



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I424162 B

(45)公告日：中華民國 103 (2014) 年 01 月 21 日

(21)申請案號：098143984

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 12 月 21 日

(51)Int. Cl. : G01N33/566 (2006.01)

G01N33/68 (2006.01)

(30)優先權：2008/12/22 歐洲專利局

08022235.9

(71)申請人：赫孚孟拉羅股份公司 (瑞士) F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (CH)  
瑞士(72)發明人：依席居 烏拉奇 ESSIG, ULRICH (DE)；豪席 瓦夫崗 HOESEL, WOLFGANG  
(DE)；史都本拉奇 凱 甘諾 STUBENRAUCH, KAY-GUNNAR (DE)；渥吉 魯  
道夫 VOGEL, RUDOLF (DE)

(74)代理人：陳長文

(83)生物材料寄存：

食品工業發展研究所 BCRC 960411 2010 年 03 月 19 日

(56)參考文獻：

EP 1917854A1

US 2007/0093415A1

審查人員：陳逸霖

申請專利範圍項數：12 項 圖式數：6 共 0 頁

(54)名稱

結合抗澱粉狀蛋白  $\beta$  肽抗體之抗遺傳性型抗體ANTI-IDIOTYPE ANTIBODY AGAINST AN ANTIBODY AGAINST THE AMYLOID  $\beta$  PEPTIDE

(57)摘要

本發明係關於一種會與抗澱粉狀蛋白  $\beta$  肽抗體的互補決定區結合之抗遺傳性型抗體。在一項實施例中，該抗體與自細胞系 DSM ACC2939(對應於 BCRC 960411)獲得之抗體相同的抗原決定部位或重疊的抗原決定部位結合。亦提出一種用於測定抗澱粉狀蛋白  $\beta$  肽抗體及測定會與抗澱粉狀蛋白  $\beta$  肽抗體結合之抗遺傳性型抗體之免疫分析法。

The current invention is directed to an anti-idiotypic antibody binding to the complementary determining region of an antibody against the amyloid  $\beta$  peptide. In one embodiment said antibody binds to the same epitope or an overlapping epitope as the antibody obtainable from the cell line DSM ACC2939 (corresponding to BCRC 960411). Also reported is an immunoassay for the determination of an antibody against the amyloid  $\beta$  peptide and for determination of an anti-idiotypic antibody binding to an antibody against the amyloid  $\beta$  peptide.

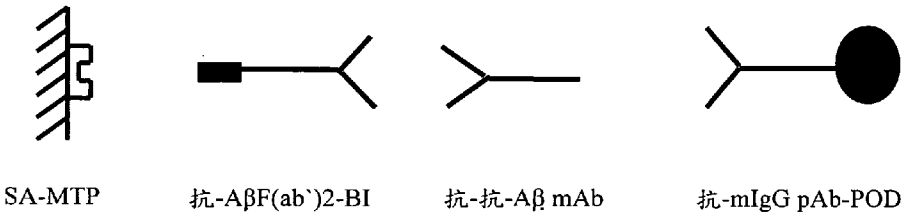


圖 1

# 發明專利說明書

中文說明書替換頁(102年7月)

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：098143984

※ 申請日：98.12.21

※ IPC 分類：

G01N 33/566 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

## 一、發明名稱：(中文/英文)

結合抗澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽抗體之抗遺傳性型抗體ANTI-IDIOTYPE ANTIBODY AGAINST AN ANTIBODY AGAINST THE  
AMYLOID  $\beta$  PEPTIDE

## 二、中文發明摘要：

本發明係關於一種會與抗澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽抗體的互補決定區結合之抗遺傳性型抗體。在一項實施例中，該抗體與自細胞系 DSM ACC2939(對應於 BCRC 960411)獲得之抗體相同的抗原決定部位或重疊的抗原決定部位結合。亦提出一種用於測定抗澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽抗體及測定會與抗澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽抗體結合之抗遺傳性型抗體之免疫分析法。

## 三、英文發明摘要：

The current invention is directed to an anti-idiotypic antibody binding to the complementary determining region of an antibody against the amyloid  $\beta$  peptide. In one embodiment said antibody binds to the same epitope or an overlapping epitope as the antibody obtainable from the cell line DSM ACC2939 (corresponding to BCRC 960411). Also reported is an immunoassay for the determination of an antibody against the amyloid  $\beta$  peptide and for determination of an anti-idiotypic antibody binding to an antibody against the amyloid  $\beta$  peptide.

#### 四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

#### 五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)

## 六、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種會與抗-A $\beta$ 抗體結合之抗遺傳性型抗體及一種檢測會與抗-A $\beta$ 抗體上相同或重疊的抗原決定部位結合之抗體的分析法。

### 【先前技術】

約70%的所有癡呆病例歸因於阿茲海默氏症，其係與對認知力極重要之大腦區域及神經回路之選擇性損傷有關。阿茲海默氏病之特徵為神經原纖維纏結，尤其是在海馬區之錐體神經元及主要含澱粉狀蛋白沉積物之緻密核心及呈淡染暈圈之大量澱粉狀蛋白斑。

位於細胞外的神經炎斑包含大量的占主導地位之纖維狀肽，其稱為「澱粉狀蛋白 $\beta$ 」、「A-beta」、「A $\beta$ 4」、「 $\beta$ -A4」或「A $\beta$ 」（參見諸如Selkoe, D.J., Ann. Rev. Cell Biol. 10 (1994) 373-403；Koo, E.H., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (1999) 9989-9990；US 4,666,829；或Glenner, G.G., Biochem. Biophysic. Res. Commun. 122 (1984) 1131-1135)。此澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽係衍生自「阿茲海默氏(Alzheimer)前體蛋白/ $\beta$ -澱粉狀蛋白前體蛋白」(APP)。APP係嵌入膜糖蛋白(參見諸如Sisodia, S.S., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 6075-6079)且在A $\beta$ 序列內藉由血漿膜蛋白酶( $\alpha$ -分泌酶)(參見上述Sisodia (1992)文獻)進行蛋白質內切水解而分解。此外，其他分泌酶活性，尤其是 $\beta$ -分泌酶及 $\gamma$ -分泌酶活性，導致細胞外釋放澱粉狀蛋白- $\beta$

(A $\beta$ )，該澱粉狀蛋白-A $\beta$  (A $\beta$ )包括39個胺基酸(A $\beta$ 39)、40個胺基酸(A $\beta$ 40)、42個胺基酸(A $\beta$ 42)或43個胺基酸(A $\beta$ 43)(參見諸如 Sinha, S., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (1999) 11049-11053 ; Price , D.L., Science 282 (1998) 1079-1083 ; WO 00/72880 ; 或 Hardy , J., Trends in Neuroscience (1997) 154-159)。

應注意到A $\beta$ 具有若干天然形式，藉此人類形式係指以上提及之A $\beta$ 39、A $\beta$ 40、A $\beta$ 41、A $\beta$ 42及A $\beta$ 43。最突出的形式A $\beta$ 42，具有以下胺基酸序列(自N-末端開始)：DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGV VIA (SEQ ID NO: 13)。在A $\beta$ 41、A $\beta$ 40、A $\beta$ 39中，分別缺失C-端A、IA及VIA。在A $\beta$ 43-形式中，上述序列之C-末端中另包含附加的蘇胺酸殘基。

使用抗體的標準固相免疫分析法包括：在吸附/固定於固相上之抗體(捕捉抗體)、抗原、及與酶或可檢測標記共軛之抗原的另一抗原決定部位之抗體(示蹤抗體)之間形成錯合物。在該分析中，形成夾層結構：固相/捕捉抗體/抗原/示蹤抗體。在該夾層結構(除其他物質外)所催化之反應中，與抗體共軛之酶之活性應與培養介質中抗原濃度成比例。標準的夾層結構方法亦稱為雙抗原橋連免疫測定，因為捕捉抗體及示蹤抗體可結合相同抗體之不同抗原決定部位。Hoesel, W., 等人(J. Immunol. Methods 294 (2004) 101-110)報告了一種抗-EPO雙抗原橋連分析法，其中使用到與胺基及碳水化合物基偶合之固定化rhEPO之混合物。



