

公告本
-----

# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：94/26072

※ 申請日期：94.8.1

※IPC 分類：C07K 16/18(2006.01)

A61K 28/16 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

抗澱粉狀蛋白-β胜肽之抗體及其使用方法

ANTIBODIES DIRECTED AGAINST AMYLOID-BETA PEPTIDE AND  
METHODS USING SAME

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

美商雷那特神經科學股份有限公司

RINAT NEUROSCIENCE CORP.

代表人：(中文/英文)

大衛 W 普理查

PRITCHARD, DAVID W.

住居所或營業所地址：(中文/英文)

美國加州南舊金山市東葛蘭大道230號

230 E. GRAND AVE., SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080, U.S.A.

國籍：(中文/英文)

美國 U.S.A.

三、發明人：(共 4 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 艾儂 羅森塞爾

ROSENTHAL, ARNON

2. 強 波恩

PONS, JAUME

3. 偉憲 何

HO, WEI-HSIEN

4. 珍 馬克斯 葛林姆

GRIMM, JAN MARKUS

國 籍：(中文/英文)

1. 美國 U.S.A.

2. 西班牙 SPAIN

3. 美國 U.S.A.

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；2004年07月30日；60/592,494
2. 美國；2005年02月14日；60/653,197
3. 美國；2005年04月29日；60/676,093

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】

1. 中華民國；食品工業發展研究所；2005/10/4；BCRC 940486
2. 中華民國；食品工業發展研究所；2005/10/4；BCRC 940487
3. 中華民國；食品工業發展研究所；2005/10/4；BCRC 940488
4. 中華民國；食品工業發展研究所；2005/10/4；BCRC 940489

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

1. 美國；ATCC；2004/7/20；PTA-6124
2. 美國；ATCC；2004/7/20；PTA-6125
3. 美國；ATCC；2005/6/15；PTA-6786
4. 美國；ATCC；2005/6/15；PTA-6787

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

## 九、發明說明：

相關專利之交叉參考資料

本申請案主張2004年7月30日申請之美國臨時專利申請案第60/592,494號、2005年2月14日申請之美國臨時專利申請案第60/653,197號及2005年4月29日申請之美國臨時專利申請案第60/676,093號之權利；將其全文以引用的方式併於本文中。

### 【發明所屬之技術領域】

本發明係關於抗澱粉狀蛋白- $\beta$ 胜肽之抗體。本發明更關於此抗體於治療及/或預防疾病(如阿耳滋海默氏症)之用途。

### 【先前技術】

阿耳滋海默氏症(AD, Alzheimer's disease)為退化性腦部疾病，臨床上的特徵為逐漸的記憶衰退、混淆、逐漸身體退化及最後死亡。全世界大約有1500萬人罹患阿耳滋海默氏症，且隨壽命增加預期此數字將巨幅增加。組織學上，此疾病的特徵為主要見於聯合皮質區(association cortex)、邊緣系統(limbic system)及基底核(basal ganglia)的神經炎斑(neuritic plaques)。此等斑的主要組成份為澱粉狀蛋白- $\beta$ 胜肽( $A\beta$ , amyloid beta peptide)，其為 $\beta$ 澱粉狀蛋白前驅蛋白質( $\beta$ APP或APP, amyloid precursor protein)之切斷產物。APP為含有一個大的異位N端區塊、一個跨膜區塊、及一個小的細胞質C端尾巴的第I型跨膜糖蛋白。在第21個染色體上單一APP基因轉錄體之選擇性剪接



(alternative splicing)造成胺基酸數目不同的數個亞型(isoforms)。

A $\beta$ 似乎在阿耳滋海默氏症的神經病理學中具有重要角色。已將此疾病的遺傳形式關聯至APP及早老素(Presenilin)基因的突變(Tanzi等人, 1996, Neurobiol. Dis. 3:159-168; Hardy, 1996, Ann. Med. 28:255-258)。於此等基因中疾病關聯的突變造成在澱粉狀蛋白斑中主要形式之42個胺基酸形式A $\beta$ 製造增加。再者, 用人類A $\beta$ 接種過度表現疾病關聯的突變形式APP之基因轉殖鼠降低斑負擔及相關的病變(Schenk等人, 1999, Nature 400:173-177; 世界專利WO 99/27944), 及體表給予抗A $\beta$ 抗體也降低腦中的斑負擔(Bard等人, 2000, Nature Medicine 6(8):916-919; 世界專利WO 2004/032868; WO 00/72880)。

曾有報導說微膠細胞(microglial cell)及/或巨噬細胞之Fc媒介的吞噬作用對於活體內斑清除之過程為重要。Bard等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 2023-2028(2003)。然而, 也曾報導非Fc媒介的機制涉及由免疫療法之活體內澱粉狀蛋白- $\beta$ 清除。Bacsikai等人, J. Neurosci. 22:7873-7878(2002); Das等人, J. Neurosci. 23:8532-8538(2003)。

所以抗體療法提供治療及預防阿耳滋海默氏症的一種有希望的方法。然而, 用包括A $\beta$ 1-42之疫苗的人類臨床試驗中止因為在病患之子集中發生腦膜腦炎(Meningoencephalitis)。Orgogozo等人, Neurology 61:7-8(2003); Ferrer等人, Brain Pathol. 14:11-20(2004)。曾報

導用N端專一的抗-A $\beta$ 抗體之被動免疫造成顯著降低主要擴散澱粉狀蛋白，但是引起增加大腦微出血頻率於呈現年齡相關的澱粉狀蛋白斑生長及神經退化以及類似於在人類AD腦中觀察到的腦澱粉狀蛋白血管病(CAA, cerebral amyloid angiopathy)之基因轉殖鼠中。Pfeifer等人，Science 298:1379(2002)。曾建議由抗 $\beta$ -澱粉狀蛋白抗體之被動免疫在APP基因轉殖鼠中腦澱粉狀蛋白血管病(CAA, cerebral amyloid angiopathy)相關的微出血之惡化視抗體辨識澱粉狀蛋白 $\beta$ 胜肽之沉澱形式而定。Racke等人，J. Neurosci. 25:629-636(2005)。曾建議用抗澱粉狀蛋白沉澱物之胜肽成分的抗體之被動免疫(此抗體缺乏Fc區域)以便降低發炎的危險。世界專利WO 03/086310。仍有需要具有改善的功效及安全特性與適用於人類病患之抗A $\beta$ 抗體及其他免疫療法藥劑。

遍及本申請案引用許多文獻(包括專利及專利申請案)。此等文獻之揭示全文以引用的方式併於本文中。

### 【發明內容】

#### 第I段

本發明於本文中揭示關於結合至A $\beta$ <sub>1-40</sub>胜肽(示於表4中的SEQ ID NO:15)的C端之抗體。於是，一方面，本發明為由具有ATCC登錄號PTA-6124及PTA-6125之表現載體產生的抗體9TL(可互換地稱為「9TL」)。將9TL的重鏈及輕鏈可變區域之胺基酸序列示於圖1中。也將抗體9TL的互補決定區(CDR, complementarity determining region)部分(包括

裘蒂艾(Chothia)及卡巴(Kabat)CDRs)示於圖1中。當然提及9TL的任何部分或整個區域包含由具有ATCC登錄號PTA-6124及PTA-6125之表現載體製造的序列，及/或繪於圖1中的序列。

另一方面，本發明也提供具有示於表3中的胺基酸序列之9TL抗體變體。

另一方面，本發明為一種抗體，包含示於表3中的抗體9TL或其變體之片段或區域。於一個實施例中，片段為抗體9TL的輕鏈。於另一個實施例中，片段為抗體9TL的重鏈。於再另一個實施例中，片段含有來自抗體9TL的輕鏈及/或重鏈的一或多個可變區域。於再另一個實施例中，片段含有如圖1中所示來自抗體9TL的輕鏈及/或重鏈的一或多個可變區域。於再另一個實施例中，片段含有來自抗體9TL的輕鏈及/或重鏈的一或多個CDRs。

另一方面，本發明提供多胜肽(其可為或可不為抗體)，包含下列之任何一或多者：a)示於表3中抗體9TL或其變體之一或多個CDR；b)來自示於表3中抗體9TL或其變體之重鏈的CDR H3；c)來自示於表3中抗體9TL或其變體之輕鏈的CDR L3；d)來自示於表3中抗體9TL或其變體之輕鏈的三個CDRs；e)來自示於表3中抗體9TL或其變體之重鏈的三個CDRs；f)來自示於表3中抗體9TL或其變體之輕鏈的三個CDRs及重鏈的三個CDRs。本發明更提供多胜肽(其可為或可不為抗體)，包含下列之任何一或多者：a)衍生自示於表3中抗體9TL或其變體之一或多(一、二、三、四、

五、或六)個 CDR； b) 衍生自來自抗體 9TL 重鏈的 CDR H3 之 CDR； 及/或衍生自來自抗體 9TL 輕鏈的 CDR L3 之 CDR。於一些實施例中，CDR 為示於圖 1 中的 CDR。於一些實施例中，衍生自示於表 3 中抗體 9TL 或其變體之一或多個 CDR 為至少約 85%、至少約 86%、至少約 87%、至少約 88%、至少約 89%、至少約 90%、至少約 91%、至少約 92%、至少約 93%、至少約 94%、至少約 95%、至少約 96%、至少約 97%、至少約 98%、或至少約 99% 相等於 9TL 或其變體之至少一個、至少兩個、至少三個、至少四個、至少五個、或至少六個 CDR。

於一些實施例中，CDR 為卡巴 CDR。於其他實施例中，CDR 為裘蒂艾 CDR。於其他實施例中，CDR 為卡巴及裘蒂艾 CDR 之組合(也稱為「組合的 CDR」或「延伸的 CDR」)。換言之，對於含有多於一個 CDR 的任何特定實施例，CDR 可為卡巴、裘蒂艾、及/或其組合。

於一些實施例中，本發明的抗體為人類抗體。於其他實施例中，本發明的抗體為人化抗體。於一些實施例中，抗體為單株。於一些實施例中，將抗體(或多胜肽)分離。於一些實施例中，抗體(或多胜肽)大體上為純的。

於一些實施例中，抗體包含經改質的固定區域，如為免疫學上惰性(與用詞「具有受損的作用功能」可互換地使用)的固定區域，如不驅動補體媒介的分解、或不刺激抗體相關的細胞調節細胞毒性(ADCC, antibody-dependent cell mediated cytotoxicity)、或不活化微膠細胞。於一些

實施例中，將固定區域如 Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624；PCT專利申請案 PCT/GB99/01441；及/或大英聯合王國專利申請案第 9809951.8 號中所述改質。於其他實施例中，抗體包含人類重鏈 IgG2a 固定區域，其含有下列突變：A330P331 成為 S330S331 (胺基酸編號參照野生型 IgG2a 序列)。Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624。於一些實施例中，抗體包含含有下列突變之 IgG4 固定區域：E233F234L235 成為 P233V234A235。於再其他實施例中，將固定區域無醣化做 N-連結的醣化。於一些實施例中，藉由突變寡醣連接的殘基 (如 Asn297) 及/或於固定區域中為 N-醣化辨識序列部分的側邊殘基，將固定區域無醣化做 N-連結的醣化。於一些實施例中，將固定區域無醣化做 N-連結的醣化。用酵素或藉由在醣化缺陷的宿主細胞中表現可將固定區域無醣化做 N-連結的醣化。

另一方面，本發明提供多核苷酸 (其可為分離的)，其包含編碼表 3 中所示的抗體 9TL 或其變體之片段或區域的多核苷酸。於一個實施例中，片段為抗體 9TL 的輕鏈。於另一個實施例中，片段為抗體 9TL 的重鏈。於再另一個實施例中，片段含有來自抗體 9TL 的輕鏈及/或重鏈的一或多個可變區域。於再另一個實施例中，片段含有來自抗體 9TL 的輕鏈及/或重鏈的一或多 (即一、二、三、四、五、六) 個互補決定區 (CDRs, complementarity determining regions)。

另一方面，本發明為多核苷酸 (其可為分離的)，其包含編碼示於表 3 中的抗體 9TL 或其變體之多核苷酸。於一些實

施例中，多核苷酸包含示於SEQ ID NO:9及SEQ ID NO:10中的任一或兩者多核苷酸。

另一方面，本發明提供編碼本文中所述之任何抗體(包括抗體片段)或多胜肽之多核苷酸。

另一方面，本發明提供載體(包括表現及選殖載體)及宿主細胞，其包含本文中揭示之任何多核苷酸。於一些實施例中，載體為具有ATCC編號PTA-6124的pDb.9TL.hFc2a。於其他實施例中，載體為具有ATCC編號PTA-6125的pEb.9TL.hK。

另一方面，本發明為宿主細胞，其包含編碼本文中說明之任何抗體的多核苷酸。

另一方面，本發明為由示於表3中的抗體9TL或其變體結合 $A\beta_{1-40}$ 之複合物。

另一方面，本發明為由本文中說明之任何抗體或多胜肽結合 $A\beta_{1-40}$ 之複合物。

另一方面，本發明為一種醫藥組合物，其包含有效量之本文中說明的任何多胜肽(包括抗體，如包含抗體9TL的一或多個CDRs之抗體)或多核苷酸，及醫藥上可接受的賦形劑。

另一方面，本發明為產生抗體9TL的方法，其包含在允許製造抗體9TL的條件下培養宿主細胞或其子代，其中宿主細胞包含編碼抗體9TL的表現載體；及於一些實施例中，純化抗體9TL。於一些實施例中，表現載體包含一或兩者示於SEQ ID NO:9及SEQ ID NO:10中之多核苷酸序

列。

另一方面，本發明提供產生本文中所述的任何抗體或多胜肽的方法，其藉由在適當的細胞中表現一或多個編碼抗體(可將其分開地表現為單一輕或重鏈，或將輕鏈及重鏈兩者由一個載體表現)或多胜肽的多核苷酸，一般接著回收及/或分離所需的抗體或多胜肽。

本發明也提供用以預防、治療、抑制、或延遲阿耳滋海默氏症及其他與改變的 $A\beta$ 或 $\beta$ APP表現或 $A\beta$ 胜肽累積有關的疾病，如蒙古症(Down's syndrome)、帕金森氏症(Parkinson's disease)、多發梗塞性痴呆症(Multi-infarct Dementia)、輕度知能障礙(Mild Cognitive Impairment)、及腦澱粉狀蛋白血管病之發展。方法包含給予個體有效劑量之醫藥組合物，其包含本發明之抗體、多胜肽、或多核苷酸。

本發明也提供方法延緩與阿耳滋海默氏症或與 $A\beta$ 胜肽累積有關的其他疾病相關的症狀之發展，其包含給予個體有效劑量之醫藥組合物，其包含本發明之抗體、多胜肽、或多核苷酸。

本發明也提供抑制個體中澱粉狀蛋白斑形成及/或澱粉狀蛋白累積之方法，其包含給予個體有效劑量之醫藥組合物，其包含本發明之抗體、多胜肽、或多核苷酸。於一些實施例中，澱粉狀蛋白斑係於個體的腦(腦組織)中。於一些實施例中，澱粉狀蛋白斑係於大腦血管中。於其他實施例中，澱粉狀蛋白累積是在循環系統中。

本發明也提供降低個體中澱粉狀蛋白斑及/或澱粉狀蛋白累積之方法，其包含給予個體有效劑量之醫藥組合物，其包含本發明之抗體、多胜肽、或多核苷酸。於一些實施例中，澱粉狀蛋白斑係於個體的腦(腦組織)中。於一些實施例中，澱粉狀蛋白斑係於大腦血管中。於其他實施例中，澱粉狀蛋白累積是在循環系統中。

本發明也提供移除或清除個體中澱粉狀蛋白斑及/或澱粉狀蛋白累積之方法，其包含給予個體有效劑量之醫藥組合物，其包含本發明之抗體、多胜肽、或多核苷酸。於一些實施例中，澱粉狀蛋白斑係於個體的腦(腦組織)中。於一些實施例中，澱粉狀蛋白斑係於大腦血管中。於其他實施例中，澱粉狀蛋白累積是在循環系統中。

此外，本發明提供抑制A $\beta$ 胜肽累積在組織中的方法，其包含使組織與本發明的抗體或多胜肽接觸。

本發明也提供降低A $\beta$ 胜肽(如可溶、寡聚合及沉澱的形式)於個體腦中的方法，其包含給予個體有效量之本發明抗體或多胜肽。於一些實施例中，抑制及/或降低A $\beta$ 胜肽在腦中的累積。於一些實施例中，將A $\beta$ 胜肽的毒性作用抑制及/或降低。因此，可使用本發明的方法來治療A $\beta$ 胜肽的累積存在或可能存在之任何疾病，如阿耳滋海默氏症、蒙古症、帕金森氏症、多發梗塞性痴呆症、輕度知能障礙、及腦澱粉狀蛋白血管病。

本發明也提供改善知能或倒轉與個體腦中A $\beta$ 沉澱有關的疾病(如阿耳滋海默氏症)相關的知能衰退之方法，其包含



給予個體有效劑量之醫藥組合物，其包含本發明之抗體、多胜肽、或多核苷酸。

可使用本文中所述的任何抗體、多胜肽、或多核苷酸於本發明的方法中。於一些實施例中，抗體為抗體9TL。

更可將本發明的抗體及多胜肽用於偵測、診斷及監測阿耳滋海默氏症及與改變的A $\beta$ 或 $\beta$ APP表現有關的其他疾病，如蒙古症。此方法包含使可能具有改變的A $\beta$ 或 $\beta$ APP表現的病患之樣本與本發明的抗體接觸及決定是否A $\beta$ 或 $\beta$ APP的量與控制組或比較樣本不同。於一些實施例中，在給予抗-A $\beta$ 抗體之前及之後測量血清A $\beta$ 量；及評估血清A $\beta$ 量之任何增加。

本發明之任何抗體及多胜肽之給予可為藉由技藝中已知之任何方式，包括：靜脈內、皮下、經由吸入、動脈內、肌肉內、心臟內、腦室內、非經腸胃、脊髓腔內 (intrathecally)、及腹腔內。給予可為全身性，如靜脈內，或為局部的。此也普遍適用於本發明的多胜肽及多核苷酸。

另一方面，本發明提供套組及組合物，其含有本文中所述之任何一或多種組合物。此等套組(通常於適當的包裝內及具有適當用法說明)有用於本文中所述之任何方法。

## 第II段

本發明提供方法以治療特徵為腦中蛋白質沉積的神經學症狀而不導致個體的發炎。方法包含給予個體有效量之醫藥組合物，其包含專一地結合至蛋白質或蛋白質沉積物的

抗體，或編碼此抗體的多核苷酸，其中此抗體具有受損的作用功能。

本發明也提供方法以治療或預防與個體中A $\beta$ -澱粉狀蛋白沉積(如沉積於腦組織及大腦血管中)有關的疾病，如阿耳滋海默氏症、蒙古症、多發梗塞性痴呆症、輕度知能障礙、及腦澱粉狀蛋白血管病。此方法包含給予個體有效量之醫藥組合物，其包含專一地結合至 $\beta$ -澱粉狀蛋白胜肽或 $\beta$ -澱粉狀蛋白胜肽之聚集形式之抗體，或編碼此抗體的多核苷酸，其中此抗體具有受損的作用功能。

本發明也提供方法延緩個體中與A $\beta$ -澱粉狀蛋白沉積有關的疾病(如阿耳滋海默氏症)相關的症狀發展，其包含給予個體有效劑量之醫藥組合物，其包含專一地結合至 $\beta$ -澱粉狀蛋白胜肽或 $\beta$ -澱粉狀蛋白胜肽之聚集形式之抗體，或編碼此抗體的多核苷酸，其中此抗體具有受損的作用功能。

本發明也提供抑制個體中澱粉狀蛋白斑形成及/或澱粉狀蛋白累積之方法，其包含給予個體有效劑量之醫藥組合物，其包含專一地結合至 $\beta$ -澱粉狀蛋白胜肽或 $\beta$ -澱粉狀蛋白胜肽之聚集形式之抗體，或編碼此抗體的多核苷酸，其中此抗體具有受損的作用功能。於一些實施例中，澱粉狀蛋白斑係於個體的腦(腦組織)中。於一些實施例中，澱粉狀蛋白斑係於大腦血管中。於一些實施例中，澱粉狀蛋白累積是在循環系統中。

本發明也提供降低個體中澱粉狀蛋白斑及/或澱粉狀蛋

白累積之方法，其包含給予個體有效劑量之醫藥組合物，其包含專一地結合至 $\beta$ -澱粉狀蛋白胜肽或 $\beta$ -澱粉狀蛋白胜肽之聚集形式之抗體，或編碼此抗體的多核苷酸，其中此抗體具有受損的作用功能。於一些實施例中，澱粉狀蛋白斑係於個體的腦(腦組織)中。於一些實施例中，澱粉狀蛋白斑係於大腦血管中。於一些實施例中，澱粉狀蛋白累積是在循環系統中。

本發明也提供移除或清除個體中澱粉狀蛋白斑及/或澱粉狀蛋白累積之方法，其包含給予個體有效劑量之醫藥組合物，其包含專一地結合至 $\beta$ -澱粉狀蛋白胜肽或 $\beta$ -澱粉狀蛋白胜肽之聚集形式之抗體，或編碼此抗體的多核苷酸，其中此抗體具有受損的作用功能。於一些實施例中，澱粉狀蛋白斑係於個體的腦(腦組織)中。於一些實施例中，澱粉狀蛋白斑係於大腦血管中。於一些實施例中，澱粉狀蛋白累積是在循環系統中。

本發明也提供用以抑制 $A\beta$ 胜肽累積在組織中的方法，其包含使組織與專一地結合至 $\beta$ -澱粉狀蛋白胜肽或 $\beta$ -澱粉狀蛋白胜肽之聚集形式之抗體接觸，其中此抗體具有受損的作用功能。

本發明也提供降低個體中 $A\beta$ 胜肽(如可溶、寡聚合及沉澱的形式)的方法，其包含給予個體有效量之專一地結合至 $\beta$ -澱粉狀蛋白胜肽或 $\beta$ -澱粉狀蛋白胜肽之聚集形式之抗體，或編碼此抗體的多核苷酸，其中此抗體具有受損的作用功能。於一些實施例中，抑制及/或降低 $A\beta$ 胜肽在腦中

的累積。於一些實施例中，將A $\beta$ 胜肽的毒性作用抑制及/或降低。因此，可使用本發明的方法來治療A $\beta$ 胜肽的累積存在或可能存在之任何疾病，如阿耳滋海默氏症、蒙古症、帕金森氏症、及多發梗塞性痴呆症。

本發明也提供改善知能或倒轉與個體腦中A $\beta$ 沉澱有關的疾病(如阿耳滋海默氏症)相關的知能衰退之方法，其包含給予個體有效劑量之醫藥組合物，其包含專一地結合至 $\beta$ -澱粉狀蛋白胜肽或 $\beta$ -澱粉狀蛋白胜肽之聚集形式之抗體，或編碼此抗體的多核苷酸，其中此抗體具有受損的作用功能。

本發明也提供治療或預防與A $\beta$ 的澱粉狀蛋白沉澱有關的疾病之方法，其包含給予個體有效劑量之醫藥組合物，其包含專一地結合至 $\beta$ -澱粉狀蛋白胜肽或 $\beta$ -澱粉狀蛋白胜肽之聚集形式之抗體，其中此抗體包含與天然發生的Fc區域有差異的Fc區域，其中此差異造成受損的作用功能，因而此抗體之給予比不具此差異的抗體之給予引發較少大腦微出血。

也可使用專一地結合至A $\beta$ 胜肽或A $\beta$ 胜肽之聚集形式且包含具有受損的作用功能之重鏈固定區域的多胜肽於本文中所述的任何方法。於一些實施例中，多胜肽包含衍生自如表3中所示的抗體9TL或其變體之序列(如一或多個CDR)。於一些實施例中，多胜肽包含衍生自抗體6G之序列(如一或多個CDR)。

用於本發明方法之抗體及多胜肽專一地結合至A $\beta$ 胜肽或

A $\beta$ 胜肽之聚集形式，但具有受損的作用功能。於一些實施例中，抗體或多胜肽不是F(ab')<sub>2</sub>片段。於一些實施例中，抗體或多胜肽不是Fab片段。於一些實施例中，抗體或多胜肽不是單鏈抗體scFv。

於一些實施例中，抗體或多胜肽包含具有受損的作用功能之重鏈固定區域，其中重鏈固定區域包含Fc區域。於一些實施例中，將Fc區域中的N-醣化去除。於一些實施例中，Fc區域包含突變於N-醣化辨識序列內，因而抗體或多胜肽的Fc區域不受N-醣化。於一些實施例中，將Fc區域聚乙二醇化(PEGylated)。於一些實施例中，抗體或多胜肽的重鏈固定區域為含有下列突變之人類重鏈IgG2a固定區域：A330P331成為S330S331(胺基酸編號參照野生型IgG2a序列)。於一些實施例中，抗體或多胜肽包含含有下列突變之IgG4固定區域：E233F234L235成為P233V234A235。

於一些實施例中，抗體或多胜肽專一地結合至A $\beta$ 胜肽之殘基1-16內的抗原決定區。於一些實施例中，抗體或多胜肽專一地結合至A $\beta$ 胜肽之殘基16-28內的抗原決定區。於一些實施例中，抗體專一地結合至A $\beta$ 胜肽之C端側上的抗原決定區，如由胺基酸25或之後開始的抗原決定區。抗體可專一地結合至C端截斷的A $\beta$ 胜肽(例如A $\beta$  1-37、1-38、1-39、1-40、1-41、1-42、1-43)之游離C端胺基酸。於一些實施例中，抗體或多胜肽專一地結合至A $\beta$ <sub>1-40</sub>胜肽之殘基28-40內的抗原決定區。於一些實施例中，抗體或多胜肽專一地結合至A $\beta$ <sub>1-42</sub>胜肽之殘基28-42內的抗原決定區。

於一些實施例中，抗體或多胜肽專一地結合至 $A\beta_{1-43}$ 胜肽之殘基28-43內的抗原決定區。於一些實施例中，抗體或多胜肽專一地結合至 $A\beta$ 胜肽而不結合至全長澱粉狀蛋白前驅蛋白質(APP, amyloid precursor protein)。於一些實施例中，抗體或多胜肽專一地結合至 $A\beta$ 之聚集形式而不結合至可溶的形式。於一些實施例中，抗體或多胜肽專一地結合至 $A\beta$ 之可溶的形式而不結合至聚集形式。於一些實施例中，抗體或多胜肽專一地結合至 $A\beta$ 之聚集形式及可溶的形式兩者。

於一些實施例中，抗體或多胜肽專一地結合至 $A\beta_{1-40}$ 之C端胜肽33-40。於一些實施例中，抗體或多胜肽專一地結合至 $A\beta_{1-40}$ 上包括胺基酸35-40的抗原決定區。於一些實施例中，抗體或多胜肽專一地結合至 $A\beta_{1-40}$ 上包括胺基酸36-40的抗原決定區。於一些實施例中，抗體或多胜肽專一地結合至 $A\beta_{1-40}$ 上包括胺基酸39及/或40的抗原決定區。於一些實施例中，抗體或多胜肽專一地結合至 $A\beta_{1-40}$ 但不專一地結合至 $A\beta_{1-42}$ 及/或 $A\beta_{1-43}$ 。於一些實施例中，抗體包含抗體9TL或本文中所述衍生自9TL的抗體之可變區域。於一些實施例中，抗體或多胜肽競爭性地抑制抗體9TL及/或衍生自9TL的抗體或多胜肽結合至 $A\beta_{1-40}$ 。

於一些實施例中，抗體或多胜肽以較其結合至 $A\beta_{1-42}$ 及 $A\beta_{1-43}$ 更高的親合力結合至 $A\beta_{1-40}$ 。於一些實施例中，抗體或多胜肽專一地結合至 $A\beta_{1-40}$ 上包括胺基酸25-34及40的抗原決定區。於一些實施例中，抗體包含抗體6G或本文中所述

述衍生自6G的抗體之可變區域。於一些實施例中，抗體或多胜肽競爭性地抑制抗體6G及/或衍生自6G的抗體或多胜肽結合至A $\beta$ 。

專一地結合至A $\beta$ 胜肽且具有受損的作用功能的抗體或多胜肽之給予可為藉由技藝中已知之任何方式，包括：靜脈內、皮下、經由吸入、動脈內、肌肉內、心臟內、腦室內、非經腸胃、脊髓腔內(intrathecally)、及腹腔內。給予可為全身性，如靜脈內，或為局部的。此也普遍適用於本發明的多胜肽及多核苷酸。

本發明也提供醫藥組合物，其包含有效量之專一地結合至A $\beta$ 胜肽或A $\beta$ 胜肽之聚集形式且具有受損的作用功能之任何抗體或多胜肽，或編碼此抗體或多胜肽之多核苷酸，及醫藥上可接受的賦形劑。

本發明也提供套組及組合物，其包含任何一或多種組合物，其包括有效量之專一地結合至A $\beta$ 胜肽或A $\beta$ 胜肽之聚集形式且具有受損的作用功能之任何抗體或多胜肽，或編碼此抗體或多胜肽之多核苷酸。此等套組(通常於適當的包裝內及具有適當用法說明)有用於本文中所述之任何方法。

### 【實施方式】

本文中揭示的發明提供結合至A $\beta$ <sub>1-40</sub>的C端之抗體及多胜肽。此等抗體及多胜肽係衍生自9TL及其變體(如表3所示)。本發明也提供此等抗體之製造及使用方法。於一些實施例中，本發明提供抗體9TL，及製造與使用此抗體之

方法。本發明也提供結合 $A\beta_{1-40}$ 的9TL多胜肽(包括抗體)，及編碼9TL抗體及/或多胜肽之多核苷酸。

本文中揭示的發明也提供方法以預防及/或治療個體中 $A\beta$ 相關的疾病，如阿耳滋海默氏症、蒙古症、帕金森氏症、多發梗塞性痴呆症、輕度知能障礙、腦澱粉狀蛋白血管病、由 $A\beta$ 胜肽於血管中之沉澱引發的血管疾病(如中風及HCHWA-D)，其係藉由給予治療有效量之抗體9TL，或衍生自9TL的抗體或多胜肽。

本發明也提供方法以治療或預防個體中與 $\beta$ -澱粉狀蛋白沉積有關的疾病，如個體中的阿耳滋海默氏症、蒙古症、多發梗塞性痴呆症、輕度知能障礙、及腦澱粉狀蛋白血管病，其係藉由給予個體有效量之醫藥組合物，其包含專一地結合至 $\beta$ -澱粉狀蛋白胜肽或 $A\beta$ 胜肽之聚集形式之抗體或多胜肽，或編碼此抗體或多胜肽的多核苷酸，其中該抗體或多胜肽具有受損的作用功能。

#### 一般技術

除非另外指明，本發明的實行將利用分子生物學(包括重組技術)、微生物學、細胞生物學、生物化學及免疫學之習見技術，其為本技藝之技術範圍內。此等技術係充分於文獻中解釋，如 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版 (Sambrook 等人, 1989) Cold Spring Harbor Press; Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait 編著, 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J.E. Cellis 編著, 1998)



Academic Press; Animal Cell Culture(R.I. Freshney編著，1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P. Mather 及 P.E. Roberts,1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths,及 D.G. Newell編著，1993-1998) J. Wiley and Sons; Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Handbook of Experimental Immunology(D.M. Weir及 C.C. Blackwell編著); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller及 M.P. Calos編著，1987); Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel等人編著，1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis等人，1994); Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan等人編著，1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley父子，1999); Immunobiology (C.A. Janeway及P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: a practical approach (D. Catty編著，IRL Press, 1988-1989); Monoclonal antibodies: a practical approach (P. Shepherd及 C. Dean編著，Oxford University Press, 2000); Using antibodies: a laboratory manual (E. Harlow及D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti及J.D. Capra編著，Harwood Academic Publishers, 1995)。

定義

「抗體」為一種免疫球蛋白分子，其能夠經由位於免疫

球蛋白分子的可變區域中的至少一個抗原辨識位置專一結合至目標如碳水化合物、多核苷酸、脂質、多胜肽等。如本文中使用的，此用詞不僅包含完整多株或單株抗體，也包含其片段(如 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv)、單鏈(ScFv)、其突變體、包括抗體部分之融合蛋白質、及包含抗原辨識位置的免疫球蛋白分子之任何其他改質的結構。抗體包括任何種類抗體，如 IgG、IgA、或 IgM(或其亞群(sub-class))，抗體不需要為任何特定類別。視其重鏈固定區塊的抗體胺基酸序列而定，可將免疫球蛋白指定為不同類別。免疫球蛋白有五個主要類別：IgA, IgD, IgE, IgG, 及 IgM，及此等之數個可再分成「亞群」(同種型(isotypes))，如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、及 IgA2。相當於免疫球蛋白不同類別的重鏈固定區塊分別稱為  $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$ 、及  $\mu$ 。免疫球蛋白不同類別之次單元結構及三度空間組態為已熟知。

如本文中使用的，「單株抗體」意指來自大體上同源的抗體群體之抗體，即除了可能以少量存在的可能天然發生突變外，包含群體之個別抗體為相同。單株抗體為高度專一性，針對單一抗原位置。再者，相反於通常包括針對不同決定位置(抗原決定區)的不同抗體之多株抗體製品，各單株抗體係針對抗原上的單一決定位置。修飾詞「單株」代表抗體的特性為得自大體上同源的抗體群體，且不應視為需要藉任何特別方法製造抗體。例如，欲根據本發明使用的單株抗體可用首先由 Kohler 及 Milstein, 1975, Nature, 256:495 所述的融合瘤方法製造，或由如美國專利第

4,816,567號中所述之重組DNA方法製造。例如，也可將單株抗體自利用說明於McCafferty等人，1990, Nature, 348:552-554中的技術所產生的噬菌體庫分離。

如本文中使用的，「人化」抗體意指非人(如鼠科)抗體之形式，其為含有衍生自非人免疫球蛋白之最少序列之特定嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白鏈、或其片段(如Fv、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>或抗體之其他抗原結合子序列)。對於大部分，人化抗體為人類免疫球蛋白(接受者抗體)，其中將來自接受者互補決定區(CDR, complementary determining region)的殘基以來自具有理想專一性、親合力、及能力之非人物種(供給者抗體)如小鼠、大鼠、或兔子的CDR之殘基取代。於一些情況中，將人類免疫球蛋白的Fv骨架區域(FR, framework region)殘基用相對應的非人殘基取代。再者，人化抗體可包含不見於接受者抗體中及也不見於引進的CDR或骨架序列中的殘基，但被包含以進一步幫助及最適化抗體性能。一般而言，人化抗體將大體上包含至少一個(通常為兩個)可變區塊之整體，其中所有或大體上所有CDR區域相當於非人免疫球蛋白的CDR區域及所有或大體上所有FR區域為人類免疫球蛋白共通序列的FR區域。理想上人化抗體也將包含至少一部份免疫球蛋白固定區域或區塊(Fc)，通常為人類免疫球蛋白的Fc。較佳的是具有如WO 99/58572中所述改質的Fc區域之抗體。人化抗體之其他形式具有一或多個CDRs(一、二、三、四、五、六個)，其係相對於原始抗體改變，其也稱為自原始抗體的一或多

個 CDRs 「衍生的」一或多個 CDRs。

如本文中使用的，「人類抗體」意指具有胺基酸序列相當於由人類製造的抗體者之抗體及/或利用技藝中已知或本文中揭示的製造人類抗體的任何技術製造的抗體。此人類抗體之定義包括包含至少一個人類重鏈多胜肽或至少一個人類輕鏈多胜肽之抗體。一個如此之實例為包含鼠科輕鏈及人類重鏈多胜肽之抗體。利用技藝中已知的不同技術可製造人類抗體。於一個實施例中，人類抗體係選自噬菌體庫，其中噬菌體庫表現人類抗體 (Vaughan 等人，1996, *Nature Biotechnology*, 14:309-314；Sheets 等人，1998, *PNAS*, (USA) 95:6157-6162；Hoogenboom 及 Winter, 1991, *J. Mol. Biol.*, 227:381；Marks 等人，1991, *J. Mol. Biol.*, 222:581)。藉由將人類免疫球蛋白基因座導入基因轉殖動物，如已將內生免疫球蛋白基因部分或完全去活性的小鼠，也可做出人類抗體。此方法係說明於美國專利第 5,545,807；5,545,806；5,569,825；5,625,126；5,633,425；及 5,661,016 號中。或者，藉由使產生抗目標抗原的抗體之人類 B 淋巴球不朽 (此 B 淋巴球可由個體取得或可於試管內被接種) 而可製備人類抗體。見如 Cole 等人，*Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, 77 頁 (1985)；Boerner 等人，1991, *J. Immunol.*, 147(1):86-95；及美國專利第 5,750,373 號。

如本文中使用的，可互換地使用用詞「9TL」及「抗體 9TL」來意指由具有寄存編號 ATCC PTA-6124 及 ATCC

PTA-6125之表現載體製造的抗體。將重鏈及輕鏈可變區域的胺基酸序列示於圖1中。將抗體9TL的CDR部分(包括裘蒂艾及卡巴CDRs)概略地繪於圖1中。將編碼重及輕鏈可變區域的多核苷酸示於SEQ ID NO:9及SEQ ID NO:10中。9TL的特徵係說明於實例中。

