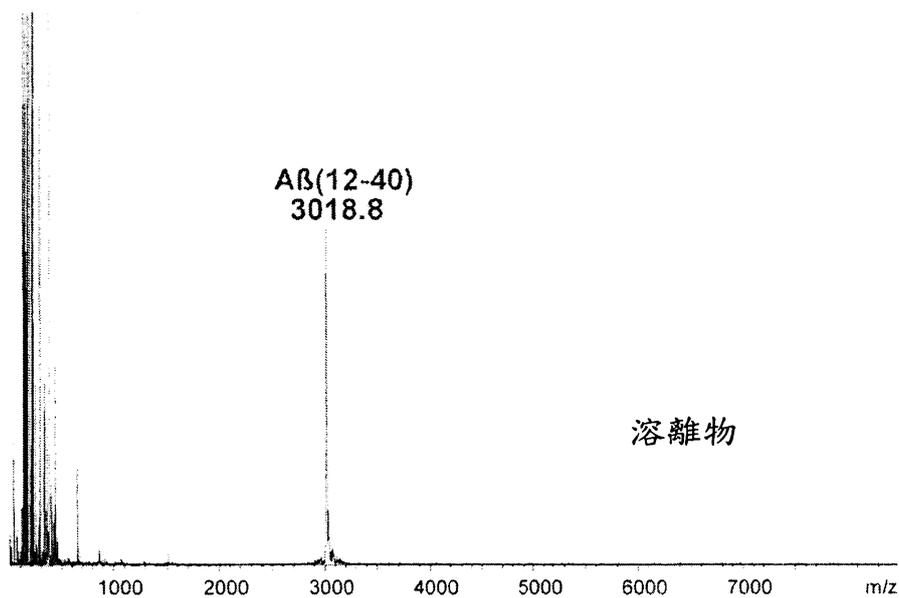
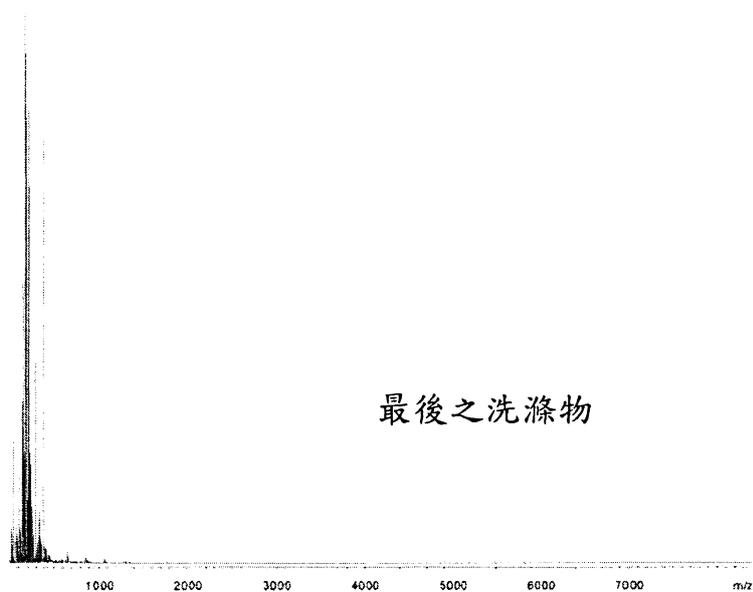
最後之洗滌物



溶離物

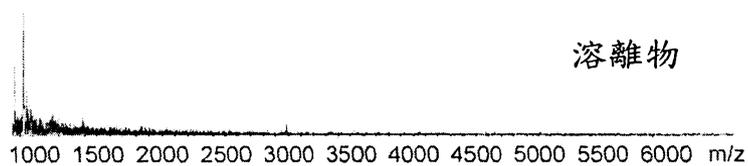
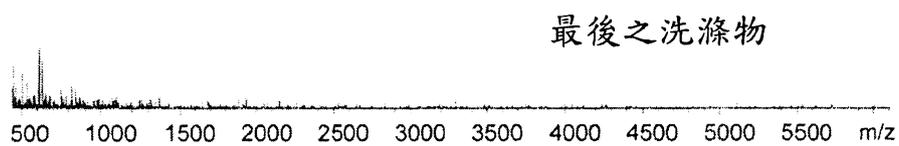
對A β (17-28)無親和力