在研究患者對藥物抗體產生之免疫反應中，免疫測定法(諸如雙抗原橋連ELISA)係一般分析類型。Mire-Sluis, A.R., 等人(J. Immunol. Methods 289 (2004) 1-16)總結了關於免疫分析之設計及最適化之建議，其使用針對生物技術產物之宿主抗體進行檢測。抗藥物抗體分析法述於(例如)WO 2005/045058及WO 90/006515中。抗遺傳性型抗體分析法述於(例如)US 5,219,730、WO 87/002778、EP 0 139 389及EP 0 170 302中。Wadhwa, M., 等人(J. Immunol. Methods 278 (2003) 1-17)報告了用於檢測、測定及特徵分析由治療性生物製品誘發的非所需抗體之方法。US 2007/0093415中有報告澱粉狀蛋白特異性肽及其用途。EP 1 917 854中有報告一種用於製造抗遺傳性型抗體之方法。

### 【發明內容】

本發明第一態樣關於一種會與抗澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽抗體結合之抗遺傳性型抗體及其於根據本發明分析法中之用途。在一項實施例中，該抗體之特徵為其會與來自寄存之細胞系DSM ACC2939(對應於BCRC 960411)的抗體相同或重疊的抗原決定部位結合。另一實施例中，該抗體係自寄存之細胞系DSM ACC2939(對應於BCRC 960411)獲得之抗體。

本發明其他態樣係一種使用免疫分析法測定樣品中抗澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽抗體之免疫學方法，及一種使用免疫分析法測定樣品中結合抗澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽抗體之抗遺傳性型抗體之免疫學方法。

測定樣品中抗澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽抗體的免疫學方法之一項

實施例中，該免疫分析法包括捕捉抗體、示蹤抗體及檢測抗體，其中該捕捉抗體係一種利用鏈黴抗生物素蛋白與固相共軛且會結合抗澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽抗體之生物素基化抗遺傳性型抗體，該示蹤抗體係與作為可檢測標記物之地高辛共軛且會結合抗澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽抗體之抗遺傳性型抗體，及該檢測抗體係與辣根過氧化物酶共軛之抗地高辛抗體。

測定樣品中抗澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽抗體之免疫學方法之另一實施例中，該免疫分析法包括與固相共軛之澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽、與作為可檢測標記物之地高辛共軛且會結合抗澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽抗體之抗遺傳性型抗體及與辣根過氧化物酶共軛之抗地高辛檢測抗體。

在一項實施例中，會結合抗澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽抗體之抗遺傳性型抗體係與來自寄存之細胞系DSM ACC2939(對應於BCRC 960411)之抗體的相同或重疊的抗原決定部位結合。在另一實施例中，會結合抗澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽抗體之抗遺傳性型抗體係自寄存之細胞系DSM ACC2939(對應於BCRC 960411)獲得之抗體。

測定樣品中會結合抗澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽抗體之抗遺傳性型抗體的免疫學方法之一項實施例中，該免疫分析法包括捕捉抗體及示蹤抗體，其中該捕捉抗體係與配對結合中第一部份共軛的抗澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽抗體，及該示蹤抗體係與可檢測標記物共軛之抗澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽抗體。在一項實施例中，該免疫測定法包括與辣根過氧化物酶共軛之抗地高辛檢測抗體。

測定樣品中會結合抗澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽抗體之抗遺傳性型



抗體的免疫學方法之另一實施例中，該免疫分析法包括與固相共軛之澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽、與作為可檢測標記物之地高辛共軛之抗澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽抗體及與辣根過氧化物酶共軛之抗地高辛檢測抗體。

在根據本發明方法之一項實施例中，免疫分析法包括捕捉抗體及示蹤抗體，其中該捕捉抗體係含至少兩種抗體之混合物，其不同處在於其與固相共軛之抗體位點；及該示蹤抗體係含至少兩種抗體之混合物，其不同處在於其與可檢測標記物共軛之抗體位點。

在一項實施例中，抗體與其共軛搭配物之共軛作用係經由N-末端及/或 $\epsilon$ -胺基(離胺酸)、不同離胺酸之 $\epsilon$ -胺基、藥物抗體之胺基酸主鏈之羧基-、巰基-、羥基-及/或酚官能基及/或藥物抗體之碳水化合物結構之糖醇基之化學鍵結進行。在另一實施例中，捕捉抗體混合物包括經由胺基及經由碳水化合物結構與其共軛搭配物共軛之抗體。

在一項實施例中，抗澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽抗體係如 WO 03/070760 中所報告之抗體。在另一實施例中，抗澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽抗體包括選自 SEQ ID NO: 1、2及3之重鏈CDR3及選自 SEQ ID NO: 4、5及6之輕鏈CDR3。在另一實施例中，抗澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽抗體包括選自 SEQ ID NO: 7、8及9之重鏈可變域及/或選自 SEQ ID NO: 10、11及12之輕鏈可變域。

在另一實施例中，捕捉抗體混合物及/或示蹤抗體混合物包括利用至少兩個不同胺基與其共軛搭配物共軛之抗

[5]

體。在第一步驟中，該經由不同胺基之偶合法可藉由部份 $\epsilon$ -胺基與化學保護劑之醯化作用來進行，例如藉由檸檬康醯化作用。在第二步驟中，經由其餘胺基進行共軛。隨後，去除檸檬康醯化作用，並由該抗體利用其餘游離胺基與共軛搭配物共軛，亦即所得該抗體利用未經檸檬康醯化作用保護之胺基與共軛搭配物共軛。適宜的化學保護劑在未經保護之側鏈胺上形成鍵，且比彼等在N-端之鍵不穩定且不同。許多此等化學保護劑係已知(參見實例EP 0 651 761)。在一項實施例中，該化學保護劑包括環狀二羧酸酐，諸如馬來酸或檸檬康酸酐。

在一項實施例中，捕捉抗體係藉由被動吸附作用而與固相共軛，並因此在至少兩個不同的抗體位置與固相共軛。被動吸附作用係(例如)闡述於Butler, J.E.,之「Solid Phases in Immunoassay」(1996) 205-225及Diamandis, E.P.,及Christopoulos, T.K. (Editors)之「Immunoassays」(1996) Academic Press (San Diego) 中。

在一項實施例中，示蹤抗體混合物包括利用胺基及利用碳水化合物結構與其共軛搭配物共軛之抗體。

在另一實施例中，捕捉抗體與示蹤抗體之比例為1:10至50:1(該比例意指不考慮可能不同之共軛物分子量的抗體分子之莫耳比例)。在另一實施例中，此混合物中利用胺基共軛之抗體(示蹤或捕捉抗體)對利用碳水化合物共軛之抗體的比例為1:10至10:1(該比例意指不考慮可能不同之共軛物分子量的抗體分子之莫耳比例)。

在本發明一項實施例中，捕捉抗體係利用特定結合配對共軛(固定)。在一項實施例中，此結合配對(第一組分/第二組分)係選自鏈黴抗生物素蛋白或抗生物素蛋白/生物素、抗體/抗原(參見(例如)Hermanson, G.T., 等人之 Bioconjugate Techniques, Academic Press, 1996)、外源凝集素/多醣、類固醇/類固醇結合蛋白、荷爾蒙/荷爾蒙受體、酶/受質、IgG/蛋白質 A 及/或 G，等。在一項實施例中，捕捉抗體係與生物素共軛，並利用固定化之抗生物素蛋白或鏈黴抗生物素蛋白進行固定。

在另一實施例中，示蹤抗體係與可檢測標記物共軛。在另一實施例中，示蹤抗體係利用地高辛及抗地高辛抗體與可檢測標記物共軛。或者，示蹤抗體與電化學發光標記物，諸如雙吡啶鈣錯合物共軛。

