



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108064284 A

(43)申请公布日 2018.05.22

(21)申请号 201580064598.3

(22)申请日 2015.12.14

(30)优先权数据

2014-251898 2014.12.12 JP

2015-104411 2015.05.22 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.05.26

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2015/006224 2015.12.14

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/092865 JA 2016.06.16

(71)申请人 国立大学法人京都大学

地址 日本京都府

申请人 国立大学法人千叶大学

株式会社免疫生物研究所

(72)发明人 入江一浩 村上一马 清水孝彦

泉尾直孝 清藤勉

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 巫肖南 闫桑田

(51)Int.Cl.

C12N 15/09(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61P 25/28(2006.01)

C07K 16/18(2006.01)

C12N 15/02(2006.01)

权利要求书3页 说明书35页

序列表(电子公布) 附图13页

(54)发明名称

极其特异性识别淀粉样蛋白 β 的22位及23位的转角结构的抗体

(57)摘要

本发明提供仅以具有A β 的特定的转角结构的A β (A β 的毒性构象异构体)作为靶标的抗体或其免疫反应性片段。此外,本发明涉及含有特异性识别A β 的毒性构象异构体的抗体作为有效成分的药物组合物、或A β 的毒性构象异构体的测定试剂盒或者阿尔茨海默病的诊断试剂等。

1. 抗体或其免疫反应性片段,其极其特异性识别在22位和23位的氨基酸具有转角结构的A β ,且不识别具有其它结构的A β 。

2. 根据权利要求1所述的抗体或其免疫反应性片段,其进一步识别A β 的寡聚物。

3. 根据权利要求2所述的抗体或其免疫反应性片段,其中,A β 的寡聚物为二聚物。

4. 根据权利要求1~权利要求3中任一项所述的抗体或其免疫反应性片段,其中,A β 为A β 42。

5. 根据权利要求1~权利要求4中任一项所述的抗体或其免疫反应性片段,其中,A β 的其它结构至少包含选自以下结构中的1种以上:

A β 的21位及22位的氨基酸处的转角结构、A β 的23位及24位的氨基酸处的转角结构、A β 的24位及25位的氨基酸处的转角结构、A β 的25位及26位的氨基酸处的转角结构、及A β 的35位及36位的氨基酸处的转角结构。

6. 抗体或其免疫反应性片段,其极其特异性识别与VH具有序列编号4中记载的氨基酸序列且VL具有序列编号11中记载的氨基酸序列的抗体结合的表位,且不识别不与VH具有序列编号4中记载的氨基酸序列且VL具有序列编号11中记载的氨基酸序列的抗体结合的表位。

7. 抗体或其免疫反应性片段,其竞争抑制VH具有序列编号4中记载的氨基酸序列且VL具有序列编号11中记载的氨基酸序列的抗体与其抗原之间的结合,且不结合不与VH具有序列编号4中记载的氨基酸序列且VL具有序列编号11中记载的氨基酸序列的抗体结合的表位。

8. 抗体或其免疫反应性片段,其重链可变区的CDR1、CDR2及CDR3分别具有序列编号5、序列编号6及序列编号7中记载的氨基酸序列。

9. 根据权利要求8所述的抗体或其免疫反应性片段,进一步,其轻链可变区的CDR1、CDR2及CDR3分别具有序列编号12、序列编号13及序列编号14中记载的氨基酸序列。

10. 根据权利要求1~权利要求7中任一项所述的抗体或其免疫反应性片段,其重链可变区的CDR1、CDR2及CDR3分别具有序列编号5、序列编号6及序列编号7中记载的氨基酸序列。

11. 根据权利要求10所述的抗体或其免疫反应性片段,进一步,其轻链可变区的CDR1、CDR2及CDR3分别具有序列编号12、序列编号13及序列编号14中记载的氨基酸序列。

12. 抗体或其免疫反应性片段,其VH具有序列编号4中记载的氨基酸序列。

13. 根据权利要求12所述的抗体或其免疫反应性片段,进一步,其VL具有序列编号11中记载的氨基酸序列。

14. 核酸分子,其编码具有序列编号4中记载的氨基酸序列的抗体或其免疫反应性片段。

15. 根据权利要求14所述的核酸分子,其为由序列编号1的第126位~第479位的核苷酸序列组成的核酸分子。

16. 核酸分子,其编码具有序列编号11中记载的氨基酸序列的抗体或其免疫反应性片段。

17. 根据权利要求16所述的核酸分子,其为由序列编号8的第130位~第465位的核苷酸序列组成的核酸分子。

18. 载体, 其能够表达具有序列编号4中记载的氨基酸序列的抗体或其免疫反应性片段、和/或具有序列编号11中记载的氨基酸序列的抗体或其免疫反应性片段。

19. 根据权利要求18所述的载体, 其含有权利要求14或权利要求15所述的核酸分子、和/或权利要求16或权利要求17所述的核酸分子。

20. 宿主细胞, 其包含权利要求18或权利要求19所述的载体。

21. 药物组合物, 其含有权利要求1~权利要求13中任一项所述的抗体或其免疫反应性片段。

22. 根据权利要求21所述的药物组合物, 其用于AD的预防用途、治疗用途或改善用途。

23. 根据权利要求21所述的药物组合物, 其用于改善AD患者的认知功能。

24. 根据权利要求21所述的药物组合物, 其用于改善AD患者的记忆障碍。

25. 诊断用组合物, 其含有权利要求1~权利要求13中任一项所述的抗体或其免疫反应性片段。

26. 根据权利要求25所述的诊断用组合物, 其用于AD的诊断。

27. 用于测定AB的毒性构象异构体的试剂盒, 其含有权利要求1~权利要求13中任一项所述的抗体或其免疫反应性片段。

28. 用于测定AB的毒性构象异构体的组合物, 其含有权利要求1~权利要求13中任一项所述的抗体或其免疫反应性片段。

29. 被检物中的AB的毒性构象异构体水平的测定方法, 其包括:

使被检物与权利要求1~权利要求13中任一项所述的抗体或其免疫反应性片段接触的步骤。

30. AD的诊断方法, 其包括以下步骤:

a) 使源自受试者的试样与权利要求1~权利要求13中任一项所述的抗体或其免疫反应性片段中的至少1个在体外接触的步骤,

b) 测定与上述抗体或其免疫反应性片段结合的抗原的水平的步骤, 以及,

c) 根据确定的抗原水平, 诊断上述受试者中的AD的有无或程度的步骤,

其中, 在与权利要求1~权利要求13中任一项所述的抗体或其免疫反应性片段结合的抗原的水平高于源自健康人的试样的该水平的情况下, 诊断为罹患AD的可能性高。

31. AD的诊断方法, 其包括以下步骤:

a) 使源自受试者的试样与权利要求1~权利要求13中任一项所述的抗体或其免疫反应性片段中的至少1个接触的步骤,

b) 测定与上述抗体或其免疫反应性片段结合的抗原的水平的步骤,

c) 通过使AB的结构非特异性抗AB抗体与源自受试者的试样接触并测定其结合物的量, 测定源自受试者的试样中的总AB量的步骤, 以及,

d) 计算在源自受试者的试样中, 与权利要求1~权利要求13中任一项所述的抗体或其免疫反应性片段结合的抗原的水平和总AB的水平之间的比值, 由确定的该比值判定上述受试者中AD的有无或程度的步骤,

其中, 在与权利要求1~权利要求13中任一项所述的抗体或其免疫反应性片段结合的抗原的水平和总AB的水平之间的比值高于源自健康人的试样中的该比值的情况下, 判定为罹患AD的可能性高。

32. 确定被检物中是否存在淀粉样蛋白 β 的毒性构象异构体的方法,其包括以下步骤:

(a) 使权利要求1~权利要求13中任一项所述的抗体或其免疫反应性片段与被检物接触的步骤,

(b) 检测与上述抗体或其免疫反应性片段结合的淀粉样蛋白 β 的毒性构象异构体的步骤,以及

(c) 在上述步骤中检测出淀粉样蛋白 β 的毒性构象异构体的情况下,判定被检物中存在淀粉样蛋白 β 的毒性构象异构体,在上述步骤中未检测出淀粉样蛋白 β 的毒性构象异构体的情况下,判定被检物中不存在淀粉样蛋白 β 的毒性构象异构体的步骤。

33. 确定被检物中的淀粉样蛋白 β 的毒性构象异构体的水平的方法,其包括以下步骤:

(a) 使权利要求1~权利要求13中任一项所述的抗体或其免疫反应性片段与被检物接触的步骤,

(b) 测定与上述抗体或其免疫反应性片段结合的淀粉样蛋白 β 的毒性构象异构体量的步骤,以及

(c) 由上述检测的毒性构象异构体量,计算出被检物中的淀粉样蛋白 β 的毒性构象异构体的水平的步骤。

极其特异性识别淀粉样蛋白 β 的22位及23位的转角结构的 抗体

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请基于2014年12月12日在日本提出申请的日本特愿2014-251898号、及2015年5月22日在日本提出申请的日本特愿2015-104411号要求优先权,并将该申请中记载的内容全部通过参照直接援引于本说明书。另外,在本申请中引用的全部专利、日本专利申请及文献中记载的内容全部通过参照直接援引至本说明书。

技术领域

[0003] 本发明涉及极其特异性识别22位和23位的氨基酸具有转角结构的淀粉样蛋白 β 的抗体、利用该抗体对22位和23位的氨基酸具有转角结构的淀粉样蛋白 β 进行测定的方法、以及阿尔茨海默病的诊断及治疗方法。

背景技术

[0004] 阿尔茨海默病(以下称“AD”)一般以老年斑中淀粉样蛋白的蓄积为特征。淀粉样蛋白由淀粉样蛋白 β 蛋白质(以下称为“ $A\beta$ ”),特别是包括40及42个残基的氨基酸的 $A\beta$ (以下分别称为“ $A\beta 40$ ”及“ $A\beta 42$ ”)构成。这些蛋白质是淀粉样蛋白前体蛋白质(APP)被 β -以及 γ -分泌酶这两种蛋白酶分解而生成的。可以认为:在AD的发病中, $A\beta 42$ 因其凝集倾向、神经毒性而承担着比 $A\beta 40$ 更为重要的作用。最近的研究表明,氧化应激对与AD关联的神经变性做出贡献。介导自由基的形成的 $A\beta 42$ 的神经毒性与伴随活性氧物质的生成的10位的酪氨酸以及35位的甲硫氨酸的自由基化密切相关。另一方面,有证据显示, $A\beta$ 寡聚物的积累通过突触毒性诱导AD。

[0005] 若对AD模型小鼠接种 $A\beta$ 凝聚体作为疫苗,则减少脑内的 $A\beta$ 沉积,抑制认知功能障碍,因而可以认为利用 $A\beta$ 赋予免疫是有希望的AD治疗方法。但是,虽然进行了用 $A\beta 42$ 免疫AD患者的临床试验(AN1792),但因过度免疫活化这种严重的副作用而中止。此后,将抗 $A\beta$ 抗体作为AD治疗药期待,直到目前仍持续进行着开发。

[0006] 本发明人等已报告了,根据与迄今为止系统的脯氨酸置换法共同使用固体NMR法的研究,区分了 $A\beta 42$ 的22位及23位具有转角结构的毒性构象异构体与 $A\beta 42$ 的25位及26位具有转角结构的生理构象异构体,并且前一种构象异构体显示出较强的凝集能力和神经毒性(非专利文献1、专利文献1)。

[0007] 进一步,本发明人等已报告了,可以通过将 $A\beta$ 的22位的谷氨酸置换成脯氨酸而在该部位将转角结构固定的肽用作抗原,制作特异性识别 $A\beta 42$ 的22位和23位的氨基酸具有转角结构的毒性构象异构体的抗体(专利文献2)。

[0008] 现有技术文献

[0009] 专利文献

[0010] 专利文献1:日本特开2006-265189号

[0011] 专利文献2:国际公开W02011/045945号

[0012] 非专利文献

[0013] 非专利文献1:K.Murakami等人(2005) J.Am.Chem.Soc.,127:15168-15174

发明内容

[0014] 本发明人等考虑,迄今为止AB是否是通过在22位及23位的氨基酸具有转角结构,从而促进淀粉样蛋白的凝聚而与AD发病关联,作为已经报告的特异性识别22位和23位的氨基酸具有转角结构的AB(以下称为“22,23-转角AB”)的抗体,使用了IBL-101抗体(保藏机构:独立行政法人产业技术综合研究所、日本专利生物保藏中心(日本国茨城县筑波市东1-1-1筑波中心中央第6);保藏日:2009年10月14日;保藏号:FERM BP-11290)对AD的诊断及治疗的应用进行了研究。特别是,由于IBL-101抗体有与聚合的野生型AB的结合力也较强、且对不具有转角结构的AB的结合力弱的特异性,因此期待其在AD的诊断及治疗中的应用。但是,针对IBL-101抗体的研究进展的结果认为:虽然在使用AD模型小鼠的治疗实验中提示有一定的效果,但其尚未达到能够作为治疗药进行实用的程度。因此,本发明人等针对IBL-101抗体的这样的问题的原因,进行了进一步分析。

[0015] 其结果,本发明人等注意到,IBL-101抗体虽然对22位及23位的氨基酸具有转角结构的AB及野生型AB的寡聚物有比较高的识别,但对22位及23位不具有转角结构的其它AB也可以少量结合。另外,本发明人等对除了IBL-101抗体以外的22,23-转角AB有特异性的各种抗体进行了研究,结果发现:与IBL-101抗体比较而在特异性方面优异的抗体,在使用AD模型小鼠的治疗实验中具有优异的认知功能改善效果等。特别是,这样的抗体显示出了以下在迄今为止的抗体中没有发现的优异的效果:即使进行单次施用也可改善已AD发病的小鼠的记忆能力。另外,使用该抗体测定了AD患者和健康人的脑脊髓液(CSF)中的AB量,结果确认了在AD患者中与该抗体结合的AB量较多。进一步进行分析,结果确认:在AD患者中,与该抗体结合的AB量相对于总AB量的比值较大。因此,对本发明的抗体的结合特性进行了进一步详细的研究,结果确认:在具有多个转角结构、直线状结构等各种结构的AB中,其尤其对于22,23-转角AB的特异性极高,而几乎没有观察到与具有其它结构的AB结合。进一步分析了该抗体对认为在AD中最发挥毒性的AB寡聚物的结合特性,结果发现,与22,23-转角AB单体的结合相比,与22,23-转角AB寡聚物的结合更强。根据这些结果,本发明人等发现:在AD的诊断及治疗中,利用与22,23-转角AB单体非常特异性结合(即,与其它结构的AB几乎不结合),优选为进一步与22,23-转角AB的寡聚物强力结合的抗体十分重要。换言之,本发明人等发现,通过使用极其特异性识别22,23-转角AB的抗体,或极其特异性识别22,23-转角AB且与22,23-转角AB的寡聚物强力结合的抗体,使AD的治疗及诊断成为可能。

[0016] 认为迄今为止的以AB为靶标的免疫疗法特别是AB疫苗(AN1792)、抗AB单体抗体的副作用、效果低的原因之一,是与生理的(没有毒性的)AB₄₂的结合。实际上,已知AB单体也存在抗炎症作用等优点(Sci Transl Med.2012August 1;4(145):145ra105.),已知生理上也承担了重要的功能。除了抗AB单体抗体的副作用高以外,已知AB虽然通过变为寡聚物而发挥毒性,但进一步凝聚变为纤丝而不具有毒性,因此目前以AB为靶标的抗体医药品开发,以与生理的AB区分、仅对具有毒性的AB进行靶向化为战略,利用了与AB单体、纤丝不结合的,仅与AB寡聚物结合的抗体(Aducanumab,Crenezumab,BAN2401)。即,传统构思是:不以结构来区别AB单体,仅根据其聚合化的程度作为有无毒性的根据。本发明人等迄今为止已报

告了即使是相同的A β 单体,其结构中也存在可发挥毒性的结构的假设,根据本发明,首次发现:为了发挥AD的治疗效果、诊断效果,抗体“极其”特异性识别22,23-转角A β 十分重要。即,本发明人等首次发现,迄今为止对结构无区别地理解的A β 单体,实际上极其细致地通过其结构控制了功能,22,23-转角A β 是凝聚性高(毒性高)的A β ,与此相对,具有其它结构的A β 是凝聚性低(毒性低、生理上)的A β ,以及,在将抗A β 抗体作为AD治疗药、诊断试剂进行开发方面最重要的是极其特异性地靶向22,23-转角A β ,可以解决副作用的问题、效果低的问题。进一步,本发明的抗体由于不仅可以以A β 寡聚物为靶标、也可以以A β 单体为靶标,因此可以从A β 的凝聚进行前(产生A β 寡聚物前)的单体阶段来抑制A β 的凝聚,根据这点,能够提供比以往开发的抗体药物更优异的药物。

[0017] 因而,本发明涉及极其特异性识别22位和23位的氨基酸具有转角结构的A β 的抗体及其用途。本发明特别涉及与22,23-转角A β 结合,且不与具有除此以外的结构的A β 结合的针对22,23-转角A β 的特异性抗体及其用途。具体而言,本发明涉及以下发明。需要说明的是,在以下(1)~(31)或本说明书整体中,“22位和23位的氨基酸具有转角结构的A β ”的语句可以与“E22P-A β ”或“IBL-102抗体结合的A β ”调换。

[0018] (1) 抗体或其免疫反应性片段,其极其特异性识别22位和23位的氨基酸具有转角结构的A β ,且不识别具有其它结构的A β 。

[0019] (2) 根据(1)所述的抗体或其免疫反应性片段,其进一步识别A β 的寡聚物。

[0020] (3) 根据(2)所述的抗体或其免疫反应性片段,其中,A β 的寡聚物为二聚物。

[0021] (4) 根据(1)~(3)中任一项所述的抗体或其免疫反应性片段,其中,A β 为A β 42。

[0022] (5) 根据(1)~(4)中任一项所述的抗体或其免疫反应性片段,其中,A β 的其它结构,至少包含选自以下结构中的1种以上:

[0023] A β 的21位及22位的氨基酸处的转角结构、A β 的23位及24位的氨基酸处的转角结构、A β 的24位及25位的氨基酸处的转角结构、A β 的25位及26位的氨基酸处的转角结构、及A β 的35位及36位的氨基酸处的转角结构。

[0024] (6) 抗体或其免疫反应性片段,其极其特异性识别与VH具有序列编号4中记载的氨基酸序列且VL具有序列编号11中记载的氨基酸序列的抗体结合的表位,且不识别不与VH具有序列编号4中记载的氨基酸序列且VL具有序列编号11中记载的氨基酸序列的抗体结合的表位。

[0025] (7) 抗体或其免疫反应性片段,其竞争抑制VH具有序列编号4中记载的氨基酸序列且VL具有序列编号11中记载的氨基酸序列的抗体与其抗原之间的结合,且不结合不与VH具有序列编号4中记载的氨基酸序列且VL具有序列编号11中记载的氨基酸序列的抗体结合的表位。

[0026] (8) 抗体或其免疫反应性片段,其重链可变区的CDR1、CDR2及CDR3分别具有序列编号5、序列编号6及序列编号7中记载的氨基酸序列。

[0027] (9) 根据(8)所述的抗体或其免疫反应性片段,进一步,其轻链可变区的CDR1、CDR2及CDR3分别具有序列编号12、序列编号13及序列编号14中记载的氨基酸序列。

[0028] (10) 根据(1)~(7)中任一项所述的抗体或其免疫反应性片段,其重链可变区的CDR1、CDR2及CDR3分别具有序列编号5、序列编号6及序列编号7中记载的氨基酸序列。

[0029] (11) 根据(10)所述的抗体或其免疫反应性片段,进一步,其轻链可变区的CDR1、

CDR2及CDR3分别具有序列编号12、序列编号13及序列编号14中记载的氨基酸序列。

[0030] (12) 抗体或其免疫反应性片段,其VH具有序列编号4中记载的氨基酸序列。

[0031] (13) 根据(12)所述的抗体或其免疫反应性片段,进一步,其VL具有序列编号11中记载的氨基酸序列。

[0032] (14) 核酸分子,其编码具有序列编号4中记载的氨基酸序列的抗体或其免疫反应性片段。

[0033] (15) 根据(14)所述的核酸分子,其为由序列编号1的第126位~第479位的核苷酸序列组成的核酸分子。

[0034] (16) 核酸分子,其编码具有序列编号11中记载的氨基酸序列的抗体或其免疫反应性片段。

[0035] (17) 根据(16)所述的核酸分子,其为由序列编号8的第130位~第465位的核苷酸序列组成的核酸分子。

[0036] (18) 载体,其能够表达具有序列编号4中记载的氨基酸序列的抗体或其免疫反应性片段、和/或具有序列编号11中记载的氨基酸序列的抗体或其免疫反应性片段。

[0037] (19) 根据(18)所述的载体,其含有(14)或(15)所述的核酸分子、和/或(16)或(17)所述的核酸分子。

[0038] (20) 宿主细胞,其包含(18)或(19)所述的载体。

[0039] (21) 药物组合物,其含有(1)~(13)中任一项所述的抗体或其免疫反应性片段。

[0040] (22) 根据(21)所述的药物组合物,其用于AD的预防用途、治疗用途或改善用途。

[0041] (23) 根据(21)所述的药物组合物,其用于改善AD患者的认知功能。

[0042] (24) 根据(21)所述的药物组合物,其用于改善AD患者的记忆障碍。

[0043] (25) 诊断用组合物,其含有(1)~(13)中任一项所述的抗体或其免疫反应性片段。

[0044] (26) (25)所述的诊断用组合物,其用于AD的诊断。

[0045] (27) 用于测定AB的毒性构象异构体的试剂盒,其含有(1)~(13)中任一项所述的抗体或其免疫反应性片段。

[0046] (28) 用于测定AB的毒性构象异构体的组合物,其含有(1)~(13)中任一项所述的抗体或其免疫反应性片段。

[0047] (29) 被检物中的AB的毒性构象异构体水平的测定方法,其包括使被检物与(1)~(13)中任一项所述的抗体或其免疫反应性片段接触的步骤。

[0048] (30) AD的诊断方法,其包括以下步骤:

[0049] a) 使源自受试者的试样与(1)~(13)中任一项所述的抗体或其免疫反应性片段中的至少1个在体外接触的步骤,

[0050] b) 测定与上述抗体或其免疫反应性片段结合的抗原的水平,的步骤,以及,

[0051] c) 根据确定的抗原水平,诊断上述受试者中的AD的有无或程度的步骤。

[0052] 其中,在与(1)~(13)中任一项所述的抗体或其免疫反应性片段结合的抗原的水平高于源自健康人的试样的该水平的情况下,诊断为罹患AD的可能性高。

[0053] (31) AD的诊断方法,其包括以下步骤:

[0054] a) 使源自受试者的试样与(1)~(13)中任一项所述的抗体或其免疫反应性片段中的至少1个接触的步骤,

[0055] b) 测定与上述抗体或其免疫反应性片段结合的抗原的水平步骤，

[0056] c) 通过使AB的结构非特异性抗AB抗体与源自受试者的试样接触并测定其结合物的量，测定源自受试者的试样中的总AB量的步骤，以及，

[0057] d) 计算在源自受试者的试样中，与(1)～(13)中任一项所述的抗体或其免疫反应性片段结合的抗原的水平和总AB的水平之间的比值，由确定的该比值判定上述受试者中AD的有无或程度的步骤，

[0058] 其中，在与(1)～(13)中任一项所述的抗体或其免疫反应性片段结合的抗原的水平和总AB的水平之间的比值高于源自健康人的试样中的该比值的情况下，判定为罹患AD的可能性高。