本文中可互換地使用用詞「多胜肽」、「寡胜肽」、「胜肽」及「蛋白質」以意指任何長度的胺基酸聚合物。此聚合物可為直線或有分支，其可包含經改質的胺基酸，及可將其插入非胺基酸。此用詞也包含自然或藉由介入而受改質的胺基酸聚合物；例如，雙硫鍵形成、醣化、脂化、乙酰化、磷酸化、或任何其他操作或修飾，如用標記成分連結。同樣包含於此定義的是，例如，含有胺基酸的一或多個類似物(包括，例如，非天然胺基酸等)之多胜肽，以及技藝中已知的其他修飾。當然因為本發明的多胜肽係基於抗體，多胜肽可存在為單鏈或結合的鏈。

本文中可交互使用的「多核苷酸」或「核酸」意指任何長度之核苷酸聚合物，且包括DNA及RNA。核苷酸可為去氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、經改質的核苷酸或鹼基，及/或其類似物，或可被DNA或RNA聚合酶併入聚合物內的任何受質。多核苷酸可包含經改質的核苷酸，如甲基化核苷酸及其類似物。若存在，可於聚合物組合之前或之後賦予對核苷酸結構的改質。可將核苷酸序列用非核苷酸成分插入。於聚合後可將多核苷酸進一步修飾，如藉由與標記成分連結。其他修飾類型包括，例如，「套冠(caps)」、用

類似物取代一或多個天然發生的核苷酸、核苷酸間修飾如例如具有未帶電荷的連結(如磷酸甲酯、磷酸三酯、磷醯胺酸、胺基甲酸等)及具有帶電荷的連結(如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等)者、含有側基(pendant moieties)者,如例如蛋白質(如核酸酶、毒素、抗體、信號胜肽、聚離胺酸等)、具有嵌入劑(如吡啶(acridine)、補骨脂素(psoralen)等)者、含有螯合劑(如金屬、放射性金屬、硼、氧化性金屬等)者、含有烷化劑者、具有經改質的連結(如 $\alpha$ 異位性核酸等)者,以及多核苷酸之未經修飾的形式。再者,可將普通存在於糖中的任何羥基用例如磷酸殘基、磷酸殘基取代、用標準保護殘基保護、或活化以製備其他連結至其他核苷酸、或可被結合至固體支撐體。可將5'及3'端OH磷酸化或用胺或由1至20個碳原子之有機套冠殘基部分取代。也可將其他羥基衍生化成標準保護殘基。多核苷酸也可含有技藝中已普遍知道的核糖或去氧核糖之類似形式,包括例如2'-O-甲基-, 2'-O-烯丙基-, 2'-氟-或2'-疊氮-核糖、碳環糖類似物、 $\alpha$ 異位性糖、差向異構(epimeric)糖如樹膠醛糖(arabinose)、木糖或來蘇糖(lyxoses)、吡喃糖(pyranose sugars)、呋喃糖(furanose sugars)、天庚酮糖(sedoheptulose)、非環狀類似物及無鹼基核苷類似物如甲基核苷。可將一或多個磷酸二酯連結用其他連結殘基取代。此等其他連結殘基包括(但不限於)其中將磷酸用P(O)S(「硫代」)、P(S)S(「二硫代」)、(O)NR<sub>2</sub>(「醯胺酸」)、P(O)R、P(O)OR'、CO或CH<sub>2</sub>(甲縮醛(formacetal))

取代，其中各R或R'獨立地為H或視情況含有醚(-O-)連結的經取代或未經取代的烷基(1-20C)、芳基、烯基、環烷基、環烯基或阿拉第基(araldyl)。於多核苷酸中不是所有連接必須為相同。前面的說明適用於本文中提及的所有多核苷酸，包括RNA及DNA。

抗體的「可變區域」意指抗體輕鏈的可變區域或抗體重鏈的可變區域，無論是單獨或組合。重及輕鏈的可變區域各由被也稱為高度可變區域的三個互補決定區(CDRs, complementarity determining regions)連接的四個骨架區域(FR, framework regions)組成。於各鏈中的CDRs由FRs連結在一起靠攏接近，及與來自另一鏈的CDRs幫助抗體的抗原結合位置之形成。有至少兩個技術決定CDRs：(1)基於跨物種序列變化性之方法(即Kabat等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest,(第5版，1991，國家衛生研究院，Bethesda MD))；及(2)基於抗原-抗體複合物之結晶學研究之方法(Al-lazikani等人，(1997) J. Molec. Biol. 273:927-948)。如本文中使用的，CDR可意指由任一種方法或由兩種方法組合定義的CDR。

抗體的「固定區域」意指抗體輕鏈的固定區域或抗體重鏈的固定區域，無論是單獨或組合。

「優先地結合」或「專一地結合」(於本文中可交替使用)至抗體或多肽之抗原決定區為技藝中已熟知的用詞，且決定此專一或優先結合之方法也為技藝中已熟知。若分子相較於與其他細胞或物質更經常、更快速、以較長

期間及/或以更大親合力與特定細胞或物質反應或結合，則稱此分子呈現「專一性結合」或「優先性結合」。若抗體相較於其結合至其他物質，以較大親合力、親留力(avidity)、更容易、及/或以較長期間結合，則抗體「專一地結合」或「優先地結合」至目標。例如，專一地或優先地結合至 $A\beta_{1-40}$ 抗原決定區之抗體為以比其結合至其他 $A\beta_{1-40}$ 抗原決定區或非 $A\beta_{1-40}$ 抗原決定區更大親合力、親留力、更容易、及/或以較長期間結合此抗原決定區之抗體。由閱讀此定義也知，例如，專一地或優先地結合至第一個目標的抗體(或部分或抗原決定區)可能或可能不專一地或優先地結合至第二個目標。就其本身而論，「專一性結合」或「優先性結合」不一定需要(雖然其可包括)獨佔的結合。一般而言(但非必須)，提及結合意指優先的結合。

如本文中使用的，「大體上純的」意指為至少50%純(即無污染物)，更佳至少90%純，更佳至少95%純，更佳至少98%純，更佳至少99%純之材料。

「宿主細胞」包括可為或曾為用以併入多核苷酸插入體之載體接受者之獨立細胞或細胞培養株。宿主細胞包括單一宿主細胞的子代，且子代可能不一定為完全相同(於形態上或於基因組DNA組)於原始母細胞，因為自然、偶發的、或故意的突變。宿主細胞包括用本發明多核苷酸於活體內轉染的細胞。

使用用詞「Fc區域」來定義免疫球蛋白重鏈的C端區



域。「Fc區域」可為天然序列Fc區域或變體Fc區域。雖然免疫球蛋白重鏈的Fc區域之邊界可能改變，通常將人類IgG重鏈Fc區域定義為由在位置Cys226(或由Pro230)至其羧基端的一段。於Fc區域中殘基的編號為如於卡巴中的EU標號者。Kabat等人，*Sequences of Proteins of Immunological Interest*，第5版，公共衛生服務，國家衛生研究院，Bethesda MD.，1991。免疫球蛋白的Fc區域通常包含兩個固定區塊：CH2及CH3。

如本文中使用的「Fc受體」及「FcR」說明結合至抗體的Fc區域之受體。較佳的FcR為天然序列人類FcR。再者，較佳的FcR為結合IgG抗體者( $\gamma$ 受體)及包括Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RII、及Fc $\gamma$ RIII亞群之受體，包括此等受體之對偶變體及交替接合的形式。Fc $\gamma$ RII受體包括Fc $\gamma$ RIIA(「活化受體」)及Fc $\gamma$ RIIB(「抑制受體」)，其具有主要不同於其細胞質區塊之類似胺基酸序列。將FcR回顧於Ravetch及Kinet, 1991, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92; Capel等人, 1994, *Immunomethods*, 4:25-34; 及de Haas等人, 1995, *J. Lab. Clin. Med.*, 126:330-41。「FcR」也包括新生兒受體FcRn，其負責轉移母親IgG至胎兒(Guyer等人, 1976, *J. Immunol.*, 117:587; 及Kim等人, 1994, *J. Immunol.*, 24:249)。

「補體相關的細胞毒性」及「CDC」意指在補體存在中分子目標的分解。補體活化途徑受補體系統第一個成分(C1q)結合至與同源抗原複合的分子(如抗體)而起始。為了

評估補體活化，可進行如說明於Gazzano- Santoro等人，*J. Immunol. Methods* 202:163(1996)之CDC分析法。

「有功能的Fc區域」具有天然序列Fc區域之至少一個作用功能。例示「作用功能」包括包括C1q結合；補體相關的細胞毒性(CDC, complement dependent cytotoxicity)；Fc受體結合；抗體相關的細胞調節細胞毒性(ADCC, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)；吞噬作用；細胞表面受體(如B細胞受體(BCR, B cell receptor))之向下調節等。此作用功能通常需要Fc區域與結合區塊(如抗體可變區塊)組合且可利用技藝中用以評估此抗體作用功能之已知許多分析法評估。

「天然序列Fc區域」包含自然界中可見的Fc區域之胺基酸序列相同的胺基酸序列。「變體Fc區域」包含由於至少一個胺基酸修飾而不同於天然序列Fc區域胺基酸序列者，然而仍保留天然序列Fc區域之至少一個作用功能。較佳的是，相較於天然序列Fc區域或母多胜肽之Fc區域，變體Fc區域具有至少一個胺基酸取代，如於天然序列Fc區域或母多胜肽之Fc區域中有由約1個至約10個胺基酸取代，及較佳的是有由約1個至約5個胺基酸取代。本文中的變體Fc區域較佳將具有與天然序列Fc區域及/或與母多胜肽之Fc區域至少約80%序列一致性，及最佳與其有至少約90%序列一致性，更佳與其有至少約95%序列一致性。

如本文中使用的，「抗體相關的細胞調節細胞毒性」及「ADCC」意指一種細胞調節反應，其中表現Fc受體

(FcRs)的非專一性細胞毒性細胞(如自然殺手(NK, natural killer)細胞、嗜中性白細胞(Neutrophils)、及巨噬細胞)辨識目標細胞上結合的抗體及隨後造成目標細胞的分解。利用試管內ADCC分析法，如說明於美國專利第5,500,362或5,821,337號中者，可評估有興趣的分子之ADCC活性。此分析法的有用作用細胞包括周邊血液單核細胞(PBMC, peripheral blood mononuclear cell)及NK細胞。或者(或此外)，可將有興趣的分子之ADCC活性於活體內評估，如於動物模型如揭示於Clynes等人，1998, *PNAS(USA)* 95:652-656中者。

如本文中使用的，「有效劑量」或「有效量」藥物、化合物、或醫藥組合物為足以產生有利或理想結果的量。對於預防用途，有利或理想結果包括如消除或降低危險、減輕嚴重性、或延遲發病，包括疾病的生物化學、組織學及/或行為上的症狀、其併發症及在疾病發展期間呈現的中間病理學表型之結果。對於治療用途，有利或理想結果包括臨床結果如抑制、壓制或降低澱粉狀蛋白斑之形成、降低、去除、清除澱粉狀蛋白斑、改善知能、倒轉或或減慢知能衰退、隔離在生物體液中循環的可溶性A $\beta$ 胜肽、減小由疾病造成的一或多種症狀(生物化學、組織學及/或行為上)，包括其併發症及在疾病發展期間呈現的中間病理學表型、增進患有疾病者的生活品質、減少治療疾病所需的其他藥物劑量、增強其他藥物的作用、延緩疾病的惡化、及/或延長病患的存活。可將有效劑量以一或多次投藥給

予。為了本發明之目的，藥物、化合物、或醫藥組合物之有效劑量為直接或間接足以達到預防或治療處理之量。如於臨床背景中了解，藥物、化合物、或醫藥組合物之有效劑量可或可不與另一種藥物、化合物、或醫藥組合物結合而達到。因此，可考慮「有效劑量」於給予一或多種治療藥物之文中，及若與一或多種其他藥物結合，可以或已達到理想結果，可將單一藥物視為以有效量給予。

如本文中使用的，「治療」或「處理」為用以得到有利或理想結果(包括臨床結果)之方法。為了本發明之目的，有利或理想臨床結果包括(但不限於)下列一或多項：抑制、壓制或降低澱粉狀蛋白斑之形成、降低、去除、清除澱粉狀蛋白斑、改善知能、倒轉或減慢知能衰退、隔離在生物體液中循環的可溶性A $\beta$ 胜肽、減少組織(如腦)中A $\beta$ 胜肽(包括可溶性、寡聚合及沉澱的)、抑制、減慢及/或降低A $\beta$ 胜肽於腦中的累積、抑制、減慢及/或降低A $\beta$ 胜肽於組織(如腦)中之毒性作用、減少自疾病引起的症狀、增進患有疾病者的生活品質、減少治療疾病所需的其他藥物劑量、延緩疾病的惡化、及/或延長病患的存活。

如本文中使用的，「延緩」阿耳滋海默氏症之發展意指推遲、阻礙、減慢、穩定化、及/或延遲疾病之發展。此延緩可為不同時間長度，視病史及/或受治療的個體而定。對熟悉本技藝者而言明顯的是，實際上充分或重要的延緩可包含預防，其中個體不患此疾病。「延緩」阿耳滋海默氏症之發展的方法為當與不使用此方法比較時，在特定時

間範圍中降低疾病發展的機率及/或在特定時間範圍中降低疾病的程度之方法。此比較通常係基於臨床研究，利用統計學上有意義的個體數目。

阿耳滋海默氏症之「發展」意指在個體內阿耳滋海默氏症之開始及/或惡化。利用如本文中所述的標準臨床技術可偵測到阿耳滋海默氏症發展。然而，發展也意指可為一開始無法偵測到的疾病惡化。為了本發明之目的，惡化意指疾病狀態的生物進程，於此情況中，如由標準神經學檢查、病患面談而決定，或可由更專門的測試而決定。許多此等診斷測試包括(但不限於)神經造影、偵測血清或腦脊髓液中特定蛋白質量之改變(如澱粉狀蛋白胜肽及Tau)、電腦斷層(CT, computerized tomography)、及磁振造影(MRI, magnetic resonance imaging)。「發展」包括出現、復發、及開始。如本文中使用的阿耳滋海默氏症之「開始」或「出現」包括一開始的發病及/或復發。

如本文中使用的，「結合」給予包括同時給予及/或於不同時間給予。結合給予也包含以共同配方給予或以分開的組合物給予。如本文中使用的，結合給予意指包含任何情況，其中將抗A $\beta$ 抗體及另一種藥劑給予至個體，其可同時及/或分開地進行。如本文中進一步討論，當然可將抗A $\beta$ 抗體及另一種藥劑以不同投藥頻率或間隔給予。例如，可將抗A $\beta$ 抗體每週給予一次，而可將另一種藥劑較不頻繁地給予。當然利用相同給予途徑或不同給予途徑可給予抗A $\beta$ 抗體及另一種藥劑。

「生物樣本」包含由個體獲得的不同樣本類型及可用於診斷或監測分析中。此定義包含血液及生物來源的其他液體樣本、實體組織樣本如切片樣品或由其產生的組織培養或細胞，及其子代。此定義也包括在其取得後已用任何方式處理的樣本，如由與試藥處理、溶解、或增加某成分(如蛋白質或多核苷酸)含量、或為切片目的而包埋於半固體或固體基質中。用詞「生物樣本」包含臨床樣本，並且也包括培養的細胞、細胞上層清液、細胞分解物、血清、血漿、生物體液、及組織樣本。

「個體」為哺乳類，更佳的是人類。哺乳類包括(但不限於)農場動物(如乳牛)、運動動物、寵物(如貓、狗、馬)、靈長類、小鼠及大鼠。

如本文中使用的，「載體」意指一種構體，其能夠傳遞(及較佳表現)一或多個有興趣的基因或序列於宿主細胞中。載體之實例包括(但不限於)病毒載體、裸DNA或RNA表現載體、質體、黏質體(cosmid)或噬菌體載體、與陽離子凝聚劑結合的DNA或RNA表現載體、包入微脂粒中的DNA或RNA表現載體、及某些真核細胞，如生產者細胞。

如本文中使用的，「表現控制序列」意指指揮核酸轉錄的核酸序列。表現控制序列可為啟動子(如持續表現或可誘導式啟動子)、或促進子。將表現控制序列可操作地連接到要轉錄的核酸序列。

如本文中使用的，「醫藥上可接受的載體」包括任何材料當與活性成分合併時，其允許成分保持生物活性且其不與

個體的免疫系統反應。實例包括(但不包括)任何標準醫藥載體如磷酸緩衝鹽水溶液、水、乳液如油/水乳液、及許多類型濕潤劑。氣溶膠或非經腸胃給予的較佳稀釋劑為磷酸緩衝鹽水或生理食鹽水(0.9%)。將含有此載體的組合物藉已熟知的習見方法配製(見例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, 第18版, A. Gennaro編著, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990; 及 Remington, The Science and Practice of Pharmacy 第20版, Mack Publishing, 2000)。

如本文中使用的, 用詞「 $k_{on}$ 」係用來意指抗體結合至抗原的結合速率常數。

如本文中使用的, 用詞「 $k_{off}$ 」係用來意指抗體自抗體/抗原複合物分解的脫離速率常數。

如本文中使用的, 用詞「 $K_D$ 」係用來意指抗體-抗原交互作用的平衡分解常數。

*組合物及製造此組合物的方法*

**抗體9TL及9TL衍生的抗體及多胜肽**

本發明包含組合物(包括醫藥組合物), 其包含如表3中所示的抗體9TL及其變體或衍生自如表3中所示的抗體9TL及其變體的多胜肽; 及含有編碼9TL抗體及其變體或多胜肽之序列的多核苷酸。如本文中使用的, 組合物包含結合至 $A\beta_{1-40}$ 的C端之一或多種抗體或多胜肽(其可為或可不為抗體)及/或含有編碼結合至 $A\beta_{1-40}$ 的C端之一或多種抗體或多胜肽之序列的一或多種多核苷酸。此等組合物可進一步包

含適當賦形劑，如醫藥上可接受的賦形劑(包括緩衝液)，其為技藝上已熟知。

本發明的抗體及多胜肽之特徵為任何(一或多個)下列特徵：(a)結合至 $A\beta_{1-40}$ 的C端胜肽28-40，但不顯著地結合至 $A\beta_{1-42}$ 或 $A\beta_{1-43}$ ；(b)結合至 $A\beta_{1-40}$ 的C端胜肽33-40；(c)抑制個體中澱粉狀蛋白斑之形成；(d)減少個體中的澱粉狀蛋白斑；(e)治療、預防、改善阿耳滋海默氏症之一或多個症狀；(f)改善知能功用。相反於其他報導的抗 $A\beta$ 抗體，本發明之抗體及多胜肽也可呈現理想的安全特性。例如，本發明之組合物可能不會引起明顯或不可接受程度之下列任何一或多種：腦血管中的出血(大腦出血)；腦膜腦炎(包括改變的磁振掃描)；於大腦脊髓液中升高的白血球數目；中樞神經系統發炎。

於是，本發明提供任何下列，或包含任何下列之組合物(包括醫藥組合物)：(a)示於表3中的抗體9TL及其變體；(b)示於表3中的抗體9TL及其變體之片段或區域；(c)示於表3中的抗體9TL及其變體之輕鏈；(d)示於表3中的抗體9TL及其變體之重鏈；(e)來自示於表3中的抗體9TL及其變體之輕鏈及/或重鏈之一或多個可變區域；(f)示於表3中的抗體9TL及其變體之一或多個CDRs(一、二、三、四、五或六個CDRs)；(g)來自抗體9TL重鏈的CDR H3；(h)來自示於表3中的抗體9TL及其變體之輕鏈的CDR L3；(i)來自示於表3中的抗體9TL及其變體之輕鏈的三個CDRs；(j)來自示於表3中的抗體9TL及其變體之重鏈的三個CDRs；(k)



來自示於表3中的抗體9TL及其變體之輕鏈的三個CDRs及來自重鏈的三個CDRs；及(l)包含(b)至(k)任何一者之抗體。本發明也提供多胜肽，其包含上述任何一或多者。

將抗體9TL之CDR部分(包括裘蒂艾及卡巴CDRs)圖表地繪於圖1中。CDR區域之決定為在本技藝技術範圍內。當然於一些實施例中，CDRs可為卡巴及裘蒂艾CDR的組合(也稱為「組合的CDRs」或「延伸的CDRs」)。於一些實施例中，CDRs為卡巴CDRs。於其他實施例中，CDRs為裘蒂艾CDRs。換言之，在具有多於一個CDR的實施例中，CDR可為任何卡巴、裘蒂艾、組合CDRs、或其組合。

於一些實施例中，本發明提供多胜肽(其可為或可不為抗體)，其包含至少一個CDR、至少兩個、至少三個、或至少四個、至少五個、或所有六個CDRs與示於表3中的抗體9TL及其變體之至少一個CDR、至少兩個、至少三個、或至少四個、至少五個、或所有六個CDRs大體上相同。其他實施例包括具有至少兩個、三個、四個、五個、或六個CDRs與9TL或衍生自9TL的至少兩個、三個、四個、五個、或六個CDRs大體上相同之抗體。於一些實施例中，此至少一個、兩個、三個、四個、五個、或六個CDRs為至少約85%、86%、87%、88%、89%、90%、95%、96%、97%、98%、或99%相等於示於表3中的抗體9TL及其變體之至少一個、兩個、三個、四個、五個、或六個CDRs。當然，為了本發明的目的，一般將結合專一性及/或整體活性保留，雖然相較於示於表3中的抗體9TL及其變體，活

性範圍可能改變(可為更大或更小)。

本發明也提供多胜肽(其可為或可不為抗體)，其包含具有任何下列之示於表3中的抗體9TL或其變體之胺基酸序列：示於表3中的抗體9TL或其變體之序列的至少5個連續胺基酸、至少8個連續胺基酸、至少約10個連續胺基酸、至少約15個連續胺基酸、至少約20個連續胺基酸、至少約25個連續胺基酸、至少約30個連續胺基酸，其中至少3個胺基酸係來自示於表3中的9TL(圖1)或其變體之可變區域。於一個實施例中，可變區域係來自9TL的輕鏈。於另一個實施例中，可變區域係來自9TL的重鏈。例示多胜肽具有來自9TL的重及輕鏈兩者可變區域之連續胺基酸(如上述長度)。於另一個實施例中，5(或更多)個連續胺基酸係來自示於圖1中的9TL之互補決定區(CDR, complementarity determining region)。於一些實施例中，連續胺基酸係來自9TL的可變區域。

本發明抗體及多胜肽之結合親合力可能不同，且不需要為(但可為)特定範圍值，如下述之例示實施例。本發明抗體及多胜肽對 $A\beta_{1-40}$ 的結合親合力可為約0.10至約0.80 nM、約0.15至約0.75 nM、及約0.18至約0.72 nM。於一些實施例中，結合親合力為約2 pM、約5 pM、約10 pM、約15 pM、約20 pM、約40 pM、或大於約40 pM。於一個實施例中，結合親合力為約2 pM及22 pM之間。於其他實施例中，結合親合力為小於約10 nM、約5 nM、約1 nM、約900 pM、約800 pM、約700 pM、約600 pM、約500 pM、

約 400 pM、約 300 pM、約 200 pM、約 150 pM、約 100 pM、約 90 pM、約 80 pM、約 70 pM、約 60 pM、約 50 pM、約 40 pM、約 30 pM、約 10 pM。於一些實施例中，結合親合力為約 10 nM。於其他實施例中，結合親合力為小於約 10 nM、小於約 50 nM、小於約 100 nM、小於約 150 nM、小於約 200 nM、小於約 250 nM、小於約 500 nM、或小於約 1000 nM。於其他實施例中，結合親合力為小於約 5 nM。於其他實施例中，結合親合力為小於約 1 nM。於其他實施例中，結合親合力為約 0.1 nM 或約 0.07 nM。於其他實施例中，結合親合力為小於約 0.1 nM 或小於約 0.07 nM。於其他實施例中，結合親合力為約 10 nM、約 5 nM、約 1 nM、約 900 pM、約 800 pM、約 700 pM、約 600 pM、約 500 pM、約 400 pM、約 300 pM、約 200 pM、約 150 pM、約 100 pM、約 90 pM、約 80 pM、約 70 pM、約 60 pM、約 50 pM、約 40 pM、約 30 pM、約 10 pM 之任一者至約 2 pM、約 5 pM、約 10 pM、約 15 pM、約 20 pM、約 40 pM 之任一者。於一些實施例中，結合親合力為約 10 nM、約 5 nM、約 1 nM、約 900 pM、約 800 pM、約 700 pM、約 600 pM、約 500 pM、約 400 pM、約 300 pM、約 200 pM、約 150 pM、約 100 pM、約 90 pM、約 80 pM、約 70 pM、約 60 pM、約 50 pM、約 40 pM、約 30 pM、約 10 pM 之任一者。於再其他實施例中，結合親合力為約 2 pM、約 5 pM、約 10 pM、約 15 pM、約 20 pM、約 40 pM、或大於約 40 pM。

本發明也提供製造任何此等抗體或多胜肽之方法。藉由技藝中已知的程序可製造本發明之抗體。藉由抗體之蛋白質分解或其他分解法、藉由如上述之重組方法(即單一或融合多胜肽)或藉由化學合成可製造多胜肽。方便地藉由化學合成製造抗體之多胜肽，特別是最多到約50個胺基酸的較短多胜肽。化學合成之方法為技藝中已知且為市面上可購得。例如，藉由利用固相方法之自動多胜肽合成器可製造抗體。也見於美國專利第5,807,715；4,816,567；及6,331,415。

於另一個替代方法中，利用技藝中已熟知的程序可重組地製造抗體。於一個實施例中，多核苷酸包含示於SEQ ID NO:9及SEQ ID NO:10中之編碼抗體9TL重鏈及/或輕鏈可變區域之序列。於另一個實施例中，將包含有示於SEQ ID NO:9及SEQ ID NO:10中核苷酸序列之多核苷酸選殖入一或多個表現或繁殖載體中。可將編碼有興趣的抗體之序列保持於宿主細胞中的載體中及而後使宿主細胞增長及冷凍做進一步使用。將載體(包括表現載體)及宿主細胞於本文中進一步說明。

本發明也包含本發明抗體(如9TL)之單鏈可變區域片段(「scFv」)。藉由利用短連結胜肽由連結輕及/或重鏈可變區域製成單鏈可變區域片段。Bird等人，(1988) Science 242:423-426。連結胜肽之實例為(GGGGS)<sub>3</sub>(SEQ ID NO:40)，其在一個可變區域之羧基端及另一個可變區域的胺基端之間架橋大約3.5 nm。其他序列之連接體也曾被設

計及使用。Bird等人(1988)。之後可將連接體修飾做其他功用，如附加藥物或附著至固體支撐體。可將單鏈變體以重組或合成地製造。對於scFv之合成製造，可使用自動合成器。對於scFv之重組製造，可將含有編碼scFv之多核苷酸的適當質體導入適當宿主細胞中，無論是真核細胞如酵母菌、植物、昆蟲或哺乳類細胞，或是原核細胞如大腸桿菌。藉由常規操作如多核苷酸的接合可製造編碼有興趣的scFv之多核苷酸。利用技藝中已知的標準蛋白質純化技術可將形成的scFv分離。

也包含單鏈抗體之其他形式，如微型雙功能抗體(Diabodies)。微型雙功能抗體為雙價、雙專一性抗體，其中將VH及VL區塊表現於單一多胜肽鏈上，但使用太短而不允許相同鏈上兩區塊間配對之連接體，因而強迫區塊與另一鏈的互補區塊配對及產生兩個抗原結合位置(見如Holliger, P.等人(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448；Poljak, R.J.等人(1994) Structure 2:1121-1123)。

例如，利用揭示於本文中的抗體可製備雙專一性抗體(對於至少兩個不同抗原具有結合專一性的單株抗體)。製造雙專一性抗體之方法為技藝中已知(見如Suresh等人，1986, Methods in Enzymology 121:210)。傳統上，雙專一性抗體之重組製造係基於兩個免疫球蛋白重鏈-輕鏈組與具有不同專一性之兩個重鏈之共同表現(Millstein及Cuello, 1983, Nature 305, 537-539)。

根據製造雙專一性抗體的一個方式，將具有理想結合專

一性的抗體可變區塊(抗體-抗原結合區域)與免疫球蛋白固定區塊序列融合。此融合較佳為與免疫球蛋白重鏈固定區塊，包含至少部分之樞紐區(hinge)、CH2及CH3區域。較佳使含有輕鏈結合所必須的位置之第一個重鏈固定區域(CH1)存在於至少一個融合中。將編碼免疫球蛋白重鏈融合體及視需要免疫球蛋白的DNAs插入分開的表現載體，及共同轉染入適當的宿主生物中。當使用不相等比例之此三種多胜肽鏈於提供最佳產量之構造中，此提供極大彈性於調整實施例中三個多胜肽片段之相互比例。然而，當至少兩個多胜肽鏈之表現以相等比例造成高產量或當比例不特別重要時，能夠插入二或所有三種多胜肽鏈之編碼序列於一個表現載體中。

於一個方法中，雙專一性抗體係由具有第一個結合專一性於一臂之雜交免疫球蛋白重鏈及(具有第二個結合專一性)於另一臂中之雜交免疫球蛋白輕鏈對組成。此不對稱結構(具有免疫球蛋白輕鏈於雙專一性分子之單一半中)幫助分離理想雙專一性化合物與不必要的免疫球蛋白鏈組合。此方法係說明於1994年3月3日發表的PCT公告編號WO 94/04690中。

包含兩個共價結合的抗體之異體結合抗體也為本發明的範圍內。曾使用此等抗體來使免疫系統細胞攻擊有害的細胞(美國專利第4,676,980號)及用以治療HIV感染(PCT申請公告編號WO 91/00360及WO 92/200373；歐洲專利EP 03089)。利用任何方便的交聯方法可製造異體結合抗體。

適當的交聯試劑及技術為技藝中已熟知，及揭示於美國專利第4,676,980號。

利用合成蛋白質化學之已知方法，包括包含交聯試劑者，可於試管內製備嵌合或雜交抗體。例如，利用雙硫交換反應或藉由形成硫醚鍵可建造免疫毒素。為此目的之適當試劑之實例包括亞胺基硫氫根(iminothiolate)及甲基-4-巰基丁醯亞胺甲酯鹽酸鹽(butyrimidate)。

利用技藝中已知的任何方法可製造包含抗體9TL之一或多種CDRs或衍生自抗體9TL之一或多種CDRs之人化抗體。例如，可使用四個一般步驟來人化單株抗體。此等為：(1)決定開始抗體輕及重可變區塊的核苷酸及預測的胺基酸序列(2)設計人化抗體，即決定在人化過程期間要使用的抗體骨架區域(3)實際人化方法/技術及(4)轉染及表現人化抗體。例如，見美國專利第4,816,567；5,807,715；5,866,692；6,331,415；5,530,101；5,693,761；5,693,762；5,585,089；6,180,370；5,225,539；6,548,640號。

於重組人化抗體中，可將Fc部分改質以避免與Fc $\gamma$ 受體及補體免疫系統交互作用。此類型改質係由劍橋大學病理系的Mike Clark博士設計，製備此抗體之技術係說明於1999年11月18日發表的WO 99/58572中。

例如，若抗體用於人類的臨床試驗及治療上，可將固定區域設計成更像人類固定區域以避免免疫反應。見例如美國專利第5,997,867及5,866,692號。

本發明包含抗體9TL的改質，包括不顯著影響其性質的功能上相當抗體及具有增強或降低的活性及/或親合力之變體。例如，可將抗體9TL的胺基酸序列突變以得到對 $A\beta_{1-40}$ 胜肽具有理想結合親合力之抗體。多胜肽之改質為技藝中的常規工作，不需要於本文中詳述。將多胜肽之改質舉例於實例中。經改質的多胜肽之實例包括具有胺基酸序列之保守性置換、不顯著有害地改變功能活性之一或多個胺基酸缺失或加成、或利用化學類似物之多胜肽。

胺基酸序列插入包括長度範圍為一個殘基至含有一百個或以上殘基的多胜肽之胺基-及/或羧基端融合，以及單一或多個胺基酸殘基之序列內插入。末端插入之實例包括具有N-端甲硫胺醯殘基的抗體或融合至抗原決定區標記物之抗體。抗體分子的其他插入變體包括融合增加抗體的血清半生期之酵素或多胜肽至抗體的N-或C-端。

置換變體在抗體分子中具有至少一個胺基酸殘基被移除及於其位置插入不同殘基。最有興趣的置換性突變之位置包括高度可變區域，但是也考慮FR改變。將保守性置換示於表1的列標題「保守性置換」下。若此置換造成生物活性的改變，則可能導入更實質的改變(於表1中稱為「例示置換」)，或如下參照胺基酸類別進一步說明，及將產物篩選。



表 1：胺基酸置換

原始殘基	保守性置換	例示置換
Ala (A)	Val	Val; Leu; Ile
Arg ®	Lys	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln	Gln; His; Asp, Lys; Arg
Asp (D)	Glu	Glu; Asn
Cys (C)	Ser	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn	Asn; Glu
Glu (E)	Asp	Asp; Gln
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Arg	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile(I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正 白胺酸 (norleucine)
Leu(L)	Ile	正白胺酸 ; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Tyr	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Phe	Trp; Phe; Thr; Ser
Val(V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正白胺酸

藉由選擇顯著改變其於維持(a)多胜肽骨架在置換的區域中的結構，例如，呈片層或螺旋形態、(b)在目標位置的分

子電荷或親油性、或(c)側鏈的體積之作用的置換完成抗體生物性質上的實質改質。基於共同側鏈性質將天然發生的殘基分成群組：

- (1)非極性：正白胺酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；
- (2)極性不帶電荷：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；
- (3)酸性(負電荷)：Asp、Glu；
- (4)鹼性(正電荷)：Lys、Arg；
- (5)影響鏈方位之殘基：Gly、Pro；及
- (6)芳香族：Trp、Tyr、Phe、His。

非保守性置換係由交換此等類別其中之一員與另一類別而製成。

也可將不涉及維持抗體適當形態的任何半胱胺酸殘基置換(通常與絲胺酸)以改善分子的氧化安定性及避免異常的交聯。相反地，可將半胱胺酸鍵加至抗體以改善其安定性，特別是當抗體為抗體片段如Fv片段時。

胺基酸改質反為可為改變或修飾一或多個胺基酸至完全重新設計一區域，如可變區域。可變區域的改變可改變結合親合力及/或專一性。於一些實施例中，在CDR區塊內不做超過一至五個保守性胺基酸置換。於其他實施例中，在CDR區塊內不做超過一至三個保守性胺基酸置換。於再其他實施例中，在CDR區塊為CDRH3及/或CDR L3。

改質也包括醣化及無醣化多胜肽，以及具有其他轉譯後修飾之多胜肽，如例如用不同糖之醣化、乙醣化、及磷酸化。將抗體在其固定區域中的保守性位置醣化(Jefferis及

Lund, 1997, Chem. Immunol. 65:111-128 ; Wright 及 Morrison, 1997, TibTECH 15:26-32)。免疫球蛋白的寡糖側鏈影響蛋白質的功能 (Boyd 等人, 1996, Mol. Immunol. 32:1311-1318 ; Wittwe 及 Howard, 1990, Biochem. 29:4175-4180) 及糖蛋白部分間的分子內交互作用 (Hefferis 及 Lund, 同前 ; Wyss 及 Wagner, 1996, Current Opin. Biotech. 7:409-416)。寡糖也可作為使特定糖蛋白基於專一辨識結構攻擊某分子。也曾報導抗體的糖化影響抗體相關的細胞毒性 (ADCC, antibody-dependent cellular cytotoxicity)。特別是, 曾報導具有四環素調節的  $\beta(1,4)$ -N-乙醯胺基葡萄糖轉移酶 III (GnTIII) (一種催化等分 GlcNAc 形成之糖轉移酶) 表現之 CHO 細胞具有改善的 ADCC 活性 (Umana 等人, 1999, Mature Biotech. 17:176-180)。

抗體的糖化通常為 N-連結或 O-連結。N-連結意指將糖部分連接至天冬醯胺酸殘基的側鏈。三胜肽序列天冬醯胺酸-X-絲胺酸、天冬醯胺酸-X-羥丁胺酸、及天冬醯胺酸-X-半胱胺酸 (其中 X 為除了脯胺酸外之任何胺基酸) 為酵素連接糖部分至天冬醯胺酸側鏈之辨識序列。因此, 在多胜肽中此等胜肽序列之存在產生可能的糖化位置。O-連結意指連接糖類 N-乙醯半乳糖胺、半乳糖、或木糖其中之一者至羥胺基酸, 最常見的是絲胺酸或羥丁胺酸, 雖然也可使用 5-羥脯胺酸或 5-羥離胺酸。

藉由改變胺基酸序列使其含有一或多個上述三胜肽序列 (作為 N-連結糖化位置) 方便地完成將糖化位置加入至抗

體。藉由加入或用一或多個絲胺酸或羥丁胺酸取代至原始抗體的序列(作為O-連結醣化位置)也可做此改變。

也可改變抗體之醣化模式而不改變根本的核苷酸序列。醣化主要視用來表現抗體的宿主細胞而定。因為用於表現作為可能療法的重組醣蛋白(如抗體)的細胞類型罕為天然細胞，可預期抗體之醣化模式的變異(見如Hse等人，1997, J. Biol. Chem. 272:9062-9070)。