### 【實施方式】

根據本發明術語「抗澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽抗體」係指一種可投與個體之抗體，使得該個體在投與後之採樣疑似含有該抗體。根據本發明一種分析法中，捕捉抗體及示蹤抗體包括「相同」抗體分子，例如由相同表現載體重組產生且包括相同胺基酸序列。抗澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽抗體闡述於(例如)US 7,256,273、US 7,189,819、US 7,179,892、US 7,195,761、US 2008/0281082、US 2008/0221306、US 2008/0131422、US 2008/0050367、US 2007/0238154、US 2007/0154480、US 2007/0110750、US 2006/0280743、US 2006/0292152、US 2006/0165682、US 2006/0057701、US

2006/0057702、US 2006/0039906、US 2005/0249725、US 2005/0169925、US 2005/0118651、US 2005/0009150、US 2004/0171816、US 2004/0171815及US 2004/0192898中。

「抗遺傳性型抗體」係對抗治療性抗體之抗原結合位點(亦即可變區域，諸如互補決定區域)之抗體。此等抗遺傳性型抗體可出現在抗體治療期間患者產生免疫性反應時(參見Pan, Y.,等人，FASEB J. 9 (1995) 43-49)。在一項實施例中，該結合抗澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽抗體之抗遺傳性型抗體係與抗澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽抗體之一或多個CDR結合。

本發明第一態樣係會結合抗澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽抗體之抗遺傳性型抗體。本發明此態樣之抗體實例係自寄存的細胞系DSM ACC2939(對應於BCRC 960411)獲得之抗體。此抗體及其於根據本發明分析法中之用途亦包括在本發明之態樣中。在一項實施例中，該抗遺傳性型抗體之特徵為會與來自寄存的細胞系DSM ACC2939(對應於BCRC 960411)之抗體相同的或重疊的抗原決定部位結合。利用固定化抗體及可溶性抗原藉由表面電漿共振(SPR)分析法，其中所探討之抗原決定部位的濃度為20-50 nM且該重疊之抗原決定部位所檢測抗體之濃度為100 nM時，若測定信號減少50%或更多，在一項實施例中減少75%或更多，則兩個抗原決定部位係重疊，或反之亦然。或者，一種可採用之方法係藉助於競爭測試系統，測定與相同抗原結合的兩個抗體之重疊之抗原決定部位。就此目的而言，例如藉助於利用表現重組抗原決定部位之細胞進行以細胞為主之酶素免疫分析

法(ELISA)，測試該重疊之抗原決定部位所需檢測之抗體是否與其他抗體競爭結合至固定化抗原。就此目的而言，此固定化抗原係與呈標記物形式之抗體及該重疊之抗原決定部位所需測定之過量抗體培養。藉由檢測標記物之結合量即很容易確定重疊之抗原決定部位。若在相同的濃度下，信號減少70%以上，在一項實施例中80%以上；或在更高濃度下，例如：當該重疊之抗原決定部位所需檢測之抗體(稱為已知抗體)之用量超過 $10^5$ 倍時，信號減少80%以上，在一項實施例中90%以上，則該抗原決定部位相同或重疊，且該兩種抗體會與相同抗原上之相同或重疊的抗原決定部位結合。根據本發明之抗遺傳性型抗體係對抗與澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽之胺基酸序列特異性結合(例如在一項實施例中，與SEQ ID NO: 13之胺基酸殘基結合)之抗體。

不同的免疫分析法原理係藉由(例如)Hage, D.S. (Anal. Chem. 71 (1999) 294R-304R)闡述。Lu, B., 等人(Analyst 121 (1996) 29R-32R)報告用於免疫分析法之抗體的定向固定化作用。抗生物素蛋白-生物素-介導的免疫分析法係報告於(例如)Wilchek, M.及Bayer, E.A.之Methods Enzymol. 184 (1990) 467-469中。

單株抗體及其不變區域包含許多反應性側鏈作為蛋白質，用於與結合搭配物(諸如表面、蛋白質、聚合物(諸如PEG、纖維素或聚苯乙烯)、酶或結合配對中之一員)偶合。抗體之化學反應性基團係(例如)胺基(離胺酸、 $\alpha$ -胺基)、硫醇基(胱胺酸、半胱胺酸及甲硫胺酸)、羧酸基(天

冬胺酸、麩胺酸)及糖-醇基。此等方法係闡述於Aslam M. 及 Dent, A. 之「Bioconjugation」, MacMillan Ref. Ltd. 1999, 第50至100頁中。

蛋白質最常見之反應性基團之一係胺基酸離胺酸之脂族 $\epsilon$ -胺基。一般而言, 將近所有抗體皆包含大量離胺酸。離胺酸係pH大於8.0( $pK_a=9.18$ )之極佳親核劑, 因此易於俐落地與不同試劑反應, 形成穩定鍵。胺反應性試劑主要與離胺酸及蛋白質之 $\alpha$ -胺基反應。反應性酯, 特別是N-羥基-琥珀醯亞胺(NHS)酯, 係用於修飾胺基之最常用試劑。用於水性環境中之反應的最適宜pH為pH 8.0至9.0。異硫氰酸酯係胺修飾試劑, 且與蛋白質形成硫脲鍵。此等與蛋白質胺在水性溶液中反應(最佳為pH 9.0至9.5)。醛在溫和水性條件下與脂族及芳族胺、肼及醯肼反應, 形成亞胺中間物(席夫鹼(Schiff's base))。席夫鹼可經溫和或強力還原劑(諸如硼氫化鈉或氰基硼氫化鈉)選擇性還原, 得到穩定烷基胺鍵。已用於修飾胺之其他試劑為酸酐。舉例而言, 二伸乙基三胺五乙酸酸酐(DTPA)係雙官能性螯合劑, 其包含兩個胺反應性酸酐基團。其可與蛋白質N-末端及 $\epsilon$ -胺基反應, 形成醯胺鏈結。打開酸酐環, 以產生多價、金屬螯合臂, 能夠在配位錯合物中與金屬牢固結合。

抗體中另一個常見反應性基團係來自含硫胺基酸胱胺酸及其還原產物半胱胺酸(或半-胱胺酸)之硫醇殘基。半胱胺酸包含游離硫醇基, 其比胺更具親核性, 且一般係蛋白質中最高反應性官能基。硫醇在中性pH下一般具有反應性,

且因此可在胺的存在下選擇性偶合其他分子。由於游離巰基相當具反應性，因此含此等基團之蛋白質經常以二硫化物基團或二硫化物鍵之氧化形式存在。在此等蛋白質中，需要以試劑(諸如二硫蘇糖醇(DTT))還原二硫化物鍵，產生反應性游離硫醇。硫醇反應性試劑係彼等可與蛋白質上硫醇基團偶合，形成硫醚偶合產物者。此等試劑在弱酸性至中性pH下可快速反應，因此可在胺基存在下選擇性反應。文獻報告若干種硫醇化交聯劑(諸如陶氏(Traut's)試劑(2-亞胺基硫雜環戊烷)、琥珀醯亞胺基(乙醯基硫基)醋酸酯(SATA)及磺基琥珀醯亞胺基6-[3-(2-吡啶基硫基)丙醯胺基]己酸酯(Sulfo-LC-SPDP))之用途，以提供經由反應性胺基引入多個巰基之有效方式。鹵代乙醯類衍生物(例如碘乙醯胺)會形成硫醚鍵，亦係用於修飾硫醇之試劑。其他適用的試劑為馬來醯亞胺。馬來醯亞胺與硫醇反應性試劑之反應基本上如同其與碘乙醯胺之反應。馬來醯胺在弱酸性至中性pH下快速反應。

抗體中另一常見反應性基團為羧酸。蛋白質在天冬胺酸及麩胺酸C-末端位置及其側鏈內包含羧酸基。羧酸在水中之反應性相當低，一般很難利用此等基團選擇性修飾蛋白質及其他生物分子。當使用時，一般利用水可溶性碳化二亞胺將羧酸基團轉化成反應性酯，並與親核性試劑(諸如胺、醯肼或肼)反應。此含胺試劑應為弱鹼性，以與活化羧酸在更高鹼性之離胺酸之 $\epsilon$ -胺存在下選擇性反應，形成穩定的醯胺鍵。當pH升高至高於8.0時，會出現蛋白質交

