



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101878301 B

(45) 授权公告日 2014. 08. 20

(21) 申请号 200880113862. 8

代理人 白丽 陈建全

(22) 申请日 2008. 10. 29

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

2007-280187 2007. 10. 29 JP

*C12N 15/02* (2006. 01)

*A61K 39/395* (2006. 01)

*A61P 25/28* (2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2010. 04. 29

*C07K 16/18* (2006. 01)

*C12N 5/10* (2006. 01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2008/069696 2008. 10. 29

*G01N 33/53* (2006. 01)

*C12P 21/08* (2006. 01)

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/057664 JA 2009. 05. 07

(56) 对比文件

WO 2006016644 A1, 2006. 02. 16,

JP 4227275 B2, 2009. 02. 18,

JP 4317317 B2, 2009. 08. 19,

CN 101048662 A, 2007. 10. 03,

CN 101555477 A, 2009. 10. 14,

CN 1849139 A, 2006. 10. 18,

CN 1649623 A, 2005. 08. 03,

CN 1826354 A, 2006. 08. 30,

(83) 生物保藏信息

FERM BP-10872 2007. 07. 13

FERM BP-10871 2007. 07. 13

FERM BP-11040 2008. 10. 17

FERM BP-11041 2008. 10. 17

(73) 专利权人 道健康生活医药株式会社

地址 日本京都府

审查员 张蕊

(72) 发明人 星美奈子 佐藤道夫 井手野祥次

内藤幸嗣 保理江智 野田宗宏

堀井肇

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

权利要求书2页 说明书30页

序列表11页 附图14页

(54) 发明名称

抗体及其应用

(57) 摘要

本发明的目的在于提供一种对淀粉样前体蛋白的反应性低、且对淀粉样蛋白球体的反应性比对 $\beta$ 淀粉样蛋白纤维或 $\beta$ 淀粉样蛋白单体蛋白的反应性高的抗体等。根据本发明,能够提供对淀粉样蛋白球体的反应性比对淀粉样前体蛋白的反应性高、且具有下述任意1个以上的特征的抗体。

(i) 对淀粉样蛋白球体的反应性比对 $\beta$ 淀粉样蛋白纤维的反应性高;(ii) 对淀粉样蛋白球体的反应性比对 $\beta$ 淀粉样蛋白单体蛋白的反应性高;(iii) 具有抑制淀粉样蛋白球体对神经细胞死亡的诱导的活性。

CN 101878301 B

1. 一种单克隆抗体,其对淀粉样蛋白球体的反应性比对淀粉样前体蛋白的反应性高,且具有以下任意 1 个以上的特征:

- (i) 对淀粉样蛋白球体的反应性比对  $\beta$  淀粉样蛋白纤维的反应性高;
- (ii) 对淀粉样蛋白球体的反应性比对  $\beta$  淀粉样蛋白单体蛋白的反应性高;
- (iii) 具有抑制淀粉样蛋白球体对神经细胞死亡的诱导的活性,

所述抗体是由保藏编号为 FERM BP-10871 或 FERM BP-10872 的杂交瘤产生的。

2. 通过对由保藏编号为 FERM BP-10871 或 FERM BP-10872 的杂交瘤产生的仓鼠单克隆抗体进行人源化而得到的人源化抗体或其片段,其包含人源化重链和人源化轻链,

所述人源化重链包含来源于由保藏编号为 FERM BP-10872 的杂交瘤产生的仓鼠单克隆抗体的 3 个重链互补决定区 CDRs、和来源于人免疫球蛋白重链的重链可变区框架序列;

所述人源化轻链包含来源于由保藏编号为 FERM BP-10872 的杂交瘤产生的仓鼠单克隆抗体的 3 个轻链互补决定区 CDRs、和来源于人免疫球蛋白轻链的轻链可变区框架序列;

并且,3 个重链互补决定区 CDRs 分别具有下述氨基酸序列:重链 CDR1:Asp Tyr Phe Met Ser,即序列号 11;重链 CDR2:Gly Ile Glu Ile Lys Ser Tyr Phe Tyr Ala Thr Tyr Tyr Phe Gly Ser Val Lys Gly,即序列号 12;和重链 CDR3:Asn Arg Glu Val Gly Gly Leu Asp Asn,即序列号 13;

3 个轻链互补决定区 CDRs 分别具有下述氨基酸序列:轻链 CDR1:Thr Leu Arg Ser Gly Ile Ser Val Gly Gly Lys Asn Ile Tyr,即序列号 14;轻链 CDR2:Tyr Ser Ser Tyr Ser Asn Lys Gln Leu Gly Pro,即序列号 15;和轻链 CDR3:Ser Ile His Glu Ser Asn Ala Tyr Val,即序列号 16。

3. 通过对由保藏编号为 FERMBP-10871 或 FERM BP-10872 的杂交瘤产生的仓鼠单克隆抗体进行人源化而得到的人源化抗体或其片段,其包含人源化重链可变区和轻链可变区;

所述人源化重链可变区含有下述氨基酸序列,即序列号 17:

```

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

```

式中,第 49 位的 Xaa 为 Gly 或 Ala、第 81 位的 Xaa 为 Leu 或 Val;以及第 100 位的 Xaa 为 Thr 或 Arg;

所述轻链可变区含有下述氨基酸序列,即序列号 18:

```

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

```

式中,第 2 位的 Xaa 为 Ser 或 Ala,第 8 位的 Xaa 为 Ser 或 Ala,第 48 位的 Xaa 为 Tyr 或 Phe,第 49 位的 Xaa 为 Leu 或 Phe,第 51 位的 Xaa 为 Lys、Phe 或 Arg,第 74 位的 Xaa 为 Ala 或 Thr,第 79 位的 Xaa 为 Gly 或 Ala。

4. 权利要求 3 所述的人源化抗体或其片段,其具有序列号 5 记载的氨基酸序列的重链可变区和序列号 7 记载的氨基酸序列的轻链可变区。

5. 一种阿尔茨海默病的治疗和 / 或预防药物的筛选方法,其包括:使受检物和权利要求 1~4 中任一项所述的抗体与淀粉样蛋白球体接触,并以受检物对淀粉样蛋白球体的结合性为指标来选择候补物质。

6. 一种神经细胞保护剂,其含有权利要求 1~4 中任一项所述的抗体。

7. 一种阿尔茨海默病的检测用的试剂,其含有权利要求 1~4 中任一项所述的抗体。

8. 一种药品,其含有权利要求 1~4 中任一项所述的抗体。

9. 一种阿尔茨海默病的治疗和 / 或者预防药物,其含有权利要求 1~4 中任一项所述的抗体。

10. 保藏编号为 FERM BP-10871 或 FERM BP-10872 的杂交瘤。

11. 一种核酸,其含有对权利要求 2~4 中任一项所述的人源化抗体的重链或轻链进行编码的序列或其片段。

12. 一种用于表达权利要求 2~4 中任一项所述的人源化抗体或片段的表达载体,其含有对所述抗体或片段进行编码的核苷酸序列。

## 抗体及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及对淀粉样前体蛋白的反应性低、且对淀粉样蛋白球体具有高反应性的新型的抗体及其应用方法。

### 背景技术

[0002] 在阿尔茨海默病、帕金森病、亨廷顿舞蹈病、朊病毒病等随着年龄增加而发病的多种神经变性疾病中,目前“异常结构蛋白”作为共同的发病机制而受到关注,并进行了对其分子本质的探索。关于阿尔茨海默病,报告了其病理学特征为下述 2 种纤维性聚集体在脑内的沉积:以  $\beta$  淀粉样蛋白 ( $A\beta$ ) 为主要成分的老年斑(参照 Selkoe, D. J., *Annu. Rev. Neurosci.*, 12, 463-490 (1989); 和 Glenner, G. G. and Wong, C. W., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 120 (3), 885-890 (1984)) 和以经磷酸化的 tau 蛋白为主要成分的神原纤维变化(配对螺旋样纤维, PHF) (Ihara, Y et al., *J. Biochem.*, 99, 1807-1810 (1986); 和 Grundke-Iqbal, I. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 83, 4913-4917 (1986))。另外,近年来,在被认为是由很多、各种病因导致发病的阿尔茨海默病的研究中,逐渐认为到  $\beta$  淀粉样蛋白的聚集是共同的发病途径。 $\beta$  淀粉样蛋白是从其前体物质(淀粉样前体蛋白, Amyloid Precursor Protein, APP) 中主要以 40 个残基 ( $A\beta_{1-40}$ ) ~ 42 个残基 ( $A\beta_{1-42}$ ) 的分子种 (molecular species) 的形式切出而生成的肽,虽然在健康人中通常以单体形式进行着生成、分解过程,但在阿尔茨海默病中,观察到  $\beta$  淀粉样蛋白聚集并最终成为过剩的沉积。其原因被认为是在切出过程或分解过程中脱离了控制。在本说明书中,有时将前者 ( $A\beta_{1-40}$ ) 称为“ $\beta$  40 淀粉样蛋白”、“ $\beta$  40 淀粉样蛋白单体”或者“ $\beta$  40 淀粉样蛋白单体蛋白”,并将后者 ( $A\beta_{1-42}$ ) 称为“ $\beta$  42 淀粉样蛋白”、“ $\beta$  42 淀粉样蛋白单体”或者“ $\beta$  42 淀粉样蛋白单体蛋白”。另外,43 个残基 ( $A\beta_{1-43}$ ) 的分子种尽管微量但也被切出而生成,有时将其称为“ $\beta$  43 淀粉样蛋白”、“ $\beta$  43 淀粉样蛋白单体”或者“ $\beta$  43 淀粉样蛋白单体蛋白”。

[0003] 人们认为聚集的  $\beta$  淀粉样蛋白对神经细胞具有神经毒作用,可引起突触变性和随之发生的神经细胞死亡,是导致阿尔茨海默病的进行性认知障碍的神经细胞脱落的机制。另外据报告, $\beta$  淀粉样蛋白在以水溶性的单体肽形式释放到细胞外的状态下不显示神经细胞死亡活性(以下在本说明书中,有时将神经细胞死亡活性称为“毒性”),而在自缔合形成  $\beta$  淀粉样蛋白纤维后开始获得毒性(参照 Lorenzo, A. and Yankner, B. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 91, 12243-12247 (1994))。由于已知当将含有该  $\beta$  淀粉样蛋白纤维的毒性  $\beta$  淀粉样蛋白含有液以高浓度添加到神经系统的培养细胞中时,会导致这些细胞死亡,因此一直以来认为在阿尔茨海默病中,该  $\beta$  淀粉样蛋白纤维是诱发神经细胞死亡的真正原因。

[0004] 因此,认为通过添加含有该  $\beta$  淀粉样蛋白纤维的毒性  $\beta$  淀粉样蛋白来诱导神经系统细胞等的细胞死亡的实验体系能够反映阿尔茨海默病的神经细胞死亡,一直以来多被用于神经细胞死亡抑制剂的筛选等。但是近年来,逐渐报告了下述事实:(1) 在含有  $\beta$  淀粉样蛋白纤维的毒性  $\beta$  淀粉样蛋白含有液中,诱导神经细胞死亡所需的浓度为数  $10 \mu M$  (参

照 Yankner, B. A., et. al., Science, 250, 279-282 (1990)), 该浓度高于阿尔茨海默病患者的脑内存在的  $\beta$  淀粉样蛋白浓度的 1000 倍以上; (2) 在阿尔茨海默病患者的脑内,  $\beta$  淀粉样蛋白纤维的沉积量与记忆或认知功能等高级功能的障碍程度没有必然联系, 即使存在大量的  $\beta$  淀粉样蛋白纤维沉积, 有时也不显示任何临床症状; (3) 此外, 脑内的淀粉样蛋白  $\beta$  的沉积部位与神经细胞脱落部位未必一致; (4) 在过剩表达 APP 的小鼠的脑内, 在  $\beta$  淀粉样蛋白纤维的沉积以前或没有沉积, 也发生学习行为异常; (5) 阿尔茨海默病患者脑内的可溶性  $\beta$  淀粉样蛋白含量的增加比难溶性纤维沉积早 10 年以上等; 这些事实启示  $\beta$  淀粉样蛋白的毒性的真正原因并不是  $\beta$  淀粉样蛋白纤维。

[0005] 本发明人等之前提出了具有高毒性的自缔合型  $\beta$  淀粉样蛋白含有液及其制备方法 (日本特开 2001-247600 号公报), 该含有液以与阿尔茨海默病等的患者的机体内存在的自缔合产生的  $\beta$  淀粉样蛋白同等的浓度诱导神经系统细胞发生细胞死亡。此外, 还发现了分离上述自缔合型  $\beta$  淀粉样蛋白含有液中所含的神经细胞毒性的真正原因的方法, 从分析的结果可知, 该真正原因是具有粒径为约 10 ~ 约 20nm 左右的粒状形态的自缔合型  $\beta$  淀粉样蛋白, 并将之命名为淀粉样蛋白球体 (amylospheroid) (参照 Hoshi, M., et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 100, 6370-6375 (2003))。在本说明书中, 按照该命名, 将具有粒径为约 10 ~ 约 20nm 左右的粒状形态的自缔合型  $\beta$  淀粉样蛋白称为“淀粉样蛋白球体”。

[0006] 由于淀粉样蛋白球体以与阿尔茨海默病患者的脑内存在的  $\beta$  淀粉样蛋白同等的浓度诱导神经细胞死亡, 并且在淀粉样蛋白球体导致神经死亡的过程中, 引起另一个病理学标记物即 tau 蛋白的磷酸化等, 并与因阿尔茨海默病发生的症状一致, 因此认为该淀粉样蛋白球体是脑内的  $\beta$  淀粉样蛋白的毒性的真正原因。因此, 如果得到 (1) 抑制淀粉样蛋白球体形成的抗体, 或者 (2) 抑制淀粉样蛋白球体对神经系统细胞的毒性的抗体, 则可以用作阿尔茨海默病的治疗或者预防药。另外, 如果得到 (3) 对淀粉样蛋白球体的反应性比对淀粉样前体蛋白、 $\beta$  淀粉样蛋白单体和  $\beta$  淀粉样蛋白纤维等的反应性高的抗体, 则可应用到用来诊断阿尔茨海默病的测定。

[0007] 以淀粉样蛋白球体为抗原的抗体的制作方法可以是已知的方法。另外, 已得到了兔多克隆抗淀粉样蛋白球体抗体 (ASD2、ASD3) 和小鼠单克隆抗淀粉样蛋白球体抗体 (MASD1、MASD2、MASD3) (WO2006/016644 号) (有时将与淀粉样蛋白球体反应的抗体称为“抗淀粉样蛋白球体抗体”)。但是, 还没有得到对淀粉样前体蛋白的反应性低、且与淀粉样蛋白球体发生特异性反应、并抑制所述蛋白对神经系统细胞的毒性的抗体。其中, WO2006/016644 号中记载的兔多克隆抗淀粉样蛋白球体抗体 (ASD2、ASD3) 和小鼠单克隆抗淀粉样蛋白球体抗体 (MASD1、MASD2、MASD3) 在本申请说明书中分别如下表示。

[0008] ASD2  $\rightarrow$  rpASD2

[0009] ASD3  $\rightarrow$  rpASD3

[0010] MASD1  $\rightarrow$  mASD1

[0011] MASD2  $\rightarrow$  mASD2

[0012] MASD3  $\rightarrow$  mASD3

[0013] 非专利文献 1 : Selkoe, D. J., Annu. Rev. Neurosci., 12, 463-490 (1989)

[0014] 非专利文献 2 : Glenner, G. G. and Wong, C. W., Biochem. Biophys. Res. Commun., 120 (3), 885-890 (1984)

- [0015] 非专利文献 3 :Ihara, Y. et al., J. Biochem., 99, 1807-1810 (1986)
- [0016] 非专利文献 4 :Grundke-Iqbal, I. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 83, 4913-4917 (1986)
- [0017] 非专利文献 5 :Lorenzo, A. and Yankner, B. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 91, 12243-12247 (1994)
- [0018] 非专利文献 6 :Yankner, B. A., et. al., Science, 250, 279-282 (1990)
- [0019] 非专利文献 7 :Hoshi, M., et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 100, 6370-6375 (2003)
- [0020] 专利文献 1 :日本特开 2001-247600 号公报
- [0021] 专利文献 2 :W02006/016644 号