圖 34e



ACA Ab對A β (12-40)
具有親和力

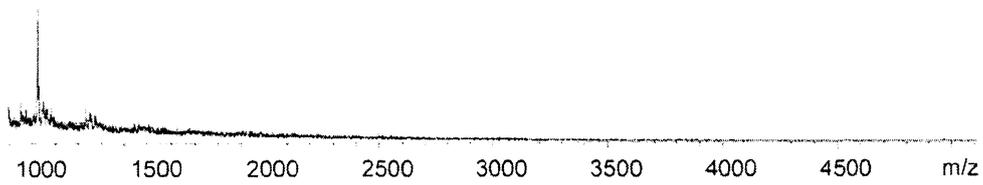
圖 34f



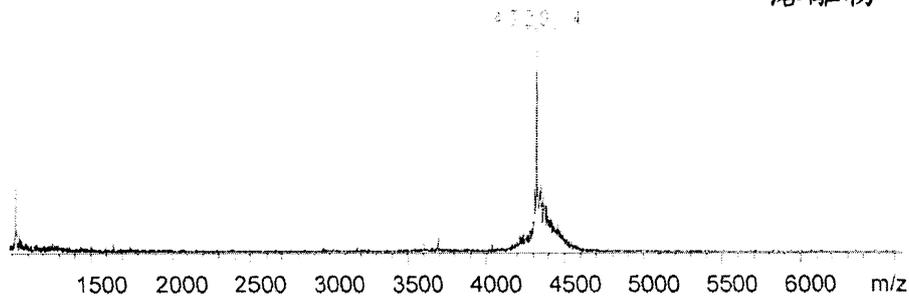
對A β (20-37)無親和力

圖34g

最後之洗滌物



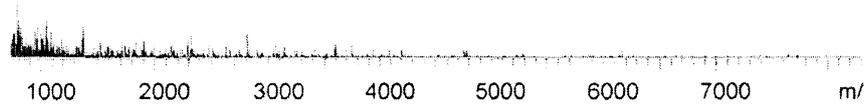
溶離物



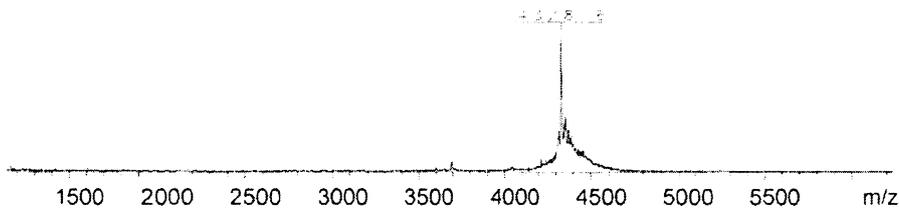
ACA Ab對A β (1-40)具有親和力

