

公告本

發明專利說明書

中文說明書替換頁(103年02月)(4b)

(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：097121924

C07K 16/18 (2006.01)

※ 申請日期：97.06.12

※IPC 分類：A61K 39/395 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

G01N 33/566 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

特異性結合 β -類澱粉蛋白之抗體及相關核酸分子、表現載體、細胞、
組合物、套組、方法及用途

ANTIBODY SPECIFICALLY BINDING TO BETA AMYLOID AND
RELEVANT NUCLEIC ACID MOLECULE, EXPRESSION VECTOR,
CELL, COMPOSITION, KIT, METHOD, AND USE

二、申請人：(共 2 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

1. 瑞士商 AC 免疫公司
AC IMMUNE S.A.
2. 美商建南德克公司
GENENTECH, INC.

代表人：(中文/英文)

1. 安得瑞 菲弗
PFEIFER, ANDREA
2. 提摩西 R 史瓦茲
SCHWARTZ, TIMOTHY R.

住居所或營業所地址：(中文/英文)

1. 瑞士洛桑市愛普爾創新園區 B 棟大樓
EPFL INNOVATION PARK, BUILDING B, CH-1015 LAUSANNE,
SWITZERLAND
2. 美國加州舊金山市 DNA 路 1 號
1 DNA WAY, SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990, U.S.A.

國籍：(中文/英文)

1. 瑞士 SWITZERLAND
2. 美國 U.S.A.

三、發明人：(共 4 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 萊恩 華茲
WATTS, RYAN
2. 安得瑞 菲弗
PFEIFER, ANDREA
3. 瑪利亞 皮爾格蘭
PIHLGREN, MARIA
4. 安卓斯 慕斯
MUHS, ANDREAS

國 籍：(中文/英文)

1. 美國 U.S.A.
2. 德國 GERMANY
3. 瑞典 SWEDEN
4. 德國 GERMANY

四、聲明事項：

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

☒ 申請前已向下列國家(地區)申請專利：

【格式請依：受理國家(地區)、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 美國；2007年06月12日；60/943,509

2.

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.

2.

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☒ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☒ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

五、中文發明摘要：

本發明係關於嵌合及人類化抗體，及用於治療及診斷類澱粉變性、一群與類澱粉蛋白相關的病症及異常(如阿茲海默氏症)之方法及組合物。

六、英文發明摘要：

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

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(11)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)

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於用於診斷及治療類澱粉變性、一群與類澱粉蛋白相關的病症及異常如阿茲海默氏症之方法及組合物。

此美國非臨時申請案主張2007年6月11日申請之美國臨時申請案第60/943,291號及2007年6月12日申請之美國臨時申請案第60/943,509號之優先權。

【先前技術】

類澱粉變性非單一疾病實體，而係一群各種不同進行性疾病過程，其特徵在於在一或多個器官或身體系統中積累所謂為類澱粉的蠟狀澱粉樣蛋白的細胞外組織沈積物。由於類澱粉沈積物累積，其開始干擾器官或身體系統之正常功能。存在至少15種不同類型之類澱粉變性。主要形式為無已知前提之原發性類澱粉變性、繼發於某些其他病狀之繼發性類澱粉變性症及遺傳性類澱粉變性。

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

類澱粉沈積物包括類澱粉P(五邊形)組份(AP)、與正常血清類澱粉P(SAP)有關之醣蛋白及硫酸化葡糖胺聚糖(GAG)、結締組織之複合糖類。占類澱粉物質之約90%的類澱粉蛋白原纖維包含數種不同類型之蛋白質中的一者。

該等蛋白質能夠摺疊成所謂的" β -褶"片狀原纖維，一種顯示剛果紅之結合位點而導致類澱粉蛋白之獨特染色特性的獨特蛋白質構型。

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

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

阿茲海默氏症(AD)為神經性病變，認為其主要係由類澱粉斑塊，蛋白之異常沈積物在腦中之積累引起。在患病個體之腦中最常見的類澱粉類型主要包含 $A\beta$ 原纖維。科學證據證明 β -類澱粉蛋白在斑塊中產生及積累之增加會導致神

經細胞死亡，此造成AD之發生及進展。關鍵腦區域中神經細胞之喪失又導致神經傳遞質減少及記憶損害。主要負責斑塊積聚之蛋白包括類澱粉前驅蛋白(APP)及兩種早衰蛋白(早衰蛋白I及早衰蛋白II)。在大多數細胞中組成型表現且異化之類澱粉前驅蛋白(APP)經酶 β 及 γ 分泌酶之連續裂解使得39至43個胺基酸 $A\beta$ 肽釋放。APP之降解可能增加其在斑塊中之聚集傾向。 $A\beta(1-42)$ 片段因其C末端處2個極具疏水性的胺基酸殘基而尤其具有構建聚集體之高傾向。因此咸信 $A\beta(1-42)$ 片段主要涉及且負責AD中神經炎斑塊形成之起始且因此咸信其具有高病理可能性。因此需要防止類澱粉斑塊形成且使AD中現有斑塊擴散之藥劑。

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

目前，診斷AD唯一確定方式為在個體死亡後屍檢時鑑定腦組織中之斑塊及纏結。因此，當個體仍活著時醫師僅可作出"可能的"AD診斷。使用現有方法，醫師可使用數種診斷"可能的"AD之工具，在高達90%的時間中正確診斷AD。醫師詢問關於個體之一般健康、過往醫學問題及個

體進行日常活動所具有的任何困難之病史的問題。記憶、問題解決、注意力、計數及語言之行為測試提供關於認知退化之資訊，且諸如血液、尿或脊髓液之測試的醫學測試及腦同位素掃描可提供某些其他資訊。

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

對於某些處於疾病早期及中期之患者，藥物塔克林(COGNEX[®], Morris Plains, NJ)、冬尼培唑(donepezil)(ARICEPT[®], Tokyo, JP)、雷斯替明(EXELON[®], East Hanover, NJ)或加蘭他敏(galantamine)(REMINYL[®], New Brunswick, NJ)可有助於在有限時間內防止某些症狀惡化。已批准將另一藥物美金剛(memantine)(NAMENDA[®], New York, NY)用於治療中度至重度AD。藥物亦可用以解決AD之精神病學表現。某些藥物亦可幫助控制AD之行為症狀，諸如失眠、興奮、精神恍惚、焦慮及抑鬱。治療該等症狀通常使得患者更舒適且對於護理者而言使其監護更容易。令人遺憾地，雖然顯著治療進展顯示此類藥劑始終優於安慰劑，但疾病繼續進展且對心理機能之一般作用僅為輕微的。用於AD藥療法中之許多藥物如ChEI亦具有包

括胃腸功能失調、肝臟毒性及體重減輕之副作用。

基於或與類澱粉樣蛋白之積累及沈積相關的另一疾病為黃斑退化。

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

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

儘管濕性形式僅占病例之15%，但其引起90%之失明且

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

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

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

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

正在進行之研究繼續探索可能造成AMD之環境、遺傳及食物要素的研究。亦探索新穎治療策略，包括視網膜細胞移植、防止或減緩疾病進展之藥物、放射治療、基因治療、可有助於刺激視力的植入視網膜中之電腦晶片及防止黃斑下新血管生長之藥劑。

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

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

劑。

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

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

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

該問題可藉由直接在人類中產生抗體或藉由形成"人類化"抗體(亦稱作"重塑"抗體)來克服。人類化抗體具有含有散布於人類或人類樣構架序列中之源自齧齒動物之CDR的

可變區胺基酸序列。由於人類化抗體之特異性係由源自齧齒動物之CDR提供，因此僅在容許少量修飾之情況下基本上不變地使用其殘基，該等修飾並不明顯干擾抗體對其目標抗原之親和力及特異性。構架殘基可源自任何靈長類或尤其任何人類可變區或可為其之組合，且所得經設計之可變區將視為經重塑的。

為使親和力將保持於該重塑抗體中之可能性最大化，重要的係合理選擇構架區。已知構架序列係用來將CDR固持於其恰當空間定向中以與抗原相互作用，且構架殘基有時甚至可參與抗原結合。為保持抗體對其抗原之親和力，選擇與齧齒動物構架之序列最相似的人類構架序列係有利的。接著可能仍需要以齧齒動物構架中之相應殘基替換人類構架序列中之一或多個胺基酸以避免親和力損失。該替換可藉由電腦模擬來輔助。

本發明提供新穎方法及組合物，其包含高度特異性且高效之抗體、尤其嵌合抗體(包括其片段)、更尤其部分或完全人類化抗體(包括其片段)，其具有特異性地識別且與一系列 β -類澱粉抗原之特定抗原決定基結合之能力， β -類澱粉抗原可以單體、二聚、三聚等多聚形式、聚集體、纖維、長絲形式或斑塊縮合形式遞呈至抗體。本發明之教示能夠實現之抗體尤其適用於治療類澱粉變性，一群與類澱粉斑塊形成相關的疾病及病症，其包括繼發性類澱粉變性及年齡相關之類澱粉變性，包括(但不限於)神經性病變，諸如阿茲海默氏症(AD)、路易體性癡呆、唐氏綜合症、具

有類澱粉變性(荷蘭類型)之遺傳性腦出血；關島帕金森癡呆複合症；以及基於或與類澱粉樣蛋白相關的其他疾病，諸如進行性核上眼神經麻痺症、多發性硬化；庫賈氏病、具有荷蘭類型類澱粉變性之遺傳性腦出血、帕金森氏病、HIV相關性癡呆、ALS(肌萎縮性側索硬化)、成年發病型糖尿病；老年心臟類澱粉變性；內分泌腫瘤及包括黃斑退化之其他病症等等。

【發明內容】

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

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

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

成構形非連續性抗原決定基。

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

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

Xaa₃-Phe-Phe-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆，其中：

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

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

Xaa₅為選自由Glu及Asp組成之群的胺基酸殘基；

Xaa₆為選自由Glu及Asp組成之群的胺基酸殘基，且其中該等胺基酸殘基Xaa₃、Xaa₄、Xaa₅及Xaa₆未涉及抗體結合

或以與 -Phe-Phe- 結合位點相比顯著較低程度涉及抗體結合。

本發明之另一實施例提供嵌合抗體或其片段，或人類化抗體或其片段，其中：

Xaa₃ 為 Val 或 Leu，但尤其為 Val；

Xaa₄ 為 Ala 或 Val，但尤其為 Ala；

Xaa₅ 為 Glu 或 Asp，但尤其為 Glu；

Xaa₆ 為 Glu 或 Asp，但尤其為 Asp。

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

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

其中：

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

Xaa₃ 為選自由 Asn 及 Gln 組成之群的胺基酸殘基；

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

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

酸殘基；

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

Xaa₇為選自由Ala、Val、Leu及Ile組成之群的胺基酸殘基；

Xaa₈為選自由Glu及Asp組成之群的胺基酸殘基；

Xaa₉為選自由Glu及Asp組成之群的胺基酸殘基；且其中該等胺基酸殘基Xaa₁、Xaa₃、Xaa₆、Xaa₇、Xaa₈及Xaa₉未涉及抗體結合或以分別與-His-及-Phe-Phe-結合位點相比之較低至顯著較低程度涉及抗體結合。

在本發明之另一實施例中，提供嵌合抗體或其片段，或人類化抗體或其片段，其中：

Xaa₃為Gln或Asn，但尤其為Gln；

Xaa₄為Lys；

Xaa₅為Leu；

Xaa₆為Val或Leu，但尤其為Val；

Xaa₇為Ala或Val，但尤其為Ala；

Xaa₈為Glu或Asp，但尤其為Glu；且

Xaa₉為Asp或Glu，但尤其為Asp。

在本發明之另一實施例中，提供嵌合抗體或其片段，或人類化抗體或其片段，其識別且與 β -類澱粉蛋白上之至少一個特定結合位點、特別是至少兩個特定結合位點、更特別是至少三個特定結合位點結合，其中該至少一個或該至少兩個特定結合位點各包含至少兩個顯著涉及抗體結合之

連續胺基酸殘基，其中該表示第二結合位點之至少兩個連續胺基酸殘基為嵌入以下核心序列 (SEQ ID NO: 10) 中之 -Lys-Leu-：

Xaa₁-Xaa₂-Lys-Leu-Xaa₃，其中：

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

Xaa₂為選自由 Asn 及 Gln 組成之群的胺基酸殘基；

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

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

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

Xaa₂為選自由 Asn 及 Gln 組成之群的胺基酸殘基；

Xaa₃為選自由 Ala、Val、Leu、正白胺酸、Met、Phe 及

Ile組成之群的胺基酸殘基；

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

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

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

Xaa₇為選自由Glu及Asp組成之群的胺基酸殘基；

Xaa₈為選自由Glu及Asp組成之群的胺基酸殘基；

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

在本發明之另一實施例中，提供嵌合抗體或其片段，或人類化抗體或其片段，其中：

Xaa₂為Gln或Asn，但尤其為Gln；

Xaa₃為Val或Leu，但尤其為Val；

Xaa₄為Phe；

Xaa₅為Phe；

Xaa₆為Ala或Val，但尤其為Ala；

Xaa₇為Glu或Asp，但尤其為Glu；且

Xaa₈為Asp或Glu，但尤其為Asp。

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

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

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

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

Xaa₂為選自由Asn及Gln組成之群的胺基酸殘基；

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

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

Xaa₅為選自由Glu及Asp組成之群的胺基酸殘基；

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

在本發明之另一實施例中，提供嵌合抗體或其片段，或人類化抗體或其片段，其識別且與β-類澱粉蛋白上之至少一個特定結合位點、特別是至少2個特定結合位點、更特別是至少三個特定結合位點結合，其中該等特定結合位點分別包含顯著涉及抗體結合之至少一個及至少兩個連續胺

基酸殘基，其中該至少一個及至少兩個連續胺基酸係由至少一個未涉及抗體結合或以與該等顯著涉及抗體結合之胺基酸殘基相比之顯著較低程度涉及抗體結合的胺基酸殘基分隔，且其中該等胺基酸殘基分別為嵌入以下核心序列中之-His-及-Phe-Phe-及-Lys-Leu-。

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

Xaa₂為選自由Asn及Gln組成之群的胺基酸殘基；

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

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

Xaa₅為選自由Glu及Asp組成之群的胺基酸殘基；

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

在本發明之另一實施例中，提供嵌合抗體或其片段，或人類化抗體或其片段，其中：

Xaa₂為Gln或Asn，但尤其為Gln；

Xaa₃為Val或Leu，但尤其為Val；

Xaa₄為Ala或Val，但尤其為Ala；

Xaa₅為Glu或Asp，但尤其為Glu；且

Xaa₆為Asp或Glu，但尤其為Asp。

在本發明之另一實施例中，提供嵌合抗體或其片段，或

人類化抗體或其片段，其識別且與 β -類澱粉蛋白上之至少兩個特定結合位點結合，其中該至少兩個特定結合位點各包含至少兩個顯著涉及抗體結合之連續胺基酸殘基，其中該至少兩個連續胺基酸係由至少一個未涉及抗體結合或以與該等連續胺基酸殘基相比之顯著較低程度涉及抗體結合的胺基酸殘基分隔，該等連續胺基酸殘基分別為-Phe-Phe-及-Lys-Leu-，表示嵌入以下核心序列中之第一及第二結合位點：

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

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

Xaa₂為選自由Asn及Gln組成之群的胺基酸殘基；

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

Xaa₄為選自由Ala、Val、Leu及Ile組成之群的胺基酸殘基；

● Xaa₅為選自由Glu及Asp組成之群的胺基酸殘基；

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

在本發明之另一實施例中，提供嵌合抗體或其片段，或人類化抗體或其片段，其中：

Xaa₁為His或Arg，但尤其為His；

Xaa₂為 Gln或 Asn，但尤其為 Gln；

Xaa₃為 Val或 Leu，但尤其為 Val；

Xaa₄為 Ala或 Val，但尤其為 Ala；

Xaa₅為 Glu或 Asp，但尤其為 Glu；且

Xaa₆為 Asp或 Glu，但尤其為 Asp。

在本發明之一實施例中，提供嵌合抗體或其片段，或人類化抗體或其片段，其識別且與 β -類澱粉蛋白上之至少兩個特定結合位點結合，其中該至少兩個特定結合位點各包含至少兩個顯著涉及抗體結合之連續胺基酸殘基，其為 -Phe-Phe-Ala-Glu-、尤其 -Phe-Phe-Ala-，但尤其分別為 -Phe-Phe-及 -Lys-Leu-，且其中該至少兩個特定結合位點分別具有 SEQ ID NO: 7 中所示之胺基酸序列 -Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-及 SEQ ID NO:8 中所示之胺基酸序列 His-Gln-Lys-Leu-Val-。