### 发明内容

[0022] 本发明的课题在于得到对淀粉样蛋白球体的反应性比对淀粉样前体蛋白的反应性高、对淀粉样蛋白球体的反应性比对  $\beta$  淀粉样蛋白纤维或  $\beta$  淀粉样蛋白单体蛋白的反应性高的抗体、或者对淀粉样蛋白球体的反应性比对淀粉样前体蛋白的反应性高、且具有抑制淀粉样蛋白球体对神经细胞死亡的诱导的活性的抗体。此外,本发明的课题还在于提供使用上述抗体的阿尔茨海默病的治疗和 / 或预防药物的筛选方法,以及阿尔茨海默病个体的检测方法。此外,本发明的课题还在于提供使用上述抗体的神经细胞保护剂、阿尔茨海默病的检测用的试剂、以及阿尔茨海默病的治疗和 / 或预防药物等药品。此外,本发明的课题还在于提供用于检测上述抗体的固相载体。此外,本发明的课题还在于提供产生上述抗体的杂交瘤。

[0023] 本发明人等为了解决上述课题进行了深入研究,结果发现下述抗体对淀粉样前体蛋白的反应性低、对淀粉样蛋白球体的反应性比对  $\beta$  淀粉样蛋白纤维或  $\beta$  淀粉样蛋白单体蛋白的反应性高,并且还具有抑制淀粉样蛋白球体对神经细胞死亡的诱导的活性:所述抗体为用淀粉样蛋白球体对仓鼠进行皮下免疫,利用从该动物得到的脾细胞构建杂交瘤,由该杂交瘤产生的单克隆抗体。另外,还发现该抗体对人正常组织的交叉反应性低、而与阿尔茨海默病脑发生特异性反应。本发明是基于这些认识而完成的发明。

[0024] 即,根据本发明,提供以下的发明。

[0025] (1) 一种抗体,其对淀粉样蛋白球体的反应性比对淀粉样前体蛋白的反应性高,且具有以下任意 1 个以上的特征。

[0026] (i) 对淀粉样蛋白球体的反应性比对  $\beta$  淀粉样蛋白纤维的反应性高;

[0027] (ii) 对淀粉样蛋白球体的反应性比对  $\beta$  淀粉样蛋白单体蛋白的反应性高;

[0028] (iii) 具有抑制淀粉样蛋白球体对神经细胞死亡的诱导的活性。

[0029] (2) 根据 (1) 所述的抗体,其中,在使用相同的抗体浓度和抗体量以及相同的抗原蛋白浓度和抗原蛋白量来比较抗体对淀粉样蛋白球体和  $\beta$  淀粉样蛋白纤维的反应性的体系中,抗体对淀粉样蛋白球体的反应性是对  $\beta$  淀粉样蛋白纤维的反应性的 3 倍以上。

[0030] (3) 根据 (1) 或 (2) 所述的抗体,其中,在使用相同的抗体浓度和抗体量以及相同的抗原蛋白浓度和抗原蛋白量来比较抗体对淀粉样蛋白球体和  $\beta$  淀粉样蛋白纤维的反应性的体系中,抗体对淀粉样蛋白球体的反应性是对  $\beta$  淀粉样蛋白纤维的反应性的 5 倍以

上。

[0031] (4) 根据 (1) ~ (3) 中任一项所述的抗体,其中,在使用相同的抗体浓度和抗体量以及相同的抗原蛋白浓度和抗原蛋白量来比较抗体对淀粉样蛋白球体和  $\beta$  淀粉样蛋白单体蛋白的反应性的体系中,抗体对淀粉样蛋白球体的反应性是对  $\beta$  淀粉样蛋白单体蛋白的反应性的 50 倍以上。

[0032] (5) 根据 (1) ~ (4) 中任一项所述的抗体,其中,在使用相同的抗体浓度和抗体量以及相同的抗原蛋白浓度和抗原蛋白量来比较抗体对淀粉样蛋白球体和  $\beta$  淀粉样蛋白单体蛋白的反应性的体系中,抗体对淀粉样蛋白球体的反应性是对  $\beta$  淀粉样蛋白单体蛋白的反应性的 500 倍以上。

[0033] (6) 根据 (1) ~ (5) 中任一项所述的抗体,其中,所述抗体是以淀粉样蛋白球体为抗原得到的。

[0034] (7) 根据 (1) ~ (6) 中任一项所述的抗体,其中,所述抗体是单克隆抗体。

[0035] (8) 根据 (7) 所述的抗体,其中,所述抗体对淀粉样蛋白球体的解离常数为  $10^{-9}$  以下。

[0036] (9) 根据 (1) ~ (8) 中任一项所述的抗体,其中,所述抗体在不显示对人正常组织的显著的交叉反应性的情况下,与阿尔茨海默病脑发生特异性反应。

[0037] (10) 根据 (1) ~ (9) 中任一项所述的抗体,其中,所述抗体对淀粉样蛋白球体的立体结构特异性表位进行识别。

[0038] (11) 根据 (1) ~ (10) 中任一项所述的抗体,其中,所述抗体为来自仓鼠的抗体。

[0039] (12) 根据 (1) ~ (11) 中任一项所述的单克隆抗体,其中,所述抗体是由保藏编号为 FERM BP-10871 或 FERM BP-10872 的杂交瘤产生的。

[0040] (13) 一种人源化抗体,其是通过由保藏编号为 FERM BP-10871 或 FERM BP-10872 的杂交瘤产生的仓鼠单克隆抗体进行人源化而得到的。

[0041] (14) (13) 所述的人源化抗体或其片段,其包含人源化重链和人源化轻链,

[0042] 所述人源化重链包含来源于由保藏编号为 FERM BP-10872 的杂交瘤产生的仓鼠单克隆抗体的 3 个重链互补决定区 (CDRs)、和来源于人免疫球蛋白重链的重链可变区框架序列;

[0043] 所述人源化轻链包含来源于由保藏编号为 FERM BP-10872 的杂交瘤产生的仓鼠单克隆抗体的 3 个轻链互补决定区 (CDRs)、和来源于人免疫球蛋白轻链的轻链可变区框架序列;

[0044] 并且,3 个重链互补决定区 (CDRs) 分别具有下述氨基酸序列:

[0045] 重链 CDR1 :Asp Tyr Phe Met Ser(序列号 11);

[0046] 重链 CDR2 :Gly Ile Glu Ile Lys Ser Tyr Phe Tyr Ala Thr Tyr Tyr Phe GlySer Val Lys Gly(序列号 12);和

[0047] 重链 CDR3 :Asn Arg Glu Val Gly Gly Leu Asp Asn(序列号 13);

[0048] 3 个轻链互补决定区 (CDRs) 分别具有下述氨基酸序列:

[0049] 轻链 CDR1 :Thr Leu Arg Ser Gly Ile Ser Val Gly Gly Lys Asn Ile Tyr(序列号 14);

[0050] 轻链 CDR2 :Tyr Ser Ser Tyr Ser Asn Lys Gln Leu Gly Pro(序列号 15);和

- [0051] 轻链 CDR3 :Ser Ile His Glu Ser Asn Ala Tyr Val (序列号 16)。  
 [0052] (15) (13) 所述的人源化抗体或其片段,其包含人源化重链可变区 和轻链可变区 ;  
 [0053] 所述人源化重链可变区含有下述氨基酸序列 (序列号 17) :  
 [0054]

```

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

```

- [0055] 式中,第 49 位的 Xaa 为 Gly 或 Ala、第 81 位的 Xaa 为 Leu 或 Val ;以及第 100 位的 Xaa 为 Thr 或 Arg ;  
 [0056] 所述轻链可变区含有下述氨基酸序列 (序列号 18) :  
 [0057]

```

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

```

- [0058] 式中,第 2 位的 Xaa 为 Ser 或 Ala,第 8 位的 Xaa 为 Ser 或 Ala,第 48 位的 Xaa 为 Tyr 或 Phe,第 49 位的 Xaa 为 Leu 或 Phe,第 51 位的 Xaa 为 Lys、Phe 或 Arg,第 74 位的 Xaa

为 Ala 或 Thr, 第 79 位的 Xaa 为 Gly 或 Ala。

[0059] (16) (15) 所述的人源化抗体或其片段, 其具有序列号 5 记载的氨基酸序列的重链可变区和序列号 7 记载的氨基酸序列的轻链可变区。

[0060] (17) 一种阿尔茨海默病的治疗和 / 或预防药物的筛选方法, 其包括: 使受检物和 (1) ~ (16) 中任一项所述的抗体与淀粉样蛋白球体接触, 并以受检物对淀粉样蛋白球体的结合性为指标来选择候补物质。

[0061] (18) 一种阿尔茨海默病个体的检测方法, 其包括: 使从怀疑具有阿尔茨海默病的个体获得的生物试样与 (1) ~ (16) 中任一项所述的抗体接触, 测定该样品中是否有与该抗体发生反应的物质。

[0062] (19) 一种神经细胞保护剂, 其含有 (1) ~ (16) 中任一项所述的抗体。

[0063] (20) 一种阿尔茨海默病的检测用的试剂, 其含有 (1) ~ (16) 中任一项所述的抗体。

[0064] (21) 一种药品, 其含有 (1) ~ (16) 中任一项所述的抗体。

[0065] (22) 一种阿尔茨海默病的治疗和 / 或者预防药物, 其含有 (1) ~ (16) 中任一项所述的抗体。

[0066] (23) 用于检测 (1) ~ (16) 中任一项所述的抗体的固相载体, 其特征在于, 其是包覆淀粉样蛋白球体而成的。

[0067] (24) 一种产生 (7) 或 (8) 所述的抗体的杂交瘤。

[0068] (25) 保藏编号为 FERM BP-10871 或 FERM BP-10872 的杂交瘤。

[0069] (26) 一种核酸, 其含有对 (13) ~ (16) 中任一项所述的人源化抗体的重链或轻链进行编码的序列或其片段。

[0070] (27) 一种用于表达 (13) ~ (16) 中任一项所述的人源化抗体或片段的表达载体, 其含有对所述抗体或片段进行编码的核苷酸序列。

[0071] 本发明的抗体由于对淀粉样前体蛋白的反应性低、且对淀粉样蛋白球体的反应性比对  $\beta$  淀粉样蛋白纤维或  $\beta$  淀粉样蛋白单体蛋白的反应性高, 并且具有抑制淀粉样蛋白球体对神经细胞死亡的诱导的活性, 因此可用作阿尔茨海默病的治疗或者预防药, 另外, 还可应用于阿尔茨海默病个体的检测。

## 附图说明

[0072] 图 1 为表示分析本发明的单克隆抗淀粉样蛋白球体特异性抗体的反应性获得的淀粉样蛋白球体固相 ELISA 的结果的曲线图。

[0073] 图 2 为表示分析本发明的单克隆抗淀粉样蛋白球体特异性抗体的反应性获得的点印迹的结果的曲线图。

[0074] 图 3 为表示分析本发明的单克隆抗淀粉样蛋白球体特异性抗体的表位获得的结果的图。

[0075] 图 4 为表示本发明的单克隆抗淀粉样蛋白球体特异性抗体的抑制淀粉样蛋白球体对神经细胞死亡的诱导的活性获得的结果的曲线图。

[0076] 图 5 为分析市售抗体 (6E10) 的反应性获得的 Western 印迹的结果的曲线图。

[0077] 图 6 为表示分析小鼠单克隆抗淀粉样蛋白球体抗体 (mASD1、mASD2、mASD3) 的反应

性获得的 Western 印迹的结果的曲线图。

[0078] 图 7 为表示本发明的仓鼠单克隆抗淀粉样蛋白球体特异性抗体的反应性获得的 Western 印迹的结果的曲线图。

[0079] 图 8 为表示代表性的小鼠单克隆抗体和仓鼠单克隆抗体对人正常组织组的反应性的图。

[0080] 图 9 为表示对纤维状淀粉样蛋白球体和 ASPD 的抗体特异性的电子显微镜照片。

[0081] 图 10 为表示人源化抗体 RHA/RLA (huASD2) 的重链可变区的 DNA 序列、氨基酸序列和 CDR1、2、3 的位置的图。

[0082] 图 11 为表示人源化抗体 RHA/RLA (huASD2) 的轻链可变区的 DNA 序列、氨基酸序列和 CDR1、2、3 的位置的图。

[0083] 图 12 为表示人源化抗体 RHB/RLB 的重链可变区的氨基酸序列和 CDR1、2、3 的位置的图。

[0084] 图 13 为表示人源化抗体 RHB/RLB 的轻链可变区的氨基酸序列和 CDR1、2、3 的位置的图。

[0085] 图 14 为表示人源化抗体 RHC/RLC 的轻链可变区的氨基酸序列和 CDR1、2、3 的位置的图。

[0086] 图 15 为与通过本发明得到的三种人源化抗体的重链和轻链的氨基酸序列对比地示出了 CDR1、2、3 的位置的图。将 RHA/RLA (huASD2)、RHB/RLB 和 RHC/RLC 的重链分别表示为 ADS2RHA、ADS2RHB 和 ASD2RHC。其中,ASD2RHC 由于与 ADS2RHA 是相同的序列,因此省略了。将 RHA/RLA (huASD2)、RHB/RLB 和 RHC/RLC 的轻链分别表示为 ADS2RLA、ADS2RLB 和 ASD2RLC。

[0087] 图 16 为表示 huASD2 抗体抑制 DF-ASPD 对凋亡的诱导的抑制效果的图。

[0088] 图 17 为表示 haASD2 和 huASD2 抗体抑制 DF-ASPD 对细胞死亡的诱导的效果的图。

## 具体实施方式

[0089] 本发明的抗体对淀粉样蛋白球体的反应性比对淀粉样前体蛋白的反应性高、且具有下述任意 1 个以上的特征(下文有时将它们称为“抗淀粉样蛋白球体特异性抗体”)。

[0090] (i) 对淀粉样蛋白球体的反应性比对  $\beta$  淀粉样蛋白纤维的反应性高;

[0091] (ii) 对淀粉样蛋白球体的反应性比对  $\beta$  淀粉样蛋白单体蛋白的反应性高;

[0092] (iii) 具有抑制淀粉样蛋白球体对神经细胞死亡的诱导的活性。

[0093] 本发明还涉及使用上述抗体的阿尔茨海默病的治疗和 / 或预防药物的筛选方法、阿尔茨海默病个体的检测方法、阿尔茨海默病的治疗和 / 或预防药物等药品、以及产生上述抗体的杂交瘤。以下对它们进行详细说明,但下文对本发明的说明仅仅是本发明实施方式的一个例子(代表例),本发明的范围并不限于这些内容。

[0094] (1) 抗淀粉样蛋白球体特异性抗体

[0095] 本发明的抗淀粉样蛋白球体特异性抗体的特征在于其对淀粉样蛋白球体的反应性比对淀粉样前体蛋白的反应性高,并表示为下述方式。

[0096] 根据第一方式,本发明的抗淀粉样蛋白球体特异性抗体对淀粉样蛋白球体的反应性比对  $\beta$  淀粉样蛋白纤维的反应性高。“对淀粉样蛋白球体的反应性”是指与通过下述方法形成的淀粉样蛋白球体发生反应。该抗体的反应性的测定可以通过其本身通常使用的方

法来进行,当利用这些方法进行测定时,如果所述抗体对淀粉样蛋白球体的反应性比对 $\beta$ 淀粉样蛋白纤维的反应性高,则其包含在本发明的抗体中。根据优选的方式,抗体对淀粉样蛋白球体的反应性是对 $\beta$ 淀粉样蛋白纤维的反应性的3倍以上,更优选为4倍以上、最优选为5倍以上。此时,可以对使用相同的抗体浓度和量、相同的抗原蛋白浓度和抗原蛋白量时的反应性进行比较。另外,以与淀粉样蛋白球体发生特异性反应、不与 $\beta$ 淀粉样蛋白纤维发生反应为特征的抗体也包含在本发明的抗淀粉样蛋白特异性抗体中。

[0097] 根据第二方式,本发明的抗淀粉样蛋白球体特异性抗体对淀粉样蛋白球体的反应性比对 $\beta$ 淀粉样蛋白单体蛋白的反应性高。此时,抗淀粉样蛋白球体特异性抗体对淀粉样蛋白球体的反应性优选是对 $\beta$ 淀粉样蛋白单体蛋白(A $\beta$ )的反应性的50倍以上、更优选为100倍以上、最优选为500倍以上。此时,可以对使用相同的抗体浓度和量、相同的抗原蛋白浓度和抗原蛋白量时的反应性进行比较。