聯。

過碘酸鈉可用於使抗體所附接碳水化合物部份基團內之糖之醇部份氧化成醛。每個醛皆可與胺、醯肼或肼反應，如羧酸所述之反應。由於碳水化合物部份基團主要發現於抗體之可結晶片段(Fc)區域，因此可利用遠離抗原結合位點之碳水化合物的定點修飾而達成共軛。形成席夫鹼(Schiff's base)中間物，該中間物利用氰基硼氫化鈉(溫和且具選擇性)或硼氫化鈉(強力)水可溶性還原劑之還原作用還原成烷基胺。

術語「樣品」包括(但不限於)來自活生物或曾為活生物之任何數量的物質。該等活生物包括(但不限於)人類、小鼠、猴、大鼠、兔及其他動物。該等物質包括(但不限於)來自個體之全血、血清或血漿，其係臨床路徑中最廣泛使用之樣品來源。

術語「固相」意指非流體物質，包括由以下材料製造之顆粒(包括微粒及珠粒)，諸如聚合物、金屬(順磁性、鐵磁性顆粒)、玻璃及陶瓷；凝膠物質，諸如矽石、礬土及聚合物凝膠、毛細管，其可由聚合物、金屬、玻璃及/或陶瓷、沸石及其他孔狀物質製成；電極；微量滴定板；固體；測光管、試管或其他光譜儀樣品容器。分析法之固相組分與該分析法可能接觸之惰性固體表面之區別在於，「固相」之表面上包含至少一種希望與捕捉藥物抗體相互作用之基團。固相可為固定組分，諸如試管、條狀、測光管或微量滴定板，或者可為非固定組分，諸如珠粒及微



粒。有多種不同微粒可與蛋白質及可能使用到的其他物質進行非共價或共價連結。該等顆粒包括聚合物顆粒，諸如聚苯乙烯及聚(甲基丙烯酸甲酯)；金顆粒，諸如金奈米顆粒及金膠體；及陶瓷顆粒，諸如矽石、玻璃及金屬氧化物顆粒。參見(例如)Martin, C.R.等人之Analytical Chemistry-News & Features, 70 (1998) 322A-327A或Butler, J.E.之Methods 22 (2000) 4-23。

在一項實施例中，可自發色體(發螢光或發光基團及染料)、酶、NMR-活性基團、金屬顆粒或半抗原(haptens)(諸如地高辛)中選擇可檢測標記物。該可檢測標記物亦可為光可激活之交聯基團，諸如疊氮基或氮雜環丙烯基。在一項實施例中，可利用電化學發光法檢測之金屬螯合物亦可作為信號發射基團，特別佳係鈣螯合物，諸如鈣(雙吡啶基)<sub>3</sub><sup>2+</sup>螯合物。適宜的鈣標記基團係闡述於(例如)EP 0 580 979、WO 90/05301、WO 90/11511及WO 92/14138中。

本發明提供一種使用免疫分析法測定樣品中會結合抗澱粉狀蛋白β抗體之抗遺傳性型抗體之免疫學測定方法，該免疫分析法包括捕捉抗體及示蹤抗體。在一項實施例中，該免疫分析係抗原橋連免疫分析法。在另一實施例中，該免疫分析法包括捕捉抗體及示蹤抗體，其中該捕捉抗體係抗澱粉狀蛋白β抗體之混合物，其包含至少兩種抗體，其不同處在於其與固相共軛之抗體位點，及該示蹤抗體係抗澱粉狀蛋白β抗體之混合物，其包含至少兩種抗體，其不同處在於其與可檢測標記物共軛之抗體位點。

通常/一般所用分析法在定量及/或定性樣品中抗澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽抗體時受到限制，其原因在於(例如)抗澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽抗體與澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽之結合產生變化。已發現，在免疫分析中使用根據本發明會結合抗澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽抗體之抗體(抗-抗-A $\beta$ 抗體抗體)可以克服此等限制。

適用於根據本發明方法的捕捉抗體係與固相共軛。在一項實施例中，此共軛作用係利用以下基團之化學結合達成：N-末端及/或 $\epsilon$ -胺基(離胺酸)、不同離胺酸之 $\epsilon$ -胺基、該抗體胺基酸主鏈之羧基-、巯基-、羥基-及/或酚官能基及/或該抗體碳水化合物結構之糖醇基。在一項實施例中，適用於根據本發明方法的捕捉抗體係至少兩種與固相共軛之抗體的混合物，其中該等至少兩種與固相共軛之抗體之不同處在於其與固相之共軛位點。舉例而言，至少兩種與固相共軛之抗體的混合物可包括一個利用該抗體胺基酸主鏈之胺基酸與該固相共軛的抗澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽抗體及一個經由該抗體之碳水化合物結構之糖醇基與該固相共軛的抗澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽抗體。亦舉例而言，該至少兩種與固相共軛之抗體的混合物可包括利用其胺基酸主鏈之不同胺基酸殘基與該固相共軛之抗體。詞組「不同胺基酸殘基」係指兩種不同種類的胺基酸，諸如離胺酸與天冬胺酸，或酪胺酸與麩胺酸，或者在該抗體胺基酸序列中不同位置的胺基酸主鏈之兩種胺基酸殘基。在後一情況中，該胺基酸可為相同或不同種類。詞組「不同抗體位點」以及「位

點」係指位點的種類不同(諸如胺基酸或糖醇基)，或在胺基酸主鏈之胺基酸數量的不同(諸如在該抗體與該固相共軛之位點)。此點同樣可應用在適用於根據本發明方法的示蹤抗體。

本發明一項實施例中，抗澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽抗體之重鏈可變區域包括具有選自SEQ ID NO: 1、2或3之胺基酸序列的CDR3。在另一實施例中，抗澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽抗體之輕鏈可變區域包括具有選自SEQ ID NO: 4、5或6之胺基酸序列的CDR3。在另一實施例中，抗澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽抗體包括具有選自SEQ ID NO: 7、8或9之胺基酸序列的重鏈可變區域。在另一實施例中，抗澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽抗體包括具有選自SEQ ID NO: 10、11或12之胺基酸序列的輕鏈可變區域。

根據本發明方法之一項實施例中，免疫分析法包括作為捕捉抗體的單株抗澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽抗體之F(ab')<sub>2</sub>片段，其已生物素基化並利用鏈黴抗生物素蛋白與固相共軛；及作為示蹤抗體之與辣根過氧化物酶共軛的多株抗人類免疫球蛋白G抗體。

根據本發明方法之另一實施例中，免疫分析法係雙抗原橋連免疫分析法。

根據本發明方法之另一實施例中，免疫分析法包括捕捉抗體、示蹤抗體及檢測抗體，其中該捕捉抗體係利用鏈黴抗生物素蛋白與固相共軛之生物素基化抗澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽抗體，該示蹤抗體係與地高辛共軛之抗澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽抗體，及該檢測抗體係與辣根過氧化物酶共軛之抗地高辛抗

[51]

體。

根據本發明方法另一實施例中，免疫分析法包括捕捉抗體、示蹤抗體及檢測抗體，其中該捕捉抗體係利用鏈黴抗生物素蛋白與固相共軛之會結合抗澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽之生物素基化抗遺傳性型抗體，該示蹤抗體係與作為可檢測標記物之地高辛共軛之會結合抗澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽抗體之抗遺傳性型抗體，及該檢測抗體係與辣根過氧化物酶共軛之抗地高辛抗體。

根據本發明方法之另一實施例中，免疫分析法包括與固相共軛的澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽、與作為可檢測標記物之地高辛共軛之會結合抗澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽抗體之抗遺傳性型抗體、及與辣根過氧化物酶共軛之抗地高辛檢測抗體。