圖 34h

最後之洗滌物



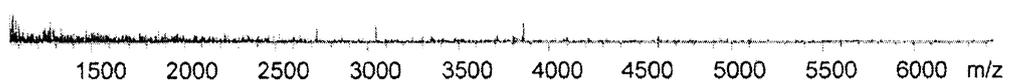
溶離物



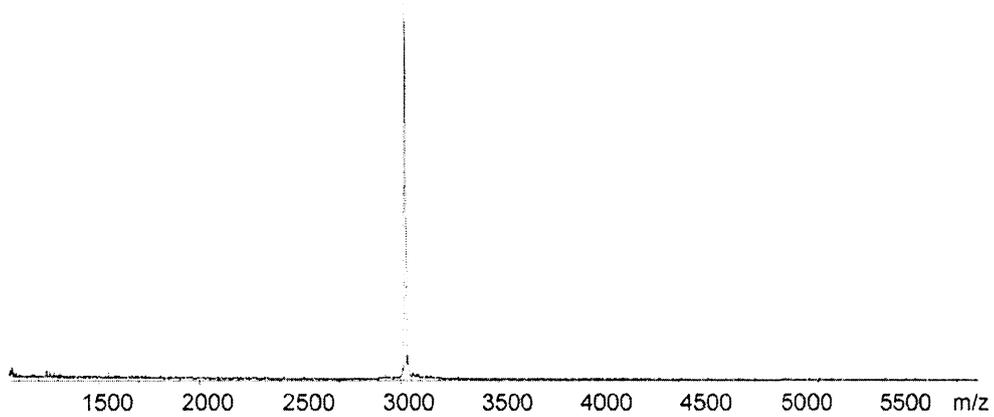
A β -Ab對A β (1-40)具有親和力

圖34i

最後之洗滌物



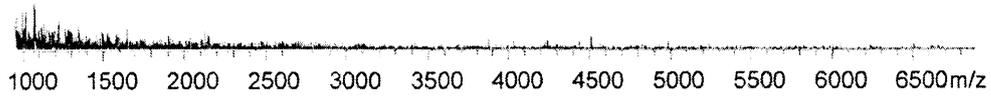
溶離物



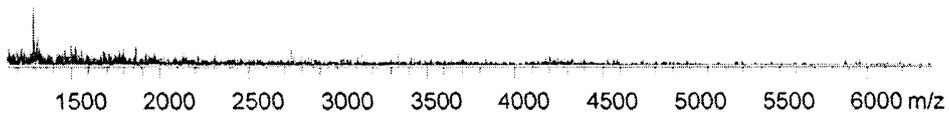
A β -Ab對A β (12-40)具有親和力