除了宿主細胞之選擇，在抗體的重組製造期間影響醣化的因素包括生長模式、培養基配方、培養密度、氧化作用、pH、純化步驟等。曾建議許多方法來改變於特定宿主生物中達到的醣化模式，其包括導入或過度表現涉及寡醣製造的某些酵素(美國專利第5,047,335；5,510,261及5,278,299號)。可將醣化(或某類型醣化)自醣蛋白酵素式移除，例如，利用內切糖苷酶H(Endo H, Endoglycosidase H)、如實例3中所述的N-糖苷酶F、內切糖苷酶F1、內切糖苷酶F2、內切糖苷酶F3。此外，可將重組宿主細胞遺傳上設計為在處理某類型多醣中有缺陷。此等及類似技術為技藝中已熟知。

改質的其他方法包括利用技藝中已知的偶合技術，包括(但不限於)酵素方式、氧化置換及螯合。例如，可使用改質於連接標記做免疫分析。利用技藝中已建立的程序做經改質的9TL多胜肽及利用技藝中已知的標準分析法可篩選，將其部分於下及實例中說明。

於本發明的一些實施例中，抗體包含經改質的固定區

域，如為免疫學上惰性或部分惰性之固定區域，如不引發補體媒介的分解、不刺激抗體相關的細胞調節細胞毒性 (ADCC, antibody-dependent cell mediated cytotoxicity)、或不活化微膠細胞；或具有降低的活性(相較於未經改質的抗體)於下列任何一或多者：引發補體媒介的分解、刺激抗體相關的細胞調節細胞毒性 (ADCC, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)、或活化微膠細胞。可使用固定區域之不同修飾來達到作用功能之最佳程度及/或組合。見例如 Morgan 等人，*Immunology* 86:319-324 (1995)；Lund 等人，*J. Immunology* 157:4963-9, 157:4963-4969 (1996)；Idusogie 等人，*J. Immunology* 164:4178-4184 (2000)；Tao 等人，*J. Immunology* 143:2595-2601 (1989)；及 Jefferis 等人，*Immunological Reviews* 163:59-76 (1998)。於一些實施例中，將固定區域如 *Eur. J. Immunol.* (1999)29:2613-2624；PCT 申請案第 PCT/GB99/01441 號；及/或大英聯合王國專利申請案第 9809951.8 號中所述改質。於其他實施例中，抗體包含人類重鏈 IgG2a 固定區域，其含有下列突變：A330P331 成為 S330S331(胺基酸編號參照野生型 IgG2a 序列)。 *Eur. J. Immunol.* (1999) 29:2613-2624。於再其他實施例中，將固定區域無醣化做 N-連結的醣化。於一些實施例中，藉由突變醣化的胺基酸殘基或於固定區域中為 N-醣化辨識序列部分的側邊殘基，將固定區域無醣化做 N-連結的醣化。於一些實施例中，將固定區域無醣化做 N-連結的醣化。例如，可將 N-醣化位置

N297突變成A、Q、K、或H。見Tao等人，*J. Immunology* 143:2595-2601(1989)；及Jefferis等人，*Immunological Reviews* 163:59-76(1998)。用酵素或藉由在醣化缺陷的宿主細胞中表現可將固定區域無醣化做N-連結的醣化。於一些實施例中，將固定區域無醣化做N-連結的醣化。可用酵素(如由酵素PNGase移除醣)或藉由表現於醣化缺陷的宿主細胞中，將固定區域無醣化做N-連結的醣化。

其他抗體改質包括已經修飾如1999年11月18日發表的PCT申請案WO 99/58572中所說明。此等抗體除了針對目標分子的結合區塊外還包含一個作用區塊，其具有大體上同源於所有或部分人類免疫球蛋白重鏈的固定區塊之胺基酸序列。此等抗體能夠結合目標分子而不引發顯著補體相關的分解、或細胞調節的目標破壞。於一些實施例中，作用區塊能夠專一地結合FcRn及/或FcγRIIb。此等通常係基於衍生自二或多個人類免疫球蛋白重鏈C<sub>H</sub>2區塊之嵌合區塊。以此方式改質的抗體特別適用於慢性抗體療法，以避免發炎及其他習見抗體療法之不良反應。

本發明包括親合力成熟的實施例。例如，藉由技藝上已知的程序可製造親合力成熟的抗體(Marks等人，1992，*Bio/Technology*, 10:779-783；Barbas等人，1994，*Proc Nat. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813；Schier等人，1995，*Gene*, 169:147-155；Yelton等人，1995，*J. Immunol.*, 155:1994-2004；Jackson等人，1995，*J. Immunol.*, 154(7):3310-9；Hawkins等人，1992，*J. Mol. Biol.*, 226:889-896；及WO

2004/058184)。

可使用下列方法來調整抗體的親合力及了解CDR。了解抗體的CDR及/或改變(如改善)多胜肽(如抗體)的結合親合力的一個方式稱為「資料庫掃描突變法」。一般而言，資料庫掃描突變法運作如下。利用技藝上認可的方法將CDR中的一或多個胺基酸位置用二或多個(如3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、或20個)胺基酸取代。此產生小的殖株(clone)資料庫(於一些實施例中，對每個分析的胺基酸位置有一個)，各具有二或多個成員之複雜度(若在每個位置取代二或多個胺基酸)。一般而言，資料庫也包括包含自然(未取代的)胺基酸之殖株。將來自各資料庫的小數量殖株，如約20-80個殖株(視資料庫的複雜度而定)篩選對目標多胜肽(或其他結合目標)的結合親合力，及鑑定具有增加、相同、降低或無結合的候選者。決定結合親合力的方法為技藝中已熟知。利用BIAcore表面電漿共振(plasmon resonance)分析可決定結合親合力，其偵測結合親合力約2倍或以上之差異。當開始抗體已以較高親合力結合，例如 $K_D$ 約10 nM或更低時，BIAcore為特別有用。利用BIAcore表面電漿共振之篩選係說明於本文中的實例中。

利用動態排除螢光免疫分析法(Kinexa)生物感應器、閃爍接近分析法(Scintillation Proximity Assay)、ELISA、ORIGEN免疫分析法(IGEN)、螢光淬滅(fluorescence quenching)、螢光轉移、及/或酵母菌呈現(yeast display)可

決定結合親合力。利用適當的生物檢定法也可篩選結合親合力。

於一些實施例中，將CDR中的每個胺基酸位置利用技藝上認可的突變方法(將其部分揭示於本文中)用所有20個天然胺基酸取代(於一些實施例中，一次一個)。此產生小的植株資料庫(於一些實施例中，對每個分析的胺基酸位置有一個)，各具有20個成員之複雜度(若於每個位置將20個胺基酸置換)。

於一些實施例中，要篩選的資料庫包含有在二或多個位置之置換，其可為在相同的CDR中或於二或多個CDR中。因此，資料庫可包含在一個CDR中的二或多個位置之置換。資料庫可包含在二或多個CDR中的二或多個位置之置換。資料庫可包含在3、4、5、或更多個位置中的置換，該位置見於在二、三、四、五、或六個CDR中。利用低重複性(redundancy)密碼子可製備置換。見如Balint等人，(1993) Gene 137(1):109-18之表2。

CDR可為CDRH3及/或CDRL3。CDR可為CDRL1、CDRL2、CDRL3、CDRH1、CDRH2、及/或CDRH3。CDR可為卡巴CDR、裘蒂艾CDR、或延伸的CDR。

可將具有改良結合的候選者定序，因而確認造成改良的親合力之CDR置換突變體(也稱為「改良的」置換)。也可將結合的候選者定序，因而確認保留結合的CDR置換。

可進行多重系列之篩選。例如，具有改善的結合之候選者(各包含一個胺基酸置換於一或多個CDR的一或多個位



置)也有用於設計至少含有原始及經取代的胺基酸於各改良的CDR位置(即於CDR中在置換的突變體顯示改善的結合之胺基酸位置)之第二個資料庫之設計。將此資料庫的製備、及篩選或選擇於下進一步說明。

資料庫掃描突變法也提供用以描繪CDR特性的方式，在具有改善的結合之殖株頻率之範圍內，相同結合、降低的結合或無結合也提供關於各胺基酸位置對抗體-抗原複合物安定性的重要性之資訊。例如，若當CDR的一個位置改變至所有20個胺基酸仍保持結合，則將此位置鑑定為不太可能是抗原結合所必須者。相反地，CDR的一個位置若僅於小部份置換保持結合，則將此位置鑑定為對於CDR功用重要者。因此，資料庫掃描突變法產生關於在CDR中可改變成許多不同胺基酸(包括所有20個胺基酸)的位置及於CDR中不能改變或僅可改變成一些胺基酸的位置之資訊。

可將具有改善的親合力之候選者組合於第二個資料庫中，其包括改善的胺基酸、在該位置的原始胺基酸，及可進一步包括於該位置的其他置換，視希望或利用理想的篩選或選擇方法允許的資料庫之複雜度而定。此外，視需要，可將相鄰胺基酸位置任意排列成至少二或多個胺基酸。任意排列相鄰胺基酸可能允許突變的CDR中之其他形態彈性，其而後可能允許或幫助導入較大量改善的突變。資料庫也可包含置換於在第一次篩選中未顯示改善的親合力之位置。

利用技藝中已知的任何方法，包括利用BIAcore表面電

漿共振分析之篩選，及利用技藝中已知作為選擇的任何方法選擇，包括噬菌體呈現、酵母菌呈現、及核醣體呈現，將第二個資料庫篩選或選擇具有改善的及/或改變的結合親合力之資料庫成員。

本發明也包含包括來自本發明之抗體(如9TL)或多胜肽之一或多個片段或區域之融合蛋白質。於一個實施例中，提供一種融合多胜肽，其包含示於SEQ ID NO:2(圖1)可變輕鏈區域之至少10個連續胺基酸及/或示於SEQ ID NO:1(圖1)可變重鏈區域之至少10個胺基酸。於其他實施例中，提供一種融合多胜肽，其包含示於SEQ ID NO:2(圖1)可變輕鏈區域之至少約10個、至少約15個、至少約20個、至少約25個、或至少約30個連續胺基酸及/或示於SEQ ID NO:1(圖1)可變重鏈區域之至少約10個、至少約15個、至少約20個、至少約25個、或至少約30個連續胺基酸。於另一個實施例中，融合多胜肽包含9TL之輕鏈可變區域及/或重鏈可變區域，如圖1之SEQ ID NO:2及SEQ ID NO:1中所示。於另一個實施例中，融合多胜肽包含9TL之一或多個CDR。於再其他實施例中，融合多胜肽包含抗體9TL之CDR H3及/或CDR L3。為了本發明之目的，9TL融合蛋白質含有一或多個9TL抗體及在天然分子中不連接的另一個胺基酸序列，例如來自另一個區域之異源或同源序列。例示異源序列包括(但不限於)「標籤」如FLAG標籤或6His標籤。標籤為技藝中已熟知。

藉由技藝中已知的方法，例如合成或重組，可將9TL融

合多胜肽建立。典型而言，利用本文中說明的重組方法，藉由製備表現編碼它們的多核苷酸，將本發明之9TL融合多胜肽製造，雖然也可將其藉由技藝中已知的其他方法製備，包括例如化學合成法。

本發明也提供包含9TL抗體或多胜肽結合(例如連結)至幫助偶合至固體支撐物的試劑(如生物素(biotin)或卵白素(avidin))之組合物。為了簡化，須知一般提及9TL或抗體時，此等方法適用於本文中說明的任何 $A\beta_{1-40}$ 結合實施例。結合一般意指連結如本文中說明的此等成分。可將連結(其一般至少為投藥以鄰近結合固定此等成分)以任何方法達到。例如，當各具有能夠與另一者反應的取代基時，試劑及抗體之間的直接反應為可能。例如，在一個上之親核性殘基，如胺基或硫氫基(sulfhydryl group)可能可以和另一個上具有含羰基(如酞或醯鹵)或具有含好的離去殘基之烷基殘基(如鹵化物)反應。

可將本發明之抗體或多胜肽連接至標記試劑(或稱為「標記」)如螢光分子、放射線分子或技藝中已知的任何其他標記。標記為技藝中已知，其一般提供(直接或間接)信號。

本發明也提供包含抗體9TL的組合物(包括醫藥組合物)及套組，及如本揭示顯示之任何或所有本文中說明的抗體及/或多胜肽。

**具有受損的作用功能之抗- $A\beta$ 胜肽抗體及多胜肽**

本發明之方法利用專一地結合至 $\beta$ -澱粉狀蛋白胜肽及具

有受損的作用功能之抗體或多胜肽(包括含有此抗體或多胜肽之醫藥組合物)。此抗體及多胜肽更具有下列任何(一或多個)特徵：(a)抑制澱粉狀蛋白斑於個體中之形成；(b)降低個體中的澱粉狀蛋白斑；(c)治療、預防、緩解阿耳滋海默氏症的一或多個症狀；(d)改善知能功用。說明於本文中的抗體及多胜肽可能呈現理想的安全特性，例如，本發明之組合物不會引起明顯或不可接受程度或具有降低的程度之下列任何一或多種：腦血管中的出血(大腦出血)；腦膜腦炎(包括改變的磁振掃描)；於大腦脊髓液中升高的白血球數目；中樞神經系統發炎。如時理例4中所示，使於Fc區域中N-連結的醣化移除的抗-A $\beta$ 抗體有效於去除腦中的澱粉狀蛋白斑及改善的知能功用並於阿耳滋海默氏症的動物模型中具有比完整抗體明顯較少微出血。

如本文中使用的，具有「受損的作用功能」(與「免疫學上惰性」或「部分免疫學上惰性」)的抗體或多胜肽意指不具有任何作用功能或具有降低的活性或作用功能活性之抗體或多胜肽(與具有未經改質的或天然發生的固定區域之抗體或多胜肽比較)，如具有無活性或降低的活性於下列之任何一或多者：a)引發補體媒介的分解；b)刺激抗體相關的細胞調節細胞毒性(ADCC, antibody-dependent cell mediated cytotoxicity)；及c)活化微膠細胞。可將作用功能降低約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%、及100%之任一者。於一些實施例中，抗體結合至 $\beta$ -澱粉狀蛋白胜肽而不引發顯著的補體相關的

分解，或目標的細胞調節破壞。例如，可將固定區域上的Fc受體結合位置改質或突變以去除或降低對某些Fc受體如Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RII及/或Fc $\gamma$ RIII之結合親合力。為了簡化，須知若提及抗體時，實施例也適用於多胜肽。使用EU編號系統(Kabat等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest；第5版Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD., 1991)來指明(如IgG抗體的)固定區域的何者胺基酸殘基被改變或突變。可使用編號於抗體的特定類型(如IgG1)或物種(如人類)，並且須知可對不同抗體及物種作類似改變。

於一些實施例中，專一地結合至A $\beta$ 胜肽的抗體包含具有受損的作用功能之重鏈固定區域。重鏈固定區域可具有天然發生的序列或為變體。於一些實施例中，將天然發生的重鏈固定區域之胺基酸序列突變，如藉由胺基酸置換、插入及/或缺失，因而使固定區域的作用功能受損。於一些實施例中，也可將重鏈固定區域之Fc區域的N-糖化改變，如可完全或部分移除，因而使固定區域的作用功能受損。

於一些實施例中，藉由移除抗A $\beta$ 胜肽的Fc區域(如於IgG的CH<sub>2</sub>區塊中)的N-糖化，使作用功能受損。於一些實施例中，藉由突變糖化的胺基酸殘基或於固定區域中為糖化辨識序列部分的側邊殘基，將Fc區域的N-糖化移除。三胜肽序列天冬醯胺酸-X-絲胺酸(N-X-S)、天冬醯胺酸-X-羥丁胺酸(N-X-T)及天冬醯胺酸-X-半胱胺酸(N-X-C)(其中X為除了脯胺酸外之任何胺基酸)為酵素連接糖部分至天冬醯胺

酸側鏈做N-醣化之辨識序列。突變在固定區域中的三胜肽中之任何胺基酸產生去醣化IgG。例如，可將人類IgG1及IgG3的N-醣化位置N297突變成A、D、Q、K、或H。見Tao等人，*J. Immunology* 143:2595-2601(1989)；及Jefferis等人，*Immunological Reviews* 163:59-76(1998)。已報導具有用Gln、His、或Lys取代Asn-297之人類IgG1及IgG3不結合至人類FcγRI且不活化具有IgG1之C1q結合能力完全喪失及IgG3之C1q結合能力大幅降低之補體。於一些實施例中，將三胜肽序列中之胺基酸N突變成胺基酸A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、P、Q、R、S、T、V、W、Y之任一者。於一些實施例中，將三胜肽序列中之胺基酸N突變成保守性置換。於一些實施例中，將三胜肽序列中之胺基酸X突變成脯胺酸。於一些實施例中，將三胜肽序列中之胺基酸S突變成A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、V、W、Y。於一些實施例中，將三胜肽序列中之胺基酸T突變成A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、V、W、Y。於一些實施例中，將三胜肽序列中之胺基酸C突變成A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、V、W、Y。於一些實施例中，將三胜肽序列後的胺基酸突變成P。於一些實施例中，將固定區域中的N-醣化以酵素去除(如於實例3中所述之N-糖苷酶F、內切糖苷酶F1、內切糖苷酶F2、內切糖苷酶F3、及內切糖苷酶H)。藉由在具有N-醣化缺陷的細胞株中製造抗體，也可達到去除N-醣化。Wright等人，*J. Immunol.*

160(7):3393-402(1998)。

於一些實施例中，將與連接至固定區域的N-醣化位置之寡醣交互作用的胺基酸殘基突變以降低對FcγRI結合親合力。例如，可將人類IgG3的F241、V264、D265突變。見Lund等人，*J. Immunology* 157:4963-4969(1996)。

於一些實施例中，藉由改質區域如人類IgG之233-236、297、及/或327-331，如說明於PCT WO99/58572及Armour等人，*Molecular Immunology* 40:585-593(2003)；Reddy等人，*J. Immunology* 164:1952-1933(2000)中，使作用功能受損。說明於PCT WO 99/58572及Armour等人中的抗體除了針對目標分子的結合區塊外，還包含一個作用區塊，其具有大體上同源於所有或部分人類免疫球蛋白重鏈的固定區塊之胺基酸序列。此等抗體能夠結合目標分子而不引發顯著補體相關的分解、或細胞調節的目標破壞。於一些實施例中，作用區塊對於FcγRI、FcγRIIα及FcγRIII具有降低的親合力。於一些實施例中，作用區塊能夠專一地結合FcRn及/或FcγRIIb。此等通常係基於衍生自二或多個人類免疫球蛋白重鏈C<sub>H</sub>2區塊之嵌合區塊。以此方式改質的抗體特別適用於慢性抗體療法，以避免發炎及其他習見抗體療法之不良反應。於一些實施例中，抗體之重鏈固定區域為具有下列突變任一者的人類重鏈IgG1：1)A327A330P331成為G327S330S331；2)E233L234L235G236成為P233V234A235與缺失的G236；3)E233L234L235成為P233V234A235；4)E233L234L235G236A327A330P331成為P233V234A235G327S330S331

與 缺 失 的 G236 ; 5)E233L234L235A327A330P331 成 為 P233V234A235G327S330S331 ; 6)及 N297 成 為 A297 或 除 了 N 以 外 的 任 何 其 他 胺 基 酸 。 於 一 些 實 施 例 中 ， 抗 體 的 重 鏈 固 定 區 域 為 具 有 下 列 突 變 之 人 類 重 鏈 IgG2 : A330P331 成 為 S330S331 。 於 一 些 實 施 例 中 ， 抗 體 的 重 鏈 固 定 區 域 為 具 有 下 列 突 變 任 一 者 之 人 類 重 鏈 IgG4 : E233F234L235G236 成 為 P233V234A235 與 缺 失 的 G236 ; E233F234L235 成 為 P233V234A235 ; 及 S228L235 成 為 P228E235 。

● 也 可 將 抗 體 的 固 定 區 域 改 質 以 削 弱 補 體 活 化 。 例 如 ， 藉 由 突 變 在 固 定 區 域 中 於 C1 結 合 基 序 ( 如 C1q 結 合 基 序 ) 的 胺 基 酸 殘 基 可 降 低 補 體 之 C1 成 分 結 合 後 IgG 抗 體 之 補 體 活 化 。 曾 報 導 Ala 突 變 人 類 IgG1 的 D270 、 K322 、 P329 、 P331 各 顯 著 地 降 低 抗 體 結 合 至 C1q 及 活 化 補 體 的 能 力 。 對 於 鼠 科 IgG2b ， C1q 結 合 基 序 構 成 殘 基 E318 、 K320 、 K322 。 Idusogie 等 人 ， J. Immunology 164:4178-4184(2000) ; Duncan 等 人 ， Nature 322:738-740(1988) 。

● 吾 人 相 信 鼠 科 IgG2b 鑑 定 的 C1q 結 合 基 序 E318 、 K320 、 及 K322 對 於 其 他 抗 體 同 種 型 為 共 有 的 。 Duncan 等 人 ， Nature 322:738-740(1988) 。 藉 由 用 具 有 不 適 當 官 能 基 於 其 側 鏈 上 的 殘 基 取 代 此 等 指 定 的 殘 基 之 任 一 者 可 徹 底 破 壞 IgG2b 的 C1q 結 合 活 性 。 不 一 定 僅 用 Ala 取 代 離 子 性 殘 基 來 破 壞 C1q 結 合 。 也 可 使 用 其 他 經 烷 基 取 代 的 非 離 子 殘 基 ， 如 Gly 、 Ile 、 Leu 、 或 Val ， 或 芳 香 族 非 極 性 殘 基 如 Phe 、 Tyr 、 Trp 及 Pro 取 代 此 三 個 殘 基 之 任 一 者 以 便 破 壞 C1q 結



合。此外，也能夠利用極性非離子殘基如 Ser、Thr、Cys、及 Met 取代殘基 320 及 322 (但非 318) 以便破壞 C1q 結合活性。

本發明也提供具有受損的作用功能之抗體，其中抗體具有經改質的樞紐區域。藉由修飾樞紐區域可調節人類 IgG 對其 Fc 區域的結合親合力。Canfield 等人，*J. Exp. Med.* 173:1483-1491 (1991)；Hezareh 等人，*J. Virol.* 75:12161-12168 (2001)；Redpath 等人，*Human Immunology* 59:720-727 (1998)。可將特定的胺基酸殘基突變或刪除。經改質的樞紐區域可包含由來自 CH1 區塊之不同抗體類別或亞群的抗體衍生的完整樞紐區域。例如，可將 IgG 抗體類別之固定區塊 (CH1) 連接至 IgG4 抗體類別之樞紐區域。或者，新的樞紐區域可包含部分天然樞紐或重複單元，其中於重複中的各單元係衍生自天然樞紐區域。於一些實施例中，藉由轉變一或多個半胱胺酸殘基成為中性殘基，如丙胺酸，或藉由適當放置的殘基成為半胱胺酸殘基，將天然樞紐區域改變。美國專利第 5,677,425。利用技藝上確認的蛋白質化學及較佳的是遺傳工程技術及如本文中所述進行此改變。

也可使用專一地結合至 A $\beta$  胜肽及融合至具有受損的作用功能之重鏈固定區域之多胜肽於本文中所述的方法中。於一些實施例中，多胜肽包含衍生自示於表 3 中的抗體 9TL 或其變體的序列。於一些實施例中，多胜肽係衍生自結合至 A $\beta$  胜肽的單一區塊抗體。利用技藝中已知的方法可產生單

一區塊抗體。Omidfar 等人，*Tumour Biol.* 25:296-305(2004)；Herring 等人，*Trends in Biotechnology* 21:484-489(2003)。

於一些實施例中，抗體或多胜肽不是不是 F(ab')<sub>2</sub> 片段。於一些實施例中，抗體或多胜肽不是 Fab 片段。於一些實施例中，抗體或多胜肽不是單鏈抗體 scFv。於一些實施例中，抗體或多胜肽為乙二醇化的 F(ab')<sub>2</sub> 片段。於一些實施例中，抗體或多胜肽為乙二醇化的 Fab 片段。於一些實施例中，抗體或多胜肽是乙二醇化的單鏈抗體 scFv。

也可使用技藝中已知製造具有受損作用功能的抗體之其他方法。

可於一或多個分析法中測試具有經改質的固定區域之抗體及多胜肽以評估和開始抗體相較生物活性上作用功能降低的量。例如，利用揭示於本文中的分析法以及任何技藝確認的分析法可評估具有改變的 Fc 區域(或改變的樞紐區域)之抗體或多胜肽結合補體或 Fc 受體(例如於微膠細胞上的 Fc 受體)之能力。PCT WO 99/58572；Armour 等人，*Molecular Immunology* 40:585-593(2003)；Reddy 等人，*J. Immunology* 164:1952-1933(2000)；Song 等人，*Infection and Immunity* 70:5177-5184(2002)。

於一些實施例中，專一地結合至 β 澱粉狀蛋白胜肽之抗體為多株抗體。於一些實施例中，抗體為單株抗體。於一些實施例中，抗體為人類抗體。於一些實施例中，抗體為嵌合抗體。於一些實施例中，抗體為人化抗體。於一些實

施例中，抗體為靈長類化抗體。見如 Yocum 等人，*J. Rheumatol.* 25:1257-62(1998)；Bugelski 等人，*Human & Experimental Toxicology* 19:230-243(2000)。於一些實施例中，將抗體藉突變去免疫性使得抗體不活化人類免疫系統。見如 Nanus 等人，*J. Urology* 170:S84-S89(2003)。

如本文中使用的，A $\beta$  胜肽包括澱粉狀蛋白前驅蛋白質酵素切斷產物之任何片段。例如，A $\beta$  胜肽包括 A $\beta$ <sub>1-40</sub>、A $\beta$ <sub>1-42</sub>、或 A $\beta$ <sub>1-43</sub> 之任何片段；及在 A $\beta$ <sub>1-40</sub>、A $\beta$ <sub>1-42</sub>、或 A $\beta$ <sub>1-43</sub> 之 N 端或 C 端處不同胺基酸數目截斷的胜肽。本文中使用的胺基酸編號係基於為 A $\beta$ <sub>1-43</sub>(SEQ ID NO:17) 之編號。

於一些實施例中，抗體或多胜肽專一地結合至 A $\beta$  胜肽的殘基 1-16 內的抗原決定區。於一些實施例中，抗體或多胜肽專一地結合至 A $\beta$  胜肽的殘基 16-28 內的抗原決定區。於一些實施例中，抗體或多胜肽專一地結合至 A $\beta$ <sub>1-40</sub> 胜肽的殘基 28-40 內的抗原決定區。於一些實施例中，抗體或多胜肽專一地結合至 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 胜肽的殘基 28-42 內的抗原決定區。於一些實施例中，抗體或多胜肽專一地結合至 A $\beta$ <sub>1-43</sub> 胜肽的殘基 28-43 內的抗原決定區。於一些實施例中，抗體或多胜肽專一地結合至 A $\beta$  胜肽而不結合至全長澱粉狀蛋白前驅蛋白質 (APP, amyloid precursor protein)。於一些實施例中，抗體或多胜肽專一地結合至 A $\beta$  之聚集形式而不結合至可溶的形式。於一些實施例中，抗體或多胜肽專一地結合至 A $\beta$  之可溶的形式而不結合至聚集形式。於一些實施例中，抗體或多胜肽專一地結合至 A $\beta$  之聚集形式及可溶的

形式兩者。結合至A $\beta$ 之不同聚集形式之抗體為技藝中已知，例如，結合至澱粉狀蛋白 $\beta$ 衍生的可擴散配體(ADDLs, amyloid beta-derived diffusible ligands)；結合至澱粉狀蛋白纖維及/或沉澱物之抗體。WO 03/104437；美國專利申請案第2003/0147887號；美國專利申請案第2004/0219146號。

於一些實施例中，抗體或多胜肽專一地結合至A $\beta_{1-40}$ 之殘基33-40內的抗原決定區。於一些實施例中，抗體或多胜肽專一地結合至A $\beta_{1-40}$ 上包括胺基酸35-40的抗原決定區。於一些實施例中，抗體或多胜肽專一地結合至A $\beta_{1-40}$ 上包括胺基酸36-40的抗原決定區。於一些實施例中，抗體或多胜肽專一地結合至A $\beta_{1-40}$ 上包括胺基酸39及/或40的抗原決定區。於一些實施例中，抗體或多胜肽專一地結合至A $\beta_{1-40}$ 但不專一地結合至A $\beta_{1-42}$ 及/或A $\beta_{1-43}$ 。於一些實施例中，抗體或多胜肽為抗體9TL或本文中所述衍生自9TL的抗體之抗體或多胜肽。於一些實施例中，抗體或多胜肽競爭性地抑制抗體9TL及/或衍生自9TL的抗體或多胜肽結合至A $\beta_{1-40}$ 。於一些實施例中，抗體不是說明於PCT WO 2004/032868中的抗體2286。

本發明之抗體及多胜肽的結合親合力可能不同，且不需要(但可為)一特定值或範圍，如以下說明的例示實施例。本發明之抗體及多胜肽對A $\beta_{1-40}$ 、A $\beta_{1-40}$ 或A $\beta_{1-40}$ 的結合親合力可為約0.10至約0.80 nM、約0.15至約0.75 nM及約0.18至約0.72 nM。於一些實施例中，結合親合力為約2 pM、

約 5 pM、約 10 pM、約 15 pM、約 20 pM、約 40 pM、或大於約 40 pM。於一個實施例中，結合親合力為約 2 pM及 22 pM之間。於其他實施例中，結合親合力為小於約 10 nM、約 5 nM、約 1 nM、約 900 pM、約 800 pM、約 700 pM、約 600 pM、約 500 pM、約 400 pM、約 300 pM、約 200 pM、約 150 pM、約 100 pM、約 90 pM、約 80 pM、約 70 pM、約 60 pM、約 50 pM、約 40 pM、約 30 pM、約 10 pM。於一些實施例中，結合親合力為約 10 nM。於其他實施例中，結合親合力為小於約 10 nM、小於約 50 nM、小於約 100 nM、小於約 150 nM、小於約 200 nM、小於約 250 nM、小於約 500 nM、或小於約 1000 nM。於其他實施例中，結合親合力為小於約 5 nM。於其他實施例中，結合親合力為小於約 1 nM。於其他實施例中，結合親合力為約 0.1 nM或約 0.07 nM。於其他實施例中，結合親合力為小於約 0.1 nM或小於約 0.07 nM。於其他實施例中，結合親合力為約 10 nM、約 5 nM、約 1 nM、約 900 pM、約 800 pM、約 700 pM、約 600 pM、約 500 pM、約 400 pM、約 300 pM、約 200 pM、約 150 pM、約 100 pM、約 90 pM、約 80 pM、約 70 pM、約 60 pM、約 50 pM、約 40 pM、約 30 pM、約 10 pM之任一者至約 2 pM、約 5 pM、約 10 pM、約 15 pM、約 20 pM、或約 40 pM之任一者。於一些實施例中，結合親合力為約 10 nM、約 5 nM、約 1 nM、約 900 pM、約 800 pM、約 700 pM、約 600 pM、約 500 pM、約 400 pM、約 300 pM、約 200 pM、約 150 pM、約 100 pM、約 90 pM、約 80

pM、約 70 pM、約 60 pM、約 50 pM、約 40 pM、約 30 pM、約 10 pM 之任一者。於再其他實施例中，結合親合力為約 2 pM、約 5 pM、約 10 pM、約 15 pM、約 20 pM、約 40 pM、或大於約 40 pM。

製造抗體及多胜肽之方法為技藝中已知及說明於本文中。

可使用競爭性分析法來決定兩個抗體是否藉由辨識相同而結合相同抗原決定區或立體上重疊的抗原決定區或一個抗體競爭性抑制另一個抗體對抗原的結合。此等分析法為技藝上已知。典型而言，將抗原固定於多孔盤上並測量未經標記的抗體阻擋經標記的抗體之結合的能力。此競爭性分析法的一般標記為放射線標記或酵素標記。

可篩選專一地結合至 A $\beta$  的抗體及多胜肽之去除澱粉狀蛋白沉澱物的功效及其他有利的作用，如改善知能。例如，可將抗體或多胜肽給予至具有阿耳滋海默氏病變的動物。阿耳滋海默氏症的許多動物模型為技藝中已知。給予後，利用技藝中已知及詳述於實例 2 中的方法，可測試完整及擴散澱粉狀蛋白之量、知能之行為分析、及微膠細胞活化及微出血。PCT WO 2004/032868；Wilcock 等人，J. Neurosci. 23:3745-3751(2003)；Wilcock 等人，J. Neuroinflammation 1:24(2004)。

#### 多核苷酸、載體及宿主細胞

本發明也提供編碼本發明之抗體及多胜肽(包括包含示於圖 1 中輕鏈及重鏈可變區域之多胜肽序列之抗體)的分離

的多核苷酸，及包含此多核苷酸之載體及宿主細胞。

於是，本發明提供多核苷酸(或組合物，包括醫藥組合物)，其包含編碼下列任一者之多核苷酸：(a)示於表3中的抗體9TL或其變體；(b)示於表3中的抗體9TL或其變體之片段或區域；(c)示於表3中的抗體9TL或其變體之輕鏈；(d)示於表3中的抗體9TL或其變體的重鏈；(e)來自示於表3中的抗體9TL或其變體之輕鏈及/或重鏈之一或多個可變區域；(f)示於表3中抗體9TL或其變體之一或多(一、二、三、四、五、或六)個CDR；(g)來自抗體9TL重鏈的CDR H3；(h)來自示於表3中抗體9TL或其變體之輕鏈的CDR L3；(i)來自示於表3中抗體9TL或其變體之輕鏈的三個CDRs；(j)來自示於表3中抗體9TL或其變體之重鏈的三個CDRs；(k)來自示於表3中抗體9TL或其變體之輕鏈的三個CDRs及來自重鏈的三個CDRs；及(l)包含(b)至(k)任一者之抗體。於一些實施例中，多核苷酸包含示於SEQ ID NO:9及SEQ ID NO:10中的任一或兩者多核苷酸。

另一方面，本發明提供編碼本文中所述之任何抗體(包括抗體片段)或多胜肽之多核苷酸，如具有受損的作用功能之抗體或多胜肽。藉由技藝中已知的程序可製造多核苷酸。

另一方面，本發明提供組合物(如醫藥組合物)，其包含本發明之任何多核苷酸。於一些實施例中，組合物包含表現載體，其包含編碼如本文中所述的9TL抗體之多核苷酸。於其他實施例中，組合物包含表現載體，其包含編碼

如本文中所述的任何抗體或多胜肽之多核苷酸。於再其他實施例中，組合物包含示於SEQ ID NO:9及SEQ ID NO:10中的任一或兩者多核苷酸。將表現載體、及多核苷酸組合物之給予於本文中進一步說明。

另一方面，本發明提供製造本文中說明的任何多核苷酸之方法。

本發明也包含互補於任何此序列之多核苷酸。多核苷酸可為單股(編碼或反意義)或雙股，及可為DNA(基因組、cDNA或合成的)或RNA分子。RNA分子包括HnRNA分子(其含有內含子及以一對一的方式相當於DNA分子)及mRNA分子(其不含有內含子)。其他編碼或非編碼序列可(但不需要)存在於本發明的多核苷酸內，及可(但不需要)將多核苷酸連接至其他分子及/或支撐材料。

多核苷酸可包含天然序列(即編碼抗體或其部分之內生序列)或可包含此序列之變體。多核苷酸變體含有一或多個置換、加成、缺失及/或插入使得相對於天然免疫反應性分子，編碼的多胜肽之免疫反應性不變小。如本文中所述可一般地評估編碼的多胜肽之免疫反應性作用。變體較佳與編碼天然抗體或其部分之多核苷酸序列呈現至少約70%一致性、更佳至少約80%一致性及最佳至少約90%一致性。

當如下所述對齊做最大符合性，若在兩個序列中的核苷酸或胺基酸的序列為相同時，則說兩個多核苷酸或多胜肽序列為「相同」。於兩序列間之比較通常由在比較窗上比



較序列進行以確認及比較序列局部區域之相似性。如本文中  
使用「比較窗」意指一段至少約20個連續位置，通常30  
個至約75個、40個至約50個，其中在將兩序列最適對齊  
後，可將序列與相同數目連續位置之參考序列比較。

利用生物資訊(bioinformatics)軟體之Lasergene套裝軟體  
的Megalign程式(DNASTAR, Inc., Madison, WI)，利用預設  
參數，可進行比較序列之最適對齊。此程式包含說明於下  
列參考資料中的對齊系統：Dayhoff, M.O. (1987)A model  
of evolutionary change in proteins-Matrices for detecting  
distant relationships。於Dayhoff, M.O. 編著，Atlas of  
Protein Sequence and Structure, National Biomedical  
Research Foundation, Washington DC第5冊，附錄3，345-  
358頁；Hein J., 1990, Unified Approach to Alignment and  
Phylogenesis, 626-645頁，Methods in Enzymology第183  
冊，Academic Press, Inc., San Diego, CA；Higgins, D.G.及  
Sharp, P.M., 1989, CABIOS 5:151-153；Myers, E.W.及  
Muller W., 1988, CABIOS 4:11-17；Robinson, E.D., 1971,  
Comb. Theor. 11:105；Santou, N., Nes, M., 1987, Mol.  
Biol. Evol. 4:406-425；Sneath, P.H.A.及Sokal, R.R., 1973,  
Numerical Taxonomy the Principles and Practice of  
Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA；  
Wilbur, W.J.及Lipman, D.J., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci.  
USA 80:726-730。