[0059] (32) 确定被检物中是否存在淀粉样蛋白 β 的毒性构象异构体的方法，其包括以下步骤：

[0060] (a) 使(1)～(13)中任一项所述的抗体或其免疫反应性片段与被检物接触的步骤，

[0061] (b) 检测与上述抗体或其免疫反应性片段结合的淀粉样蛋白 β 的毒性构象异构体的步骤，以及

[0062] (c) 在上述步骤中检测出淀粉样蛋白 β 的毒性构象异构体的情况下，判定被检物中存在淀粉样蛋白 β 的毒性构象异构体，在上述步骤中未检测出淀粉样蛋白 β 的毒性构象异构体的情况下，判定被检物中不存在淀粉样蛋白 β 的毒性构象异构体的步骤。

[0063] (33) 确定被检物中的淀粉样蛋白 β 的毒性构象异构体的水平的方法，其包括以下步骤：

[0064] (a) 使(1)～(13)中任一项所述的抗体或其免疫反应性片段与被检物接触的步骤，

[0065] (b) 测定与上述抗体或其免疫反应性片段结合的淀粉样蛋白 β 的毒性构象异构体量的步骤，以及

[0066] (c) 由上述检测的毒性构象异构体量，计算出被检物中的淀粉样蛋白 β 的毒性构象异构体的水平的步骤。

[0067] 在本说明书中，“22位和23位的氨基酸具有转角结构的AB”是指第22位的氨基酸及第23位的氨基酸处具有弯折(转角)结构(立体结构)的AB(本说明书中称为“22,23-转角AB”)。22,23-转角AB包括22,23-转角AB42及22,23-转角AB40，优选为22,23-转角AB42。另外，“淀粉样蛋白 β 的22位及23位的氨基酸处的转角结构”是指AB的第22位的氨基酸及第23位的氨基酸处的弯折(转角)结构(立体结构)。以下，在本说明书中将AB的第22位的氨基酸及第23位的氨基酸处的转角结构和/或具有该结构的AB总称为“AB的毒性构象异构体”。淀粉样蛋白 β 的22位及23位的氨基酸处的转角结构，可以为例如，在第22位的谷氨酸置换为脯氨酸的AB突变体(E22P-AB42或E22P-AB40等E22P-AB)中，在第22位的氨基酸及第23位的氨基酸处有弯折(转角)结构。另外，在其它表述中，由于本发明的IBL-102抗体仅识别具有这样的结构的AB，“22位和23位的氨基酸具有转角结构的AB”也可以与“IBL-102抗体识别的AB”调换。

[0068] 在本说明书中，AB是淀粉样蛋白 β 的简称，AB42指具有序列编号15中记载的氨基酸序列的肽，AB40指具有序列编号16中记载的氨基酸序列的肽。在本说明书中，“淀粉样蛋白 β 的22位及23位”或“22位和23位的氨基酸具有转角结构的AB”等表述中，所述22位及23位分别是指：序列编号15及序列编号16中的第22位及第23位的氨基酸(分别为野生型中的谷氨

酸及天冬氨酸)的位置。

[0069] 本发明涉及极其特异性识别“22位和23位的氨基酸具有转角结构的A β ”和/或“淀粉样蛋白 β 的22位及23位的氨基酸处的转角结构”(A β 的毒性构象异构体)的抗体或其免疫反应性片段。因而,本发明的抗体极其特异性识别22,23-转角A β 42和/或22,23-转角A β 40。

[0070] 基于本发明的抗体或其免疫反应性片段的A β 的毒性构象异构体的识别,可以不依赖于第22位的氨基酸的种类。即,本发明的抗体或其免疫反应性片段识别的“表位”,虽然在22位和23位的氨基酸具有转角结构的A β 中存在的结构及氨基酸(除了第22位的谷氨酸以外)是必需的,但第22位的氨基酸可以不必须为谷氨酸。另外,对本发明的极其特异性识别A β 的毒性构象异构体的抗体而言,只要极其特异性识别22位及23位的氨基酸处具有转角结构的A β 即可,对其识别部位没有限制。本发明的极其特异性识别A β 的毒性构象异构体的抗体的识别部位可以为例如,A β 的23位的氨基酸(天冬氨酸)和/或与其相邻的氨基酸,例如,从A β 的22位或23位的氨基酸起的1~10个残基(优选为1~5个、1~4个、1~3个残基)以内的氨基酸。例如,本发明的抗体也可以为极其特异性识别A β 的毒性构象异构体,且识别A β 的23位的氨基酸(天冬氨酸)的抗体。或者,本发明的极其特异性识别A β 的毒性构象异构体的抗体,也可以识别存在于距22位及23位为远位的A β 上的立体表位,该表位可通过22位和23位的氨基酸具有转角结构而产生。例如,本发明的抗体也可以识别A β 的形成分子间 β 片层(sheet)的区域。更优选本发明的抗体识别在这样的区域存在的第27位的天冬酰胺及第31位的异亮氨酸。进一步,本发明的抗体也可以与A β 的第3位的谷氨酸及第4位的苯丙氨酸结合。进一步,本发明的抗体也可以与A β 的第11位的谷氨酸、第12位的缬氨酸、第13位的组氨酸及第14位的组氨酸结合。

[0071] A β 凝聚而形成寡聚物,进一步进行凝聚形成原纤维,进一步凝聚发展则形成纤丝。认为在AD发病中,寡聚物、原纤维等可溶性凝聚体发挥某些毒性。在本说明书中,“A β 的寡聚物”是指从A β 的二聚物到二十聚体或90~650kDa的A β 的凝聚体。例如,A β 的寡聚物包括A β 的二聚物、三聚物、四聚物、五聚物、六聚物、七聚物、八聚物、九聚物、十聚物及原纤维。在某种实施方案中,A β 的寡聚物为形成分子间 β 片层的多聚体。

[0072] 优选本发明的抗体也可以与A β (优选为22,23-转角A β 或E22P-A β 42)的寡聚物(例如,二聚物)结合。即,在一个实施方案中,本发明涉及与22,23-转角A β 和/或E22P-A β 42的单体及寡聚物(例如:二聚物)中的两者结合的抗体或其免疫反应性片段。

[0073] 已知A β 除了22位和23位的氨基酸具有转角结构的结构以外,也可取接近直线的结构、25位及26位的氨基酸处具有转角结构的结构等各种结构。在本说明书中,(除了22位和23位的氨基酸具有转角结构的结构以外的)“其它结构”是指除了22位和23位的氨基酸具有转角结构的结构以外的A β 的结构,具体包括:A β 的21位及22位的氨基酸处的转角结构、A β 的23位及24位的氨基酸处的转角结构、A β 的24位及25位的氨基酸处的转角结构、A β 的25位及26位的氨基酸处的转角结构、A β 的35位及36位的氨基酸处的转角结构及直线状的结构(接近直线的结构,及不包含在转角结构中的结构,以下相同)。或者,“其它结构”也可以包括:A21P-A β 42、E22V-A β 42、D23P-A β 42、V24P-A β 42、G25P-A β 42、G33P-A β 42、L34P-A β 42、M35P-A β 42、V36P-A β 42、G37P-A β 42、G38P-A β 42、V39P-A β 42、V40P-A β 42和/或I41P-A β 42具有的结构,例如,这些肽具有的转角结构。另外,“具有其它结构的A β ”是指具有除了22位及23位的氨基酸处的转角结构以外的结构的A β ,具体而言包括:具有A β 的21位及22位的氨基酸处的转角

结构的A β 、具有A β 的23位及24位的氨基酸处的转角结构的A β 、具有A β 的24位及25位的氨基酸处的转角结构的A β 、具有A β 的25位及26位的氨基酸处的转角结构的A β 、具有A β 的33位及34位的氨基酸处的转角结构的A β 、具有A β 的34位及35位的氨基酸处的转角结构的A β 、具有A β 的35位及36位的氨基酸处的转角结构的A β 、具有A β 的36位及37位的氨基酸处的转角结构的A β 、具有A β 的37位及38位的氨基酸处的转角结构的A β 、具有A β 的38位及39位的氨基酸处的转角结构的A β 、具有A β 的40位及41位的氨基酸处的转角结构的A β 、具有A β 的41位及42位的氨基酸处的转角结构的A β 和/或具有直线状的结构A β 。或者,“具有其它结构的A β ”可以包括具有以下结构的A β :A21P-A β 42、E22V-A β 42、D23P-A β 42、V24P-A β 42、G25P-A β 42、G33P-A β 42、L34P-A β 42、M35P-A β 42、V36P-A β 42、G37P-A β 42、G38P-A β 42、V39P-A β 42、V40P-A β 42、和/或I41P-A β 42具有的结构。

[0074] 在一个实施方案中,本发明涉及极其特异性识别22,23-转角A β 和/或A β 的22位及23位的氨基酸处的转角结构的抗体。在其他实施方案中,本发明涉及特异性识别22,23-转角A β 和/或A β 的22位及23位的氨基酸处的转角结构,且不识别具有其它结构的A β 和/或A β 其它结构的抗体。即,本发明的抗体或其免疫反应性片段特异性识别22,23-转角A β 或A β 的22位及23位的氨基酸处的转角结构,且不识别具有其它结构的A β 和/或A β 其它结构,例如,除了A β 以外的部位处的转角结构。在本说明书中,“不结合”及“不识别”不是指完全不结合或完全不识别,而是指在能够充分识别目的抗原(A β 的毒性构象异构体)的程度上,与其它结构的亲和性较低。例如,对“不结合”及“不识别”而言,也可以指利用ELISA或EIA针对被检抗体与具有其它结构的A β 或A β 的其它结构之间的结合进行检测的强度(例如:荧光强度),与同样利用ELISA或EIA针对该被检抗体的对A β 的毒性构象异构体的结合进行检测的强度比较,为1/3以下、1/4以下、1/5以下、1/6以下、1/7以下、1/8以下、1/9以下、1/10以下、1/20以下、1/30以下、1/40以下、1/50以下、1/100以下。利用ELISA或EIA的检测,可以按照后述的(使用抗体分子的公知的测定方法)的记载进行。例如,对本发明的抗体而言,相对于主反应(相对于22,23-转角A β 或E22P-A β 42的结合),与选自A21P-A β 42、E22V-A β 42、D23P-A β 42、V24P-A β 42、G25P-A β 42、G33P-A β 42、L34P-A β 42、M35P-A β 42、V36P-A β 42、G37P-A β 42、G38P-A β 42、V39P-A β 42、V40P-A β 42及I41P-A β 42中的1种以上的任意肽(包括为全部的情况)结合的交叉反应率,可以为10%以下、8%以下、5%以下、4%以下、3%以下、2%以下、1%以下、0.5%以下或0.3%以下。或者,对本发明的抗体而言,相对于主反应(相对于22,23-转角A β 或E22P-A β 42的结合),与A21P-A β 42、E22V-A β 42、D23P-A β 42、V24P-A β 42、G25P-A β 42及M35P-A β 42的结合的交叉反应率,可以为分别依次为0.3%以下、0.3%以下、0.5%以下、0.4%以下、0.6%以下及0.7%以下,以及分别依次为0.27%以下、0.28%以下、0.50%以下、0.33%以下、0.53%以下及0.68%以下。交叉反应率可以用后述(交叉反应率)中记载的方法确定。

[0075] 在本说明书中,抗体或其免疫反应性片段“特异性”识别(结合)是指,对该抗体或其免疫反应性片段而言,与对具有其它氨基酸序列、其它立体结构的肽或蛋白质的亲和性相比,实质上以高的亲和性与A β 的毒性构象异构体结合。在本说明书中,抗体或其免疫反应性片段“极其特异性”识别(结合)是指,对该抗体或其免疫反应性片段而言,与对具有与其表位或抗原非常近似的其它氨基酸序列、其它立体结构的肽或蛋白质的亲和性相比,实质上以高亲和性与其表位或抗原结合。例如,本发明的抗体“极其特异性”识别(结合)也可以指,与对具有与作为其抗原的A β 同一氨基酸序列或者与E22P-A β 42接近的氨基酸序列(1~2

个氨基酸的差异)的肽,或具有与作为其抗原的A β 同一氨基酸序列或者接近E22P-A β 42的氨基酸序列(有1~2个氨基酸的差异)且具有非常接近的立体结构的肽或蛋白质,即,与相对于A β (22,23-转角A β 除外)或A β 突变体(例如:A21P-A β 42、D23P-A β 42、V24P-A β 42、G25P-A β 42、G33P-A β 42、L34P-A β 42、M35P-A β 42、V36P-A β 42、G37P-A β 42、G38P-A β 42、V39P-A β 42、V40P-A β 42和/或I41P-A β 42)的亲合性相比,实质上以高亲合性与22,23-转角A β 或者E22P-A β 42(或A β 的22位及23位的氨基酸处的转角结构)结合。这里,“实质上以高亲合性结合”是指利用希望的测定装置或方法,能够将目标的特定的氨基酸序列、立体结构与其它氨基酸序列、立体结构区分并检测的程度的高亲合性。例如,实质上以高亲合性,也可以指作为利用ELISA或EIA检测的强度(例如:荧光强度)为3倍以上、4倍以上、5倍以上、6倍以上、7倍以上、8倍以上、9倍以上、10倍以上、20倍以上、30倍以上、40倍以上、50倍以上、100倍以上。因而,在一个实施方案中,本发明涉及抗体或其免疫反应性片段,其虽然与E22P-A β 42极其特异性结合,但不结合选自以下的肽中的1种以上(优选为全部):A21P-A β 42、D23P-A β 42、V24P-A β 42、G25P-A β 42、G33P-A β 42、L34P-A β 42、M35P-A β 42、V36P-A β 42、G37P-A β 42、G38P-A β 42、V39P-A β 42、V40P-A β 42和/或I41P-A β 42。

[0076] 另外,例如:本发明的抗体“极其特异性”识别(结合)也可以指,即使在该抗体或其免疫反应性片段为高浓度的情况下,也不和与该抗体或其免疫反应性片段的表位或抗原非常近似的其它氨基酸序列、其它立体结构相结合。例如:本发明的抗体“极其特异性”识别(结合)也可以指,高浓度的该抗体或其免疫反应性片段,和对具有与其表位或抗原和非常近似的其它氨基酸序列、其它立体结构的肽或蛋白质的亲合性相比,实质上以高亲合性与其表位结合。这里,高浓度的抗体或其免疫反应性片段可以为例如:15ng/mL或更高、30ng/mL或更高、40ng/mL或更高、50ng/mL或更高、60ng/mL或更高、70ng/mL或更高、80ng/mL或更高、90ng/mL或更高、100ng/mL或更高、110ng/mL或更高、120ng/mL或更高、130ng/mL或更高、140ng/mL或更高、或者150ng/mL或更高。另外,这样的特异性也可以例如在ELISA或EIA测定中测得。

[0077] 作为本发明的抗体与A β 的毒性构象异构体或E22P-A β 42结合的结合速度常数(Ka1),可列举例如: $1 \times 10^4 \text{Ms}^{-1}$ 以上、 $1 \times 10^5 \text{Ms}^{-1}$ 以上、 $2 \times 10^5 \text{Ms}^{-1}$ 以上、 $2.3 \times 10^5 \text{Ms}^{-1}$ 以上,优选为 2.32×10^5 以上。另外,作为本发明的抗体与A β 的毒性构象异构体或E22P-A β 42结合的解离速度常数(Kd1),例如为 1×10^{-3} 以下、 9×10^{-4} 以下、 8×10^{-4} 以下,优选为 7.09×10^{-4} 以下。作为本发明的抗体与A β 的毒性构象异构体或E22P-A β 42结合的结合常数(KD),例如可以为 1×10^{-8} (M)以下、 7×10^{-8} (M)以下、 5×10^{-8} (M)以下、 4×10^{-9} 以下,优选为 3.05×10^{-9} 以下。对本说明书中抗体的结合速度常数(Ka1)、解离速度常数(Kd1)及结合常数(KD)而言,可以用BIACORE(GE Healthcare Bioscience株式会社,BIACORE-X100),按照制造者提供的指南,将生物素化的E22P-A β 42或生物素化野生型A β 42固定于SA芯片,然后流入被检抗体,测定结合速度常数Ka1、解离速度常数Kd1,用二价拟合(bivalent fitting)确定结合常数KD值。

[0078] 本发明的抗体可以是多克隆抗体,也可以是单克隆抗体,优选是单克隆抗体。在本发明中,“单克隆抗体”为与单一的抗原确定基团反应,结构基本均一的抗体。而且,本发明的抗体包括非人动物的抗体、具有非人动物的抗体的氨基酸序列和来源于人的抗体的氨基酸序列的抗体、以及人抗体。作为非人动物的抗体,可以列举出例如,小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠、

兔、犬、猴、绵羊、山羊、鸡、鸭等的抗体,优选能够制作杂交瘤的动物的抗体,更优选小鼠、大鼠或兔的抗体。作为具有非人动物的抗体的氨基酸序列和来源于人的抗体的氨基酸序列的抗体,可以列举出人型嵌合抗体、人化抗体。上述中,“嵌合抗体”是非人动物来源的、其中对与AB的毒性构象异构体极其特异性结合的抗体的恒定区进行了基因工程修饰使之具有与人的抗体相同的恒定区而得到的抗体,优选是人小鼠嵌合抗体(参照欧洲专利公开公报EP0125023)。“人化抗体”是非人动物来源的、其中将与AB的毒性构象异构体极其特异性结合的抗体的H链和L链的互补识别区(CDR)以外的一级结构基因工程修饰成对应于人的抗体的一级结构而得到的抗体。这里,CDR可以依据Kabat等(“Sequences of Proteins of Immunological Interest”,Kabat,E.等,U.S.Department of Health and Human Services,1983)或Chothia等(Chothia&Lesk(1987)].Mol.Biol.,196:901-917)任何一个中的定义。“人抗体”是指作为完全的人来源的抗体基因的表达产物的人抗体,可以列举例如使用导入了参与人的抗体产生的基因的转基因动物制作的单克隆抗体(参照欧洲专利公开公报EP0546073)等。例如,在将本发明的抗体应用于治疗、预防、或通过体内施用而使用的诊断的情况下,作为本发明的抗体,优选是人-非人动物嵌合抗体、人化抗体、或人抗体。

[0079] 对本发明的抗体的免疫球蛋白类别没有特殊限制,可以是IgG、IgM、IgA、IgE、IgD、或IgY中的任何免疫球蛋白类别(同种型),优选IgG。另外,在本发明的抗体为IgG的情况下,可以为任意亚类(IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)。另外,本发明的抗体可以是单特异性、双特异性(双重特异性抗体)、三特异性(三重特异性抗体)(例如:W01991/003493号)。

[0080] 已知对抗体而言,其可变区(特别是CDR)赋予结合特性,即使不是完全抗体的抗体片段,也能够利用其结合特性,这点广为本领域技术人员所知。在本说明书中,“免疫反应性片段”是指包含抗体的一部分(部分片段)的蛋白质或肽,指保持抗体对抗原的作用(免疫反应性、结合性)的蛋白质或肽。作为这样的免疫反应性片段,可列举例如:F(ab')₂、Fab'、Fab、Fab₃、单链Fv(以下称为“scFv”)、(串联)双特异性单链Fv(sc(Fv)₂)、单链三联体、纳米抗体、二价VHH、五价VHH、微抗体、(双链)二价抗体、串联二价抗体、双特异性三价抗体、双特异性双抗体、双亲和重靶向分子(DART)、三抗体(或三价抗体)、四抗体(或[sc(Fv)₂]₂)、或者(scFv-SA)₄二硫键Fv(以下称为“dsFv”)、紧凑型IgG(compact IgG)、重链抗体、或它们的聚合物(参照Nature Biotechnology,29(1):5-6(2011);Maneesh Jain et al.,TRENDS in Biotechnology,25(7)(2007):307-316;及,Christoph stein等,Antibodies(1):88-123(2012))。在本说明书中,免疫反应性片段可以为单特异性、双特异性(双重特异性)、三特异性(三重特异性)及多特异性(多重特异性)中的任意。

[0081] 作为本说明书的极其特异性识别AB的毒性构象异构体的抗体或其免疫反应性片段的具体例,可列举IBL-102抗体或其衍生物。例如,对本发明的抗体而言,可列举:(i)抗体或其免疫反应性片段,其重链可变区的CDR1、CDR2及CDR3分别具有序列编号5、序列编号6及序列编号7中记载的氨基酸序列;(ii)根据上述(i)的抗体或免疫反应性片段,进一步,其轻链可变区的CDR1、CDR2及CDR3分别为具有序列编号12、序列编号13及序列编号14中记载的氨基酸序列。或者,作为本说明书的“特异性识别淀粉样蛋白β的22位及23位的氨基酸处的转角结构的抗体或其免疫反应性片段”,可列举例如:选自以下(iii)~(viii)的抗体或其免疫反应性片段:(iii)抗体或其免疫反应性片段,其VH具有由编码序列编号4中记载的氨基酸序列的核酸序列和在严格条件下杂交的核酸序列所编码的氨基酸序列,所述抗体或其

免疫反应性片段极其特异性识别A β 的22位及23位的氨基酸处的转角结构,且不识别A β 的其它部位的转角结构,(iv)根据上述(iii)的抗体或免疫反应性片段,进一步,其VL具有由编码序列编号11中记载的氨基酸序列的核酸序列和在严格条件下杂交的核酸序列所编码的氨基酸序列;(v)抗体或其免疫反应性片段,其VH具有与序列编号4的氨基酸序列有80%以上的同源性的氨基酸序列,所述抗体或其免疫反应性片段极其特异性识别A β 的22位及23位的氨基酸处的转角结构,且不识别A β 的其它部位的转角结构;(vi)根据上述(v)的抗体或免疫反应性片段,进一步,其VL具有与序列编号11的氨基酸序列有80%以上的同源性的氨基酸序列;(vii)抗体或其免疫反应性片段,其VH具有序列编号4中记载的氨基酸序列;(viii)根据上述(vii)的抗体或免疫反应性片段,进一步,其VL具有序列编号11中记载的氨基酸序列。这里,上述(iii)~(vi)的抗体或其免疫反应性片段也可以进一步为,重链可变区的CDR1、CDR2及CDR3分别具有序列编号5、序列编号6及序列编号7中记载的氨基酸序列,和/或轻链可变区的CDR1、CDR2及CDR3分别具有序列编号12、序列编号13及序列编号14中记载的氨基酸序列。在本说明书中提及的“IBL-102单克隆抗体”,在广义上(尤其除去以此方式解释不合适的情况)有时包括上述(i)~(viii)中记载的抗体及它们的免疫反应性片段。

[0082] 在本说明书中,“序列编号5、序列编号6及序列编号7中记载的氨基酸序列”也可以分别替换为以从左上向右侧读的出现顺序在图10所示的作为IBL-102HC的氨基酸序列中的利用下划线及粗体显示的3种氨基酸序列。即,可以为序列编号5(DYNMD)、序列编号6(DINPNTGVTIDNPKFKG)、序列编号7(LPDNYVMDY)。另外,在本说明书中,“序列编号12、序列编号13及序列编号14中记载的氨基酸序列”的语句也可以分别替换为从左上方向右侧读的出现顺序在图10所示的作为IBL-102LC的氨基酸序列中的利用下划线及粗体显示的3种氨基酸序列。即,可以为序列编号12(RCSQSLVHRNGNTNLH)、序列编号13(KVSNRFS)、序列编号14(SQSTYVPLT)。在本说明书中,“序列编号4中记载的氨基酸序列”的语句也可以替换为图10所示的作为IBL-102HC的氨基酸序列中的框内的氨基酸序列。另外,在本说明书中,“序列编号11中记载的氨基酸序列”的语句也可以替换为图10所示的作为IBL-102LC的氨基酸序列中的框内的氨基酸序列。