圖34j

最後之洗滌物



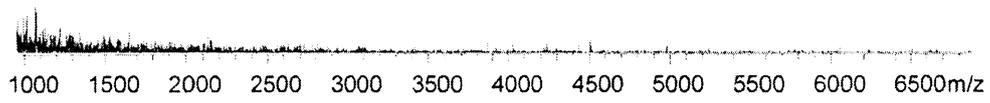
溶離物



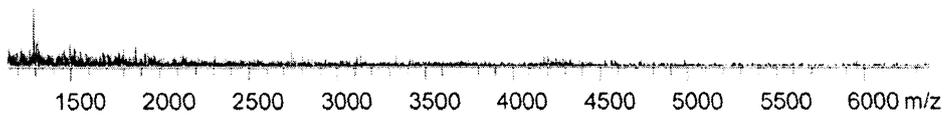
$A\beta$ -Ab對 $A\beta(17-28)$ 不具有親和力

圖 34k

最後之洗滌物



溶離物



$A\beta$ -Ab對 $A\beta(17-28)$ 不具有親和力

圖341

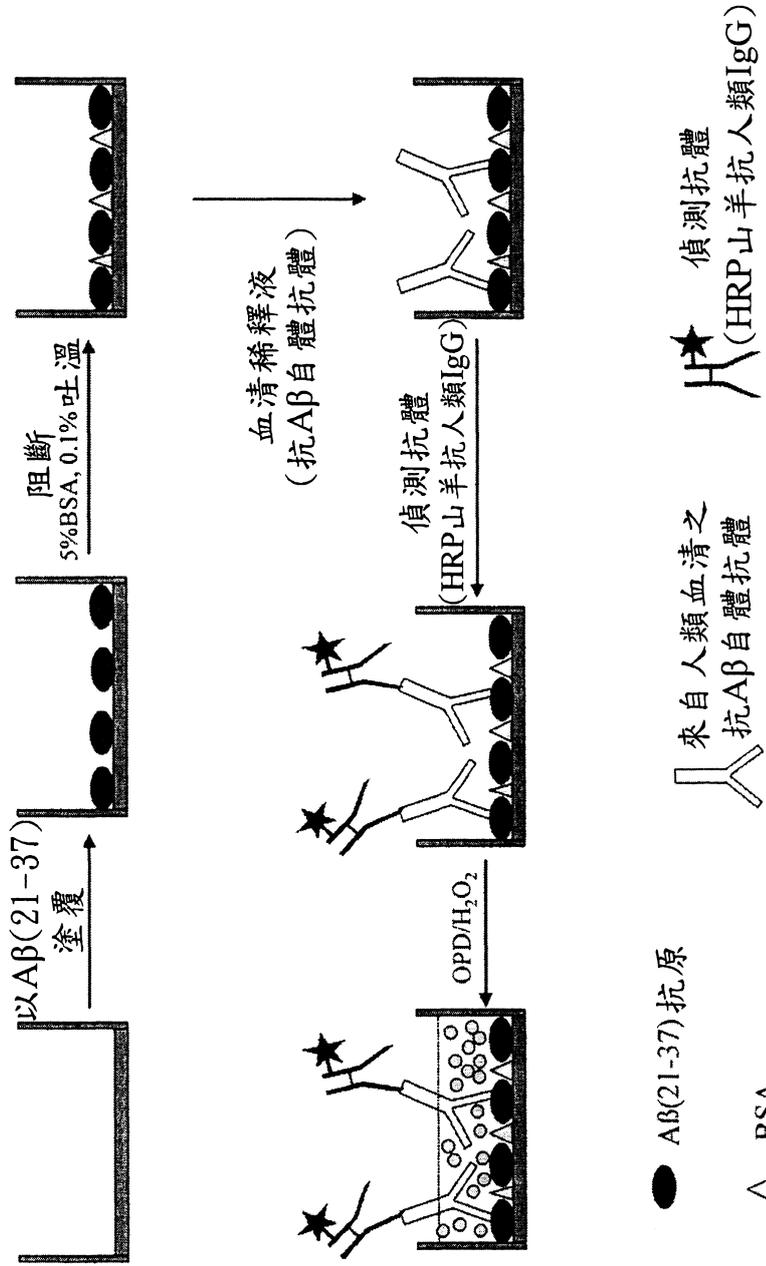


圖35