較佳的是，「序列一致性百分比」係由在至少20個位置

之比較窗上比較兩個最佳對齊的序列而決定，其中當比較兩序列之最佳對齊的參考序列(其不含加成或缺失)，在比較窗中多核苷酸或多胜肽序列之部分可包含20%或以下，通常為5至15%，或10至12%之加成或缺失(即空缺)。藉由決定於兩個序列中發生相同核酸鹼基或胺基酸殘基的位置之數目而產生相符的位置之數目，將此相符的位置之數目除以參考序列中位置之總數(即窗大小)及將此結果乘以100而產生序列一致性百分比而計算百分比。

變體可能也(或不同地)為大體上同源於天然基因，或其部分或互補。此多核苷酸變體能夠在中等嚴謹的條件下雜交至編碼天然抗體的天然發生的DNA序列(或互補序列)。

適當的「中等嚴謹的條件」包括於5X SSC、0.5%SDS、1.0 mM EDTA(pH 8.0)之溶液中預洗；在50°C -65°C、5X SSC中雜交隔夜；之後於含0.1% SDS的2X、0.5X及0.2X SSC於65°C清洗20分鐘各2次。

如本文中使用的「高度嚴謹的條件」或「高嚴謹度條件」為：(1)利用低離子強度及高溫做清洗，例如0.015 M氯化鈉/0.0015 M檸檬酸鈉/0.1%月桂硫酸鈉於50°C；(2)於雜交期間利用變性劑如甲醯胺，例如50%(v/v)甲醯胺與0.1%牛血清白蛋白/0.1%聚蔗糖(Ficoll)/0.1%聚乙烯吡咯烷酮/50 mM磷酸鈉緩衝液於pH 6.5與750 mM氯化鈉、75 mM檸檬酸鈉於42°C；或(3)利用50%甲醯胺、5x SSC(0.75 M NaCl、0.075 M檸檬酸鈉)、50 mM磷酸鈉(pH 6.8)、0.1%焦磷酸鈉、5x Denhardt's溶液、經超音波震盪的鮭魚精

DNA(50微克/毫升)、0.1% SDS、及10%硫酸葡聚糖於42°C，與在42°C於0.2x SSC(氯化鈉/檸檬酸鈉)中及於55°C的50%甲醯胺中清洗，之後用由含EDTA的0.1x SSC在55°C組成的高嚴謹度清洗。熟悉本技藝者將知如何視需要調整溫度、離子強度等以符合如探針長度等的因素。

一般熟悉本技藝者將知，由於遺傳密碼的簡併性，有許多核苷酸序列編碼如本文中所述的多胜肽。一些此等多核苷酸具有對任何天然基因之核苷酸序列極小的同源性。但是，本發明也特別考慮由於密碼子用法不同而改變的多核苷酸。再者，包含有本文中提供的多核苷酸序列的基因之對偶基因為本發明範圍內。對偶基因為由於一或多個突變，如核苷酸之缺失、加入及/或置換造成改變的內生基因。形成的mRNA及蛋白質可能(但不一定要)具有改變的結構或功能。利用標準技術(如雜交、放大及/或資料庫序列比較)可鑑定對偶基因。

本發明的多核苷酸可利用化學合成、重組方法、或PCR得到。化學多核苷酸合成之方法為技藝中已熟知，不需要於本文中詳細說明。熟悉本技藝者可以使用本文中提供的序列及市售DNA合成儀來產生理想DNA序列。

對於利用重組方法製造多核苷酸，可將包含有理想序列之多核苷酸插入適當載體，之後可將載體導入適當宿主細胞做複製及放大，如本文中進一步說明。藉由任何技藝中已知的方式可將多核苷酸插入宿主細胞中。藉由直接攝入、內吞作用、轉染、F-交配或電穿孔導入外生的多核苷

酸將細胞轉化。一旦導入，可將外生的多核苷酸維持於細胞內呈未結合的載體(如質體)或結合入宿主細胞基因組。藉由技藝中已熟知的方法可將如此放大的DNA自宿主細胞分離。見如 Sambrook 等人(1989)。

或者，PCR允許DNA序列之複製。PCR技術為技藝中已熟知及說明於美國專利第4,683,195、4,800,159、4,754,065及4,683,202號中，以及PCR: The Polymerase Chain Reaction, Mullis 等人編著，Birkauswer Press, Boston(1994)。

藉由利用分離的DNA於適當的載體及插入適當的宿主細胞中，可得到RNA。當細胞複製及將DNA轉錄成RNA，之後可將RNA利用熟悉本技藝者已熟知的方法分離，如 Sambrook 等人(1989)中所提出。

根據標準技術可建立適當的選殖載體，或可由技藝中可得到的大量選殖載體選出。雖然選擇的選殖載體可能根據欲使用的宿主細胞而不同，有用的選殖載體一般有自身複製的能力，可能對特定限制內切核酸酶具有單一目標，及/或可能攜帶可用於選擇含有此載體之植株之標記基因。適當的實例包括質體及細菌性病毒，如pUC18、pUC19、Bluescript(如pBS SK+)及其衍生物、mp18、mp19、pBR322、pMB9、ColE1、pCR1、RP4、噬菌體DNA及穿梭載體(shuttle vectors)如pSA3及pAT28。此等及=許多其他選殖載體為可購自市場供應商如BioRad、Stratagene、及Invitrogen。

表現載體一般為可複製的多核苷酸構體，其含有根據本發明之多核苷酸。此意味表現載體必須在宿主細胞中可複製，無論是呈游離基因(episomes)或呈染色體DNA的整體部分。適當的表現載體包括(但不限於)質體、病毒載體，包括腺病毒、腺相關病毒、反轉錄病毒、黏粒、及揭示於世界專利申請案第WO 87/04462號中的表現載體。載體成分一般可包括(但不限於)下列一或多者：信號序列；複製起點；一或多個標記基因；適當的轉錄控制元件(如啟動子、促進子及終結子)。為了表現(即轉譯)，也通常需要一或多個轉譯控制元件，如核糖體結合位置、轉譯起始位置、及停止密碼子。

藉由任何許多適當的方法，包括電穿孔、利用氯化鈣、氯化銣、磷酸鈣、DEAE-葡聚糖、或其他物質之轉染；微彈轟擊法(microprojectile bombardment)；脂轉染(lipofection)；及感染(如當載體為有感染性藥劑如牛痘病毒)，可將含有有興趣的多核苷酸之載體導入宿主細胞。導入載體或多核苷酸之選擇常視宿主細胞的特性而定。

本發明也提供包含任何本文中所述的多核苷酸之宿主細胞。為了分離編碼有興趣的抗體、多胜肽或蛋白質之基因可使用能夠過度表現異源DNA的任何宿主細胞。哺乳類宿主細胞之非限制性實例包括(但不限於)COS、HeLa、及CHO細胞。也見世界專利申請案第WO 87/04464號。適當的非哺乳類宿主細胞包括原核細胞(如大腸桿菌或枯草芽胞桿菌)及酵母菌(如釀酒酵母(*S. cerevisiae*)、裂殖酵母(*S.*

pombe)；或乳酸克魯維酵母(K.lactis))。較佳的是，宿主細胞以約5倍，更佳的是10倍，再更佳20倍高於宿主細胞中相對應內生的有興趣的抗體或蛋白質之量表現cDNA量。藉由免疫分析法或FACS實行篩選對 $A\beta_{1-40}$ 專一性結合之宿主細胞。可鑑定過度表現有興趣的抗體或蛋白質之細胞。

#### 具有受損的作用功能之9TL衍生的抗體及抗- $A\beta$ 抗體之診斷用途

可使用結合至 $A\beta_{1-40}$ C端的抗體9TL來鑑定或偵測 $A\beta_{1-40}$ 的存在與否。為了簡化，一般提及9TL或抗體時應知此等方法適用於任何本文中說明的 $A\beta_{1-40}$ 結合實施例(如多胜肽)。偵測一般包含使生物樣本與本文中說明結合至 $A\beta_{1-40}$ 的抗體接觸及於 $A\beta_{1-40}$ 及專一地結合至 $A\beta_{1-40}$ 的抗體(如9TL)之間形成複合物。此複合物之形成可為試管內或活體內。如本文中使用的用詞「偵測」包括參照或不參照控制組之定性及/或定量偵測(測量程度)。

可使用任何許多已知方法於偵測，包括(但不限於)免疫分析法，利用結合至多胜肽的抗體，如藉由酵素連結免疫吸附分析法(ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay)、放射免疫分析(RIA, radioimmunoassay)等；編碼的多胜肽之功能分析，如結合活性或酵素分析。於一些實施例中，將抗體可偵測地標記。其他實施例為技藝中已知及說明於本文中。

可使用本發明的抗體及多胜肽於偵測、診斷及監測與改

變的或異常A $\beta$ 或 $\beta$ APP表現有關的疾病、症狀或失調，如阿耳滋海默氏症及蒙古症。因此，於一些實施例中，本發明提供方法，其包含使懷疑具有改變的或異常A $\beta$ 表現的個體之標本(樣本)與本發明的抗體或多胜肽接觸及決定是否A $\beta_{1-40}$ 的量與控制組或比較樣本之量不同。於其他實施例中，本發明提供方法，其包含接觸個體之標本(樣本)及決定A $\beta_{1-40}$ 表現量。

為了診斷應用，可將抗體用可偵測的部分標記，包括但不限於放射線同位素、螢光標記、及許多酵素受質標記。結合標記至抗體的方法為技藝中已知。於本發明的其他實施例中，不需要將本發明的抗體標記，利用結合至本發明抗體的標記的抗體可偵測其存在。

可將本發明的抗體用於任何已知分析法中，如競爭性結合分析法、直接及間接三明治分析法、及免疫沉澱分析法。Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, 147-158頁(CRC Press, Inc. 1987)。

也可使用抗體於活體內診斷分析中，如活體內造影。一般而言，將抗體用放射線核種(如 $^{111}\text{In}$ 、 $^{99}\text{Tc}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、或 $^3\text{H}$ )標記，以便可使有興趣的細胞或組織利用免疫閃爍攝影定位。

也可使用抗體作為病理學上的染色試劑，下列技術為技藝中已熟知。

可使用具有受損的作用功能的抗-A $\beta$ 抗體於測量腦澱粉狀蛋白量以診斷有高危險性或已診斷出具有AD的個體，

及評估任何治療及疾病狀態的進展。曾有報導體表給予單株抗-A $\beta$ 抗體造成快速增加血漿A $\beta$ 及此增加的大小與海馬迴及皮質中澱粉狀蛋白量有高度相關性。DeMattos等人，*Science* 295:2264-2267(2002)。於一些實施例中，將具有受損的作用功能的抗-A $\beta$ 抗體給予個體，及測量血漿中A $\beta$ 的量，因而血漿A $\beta$ 之增加代表個體中腦澱粉狀蛋白量之存在及程度。可將此等方法用於監測治療的有效性及疾病階段及用以決定未來投藥及頻率。具有受損的作用功能的抗體可能有較好的安全特性及提供此等診斷用途之優點。

#### 利用抗-A $\beta$ 抗體於治療目的之方法

可使用說明於本文中的抗體(包括多胜肽)、多核苷酸、及醫藥組合物於治療、預防及抑制特徵為個體腦中蛋白質沉積的神經學症狀發展的方法中。此神經學症狀之實例包括阿耳滋海默氏症、病原素病(prion disease)、特徵為路易氏體(Lewy Bodies)之疾病(如帕金森氏症)。方法包含給予個體有效量之專一地結合至蛋白質或蛋白質沉積物的抗體或編碼此抗體之多核苷酸，其中抗體具有受損的作用功能。例如，可將專一地結合至病原素蛋白質或病原素蛋白質之聚集形式且具有受損的作用功能的抗體給予個體做為病原素病之預防及/或治療處理；可將專一地結合至突觸核蛋白(synuclein)(如 $\alpha$ -突觸核蛋白)或突觸核蛋白之聚集形式且具有受損的作用功能的抗體給予個體做為帕金森氏症之預防及/或治療處理。

可使用說明於本文中的抗體(包括多胜肽)、多核苷酸、



及醫藥組合物於治療、預防及抑制阿耳滋海默氏症及其他與改變的A $\beta$ 或 $\beta$ APP表現、或A $\beta$ 胜肽累積或沉澱物有關的疾病(通稱為「A $\beta$ -相關的疾病」),如蒙古症、帕金森氏症、多發梗塞性痴呆症、輕度知能障礙、腦澱粉狀蛋白血管病、於血管中由A $\beta$ 胜肽沉澱物引起的血管疾病(如中風及HCHWA-D)之發展。此方法包含給予個體抗體、多胜肽、或多核苷酸、或醫藥組合物。於預防應用中,將醫藥組合物或藥物以足以消除或降低風險、減輕嚴重性、或延遲發病,包括疾病的生物化學、組織學及/或行為症狀、其併發症及在疾病發展期間存在的中間病理學表現型之量給予有可能或有危險得到阿耳滋海默氏症(或其他A $\beta$ -相關的疾病)之病患。於治療應用中,將醫藥組合物或藥物以足以痊癒,或至少部分阻止疾病的症狀(生物化學、組織學及/或行為),包括其併發症及在疾病發展期間存在的中間病理學表現型之量給予懷疑或已患有此疾病之病患。

本發明也提供於個體中延遲與阿耳滋海默氏症(或其他A $\beta$ -相關的疾病)相關的症狀之發展的方法,其包含給予個體有效劑量之包含本文中所述的抗體、多胜肽、或多核苷酸之醫藥組合物。與阿耳滋海默氏症相關的症狀包含(但不限於)記憶、問題解答、語言、計算、視覺空間感覺、判斷、及行為異常。

本發明也提供抑制或降低個體中澱粉狀蛋白斑形成及/或A $\beta$ 累積之方法,其包含給予個體有效劑量之包含本文中所述的抗體、多胜肽、或多核苷酸之醫藥組合物。於一些

實施例中，澱粉狀蛋白斑係於個體的腦中。於一些實施例中，澱粉狀蛋白斑係於個體的大腦血管中。於其他實施例中，A $\beta$ 累積是在個體的循環系統中。

本發明也提供降低個體中澱粉狀蛋白斑及/或降低或減慢A $\beta$ 累積之方法，其包含給予個體有效劑量之包含本文中所述的抗體、多胜肽、或多核苷酸之醫藥組合物。於一些實施例中，澱粉狀蛋白斑係於個體的腦中。於一些實施例中，澱粉狀蛋白斑係於個體的大腦血管中。於其他實施例中，A $\beta$ 累積是在個體的循環系統中。

本發明也提供移除或清除個體中澱粉狀蛋白斑及/或A $\beta$ 累積之方法，其包含給予個體有效劑量之包含本文中所述的抗體、多胜肽、或多核苷酸之醫藥組合物。於一些實施例中，澱粉狀蛋白斑係於個體的腦中。於一些實施例中，澱粉狀蛋白斑係於個體的大腦血管中。於其他實施例中，A $\beta$ 累積是在個體的循環系統中。

本發明也提供降低A $\beta$ 胜肽在組織中(如腦)、抑制及/或降低A $\beta$ 胜肽累積於組織中(如腦)、及抑制及/或降低A $\beta$ 胜肽於個體組織中(如腦)的毒性作用的方法，其包含給予個體有效劑量之包含本文中所述的抗體、多胜肽、或多核苷酸之醫藥組合物。A $\beta$ 多胜肽可為以可溶、寡聚合、或沉澱的形式。A $\beta$ 之寡聚合形式可由2-50個A $\beta$ 多胜肽組成，其可為全長1-40及1-42之胜肽的混合物及/或此等胜肽之任何截短的形式。

本發明也提供改善知能或倒轉與個體中A $\beta$ 之澱粉狀蛋白

沉澱有關的疾病(如阿耳滋海默氏症)相關的知能衰退之方法，其包含給予個體有效劑量之包含本文中所述的抗體、多胜肽、或多核苷酸之醫藥組合物。

藉由於單一個時間點之單一直接注射或多個時間點至單一或多處，可完成本文中所述的方法(包括預防或治療)。給予也可為幾乎同時至多處。基於達到理想結果，隨治療過程可決定及調整給予之頻率。於一些情況中，本發明之抗體(包括多胜肽)、多核苷酸、及醫藥組合物之持續連續釋放配方可能為適當。用以達到持續釋放的不同配方及裝置為技藝中已知。

病患、對象、或個體包括哺乳類，如人類、牛、馬、狗、貓、豬、及綿羊動物。個體較佳為人類，及可或可不受疾病折磨或目前顯現症狀。在阿耳滋海默氏症的情況中，實際上每個人都有罹患阿耳滋海默氏症的危險，只要他或她活的夠久。所以，可將本方法預防性地給予一般大眾而不需任何評估個體病患的風險。本方法有用於確實具有阿耳滋海默氏症已知遺傳風險的個體。此個體包括具有經歷此症的親戚、及由分析遺傳或生物化學標記物決定有風險者。對於阿耳滋海默氏症風險之遺傳標記物包括在APP基因中的突變，特別是在位置717及位置670及671的突變，分別稱為哈地(Hardy)及瑞典人(Swedish)突變(見Hardy(1997) Trends Neurosci. 20:154-9)。其它風險標記物為在早老素基因(PS1及PS2)及ApoE4的突變、AD、高膽固醇血症或動脈硬化之家族史。目前患有阿耳滋海默氏症的

個體可由特殊癡呆以及上述風險因子的存在而辨識。此外，可得到許多診斷測試來鑑定具有AD的個體。此等包括測量CSF tau及A $\beta$ 42量。升高的 tau及降低的A $\beta$ 42量意味AD的存在。也可由阿耳滋海默氏症及相關疾病協會(ADRDA, Alzheimer's Disease and Related Disorders Association)標準診斷患有阿耳滋海默氏症的個體。在無症狀的病患中，治療可於任何年齡(如10、20、30歲)開始。然而，一般直到病患達到40、50、60或70歲才需要開始治療。藉著技藝中已知的不同方式可隨時間監測治療。在可能的蒙古症患者的情況中，在產前藉由給予母親治療藥劑或出生後不久可開始治療。

可用於上述方法中的醫藥組合物包括本文中所述的任何抗體、多胜肽、及/或多核苷酸。於一些實施例中，抗體為示於表3中的抗體9TL或其變體。於一些實施例中，抗體為專一地結合至A $\beta$ 胜肽之抗體及包含具有受損的作用功能之固定區域。

#### 給予及劑量

較佳將抗體於載體中給予至哺乳類；較佳的是醫藥上可接受的載體。適當的載體及其配方係說明於Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版，A. Gennaro編著，Mack Publishing Co, Easton PA, 1990；及Remington, The Science and Practice of Pharmacy第20版，Mack Publishing, 2000。典型而言，將適當量之醫藥上可接受的鹽用於配方中使得配方為等張性。載體之實例包括鹽水、

林格氏液(Ringer's solution)及葡萄糖溶液。溶液的pH較佳為約5至約8，更佳為約7至約7.5。其它載體包括持續釋放製品如含有抗體之固體親油性聚合物之半滲透基質，此基質為以成某形狀物件，如膜、微脂粒或微顆粒之形式。對於熟悉本技藝者將知某些載體可能為更佳，視例如給予途徑及給予的抗體濃度而定。

藉由注射(如全身性、靜脈內、腹腔內、皮下、肌肉內、肝門內)、或藉由其它方法，如灌流，其確保其以有效形式傳遞至血流，可將抗體給予哺乳類。藉由分離的灌注技術，如分離的組織灌注，也可將抗體給予以發揮局部治療作用。靜脈內注射為較佳。

給予抗體的有效劑量及時間表可由經驗決定，做此決定為本技藝的技術範圍內。熟悉本技藝者將知必須給予的抗體劑量將視例如接受抗體的哺乳類、給予的途徑、使用的抗體之特定種類及給予此哺乳類之其它藥物而定。選擇適當抗體劑量之指導可見於抗體之治療用途的文獻中，如 Handbook of Monoclonal Antibodies, Ferrone等人編著，Noges Publication, Park Ridge, N. J., 1985第22章及303-357頁；Smith等人，Antibodies in Human Diagnosis and Therapy, Haber等人編著，Raven Press, New York, 1977, 365-389頁。單獨使用抗體之典型每日劑量可能範圍為每天約1微克/公斤至高達100毫克/公斤體重或以上，視上述因素而定。一般而言，可使用下列任何劑量：給予劑量為至少約50毫克/公斤體重；至少約10毫克/公斤體重；至少

約3毫克/公斤體重；至少約1毫克/公斤體重；至少約750微克/公斤體重；至少約500微克/公斤體重；至少約250微克/公斤體重；至少約100微克/公斤體重；至少約50微克/公斤體重；至少約10微克/公斤體重；至少約1微克/公斤體重，或以上。在開始治療時可將抗體以較低劑量或較少頻率給予以避免可能的副作用，如暫時腦澱粉狀蛋白血管病(CAA, cerebral amyloid angiopathy)。

於一些實施例中，可存在多於一種抗體。此組合物可含有至少一種、至少兩種、至少三種、至少四種、至少五種不同本發明抗體(包括多胜肽)。

也可將抗體與有效量之一或多種其它治療藥劑組合給予哺乳類。可將抗體與一或多種其它治療藥劑相繼或同時給予。抗體及治療藥劑的量視例如使用的藥物類型、治療的病理症狀、及給予的時間表及途徑，但一般比其獨立地使用較少量。

給予哺乳類抗體後，可以熟悉本技藝者已熟知的不同方式監測哺乳類的生理狀況。

上述給予及劑量的原理可適用於本文中所述的多胜肽。

也可使用編碼本文中所述的抗體或多胜肽之多核苷酸於傳遞及表現抗體或多胜肽於理想細胞中。當然可使用表現載體來主導抗體之表現。可將表現載體全身性、腹腔內、靜脈內、肌肉內、皮下、脊髓腔內、腦室內、口服、腸內、非經腸胃、鼻內、皮膚、或經由吸入給予。例如，表現載體之給予包括局部或全身給予，包括注射、口服給

予、顆粒槍或導管給予、及局部給予。熟悉本技藝者熟知表現載體之給予以在活體內得到外生蛋白質之表現。見如美國專利第6,436,908；6,413,942；及6,376,471號。

也可使用包含編碼本發明抗體之多核苷酸的治療組合物之目標傳遞。受體媒介的DNA傳遞技術係說明於例如 Findeis等人，Trends Biotechnol. (1993) 11:202；Chiou等人，Gene Therapeutics: Methods And Applications Of Direct Gene Transfer (J.A. Wolff編著)(1994)；Wu等人，J. Biol. Chem. (1988) 263:621；Wu等人，J. Biol. Chem. (1994) 269:542；Zenker等人，Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)(1990) 87:3655；Wu等人，J. Biol. Chem. (1991) 266:338。將含有多核苷酸的治療組合物於基因療法步驟之局部給予中以約100 ng至約200毫克DNA之範圍給予。於基因療法步驟期間也可使用約500 ng至約50 mg、約1微克至約2毫克、約5微克至約500微克、及約20微克至約100微克DNA之濃度範圍。利用基因傳遞媒介可傳遞本發明的治療多核苷酸及多胜肽。基因傳遞媒介可為病毒或非病毒來源(一般見Jolly, Cancer Gene Therapy(1994) 1:51；Kimura, Human Gene Therapy (1994) 5:845；Connelly, Human Gene Therapy (1995) 1:185；及Kaplitt, Nature Genetics (1994)6:148)。利用內生的哺乳類或異源啟動子可引發此編碼序列之表現。編碼序列之表現可為持續性或受調控者。

用以傳遞理想多核苷酸及在理想細胞中表現之以病毒為

基礎的載體為技藝中已熟知。例示以病毒為基礎的媒介包括(但不限於)重組反轉錄病毒(見如世界專利申請案第 WO 90/07936 ; WO 94/03622 ; WO 93/25698 ; WO 93/25234 ; WO 93/11230 ; WO 93/10218 ; WO 91/02805 號 ; 美國專利第 5,219,740 ; 4,777,127 號 ; 德國專利地 2,200,651 號 ; 及歐洲專利 0 345 242)、 $\alpha$  病毒為基本的載體(如辛德比斯(Sindbis)病毒載體、聖利基森林(Semliki Forest)病毒(ATCC VR-67 ; ATCC VR-1247)、羅斯河(Ross River)病毒(ATCC VR-373 ; ATCC VR-1246)及委內瑞拉馬腦炎 Venezuelan equine encephalitis)病毒(ATCC VR-923 ; ATCC VR-1250 ; ATCC VR 1249 ; ATCC VR-532))、及腺相關病毒(AAV, adeno-associated virus)載體(見如世界專利申請案第 WO 94/12649, WO 93/03769 ; WO 93/19191 ; WO 94/28938 ; WO 95/11984 及 WO 95/00655 號)。也可使用如說明於 Curiel, Hum. Gene Ther. (1992) 3:147 之 DNA 連接至殺死的腺病毒之給予。

也可使用非病毒傳遞媒介及方法，包括但不限於聚陽離子縮合的 DNA 連接或未連接至殺死的單獨腺病毒(見如 Curiel, Hum. Gene Ther. (1992) 3:147) ; 配體連接的 DNA(見如 Wu, J. Biol. Chem. (1989) 264:16985) ; 真核細胞傳遞媒介細胞(見如美國專利第 5,814,482 號 ; 世界專利申請案第 WO 95/07994 ; WO 96/17072 ; WO 95/30763 ; 及 WO 97/42338 號)及核電荷中和或與細胞膜融合。也可使用裸 DNA。例示裸 DNA 導入方法係說明於世界專利申請案第



WO 90/11092號及美國專利第5,580,859號中。可作用為基因傳遞媒介的微脂粒係說明於美國專利第5,422,120號；世界專利申請案第WO 95/13796；WO 94/23697；WO 91/14445號；及歐洲專利0 524 968中。其他方式係說明於Philip, Mol. Cell Biol. (1994) 14:2411，及於Woffendin, Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91:1581中。

### 套組

本發明也提供製造的物件及含有有用於治療本文中所述的病理症狀如阿耳滋海默氏症或其他A $\beta$ -相關的疾病(如蒙古症、帕金森氏症、多發梗塞性痴呆症、輕度知能障礙、腦澱粉狀蛋白血管病、於血管中由A $\beta$ 胜肽沉澱物引起的血管疾病(如中風及HCHWA-D))，或偵測或純化A $\beta$ 或 $\beta$ APP之物質的套組。製造的物件包含具有標籤的容器。適當的容器包括例如瓶子、小瓶、及試管。容器可由許多材質如玻璃或塑膠形成。容器容納具有活性藥劑之組合物，其有效於治療病理症狀或有效於偵測或純化A $\beta$ 或 $\beta$ APP。於組合物中的活性藥劑為抗體，較佳的是，包含對A $\beta$ 或 $\beta$ APP有專一性的單株抗體。於一些實施例中，活性藥劑包含抗體9TL或衍生自抗體9TL之任何抗體或多胜肽。於一些實施例中，活性藥劑包含具有受損的作用功能之抗-A $\beta$ 抗體或多胜肽。於一些實施例中，抗-A $\beta$ 抗體或多胜肽包含重鏈固定區域，其中固定區域具有受損的作用功能。在容器上的標籤指出組合物係用於治療病理症狀如阿耳滋海默氏症或偵測或純化A $\beta$ 或 $\beta$ APP，及也可指出於活體內或市管內

使用之用法說明，如上述者。

本發明也提供包含本文中所述的任何抗體(如9TL)、多胜肽、多核苷酸之套組。於一些實施例中，本發明之套組包含上述的容器。於其他實施例中，本發明之套組包含上述的容器及包含緩衝劑的第二個容器。其可更包括由商業及使用者觀點喜歡的其它材料，包括其它緩衝劑、稀釋劑、過濾器、針頭、針筒、及用以實施任何本文中說明的方法(如治療阿耳滋海默氏症的方法，及用以抑制或降低A $\beta$ 胜肽於腦中的累積)之用法說明的包裝內頁。在用於偵測或純化A $\beta$ 或 $\beta$ AAPP的套組中，通常將抗體用可偵測的標記物標記，如例如放射線同位素、螢光化合物、生物發光化合物、化學發光化合物、金屬螯合劑或酵素。

於一些實施例中，本發明提供用於本文中所述的任何方法中之組合物(本文中所述)，無論是作為藥劑使用及/或用於藥劑之製造的文中。

提供下列實例以作為說明(但非限制)本發明。

### 實例

#### 實例1 抗體9TL及其變體之結合親合力測定

##### A. 一般方法

於此實例中使用下列一般方法。

##### 用於殖株鑑定的表現載體

抗體Fab片段之表現是在IPTG可誘發的lacZ啟動子的控制下，類似於說明於Barbas (2001)Phage display: a laboratory manual, Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring

Harbor Laboratory Press pg 2.10。載體 pComb3X)然而，修飾包括加入及表現下列其它區塊：人類 $\kappa$ 輕鏈固定區塊及 IgG2a人類免疫球蛋白的 CHI 固定區塊，Ig $\gamma$ -2鏈 C 區域，蛋白質登錄號 P01859；免疫球蛋白 $\kappa$ 輕鏈(智人)，蛋白質登錄號 CAA09181。

### 小規模 Fab 製備

如下進行小規模表現 Fab 於 96 孔盤中。開始由用 Fab 資料庫轉化的大腸桿菌，將菌落挑至接種於主盤(洋菜膠 LB+氨比西林(Ampicillin)(50 微克/毫升)+2% 葡萄糖)及工作盤(2 毫升/孔，96 孔/盤含 1.5 毫升 LB+氨比西林(50 微克/毫升)+2% 葡萄糖)兩者。將兩盤皆培養於 30°C 8-12 小時。將主盤儲存於 4°C，將取自工作盤的細胞以 5000 rpm 沉澱及用 1 毫升 LB+氨比西林(50 微克/毫升)+1 mM IPTG 重新懸浮以誘發 Fab 表現。在 30°C 及 5 小時表現時間後藉離心將細胞收集，而後重新懸浮於 500 微升 HBS-P 緩衝液(10 mM HEPES 緩衝液 pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.005% P20)。藉由冷凍(-80°C)而後於 37°C 解凍之一次循環達到 HBS-P 重新懸浮的細胞之分解。將細胞分解物以 5000 rpm 離心 30 分鐘以分離細胞殘骸與含 Fab 的上層清液。而後將上層清液注入 BIAcore 電漿共振裝置以得到各 Fab 的親合力資訊。將表現 Fab 的殖株自主盤救回以定序 DNA 及如下述為大規模 Fab 製造及詳細定性。

### 大規模 Fab 製備

為了得到詳細的動力學參數，自大的培養將 Fab 表現及

純化。將含有200毫升LB+氨比西林(50微克/毫升)+2%葡萄糖的錐形瓶用來自選擇的Fab表現的大腸桿菌菌株的5毫升隔夜培養液接種。將菌株於30°C培養直到達到OD<sub>550nm</sub>為1.0及而後由取代培養基成為200毫升LB+氨比西林(50微克/毫升)+1 mM IPTG誘發。在30°C及5小時表現時間後藉離心將細胞沉澱，而後重新懸浮於10毫升PBS(pH 8)。藉由冷凍/解凍(分別於-80°C及37°C)之兩次循環達到細胞分解。將細胞分解物的上層清液裝入用PBS(pH 8)平衡的Ni-NTA超流量瓊脂糖凝膠(superflow sepharose)(Qiagen, Valencia, CA)管柱，而後用5倍管柱體積的PBS(pH 8)清洗。各別Fab用PBS(pH 8)+300 mM Imidazol沖提於不同分液中。將含有Fab的分液集合及於PBS中透析，而後在親合力定性前用EILSA定量。

### 完整抗體製備

為了表現完整抗體，將重及輕鏈可變區域選殖入哺乳類表現載體及利用陽離子脂質體(lipofectamine)轉染入HEK 293細胞做暫時表現。利用標準方法利用蛋白質A將抗體純化。

載體pDb.9TL.hFc2a為包含9TL抗體重鏈之表現載體，及為適於做重鏈的暫時或穩定表現。載體pDb.9TL.hFc2a具有相對應於下列區域之核苷酸序列：鼠巨細胞病毒(cytomegalovirus)啟動子區域(核苷酸1-612)；合成的內含子(核苷酸619-1507)；DHFR編碼區域(核苷酸707-1267)；人類生長荷爾蒙信號勝肽(核苷酸1525-1602)；9TL的重鏈

可變區域(核苷酸1603-1951)；含有下列突變之人類種鏈IgG2a固定區域：A330P331成為S330S331(胺基酸編號參照野生型IgG2a序列；見Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624)；SV40晚期聚腺苷酸化信號(polyadenylation signal)(核苷酸2960-3203)；SV40促進子區域(核苷酸3204-3449)；噬菌體f1區域(核苷酸3537-4992)及β內醯胺酶(Lactamase)(AmpR)編碼區域(核苷酸4429-5286)。載體pDb.9TL.hFc2a係於2004年7月20日寄存於ATCC，並被指定ATCC登錄號PTA-6124。

載體pEb.9TL.hK為包含9TL抗體輕鏈之表現載體，及為適於做輕鏈的暫時表現。載體pEb.9TL.hK具有相對應於下列區域之核苷酸序列：鼠巨細胞病毒啟動子區域(核苷酸1-612)；人類EF-1內含子(核苷酸619-1142)；人類生長荷爾蒙信號勝肽(核苷酸1173-1150)；抗體9TL輕鏈可變區域(核苷酸1251-1593)；人類κ鏈固定區域(核苷酸1594-1914)；SV40晚期聚腺苷酸化信號(核苷酸1932-2175)；SV40促進子區域(核苷酸2176-2421)；噬菌體f1區域(核苷酸2509-2964)及β內醯胺酶(AmpR)編碼區域(核苷酸3401-4258)。載體pEb.9TL.hK係於2004年7月20日寄存於ATCC，並被指定ATCC登錄號PTA-6125。

### **Biacore分析法**

利用BIAcore3000<sup>TM</sup>表面電漿共振(SPR, surface plasmon resonance)系統(BIAcore, INC, Piscaway NJ)決定9TL單株抗體的親合力。決定親合力的一個方式為固定9TL於CM5

晶片上及測量 $A\beta_{1-40}$ 胜肽對抗體的結合動力學。根據供應商的使用說明將CM5晶片用N-乙基-N'-(3-二甲基胺基丙基)-碳化二亞胺鹽酸鹽(EDC, N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride)及N-羥基琥珀硫亞胺(NHS, N-hydroxysuccinimide)活化。將抗體9TL或其變體稀釋入10 mM醋酸鈉pH 4.0或5.0及以0.005毫克/毫升之濃度注入活化的晶片上。利用可變的流動時間通過個別晶片通道，達到一定範圍之抗體密度：1000-2000或2000-3000反應單元(RU, response units)。將晶片用乙醇胺阻斷。再生的研究顯示含2倍體積PIERCE沖提緩衝液及1倍體積4M NaCl之溶液有效地去除結合的 $A\beta_{1-40}$ 胜肽同時在超過200次注射後仍保持晶片上9TL活性。於所有Biacore分析法中使用HBS-EP緩衝液(0.01M HEPES, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005%界面活性劑P20)作為運轉緩衝液。將純化的 $A\beta_{1-40}$ 合成胜肽樣品之連續稀釋(0.1-10x估計的 $K_D$ )以100微升/分鐘注入1分鐘及允許10分鐘分解時間。利用BIA評估程式藉由套用數據至1:1蘭格默爾(Langmuir)結合模型(Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B.(1994). Methods Enzymology 6. 99-110)同時得到動力學結合速率( $k_{on}$ )及分解速率( $k_{off}$ )。將平衡分解常數( $K_D$ )值計算為 $k_{off}/k_{on}$ 。

或者，藉由固定 $A\beta_{1-40}$ 胜肽於SA晶片上及測量9TL Fab及9TL變體的Fab對固定的 $A\beta_{1-40}$ 胜肽之結合動力學，決定親合力。9TL Fab片段及其變體Fab片段之親合力係由表

面電漿共振 (SPR, surface plasmon resonance) 系統 (BIAcore3000™, BIAcore, INC, Piscaway NJ) 決定。根據供應商的使用說明使用 SA 晶片 (鏈親合素)。將生物素化的 A $\beta$  胜肽 1-40 稀釋入 HBS-EP (10 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% P20) 及 0.005 毫克/毫升之濃度注入活化的晶片上。利用可變的流動時間通過個別晶片通道，達到兩個範圍之抗原密度：10-200 反應單元 (RU, response units) 用於詳細動力學研究及 500-600 RU 作為濃度研究及篩選。再生的研究顯示 100 mM 磷酸 (也可接著用含 2 倍體積 50 mM NaOH 及 1 倍體積 70% 乙醇) 有效地去除結合的 Fab 同時在超過 200 次注射後仍保持晶片上 A $\beta$  胜肽活性。於所有 BIAcore 分析法中使用 HBS-EP 緩衝液作為運轉緩衝液。將純化的 Fab 樣品之連續稀釋 (0.1-10x 估計的  $K_D$ ) 以 100 微升/分鐘注入 2 分鐘及允許 10 分鐘分解時間。Fab 蛋白質的濃度係由 ELISA 及 / 或 SDS-PAGE 電泳利用已知濃度 (由胺基酸分析決定) 之標準 Fab 而決定。利用 BIA 評估程式藉由套用數據至 1:1 蘭格默爾結合模型 (Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B. (1994). *Methods Enzymology* 6. 99-110) 同時得到動力學結合速率 ( $k_{on}$ ) 及分解速率 ( $k_{off}$ )。將平衡分解常數 ( $K_D$ ) 值計算為  $k_{off}/k_{on}$ 。