[0083] 本说明书中提供的IBL-102单克隆抗体可以和与AD之间的相关关系高的物质结合,另外,由于具有一定的治疗效果,可知IBL-102单克隆抗体结合的抗原(或具有IBL-102单克隆抗体结合的表位的蛋白质)与AD的发病和进一步恶化、A β 的毒性发挥有深刻的关系。在由同样在A β 的22位及23位的氨基酸处包含转角结构的抗原获得的IBL-101抗体中,未确认到这样的效果。因而表明,以和IBL-102同样的特异性与IBL-102单克隆抗体结合的抗原(或表位)进行结合的抗体或其免疫反应性片段,可以与IBL-102单克隆抗体同样利用于AD的诊断及治疗。因而,在其他实施方案中,本发明涉及抗体或其免疫反应性片段,其极其特异性结合与IBL-102单克隆抗体结合的抗原(或表位)。例如,本发明可以为抗体或其免疫反应性片段,其极其特异性识别IBL-102抗体结合的在A β 内可能存在的表位,且不识别IBL-102抗体不结合的在A β 内可能存在的表位。或者,本发明可以为抗体或其免疫反应性片段,其极其特异性识别IBL-102抗体结合的A β (或者说,E22P-A β 42),且不识别IBL-102抗体不结合的具有其它结构的A β 。在其他实施方案中,本发明涉及抗体或其免疫反应性片段,该抗体或其免疫反应性片段与IBL-102抗体和A β (例如:22,23-转角A β 、E22P-A β 42或A β 寡聚物(包括E22P-A β 42的寡聚物))的特异性结合进行竞争,优选为进一步不结合具有IBL-102抗体不

结合的结构的重链。

[0084] 在本说明书中,被检抗体是否极其特异性识别(结合)目的表位或目的抗原,可以通过检查该抗体与具有该表位的肽或该抗原的结合,及该抗体与具有其它表位、其它结构的抗原或其它抗原的结合来判定。这样的结合的测定,可以按照后述(使用抗体分子的公知的测定方法)的记载进行。另外,被检抗体是否与IBL-102抗体和A β (例如:22,23-转角A β 的单体或者寡聚物,或E22P-A β 42)的特异性的结合进行竞争,可以通过比较IBL-102抗体与被检抗体共同、或IBL-102抗体单独与抗原(例如,22,23-转角A β 的单体或者寡聚物,或E22P-A β 42)接触后,已与抗原结合的IBL-102抗体的量来确定。在与被检抗体同时反应时,在IBL-102抗体与抗原的结合量少于单独添加IBL-102抗体时同一抗体对抗原的结合量的情况下,可以确定该被检抗体与IBL-102抗体进行竞争。抗体与抗原的结合的测定,可以按照后述(使用抗体分子的公知的测定方法)的记载进行。

[0085] 对极其特异性结合IBL-102单克隆抗体结合的抗原(或表位)的抗体或其免疫反应性片段而言,与IBL-102抗体和A β (或E22P-A β 42)的特异性的结合进行竞争,但与具有IBL-102抗体不结合的结构的重链不结合。极其特异性结合IBL-102单克隆抗体结合的抗原(或表位)的抗体或其免疫反应性片段,优选进一步与A β (包括E22P-A β 42)的寡聚物结合。

[0086] (核酸分子、载体、宿主细胞)

[0087] 在其他实施方案中,本发明涉及具有编码上述本发明的抗体的多核苷酸的核酸分子。具体而言,本发明的核酸分子包括:具有编码作为VH的序列编号4中记载的氨基酸的多核苷酸的核酸分子、具有编码作为VL的序列编号11中记载的氨基酸序列的多核苷酸的核酸分子、或具有编码作为VH的序列编号4中记载的氨基酸的多核苷酸及编码作为VL的序列编号11中记载的氨基酸序列的多核苷酸的核酸分子。作为编码作为VH的序列编号4中记载的氨基酸的多核苷酸,可以为例如,具有序列编号1中第126位到第479位的碱基序列的多核苷酸。另外,作为编码作为VL的序列编号11中记载的氨基酸序列的多核苷酸,可以为具有序列编号8的第130位到第465位的碱基序列的多核苷酸。进一步,本发明包括具有上述核酸分子的载体。作为这样的载体没有特别的限制,只要是能够用于抗体的表达的载体即可,可根据使用的宿主选择适当的质粒载体等。在其他实施方案中,本发明涉及含有上述载体的宿主细胞。作为宿主细胞没有特别的限制,只要是能够用于抗体的表达的宿主细胞即可,可列举哺乳类细胞(小鼠细胞、大鼠细胞、兔细胞、人细胞等)、酵母、微生物(大肠杆菌等)。

[0088] (药物组合物)

[0089] 另外,在其他实施方案中,本发明涉及含有上述本发明的抗体或其免疫反应性片段作为有效成分的药物组合物。作为本发明的药物组合物的对象疾病,可列举AD。因而,本发明的药物组合物可以作为AD的预防药、治疗药、发展抑制剂或改善药。或者,本发明的药物组合物可以作为用于改善AD患者的认知障碍(短期或者长期的记忆障碍、定向障碍(Disorientation)、学习障碍、注意力障碍、空间认知功能和/或问题解决能力的障碍)的药物组合物。或者,本发明涉及用于制造上述药物组合物的本发明的抗体或其免疫反应性片段的用途。

[0090] 本发明的药物组合物只要是可以对患者施用的制剂即可,可以采用口服或非口服的任何制剂。作为用于非口服施用的组合物,可列举例如:注射剂、滴鼻剂、栓剂、贴剂、软膏等。优选注射剂。对本发明的药物组合物的剂型而言,可列举例如:液剂或冻干制剂。将本发

明的药物组合物作为注射剂使用时,可以视需要添加丙二醇、乙二胺等增溶剂,磷酸盐等缓冲剂,氯化钠、甘油等等渗剂,亚硫酸盐等稳定剂,苯酚等防腐剂,利多卡因等去痛剂等添加剂(参照“药物品添加物事典”药事日报社,“Handbook of Pharmaceutical Excipients Fifth Edition”APhA Publications公司)。另外,在将本发明的药物组合物作为注射剂使用的情况下,作为保存容器,可列举安瓿、管形瓶、预装针、笔式注射筒及点滴用袋等。

[0091] (试剂盒)

[0092] 另外,在其他实施方案中,本发明涉及具备上述抗体或其免疫结合性片段的试剂盒。在一个实施方案中,本发明的试剂盒可以为IBL-102抗体结合的抗原的检测用或测定用的试剂盒。另外,在其他实施方案中,本发明的测定用试剂盒可以为AB的毒性构象异构体的检测用或测定用的试剂盒。在进一步的其他实施方案中,本发明的试剂盒可以为AD的诊断用。另外,本发明包括用于制造这样的试剂盒的、上述本发明的抗体或其免疫反应性片段的用途。

[0093] 本发明的试剂盒优选包含选自固相、半抗原及不溶性载体的载体。本发明的测定试剂盒可以基于使用抗体分子的公知的检测和/或测定方法。在本说明书中,“使用抗体分子的公知的检测和/或测定方法”包括例如:酶免疫测定方法(EIA法)用试剂盒、简易EIA法用试剂盒、酶联免疫吸附测定法(ELISA法)用试剂盒、放射性免疫测定法(RIA法用试剂盒)、荧光免疫测定法(FIA法)用试剂盒等标记化免疫测定法用试剂盒;Western印迹法用试剂盒等免疫印迹法用试剂盒;金胶体凝集法用试剂盒等免疫染色法用试剂盒;离子交换色谱法用试剂盒、亲和色谱法用试剂盒等色谱法用试剂盒;比浊法(TIA法)用试剂盒;散射测浊法(NIA法)用试剂盒;比色法用试剂盒;胶乳凝集法(LIA法)用试剂盒;粒子计数法(CIA法)用试剂盒;化学发光测定法(CLIA法,CLEIA法)用试剂盒;沉降反应法用试剂盒;表面等离子体共振法(SPR法)用试剂盒;共振镜检测器法(resonant mirror detector)(RMD法)用试剂盒;比较干涉法用试剂盒等。本发明的试剂盒能否实施希望的检测和/或测定可以通过以下来确认:通过根据本领域技术人员众所周知的方法,用标准被检物或目的的被检物实施各测定方法,来判定是否能够检测和/或测定。

[0094] 例如,本发明的试剂盒可以为包含(i)固定有作为第一抗体的本发明的抗体或其免疫反应性片段的固相或半抗原、及(ii)作为第二抗体的已标记的抗AB抗体(包括抗AB42抗体及抗AB40抗体,在本说明书全体中均相同)的免疫化学测定试剂盒。另外,在本发明的试剂盒包含半抗原的情况下,也可以进一步包含固定有与半抗原特异性结合的物质固相。另外,也可以将上述第一抗体制成标记化抗体,上述第二抗体制成固定化抗体。

[0095] 另外,本发明的试剂盒可以为包含(i)固定有作为第一抗体的本发明的抗体或其免疫反应性片段的固相、及(ii)固定有作为第二抗体的抗AB抗体的半抗原的免疫化学测定试剂盒。另外,该试剂盒可以进一步包含与半抗原特异性结合的已标记的物质。另外,也可以将上述第一抗体制成半抗原结合抗体,上述第二抗体制成固相固定化抗体。

[0096] 或者,本发明的试剂盒可以为包含(i)固定有作为第一抗体的本发明的抗体或其免疫反应性片段的不溶性载体,及(ii)固定有作为第二抗体的抗AB抗体的不溶性载体的免疫化学测定试剂盒。

[0097] 在上述的任意试剂盒的例子中,上述第一抗体和上述第二抗体均识别AB(包括AB42、AB40,在本说明书全体中相同)的不同部位。另外,也可以是上述第一抗体为单克隆抗体

或其免疫反应性片段,第二抗体为多克隆抗体或其免疫反应性片段;也可以是第一抗体为多克隆抗体或其免疫反应性片段,第二抗体为单克隆抗体或其免疫反应性片段;或者,也可以为第一及第二两种抗体均为单克隆抗体或其免疫反应性片段。在本说明书的试剂盒中,也可以例如为:第一抗体为上述本发明的抗体,第二抗体为特异性识别AB的N端附近(N末端起的1~20个氨基酸)或C端附近(C末端起的1~20个氨基酸)的抗体。

[0098] 在本发明的试剂盒包含已标记的抗体或其免疫结合性片段的情况下,作为该标记,可以使用放射性标记、酶、荧光标记、生物发光标记、化学发光标记金属等能够检测的标记。作为这样的标记,可列举 ^{32}P 、 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{14}C 等放射性标记; β 半乳糖苷酶、过氧化物酶、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶、乳酸氧化酶、醇氧化酶、单胺氧化酶、辣根过氧化物酶等酶;FAD、FMN、ATP、生物素、血红素(ヘム)等辅酶或辅基;荧光素衍生物(荧光素异硫氰酸酯(FITC)、Fluorescein thioflubamyl等)、罗丹明衍生物(四甲基罗丹明、三甲基罗丹明(RITC)、TEXAS RED、罗丹明110等)、Cy色素(Cy3、Cy5、Cy 5.5、Cy7)、Cy-铬、Spectrum Green、Spectrum Orange、碘化丙烷、别藻蓝蛋白(APC)、R-藻红蛋白(R-PE)等荧光标记;萤光素酶等生物发光标记;或者,鲁米诺、异鲁米诺、N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺酯等鲁米诺衍生物、N-甲基吡啶酯、N-甲基吡啶酰基砒酰胺酯等吡啶衍生物、光泽精、金刚烷基二氧杂环丁烷、吡啶衍生物、钆络合物等化学发光标记;金胶体等金属等能够检测的标记,但不限于这些例子。

[0099] 本发明的试剂盒可以视需要包含生色试剂、反应终止用试剂、标准抗原试剂、被检物前处理用试剂、封闭试剂等。另外,在本发明的试剂盒包含已标记的抗体的情况下,可以进一步包含与标记反应的底物。进一步,本发明的试剂盒可以包含纸箱或塑料壳体等容纳试剂盒的构成物的包装、操作说明书等。

[0100] 作为用于本发明的试剂盒的被检物,可以使用例如:以活检方式从受试者采集的组织试样或液体。对使用的活检没有特殊限制,只要能够作为希望的检测和/或测定的对象即可,可列举例如:血液、血浆、血清、淋巴液、尿、浆膜腔液、髓液、脑脊髓液、关节液、房水、泪液、唾液、脑组织或它们的分级物或者处理物。利用本发明的试剂盒进行的分析,可以定性、定量或半定量地进行。

[0101] (检测、测定、诊断用的药剂,检测、测定、诊断用组合物)

[0102] 在其他实施方案中,本发明涉及含有本发明的抗体或其免疫反应性片段的、用作检测和/或测定IBL-102抗体结合的抗原或AB的毒性构象异构体的药剂或组合物(以下称为“测定用的药剂或组合物”)。在本说明书中,测定用的药剂或组合物为用于AD的诊断用途的物质,即,包括AD的诊断试剂或AD的诊断用组合物。或者,本发明涉及用于制造上述诊断用组合物的本发明的抗体或其免疫反应性片段的用途。

[0103] 例如,在以活体外使用(体外(in vitro)或活体外(ex vivo))为目标的情况下,本发明的检测和/或测定用的药剂或组合物,视需要可以按照上述本发明的试剂盒构成。

[0104] 另外,本发明的检测和/或测定用的药剂或组合物,也可以为包括图像诊断用的用于在活体内施用的实施方案(以下称为“体内检测和/或测定用的药剂或组合物”)。在本发明的体内检测和/或测定用的药剂或组合物中,本发明的抗体或其免疫反应性片段含有标记物质或已与标记物质结合。作为标记物质,可以使用例如放射性同位素等本领域技术人员公知的物质,优选正电子释放放射性同位素或 γ 线放射性同位素,可列举例如: ^{131}I 、 ^{123}I

、 ^{124}I 、 ^{86}Y 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{111}In 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{18}F 、 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 和 ^{75}Br ,但不限于此。在本发明的体内检测和/或测定用的药剂或组合物中,本发明的抗体或其免疫反应性片段优选为嵌合抗体、人化抗体或人抗体。另外,本发明的体内检测和/或测定用的药剂或组合物为对适于人施用的药物上允许的形态,可以包含生理学可接受的添加剂,例如:药学可接受的稀释剂、缓冲剂、增溶剂、去痛剂、溶剂、稳定剂或抗氧化剂。对本发明的体内检测和/或测定用的药剂或组合物的施用量而言,可以根据对象部位,用作检测、测定、诊断的方法,受试者的年龄,性别,其它条件,疾病的程度不同而适宜选择。

[0105] 在本说明书中,“XNY”(X和Y是氨基酸单字母符号;N是自然数)表示N位的氨基酸X被氨基酸Y取代,“A β p-q”(p和q是自然数)表示由A β 的p位的氨基酸到q位的氨基酸组成的肽。特别是A β 1-40及A β 1-42,分别记载为A β 40及A β 42。例如:E22P-A β 42表示由22位的谷氨酸被脯氨酸取代的A β 的1位到42位为止的氨基酸组成的肽,G9C-E22P-A β 9-35表示由9位的甘氨酸被半胱氨酸取代,由22位的谷氨酸被脯氨酸取代的A β 的9位-35位为止的氨基酸组成的肽。

[0106] 发明的效果

[0107] 本发明的抗体由于可以与A β 的毒性构象异构体以极其高的特异性结合,可以在以A β 的毒性构象异构体为目标的各种用途中发挥优异的效果。例如,本发明的抗体可以用于AD的诊断用途。另外,本发明的抗体由于可以与A β 的毒性构象异构体的单体及二聚物两种状态结合,可以用于A β 的聚合物化有助于发病或恶化的疾病,例如,AD的治疗或预防用途。

附图说明

[0108] [图1]显示源自阿尔茨海默病患者(AD)及健康人(对照)的脑脊髓液中的与IBL-102抗体结合的A β 量的比较的图。纵轴显示A β 的毒性构象异构体(与IBL-102抗体结合的A β)的量(pg/mL)。

[0109] [图2]显示用大鼠初级神经元(primary neuron),对IBL-102抗体相对于A β 42引起神经毒性的神经毒性保护效果进行研究的结果的图。左图显示野生型A β 42(Wt-A β 42)添加组,右图显示E22P-A β 42添加组的结果。纵轴表示相对于无细胞毒性刺激且没有抗体添加(Veh)组的生存率(%)的平均值,误差棒表示标准误差。在各图中,从左依次表示:无细胞毒性刺激且没有抗体添加(Veh)、有细胞刺激且没有抗体添加(-)、有细胞刺激且有IgG添加(IgG)、及有细胞刺激且有IBL-102添加(IBL-102)。***表示相对于veh为 $p<0.001$,#表示 $p<0.05$,###表示 $p<0.001$ 。

[0110] [图3]用AD模型小鼠的脑切片,利用免疫组织化学染色,对82E1、IBL-101、IBL-102相对于老年斑的染色性进行研究的染色图像。照片下方的数值表示各个免疫染色中使用的抗体的浓度。

[0111] [图4]用高架加迷宫试验(Elevated plus-maze test),对于IBL-102抗体对AD模型小鼠表现的神经症状的神经症状抑制效果进行研究的的结果。纵轴表示在闭合臂(closed arm)中停留的时间的比例(%)的平均值,误差棒表示标准误差。图中从左依次表示:非施用抗体野生型小鼠(Wt)、施用IgG AD模型小鼠(Tg+IgG)、施用IBL-101AD模型小鼠(Tg+IBL-101)及施用IBL-102AD模型小鼠(Tg+IBL-102)。*表示 $p<0.05$ 。

[0112] [图5]用筑巢试验(Nesting test)对于IBL-102抗体对AD模型小鼠表现的神经症

状的神经症状抑制效果进行研究的图。纵轴表示分数的平均值,误差棒表示标准误差。图中从左依次表示:非施用抗体野生型小鼠(Wt)、施用IgG AD模型小鼠(Tg+IgG)、施用IBL-101AD模型小鼠(Tg+IBL-101)及施用IBL-102AD模型小鼠(Tg+IBL-102)。*表示 $p<0.05$ 。

[0113] [图6]为用免疫组织化学染色,对于IBL-102抗体对AD模型小鼠的脑内的老年斑的蓄积的抑制效果进行研究的染色图像,及显示老年斑的计数结果的图。图的纵轴表示利用82E1抗体染色的老年斑的数量的平均值,误差棒表示标准误差。横轴表示各个施用的抗体。

[0114] [图7]为用免疫组织化学染色,对于IBL-102抗体对AD模型小鼠的海马内的老年斑的蓄积的抑制效果进行研究的染色图像,及显示老年斑的计数结果的图。图的纵轴表示利用82E1抗体染色的老年斑的数量的平均值,误差棒表示标准误差。横轴表示各个施用的抗体。

[0115] [图8]为用ELISA法,对于IBL-102抗体对AD模型小鼠的脑内的A β 的蓄积的抑制效果进行研究的图。纵轴从上依次表示:脑内不溶性级分中的A β 40的浓度、脑内不溶性级分中的A β 42的浓度、及脑内可溶性级分中的A β 40的浓度(均为pg/mg蛋白质)的平均值,误差棒表示标准误差。横轴表示各个施用的抗体。

[0116] [图9]为IBL-102抗体的碱基序列(重链为序列编号1,轻链为序列编号8)。

[0117] [图10]为IBL-102抗体的氨基酸序列。重链(HC)记载于序列编号2、轻链(LC)记载于序列编号9中。斜线表示信号序列,下划线表示CDR,框内表示可变区。

[0118] [图11]表示测定对A β 聚合物的结合能力的结果的图。纵轴表示在492nm的吸光度,横轴表示被检抗体的浓度(ng/mL)。图中从上依次显示了作为被检抗体使用了IBL-101、IBL-102、4G8的结果。

[0119] [图12]表示单次施用IBL-102的方案图。

[0120] [图13]表示单次施用IBL-102试验的结果的图。A表示向对照组及Tg2576小鼠施用PBS或IBL-102时的各组的再探索分数。B为在Tg2576小鼠的每个个体中,施用PBS时和施用IBL-102抗体时的再探索分数的比较。纵轴表示再探索分数(Re-exploring score)。

[0121] [图14]为表示在源自阿尔茨海默病患者(AD患者组)及非AD对照组(非AD对照组)的脑脊髓液中的总A β 42(右图),及与IBL-102抗体结合的A β 与总A β 42的比(左图)的图。纵轴分别表示A β 42(ng/mL)(右图),及A β 的毒性构象异构体(与IBL-102抗体结合的A β)/总A β 的比(左图)。

[0122] [图15]为表示利用酶免疫测定,对于IBL-102抗体和IBL-101抗体的与各抗原的结合能力进行测定的结果的图。上框的图表示作为抗体使用了IBL-101的结果,下框表示作为抗体使用了IBL-102的结果。两个图中的横轴表示使用的抗原,从左起表示野生型A β 40、野生型A β 42、E22P-A β 42、E22V-A β 42、G33P-A β 42、L34P-A β 42、V36P-A β 42、G37P-A β 42、G38P-A β 42、V39P-A β 42、V40P-A β 42、I41P-A β 42。纵轴表示在492nm的吸光度。对各抗原进行表示的4根柱状图从左依次表示:作为抗体量使用了15ng/mL、30ng/mL、60ng/mL及120ng/mL的结果。

[0123] [图16]表示单次施用试验的日程表及结果。纵轴表示((对新奇物体B的接触次数)/((对已知物体A的接触次数)+(对新奇物体B的接触次数))(Novel),或((对已知物体A的接触次数)/((对已知物体A的接触次数)+(对新奇物体B的接触次数))(Similar)。“Wt”表示野生型小鼠,“IgG”表示施用IgG的Tg2576小鼠,“IBL-102”表示施用IBL-102的Tg2576小鼠,n表示各组使用的小鼠的数量。***表示 $P<0.0005$ 。

具体实施方式

[0124] 1. 抗体的制作

[0125] (抗体的获得)

[0126] 本发明的抗体可以通过将A β 42的22位及23位的氨基酸处具备转角结构的物质,优选为E22P-A β 42、A β -内酰胺(22K-23E)或P3-A β 42(日本特开2006-265189号;K.Murakami等(2005) J. Am. Chem. Soc., 127:15168-15174)作为免疫源,视需要与免疫刺激剂(例如,矿物油或铝沉淀物和加热处理得到的死菌或者脂多糖、弗氏完全佐剂、或弗氏不完全佐剂等)一起免疫非人哺乳动物或鸟类来制作。作为免疫动物,没有特殊限制,可以是小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠、兔、犬、猴、绵羊、山羊、鸡、鸭等能够制作杂交瘤的动物,优选小鼠或大鼠,更优选小鼠。对动物的免疫原的施用,可以在例如,1次或隔适当的间隔多次(通常为将每1~6周1次的免疫,合计进行2~10次左右)将0.1~1000 μ g,通过皮下注射、腹腔内注射、静脉内注射、皮内注射、肌肉内注射或足距注射进行。在最后一次免疫的1~2周后,从免疫的动物的眼窝或尾静脉进行采血,并使用其血清进行抗体效价的测定。可以通过对显示足够抗体效价的动物的血清进行纯化来获得本发明的抗体。

[0127] 单克隆抗体可以通过培养从按照上述方法免疫的免疫化动物获得的抗体生成细胞与骨髓瘤类细胞(骨髓瘤细胞)融合而得到的杂交瘤来生成。此类融合方法可列举例如Milstein等人的方法(Galfre, G. & Milstein, C. (1981) Methods Enzymol., 73:3-46)。所使用的抗体生成细胞可以从经过上述方法免疫且在血清中显示足够抗体效价的小鼠或大鼠的脾、胰、淋巴结、外周血收集。所使用的骨髓瘤细胞不受限制,只要该细胞衍生自哺乳动物,诸如小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠、家兔或人,并且可以在体外增殖即可。此类细胞可列举例如:P3-X63Ag8(X63)(Nature, 256, 495, 1975)、P3/NS1/1-Ag4-1(NS1)(Eur. J. Immunol., 6, 292, 1976)、P3X63Ag8U1(P3U1)(Curr. Top. Microbiol. Immunol., 81, 1, 1978)、P3X63Ag8.653(653)(J. Immunol., 123, 1548, 1979)、Sp2/0-Ag14(Sp2/0)(Nature, 276, 269, 1978)、Sp2/0/F0-2(F0-2)(J. Immunol. Methods, 35, 1, 1980)等,优选细胞源自与抗体生成细胞同种的动物,更优选细胞源自与抗体生成细胞同一系统(同系统)的动物。例如,作为小鼠来源的骨髓瘤细胞,优选P3U1或P3X63-Ag8-653。

