



(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 I424852 B

(45)公告日：中華民國 103 (2014) 年 02 月 01 日

- (21)申請案號：099111628 (22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 04 月 14 日
- (51)Int. Cl. : *A61K39/395 (2006.01)* *A61P9/00 (2006.01)*
- (30)優先權：2009/05/04 古巴 CU-2009-71
- (71)申請人：分子免疫學中心(古巴) CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR (CU)  
古巴
- (72)發明人：梅妥亞柯斯塔雷歐 克莉絲汀納 MATEO DE ACOSTA DEL RIO, CRISTINA MARIA (CU)；凡奎茲羅普茲 安娜 VAZQUEZ LOPEZ, ANA MARIA (CU)；羅普茲 艾珍卓 LOPEZ REQUENA, ALEJANDRO (CU)；弗南德茲瑪瑞羅 優尼爾 FERNANDEZ MARRERO, YUNIEL (CU)；沙托羅普茲 佑斯德爾 SOTO LOPEZ, YOSDEL (CU)；布利托納發羅 維多 BRITO NAVARRO, VICTOR (CU)
- (74)代理人：林志剛
- (56)參考文獻：  
US 2004/0253233A1  
A.M. Vázquez et al., "Generation of a Murine Monoclonal Antibody Specific for N-Glycolylneuraminic Acid-Containing Gangliosides That Also Recognizes Sulfated Glycolipids", Hybridoma, Vol. 14, No. 6, pp. 551~556, 1995
- 審查人員：張瀚壬
- 申請專利範圍項數：8 項 圖式數：6 共 0 頁

## (54)名稱

抗腦苷硫酸酯類且抗硫酸化蛋白聚糖類之抗體類及彼等之用途

ANTI SULFATIDES AND ANTI SULFATED PROTEOGLYCANS ANTIBODIES AND THEIR USE

## (57)摘要

本發明關於生物技術，尤其是用於人體健康之新產品。

本發明提供新穎特異性單株抗體，該單株抗體以高親和力結合腦苷硫酸酯類及硫酸化蛋白聚糖類。

本發明所揭示且描述於發明說明中之抗腦苷硫酸酯類且抗硫酸化蛋白聚糖類之抗體類提供重要之診斷及治療工具以作用在與出現動脈粥狀硬化斑塊相關之病理過程。

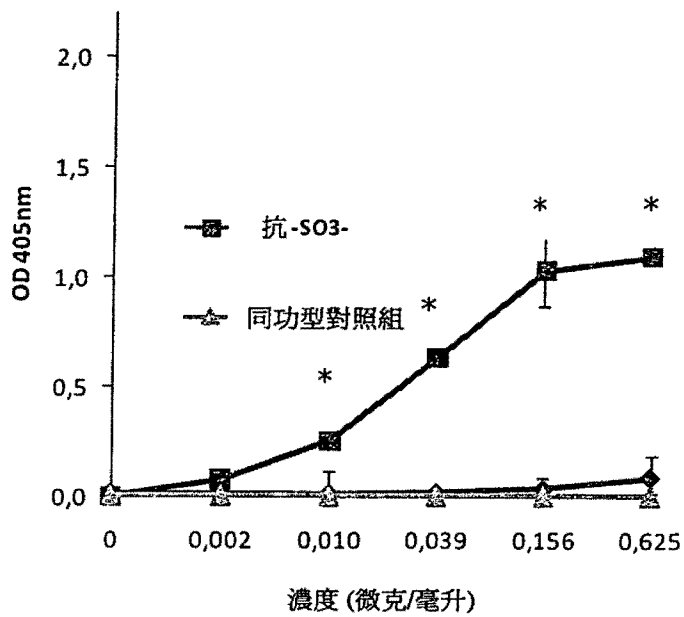
因此，本發明提供包含本發明之單株抗體或其片段的醫藥組成物以用於與心血管疾病相關之治療及診斷用途。尤其是，本發明關於衍生自可辨識腦苷硫酸酯類及硫酸化蛋白聚糖類之單株抗體的片段，其可用於該病理之治療及診斷。

The present invention relates to the biotechnology and particularly with new products for use in human health.

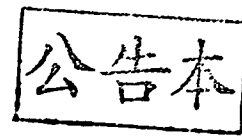
The present invention provides new specific monoclonal antibodies, which bind with high affinity sulfatides and sulfated proteoglycans.

The anti sulfatides and anti sulfated proteoglycans antibodies disclosed in the present invention and described in the description, provide important diagnostic and therapeutic tools to act on pathological processes associated with the appearance of atherosclerotic plaques.

Accordingly, the invention provides pharmaceutical compositions comprising MAbs of the invention or fragments thereof for the therapeutic and diagnostic use associated with cardiovascular diseases. Particularly, the present invention relates to the fragments derived from the MAbs that recognize sulfatides and sulfated proteoglycans, which can be used in the therapy or diagnosis of this pathology.



第1圖



861663

## 發明專利說明書

(本申請書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：99111628

A61k 39/395 (2006.01)

※申請日：99年04月14日

※IPC分類：

A61P 9/00 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

抗腦苷硫酸酯類且抗硫酸化蛋白聚糖類之抗體類及彼等之用途

Anti sulfatides and anti sulfated proteoglycans antibodies and their use

二、中文發明摘要：

本發明關於生物技術，尤其是用於人體健康之新產品

本發明提供新穎特異性單株抗體，該單株抗體以高親和力結合腦苷硫酸酯類及硫酸化蛋白聚糖類。

本發明所揭示且描述於發明說明中之抗腦苷硫酸酯類且抗硫酸化蛋白聚糖類之抗體類提供重要之診斷及治療工具以作用在與出現動脈粥狀硬化斑塊相關之病理過程。

因此，本發明提供包含本發明之單株抗體或其片段的醫藥組成物以用於與心血管疾病相關之治療及診斷用途。尤其是，本發明關於衍生自可辨識腦苷硫酸酯類及硫酸化蛋白聚糖類之單株抗體的片段，其可用於該病理之治療及診斷。

### 三、英文發明摘要：

The present invention relates to the biotechnology and particularly with new products for use in human health.

The present invention provides new specific monoclonal antibodies, which bind with high affinity sulfatides and sulfated proteoglycans.

The anti sulfatides and anti sulfated proteoglycans antibodies disclosed in the present invention and described in the description, provide important diagnostic and therapeutic tools to act on pathological processes associated with the appearance of atherosclerotic plaques.

Accordingly, the invention provides pharmaceutical compositions comprising MAbs of the invention or fragments thereof for the therapeutic and diagnostic use associated with cardiovascular diseases. Particularly, the present invention relates to the fragments derived from the MAbs that recognize sulfatides and sulfated proteoglycans, which can be used in the therapy or diagnosis of this pathology.