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

在本發明之另一實施例中，嵌合抗體或其片段，或人類

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

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

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

在一特定實施例中，將該等顯著涉及 β -類澱粉蛋白之結

合的連續胺基酸殘基、尤其位置16及17之-Lys-Leu-及位置19及20之-Phe-Phe-嵌入以下核心區中：

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

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

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

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

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

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

Xaa₂為選自由Asn及Gln組成之群的胺基酸殘基，但尤其為Gln；且

Xaa₃為選自由Val、Leu及Ile組成之群的胺基酸殘基，但

尤其為 Val；

Xaa₄為選自由 Ala及 Val組成之群的胺基酸殘基，但尤其為 Ala；

Xaa₅為選自由 Glu及 Asp組成之群的胺基酸殘基，但尤其為 Glu；

Xaa₆為選自由 Glu及 Asp組成之群的胺基酸殘基，但尤其為 Asp。

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

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

Xaa₂為選自由 Asn及 Gln組成之群的胺基酸殘基，但尤其為 Gln；且

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

Xaa₄為選自由 Ala及 Val組成之群的胺基酸殘基，但尤其為 Ala；

Xaa₅為選自由 Glu及 Asp組成之群的胺基酸殘基，但尤其

為 Glu；

Xaa₆為選自由 Glu及 Asp組成之群的胺基酸殘基，但尤其為 Glu；且其中該等胺基酸殘基 Xaa₂、Xaa₃、Xaa₄、Xaa₅、Xaa₆未涉及抗體結合或以與 -His-及 -Lys-Leu-及 -Phe-Phe-結合位點相比之較低程度涉及抗體結合。

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

詳言之，非人類來源之 CDR係獲自鼠類供體抗體，其顯示"德國微生物菌種保藏中心(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSMZ)"於 Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig 依據布達佩斯條約(Budapest Treaty)之條款以寄存編號

DSM ACC2750於2005年12月1日寄存的ACI-01-Ab7C2(在本申請案通篇中亦稱作"mC2")之特徵特性。

在本發明之一實施例中，非人類來源之CDR係獲自"德國微生物菌種保藏中心(DSMZ)"於Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig依據布達佩斯條約之條款以寄存編號DSM ACC2750於2005年12月1日寄存之鼠類供體抗體ACI-01-Ab7C2(在本申請案通篇中亦稱作"mC2")。

脂質A作為免疫方案之部分的使用亦可造成抗原決定基區之移位。

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

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

在另一實施例中，本發明係關於人類化抗體或其片段，其中該人類化抗體包含整合至源自人類或靈長類之輕鏈構架區中的肽，其具有表示輕鏈可變區(LCVR)之CDR1的

SEQ ID NO: 4之胺基酸序列。

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

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

本發明進一步係關於人類化抗體或其片段，其包含整合至源自人類或靈長類之構架區中的至少兩種肽，該等肽不同且顯示選自由以下各物組成之序列之群的胺基酸序列：表示重鏈可變區(HCVR)之CDR1之SEQ ID NO: 1、表示重鏈可變區(HCVR)之CDR2之SEQ ID NO: 2及表示重鏈可變區(HCVR)之CDR3之SEQ ID NO: 3；及表示輕鏈可變區(LCVR)之CDR1之SEQ ID NO: 4、表示輕鏈可變區(LCVR)之CDR2之SEQ ID NO: 5及表示輕鏈可變區(LCVR)之CDR3之SEQ ID NO: 6，其中相同CDR不能在抗體中出現兩次。詳言之，若存在之至少兩個CDR皆為輕鏈可變區(LCVR)之CDR，則該等CDR中之至少一者須為由SEQ ID NO: 4表示之CDR1。

本發明亦包含人類化抗體或其片段，其包含整合至源自人類或靈長類之重鏈構架區中的至少兩種肽，該等肽具有

選自由表示重鏈可變區(HCVR)之CDR1之SEQ ID NO: 1、表示重鏈可變區(HCVR)之CDR2之SEQ ID NO: 2及表示重鏈可變區(HCVR)之CDR3之SEQ ID NO: 3組成的序列之群的胺基酸序列，但尤其包含其中相同CDR不能在抗體中出現兩次之人類化抗體或其片段。

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

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

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

CDR1。

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

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

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

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

胺基酸序列。

本發明亦係關於人類化抗體或其片段，其包含整合至源自人類或靈長類之構架區中的至少三種肽，其具有選自由以下各物組成之序列之群的胺基酸序列：表示重鏈可變區(HCVR)之CDR1之SEQ ID NO: 1、表示重鏈可變區(HCVR)之CDR2之SEQ ID NO: 2及表示重鏈可變區(HCVR)之CDR3之SEQ ID NO: 3；及表示輕鏈可變區(LCVR)之CDR1之SEQ ID NO: 4、表示輕鏈可變區(LCVR)之CDR2之SEQ ID NO: 5及表示輕鏈可變區(LCVR)之CDR3之SEQ ID NO: 6，但尤其係關於其中相同CDR不能在抗體中出現兩次之人類化抗體或其片段。

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

在另一實施例中，本發明係關於人類化抗體或其片段，其包含整合至源自人類或靈長類之構架區中的至少5種肽，其具有選自由以下各物組成之序列之群的胺基酸序

列：表示重鏈可變區(HCVR)之CDR1之SEQ ID NO: 1、表示重鏈可變區(HCVR)之CDR2之SEQ ID NO: 2及表示重鏈可變區(HCVR)之CDR3之SEQ ID NO: 3；及表示輕鏈可變區(LCVR)之CDR1之SEQ ID NO: 4、表示輕鏈可變區(LCVR)之CDR2之SEQ ID NO: 5及表示輕鏈可變區(LCVR)之CDR3之SEQ ID NO: 6，但本發明尤其係關於其中相同CDR不能在抗體中出現兩次的人類化抗體或其片段。

在其他實施例中，本發明係關於人類化抗體或其片段，其包含整合至源自人類或靈長類之構架區中的肽，該等肽具有表示重鏈可變區(HCVR)之CDR1的SEQ ID NO: 1、表示重鏈可變區(HCVR)之CDR2的SEQ ID NO: 2及表示重鏈可變區(HCVR)之CDR3的SEQ ID NO: 3；及表示輕鏈可變區(LCVR)之CDR1的SEQ ID NO: 4、表示輕鏈可變區(LCVR)之CDR2的SEQ ID NO: 5及表示輕鏈可變區(LCVR)之CDR3的SEQ ID NO: 6之胺基酸序列。

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

在另一特定實施例中，本發明係關於人類化抗體、重鏈可變區(HCVR)或其片段，其中該人類化抗體、重鏈可變區(HCVR)或其片段包含整合至源自人類或靈長類之重鏈構架區中的至少一種肽，其具有表示重鏈可變區(HCVR)

之 CDR3 的 SEQ ID NO: 3 之胺基酸序列。

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

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

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

另一實施例為人類化抗體或其片段，其包含具有源自人類或靈長類之構架區及至少一種具有選自以下序列組成之群的胺基酸序列之 CDR 的可變區：表示重鏈可變區 (HCVR) 之 CDR1 的 SEQ ID NO: 1，表示重鏈可變區 (HCVR) 之 CDR2 的 SEQ ID NO: 2，及表示輕鏈可變區 (LCVR) 之

CDR1的 SEQ ID NO: 4。

在另一特定實施例中，本發明係關於人類化抗體、輕鏈可變區(LCVR)或其片段，該抗體、輕鏈可變區(LCVR)或其片段包含整合至源自人類或靈長類之重鏈構架區中的至少兩種肽，其具有表示輕鏈可變區(LCVR)之CDR1的 SEQ ID NO: 4及表示輕鏈可變區(HCVR)之CDR2的 SEQ ID NO: 5之胺基酸序列。

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

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

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

表示 CDR3(HCVR)之 SEQ ID NO: 3 的至少一個胺基酸序列；

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

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

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

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

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

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

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

在另一實施例中，本發明係關於嵌合抗體或其片段，或

人類化抗體或其片段，其中表示如SEQ ID NO: 1-6中所示之輕鏈及/或重鏈CDR區的至少1、尤其至少1而不大於5、更尤其至少1而不大於4、甚至更尤其至少1而不大於3、但尤其至少1而不大於2個胺基酸經由保守取代而改變使得抗體保持其全部功能。

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

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

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

本發明尤其係關於輕鏈可變區(LCVR)，其中在如SEQ ID NO: 5所示之CDR2中，Kabat位置53處之Ser經選自由Asn或Thr組成之群的胺基酸殘基、但尤其經Asn置換。

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

在本發明之另一實施例中，提供嵌合抗體或其片段，或

人類化抗體或其片段，其中輕鏈可變區(LCVR)具有與SEQ ID NO: 12及13中分別給出之序列90%、尤其95%、更尤其98%一致的胺基酸序列。

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

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

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

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

在另一實施例中，本發明係關於如本文先前所述的本發明之嵌合抗體或其片段，或人類化抗體或其片段，其中重鏈可變區(HCVR)之至少一個、尤其至少兩個、但尤其三

個 CDR 區具有與 SEQ ID NO: 1-3 中給出之相應 CDR 區 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 一致的胺基酸序列。

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

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

本發明尤其係關於人類化抗體，其中獲自如 SEQ ID NO: 15 所示的重鏈可變區之 KABAT 亞群 V_{HIII} 的人類生殖系 V_H 序列之受體構架序列中的 Kabat 位置 47 之 Trp 經選自由 Leu、正白胺酸、Ile、Val、Met、Ala 及 Phe 組成之群的胺基酸置換，尤其 Leu 及 Ile，但尤其 Leu 置換。

本發明進一步係關於人類化抗體，其中獲自如 SEQ ID NO: 15 所示的重鏈可變區的 KABAT 亞群 V_{HIII} 之人類生殖系 V_H 序列的受體構架序列中 Kabat 位置 94 之 Arg 經選自由 Ser 及 Thr 組成之群的胺基酸置換，而尤其經 Ser 置換。

在另一實施例中，本發明係關於人類化抗體，其中獲自

如 SEQ ID NO: 15所示的重鏈可變區的KABAT亞群V_HIII之人類生殖系V_H序列之受體構架序列中Kabat位置47之Trp經選自由Leu、正白胺酸、Ile、Val、Met、Ala及Phe組成之群的胺基酸，尤其Leu及Ile，而尤其Leu置換，且Kabat位置94之Arg經選自由Ser及Thr組成之群的胺基酸置換、而尤其經Ser置換。

本發明進一步係關於人類化抗體，其中獲自如 SEQ ID NO: 12所示的輕鏈可變區之KABAT亞群V_KII之人類生殖系V_K序列之受體構架序列中Kabat位置45之Gln經選自由Lys、Arg、Gln及Asn組成之群的胺基酸置換，尤其經Lys及Arg，而尤其經Lys置換。

本發明進一步係關於人類化抗體，其中獲自如 SEQ ID NO: 12所示的輕鏈可變區之KABAT亞群V_KII之人類生殖系V_K序列之受體構架序列中Kabat位置50之Leu經選自由Lys、Arg、Gln及Asn組成之群的胺基酸置換，尤其經Lys及Arg，而尤其經Lys置換。

本發明進一步係關於人類化抗體，其中獲自如 SEQ ID NO: 12所示的輕鏈可變區的KABAT亞群V_KII之人類生殖系V_K序列之受體構架序列中Kabat位置87之Tyr經選自由Phe、Leu、Val、Ile及Ala組成之群的胺基酸置換，尤其經Leu及Phe，而尤其經Phe置換。

在另一實施例中，本發明係關於人類化抗體，其中獲自如 SEQ ID NO: 12所示的輕鏈可變區的KABAT亞群V_KII之人類生殖系V_K序列之受體構架序列中Kabat位置53之Asn可

經選自由 Gln、His、Lys 及 Arg 組成之群的胺基酸置換，尤其經 His 及 Gln 置換。

在另一實施例中，本發明係關於人類化抗體，其中獲自如 SEQ ID NO: 15 所示的重鏈可變區之 KABAT 亞群 V_HIII 的人類生殖系 V_H 序列之受體構架序列中 Kabat 位置 47 之 Trp 經選自由 Leu、正白胺酸、Ile、Val、Met、Ala 及 Phe 組成之群的胺基酸置換，尤其經 Leu 及 Ile，而尤其經 Leu 置換置換，且獲自如 SEQ ID NO: 15 所示的重鏈可變區之 KABAT 亞群 V_HIII 的人類生殖系 V_H 序列之受體構架序列中 Kabat 位置 94 之 Arg 經選自由 Ser 及 Thr 組成之群的胺基酸置換，而尤其經 Ser 置換，且獲自如 SEQ ID NO: 12 所示的輕鏈可變區之 KABAT 亞群 V_KII 的人類生殖系 V_K 序列之受體構架序列中 Kabat 位置 87 之 Tyr 經選自由 Phe、Leu、Val、Ile 及 Ala 組成之群的胺基酸置換，尤其經 Leu 及 Phe，而尤其經 Phe 置換。

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

在另一實施例中，本發明係關於人類化抗體，其中獲自如 SEQ ID NO: 15 中所示之重鏈可變區之 KABAT 亞群 V_HIII 的人類生殖系 V_H 序列之受體構架序列中 Kabat 位置 94 之 Arg 經選自由 Ser 及 Thr 組成之群的胺基酸置換，尤其經 Ser 置

換。

在另一實施例中，本發明係關於人類化抗體，其中獲自如 SEQ ID NO: 15 中所示之重鏈可變區之 KABAT 亞群 V_HIII 的人類生殖系 V_H 序列之受體構架序列中 Kabat 位置 47 之 Trp 經 Leu 及 Ile 置換，而尤其經 Leu 置換，且獲自如 SEQ ID NO: 15 中所示之重鏈可變區之 KABAT 亞群 V_HIII 的人類生殖系 V_H 序列之受體構架序列中 Kabat 位置 94 之 Arg 經 Ser 置換。

在另一實施例中，本發明係關於人類化抗體，其中獲自如 SEQ ID NO: 12 中所示之輕鏈可變區之 KABAT 亞群 V_KII 的人類生殖系 V_K 序列之受體構架序列中 Kabat 位置 87 之 Tyr 經 Phe 置換。

在另一實施例中，本發明係關於人類化抗體，其中獲自如 SEQ ID NO: 15 中所示之重鏈可變區之 KABAT 亞群 V_HIII 的人類生殖系 V_H 序列之受體構架序列中 Kabat 位置 47 之 Trp 經 Leu 及 Ile 置換，而尤其經 Leu 置換，且獲自如 SEQ ID NO: 15 中所示之重鏈可變區之 KABAT 亞群 V_HIII 的人類生殖系 V_H 序列之受體構架序列中 Kabat 位置 94 之 Arg 經 Ser 置換，且獲自如 SEQ ID NO: 12 中所示之輕鏈可變區之 KABAT 亞群 V_KII 的人類生殖系 V_K 序列之受體構架序列中 Kabat 位置 87 之 Tyr 經 Phe 置換。

在一特定實施例中，本發明係關於 SEQ ID NO: 12 之輕鏈可變區。

在本發明之另一特定實施例中，提供包含 SEQ ID NO:

12之輕鏈可變區的人類化抗體。

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

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

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

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

在一特定實施例中，本發明係關於SEQ ID NO: 15之重鏈可變區。

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

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

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

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

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

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

詳言之，在介於28°C與40°C、尤其介於32°C與38°C之間的溫度下，更尤其在37°C下與類澱粉單體及/或聚合型可溶類澱粉肽一起培育本發明之抗體歷時24小時至60小時、尤其歷時30小時至50小時、更尤其歷時48小時、而尤其24小時。

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

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

合物向高分子聚合型原纖維之聚集。

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

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

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

根據本發明且如本文所述之抗體與類澱粉樣單體及/或聚合型肽，而尤其與類澱粉形式(1-42)之結合造成單體及/或聚合型類澱粉樣肽向高分子原纖維或長絲之聚集受抑。經由抑制類澱粉樣單體及/或聚合型肽之聚集，根據本發