[0128] 作为将抗体生成细胞和骨髓瘤细胞融合来形成杂交瘤的方法,可以列举出使用聚乙二醇(以下也称“PEG”)等方法(PEG法)、使用仙台病毒的方法、使用电融合装置的方法等。产生单克隆抗体的杂交瘤细胞的选择可以按照公知或者基于此的方法来进行。通常,通过用添加有HAT(次黄嘌呤-氨基蝶呤胸苷-胸苷)的动物细胞用培养基进行通常5天~3周,优选为1周~2周的选择性增殖,可以进行杂交瘤细胞的选择。

[0129] 培养后,采集培养上清液,通过ELISA等选择与A β 的毒性构象异构体极其特异性结合的克隆。对于选择的克隆重复极限稀释法1~5次来进行单细胞化,能够通过从该单细胞化的克隆产生的抗体中,选择对A β 的毒性构象异构体的特异性极高的抗体,来选择稳定地产生显示高特异性的抗体的细胞。对本发明的与A β 的毒性构象异构体极其特异性结合的抗体的选择,可以通过将对在22位及23位具有 β -转角结构的A β 突变体(E22P-A β 42)(K.Murakami等(2003) J. Biol. Chem., 278:46179-46187)的结合能力高,且对其以外的A β 的结构(例如,选自A21P-A β 42、D23P-A β 42、V24P-A β 42、G25P-A β 42、M35P-A β 42、E22V-A β 42中的

1种以上的肽或这些全部的肽)的结合能力较低设为指标,通过与结合力相比优先特异性来反复选择特异性高的克隆来进行。

[0130] 所得抗体可以纯化至均一。抗体的分离、纯化可以使用对通常的蛋白质使用的分离、纯化方法。例如,通过适宜选择、组合亲和色谱等柱色谱、过滤、超滤、盐析、透析、SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳、等电点电泳等,能够分离、纯化抗体(Antibodies:A Laboratory Manual.Ed Harlow and David Lane,Cold Spring Harbor Laboratory,1988)。作为用于亲和色谱的柱子,可以列举出例如蛋白A柱、蛋白G柱。而且,不论抗体的类别,还可以使用E22P-A β 42固定化柱、离子交换色谱、疏水相互作用色谱等。

[0131] 或者,可以按照上述方法从以下选择对AB的毒性构象异构体的特异性极高的抗体:VH具有由编码序列编号4中记载的氨基酸序列的核酸序列和在严格条件下杂交的核酸序列所编码的氨基酸序列,且,VL具有由编码序列编号11中记载的氨基酸序列的核酸序列和在严格条件下杂交的核酸序列所编码的氨基酸序列的抗体或其免疫反应性片段;VH具有与序列编号4的氨基酸序列有80%、85%、90%、95%、98%或99%的同一性的氨基酸序列,且,VL具有与序列编号11的氨基酸序列有80%、85%、90%、95%、98%或99%的同一性的氨基酸序列抗体或其免疫反应性片段;能够通过设计氨基酸序列,制备编码该设计的氨基酸序列的DNA并导入表达载体,然后将该载体导入适当的宿主细胞进行表达得到的抗体,其中,该氨基酸序列为CDRH1、CDRH2及CDRH3分别具有序列编号5、6及7中记载的氨基酸序列,且CDRL1、CDRL2及CDRL3分别具有序列编号12、13及14中记载的氨基酸序列的抗体或其免疫反应性片段的氨基酸序列。

[0132] 另外,例如,本发明的抗体可以通过这样来制造:合成编码序列编号2(具有信号肽的重链)、序列编号3(不含有信号肽的重链)及序列编号4(重链可变区)中任一项所述的氨基酸序列的DNA,以及编码序列编号9(具有信号肽的重链)、序列编号10(不含有信号肽的重链)及序列编号11(轻链可变区)中任一项所述的氨基酸序列的DNA;或者合成具有序列编号1及8中记载的核酸序列的DNA,并从该DNA得到分别具有序列编号2~序列编号4及序列编号9~11中记载的氨基酸序列的H链及L链,或它们的可变区。

[0133] (人型嵌合抗体制作)

[0134] 在本发明的抗体为人型嵌合抗体的情况下,可以这样获得:制备编码极其特异性识别AB的毒性构象异构体的非人动物单克隆抗体(例如:IBL-102单克隆抗体)的VH及VL的DNA,将其与人免疫球蛋白的恒定区cDNA结合并导入表达载体,然后将该载体导入适当的宿主细胞进行表达(Morrison,S.L.等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81,6851-6855,1984)。

[0135] (人化抗体制作)

[0136] 在本发明的抗体为人化抗体时,可以这样获得:构建下述DNA,并将构建的DNA与人来源的免疫球蛋白的恒定区cDNA结合,导入表达载体,将该载体导入适当的宿主细胞中进行表达;其中,所述DNA编码将编码特异性识别AB的毒性构象异构体的非人动物单克隆抗体(例如:IBL-102单克隆抗体)的VH及VL的CDR的氨基酸序列移植到人抗体的VH及VL的FR上而得到的V区域(参照L.Rieohmann等,Nature,332,323,1988;Kettleborough,C.A.等,Protein Eng.,4,773-783,1991;Clark M.,Immunol.Today.,21,397-402,2000。对于非人动物单克隆抗体的CDR而言,可以将从编码通过上述方法得到的非人动物单克隆抗体的VH及VL的DNA序列预测的氨基酸序列,与已知的抗体的VH及VL的全氨基酸序列进行比较而获

得。已知的抗体的氨基酸序列可以通过例如登录于蛋白数据银行等数据库的抗体的氨基酸序列来获得。此外,作为人化抗体的FR没有特殊限制,只要移植后的抗体能够实现本发明的效果即可,优选使人化抗体的可变区(以下称为“V区域”)的CDR为与为非人动物来源单克隆抗体的V区域类似的立体结构的人抗体的FR、或与使用的非人动物来源单克隆抗体的FR的氨基酸序列同一性高的人抗体FR。在人化抗体中,对构成源自人抗体的FR的氨基酸的一部分(特别是,存在与立体地与CDR接近的位置的氨基酸)而言,视需要可以置换成CDR为源自非人动物单克隆抗体的FR序列(参照Queen等,美国专利第5585089号)。将编码使用的人化抗体的V区域的DNA序列,设计为对应于将非人动物单克隆抗体的CDR的氨基酸序列与人抗体的FR的氨基酸序列结合而成的氨基酸序列的DNA序列。编码人化抗体的V区域的DNA,可以基于设计而成的DNA序列而采用本领域技术人员公知的方法制作。

[0137] (人抗体)

[0138] 人抗体可以通过例如利用人抗体噬菌体文库或产生人抗体的转基因小鼠来得到(富塚等,Nature Genet.,15,146-156(1997))。利用人抗体噬菌体文库时,例如,可以通过将E22P-AB42固定至固相,使其与噬菌体抗体文库反应,洗涤除去非结合的噬菌体后,回收已结合的噬菌体来得到希望的克隆(淘选)。产生人抗体的转基因小鼠,是向敲除了内源性免疫球蛋白(Ig)基因的小鼠中导入了人抗体的Ig基因而得到的小鼠。通过将产生人抗体的转基因小鼠作为免疫动物,免疫利用上述本发明的抗体制作方法的抗原(优选为E22P-AB42),可以得到特异性识别AB的毒性构象异构体的人抗体。

[0139] (交叉反应率)

[0140] 例如,对本发明的抗体而言,相对于主反应(与E22P-AB42的结合),与选自A21P-AB42、E22V-AB42、D23P-AB42、V24P-AB42、G25P-AB42、及M35P-AB42中的1种以上的任意种(包括全部)的肽的结合的交叉反应率,可以为5%以下、3%以下、或1%以下。或者,对本发明的抗体而言,相对于主反应(与E22P-AB42的结合),与选自A21P-AB42、E22V-AB42、D23P-AB42、V24P-AB42、G25P-AB42、及M35P-AB42中的1种以上的任意种(包含全部)的肽的结合的交叉反应率,可以分别依次为0.3%以下、0.3%以下、0.5%以下、0.4%以下、0.6%以下及0.7%以下,进一步,可以分别依次为0.27%以下、0.28%以下、0.50%以下、0.33%以下、0.53%以下及0.68%以下。

[0141] 因而,例如,上述选择可以以与AB的毒性构象异构体和具有除了其以外的结构的A β (例如:A21P-AB42、及E22V-AB42)的交叉反应性作为指标进行。即,可以选择作为交叉反应率包括在上述范围内的抗体。交叉反应率可以通过以下求出:首先,在测定对象希望的测定体系中,制作使用AB的毒性构象异构体(例如:E22P-AB42或E22P-AB40)作为标准物质的标准曲线,并在此基础上,将针对非毒性构象异构体(例如:A21P-AB42及E22V-AB42)得到的测定值(例如:吸光度),与用AB的毒性构象异构体制作的标准曲线进行比对并算出浓度,然后通过算出的浓度(实测值)/(非毒性构象异构体的实际的添加浓度) $\times 100$ (%)而求出。对交叉反应率的确定方法中的测定没有特别限制,只要是使用抗体分子的公知的测定方法即可,可以基于后述AB的毒性构象异构体的测定方法进行。

[0142] (核酸、载体、宿主细胞)

[0143] 本发明的核酸可以通过以下得到:从产生上述得到的抗体的杂交瘤进行克隆,或者基于上述得到的抗体或其免疫反应性片段的氨基酸序列来设计适宜的核酸序列。本发明

的载体可以通过将得到的核酸装入适于进行适宜表达的载体而得到。本发明的载体除了本发明的核酸以外,也可以包含表达所必须的区域(启动子、增强子、终止子等)。另外,本发明的宿主细胞可以通过将本发明的载体导入适当的细胞株(例如:动物细胞、昆虫细胞、植物细胞、酵母、大肠杆菌等微生物)而得到。

[0144] (标记)

[0145] 抗体或其免疫反应性片段与标记的结合可以通过本领域中常规的方法进行。例如,在荧光标记蛋白质或肽时,可以通过利用磷酸缓冲液洗涤蛋白质或肽后,添加用DMSO、缓冲液等调整的染料并混合后,于室温静置10分钟使其结合。另外,作为市售的标记试剂盒,也可以用:生物素标记试剂盒(Biotin Labeling Kit-NH₂、Biotin Labeling Kit-SH:株式会社同仁化学研究所)、碱性磷酸酶标记用试剂盒(Alkaline Phosphatase Labeling Kit-NH₂、Alkaline Phosphatase Labeling Kit-SH:株式会社同仁化学研究所)、过氧化物酶标记试剂盒(Peroxidase Labeling Kit-NH₂、Peroxidase Labeling Kit-SH:株式会社同仁化学研究所)、藻胆蛋白标记试剂盒(Allophycocyanin Labeling Kit-NH₂、Allophycocyanin Labeling Kit-SH、B-Phycocyanin Labeling Kit-NH₂、B-Phycocyanin Labeling Kit-SH、R-Phycocyanin Labeling Kit-NH₂、R-Phycocyanin Labeling Kit-SH:株式会社同仁化学研究所)、荧光标记试剂盒(Fluorescein Labeling Kit-NH₂、HiLyte Fluor(注册商标)555Labeling Kit-NH₂、HiLyte Fluor(注册商标)647Labeling Kit-NH₂:株式会社同仁化学研究所)、DyLight547、DyLight647(Techno chemical株式会社)、Zenon(注册商标)Alexa Fluor(注册商标)抗体标记试剂盒、Qdot(注册商标)抗体标记试剂盒(Invitrogen公司)、EZ-Label Protein Labeling Kit(funakoshi株式会社)等进行标记。另外,对已标记的抗体或其片段的检测,可以通过使用适于适宜标记的设备进行。

[0146] (试剂盒)

[0147] 另外,本发明涉及含有上述本发明的抗体或其免疫反应性片段的,AB的毒性构象异构体测定试剂盒。本发明的试剂盒可以用按照上述方法制作的抗体或其免疫反应性片段,根据目的用本领域技术人员常用的技术进行制造。

[0148] (AB的毒性构象异构体的检测和/或测定方法)

[0149] 在其他实施方案中,本发明涉及AB的毒性构象异构体的检测和/或测定方法。对本发明的AB的毒性构象异构体的检测和/或测定方法而言,作为基本构成,其具备:使被检物与本申请发明的抗体或其免疫反应性片段接触的步骤,及对已与本申请发明的抗体或其免疫反应性片段结合的AB的毒性构象异构体进行检测和/或测定的步骤。另外,本发明的检测和/或测定方法虽然可以在体外及体内的任意进行,但优选在体外进行。例如:本发明的检测和/或测定方法,可以基于使用抗体分子的公知的检测和/或测定方法进行。

[0150] 更具体而言,本发明的检测方法例如包含以下方法:

[0151] 确定被检物中是否存在淀粉样蛋白 β 的毒性构象异构体的方法,具备以下步骤:

[0152] (a) 使极其特异性识别AB的22位及23位的氨基酸处的转角结构、且不识别AB的在其他部位的转角结构的抗体或其免疫反应性片段与被检物接触的步骤,

[0153] (b) 检测与上述抗体或其免疫反应性片段结合的淀粉样蛋白 β 的毒性构象异构体的步骤;

[0154] (c) 在上述步骤中检测出淀粉样蛋白 β 的毒性构象异构体的情况下,判定被检物中存在淀粉样蛋白 β 的毒性构象异构体,在上述步骤中未检测出淀粉样蛋白 β 的毒性构象异构体的情况下,判定被检物中不存在淀粉样蛋白 β 的毒性构象异构体的步骤。

[0155] 另外,本发明的测定方法例如包括以下方法:

[0156] 确定被检物中的淀粉样蛋白 β 的毒性构象异构体的水平的方法,具备以下步骤:

[0157] (a) 使极其特异性识别AB的22位及23位的氨基酸处的转角结构、且不识别AB的在其他部位的转角结构的抗体或其免疫反应性片段与被检物接触的步骤;

[0158] (b) 测定与上述抗体或其免疫反应性片段结合的淀粉样蛋白 β 的毒性构象异构体量的步骤;

[0159] (c) 根据上述检测的毒性构象异构体量,计算出被检物中的淀粉样蛋白 β 的毒性构象异构体的水平的步骤。

[0160] 在定量进行本发明的测定方法的情况下,可以预先制作阶梯性稀释至适宜已知的浓度的标准物质(例如:E22P-AB42),该标准物质用于与被检物的检测同时或分别使用制作标准曲线,基于该标准曲线,根据被检物中的测定值计算并求出淀粉样蛋白 β 的毒性构象异构体的浓度。

[0161] 在本说明书中,“使抗体或其免疫反应性片段与被检物接触的步骤”及“检测或定量被检物中淀粉样蛋白 β 的毒性构象异构体的步骤”可以通过例如夹心ELISA进行。具体而言,可以使固定至固相的本发明的抗体或其免疫反应性片段与被测试样(被检物)接触,洗涤后,添加能够与检测对象物质(淀粉样蛋白 β 的毒性构象异构体)结合的标记化抗体,然后通过洗涤除去非结合抗体,通过检测该抗体的标记或测定标记量(或强度)来进行。另外,在利用免疫染色进行的情况下,可以使能够与未固定的检测对象物质(淀粉样蛋白 β 的毒性构象异构体)结合的标记化抗体与被检物接触,然后将该混合物与将本发明的抗体或其免疫反应性片段固定于特定部位而成的载体接触,通过检测在该部位的上述标记化抗体或测定标记量(或强度)来进行。在本段的记载中,也可以取代能够与检测对象物质(淀粉样蛋白 β 的毒性构象异构体)结合的标记化抗体,而使用标记化的本发明的抗体或其免疫反应性片段,并且,取代本发明的抗体或其免疫反应性片段,而使用能够与检测对象物质(淀粉样蛋白 β 的毒性构象异构体)结合的抗体。

[0162] 或者,本发明的抗体或其免疫反应性片段也可以用于在体内的AB的毒性构象异构体的检测和/或测定。例如,本发明包括在活体内AB的毒性构象异构体的检测方法或测定方法,该方法具备:将已用荧光或放射性物质标记的本发明的抗体或其免疫反应性片段在活体内施用的步骤,检测和/或测定在活体内的上述标记的步骤。例如,作为其应用的实施方案,本发明也可以为确定在活体内AB的毒性构象异构体的存在位置的方法,该方法具备:将已用荧光或放射性物质标记的本发明的抗体或其免疫反应性片段在活体内施用的步骤,检测在活体内的上述标记来确定其存在位置的步骤。或,本发明也可以为确定在活体内的AB的毒性构象异构体量的方法,该方法具备:将已用荧光或放射性物质标记的本发明的抗体或其免疫反应性片段在活体内施用的步骤,测定在活体内的上述标记的量或强度的步骤,根据测定的标记量或强度来确定AB的毒性构象异构体的水平的步骤。或者,本发明可以为确定在活体内的AB的毒性构象异构体的存在位置和其量的方法,该方法具备:将已用荧光或放射性物质标记的本发明的抗体或其免疫反应性片段在活体内施用的步骤,测定在活体

内的上述标记的存在位置及量或强度的步骤,根据测定的标记量或强度确定A β 的毒性构象异构体的水平的步骤,使A β 的毒性构象异构体的存在位置与水平相关的步骤。

[0163] (AD的诊断方法)

[0164] A β 的毒性构象异构体与AD的发病及进一步恶化相关。即,以往认为A β 40或A β 42的水平(总A β 量)与AD的发病及进一步恶化相关,但现在提示:相比于总A β 量的增加,这些A β 中具有特定的立体结构(毒性构象异构体)的A β 的增加会参与AD发病。已知A β 可以具有各种立体结构,但本发明的抗体及其免疫反应性片段仅极其特异性识别A β 的毒性构象异构体。因而,本发明的抗体及其免疫反应性片段可以实现更准确的AD的诊断。因而,本发明包括AD的诊断试剂,其含有上述本发明的抗体及其免疫反应性片段作为有效成分。另外,本发明包括:AD的诊断方法,其包括用上述本发明的抗体或其免疫反应性片段测定A β 的毒性构象异构体;提供用于AD的诊断的信息的方法;监测AD的状态或进展的方法;判定候选AD治疗药的治疗效果的方法(以下统称为“本发明的诊断方法等”)。在本说明书整体中,除去以此方式解释不合适的情况外,“AD的诊断”及“诊断AD”的术语可以替换为“提供用于AD的诊断的信息”、“AD的状态或进展的监测”及“监测AD的状态或者进展”,或“候选AD治疗药的治疗效果的判定”及“判定候选AD治疗药的治疗效果”。在其他实施方案中,本发明包括本发明的抗体或其免疫反应性片段的用途,其用于诊断AD(或监测AD的状态或者进展,或判定候选AD治疗药的治疗效果)。或者,本发明涉及本发明的抗体或其免疫反应性片段的用途,其用于制造用于诊断AD(或监测AD的状态或者进展,或判定候选AD治疗药的治疗效果)的药剂或组合物。

[0165] 在本说明书中,尤其除去以此方式解释不合适的情况,“诊断”的语句除了判定是否为AD、和/或判定AD的严重程度(狭义的诊断)以外,也可以解释为根据其目的而提供用于AD的诊断的信息、或监测AD的状态或进展。在本发明的诊断方法等中,检测A β 的毒性构象异构体是否存在或水平的测定可以基于例如,上述的A β 的毒性构象异构体的测定方法进行。

[0166] 对本发明的AD的诊断方法等而言,具备测定被检物中的A β 的毒性构象异构体的步骤,并以A β 的毒性构象异构体量作为指标进行诊断。更具体而言,本发明的诊断方法等包括以下方法:

[0167] 具备以下步骤的AD的诊断方法:

[0168] a) 使极其特异性识别A β 的22位及23位的氨基酸处的转角结构中的至少1个,且不识别A β 的在其他部位的转角结构的抗体或其免疫反应性片段,与源自受试者的被检物接触的步骤,

[0169] b) 测定与该抗体或其免疫反应性片段结合的A β 的毒性构象异构体,由测定值确定A β 的毒性构象异构体的水平的步骤,以及,

[0170] c) 根据测定的A β 的毒性构象异构体的水平,判定该受试者的AD发病的有无或程度的步骤。

[0171] 这里,判定A β 的毒性构象异构体的水平高的受试者罹患AD或罹患的严重程度高。

[0172] 这里,本发明的诊断方法等为提供用于AD的诊断的信息的方法的情况下,包括以下方法:

[0173] 具备以下步骤的提供用于AD的诊断的信息的方法:

[0174] a) 使极其特异性识别A β 的22位及23位的氨基酸处的转角结构中的至少1个,且不

识别Aβ的在其他部位的转角结构的抗体或其免疫反应性片段,与源自受试者的被检物接触的步骤,

[0175] b) 测定与该抗体或其免疫反应性片段结合的Aβ的毒性构象异构体,由测定值确定Aβ的毒性构象异构体的水平的步骤,以及,

[0176] c) 根据测定的Aβ的毒性构象异构体的水平,判定该受试者的AD发病的有无或程度的结果的信息的步骤,

[0177] 这里,判定Aβ的毒性构象异构体的水平高的受试者罹患AD或罹患的严重程度高。

[0178] 另外,在本发明的诊断方法等为监测AD的状态或进展的方法的情况下,包括以下方法:

[0179] 具备以下步骤的监测AD的状态或进展的方法:

[0180] a) 使极其特异性识别Aβ的22位及23位的氨基酸处的转角结构中的至少1个,且不识别Aβ的在其他部位的转角结构的抗体或其免疫反应性片段,与源自受试者的被检物接触的步骤,

[0181] b) 测定该被检物中的Aβ的毒性构象异构体与该抗体或其免疫反应性片段的结合,由测定值确定Aβ的毒性构象异构体的水平的步骤,以及,

[0182] c) 通过将确定的Aβ的毒性构象异构体的水平,与在该次确定以前除该次确定以外的利用相同方法确定的Aβ的毒性构象异构体的水平进行比较,判定该受试者的AD发病的变化步骤。

[0183] 这里,将在该次确定以前除该次确定以外的利用相同方法确定的Aβ的毒性构象异构体的水平进行比较,在确定的Aβ的毒性构象异构体的水平升高的情况下,判定AD在进展(发展)。

[0184] 另外,在本发明的诊断方法等中,将与Aβ的毒性构象异构体特异性结合的抗体或其免疫结合性片段在活体内施用,可以根据图像诊断进行诊断。根据图像诊断进行测定时,本发明的诊断方法等包括以下方法:

[0185] 具备以下步骤的AD的诊断方法:

[0186] a) 通过对施用了极其特异性识别Aβ的22位及23位的氨基酸处的转角结构中的至少1个、且不识别Aβ的在其他部位的转角结构的抗体或其免疫反应性片段的受试者,用图像诊断装置(例如:闪烁显像、PET或SPECT模式)生成上述抗体或其免疫反应性片段的一部分以上的图像,从而检测和/或测定在活体内的上述抗体或其免疫反应性片段的步骤,

[0187] b) 由检测和/或测定的上述抗体或其免疫反应性片段的位置或值(例如:强度),确定在该受试者的体内的Aβ的毒性构象异构体是否存在、存在的位置和/或水平的步骤,以及,

[0188] c) 将确定为Aβ的毒性构象异构体存在或者水平高的受试者,在脑内检测出Aβ的毒性构象异构体的受试者,或脑内的Aβ的毒性构象异构体的水平高的受试者,判定为罹患AD或AD的严重程度高的步骤。