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

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】

本發明關於可特異辨識且對腦苷硫酸酯類和硫酸化蛋白聚糖類具有高親和力之新穎單株抗體（MAb）。本發明亦關於包含本發明之單株抗體或自該等抗體衍生之片段的醫藥組成物。此外，本發明關於包含本發明之單株抗體或彼等之片段的用於診斷心血管疾病之試劑套組。

### 【先前技術】

經過超過 30 年研發用於取得老鼠單株抗體之雜交瘤技術（Koehler y Milstein Nature, 256 : 495-497, (1975) 後，已證實這些單株抗體在疾病診斷及基礎研究中極為有用，但僅有 20 種抗體已登記用於人體療法（Pharma Vitae, Monoclonal Abs Update, 6-363, 2008）中。此大部分係基於當將該等抗體注射至患者體內時，其在血液中之半衰期短且因該等抗體之老鼠來源而致使人體免疫系統及免疫反應對老鼠效應子之功能的辨識不良（HAMA 反應，人類抗老鼠抗體之首字字母縮寫）。數個研究已顯示投服外來抗體後，患者所產生之免疫反應可能相當強且可在初次治療後實質上排除該治療上之有用之抗體。再者，根據 Khazaeli, M. B. y col. Journal of Immunotherapy 15 : 42-52 (1994) 之報告，給予患者老鼠單株抗體後，接著以無關連之老鼠抗體治療將會因為交叉反應性之 HAMA 反應而可能無效或甚至有危險。

從上述資料可知，吾人需要取得在人體中較無致免疫性，且其取得較容易且經濟並適合用於製造治療性調製劑和其他用途之治療性抗體。Morrison S. L. y col. *Adv Immunol.*, 44 : 65-92 (1989)。

現已開發數種方法將來自小鼠或大鼠之抗體人化，從而在將這些外來蛋白質注射入人體時減輕針對彼等之異種反應。降低致免疫性之首要嘗試之一為製造“嵌合性抗體”，該嵌合性抗體中老鼠蛋白質之可變區係連接人分子之恆定區，其不僅可達到降低致免疫性，且亦可活化免疫效應子功能 (Morrison S. L. y col. *PNAS USA*, 81 : 6851-6855 (1984))。此等嵌合型分子維持原始抗體關於抗原結合之特性，但其恆定區則無致免疫性。

動脈粥狀硬化及其後果對全世界人口有很大的影響，且在已開發國家 (Melián, A. y col. *Am. J. Pathol.*, 155 : 775, 1999) 及自數年前開始在古巴 (OMS, 2004, *Anuario Estadístico*, MINSAP, 2007) 為發病率及死亡率之主要原因。

動脈粥狀硬化為一種多因素性質之慢性發炎疾病，其對心肌梗塞和腦梗塞之致病、壞疽及失去肢體功能極具影響。Greaves, D. R. y col. *Trends Immunol* 22 : 180-181 (2001) ; Ross, R. y col. *Am Heart J* 138 (5 Pt 2) : S419-20 (1999)。

動脈粥狀硬化的主要原因之一為高脂血症。通過動脈壁之低密度脂蛋白 (LDL) 經由與蛋白聚糖交互作用而被

捕捉在動脈內膜之胞外基質中並發生氧化修飾。與動脈內膜之蛋白聚糖結合的脂蛋白易於改變脂質及蛋白質部分（諸如氧化作用及酶催化性水解，此作用使其致動脈粥樣化電位增加）。ApoB-100 含有數個區，透過這些區 ApoB-100 可與蛋白聚糖之葡糖胺聚糖鏈結合（ApoB-100 與該蛋白聚糖共同含有數種鹼性胺基酸）（Camejo, G., E. y col. *Atherosclerosis* 139 : 205-22, (1998) ; Chang, T. Y. y col. *Curr Opin Lipidol* 12 : 289-96 (2001) ; Camejo, G., U. y col. *Atheroscler Suppl* 3 : 3-9 (2002) 。

葡糖胺聚糖上之負電密度影響與 LDL 之交互作用，硫酸化程度影響 LDL 與蛋白聚糖之交互作用。Sambandam T. y col. *Arterioascler Thromb*, 11 : 561-568 (1991) 。

再者，氧化之 LDL 可經由此等細胞表面上之清除受體而被巨噬細胞內化，造成細胞內膽固醇累積，接著形成泡沫細胞。這些情況代表開始發炎反應之主要步驟，其中涉及單核細胞/巨噬細胞、肥大細胞、樹突細胞、T 細胞及 NKT。Camejo, G. y col. *Atherosclerosis* 139 (2) : 205-22 (1998) ; Hurt-Camejo, E. y col. *Invest Clin* 42 Suppl 1 : 43-73 (2001) ; Skalen, K., M. y col. *Nature* 417 : 750-754 (2002) 。實驗證據證明存在巨噬細胞表面上之蛋白聚糖涉及氧化之 LDL 與此等細胞結合並涉及這些顆粒之內化或納入，而最終會形成泡沫細胞。Halvorsen B. y col. *Biochem J.* 331 : 743-752 (1998) 。

很清楚地，採取較健康之生活型態並使用抗血栓及降

脂劑對降低發展心血管疾病之風險有影響，但此等方法仍不足以完全排除這些風險。

如上述，動脈粥狀硬化為一種多重因素之發炎疾病，其中有多種抗原在該疾病之發展中很重要，因此開發用於主動及被動免疫療法的不同策略以取得對此疾病之較大治療作用。

這些策略之一係增加 HDL 之療法，因為 HDL-膽固醇與心血管疾病間之關係相反。CETP 為 HDL 代謝中之關鍵酶且被認為係一種可能之治療標的，因為其活性降低時可增加 HDL 之濃度。使用疫苗來誘導能結合並抑制 CETP 之功能的抗體的策略已描述於 WO 1997/041227 及 WO 2006/133196 中。然而，最近之研究顯示使用 CETP 抑制劑 Torcetrapib 之第三期臨床試驗失敗已使此策略令人懷疑。Nicholls S. J. y col. *Circulation*. 9 ; 118 : 2506-14 ( 2008 ) ; Hermann M. y col. *Curr Hypertens Rep*, 11 : 76-80 ( 2009 ) 。某些作者描述使用氧化之 LDL 作為免疫原之疫苗以抑制動脈粥狀硬化斑塊形成。Palinski W. y col. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 : 821-25 ( 1995 ) ; Ameli S y col. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16 ; 1074-79 ( 1996 ) ; Freigang S. y col. *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* 18 : 1972-82 9 ( 1998 ) ; Zhou X y col. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21 : 108-14 ( 2001 ) ; George J. y col. *Atherosclerosis* 138 : 147-52 ( 1998 ) ; Fredrikson G. N. y col. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*

23 : 879-84 ( 2003 ) ; US 2008-0070265A1 。 另一種策略係研發以氧化之載脂蛋白 C-III 的特殊片段為基礎的預防性及治療性疫苗以誘導能預防或減少動脈粥狀硬化損傷形成的免疫反應 ( WO 2001/064008, WO 2003/020765, WO 2004/080375 及 WO 2004/081045 ) 。

另一種記載之疫苗方法係以與醛共軛之肽為基礎 ( 諸如 MDA 或 4-HNE ) 以誘導可與 T 細胞之  $\alpha/\beta$  受體交互作用而預防動脈粥狀硬化損傷形成之抗體 ( WO2001/068119 ) 。