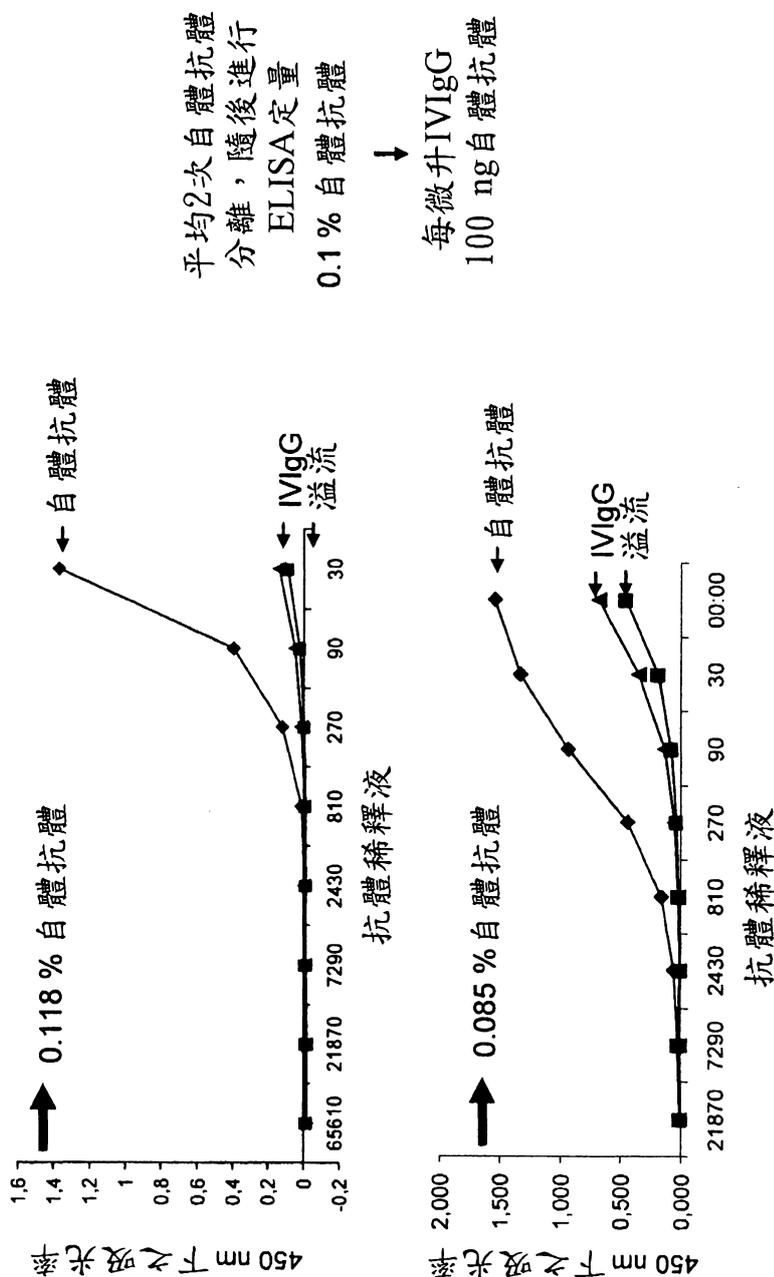


圖36

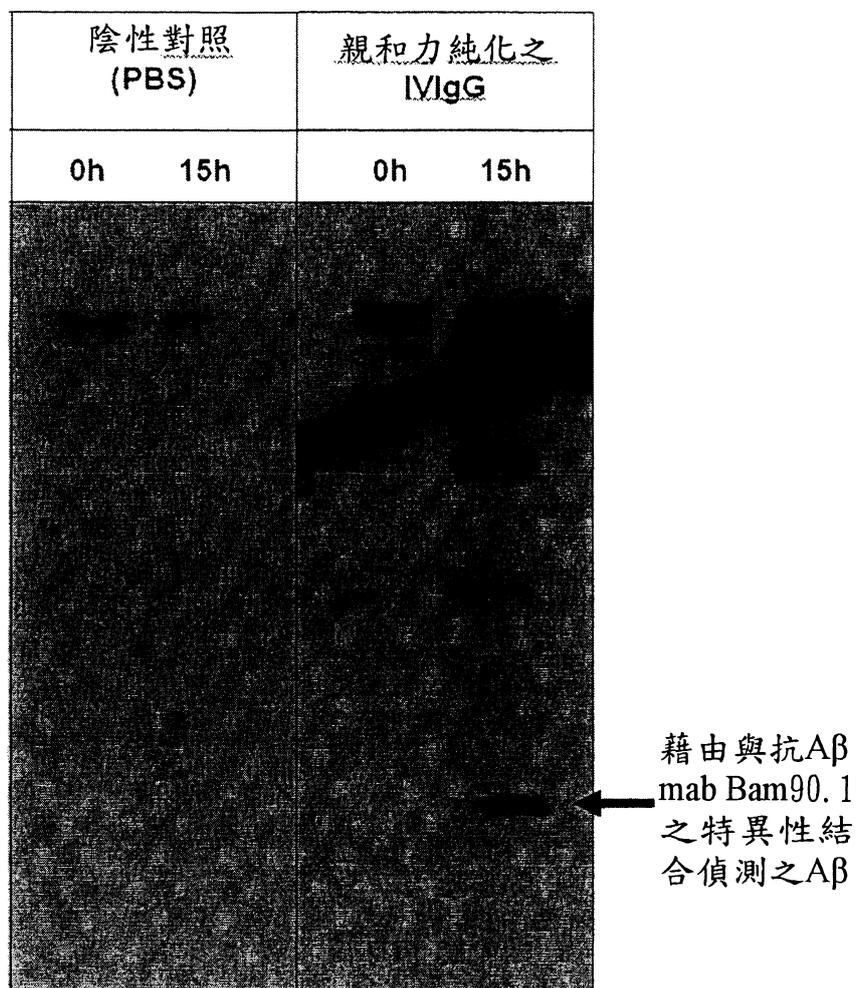


圖37

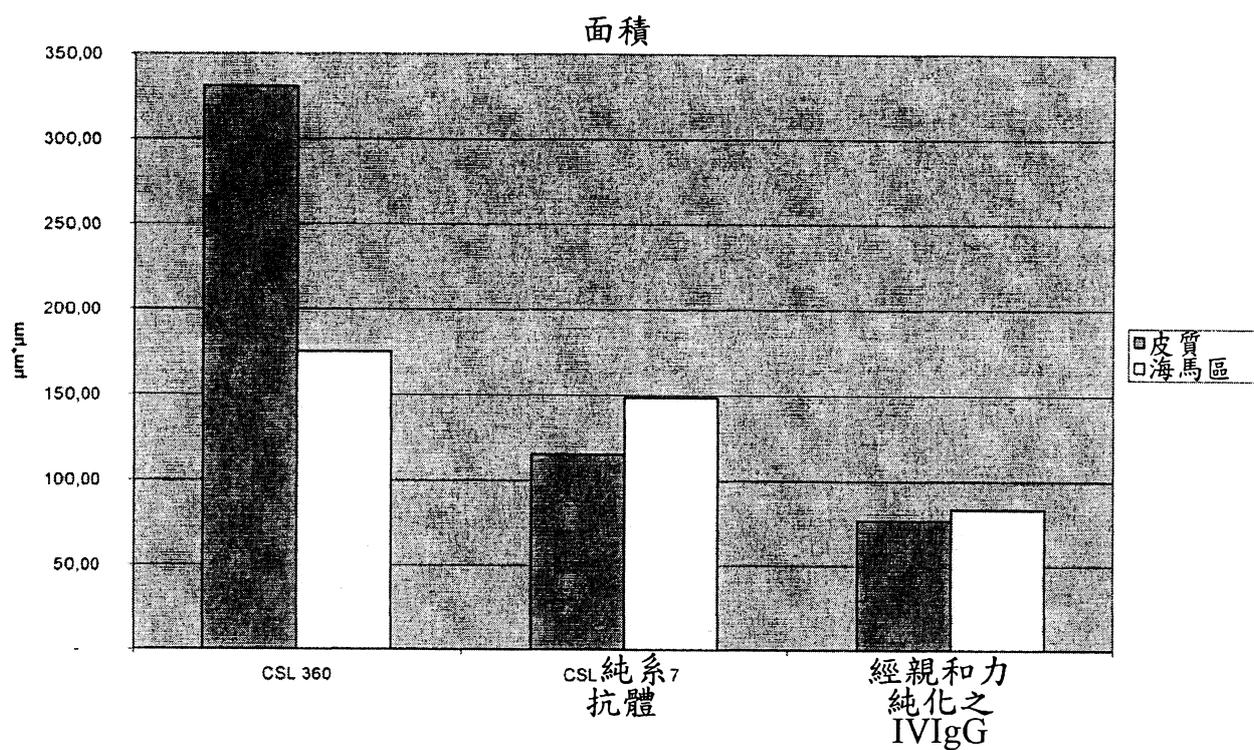


圖 38

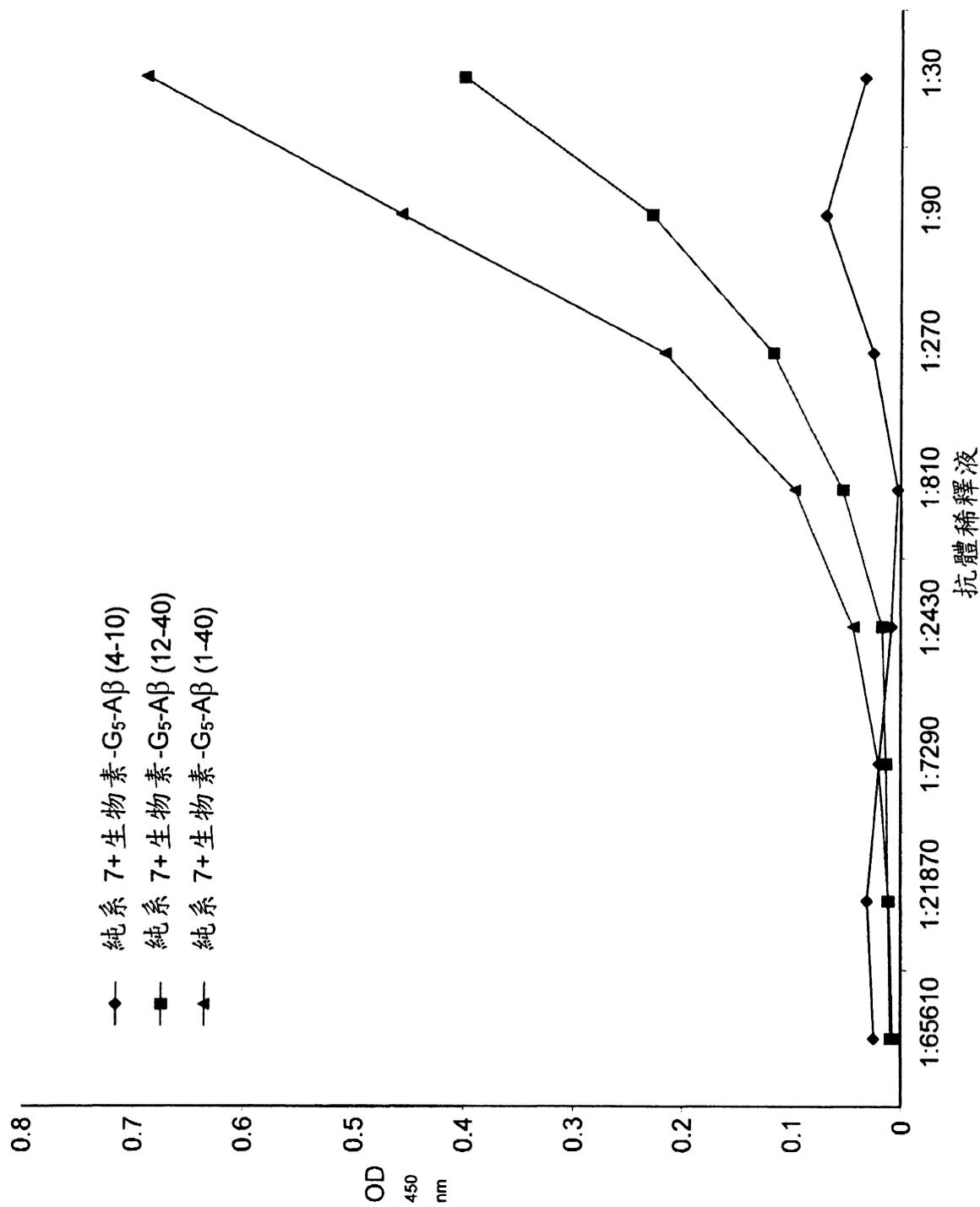


圖39

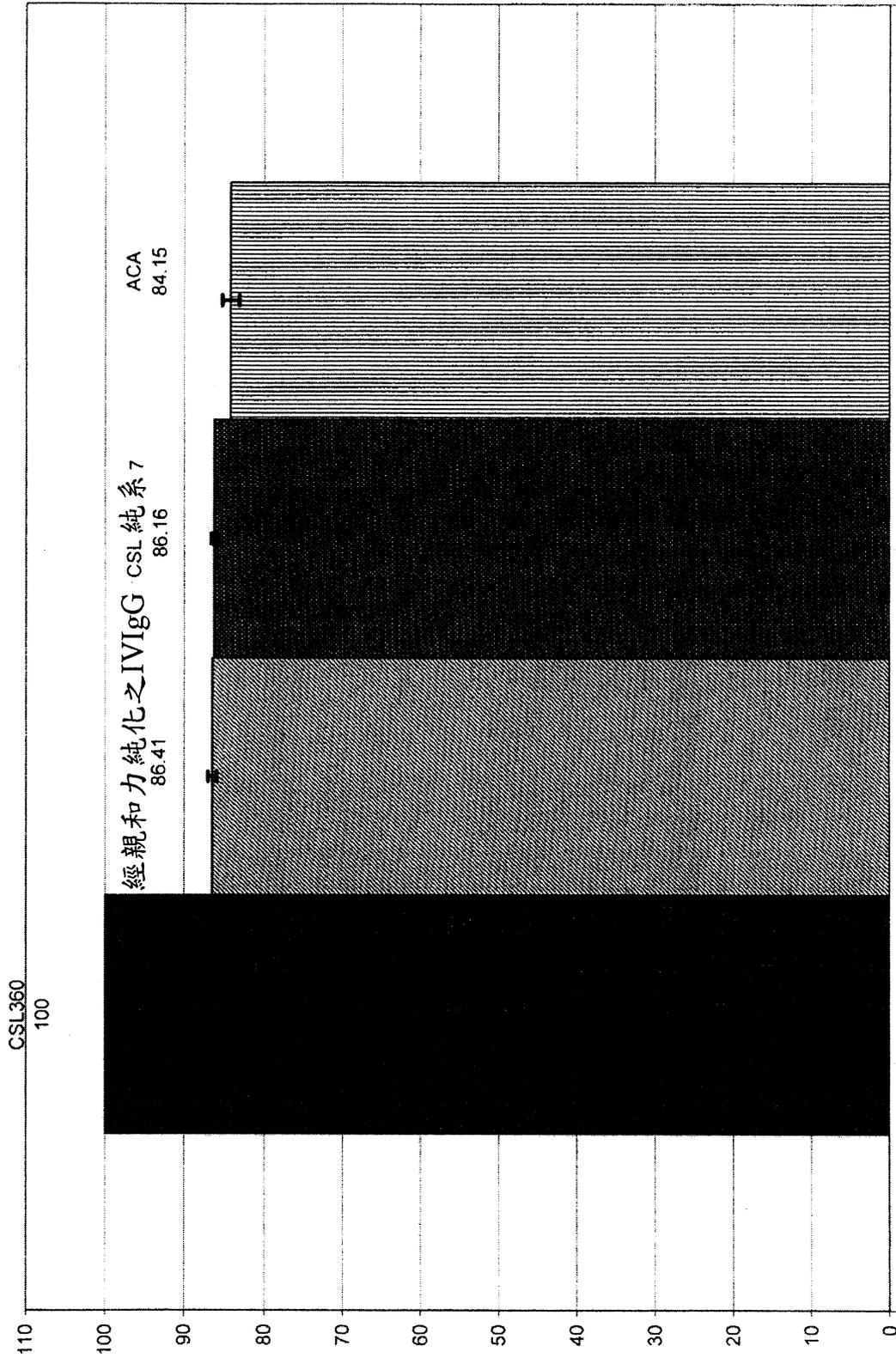
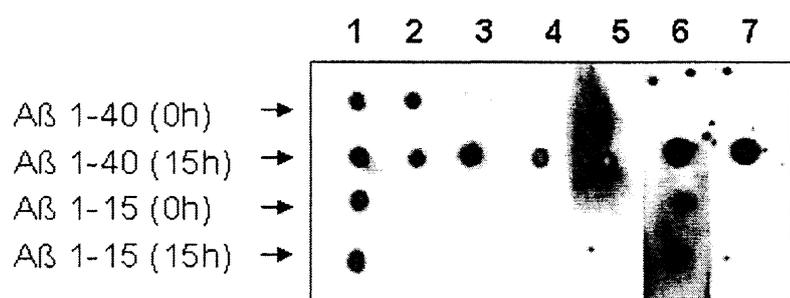