[0189] 或者,对本发明的AD的诊断方法等而言,具备测定被检物中的Aβ的毒性构象异构体的步骤,且以总Aβ量与Aβ的毒性构象异构体量之间的比值作为指标进行诊断。更具体而言,本发明的诊断方法等包括以下方法:

[0190] AD的诊断方法,其具备以下步骤:

[0191] a) 使源自受试者的试样与本发明的抗体或其免疫反应性片段中的至少1个接触的步骤,

[0192] b) 测定已与上述本发明的抗体或其免疫反应性片段结合的,与本发明的抗体或其免疫反应性片段结合的抗原的水平,的步骤,

[0193] c) 使AB的结构非特异性抗AB抗体与源自受试者的试样接触,通过测定该结合物的量,测定源自受试者的试样中的总AB量的步骤,以及,

[0194] d) 计算在源自受试者的试样中,与本发明的抗体或其免疫反应性片段结合的抗原的水平与总AB的水平之间的比值,根据确定的比值来判定上述受试者中AD的有无或程度的步骤,

[0195] 这里,在与本发明的抗体或其免疫反应性片段结合的抗原的水平相对于总AB的水平之间的比值高于源自健康人的试样中的该比值的情况下,判定为罹患AD的可能性高。

[0196] 将总AB量与AB的毒性构象异构体量之间的比值(比例)作为指标进行诊断的方法,也可以为依据上述提供用于AD的诊断的信息的方法,监测AD的状态或进展的方法的方法。

[0197] 本发明的诊断方法等中的“判定步骤”,可以利用AB的毒性构象异构体的水平、或AB的毒性构象异构体量相对于总AB量之比来进行。在本发明的诊断方法等中,利用AB的毒性构象异构体的水平或AB的毒性构象异构体量相对于总AB量之比时,判定步骤可以通过以下进行:将受试者中的AB的毒性构象异构体的水平或AB的毒性构象异构体量相对于总AB量之比,与健康人、非AD的患者和/或相信不是AD的患者(以下,统称为“阴性比较对照”)中的AB的毒性构象异构体的水平或AB的毒性构象异构体量相对于总AB量之比进行比较。在源自受试者的被检物中的AB的毒性构象异构体的水平或AB的毒性构象异构体量相对于总AB量之比,高于在源自这样的阴性比较对照的被检物中的AB的毒性构象异构体的水平或AB的毒性构象异构体量相对于总AB量之比的情况下,可以判定为“AB的毒性构象异构体水平或AB的毒性构象异构体量相对于总AB量之比高”,即罹患AD或AD的严重程度高,在源自受试者的被检物中的AB的毒性构象异构体的水平或AB的毒性构象异构体量相对于总AB量之比,不高于在源自这样的比较对照的被检物中的AB的毒性构象异构体的水平或和AB的毒性构象异构体量与总AB量之比(即相同或低于)的情况下,可以判定为“AB的毒性构象异构体水平或AB的毒性构象异构体量相对于总AB量之比不高”,即,未罹患AD或AD的严重程度较低。

[0198] 在本说明书整体中,被检物中的AB的毒性构象异构体的水平或AB的毒性构象异构体量相对于总AB量之比,是否分别高于作为比较对照的被检物中的AB的毒性构象异构体的水平或AB的毒性构象异构体量相对于总AB量之比,可以通过统计分析确定。就统计学有意义而言,通过比较2种以上的被检物,确定置信区间和/或p值来确定(Dowdy and Wearden, Statistics for Research, John Wiley & Sons, New York, 1983)。本发明的置信区间可以是例如90%、95%、98%、99%、99.5%、99.9%或99.99%。此外,本发明的p值可以是例如0.1、0.05、0.025、0.02、0.01、0.005、0.001、0.0005、0.0002或0.0001。

[0199] 在本说明书整体中,“比较对照”(包括阳性和阴性)中的AB的毒性构象异构体的水平,可以与受试者中的AB的毒性构象异构体的水平的测定同样进行测定。或者,如果已经有关于在这样的比较对照中测定的AB的毒性构象异构体的水平的信息,也可以将这样的信息用作比较对照中的AB的毒性构象异构体的水平或AB的毒性构象异构体量与总AB量之比。

[0200] 另外,判定步骤也可以通过例如以下进行:根据预先得到的阴性比较对照中的AB

的毒性构象异构体的水平或AB的毒性构象异构体量相对于总AB量之比,以及,AD患者或相信为AD的患者(以下统称为“阳性比较对照”)中的AB的毒性构象异构体的水平或AB的毒性构象异构体量相对于总AB量之比(及关于其AD发病的严重程度信息),来针对AB的毒性构象异构体的水平或AB的毒性构象异构体量相对于总AB量之比,而设定阈值水平或比例(比值)来作为有无罹患AD的指标或罹患AD的严重程度的指标,并将源自受试者的被检物中的AB的毒性构象异构体的水平,与设定的阈值水平或比例进行比较。

[0201] 特别是对“AD罹患的严重程度”进行诊断时,判定步骤也可以是:简单地将预先得到的阴性比较对照及阳性比较对照中的AB的毒性构象异构体的水平或AB的毒性构象异构体量相对于总AB量之比进行比较,将显示同程度(同等水平)的AB的毒性构象异构体水平或AB的毒性构象异构体量相对于总AB量之比作为对照的AD的严重程度来进行诊断。或者,“AD罹患的严重程度”的判定步骤可以通过以下来进行:设定关于罹患同程度的AD的严重程度的若干群组(类别)(例如:重度、中度、轻度、未发病等,或者认知障碍的程度)。即,根据预先得到的阴性比较对照及阳性比较对照中的AB的毒性构象异构体的水平或AB的毒性构象异构体量与总AB量之比、及关于阳性比较对照的AD的严重程度的信息,设定2种以上的AB的毒性构象异构体的阈值水平并制作至少3个组,通过确定属于各组的比较对照的严重程度(健康人、未发病、轻度AD、中度AD或重度AD等)并将其作为该组的严重程度类别,由此将罹患AD的严重程度与各类(组)进行对应,其中,所述至少3个组包括:将最低阈值水平或AB的毒性构象异构体量相对于总AB量之比作为上限值的组、将最接近的2个阈值水平或AB的毒性构象异构体量相对于总AB量之比作为上限值或下限值的组、将最高阈值水平作为下限值的组。也可以测定源自受试者的被检物中的AB的毒性构象异构体的水平,然后确定包含该水平的类别,并判定与确定的类别相对应的AD的严重程度类别作为该受试者的AD的严重程度。上述中“关于AD发病的严重程度的信息”,可以用已经建立的关于AD发病的各种指标来确定。需要说明的是,在上述分类中,AB的毒性构象异构体的水平或AB的毒性构象异构体量相对于总AB量之比越高,将AD发病的严重程度分类为越高的类别。

[0202] 作为这样的阈值水平,可以设定成灵敏度为50、55、60、65、70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97或98%以上。此外,阈值水平的特异度可以设定成40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97或98%以上。

[0203] 另外,在本发明的诊断方法等为候选AD治疗药的治疗效果的判定方法的情况下,包括以下方法:

[0204] 具备以下步骤的候选AD治疗药的治疗效果的判定方法:

[0205] a) 使极其特异性识别AB的22位及23位的氨基酸处的转角结构中的至少1个、且不识别AB的在其他部位的转角结构的抗体或其免疫反应性片段,分别与源自未施用候选AD治疗药的受试者的被检物、和/或源自施用了候选AD治疗药的受试者的被检物进行接触的步骤,

[0206] b) 测定已与上述抗体或其免疫反应性片段结合的AB的毒性构象异构体,由测定值确定AB的毒性构象异构体的水平或AB的毒性构象异构体量相对于总AB量之比的步骤,以及,

[0207] c) 通过对源自未施用候选AD治疗药的受试者的被检物中测定的AB的毒性构象异构体的水平或AB的毒性构象异构体量相对于总AB量之比与源自施用了候选AD治疗药的受

试者的被检物中测定的A β 的毒性构象异构体的水平或A β 的毒性构象异构体量相对于总A β 量之比进行比较,判定在受试者中候选AD治疗药的响应性(奏效性)的步骤

[0208] 这里,在源自施用了候选AD治疗药的受试者的被检物中的A β 的毒性构象异构体的水平或A β 的毒性构象异构体量相对于总A β 量之比,低于源自未施用候选AD治疗药的受试者的被检物中的A β 的毒性构象异构体的水平或A β 的毒性构象异构体量相对于总A β 量之比的情况下,判定候选AD治疗药存在AD治疗效果,

[0209] 本发明的诊断方法等,可以与已经用作AD的指标的其它指标进行组合。

[0210] 在本说明书中,“AD”是指根据基于DSM-IV分类的Alzheimer型(阿尔茨海默型)痴呆的诊断基准(American Psychiatric Association:Diagnostic and statistical manual of mental disorders,4th ed(DSM-IV).American Psychiatric Association, Washington D.C.,1994)、或NINCDS-ADRDA Work Group的Alzheimer病的临床诊断基准(McKahann g et al:Clinical diagnosis of Alzheimer's disease-report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's disease.Neurology 34:939,1984),诊断为AD或AD型痴呆。具体而言,在以下情况下可以诊断为AD或AD型痴呆:记忆障碍及认知功能的障碍(失语、失用、失认或执行功能障碍(实行機能障害));由认知障碍导致的社会或职业性功能的显著障碍等;显示出具有缓慢发病和持续的认知降低的特征的进程;不是由其它中枢神经疾病、全身性疾病或外源性物质导致的痴呆;上述障碍不是仅在意识障碍(谵妄)的时期中出现;上述障碍无法通过其它主要精神疾病说明。或者,在认知功能中有二项以上障碍、识记(記憶)和其它认知功能发生进行性的劣化,没有意识障碍,没有作为痴呆的原因的全身疾病、除了AD以外的脑疾病的情况下,可以诊断为AD或AD型痴呆。或者,也可以利用在活检或解剖检查得到的脑,用组织病理学确认AD。

[0211] (水平)

[0212] 在本说明书整体中,“水平”是指数值化的关于存在量的指标,包括例如浓度、量或者可用作代替这些的指标。因而,水平也可以是荧光强度等测定值本身,也可以是换算成浓度的值。另外,水平可以是绝对的数值(存在量、每单位面积的存在量等),或也可以为与视需要设定的比较对照进行比较的相对数值。

[0213] (被检物)

[0214] 在上述全部的本发明的方法中使用的被检物没有特殊限制,只要是能够测定本发明的方法中的A β 的毒性构象异构体的被检物即可,可以根据利用目的适宜选择。例如,在本说明书中,“被检物”指包括:细胞培养上清液、细胞裂解物、以活检方式从受试者采集的组织试样或液体等。作为源自受试者的体液,可列举例如:血液、血浆、血清、淋巴液、尿、浆膜腔液、髓液、脑脊髓液、关节液、房水、泪液、唾液等体液或它们的分级物或者处理物。另外,作为源自受试者的组织试样,可列举脑组织或脑组织裂解物。另外,本发明的方法中使用的被检物,可以为将源自受试者的试样在测定试验中预先经前处理而成,也可以将从受试者采集的试样直接作为被检物使用。这里,受试者包括人及除了人以外的动物。另外,本发明的方法中的分析可以定性地、定量地或半定量地进行。

[0215] (使用抗体分子的公知的测定方法)

[0216] 在使用抗体分子的公知的测定方法中,在采用EIA法时,可以这样测定与A β 的毒性

构象异构体特异性结合的抗体或其免疫结合性片段和被检物中的AB的毒性构象异构体之间的结合:使与AB的毒性构象异构体特异性结合的抗体或其免疫结合性片段和被检物中的AB的毒性构象异构体反应后,将已与上述AB的毒性构象异构体结合的抗体或其免疫结合性片段,和识别该抗体或其免疫结合性片段的已标记的抗体结合并除去非结合抗体,然后利用适于标记物质的方法进行测定来测定形成的复合体。在进行定量测定的情况下,可以这样进行确定:利用预先判明浓度的标准物质(E22P-AB42)进行阶梯性稀释而成的标准液制成标准曲线,并由该标准曲线计算测定值相应的浓度来确定。

[0217] 利用免疫染色法进行测定时,可以这样进行检测:使被检物与标记抗体结合后,进行利用了硝酸纤维素膜的毛细管现象的色谱,使与固定化的AB的毒性构象异构体特异性结合的抗体或其免疫结合性片段结合。需要说明的是,在免疫染色法中,通过利用金胶体作为标记,也能够目测确认固定化抗体与被检物/标记抗体复合体的结合。

[0218] (药物组合物(治疗药、预防药)及体内检测和/或测定用的药剂或组合物)

[0219] 本发明的抗体或其免疫反应性片段,可以通过视需要纯化后按照常规方法制剂化,从而用作药物组合物(包括AD的治疗药及预防药)或体内检测和/或测定用的药剂或组合物。另外,本发明包括:用于制造药物组合物(包括AD的治疗药及预防药)或体内检测和/或测定用的药剂或组合物的,本发明的抗体或其免疫反应性片段的用途。或者,本发明包括:本发明的抗体或其免疫反应性片段的用于AD的治疗或者预防或体内检测或者测定的用途。

[0220] 例如,本发明的药物组合物(治疗药或者预防药)或体内检测或者测定用的药剂或组合物可以作为注射剂利用,包括静脉注射剂、皮下注射剂、皮内注射剂、肌肉注射剂、点滴注射剂等剂型。这样的注射剂可以通过众所周知的方法来制备,例如可以通过在常规用于注射剂的无菌水性介质或油性介质中溶解、悬浮或乳化上述抗体等来制备。作为供注射用的水性介质,可以使用例如生理盐水、含有葡萄糖、蔗糖、甘露醇、其它辅助剂的等渗溶液等,其可以与合适的增溶剂诸如醇(例如乙醇)、多元醇(例如丙二醇、聚乙二醇)、非离子型表面活性剂[例如聚山梨醇80、聚山梨醇20、HCO-50(氢化蓖麻油的聚氧乙烯(50mol)加合物)]等组合使用。作为油性介质,可以使用例如芝麻油、大豆油等,可以与增溶剂诸如苯甲酸苄酯、苯甲醇等组合使用。通常可以将所制备的注射液充填在适当的安瓿、管形瓶、注射器中。此外,本发明的抗体或其免疫反应性片段也可以通过添加适当的赋形剂来制备冻干制剂,在使用时用注射用水、生理盐水等溶解来作为注射液。而且,一般地抗体等蛋白质的口服施用会被消化器官分解,因而是困难的,但是通过在抗体片段、修饰抗体片段及剂型方面下功夫,也存在口服施用的可能性。作为口服施用的制剂,可以列举出例如胶囊剂、片剂、糖浆剂、颗粒剂等。

[0221] 本发明的药物组合物(治疗药或者预防药)或体内检测或者测定用的药剂或组合物,优选制备成适合于活性成分的施用量的给药单位的剂型。作为这样的给药单位的剂型,可以示例出注射剂(安瓿、管形瓶、预装针),每个给药单位剂型通常可以含有5~500mg、5~100mg、10~250mg的本发明的抗体或其免疫反应性片段。

[0222] 本发明的药物组合物(治疗药或者预防药)或体内检测或者测定用的药剂或组合物的施用,可以为局部性也可以为全身性。对施用方法没有特殊限制,如上所述非口服地或口服施用。作为非口服的施用途径,可以列举出对皮下、腹腔内、血中(静脉内或者动脉内)

或脊髓液的注射或点滴等,优选对血中施用。本发明的药物组合物(治疗药或者预防药)或体内检测或者测定用的药剂或组合物可以一次性施用,也可以持续或断续施用。例如,施用也可以是1分钟~2周的持续施用。

[0223] 对本发明的药物组合物的施用量没有特殊限制,只要是能够获得希望的治疗效果或预防效果的施用量即可,可以根据症状、性别、年龄等适宜确定。本发明的药物组合物的施用量例如可以以AD的治疗效果或预防效果作为指标来确定。例如,在用于AD患者的预防和/或治疗的情况下,作为本发明的药物组合物的有效成分的1次量,适合的是通过静脉注射施用通常0.01~20mg/kg体重左右,优选0.1~10mg/kg体重左右,更优选0.1~5mg/kg体重左右,1个月1~10次左右,优选1个月1~5次左右。其他非口服施用和口服施用的情况下,可以参照此量施用。在症状特别严重的情况下,可以根据其症状增量或增加施用次数。

[0224] 另外,对本发明的体内检测或者测定用的药剂或组合物的施用量没有特殊限制,只要是能够获得希望的检测、测定或诊断的施用量即可,可以根据症状、性别、年龄等适宜确定。例如,在用于AD患者的诊断的情况下,作为本发明的体内检测或者测定用的药剂或组合物的有效成分的1次量,适合的是可以通过静脉注射施用通常0.01~20mg/kg体重左右,优选0.1~10mg/kg体重左右,更优选0.1~5mg/kg体重左右,1次~多次左右。其他非口服施用和口服施用的情况下,可以参照此量施用。

[0225] 以下,为更具体地对本发明进行说明而给出实施例,但本发明不受其限制。而且,整个本说明书中引用的全部文献通过参考直接并入本说明书中。

[0226] 实施例

[0227] (实施例1) 抗Aβ42的22位及23位具有转角结构的毒性构象异构体的抗体的制作

[0228] 在实施例1的实验中,小鼠的维持以及实验按照免疫生物研究所动物保护委员会认可的规程进行。G9C、E22P-Aβ9-35及E22P-Aβ9-35的分子量用MALDI-TOF-MS进行了确认(K.Murakami等(2010) ACS.Chem.Neurosci.,1:747-756)。

[0229] 按照已经报告的方法(K.Murakami等(2002) Biochem.Biophys.Res. Commun., 294:5-10;K.Murakami等(2007) ChemBioChem,8:2308-2314),合成G9C、E22P-Aβ9-35肽(CYEVHHQKL VFFAPDVGSNKGAIIGLM:SEQ ID NO:1),作为免疫原使用。在N末端添加半胱氨酸来替代第9位的甘氨酸,使之与作为载体蛋白的牛甲状腺球蛋白结合(Y.Horikoshi等(2004) Biochem.Biophys.Res. Commun.,319:733-737)。将BALB/c小鼠(日本Charles River株式会社、日本)用50mg/小鼠的G9C、E22P Aβ9-35肽融合体每周1次免疫1个月。将所得克隆在用50mg/mL的各种抗体突变体包覆的96孔Maxisorp平板(Nunc公司、丹麦)中于室温培养1小时后,用辣根过氧化物酶结合抗小鼠IgG抗体(Sigma公司、圣路易斯、密苏里州、美国)进行处理,用3,3',5,5'-四甲基联苯胺(Pierce公司、ROCK FIELD、伊利诺伊州、美国)或邻苯二胺二盐酸碱底物(Sigma公司)进行定量。对于所得45个克隆,筛选对处于22位以及23位具有转角结构的倾向的Aβ突变体(E22Q-Aβ42、E22G-Aβ42、E22K-Aβ42、E22P-Aβ42、以及D23N-Aβ42)(K.Murakami等(2003) J. Biol. Chem.,278:46179-46187)的结合能力高的克隆,对选择出的克隆进行了亚克隆。重复进行筛选,排除阳性率低或假阳性的克隆。对于所得克隆,通过Western印迹进一步进行筛选,得到了克隆IBL-102。

[0230] (实施例2) IBL-102抗体的结合特异性的测定1

[0231] 酶免疫测定对得到的克隆IBL-102产生的单克隆抗体(以下称为“IBL-102抗体”)

的与以下各抗原的结合能力进行测定:22,23内酰胺- $\text{A}\beta$ 、E22P- $\text{A}\beta 42$ 、E22G- $\text{A}\beta 42$ 、E22G- $\text{A}\beta 40$ 、E22K- $\text{A}\beta 42$ 、E22Q- $\text{A}\beta 40$ 、E22 Δ - $\text{A}\beta 42$ 、E22 Δ - $\text{A}\beta 40$ 、25,26内酰胺- $\text{A}\beta$ 、A21P- $\text{A}\beta 42$ 、E22V- $\text{A}\beta 42$ 、D23P- $\text{A}\beta 42$ 、V24P- $\text{A}\beta 42$ 、G25P- $\text{A}\beta 42$ 、M35P- $\text{A}\beta 42$ 、野生型 $\text{A}\beta 38$ 、野生型 $\text{A}\beta 40$ 、野生型 $\text{A}\beta 42$ 、recom. $\text{A}\beta 42$ 、野生型 $\text{A}\beta 43$ 及野生型 $\text{A}\beta 46$ 。具体而言,向用0.1M碳酸缓冲液固定化(包覆)了1 μg /孔的82E1抗体(识别 $\text{A}\beta$ 序列的1-16残基(非转角结构部分);参照Y.Horikoshi等(2004) Biochem Biophys Res Commun.2004Jul 2;319(3):733-7.;以下相同)的96孔板,添加了4000、1000、250、62.5pg/mL的上述各抗原,或作为对照的0.1% (w/v) BSA。在4 $^{\circ}\text{C}$ 静置一夜后,除去孔中的反应液,进行洗涤。向各孔添加辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗 $\text{A}\beta$ 小鼠单克隆抗体IBL-102 100 μL 。在4 $^{\circ}\text{C}$ 静置60分钟后,除去孔中的反应液,进行洗涤。添加3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)底物液100 μL ,遮光于室温静置30分钟后,加入1N H_2SO_4 ,100 μL 使显色反应终止。测定了在450nm的吸光度。

[0232] 将测定IBL-102抗体与上述各抗原的结合能力的结果示于表1。对数值而言,表1表示了在450nm的吸光度。IBL-102抗体对E22P- $\text{A}\beta 42$ 显示出极其特异性的免疫反应性,对其它抗原显示低亲和性。该结果表明,IBL-102抗体仅非常特异性识别在22位及23位具有转角结构的 $\text{A}\beta 42$ 。根据表1显示的E22P- $\text{A}\beta 42$ 的数据制作标准曲线,分别对A21P- $\text{A}\beta 42$ 、E22V- $\text{A}\beta 42$ 、D23P- $\text{A}\beta 42$ 、V24P- $\text{A}\beta 42$ 、G25P- $\text{A}\beta 42$ 、及M35P- $\text{A}\beta 42$ 测定了4000pg/mL的OD值,通过与该OD值制作成的标准曲线进行比对,算出作为E22P的浓度,求出作为与实际测定的浓度(4000pg/mL)之比(%)的交叉反应率。其结果,相对于IBL-102抗体的主反应(与E22P- $\text{A}\beta 42$ 的结合),对A21P- $\text{A}\beta 42$ 、E22V- $\text{A}\beta 42$ 、D23P- $\text{A}\beta 42$ 、V24P- $\text{A}\beta 42$ 、G25P- $\text{A}\beta 42$ 及M35P- $\text{A}\beta 42$ 的交叉反应率分别依次为0.27%、0.28%、0.50%、0.33%、0.53%及0.68%。

[0233] [表1]

[0234]

抗原	抗原量 (pg/mL)			
	4000	1000	250	62.5
22,23lactam-A β 42	0.057	0.011	-0.001	-0.005
E22P-A β 42	3.92	3.92	3.489	1.119
E22G-A β 42	0.321	0.111	0.121	0.051
E22G-A β 40	0.55	0.074	0.009	-0.007
E22K-A β 42	0.093	0.018	0.001	-0.001
E22Q-A β 40	0.863	0.092	0.01	-0.007
E22 Δ -A β 42	0.25	0.118	0.163	0.031
E22 Δ -A β 40	1.818	0.437	0.194	0.116
25,26lactam-A β 42	0.188	0.049	0.027	0.017
A21P-A β 42	0.193	0.047	0.011	-0.003
E22V-A β 42	0.198	0.085	0.021	0.054
D23P-A β 42	0.358	0.086	0.023	0.004
V24P-A β 42	0.233	0.116	0.05	0.064
G25P-A β 42	0.383	0.127	0.035	0.014
M35P-A β 42	0.489	0.18	0.107	0.047
WT-A β 38	0.433	0.161	0.052	0.009
WT-A β 40	0.404	0.193	0.087	0.054
WT-A β 42	0.283	0.085	0.021	0.002
recom.A β 42	0.358	0.2	0.062	0.113
WT-A β 43	0.384	0.213	0.091	0.042
WT-A β 46	0.124	0.126	0.09	0.087