某些作者主張對抗動脈粥狀硬化中之病原以防止發展動脈粥狀硬化斑塊之疫苗的重要性 ( WO 1998/033510, US 006291437 B1, US 6471965 B1, US006808713 B1 ) 。

另一種提出之延遲或減輕由攝入膳食膽固醇所引起之動脈粥狀硬化的嚴重性的策略係使用對抗固醇的疫苗 ( US 2002/0018808 A1 ) 。

作為治療工具之被動免疫療法亦可在動脈粥狀硬化中扮演重要角色。已描述經由使用對抗經氧化或改質之 Apo B100 片段的人抗體以治療或預防動脈粥狀硬化之被動免疫 ( US 005196324<sup>a</sup>, US 2007/0098725 A1, US 2008/0075716 A1 ) 。

此外，以特異於磷醯膽鹼之抗體進行之被動免疫已被提出以作為用於治療或預防動脈粥狀硬化之治療組合 ( US 2007/0286868 A1, US 2007/0122419 A1 ) 。

另一描述之策略係使用特異結合人 M-CSF 之抗體或

抗原結合片段（US 2007326414 B2）。

使用防止單核細胞黏附血管內皮之單株抗體以防止該細胞侵入內皮及周圍組織為此疾病之另一種治療方法（US 005541296 A）。

已描述使用單株抗體作為糖蛋白 II b/III a 受體之抑制劑以抑制血小板凝結（WO 1999/052551, US 005976532 A）。

另外，取得對抗 C-III 載脂蛋白之保護性肽抗原決定部位的人單株抗體以供用於被動免疫療法（WO 2004/081046）。

再者，使用靜脈內免疫球蛋白（IVIG）可具有動脈保護效果。Udi N y y col. Autoimmunity reviews 7 : 445-452（2008）。過去未曾描述過可與腦苷硫酸酯類及硫酸化蛋白聚糖類反應，或辨識巨噬細胞及動脈粥狀硬化損傷之嵌合型單株抗體，且當以低劑量投服時，此等嵌合性抗體能抑制動脈粥狀硬化損傷形成並可誘導對抗該等硫酸化分子之抗體反應。

### 【發明內容】

本發明之詳細說明：

本發明關於其特性為可辨識腦苷硫酸酯類及硫酸化蛋白聚糖類之單株抗體或自彼等衍生之片段。

本發明之抗腦苷硫酸酯類且抗硫酸化蛋白聚糖類抗體宜為單株抗體。本發明之範圍內亦包括抗體片段，諸如本

專利說明書中所提供之抗腦苷硫酸酯且抗硫酸化蛋白聚糖抗體的 Fab 片段、Fab'、Fab'-SH 及 F(ab')<sub>2</sub>。這些抗體片段可藉由習知方法（諸如酶催化性分解）製造，或可藉由重組技術產生。這些抗體片段可為嵌合型或人化。這些片段可用於本說明中所列出之診斷及治療目的。本發明亦包括實質上純質之抗體及片段的較佳體系。

於一特殊之較佳體系中，本發明之抗體特徵為下列重鏈及輕鏈可變區的序列：

重鏈：

HCDR1 RYSVH

HCDR2 MIWGGGSTDYNSALKS

HCDR3 SGVRRGRAQAWFAY

HFR1 QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSL

HFR2 WVRQPPGKGLEWLG

HFR3 RLSISKDNSKSKVFLKMNSLQTDDTAMYYCAR

HFR4 WGQGTLVTVSA

輕鏈：

LCDR1 KASQDVSTAVA

LCDR2 SASRYT

LCDR3 QQHYSTPWT

LFR1 DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITC

LFR3 GVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYC

LFR4 FGGGTKLELK

此外，本發明之抗體包括在重鏈之人 IgG1 恆定區及在輕鏈之人 C<sub>K</sub>。

本發明包含組成物，包括含有本發明之抗腦苷硫酸酯類且抗硫酸化蛋白聚糖類抗體或自彼等衍生之片段的醫藥組成物。如本專利說明書中所使用者，該組成物包含一或多種結合腦苷硫酸酯類及硫酸化蛋白聚糖類之抗體。

這些組成物可進一步包含合適之載體，諸如藥學上可接受之賦形劑（包括本技藝熟知之緩衝溶液或佐劑）。

於另一較佳體系中，本發明關於包含單株抗體之醫藥組成物，該單株抗體之重鏈及輕鏈的可變區序列顯示於下。

重鏈：

HCDR1 RYSVH

HCDR2 MIWGGGSTDYNSALKS

HCDR3 SGVRRGRAQAWFAY

HFR1 QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSL

HFR2 WVRQPPGKGLEWLG

HFR3 RLSISKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAMYYCAR

HFR4 WGQGTLVTVSA

輕鏈：

LCDR1 KASQDVSTAVA

LCDR2 SASYRYT

LCDR3 QQHYSTPWT

LFR1 DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITC

LFR2 WYQQKPGQSPKLLIY

LFR3 GVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYC

LFR4 FGGGTKLELK

於第三種觀點中，本發明關於可用於診斷動脈粥狀硬化損傷之試劑套組，其包括一種本發明之抗體或自彼等衍生之片段。更特別地，該試劑組包含具有上述之重鏈及輕鏈可變區序列的單株抗體。

於另一種觀點中，本發明關於本發明之抗體於治療心血管疾病（尤其是那些顯示出動脈粥狀硬化損傷之跡象者）的用途。

抗體一詞通常係指單株抗體，更特別地，係指老鼠單株抗體或嵌合型抗體。

取得抗體：

一般而言，本發明之抗腦苷硫酸酯且抗硫酸化蛋白聚糖類單株抗體可藉由雜交株方法取得，該雜交株方法首先係由 Kohler，等人描述於 Nature, 256:495 (1975) 中，其為先以自天然或合成來源取得之糖脂萃取物將老鼠免疫化。將來自免疫化之老鼠的脾臟細胞與雜交株細胞 P3.X63Ag8 6.5.3 融合，再將其依描述培養在選擇性介質

中並藉由 ELISA 偵測在培養上清液中之免疫球蛋白來選擇所產生之選殖株。

鑑定可產生具有所需之特異性、親和力及/或活性之抗體的雜交株細胞後，可藉由限制性稀釋程序將產製抗體之選殖株分殖並可藉由細胞培養生長之標準方法長成（Goding, *Monoclonal Abs: Principles and Practice*, pags. 59-103 (Academic Press, 1986)）。適合用於此目的之培養介質包括，例如：D-MEM 或 RPMI-1640 介質。再者，雜交株細胞可在動物體內以腹水腫瘤之形式生長。

藉由習知之用於純化免疫球蛋白之程序（例如：蛋白質 A-瓊脂糖凝膠、羥基磷灰石層析法、凝膠電泳法、透析或親和力層析法）從培養介質、腹水或血清中適當地分離出由分殖株分泌之單株抗體。

本發明之抗體亦可藉由遺傳工程技術正確地處理老鼠免疫球蛋白基因來取得。例如：本發明之嵌合型抗體可藉由習知之用於處理基因之技術（諸如增數、選殖、基因定序及分解，以及本技藝中所描述之其他方法，例如：Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3rd. edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. *Current Protocols in molecular biology* (F. M. Ausubel, et al. eds., (2003)) ; *la serie Methods in Enzimology* (Academic Press, Inc.) : PCR 2: A practical approach (M. J. MacPherson, B. D. Hames y G. R. Taylor eds. (1995