圖40



- 1: 6E10
- 2: Bam90.1
- 3: CSL-7
- 4: IVIG
- 5: ACA
- 6: 血清 AD1
- 7: 血清 K4

圖41

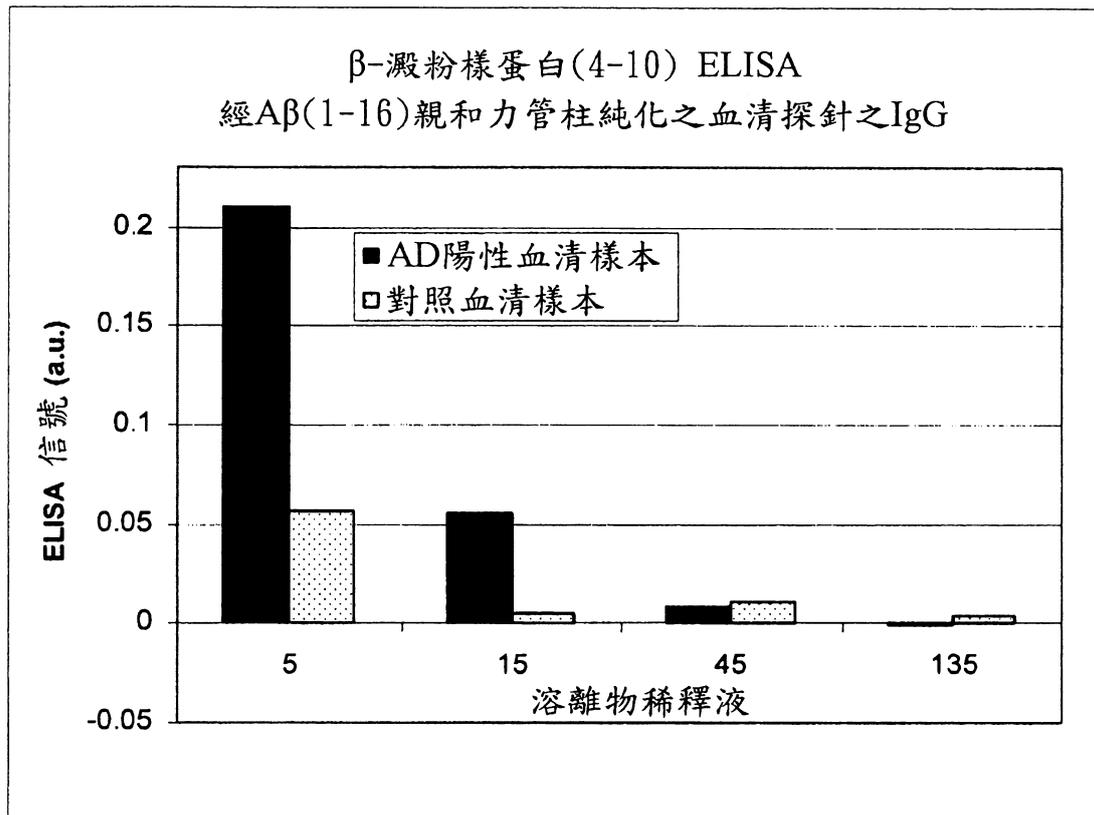


圖42

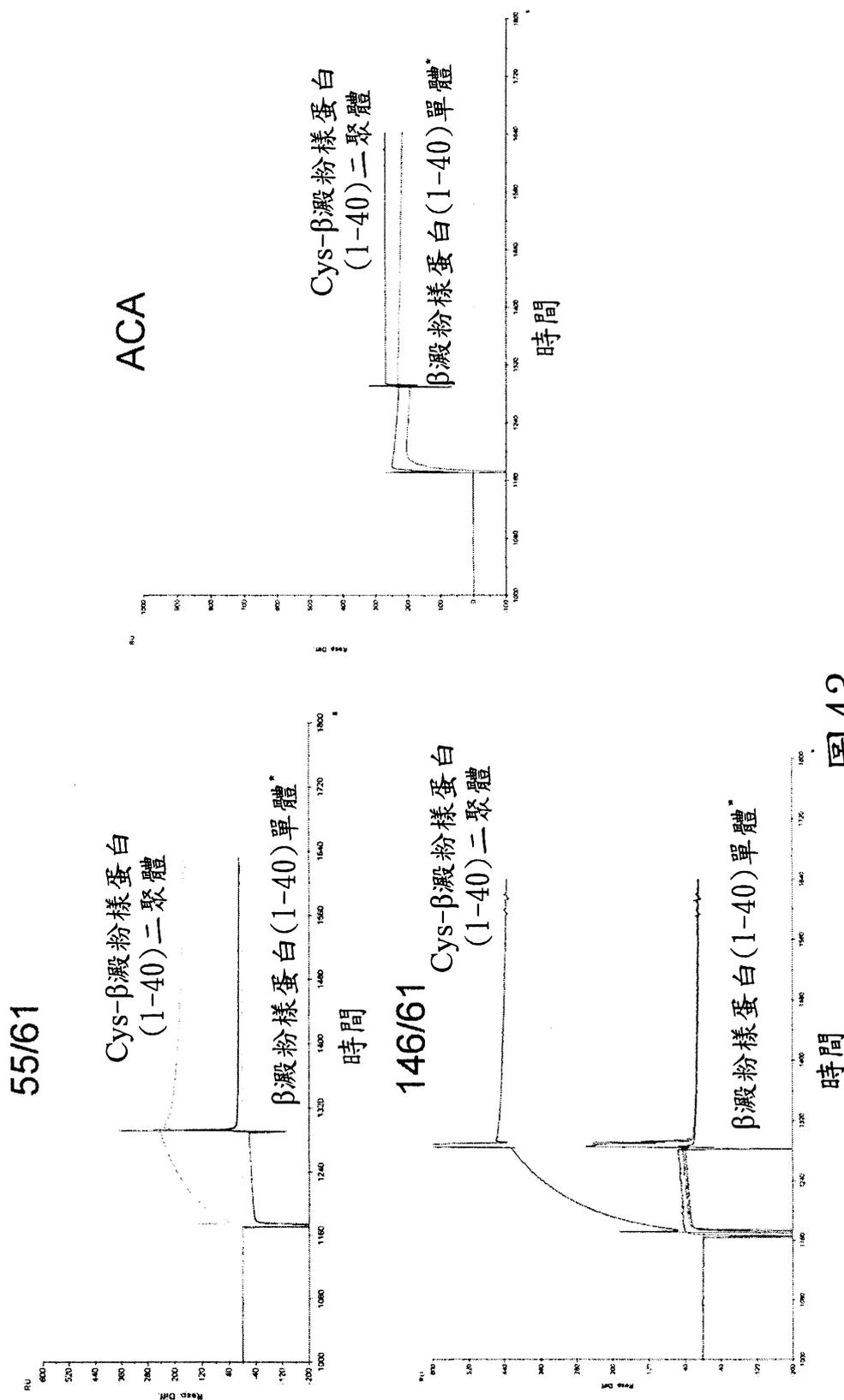