[0235] (实施例3) IBL-102抗体的结合特异性的测定2

[0236] 通过酶免疫测定,对得到的单克隆抗体IBL-102(以下称为“IBL-102抗体”)与以下各抗原的结合能力进行了测定:E22P-A β 42、E22V-A β 42、野生型A β 42、野生型A β 40及作为对照的牛血清白蛋白(BSA)。将各抗原利用固相用缓冲液(0.1M碳酸缓冲液,pH 9.5)以50ng/孔的浓度加入ELISA用96孔板,在4℃反应一夜使其固定化。用PBS洗涤后,利用封闭液(1% BSA、0.05% Tween 20/PBS)进行封闭。如上所述地将各抗原固定化后,将IBL-102抗体稀释为1、0.5、0.25、0.125 μ g/mL的浓度,以50 μ L/孔添加到各固相抗原。于37℃反应30分钟后,洗涤并添加标记抗体(抗小鼠IgG(H+L)山羊Fab'-HRP)50 μ L/孔,于37℃反应30分钟后,进行洗涤。添加生色用底物液(邻亚苯基二胺二盐酸盐;OPD)进行生色(遮光,于室温15分钟),添加

终止液 (1N H_2SO_4) 终止后,测定了在490nm的吸光度。作为对照的IBL-101抗体 (#10379, Anti-Human Amyloid β E22P (11A1) Mouse IgG MoAb株式会社免疫生物研究所,日本) 也同样地进行了试验。

[0237] 将测定IBL-102抗体和IBL-101抗体的与上述各抗原的结合能力的结果示于表2。数值表示在490nm的吸光度。IBL-102抗体显示了对E22P-A β 42极其特异性的免疫反应性,相对于其它抗原显示了低亲和性。相对于IBL-101抗体对E22V-A β 42、野生型A β 42、野生型A β 40等均反应较弱,该结果表明,IBL-102抗体仅非常特异性地识别在22位及23位具有转角结构的A β 42。

[0238] [表2]

[0239]

抗体	$\mu\text{g/mL}$	E22P, A β 1-42	E22V, A β 1-42	A β 1-42	A β 1-40	BSA
IBL-101	1	2.247	0.493	2.13	2.078	0.038
	0.5	1.921	0.256	1.756	1.808	0.039
	0.25	1.553	0.147	1.279	1.35	0.036
	0.125	1.151	0.08	0.924	0.97	0.037
IBL-102	1	1.284	0.03	0.231	0.449	0.039
	0.5	0.833	0.016	0.154	0.292	0.039
	0.25	0.496	0.009	0.102	0.165	0.039
	0.125	0.301	0.006	0.069	0.106	0.039

[0240] (实施例4) 利用了IBL-102抗体的阿尔茨海默病患者的诊断

[0241] 将以下患者作为AD患者:在到京都府立医科大学神经内科就诊的认知症患者中,在得到书面同意的基础上采集髓液的患者中,通过随后的临床进程及图像诊断等诊断为AD的患者。另外,将得到书面同意在各种神经疾病的诊断的过程中进行髓液检验,并将其被检物用于研究目的的患者作为对照(健康人)。髓液样品通过以下方法进行采集。在空腹时通过腰椎穿刺将脑脊髓液直接采集到灭菌单个装管(ASIAKIZAI, PP螺纹管15mL)中。

[0242] 用0.1M碳酸缓冲液以1 μg /孔将抗A β 小鼠单克隆82E1抗体(识别人A β 的N末端(第1~16位的氨基酸)的抗体;Horikoshi Y等, Biochem Biophys Res Commun. (2004) 319(3): 733-7;株式会社免疫生物研究所, #10323。以下相同)固定化(包覆)至96孔板。将被检物、阶梯性稀释而成的标准物质(E22P A β -40二聚物)及稀释用缓冲液(空白)各100 μL 加入各自的孔中。在4 $^{\circ}\text{C}$ 静置一夜后,除去孔中的反应液,进行洗涤。向各孔添加HRP标记的抗A β 小鼠单克隆抗体IBL-102 100 μL 。在4 $^{\circ}\text{C}$ 静置60分钟后,除去孔中的反应液,进行洗涤。添加TMB底物液100 μL ,遮光于室温静置30分钟后,加入1N H_2SO_4 100 μL 终止生色反应。测定了在450nm的吸光度。用根据标准物质得到的标准曲线,确定了各样品中的具有毒性构象异构体的A β 的量。

[0243] 另外,按照已经报告的方法测定了相同髓液样品中的A β 42的量,确定了总A β 42的量。相对于确定的总A β 42量,计算具有毒性构象异构体的A β 的量,检查与AD发病之间的相关性。

[0244] 将测定源自阿尔茨海默病患者(AD)及健康人(Control)的脑脊髓液中,与IBL-102

抗体结合的物质(A β 的毒性构象异构体:ToxicA β)的结果示于图1。另外,将相同脑脊髓液中的总A β 42、算出的具有毒性构象异构体的A β 的量相对于相同脑脊髓液中的总A β 42的量之比的结果示于图14。在AD患者中通过使用IBL-102抗体ToxicA β 水平显示为高值,相对于此,在健康人中ToxicA β 水平显示为低值。根据Mann Whitney test检验的结果为 $P=0.0635$ 。在IBL-101抗体中未能发现这样的在AD患者和健康人中的显著差异(未图示)。进一步表明,如果该差异作为具有毒性构象异构体的A β 的量相对于总A β 42的量之比计算,则该差异更为显著。即,表明具有毒性构象异构体的A β 的量相对于AD患者的总A β 42的量之比,与非AD患者的上述之比(比值)相比,有显著性更高($p<0.05$)。因而,表明IBL-102抗体能够利用于AD的诊断。

[0245] (实施例5) IBL-102抗体的对A β 42诱导神经细胞毒性的效果

[0246] 为了确定IBL-102抗体是否可以抑制A β 42的细胞毒性,通过MTT测定对大鼠初级神经元中的A β 42诱导神经细胞毒性进行了评价(K.Murakami等(2003) J.Biol.Chem., 278: 46179-46187)。向培养的大鼠初级神经元添加1 μ M的野生型A β 42或E22P-A β 42,给予细胞毒性刺激。将细胞毒性刺激非添加组作为对照(无刺激)。添加A β 42或E22P-A β 42后,作为被检药剂分别添加了0.1mg/mL的IBL-102抗体及IgG抗体(阴性对照)。将抗体非添加组作为对照(无药剂)。在37 $^{\circ}$ C培养了4天。使用的A β 的浓度是接近野生型A β 42的IC₅₀值的 10^{-6} M。统计学上有意义的差异根据单因素方差分析后的Tukey's test进行评价。

[0247] 将结果示于图2。用1 μ M的野生型A β 42及E22P-A β 42处理过的大鼠初级神经元,显示出低于对照细胞的生存能力。通过添加IBL-102抗体,阻碍了A β 42及E22P-A β 42的细胞毒性。因而,表明IBL-102抗体可以显著地阻碍由A β 42及A β 的毒性构象异构体导致的细胞毒性。

[0248] (实施例6) AD模型小鼠(促进型APP转基因小鼠)脑的免疫染色

[0249] 作为AD模型小鼠,使用了APP转基因小鼠,使Tg2576(K.Hsiao等(1996) Science, 274:99-102)过量表达作为A β 42生成酶的早老素2的小鼠PS2,Tg2576(T.Toda等(2011) J.Biomed.Biotech., 2011, 617974)。在乙醚麻醉下摘出小鼠的脑,利用4%多聚甲醛固定。通过利用石蜡进行包埋,以5 μ m的厚度切成薄片制作成切片。切片经脱石蜡处理、亲水化处理后,利用甲酸激活抗原并使内源性过氧化物酶失活,然后进行血清封闭。将作为一次抗体的1 μ g/ml或5 μ g/ml的82E1(阳性对照)、5 μ g/ml或20 μ g/ml的IBL-101及5 μ g/ml或20 μ g/ml的IBL-102在4 $^{\circ}$ C反应一夜,洗涤后用作为二次抗体的生物素化抗小鼠IgG抗体在室温反应。用亲生物素复合试剂盒增强免疫反应强度,利用3,3'-二氨基联苯胺进行染色。

[0250] 将结果示于图3。对作为阳性对照的82E1而言,通过适用1 μ g/ml及5 μ g/ml的浓度,使老年斑明显染色。对IBL-101而言,通过5 μ g/ml的适用可见老年斑和脑实质的染色,通过20 μ g/ml的适用,染色性增强。另一方面,对IBL-102而言,在5 μ g/ml及20 μ g/ml的任意浓度中的适用,均未见老年斑及脑实质的染色。可知,IBL-102与IBL-101不同,与老年斑不反应,显示出特征的反应性。

[0251] (实施例7) 在AD模型小鼠(促进型APP转基因小鼠)中的药效评价试验

[0252] 作为AD模型小鼠,使用了PS2,Tg2576。以小鼠出生作为第0天,从第3个月开始施用抗体,在第6个月进行行为测试。作为施用抗体,使用了IgG、IBL-101抗体及IBL-102抗体(各组 $n=5\sim9$)。各抗体以10mg/kg的施用量、每周1次的频率进行了3个月的施用。

[0253] 对评价而言,作为神经症状的行为评价进行了高架加迷宫测试(Elevated plus-

maze test)、筑巢试验(Nesting test)。另外,作为病理学的评价,进行了老年斑的免疫组织化学染色(使用82E1抗体),以及根据ELISA的脑内(可溶性级分及不溶性级分)的A β 量的测定。可溶性级分及不溶性级分的制备按照常规方法进行。统计学上有意义的差异根据单因素方差分析后的Tukey's test进行评价。

[0254] 高架加迷宫试验的结果示于图4。PS2,Tg2576在施用IgG组中显示出对闭合臂(closed arm)的指向性的降低。虽然IBL-101的施用不能改善这样的神经症状,但IBL-102的施用显示了显著的改善。以上的结果表明,对毒性构象异构体的选择性高对于AD的抗体治疗十分重要,选择性高的IBL-102显示出显著的治疗、预防效果。

[0255] 筑巢试验的结果示于图5。筑巢试验如下进行:把小鼠放入已放入10片6cm见方的正方形的纸片的笼中,按照以下基准对4天后的筑巢情况评分。分数0:没有筑巢(No Nesting);分数1:将全部碎片收集到角落(Gather all strips at a corner);分数2:将全部碎片收集到角落并进行作业(Gather and process all strips);分数3:集中并撕成细小的片(Gather and tear to small pieces)。对PS2,Tg2576而言,在施用IgG组中显示出筑巢分数的降低。虽然IBL-101的施用不能改善这样的神经症状,但IBL-102的施用显示了改善。以上的结果表明,对毒性构象异构体的选择性高对于AD的抗体治疗十分重要,选择性高的IBL-102显示出治疗、预防效果。

[0256] 将老年斑的免疫染色的结果示于图6(脑)及图7(海马)。确认在PS2,Tg2576的脑内及海马中,在施用IgG组中存在老年斑。IBL-101及IBL-102的施用不能抑制该老年斑的沉积。由以上的结果可知,IBL-101及IBL-102没有减少老年斑的数量的效果。另外,认为IBL-102与老年斑的数量无关地改善了神经症状。

[0257] 通过ELISA测定的脑内的A β 量的结果示于图8。在PS2,Tg2576的脑内,在施用IgG组中检测出了A β 40及A β 42。IBL-101及IBL-102的施用未能减少该A β 40及A β 42。由以上的结果可知,IBL-101及IBL-102没有减少脑内的A β 40及A β 42的总量的效果。另外,认为IBL-102与A β 40及A β 42的总量无关地改善了神经症状。

[0258] (实施例8) 确定IBL-102抗体的序列

[0259] 为了确定IBL-102抗体的基因序列,进行了重链(以下称为“Hc”)及轻链(以下称为“Lc”)的克隆。从产生IBL-102抗体的杂交瘤提取mRNA,制备了cDNA。按照常规方法,进行cDNA 5'末端快速扩增(5'-RACE),确定了Hc及Lc基因的5'末端的碱基序列。使用对Hc、Lc特异性的引物,克隆了各自的全长cDNA。确定的Hc及Lc的基因序列、氨基酸序列(包括信号序列)分别如图9(序列编号1及序列编号8)所述、如图10(序列编号2及序列编号9)所述。另外,IBL-102抗体的VH及VL的序列,分别依次如序列编号4及序列编号11记载所述。另外,IBL-102抗体的CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2及CDRL3的序列分别依次如序列编号5、6、7、12、13及14记载所述。

[0260] (实施例9) 根据BIACORE的解离常数的测定

[0261] 对于IBL-102抗体及IBL-101抗体,用BIACORE(GE Healthcare Bioscience株式会社,BIACORE-X100)测定了该抗体与抗原之间的解离常数(KD)。按照BIACORE(GE Healthcare Bioscience株式会社,BIACORE-X100)的指南,将生物素化E22P-A β 42或生物素化野生型A β 42固定于SA芯片,然后流入IBL-101抗体或IBL-102抗体,测定了结合速度常数Ka1、解离速度常数Kd1,并用二价拟合确定了结合常数KD值。

[0262] Ka1、Kd1及KD值的结果示于以下表3。如下所述，与IBL-101抗体比较，IBL-102抗体与E22P-Aβ42及E22P-Aβ42二聚物强力结合。

[0263] [表3]

[0264] Table 3. IBL-102和IBL-101与Aβ衍生物的结合过率常数 (k_a) 和解离速率 (k_d) 及解离常数 (K_D)

抗体	已固定 Aβ	k_a ($M^{-1} s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (nM)
	Aβ42	$<5.0 \times 10^4$	$>5.0 \times 10^{-7}$	>100
IBL-102	E22P-Aβ42	2.3×10^5	7.1×10^{-4}	3.1
[0265]	E22P-Aβ42 二聚物	2.3×10^5	3.9×10^{-4}	1.7
	Aβ42	3.4×10^4	4.9×10^{-4}	14
IBL-101	E22P-Aβ42	4.0×10^4	9.2×10^{-4}	23
	E22P-Aβ42 二聚物	9.5×10^2	1.1×10^{-5}	11

[0266] (实施例10) 对Aβ聚合物的结合能力测定

[0267] 认为Aβ通过互相结合形成寡聚物而具有毒性。为了检查IBL-102抗体与Aβ寡聚物的结合，根据酶免疫测定对与以下各抗原的结合能力进行测定：野生型Aβ42；E22P-Aβ42；E22P, V40L, LDap-Aβ42二聚物；及E22P, A30L, LDap-Aβ40二聚物。将各抗原利用固相用缓冲液 (0.1M碳酸缓冲液, pH 9.5) 以50ng/孔的浓度加入ELISA用96孔板，在4℃反应一夜使其固定化。用PBS洗涤后，利用封闭液 (1%BSA, 0.05%Tween 20/PBS) 进行封闭。如上所述地将各抗原固定化后，将IBL-102抗体稀释为1、0.5、0.25、0.125μg/mL的浓度，以100μL/孔添加到各固相抗原。于室温反应60分钟后，洗涤并添加标记抗体 (抗小鼠IgG (H+L) 山羊Fab' -HRP) 50μL/孔，于室温反应60分钟后，进行洗涤。添加生色用底物液 (邻亚苯基二胺二盐酸盐；OPD) 进行生色 (遮光，于室温30分钟)，添加终止液 (2N H₂SO₄) 终止后，测定了在492nm的吸光度。作为对照的IBL-101抗体及4G8抗体 (在Aβ序列的18-22残基 (非转角结构部分) 具有表位的单克隆抗体；H.M.Wisniewski等 (1989) Acta.Neuropathol., 78:22-27) 也同样地进行了试验。

[0268] 结果如图11所示。对IBL-101抗体而言，显示出与野生型的Aβ42、E22P-Aβ42的单体、E22P, V40L, LDap-Aβ42的二聚物、E22P, V40L, LDap-Aβ40的二聚物中的任意的基本同样弱的结合力。与此相对，IBL-102抗体虽然对野生型的Aβ42的结合力与IBL-101相同，但与E22P-Aβ42的单体为强力结合，进一步，与E22P, V40L, LDap-Aβ42的二聚物、及E22P, V40L, LDap-Aβ40的二聚物为更强力结合。作为对照使用的4G8抗体虽然与野生型的Aβ42强力结合，但对E22P突变型的Aβ42只有较弱的结合。这点表明，IBL-102抗体显示出与Aβ寡聚物为特异性的强力结合。

[0269] (实施例11) 疫苗单次施用试验

[0270] 为了检查IBL-102抗体的静脉内的单次施用的效果，对18月龄的AD模型小鼠Tg2576施用了IBL-102抗体。实验的日程表示于图12。从初次施用抗体开始，以1周间隔，合

计2次交替施用了IBL-102抗体(10-20mg/kg)或PBS。将小鼠分为A组及B组2组(各n=7),对于A组施用了:初次:IBL-102抗体,第2次:PBS,对于B组施用了:初次:PBS,第2次:IBL-102抗体。在初次及第2次施用之前(试验前)及之后(试验后)进行了行为测试,检查了抗体施用引起的效果。行为测试测量了对新物体的接触时间(交换味道的时间),通过与对照小鼠(年轻B6)之间的比较,将好奇心的指标分数化。具体而言,如下求出再检索分数:用施用IBL-102组或施用PBS组的各个体的(试验后中的接触次数)/(试验前中的接触次数),除以对照小鼠组的(试验后中的接触次数)/(试验前中的接触次数)的平均值。在初次和第2次施用的行为测试中,使用了不同物体。

[0271] 结果如图13所示。在施用PBS组中,忘记在试验前中接触过一次、在试验后中再次将相同物体识别为新物体并采取探索行为的小鼠多于对照,与此相对,通过施用IBL-102抗体,不再接触在试验前中接触过一次的物体的小鼠的数量增加了。这点表明,IBL-102抗体的施用可改善由A β 引起的记忆障碍。

[0272] (实施例12) IBL-102抗体的结合特异性的测定3

[0273] 通过酶免疫测定,对IBL-102抗体和IBL-101抗体的与以下各抗原的结合能力进行测定、比较:野生型A β 40、野生型A β 42、E22P-A β 42、E22V-A β 42、G33P-A β 42、L34P-A β 42、L34P-A β 42、V36P-A β 42、G37P-A β 42、G38P-A β 42、V39P-A β 42、V40P-A β 42、I41P-A β 42。具体而言,向用0.1M碳酸缓冲液固定化(包覆)了1 μ g/孔的82E1抗体(识别A β 序列的1-16残基(非转角结构部分);参照Y.Horikoshi等(2004)Biochem Biophys Res Commun.2004Jul 2;319(3):733-7.;以下相同)的96孔板添加了2.5 μ g/孔的上述各抗原。于室温静置2小时后,除去孔中的反应液,洗涤后,在4℃封闭一夜。向各孔添加抗A β 小鼠单克隆抗体IBL-101及HRP标记的抗A β 小鼠单克隆抗体IBL-102100 μ L(120、60、30、15ng/mL)。于室温静置60分钟后,除去孔中的反应液,洗涤后,与HRP标记的二次抗体于室温反应一小时。添加邻亚苯基二胺(OPD)底物液100 μ L,遮光并于室温静置30分钟后,加入2M H₂SO₄ 50 μ L终止生色反应。测定了在492nm的吸光度。

[0274] 测定了IBL-102抗体和IBL-101抗体对上述各抗原的结合能力,比较的结果示于图15。数值表示在492nm的吸光度。IBL-102抗体对E22P-A β 42显示了极其特异性的免疫反应性,相对于其它抗原显示了低亲和性。该结果表明,IBL-102抗体仅非常特异性识别在22位及23位具有转角结构的A β 42。

[0275] (实施例13) 疫苗单次施用试验(IgG对照)

[0276] 为了检查IBL-102抗体的静脉内的单次施用的效果,对16-19个月龄的AD模型小鼠Tg2576施用了IBL-102抗体。相对于野生型小鼠及Tg2576,使其3天期间记忆了2个非常类似的物体A1及A2,每1天10分钟。在次日,对于野生型小鼠施用了PBS,对于Tg2576施用了IgG或IBL-102(20mg/kg)。在施用的次日计数了小鼠对于2个物体的接触次数,分别将(对物体A1的接触次数)/((对物体A1的接触次数)+(对物体B的接触次数))及(对物体B的接触次数)/((对物体A1的接触次数)+(对物体B的接触次数))作为小鼠的记忆力的指标进行评价,其中,所述2个物体包括:2个使其记忆的物体A1及A2中的一个(A1)、新物体B。

[0277] 结果示于图16。虽然野生型小鼠显示出对新奇物体(Novel:B)有意义的高的指向性(p=0.0003),但在施用IgG的Tg2576中观察不到该倾向,显示记忆力降低。另一方面,施用IBL-102的Tg2576显示出对于新奇物体的有意义的指向性(p=0.0002),未显示记忆力降