[0098] 当在阿尔茨海默病模型动物或临床试验中给予抗A $\beta$ 抗体时,可确认诱发脑出血。该出血认为是由抗体对脑血管淀粉样蛋白的结合所产生的炎症反应引起的,是用抗A $\beta$ 抗体进行治疗的副作用。脑血管淀粉样蛋白的沉积在80~90%的阿尔茨海默病患者中可见,被称为A $\beta$ 型脑淀粉样血管病(Cerebral Amyloid Angiopathy, CAA)。与阿尔茨海默病中的老年斑的淀粉样蛋白以A $\beta$ 42为主要成分不同,CAA中的沉积以A $\beta$ 40为主体。由此,作为本发明中的抗体,特别优选选择性地与淀粉样蛋白球体反应、而对A $\beta$ 40的反应性低的抗体。具体而言,本发明中的抗淀粉样蛋白球体特异性抗体对淀粉样蛋白球体的反应性优选是对A $\beta$ 40的反应性的50倍以上、更优选是100倍以上、最优选是500倍以上。

[0099] 本发明显示与抗淀粉样蛋白球体特异性抗体具有高反应性的“淀粉样蛋白球体”是指 $\beta$ 淀粉样蛋白单体蛋白发生自缔合且具有粒状形态的物质。“粒状形态”是指只要呈现粒状则可以是任何形状,包括颗粒状、细粒状、晶体、聚集块等全部。粒径通常为约10~约20nm、优选为约10~约15nm、更优选为约10~约12nm、特别优选为约12nm左右。另外,关于淀粉样蛋白球体,其蛋白质浓度为约1 $\mu$ g/ml以下、优选为约0.45 $\mu$ g/ml以下,且具有诱导神经系统细胞发生细胞死亡的高的神经细胞死亡活性。另外,当用甘油密度梯度离心法对具有所述物性的淀粉样蛋白球体进行分级时,能够得到甘油浓度为约15%以上的级分。

[0100] 作为本发明的抗淀粉样蛋白球体特异性抗体对抗原的反应性的测定方法,可列举出例如免疫印迹法、点印迹法、ELISA法等其本身已知的免疫学测定法、或使用电子显微镜观察的方法等。另外,作为此时的比较对照的 $\beta$ 淀粉样蛋白单体是指由约40个氨基酸残基构成的蛋白,其在机体中,通过蛋白酶介导的过程由淀粉样蛋白前体蛋白(APP)产生。已知根据该蛋白酶的种类和其后的修饰的不同而存在的各种种类,但根据在刚分泌后C末端的氨基酸残基的长度不同,主要存在 $\beta$ 40淀粉样蛋白(A $\beta$ <sub>1-40</sub>,序列号1)和 $\beta$ 42淀粉样蛋白(A $\beta$ <sub>1-42</sub>,序列号2),另外 $\beta$ 43淀粉样蛋白(A $\beta$ <sub>1-43</sub>,序列号3)也微量存在, $\beta$ 淀粉样蛋白单体包括它们中的任意一种。另外,也包括它们的部分多肽和衍生物。此外, $\beta$ 淀粉样蛋白纤维是指 $\beta$ 淀粉样蛋白自缔合形成的纤维状的纤维,其具有神经细胞死亡活性。这样的 $\beta$ 淀粉样蛋白纤维包括例如从机体内获得的纤维或通过Lorenzo, A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 91, 12243-12247 (1994)中所述的方法制造的纤维。

[0101] 根据第三方式,本发明的抗淀粉样蛋白球体特异性抗体是具有抑制淀粉样蛋白球体对神经细胞死亡的诱导的活性的抗体。“淀粉样蛋白球体对神经细胞死亡的诱导”是指通

过上述或后述方法制备的淀粉样蛋白球体诱导神经细胞发生细胞死亡的活性,所诱导的细胞死亡可以是凋亡或坏死中的任意一种。另外,关于神经细胞,只要是神经系统细胞则没有特殊限制,可以使用哺乳动物(人、大鼠、小鼠、猴、猪等)来源的神经系统细胞。也可以使用从ES细胞等分化诱导得到的神经细胞。作为原代培养细胞,可列举出从上述动物的海马和前脑基底、大脑皮质等获得的神经细胞。还包括培养上述动物的海马等器官而获得的细胞。作为具有这样的活性的抗淀粉样蛋白球体特异性抗体的特征,可列举出例如对淀粉样蛋白球体的反应性比对淀粉样前体蛋白、 $\beta$ 淀粉样蛋白纤维或 $\beta$ 淀粉样蛋白单体蛋白的反应性高等。其中,可优选使用对淀粉样蛋白球体的反应性是对淀粉样前体蛋白的反应性的约10~约20倍的抗淀粉样蛋白球体特异性抗体。

[0102] 本发明的抗淀粉样蛋白球体特异性抗体具有的抑制对神经细胞死亡的诱导的活性是指,优选具有完全抑制上述的淀粉样蛋白球体对神经细胞死亡的诱导的能力,但也包括根据抗体的给药量不同而部分地抑制的情况。关于抑制活性的具体的测定方法,如后所述。

[0103] 另外,除了第一~第三中的任意1个以上的方式外,以在不显示对人正常组织的显著的交叉反应性的情况下、与阿尔茨海默病脑发生特异性反应为特征的抗体也包括在本发明的抗淀粉样蛋白球体特异性抗体中。

[0104] 另外,第一~第三中的任意1个以上的方式或者前述的方式中,以识别淀粉样蛋白球体的立体结构特异性表位为特征的抗体也包括在本发明的抗淀粉样蛋白球体特异性抗体中。其中优选以 $\beta$ 淀粉样蛋白单体蛋白的N末端为表位进行识别、或不以 $\beta$ 淀粉样蛋白单体蛋白上的一次序列为表位进行识别为特征的抗淀粉样蛋白球体特异性抗体。“以识别淀粉样蛋白球体的立体结构特异性表位为特征的抗体”是指,具体而言,只要淀粉样蛋白球体是自然的状态就能够结合、而在淀粉样蛋白球体为改性状态的情况下则不能结合的抗体。

[0105] 以下对本发明的抗淀粉样蛋白球体特异性抗体的具体的制造方法和上述的特征的分析方法进行详细说明。

[0106] (2) 淀粉样蛋白球体(抗原)的制作

[0107] 本发明的抗体可以将具有下述性质的淀粉样蛋白球体作为抗原来得到。在本发明中,淀粉样蛋白球体是指 $\beta$ 淀粉样蛋白发生自缔合、且具有粒状形态的物质。“粒状形态”是指只要呈现为粒状则可以是任意形状,包括颗粒状、细粒状、晶体、聚集块等全部。粒径通常为约10~约20nm、优选为约10~约15nm、更优选为约10~约12nm、特别优选为约12nm左右。另外,淀粉样蛋白球体在蛋白质浓度为约 $1\mu\text{g/ml}$ 以下、优选为约 $0.45\mu\text{g/ml}$ 以下时具有诱导神经系统细胞发生细胞死亡的高的神经细胞死亡活性。另外,当用甘油密度梯度离心法对具有所述物性的淀粉样蛋白球体进行分级时,能够得到甘油浓度为约15%以上的级分。

[0108] 这种淀粉样蛋白球体可以首先通过使含有 $\beta$ 淀粉样蛋白的水溶液对流(第一工序)来进行制备。此外,为了制备高效地含有淀粉样蛋白球体的溶液,可以使用将对流得到的水溶液中的淀粉样蛋白球体进行分级(第二工序)的方法。本发明的抗体的抗原也可以使用上述任意的淀粉样蛋白球体含有液。

[0109] 上文中的“ $\beta$ 淀粉样蛋白”是指由约40个氨基酸残基构成的蛋白,其是在机体中

通过蛋白酶介导的过程由淀粉样蛋白前体蛋白 (APP) 产生的。已知根据所述蛋白酶的类型的不同以及经过其后修饰的不同而存在各种种类,但根据在刚分泌后 C 末端的氨基酸残基的长度不同,主要存在  $\beta$  40 淀粉样蛋白 ( $A\beta_{1-40}$ , 序列号 1) 和  $\beta$  42 淀粉样蛋白 ( $A\beta_{1-42}$ , 序列号 2), 并且微量存在  $\beta$  43 淀粉样蛋白 ( $A\beta_{1-43}$ , 序列号 3)。淀粉样蛋白球体的制备中优选使用例如刚分泌后的  $\beta$  淀粉样蛋白的全长分子种即  $A\beta_{x-40}$ 、 $A\beta_{x-42}$  或  $A\beta_{x-43}$ 、或者它们的突变体或衍生物,其中特别优选  $A\beta_{1-40}$  或  $A\beta_{1-42}$ 。另外,  $\beta$  淀粉样蛋白可以使用利用肽合成机等合成的蛋白、市售的蛋白或从生物试样提取精制而得到的蛋白等任意蛋白。当使用合成肽作为  $\beta$  淀粉样蛋白时,其合成、提取精制方法可以使用那些本身已知的通常使用的方法。另外,合成肽的精制度只要按照能够在高效液相色谱法中得到单一的峰的程度进行就足够了,作为精制方法,可以使用例如凝胶过滤、高效液相色谱法等。在本说明书中,有时也将“ $\beta$  淀粉样蛋白”称为“ $\beta$  淀粉样蛋白单体”、“ $\beta$  淀粉样蛋白单体蛋白”、“ $A\beta$ ”、“ $A\beta$  单体”。如此得到的  $\beta$  淀粉样蛋白例如溶解于灭菌精制水中,用于淀粉样蛋白球体含有液的制备。溶解所用的灭菌精制水的量只要是  $\beta$  淀粉样蛋白溶解的范围即可,但优选水溶液中的  $\beta$  淀粉样蛋白的浓度为达到约 50nM ~ 约 2mM、优选为约 1  $\mu$ M ~ 约 1mM、更优选为约 50 ~ 约 700  $\mu$ M 的范围。优选将该溶液调节成适当的盐浓度。盐浓度只要是  $\beta$  淀粉样蛋白能够溶解的范围则任何浓度均可,例如最终的 pH 为约 3 ~ 约 11、优选为约 5.5 ~ 约 8.5、更优选为约 7.5,盐优选为约 1M 以下。作为调节至这样的盐浓度的方法,可以使用例如将 PBS(-) 与  $\beta$  淀粉样蛋白水溶液等量添加的方法。溶解的方法只要是  $\beta$  淀粉样蛋白在适量的适当盐浓度的溶液中完全溶解的方法,则没有特殊限制。

[0110] 关于淀粉样蛋白球体含有液的制备方法的第一工序,可列举出例如日本特开 2001-247600 号公报中记载的工序。虽然如此得到的淀粉样蛋白球体含有液即使不经任何处理也具有诱导神经细胞死亡的活性,能够作为本发明的抗原使用,但进行作为第二工序的分级,能够得到具有更高的神经细胞死亡活性的级分。作为分级的方法,可以使用例如日本特开 2002-105099 号公报中记载的方法。如此得到的淀粉样蛋白球体含有液在根据需要进行了浓缩等处理后,可作为抗原用于以下的免疫工序中。

[0111] 作为确认淀粉样蛋白球体形成的方法,可列举出下述的对神经细胞死亡活性进行分析的方法或利用电子显微镜进行测定的方法等。电子显微镜的测定方法只要是能够分析淀粉样蛋白球体的粒径的方法、且是在淀粉样蛋白球体的自缔合不受损伤的情况下能够进行观察的方法,则可以是任何方法。具体而言,例如,首先在直径为 18mm 左右的玻璃皿等中加入 30 ~ 40°C 的蒸馏水,向其水面滴加约 30  $\mu$ l 左右的火棉胶 1.5% (W/V) 醋酸异戊酯溶液等,溶剂立即挥发生成薄膜。将该支撑膜张贴到栅格上干燥后,真空蒸镀碳并使用利用辉光放电的亲水化处理装置对表面进行亲水化。接着,使张贴有所述支撑膜的栅格面朝下,与含有制备后的淀粉样蛋白球体的溶液的小滴接触,立即用滤纸擦去多余的水分,并添加醋酸铀溶液进行观察。优选下述方法等:在稳定的 100 ~ 120kV 的高压加速下使用电子显微镜,为了防止电子射线破坏试样,使用栅格的端部等进行像散校正,然后使用电子射线损伤降低法进行观察。

[0112] (3) 将淀粉样蛋白球体作为抗原的抗体的制备

[0113] 关于获得上述 (2) 中所述的将淀粉样蛋白球体作为抗原的抗体的方法,只要是能够获得具有对淀粉样蛋白球体的反应性比对淀粉样前体蛋白的反应性高、且具有下述任意

1 项以上的特征的抗体的方法,则没有特殊限制。具体而言,优选可以使用下文详细记载的方法。

[0114] (i) 对淀粉样蛋白球体的反应性比对  $\beta$  淀粉样蛋白纤维的反应性高;

[0115] (ii) 对淀粉样蛋白球体的反应性比对  $\beta$  淀粉样蛋白单体蛋白的反应性高;

[0116] (iii) 具有抑制淀粉样蛋白球体对神经细胞死亡的诱导的活性。

[0117] 关于抗原,将上述 (2) 中所述的淀粉样蛋白球体与通常作为载体的 KLH(匙孔血蓝蛋白)、BSA(牛血清白蛋白)、OVA(卵清蛋白)等蛋白质或高分子体结合或者聚合而得到的抗原作为免疫用抗原使用,但载体并不是必需的。另外,也可以将通过不同载体的结合法制备的多种抗原混合制成免疫用抗原。

[0118] 用于免疫的动物没有特殊限定,兔、山羊、绵羊、仓鼠、小鼠、大鼠、豚鼠、鸡、除了产生人抗体的人以外的动物等均可以使用。优选使用仓鼠。充分混合弗氏完全佐剂或弗氏不完全佐剂与免疫用抗原后,对免疫用抗原的动物在皮下、肌肉内、腹腔内进行接种。每周~5周实施1次接种,持续到免疫动物的抗体对接种的抗原的反应性充分上升为止。1次免疫的抗原的量只要是免疫动物的抗体的反应性能够充分上升的量,则没有特殊限制,具体而言,优选为约1~约100  $\mu$ g。另外,关于免疫的次数,优选反复从经免疫的动物采血,用后述的方法检测该血中所含的抗体对抗原的反应性,直至对淀粉样蛋白球体的反应性比对  $\beta$  淀粉样蛋白单体蛋白的反应性高为止。具体而言,优选为5~20次。

[0119] 在从最后的免疫过7~10日后,从该动物采集血液、腹水等。优选例如采集全血,用离心分离等方法制备血清。关于该血清中所含的本发明的抗淀粉样蛋白球体特异性抗体的反应性的测定方法,只要是能够分析与上述 (2) 中制备的淀粉样蛋白球体的反应性的方法,则可以是任意方法,例如可列举出用荧光物质等对上述淀粉样蛋白球体进行标记,使其与上述血清反应,然后测定与该抗体结合的标记剂的活性的方法等。具体而言,可列举出上述的利用电子显微镜观察的方法、后述的ELISA法等酶免疫测定法、免疫印迹法或点印迹法等。其中,对于本发明的抗淀粉样蛋白球体特异性抗体,当测定比较与  $\beta$  淀粉样蛋白纤维的反应性时,可以优选使用利用电子显微镜观察的方法,当测定比较  $\beta$  淀粉样蛋白单体蛋白与作为其自缩合体的淀粉样蛋白球体的反应性时,可以优选使用点印迹法或ELISA法等酶免疫测定法。另外,通过比较  $\beta$  淀粉样蛋白纤维、 $\beta$  淀粉样蛋白单体蛋白或它们的部分多肽与发生特异性反应的抗体的反应性,能够选择性地获得本发明的抗淀粉样蛋白球体特异性抗体。

[0120] 抗体的分离精制可以利用其本身已知的免疫球蛋白的分离精制法来进行精制。具体而言,可列举出盐析法、醇沉淀法、等电点沉淀法、电泳法、利用离子交换体的吸附法、超离心分离法、凝胶过滤法、利用抗原抗体结合物或活性吸附剂来仅对特异性抗体进行吸附分离的方法等。