根據本發明之小鼠-小鼠雜交瘤細胞系：雜交瘤細胞系 MAK<Mab31>M-1.5.74 係依據布達佩斯條約，寄存在國際認可專用於專利程序的微生物寄存處，德國微生物與細胞培養物保存處 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ))，寄存日期 2008 年 7 月 29 日，登錄號 DSM ACC2939。

提供以下實例、序列表及圖示以利於更佳理解本發明，其確實範疇已闡述於申請專利範圍中。應瞭解，可在不偏離本發明主旨下，對程序進行修飾。

## 實例

### 實例 1

#### 抗澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽抗體之 F(ab')<sub>2</sub> 片段之製備

舉例而言，抗澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽抗體(抗A $\beta$ 抗體)及其相應的核酸序列實例係報告於WO 2003/070760或US 2005/0169925或於SEQ ID NO: 1至12中。

將於100 mM檸檬酸鈉緩衝液(pH 3.6)中之抗A $\beta$ 抗體與胃蛋白酶培養(每mg抗體用5  $\mu$ g胃蛋白酶)。藉由分析級凝膠過濾法分析其片段，在50分鐘之後，使用磷酸鉀將pH調節至7.0而停止反應。該混合物相對於pH 7.5之含300 mM氯化鈉之50 mM磷酸鉀緩衝液透析之後，將製劑濃縮至約20 mg/ml，並施加至凝膠過濾管柱(Superdex 200)上。將回收的部份藉由分析級凝膠過濾法分析，並將包含F(ab')<sub>2</sub>片段之部份施加至含有會結合人類Fc $\gamma$ 之固定化多株抗體之親和基質上，以消除微量的含Fc $\gamma$ 片段。集中流出物並且最終濃縮至約20 mg/ml。

## 實例2

### 單株抗遺傳性型抗體之製造

#### a) 小鼠之免疫接種法

取分別為8-12周齡之雌Balb/c或NMRI小鼠，首先用100  $\mu$ g的單株抗A $\beta$ 抗體之F(ab')<sub>2</sub>片段(依實例1所述獲得，且與CFA(弗氏完全佐劑)混合)經腹膜內免疫接種，該片段包括選自SEQ ID NO: 7至9之重鏈可變區域及選自SEQ ID NO: 10至12之輕鏈可變區域。在4、7及10周後，再進行三個腹膜內免疫接種步驟，每隻鼠施用100  $\mu$ g與IFA(弗氏不完全佐劑)混合之上述F(ab')<sub>2</sub>片段。繼之，在融合前三天，分別使用25至100  $\mu$ g含於PBS(磷酸鹽緩衝鹽水)中之F(ab')<sub>2</sub>片

[5]

段，經靜脈內或腹膜內追加免疫接種。

#### b) 融合及選殖

根據 Galfré, G., 及 Milstein, C. (Galfré, G., and Milstein, C., Methods Enzymol. 73 (1981) 3-46), 使來自根據 a) 免疫接種之小鼠脾細胞所衍生骨髓瘤細胞進行融合。將約  $1 \times 10^8$  個脾細胞與  $2 \times 10^7$  個骨髓瘤細胞 (P3x63-Ag8.653, ATCC CRL1580) 混合，並離心 (在  $4^\circ\text{C}$ ， $300 \times g$  下 10 分鐘)。然後使用不含 FCS (胎牛血清) 之培養基 RPMI 1640 沖洗細胞一次，及在  $400 \times g$  下於 50 ml 尖角瓶中再次離心。繼而，添加 1 ml 的 PEG (聚(乙二醇)，分子量 4,000 g/mol)。藉由吸液管完成混合。1 分鐘之後，在  $37^\circ\text{C}$  水浴中，滴加 5 ml 的不含 FCS 之 RPMI 1640。混合懸浮液，使用含 10% (v/v) FCS 之 RPMI 1640 填滿至 50 ml，隨後離心。將沉澱之細胞再懸浮於含 10% FCS 之 RPMI 1640 中，及塗佈於含生長因子介白素 6 (IL-6, 100 U/ml) 之次黃嘌呤-氮雜絲胺酸選拔培養基 (在含 10% FCS 之 RPMI 1640 中，100 毫莫耳/升次黃嘌呤，1  $\mu\text{g/ml}$  氮雜絲胺酸) 中。在約 10 天後，分析初培養物之特異性抗體合成 (參見實例 3)。取對上述  $\text{F(ab')}_2$  片段展現結合性且對人類 IgG 無交叉反應，且已顯示為抗遺傳性型之初培養物，使用流動細胞計數儀 (FACS Aria, BD 生物科學)，分別將單細胞存放在 96-孔細胞培養盤中，其中之培養基包含生長因子介白素 6 (100 U/ml)。根據此製程產生寄存之純系 1.5:74 (表 1)。適用於本發明的細胞系寄存於德國微生物與細胞培養物保存處 (Deutsche Sammlung von

Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ))。

表 1：產生抗遺傳性型單株抗體之純系

| 純系     | IgG類及子類     | 寄存編號        | 寄存日期       |
|--------|-------------|-------------|------------|
| 1.5.74 | IgGX, kappa | DSM ACC2939 | 29.07.2008 |

### c) 自細胞培養物上清液製造免疫球蛋白

將所生成的雜交瘤細胞系依  $1.0 \times 10^5$  個細胞/ml 的原始細胞密度接種於補充 10% FCS 之 RPMI 1640 培養基中，及於旋轉培養物中擴增。自此，在 Miniperm 培養單元中接種細胞，在補充 10% FCS 之 RPMI 1640 培養基中之原始細胞密度(活細胞)為  $2.4 \times 10^6$  個細胞/ml，並擴增。在所得培養物上清液中，獲得濃度為 1.2 mg/毫升的單株抗體。根據標準蛋白質化學方法，例如根據 Bruck, C. 等人之 Methods Enzymol. 121 (1986) 587- 596，純化來自培養物上清液之抗體。

### 實例 3

#### 檢測抗遺傳性型抗體之篩選分析

##### a) 與藥物抗體結合之抗體的初次篩選

為了測定雜交瘤細胞之培養物上清液中抗體之特異性，在經過重組鏈黴抗生物素蛋白(德國 MicroCoat, Bernried)預塗覆之 MTP(微量滴定板)上分別塗覆含於補充 1.0% (w/v) BSA 第 II 部份之 PBS 中之生物素基化單株抗 A $\beta$  抗體 (200 ng/ml) 或生物素基化人類 IgG (2  $\mu$ g/ml) (每孔 100  $\mu$ l，在環境溫度下振盪培養 60 分鐘)。繼而，用含 0.05% (w/v) Tween<sup>®</sup> 20 之 0.9% (w/v) 氯化鈉溶液沖洗三次。在下一步

[5]

中，每孔添加100  $\mu$ l的待分析抗體溶液(培養物上清液)，在環境溫度下振盪培養60分鐘。每孔使用0.9% (w/v) NaCl/0.05% Tween<sup>®</sup> 20沖洗三次之後，添加100  $\mu$ l多株羊抗小鼠Fc $\gamma$ 抗體之標記辣根過氧化物酶之F(ab')<sub>2</sub>片段並在環境溫度下振盪培養60分鐘。隨後，進行如上沖洗。最後，每孔添加100  $\mu$ l的ABTS<sup>®</sup> (德國Roche Diagnostics GmbH，目錄編號1684302)。在環境溫度下培養30分鐘之後，在可自商品購得之微量滴定板ELISA分析儀中，於405及492 nm [405/492]處測定消光度(光密度OD)。此篩選法選拔到之抗體可良好結合至單株抗A $\beta$ 抗體IgG且對人類IgG僅展現低度或甚至無交叉反應。所選拔此抗體進一步進行分析法b)。