低。这点表明,IBL-102抗体的施用可改善由A β 引起的记忆障碍。

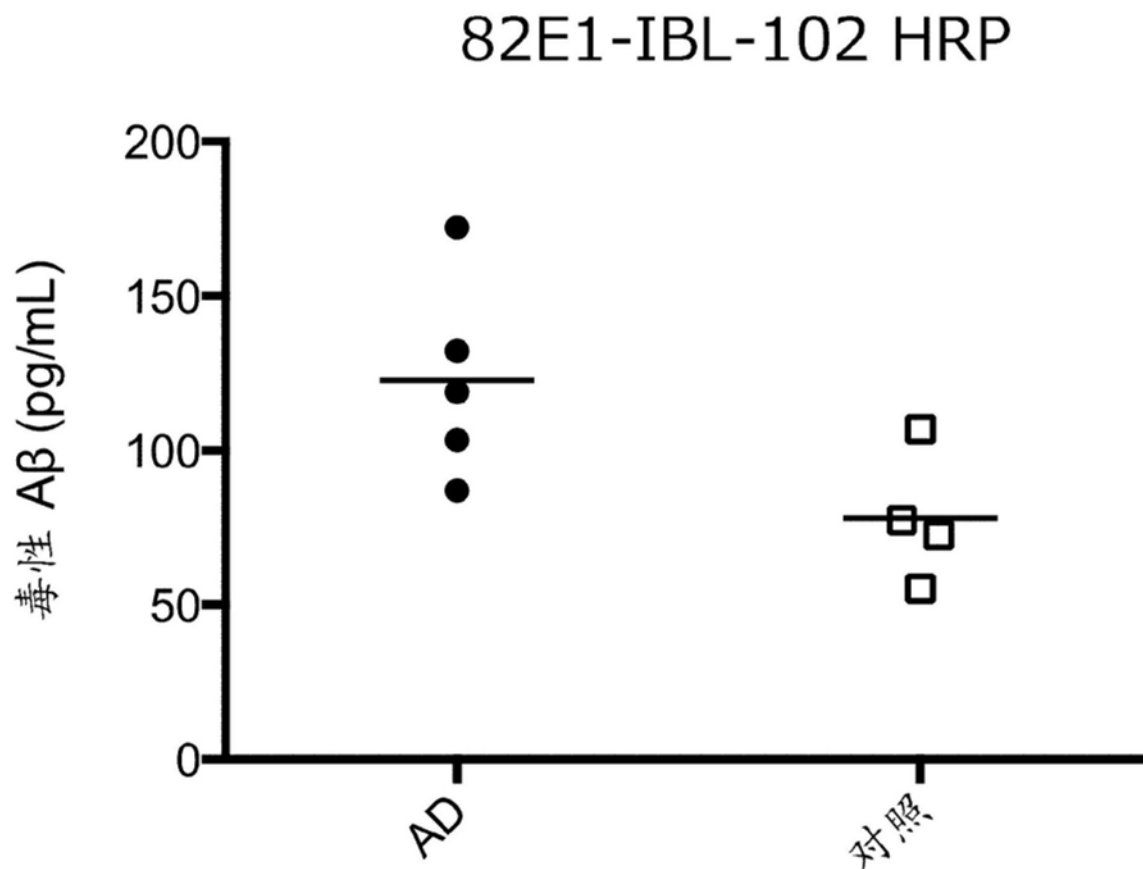


图1

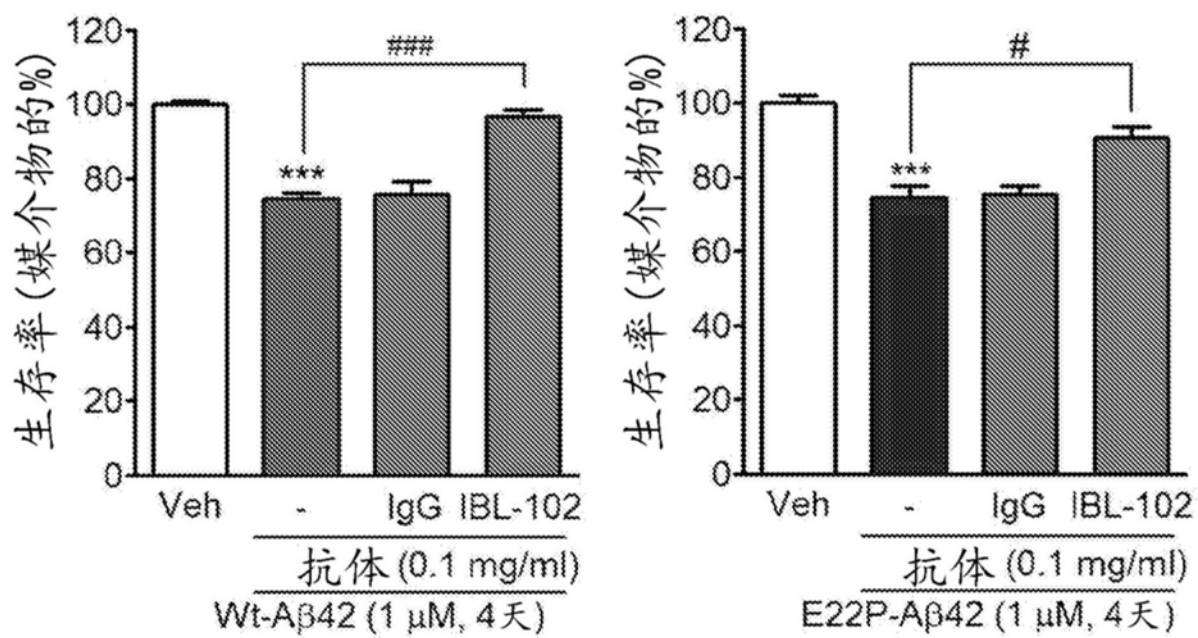


图2

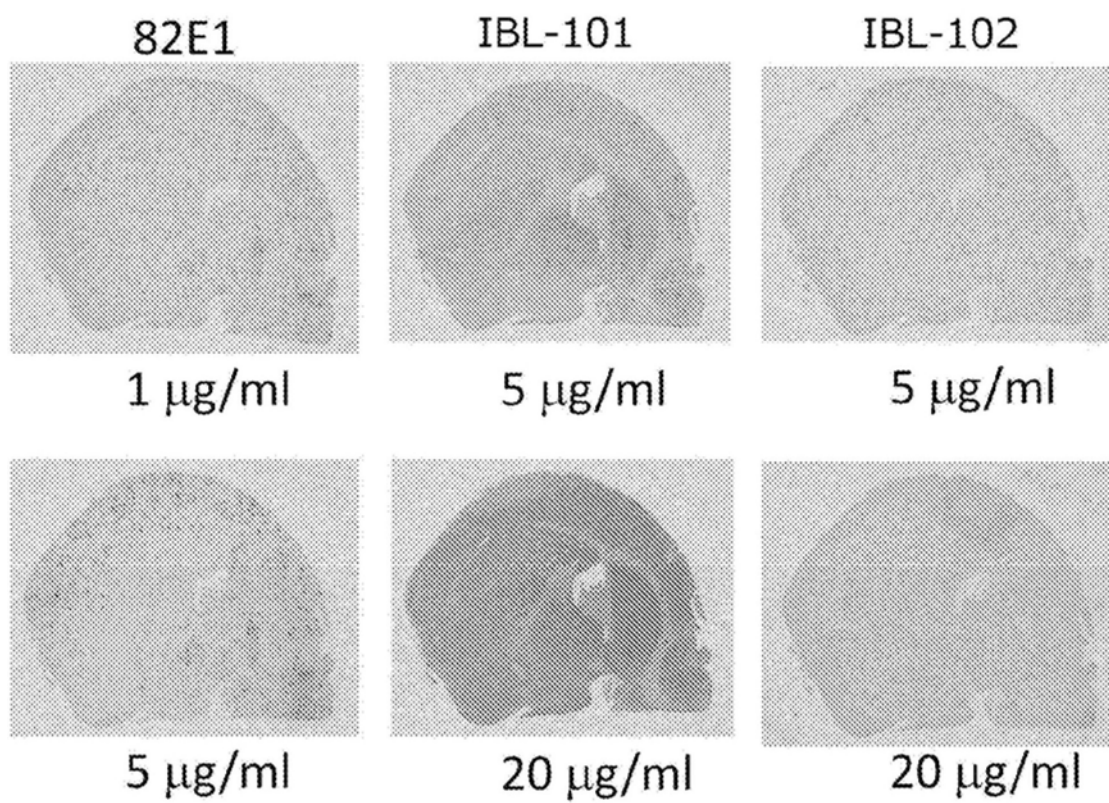
抗体对PS2、Tg2576小鼠的反应性

图3

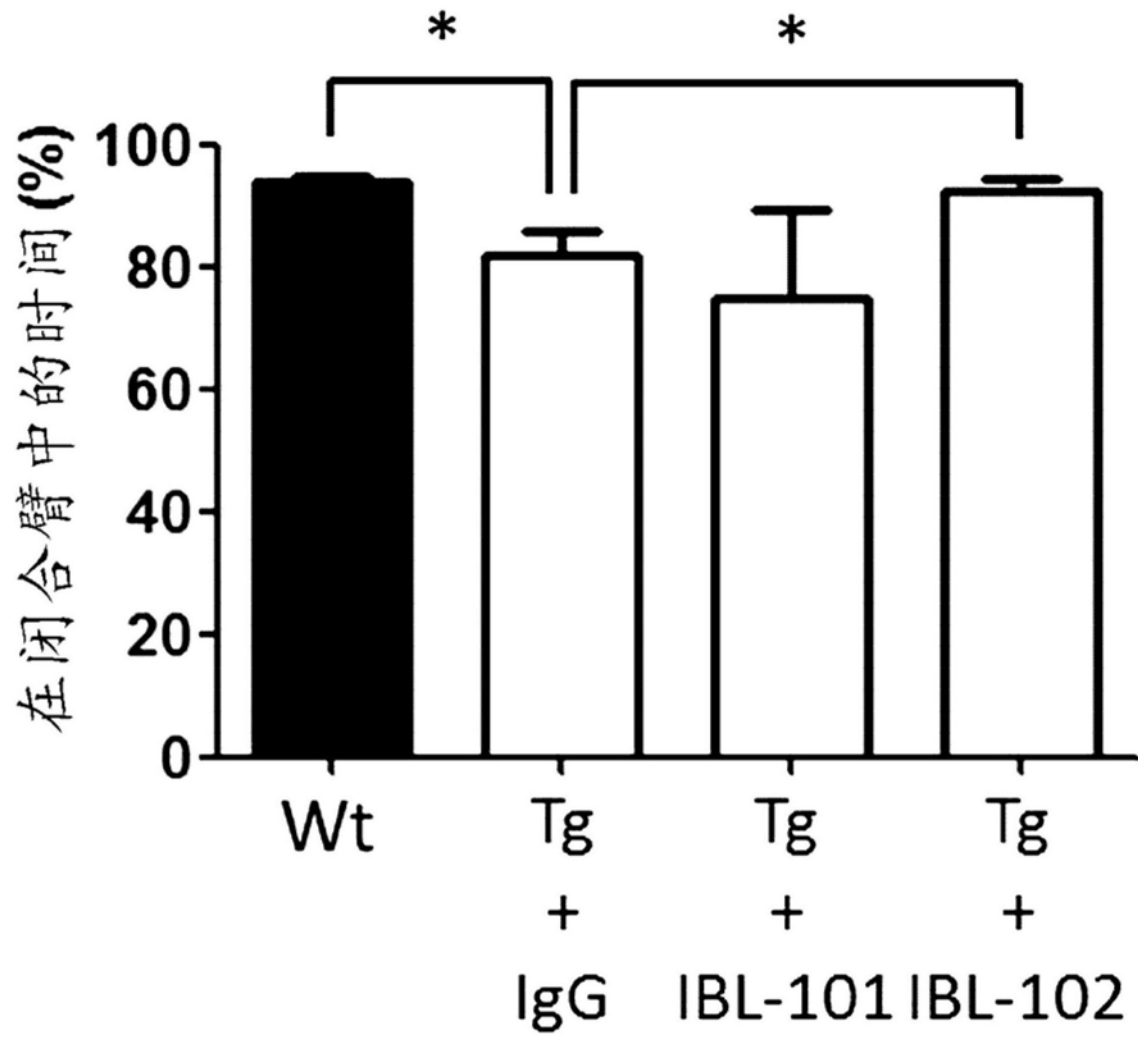


图4

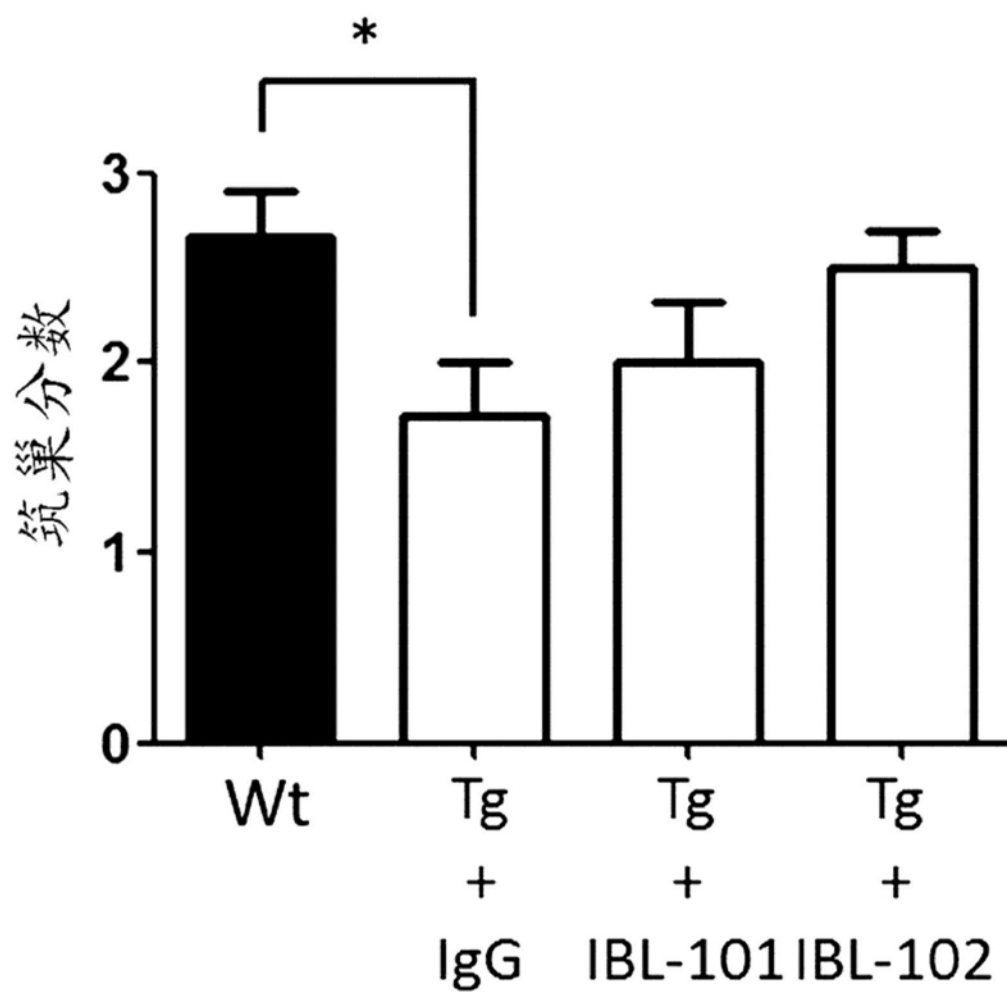


图5

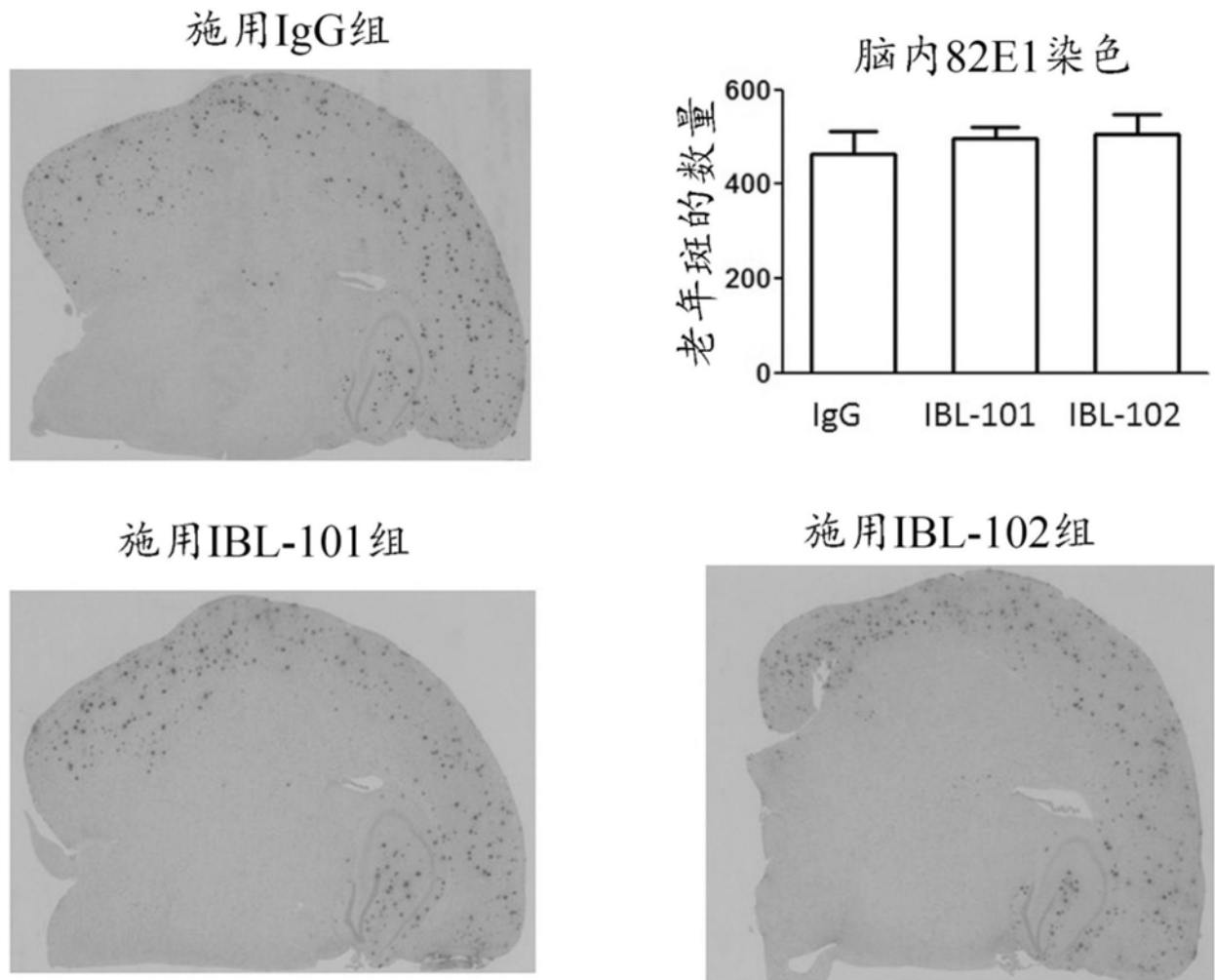


图6

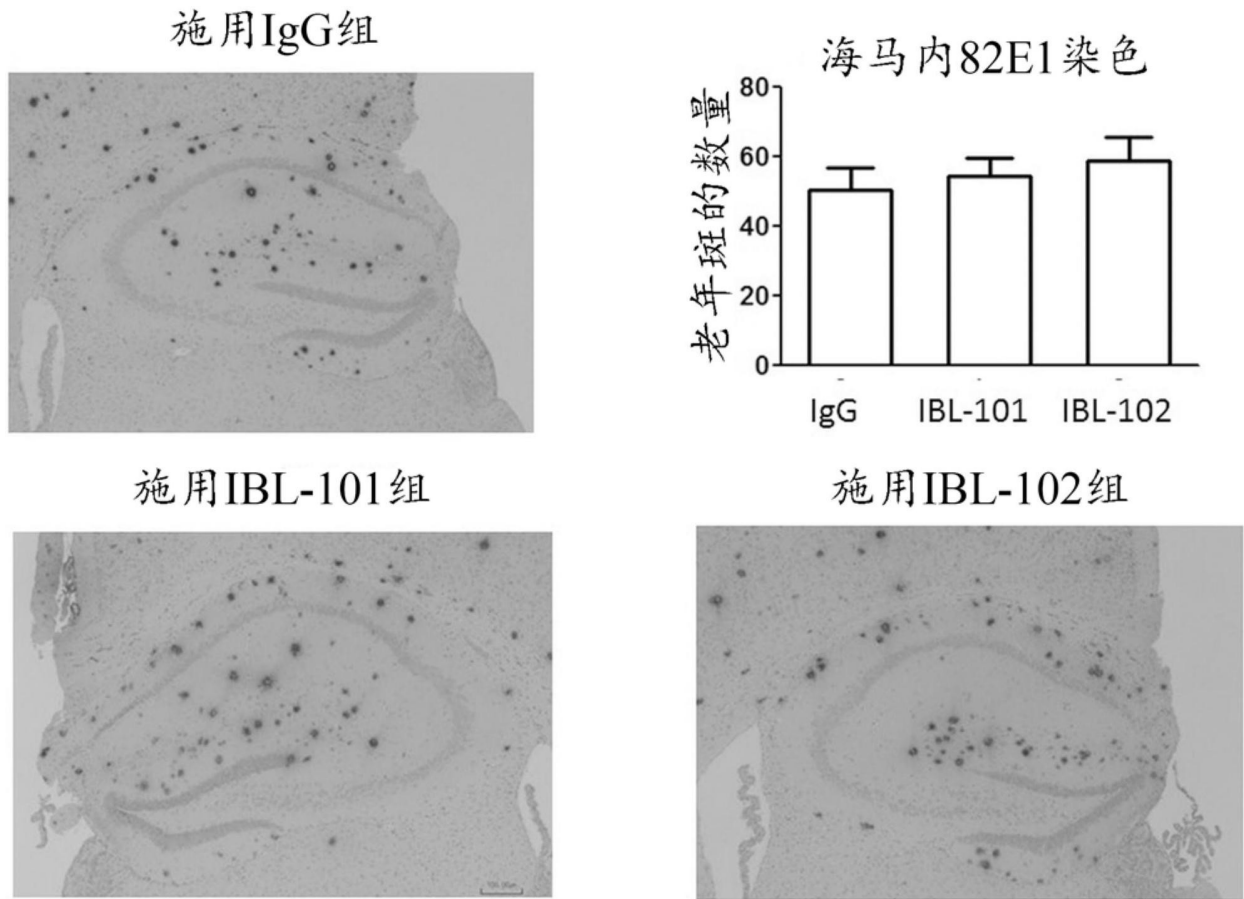


图7

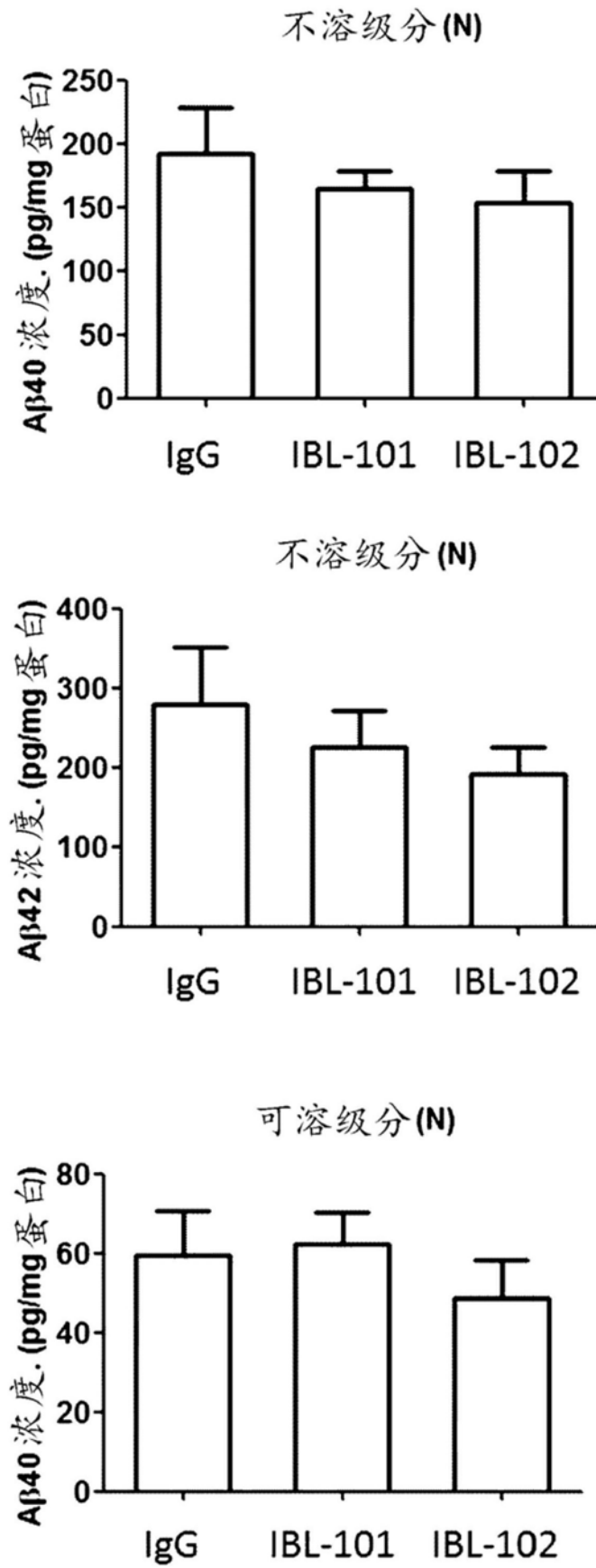


图8

IBL-102重链

CTACAGCGTTTACTTAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTCCAGTGTGGTGGAATTCCTAACC
ATGGGATGGAGCTGGATCTTTCTCCTCTTCCTGTCAGGAACTGCAGGTGTCCTCTCTGAGGTCCAGCT
GCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATTCTGCAAGGCTTCTGGAT
ACACTTTCAGTGACTACAATATGGACTGGGTGAAGCAGAGTCATGGAAAGAGACTTGAGTGGATTGGA
GATATTAATCCTAACACTGGTGTACTATCGACAATCCGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTA
GACGAGTCTCCAGTACAGTCTACATGGAGCTCCGCAGCCTGTCTGCTGAAGACACTGCCGTCTATTA
CTGTGCAAGATTACCCGATAACTATGTTATGGACTATTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCGC
AGCCAAAACGACACCCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCCTGGATCTGCTGCCCAAACCTAATCCATGG
TGACCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTCTGGATCC
CTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTGCAGTCTGACCTCTACACTCTGAGCAGCTCAGT
GACTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCCCAGCCAGACCGTCACCTGCAACGTTGCCACCCGGCCAGCAGC
ACCAAAGTGGACAAGAAAATTGTGCCCAGGGATTGTGGTTGTAAGCCTTGTCATATGTACAGTCCCAGA
AGTATCATCTGTCTTCATCTTCCCCCAAGCCCAAGGATGTGCTCACCATTACTCTGACTCCTAAGGT
CACGTGTGTTGTGGTAGACATCAGCAAGGATGATCCCGAGGTCCAGTTCAGCTGGTTTGTAGATGATG
TGGAGGTGCACACAGCTCAGACGAAAACCCCGGAGGAGCAGATCAACAGCACTTTCCGTTCAGTCAG
TGAACTTCCCATCATGCACCAGGACTGGCTCAATGGCAAGGAGTTCAAATGCAGGGTCAACAGTGCAG
CTTTCCCTGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGCAGACCGAAGGCTCCACAGGTGTAC
ACCATTCCACCTCCCAAGGAGCAGATGGCCAAGGATAAAGTCAGTCTGACCTGCATGATAACAAACTT
CTTCCCTGAAGACATTACTGTGGAGTGGCAGTGGAAATGGGCAGCCAGCGGAGAACTACAAGAACT
CAGCCCATCATGGACACAGATGGCTCTTACTTCGTCTACAGCAAGCTCAATGTGCAGAAGAGCAACTG
GGAGGCAGGAAATACTTTACCTGCTCTGTGTTACATGAGGGCCTGCACAACCACCTACTGAGAAGA
GCCTCTCCCACTCTCCTGGTAAATAAGCGGCCGCTCGAGTCTAGAGTCCCGTATG