[0121] 如此制作的抗体为多克隆抗体,其可以以IgG为主要成分并包含IgM、IgA等其他的免疫球蛋白。

[0122] 另一方面,当制备单克隆抗体时,对上述免疫动物仅静脉注射作为通常抗原的淀粉样蛋白球体,在其2~5日、优选3日后采集认为包含抗体产生细胞的脾脏或者淋巴结,使该脾脏细胞或淋巴细胞与肿瘤细胞发生细胞融合。其后,将经细胞融合并永生化的抗体产生细胞(杂交瘤)分离。这里使用的肿瘤细胞优选与通常从经免疫的动物制备的脾脏

细胞或者淋巴细胞为相同种,但异种动物间的细胞也可以。另外,作为永生化的方法,还可以使用除细胞融合以外的公知的方法。例如,也可以利用使用了EB病毒(Epstein-Barr virus)的转化法(D.Kozbor等, Eur J Immunol, 14:23(1984))来进行。

[0123] 作为肿瘤细胞的例子,使用 p3(p3/x63-Ag8)、P3U1、NS-1、MPC-11、SP2/0-Ag14、FO、x63.6.5.3、S194、R210 等骨髓瘤细胞。细胞融合可以按照通常进行的方法,例如《単クローン抗体実験マニュアル》(講談社サイエンティフィック 1987年出版),G. KOHLER AND C. MILSTEIN, Nature, 256, 495(1975) 中记载的方法等来实施。细胞融合可以通过将细胞融合促进剂加入到悬浮有要融合的细胞的融合培养基中来实施。作为细胞融合促进剂,可列举出仙台病毒或平均分子量为 1000~6000 的聚乙二醇等。此时,为了进一步提高融合效率,可以将二甲基亚砷等助剂或 IL-6 等细胞因子添加到融合培养基中。关于肿瘤细胞与进行了免疫的脾脏细胞或者淋巴细胞的混合比,可以使用例如相对于肿瘤细胞为约 1 倍~约 10 倍左右的脾脏细胞或者淋巴细胞。

[0124] 作为上述融合培养基,可以使用 ERDF 培养基、RPMI-1640 培养基、MEM 培养基、GIT 培养基等通常的各种培养基,融合时通常可以预先将胎牛血清(FBS)等血清从培养基中除去。融合通过如下方法来实施:将规定量的进行了上述免疫的脾脏细胞或淋巴细胞与肿瘤细胞在上述培养基内充分混合,加入约 20~约 50%左右的预先加热到 37℃左右的聚乙二醇溶液,优选使其在 30~37℃下反应 1~10 分钟左右。之后,反复进行逐次添加适当的培养基并离心以除去上清液的操作。

[0125] 将目标杂交瘤在通常的选择性培养基例如 HAT 培养基(含有次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸腺嘧啶脱氧核苷的培养基)中培养。为了使除目标杂交瘤以外的细胞(未融合细胞等)死亡,在该 HAT 培养基中的培养可以进行足够的时间通常为数日~数周。

[0126] 得到的杂交瘤产生的抗体包含在上述杂交瘤的培养上清液中。通过与测定上述多克隆抗体的方法同样地测定该抗体的反应性或反应特异性等,可以选择性获得产生本发明的抗淀粉样蛋白球体特异性抗体的杂交瘤。

[0127] 通过将得到的杂交瘤利用有限稀释法进行克隆,可以得到产生单一的单克隆抗体的杂交瘤克隆。该杂交瘤克隆使用加入有约 1~约 10%左右的预先除去了 FBS 中所含的牛抗体(IgG)的 FBS 的培养基或者无血清用培养基来进行培养,将得到的培养上清液作为精制目标单克隆抗体的原料。另一方面,也可以将得到的杂交瘤克隆移植到预先给予了姥蛟烷的 Balb/c 小鼠或者 Balb/c(nu/nu) 小鼠的腹腔内,在 10~14 日后采集高浓度地含有单克隆抗体的腹水,作为精制目标单克隆抗体的原料。精制单克隆抗体的方法可以通过使用通常的免疫球蛋白精制法例如硫酸铵分级法(ammonium sulfate fractionation)、聚乙烯分级法、乙醇分级法、阴离子交换色谱法、结合有蛋白 A、蛋白 G 或抗小鼠免疫球蛋白抗体等的亲和色谱法等来实施。

[0128] 如此得到的本发明的抗淀粉样蛋白球体特异性抗体可以直接使用,也可以以通过规定的方法即番木瓜蛋白酶处理得到的 Fab 形式或者以通过胃蛋白酶处理得到的 F(ab')<sub>2</sub> 或 Fab' 的形式使用。另外,通过其本身已知的方法获得含有该抗体的 H 链和 L 链这两可变区内的互补决定区(CDR)、或超可变区等的片段或编码它们的基因,此外人型的抗体也包含在本发明的抗淀粉样蛋白球体特异性抗体中。此外,使用噬菌体展示法或人抗体产生小鼠等制备的完全人抗体也包含在本发明的抗淀粉样蛋白球体特异性抗体中。此

外,上述产生单克隆抗体的杂交瘤细胞系也包含在本发明中。作为本发明的杂交瘤的具体例子,可列举出在以下的实施例中获得的具有保藏编号为 FERM BP-10871 或者为 FERM BP-10872 的杂交瘤。

[0129] 将非人(小鼠、大鼠、仓鼠、兔等)抗体人型化后得到的抗体(以下称为人源化抗体)是嵌合体免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段(例如 Fv、Fab'、F(ab')<sub>2</sub> 或者抗体之外的抗原结合亚序列),其包含非人免疫球蛋白来源的最小序列。作为人源化抗体,特别优选通过改变具有非人抗体的互补决定区(CDR)的抗体的序列,由人抗体生殖胚系来源的氨基酸序列部分地或整体地构成的抗体。这种改变通过用人抗体的恒定区替换非人抗体恒定区来实现,能够制成在医药应用中具有可容许程度的低的免疫原性的人/非人嵌合体。更优选甚至是将抗体的可变区和 CDR 通过到目前为止本领域所公知的技术进行人源化。有时也将可变区的框架区用相应的人框架区替换,非人 CDR 实质上没有变化或者被其人基因组来源的序列替换。

[0130] 人源化抗体进一步是包含人框架和至少 1 个非人抗体来源的 CDR 的抗体,这里存在的任意的恒定区表示与人免疫球蛋白恒定区实质上相同。实质上相同表示至少 85~100%、优选 95~100%的氨基酸序列相同。即,该人源化抗体的除了 CDR 部分外的所有部分和与 1 个或 1 个以上的天然的人免疫球蛋白序列对应的部分相同。

[0131] 人源化抗体在作为药品用于人的治疗的情况下,与非人抗体和嵌合体抗体相比至少具有 3 个优点。

[0132] 1) 由于效应部分为人,因此与人体内的免疫反应中的其他因子的相互作用良好。例如,通过补体依赖性细胞毒性(CDC)或者抗体依赖性细胞毒性(ADCC)高效地破坏靶细胞。

[0133] 2) 认为人免疫系统不会将人源化抗体的框架或者恒定区作为外源物进行识别。因此,认为当将该人源化抗体给予人体内时,抗原抗体反应比对非人抗体或者嵌合体抗体的反应低。

[0134] 3) 还报告在人的循环系统中,给予的非人抗体的半衰期比人抗体的短。在给予了人源化抗体的情况下,期待具有与天然的人抗体本质上相同的半衰期,给药量和给药频率可以更少。

[0135] 将非人抗体进行人源化的方法是本领域熟知的。例如通过 Winter 等的方法(日本专利第 2912618 号公报)、Jones 等的方法(Nature, 321:522(1986))、Riechmann 等的方法(Nature, 332:323(1988))、Verhoeyen 等的方法(Science, 239:1534(1988))、Queen 等的方法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2869(1991))等来实施。在获得人源化抗体的作业中,为了使表达人源化抗体的宿主细胞中的表达最优化,优选进行密码的沉默突变(例如 Nakamura 等的方法:Nucleic Acid Res 29:292(2000))。如此得到的抗体只要具有本申请所述的特异性,则下述人源化抗体也包含在本申请发明中,该人源化抗体的特征在于其在所述可变区中具有 1 个以上的氨基酸的缺失、替换、插入或者添加形成的氨基酸序列。

[0136] (4) 抗淀粉样蛋白球体特异性抗体对抗原的反应性的测定

[0137] 下面说明用于测定本发明的抗淀粉样蛋白球体特异性抗体对抗原的反应性的 ELISA、点印迹法的具体方法的例子。作为 ELISA,可列举出例如固相 ELISA、液相 ELISA 等。另外,还可以测定本发明的抗淀粉样蛋白球体特异性抗体对抗原的解离常数。抗体的

解离常数的测定可以使用 BIACore (BIACORE 公司制) 等仪器或通过按照它的方法来进行。

[0138] (a) 包覆淀粉样蛋白球体的固相载体和淀粉样蛋白球体固相 ELISA

[0139] 通过使用包覆有淀粉样蛋白球体的固相载体来测定抗淀粉样蛋白球体特异性抗体对抗原的反应性,能够对抗淀粉样蛋白球体特异性抗体进行测定。这里,作为固相载体,可列举出聚苯乙烯、聚丙烯等塑料制的球状、棒状、板状等的载体,优选塑料制板。为了使淀粉样蛋白球体包覆到固相载体上,可列举出使用常用方法例如吸附法、交联剂的方法等,从简便性出发,优选使用使淀粉样蛋白球体物理吸附的吸附法。

[0140] 作为使用了包覆淀粉样蛋白球体的固相载体的测定法,具体而言,可列举出淀粉样蛋白球体 ELISA。首先,在 Nunc 公司制等的 ELISA 板上涂布上述 (2) 中制备的淀粉样蛋白球体。此时,溶剂只要不使淀粉样蛋白球体脱缔合,可以是任意溶剂,但优选使用例如 PBS(-)。将该板用适当的溶液、例如含有 0.05% Tween20 等表面活性剂的生理盐水等洗涤,用牛血清白蛋白 / 磷酸缓冲液 (Phosphate buffered saline :PBS) 等封闭,然后使之与上述得到的抗体反应。之后,在进一步洗涤后,使之作为第二抗体 (二抗) 和与免疫动物的免疫球蛋白反应的抗体接触。同样地洗涤后,以被标记物的活性等为指标,检测结合在板上的所述第二抗体。这种被标记物的活性可以使用例如 ELISA 酶标仪 (ELISA plate reader) 等进行测定。另外,使用淀粉样蛋白球体 ELISA,可以确定本发明的抗淀粉样蛋白球体特异性抗体的抗原决定部位 (表位)。具体而言,通过淀粉样蛋白球体 ELISA,可以测定  $\beta$  淀粉样蛋白单体蛋白的片段与抗淀粉样蛋白球体特异性抗体的结合竞争抑制并确定表位。也可以多个组合  $\beta$  淀粉样蛋白单体蛋白的片段。此外,通过淀粉样蛋白球体 ELISA,可以测定表位已知的抗体与抗淀粉样蛋白球体特异性抗体的结合竞争抑制并确定表位。此外,表位的确定可以通过 "Antibodies :A LABORATORY MANUAL" (Ed Harlow et al., ColdSpringHarbor Laboratory (1988)) 等的实验书中记载的方法或通过按照它的方法来进行。

[0141] (b) 淀粉样蛋白球体液相 ELISA

[0142] 使含有抗淀粉样蛋白球体的抗体的样品例如杂交瘤培养上清液与淀粉样蛋白球体在室温下混和 1 小时以上并反应。向预先涂布了适量的兔抗淀粉样蛋白球体 IgG 并用例如牛血清白蛋白 /PBS 封闭的 ELISA 板上添加一定量的上述混合液,并使其在室温下反应 1 小时以上。然后,在进一步洗涤后,使其作为第二抗体和与样品中的免疫球蛋白反应的抗体例如抗小鼠 IgG 抗体、抗小鼠 IgM、抗小鼠免疫球蛋白接触。同样地洗涤后,以被标记物的活性等为指标检测板上结合的所述第二抗体。这种被标记物的活性可以使用例如 ELISA 酶标仪等来进行测定。

[0143] (c)  $\beta$  淀粉样蛋白单体 ELISA

[0144] 使含有抗体的样品例如杂交瘤培养上清液与在 N 末端结合有生物素的  $\beta$  淀粉样蛋白单体蛋白或在 C 末端结合有生物素的  $\beta$  淀粉样蛋白单体蛋白混合并在室温下反应 1 小时以上。将该混合液添加到预先用牛血清白蛋白 /PBS 封闭的链霉亲和素 ELISA 板上,使其在室温下反应 30 分钟以上。然后,在洗涤后使其作为第二抗体和与样品中的免疫球蛋白反应的抗体例如抗小鼠 IgG 抗体、抗小鼠 IgM、抗小鼠免疫球蛋白接触。同样地洗涤后,以被标记物的活性等为指标检测板上结合的所述第二抗体。这种被标记物的活性可以使用例如 ELISA 酶标仪等进行测定。

[0145] (d) 点印迹法

[0146] 下面说明用于测定本发明的抗淀粉样蛋白球体特异性抗体对抗原的反应性的点印迹法的具体方法的例子。首先,使用 Bio Rad 公司制等的市售的 Blotter 等,将适量的上述 (2) 中制备的淀粉样蛋白球体在硝酸纤维素膜等上印迹。此时,溶剂只要不使淀粉样蛋白球体脱缔合,则可以是任意溶剂,优选使用例如 PBS(-)。除了对淀粉样蛋白球体进行印迹 (blotting) 以外,也对  $\beta$  淀粉样蛋白单体蛋白或其部分肽、溶剂本身进行印迹以作为对照。在将该膜用适当的缓冲液例如磷酸缓冲液 (Phosphate buffered saline, PBS) 等洗涤并用脱脂乳/TTBS (Tween-Tris buffered saline) 等封闭后,使膜与上述得到的抗体接触,然后,在进一步用 TTBS 等洗涤后,使其作为第二抗体和与免疫动物的免疫球蛋白反应的抗体接触,将其同样地洗涤后,以被标记物的活性等为指标检测膜上结合的所述第二抗体。作为对照,优选使用与  $\beta$  淀粉样蛋白单体蛋白反应的抗体。作为这样的抗体,可列举出例如“6E10”(Senetek 公司制) 等。

[0147] (5) 抑制淀粉样蛋白球体对神经细胞死亡的诱导的活性的分析

[0148] 下面说明本发明的抗淀粉样蛋白球体特异性抗体具有的、抑制淀粉样蛋白球体对神经细胞死亡的诱导的活性(下文有时也将其称为“神经细胞毒性中和活性”或者“抑制神经细胞死亡诱导的活性”)的分析方法的例子。

[0149] 首先,使用了淀粉样蛋白球体的神经细胞死亡的诱导可以如下进行:在神经系统的细胞等的培养液中添加上述淀粉样蛋白球体,按照通常的方法进行培养。这里,当分析本发明的抗淀粉样蛋白球体特异性抗体是否具有该神经细胞毒性中和活性时,可以如下进行:在抗淀粉样蛋白球体特异性抗体的存在下,将上述神经细胞与淀粉样蛋白球体一起培养,确认未诱导神经细胞死亡。由淀粉样蛋白球体诱导的细胞死亡可以是凋亡或坏死中的任意一种。另外,作为使用的细胞,只要是神经系统细胞,则没有特殊限制,优选哺乳动物(人、大鼠、小鼠、猴、猪等)来源的神经系统细胞。另外,优选原代培养细胞。作为原代培养细胞,优选从上述动物的海马和前脑基底、大脑皮质等获得的细胞。另外,也可以使用将上述动物的海马等器官培养得到的细胞。另外,也可以使用从 ES 细胞等分化诱导得到的神经细胞。

[0150] 这些细胞或器官可以按照通常的培养方法进行培养。具体而言,作为神经系统细胞的原代培养和神经系统已构建细胞株的培养方法,可以使用 Hoshi, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 93, 2719-2723 (1996) 和 Schubert, D. et al., Nature, 249 (454), 224-227 (1974) 中记载的方法等,关于器官培养,可以使用 Gary Banker and Kimberly Goslin, Culturing nerve cells, 2nd Edition, MIT Press, Cambridge (1998) 中记载的方法等。为了诱导这样培养的神经系统的细胞和器官发生细胞死亡,所添加的淀粉样蛋白球体的量可以适当选择,淀粉样蛋白球体通常能够与阿尔茨海默病等的患者的脑内存在的毒性  $\beta$  淀粉样蛋白以实质上同等的浓度诱导细胞死亡。例如,上述 (2) 中得到的淀粉样蛋白球体如上所述,能够以培养液中的  $\beta$  淀粉样蛋白浓度为约  $1 \mu\text{g/ml}$  以下、更优选为约  $0.45 \mu\text{g/ml}$  以下等的量诱导原代培养细胞发生细胞死亡。但是,上述浓度仅是为了举例,并不受该量的限定。