明之抗體能夠防止或減慢類澱粉斑塊、尤其類澱粉形式(1-42)之形成，已知類澱粉形式(1-42)藉由改變第二構形而變得不溶，且為患病動物或人類之腦中類澱粉斑塊之主要部分。

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

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

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

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

在另一特定實施例中，在介於28°C與40°C、尤其介於32°C與38°C、更尤其37°C之溫度下將本發明之抗體與類澱

粉預成型高分子聚合型類澱粉原纖維或長絲一起共同培育12小時至36小時、尤其18小時至30小時、更尤其24小時。

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

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

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

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

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

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

本發明尤其係關於根據本發明且如本文先前所述之嵌合

抗體或其片段，或人類化抗體或其片段，該抗體與類澱粉單體及/或聚合型可溶類澱粉肽、尤其與諸如A β 單體肽1-39、1-40、1-41或1-42之 β -類澱粉單體肽及/或包含複數個該等A β 單體單元之聚合型可溶 β -類澱粉肽，而尤其與A β_{1-42} 單體及/或包含複數個該等A β_{1-42} 單體單元之A β 聚合型可溶類澱粉肽一起共同培育後，抑制A β 單體向高分子聚合型原纖維或長絲之聚集，且此外，在與藉由類澱粉單體肽、尤其諸如A β 單體肽1-39、1-40、1-41或1-42之 β -類澱粉單體肽，而尤其A β_{1-42} 單體肽聚集所形成之預成型高分子聚合型類澱粉原纖維或長絲一起培育後，能夠將預成型聚合型原纖維或長絲解聚。

在另一態樣中，本發明係關於根據本發明且如本文先前所述之嵌合抗體或其片段，或人類化抗體或其片段，該抗體能夠誘導 β 摺疊構形向 α -螺旋及/或無規捲曲構形、尤其無規捲曲構形、甚至更尤其在分子中尤其在A β 蛋白之Tyr 10及Val 12之環境中所給位置處的無規捲曲構形之轉變，其在損耗 β 摺疊構形的情況下使得無規捲曲構形增加且使得預成型高分子聚合型類澱粉原纖維或長絲之溶解得以改善。詳言之，與在緩衝液中培育之個別預成型類澱粉聚合型原纖維或長絲(對照)相比， β 摺疊構形減少合計至少30%、尤其至少35%、且更尤其至少40%及更多。

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

在本發明之另一實施例中，係提供根據本發明及如本文先前所述之嵌合抗體或其片段，或人類化抗體或其片段，其包含至少一個輕鏈或其片段或至少一個重鏈或其片段，其中該抗體或片段以至少約 1×10^{-7} 至至少約 1×10^{-12} 、尤其至少約 1×10^{-8} 至至少約 1×10^{-11} 、更尤其至少約 1×10^{-9} 至至少約 1×10^{-10} 、甚至更尤其至少約 1×10^{-8} 至至少約 2×10^{-8} 的結合親和力與 A β 單體結合，但較佳地不會呈現與類澱粉前驅蛋白 (APP) 具有任何顯著交叉反應性。

在本發明之另一實施例中，提供根據本發明及如本文中先前所描述之嵌合抗體或其片段，或人類化抗體或其片段，其包含至少一個輕鏈或其片段或至少一個重鏈或其片段，其中該抗體或片段以至少約 1×10^{-7} 至至少約 1×10^{-12} 、尤其至少約 1×10^{-8} 至至少約 1×10^{-11} 、更尤其至少約 1×10^{-9} 至至少約 1×10^{-10} 、甚至更尤其至少約 2×10^{-9} 至至少約 5×10^{-9} 的結合親和力與 A β 纖維、原纖維或長絲結合，但較佳地不會呈現與類澱粉前驅蛋白 (APP) 具有任何顯著交叉反應性。

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

在另一實施例中，提供如本文先前所述之嵌合抗體或其片段，或人類化抗體或其片段，該抗體大體上可結合至哺乳動物 (尤其是人腦) 中包括 A β 斑塊之經聚集 A β ，但較佳地

不會呈現與類澱粉前驅蛋白 (APP) 具有任何顯著交叉反應性。

在本發明之另一態樣中，提供如本文先前所述之嵌合抗體或其片段，或人類化抗體或其片段，該抗體大體上可結合至哺乳動物 (尤其是人腦) 中的可溶聚合型類澱粉 (尤其是包括 $A\beta$ 單體之類澱粉 $\beta(A\beta)$)，但較佳地不會呈現與類澱粉前驅蛋白 (APP) 具有任何顯著交叉反應性。

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

經由此穩定活性，本發明之抗體能夠中和組織及/或體液中聚合型及較低聚集度之可溶性類澱粉蛋白、尤其類澱粉 $\beta(A\beta)$ 蛋白的毒性作用。在本發明之一特定實施例中，本發明之抗體可因此在不必結合腦中聚集之類澱粉 β 的情況下實現其有利作用。

在本發明之另一態樣中，提供根據本發明且如本文先前

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

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

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

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

片段包含具有改變之效應功能的Fc區。

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

在本發明之另一實施例中，該組合物包含治療有效量之抗體。

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

詳言之，本發明係關於一種混合物，其中其他生物活性物質為用於類澱粉變性、一組與諸如涉及阿茲海默氏症之A β 蛋白的類澱粉或類澱粉樣蛋白相關之疾病及病症之藥療法的化合物。

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

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

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

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

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

組成之群的混合物。

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

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

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

其他可適當地以與根據本發明之抗體組合之混合物來使用的化合物係描述於WO 2004/058258(參見尤其第16及17頁)中，其包括治療藥物目標(第36-39頁)、鏈烷磺酸及烷醇硫酸(第39-51頁)、膽鹼酯酶抑制劑(第51-56頁)、NMDA受體拮抗劑(第56-58頁)、雌激素(第58-59頁)、非類固醇消炎藥物(第60-61頁)、抗氧化劑(第61-62頁)、過氧化體增殖

劑活化受體(PPAR)促效劑(第63-67頁)、膽固醇降低劑(第68-75頁);類澱粉抑制劑(第75-77頁)、類澱粉形成抑制劑(第77-78頁)、金屬螯合劑(第78-79頁)、抗精神病及興奮劑(第80-82頁)、營養補充劑(第83-89頁)及增加生物活性物質在腦中之利用度的化合物(參見第89-93頁)及前藥(第93及94頁),其文獻以引用的方式併入本文中。

在另一實施例中,本發明係關於包含治療有效量的抗體、尤其本發明之單株抗體、但尤其根據本發明且如本文先前所述之嵌合抗體或其片段或人類化抗體或其片段及/或生物活性物質的混合物。

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

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

本發明進一步包含用於防止、治療或減輕類澱粉變性、一組與類澱粉斑塊形成相關之包括繼發性類澱粉變性及年齡相關類澱粉變性的疾病及病症之影響的方法，諸如包括(但不限於)以下之疾病：神經性病症，諸如阿茲海默氏症(AD)、路易體性癡呆、唐氏綜合症、具有類澱粉變性(荷蘭類型)之遺傳性腦出血；關島帕金森-癡呆複合症；以及其他基於或與類澱粉樣蛋白相關的疾病，諸如進行性核上

眼神經麻痺症、多發性硬化；庫賈氏病、帕金森氏病、HIV相關性癡呆、ALS(肌萎縮性側索硬化)、成年發病型糖尿病；老年心臟類澱粉變性；內分泌腫瘤及包括黃斑退化之其他疾病，該方法藉由向患該病症之動物或人類投與抗體及/或其功能部分、但尤其人類化抗體及/或其功能部分或包含該抗體及/或其功能部分之組合物或混合物，該方法包含投與治療有效量之抗體。

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

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

本發明之另一目標提供治療組合物及製備該組合物之方法以及使用根據本發明且如本文先前所述之抗體來治療以下各病的方法：類澱粉變性、一組與類澱粉斑塊形成相關之包括繼發性類澱粉變性及年齡相關類澱粉變性(包括(但不限於)神經性病症，諸如阿茲海默氏症(AD))的疾病及病症、尤其特徵在於認知記憶容量喪失之疾病或病狀。

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

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

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

(b) 使抗體及/或其功能部分與類澱粉蛋白結合以形成免疫複合體；

(c) 偵測該免疫複合體之形成；及

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

亦包含測定組織及/或體液中類澱粉樣斑塊負擔之程度的方法，其包含：

(a) 獲得表示研究中之組織及/或體液之樣品；

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

(c) 確定與蛋白結合之抗體之量；及

(d) 計算組織及/或體液中之斑塊負擔。

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

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

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

在另一態樣中，本發明提供使用如本文所述進一步包含變異Fc區之免疫球蛋白預防、治療或偵測與類澱粉變性相關之疾病的方法及組合物，其中該變異Fc區包含至少一個相對於野生型Fc區之胺基酸修飾。Fc區介導抗體或其片段之效應功能。藉由調節抗體或其片段之Fc部分結合或活化其受體之能力，可能消除或增強抗體或其片段之效應功能。

因此，在另一態樣中，本發明提供進一步包含變異Fc區

的本發明之抗體或其片段，該變異Fc區包含至少一個減弱效應功能之胺基酸突變。在一該態樣中，該至少一個胺基酸突變減少抗體或其片段之糖基化。在另一該態樣中，該至少一個胺基酸突變減少與同源Fc受體之結合。在另一該態樣中，該至少一個胺基酸突變降低結合抗體或其片段後同源Fc受體之活化。在一該態樣中，變異Fc區為變異IgG1 Fc區。在一該態樣中，抗體或其片段在Fc區中包含D265A突變。

在另一態樣中，本發明提供進一步包含變異Fc區的本發明之抗體或其片段，該變異Fc區包含至少一個增強效應功能之胺基酸突變。在一該態樣中，該至少一個胺基酸突變增加抗體或其片段之糖基化。在另一該態樣中，該至少一個胺基酸突變增加與同源Fc受體之結合。在另一該態樣中，該至少一個胺基酸突變增加結合抗體或其片段後同源Fc受體之活化。

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

【實施方式】

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

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

用語"由類澱粉或類澱粉樣蛋白所致或與其相關之疾病及病症"包括(但不限於)由以單體、原纖維或聚合態或該三

種之任一組合的類澱粉樣蛋白的存在或其活性所致的疾病及病症。該等疾病及病症包括(但不限於)類澱粉變性、內分泌腫瘤及黃斑退化。

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

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

"聚合型可溶類澱粉"係指形成在哺乳動物或人體中、更尤其在腦中可溶之寡聚或聚合型結構之類澱粉肽或類澱粉樣肽或經修飾或截短之類澱粉肽或類澱粉肽之其他衍生物的多重聚集單體，但尤其係指類澱粉 β (A β)或經修飾或截短之類澱粉 β (A β)肽或其衍生物之多重聚集單體，其在哺

乳動物或人體中、更尤其在腦中可溶。

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

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

"經分離"意謂不含至少某些天然存在之組份的生物分子。

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

球蛋白可為免疫球蛋白分子之任何種類(IgG、IgM、IgD、IgE、IgA及IgY)或亞類(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2)。

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

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

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

意欲在本發明範疇內之"抗體"包括單株抗體、多株抗體、嵌合抗體、單鏈抗體、雙特異性抗體、猿化抗體、人類及人類化抗體以及其活性片段。與已知抗原結合的分子活性片段之實例包括經分離之輕鏈及重鏈、Fab、Fab/c、Fv、Fab'及F(ab')₂片段，包括上述抗體及片段中之任一者的Fab免疫球蛋白表現文庫及抗原決定基結合片段之產物。

該等活性片段可藉由若干技術源自於本發明之抗體。例如，單株抗體可經諸如胃蛋白酶之酶裂解且經受HPLC凝膠過濾。可隨後收集含有Fab片段之適當部分且藉由膜過濾及其類似方法來濃縮。對於抗體之活性片段之分離的通用技術之進一步描述參看實例Khaw, B. A.等人。J. Nucl. Med. 23:1011-1019 (1982)；Rousseaux等人。Methods Enzymology, 121:663-69, Academic Press, 1986。

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

見，例如美國專利第 5,091,513 號、第 5,132,405 號及第 4,956,778 號。

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

可使用在此項技術中熟知之方法確定構成結合位點之特定抗體中胺基酸殘基之身份。例如，抗體 CDR 可經鑑別為最初由 Kabat 等人 (參見 "Sequences of Proteins of Immunological Interest" E. Kabat 等人，美國衛生和人類服務部 (U.S. Department of Health and Human Services); Johnson, G 及 Wu, TT (2001) Kabat Database and its applications: future directions. Nucleic Acids Research, 29: 205-206; <http://immuno.bme.nwa.edu>) 定義之高變區。CDR 之位置亦可經鑑別為最初由 Chothia 及其他人描述之結構性環結構 (參見 Chothia 及 Lesk, J. Mol. Biol. 196, 901 (1987), Chothia 等人, Nature 342, 877 (1989) 及 Tramontano 等人, J. Mol. Biol. 215, 175 (1990))。其他方法包括 "AbM 定義"，

其為 Kabat 與 Chothia 之折衷，且使用 Oxford Molecular 之 AbM 抗體模型軟體 (目前 Accelrys) 獲得，或包括 Macallum 等人 ("Antibody-antigen interactions: contact analysis and binding site topography" J Mol Biol. 1996 Oct 11; 262 (5) : 732-45) 之 CDR 之 "接觸定義"。下表基於各種已知定義來鑑別 CDR。

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

可單獨自序列鑑別抗體中之 CDR 的通用準則係如下：

LCDR1：

起始 - 大約殘基 24。

之前的殘基始終為 Cys。

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

長度為 10 至 17 個殘基。

LCDR2：

起始 - L1 末端後之 16 個殘基。

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

長度通常為 7 個殘基。

LCDR3 :

起始-通常L2之33個殘基。

之前的殘基為Cys。

之後的序列為PHE-GLY-X-GLY。

長度為7至11個殘基。

HCDR1 :

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

之前的序列為CYS-X-X-X。

之後的殘基為TRP，其後通常為VAL，但其後亦可為ILE
或ALA。

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

HCDR2 :

起始-CDR-H1之Kabat/AbM定義之末端後的15個殘基。

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

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

在Kabat定義下(AbM定義結束先前之7個殘基)長度為16至
19個殘基。

HCDR3 :

起始-CDR-H2(CYS後之兩個殘基)之末端後的33個殘基。

之前的序列為CYS-X-X(通常CYS-ALA-ARG)。

之後的序列為 TRP-GLY-X-GLY。

長度為 3 至 25 個殘基。

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

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

5,639,641號)等之方法製備嵌合及人類化抗體。

如本文中所用，在兩鏈抗體之情況下，"人類化抗體"為其中至少一個鏈經人類化者。人類化抗體鏈具有其中一或多個構架區來自人類之可變區。為單鏈之人類化抗體為其中該鏈具有可變區者，該可變區中一或多個構架區來自人類。人類化抗體鏈或其片段之可變區之非人類部分係源自於非人類來源、尤其非人類抗體、通常齧齒動物來源。對人類化抗體之非人類貢獻通常以至少一間置在衍生自一(或多個)人免疫球蛋白的構架區中的CDR區域之形式提供。另外，可改變構架支撐殘基以保存結合親和力。

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

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

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

[*以上述定義替換此處之部分]

如本文中所用，術語恆定區(CR)係指免疫球蛋白之恆定區基因。恆定區基因編碼賦予效應功能之抗體分子之部

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

使用術語"Fc區"定義免疫球蛋白重鏈之C末端區。"Fc區"可為原生序列Fc區或變異Fc區。儘管免疫球蛋白重鏈之Fc區的邊界可變，但人類IgG重鏈Fc區通常經定義以自位置Cys226之胺基酸殘基或自Pro230伸展至其羧基末端。免疫球蛋白之Fc區通常包含兩個恆定域CH2及CH3。

"功能Fc區"具有原生序列Fc區的"效應功能"。例示性"效應功能"包括C1q結合；補體依賴型細胞毒性；Fc受體結合；抗體依賴型細胞介導之細胞毒性(ADCC)；吞噬作用；細胞表面受體(例如B細胞受體，BCR)之下調等等。該等效應功能通常要求Fc區與結合域(例如抗體可變域)組合，且可使用(例如)本文揭示之各種檢定來評估。功能Fc區通常包括兩個重鏈CH2及CH3，其含有相接合之多肽。