#### B. 抗體 9TL 及其變體對 A $\beta$ <sub>1-40</sub> 之結合親合力

將抗體 9TL 的重鏈及輕鏈可變區域之胺基酸序列適於圖 1 中。將利用上述兩個 Biacore 方法決定的抗體 9TL 對 A $\beta$ <sub>1-40</sub> 之結合親合力示於下表 2 中。

表2. 抗體9TL及Fab片段之結合親合力

	$k_{on}(1/Ms)$	$k_{off}(1/s)$	$K_D( nM)$
9TLmAb於CM5晶片上， $A\beta_{1-40}$ 流動到其上	$4.25 \times 10^5$	$3.89 \times 10^{-4}$	0.9
$A\beta_{1-40}$ 於SA晶片上，9TL Fab流動到其上	$3.18 \times 10^5$	$3.59 \times 10^{-4}$	1.13

將9TL變體之胺基酸序列示於下表3中。示於表3中的變體之所有胺基酸置換係相對於9TL的序列說明。9TL變體的Fab片段之結合親合力也示於表3中。 $K_D$ 及其他動力學參數係由上述BIAcore分析用 $A\beta_{1-40}$ 固定於SA晶片上而決定。

表3. 抗體9TL變體之胺基酸序列及動力學數據

植株	H1 (1)	H2	H3	L1	L2	L3	$k_{on}(Ms^{-1})$ (2)	$k_{off}(s^{-1})$	$K_D( nM)$ (3)
9TL							$3.18 \times 10^5$	$3.59 \times 10^{-4}$	1.13
22-T/I						L102I	$3.18 \times 10^5$	$4.60 \times 10^{-4}$	1.45
C6 new						L102T	$3.56 \times 10^5$	$9.20 \times 10^{-4}$	2.58
W1				Y31A, A34S		L102T	$3.18 \times 10^5$	$9.00 \times 10^{-3}$	28.30
W8				Y31H, A34S, K35A		L102T	$3.18 \times 10^5$	$3.80 \times 10^{-3}$	11.95
W5				Y31H, K35A		L102T	$3.18 \times 10^5$	$4.00 \times 10^{-3}$	12.58
M1						L94M	$3.18 \times 10^5$	$8.60 \times 10^{-4}$	2.70
M2						L94N	$3.18 \times 10^5$	$1.10 \times 10^{-3}$	3.46
M3						L94C	$3.18 \times 10^5$	$1.30 \times 10^{-3}$	4.09



M4						L94F	$3.18 \times 10^5$	$9.95 \times 10^{-4}$	3.13
M5						L94V	$3.18 \times 10^5$	$1.65 \times 10^{-3}$	5.19
M6						L94K	$3.18 \times 10^5$	$4.10 \times 10^{-3}$	12.89
M7						L94S	$3.18 \times 10^5$	$6.00 \times 10^{-3}$	18.87
M8						L94Q	$3.18 \times 10^5$	$6.80 \times 10^{-3}$	21.38
M9						L94G	$3.18 \times 10^5$	$7.80 \times 10^{-3}$	24.53
M10						L94S	$3.18 \times 10^5$	$8.30 \times 10^{-3}$	26.10
M11						G96S	$3.18 \times 10^5$	$2.00 \times 10^{-3}$	6.29
M12						G96T	$3.18 \times 10^5$	$3.30 \times 10^{-3}$	10.38
M13						T97S	$3.18 \times 10^5$	$3.90 \times 10^{-4}$	1.23
M14						H98L	$3.18 \times 10^5$	$1.60 \times 10^{-3}$	5.03
M15						Y99P	$3.18 \times 10^5$	$6.70 \times 10^{-4}$	2.11
M16						Y99A	$3.18 \times 10^5$	$7.00 \times 10^{-4}$	2.20
M17						Y99W	$3.18 \times 10^5$	$1.00 \times 10^{-3}$	3.14
M18						Y99Q	$3.18 \times 10^5$	$1.50 \times 10^{-3}$	4.72
M19						Y99M	$3.18 \times 10^5$	$1.70 \times 10^{-3}$	5.35
M20						Y99S	$3.18 \times 10^5$	$2.00 \times 10^{-3}$	6.29
M21						Y99E	$3.18 \times 10^5$	$5.00 \times 10^{-3}$	15.72
M22						V101L	$3.18 \times 10^5$	$4.00 \times 10^{-3}$	12.58
M23						V101K	$3.18 \times 10^5$	$5.00 \times 10^{-3}$	15.72
M24						V101H	$3.18 \times 10^5$	$6.00 \times 10^{-3}$	18.87
M25						V101T	$3.18 \times 10^5$	$8.00 \times 10^{-3}$	25.16
M26						V101A	$3.18 \times 10^5$	$9.00 \times 10^{-3}$	28.30
M27						V101E	$3.18 \times 10^5$	$1.20 \times 10^{-2}$	37.74
M28						V101M	$3.18 \times 10^5$	$1.40 \times 10^{-2}$	44.03

M29					L102S	$3.18 \times 10^5$	$7.60 \times 10^{-4}$	2.39
M30					L102V	$3.18 \times 10^5$	$6.80 \times 10^{-4}$	2.14
M31			L99V			$3.18 \times 10^5$	$1.00 \times 10^{-2}$	31.45
M32			L99I			$3.18 \times 10^5$	$2.00 \times 10^{-2}$	62.89
M33			Y100W			$3.18 \times 10^5$	$6.30 \times 10^{-4}$	1.98
M34			S101T			$3.18 \times 10^5$	$8.00 \times 10^{-4}$	2.52
M35			S101G			$3.18 \times 10^5$	$9.00 \times 10^{-3}$	28.30
M36			L102R			$3.18 \times 10^5$	$9.00 \times 10^{-4}$	2.83
M37			L102A			$3.18 \times 10^5$	$9.20 \times 10^{-4}$	2.89
M38			L102V			$3.18 \times 10^5$	$1.50 \times 10^{-3}$	4.72
M39			L102S			$3.18 \times 10^5$	$2.30 \times 10^{-3}$	7.23
M40			L102T			$3.18 \times 10^5$	$4.50 \times 10^{-3}$	14.15
M41			L102Q			$3.18 \times 10^5$	$1.00 \times 10^{-2}$	31.45
M42			L102E			$3.18 \times 10^5$	$1.50 \times 10^{-2}$	47.17
M43			V104I			$3.18 \times 10^5$	$3.00 \times 10^{-4}$	0.94
M44			V104T			$3.18 \times 10^5$	$3.00 \times 10^{-3}$	9.43
M45			V104P			$3.18 \times 10^5$	$1.50 \times 10^{-2}$	47.17
M46			V104C			$3.18 \times 10^5$	$2.00 \times 10^{-2}$	62.89
M47			V104Q			$3.18 \times 10^5$	$2.00 \times 10^{-2}$	62.89
M48			V104S			$3.18 \times 10^5$	$2.60 \times 10^{-2}$	81.76
M49			V104N			$3.18 \times 10^5$	$2.60 \times 10^{-2}$	81.76
M50			V104F			$3.18 \times 10^5$	$2.70 \times 10^{-2}$	84.91
M51			Y105H			$3.18 \times 10^5$	$8.60 \times 10^{-4}$	2.70
M52			Y105F			$3.18 \times 10^5$	$1.30 \times 10^{-3}$	4.09
M53			Y105W			$3.18 \times 10^5$	$1.30 \times 10^{-3}$	4.09

M54			Y105S				$3.18 \times 10^5$	$2.40 \times 10^{-3}$	7.55
M55			Y105I				$3.18 \times 10^5$	$3.00 \times 10^{-3}$	9.43
M56			Y105V				$3.18 \times 10^5$	$3.50 \times 10^{-3}$	11.01
M57			Y105A				$3.18 \times 10^5$	$3.90 \times 10^{-3}$	12.26

1=所有 CDR 為包括卡巴及裘蒂艾 CDR 兩者之延伸的 CDR。

將胺基酸殘基依序編號。

2=下標線的  $k_{on}$  係由實驗決定。其它的為估計與 9TL 同。

3=將  $K_D$  值計算為  $K_D = k_{off}/k_{on}$ 。

● 實例 2：於  $A\beta_{1-40}$  胜肽上抗體 9TL 結合的抗原決定區之定性

為了決定  $A\beta$  多胜肽上被抗體 9TL 辨識的抗原決定區，使用表面電漿共振 (SPR, surface plasmon resonance, BIAcore 3000) 結合分析。將偶合至生物素的  $A\beta_{1-40}$  多胜肽 (Global Peptide Services, CO) 固定於鏈親合素塗佈的晶片 (SA 晶片) 上。 $A\beta$  抗體 Fab 片段 (以 50 nM) 對固定的  $A\beta_{1-40}$  之結合在  $A\beta$  胜肽之不同可溶性片段 (以 10  $\mu$ M，來自 American Peptide Company Inc., CA) 存在或不存在下。將  $A\beta_{1-40}$ 、 $A\beta_{1-42}$ 、及  $A\beta_{1-43}$  之胺基酸序列示於下表 4 中。取代抗體 9TL Fab 片段對  $A\beta_{1-40}$  之結合的  $A\beta$  胜肽分別為  $A\beta_{28-40}$ 、 $A\beta_{1-40}$ 、 $A\beta_{33-40}$ 、及  $A\beta_{17-40}$  (圖 2)。因此，抗體 9TL 結合至  $A\beta_{1-40}$  的 C 端胜肽 (33-40)。如圖 2 中所示， $A\beta_{1-28}$ 、 $A\beta_{28-42}$ 、 $A\beta_{22-35}$ 、 $A\beta_{1-16}$ 、 $A\beta_{1-43}$ 、及  $A\beta_{1-38}$  胜肽不抑制抗體 9TL Fab 片段的結合，暗示抗體 9TL 結合至  $A\beta_{1-40}$  胜肽的 C 端。

此外， $A\beta_{28-42}$  及  $A\beta_{1-43}$  胜肽不抑制抗體 9TL 至  $A\beta_{1-40}$  的結合，雖然其可立即抑制  $A\beta_{1-40}$  結合至控制組抗體 (抗體

2289，此抗體係說明於美國專利申請案第2004/0146512及世界專利WO 04/032868)，其結合至 $A\beta_{1-40}$ 的16-28。此等結果顯示抗體9TL較優先結合至 $A\beta_{1-40}$ ，但不結合至 $A\beta_{1-42}$ 及 $A\beta_{1-43}$ 。

表4.  $\beta$ 澱粉狀蛋白胜肽之胺基酸序列

1-40 (WT)	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV (SEQ ID NO: 15)
1-42(WT)	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA (SEQ ID NO: 16)
1-43 (WT)	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIAT (SEQ ID NO: 17)

### 實例3. 單株抗體2H6及去醣化2H6之產生

#### A. 單株抗體2H6之產生及定性

以約16週連續間隔用25-100微克連結至KLH的胜肽( $A\beta_{1-40}$ 的胺基酸28-40)於佐劑中將小鼠接種(每腳掌50微升，每隻共100微升)，如 Geerligs HJ 等人，1989，J. Immunol. Methods 124:95-102；Kenney JS 等人，1989，J. Immunol. Methods 121:157-166；及 Wicher K 等人，1989，Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 89:128-135 中所述。首先將小鼠用50微克胜肽於完全弗氏佐劑(CFA, complete Freud's adjuvant)中接種。21天後，將小鼠用25微克胜肽於不完全弗氏佐劑(IFA, incomplete Freud's adjuvant)中第二次接種。第二次接種後23天，用25微克胜肽於IFA中進行第三次接種。10天後，利用ELISA測試抗體力價(titer)。第三次接種後34天，用25微克胜肽於IFA中進行第四次接種。

第四次接種後32天，用100微克可溶性肽進行最後追加。

自接種的小鼠取得脾細胞及以10:1之比例用聚乙二醇1500和NSO骨髓瘤細胞融合。將融合細胞植入含20%馬血清及2-草醋酸(oxaloacetate)/丙酮酸/胰島素(Sigma)之DMEM中的96孔盤內，及開始次黃嘌呤(hypoxanthine)/胺甲蝶呤(aminopterin)/胸腺嘧啶核苷(thymidine)選擇。在第8天，將100微升含有20%馬血清的DMEM加入至所有孔中。藉由利用抗體捕獲免疫分析法篩選融合細胞的上層清液。用類別專一的二級抗體完成抗體類別的決定。

選擇一組製造單株抗體的細胞株做定性。選擇的一個細胞株產生記為2H6之抗體。抗體被測定為具有IgG2b重鏈。

決定抗體2H6對 $A\beta_{1-40}$ 的親合力。利用蛋白質A親合力層析法將單株抗體2H6自融合瘤培養之上層清液純化。將上層清液平衡至pH 8。而後將上層清液裝載至用PBS平衡至pH 8的蛋白質A管柱MabSelect(Amersham Biosciences # 17-5199-02)。將管柱用5倍管柱體積PBS(pH 8)清洗。將抗體用50 mM檸檬酸-磷酸緩衝液(pH 3)沖提。將沖提出的抗體用1M磷酸緩衝液(pH 8)中和。將純化的抗體用PBS透析。利用鼠科mAb標準曲線藉SDS-PAGE決定抗體濃度。

藉由利用免疫純(immunopure)Fab套組(pierce# 44885)之木瓜酵素蛋白質水解2H6完整抗體及遵照製造商的使用說明藉流經蛋白質A層析法純化而製備2H6 Fab。藉SDS-PAGE及利用 $1\text{OD}=0.6$ 毫克/毫升之A280決定濃度。

利用 BIAcore3000<sup>TM</sup> 表面電漿共振 (SPR, surface plasmon resonance) 系統 (BIAcore, INC, Piscaway NJ) 決定 2H6 單株抗體的親合力。決定親合力的一個方式為固定 2H6 抗體於 CM5 晶片上及測量 A $\beta$ <sub>1-40</sub> 胜肽對抗體的結合動力學。根據供應商的使用說明將 CM5 晶片用 N-乙基-N'-(3-二甲基胺基丙基)-碳化二亞胺鹽酸鹽 (EDC, N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride) 及 N-羥基琥珀硫亞胺 (NHS, N-hydroxysuccinimide) 活化。將 2H6 單株抗體稀釋入 10 mM 醋酸鈉 pH 4.0 或 5.0 及以 0.005 毫克/毫升之濃度注入活化的晶片上。利用可變的流動時間通過個別晶片通道，達到一定範圍之抗體密度：1000-2000 或 2000-3000 反應單元 (RU, response units)。將晶片用乙醇胺阻斷。再生的研究顯示 Pierce 沖提緩衝液 (產品編號 21004, Pierce Biotechnology, Rockford, IL) 及 4M NaCl (2:1) 之混合物有效地去除結合的 A $\beta$ <sub>1-40</sub> 胜肽同時在超過 200 次注射後仍保持晶片上 2H6 抗體之活性。於所有 Biacore 分析法中使用 HBS-EP 緩衝液 (0.01M HEPES, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% 界面活性劑 P20) 作為運轉緩衝液。將純化的 A $\beta$ <sub>1-40</sub> 合成胜肽樣品之連續稀釋 (0.1-10x 估計的 K<sub>D</sub>) 以 100 微升/分鐘注入 1 分鐘及允許 10 分鐘分解時間。利用 BIA 評估程式藉由套用數據至 1:1 蘭格默爾結合模型 (Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B. (1994). *Methods Enzymology* 6. 99-110) 同時得到動力學結合速率 (k<sub>on</sub>) 及分解速率 (k<sub>off</sub>)。將平衡分解常數 (K<sub>D</sub>) 值計算為

$k_{off}/k_{on}$ 。

或者，藉由固定  $A\beta_{1-40}$  胜肽於 SA 晶片上及測量 2H6 Fab 對固定的  $A\beta_{1-40}$  胜肽之結合動力學，決定親合力。2H6 Fab 片段之親合力係由表面電漿共振 (SPR, surface plasmon resonance) 系統 (BIAcore3000™, BIAcore, INC, Piscaway NJ) 決定。根據供應商的使用說明使用 SA 晶片 (鏈親合素)。將生物素化的  $A\beta$  胜肽 1-40 (SEQ ID NO:15) 稀釋入 HBS-EP (10 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% P20) 及以 0.005 毫克/毫升之濃度注入活化的晶片上。利用可變的流動時間通過個別晶片通道，達到兩個範圍之抗原密度：10-200 反應單元 (RU, response units) 用於詳細動力學研究及 500-600 RU 作為濃度研究。再生的研究顯示 Pierce 沖提緩衝液及 4M NaCl (2:1) 之混合物有效地去除結合的 Fab 同時在超過 200 次注射後仍保持晶片上  $A\beta$  胜肽活性。於所有 Biacore 分析法中使用 HBS-EP 緩衝液作為運轉緩衝液。將純化的 Fab 樣品之連續稀釋 (0.1-10x 估計的  $K_D$ ) 以 100 微升/分鐘注入 2 分鐘及允許 10 分鐘分解時間。Fab 蛋白質的濃度係由 ELISA 及/或 SDS-PAGE 電泳利用已知濃度 (由胺基酸分析決定) 之標準 Fab 而決定。利用 BIA 評估程式藉由套用數據至 1:1 蘭格默爾結合模型 (Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B. (1994). *Methods Enzymology* 6. 99-110) 同時得到動力學結合速率 ( $k_{on}$ ) 及分解速率 ( $k_{off}$ )。將平衡分解常數 ( $K_D$ ) 值計算為  $k_{off}/k_{on}$ 。將利用上述兩種方法決定的 2H6 抗體親合力示於下表 5 中。

將結合至A $\beta$ <sub>1-40</sub>的胺基酸28-40之胜肽的抗體2286如上述測試。抗體2286係說明於美國專利申請案第10/683,815號及PCT/US03/32080中。

表 5. 抗體 2H6 及 2286 之結合親合力

	$k_{on}(1/Ms)$	$k_{off}(1/s)$	$K_D( nM)$
2H6 mAb 於 CM5 晶片上，A $\beta$ <sub>1-40</sub> 流動到其上	$4.67 \times 10^5$	$3.9 \times 10^{-3}$	9
A $\beta$ <sub>1-40</sub> 於 SA 晶片上，2H6 Fab 流動到其上	$6.3 \times 10^5$	$3.0 \times 10^{-3}$	4.7
2286 mAb 於 CM5 晶片上，A $\beta$ <sub>1-40</sub> 流動到其上	$1.56 \times 10^5$	0.0419	269
A $\beta$ <sub>1-40</sub> 於 SA 晶片上，2286 Fab 流動到其上	$1.8 \times 10^5$	0.044	245

為了決定A $\beta$ 多胜肽上被抗體2H6辨識的抗原決定區，使用表面電漿共振 (SPR, surface plasmon resonance, BIAcore 3000) 結合分析。將偶合至生物素的A $\beta$ <sub>1-40</sub>多胜肽 (SEQ ID NO:15) (Global Peptide Services, CO) 固定於鏈親合素塗佈的晶片 (SA 晶片) 上。A $\beta$ 抗體 (以 100 nM) 對固定的A $\beta$ <sub>1-40</sub>之結合在A $\beta$ 胜肽之不同可溶性片段 (以 16  $\mu$ M，來自 American Peptide Company Inc., CA) 存在或不存在下。取代抗體2H6對A $\beta$ <sub>1-40</sub>之結合的A $\beta$ 胜肽分別為A $\beta$ <sub>17-40</sub>、A $\beta$ <sub>33-40</sub>、及A $\beta$ <sub>1-40</sub> (圖3)。因此，抗體2H6結合至A $\beta$ <sub>1-40</sub>的C端胜肽(33-40)。然而，在測試的濃度下A $\beta$ <sub>1-40</sub>的C端胜肽(33-40)不取代抗體2286對A $\beta$ <sub>1-40</sub>之結合。如圖3中所示，A $\beta$ <sub>1-38</sub>胜肽不抑制抗體2H6或抗體2286對A $\beta$ <sub>1-40</sub>的結合，暗示類似於抗體2286，



抗體 2H6 結合的抗原決定區包括  $A\beta_{1-40}$  胜肽的胺基酸 39 及 / 或 40 (圖 3)。

此外， $A\beta_{1-42}$  及  $A\beta_{1-43}$  胜肽不抑制抗體 2H6 至  $A\beta_{1-40}$  的結合，雖然其可立即抑制  $A\beta_{1-40}$  結合至控制組抗體 (抗體 2289，此抗體係說明於美國專利申請案第 10/683,815 及 PCT/US03/32080)，其結合至  $A\beta_{1-40}$  的 16-28 (圖 3)。此等結果顯示抗體 2H6 較優先結合至  $A\beta_{1-40}$ ，但不結合至  $A\beta_{1-42}$  及  $A\beta_{1-43}$ 。

為了進一步評估抗體 2H6 結合的  $\beta$ -澱粉狀蛋白胜肽之分離胺基酸殘基的關聯，藉由定點突變法產生不同  $A\beta_{1-40}$  變體，其中將最後 6 個胺基酸 ( $A\beta_{1-40}$  胺基酸殘基 35-40) 各用丙胺酸個別取代 (丙胺酸掃描突變法)。將此等  $A\beta_{1-40}$  變體 (序列示於表 6 中) 表現於大腸桿菌中成為麩胱甘肽-S-轉移酶 (GST, Glutathione-S-Transferase) 融合蛋白質 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ USA) 隨後於麩胱甘肽-瓊脂糖珠 (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) 上親合力純化。作為控制組，將野生型 (WT, Wild-type)  $A\beta_{1-40}$  以及  $A\beta_{1-41}$ 、 $A\beta_{1-42}$ 、及  $A\beta_{1-39}$  也表現為 GST 融合蛋白質。而後將  $A\beta_{1-40}$ 、 $A\beta_{1-41}$ 、 $A\beta_{1-42}$ 、 $A\beta_{1-39}$  以及六個不同變體 (示於表 6 中的 M35A(1-40)、V36A(1-40)、G37A(1-40)、G38A(1-40)、V39A(1-40)、或 V40A(1-40)) 固定 (每孔 100 微升之 0.025 微克 / 微升 GST-胜肽) 於 ELISA 分析盤上及用 mAb 2286、2289、及 2H6 任一者以自 0.3 nM 往下連續稀釋培養 (將利用 0.3 nM mAb 之數據示於圖 4 中)。在 10 次連續清洗

後，將分析盤用每孔 100 微升之 0.03 微克 / 毫升生物素連結的羊-抗-小鼠 (H+L) 抗體 (Vector Laboratories, vector #BA-9200, Burlingame CA, USA) 培養，隨後每孔 100 微升之 0.025 微克 / 毫升 HRP- 連結的鏈親合素 (Amersham Biosciences Corp., #RPN4401V, NJ, USA)。於 450 nm 讀取盤的吸收度。

表 6.  $\beta$ -澱粉狀蛋白胜肽及變體之胺基酸序列

1-40 (WT)	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGL MVGGVV	(SEQ ID NO: 15)
1-42(WT)	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGL MVGGVVIA	(SEQ ID NO: 16)
1-43 (WT)	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGL MVGGVVIAT	(SEQ ID NO: 17)
1-41 (WT)	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGL MVGGVVI	(SEQ ID NO: 18)
1-39(WT)	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGL MVGGV	(SEQ ID NO: 19)
M35A(1-40)	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGL AVGGVV	(SEQ ID NO: 20)
V36A(1-40)	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGL MAGGVV	(SEQ ID NO: 21)
G37A(1-40)	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGL MVAGVV	(SEQ ID NO: 22)
G38A(1-40)	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGL MVGAVV	(SEQ ID NO: 23)
V39A(1-40)	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGL MVGGAV	(SEQ ID NO: 24)
V40A(1-40)	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGL MVGGVA	(SEQ ID NO: 25)

如圖 4 中所示，針對 A $\beta$  的 16 至 28 胺基酸的 Mab 2289 以相

同強度辨識所有變體及作為盤上蛋白質濃度及蛋白質完整性的內部正控制組。抗體2H6不辨識 $A\beta_{1-41}$ 、 $A\beta_{1-39}$ 、或 $A\beta_{1-42}$ ，如圖4中所示。 $A\beta_{1-40}$ 變體V40A、V39A、G38A、G37A、V36A、及M35A顯示對抗體2H6降低的結合，證實抗體2H6抗原決定區延伸於 $A\beta_{1-40}$ C端的至少6個胺基酸。V及G突變至A為非常保守，不可能產生蛋白質重大的形態改變，所以，此等突變對抗體2H6結合之大影響可能是由於抗體區別 $A\beta$ 內容中上述胺基酸之間的能力，此等資料顯示此抗體之非常高度專一性。

為了決定是否2H6及9TL競爭對 $A\beta_{1-40}$ 之結合，利用Biacore分析法進行競爭實驗。將抗體2H6、9TL及2289固定於CM5晶片的不同通道上。根據供應商的使用說明將CM5晶片通道用N-乙基-N'-(3-二甲基胺基丙基)-碳化二亞胺鹽酸鹽(EDC, N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl) - carbodiimide hydrochloride)及N-羥基琥珀硫亞胺(NHS, N-hydroxysuccinimide)活化。將抗體2H6、9TL及2289稀釋入10 mM醋酸鈉pH 4.0及以0.005毫克/毫升之濃度注入活化的晶片上。抗體密度為2H6有1625反應單元(RU, response units)；9TL為4000 RU；及2289為2200 RU。將各通道用乙醇胺阻斷。將 $A\beta_{1-40}$ 胜肽(150  $\mu$ M)流至晶片上2分鐘。而後將抗體2H6(欲測試結合競爭者)以0.6  $\mu$ M至晶片上1分鐘。於所有Biacore分析法中使用HBS-EP緩衝液(0.01M HEPES, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005%界面活性劑P20)作為運轉緩衝液。在測量 $A\beta_{1-40}$ 的結合後，藉由

用 Pierce 沖提緩衝液 (產品編號 21004, Pierce Biotechnology, Rockford, IL) 及 4M NaCl(2 : 1) 之混合物清洗 6 秒 2 次再生晶片的所有通道。而後對抗體 9TL 進行競爭結合，及而後抗體 2289。觀察到 9TL 及 2H6 對  $A\beta_{1-40}$  結合之競爭，但未觀察到 9TL 及 2289 之間或 2H6 及 2289 之間的競爭。觀察固定的抗體及流至晶片上相同的抗體之間的競爭作為正控制組。

#### B. 抗體 2H6 不結合至 APP

為了決定 2H6 是否結合至澱粉狀蛋白前驅蛋白質 (APP, amyloid precursor protein) 決定 2H6 對用野生型 APP 轉染的細胞之結合。將 293 細胞用編碼野生型人類澱粉狀蛋白前驅蛋白質的 cDNA 轉染。轉染後 48 小時，將細胞於冰上與單株抗體抗- $A\beta_{1-16}$ 、抗- $A\beta_{16-28}$ 、或 2H6 (5 微克/毫升於具有 10% FCS 的 DMEM) 培養 45 分鐘。而後將細胞於 PBS 中 5 分鐘清洗 3 次，用 4% PFA 固定。將細胞再次於 PBS 中清洗 3 次，用來自 Jackson Immunoresearch 之二級 Cy3-結合的羊抗-小鼠抗體 (1 : 500 稀釋) 在螢光顯微鏡下偵測抗體結合。

辨認  $A\beta$  中的 N 端或中間抗原決定區的抗- $A\beta_{1-16}$  及抗- $A\beta_{16-28}$  抗體皆對表現於細胞上的 APP 前驅蛋白質顯示顯著結合。相反地，2H6 不結合至 APP 表現細胞。

#### C. 去醣化抗體 2H6 之產生

為了產生去醣化抗體 2H6，將純化的抗體 2H6 與胜肽-N-糖苷酶 F (Prozyme, 每毫克抗體 0.05U) 於 20 mM Tris-HCl pH 8.0 在 37°C 培養 7 天。由 MALDI-TOF-MS 及蛋白質膠體電泳證實完全去醣化。將去醣化的抗體用蛋白質 A 層析法

純化及將內毒素藉Q-瓊脂糖凝膠去除。利用上述Biacore分析法測試去醣化的2H6對 $A\beta_{1-40}$ 的結合親合力，及發現2H6對 $A\beta_{1-40}$ 的結合親合力相同於完整抗體2H6。

實例4. 於阿耳滋海默氏症的動物模型中藉給予去醣化的2H6逆轉知能衰退及組織學的症狀且具有較少微出血

#### A. 實驗步驟

抗體之給予：使用過度表現「瑞典人」突變澱粉狀蛋白前驅蛋白質(具有K670N/M671之APP Tg2576；Hsiao等人，Science 274:99-102(1996))的基因轉殖小鼠於此實驗。存在於此等小鼠中的類似阿耳滋海默氏症表現型已被詳細了解。Holcomb等人，Nat. Med. 4:97-100(1998)；Holcomb等人，Behav. Gen. 29:177-185(1999)；及McGowan E, Neurobiol. Dis. 6:231-244(2000)。為了16週處理研究，將APP-基因轉殖的小鼠(20週大)分成四群。第一群每週腹膜內接受抗- $A\beta$ 抗體2H6(小鼠單株抗-人類 $A\beta_{28-40}$  IgG2b，如實例3中所述)注射16週期間(n=4)。第二群每週腹膜內接受去醣化抗- $A\beta$ 抗體2H6(如實例3中所述製造)注射16週期間(n=5)。第三群每週腹膜內接受抗-AMN抗體2H6(2906；小鼠單株抗-果蠅遺忘症蛋白質IgG1)注射16週期間(n=6)。同窩出生非基因轉殖鼠用抗-AMN抗體(n=4)或2H6(n=2)處理16週。

行為分析：抗體處理16週後，使來自研究的小鼠經過兩天放射狀水迷宮模式，如前所述。Wilcock等人，J. Neuroinflammation 1:24(2004)。裝置為如前述之6-桿迷

宮。Gordon等人，Neurobiol. Aging 22:377-385(2001)。在第一天，15次試驗以5次一組分三組進行。使一群4隻小鼠連續對各組做測試(即4隻小鼠各做第一次測試，而後相同的小鼠做第二次測試等)。在各5次測試的組合後，使第二群小鼠進行，在小鼠接受第二組5次測試前允許延長的休息時間。對於一群中的各鼠目標桿為不同，以使氣味線索減至最小。各試驗的起始桿為不同，而對一特定個體目標桿在兩天皆保持固定。對於前11次試驗，平台交替地顯現及而後隱藏(最後4次試驗隱藏)。於第二天，使小鼠以和第一天一模一樣的方式進行，除了平台於所有試驗中皆為隱藏。於一分鐘範圍中測量失誤數目(進入不正確桿)。將20秒中無法做桿選擇的小鼠記為一次失誤，但於此研究中無小鼠必須以此方式記為失誤。由於於此研究中小鼠的數目，測試者不知道各小鼠的處理族群身分。因為在放射狀水迷宮測試中評估的內容為定量，非評估性，將測試者的偏見之可能性降低。為了使個別試驗變化性的影響減至最小，每天將各小鼠3次連續試驗的失誤平均產生5個數據點，將其利用StatView(SAS Institute Inc., NC)藉ANOVA統計分析。

組織學分析：在犧牲之日，將小鼠秤重，過量給予100毫克/公斤寧必妥(Nembutal)(Abbott laboratories, North Chicago, IL)，及而後用25毫升0.9%氯化鈉心臟內灌注。快速地取出腦，將腦的左半部浸沒固定24小時於新鮮製備的4%三聚甲醛[paraformaldehyde]於100 mM KPO<sub>4</sub>(pH 7.2)

做組織病理學。而後將半腦依序培養於10%、20%及30%蔗糖24小時做冰凍保護。利用滑走切片機收集25微米厚的水平切片並於具有疊氮化鈉的Dulbecco's 磷酸緩衝的鹽水(pH 7.2)中4°C儲存以避免微生物生長。將一系列8個等間隔600微米之組織切片隨機選擇遍及整個腦部及利用自由漂浮免疫組織化學對總A $\beta$ (兔多株抗-A $\beta$ ; Biosource, Camarillo, CA, 1:10,000)染色, 如先前所述。Gordon等人, *Exp. Neurol.* 173:183-195(2002); Wilcock等人, *J. Neurosci.* 24:6144-6151(2004)。將第二個系列之間隔600微米之組織切片利用0.2%剛果紅於NaCl飽和的80%乙醇染色。也同樣裝設另一組切片及利用2%亞鐵氰化鉀於2%鹽酸染色血鐵質(Hemosiderin)15分鐘, 而後於1%中性紅溶液10分鐘做對比染色。利用Image-Pro Plus(Media Cybernetics, Silver Spring, MD)進行剛果紅染色及A $\beta$ 免疫組織化學的定量以分析由正染色佔據的面積百分比。分析前葉皮質的一個區域及海馬迴的三個區域(以確保在海馬迴質中無區域的偏差)。進行剛果紅的起始分析以產生總值。在手動地編輯出所有實質澱粉狀蛋白沉澱後進行第二個分析而產生限制於血管剛果紅染色的面積百分比。為了估計剛果紅的實質面積, 將血管澱粉狀蛋白值自總百分比減去。對於血鐵質染色, 在所有切片上計算普魯士藍陽性位置的數目及計算每個切片的平均位置數目。以低倍率於切片上觀察到動物間性質上的差異。檢視八個等間距切片並決定陽性數目及平均成每個切片的值。為了評估可能的

處理相關的差異，將各處理族群的值用單向ANOVA分析，接著用Fisher's LSD中數比較。

利用EILSA測量A $\beta$ 胜肽血清濃度：將最後一次給予抗體後一天收集的血清稀釋及培養於96孔微量滴定盤中(MaxiSorp; Nunc, Roskilde, Denmark)，將其用5微克/毫升於PBS緩衝液(pH 7.4)之抗體6E10(抗- $\beta$ 澱粉狀蛋白抗體，其結合至A $\beta_{1-17}$ ; Signet, Dedham, MA)預先塗佈。二級抗體為以1:5000稀釋之生物素化的4G8(抗- $\beta$ 澱粉狀蛋白抗體，其結合至A $\beta_{17-24}$ ; Signet)。利用鏈親合素-辣根過氧化物酶連結體(Amersham Biosciences)，接著TMB受質(KPL, Gaithersburg, MD)進行偵測。使用6-400 pM範圍之A $\beta_{1-40}$ (American Peptide)作為標準曲線。

#### B. 結果

藉給予去醣化的抗體逆轉知能衰退：放射狀水迷宮測試偵測基因轉殖小鼠模型中之空間學習與記憶衰退。Gordon等人，*Neurobiol. Aging.* 22:377-385(2001)；Morgan等人，*Nature* 408:982-985(2000)。將用抗體2H6、去醣化2H6、或抗-AMN處理16週的動物於放射狀水迷宮之兩天版中測試空間行進學習。將未基因轉殖的正常小鼠(包括用2H6抗體處理的兩隻小鼠及用抗-AMN抗體處理的4隻小鼠；將此兩個族群合併，因為未觀察到行為差異)也於放射狀水迷宮之兩天版中測試。如圖5中所示，用控制組抗體(抗-AMN)處理的APP-基因轉殖小鼠在兩天測試中無法學習平台位置且相較於未基因轉殖的小鼠顯著能力較差，



如先前所述。Wilcock 等人，J. Neuroinflammation 1:24(2004)。然而，給予抗-A $\beta$ 抗體 2H6 及去醣化 2H6 的 APP-基因轉殖小鼠顯現顯著逆轉在控制組處理的 APP-基因轉殖小鼠中觀察到的損傷，以每次試驗接近 1 次失誤之平均表現結束第二天(圖 5)。控制組處理的 APP-基因轉殖小鼠在第二天結束時具有每次試驗接近 3 次失誤之平均表現(圖 5)。示於圖 5 中的數據指出去醣化的抗體作用如同完整抗體可逆轉在 APP-基因轉殖小鼠中的知能衰退。

減少 A $\beta$  沉澱而無增加微出血：如下表 7 所示，相較於控制組抗體處理的族群(抗-AMN)，用抗體 2H6(約 56%降低， $p=0.0001$ )及去醣化 2H6(約 58%降低， $p<0.0001$ )免疫治療 16 週後於海馬迴中的總 A $\beta$  免疫染色顯著降低。如下表 8 中所示，相較於控制組抗體處理的族群(抗-AMN)，用抗體 2H6(約 50%降低， $p<0.0001$ )及去醣化 2H6(約 51%降低， $p<0.0001$ )免疫治療 16 週後於前葉皮質中的總 A $\beta$  免疫染色顯著降低。

表 7. 抗體處理 16 週後海馬迴的總 A $\beta$  量。顯示由對 A $\beta$  正免疫組織化學染色佔據的平均百分比面積、及海馬迴的標準偏差及平均數的標準誤差。

給予的抗體	被分析的動物數目	平均數	標準偏差	標準誤差
抗-AMN	6	27.127	4.602	1.879
2H6	4	12.011	5.057	2.529
去醣化的 2H6	5	11.344	4.765	2.131

表 8. 抗體處理 16 週後前葉皮質的總 A $\beta$  量。顯示由對 A $\beta$  正免疫組織化學染色佔據的平均百分比面積、及前葉皮質的標準偏差及平均數的標準誤差。

給予的抗體	被分析的動物數目	平均數	標準偏差	標準誤差
抗-AMN	6	47.060	4.667	1.905
2H6	4	23.708	6.355	3.178
去醣化的2H6	5	22.834	1.970	0.881