[0151] 存在于该培养中的本发明的抗淀粉样蛋白球体特异性抗体的量可以根据所用的抗体对抗原的反应性来适当选择,具体而言,优选例如以约  $0.0001 \sim$  约  $1\text{mg/ml}$  的量存在。另外,抗淀粉样蛋白球体特异性抗体向所述培养液中添加的时期只要能够确认神经细胞毒

性中和活性,则没有特殊限制,淀粉样蛋白球体对神经细胞死亡的诱导是从培养后约 6 小时左右开始被诱导的,因此预先在这之前优选在培养初期添加。此外,将淀粉样蛋白球体与抗淀粉样蛋白球体特异性抗体在另外的容器中孵育后,添加到所述培养液中。另外,作为对照,优选使用与淀粉样蛋白球体不反应的抗体或对淀粉样蛋白球体的反应性低且其反应性不影响对神经细胞死亡的诱导的抗体。作为这样的抗体,优选可以使用例如抗  $\beta$  淀粉样蛋白单体蛋白的抗体,具体而言,例如“6E10”(Senetek 公司制)等。

[0152] 由淀粉样蛋白球体诱导的神经细胞死亡通常在添加了有效量的淀粉样蛋白球体后、从约 6 小时左右开始发生,在约 48 小时左右后,能够观察到明显的细胞死亡。因此,在该分析方法中,当测定对神经细胞死亡的诱导时,优选开始培养的约 20 小时以后,但可以根据使用的淀粉样蛋白球体的细胞死亡活性体系来适当选择。

[0153] 作为测定这些神经细胞死亡活性的方法,可以使用通常所用的细胞死亡检测法。具体而言,可以使用 MTT 活性测定法 (Mossman, T., J. Immunol. Methods, 65, 55 (1983))、使用碘化丙啶 (Ankarcrona, M. et al., Neuron, 15, 961 (1995)) 等的染色法、或台盼蓝拒染法 (Trypan blue dye exclusion) (Woo, K. B., Funkhouser, W. K., Sullivan, C. and Alabaster, O., Cell Tissue Kinet., 13 (6), 591-604 (1980))、检测 TUNEL 或片段化 DNA 的 ELISA (Roche 公司制) 等。其中,特别优选使用碘化丙啶等的染色法或检测片段化 DNA 的 ELISA。使用碘化丙啶等的染色法可以是使用仅选择性地对死亡细胞进行染色的碘化丙啶进行单一染色,也可以与其他多种染色色素组合使用。作为可组合的染色色素,具体而言,优选选择性地对活细胞进行染色的 Calcein-AM (Molecular Probes 公司制)、对全部细胞进行染色的 Hoechst 33258 (H33258, Bisbenzimidazole H33258) 等。

[0154] 另外,本发明的抗淀粉样蛋白球体特异性抗体抑制对神经细胞死亡的诱导的活性也可以通过将本发明的抗淀粉样蛋白球体特异性抗体直接给予动物个体来进行。由淀粉样蛋白球体诱导的细胞死亡可以是凋亡或坏死中的任意一种。另外,作为所用的动物,只要是具有哺乳动物(小鼠、大鼠、灵长类等)等的神经系统细胞的动物,则没有特殊限制,优选可以使用阿尔茨海默病的模型动物等特别是正在发生神经细胞死亡的动物。另外,给药方法除了向脑等神经系统细胞存在的部位直接给药的方法外,还可以使用经口给药法、静脉注射法、腹腔给药法等通常药物给药中所使用的方法。作为向脑等神经系统细胞存在的部位直接给药的方法,具体而言,例如在大鼠或小鼠等的脑组织的情况下,可以用渗透泵向靶部位附近的脑室内给药的方法、用微量加液器等向靶部位的脑实质进行微灌注 (micro fusion, microperfusion) 的方法等,并在给药一定期间后,使用 PET • MRI 测量脑功能的变化,然后快速取出给药部位周围的组织,制成组织切片,从而能够检验有无神经细胞死亡。有无神经细胞死亡的检验可以通过组织染色法或 Western 印迹法等来进行,作为组织染色法,可列举出 TUNEL 染色或利用抗 Caspase 抗体等的免疫染色等。

[0155] (6) 阿尔茨海默病的治疗 / 和预防药以及筛选方法

[0156] 当淀粉样蛋白球体被添加到神经系统的培养细胞中时,其能够导致所述细胞死亡,因此认为在阿尔茨海默病中,同样地  $\beta$  淀粉样蛋白自缔合形成的淀粉样蛋白球体会诱导神经变性。

[0157] 本发明的抗淀粉样蛋白球体特异性抗体显示对该淀粉样蛋白球体的高的反应性,具有抑制淀粉样蛋白球体对神经细胞死亡的诱导的活性,因此通过使受检物与本发明的抗

淀粉样蛋白球体特异性抗体竞争地与淀粉样蛋白球体结合, 并以其反应性为指标对物质进行选择, 能够进行阿尔茨海默病的治疗 / 和预防药的筛选。另外, 本发明的抗淀粉样蛋白球体特异性抗体本身即可作为阿尔茨海默病的治疗 / 和预防药的有效成分。即, 本发明的抗淀粉样蛋白球体特异性抗体由于对以淀粉样前体蛋白为代表的淀粉样蛋白  $\beta$  的单体或能够形成该单体的其他的结构体的反应性低、而对脑的特异性高, 因此与 W02006/016644 号公报中已知的以往的抗淀粉样蛋白球体抗体相比, 能够成为安全性更高的阿尔茨海默病的治疗药。

[0158] 下面说明所述物质的筛选方法的具体例子。作为受检物, 可列举出例如肽、蛋白、非肽性化合物、合成化合物、发酵产物、细胞提取液、植物提取液、动物组织提取液等, 这些化合物可以是新型的化合物, 也可以是公知的化合物。关于与淀粉样蛋白球体的反应性, 可列举出在分析上述 (4) 的抗淀粉样蛋白球体特异性抗体与淀粉样蛋白球体的反应性的方法中, 在反应液中添加上述受检物来进行的方法等。淀粉样蛋白球体、抗淀粉样蛋白球体特异性抗体和受检物的混合量可以通过分别选择适当的浓度来进行。

[0159] 受检物优选标记物等预先进行了标记。通过所述分析, 能够判断与淀粉样蛋白球体结合的物质可以用作阿尔茨海默病的治疗 / 和预防药的有效成分。此外, 优选选择的物质代替上述 (5) 中记载的方法中的抗淀粉样蛋白球体特异性抗体来确认是否抑制淀粉样蛋白球体对神经细胞死亡的诱导。

[0160] 如此选择的物质和本发明的抗淀粉样蛋白球体特异性抗体本身作为用于阿尔茨海默病的预防和 / 或治疗的药物的有效成分是有用的, 也可以是生理学上可容许的它们的盐、水合物以及溶剂合物等。优选添加 Fe 或 Zn 等 的金属离子或糖链、糖蛋白而成的物质。作为生理学上容许的盐, 可列举出例如盐酸盐、硫酸盐等无机酸类的盐, 柠檬酸盐、草酸盐、对甲苯磺酸盐等有机酸的盐, 甘氨酸等氨基酸的盐等。另外, 抗淀粉样蛋白球体特异性抗体更优选使用通过上述方法改变为人型的抗体或者完全人抗体。抗体的适于对人等进行给药的变化可以组合其本身公知的方法来进行。

[0161] 本发明提供的药品含有将根据本发明的筛选方法判定为对神经细胞死亡具有抑制作用的物质或者本发明的抗淀粉样蛋白球体特异性抗体以作为有效成分, 并能够作用于阿尔茨海默病的预防和 / 或治疗的药品。根据本发明的筛选方法判定为对神经细胞死亡具有抑制作用的物质和抗淀粉样蛋白球体特异性抗体其本身可以作为药品给予患者, 但通常优选制造成含有这些有效成分中的 1 种或 2 种以上的药物组合物来给予患者。作为这样的药物组合物, 可以例举片剂、胶囊剂、颗粒剂、细粒剂、散剂、丸剂、锭剂 (troche)、舌下剂或液体制剂等经口给药的制剂、或者注射剂、栓剂、软膏、贴剂等非经口给药用制剂。

[0162] 经口给药用片剂或胶囊剂通常以单位给药物的形式提供, 其可以通过添加粘合剂、填充剂、稀释剂、压片剂、润滑剂、崩解剂、着色剂、香味剂和湿润剂等通常制剂用载体来进行制造。片剂可以按照本领域公知的方法、例如使用肠溶性包衣剂等进行包衣, 并使用例如填充剂、崩解剂、润滑剂、湿润剂等来进行制造。

[0163] 经口给药用液体制剂除了例如水性或油性悬浮液、溶液、乳液、糖浆剂或酞剂之外, 还可以在在使用前能够用水或适当的介质再溶解的干燥制剂的形式提供。这样的液体制剂中可以配合通常的添加剂例如抗沉降剂、乳化剂、保存剂以及根据需要的通常的香味剂或着色剂。

[0164] 经口给药剂的制剂可以通过混合、填充或压片等本领域公知的方法来制造。另外，还可以使有效成分分布到通过反复配合操作并使用大量填充剂等制成的制剂中。非经口给药剂的制剂通常以含有作为有效成分的物质和灭菌介质的液体载体给药量制剂的形式提供。非经口给药剂的溶剂通常通过将作为有效成分的物质溶解到介质中并灭菌过滤，接着填充到适当的小瓶或安瓿中并密封来制造。为了提高稳定性，可以将组合物冷冻后填充到小瓶中，并在真空下除去水。非经口悬浮液实质上可以采用与非经口溶液相同的方法来制造，但优选通过将有效成分悬浮到介质中并用环氧乙烷等进行灭菌来制造。另外，为了使有效成分均匀分布，还可以根据需要添加表面活性剂、湿润剂等。

[0165] 作为有效成分的物质给药量可以通过考虑物质的活性的强弱、治疗或预防的目的、患者的症状、体重、年龄或性别等来适当确定。另外，优选分成每日 1 ~ 数次进行给药。例如，当本发明的抗淀粉样蛋白球体特异性抗体为有效成分时，其给药量在 1 次给药中可以以每 kg 体重通常为约 1  $\mu$ g ~ 约 100mg、优选为约 10  $\mu$ g ~ 约 50mg 的量来进行给药。

[0166] (7) 使用了抗淀粉样蛋白球体特异性抗体的阿尔茨海默病个体的检测方法和检测用试剂

[0167] 当将淀粉样蛋白球体添加到神经系统的培养细胞中时，会导致所述细胞死亡，因此认为在阿尔茨海默病中，同样地  $\beta$  淀粉样蛋白单体蛋白自缔合形成的淀粉样蛋白球体会诱导神经变性。由于本发明的抗淀粉样蛋白球体特异性抗体对淀粉样蛋白球体具有高的反应性，因此通过使用该抗体对生物试样中的淀粉样蛋白球体进行检测，能够进行阿尔茨海默病个体的检测。

[0168] 作为生物试样，可列举出从怀疑具有阿尔茨海默病的个体获得的血液、脑脊髓液、尿等体液等，其中特别优选血液。该试样可以如下获得：例如在血液的情况下，可以从怀疑具有阿尔茨海默病的个体的肘静脉等通过采血管等进行采血并利用离心分离等方法将血浆或血清分离来得到。另外，在将脑脊髓液作为试样的情况下，可以从怀疑具有阿尔茨海默病的个体通过例如麻醉下的腰椎穿刺来采集脑脊髓液并进行离心分离而得到。为了防止获得的生物试样中的淀粉样蛋白球体变化或血液凝固等，优选在试样采集时或样品采集后向试样中加入酶抑制剂。作为酶抑制剂，可以使用蛋白分解酶抑制剂例如抑肽酶 (aprotinin)、抗蛋白酶 (antipain)、胃蛋白酶抑制素 (pepstatin)、亮肽素 (leupeptin)、EGTA、PMSF (苯基甲磺酰氯)、TLCK (磺酰赖氨酸氯甲基酮) 等。对得到的机体样品进一步根据需要进行浓缩等，能够提高淀粉样蛋白球体的检测灵敏度。

[0169] 使用了该抗淀粉样蛋白球体特异性抗体的生物试样中的淀粉样蛋白球体的检测可以使用其本身已知的免疫学测定法。具体而言，可以使用例如 夹层法、竞争法 (competition method)、免疫测定法 (Immunometric assay)、散射测浊法 (nephelometry) 等。在夹层法中，通过使生物试样与经固相化的本发明的抗淀粉样蛋白球体特异性抗体接触，进而与经标记的抗淀粉样蛋白球体特异性抗体反应，然后测定结合于固相的标记物的信号，从而能够测定生物试样中的淀粉样蛋白球体量。当通过这样的免疫学测定方法来测定生物试样中的淀粉样蛋白球体量时，优选利用使用含有已知量的淀粉样蛋白球体的标准液制作的标准曲线来计算。详细而言，可以按照生化学实验法 11 《エンザイム免疫アッセイ》(Tijssen P. 著、東京化学同人)、“Antibodies :A LABORATORY MANUAL” (Ed Harlow et al., Cold Spring Harbor Laboratory (1988)) 等实验书，适当地选择、组合来进行。另

外,本发明中也包括这些检测中使用的、包括抗淀粉样蛋白球体特异性抗体的用于阿尔茨海默病个体检测的试剂。

#### [0170] 实施例

[0171] 以下通过实施例对本发明进行说明,但本发明并不受这些实施例的任何限定。需要说明的是,在下述实施例和本说明书中,“PBS”表示“磷酸缓冲液盐 (Phosphate Buffered Saline)”,“TTBS”表示“吐温 /Tris 缓冲液盐 (Tween-Tris Buffered Saline)”,“HRP”表示“辣根过氧化物酶 (Horseradish Peroxidase)”。

#### [0172] 实施例 1 :淀粉样蛋白球体含有液的制备

##### [0173] (1) $\beta$ 40 淀粉样蛋白 (序列号 1) 树脂的制造

[0174] 将 Fmoc-Val 树脂 342mg (胺含量为 0.73mmol/g 的树脂) 放置到 PerkinElmer Applied Biosystems 公司制的 A433 型自动肽合成机中,向其供给 Fmoc-Val-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Met-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Lys (Boc)-OH、Fmoc-Asn (Trt)-OH、Fmoc-Ser (tBu)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Asp (OtBu)-OH、Fmoc-Glu (OtBu)-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Lys (Boc)-OH、Fmoc-Gln (Trt)-OH、Fmoc-His (Trt)-OH、Fmoc-His (Trt)-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Glu (OtBu)-OH、Fmoc-Tyr (tBu)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Ser (tBu)-OH、Fmoc-Asp (OtBu)-OH、Fmoc-His (Trt)-OH、Fmoc-Arg (Pmc)-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Glu (OtBu)-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Asp (OtBu)-OH,并以 HBTU (2-(1H-苯并三氮唑-1基)-1,1,3,3-四甲基脲六氟磷酸盐) 为缩合剂使其依次缩合,得到侧链保护  $\beta$  40 淀粉样蛋白树脂 1.515g。

##### [0175] (2) 三氟乙酸处理

[0176] 取上述 (1) 中得到的侧链保护  $\beta$  40 淀粉样蛋白树脂中的 304mg,向其中加入苯酚 0.75ml、茴香硫醚 0.5ml、三氟乙酸 8.25ml、乙烷二硫醇 0.25ml 和蒸馏水 0.5ml,用冰冷却 5 分钟,接着在室温下使其反应 1.5 小时。反应结束后,加入用冰冷却了的二乙基醚 200ml,使肽沉淀。用玻璃过滤器过滤得到全部内容物,用冷二乙基醚洗涤,然后用含有 35% 的乙腈的 0.1% 三氟乙酸 (约 200ml) 进行提取处理,得到以 H-Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-OH 表示的粗肽 191mg。