圖 43

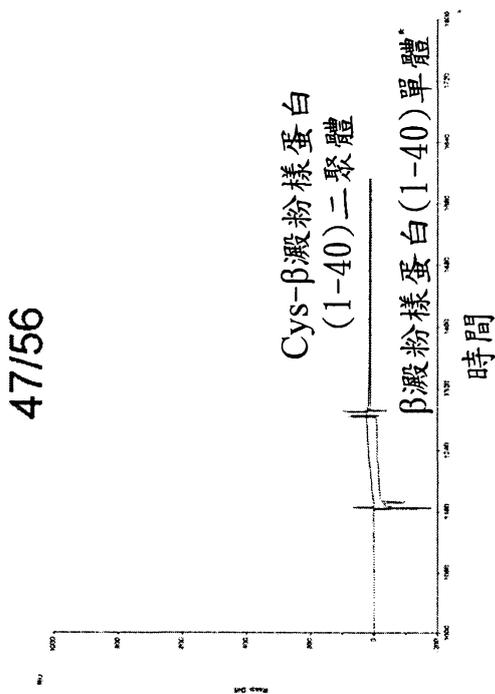
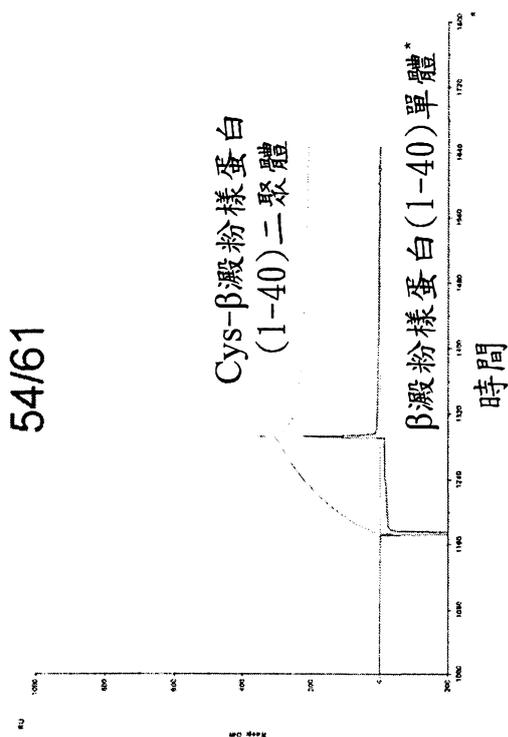
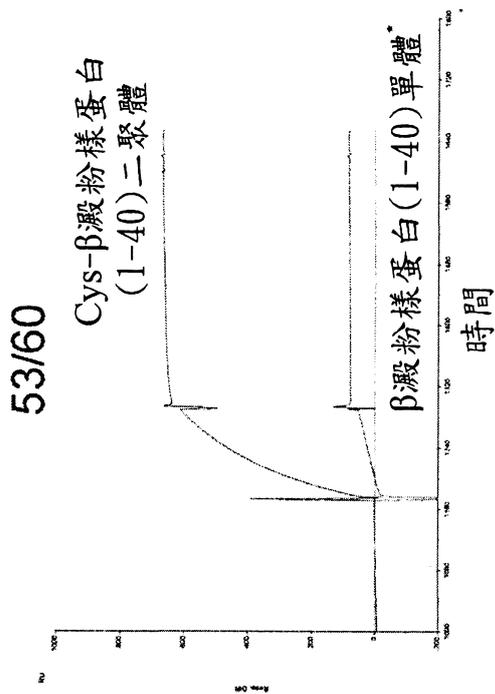
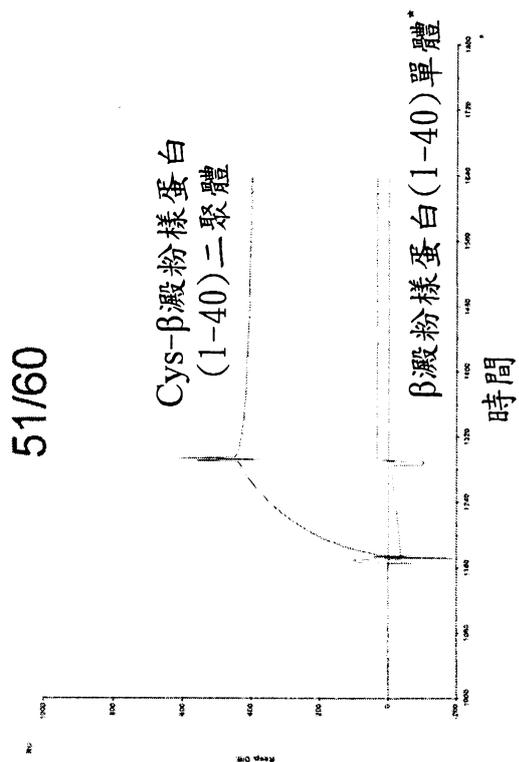