) ) , Harlow y Lane, eds. ( 1988 ) ABS, Alaboratory manual, y Animal cell culture ( R. I. Freshney, ed. ( 1987 ) ) 中所描述者 ) 從產製老鼠單株抗體之細胞純化出 RNA 來取得。

抗體可變區之 cDNA 合成作用及 PCR 增數作用 ( 聚合酶鏈反應之縮寫 ) 可從編碼老鼠抗體之 RNA 開始進行 , 合成 cDNA , 藉由 PCR 將 VK 及 VH 可變區增數 ( 此可依照用於本技藝此目的之習知技術完成 ) 。

分別將各重及輕鏈之 PCR 產物選殖入用於基因定序之載體中。利用任何用於此目的之方法 ( 例如 : 根據製造者之說明書 , 使用 T7 DNA 聚合酶二脫氧基核苷酸方法 ) 為所產生之選殖株定序。

經由將中間產物構造以限制酶分解來取得重 VH 及輕 VK 鏈之可變區基因並根據用於建構嵌合型基因之習知技術選殖入個別表現載體中。任何已描述過之可有效表現重組蛋白質 ( 尤其是單株抗體 ) 之載體均可用於這類目的中。

表現嵌合型抗體時可使用 NS0 細胞 , 將包含在含有該抗體基因之個別表現載體中的 DNA 構造物經由電穿孔送入該 NS0 細胞中。令這些細胞生長在選擇介質中。使用 ELISA ( 酶聯結之免疫吸附分析 ) 經由測量培養上清液來偵測製造免疫球蛋白的選殖株。

選擇具有所需之特異性及功能的抗體 :

於某些較佳體系中，本發明之抗體可藉由本技藝中用於此目的之已曾描述的不同技術（例如：使用 ELISA）來偵測。

於本發明之某些較佳體系中係分析所產製之抗體的生物活性。於一些較佳體系中係測試本發明抗體之抗原結合活性。

本專業中已知及可用於本專利說明書中之抗原結合分析包括使用，諸如西方點墨、放射免疫分析、ELISA、雙抗體免疫分析（三明治）、免疫沈澱分析、螢光免疫分析及蛋白質 A 免疫分析之技術的直接或競爭性結合分析，等。抗原結合之說明性分析包含在稍後之實例部分中。

此外，本發明中可鑑定能製造可辨認人類主動脈組織切片中之動脈粥狀硬化斑塊的抗體之選殖株，此可利用本技藝中所描述之習知免疫組織化學技術來完成。

於另一觀點中可測量本發明之抗體誘導老鼠體內抗肝素反應之能力。為此，以本發明之抗體將不同組之動物免疫化並測試這些動物之血清樣本中是否有抗肝素抗體存在。

於另一觀點中可測量本發明抗體之抗動脈粥狀硬化的效果，為此，可使用以力保肪寧（Lipofundin）誘導兔子體內之動脈粥狀硬化損傷的模型（Takács E, Hársing J, Füzesi S, Jellinek H. 1986 Arteriosclerosis developing in rabbits after lipofundin administration. Morphol Igazságügyi Orv Sz. 26: 99-105; Noa M & Más R (1992

) Ateromixol y lesión aterosclerótica en conejos inducida por lipoundin. *Progresos en Ciencias Médicas*, 6 : 14-19 )

醫藥組成物：

於一較佳體系中，本發明提供包含一或多種本發明抗體之醫藥組成物。於一較佳體系中，包含抗體之組成物進一步包含藥學上可接受之賦形劑。

於一觀點中，本發明提供包含一或多種本發明抗體之試劑套組，此外，可包含一種緩衝溶液。於一較佳體系中，該緩衝溶液為藥學上可接受者。於一較佳體系中，包含抗體之組成物亦包括載體分子，其於某些較佳體系中為藥學上可接受者。於一較佳體系中，試劑套組亦包括用於投服或使用該組成物之指示（如：抗體投至個體）。

供保存之包含本發明抗體的醫藥組成物係經由將抗體與具所需純度之載體分子、可選擇之生理學上可接受的賦形劑或安定劑（Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th edition (2000)）混合，製備成水溶液（凍乾的）或其他凍乾形式之調製劑。該可接受之載劑、賦形劑或安定劑在所有使用之劑量及濃度下對接受者而言為非毒性。

本發明之單株抗體存在於醫藥組成物中之合併量對所欲目的為有效之量。

用於活體內投服之調製劑必須為無菌。此係經由通過

無菌過濾膜過濾來取得。

於一觀點中，本發明顯示如何使用本發明之抗體製備用於失調（諸如心血管疾病）之治療性及/或預防性治療的藥物。

本發明之抗體可用於治療、抑制、延遲動脈粥狀硬化損傷惡化，預防/延遲動脈粥狀硬化損傷開始，改善及/或預防與一或多種抗原分子之表現及/或活性相關之疾病、失調或進程。

根據本發明，這些抗體之治療劑量將在每劑量 10 微克至 10 毫克間，宜為每劑量 100 微克至 1 毫克間。

本發明之單株抗體係藉由任何合適方式投服，包括腸胃道外、皮下、腹膜內、肺內及鼻內途徑，且若需要局部治療時，可藉由病灶內途徑投服。

於另一觀點中，本發明提供用於診斷失調（諸如心血管疾病）之試劑套組。

### 【實施方式】

下列實例係欲說明本發明而非限制本發明之範圍。

除非另外指明，下列實例中所有使用之限制酶或修飾酶以及試劑和材料係從市面上購得。

實例 1. 藉由牛腦腦苷硫酸酯類之嵌合型單株抗體抗-SO3 進行辨識

使用 ELISA，以 50 微升/槽之在甲醇中之濃度為 4 微

克/毫升的牛腦腦苷硫酸酯溶液塗覆 PolySorp 盤 (Nunc) 並將分析盤培育在 37°C 下 90 分鐘以將溶劑蒸發。然後，在室溫下，以 200 微升/槽之含有 1% 牛血清白蛋白 (SAB) 的磷酸鹽緩衝溶液 (PBS) 將分析盤封閉 1 小時。稍後，加入 50 微升/槽在 PBS 中之不同濃度的嵌合型抗體抗-SO<sub>3</sub> 並在 37°C 培育 1 小時。然後，以 PBS 清洗分析盤，並加入 50 微升/槽之與鹼性磷酸酶 (Sigma) 共軛的山羊抗血清抗-人  $\gamma$  鏈。將分析盤在 37°C 培育 1 小時後，再次清洗之並加入 100 微升/槽之在二乙醇胺緩衝劑 (pH9.8) 中的 1 毫克/毫升對-硝苯基磷酸酯受質溶液。在室溫培育 30 鐘後，在 ELISA 讀計中測量反應產物在 405nm 之吸收。