##### [0177] (3) 肽的精制

[0178] 将该粗肽溶解到含有 35% 的乙腈的 0.1% 三氟乙酸 (40ml) 中,利用 HPLC 进行精制,所述 HPLC 使用了在二氧化硅上结合有 ODS (十八烷基硅烷) 的反相柱 (内径为 2cm、长度为 25cm)。洗脱是通过在 0.1% 三氟乙酸中用 20 分钟使乙腈浓度从 22% 直线上升到 42% 来进行的。精制物的获得量为 35mg。该物质的结构用 MALDI-TOF 质量分析来确认。相对于测定值  $[M+H]^+$  4330.99,计算值 ( $C_{194}H_{295}N_{53}O_{58}S_1+H$ ) 为 4330.89。另外,关于  $\beta$  42 淀粉样蛋白,将按照上述方法进行合成 / 生成得到的  $\beta$  42 淀粉样蛋白和从 Bachem 公司购买的  $\beta$  42 淀粉样蛋白二者用于下述实验。

##### [0179] (4) 淀粉样蛋白球体含有液的制备

[0180] 将上述 (3) 中精制得到的 10nmol 的  $\beta$  40 淀粉样蛋白放入 1.5ml 容量的

Eppendorftube 中,向其中依次加入 500  $\mu$  l 的超纯水和 500  $\mu$  l 的 Dulbecco 磷酸缓冲液(-) (Nissui 公司制;下文也称为 PBS(-)),使  $\beta$  淀粉样蛋白完全溶解。将装有该  $\beta$  淀粉样蛋白水溶液的 Eppendorf tube 安装到 Duckrotor (TAITEC 公司制、rotor :RT50) 上,使其在 37°C 下以 35rpm 的速度 旋转 7 日,从而制备淀粉样蛋白球体 40。对于  $\beta$  42 淀粉样蛋白(上述(3)中精制得到的  $\beta$  42 淀粉样蛋白或者 Bachem 公司制),按照上述方法,使其旋转约 10 小时,从而制备淀粉样蛋白球体 42。

[0181] 实施例 2:仓鼠单克隆抗淀粉样蛋白球体特异性抗体的制备

[0182] 将在 PBS 中制备的淀粉样蛋白球体 42 和等量的弗氏完全佐剂(WAKO 公司制)混合乳化,在亚美尼亚仓鼠背部皮下用 0.2ml 进行免疫(16  $\mu$  g/0.2ml/仓鼠)。每隔 2 周,用经弗氏不完全佐剂(Sigma-Aldrich 公司制)乳化的淀粉样蛋白球体同样地进行免疫。在 5 次免疫后,从颈动脉采血制备血浆。用 1%牛血清白蛋白(BSA, fraction V;Sigma-Aldrich 公司制)溶液(PBS(-)中)将血浆连续稀释,测定对下述的淀粉样蛋白球体固相 ELISA 法淀粉样蛋白球体的反应性。

[0183] 对进行 6~12 次免疫后反应性充分上升的个体,最后向腹腔内给予淀粉样蛋白球体 16  $\mu$  g(PBS(-)0.2ml 中)以进行加强。在加强 3 日后回收脾细胞,通过使用聚乙二醇 4000 的常用方法,将其与为脾细胞数的 1/2 的小鼠骨髓瘤细胞(SP2/0-Ag14)进行细胞融合。将融合得到的细胞悬浮到含有 10%胎牛血清、10% BM condimed H-1(Roche Diagnostics 公司制)和 HAT(Sigma-Aldrich 公司制)的 GIT 培养基(WAKO 公司制)中,按照每孔  $5 \times 10^4$  个骨髓瘤细胞/0.1ml 培养液的方式播种到 96 孔板(FALCON 公司制)中。3 日后追加培养液,在 7 日后更换培养液,再培养 2~3 日后回收上清液。用下述 ELISA 法检查上清液中的抗淀粉样蛋白球体特异性抗体,将产生特异性抗体的细胞扩展(expand)到 24 孔板(IWAKI 公司制)中。在利用有限稀释法进行克隆时,将杂交瘤以每孔 200  $\mu$  l 培养液播种到 96 孔板中,并达到 0.3cell/well,每周更换一次一半培养液地进行培养。

[0184] 将从如此得到的产生仓鼠单克隆抗体的杂交瘤 H3-17-2-2(杂交瘤 haASD1)、H5-3-2-45(杂交瘤 haASD2)、H5-24-7、H5-47-10、H4-3-5-4 获得的抗体分别称为 haASD1、haASD2、haASD3、haASD4、haASD5。

[0185] 将杂交瘤 haASD1 以 FERM BP-10871、将杂交瘤 haASD2 以 FERMBP-10872 于 2007 年(平成 19 年)7 月 13 日保藏于日本独立行政法人产业技术综合研究所专利生物保藏中心(日本国茨城县つくば市東一丁目 1 番地 1 中央第 6)。

[0186] 从杂交瘤 H3-17-2-2、H5-3-2-45、H5-24-7、H5-47-10、H4-3-5-4 获得的抗体的分离精制如下进行。将杂交瘤在约 1L 的 CD Hybridoma 培养基(Invitrogen 公司制)中培养 1 周,通过离心分离回收培养上清液。将其用 0.45  $\mu$  m 的过滤器过滤,然后将其添加到用 PBS(-)平衡了的 2ml 的 Protein-A 琼脂糖(Sepharose)中,之后与 W02006/016644 号的实施例 2(1)同样地分离精制 IgG 抗体。

[0187] 实施例 3 抗体的性状分析

[0188] (1) 淀粉样蛋白球体固相 ELISA 法(与淀粉样蛋白球体的反应性的确认)

[0189] 在 96 孔 ELISA 板(Nunc 公司制 MaxiSorp)中添加 50  $\mu$  l 的在 1/2 浓度 PBS(-)中稀释至 1  $\mu$  g/ml 的淀粉样蛋白球体 42,并在 4°C 下过夜。在室温下添加 1%牛血清白蛋白(BSA, fraction V;Sigma-Aldrich 公司制)溶液(PBS(-)中)1 小时以上以封闭非特异性

结合部位,然后用水洗涤平板。添加 50  $\mu$  l 的用 1%牛血清白蛋白溶液 (PBS(-) 中) 稀释的抗血清或杂交瘤培养上清液,使其在室温下反应 1 小时以上。用含有 0.05% Tween20 的生理盐水洗涤平板 5 次,然后同样添加稀释至 1  $\mu$  g/ml 的过氧化物酶标记的第二抗体 (抗仓鼠 IgG 抗体 (ROCKLAND 公司制)),使其在室温下反应 1 小时。在洗涤 5 次后,添加底物溶液,使其显色一定时间,用酶标仪测定吸光度。

[0190] 实施例 2 中构建的仓鼠单克隆抗体的代表例的结果示于图 1。实施例 2 中构建的抗体以低浓度对淀粉样蛋白球体显示强的反应性。

[0191] (2) 点印迹分析 (与淀粉样蛋白球体、 $\beta$  淀粉样蛋白纤维、 $\beta$  淀粉样蛋白单体和淀粉样前体蛋白的反应性的确认)

[0192] 使用 Blotter (BioRad 公司制) 将溶于溶剂 1,1,1,3,3,3, - 六氟 -2- 丙醇 (Sigma-Aldrich 公司制) 的  $\beta$  40 淀粉样蛋白或 42 单体蛋白、实施例 1 中制备的淀粉样蛋白球体 40 或 42 含有液、由  $\beta$  40 淀粉样蛋白制备的 A $\beta$  纤维和市售的淀粉样前体蛋白 sAPP $\alpha$  (Sigma 公司制) 分别以每个 5ng 吸印到硝酸纤维素膜 (Schleicher&Schuell, 0.2  $\mu$ ) 上,将该膜用 PBS(-) 洗涤,然后从 Blotter 取下。

[0193] 将吸印有上述蛋白质的膜用 5%脱脂乳 /0.05% TTBS 封闭 1 小时后,浸到兔多克隆抗淀粉样蛋白球体特异性抗体 (rpASD1、rpASD2、rpASD3) (0.01  $\mu$  g/mL)、小鼠单克隆抗淀粉样蛋白球体抗体 (mASD3) (0.05  $\mu$  g/mL)、和实施例 2 中获得的抗体 haASD1 (0.01  $\mu$  g/mL) 中,在湿气箱中在 4 $^{\circ}$ C 下反应过夜。然后,将该膜用 0.05% TTBS 洗涤,使其作为第二抗体与 0.05 ~ 1  $\mu$  g/ml 的结合有辣根来源的过氧化物酶的抗兔 IgG 或抗小鼠 IgG 或者抗仓鼠 IgG 反应 1 小时。然后,用 0.05% TTBS 洗涤,除去未反应的第二抗体,浸到 SuperSignal West-Femto (Pierce 公司制) 中孵育 5 分钟,然后用 Image Analyzer“LAS-1000plus”(Fuji Photo Film 公司制) 检测化学发光信号和获取图像数据。作为上述抗体反应性的对照,使用 0.5  $\mu$  g/mL 的抗  $\beta$  淀粉样蛋白抗体“6E10”(Senetek 公司制) 和 0.04  $\mu$  g/mL 的抗 APP N- 末端抗体“22C11”(Chemicon 公司制) 作为第一抗体 (一抗)。

[0194] 其结果示于图 2。

[0195] 图 2 中,A $\beta$  1-40 和 A $\beta$  1-42 分别示出单体、实施例 1 中制备的淀粉样蛋白球体 40 含有液及其 100kDa 超滤膜滞留级分、和淀粉样蛋白球体 42 含有液及其 100kDa 超滤膜滞留级分的点;fibril 表示由 A $\beta$  1-40 制备的 A $\beta$  纤维的点;另外,sAPP $\alpha$  表示市售的淀粉样前体蛋白 (Sigma 公司制) 的点。由图可知,市售的抗  $\beta$  淀粉样蛋白抗体“6E10”与实施例 1 中制备的淀粉样蛋白球体 40、淀粉样蛋白球体 42、单体、纤维、sAPP $\alpha$  蛋白质均发生反应,与此相对,实施例 2 中构建的仓鼠单克隆抗体 (haASD1) 与淀粉样蛋白球体 40 和淀粉样蛋白球体 42 高选择性地发生反应,而对淀粉样前体蛋白 sAPP $\alpha$  完全不显示反应性。

[0196] (3) 解离常数测定

[0197] 在 50mM 醋酸缓冲液中,将 10  $\mu$  g/ml 淀粉样蛋白球体 (42ASPD)、 $\beta$  淀粉样蛋白单体 (42A $\beta$ 、40A $\beta$ )、由 40A $\beta$  制备的 A $\beta$  纤维 (fibril) 耦合到 BIAcore3000 (BIAcore 公司制) 的 CM5 传感器芯片上。使用 10mMHEPES、pH7.4、0.15M NaCl、3mM EDTA、0.005% Surfactant P20 从最高浓度 100nM 连续稀释 2 倍得到的抗体溶液,求出结合速度常数和解离速度常数。利用这些常数通过下式计算出解离常数。

[0198] 解离常数 = 解离速度常数 / 结合速度常数

[0199] 表 1 表示小鼠单克隆抗淀粉样蛋白球体抗体、仓鼠单克隆抗淀粉样蛋白球体特异性抗体和市售抗体 (6E10) 相对于淀粉样蛋白球体的解离常数 (Kd)。

[0200] 仓鼠单克隆抗淀粉样蛋白球体特异性抗体与小鼠单克隆抗淀粉样蛋白球体抗体同样具有对 ASPD 的强的亲和性 ( $Kd 10^{-11} \sim 10^{-9}M$ ), 并且显示比对  $\beta$  淀粉样蛋白单体或纤维更 (1 个级别 ~ 2 个级别) 高的选择性。

[0201] [表 1] 各种抗淀粉样蛋白球体抗体的解离常数

[0202]

抗体	亲和性, KD (nM)			
	42ASPD	42A $\beta$	40A $\beta$	fibril
<b>mASD1</b>	<b>0.19</b>	<b>1.2</b>	<b>8.1</b>	<b>1.61</b>
<b>mASD3</b>	<b>0.036</b>	<b>1.0</b>	<b>2.6</b>	<b>0.35</b>
<b>haASD1</b>	<b>0.49</b>	<b>2.4</b>	<b>44.6</b>	<b>8.49</b>
<b>haASD2</b>	<b>0.022</b>	<b>0.97</b>	<b>7.6</b>	<b>0.87</b>
<b>6E10</b>	<b>18.3</b>	<b>17.2</b>	<b>37.3</b>	<b>1.33</b>

[0203] 实施例 4: 抗淀粉样蛋白球体抗体的抗原决定部位 (表位) 的确定

[0204] (1) 抗淀粉样蛋白球体抗体的抗原决定部位 (表位)

[0205] 为了确定抗淀粉样蛋白球体抗体的表位, 通过从 N 末端开始每次 5 个残基地依次化学合成  $\beta$  淀粉样蛋白单体蛋白的部分序列, 得到顺次 38 个包含淀粉样蛋白  $\beta$  5 残基的部分序列肽 (以后在本实施例中简记为 A $\beta$ , 从 N 末端侧开始称为 A $\beta$  1-5、A $\beta$  2-6、A $\beta$  3-7、..... A $\beta$  38-42)。将 A $\beta$  通过 HPLC 精制成单峰, 然后每一定量地进行冷冻干燥, 保存在  $-20^{\circ}C$  下直至使用前。

[0206] 将上述各 A $\beta$  溶于经过灭菌的  $0.5 \times PBS(-)$  中, 制备 A $\beta$ -抗体混合溶液, 以使各 A $\beta$  与精制为 IgG 的各抗淀粉样蛋白球体抗体的比以摩尔比计为  $100 \sim 100$  万倍。将各 A $\beta$ -稀释液添加到实施例 3(1) 中制备的淀粉样蛋白球体 40 固相板上, 在  $4^{\circ}C$  下振荡过夜, 用  $0.01\%$  Tween 20-PBS(-) 溶液洗涤后, 添加稀释至  $1$  万分之  $1$  的结合有过氧化物酶的第二抗体 (多克隆抗体时为抗兔抗体、单克隆抗体时为抗小鼠抗体或抗仓鼠抗体), 振荡 1 小时。将其用  $0.01\%$  Tween 20-PBS(-) 溶液洗涤, 使用 TMB Substrate Kit (PIERCE 公司制) 进行显色。在停止显色后, 用酶标仪 (Benchmark ;BioRad 公司制) 测定  $450nm$  处的吸收, 得到结果。

[0207] 该结果示于图 3。由图可知, haASD2 和市售抗体的 82E1 (IBL 公司 (株式会社免疫生物研究所) 制) 受到  $\beta$  淀粉样蛋白单体蛋白的 N 末端的肽 (A $\beta$  1-5) 的很强的竞争抑制。另一方面, haASD1 和 haASD3 均不受淀粉样蛋白  $\beta$  5 残基部分序列肽 (即使将 A $\beta$  混合比提高到相对于抗体以摩尔比计为  $100$  万倍) 的竞争抑制。该结果明显启示, 与以往已知抗体所识别的表位不同, 本发明的抗淀粉样蛋白球体特异性抗体是识别 ASPD 的立体结构特异性表位的抗体。

[0208] 实施例 5 :淀粉样蛋白球体的细胞毒性的中和活性的评价

[0209] (1) 单克隆抗淀粉样蛋白球体抗体对淀粉样蛋白球体毒性的中和

[0210] 使用实施例 2 中得到的各单克隆抗淀粉样蛋白球体抗体来评价淀粉样蛋白球体毒性的中和活性。作为评价方法,使用大鼠海马原代培养神经细胞来进行。海马的原代培养基本上与 W02006/016644 的实施例 5 中记载的前脑基底的情况相同地进行制备,但培养密度按照  $1.0 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$  进行播种。淀粉样蛋白球体使用按照实施例 1 中记载的方法制备得到的淀粉样蛋白球体 42。其中,实验条件如下。

[0211] 淀粉样蛋白球体 42 的浓度 :1.25  $\mu\text{M}$

[0212] 暴露于淀粉样蛋白球体的时间 :45 小时

[0213] 细胞 :大鼠海马神经元

[0214] 用 PI 染色进行检测

[0215] 单克隆抗淀粉样蛋白球体抗体 haASD2 即使在海马原代培养神经细胞中也发挥中和淀粉样蛋白球体的神经毒性的效果。如图 4 所示,haASD2 对淀粉样蛋白球体的神经毒性显示浓度 (5 ~ 50  $\mu\text{g/ml}$ ) 依赖性的中和活性。