如下表 9 所示，相較於控制組抗體處理的族群(抗-AMN)，用抗體 2H6(約 77% 降低， $p < 0.0001$ )及去醣化 2H6(約 53% 降低， $p < 0.0001$ )免疫治療 16 週後於海馬迴中的總剛果紅染色顯著降低。如下表 10 中所示，相較於控制組抗體處理的族群(抗-AMN)，用抗體 2H6(約 79% 降低， $p < 0.0001$ )及去醣化 2H6(約 68% 降低， $p < 0.0001$ )免疫治療 16 週後於前葉皮質中的總剛果紅染色也顯著降低。

表 9. 抗體處理 16 週後海馬迴的總剛果紅染色。顯示由對 A $\beta$  正剛果紅染色佔據的平均百分比面積、及海馬迴的標準偏差及平均數的標準誤差。

給予的抗體	被分析的動物數目	平均數	標準偏差	標準誤差
抗-AMN	6	1.210	0.081	0.033
2H6	4	0.281	0.021	0.010
去醣化的2H6	5	0.573	0.101	0.045

表 10. 抗體處理 16 週後前葉皮質的總剛果紅染色。顯示由對 A $\beta$  正剛果紅染色佔據的平均百分比面積、及前葉皮質的標準偏差及平均數的標準誤差。

給予的抗體	被分析的動物數目	平均數	標準偏差	標準誤差
抗-AMN	6	2.507	0.691	0.282
2H6	4	0.520	0.047	0.023
去醣化的2H6	5	0.807	0.104	0.046

分別對前葉皮質及海馬迴兩者分析實質(表 11 及 12；及圖 6)及血管(表 13 及 14；圖 7)剛果紅染色。如表 11 及圖 6A 所示，相較於控制組抗體處理的族群(抗-AMN)，用抗體 2H6(約 98% 降低， $p < 0.0001$ )及去醣化 2H6(約 77% 降低， $p < 0.0001$ )免疫治療 16 週後於前葉皮質中的實質剛果紅染色顯著降低。如表 12 及圖 6B 中所示，相較於控制組抗體處理的族群(抗-AMN)，用抗體 2H6(約 96% 降低， $p < 0.0001$ )及去醣化 2H6(約 63% 降低， $p < 0.0001$ )免疫治療 16 週後於海馬迴中的實質剛果紅染色也顯著降低。去醣化的 2H6 比完整 2H6 抗體在降低前葉皮質及海馬迴中的剛果紅染色較不有效。

表 11. 抗體處理 16 週後前葉皮質的實質剛果紅染色。顯示由對 A $\beta$  正剛果紅染色佔據的平均百分比面積、及前葉皮質的標準偏差及平均數的標準誤差。

給予的抗體	被分析的動物數目	平均數	標準偏差	標準誤差
抗-AMN	6	2.360	0.676	0.276
2H6	4	0.059	0.047	0.024
去醣化的2H6	5	0.537	0.144	0.064

表 12. 抗體處理 16 週後海馬迴的實質剛果紅染色。顯示由對 A $\beta$  正剛果紅染色佔據的平均百分比面積、及海馬迴的標準偏差及平均數的標準誤差。

給予的抗體	被分析的動物數目	平均數	標準偏差	標準誤差
抗-AMN	6	1.117	0.104	0.043
2H6	4	0.040	0.029	0.015
去醣化的2H6	5	0.416	0.078	0.035

如表 13 及圖 7A 所示，相較於控制組抗體處理的族群(抗-AMN)，用抗體 2H6(約 2.7 倍， $p < 0.0001$ )及去醣化 2H6(約 1.7 倍， $p = 0.0185$ )免疫治療 16 週後於海馬迴中的血管剛果紅染色顯著增加。如表 14 及圖 7B 中所示，相較於控制組抗體處理的族群(抗-AMN)，用抗體 2H6(約 3.5 倍， $p < 0.0001$ )及去醣化 2H6(約 1.8 倍， $p = 0.0048$ )免疫治療 16 週後於前葉皮質中的血管剛果紅染色也顯著增加。在海馬迴( $p = 0.0025$ )及前葉皮質( $p < 0.0001$ )兩者中，去醣化的 2H6 處理之族群中血管剛果紅染色增加顯著少於完整 2H6 抗體處理的族群。

表 13 抗體處理 16 週後海馬迴的血管剛果紅染色。顯示由對

A $\beta$ 正剛果紅染色佔據的平均百分比面積、及海馬迴的標準偏差及平均數的標準誤差。

給予的抗體	被分析的動物數目	平均數	標準偏差	標準誤差
抗-AMN	6	0.093	0.036	0.015
2H6	4	0.253	0.053	0.027
去醣化的2H6	5	0.157	0.030	0.013

表 14. 抗體處理 16 週後前葉皮質的血管剛果紅染色。顯示由對 A $\beta$  正剛果紅染色佔據的平均百分比面積、及前葉皮質的標準偏差及平均數的標準誤差。

給予的抗體	被分析的動物數目	平均數	標準偏差	標準誤差
抗-AMN	6	0.147	0.055	0.023
2H6	4	0.511	0.084	0.042
去醣化的2H6	5	0.269	0.043	0.019

使用普魯士藍組織學染色來標記血鐵質(血紅素分解中產生的氧化鐵物質)。於腦中靜脈外血液導致微膠細胞的紅血球吞噬作用及於其內分解血紅素。因此，含氧化鐵的微膠細胞為昔日出血的標記物。計算抗體處理的動物中普魯士藍陽性數目。如表 15 及圖 8 中所示，相較於控制組抗體處理的族群(抗-AMN)，用抗體 2H6 處理顯著 ( $p < 0.0001$ ) 增加普魯士藍染色約 5.5 倍。相較於控制組抗體處理的族群，用去醣化的 2H6 處理僅增加普魯士藍染色約 1.8 倍

( $p=0.0364$ )。

表 15. 抗體處理 16 週後整個切片的普魯士藍染色。顯示由正普魯士藍染色佔據的平均百分比面積、及整個切片的標準偏差及平均數的標準誤差。

給予的抗體	被分析的動物數目	平均數	標準偏差	標準誤差
抗-AMN	7	0.589	0.295	0.112
2H6	4	3.250	0.445	0.222
去醣化的2H6	5	1.050	0.143	0.064

給予去醣化 2H6 抗體後  $A\beta$  的血清濃度：如圖 9 中所示，給予 APP Tg2576 小鼠抗體 2H6 及去醣化 2H6 兩者顯著地增加  $\beta$ -澱粉狀蛋白胨肽之血清濃度。然而，在給予抗-AMN 抗體於 APP Tg2576 小鼠中或在給予抗-AMN 抗體或抗體 2H6 於野生型小鼠中  $\beta$ -澱粉狀蛋白胨肽之血清濃度無顯著增加。此指出可使用  $\beta$ -澱粉狀蛋白胨肽之血清濃度增加來幫助診斷 AD 及監測 AD 療法(如免疫治療)的反應。

### C. 結論

上述資料證實 1) 去醣化抗體 2H6 與完整抗體 2H6 一樣有效於倒轉 APP Tg2576 小鼠中的學習及記憶衰退；2) 去醣化抗體 2H6 比完整抗體 2H6 有些許減少效能於減少海馬迴及前葉皮質中的  $A\beta$  沉澱物，如由剛果紅染色測量，但一樣有效於減少海馬迴及前葉皮質中的  $A\beta$  量，如  $A\beta$  免疫染色測量；3) 由去醣化抗體 2H6 增加的海馬迴及前葉皮質血管中

的A $\beta$ 沉澱物(如由剛果紅染色測量)比完整2H6抗少許多；及4)如由普魯士藍染色測量的微出血在用去醣化2H6抗體處理的APP Tg2576小鼠中比用完整2H6抗體處理的小鼠低許多。此等資料建議去醣化的抗體為一樣有效於改善阿耳滋海默氏症適應症且APP Tg2576小鼠中具有較低微出血風險。

#### 實例5.不同抗體Fc區域對鼠及人類Fc $\gamma$ 受體及補體之結合親合力

利用上述BIAcore測量抗體Fc區域對Fc $\gamma$ 受體或補體之結合親合力。簡而言之，藉由胺化學，將純化的人類或鼠類Fc $\gamma$ 受體(來自R&D Systems)及人類C1q(來自Quidel)固定於BIAcore CM5晶片上。將單株抗體之連續稀釋(範圍為2 nM至如表16及17中指示的最高濃度)注入。HBS-EP(0.01M HEPES, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005%界面活性劑P20)作為運轉及樣品緩衝液。利用1:1蘭格默爾交互作用模型於高親合力交互作用，或穩定狀態親合力模型於低親合力交互作用分析結合數據。

下表16顯示抗- $\beta$ -澱粉狀蛋白抗體對鼠Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RIIb、Fc $\gamma$ RIII、及人類C1q(hC1q)之結合親合力，如由K<sub>D</sub>(nM)測量。去醣化的抗體具有去除的N-醣化之固定區域。9TL(hIgG1)及9TL(hIgG2 $\Delta$ a)具有相同可變區域(示於SEQ ID NO:1及SEQ ID NO:2)，但不同的固定區域。9TL(hIgG1)具有人類IgG1固定區域；及9TL(hIgG2 $\Delta$ a)具有A330P331成為S330S331(卡巴胺氨基酸編號參照野生型IgG2a

序列)之突變的人類hIgG2。如表16中所示，相較於無去除的N-醣化之各相對應抗體，去醣化的2H6、2294、及2286對所有受測的鼠類Fc $\gamma$ 受體具有降低的親合力。相較於2H6，去醣化的2H6也對人類補體有降低的親合力。9TL(hIgG1)對mFc $\gamma$ RIIb或mFc $\gamma$ RIII無顯著結合；及9TL(hIgG2 $\Delta$ a)對鼠類Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RIIb、Fc $\gamma$ RIII或hC1q任一者皆無顯著結合。

下表17顯示抗- $\beta$ -澱粉狀蛋白抗體對人類Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RIIb/c、Fc $\gamma$ RIIIb、及hC1q之結合親合力，如由K<sub>D</sub>(nM)測量。如表17中所示，9TL(hIgG2 $\Delta$ a)對人類Fc $\gamma$ RI或hC1q無顯著結合；及相較於具有人類IgG1固定區域的抗體對人類Fc $\gamma$ RIIb/c及Fc $\gamma$ RIIIb之親合力，9TL(hIgG2 $\Delta$ a)對此等分子具有顯著較低的親合力。

表16. 抗體對鼠類Fc $\gamma$ 受體及人類補體之結合親合力，如由K<sub>D</sub>(nM)測量

抗體	Fc $\gamma$ RI	Fc $\gamma$ RIIb	Fc $\gamma$ RIII	hC1q	同種型	結合至Fc $\gamma$ 受體測試的最大抗體濃度(nM)
2H6	1,800	76,000	133,000	5,000	鼠類IgG2b	49,000
去醣化2H6	5,600	NB	NB	30,000	去醣化鼠類IgG2b	17,000
2294	1,200	13,000	19,000		鼠類IgG2b	18,000
去醣化2294	8,600	NB	NB		去醣化鼠類IgG2b	22,000
2286	93	5,000	10,000		鼠類IgG1	12,000



去醣化2286	2,700	NB	NB		去醣化鼠類IgG1	9,300
9TL(hIgG1)	800	NB	NB	34	人類IgG1	30,000
9TL(hIgG2Δa)	NB	NB	NB	NB	人類IgG2Δa	30,000

NB：當以測試的最大濃度使用抗體時無顯著結合。

為結合至hC1q測試的最大抗體濃度為30,000 nM。

表 17. 抗體對人類Fcγ受體及人類補體之結合親合力，如由K<sub>D</sub>(nM)測量

抗體	FcγRI	FcγRIIb/c	FcγRIIIb	hC1q
9TL(hIgG1)	2.2	7,000	33,000	34
9TL(hIgG2Δa)	NB	61,000	>100,000	NB

NB：當以30 μM濃度使用抗體時無顯著結合。

為結合測試的最大抗體濃度為30,000 nM。

實例 6. 顱內給予後去醣化2H6抗體對微膠細胞活化、Fcγ受體結合、及澱粉狀蛋白清除之作用

手術程序及抗體之顱內給予：將19.5個月大的Tg2576基因轉殖小鼠分成三個族群，所有族群接受顱內注射進入前葉皮質及海馬迴。第一個族群在各區域接受濃度2微克/微升之抗Aβ抗體2H6。第二個族群在各區域接受濃度2微克/微升之去醣化2H6抗體。第三個族群接受針對果蠅遺忘症蛋白質之IgG作為完整IgG注射之非專一性控制組。手術後所有小鼠存活72小時。

手術當天，將小鼠(Tg2576基因轉殖小鼠)秤重，用異氟烷(Isoflurane)麻醉及置於立體定位儀(stereotaxic

apparatus)(51603 雙操控器實驗室標準, Stoelting, Wood Dale, IL)中。做正中矢狀切口(midsagittal incision)以露出頭蓋骨及利用牙科鑽頭在右前葉皮質及海馬迴上方以下列座標鑽兩個顱骨鑽孔：皮質：AP+1.5 mm, L -2.0 mm,海馬迴 AP-2.7 mm, L -2.5 mm,所有皆取自前窗。將連接至10微升Hamilton(Reno, NV)針筒的26號針頭降低腹側朝向前窗3 mm及在2分鐘期間注射2微升。用鹽水清潔切口及用手術釘縫合。

**組織準備：**在犧牲當天，將小鼠秤重、過量給予100毫克/公斤戊巴比妥(Pentobarbital)(寧必妥鈉鹽溶液, Abbott laboratories, North Chicago, IL)及用25毫升0.9%氯化鈉心臟內灌注，接著50毫升新鮮製備的4%三聚甲醛(pH 7.4)。快速地取出腦及浸沒固定24小時於新鮮製備的4%三聚甲醛中。而後將腦依序培養於10、20及30%蔗糖24小時以冰凍保護之。而後利用滑走切片機收集25微米厚的水平切片並於具有疊氮化鈉的DPBS緩衝液中4°C儲存以避免微生物生長。

將6至8個間隔大約100微米之切片選擇遍及注射位置及利用自由漂浮免疫組織化學法對總A $\beta$ (與A $\beta$ <sub>1-40</sub>及A $\beta$ <sub>1-42</sub>反應的兔抗血清；使用的稀釋1:10,000)、抗-CD45抗體(目錄編號 MCA1031G, Serotec, Raleigh NC；使用的稀釋1:5000)、及抗Fc $\gamma$ 受體(CD16/CD32)抗體(目錄編號553141, 來自BD Bioscience；使用為1:1,000稀釋)染色。對於抗-A $\beta$ 抗體染色，使用以1:3,000稀釋的生物素化羊-抗兔作為二

級抗體。對於抗-CD45及Fc $\gamma$ 受體抗體染色，使用以1:3,000稀釋的生物素化羊-抗大鼠作為二級抗體。為了免疫染色，將一些切片省略一級抗體以評估非專一性免疫組織化學反應。將相鄰切片置於載玻片上及利用4%硫黃素(thioflavine)-S(Sigma-Aldrich, St. Louis MO)染色10分鐘。應注意包含注射體積的切片為有限數量。

數據分析：利用錄影量測(videometric)V150影像分析系統(Oncor, San Diego, CA)在皮質及海馬迴的注射區域中及腦的對側上相對應的區域測量所有染色的切片上免疫組織化學反應產物。將數據呈現為A $\beta$ 染色、硫黃素-S染色、CD45染色、及Fc $\gamma$ 受體染色之注射的一邊比未注射的一邊之比例。將各注射位置以相對應的對側位置平均化減少動物間變化性的影響及允許用少量小鼠對藥物作用有可靠的量測。為了評估可能的處理相關的差異，將各處理族群的比例值利用StatView軟體5.0.1版(SAS Institute Inc., NC)藉ANOVA分析，接著用Fisher's LSD中數比較。

## 結果

如圖10中所示，在顱內給予去醣化2H6抗體後在前葉皮質及海馬迴中CD45染色與控制組抗體大約相同。相反地，在顱內給予2H6抗體後比控制組抗體在前葉皮質中CD45染色為顯著較高( $p < 0.01$ )及在海馬迴中CD45染色普遍較高。此指出，不像抗體2H6，給予去醣化2H6在給予後72小時不活化前葉皮質及海馬迴中的微膠細胞。

如圖11中所示，在顱內給予去醣化2H6抗體後在前葉皮

質及海馬迴中 FcγII 及 FcγIII 受體染色與控制組抗體大約相同。相反地，在顱內給予 2H6 抗體後比控制組抗體在前葉皮質及海馬迴中 Fcγ 受體染色為顯著較高 ( $p < 0.01$ )。此指出，不像抗體 2H6，給予去醣化 2H6 在給予後 72 小時不活化前葉皮質及海馬迴中的微膠細胞。

如圖 12 中所示，相較於控制組抗體，在顱內給予 2H6 抗體或去醣化 2H6 抗體後 72 小時在前葉皮質及海馬迴中 Aβ 染色為較低。如圖 13 中所示，相較於控制組抗體，在顱內給予 2H6 抗體或去醣化 2H6 抗體後 72 小時在前葉皮質及海馬迴中硫黃素-S 染色的緊密斑也為較低。

此等數據指出去醣化 2H6 抗體能夠降低前葉皮質及海馬迴中的 Aβ 及緊密斑而不引發微膠細胞活化及發炎反應。

#### 實例 7. Aβ 胜肽上抗體 2294 結合的抗原決定區之定性

抗體 2294 為用 Aβ<sub>1-40</sub> 接種小鼠產生的鼠類抗體。此抗體係說明於美國專利 US 2004/0146512 及世界專利 WO 04/032868。

利用如上述的 Biacore 測量抗體 2294 對 Aβ<sub>1-40</sub>、Aβ<sub>1-42</sub>、或 Aβ<sub>1-43</sub> 之結合親合力。下表 18 顯示抗體 2294 Fab 片段對不同 Aβ 胜肽之親合力。

表 18. 抗體 2294 Fab 片段之結合親合力

	$k_{on}(1/Ms)$	$k_{off}(1/s)$	$K_D(nM)$
生物素化的 Aβ <sub>1-40</sub> 固定於鏈親合素晶片上，2294 Fab 流動到其上	$6.6 \times 10^4$	$3.95 \times 10^{-4}$	6
生物素化的 Aβ <sub>1-42</sub> 固定於鏈親合素	$1.1 \times 10^4$	$4.87 \times 10^{-3}$	400

晶片上，2294 Fab流動到其上			
生物素化的A $\beta$ <sub>22-37</sub> 固定於鏈親合素晶片上，2294 Fab流動到其上	$5 \times 10^3$	0.049	10,000

藉由ELISA分析法進行抗體2294的抗原決定區製圖。將生物素化的不同A $\beta$ 胜肽之15-員或10-員(此等胜肽具有甘胺酸加至C-末端)固定於鏈親合素塗佈的盤上。將NUNC maxisorp盤於4°C用6微克/毫升鏈親合素(Pierce, 21122)於PBS pH 7.4塗佈超過1小時。將盤用1% BSA於PBS緩衝液pH 7.4阻斷。清洗後，將生物素化的A $\beta$ 胜肽於PBS pH7.4中於室溫培養1小時。將一級抗體(來自細胞上層清液、含抗-A $\beta$ 抗體之血清、或以理想稀釋之純化的全抗體或Fab)與固定的A $\beta$ 胜肽於室溫培養1小時。清洗後，將盤與以1:5000稀釋之二級抗體(HRP連結的羊抗-人 $\kappa$ 鏈抗體(MP Biomedicals, 55233))培養。清洗後，藉由加入TMB受質(KPL, 50-76-02, 50-65-02)測量結合的二級抗體。藉由加入1M磷酸停止HRP反應及測量在450 nm吸收度。如圖14中所示，抗體2294結合至具有胺基酸20-34、21-35、22-36、23-37、24-38、25-39、26-40、及25-34與甘胺酸於C端的A $\beta$ 胜肽；但不結合至具有胺基酸19-33、27-41、24-33、及27-35與甘胺酸於此等胜肽的C端之A $\beta$ 胜肽。此建議抗體2294結合之抗原決定區包括由26至34之胺基酸。

為了進一步決定A $\beta$ 胜肽上由抗體2294辨認的抗原決定區，使用ELISA結合分析。將不同的A $\beta$ 胜肽(Global Peptide Services, CO)固定於ELISA盤上。如上述藉EILSA

決定2294完整抗體(以20 nM)結合至固定的A $\beta$ 。抗體2294結合至A $\beta$ 胜肽17-40、17-42、28-40、1-38、1-40、1-42、及1-43。抗體2294不結合至A $\beta$ 胜肽1-16、1-28、28-42、22-35、及33-40。因此，抗體2294結合至不同截短的A $\beta$ 胜肽的C端，例如1-38、1-40、1-42、及1-43。

下表19顯示由Biacore分析法測量的2294至A $\beta$ <sub>1-40</sub>與其他A $\beta$ 胜肽之結合比較。與其他胜肽比較，抗體2294(完整抗體)對A $\beta$ <sub>1-40</sub>具有最強結合，顯著較低結合至截短的A $\beta$ <sub>1-40</sub>(如1-36、1-37、1-38、及1-39)、A $\beta$ <sub>1-42</sub>及A $\beta$ <sub>1-43</sub>。此指出A $\beta$ 的胺基酸40(纈胺酸(Valine))之側鏈或骨架涉及2294對A $\beta$ <sub>1-40</sub>的結合；及在此胺基酸不存在時結合顯著降低。

表 19

A $\beta$ 胜肽片段	結合
1-28	-
1-43	-
22-35	-
1-36	+
1-37	+
1-38	++
1-39	++
17-42	+++
1-42	+++
17-40	++++
1-40	++++

「-」代表無結合；「+」代表非常低結合；「++」代表中等結合；「+++」代表強結合；及「++++」代表非常強結合。

基於上述數據，抗體2294結合的抗原決定區似乎包括胺基酸26-34及40。抗體2294結合至非常類似於美國臨時專利申請案第60/676,093號中所述之抗體6G的抗原決定區(將此抗體的胺基酸及核酸序列示於SEQ ID NO:36-39；編碼6G的載體係於2005年6月15日寄存於ATCC，其登錄號為PTA-6786及PTA-6787)。抗體2294及6G之抗原決定區比較也示於圖14中。然而，抗體6G以11 nM之 $K_D$ 結合至 $A\beta_{22-37}$ ；但2294以10  $\mu$ M之 $K_D$ 結合至 $A\beta_{22-37}$ 。

如實例3所述利用Biacore分析法進行2294、6G、2H6、及2289之間的抗體競爭實驗。利用Biacore分析法進行競爭實驗。將抗體2294、6G、2H6、及2289固定於CM5晶片的不同通道上。根據供應商的使用說明將CM5晶片通道用N-乙基-N'-(3-二甲基胺基丙基)-碳化二亞胺鹽酸鹽(EDC, N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride)及N-羥基琥珀硫亞胺(NHS, N-hydroxysuccinimide)活化。將抗體2294、6G、2H6、及2289各稀釋入10 mM醋酸鈉pH 4.0及以0.005毫克/毫升之濃度注入活化的晶片上。將各通道用乙醇胺阻斷。將 $A\beta_{1-40}$ 胜肽(150  $\mu$ M)流至晶片上2分鐘。而後將抗體2294(欲測試結合競爭者)以0.6  $\mu$ M至晶片上1分鐘。於所有Biacore分析法中使用HBS-EP緩衝液(0.01M HEPES, pH 7.4, 0.15 M

NaCl, 3 mM EDTA, 0.005%界面活性劑P20)作為運轉緩衝液。在測量 $A\beta_{1-40}$ 的結合後，藉由用Pierce沖提緩衝液(產品編號21004, Pierce Biotechnology, Rockford, IL)及4M NaCl(2:1)之混合物清洗6秒2次再生晶片的所有通道。而後對抗體6G、2H6、及而後抗體2289進行競爭結合。觀察到2294及6G之間及2294及2H6之間對 $A\beta_{1-40}$ 結合之競爭，但未觀察到2294及2289之間或6G及2289之間的競爭。觀察固定的抗體及流至晶片上相同的抗體之間的競爭作為正控制組。資料指出抗體2294與2H6及6G競爭結合至 $A\beta_{1-40}$ 。

**實例8.於阿耳滋海默氏症的動物模型中去醣化的抗體2294降低 $A\beta$ 沉澱物及知能之作用**

藉由於37°C將純化的抗體2294與胜肽-N-糖苷酶F(Prozyme, 每毫克抗體0.05U)於20 mM Tris-HCl pH 8.0培養7天而製備去醣化的抗體2294。由MALDI-TOF-MS及蛋白質膠體電泳證實完全去醣化。將去醣化的抗體用蛋白質A層析法純化及將內毒素藉Q-瓊脂糖凝膠去除。利用上述Biacore分析法測試去醣化的2294對 $A\beta_{1-40}$ 的結合親合力，及發現2294對 $A\beta_{1-40}$ 的結合親合力相同於完整抗體2294。

為了測試去醣化抗體2294對逆轉知能衰退、組織學的症狀、及微出血的作用，如實例4中所述於基因轉殖小鼠APP Tg2567中測試抗體2294及去醣化2294。為了16週處理研究，將APP-基因轉殖的小鼠(20週大)分成四群。第一群每週腹膜內接受抗-A $\beta$ 抗體2294注射16週期間(n=4)。第二群



每週腹膜內接受去糖化抗-A $\beta$ 抗體 2294 注射 16 週期間 (n=5)。第三群每週腹膜內接受抗-AMN 抗體 2H6(2906；小鼠單株抗-果蠅遺忘症蛋白質 IgG1) 注射 16 週期間 (n=6)。同窩出生非基因轉殖鼠用抗-AMN 抗體 (n=4) 或 2294 (n=2) 處理 16 週。

如實例 4 中所述進行組織學分析。

應知本文中所說明的實例及實施例僅為舉例的目的，熟悉本技藝者將建議按照其作許多修改或變化，其將包括於本申請案的精神及權限範圍內。將所有本文中引用的文獻、專利及專利申請案為所有目的以參考資料併於本文中，該引用的程度就如同以特定地及個別地將各個獨立的文獻、專利或專利申請案以引用的方式併入一般。

#### 生物材料之寄存

下列材料已寄存於美國菌種中心(ATCC, American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, USA)：

材料	抗體編號	ATCC 登錄號	寄存日期
pDb.9TL.hFc2a	9TL 重鏈	PTA-6124	2004 年 7 月 20 日
pEb.9TL.hK	9TL 輕鏈	PTA-6125	2004 年 7 月 20 日
pDb.6G.hFc2a	6G 重鏈	PTA-6786	2005 年 6 月 15 日
pEb.6G.hK	6G 輕鏈	PTA-6787	2005 年 6 月 15 日

載體 pEb.9TL.hK 為編碼 9TL 輕鏈可變區域及輕鏈  $\kappa$  固定區域的多核苷酸；及載體 pDb.9TL.hFc2a 為編碼 9TL 重鏈可

變區域及含有下列突變 A330P331 成為 S330S331 (胺基酸編號參照野生型 IgG2a 序列；見 Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624) 之重鏈 IgG2a 固定區域的多核苷酸。

載體 pEb.6G.hK 為編碼 6G 輕鏈可變區域及輕鏈  $\kappa$  固定區域的多核苷酸；及載體 pDb.6G.hFc2a 為編碼 6G 重鏈可變區域及含有下列突變 A330P331 成為 S330S331 (胺基酸編號參照野生型 IgG2a 序列；見 Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624) 之重鏈 IgG2a 固定區域的多核苷酸。

此等寄存係基於微生物有機體保存專利程序之國際認可布達佩斯協定 (Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure and the Regulations thereunder (Budapest Treaty)) 之規定。此保證自寄存之日始 30 年維持寄存可存活的培養物。在布達佩斯協定條款下可由 ATCC 辦理寄存，及受到 Rinat Neuroscience 公司及 ATCC 之間的協議之管制，其保證在相關美國專利發佈時或在向大眾公開任何美國或外國專利申請案 (無論哪個先) 時，大眾永久及無限制可取得寄存培養的子代，及保證由美國專利及商標委員決定根據 35 USC 第 122 條及根據其的委員規定 (包括 37 CFR 第 1.14 條，其中特別參照 886 OG 638) 命名者之子代的可得性。

本專利申請案的受讓人已同意當在適當的條件下培養若寄存的材料之培養物應死亡或失去或被摧毀，將在通知時立即將材料用相同的另一者替換。不應將寄存的材料之可

得性視為違反任何政府根據其專利法的職權下承認的權力而實行本發明的許可。

### 抗體序列

#### 9TL重鏈可變區域胺基酸序列(SEQ ID NO:1)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYYTEAYYIHWVRQAPGQ  
GLEWMGRIDPATGNTKYAPRLQDRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRS  
EDTAVYYCASLYSLPVYWGQGTTVTVSS

#### 9TL輕鏈可變區域胺基酸序列(SEQ ID NO:2)

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLYSDAKTYLNWFQQRP  
GQSPRRLIYQISRLDPGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY  
YCLQGTHYPVLFQGGTRLEIKRT

#### 9TL CDR H1(延伸的CDR)(SEQ ID NO:3)

GYYTEAYYIH

#### 9TL CDR H2(延伸的CDR)(SEQ ID NO:4)

RIDPATGNTKYAPRLQD

#### 9TL CDR H3(延伸的CDR)(SEQ ID NO:5)

LYSLPVY

#### 9TL CDR L1(延伸的CDR)(SEQ ID NO:6)

KSSQSLLYSDAKTYLN

#### 9TL CDR L2(延伸的CDR)(SEQ ID NO:7)

QISRLDP

#### 9TL CDR L3(延伸的CDR)(SEQ ID NO:8)

LQGTHYPVL

#### 9TL重鏈可變區域核苷酸序列(SEQ ID NO:9)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGTGCTGAGGTGAAGAAGCCTG  
 GCGCTTCCGTGAAGGTTTCCTGCAAAGCATCTGGTTACTATACG  
 GAGGCTTACTATATCCACTGGGTGCGCCAAGCCCCTGGTCAAGG  
 CCTGGAGTGGATGGGCAGGATTGATCCTGCGACTGGTAATACTA  
 AATATGCCCCGAGGTTACAGGACCGGGTGACCATGACTCGCGAT  
 ACCTCCACCAGCACTGTCTACATGGAACTGAGCTCTCTGCGCTC  
 TGAGGACACTGCTGTGTATTACTGTGCCTCCCTTTATAGTCTCCC  
 TGTCTACTGGGGCCAGGGTACCACTGTTACCGTGTCCTCT

● 9TL輕鏈可變區域核苷酸序列(SEQ ID NO:10)

GATGTTGTGATGACCCAGTCCCCACTGTCTTTGCCAGTTACCCT  
 GGGACAACCAGCCTCCATATCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCT  
 TATATAGTGATGCCAAGACATATTTGAATTGGTTCCAACAGAGGC  
 CTGGCCAGTCTCCACGCCGCCTAATCTATCAGATTTCCCGGCTG  
 GACCCTGGCGTGCCTGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCA  
 CAGATTTTACACTTAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAAGATGTG  
 GGAGTTTATTACTGCTTACAAGGTACACATTATCCGGTGCTCTTC  
 ● GGTCAAGGGACCCGCCTGGAGATCAAACGCACT

9TL重鏈完整抗體胺基酸序列(包括如本文中所述經改質的  
 IgG2a)(SEQ ID NO:11)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYYTEAYYIHWVRQAPGQ  
 GLEWMGRIDPATGNTKYAPRLQDRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRS  
 EDTAVYYCASLYSLPVYWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRST  
 SESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS  
 LSSVVTVPSSNFGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKTVERKCCVECPC

PAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFN  
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEY  
 KCKVSNKGLPSSIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL  
 TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLT  
 VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

**9TL輕鏈完整抗體胺基酸序列 (SEQ ID NO:12)**

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLYSDAKTYLNWFQQRP  
 GQSPRRLIYQISRLDPGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY  
 YCLQGTHYPVLFQGGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV  
 VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS  
 STLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

**9TL重鏈完整抗體核苷酸序列 (包括如本文中所述經改質的  
 IgG2a)(SEQ ID NO:13)**

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGTGCTGAGGTGAAGAAGCCTG  
 GCGCTTCCGTGAAGGTTTCCTGCAAAGCATCTGGTTACTATACG  
 GAGGCTTACTATATCCACTGGGTGCGCCAAGCCCCTGGTCAAGG  
 CCTGGAGTGGATGGGCAGGATTGATCCTGCGACTGGTAATACTA  
 AATATGCCCCGAGGTTACAGGACCGGGTGACCATGACTCGCGAT  
 ACCTCCACCAGCACTGTCTACATGGAAGTGAAGCTCTCTGCGCTC  
 TGAGGACACTGCTGTGTATTACTGTGCCTCCCTTTATAGTCTCCC  
 TGTCTACTGGGGCCAGGGTACCACTGTTACCGTGTCCCTCTGCCT  
 CCACCAAGGGCCCATCTGTCTTCCCACTGGCCCCATGCTCCCGC  
 AGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGG  
 ACTACTTCCCAGAACCTGTGACCGTGTCCCTGGAAGTCTGGCGCT

CTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTGCAGTCCTC  
AGGTCTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCATCCAGCA  
ACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCC  
AAGCAACACCAAGGTCGACAAGACCGTGGAGAGAAAGTGTTG  
TGTGGAGTGTCCACCTTGTCCAGCCCCTCCAGTGGCCGGACCAT  
CCGTGTTCTGTTCCTCCAAAGCCAAAGGACACCCTGATGATC  
TCCAGAACCCAGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCC  
ACGAGGACCCAGAGGTGCAGTTCAACTGGTATGTGGACGGAGT  
GGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCAAGAGAGGAGCAGTT  
CAACTCCACCTTCAGAGTGGTGAGCGTGCTGACCGTGGTGCAC  
CAGGACTGGCTGAACGGAAAGGAGTATAAGTGTAAGGTGTCCA  
ACAAGGGACTGCCATCCAGCATCGAGAAGACCATCTCCAAGAC  
CAAGGGACAGCCAAGAGAGCCACAGGTGTATACCCTGCCCCCA  
TCCAGAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTC  
TGGTGAAGGGATTCTATCCATCCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG  
TCCAACGGACAGCCAGAGAACA ACTATAAGACCACCCCTCCAA  
TGCTGGACTCCGACGGATCCTTCTTCTGTATTCCAAGCTGACC  
GTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGAAACGTGTTCTCTTGTT  
CCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTATAACCAGAAGAG  
CCTGTCCCTGTCTCCAGGAAAGTAATTCTAGA

9TL輕鏈完整抗體核苷酸序列 (SEQ ID NO:14)

GATGTTGTGATGACCCAGTCCCCACTGTCTTTGCCAGTTACCCT  
GGGACAACCAGCCTCCATATCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCT  
TATATAGTGATGCCAAGACATATTTGAATTGGTTCCAACAGAGGC

CTGGCCAGTCTCCACGCCGCCTAATCTATCAGATTTCCCGGCTG  
 GACCCTGGCGTGCCTGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCA  
 CAGATTTTACACTTAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAAGATGTG  
 GGAGTTTATTACTGCTTACAAGGTACACATTATCCGGTGCTCTTC  
 GGTC AAGGGACCCGCCTGGAGATCAAACGCACTGTGGCTGCAC  
 CATCTGTCTTCATCTTCCCTCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCCG  
 GAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCACGC  
 GAGGCCAAAGTACAGTGG AAGGTGGATAACGCCCTCCAATCCG  
 GTA ACTCCCAGGAGAGTGT CACAGAGCAGGACAGCAAGGACA  
 GCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAAGCAGA  
 CTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAG  
 GGCCTGAGTTCTCCAGTCACAAAGAGCTTCAACCGCGGTGAGT  
 GCTAATTCTAG

**6G 重鏈可變區域胺基酸序列 (SEQ ID NO:26)**

QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTTYAIHWVRQAPGQG  
 LEWMGFTSPYSGVSNYNQKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRS  
 EDTAVYYCARFDNYDRGYVRDYWGQGTLVTVS

**6G 輕鏈可變區域胺基酸序列 (SEQ ID NO:27)**

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDNDRISFLN WYQQKPGQ  
 PPKLLIYAATKQGTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYC  
 QQSKEFPWSFGGGTKVEIKRTV

**6G CDR H1(延伸的 CDR)(SEQ ID NO:28)**

GYTFTTYAIH

**6G CDR H2(延伸的 CDR)(SEQ ID NO:29)**

FTSPYSGVSNYNQKFKG

**6G CDR H3(延伸的 CDR)(SEQ ID NO:30)**

FDNYDRGYVRDY

**6G CDR L1(延伸的 CDR)(SEQ ID NO:31)**

RASESVDNDRISFLN

**6G CDR L2(延伸的 CDR)(SEQ ID NO:32)**

AATKQGT

**6G CDR L3(延伸的 CDR)(SEQ ID NO:33)**

QQSKEFPWS

**6G 重鏈可變區域核苷酸序列 (SEQ ID NO:34)**

CAGGTGCAACTGGTGCAATCCGGTGCCGAGGTGAAAAAGCCAG  
 GCGCCTCCGTGAAAGTGTCTGCAAAGCCTCCGGTTACACCTTT  
 ACCACCTATGCCATCCATTGGGTGCGCCAGGCCCCAGGCCAGGG  
 TCTGGAGTGGATGGGCTTTACTTCCCCCTACTCCGGGGTGTCGA  
 ATTACAATCAGAAGTTCAAAGGCCGCGTCACCATGACCCGCGA  
 CACCTCCACCTCCACAGTGTATATGGAGCTGTCCTCTCTGCGCT  
 CCGAAGACACCGCCGTGTATTACTGTGCCCGCTTCGACAATTAC  
 GATCGCGGCTATGTGCGTGACTATTGGGGCCAGGGCACCCTGGT  
 CACCGTCTCC