使用在嵌合型單株抗體抗-SO<sub>3</sub> 之位置 98 處重鏈可變區中以 S 取代 R 的經改質之嵌合型單株抗體作為陰性對照組。第 1 圖顯示出不同嵌合型單株抗體對抗腦苷硫酸酯類的反應性。該圖形顯示出即使在低至 0.01 毫克/毫升之濃度下，該嵌合型單株抗體抗-SO<sub>3</sub>-仍可辨識腦苷硫酸酯類。相反地，該在 98 位置處被修改之嵌合型單株抗體並未顯示出任何反應性。

## 實例 2. 肝素辨識試驗

接著，評估嵌合型單株抗體抗-SO<sub>3</sub>-是否認為硫酸化分子較腦苷硫酸酯類更複雜。選擇肝素進行此研究，肝素係可作為硫酸化葡糖胺聚糖模型的高度硫酸化分子。

根據由 Skalen, K. M. y cols ( Nature 417 : 750-754, 2002 ) 研發之用於雙糖鏈蛋白聚糖的 ELISA 技術來進行抗肝素反應性之分析，但進行些微修正。以濃度為 10 微克/毫升 ( 100 微升/槽 ) 之在 Hepes 緩衝之生理食鹽水溶液 ( HBSS ) ( 20mM Hepes , 150mM NaCl , pH7.4 ) 中的肝素 ( 史格馬 ( Sigma ) ) 塗覆 Maxisorp 微量滴定盤 ( Nunc ) 並將分析盤在 4°C 培育一整夜。以 HBSS 清洗盤三次，然後，以含有 1% SAB 之 HBSS ( HBSS-BSA ) 在室溫下將分析盤封閉 1 小時。以 HBSS-吐溫 20 0.02% ( HBSS-T ) 清洗盤三次並在室溫下，在 1 小時內加入在結合緩衝液 ( 10mM Hepes , 20mM NaCl , 2mM CaCl<sub>2</sub> , 2mM MgCl<sub>2</sub> , pH7.4 ) 中之嵌合型單株抗-SO<sub>3</sub> 之系列稀釋液，其起始濃度為 40 微克/毫升。使用在嵌合型單株抗體抗-SO<sub>3</sub> 之位置 98 處重鏈可變區中以 S 取代 R 的經改質之嵌合型抗體作為陰性對照組。以 HBSS-T 清洗盤二次，再將分析盤在室溫下與在 HBSS-T ( 含 0.1% 之 SAB ) 中之與鹼性磷酸酶 ( Sigma-Aldrich , 美國 ) 共軛的山羊抗血清抗-人  $\gamma$  鏈一起培育 1 小時。進行所需之清洗後，利用溶解在二乙醇胺緩衝劑 ( pH9.8 ) 中之對-硝苯基磷酸酯受質發展反應。在 ELISA 讀計 ( 奧地利 , Organon Teknica ) 中定量產物在 405nm 之吸收。

如第 2 圖所示，該嵌合型單株抗-SO<sub>3</sub>-對肝素具高度反應性。相反地，作為同功型對照組之經改質的嵌合型抗體在任何研究濃度下並未顯示出反應性。

### 實例 3：藉由流式細胞計數辨識 J774 細胞株

單核細胞和巨噬細胞在發炎過程（諸如動脈粥狀硬化）中很重要（Østerud B Björklid E. *Physiol Rev* 83: 1069-1112, 2003）。這些細胞可合成蛋白聚糖，且，在形成泡沫細胞時，巨噬細胞顯示出在其納入氧化之 LDL 的方式中有些係涉及細胞膜蛋白聚糖類（Halvorsen B, et al. *Biochem J.* 331: 743--752, 1998）。

為測定抗-SO<sub>3</sub>-嵌合型抗體是否可辨識巨噬細胞，吾人使用老鼠巨噬細胞株 J774 進行流式細胞計數實驗，該細胞係培養在補充有 8% 去活化之胎牛血清（SFT；吉布可（Gibco））、2mM L-麩醯胺、100 U/毫升青黴素、100 微克/毫升鏈黴素之 DMEM-F12（吉布可 BRL；蘇格蘭，巴斯利）中。將細胞（每管  $0.5 \times 10^6$ ）與 20 微升/管之去活化的兔子血清在 37°C 培育 10 分鐘，以封閉 Fc- $\gamma$  受體。接著，加入抗-SO<sub>3</sub>-嵌合型單株抗體及同功型對照組之經改質的嵌合型抗體（此二者均經生物素化，在含有 1% 牛血清白蛋白（密蘇里州聖路易斯，史格馬（Sigma）公司）及 0.01% 疊氮化鈉之 PBS 中，濃度為 10 微克/毫升）在冰浴中培育 30 分鐘。清洗細胞後，將其與稀釋 200 倍之鏈抗生物素蛋白-螢光異硫代氰酸酯複合物（賓州西葛洛夫，傑克森（Jackson）免疫研究實驗室）在冰浴中培育 30 分鐘。清洗細胞後，將其再懸浮於含有 1% 疊氮化鈉之 PBS 中並在流式細胞儀（加州聖荷西貝克頓-狄金遜（Becton-Dickinson））上分析。

如第 3 圖所示，作為同功型對照組之嵌合型抗體並未辨識出細胞株 J774。相反地，該抗-SO<sub>3</sub>-嵌合型抗體可辨識 93.7%之細胞。

#### 實例 4.人類主動脈中之動脈粥狀硬化斑塊之辨識

在人類主動脈片段（其係在福馬林中固定並包埋在石蠟中）上進行嵌合型抗體抗-SO<sub>3</sub>-辨識之免疫組織化學測定。使用固定在矽烷化玻片上之 4 微米組織切片並在 68 °C 培育 12 小時。將組織切片在二甲苯中脫去石蠟，並在逐漸降低濃度之乙醇中水化。然後，將其在蒸餾水中清洗 5 分鐘並在 PBS 中清洗。使用設定在 100 °C 之溫度下的恆溫浴將抗原去除遮蔽。將盤浸沒在維持在恆溫浴之檸檬酸緩衝劑（pH6.0）中 30 分鐘，然後利用微波爐烤箱在檸檬酸緩衝劑（pH6.8）中沸騰 10 分鐘。令切片冷卻 20 分鐘，然後以蒸餾水和 PBS 清洗之。在室溫下，以 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液抑制內生性過氧化酶 10 分鐘，以 PBS 清洗之，在室溫下加入濃度為 50 微克/毫升之經生物素化的嵌合型抗體抗-SO<sub>3</sub>-及同功型對照組抗體 30 分鐘。稍後，以 PBS 清洗玻片並同時在相同溫度下加入鏈抗生物素蛋白-過氧化酶複合物（Anacrom Diagnostics）。最後，將組織切片與在 1 毫升基質緩衝劑中之 3,3'-二胺基聯苯胺（DAB）的新鮮混合物溶液一起培育 3 至 5 分鐘。對比項係以邁耶蘇木（Mayer's hematoxylin）進行，將樣本在逐漸增加濃度之醇中脫水，在二甲苯中淨化，最後固定在永久介質盤