#### b) 抗遺傳性型抗體之選拔

為了判別初次篩選法a)所選拔之抗遺傳性型抗體，進行闡述於以下之分析法。在經過重組鏈黴抗生物素蛋白(MicroCoat, Bernried, Germany)預塗覆之MTP上塗覆含於含0.5% BSA 第II部份之PBS中之生物素基化A $\beta$ 肽(250 ng/ml)(每孔100  $\mu$ l，在環境溫度下振盪培養60分鐘)，隨後用0.9% (w/v) NaCl/0.05% Tween<sup>®</sup> 20沖洗三次。在下一步中，分別添加每孔50  $\mu$ l的單株抗A $\beta$ 抗體之標記地高辛之Fab片段(2.5至15 ng/ml)，以及50  $\mu$ l的PBS(參考信號)或50  $\mu$ l的候選抗體(培養物上清液，分析信號)，並在環境溫度下振盪培養60分鐘。在以0.9% (w/v) NaCl/0.05% Tween<sup>®</sup> 20每孔沖洗三次之後，添加100  $\mu$ l的多株羊抗地高辛抗體



之標記辣根過氧化物酶之Fab片段，以用於檢測已結合之人類單株抗A $\beta$ 抗體-地高辛共軛物，並在環境溫度下振盪培養60分鐘。繼之，進行如上之沖洗。最後，每孔添加100  $\mu$ l的ABTS<sup>®</sup>(德國Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, 目錄編號1684302)。在環境溫度下培養30分鐘之後，在可自商品購得之微量滴定板ELISA分析儀中，於[405/492] nm處測定消光度。選拔出分析信號比相關的參考信號大幅減少之抗體，以作為候選物準備進一步使用。

### c) 選拔對人類IgG具最低交叉反應性之抗體

為了判別篩選法b)所選拔對人類IgG展現最低交叉反應性的候選物，進行闡述於以下之分析法。在經過重組鏈黴抗生物素蛋白(德國MicroCoat, Bernried)預塗覆之MTP上塗覆含於緩衝液中之生物素基化單株抗A $\beta$ 抗體IgG(50 ng/ml)(每孔125  $\mu$ l，環境溫度下振盪培養30分鐘)，隨後用0.9% (w/v) NaCl/0.05% Tween<sup>®</sup> 20沖洗三次。在下一步中，每孔添加100  $\mu$ l的以下物質之混合物：100  $\mu$ l的各候選抗體(培養物上清液)、100  $\mu$ l的人類IgG(至高達73 mg/ml之濃度)及200  $\mu$ l標記地高辛之單株抗A $\beta$ 抗體-Fab片段，並在環境溫度下振盪培養60分鐘。在以0.9% (w/v) NaCl/0.05% Tween<sup>®</sup> 20每孔沖洗三次之後，添加100  $\mu$ l的多株羊抗地高辛抗體之標記辣根過氧化物酶之Fab片段，以檢測已結合之單株抗A $\beta$ 抗體-Fab-地高辛共軛物，並在環境溫度下振盪培養60分鐘。繼而，進行如上沖洗。最後，每孔添加100  $\mu$ l的ABTS<sup>®</sup>(德國Roche Diagnostics GmbH，

Mannheim，目錄編號1684302)。在環境溫度下培養30分鐘之後，在可自商品購得之微量滴定板ELISA分析儀中，於[405/492] nm處測定消光度。與未添加人類IgG時之信號比較，選拔分析信號減少程度最小之抗體，以準備進一步使用。

#### 實例 4

##### 對抗單株抗A $\beta$ 抗體之小鼠單株抗遺傳性型抗體之純化法

將會結合單株抗A $\beta$ 抗體IgG之抗體之發酵上清液濃縮約十倍，並轉移至含20 mM Tris、1 M硫酸銨且pH 9.0之緩衝液中，並施加於蛋白質A-瓊脂糖。含0.2 M檸檬酸鈉及0.2 M硫酸銨之pH5.5之洗出液相對於pH 7.5的磷酸鹽緩衝液透析。將牛IgG之污染物(來自發酵液中之FCS)利用固定化抗牛IgG抗體之免疫吸附法分離。

#### 實例 5

##### 會結合單株抗A $\beta$ 抗體之生物素基化抗體之製備

將含於pH8.5的磷酸鹽緩衝液中之會結合單株抗A $\beta$ 抗體-IgG之抗體調整成蛋白質濃度約15 mg/ml。將D-生物素-胺基己酸-N-羥基琥珀醯亞胺溶於DMSO中，並依莫耳比例1:5加至溶液中。在60分鐘後，添加L-離胺酸，停止反應，藉由用150 mM且pH 7.5的氯化鈉相對於25 mM的磷酸鉀緩衝液透析，及藉由凝膠過濾法，將過多的標記試劑移除。

#### 實例 6

## 會結合單株抗A $\beta$ 抗體之地高辛化抗體之製備

將含於pH 8.5的磷酸鹽緩衝液中之會結合單株抗A $\beta$ 抗體-IgG之抗體調整至蛋白質濃度約15 mg/ml。將地高辛3-O-甲基羰基- $\epsilon$ -胺基己酸-N-羥基琥珀醯亞胺溶解於DMSO中，並依莫耳比例1:5加至抗體溶液中。在60分鐘之後，藉由添加L-離胺酸停止反應，並藉由用pH 7.5之150 mM氯化鈉相對於25 mM磷酸鉀緩衝液透析，及藉由凝膠過濾法，將多餘的標記試劑移除。

### 實例 7

#### 單株抗A $\beta$ 抗體之定量分析法

ELISA係一種利用鏈黴抗生物素蛋白微量滴定板(MTP)定量人血漿中單株抗A $\beta$ 抗體之分析法。取校正標準物及樣品與對抗遺傳性型單株抗A $\beta$ 抗體之生物素基化且地高辛化的抗遺傳性型抗體(-IgG-Bi及-IgG-Dig)預培養。在預培養30分鐘之後，將該混合物轉移至微量滴定板中。使用與過氧化物酶(其可催化ABTS<sup>®</sup>受質的顯色反應)共軛之羊抗地高辛抗體進行夾層ELISA檢測法。藉由ELISA分析儀測定信號。在與抗DIG pAb-Fab-POD(pAb = 多株抗體)培養之前及之後均進行沖洗步驟。所有校正標準物及樣品均包括10%人血漿。

### 實例 8

#### 檢測對抗單株抗A $\beta$ 抗體之抗藥物抗體之分析法

在第一步驟中，取已與塗覆鏈黴抗生物素蛋白之微量滴定板(SA-MTP)的孔共軛(結合)之生物素基化單株抗A $\beta$ 抗

體。藉由用廣域緩衝劑沖洗移除未共軛(未結合)之抗體。之後，此等樣品及參考標準物(外加(spiked)單株抗遺傳性型抗A $\beta$ 抗體抗體之5%人血清)已於孔中培養。該抗-抗A $\beta$ 抗體抗體已與固定化單株抗A $\beta$ 抗體結合。洗除未結合之物質後，用地高辛化單株抗A $\beta$ 抗體檢測已結合之抗-抗A $\beta$ 抗體抗體，繼而與標記辣根過氧化物酶之抗地高辛抗體(參見圖1)培養。用抗體-酶共軛物催化ABTS<sup>®</sup>受質之顯色反應。藉由ELISA分析儀測定405 nm(參考波長：490nm)處之信號。重複測定各血清樣品之吸光度值三次。

#### 實例9

##### 定量單株抗A $\beta$ 抗體之另一種分析法

該ELISA係一種利用已塗覆包含胺基酸1至40之澱粉狀 $\beta$ 蛋白(A $\beta$ (1-40))之微量滴定板(MTP)定量測定人血漿中單株抗A $\beta$ 抗體之分析法。將校正標準物及樣品於已塗覆A $\beta$ (1至40)之微量滴定板孔中培養，並使用對抗遺傳性型單株抗A $\beta$ 抗體之地高辛化抗遺傳性型抗體(-IgG-Dig)及與過氧化物酶(其催化ABTS<sup>®</sup>受質之顯色反應)共軛之抗地高辛抗體檢測與塗覆A $\beta$ (1-40)之表面結合的單株抗A $\beta$ 抗體之量。藉由ELISA分析儀測定信號。