IBL-102轻链

CATACCAAGCGTTTTACTTAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTCCAGTGTGGGTGGAATTC
CTCAAAATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCCTGCTTCCAGCAGTGAT
GTTGTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGC
AGATGTAGTCAGAGCCTTGTAACAGAAATGGAAACACCAATTTACATTGGTACCTGCAGAAGTCA
GGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTT
AGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGG
AGTTTATTTCTGCTCTCAAAGTACATATGTTCCGCTCACGTTCCGGTGTGGGACCAAGCTGGAGCTG
AAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGA
GGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACCTTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGAAGATT
GATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCTGAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCAC
CTACAGCATGAGCAGCACCCCTCACGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTG
TGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCAACCATTTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGTAGGC
GGGCCGCTCGAGTCTAGAGGGCCCGTTTA

下划线表示编码区

图9

IBL-102 HC

MGWSWIFLLFLSGTAGVLSEVQLQQSGPELVKPGASVKIFCKASGYTFT
DYNMDWVKQSHGKRLEWIG**DINPNTGVTIDNPKFKG**KATLTVDSSSTV
YMELRSLSS EDTAVYYCAR**LPDNYVMDY**WGQGTSVTVSA**A**AKTTPPSVY
PLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQ
SDLYTLSSSVTVPSQH LAQPDRHCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCI
CTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITITLTPKVTCTVVVDISKDDPEVQFSWFVDDV
EVHTAQTKPREEQINSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPI
EKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITNFFPEDITVEWQ
WNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLVNQQSNWEAGNTFTCSVLHE
GLHNHHTEKSLSHSPGK

VH

IBL-102 LC

MKLPVRLLVLMFWIPASSSDVVMQTPLSLPVSLGDQASISCR**CSQSLVH**
RNGNTNLHWYLQKSGQSPKLLIY**KVSNRFS**GVDPDRFSGSGSGTDFTLKI
SRVEAEDLG VYFC**SQSTYVPLT**FGVGTKLELK**R**ADAAPT VSI FPPSSEQL
TSGGASVVCFLNNFY PKDINVKWKIDG SERQNGVLNSWTDQDSKDSTY
SMSSTLT LTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

VL

下划线依次表示CDR1、2、3区

图10

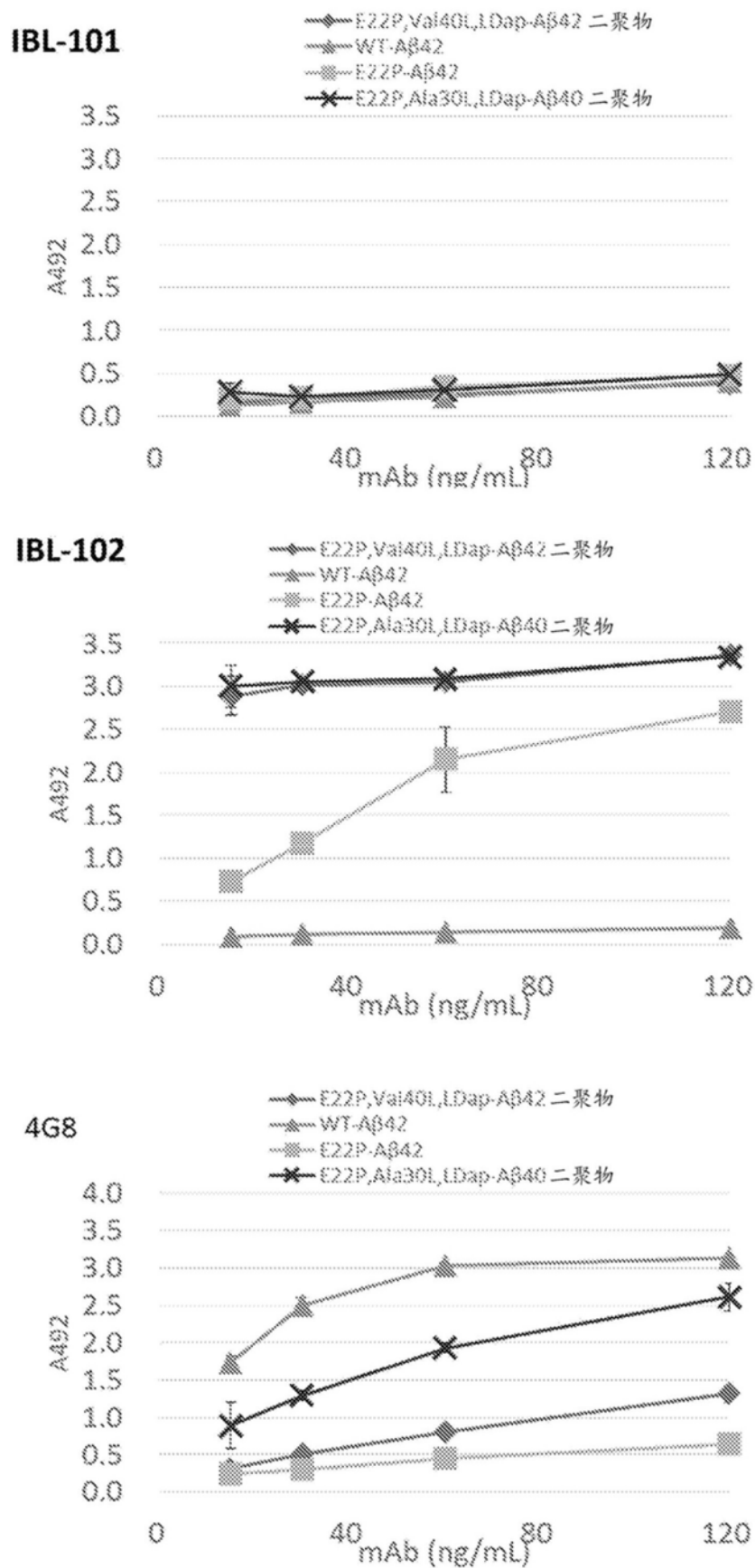


图11

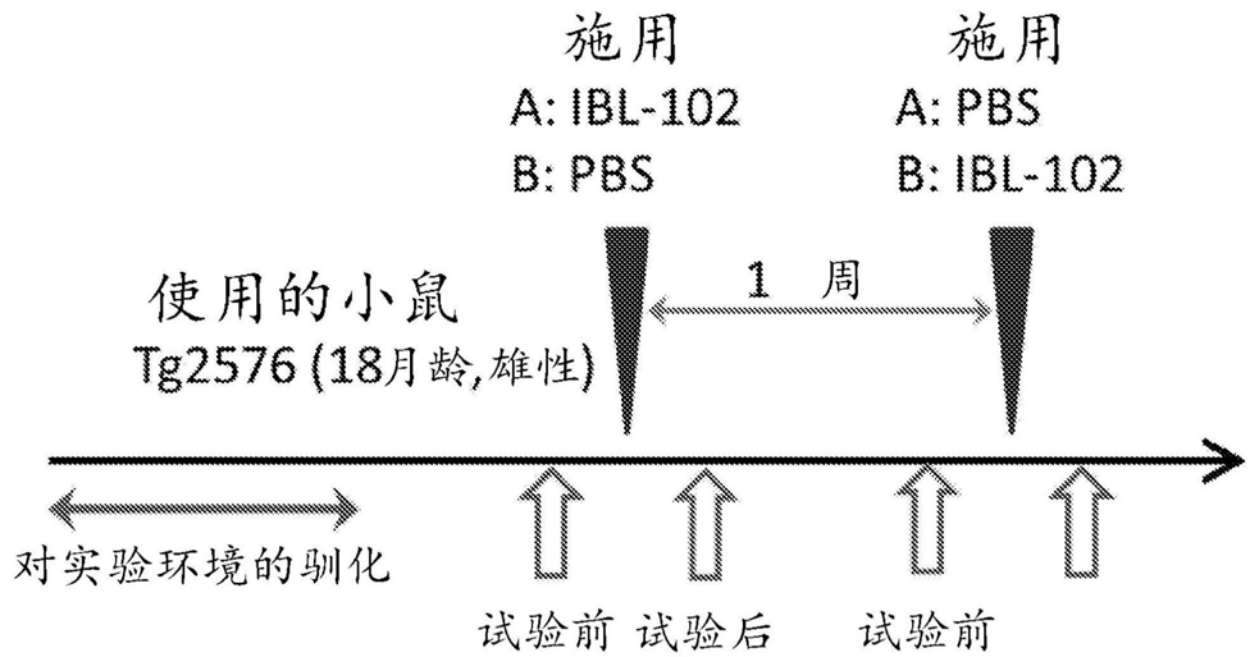


图12

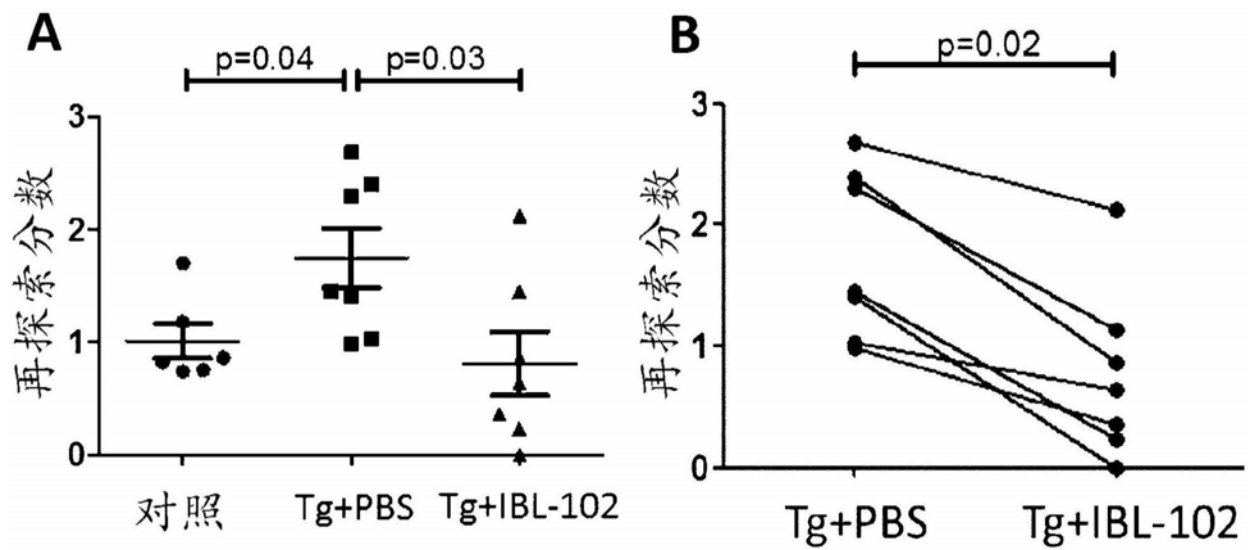


图13

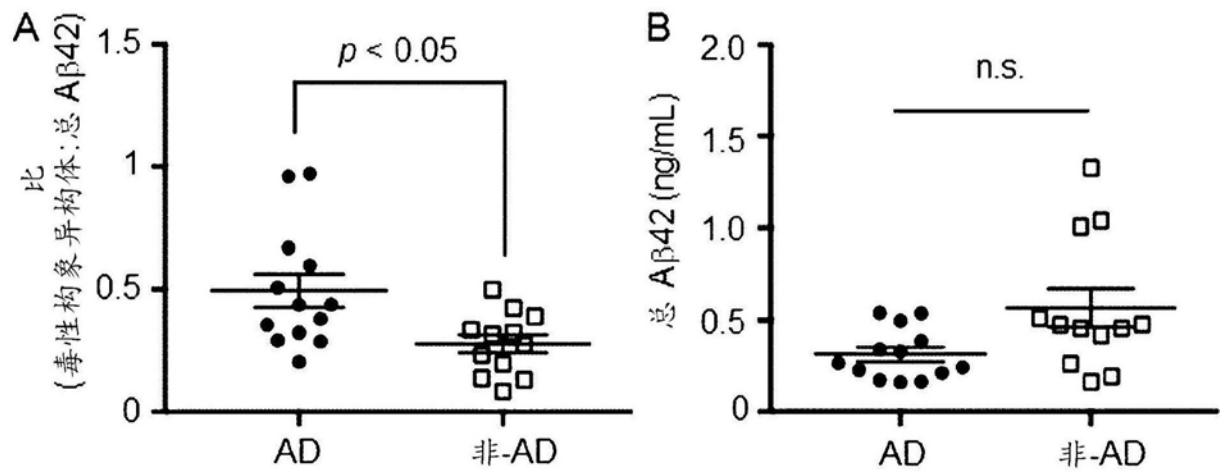


图14

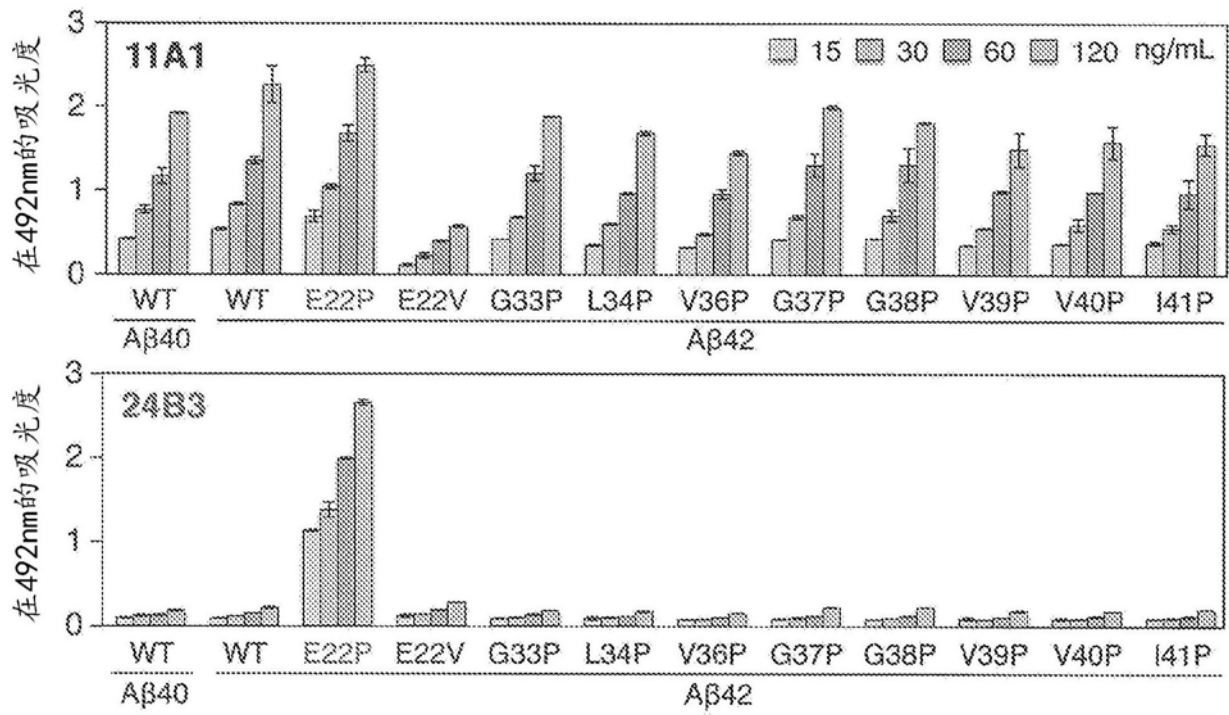


图15

IBL-102的静脉内单次施用带来的AD症状改善效果的探讨

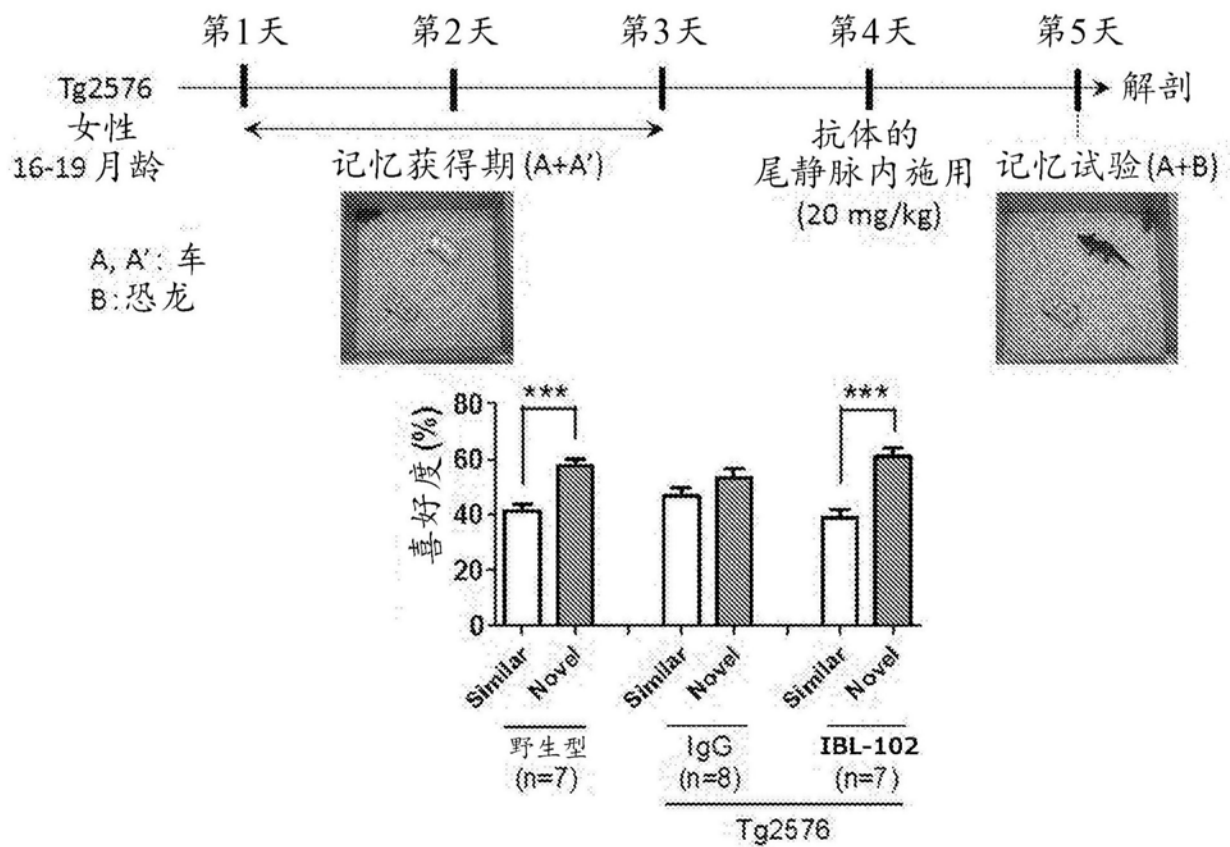


图16

专利名称(译)	极其特异性识别淀粉样蛋白 β 的22位及23位的转角结构的抗体		
公开(公告)号	CN108064284A	公开(公告)日	2018-05-22
申请号	CN201580064598.3	申请日	2015-12-14
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人京都大学 株式会社 免疫生物研究所		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人京都大学 国立大学法人千叶大学 株式会社免疫生物研究所		
当前申请(专利权)人(译)	国立大学法人京都大学 国立大学法人千叶大学 株式会社免疫生物研究所		
[标]发明人	入江一浩 村上一马 清水孝彦 泉尾直孝 清藤勉		
发明人	入江一浩 村上一马 清水孝彦 泉尾直孝 清藤勉		
IPC分类号	C12N15/09 G01N33/53 A61K39/395 A61P25/28 C07K16/18 C12N15/02		
CPC分类号	A61K39/395 C07K16/18 C12N15/02 C12N15/09 G01N33/53 A61K2039/505 C07K2317/92 G01N33/6896 G01N2333/4709 G01N2800/2821 C07K2317/33 C07K2317/76		
优先权	2014251898 2014-12-12 JP 2015104411 2015-05-22 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供仅以具有A β 的特定的转角结构的A β (A β 的毒性构象异构体)作为靶标的抗体或其免疫反应性片段。此外,本发明涉及含有特异性识别A β 的毒性构象异构体的抗体作为有效成分的药物组合物、或A β 的毒性构象异构体的测定试剂盒或者阿尔茨海默病的诊断试剂等。

抗原	抗原量(pg/mL)			
	4000	1000	250	62.5
22,23lactam-A β 42	0.057	0.011	-0.001	-0.005
E22P-A β 42	3.92	3.92	3.489	1.119
E22G-A β 42	0.321	0.111	0.121	0.051
E22G-A β 40	0.55	0.074	0.009	-0.007
E22K-A β 42	0.093	0.018	0.001	-0.001
E22Q-A β 40	0.863	0.092	0.01	-0.007
E22 Δ -A β 42	0.25	0.118	0.163	0.031
E22 Δ -A β 40	1.818	0.437	0.194	0.116
25,26lactam-A β 42	0.188	0.049	0.027	0.017
A21P-A β 42	0.193	0.047	0.011	-0.003
E22V-A β 42	0.198	0.085	0.021	0.054
D23P-A β 42	0.358	0.086	0.023	0.004
V24P-A β 42	0.233	0.116	0.05	0.064
G25P-A β 42	0.383	0.127	0.035	0.014
M35P-A β 42	0.489	0.18	0.107	0.047
WT-A β 38	0.433	0.161	0.052	0.009
WT-A β 40	0.404	0.193	0.087	0.054
WT-A β 42	0.283	0.085	0.021	0.002
recom.A β 42	0.358	0.2	0.062	0.113
WT-A β 43	0.384	0.213	0.091	0.042
WT-A β 46	0.124	0.126	0.09	0.087