"原生序列Fc區"包含與自然界中所發現的Fc區及其天然

存在變異體之胺基酸序列一致的胺基酸序列。

"變異Fc區"由於至少一個如本文所定義之"胺基酸修飾"而包含與原生序列Fc區的胺基酸序列不同之胺基酸序列。較佳地，與原生序列Fc區或與母體多肽之Fc區相比，變異Fc區具有至少一個胺基酸取代，例如在原生序列Fc區或在母體多肽之Fc區中約1個至約10個胺基酸取代，且較佳約1個至約5個胺基酸取代。本文之變異Fc區較佳將與原生序列Fc區及/或與母體多肽之Fc區具有至少約80%之同源性；且最佳與其具有至少約90%之同源性，更佳與其具有至少約95%之同源性。

"胺基酸修飾"係指預定胺基酸序列之胺基酸序列變化。例示性修飾包括胺基酸取代、插入及/或缺失。本文之較佳胺基酸修飾為取代。

例如，Fc區之特定位置處的"胺基酸修飾"係指特定殘基之取代或缺失，或鄰近於特定殘基的至少一個胺基酸殘基之插入。"鄰近於"特定殘基之插入意謂在其一至兩個殘基內之插入。插入可在特定殘基之N末端或C末端。

"胺基酸取代"係指預定胺基酸序列中至少一個現有胺基酸殘基經另一不同"置換"胺基酸殘基之置換。該或該等置換殘基可為"天然存在之胺基酸殘基"(亦即由遺傳密碼編碼)且選自由以下各物組成之群：丙胺酸(Ala)；精胺酸(Arg)；天冬醯胺(Asn)；天冬胺酸(Asp)；半胱胺酸(Cys)；麩胺醯胺(Gln)；麩胺酸(Glu)；甘胺酸(Gly)；組胺酸(His)；異白胺酸(Ile)；白胺酸(Leu)；離胺酸(Lys)；甲硫

胺酸(Met)；苯丙胺酸(Phe)；脯胺酸(Pro)；絲胺酸(Ser)；蘇胺酸(Thr)；色胺酸(Trp)；酪胺酸(Tyr)及纈胺酸(Val)。較佳地，置換殘基不為半胱胺酸。本文中胺基酸取代之定義亦涵蓋以一或多個非天然存在之胺基酸殘基進行的取代。

"非天然存在之胺基酸殘基"係指除上文所列彼等天然存在之胺基酸殘基以外的殘基，其能夠共價結合多肽鏈中之相鄰胺基酸殘基。非天然存在之胺基酸殘基之實例包括正白胺酸、鳥胺酸、正纈胺酸、高絲胺酸及其他胺基酸殘基類似物，諸如彼等描述於Ellman等人Meth. Enzym. 202:301-336 (1991)中者。為產生此等非天然存在之胺基酸殘基，可使用Noren等人Science 244:182 (1989)及前述Ellman等人之程序。簡言之，此等程序包括以非天然存在之胺基酸殘基化學上活化抑制基因tRNA，接著活體外轉錄且轉譯RNA。

"胺基酸插入"係指將至少一個胺基酸併入預定胺基酸序列中。儘管插入通常將由插入一或兩個胺基酸殘基組成，但本申請案涵蓋較大型"肽插入"，例如插入約3至約5個或甚至多達約10個胺基酸殘基。如上文所揭示，插入之殘基可天然存在或非天然存在。

"胺基酸缺失"係指由預定胺基酸序列移除至少一個胺基酸殘基。

"抗體依賴型細胞介導之細胞毒性"或"ADCC"係指結合至由目標細胞所表現的目標抗原之所分泌抗體由存在於某

些細胞毒性細胞(例如，天然殺傷(NK)細胞、嗜中性白血球及巨噬細胞)上的Fc受體(FcR)識別，使得此等細胞毒性效應細胞能夠特異性結合以識別抗體塗佈之目標細胞且隨後以細胞毒素殺死目標細胞的細胞毒性形式。用於調節ADCC、NK細胞之初級細胞僅表現Fc.γ.RIII，而單核細胞表現Fc.γ.RI、Fc.γ.RII及Fc.γ.RIII。造血細胞上之FcR表現係概括於Ravetch及Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991)之第464頁表3中。為評估所關注之分子之ADCC活性，可進行諸如描述於美國專利第5,500,362號或第5,821,337號中之活體外ADCC檢定。用於此檢定之適用之效應細胞包括周邊血液單核細胞(PBMC)及天然殺傷(NK)細胞。或者或另外，可(例如)在諸如揭示於Clynes等人 *PNAS (USA)* 95:652-656 (1998)中之動物模型中活體內評估所關注之分子之ADCC活性。

"免疫效應細胞"為表現一或多個FcR且進行效應功能之白血球。較佳地，細胞至少表現Fc.γ.RIII且進行ADCC效應功能。介導ADCC的人類白血球之實例包括周邊血液單核細胞(PBMC)、天然殺傷(NK)細胞、單核細胞、細胞毒性T細胞及嗜中性白血球，以PBMC及NK細胞為較佳。可自原生來源分離效應細胞，例如如本文所述自血液或PBMC分離。

"補體依賴型細胞毒性"或"CDC"係指已由與由目標細胞所表現之抗原具有反應性的抗體結合的目標細胞之補體依賴型溶胞。藉由將補體系統(C1q)之第一組份結合至(適當

子類之)與同源抗原結合之抗體啟始經典補體途徑之活化。為評估補體活化，例如如 Gazzano-Santoro 等人，J. Immunol. Methods 202:163 (1996)中所述，可進行 CDC 檢定。

具有變異 IgG Fc(具有"改變"之 FcR 結合親和力或 ADCC 活性)之多肽為與親本多肽或與包含原生序列 Fc 區之多肽相比，具有增強或降低之 FcR 結合活性(Fc.γ.R 或 FcRn)及/或 ADCC 活性的多肽。對 FcR"顯示提高之結合"的變異 Fc 以比親本多肽更佳之親和力結合至少一個 FcR。與親本多肽相比結合之提高可為結合提高約 3 倍、較佳約 5、10、25、50、60、100、150、200、多達 500 倍，或約 25% 至 1000%。對 FcR"顯示降低之結合"的多肽變異體以比親本多肽更差之親和力結合至少一個 FcR。與親本多肽相比結合下降可為結合下降約 40% 或 40% 以上。該等對 FcR 顯示降低之結合的 Fc 變異體對 FcR 可具有極少或無可估計之結合，例如如本文之實例中所測定，例如與原生序列 IgG Fc 區相比對 FcR 有 0-20% 結合。

包含變異 Fc 區之"顯示提高之 ADCC"或在人類效應細胞存在下比具有野生型 IgG Fc 之多肽更有效地介導抗體依賴型細胞介導之細胞毒性(ADCC)的多肽為當用於檢定的具有變異 Fc 區之多肽及具有野生型 Fc 區之多肽之量基本上相同(所有其他因素均相同)時，活體外或活體內實質上更有效調節 ADCC 之多肽。通常，將使用活體外 ADCC 檢定鑑別該等變異體，但涵蓋用於例如在動物模型等中確定

ADCC活性之其他檢定或方法。較佳變異體比野生型Fc約5倍至約100倍，例如約25至約50倍更有效地調節ADCC。

在此項技術中亦充分認可術語"單株抗體"且係指為單選殖之抗體產生細胞的產物之抗體。通常藉由將通常短期、抗體產生B細胞與諸如癌細胞(有時稱為"永生"細胞)之快速生長細胞融合來製造單株抗體。所得雜交細胞或融合瘤快速繁殖，得到產生抗體之純系。

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

在本發明之範疇內"功能等效抗體"應理解為係指大體上與上述且本文中所描述之抗體共有至少一種主要功能特性的抗體，該功能特性包含：當預防地或治療地投與時，與 β -類澱粉蛋白、尤其與 $A\beta_{1-42}$ 蛋白、且更尤其與 $A\beta_{1-42}$ 蛋白之16-21抗原決定基區的結合特異性；活體外免疫反應性；抑制 $A\beta_{1-42}$ 單體向高分子聚合型原纖維之聚集；及/或預成型 $A\beta_{1-42}$ 聚合型原纖維之解聚作用；及/或 β 摺疊破壞特性；及減輕類澱粉變性、一組與類澱粉斑塊形成相關的包括繼發性類澱粉變性及年齡相關類澱粉變性之疾病及病症之作用，諸如包括(但不限於)以下之疾病，神經性病變，諸如阿茲海默氏症(AD)、路易體性癡呆、唐氏綜合症、具有類澱粉變性(荷蘭類型)之遺傳性腦出血；關島帕金森癡呆複合症；以及其他基於或與類澱粉樣蛋白相關之疾病，諸如進行性核上眼神經麻痺症、多發性硬化；庫賈氏病、帕金森氏病、HIV相關性癡呆、ALS(肌萎縮性側索

硬化)、成年發病型糖尿病；老年心臟類澱粉變性；內分泌腫瘤及包括黃斑退化之其他疾病。該等抗體可為任何種類，諸如IgG、IgM或IgA等，或任何亞類，諸如IgG1、IgG2a等，及本文中上文提及或在此項技術中已知之其他亞類，但尤其IgG4類。此外，可藉由諸如噬菌體呈現之任何方法產生抗體，或在任何生物體或細胞株中產生，包括細菌、昆蟲、哺乳動物或產生諸如人類化抗體之具有所需特徵的抗體之其他類型之細胞或細胞株。該等抗體亦可藉由組合不同物種之Fab部分及Fc區來形成。

如所用之術語"雜交"係指習知雜交條件，較佳5×SSPE、1% SDS、1×Denhardts溶液用作溶液及/或雜交溫度介於35°C與70°C之間，較佳為65°C的雜交條件。雜交後，較佳首先以2×SSC、1% SDS且隨後以0.2×SSC在介於35°C與70°C之間的溫度下、較佳在65°C下進行洗滌(關於SSPE、SSC及Denhardts溶液之定義，參見在上述引文中之Sambrook等人)。例如描述於上文Sambrook等人之嚴格雜交條件尤其較佳。若雜交及洗滌發生在如上所指出之65°C下，則存在(例如)尤其較佳之嚴格雜交條件。例如在45°C下進行之雜交及洗滌的非嚴格雜交條件為次佳且在35°C下之非嚴格雜交條件為甚至更次佳。

藉由序列一致性測定兩個序列之間的"同源性"。若待彼此比較之兩個序列長度不同，則序列一致性較佳係關於與較長序列之核苷酸殘基相同的較短序列之核苷酸殘基的百分數。可藉助於諸如Bestfit程式(Wisconsin Sequence

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

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

"雙特異性"或"雙功能抗體"為具有兩個不同重鏈/輕鏈對及兩個特定結合位點之人工雜交抗體。可藉由包括融合瘤融合或Fab'片段鍵聯之多種方法產生雙特異性抗體。參見

例如 Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321 (1990); Kostelny 等人, J. Immunol. 148, 1547-1553 (1992)。

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

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

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

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

如本文中所用，術語"可溶性"意謂部分或完全溶解於水溶液中。

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

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

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

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

大體上保留親本抗體之結合特性的人類化抗體係指保留特異性結合由用以產生人類化抗體之親本抗體所識別的抗原之能力的該人類化抗體。人類化抗體較佳將顯示親本抗體的相同或大體上相同之抗原結合親和力及結合性。理想地，抗體之親和力將不低於親本抗體親和力之10%、更佳

不低於約30%且最佳親和力將不低於親本抗體之50%。用於檢定抗原結合親和力之方法為在此項技術中所熟知且包括半最大結合檢定、競爭檢定及Scatchard分析。合適之抗原結合檢定係描述於本申請案中。

"回復突變"為引入編碼人類化抗體之核苷酸序列中之突變，該突變得到對應於親本抗體(例如供體抗體，例如鼠類抗體)之胺基酸的胺基酸。在本發明之抗體人類化期間可保留親本抗體之某些構架殘基，以大體上保留親本抗體之結合特性，而同時將所得抗體之潛在免疫原性最小化。在本發明之一實施例中，親本抗體為小鼠來源。例如，回復突變將人類構架殘基改變成親本鼠類殘基。可回復突變之構架殘基之實例包括(但不限於)規範殘基、介面包裝殘基、靠近結合位點之異常親本殘基、"微調區(Vernier Zone)"之殘基(其形成CDR保持之平台)(Foote & Winter, 1992, J. Mol. Biol. 224, 487-499)，及彼等接近CDR H3者。

如本文中所用，"保守變化"係指以下變化：與天然蛋白質相比，大體上構形或抗原中性，分別產生突變體多肽之三級結構之最小變化，或產生突變體多肽之抗原決定子之最小變化。當提及本發明之抗體及抗體片段時，保守變化意謂並未使抗體無法結合本發明之受體的胺基酸取代。一般熟習此項技術者將能預測可在保持高構形及抗原中性之可能性的情況下進行胺基酸取代。在(例如)Berzofsky (1985) Science 229:932-940及Bowie等人(1990) Science

247:1306-1310中提供該等準則。認為影響保持構形及抗原中性之可能性的因素包括(但不限於)：(a)疏水性胺基酸取代不太可能影響抗原性，此係由於疏水性殘基更可能位於蛋白質內部；(b)物理化學類似之胺基酸取代不太可能影響構形，此係由於經取代之胺基酸在結構上模擬原生胺基酸；且(c)進化保守序列之改變可能不利地影響構形，由於此保守暗示胺基酸序列可能具有功能重要性。一般熟習此項技術者將能夠使用熟知檢定及經由使用構形依賴型單株抗體(Lewis等人(1983) Biochem. 22:948-954)之結合研究來評估蛋白質構形之變化，該等檢定係諸如(但不限於)微量補體結合法(Wasserman等人(1961) J. Immunol. 87:290-295；Levine等人(1967) Meth. Enzymol. 11:928-936)。

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

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

人類化抗體之構築

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

本發明提供新穎方法及包含具有特異性地識別且與一系列 β -類澱粉抗原之特定抗原決定基結合之能力的高度特異性及高效抗體之組合物。本發明之教示能夠實現之抗體尤

其適用於治療類澱粉變性，一組與類澱粉斑塊形成相關的疾病及病症，其包括繼發性類澱粉變性及年齡相關之類澱粉變性，包括(但不限於)神經性病症，諸如阿茲海默氏症(AD)、路易體性癡呆、唐氏綜合症、具有類澱粉變性(荷蘭類型)之遺傳性腦出血；關島帕金森癡呆複合症；以及基於或與如類澱粉之蛋白相關的其他疾病，諸如進行性核上眼神經麻痺症、多發性硬化；庫賈氏病、具有類澱粉變性荷蘭類型之遺傳性腦出血、帕金森氏病、HIV相關性癡呆、ALS(肌萎縮性側索硬化)、成年發病型糖尿病；老年心臟類澱粉變性；內分泌腫瘤及包括黃斑退化之其他病症等等。

在本發明之範疇內可藉由首先設計含有嵌入人類衍生之構架序列中之非人類、尤其齧齒動物衍生之CDR、但尤其衍生自鼠類抗體ACI-01-Ab7C2(本申請案通篇中稱作"mC2"且由"德國微生物菌種保藏中心(DSMZ)"於Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig依據布達佩斯條約之條款於2005年12月1日寄存，且給予寄存編號DSM ACC2750)的CDR之可變區胺基酸序列來產生根據本發明之充分人類化或重塑之可變區。可獲自根據本發明之抗體的非人類、尤其齧齒動物衍生之CDR提供所需特異性。因此，該等殘基基本上不變地包括於重塑可變區之設計中。因此任何修飾應均應限制在最小且密切觀察抗體特異性及親和力之改變。另一方面，理論上構架殘基可獲自任何人類可變區。

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

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

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

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

"德國菌種保藏中心"(DSMZ)於Braunschweig,

Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig 依據布達佩斯條約之條款於2005年12月1日寄存同在申請中之申請案第EP05027092.5號之產生小鼠單株抗體ACI-01-Ab7C2(在整個申請案中對於人類化C2抗體稱為"mC2"及hC2)的融合瘤細胞FP-12H3-C2，且給予寄存編號DSM ACC2750。

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

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

其他化合物共價結合以(例如)將抗原構築體嵌入脂質體之雙分子層中。

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

CDR含有最可能結合抗原之殘基且其必須保留於重塑抗體中。由根據Kabat等人，Sequence of Proteins of Immunological Interest，第五版，The United States Department of Health and Human Services, The United States Government Printing Office, 1991之序列定義CDR。CDR屬於正準類(Chothia等人，1989 Nature, 342, 877-883)，其中關鍵殘基在大程度上決定CDR環之結構構形。該等殘基幾乎總保留於重塑抗體中。