Eukitt (Kinder 有限公司) 中。利用白光顯微鏡進行評估 (萊卡)。

第 4 圖顯示抗-SO<sub>3</sub>-嵌合型抗體如何與存在主動脈中之動脈粥狀硬化損傷樣本強烈反應。其中可觀察到與載脂巨噬細胞或泡沫細胞之反應度及與損傷脂質核心之反應度 (反應度以深棕色顯示)。該圖顯示作為同功型對照組之抗體如何未辨識出人類主動脈切片。

實例 5：藉由抗-SO<sub>3</sub>-嵌合型抗體誘導老鼠體內抗肝素反應之能力

使用 10 隻 BALB/c 雌鼠；令其經由皮下途徑接受 50 微克在 200 微升中之抗-SO<sub>3</sub>-嵌合型抗體。每 14 天進行免疫化作用以完成全部共 4 個劑量。投服抗-SO<sub>3</sub>-嵌合型抗體，不加佐劑或載體蛋白。在第 0 天及 49 天 (第 4 個劑量後 7 天) 採取血清樣本。

利用實例 2 中所描述之 ELISA 技術，使用經塗覆肝素 (10 微克/毫升，100 微升/槽) 之 Maxisorp 盤測量經免疫化之動物血清中是否存有抗-肝素抗體。將老鼠血清在結合緩衝劑中稀釋 100 倍以供測試，100 微升/槽。使用與鹼性磷酸酶 (Jackson) 共軛之山羊抗老鼠 IgG 及 IgM 抗血清作為二級抗體。

第 5 圖顯示出以在第 0 天及 49 天採取之老鼠血清進行之檢定的結果。任何動物之免疫前血清 (第 0 天) 中均未偵測到存有抗肝素抗體。相反地，以抗-SO<sub>3</sub>-嵌合型抗

體將老鼠免疫化後可偵測到存有這些血清抗體。此結果指出該抗-SO<sub>3</sub>-嵌合型抗體不僅可強力辨認肝素，且具有令人驚訝之誘導對抗此分子的反應之能力（疫苗效果）。

#### 實例 6：抗-SO<sub>3</sub>-嵌合型抗體之抗動脈粥狀硬化作用

爲了評估該抗-SO<sub>3</sub>-嵌合型抗體是否能在活體內產生生物作用，吾人使用先前描述之以力保肪寧誘導兔子體內之動脈粥狀硬化損傷的模型（Takács E and cols. *Morphol Igazságügyi Orv Sz*, 26: 99-105, 1998, Noa M & R. *More Progress in Medical Sciences*, 6: 14-19, 1992）。

使用 15 隻紐西蘭兔子，將其分成 3 組，每組 5 隻。第 1 組不接受治療（陰性對照組）。第 2 組每日經由靜脈內途徑接受 2 毫升/公斤之力保肪寧 20%（Braun），共 8 天。在 7 天內經由皮下途徑給予第 3 組 3 個劑量之 100 微克在 PBS 中之抗-SO<sub>3</sub>-嵌合型抗體，最後一次免疫化當天開始每日投服力保肪寧，其投服計劃與第 2 組動物中所使用者相同。接受最後一個力保肪寧劑量後一天將所有兔子麻醉後殺死並在同一天殺死第 1 組陰性對照組動物。自動物取得主動脈，進行病理研究以決定是否出現肉眼可見及顯微鏡可見之動脈粥狀硬化損傷。

來自未接受治療之第 1 組兔子的主動脈顯示出無肉眼可見之損傷。在所有來自第 2 組兔子（其接受 8 天之 2 毫升/公斤之力保肪寧）之主動脈中可觀察到肉眼可見之損

傷。在先前接受 3 個劑量之抗-SO<sub>3</sub>-嵌合型抗體，再投予力保肪寧的兔子之主動脈中未觀察到肉眼可見之損傷。

爲了研究顯微鏡可見之損傷，將主動脈片段固定在福馬林中並包埋在石蠟中。使用固定在矽烷化玻片上之 4 微米組織切片並以蘇木紫-伊紅染色。利用白光顯微鏡（萊卡）進行評估。

如第 6 圖所示，當評估未接受治療之兔子的主動脈組織切片時，其均顯示出正常之動脈構造，並無改變。觀察來自接受力保肪寧之組別的所有兔子的主動脈切片之特有損傷時可觀察到：出現內膜增厚、胞外物質沈積在肌肉、彈性及膠原蛋白纖維間，及組織結構變形。相反地，來自接受 3 個劑量之抗-SO<sub>3</sub>-嵌合型抗體，再投服力保肪寧之三隻兔子的樣本並未觀察到顯微鏡可見之損傷。來自其餘二隻兔子之樣本中可觀察到動脈壁之某些區域中的某些不連接增厚中包含組織變化，且纖維間有胞外物質沈積。其中並無內膜增厚。

#### 【圖式簡單說明】

第 1 圖.藉由抗-SO<sub>3</sub>-嵌合型單株抗體辨識腦苷硫酸酯類

將不同濃度之抗-SO<sub>3</sub>-嵌合型單株抗體及同功型對照組嵌合型單株抗體加至塗覆以腦苷硫酸酯（其係在甲醇中，濃度爲 4 微克/毫升）的 ELISA 盤中。以與鹼性磷酸酶共軛之山羊抗-人  $\gamma$  鏈抗血清偵測反應性。在 ELISA 讀計中定量產物在 405nm 之吸收。（\*p<0.05，曼-惠特尼 U

試驗法 ( Mann-Whitney U test ) ) 。

#### 第 2 圖 . 藉由抗 -SO<sub>3</sub>-嵌合型單株抗體辨識肝素

將不同濃度之抗 -SO<sub>3</sub>-嵌合型單株抗體及同功型對照組嵌合型單株抗體加至塗覆以肝素 ( 其係在 HBSS 中 , 濃度為 10 微克 / 毫升 ) 的 ELISA 盤中 。 以與鹼性磷酸酶共軛之山羊抗 - 人  $\gamma$  鏈抗血清偵測反應性 。 在 ELISA 讀計中定量產物在 405nm 之吸收 。 ( \*p<0.05 , 曼 - 惠特尼 U 試驗法 ) 。

#### 第 3 圖 . 藉由抗 -SO<sub>3</sub>-嵌合型單株抗體辨識 J774 細胞株

將細胞與 10 微克 / 毫升之生物素化的抗體一起培育 。 以與 FITC 共軛之山羊抗 - 人 IgG 抗血清進行反應並藉由流式細胞計數分析 。

#### 第 4 圖 . 藉由抗 -SO<sub>3</sub>-嵌合型單株抗體辨識人類動脈粥狀硬化斑塊

將固定在福馬林中並包埋在石蠟中之人類主動脈片段 ( 4 微米 ) 與生物素化之抗 -SO<sub>3</sub>-嵌合型單株抗體及同功型對照組抗體一起培育 。 以鏈抗生物素蛋白 - 過氧化酶複合物進行反應 。 藉由抗 -SO<sub>3</sub>-單株抗體辨識之抗原決定部位係以深棕色表示 , 而細胞核以蘇木紫進行對比染色 。 ( 400X ) 。