在所有的培養循環之間均進行沖洗步驟。在使用A $\beta$ (1-40)塗覆微量滴定板(MTP)之後，必需再進行封阻步驟(使用培養緩衝液)。所有的校正標準物及樣品均包括10%人血漿。所有的培養步驟皆在室溫下完成。

#### 實例10

## 檢測對抗單株抗A $\beta$ 抗體之中和抗藥物抗體之分析法

分析對抗單株治療性抗A $\beta$ 抗體之互補決定區域之中和抗藥物抗體時，進行競爭性ELISA。將血漿樣品或作為標準物之會結合單株抗A $\beta$ 抗體之抗遺傳性型抗體與單株抗A $\beta$ 抗體-DIG共軛物進行預培養。於已塗覆A $\beta$ 之微量滴定板上捕捉殘留之游離單株抗A $\beta$ 抗體-DIG共軛物，並使用標記過氧化物酶之抗地高辛抗體檢測，且隨後用ABTS進行顯色反應。

### 【圖式簡單說明】

圖1抗人類A $\beta$ 抗體之抗遺傳性型抗體之選拔；

圖2評估交叉反應性之分析；

圖3抗人類A $\beta$ 抗體之定量分析；

圖4抗人類A $\beta$ 抗體之另一種定量分析；

圖5抗-抗-人類A $\beta$ 抗體抗體(ADA)之檢測；及

圖6中和抗-抗-人類A $\beta$ 抗體抗體(ADA)之檢測。

序 列 表

<110> 瑞士商赫孚孟拉羅股份有限公司  
<120> 結合抗澱粉狀蛋白β肽抗體之抗遺傳性型抗體  
<130> 25344 WO  
<140> 098143984  
<141> 2009-12-21  
<150> 08022235.9  
<151> 2008-12-22

<160> 13  
<170> PatentIn version 3.5

<210> 1  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> VH-CDR3

<400> 1  
Leu Thr His Tyr Ala Arg Tyr Tyr Arg Tyr Phe Asp Val  
1                  5                  10

<210> 2  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> VH-CDR3

<400> 2  
Gly Lys Gly Asn Thr His Lys Pro Tyr Gly Tyr Val Arg Tyr Phe Asp  
1                  5                  10                  15  
Val

<210> 3  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> VH-CDR3

<400> 3

Leu Leu Ser Arg Gly Tyr Asn Gly Tyr Tyr His Lys Phe Asp Val  
1                    5                    10                    15

<210> 4  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> VL-CDR3

<400> 4

Gln Gln Val Tyr Asn Pro Pro Val  
1                    5

<210> 5  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> VL-CDR3

<400> 5

Phe Gln Leu Tyr Ser Asp Pro Phe  
1                    5

<210> 6  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> VL-CDR3

<400> 6

Gln Gln Leu Ser Ser Phe Pro Pro  
1                    5

<210> 7  
<211> 122  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> VH

<400> 7

Gln 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

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

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

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

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

Ala Arg Leu Thr His Tyr Ala Arg Tyr Tyr Arg Tyr Phe Asp Val Trp  
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 8  
<211> 126  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> VH

<400> 8

Gln 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

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

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

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



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

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

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

<210> 9  
<211> 124  
<212> PRT  
<213> 人エ

<220>  
<223> VH

<400> 9

Gln 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

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

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

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

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

Ala Arg Leu Leu Ser Arg Gly Tyr Asn Gly Tyr Tyr His Lys Phe Asp  
100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 10  
<211> 110



<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> VL

<400> 10

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

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

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Tyr Asn Pro Pro  
85 90 95

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

<210> 11

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> VL

<400> 11

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

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

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Leu Tyr Ser Asp Pro  
85 90 95

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

<210> 12  
<211> 110  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> VL

<400> 12

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

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

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Ser Ser Phe Pro  
85 90 95

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

<210> 13  
<211> 42  
<212> PRT  
<213> 智人



<400> 13

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

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

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

## 七、申請專利範圍：

1. 一種會與抗澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽抗體之互補決定區域結合且會與自細胞系BCRC 960411獲得之抗體的相同抗原決定部位或重疊的抗原決定部位結合之抗體之用途，其係用於利用免疫分析法測定樣品中對抗抗澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽抗體之抗遺傳型抗體之免疫學測定，  
其中該抗澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽抗體包括具有選自SEQ ID NO: 7、8或9之胺基酸序列的重鏈可變區域，及包括具有選自SEQ ID NO: 10、11或12之胺基酸序列的輕鏈可變區域。
2. 一種會與抗澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽抗體之互補決定區域結合且會與自細胞系BCRC 960411獲得之抗體的相同抗原決定部位或重疊的抗原決定部位結合之抗體之用途，其係用於利用免疫分析法測定樣品中之抗澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽抗體之免疫學測定，  
其中該抗澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽抗體包括具有選自SEQ ID NO: 7、8或9之胺基酸序列的重鏈可變區域，及包括具有選自SEQ ID NO: 10、11或12之胺基酸序列的輕鏈可變區域。
3. 一種自細胞系BCRC 960411獲得之抗體。
4. 一種免疫學測定方法，其係藉由利用自細胞系BCRC 960411獲得的抗體之免疫分析法測定樣品中抗澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽抗體。
5. 如請求項4之方法，其特徵為該免疫分析包括捕捉抗

體、示蹤抗體及檢測抗體，其中該捕捉抗體係一種利用鏈黴抗生物素蛋白與固相共軛且自細胞系 BCRC 960411 獲得之對抗抗澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽抗體之生物素基化抗遺傳性型抗體，該示蹤抗體係一種與作為可檢測標記物的地高辛共軛且自細胞系 BCRC 960411 獲得之對抗抗澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽抗體之抗遺傳性型抗體，且該檢測抗體係一種與過氧化物酶共軛之抗地高辛抗體。

6. 如請求項4之方法，其特徵為該免疫分析法包括與固相共軛之澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽、與作為可檢測標記物的地高辛共軛且自細胞系 BCRC 960411 獲得之對抗抗澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽抗體之抗遺傳性型抗體，及與過氧化物酶共軛之抗地高辛檢測抗體。
7. 一種免疫學測定方法，其係藉由利用自細胞系 BCRC 960411 獲得的抗體之免疫分析法測定樣品中對抗抗澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽抗體之抗遺傳性型抗體。
8. 如請求項7之方法，其特徵為該免疫分析法包括捕捉抗體及示蹤抗體，其中該捕捉抗體係與配對結合中第一部份共軛之抗澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽抗體，及該示蹤抗體係一種與可檢測標記物共軛之抗澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽抗體。
9. 如請求項7之方法，其特徵為該免疫分析法包括與固相共軛之澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽、與作為可檢測標記物之地高辛共軛之抗澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽抗體，及與過氧化物酶共軛之抗地高辛檢測抗體。
10. 如請求項4至9中任一項之方法，其特徵為該免疫分析法

包括捕捉抗體及示蹤抗體，其中該捕捉抗體係一種包含至少兩種抗體之混合物，其不同處在其與固相共軛之抗體位置；及該示蹤抗體係一種包含至少兩種抗體之混合物，其不同處在於其與可檢測標記物共軛之抗體位置。

11. 一種會與抗澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽抗體之互補決定區域結合且會與自細胞系BCRC 960411獲得之抗體的相同抗原決定部位或重疊的抗原決定部位結合之抗體之用途，其係用於如請求項5、6或10中任一項之方法中，

其中該抗澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽抗體包括具有選自SEQ ID NO: 7、8或9之胺基酸序列的重鏈可變區域，及包括具有選自SEQ ID NO: 10、11或12之胺基酸序列的輕鏈可變區域。

12. 一種利用競爭性ELISA檢測對抗單株抗澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽抗體之中和抗藥物抗體之方法，其中：

- 將血漿樣品或作為標準物之自細胞系BCRC 960411獲得之對抗單株抗澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽抗體之抗遺傳性型抗體與單株抗澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽抗體-DIG共軛物進行預培養；
- 於已塗覆澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽之微量滴定板上捕捉殘留之游離單株抗澱粉狀蛋白 $\beta$ 肽抗體-DIG共軛物，並使用標記過氧化物酶之抗地高辛抗體檢測，且隨後用ABTS進行顯色反應。