**6G 輕鏈可變區域核苷酸序列 (SEQ ID NO:35)**

GACATCGTGATGACCCAGTCCCCAGACTCCCTGGCCGTGTCCCT  
 GGGCGAGCGCGCCACCATCAACTGCCGCGCCAGCGAATCCGTG  
 GATAACGATCGTATTTCTTTCTGAACTGGTACCAGCAGAAACC  
 AGGCCAGCCTCCTAAGCTGCTCATTTACGCCGCCACCAAACAGG



GTACCGGCGTGCCTGACCGCTTCTCCGGCAGCGGTTCCGGCAC  
 CGATTTCACTCTGACCATCTCCTCCCTGCAGGCCGAAGATGTGG  
 CAGTGTATTACTGTCAGCAGTCCAAAGAGTTTCCCTGGTCCTTT  
 GGCGGTGGCACCAAGGTGGAGATCAAACGCACTGTG

**6G重鏈完整抗體胺基酸序列(包括如本文中所述經改質的  
 IgG2a)(SEQ ID NO:36)**

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYAIHWVRQAPGQG  
 LEWMGFTSPYSGVSNYNQKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRS  
 EDTAVYYCARFDNYDRGYVRDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPL  
 APCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVL  
 QSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKC  
 CVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE  
 DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQD  
 WLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREE  
 MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDG  
 SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

**6G輕鏈完整抗體胺基酸序列(SEQ ID NO:37)**

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDNDRISFLNWFYQQKPGQ  
 PPKLLIYAATKQGTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC  
 QQSKEFPWSFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC  
 LLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTL  
 TLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

**6G重鏈完整抗體核苷酸序列(包括如本文中所述經改質的  
 IgG2a)(SEQ ID NO:38)**

CAGGTGCAACTGGTGCAATCCGGTGCCGAGGTGAAAAAGCCAG  
GCGCCTCCGTGAAAGTGTCTGCAAAGCCTCCGGTTACACCTTT  
ACCACCTATGCCATCCATTGGGTGCGCCAGGCCCCAGGCCAGGG  
TCTGGAGTGGATGGGCTTTACTTCCCCCTACTCCGGGGTGTCTGA  
ATTACAATCAGAAGTTCAAAGGCCGCGTCACCATGACCCGCGA  
CACCTCCACCTCCACAGTGTATATGGAGCTGTCCTCTCTGCGCT  
CCGAAGACACCGCCGTGTATTACTGTGCCCGCTTCGACAATTAC  
GATCGCGGCTATGTGCGTGACTATTGGGGCCAGGGCACCCTGGT  
CACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCTGTCTTCCCAC  
TGGCCCCATGCTCCCGCAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCT  
GGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCAGAACCTGTGACCGTG  
TCCTGGAACTCTGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGACACACCTTCCC  
AGCTGTCCTGCAGTCCTCAGGTCTCTACTCCCTCAGCAGCGTGG  
TGACCGTGCCATCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGC  
AACGTAGATCACAAGCCAAGCAACACCAAGGTCGACAAGACCG  
TGGAGAGAAAGTGTTGTGTGGAGTGTCCACCTTGTCCAGCCCC  
TCCAGTGGCCGGACCATCCGTGTTCTGTTCCCTCCAAAGCCAA  
AGGACACCCTGATGATCTCCAGAACCCAGAGGTGACCTGTGT  
GGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGACCCAGAGGTGCAGTTCAAC  
TGGTATGTGGACGGAGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGC  
CAAGAGAGGAGCAGTTCAACTCCACCTTCAGAGTGGTGAGCGT  
GCTGACCGTGGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGAAAGGAGTAT  
AAGTGTAAGGTGTCCAACAAGGGACTGCCATCCAGCATCGAGA  
AGACCATCTCCAAGACCAAGGGACAGCCAAGAGAGCCACAGG

TGTATACCCTGCCCCATCCAGAGAGGAGATGACCAAGAACCA  
GGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGATTCTATCCATCCGACA  
TCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAACGGACAGCCAGAGAACAATA  
TAAGACCACCCCTCCAATGCTGGACTCCGACGGATCCTTCTTCC  
TGTATTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGG  
AAACGTGTTCTCTTGTTCGGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACC  
ACTATACCCAGAAGAGCCTGTCCCTGTCTCCAGGAAAG

**6G輕鏈完整抗體核苷酸序列(SEQ ID NO:39)**

GACATCGTGATGACCCAGTCCCCAGACTCCCTGGCCGTGTCCCT  
GGGCGAGCGCGCCACCATCAACTGCCGCGCCAGCGAATCCGTG  
GATAACGATCGTATTTCTTTCTGAACTGGTACCAGCAGAAACC  
AGGCCAGCCTCCTAAGCTGCTCATTACGCCGCCACCAAACAGG  
GTACCGGCGTGCCTGACCGCTTCTCCGGCAGCGGTTCCGGCAC  
CGATTTCACTCTGACCATCTCCTCCCTGCAGGCCGAAGATGTGG  
CAGTGTATTACTGTCAGCAGTCCAAAGAGTTTCCCTGGTCCTTT  
GGCGGTGGCACCAAGGTGGAGATCAAACGCACTGTGGCTGCAC  
CATCTGTCTTCATCTTCCCTCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCCG  
GAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCACGC  
GAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCCG  
GTA ACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACA  
GCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAAGCAGA  
CTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAG  
GGCCTGAGTTCTCCAGTCACAAAGAGCTTCAACCGCGGTGAGT  
GC

**【圖式簡單說明】**

圖 1 顯示 9TL 抗體之重鏈可變區域 (SEQ ID NO:1) 及輕鏈可變區域 (SEQ ID NO:2) 之胺基酸序列。卡巴 CDRs 為粗體字，而裘蒂艾 CDRs 為下底線。將重鏈及輕鏈可變區域之胺基酸殘基依序編號。

圖 2 顯示由胜肽競爭之抗體 9TL 抗原決定區圖譜分析。將  $A\beta_{1-40}$  胜肽固定在 SA 晶片上。單株抗體 2289 及 9TL Fab 片段 (各 50 nM)，將其各與 10  $\mu$ M 不同胜肽 ( $A\beta$  的胺基酸 28-40、1-40、1-28、28-42、22-35、1-16、1-43、33-40、1-38、或 17-40) 或無胜肽預先培養 1 小時，及而後流至晶片上。測量結合至固定的  $A\beta_{1-40}$  胜肽之抗體 Fab 片段。

圖 3 為顯示由胜肽競爭之抗體 2H6 抗原決定區圖譜分析之圖表。將  $A\beta_{1-40}$  胜肽固定在 SA 晶片上。單株抗體 2289、2286、及 2H6 片段 (各 100 nM)，將其各與 16  $\mu$ M 不同胜肽 ( $A\beta$  的胺基酸 1-16、1-28、1-38、1-40、1-42、1-43、17-40、17-42、22-35、25-35、或 33-40) 或無胜肽預先培養 1 小時，將其流至晶片上。測量結合至固定的  $A\beta_{1-40}$  胜肽之抗體。

圖 4 為顯示抗體 2H6、2286、及 2289 結合至不同  $A\beta$  胜肽 C 端變體的圖表。將 GST- $A\beta$  變體 (M35A、V36A、G37A、G38A、V39A、或 V40A)、或 GST- $A\beta$  胜肽 1-39、1-41、1-40、1-42 固定於 ELISA 盤上。將單株抗體 2286、2H6、或 2289 (各 mAb 0.3 nM) 與各固定的胜肽培養，及藉由與生物素抗-小鼠 IgG(H+L) 及隨後鏈親合素 (Streptavidin)-HRP 培

養偵測其結合。

圖 5 為顯示在用 2H6 及去醣化 2H6 抗體治療 16 週後倒轉 APP-基因轉殖鼠中空間學習缺陷之圖表。將小鼠於放射狀水迷宮之兩天版中測試。Y 軸代表在 2 天試驗期間做錯的平均數。方塊數目 1-5 代表第 1 天中的測試；而方塊數目 6-10 代表第 2 天中的測試。「\*」代表當與抗-AMN 抗體處理的小鼠 (A-AMN) 比較，對 2H6 (A-2H6) 及去醣化的 2H6 (A-De-2H6) 兩者處理的小鼠  $p < 0.05$ 。「\*\*」代表當與抗-AMN 抗體處理的小鼠 (A-AMN) 比較，對 2H6 (A-2H6) 及去醣化的 2H6 (A-De-2H6) 兩者處理的小鼠  $p < 0.01$ 。

圖 6A 及 6B 為圖表，顯示在用 2H6、抗-AMN(稱為 AMN)、及去醣化 2H6(稱為 D-2H6) 抗體之 16 週抗體處理後在海馬迴 (hippocampus)(圖 6B) 及前葉皮質 (frontal cortex) (圖 6A) 中實質剛果紅染色的澱粉狀蛋白- $\beta$  胜肽之減少。於圖 6A 及 6B 中的 Y 軸代表對剛果紅染色陽性的面積百分比之平均。於圖 6A 及 6B 中的 X 軸代表給予的抗體類型。

圖 7A 及 7B 為圖表，顯示在用 2H6、抗-AMN(稱為 AMN)、及去醣化 2H6(稱為 D-2H6) 抗體之 16 週抗體處理後在海馬迴(圖 7A) 及前葉皮質(圖 7B) 中血管剛果紅染色的澱粉狀蛋白- $\beta$  胜肽之增加。於圖 7A 及 7B 中的 Y 軸代表對剛果紅染色陽性的面積百分比之平均。於圖 7A 及 7B 中的 X 軸代表給予的抗體類型。

圖 8 為圖表，顯示在用 2H6、抗-AMN(稱為 AMN)、及去醣化 2H6(稱為 D-2H6) 抗體之 16 週抗體處理後普魯士藍陽性

外觀的數目。Y軸代表每個切片之陽性外觀。X軸代表給予的抗體類型。

圖9為圖表，顯示在給予APP Tg2576小鼠抗-AMN抗體(稱為AMN)、抗體2H6(稱為2H6)、去醣化2H6(稱為2H6-D)後，及給予野生型(WT)小鼠抗-AMN抗體及抗體2H6後，A $\beta$ 胜肽之血清含量。

圖10顯示頭蓋骨內給予2H6抗體(A)或去醣化2H6抗體(B)後於小鼠海馬迴中CD45之免疫染色。下圖顯示在頭蓋骨內給予控制組抗體、2H6抗體、或去醣化2H6抗體後於前葉皮質及海馬迴中被注射的一邊比未注射的一邊之受CD45陽性染色佔據的平均面積之比例。「\*\*」代表當相較於控制組抗體P<0.01。

圖11顯示頭蓋骨內給予2H6抗體(A)或去醣化2H6抗體(B)後於小鼠海馬迴中Fc $\gamma$ 受體之免疫染色。下圖顯示在頭蓋骨內給予控制組抗體、2H6抗體、或去醣化2H6抗體後於前葉皮質及海馬迴中被注射的一邊比未注射的一邊之受Fc $\gamma$ 受體陽性染色佔據的平均面積之比例。「\*\*」代表當相較於控制組抗體P<0.01。

圖12顯示頭蓋骨內給予2H6抗體(A)或去醣化2H6抗體(B)後於小鼠海馬迴中A $\beta$ 胜肽之免疫染色。下圖顯示在頭蓋骨內給予控制組抗體、2H6抗體、或去醣化2H6抗體後於前葉皮質及海馬迴中被注射的一邊比未注射的一邊之受A $\beta$ 陽性染色佔據的平均面積之比例。「\*\*」代表當相較於控制組抗體P<0.01。「\*」代表當相較於控制組抗體P<0.05。

圖 13 顯示頭蓋骨內給予 2H6 抗體 (A) 或去醣化 2H6 抗體 (B) 後於小鼠海馬迴中的硫黃素-S(thioflavine-S)。下圖顯示在頭蓋骨內給予控制組抗體、2H6 抗體、或去醣化 2H6 抗體後於前葉皮質及海馬迴中被注射的一邊比未注射的一邊之受硫黃素-S 陽性染色佔據的平均面積之比例。「\*\*」代表當相較於控制組抗體  $P < 0.05$ 。

圖 14 為顯示藉 ELISA 抗原決定區圖譜分析抗體 2294 及 6G 的圖表。將不同的 A $\beta$  胜肽固定於 ELISA 盤上。將抗體與此不同的固定胜肽培養 1 小時。利用山羊抗人類  $\kappa$ HRP 連結的二級抗體測量結合至固定的 A $\beta$  胜肽之抗體 6G。利用結合至重及輕鏈兩者及為 HRP 連結的二級抗體之山羊抗小鼠測量結合至固定的 A $\beta$  胜肽之抗體 2294。「NB」意指未偵測到結合。在「2294」及「6G」下的縱列中數字代表於 450 nm 的吸收。

## 序列表

<110> 美商雷那特神經科學股份有限公司

<120> 抗澱粉狀蛋白-β胜肽之抗體及其使用方法

<130> 514712002341

<140> 094126072

<141> 2005-08-01

<150> US 60/676,093

<151> 2005-04-29

<150> US 60/653,197

<151> 2005-02-14

<150> US 60/592,494

<151> 2004-07-30

<160> 53

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 1

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1			5						10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Thr	Glu	Ala	Tyr
			20					25					30		
Tyr	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35				40						45			
Gly	Arg	Ile	Asp	Pro	Ala	Thr	Gly	Asn	Thr	Lys	Tyr	Ala	Pro	Arg	Leu
	50					55					60				
Gln	Asp	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Val	Tyr
65					70				75					80	
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Ser	Leu	Tyr	Ser	Leu	Pro	Val	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val
			100					105						110	
Thr	Val	Ser	Ser												
			115												

<210> 2

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工序列



&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成構築體

&lt;400&gt; 2

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

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成構築體

&lt;400&gt; 3

Gly Tyr Tyr Thr Glu Ala Tyr Tyr Ile His  
 1 5 10

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成構築體

&lt;400&gt; 4

Arg Ile Asp Pro Ala Thr Gly Asn Thr Lys Tyr Ala Pro Arg Leu Gln  
 1 5 10 15  
 Asp

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成構築體

<400> 5  
 Leu Tyr Ser Leu Pro Val Tyr  
 1 5

<210> 6  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成構築體

<400> 6  
 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Asp Ala Lys Thr Tyr Leu Asn  
 1 5 10 15

<210> 7  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成構築體

<400> 7  
 Gln Ile Ser Arg Leu Asp Pro  
 1 5

<210> 8  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成構築體

<400> 8  
 Leu Gln Gly Thr His Tyr Pro Val Leu  
 1 5

<210> 9  
 <211> 348  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成構築體

<400> 9  
 caggtgcagc tgggtgcagtc tgggtgctgag gtgaagaagc ctggcgcttc cgtgaaggtt 60  
 tcttgcaaag catctgggta ctatacggag gcttactata tccactgggt gcgccaagcc 120  
 cctgggtcaag gcctggagtg gatgggcagg attgatcctg cgactggtaa tactaaatat 180  
 gccccgaggt tacaggaccg ggtgaccatg actcgcgata cctccaccag cactgtctac 240  
 atggaactga gctctctgcg ctctgaggac actgctgtgt attactgtgc ctccctttat 300

agtctccctg tctactgggg ccagggtacc actggtaccg tgtcctct

348

<210> 10  
 <211> 342  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成構築體

<400> 10  
 gatgttgtga tgaccagtc cccactgtct ttgccagtta ccctgggaca accagcctcc 60  
 atatcttgca agtcaagtc gagcctctta tatagtgatg ccaagacata tttgaattgg 120  
 ttccaacaga ggcctggcca gtctccacgc cgcctaactc atcagatttc cgggctggac 180  
 cctggcgtgc ctgacaggtt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac acttaaaatc 240  
 agcagagtgg aggctgaaga tgtgggagtt tattactgct tacaaggtac acattatccg 300  
 gtgctcttcg gtcaaggagc cgcctggag atcaaacgca ct 342

<210> 11  
 <211> 442  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成構築體

<400> 11  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Tyr Thr Glu Ala Tyr  
 20 25 30  
 Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Arg Ile Asp Pro Ala Thr Gly Asn Thr Lys Tyr Ala Pro Arg Leu  
 50 55 60  
 Gln Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Ser Leu Tyr Ser Leu Pro Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val  
 100 105 110  
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala  
 115 120 125  
 Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu  
 130 135 140  
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly  
 145 150 155 160  
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser  
 165 170 175  
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe  
 180 185 190  
 Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr  
 195 200 205  
 Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro  
 210 215 220  
 Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 225 230 235 240  
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp
			260					265					270		
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
		275					280					285			
Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val
		290				295					300				
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
305					310					315					320
Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly
				325					330					335	
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu
			340					345					350		
Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
		355					360					365			
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
		370				375					380				
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
385					390					395					400
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
				405				410						415	
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
			420					425					430		
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
		435					440								

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 219

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成構築體

&lt;400&gt; 12

Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Leu	Gly
1				5					10					15	
Gln	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Tyr	Ser
		20						25					30		
Asp	Ala	Lys	Thr	Tyr	Leu	Asn	Trp	Phe	Gln	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Ser
		35					40					45			
Pro	Arg	Arg	Leu	Ile	Tyr	Gln	Ile	Ser	Arg	Leu	Asp	Pro	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	Leu	Gln	Gly
				85				90						95	
Thr	His	Tyr	Pro	Val	Leu	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Arg	Leu	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> 13  
 <211> 1336  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成構築體

<400> 13  
 cagggtgcagc tgggtgcagtc tgggtgctgag gtgaagaagc ctggcgcttc cgtgaaggtt 60  
 tcttgcaaag catctgggta ctatacggag gcttactata tccactgggt gcgccaagcc 120  
 cctgggtcaag gcctggagtg gatgggcagg attgatcctg cgactggtaa tactaaatat 180  
 gccccgaggt tacaggaccg ggtgaccatg actcgcgata cctccaccag cactgtctac 240  
 atggaactga gctctctgcg cctgaggac actgctgtgt attactgtgc ctccctttat 300  
 agtctccctg tctactgggg ccagggtacc actgttaccg tgcctctgct ctcaccaag 360  
 ggccccatctg tcttcccact ggccccatgc tcccgcagea cctccgagag cacagccgcc 420  
 ctgggctgcc tgggtcaagga ctacttccca gaacctgtga ccgtgtcctg gaactctggc 480  
 gctctgacca gcggcgtgca caccttccca gctgtcctgc agtccctcagg tctctactcc 540  
 ctcagcagcg tgggtgaccgt gccatccagc aacttcggca cccagaccta cacctgcaac 600  
 gtagatcaca agccaagcaa caccaaggtc gacaagaccg tggagagaaa gtgtttgtgtg 660  
 gagtgtccac cttgtccagc ccctccagtg gccggaccat ccgtgttccct gttccctcca 720  
 aagccaaagg acaccctgat gatctccaga accccagagg tgacctgtgt ggtggtggac 780  
 gtgtcccacg aggaccacaga ggtgcagttc aactgggatg tggacggagt ggaggtgcac 840  
 aacgccaaga ccaagccaag agaggagcag ttcaactcca ccttcagagt ggtgagcgtg 900  
 ctgaccgtgg tgcaccagga ctggctgaac ggaaaggagt ataagtgtaa ggtgtccaac 960  
 aagggactgc catccagcat cgagaagacc atctccaaga ccaagggaca gccaaagagag 1020  
 ccacaggtgt ataccctgcc cccatccaga gaggagatga ccaagaacca ggtgtccctg 1080  
 acctgtctgg tgaagggatt ctatccatcc gacatcgccg tggagtggga gtccaacgga 1140  
 cagccagaga acaactataa gaccaccct ccaatgctgg actccgacgg atccttcttc 1200  
 ctgtattcca agctgaccgt ggacaagtcc agatggcagc agggaaacgt gttctcttgt 1260  
 tccgtgatgc acgaggccct gcacaaccac tataaccaga agagcctgtc cctgtctcca 1320  
 ggaaagtaat tctaga 1336

<210> 14  
 <211> 666  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成構築體

<400> 14  
 gatgttgatga tgaccagtc cccactgtct ttgccagtta ccctgggaca accagcctcc 60  
 atatcttgca agtcaagtca gagcctctta tatagtgatg ccaagacata ttggaattgg 120  
 ttccaacaga ggcttgcca gctctccagc cgcctaactc atcagatttc cgggctggac 180  
 cctggcgtgc ctgacaggtt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac acttaaaatc 240  
 agcagagtgg aggctgaaga tgtgggagtt tattactgct tacaaggtag acattatccg 300  
 gtgctcttcg gtcaagggac ccgcctggag atcaaacgca ctgtggctgc accatctgtc 360  
 ttcatcttcc ctccatctga tgagcagttg aaatccggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420  
 ctgaataact tctatccagc cgaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 480

tccgtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540  
 agcagcacc taccctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600  
 gtcacccatc agggcctgag ttctccagtc acaaagagct tcaaccgagg tgagtgtctaa 660  
 ttctag 666

<210> 15  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 15  
 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  
 35 40

<210> 16  
 <211> 42  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 16  
 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

<210> 17  
 <211> 43  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 17  
 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 Thr  
 35 40

<210> 18  
 <211> 41  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 18  
 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  
 35 40

<210> 19  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 19  
 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  
 35

<210> 20  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成構築體

<400> 20  
 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 Ala Val Gly Gly Val Val  
 35 40

<210> 21  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成構築體

<400> 21  
 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 Ala Gly Gly Val Val  
 35 40

<210> 22  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成構築體

&lt;400&gt; 22

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	Ala	Gly	Val	Val								
		35					40								

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成構築體

&lt;400&gt; 23

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	Ala	Val	Val								
		35					40								

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成構築體

&lt;400&gt; 24

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	Ala	Val								
		35					40								

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成構築體

&lt;400&gt; 25

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	Ala								
		35					40								



<210> 26  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成構築體

<400> 26  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr  
 20 25 30  
 Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Phe Thr Ser Pro Tyr Ser Gly Val Ser Asn Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Phe Asp Asn Tyr Asp Arg Gly Tyr Val Arg Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110  
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser  
 115 120

<210> 27  
 <211> 114  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成構築體

<400> 27  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Asp  
 20 25 30  
 Arg Ile Ser Phe Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
 35 40 45  
 Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Thr Lys Gln Gly Thr Gly Val Pro Asp  
 50 55 60  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
 65 70 75 80  
 Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys  
 85 90 95  
 Glu Phe Pro Trp Ser Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
 100 105 110  
 Thr Val

<210> 28

<211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 28  
 Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Ala Ile His  
 1 5 10

<210> 29  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成構築體

<400> 29  
 Phe Thr Ser Pro Tyr Ser Gly Val Ser Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys  
 1 5 10 15  
 Gly

<210> 30  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成構築體

<400> 30  
 Phe Asp Asn Tyr Asp Arg Gly Tyr Val Arg Asp Tyr  
 1 5 10

<210> 31  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成構築體

<400> 31  
 Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Asp Arg Ile Ser Phe Leu Asn  
 1 5 10 15

<210> 32  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成構築體

<400> 32  
Ala Ala Thr Lys Gln Gly Thr  
1 5

<210> 33  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

<400> 33  
Gln Gln Ser Lys Glu Phe Pro Trp Ser  
1 5

<210> 34  
<211> 360  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

<400> 34  
cagggtgcaac tgggtgcaatc cgggtgccgag gtgaaaaagc caggcgcctc cgtgaaagtg 60  
tcctgcaaag cctccgggta cacctttacc acctatgcca tccattgggt gcgccaggcc 120  
ccaggccagg gtctggagtg gatgggcttt acttccccct actccggggt gtcgaattac 180  
aatcagaagt tcaaaggccg cgtcaccatg acccgcgaca cctccacctc cacagtgtat 240  
atggagctgt cctctctgcg ctccgaagac accgccgtgt attactgtgc ccgcttcgac 300  
aattacgatc gcggctatgt gcgtgactat tggggccagg gcaccctggt caccgtctcc 360

<210> 35  
<211> 342  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

<400> 35  
gacatcgtga tgaccagtc cccagactcc ctggccgtgt ccctgggcga gcgcgccacc 60  
atcaactgcc gcgccagcga atccgtggat aacgatcgta tttcctttct gaactggtac 120  
cagcagaaac caggccagcc tcctaagctg ctcatcttac cgcaccacaa acagggtacc 180  
ggcgtgcctg accgcttctc cggcagcggg tccggcaccg atttactct gaccatctcc 240  
tccttgcagg ccgaagatgt ggcagtgtat tactgtcagc agtccaaaga gtttccctgg 300  
tcctttggcg gtggcaccac ggtggagatc aaacgcactg tg 342

<210> 36  
<211> 447  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

&lt;400&gt; 36

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr  
 20 25 30  
 Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Phe Thr Ser Pro Tyr Ser Gly Val Ser Asn Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Phe Asp Asn Tyr Asp Arg Gly Tyr Val Arg Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110  
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
 115 120 125  
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala  
 130 135 140  
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
 145 150 155 160  
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala  
 165 170 175  
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val  
 180 185 190  
 Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His  
 195 200 205  
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys  
 210 215 220  
 Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val  
 225 230 235 240  
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
 245 250 255  
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu  
 260 265 270  
 Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
 275 280 285  
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser  
 290 295 300  
 Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
 305 310 315 320  
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile  
 325 330 335  
 Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro  
 340 345 350  
 Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu  
 355 360 365  
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
 370 375 380  
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser  
 385 390 395 400  
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
 405 410 415  
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
 420 425 430  
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 435 440 445

<210> 37  
 <211> 218  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成構築體

<400> 37

```

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

```

<210> 38  
 <211> 1341  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成構築體

<400> 38

```

caggtgcaac tgggtgcaatc cgggtgccgag gtgaaaaagc caggcgcctc cgtgaaagtg 60
tcttgcaaag cctccgggta cacctttacc acctatgcca tccattgggt gcgccaggcc 120
ccaggccagg gtctggagtg gatgggcttt acttccccct actccggggt gtcgaattac 180
aatcagaagt tcaaaggccg cgtcaccatg acccgcgaca cctccacctc cacagtgtat 240
atggagctgt cctctctgcg ctccgaagac accgccgtgt attactgtgc ccgcttcgac 300
aattacgatc gcggctatgt gogtgactat tggggccagg gcaccctggt caccgtctcc 360
tcagcctcca ccaagggccc atctgtcttc ccactggccc catgctcccg cagcacctcc 420
gagagcacag ccgccctggg ctgcctggtc aaggactact tcccagaacc tgtgaccgtg 480

```

```

tcctggaact ctggcgctct gaccagcggc gtgcacacct tcccagctgt cctgcagtcc 540
tcaggtctct actccctcag cagcgtgggt accgtgccat ccagcaactt cggcaccag 600
acctacacct gcaacgtaga tcacaagcca agcaacacca aggtcgacaa gaccgtggag 660
agaaagtgtt gtgtggagtg tccaccttgt ccagcccctc cagtggccgg accatccgtg 720
ttcctgttcc ctccaaagcc aaaggacacc ctgatgatct ccagaacccc agaggtgacc 780
tgtgtggtgg tggacgtgtc ccacgaggac ccagaggtgc agttcaactg gtatgtggac 840
ggagtggagg tgcacaacgc caagaccaag ccaagagagg agcagttcaa ctccaccttc 900
agagtgggtg gcgtgctgac cgtggtgcac caggactggc tgaacggaaa ggagtataag 960
tgtaaggtgt ccaacaaggg actgccatcc agcatcgaga agaccatctc caagaccaag 1020
ggacagccaa gagagccaca ggtgtatacc ctgccccat ccagagagga gatgaccaag 1080
aaccaggtgt ccctgacctg tctggtgaag ggattctatc catccgacat cgccgtggag 1140
tgggagtcca acggacagcc agagaacaac tataagacca cccctccaat gctggactcc 1200
gacggatcct tcttccigtg ttccaagctg accgtggaca agtccagatg gcagcaggga 1260
aacgtgttct cttgttccgt gatgcacgag gccctgcaca accactatac ccagaagagc 1320
ctgtccctgt ctccaggaaa g 1341

```

<210> 39  
<211> 654  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

```

<400> 39
gacatcgtga tgaccagtc cccagactcc ctggccgtgt ccctgggcga gcgcgccacc 60
atcaactgcc gcgccagcga atccgtggat aacgatcgta tttcctttct gaactggtac 120
cagcagaaac caggccagcc tccctagctg ctcatctacg ccgccaccaa acagggtacc 180
ggcgtgcctg accgcttctc cggcagcggg tccggcaccg atttactct gaccatctcc 240
tccctgcagg ccgaagatgt ggcagtgtat tactgtcagc agtccaaaga gtttccctgg 300
tcctttggcg gtggcaccaa ggtggagatc aaacgcactg tggctgcacc atctgtcttc 360
atcttccctc catctgatga gcagttgaaa tccggaactg cctctgttgt gtgcctgctg 420
aataacttct atccacgcga ggccaaagta cagtggaaagg tggataacgc cctccaatcc 480
ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 540
agcacctga ccctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc 600
acccatcagg gcctgagttc tccagtcaca aagagcttca accgcggtga gtgc 654

```

<210> 40  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

```

<400> 40
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1           5           10           15

```

<210> 41  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

&lt;400&gt; 41

Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Gly  
 1 5 10 15

&lt;210&gt; 42

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成構築體

&lt;400&gt; 42

Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Gly  
 1 5 10 15

&lt;210&gt; 43

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成構築體

&lt;400&gt; 43

Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Gly  
 1 5 10 15

&lt;210&gt; 44

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成構築體

&lt;400&gt; 44

Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly  
 1 5 10 15

&lt;210&gt; 45

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成構築體

&lt;400&gt; 45

Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly  
 1 5 10 15

&lt;210&gt; 46

<211> 16  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成構築體

<400> 46  
 Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Gly  
 1 5 10 15

<210> 47  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成構築體

<400> 47  
 Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Gly  
 1 5 10 15

<210> 48  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成構築體

<400> 48  
 Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Gly  
 1 5 10 15

<210> 49  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成構築體

<400> 49  
 Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Gly  
 1 5 10 15

<210> 50  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成構築體



&lt;400&gt; 50

Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Gly  
 1 5 10 15

&lt;210&gt; 51

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成構築體

&lt;400&gt; 51

Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Gly  
 1 5 10

&lt;210&gt; 52

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成構築體

&lt;400&gt; 52

Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Gly  
 1 5 10

&lt;210&gt; 53

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成構築體

&lt;400&gt; 53

Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Gly  
 1 5 10

## 五、中文發明摘要：

本發明係說明抗澱粉狀蛋白- $\beta$ 胜肽之單株抗體9TL及衍生自9TL之抗體與使用彼於診斷及治療阿耳滋海默氏症(Alzheimer's disease)及澱粉狀蛋白- $\beta$ 胜肽相關疾病之方法。本發明也說明使用直接抗澱粉狀蛋白- $\beta$ 胜肽之具有受損的作用功能(effector function)之抗體，用以治療阿耳滋海默氏症及澱粉狀蛋白- $\beta$ 胜肽相關的疾病之方法。

## 六、英文發明摘要：

## 十一、圖式：

粗體=卡巴CDR

下底線=裘蒂艾CDR

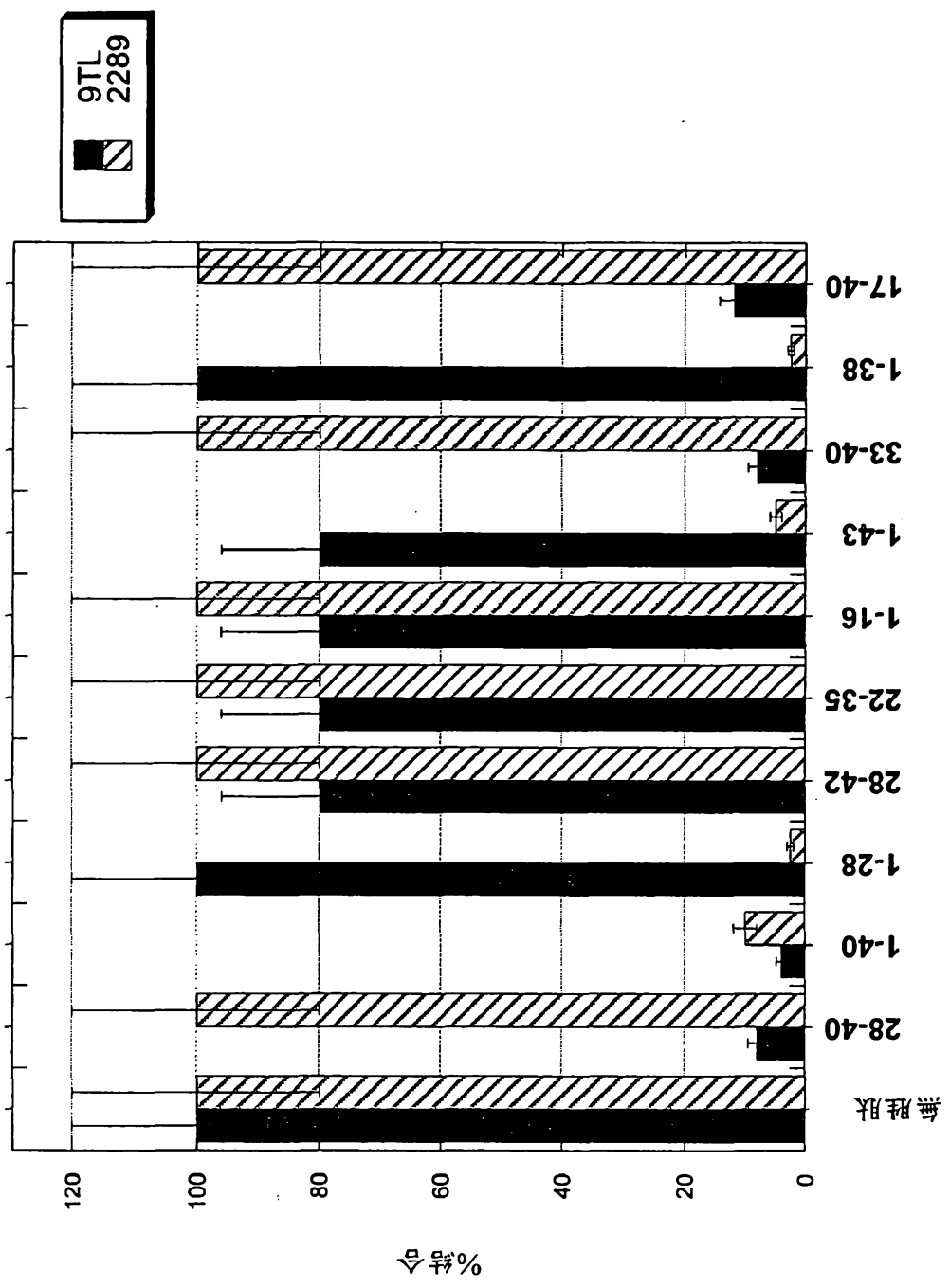
## 9TL重鏈

1 5 10 15 20 25 29 H1  
 Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y Y T  
 30 35 40 45 50 55 58 H2  
E A Y Y I H W V R Q A P G Q G L E W M G R I D P A T G N T  
 59 60 65 70 75 80 85 87  
K Y A P R L Q D R V T M T R D T S T S T V Y M E L S S L R  
 H3  
 88 90 95 100 105 110 115  
 S E D T A V Y Y C A S L Y S L P V Y W G Q G T T V T V S S

## 9TL輕鏈

1 5 10 15 20 25 29 L1  
 D V V M T Q S P L S L P V T L G Q P A S I S C K S S Q S L  
 30 35 40 45 50 55 58 L2  
L Y S D A K T Y L N W F Q Q R P G Q S P R R L I Y Q I S R  
 59 60 65 70 75 80 85 87  
L D P G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D  
 L3  
 88 90 95 100 105 110 114  
 V G V Y Y C L Q G T H Y P V L F G Q G T R L E I K R T