圖44

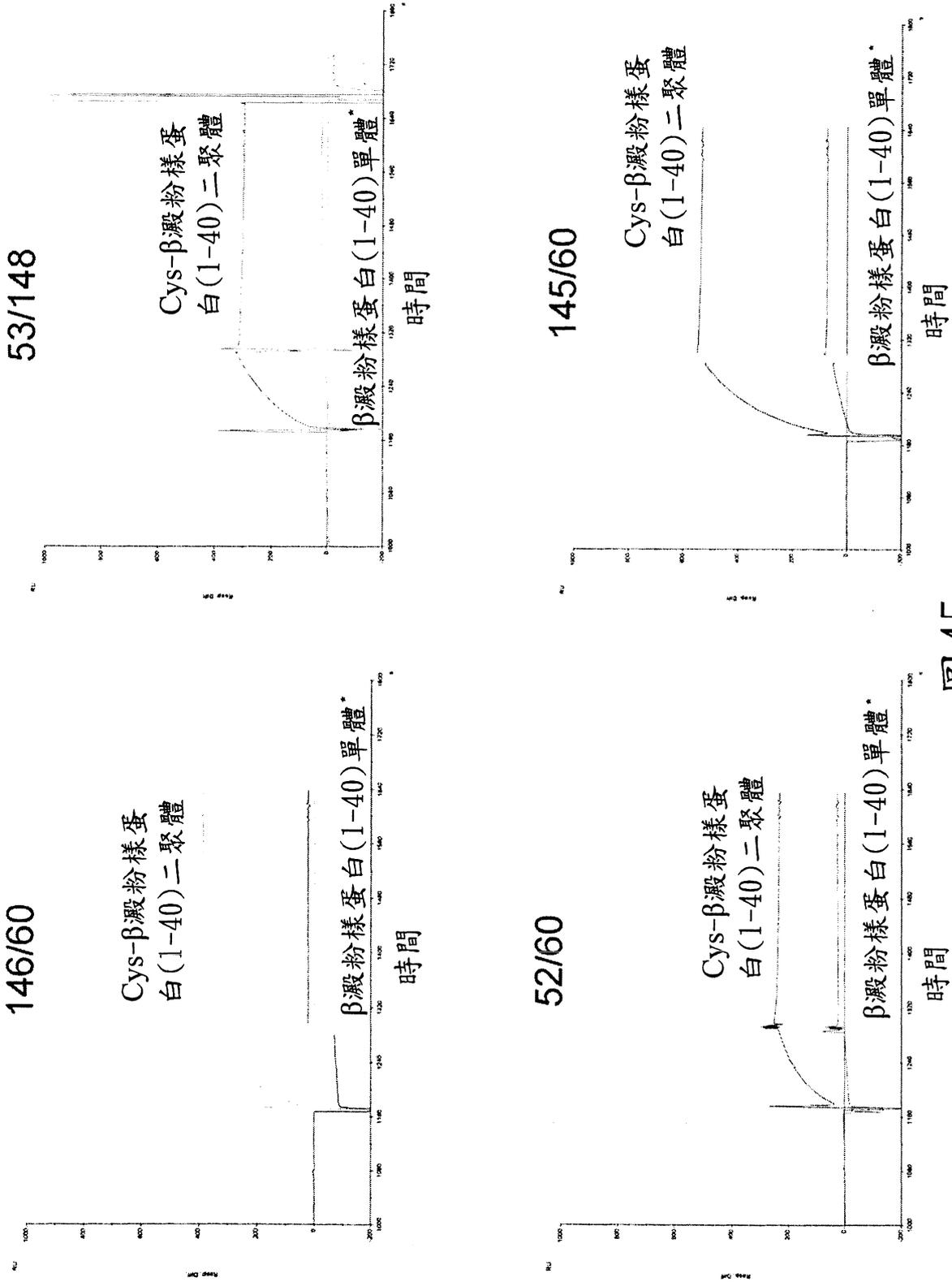


圖45

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (38) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)