八、圖式：

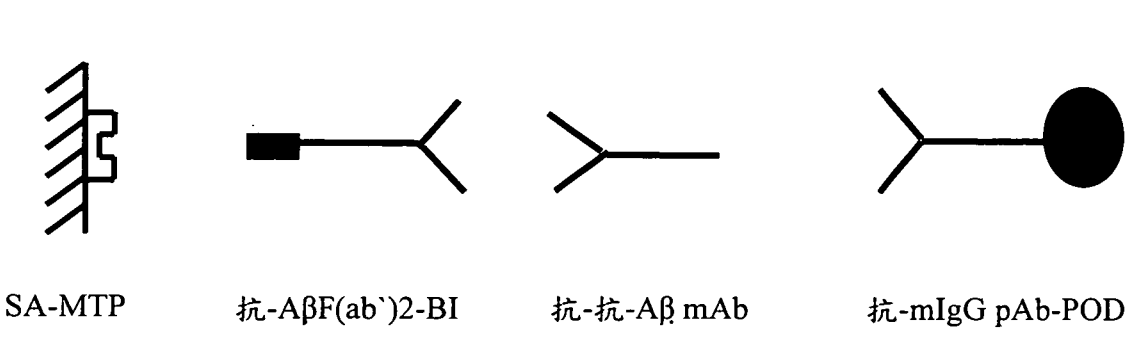


圖 1



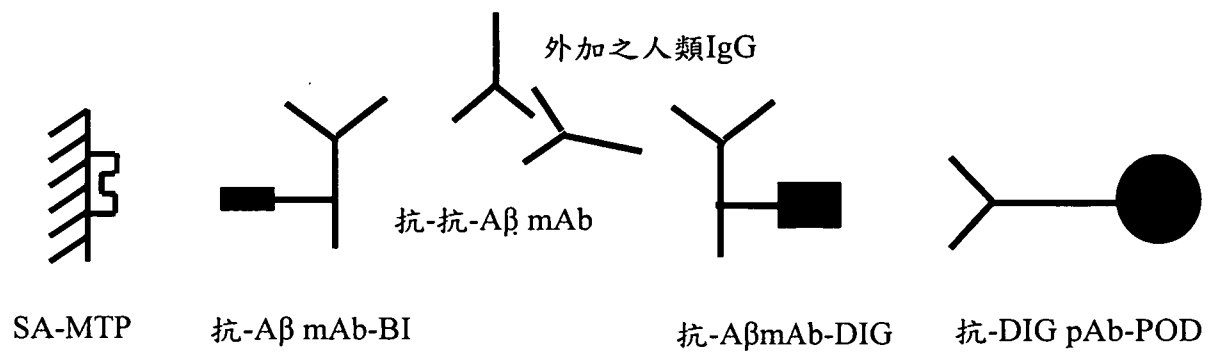


圖 2



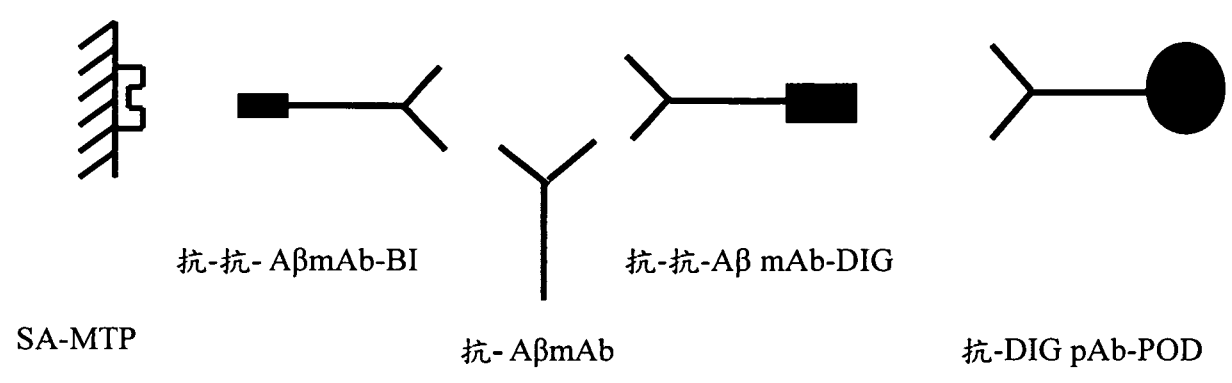
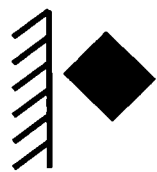


圖 3



MTP AB1-40



抗- AβmAb



抗-抗-Aβ mAb-DIG



抗-DIG pAb-POD

圖 4



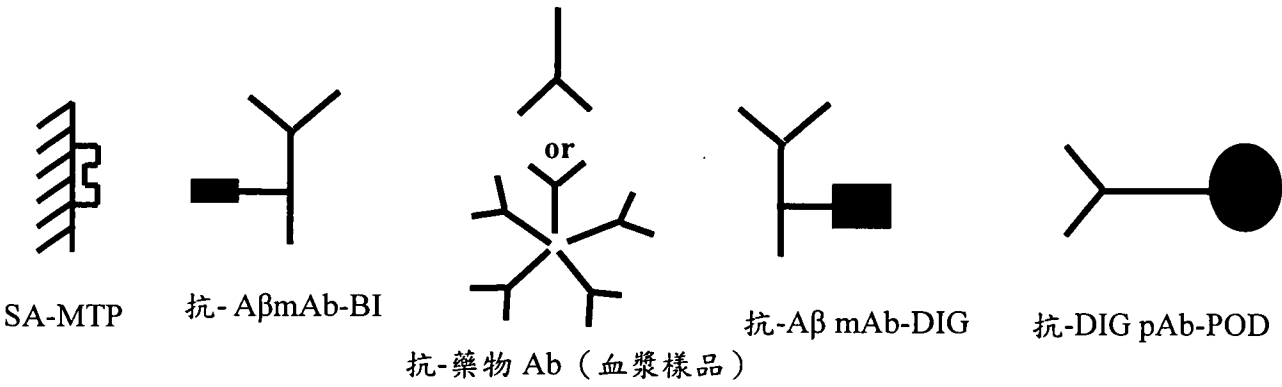


圖 5

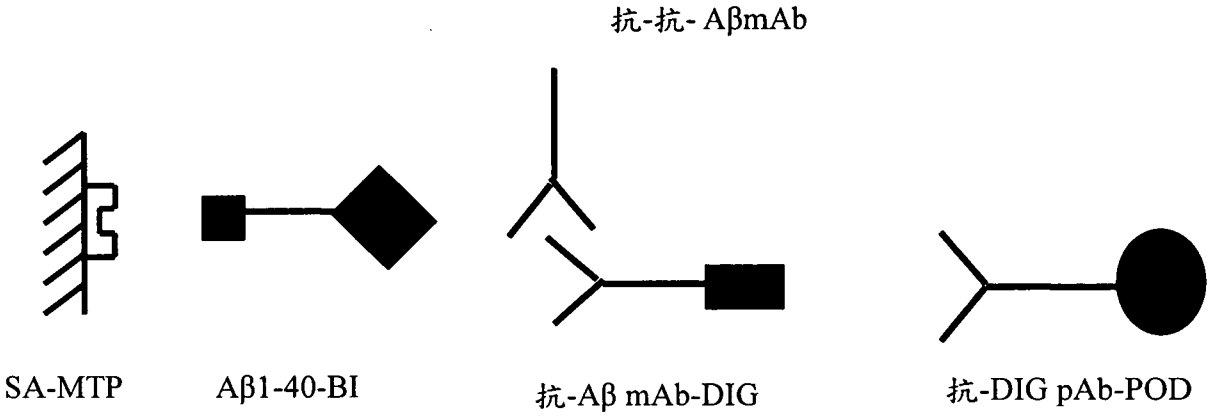


圖 6