#### 第 5 圖 . 以抗 -SO<sub>3</sub>-嵌合型單株抗體免疫化所誘導之抗肝素的抗體反應

在以抗 -SO<sub>3</sub>-嵌合型單株抗體進行免疫計劃之第 0 天及 49 天自 BALB/c 小鼠取得血清樣本並藉 ELISA 分析 。

各符號為以老鼠血清取得之數值。pI 及 hI：分別為免疫前及高度免疫（\* $p < 0.05$ ，曼－惠特尼 U 試驗法）

第 6 圖．在兔子力保肪寧模型中抗-SO3-嵌合型單株抗體於動脈粥狀硬化損傷之發展中的治療效果。

觀察代表不同研究組之兔子胸主動脈的組織切片。（A）第 1 組，未接受治療之動物，其顯示出動脈之正常構造，沒有變化。（B）第 2 組，以力保肪寧治療之動物，其中可觀察到動脈內膜增厚，胞外物質沈積在肌肉、彈性及膠原蛋白纖維間，及組織結構變形。（C 和 D）第 3 組，以抗-SO3-嵌合型單株抗體免疫化且稍後接受力保肪寧之動物；未觀察到明顯之組織傷害或內膜增厚。以蘇木紫-伊紅染色 180X。

## 序列表列

<110> 分子免疫學中心

<120> ANTICUERPOS QUE RECONOCEN SULFATIDOS Y PROTEOGLICANOS SULFATADOS Y SU USO.

<130> Anticuerpo anti sulfatidos

<160> 14

<170> PatentIn 第3.5版

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> 藉由DNA重組技術

<400> 1

Arg Tyr Ser Val His  
1 5

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> 藉由DNA重組技術

<400> 2

Met Ile Trp Gly Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser  
1 5 10 15

<210> 3

<211> 14

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> DNA重組技術

<400> 3

Ser Gly Val Arg Arg Gly Arg Ala Gln Ala Trp Phe Ala Tyr  
1 5 10

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> DNA重組技術

<400> 4

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala  
1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> 藉由DNA重組技術

<400> 5

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr  
1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> 藉由DNA重組技術

<400> 6

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr  
1 5

<210> 7

<211> 30

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> 藉由DNA重組技術

<400> 7

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln  
1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser  
20 25 30

<210> 8

<211> 14

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> 藉由DNA重組技術

<400> 8

Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly  
1 5 10

<210> 9

<211> 32

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> 藉由DNA重組技術

<400> 9

Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys  
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg  
20 25 30

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> 藉由DNA重組技術

<400> 10

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
1 5 10

<210> 11

<211> 23

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> 藉由DNA重組技術

<400> 11

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys  
20

<210> 12

<211> 15

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> 藉由DNA重組技術

<400> 12

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
1 5 10 15

<210> 13

<211> 32

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> 藉由DNA重組技術

<400> 13

Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
1 5 10 15

Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys  
20 25 30

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> 藉由DNA重組技術

<400> 14

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
1 5 10

**七、申請專利範圍：**

1. 一種特異結合腦苷硫酸酯類及硫酸化蛋白聚糖類之單株抗體，其中重鏈及輕鏈之可變區的互補決定區（CDRs）之序列顯示如下：

**重鏈**

HCDR1 RYSVH  
HCDR2 MIWGGGSTDYNSALKS  
HCDR3 SGVRRGRAQAWFAY

**輕鏈**

LCDR1 KASQDVSTAVA  
LCDR2 SASYRYT  
LCDR3 QQHYSTPWT

；且其中重鏈及輕鏈之可變區內的框構區之序列顯示如下：

**重鏈**

HFR1 QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSL S  
HFR2 WVRQPPGKGLEWLG  
HFR3 RLSISKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAMYYCAR  
HFR4 WGQGTLVTVSA

**輕鏈**

LFR1 DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITC  
LFR2 WYQQKPGQSPKLLIY  
LFR3 GVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYC  
LFR4 FGGGTKLELK

2. 如申請專利範圍第 1 項之單株抗體，其中恆定區之序列在重鏈為人 IgG1 且在輕鏈為 Ck。

3. 一種醫藥組成物，其包含如申請專利範圍第 1 或 2

項之單株抗體。

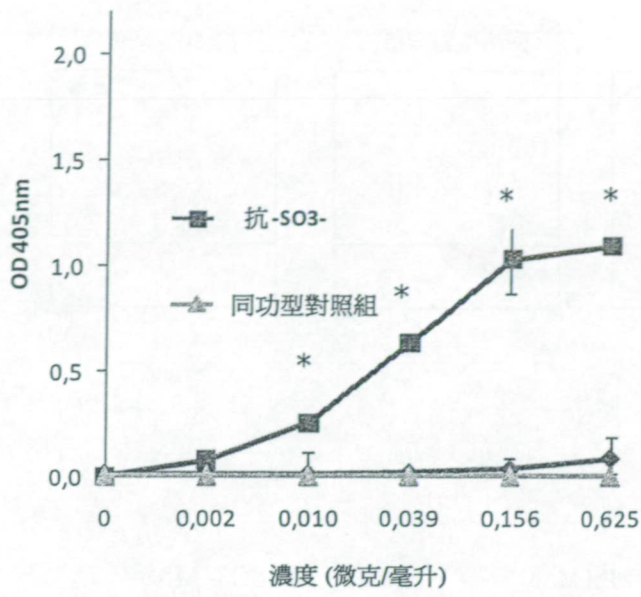
4.如申請專利範圍第 3 項之醫藥組成物，其進一步包含藥學上可接受之賦形劑。

5.如申請專利範圍第 4 項之醫藥組成物，其進一步包含佐劑。

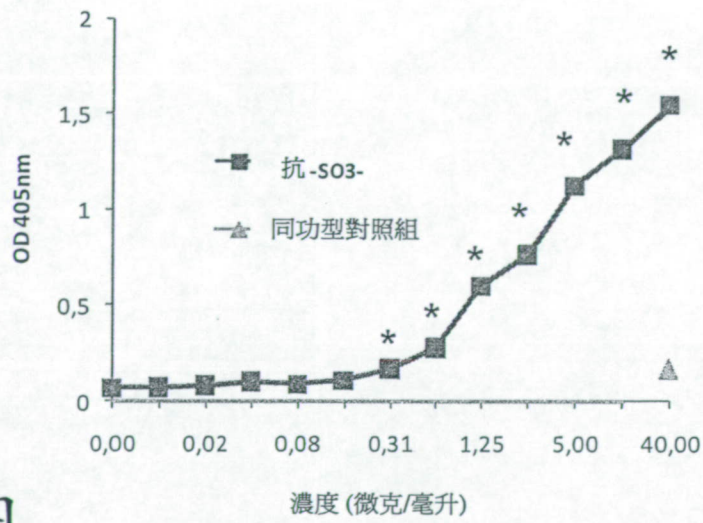
6.一種用於診斷動脈粥狀硬化損傷之試劑套組，其包含如申請專利範圍第 1 或 2 項之單株抗體。