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

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

V_K 序列之比較展示亞群 V_{KII} 之基因為 C2 V_K 之最佳配合 (Cox 等人, 1994)。C2 V_K 因此可歸為 Kabat 亞群 MuV_{KII} 序列。

可選擇 DPK15 與人類 J 區 HuJ_{K1} 以提供人類化 V_K 之受體構架序列。

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

因此人類化 V_K 序列可經設計使得 C2 HuV_{K1} 由具有來自 DPK 15 及人類 J_{K1} 之構架的小鼠 C2 V_K CDR 組成。在本發明之一特定實施例中, 人類構架區中鼠類殘基可在位置 45 及/或 87, 及/或 50 及/或 53 處經取代。殘基 45 可與支撐 CDR 之構形有關。殘基 87 係位於 V_H 與 V_K 域之介面處。因此, 該等殘基對於維持抗體結合可為關鍵的。

C2 V_H AF 之最接近匹配小鼠生殖系基因為 $VH7183$ 、基因座 AF120466 (Langdon 等人, 2000)。與人類生殖系 V_H 序列比較展示亞群 V_{HIII} 之基因為 C2 V_H 之最佳配合。C2 V_H AF 可歸為 Kabat 亞群 MuV_{HIIID} 。可選擇序列 DP54 與人類 J 區 HuJ_{H6} 以提供人類化 V_H 之受體構架序列。

比較展示在 C2 V_H 序列與人類受體生殖系序列 DP54 及 J_{H6} 之間存在 9 個胺基酸差異, 多數位於 CDRH2 中。發現具

有相同或類似(一個殘基不同)CDRH1或具有類似CDRH2(一個殘基不同)之成熟鼠類抗體，但具有所有三個CDR之抗體中無一與C2 V_H AF相同。C2抗體之CDRH3為顯著短的，其僅由三個殘基組成。然而，發現數據庫中之其他抗體具有該長度之CDRH3。C2 V_H之殘基47為Leu而非更常見之Trp，且殘基94為Ser而非常見之Arg，指示此等構架殘基對於抗體活性而言可為重要的。

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

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

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

因此，人類構架區中之鼠類殘基可經取代。尤其，重鏈可變區(HCVR)之人類構架區中位置47或94或兩者處及輕鏈可變區(LCVR)之人類構架區中位置45及/或87處，及/或50及/或53處之鼠類殘基可分別經取代。

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

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

在本發明之另一實施例中，人類化抗體中之兩種殘基可經置換。

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

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

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

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

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

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

中。

突變Fc區

本發明提供用於製備多肽變異體、尤其包含變異體區之抗體的方法。可使用該包含(例如)變異體Fc區之抗體來治療諸如類澱粉變性之疾病或病症。

使用此項技術中對於產生包含(例如)Fc區之多肽可用之技術製備"母體"、"起始"或"非變異體"多肽。在本發明之一較佳實施例中，親本多肽為抗體且在以下部分中更詳細地描述用於產生抗體之例示性方法。然而，親本多肽可為包含Fc區之任一其他多肽，例如免疫黏附素。下文更詳細地詳述用於製備免疫黏附素之方法。

在一替代實施例中，可根據本文中揭示之方法產生變異Fc區，且可將此"變異Fc區"融合至所選異源多肽，諸如受體或配位體之抗體可變域或結合域。

親本多肽包含Fc區。通常，親本多肽之Fc區將包含原生序列Fc區，且較佳地人類原生序列Fc區。然而，親本多肽之Fc區可具有一或多個自原生序列Fc區之預先存在之胺基酸序列改變或修飾。舉例而言，Fc區之C1q結合活性可能先前已改變(下文更詳細地描述其他類型之Fc區修飾)。在另一實施例中，親本多肽Fc區為"概念上的"，且儘管其在物理上並不存在，但抗體工程可決定所需變異Fc區胺基酸序列且產生包含彼序列之多肽或編碼所需變異Fc區胺基酸序列的DNA。

然而，在本發明之一較佳實施例中，編碼親本多肽之Fc

區的核酸可用且此核酸序列經改變以產生編碼Fc區變異D265A之變異體核酸序列。

藉由多種此項技術中已知之方法製備編碼起始多肽之胺基酸序列變異體之DNA。此等方法包括(但不限於)藉由先前製備之編碼多肽的DNA之定點(或寡核苷酸介導之)誘變、PCR誘變及卡匣誘變進行製備。

定點誘變為用於製備取代變異體之較佳方法。在此項技術中熟知此技術(參見, 例如Carter等人 *Nucleic Acids Res.* 13:4431-4443 (1985)及Kunkel等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488 (1987))。簡言之, 在進行DNA之定點誘變時, 藉由首先將編碼所需突變之寡核苷酸雜交至該起始DNA之單股來改變該起始DNA。雜交後, 使用雜交寡核苷酸作為引子且使用單股起始DNA作為模板將DNA聚合酶用於合成整個第二股。因此, 將編碼所需突變之寡核苷酸併入所得雙股DNA中。

PCR誘變亦適用於製備起始多肽之胺基酸序列變異體。參見Higuchi, 於PCR Protocols, 第177-183頁(Academic Press, 1990)中及Vallette等人, *Nuc. Acids Res.* 17:723-733 (1989)。簡言之, 當少量模板DNA用作PCR中之起始材料時, 可使用在序列上稍微不同於模板DNA之對應區的引子來產生相對大量僅在引子不同於模板之位置處與模板序列不同的特異性DNA片段。

另一製備變異體之方法, 卡匣誘變係基於Wells等人, *Gene* 34:315-323 (1985)描述之技術。起始材料為包含待突

變之起始多肽DNA的質體(或其他載體)。鑑別待突變的起始DNA中之密碼子。經鑑別之突變位點之各側上必須存在獨特限制性核酸內切酶位點。若該等限制性位點不存在，則可使用上述寡核苷酸介導之誘變方法在起始多肽DNA中在適當位置處將其引入而使其產生。在此等位點處切割質體DNA以使其線性化。使用標準程序合成編碼限制性位點之間的DNA序列但含有所需突變的雙股寡核苷酸，其中使用標準技術分別合成寡核苷酸之兩股且隨後將其雜交在一起。此雙股寡核苷酸係稱為卡匣。此卡匣經設計以具有與線性化質體之末端相容的5'及3'末端，使得其可直接連接至質體。此質體現含有突變DNA序列。

或者或另外，可測定編碼多肽變異體之所需胺基酸序列，且可以合成方式產生編碼該等胺基酸序列變異體之核酸序列。

親本多肽之胺基酸序列經修飾以產生活體外及/或活體內具有改變之Fc受體結合親和力或活性，及/或活體外及/或活體內具有改變之抗體依賴型細胞介導之細胞毒性(ADCC)活性，及/或活體外及/或活體內具有改變之細胞介導之細胞毒性(CDC)活性的變異Fc區。

通常，修飾需要一或多個胺基酸取代。取代可為例如"保守取代"。可藉由選擇取代來實現Fc區之生物特性之實質性修飾，該等取代在其以下維持作用中明顯不同：(a)在取代區域內維持多肽骨架之結構，例如作為摺疊或螺旋構形，(b)維持目標位點處分子之電荷或疏水性或(c)維持大

部分側鏈。基於常見側鏈特性將天然存在之殘基分組：

(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、gln、his、lys、arg；

(5)影響鏈取向之殘基：gly、pro；及

(6)芳族：trp、tyr、phe。

除胺基酸取代以外，本發明涵蓋親本區胺基酸序列之其他修飾，以產生例如具有改變之效應功能的Fc區變異體。

吾人可使(例如)Fc區之一或多個胺基酸殘基缺失以降低與FcR之結合。通常，吾人將使一或多個本文中經鑑別為影響FcR結合之Fc區殘基缺失，以產生該Fc區變異體。通常，根據本發明之此實施例，不超過1至約10個Fc區殘基將缺失。本文中包含一或多個胺基酸缺失之Fc區較佳將保持至少約80%且較佳至少約90%且最佳至少約95%之親本Fc區或原生序列人類Fc區。

藉由在親本Fc區中引入適當胺基酸序列修飾，例如，可產生(a)在人類效應細胞存在下更有效或更不有效地介導抗體依賴型細胞介導之細胞毒性(ADCC)及/或(b)與親本多肽相比以更高或更低親和力結合Fc γ 受體(Fc γ .R)的變異Fc區。該等Fc區變異體通常在Fc區中將包含至少一個胺基酸修飾。認為尤其需要組合胺基酸修飾。例如，變異Fc區可包括(例如)本文中經鑑別之特異性Fc區位置之2個、3個、4個、5個等取代。

例如，在IgG1情況中，可藉由在Fc區之任一或多個胺基酸位置238、239、248、249、252、254、265、268、269、270、272、278、289、292、293、294、295、296、298、301、303、322、324、327、329、333、335、338、340、373、376、382、388、389、414、416、419、434、435、437、438或439處引入胺基酸修飾來產生具有與Fc γ .R之降低結合的Fc區變異體。參見，例如Presta美國專利第6,737,056號。

顯示與Fc γ .RI之降低結合的IgG1變異體包括彼等在任一或多個胺基酸位置238、265、269、270、327或329處包含Fc區胺基酸修飾者。參見，例如Presta美國專利第6,737,056號。

顯示與Fc γ .RII之降低結合的IgG1變異體包括彼等在任一或多個胺基酸位置238、265、269、270、292、294、295、298、303、324、327、329、333、335、338、373、376、414、416、419、435、438或439處包含Fc區胺基酸修飾者。參見，例如Presta美國專利第6,737,056號。

顯示與Fc γ .RIII之降低結合的IgG1 Fc區變異體包括彼等在任一或多個胺基酸位置238、239、248、249、252、254、265、268、269、270、272、278、289、293、294、295、296、301、303、322、327、329、338、340、373、376、382、388、389、416、434、435或437處包含Fc區胺基酸修飾者。參見，例如Presta美國專利第6,737,056號。

一般熟習此項技術者將瞭解可藉由改變其他Ig Fc區之特

定殘基獲得相似作用，但殘基之編號可不同。參見，例如 Presta 美國專利第 6,737,056 號。

可例如藉由改變 C1q 結合及/或 FcR 結合且藉此改變 CDC 活性及/或 ADCC 活性設計具有改變之效應功能的 Fc 區。例如，可產生具有提高之 C1q 結合及提高之 Fc.γ.RIII 結合，例如具有提高之 ADCC 活性與提高之 CDC 活性的變異 Fc 區。或者，在需要降低或消除效應功能時，可使具有降低之 CDC 活性及/或降低之 ADCC 活性的變異 Fc 區工程化。在其他實施例中，可僅提高此等活性之一者，且視情況亦降低其他活性，例如以產生具有提高之 ADCC 活性但降低之 CDC 活性且具有降低之 ADCC 活性但提高之 CDC 活性的 Fc 區變異體。參見，例如 Presta 美國專利第 6,737,056 號。

關於其他胺基酸序列改變，任何不涉及維持多肽變異體之適當構形之半胱胺酸殘基亦可通常由絲胺酸取代以提高分子之氧化穩定性且防止異常交聯。參見，例如 Presta 美國專利第 6,737,056 號。

另一類型之胺基酸取代係用來改變多肽之糖基化模式。此舉可藉由使一或多個於多肽中發現之醣部分缺失及/或添加一或多個在多肽中不存在之糖基化位點而實現。多肽之糖基化通常為 N-連接或 O-連接。N-連接係指碳水化合物部分與天冬醯胺殘基之側鏈連接。三肽序列天冬醯胺-X-絲胺酸及天冬醯胺-X-蘇胺酸(其中 X 為除脯胺酸之外的任何胺基酸)為碳水化合物部分與天冬醯胺側鏈之酶促連接的識別序列。因此，在多肽中該等三肽序列之任一者之存

在產生可能的糖基化部位。O-連接糖基化作用係指糖N-乙酰半乳糖胺糖、半乳糖或木糖之一者與羥胺基酸的連接，最常用為絲胺酸或蘇胺酸，但亦可使用5-羥脯胺酸或5-羥離胺酸。藉由改變胺基酸序列來便利地實現糖基化位點向多肽之添加使得其含有上述三肽序列之一或多者(用於N連接糖基化位點)。亦可藉由添加一或多個絲胺酸或蘇胺酸殘基至原始多肽序列中或由一或多個絲胺酸或蘇胺酸殘基取代原始多肽序列實現該變化(用於O-連接糖基化位點)。例示性糖基化變異體具有重鏈之殘基Asn 297之胺基酸取代。參見，例如Presta美國專利第6,737,056號。

此外，可藉由一或多個其他胺基酸取代改變Fc區之類、子類或同種異型以視需要產生具有與不同類、亞類或同種異型更同源之胺基酸序列之Fc區。例如，鼠類Fc區可經改變以產生與人類Fc區更同源之胺基酸序列；人類非A同種異型IgG1 Fc區可經修飾以得到人類A同種異型IgG1 Fc區等。在一實施例中，在Fc區之CH2域進行本文中之改變FcR結合及/或ADCC活性之胺基修飾且CH3域缺失或經另一二聚化域置換。然而，較佳保持CH3域(除改變如本文中所揭示之效應功能的胺基酸修飾以外)。參見，例如Presta美國專利第6,737,056號。

結合檢定

可評估多肽變異體結合FcR之能力。在FcR為諸如Fc.γ.RI、FcRn或Fc.γ.RIIIA-V158之高親和力Fc受體時，可藉由使用特異性結合多肽變異體之抗體以標準ELISA形式

滴定單體多肽變異體且量測結合之多肽變異體來量測結合。參見，例如Presta美國專利第6,737,056號。低親和力FcR之FcR結合檢定在此項技術中熟知且描述在尤其Presta U.S.專利第6,737,056號中。

為評估多肽變異體之ADCC活性，可使用改變之效應子：目標比率進行活體外ADCC檢定。此檢定適用之"效應細胞"包括周邊血液單核細胞(PBMC)及天然殺傷(NK)細胞。或者或另外，可(例如)在諸如揭示於Clynes等人PNAS (USA) 95:652-656 (1998)中之動物模型中活體內評估多肽變異體之ADCC活性。

表現載體

可使用任一適當表現載體來實踐本發明。例如，一般熟習此項技術者將能在例如pSVgpt中表現IgG1。表現載體pSVgpt係基於pSV₂gpt(Mulligan及Berg, 1980)且包括用於在細菌細胞中選擇之胺苄青黴素抗性基因，用於在哺乳動物細胞中選擇之gpt基因、鼠類重鏈免疫球蛋白增強子區、編碼恆定區基因之染色體組序列及SV40聚A序列。將用於表現之重鏈可變區作為HindIII插入BamHI片段中。

表現載體pSVhyg包括用於在細菌細胞中選擇之胺苄青黴素抗性基因，用於在哺乳動物細胞中選擇之hyg基因，鼠類重鏈免疫球蛋白增強子區、編碼κ恆定區基因且包括κ增強子之染色體組序列及SV40聚A序列。將用於表現之輕鏈可變區作為HindIII插入BamHI片段中。

隨後證實對於表現載體中之人類化V_H及V_K，DNA序列

為正確的。

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

具有改良親和力、特異性、穩定性之抗體

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

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

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

獲得具有修飾之糖基化圖案的抗體之方法為熟習此項技

術者已知且描述於(例如)EP1071700、US2005272128、Ferrara等人(2006) J Biol Chem 281 (8), 5032-5036; Ferrara等人(2006) Biotechnology and Bioengineering 93 (5), 851-861中。

藥物製劑及投藥

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

可根據熟習此項技術者已知之標準方法實現本發明之醫藥組合物之調配。

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

配物。氣溶膠調配物之實例包括用於肺內投藥之吸入劑調配物。

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

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

熟習此相關技術者熟知組合物之劑量將視以下各種因素而定，諸如所治療病狀、所用特定組合物及其他臨床因素，諸如患者之體重、體型、性別及總體健康狀況，體表

面積、待投與之特定化合物或組合物，同時投與之其他藥物及投藥途徑。

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

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

在 0.01 μg 與 10 mg 單位/公斤體重/小時之範圍內，屬於該等範圍之所有個別數字亦為本發明之一部分。

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

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

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

跨過血腦屏障輸送抗體或其活性片段之物理方法包括(但不限於)完全繞過血腦屏障或藉由在血腦屏障中建造開口。繞過方法包括(但不限於)直接注入腦(參見，例如

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

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

跨過血腦屏障輸送抗體或其活性片段之受體及通道基方法包括(但不限於)使用糖皮質激素阻斷劑來增加血腦屏障之滲透性(參見例如美國專利申請公開案第2002/0065259號、第2003/0162695號及第2005/0124533號)；活化鉀通道