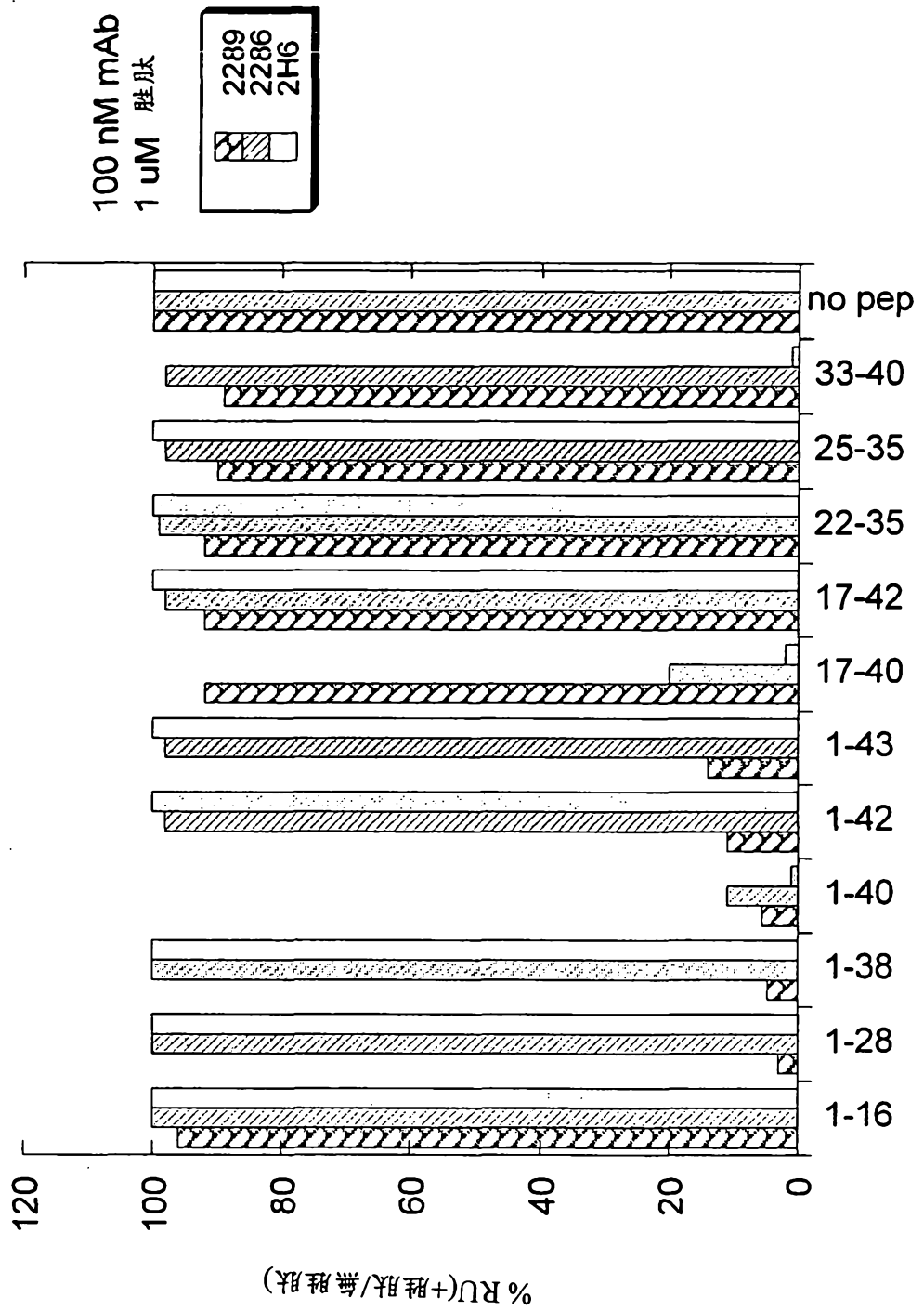
圖 1



競争胜肽

圖 2





胜肽

圖 3



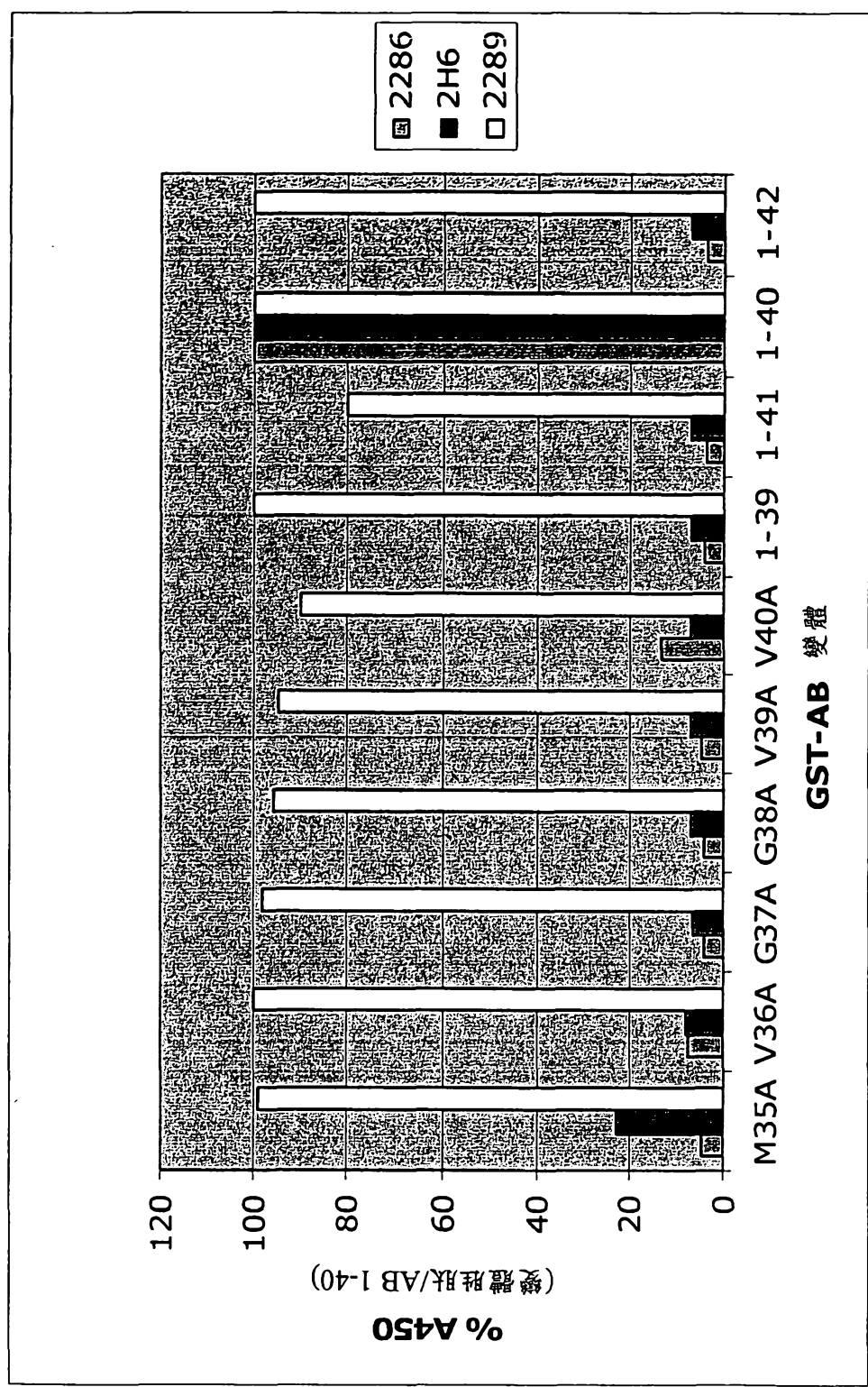


圖 4



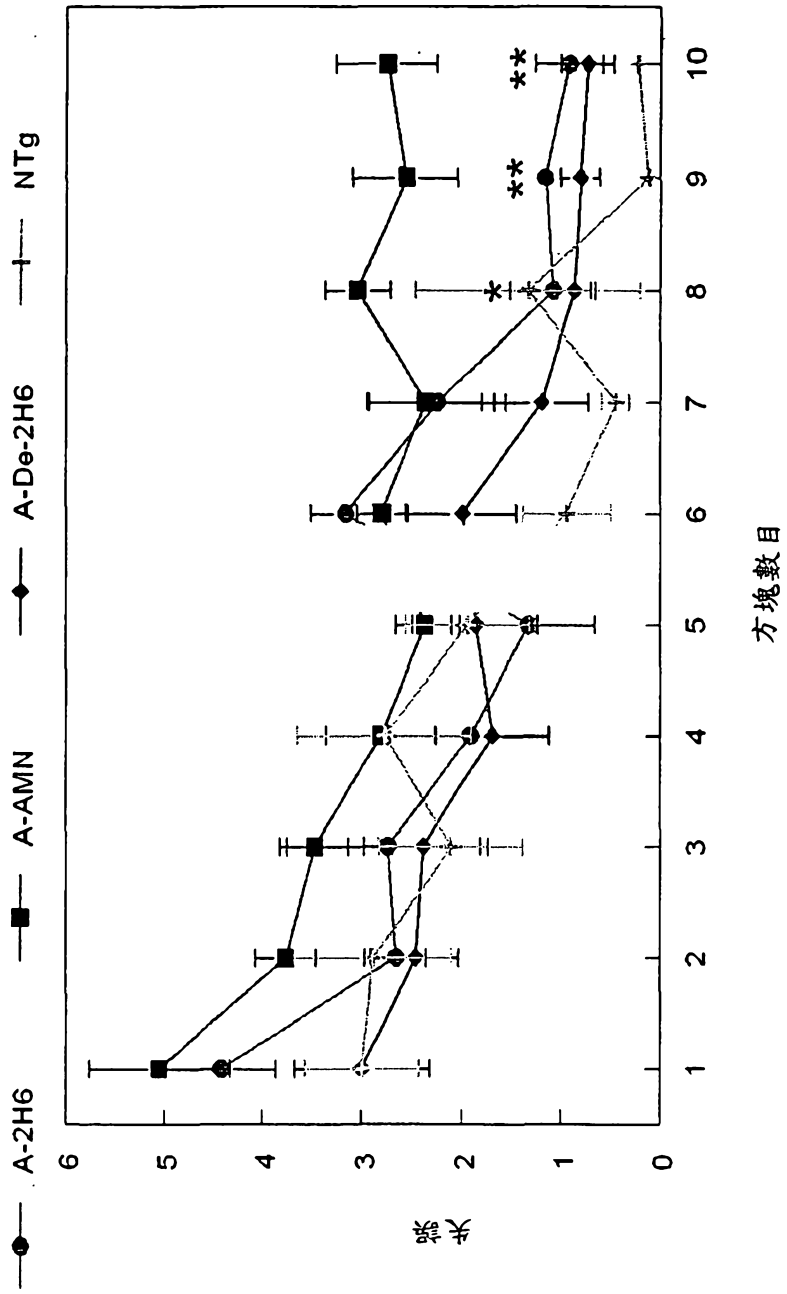
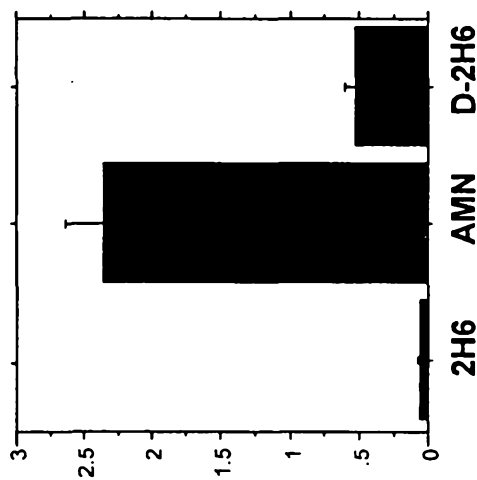


圖 5

A. 實質剛果紅  
前葉皮質



B. 實質剛果紅  
海馬迴

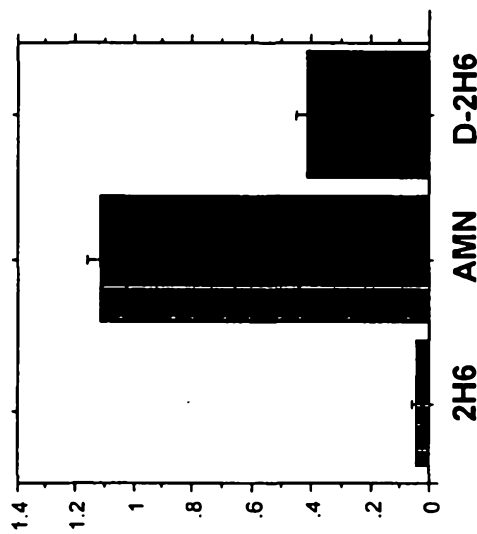
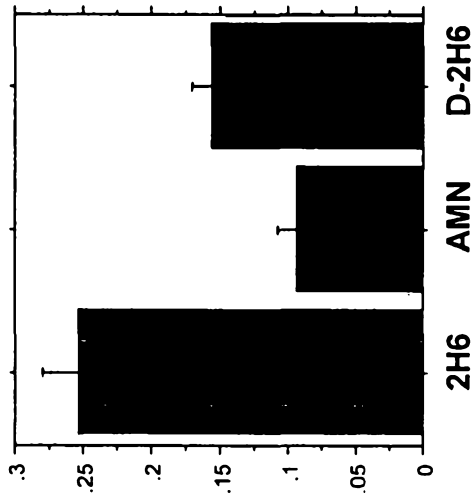


圖 6





A. 血管剛果紅  
海馬迴



B. 血管剛果紅  
前葉皮質

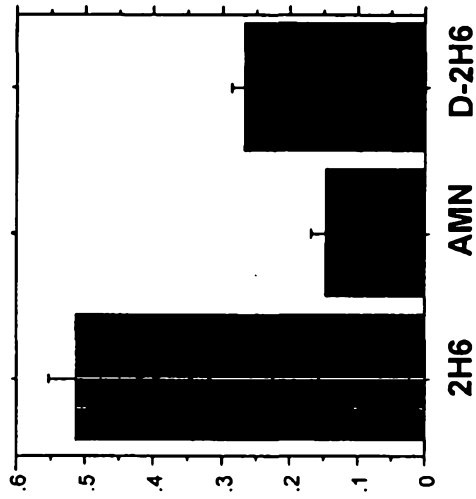


圖 7

普魯士藍

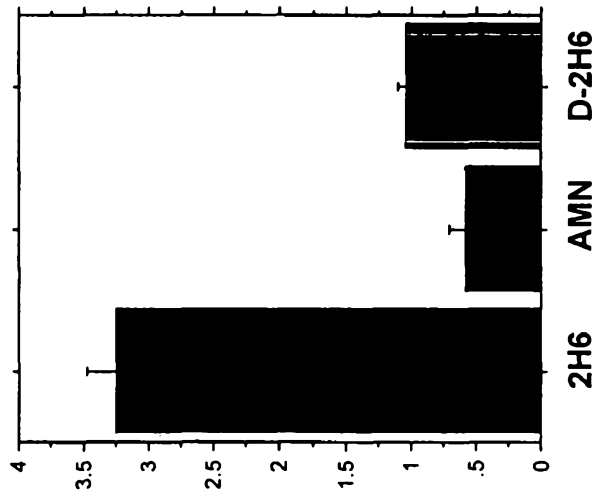


圖 8

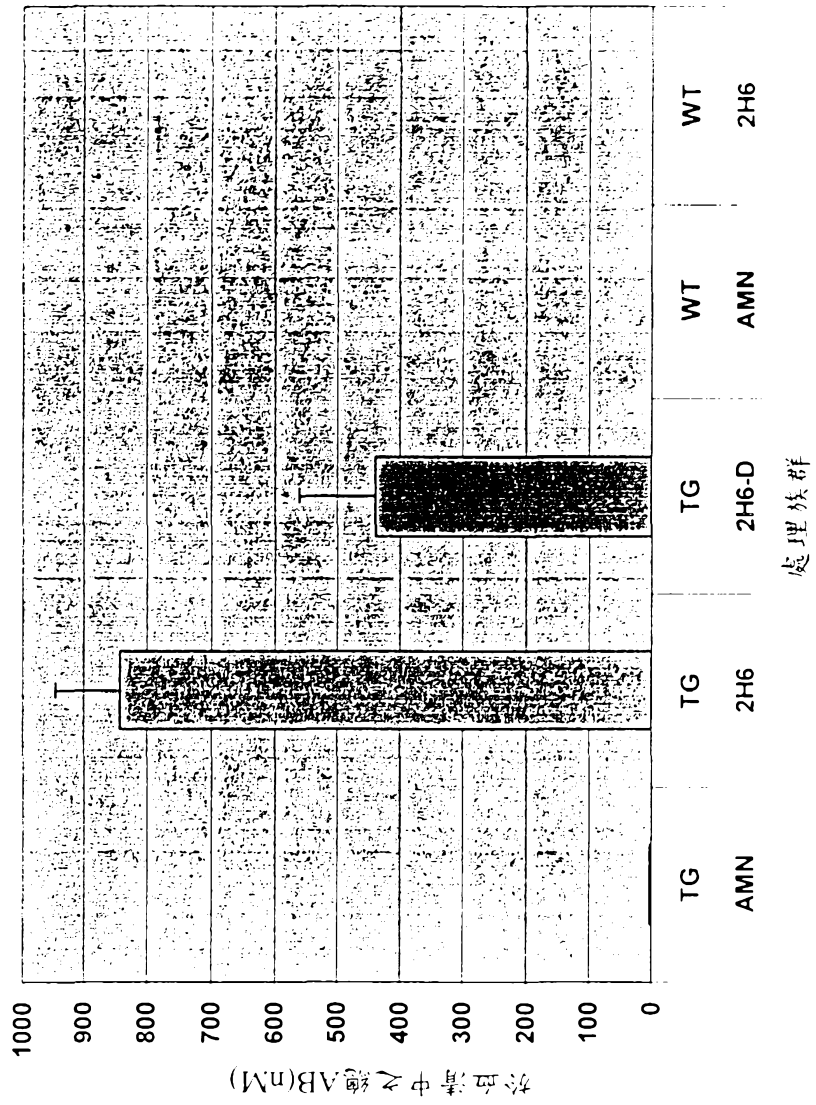
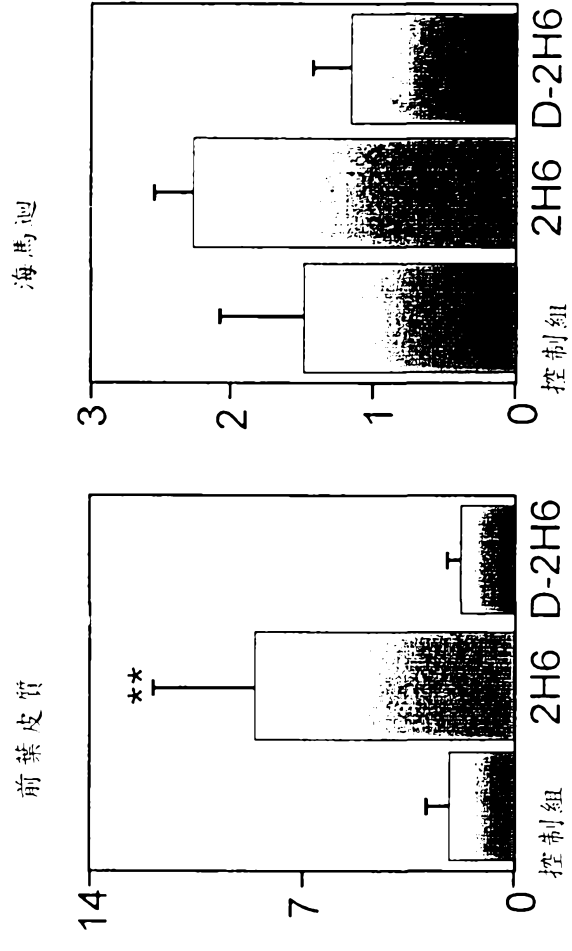
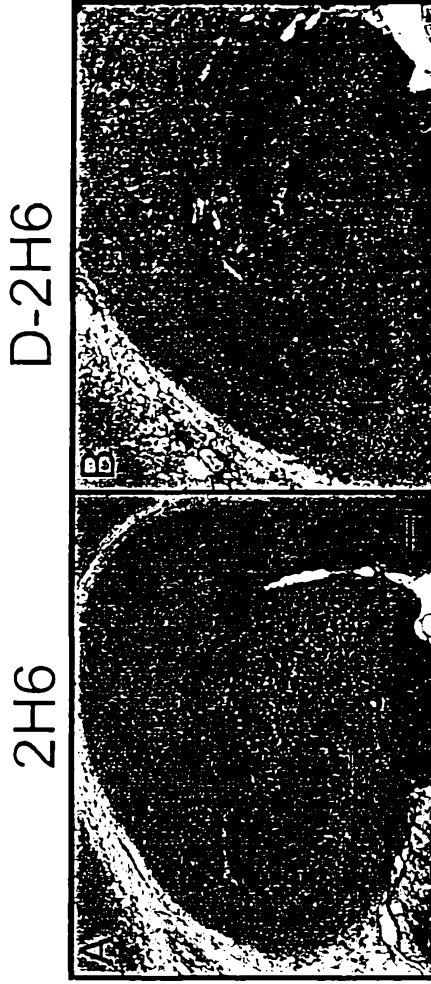


圖 9



注射的：未注射的一邊之比例

圖 10

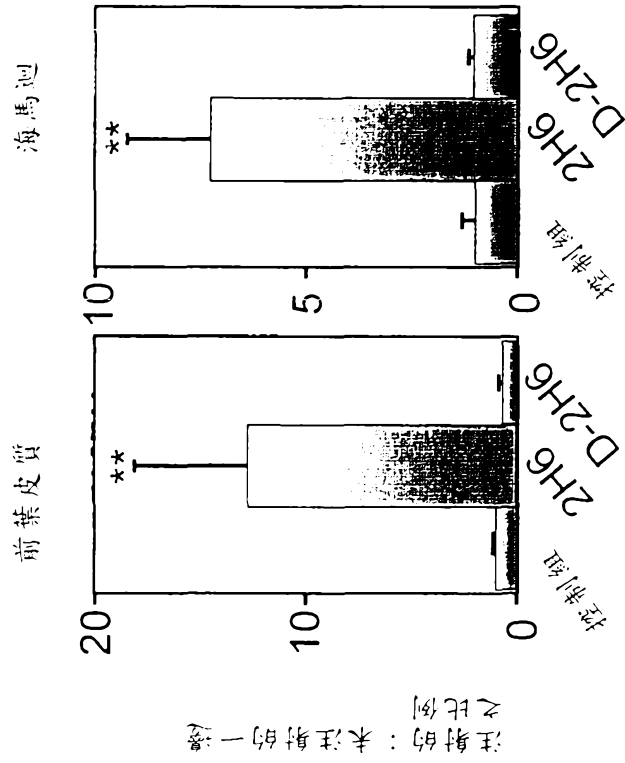
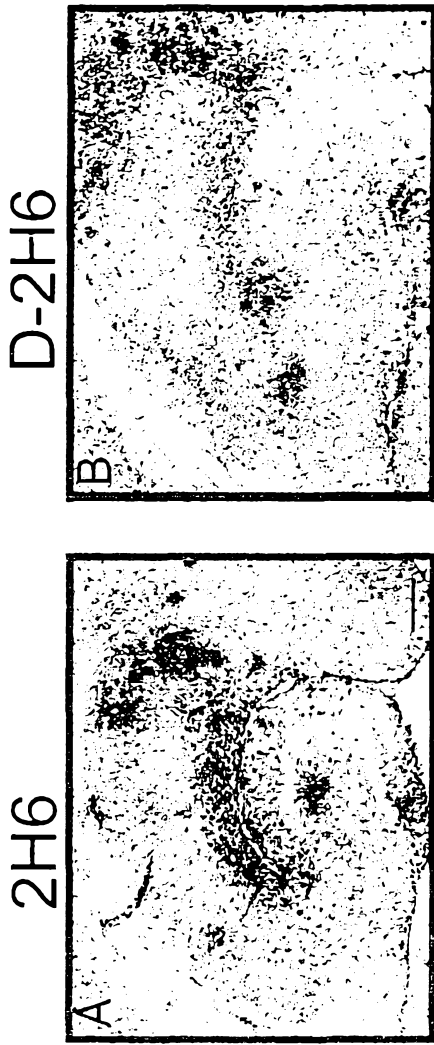


圖 11

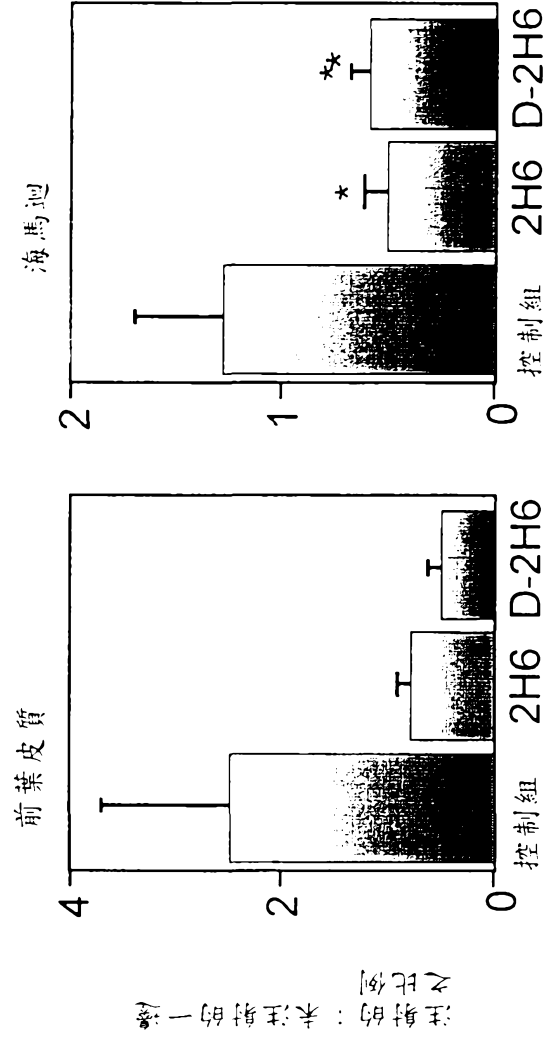
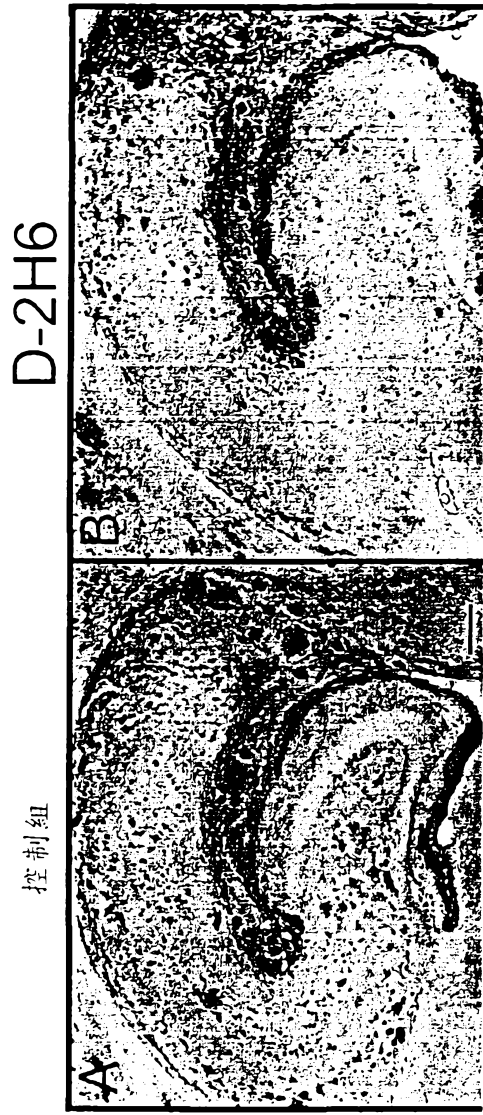


圖 12

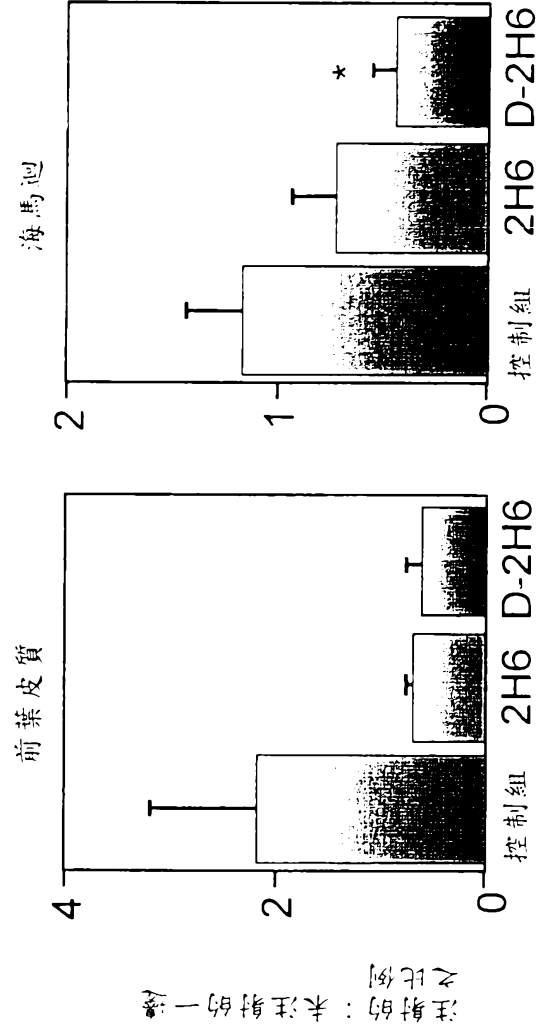
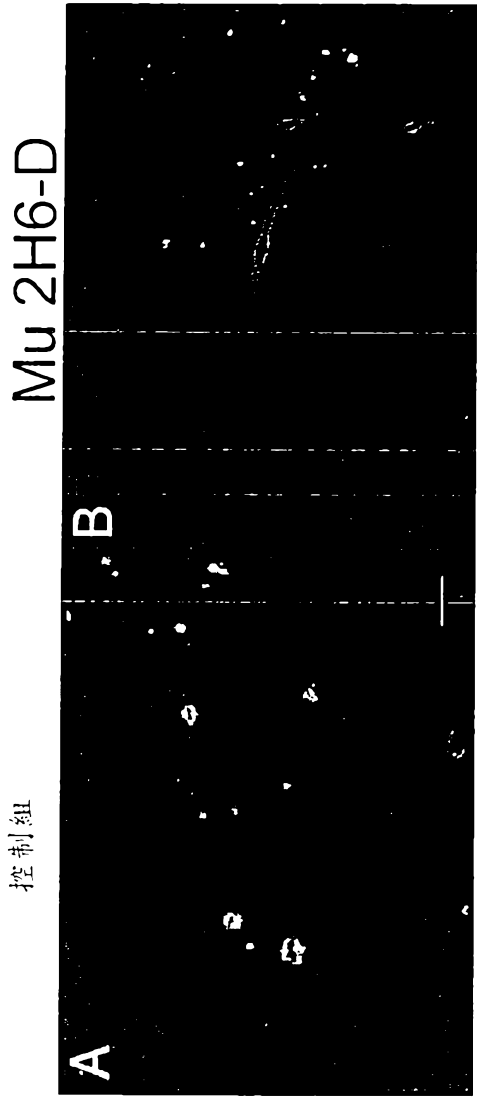


圖 13

抗原決定位圖譜分析：  
15 負胜肽

19	FFAEDVGSNKGAIIGG	2294	NB	6G	NB
20	FAEDVGSNKGAIIGLG	>3	>3		>3
21	AEDVGSNKGAIIGLMG	2.9	>3		>3
22	EDVGSNKGAIIGLMVG	>3	>3		>3
23	DVGSNKGAIIGLMVGG	>3	>3		2.3
24	VGSNKGAIIGLMVGGG	>3	>3		2.1
25	GSNKGAIIGLMVGGVG	>3	>3		1.5
26	SNKGAIIGLMVGGVVG	>3	>3		NB.
27	NKGAIIGLMVGGVVIG	NB	NB		NB
28	KGAIIGLMVGGVVIAG	NB	NB		NB

10 負胜肽結合數據：最少測試的抗原決定位

VGSNKGAIIGG	2294	6G
GSNKGAIIGLG	NB	NB
SNKGAIIGLMG	2	>3
	NB	NB

圖 14





七、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)

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)

## 十、申請專利範圍：

1. 一種專一地結合至 $\beta$ -澱粉狀蛋白(A $\beta$ )胜肽或A $\beta$ 胜肽聚集形式的抗體之用途，其係用於製造用以治療個體中與A $\beta$ -澱粉狀蛋白沉澱有關的疾病之藥物，其中抗體包含具有受損作用功能的Fc區域，且其中該抗體包含：

重鏈可變區域，其包含：

- (a) 示於SEQ ID NO:3中的CDR1區域；
- (b) 示於SEQ ID NO:4中的CDR2區域；及
- (c) 示於SEQ ID NO:5中的CDR3區域，其中第一個L可視需要被V或I取代；其中第二個Y可視需要被W取代；其中第三個S可視需要被T或G取代；其中第四個L可視需要被R、A、V、S、T、Q或E取代；其中第六個V可視需要被I、T、P、C、Q、S、N或F取代；及其中第七個Y可視需要被H、F、W、S、I、V或A取代；及

輕鏈可變區域，其包含：

- (d) 示於SEQ ID NO:6中的CDR1區域，其中第八個Y可視需要被A或H取代；其中第十一個A可視需要被S取代；及其中第十二個K可視需要被A取代；
- (e) 示於SEQ ID NO:7中的CDR2區域；及
- (f) 示於SEQ ID NO:8中的CDR3區域，其中第一個L可視需要被M、N、C、F、V、K、S、Q、G或S取代；其中第三個G可視需要被S或T取代；其中第四個T可視需要被S取代；其中第五個H可視需要被L

取代；其中第六個Y可視需要被P、A、W、Q、M、S或E取代；其中第八個V可視需要被L、K、H、T、A、E或M取代；及其中第九個L可視需要被I、T、S或V取代。

2. 如請求項1之用途，其中該個體為人類。
3. 如請求項1之用途，其中該疾病為阿耳滋海默氏症。
4. 如請求項1之用途，其中該抗體為單株抗體。
5. 如請求項1之用途，其中該抗體為人化抗體。
6. 如請求項1之用途，其中該抗體為人類抗體。
7. 如請求項1之用途，其中該抗體以約2 nM或以下的 $K_D$ 結合至A $\beta$ 胜肽。
8. 如請求項1之用途，其中該抗體專一地結合至A $\beta_{1-40}$ 的殘基28-403內的抗原決定區。
9. 如請求項1之用途，其中該抗體專一地結合至A $\beta_{1-40}$ 之C-端。
10. 如請求項1之用途，其中該抗體專一地結合至A $\beta_{1-40}$ 上包括胺基酸39及/或40之抗原決定區。
11. 如請求項10之用途，其中該抗體包含包含如SEQ ID NO:1所示的胺基酸序列之重鏈可變區域，及包含如SEQ ID NO:2所示的胺基酸序列之輕鏈可變區域。
12. 如請求項1之用途，其中該抗體以比結合至A $\beta_{1-42}$ 或A $\beta_{1-43}$ 更高的親合力結合至A $\beta_{1-40}$ 。
13. 如請求項1之用途，其中該抗體結合至A $\beta_{1-40}$ 上包括胺基酸25-34及40之抗原決定區。

14. 如請求項1之用途，其中該抗體包含：

重鏈可變區域，其包含：

(a) 示於SEQ ID NO:3中的CDR1區域；

(b) 示於SEQ ID NO:4中的CDR2區域；及

(c) 示於SEQ ID NO:5中的CDR3區域及

輕鏈可變區域，其包含：

(d) 示於SEQ ID NO:6中的CDR1區域；

(e) 示於SEQ ID NO:7中的CDR2區域；及

(f) 示於SEQ ID NO:8中的CDR3區域。

15. 如請求項1之用途，其中該抗體的Fc區域包含於N-糖化辨識序列內之突變，因而Fc區域為非N-糖化。

16. 如請求項1之用途，其中該抗體的Fc區域為包含在位置330由丙胺酸成為絲胺酸及在位置331由脯胺酸成為絲胺酸之胺基酸突變的人類重鏈IgG2a之Fc區域，其中胺基酸位置係基於參照人類野生型IgG2序列之卡巴編號。

17. 一種抗體，其包含：

重鏈可變區域，其包含：

(a) 示於SEQ ID NO:3中的CDR1區域；

(b) 示於SEQ ID NO:4中的CDR2區域；及

(c) 示於SEQ ID NO:5中的CDR3區域，其中第一個L可視需要被V或I取代；其中第二個Y可視需要被W取代；其中第三個S可視需要被T或G取代；其中第四個L可視需要被R、A、V、S、T、Q或E取代；其中第六個V可視需要被I、T、P、C、Q、S、N或F

取代；及其中第七個Y可視需要被H、F、W、S、I、V或A取代；及

輕鏈可變區域，其包含：

- (d) 示於SEQ ID NO:6中的CDR1區域，其中第八個Y可視需要被A或H取代；其中第十一個A可視需要被S取代；及其中第十二個K可視需要被A取代；
- (e) 示於SEQ ID NO:7中的CDR2區域；及
- (f) 示於SEQ ID NO:8中的CDR3區域，其中第一個L可視需要被M、N、C、F、V、K、S、Q、G或S取代；其中第三個G可視需要被S或T取代；其中第四個T可視需要被S取代；其中第五個H可視需要被L取代；其中第六個Y可視需要被P、A、W、Q、M、S或E取代；其中第八個V可視需要被L、K、H、T、A、E或M取代；及其中第九個L可視需要被I、T、S或V取代，

其中該抗體專一地結合至A $\beta$ 胜肽。

18. 如請求項17之抗體，其中該抗體包含：

重鏈可變區域，其包含：

- (a) 示於SEQ ID NO:3中的CDR1區域；
- (b) 示於SEQ ID NO:4中的CDR2區域；及
- (c) 示於SEQ ID NO:5中的CDR3區域及

輕鏈可變區域，其包含：

- (d) 示於SEQ ID NO:6中的CDR1區域；
- (e) 示於SEQ ID NO:7中的CDR2區域；及

(f) 示於SEQ ID NO:8中的CDR3區域。

19. 如請求項18之抗體，其中該重鏈可變區域包含示於SEQ ID NO:1中的胺基酸序列。
20. 如請求項18之抗體，其中該輕鏈可變區域包含示於SEQ ID NO:2中的胺基酸序列。
21. 如請求項20之抗體，其中該重鏈可變區域包含示於SEQ ID NO:1中的胺基酸序列。
22. 如請求項18之抗體，其中該重鏈包含示於SEQ ID NO:11中的胺基酸序列；及該輕鏈包含示於SEQ ID NO:12中的胺基酸序列。