[0216] 实施例 6 :对淀粉样前体蛋白的反应性

[0217] (1) Western 印迹

[0218] 以作为阿尔茨海默病的模型动物的在脑内过量表达人型 APP (hAPP) 的 Tg2576 小鼠 (Science 1996 Oct 4 ;274(5284) :99-102) 的脑提取物为样品,进行 Western 印迹,检测 ASPD 抗体和 6E10 的反应性。具体而言,用 NuPAGE LDS Sample buffer 处理 Tg2576 小鼠 (15 个月龄) 的大脑皮质和海马的 TBS (Tris 缓冲液盐) 可溶性级分,将约 50  $\mu\text{g}$  的样品施于 NuPAGE Novex Bis-Tris Gel (4-12%) 中,进行电泳 (200V)。然后,转印 (30V, 60 分钟) 到硝酸纤维素膜上,将经转印的膜用含有 5% 脱脂乳 (skim milk) 的 TTBS (含有 0.05% Tween 20 的 TBS) 封闭 (室温下 2 小时)。接着,与用相同溶液稀释的各抗体 (1  $\mu\text{g/ml}$ ) 反应 (4°C 下过夜),洗涤后,用 HRP- 标记的第二抗体进行检测 (SuperFemto)。

[0219] 其结果,在 Tg2576 小鼠的样品中,6E10 与 A $\beta$  单体和 hAPP 反应 (图 5 中分别记作 A $\beta$  单体、APP 的带)、W02006/016644 记载的小鼠 ASPD 单克隆抗体 (mASD1、mASD2、mASD3) 不与 A $\beta$  单体反应,但与 hAPP 反应 (图 6 中箭头的带)。另一方面,本发明的仓鼠 ASPD 单克隆抗体不显示如在 6E10 和小鼠抗体中可见的对 A $\beta$  单体和 hAPP 的反应性 (图 7)。

[0220] (2) 竞争 ELISA

[0221] 在固相化了 ASPD 的 ELISA 板中,进行利用各 ASPD 抗体和 6E10 的竞争 ELISA。预先在另外的板中,使各抗体与 ASPD 或 sAPP  $\alpha$  (Sigma) 反应 (室温下 1 小时),将其添加到 ASPD 固相化板 (用 1% BSA 进行了封闭) 中。接着,在室温下反应 1 小时,洗涤后,用 HRP 标记的第二抗体进行检测。

[0222] 其结果如表 1 所示,6E10 和 W02006/016644 记载的小鼠 ASPD 单克隆抗体不仅对 ASPD ( $\text{IC}_{50} = 2.1 \sim 13\text{nM}$ ) 而且对 sAPP  $\alpha$  显示反应性 ( $\text{IC}_{50} = 9.6 \sim 33.8\text{nM}$ )。另一方面,仓鼠抗体对 ASPD 显示反应性 ( $\text{IC}_{50} = 3.2 \sim 6.4\text{nM}$ ),但对 sAPP  $\alpha$  不显示明显的反应性 ( $\text{IC}_{50} \geq 100\text{nM}$ )。从以上结果可知,本发明的抗体是与淀粉样蛋白球体发生特异性反应、不与 APP 发生显著反应的抗体,因此能够成为副作用小、安全性更高的优异的药品。

[0223] [表 2]

[0224]

抗体	竞争ELISA/IC <sub>50</sub> (nM)	
	ASPD	sAPP $\alpha$
mASD1	2.1	9.6
mASD2	13.0	33.8
mASD3	2.7	18.9
haASD1	4.0	>100
haASD2	4.5	>100
haASD3	6.4	>100
haASD4	4.4	>100
haASD5	3.2	>100
6E10	3.7	16.1

[0225] 实施例 7 :有关脏器特异性的试验

[0226] 评价抗体对正常人体组织的反应性。

[0227] 在使用了小鼠抗体的免疫染色中,丙酮固定人体组织冷冻切片后,使其与 DAKO 公司 Envision 试剂盒中的 Peroxidase blocking 溶液反应 5 分钟。并使其与含有 0.5% 酪蛋白、1% 牛血清白蛋白、1.5% 正常山羊血清、2% 正常人免疫球蛋白、1mg/mL 热改性人免疫球蛋白的蛋白质封闭溶液反应 20 分钟后,添加用含有 1% 牛血清白蛋白的 PBS 稀释到 2 或 10mg/mL 的浓度的抗体,使其在室温下反应 1 小时。使其与 DAKO 公司 Envision 试剂盒中的 Peroxidase labeled polymer 反应 30 分钟后,添加 DAKO 公司 Envision 试剂盒中的 DAB 溶液使其反应 8 分钟。在上述所有步骤结束后,在移至下一步骤前用 PBS 洗涤标本。免疫染色结束后,用自来水洗涤标本,用苏木精进行复染。

[0228] 在使用仓鼠抗体的免疫染色中,在 35°C 下向经丙酮固定的冷冻切片上添加葡萄糖氧化酶 (2U/mL)/ 葡萄糖 (10mM) 和叠氮化钠 (1mM) 1 小时,使内源性过氧化物酶失活。用抗生物素蛋白溶液在室温下封闭 15 分钟、再用生物素溶液在室温下封闭 15 分钟,然后使其与含有 0.5% 酪蛋白、1% 牛血清白蛋白、1.5% 正常山羊血清、5% 人免疫球蛋白、1mg/mL 热改性人免疫球蛋白的蛋白质封闭溶液在室温下反应 20 分钟。添加用含有 1% 牛血清白蛋白的 PBS 稀释至 2 或 10mg/mL 的仓鼠抗体,使其在室温下反应 1 小时,然后添加生物素标记山羊抗亚美尼亚仓鼠 IgG(H+L) 抗体,使其在室温下反应 30 分钟。进一步使其与 ABC Elite 试剂反应 30 分钟,其后与 DAB 溶液在室温下反应 4 分钟。

[0229] 检验的所有小鼠抗 ASPD 抗体和仓鼠抗 ASPD 抗体使阿尔茨海默患者大脑的冷冻切片中的老年斑样的结构物染色,即显示在阿尔茨海默病患者脑大脑中存在识别这些抗体的物质。

[0230] 对正常人小脑、脊髓、外周神经、心脏、肝脏、肾脏进行检验,结果很多小鼠抗淀粉样蛋白球体抗体使血管内或周围的蛋白样物质、正常脑组织的神经网络和神经细胞核、平滑肌、肌成纤维细胞、巨噬细胞、Kupffer 细胞等染色。

[0231] 仓鼠抗淀粉样蛋白球体抗体的一部分虽然使骨骼肌和心肌细胞染色,但与小鼠抗体相比,对正常人体组织的反应性较弱。haASD1 和 haASD2 几乎不使正常人体组织染色,特别是 haASD2,在各正常组织中均未见阳性表现。结果示于图 8 和表 3。

[0232] [表 3] 人体组织组中确认的免疫阳性反应的比较

[0233]

	mASD1	mASD3	haASD1	haASD2
阿尔茨海默病 (老年斑、神经元纤维变化)	+++	+++	+++	+++
小脑 (purkinje 细胞、胶质细胞)	+	±	±	-
心脏	+	-	±	-
肾脏	+	+	-	-
肝脏	++	±	-	-
外周神经	++	±	-	-
脊髓	++	++	+	-
血管 (内皮、血管内蛋白)	++	-	-	+

[0234] 从以上结果可知,与以往已知的小鼠单克隆抗淀粉样蛋白球体抗体相比,本发明的仓鼠单克隆抗淀粉样蛋白球体抗体是对人正常组织的交叉反应性低的阿尔茨海默病脑的特异性抗体。由此可以设想,以这些仓鼠抗体的特异性为基础的治疗用抗体能够成为不影响靶脏器以外的组织的副作用小的阿尔茨海默病治疗药。

[0235] 实施例 8 :利用免疫电子显微镜观察的抗体特异性的检验

[0236] 在生理溶剂环境中,使 ASPD 或纤维状的  $\beta$  淀粉样蛋白缔合体与  $10 \mu\text{g/ml}$  的仓鼠抗体 haASD1 反应。反应在  $1.5\text{ml}$  管或经碳蒸镀的 Formvar 栅格上直接进行。之后,使之与结合有  $6\text{nm}$  金胶体的第二抗体进一步反应,在用醋酸铀进行负染后,进行电子显微镜观察。

[0237] 如图 9 所示,仓鼠抗体不与纤维状的缔合体反应,而与淀粉样蛋白球体结合。

[0238] 实施例 9 :免疫组织化学分析

[0239] 使用 10 名阿尔茨海默病个体(年龄为  $80.4 \pm 9.2$  岁、脑重量为  $964 \pm 82\text{g}$ 、患病期间为  $10.1 \pm 5.5$  年)来源的、和 7 名作为对照的健康个体(年龄为  $71.3 \pm 15.2$  岁、脑重量为  $1226 \pm 96\text{g}$ )来源的、optimum cutting temperature compound 包埋的冷冻脑的冷冻切片或石蜡包埋的福尔马林固定脑的  $10 \mu\text{m}$  厚的切片,按照规定的方法进行免疫组织化学分析。作为识别淀粉样蛋白球体的抗体,使用小鼠单克隆抗体 mASD3、仓鼠单克隆抗体 haASD1、兔多克隆抗体 rpASD2。另外,作为抗  $\beta$  淀粉样蛋白抗体,使用识别  $\beta$  淀粉样蛋白(A $\beta$  1-42)的 C 末端的市售的抗  $\beta$  淀粉样蛋白抗体“IBL18582”(IBL 公司制)和识别 A $\beta$  8-17 的市售的抗  $\beta$  淀粉样蛋白单克隆抗体“6F/3D”(DAKO 公司制)。

[0240] 其结果,识别淀粉样蛋白球体的全部抗体(rpASD1、rpASD2、rpASD3、mASD3、haASD1)使阿尔茨海默病脑冷冻切片的位于额叶皮质、颞叶皮质、海马的斑块(老年斑、弥漫性老年斑)显著染色。由此显示,淀粉样蛋白球体样结构物原位(in situ)存在于斑块内。另外,这些抗体除了 haASD1 外,无论有无微波炉处理或甲酸处理,福尔马林固定石蜡切片脑的斑块都染色。另外,在同年龄的正常对照脑中,除个别斑块以外的结构体未被染色。另一方面,识别  $\beta$  淀粉样蛋白(A $\beta$  1-42)的 C 末端的市售的抗  $\beta$  淀粉样蛋白抗体“IBL18582”和识别 A $\beta$  8-17 的市售的抗  $\beta$  淀粉样蛋白单克隆抗体“6F/3D”在没有微波炉处理或甲酸处理的阿尔茨海默病脑的冷冻切片或石蜡切片中,几乎不使斑块染色。从以上结果可知,识别淀粉样蛋白球体的抗体特异性地识别淀粉样蛋白球体的结构,其中特别是 haASD1,其是更微细地识别立体结构的抗体。该结果与在实施例 8 的利用免疫电子显微镜观察的抗体特异性的检验中,淀粉样蛋白球体抗体不与纤维状的缔合体反应、而与淀粉样蛋白球体结合的结果一致。

[0241] 实施例 10 :人源化抗体的获得及其分析

[0242] (1) 人源化抗体的获得

[0243] 使用 QIAGEN 制 RNeasy mini kit(Cat.No. 74106),从实施例 2 中得到的产生仓鼠单克隆抗体的杂交瘤 haASD2 获得 RNA。以该 RNA 为模板,使用 GE Life Sciences 制 1st strand cDNA synthesis kit(Cat.No. 27-9261-01),合成 cDNA。关于轻链可变区,使用引物 haVK1 和 haCK 以及 Finnzymes 制 Phusion High-Fidelity PCR Master Mix(Cat.No. F-531S)对 cDNA 进行扩增,并将之与 Invitrogen 制 Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit(Cat.No. 450245)的 pCR-Blunt II-TOPO 载体连接。关于重链可变区,使用引物 haVHf 和 MHC3 以及 Clontech 制 AdvantageR-HF 2 PCR Kit(Cat.No. 639123)对 cDNA 进行扩增,并将之与 Invitrogen 制 TOPO-TA cloning kit(Cat.No. 450641)的 pCR2.1-TOPO 载体连接。将它们导入大肠杆菌感受态细胞 Invitrogen 制 TOP10(Cat.No. 404003)后,委托 GATC Biotech 公司对具有目标大小的插入 DNA(VH:约 730bp、VL:约 850bp)的克隆进行碱基序列分析,从而确定 DNA 序列。

[0244] [表 4] 用于克隆仓鼠 VL 的 PCR 引物

[0245]

名称	序列 (5' → 3')
haVK1	ATGGCTTGACTCCTGGC(序列号 19)
haCK	GTCTCACCCATCATTGATAG(序列号 20)

[0246] [表 5] 用于克隆仓鼠 VH 的 PCR 引物

[0247]

名称	序列 (5' → 3')
haVHf	ATGGGGTTGGGGCTGCACTGGG(序列号 21)
MHCG3	CAAGGGATAGACAGATGGGGC(序列号 22)

[0248] 按照 Kabat 等的方法确定仓鼠抗体的轻链和重链可变区中的互补决定区 (CDRs) (“Sequences of Proteins of Immunological Interest”, Kabat, E., et al., US Department of Health and Human Services, (1983)), 并按照日本专利第 2912618 号公报中记载的 Winter 的方法, 将仓鼠抗体 haASD2 人源化。其结果, 得到 2 种人源化抗体, 分别将其命名为 RHA/RLA (以后有时也将其称为 huASD2) 和 RHB/RLB。

[0249] 制备导入了人源化抗体 huASD2 的重链 cDNA 的表达质粒, 将其命名为 ASD2RHApG1D200。另外, 制备导入了人源化抗体 RHA/RLA 的轻链 cDNA 的表达质粒, 将其命名为 ASD2RLApLN100。ASD2RHApG1D200 的接收编号为 FERM ABP-11040 (保藏编号: FERM BP-11040)、ASD2RLApLN100 的接收编号为 FERM ABP-11041 (保藏编号: FERMBP-11041), 二者已于 2008 年 10 月 17 日保藏于日本独立行政法人产业技术综合研究所专利生物保藏中心 (日本国茨城县つくば市東一丁目 1 番地 1 中央第 6 (郵便番号 305-8566))。

[0250] 人源化抗体 huASD2 可以通过将 ASD2RHApG1D200 和 ASD2RLApLN100 共转染给公知的动物细胞 (例如 CHO、NS0、HEK293、COS 等) 并使之表达而得到。作为一个例子, 有利用使用了 Invitrogen 制 FREESTYLE MAX 293 EXP SYSTEM (Cat. No. K9000-10) 的 HEK293 的瞬时表达。

[0251] 序列表的序列号 4 和 5 以及图 10 表示人源化抗体 huASD2 的重链可变区的 DNA 和氨基酸序列。图 10 中示出了 CDR1、2、3 各自的位置。

[0252] 序列表的序列号 6 和 7 以及图 11 表示人源化抗体 huASD2 的轻链可变区的 DNA 和氨基酸序列。图 11 中示出了 CDR1、2、3 各自的位置。

[0253] 人源化抗体 RHB/RLB 也与人源化抗体 huASD2 同样, 可以如下得到: 制备分别表达重链和轻链的质粒, 将它们共转染给动物细胞, 然后使之表达而得到。

[0254] 序列表的序列号 8 和图 12 表示人源化抗体 RHB/RLB 的重链可变区的氨基酸序列。图 12 中示出了 CDR1、2、3 各自的位置。

[0255] 序列表的序列号 9 和图 13 表示人源化抗体 RHB/RLB 的轻链可变区的氨基酸序列。图 13 中示出了 CDR1、2、3 各自的位置。

[0256] 此外, 通过改变人源化抗体 huASD2 可以得到人源化抗体 RHC/RLC。人源化抗体 RHC/RLC 的重链可变区的氨基酸序列与人源化抗体 huASD2 的重链可变区相同。人源化抗体 RHC/RLC 的轻链可变区的氨基酸序列如序列表的序列号 10 和图 14 所示。

[0257] (2) 人源化抗体的分析

[0258] 对人源化抗体 huASD2、RHB/RLB 和 RHC/RLC 的重链可变区和轻链可变区氨基酸序列进行比较的图为图 15。图中, 将人源化抗体 huASD2 的重链可变区序列记为 ASD2RHA、将轻