(參見例如美國專利申請公開案第2005/0089473號)、抑制ABC藥物轉運蛋白(參見例如美國專利申請公開案第2003/0073713號);以運鐵蛋白塗佈抗體且調節該或該等運鐵蛋白受體之活性(參見例如美國專利申請公開案第2003/0129186號)且將該等抗體陽離子化(參見例如美國專利第5,004,697號)。

偵測/診斷

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

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

可用於診斷類澱粉相關疾病或病狀之生物樣品為例如諸如血清、血漿、唾液、胃分泌液、黏液、腦脊髓液、淋巴液及其類似物之液體，或獲自生物體之諸如神經、腦、心臟或脈管組織之組織或細胞樣品。對於測定樣品中類澱粉蛋白之存在或缺失，一般熟習此項技術者已知之任何免疫

檢定(參見Harlow及Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1988 555-612) 均可使用, 諸如使用用於偵測之第二試劑利用間接偵測方法之檢定、ELISA及免疫沈澱及凝集檢定。該等檢定之詳細描述係於(例如)Maertens及Stuyver, Zrein等人(1998)之WO 96/13590及WO 96/29605中給出。

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

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

或者, 抗體可藉由與對免疫球蛋白具有親和力之諸如蛋白A或G或第二抗體之標記物質反應而間接標記。抗體可

與第二物質結合且以對與抗體結合之第二物質具有親和力的經標記之第三物質偵測。例如，抗體可與生物素結合且使用經標記之親和素或抗生蛋白鏈菌素偵測抗體-生物素結合物。相似地，抗體可結合至半抗原且使用經標記之抗半抗原抗體偵測抗體-半抗原結合物。

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

當前的免疫檢定利用雙抗體法來偵測其中分析物之存在。藉由與已經可偵測標記物標記之第二抗體反應間接標記抗體。第二抗體較佳為與衍生單株抗體之動物抗體結合者。換言之，若單株抗體為小鼠抗體，則經標記之第二抗體為抗小鼠抗體。對於欲用於如下所述之檢定之單株抗體，該標記物較佳為經抗體塗佈之珠粒、尤其磁性珠粒。對於待用於本文中所描述之免疫檢定之多株抗體，該標記物較佳為諸如放射性、螢光之可偵測分子或電化學發光物質。

由於適合於快速測定分析物之存在，通常稱為較快形式系統之替代雙抗體系統亦可用於本發明之範疇內。該系統

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

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

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

本發明之另一目標提供用於偵測及診斷類澱粉相關疾病

及病狀的包含本發明之抗體之新穎免疫探針及測試套組。對於免疫探針，抗體直接或間接連接至合適之報導分子，例如酶或放射性核素。該測試套組包括容納本發明之一或多種抗體之容器及使用該等抗體用於以下目的之說明書：與類澱粉蛋白結合以形成免疫複合體且偵測該免疫複合體之形成，使得該免疫複合體之存在或缺失與類澱粉蛋白之存在或缺失相關聯。

實例

材料

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

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

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

檢定

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

選擇人類恆定區

由於臨床抗體候選者無需免疫系統招募，因此重鏈之所選人類恆定區為人類IgG4，其經修飾以將鉸鏈區位置228之絲胺酸改變為脯胺酸(HuIgG4 Ser-Pro)。該突變使鏈間二硫鍵穩定，且防止原生人類IgG4製劑中會出現之半分子的形成。自該產生細胞株表現之抗體亦將其末端離胺酸移除。人類恆定區HuIgG4 Ser-Pro及人類 κ 之序列分別於SEQ ID NO: 17及14中給出。

實例1 抗體可變區之選殖及定序

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

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

通篇中使用抗體可變區之Kabat編號規定；因此殘基數目可與嚴格線性數目不同。

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

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

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

實例2 嵌合抗體基因之構築

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

構築兩種由與表現載體 *pSVgpt* 中之 HuIgG4 (Ser-Pro) 恆定區連接的 mC2 V_H AF 或 mC2 V_H B 可變區組成之嵌合重鏈表現載體 (圖 1)。此舉係基於 *pSV₂gpt* (Mulligan 及 Berg, 1980) 且包括用於在細菌細胞中選擇之胺苄青黴素抗性基因，用於在哺乳動物細胞中選擇之 *gpt* 基因、鼠類重鏈免疫球蛋白增強子區、編碼恆定區基因之染色體組序列及 SV40 聚 A 序列。將用於表現之重鏈可變區作為 *Hind*III 插入 *Bam*HI 片段中。

構築由與表現載體 *pSVhyg* 中之人類 C κ 恆定區連接的 C2 VK 組成之嵌合輕鏈載體 (圖 2)。*pSVhyg* 包括用於在細菌細胞中選擇之胺苄青黴素抗性基因、用於在哺乳動物細胞中選擇之 *hyg* 基因、鼠類免疫球蛋白重鏈增強子區域、編碼 κ 恆定區基因且包括 κ 增強子之染色體組序列及 SV40 聚 A 序列。將用於表現之輕鏈可變區作為 *Hind*III 插入 *Bam*HI 片段中。

藉由使用載體 VH-PCR1 及 VK-PCR1 作為模板添加包括前導信號肽、前導內含子及鼠類免疫球蛋白啟動子之 5' 側接序列及包括剪接位點及內含子序列之 3' 側接序列來構築鼠類 C2 V_H 及 V_K 序列之表現卡匣 (Riechmann 等人, 1988)。證實 DNA 序列對於嵌合表現載體中之 V_H 及 V_K 係正確的。表現卡匣中 V_H 及 V_K 基因之 DNA 及胺基酸序列係展示於圖 3 及 4 中。

實例 3 表現嵌合抗體

3.1 在穩定細胞株中表現

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

3.2 嵌合抗體之瞬時表現

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

實例4 嵌合C2抗體之活性

4.1 藉由瞬時轉染產生之嵌合C2抗體之活性

在ELISA中測試自瞬時轉染之條件培養基樣品的兩種不同嵌合抗體與類澱粉 β 之結合。結果明顯指示C2 V_H AF為恰當序列。C2 V_H AF/C2 V_K嵌合抗體在該檢定中良好結合，但C2 V_H B/C2 V_K根本不展示任何結合。Chemicon 1560鼠類對照抗體展示良好結合，但所提供純化之鼠類C2抗體之結合較低。應注意到與具有人類恆定區之嵌合抗體相比，不同二次抗體係用於具有小鼠恆定區之鼠類抗體，因此結果無法直接相比。隨後發現自C2融合瘤之條件培養基在該檢定中得到良好結果。

4.2 純化之嵌合C2抗體之活性

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

實例5 設計人類化C2抗體基因

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

5.1 輕鏈可變區

mC2 V_K之最接近匹配小鼠生殖系基因為bb1，基因座MMU231201(Schable等人，1999)。僅兩個胺基酸與此生殖系序列不同，兩者均位於CDRL1中。發現具有類似但不同序列之成熟鼠類抗體。數種具有相同CDRL2及相同CDRL3，但mC2之CDRL1似乎為獨特的。mC2 V_K可歸為

Kabat亞群MuV_KII。mC2 V_K之位置87為F而非在該亞群中更常見之Y，指示該構架殘基對於抗體活性而言可為重要的。與人類生殖系V_K序列之比較展示亞群V_KII之基因為mC2 V_K之最佳配合(Cox等人，1994)。選擇序列DPK15以及人類J區HuJ_K1以提供人類化V_K之受體構架序列。

設計4個人類化V_K序列。C2HuV_K1係由具有來自DPK 15及人類J_K1之構架的mC2 V_K CDR組成。在形式2、3及4中，鼠類殘基已在構架中在位置45或87或兩者處經取代。殘基45可與支撐CDR之構形有關。殘基87係位於V_H及V_K域之介面處。因此，該等殘基對於維持抗體結合而言可為關鍵的。

輕鏈構架區中已作出之位置及變化係展示於表1中。人類化序列與mC2 V_K序列及與DPK15及人類J_K1之比較

5.2 重鏈可變區

mC2 V_H AF之最接近匹配小鼠生殖系基因為V_H7183、基因座AF120466(Langdon等人，2000)。比較係展示於圖5中。9個胺基酸與此生殖系序列不同，多數位於CDR2中。發現具有相同或類似(一個殘基不同)CDR1或具有類似CDR2(一個殘基不同)之成熟鼠類抗體，但所有三個CDR中無一者與mC2 V_H AF相同。mC2抗體之CDR3為顯著短的，其僅由三個殘基組成。然而，發現數據庫中之其他抗體具有該長度之CDR3。mC2 V_H AF可歸為Kabat亞群MuV_HIIID。mC2 V_H之殘基47為L而非更常見之W，且殘基94為S而非常見之R，其指示此等構架殘基對於抗體活性而

言可為重要的。與人類生殖系 V_H 序列之比較展示亞群 V_{HIII} 之基因為 mC2 V_H 之最佳配合。選擇序列 DP54 與人類 J 區域 HuJ_H6 以提供人類化 V_H 之受體構架序列。

設計 4 個人類化 V_H 序列。C2Hu V_H 1 係由具有來自 DP54 及 HuJ_H6 之構架的 mC2 V_H AF CDR 組成。在形式 2、3 及 4 中，鼠類殘基已在構架中在位置 47 或 94 或兩者處經取代。構架 2 之殘基 47 與 CDR 及 V_K 域接觸。殘基 94 可與支撐 CDR 之構形有關。因此，該等殘基對於維持抗體結合而言可為關鍵的。

重鏈構架區中已作出之位置及變化係展示於表 2 中。

實例 6 構築人類化抗體基因

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

實例 7 人類化抗體之表現

7.1 在穩定細胞株中表現

關於嵌合抗體之表現，藉由電穿孔將人類化重鏈及輕鏈

表現載體共轉染至NS0細胞中。確切地關於嵌合抗體，選擇及擴增抗體產生細胞株且純化人類化抗體。藉由SDS-PAGE分析純化抗體。

7.2 人類化抗體之瞬時表現

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

實例8 人類化C2抗體之活性

8.1 藉由瞬時轉染產生之人類化C2抗體之活性

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

8.2 經純化之人類化C2抗體之活性

如所述自穩定NS0細胞株純化包含兩個人類化重鏈及4個人類化輕鏈之全部組合的8個不同人類化C2抗體，且使

用類澱粉 β ELISA來測試(圖 6)。

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

實例 9 對 CDRL2 之修飾

9.1 設計具有經修飾之 CDR 2 的輕鏈

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

9.2 經修飾之 CDRL2 抗體之瞬時表現

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

9.3 具有經修飾之CDRL2之C2抗體的活性

在類澱粉 β ELISA中測試自具有與mC2 V_H 組合之經修飾之CDRL2的mC2 V_K s瞬時轉染之條件培養基樣品(圖7)。VK-R與VK-S抗體與嵌合C2抗體可比，指示所選擇CDRL2之個別修飾並不顯著影響檢定中之抗體活性。

實例10 親和力測定

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

	單體			纖維		
	$k_a(1/Ms)$	$k_d(1/s)$	KD(M)	$k_a(1/Ms)$	$k_d(1/s)$	KD(M)
小鼠ACI-01-Ab-7-C2	1,8E+04	2,7E-03	1,5E-07	2,4E+04	9,9E-04	4,1E-08
嵌合AF	4,7E+04	9,5E-04	2E-08	5,1E+04	3,3E-04	6,5E-09
人類化H4K1	5,0E+04	9,5E-04	1,9E-08	4,9E+04	2,3E-04	4,7E-09
人類化H4K4	2,5E+04	4,4E-04	1,8E-08	1,3E+05	3,0E-04	2,3E-09

實例11 免疫組織化學結合檢定

11. 人類腦部分

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

存石蠟切片直至使用。對於新鮮材料，以冷凍切片機切割5 μm 低溫切片且將切片儲存在 -80°C 下直至使用。

11.2 免疫組織化學

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

在 -80°C 下將低溫切片固定於甲醇中30分鐘且藉由將 H_2O_2 添加至冷甲醇中至最終濃度10%且在RT下培育30分鐘減去背景。於Tris緩衝鹽水(TBS, pH 7.5)中洗滌3次後，藉由如上所述之將載片在於TBS中之10% BSA、0.25% Triton X 100中培育2小時阻斷非特異標記，且如上所述之進行相同染色程序。

以Leica DMLB顯微鏡檢查切片，且使用Leica DC500攝

影機及Leica FireCam1.2.0軟體攝影。

人類抗體A與C標記AD疾病患者之腦斑塊(圖8)。標記擴散與核心斑塊兩者。此外，亦可藉由A及C抗體偵測非發狂預AD患者之擴散斑塊。以2種抗體標記腦類澱粉血管病變(CAA)之類澱粉，且亦偵測可能對應於細胞內類澱粉之神經元之某些染色。健康患者之對照腦上未見標記。可在經甲酸預處理之石蠟切片上偵測斑塊，但在無甲酸預處理之石蠟切片上及固定於甲醇中之低溫切片上斑塊未經標記。人類抗體B並不偵測石蠟切片上之斑塊且小鼠抗體不染色人類腦之石蠟或低溫切片。

縮寫：

A=結合嵌合抗體AF(IgG4)

B=非結合嵌合抗體B(IgG4)

C=結合人類化抗體H4K1(IgG4)

小鼠=ACI-01-Ab-C2小鼠抗體(IgG2b)

實例 12 mC2對類澱粉纖維之功能性

12.1 A β 1-42纖維構形之修飾及mC2抗體結合後解聚之啟始

為評估抗體能夠解聚預成型 β -類澱粉(A β ₁₋₄₂)纖維之機制，進行硫黃素-T(Th-T)螢光檢定之頭接頭比較，量測U-¹³C酪胺酸10及纈胺酸12標記之A β ₁₋₄₂肽的解聚及固態核磁共振(NMR)，分析第二構形(圖9A)。mC2抗體將35.4%之預成型A β ₁₋₄₂纖維溶解且同時誘發 β 摺疊至無規捲曲之第二構形變化。 β 摺疊構形相對於無規捲曲之群體降低為35%水

準，且因此與使用螢光 Th-T 檢定所量測值接近一致(圖 9B)。該等數據指示 mC2 抗體之結合啟始潛在地引起 β 摺疊之平行分子間排列之失穩的二級結構之轉變，影響延長型纖維斷裂成較小片段。

12.2 mC2 抗體之構形依賴型結合親和力

由於科學文獻中已熟知抗體-抗原結合能之比例可用於能量依賴型改變抗原之構形(Blond 及 Goldberg, 1987)，因此進行 C2 抗體與完全 $A\beta_{1-42}$ 蛋白及與較小、9 個胺基酸長之包含抗體的抗原決定基之肽的比較實驗(圖 10)。對於此比較，藉由 ELISA 使用涵蓋 C2 抗原決定基之完整胺基酸序列的生物素化肽(由 Mimotopes 產生且購自 ANAWA Trading SA)及生物素化完整 $A\beta_{1-42}$ 肽(Bachem)分析人類化抗體 C2 之親和力。根據製造商(Mimotopes)之用法說明書進行分析。如圖 10 中所證明，抗體以比完全 $A\beta_{1-42}$ 蛋白高 36.0% 之親和力結合包含其特異性抗原決定基($A\beta_{1-42}$ 序列之胺基酸 13-21)之肽。因此提議結合親和力能量差異用於類澱粉蛋白之第二構形之能量消耗轉變以使抗原在更可接受之位置存在用於抗體相互作用。此說明抗體之親和力對於原生(完全類澱粉蛋白)比所分離亞單元更低之原因。

實例 13 抗類澱粉 hC2 對類澱粉 β 1-42 肽之聚集的影響

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

13.1 抑制聚集檢定

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

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

13.2 解聚檢定

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

13.3 計算

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

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

13.4 結果

13.4.1 A β_{1-42} 聚集之抑制

使用 hC2 抗體之 A β_{1-42} 聚集之抑制展示於表 1 及圖 18 中。在抗體：A β_{1-42} 1:100 之莫耳比下，平均抑制 30% (2 個獨立實驗)，而在 1:10 莫耳比下抑制為 80% (2 個獨立實驗；參見表 1)。