7.如申請專利範圍第 1 或 2 項之單株抗體，用於製造用於治療動脈粥狀硬化之藥物。

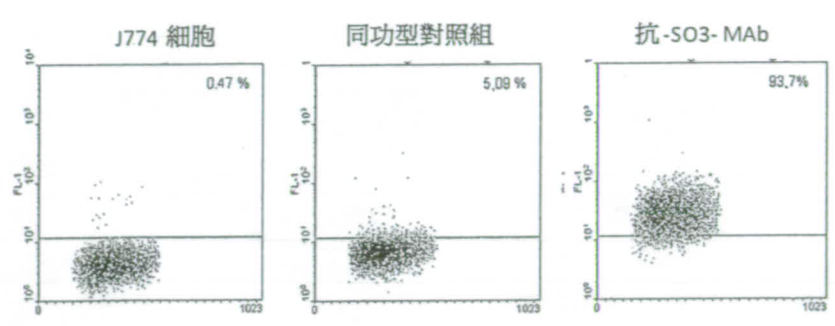
8. 一種如申請專利範圍第 1 或 2 項之單株抗體作為特異性(idiotypic)疫苗的用途。



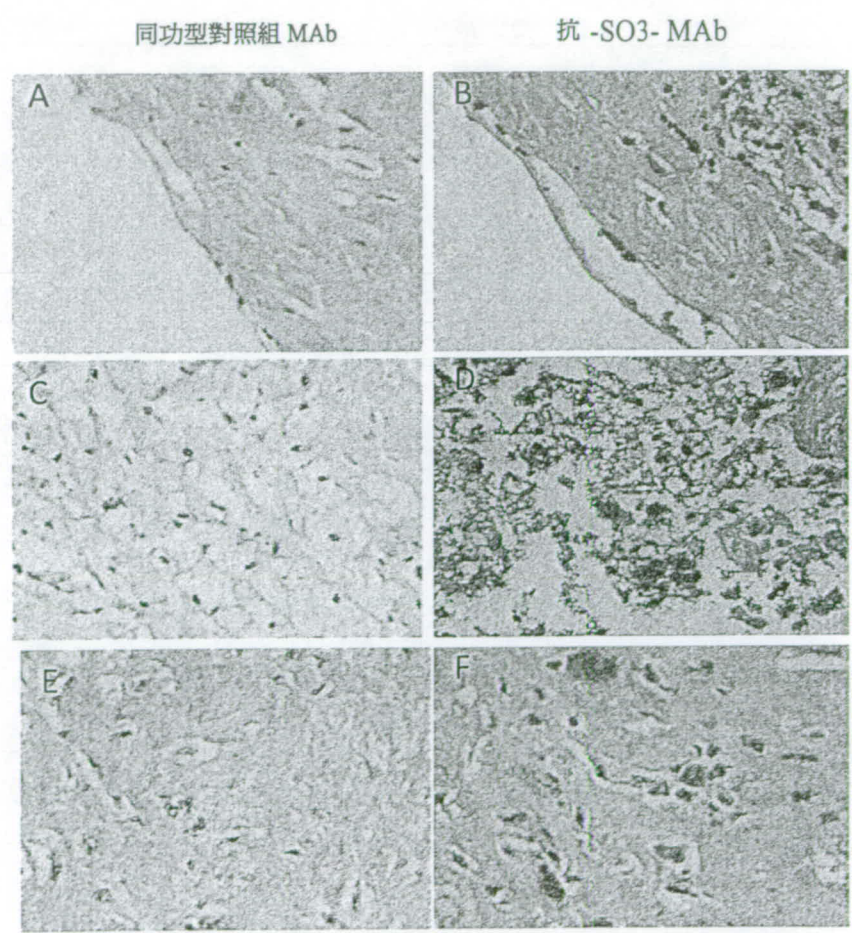
第1圖



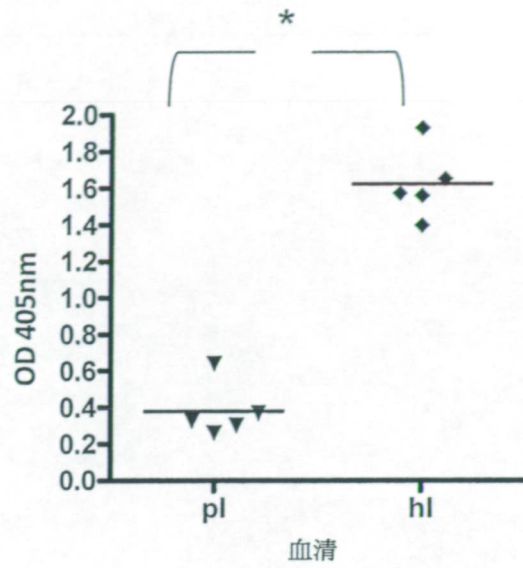
第2圖



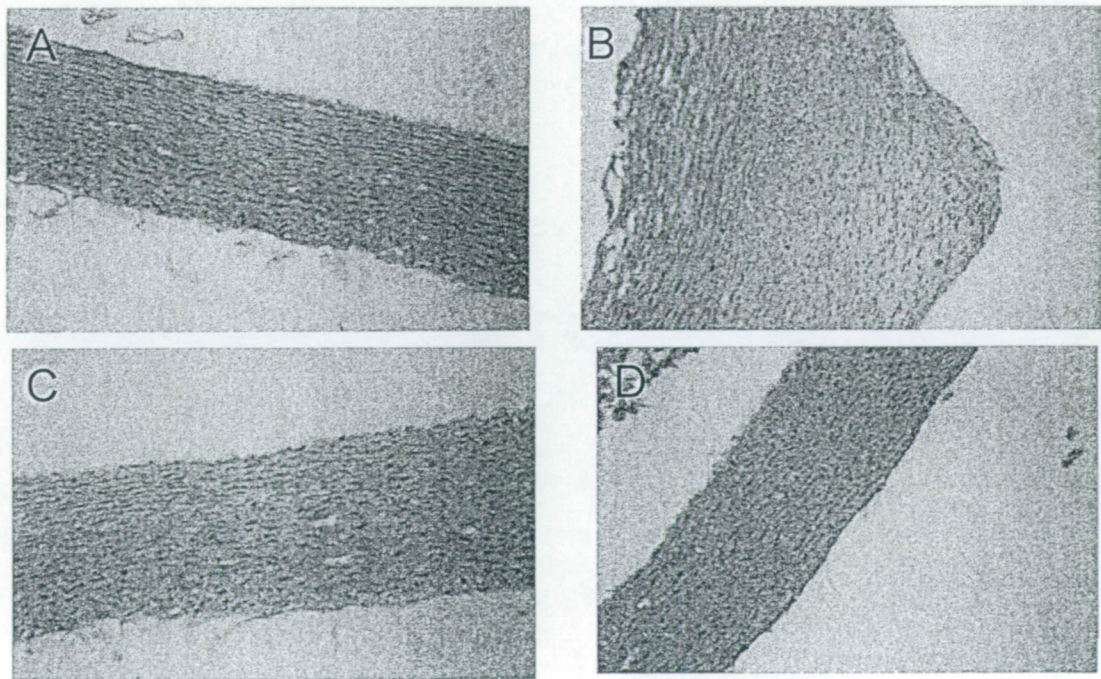
第3圖



第4圖



第5圖



第6圖