表 1. 在 1:100 及 1:10 抗體：A β_{1-42} 莫耳比下，hC2 所介導之 A β_{1-42} 聚集之抑制

抗體	莫耳比(抗體：A β_{1-42})	
	1:100	1:10
hC2	30.0 $\pm$ 4.1%	80.4 $\pm$ 6.9%

13.4.2 預聚集 A β_{1-42} 之解聚

使用 hC2 抗體之預聚集 A β_{1-42} 之解聚展示於表 2 及圖 19 中。在抗體：A β_{1-42} 1:100 莫耳比下，平均解聚 24%，而在 1:10 莫耳比下解聚為 32% (3 個獨立實驗，參見表 2)。

表 2. hC2 所介導之預聚集 A β_{1-42} 在 1:100 及 1:10 抗體：A β_{1-42} 莫耳比下之解聚

抗體	莫耳比(抗體：A β_{1-42})	
	1:100	1:10
hC2	23.9 $\pm$ 4.4%	31.9 $\pm$ 3.5%

使用硫黃素 T 檢定，可證明抗 A β 人類化抗體 hC2 之雙功能特性，亦即抑制 A β_{1-42} 聚集成病原性原纖維體構形及另外使預成型 A β_{1-42} 原纖維解聚。在 1:10 之抗體：A β_{1-42} 莫耳比下，hC2 抑制 80% 之 A β_{1-42} 聚集。經展示 hC2 使預先聚集

之 $A\beta_{1-42}$ 之原纖維在 1:10 莫耳比下解聚的能力為 32%。

實例 14： mC2 與不同類別類澱粉蛋白之構形特異性結合

為評估 mC2 對不同等級之聚合型類澱粉蛋白、單體、聚合型可溶性及纖維體類澱粉之特異性，進行以該等不同等級之聚合型 β -類澱粉塗佈的 ELISA (圖 11)。根據由 (Klein, 2002) 公開之改進方法製備單體、根據 (Barghorn 等人, 2005) 製備可溶性聚合型類澱粉 β ，而藉由在 37°C 下將最終濃度為於 Tris/HCl pH 7.4 中 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 之類澱粉 (Bachem, Switzerland) 培育 5 天，接著進行離心步驟 (10,000 rpm，歷時 5 分鐘) 來製備纖維。隨後將類澱粉聚合物塗佈於 ELISA 板上，最終濃度為 55 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 且藉由使用經鹼性磷酸酶標記之抗小鼠 IgG 單株抗體 (Jackson) 進行結合親和力 ELISA。如圖 11 中所證明，mC2 抗體以比纖維更高之親和力與可溶性聚合型類澱粉 β 結合，且以最低親和力與單體結合。該等數據指示抗體之結合受類澱粉抗原決定基及不同類澱粉聚集體之構形影響。

實例 15： AC 免疫之單株抗體 hC2 之抗原決定基定位

藉由 ELISA 使用三個不同肽文庫進行人類化單株抗體 hC2 之抗原決定基定位。一文庫包含總共 33 個涵蓋 $A\beta_{1-42}$ 之完整胺基酸 (aa) 序列的生物素標記肽 (由 Mimotopes 產生且購自 ANAWA Trading SA)；第二文庫含有使用第一肽文庫之肽 12 ($A\beta$ 之 aa12-20) 且藉由丙胺酸取代序列中之各 aa (參見下文表 3) 的生物素標記肽；且第三文庫含有生物素標記肽 13、14 或 15 ($A\beta$ 之 aa 13-21、14-22 或 15-23) 且在各情況下

將最後胺基酸取代為丙胺酸或對於已為丙胺酸之aa 21而言取代為甘胺酸(參見下表4)。生物素化完整A β ₁₋₄₂肽係用作陽性對照(Bachem)。根據製造商(Mimotopes)之用法說明書進行抗原決定基定位。簡言之，在4°C下以於PBS中0.1% BSA將鏈黴抗生素蛋白塗佈之板(NUNC)阻斷隔夜。以PBS-0.05% Tween 20洗滌後，在RT下以文庫中之稀釋於PBS中0.1% BSA、0.1%疊氮化鈉中為10 μ M最終濃度之不同肽將板塗佈1小時。洗滌後，在RT下以於PBS中2% BSA、0.1%疊氮化鈉中稀釋為200 ng/ml之hC2抗體或非A β 結合嵌合IgG4抗體將板培育1小時。再次洗滌板且在RT下以鹼性磷酸酶結合之山羊抗人類IgG培育1 h。最終洗滌後，以磷酸酯酶受質(pNPP)培育板且使用ELISA板讀取器在405 nm讀取。

展示人類化單株抗體hC2與第一肽文庫之肽12、13、14、15及16特異性結合。該等肽分別包含A β ₁₋₄₂之aa 12-20、13-21、14-22、15-23及16-24，表明抗原決定基處於A β 之區域12-24中。具有丙胺酸取代之第二文庫用以測定對於與A β 12-20(VHHQKLVFF)結合關鍵之aa。當胺基酸16、17、19或20經丙胺酸取代時，hC2抗體之結合完全喪失，指示該等aa對於抗體與A β 之結合絕對關鍵。當aa 15及18經取代時hC2抗體之結合部分喪失。

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

最後，第三文庫係用以測定aa 21、22或23對於與抗原決

定基結合是否關鍵。當aa 23將取代為丙胺酸時，抗體與aa 15-23之結合降低，指示aa 23對於結合亦重要。當aa 21經取代為甘胺酸時結合部分喪失，且當aa 22經取代為丙胺酸時略微喪失。

實例 16：藉由hC2抗體進行之神經保護

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

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

對於對照細胞，在第5天僅添加相同體積之作為Abeta-DMSO的DMSO-F12，且在無任何其他處理之情況下將細胞再培養4天。在第9天，將所有培養條件之神經元且以Tuj1(抗 β 微管蛋白抗體)染色，接著以經FITC標記之第二抗體染色以目測微管，且因此一般而言目測神經元過程。結果展示於圖20中。未處理小鼠胚胎皮層神經元在培養9

天後展示正常形態學(圖 20，最左圖)。以 Abeta寡聚物將細胞處理三天誘發軸突退化且導致軸突總數下降(圖 20，下部中心圖)且在處理4天後該影響甚至更顯著(圖 20，上部中心圖)。與此相反，以 Abeta寡聚物與抗 Abeta抗體 hC2之組合處理的細胞看似與對照細胞相似(圖 20，上部及下部右圖)。該等結果指示抗 Abeta抗體 hC2能夠保護胚胎小鼠皮層神經元免於 Abeta寡聚物誘發之退化。

表 1：人類化 C2輕鏈構架區中所得之位置及變化

位置輕鏈	45	87	50	53
小鼠C2V _K	K	F	K	N
人類化C2HuV _K 1	Q	Y	K	N
人類化C2HuV _K 2	Q	F	K	N
人類化C2HuV _K 3	K	Y	K	N
人類化C2HuV _K 4	K	F	K	N
人類化生殖系dpk15	Q	Y	L	N
小鼠C2V _K -R			R	
小鼠C2V _K -S				S

表 2：人類化 C2重鏈構架區中所得之位置及變化

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

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

表 3.第二文庫中所用肽之總結

對於結合重要之 aa以斜體標記且加底線強調，對結合絕

102年10月4日

對關鍵之 aa 以斜體及粗體標記。

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

表 4. 第三文庫中所用肽之總結。

對結合重要之 aa 以斜體標記且加底線強調且對結合絕對

關鍵之 aa 以斜體及粗體標記。

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

參考文獻列表

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

Blond及Goldberg, 1987, PNAS 1987年3月1日, 第84卷|第5號|1147-1151 Cox JPL, Tomlinson IM及Winter G. Eur. J.

Immunol. 1994; 24: 827-836. A directory of human germline V κ segments reveals a strong bias in their usage。

Kabat EA, Wu TT, Perry HM, Gottesman KS, Foeller C. Sequences of proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, 1991。

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

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

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

Riechmann L, Clark M, Waldmann H, Winter G, Nature

1988; 332: 323-327. Reshaping human antibodies for therapy.

Schable KF, Thiebe R, Bensch A, Brensing-Kueppers J, Heim V, Kirschbaum T, Lamm R, Ohnrich M, Pourrajabi S, Roschenthaler F, Schwendinger J, Wichelhaus D, Zocher I 及 Zachau HG. Eur. J. Immunol. 1999; 29: 2082-2086.

Characteristics of the immunoglobulin V kappa genes, pseudogenes, relics and orphans in the mouse genome.

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

【圖式簡單說明】

圖 1(實例 2)：嵌合抗體之重鏈表現載體

圖 2(實例 2)：嵌合抗體之輕鏈表現載體

圖 3(實例 2)：嵌合抗體之小鼠輕鏈可變區之表現卡匣

圖 4(實例 2)：嵌合抗體之小鼠重鏈可變區之表現卡匣

圖 5(實例 5.2)：小鼠重鏈可變區與最接近鼠類生殖系序列之比較

圖 6(實例 8)：純化之人類化 C2 抗體之活性

圖 7(實例 9)：與藉由瞬時轉染及純化抗體產生之嵌合抗體 C2ChV_HAF/ChV_K相比，藉由瞬時表現聯合 C2 嵌合重鏈的經 C2 修飾之 CDRL2 構築體產生的抗體之結合活性

圖 8(實例 11)：嵌合抗體 AF(IgG4)及人類化抗體 H4K1

(IgG4)之免疫組織化學結合檢定之結果

圖 9(實例 12)：mC2 對類澱粉纖維之功能性

圖 10(實例 12)：ELISA 中人類化 C2 之結合親和力

圖 11(實例 14)：mC2 與不同類型之類澱粉蛋白的構形特异性結合。此圖之圖例中顆粒製劑係指 A β ₁₋₄₂ 纖維，上清液製劑係指類澱粉單體

圖 12：與鼠類序列及人類受體序列 DPK15 AND J_K1 相比之人類化 C2 VK 序列

圖 13：與鼠類序列及人類受體序列 DP54 AND J_H6 相比之人類化 C2 VH 序列

圖 14：C2 人類化抗體 C2HuVK1 之輕鏈可變區之完整 DNA 及蛋白序列

圖 15：人類化 C2 抗體之輕鏈恆定區(人類 C κ)之完整 DNA 及蛋白序列

圖 16：人類化 C2 抗體之重鏈恆定區(人類 IgG4 ser228-pro)之完整 DNA 及蛋白序列

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

圖 18(實例 13)：聚集檢定實驗之結果

圖 19(實例 13)：解聚檢定實驗之結果

圖 20(實例 16)：人類化抗體 C2 之神經保護實驗的結果。

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

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

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

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

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

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

SEQ ID NO: 7：A β 抗原決定基區 2 之胺基酸序列；

SEQ ID NO: 8：A β 抗原決定基區 1 之胺基酸序列；

SEQ ID NO: 9：修飾之 A β 抗原決定基區 2 之胺基酸序列；

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

SEQ ID NO: 11：修飾之完整抗原決定基區之胺基酸序列；

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

SEQ ID NO: 13：C2 人類化輕鏈之胺基酸序列；

SEQ ID NO: 14：人類化 C2 輕鏈恆定區之胺基酸序列；

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

SEQ ID NO: 16：C2 人類化重鏈之胺基酸序列；

SEQ ID NO: 17：修飾之 IG γ -4 鏈 C 區之胺基酸序列；

SEQ ID NO: 18 : C2 HuVH AF 4人類化重鏈可變區之
CDR2之核苷酸序列；

SEQ ID NO: 19 : C2 HuVH AF 4人類化重鏈可變區之
CDR3之核苷酸序列；

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

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

SEQ ID NO: 22 : C2人類化輕鏈之核苷酸序列；

SEQ ID NO: 23 : C2人類化輕鏈恆定區之核苷酸序列；

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

SEQ ID NO: 25 : C2人類化重鏈之核苷酸序列；

SEQ ID NO: 26 : C2人類化重鏈恆定區之核苷酸序列；

SEQ ID NO: 27 : 小鼠C2輕鏈可變區之胺基酸序列；

SEQ ID NO: 28 : 小鼠C2重鏈可變區之胺基酸序列；

SEQ ID NO: 29 : 小鼠C2輕鏈可變區之核苷酸序列；

SEQ ID NO: 30 : 小鼠C2輕鏈之核苷酸序列；

SEQ ID NO: 31 : 小鼠C2重鏈可變區之核苷酸序列；

SEQ ID NO: 32 : 小鼠C2重鏈之核苷酸序列。

序列表

<110> 美商建南德克公司

<120> 人類化抗體 IGG1

<130> M1967 EP S3

<140> 097121924

<141> 2008-06-12

<150> 60/943,509

<151> 2007-06-12

<160> 32

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<223> C2 HuVH AF 4 人類化重鏈可變區(CDR1)

<400> 1

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser

1 5 10

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<223> C2 HuVH AF 4 人類化重鏈可變區(CDR2)

<400> 2

Ser Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 3

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<223> C2 HuVH AF 4 人類化重鏈可變區(CDR3)

<400> 3

Gly Asp Tyr

1

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<223> C2 HuVK 1 人類化輕鏈可變區 (CDR1)

<400> 4

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser Asn Gly Asp Thr Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<223> C2 HuVK 1 人類化輕鏈可變區 (CDR2)

<400> 5

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<223> C2 HuVK 1 人類化輕鏈可變區 (CDR3)

<400> 6

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr

1 5

<210> 7

<211> 6

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<223> Aβ 抗原決定基，區2

<400> 7

Val Phe Phe Ala Glu Asp

1 5

<210> 8

<211> 5

<212> PRT
 <213> 智人
 <220>
 <223> Aβ 抗原決定基，區1
 <400> 8
 His Gln Lys Leu Val
 1 5
 <210> 9
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 智人
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa 可為 Ala、Val、Leu、正白胺酸、Met、Phe 或 Ile
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa 可為 Ala、Val、Leu、Ser 或 Ile
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa 可為 Glu 或 Asp
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa 可為 Glu 或 Asp
 <400> 9
 Xaa Phe Phe Xaa Xaa Xaa
 1 5
 <210> 10
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 智人
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)

<223> Xaa 可為 His、Asn、Gln、Lys 或 Arg
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa 可為 Asn 或 Gln
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa 可為 Ala、Val、Leu、正白胺酸、Met、Phe 或 Ile
 <400> 10
 Xaa Xaa Lys Leu Xaa
 1 5
 <210> 11
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 智人
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa 可為 His、Asn、Gln Lys 或 Arg
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa 可為 Asn 或 Gln
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa 可為 Ala、Val、Leu、正白胺酸、Met、Phe 或 Ile
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa 可為 Ala、Val、Leu、Ser 或 Ile
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa 可為 Glu 或 Asp
 <220>

<221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> Xaa 可為 Glu 或 Asp

<400> 11

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

<210> 12

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工人類化 C2 HuVK 1 可變輕鏈

<400> 12

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser

85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 13

<211> 219

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工人類化 C2 輕鏈

<400> 13

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser

	20	25	30	
Asn Gly Asp Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser				
35	40	45		
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro				
50	55	60		
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile				
65	70	75	80	
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser				
85	90	95		
Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys				
100	105	110		
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu				
115	120	125		
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe				
130	135	140		
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln				
145	150	155	160	
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser				
165	170	175		
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu				
180	185	190		
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser				
195	200	205		
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys				
210	215			
<210> 14				
<211> 107				
<212> PRT				
<213> 人工序列				
<220>				
<223> 人工人類化 C2 輕鏈恆定區				
<400> 14				
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu				
1	5	10	15	
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe				
20	25	30		
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln				

35 40 45
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 15

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工人類化 C2 HuVH AF 4 可變重鏈

<400> 15

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val
 35 40 45
 Ala Ser Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110

<210> 16

<211> 439

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工人類化 C2 重鏈

<400> 16

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val
 35 40 45
 Ala Ser Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 115 120 125
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 130 135 140
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 145 150 155 160
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 165 170 175
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 180 185 190
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 195 200 205
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 210 215 220
 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 225 230 235 240
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 245 250 255
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 260 265 270
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 275 280 285
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp

290 295 300
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 305 310 315 320
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 325 330 335
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 340 345 350
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 355 360 365
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 370 375 380
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 385 390 395 400
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 405 410 415
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 420 425 430
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

435
 <210> 17
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> 智人
 <220>
 <223> 經修飾之IG γ -4鏈C區
 <400> 17

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

	85	90	95
Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro			
100	105	110	
Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys			
115	120	125	
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val			
130	135	140	
Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp			
145	150	155	160
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe			
165	170	175	
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp			
180	185	190	
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu			
195	200	205	
Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg			
210	215	220	
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys			
225	230	235	240
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp			
245	250	255	
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys			
260	265	270	
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser			
275	280	285	
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser			
290	295	300	
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser			
305	310	315	320
Leu Ser Leu Ser Leu Gly			
325			

<210> 18

<211> 51

<212> DNA

<213> 小家鼠
 <220>
 <223> C2 HuVH AF 4 人類化重鏈可變區 (CDR2)
 <400> 18
 agcatcaata gtaatggtgg tagcacctat tatccagaca gtgtgaaggg c 51
 <210> 19
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> 小家鼠
 <220>
 <223> C2 HuVH AF 4 人類化重鏈可變區 (CDR3)
 <400> 19
 ggtgactac 9
 <210> 20
 <211> 49
 <212> DNA
 <213> 小家鼠
 <220>
 <223> C2 HuVK 1 人類化輕鏈可變區 (CDR1)
 <400> 20
 agatctagtc agagccttgt atatagtaat ggagacacct atttacatt 49
 <210> 21
 <211> 635
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工人類化 C2 Hu VK 1 可變輕鏈
 <400> 21
 gatattgtga tgaccaatc tccactctcc ctgcctgtca ctcttggtga gcctgcctcc 60
 atctcttgca gatctagta gagccttgta tatagtaatg gagacaccta ttacattgg 120
 tacctgcaga agccaggcca gtcctcacag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180
 tctgggggcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
 agcagagtgg aggctgagga tgtgggagtt tattactgct ctcaaagtac acatgttcct 300
 tggacgttcg gccaaaggcac caagtgga atcaaa 336

<210> 22
 <211> 657
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工人類化 C2 輕鏈
 <400> 22
 gatattgtga tgaccaatc tccactctcc ctgcctgtca ctcttggtga gcctgcctcc 60
 atctcttgca gatctagtca gagccttgta tataagtaag gagacaccta ttacattgg 120
 tacctgcaga agccaggcca gtctccacag ctctgatct acaaagtgc caaccgattt 180
 tctgggtgcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
 agcagagtgg aggctgagga tgtgggagtt tattactgct ctcaaagtac acatgttcct 300
 tggacgttcg gccaaaggcac caagtgga atcaaaagga ctgtggctgc accatctgtc 360
 ttcatctcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420
 ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtga aggtggataa cgccctccaa 480
 tcgggtaact ccagagagag tgcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540
 agcagcacc tgacgtgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600
 gtcacccatc agggcctgag ctgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt 657
 <210> 23
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> 智人
 <220>
 <223> 人工人類化 C2 輕鏈恆定區
 <400> 23
 aggactgtgg ctgcaccatc tgtctcatc ttcccggcat ctgatgagca gttgaaatct 60
 ggaactgcct ctgttgtgtg cctgtgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag 120
 tggaggtgg ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180
 agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240
 aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctgcc cgtcacaaag 300
 agcttcaaca ggggagagtg t 321
 <210> 24
 <211> 798
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工人類化 C2 HuVH AF 可變重鏈
 <400> 24

gaggtgcagc tggtcgagtc tgggggaggc ttagtcagc ctggagggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacttcagtc agctatggca tgccttgggt tcgccaggct 120
 ccaggcaagg gtctcgaatt ggtcgaagc atcaatagta atggtggtag cacctattat 180
 ccagacagtg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa ctccctgtac 240
 ctgcaaatga acagtctgag agctgaggac accgccgtgt attactgtgc aagtgggtgac 300
 tactggggcc aaggcaccac tgtcacagtc tcctca 336

<210> 25

<211> 1317

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工人類化 C2 重鏈

<400> 25

gaggtgcagc tggtcgagtc tgggggaggc ttagtcagc ctggagggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacttcagtc agctatggca tgccttgggt tcgccaggct 120
 ccaggcaagg gtctcgaatt ggtcgaagc atcaatagta atggtggtag cacctattat 180
 ccagacagtg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa ctccctgtac 240
 ctgcaaatga acagtctgag agctgaggac accgccgtgt attactgtgc aagtgggtgac 300
 tactggggcc aaggcaccac tgtcacagtc tcctcagctt ccaccaaggg cccatccgtc 360
 ttccccctgg cgccctgtc cagatcgacc tccgagagca cagccgccct gggctgcctg 420
 gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc 480
 ggcgtgcaca ccttcccggc tgcctacag tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg 540
 gtgaccgtgc cctccagcag ctgggacag aagacctaca cctgcaacgt agatcacaag 600
 cccagcaaca ccaagggtga caagagagtt gagtccaaat atggtccccc gtgtcccca 660
 tgcccagcac ctgagttcct ggggggacac tcagtcttcc tgttcccc aaacccaag 720
 gacactctca tcatctccc gaccctgag gtcacgtgcg tgggtggtga cgtgagccag 780
 gaagaccccc aggtccagtt caactggtac gtggatggcg tggaggtgca taatgccaa 840
 acaaagccgc gggaggagca gttaacagc acgtaccgtg tggtcagcgt cctaccgtc 900
 ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag tacaagtga aggtctcaa caaaggcctc 960
 ccgtctcca tcgagaaaac catctccaaa gccaaagggc agccccgaga gccacaggtg 1020
 tacacctgc cccatccca ggaggagatg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg 1080
 gtcaaaggct tctacccag cgacatgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag 1140
 aacaactaca agaccacgcc tccgtcttc gattccgacg gctccttct cctctacagc 1200
 aggctaaccg tggacaagag caggtggcag gaggggaatg tcttctatg ctccgtgatg 1260

catgaggctc tgcacaacca ctacacacag aagagcctct cctgtctct gggtaaa 1317
<210> 26
<211> 981
<212> DNA
<213> 智人
<220>

<223> 人工人類化C2重鏈恆定區
<400> 26

gctccacca agggcccatc cgtctcccc ctggcgccct gctccagatc gacctccgag 60
agcacagccg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 120
tggaactcag ggcacctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 180
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc 240
tacacctgca acgtatgca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtc 300
aaatatggtc ccccggtgcc cccatgcccc gacctgagt tcctgggggg accatcagtc 360
ttcctgttcc ccccaaacc caaggacact ctcagtatct cccggacccc tgaggtcacg 420
tgcgtgggtg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat 480
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac 540
cgtgtgtgca gcgtcctcac cgtctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 600
tgcaaggctc ccaacaaagg cctcccgctc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 660
gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgccccat cccaggagga gatgaccaag 720
aaccagggtc gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag 780
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctccgt cctcgattcc 840
gacggctcct tcttctcta cagcaggcta accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg 900
aatgtcttct catgctcgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc 960
ctctccctgt ctctgggtaa a 981

<210> 27
<211> 112
<212> PRT
<213> 小家鼠
<400> 27

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser
20 25 30

Asn Gly Asp Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
85 90 95
Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 28

<211> 112

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 28

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Leu Val
35 40 45
Ala Ser Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ser Thr Leu Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 29

<211> 336

<212> DNA

<213> 小家鼠

<400> 29

gatgttgta tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttgaga tcaagcctcc 60
atctcttgca gatctagtca gaggcttgta tatagtaatg gagacaccta ttacattgg 120
tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtctt caaccgattt 180

tctggggtcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
 agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaagtac acatgttcct 300
 tggacgttcg gtggaggcac caagctagaa atcaaa 336
 <210> 30
 <211> 417
 <212> DNA
 <213> 小家鼠
 <400> 30
 atgaagtgc ctgttaggct gttggtgctg atgttctgga ttctgcttc cagcagtgat 60
 gttgtgatga cccaaactcc actctccctg cctgtcagtc ttggagatca agcctccatc 120
 tcttcagat ctatgcagag ccttgtatat agtaatggag acacctattt acattggtac 180
 ctgcagaagc caggccagtc tccaaagctc ctgactaca aagtttcaa ccgattttct 240
 ggggtcccag acaggttcag tggcagtgga tcagggacag atttcacact caagatcagc 300
 agagtggagg ctgaggatct gggagtttat ttctgcttc aaaglacaca tgttccttgg 360
 acgttcggtg gaggcaccaa gctagaaatc aaacgggctg atgctgcacc aactgta 417
 <210> 31
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> 小家鼠
 <400> 31
 gaggtgcagc tggaggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc cctgaaactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatggca tgtcttgggt tcgccagact 120
 ccagacaaga ggctggaatt ggtcgcaagc atcaatagta atggtggtag cacctattat 180
 ccagacagtg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240
 ctgcaaatga gcagtctgaa gtctgaggac acagccatgt attactgtgc aagtgggtgac 300
 tactggggcc aaggctccac tctcacagtc tctca 336
 <210> 32
 <211> 408
 <212> DNA
 <213> 小家鼠
 <400> 32
 atgrasttsg ggytcagmtt grtttcctt gcccttattt taaaaggtgt ccaatgtgag 60
 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gagggtcctt gaaactctcc 120
 tgtgcagcct ctggattcac tticagtagc tatggcatgt ctgggttcg ccagactcca 180
 gacaagagcg tggaattggt cgcaagcatc aatagtaatg gtggtagcac ctattatcca 240
 gacagtgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg 300
 caaatgagca gtctgaagtc tgaggacaca gccatgtatt actgtgcaag tggtgactac 360
 tggggccaag gctccactct cacagtctcc tcagccaaaa caacaccc 408

十、申請專利範圍：

1. 一種人類化抗體或其片段，其可特異性地結合 β -類澱粉蛋白，其中該人類化抗體或其片段包含：
 - (i)重鏈可變區(HCVR)，其包含SEQ ID NO:15所示胺基酸序列；
 - (ii)輕鏈可變區(LCVR)，其包含SEQ ID NO:12所示胺基酸序列；及
 - (iii)人類IgG1 Fc區，其包含D265A胺基酸取代。
2. 如請求項1之人類化抗體或其片段，其中位於該Fc區之該胺基酸取代導致降低之效應子功能。
3. 一種核酸分子，其包含編碼如請求項1之人類化抗體或其片段之核苷酸序列。
4. 如請求項3之核酸分子，其包含含有編碼重鏈可變區之SEQ ID NO:24序列及編碼輕鏈可變區之SEQ ID NO:21序列之核苷酸序列。
5. 一種表現載體，其包含如請求項3或4之核酸分子。
6. 一種細胞，其包含如請求項5之表現載體。
7. 一種組合物，其包含治療有效量之如請求項1之人類化抗體或其片段，並視情況進一步包含醫藥學上可接受載劑。
8. 一種組合物，其包含治療有效量之如請求項1之人類化抗體或其片段，及一或多種以下：生物活性物質、醫藥學上可接受之載劑、稀釋劑或賦形劑。
9. 如請求項8之組合物，其中該生物活性物質係選自用於

治療類澱粉變性之化合物、抗氧化應力之化合物、抗細胞凋亡化合物、金屬螯合劑、DNA修復抑制劑、3-胺基-1-丙烷磺酸(3APS)、1,3-丙烷二磺酸鹽(1,3PDS)、 α -分泌酶活化劑、 β 及 γ 分泌酶抑制劑、 τ 蛋白、神經傳遞質、 β 摺疊斷裂劑、清除/消耗細胞組份之類澱粉 β 之引誘劑、N端截短之類澱粉 β 的抑制劑、抗發炎分子及膽鹼酯酶抑制劑(ChEI)及M1促效劑。

10. 如請求項9之組合物，其中該DNA修復抑制劑為派侖西平(pirenzepine)及代謝物。
11. 如請求項9之組合物，其中該N端截短之類澱粉 β 的抑制劑為焦穀胺酯化類澱粉 β 3-42。
12. 如請求項9之組合物，其中該膽鹼酯酶抑制劑(ChEI)為塔克林(tacrine)、雷斯替明(rivastigmine)、冬尼培唑(donepezil)及/或加蘭他敏(galantamine)。
13. 如請求項8之組合物，其中該生物活性物質為類澱粉-或 τ -修飾藥物或營養補充劑。
14. 如請求項1之人類化抗體或其片段，其係以治療有效量存在以於有需要之患者預防、治療或減輕選自以下之一或多種與類澱粉變性相關的疾病之影響：類澱粉變性、神經性病、路易體性癡呆、唐氏綜合症(Down's syndrome)、具有類澱粉變性(荷蘭類型)之遺傳性腦出血、關島帕金森-癡呆複合症(Guam Parkinson-Dementia complex)、進行性核上眼神經麻痺症、多發性硬化、庫賈氏病(Creutzfeldt Jacob disease)、帕金森氏病、HIV相

關性癱瘓、ALS(肌萎縮性側索硬化)、成年發病型糖尿病、老年心臟類澱粉變性、內分泌腫瘤、 β -類澱粉誘發之神經退化、及黃斑退化。

15. 如請求項14之人類化抗體或其片段，其中該神經性病症為阿茲海默氏症(AD)。
16. 如請求項14之人類化抗體或其片段，其中對罹患以認知記憶容量喪失為特徵之類澱粉變性相關疾病之患者進行治療可導致認知記憶容量增加或完全恢復。
17. 如請求項16之人類化抗體或其片段，其中該患者為哺乳動物。
18. 如請求項16之人類化抗體或其片段，其中該患者為人類。
19. 一種可特異性地結合 β -類澱粉蛋白之人類化抗體或其片段之用途，其係用以製備用於診斷類澱粉相關疾病或病狀之方法之套組試劑，其中該方法包含以下步驟：
 - (a) 使懷疑含有 β -類澱粉蛋白之患者組織樣品或特定軀體部分與如請求項1之人類化抗體或其片段接觸；
 - (b) 使該抗體或其片段結合 β -類澱粉蛋白；
 - (c) 偵測與 β -類澱粉蛋白結合之抗體或其片段；及
 - (d) 將有或無結合抗體與樣品或特定軀體部分中 β -類澱粉蛋白之有或無找出相關聯性。
20. 一種可特異性地結合 β -類澱粉蛋白之人類化抗體或其片段之用途，其係用以製備用於測定患者組織及/或體液樣品中類澱粉樣斑塊負擔程度之方法之套組試劑，其中該

方法包含以下步驟：

- (a) 以如請求項1之人類化抗體或其片段測試該樣品之 β -類澱粉蛋白之存在；
- (b) 測定與 β -類澱粉蛋白結合之抗體或其片段的含量；
及
- (c) 計算該患者組織及/或體液中之斑塊負擔。

- 21. 一種用於偵測及診斷類澱粉相關疾病及病症的測試套組，其包含如請求項1之人類化抗體或其片段，並視情況另包含使用該抗體用於以下目的之說明書：與 β -類澱粉蛋白結合以形成免疫複合體及偵測該免疫複合體之形成，使得該免疫複合體之有或無與 β -類澱粉蛋白之有或無具有相關聯。
- 22. 一種製備人類化抗體或其片段之方法，其中該方法包含培養包含如請求項3或4之核酸分子之細胞。
- 23. 如請求項22之方法，其進一步包含純化由該細胞產生之人類化抗體或其片段之步驟。
- 24. 一種治療有效量之如請求項1之人類化抗體或其片段之用途，其係用以製備用於預防、治療或減輕選自以下之一或多種與類澱粉變性相關的疾病之影響之藥劑：類澱粉變性、神經性病症、路易體性癡呆、唐氏綜合症(Down's syndrome)、具有類澱粉變性(荷蘭類型)之遺傳性腦出血、關島帕金森-癡呆複合症(Guam Parkinson-Dementia complex)、進行性核上眼神經麻痺症、多發性硬化、庫賈氏病(Creutzfeldt Jacob disease)、帕金森氏

病、HIV相關性癡呆、ALS(肌萎縮性側索硬化)、成年發病型糖尿病、老年心臟類澱粉變性、內分泌腫瘤、 β -類澱粉誘發之神經退化、及黃斑退化。

25. 如請求項24之用途，其中該神經性病症為阿茲海默氏症(AD)。