链可变区序列记为 ASD2RLA、将人源化抗体 RHB/RLB 的重链可变区序列记为 ASD2RHB、将轻链可变区序列记为 ASD2RLB、以及将人源化抗体 RHC/RLC 的轻链可变区序列记为 ASD2RLC。由于人源化抗体 RHC/RLC 的重链可变区的氨基酸序列与人源化抗体 huASD2 的重链可变区氨基酸序列（图 15 的 ASD2RHA）相同，因此在图 15 中省略了。

[0259] 图 15 中，通过将人源化抗体 huASD2 的重链可变区中的氨基酸编号第 49 位 (G)、第 81 位 (L) 和第 100 位 (T) 分别替换成 A、V 和 R，能够制成人源化抗体 RHB/RLB 重链可变区。另外，通过将人源化抗体 huASD2 的轻链可变区中的氨基酸编号第 48 位 (Y)、第 49 位 (L)、第 51 位 (K)、第 74 位 (A) 和第 79 位 (G) 分别替换成 F、F、F、T 和 A，能够制成人源化抗体 RHB/RLB 的轻链可变区。

[0260] 在图 15 所示的氨基酸残基中，对于除人源化抗体 huASD2 的重链可变区 (ASD2RHA) 和轻链可变区 (ASD2RLA) 的 CDRs 以外的序列，按照日本专利第 2912618 号公报中记载的 Winter 的方法，通过 Medical Research Council 公司（以下称为 MRCT）的分析判断其在结构上是重要的，通过对它们进行替换，能够更有效地修饰 / 改变 huASD2 的性状。具体而言，在人源化抗体 huASD2 与仓鼠抗体 haASD2 中，当存在功能上的差异时，可以期待通过将它们中的一个位置或几个位置或者全部回复到原始的仓鼠抗体 haASD2 的序列（回复突变）来缩小或消除该差异。作为一个例子，可列举出序列 RHB/RLB（序列号 8 和 9、图 15 的 ASD2RHB 和 ASD2RLB）。不过，从人源化的目的即降低对具有异种优势抗体 (heterologous leadantibody) 的人的免疫原性的视角出发，这里所述的氨基酸替换并不是优选的操作，如果没有提高对免疫原性的影响的效果，则没有必要实施。

[0261] 另一方面，当将用于设计 huASD2 的可变区框架的人抗体 AB021517 (GenBank 编号) 和 AJ241418 (GenBank 编号) 的序列分别与来源基因组序列（各 V 链段、J 链段）进行比较时，可见轻链（序列号 6 和 7）的超突变。超突变是在抗体的抗原特异性成熟过程中可见的突变，其发生在反映个人的遗传背景的免疫学环境中。因此，若遗传背景不同，则可能显示免疫原性，这被认为是见于完全人抗体 Humira 中的预料外的免疫原性的一个因素。

[0262] 作为避免其发生的手段，考虑将发生超突变的氨基酸残基回复为人共通的基因组序列。具体而言，在可容许的对抗体性状的影响的范围内，将 huASD2 轻链可变区（图 15 的 ASD2RLA）的超突变氨基酸残基 3 个（序列号 7 的氨基酸第 2 位 (S)、第 8 位 (S) 和第 51 位 (K)）中 1 个位置或 2 个位置或者全部位置分别替换为各自的基因组序列即 A、A 和 R（序列号 10、图 15 的 ASD2RLC）。

[0263] 实施例 11：人源化抗体的性状分析

[0264] (1) 解离常数测定

[0265] 按照与实施例 3(3) 同样的顺序，将 42ASPD、40A $\beta$  (A $\beta$  单体) 和由 42A $\beta$  制备的 A $\beta$  纤维 (42fibril) 耦合到 CM5 传感器芯片上，测定对仓鼠抗体 haASD2、人源化抗体 huASD2 和抗 A $\beta$  抗体 3D6 (US20030165496A1) 对上述蛋白质的解离常数。抗 A $\beta$  抗体 3D6 用已知的方法制备与 US20030165496A1 中记载的小鼠抗体轻链可变区 3d6v1.aa 和其重链可变区 3d6vh.aa 对应的合成基因，基于该专利的信息，分别与已知的小鼠抗体的轻链恒定区和重链恒定区连接，制成小鼠 IgG2b/ $\kappa$  分子。

[0266] 其结果示于表 6。人源化抗体 huASD2 显示对 ASPD 的强的亲和性 ( $K_d$  1.8 $\times 10^{-10}$ M)，且其亲和性与  $\beta$  淀粉样蛋白单体相比高约 580 倍、与淀粉样蛋白纤维相比高约 6.4 倍。另

一方面,抗 A $\beta$  抗体 3D6 对 ASPD 的亲合性与  $\beta$  淀粉样蛋白单体相比高约 34 倍、与淀粉样蛋白纤维相比高约 2.0 倍高。即显示,这次我们得到的人源化抗体 huASD2 比公知的 A $\beta$  抗体 3D6 对 ASPD 的选择性高。即,本发明的人源化抗体 huASD2 由于对脑血管中沉积的 A $\beta$  40 的结合低,因此可期待脑微小血管出血的副作用小。

[0267] [表 6] 各种抗体的解离常数

[0268]

抗体	亲和性, Kd (nM)		
	42ASPD	40A $\beta$	42fibril
haASD2	0.0989	13.2	0.187
huASD2	0.180	105	1.15
3D6	0.115	3.93	0.231

[0269] (2) 人源化抗体 huASD2 的抗原决定部位(表位)的确定

[0270] 使用与实施例 4 同样的方法,研究人源化抗体 huASD2 与哪个 A $\beta$  5 残基肽结合。从其结果可知,人源化抗体 huASD2 与仓鼠抗体 haASD2 同样地受到  $\beta$  淀粉样蛋白单体蛋白的 N 末端的肽(A $\beta$  1-5)的强的竞争抑制。

[0271] 实施例 12:人源化抗体 RHA/RLA 的细胞毒性的中和活性的评价

[0272] 从妊娠 17 日龄的大鼠(SD、日本 Charles River)中取出胎鼠,然后从其脑中摘出海马。与 W02006/016644 的实施例 5 的记载同样地制备海马原代培养神经细胞。具体而言,将海马神经细胞用神经细胞培养液(SUMILON)培养(37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>)5 天。对于 ASPD,使用按照公知方法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100, 6370-6375 (2003))得到的 ASPD、将其称为 DF-ASPD。将 DF-ASPD(0.35  $\mu$ M)与 haASD2 或 huASD2(7.5、25 和 75  $\mu$ g/ml)一起在室温下孵育 2 时间,然后将其直接添加到培养液中,培养 24 和 45 小时。作为对照,使用不含抗体的 PBS(-)。其后,通过 cell death ELISA(Rosch)和碘化吡啶(PI)染色,检测神经细胞死亡。

[0273] 将利用凋亡的检测系统即 cell death ELISA 评价 haASD2 和 huASD2 对 DF-ASPD 导致的神经细胞死亡的中和活性的结果示于图 16。图 16 中, F12 为不含 DF-ASPD 的对照。通过添加 DF-ASPD, OD(405-492nm) 值增加,确认存在凋亡诱导(DF-ASPD(0.35  $\mu$ M)、PBS(-)的柱)。与此相对,仓鼠抗体 haASD2 的人源化抗体 huASD2 添加组显示 OD 值显著地降低(DF-ASPD(0.35  $\mu$ M)、huASD2(7.5、25 和 75)的柱)、由 DF-ASPD 诱导的神经细胞死亡的抑制效果高。

[0274] 接着,将通过使用 PI 染色检测细胞死亡来评价 haASD2 和 huASD2 抗体(25  $\mu$ g/ml)对 DF-ASPD 导致的神经细胞死亡的中和活性的结果示于图 17。细胞死亡的检测通过测量每个视野的 PI 阳性细胞数来进行。与图 16 同样, F12 为不含 DF-ASPD 的对照, PBS(-) 为不含抗体的对照。通过添加 DF-ASPD(0.35  $\mu$ M), PI 阳性细胞显著地增加,确认存在细胞死亡的诱导(DF-ASPD(0.35  $\mu$ M)、PBS(-)的柱)。与此相对, haASD2 和 huASD2 显示对 PI 阳性细胞数的显著的抑制作用,由 DF-ASPD 诱导的细胞死亡所导致的神经细胞死亡的抑制效果高。

[0275] 本发明的抗体对淀粉样前体蛋白的反应性低、且对淀粉样蛋白球体的反应性比对  $\beta$  淀粉样蛋白纤维或  $\beta$  淀粉样蛋白单体蛋白的反应性高,并具有抑制淀粉样蛋白球体对神经细胞死亡的诱导的活性。淀粉样蛋白球体由于与阿尔茨海默病患者的脑内存在的  $\beta$

淀粉样蛋白同等的浓度诱导神经细胞死亡,因此只要获得(1)具有抑制淀粉样蛋白球体形成的活性的抗体、或(2)具有抑制淀粉样蛋白球体对神经细胞死亡的诱导的活性的抗体,则能够用作阿尔茨海默病的治疗或者预防药。另外,只要获得(3)对淀粉样蛋白球体的反应性比对 $\beta$ 淀粉样蛋白单体蛋白或 $\beta$ 淀粉样蛋白纤维的反应性高的抗体,则还可应用于阿尔茨海默病个体的检测。本发明的抗体由于对淀粉样前体蛋白的反应性低、而对脑的特异性高,因此与以往已知的抗淀粉样蛋白球体抗体相比,能够成为安全性更高的阿尔茨海默病的治疗药。

## 序列表

<110> 三菱化学株式会社

<110> 田边三菱制药株式会社

<120> 抗体及其应用

<130>A81495A

<160>22

<210>1

<211>40

<212>PRT

<213>Human

<400>1

```

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>2

<211>42

<212>PRT

<213>Human

<400>2

```

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>3

<211>43

<212>PRT

<213>Human

<400>3

```

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		
<p>&lt;210&gt;4          &lt;211&gt;360          &lt;212&gt;DNA          &lt;213&gt;Artificial Sequence          &lt;220&gt;          &lt;223&gt;Description of Artificial Sequence :humanized antibody          &lt;220&gt;          &lt;221&gt;CDS          &lt;222&gt;(1)..(360)          &lt;223&gt;          &lt;400&gt;4</p>				
gaa gtg cag ctg gtc gag tct ggc ggc gga ctc gtg aag cct ggc ggc				48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly				
1	5	10	15	
tcc ctg cgg ctg tcc tgc gcc gcc tcc ggc ttt acc ttc tcc gac tac				96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr				
	20	25	30	
ttc atg tcc tgg gtg cgg cag gct cct ggc aag ggc ctg gaa tgg gtc				144
Phe Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val				
	35	40	45	
ggg ggg atc gag atc aag tcc tacttc tac gcc acc tac tac ttc ggc				192
Gly Gly Ile Glu Ile Lys Ser Tyr Phe Tyr Ala Thr Tyr Tyr Phe Gly				
	50	55	60	
tcc gtg aag ggc cgg ttc acc atc tcc cgg gac gac tcc aag aac acc				240
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr				
65	70	75	80	
ctg tac ctg cag atg aac tcc ctg aaa acc gag gac acc gcc gtg tac				288
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr				
	85	90	95	
tac tgc acc acc aac cgg gaa gtg ggg ggc ctg gac aac tgg ggc cag				336
Tyr Cys Thr Thr Asn Arg Glu Val Gly Gly Leu Asp Asn Trp Gly Gln				
	100	105	110	
ggc acc ctg gtg acc gtg tcc tcc				360
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser				
	115	120		

<210>5

<211>120

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Description of Artificial Sequence :humanized antibody

<400>5

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

<210>6

<211>351

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Description of Artificial Sequence :humanized antibody

<220>

<221>CDS

<222>(1)..(351)

<223>

<400>6

cag	tcc	gtg	ctg	acc	cag	cct	tcc	tcc	ctg	tcc	gcc	tcc	cct	ggc	gcc
1				5					10					15	
Gln	Ser	Val	Leu	Thr	Gln	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly	Ala

48

tcc gcc tcc ctg acc tgc acc ctg cgg tcc ggc atc tcc gtg ggc ggc	96
Ser Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu Arg Ser Gly Ile Ser Val Gly Gly	
20 25 30	
aag aac atc tac tgg tat cag cag aag cct ggc tcc cct cct cag tac	144
Lys Asn Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Pro Pro Gln Tyr	
35 40 45	
ctg ctg aag tac tcc tcc tac tcc aac aag cag ctg gga cct ggc gtg	192
Leu Leu Lys Tyr Ser Ser Tyr Ser Asn Lys Gln Leu Gly Pro Gly Val	
50 55 60	
cct tcc cgg ttc tcc ggc tcc aag gac gcc agc gcc aac gcc ggc atc	240
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Asp Ala Ser Ala Asn Ala Gly Ile	
65 70 75 80	
ctg ctg atc tct gga ctg cag agc gag gac gag gcc gac tac tac tgc	288
Leu Leu Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
tcc atc cac gag tcc aac gcc tac gtg ttt ggc ggc gga aca aag ctg	336
Ser Ile His Glu Ser Asn Ala Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu	
100 105 110	
aca gtc ctg ggc cgg	351
Thr Val Leu Gly Arg	
115	

<210>7

<211>117

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Description of Artificial Sequence :humanized antibody

<400>7

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



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

<210>10

<211>116

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Description of Artificial Sequence :humanized antibody

<400>10

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

<210>11

<211>5

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Description of Artificial Sequence :recombinant antibody

<400>11

Asp Tyr Phe Met Ser

1                      5

<210>12

<211>19

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Description of Artificial Sequence :recombinant antibody

<400>12

Gly Ile Glu Ile Lys Ser Tyr Phe Tyr Ala Thr Tyr Tyr Phe Gly Ser Val Lys Gly

1                      5                      10                      15

<210>13

<211>9

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Description of Artificial Sequence :recombinant antibody

<400>13

Asn Arg Glu Val Gly Gly Leu Asp Asn

1                      5

<210>14

<211>14

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Description of Artificial Sequence :recombinant antibody

<400>14

Thr Leu Arg Ser Gly Ile Ser Val Gly Gly Lys Asn Ile Tyr

1	5	10
<p>&lt;210&gt;15          &lt;211&gt;11          &lt;212&gt;PRT          &lt;213&gt;Artificial Sequence          &lt;220&gt;          &lt;223&gt;Description of Artificial Sequence :recombinant antibody          &lt;400&gt;15          Tyr Ser Ser Tyr Ser Asn Lys Gln Leu Gly Pro          1                    5                    10</p>		
<p>&lt;210&gt;16          &lt;211&gt;9          &lt;212&gt;PRT          &lt;213&gt;Artificial Sequence          &lt;220&gt;          &lt;223&gt;Description of Artificial Sequence :recombinant antibody          &lt;400&gt;16          Ser Ile His Glu Ser Asn Ala Tyr Val          1                    5</p>		
<p>&lt;210&gt;17          &lt;211&gt;120          &lt;212&gt;PRT          &lt;213&gt;Artificial Sequence          &lt;220&gt;          &lt;223&gt;Description of Artificial Sequence :recombinant antibody          &lt;220&gt;          &lt;222&gt;(49)          &lt;223&gt;Gly or Ala          &lt;220&gt;          &lt;222&gt;(81)          &lt;223&gt;Leu or Val          &lt;220&gt;          &lt;222&gt;(100)          &lt;223&gt;Thr or Arg          &lt;400&gt;17          Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly          1                    5                    10                    15</p>		

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

<210>18

<211>116

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Description of Artificial Sequence :recombinant antibody

<220>

<222>(2)

<223>Ser or Ala

<220>

<222>(8)

<223>Ser or Ala

<220>

<222>(48)

<223>Tyr or Phe

<220>

<222>(49)

<223>Leu or Phe

<220>

<222>(51)

<223>Lys, Phe or Arg

<220>

<222>(74)

<223>Ala or Thr

<220>

<222>(79)

<223>Gly or Ala

<400>18

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

<210>19

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Description of Artificial Sequence :Synthetic DNA

<400>19

atggcttgga ctcttggc                    18

<210>20

<211>22

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Description of Artificial Sequence :Synthetic DNA

<400>20

gtcttcaccc catcattgat ag                    22

---

<210>21	
<211>22	
<212>DNA	
<213>Artificial Sequence	
<220>	
<223>Description of Artificial Sequence ;Synthetic DNA	
<400>21	
atggggttgg ggctgcactg gg	22
<210>22	
<211>21	
<212>DNA	
<213>Artificial Sequence	
<220>	
<223>Description of Artificial Sequence ;Synthetic DNA	
<400>22	
caagggatag acagatgggg c	21

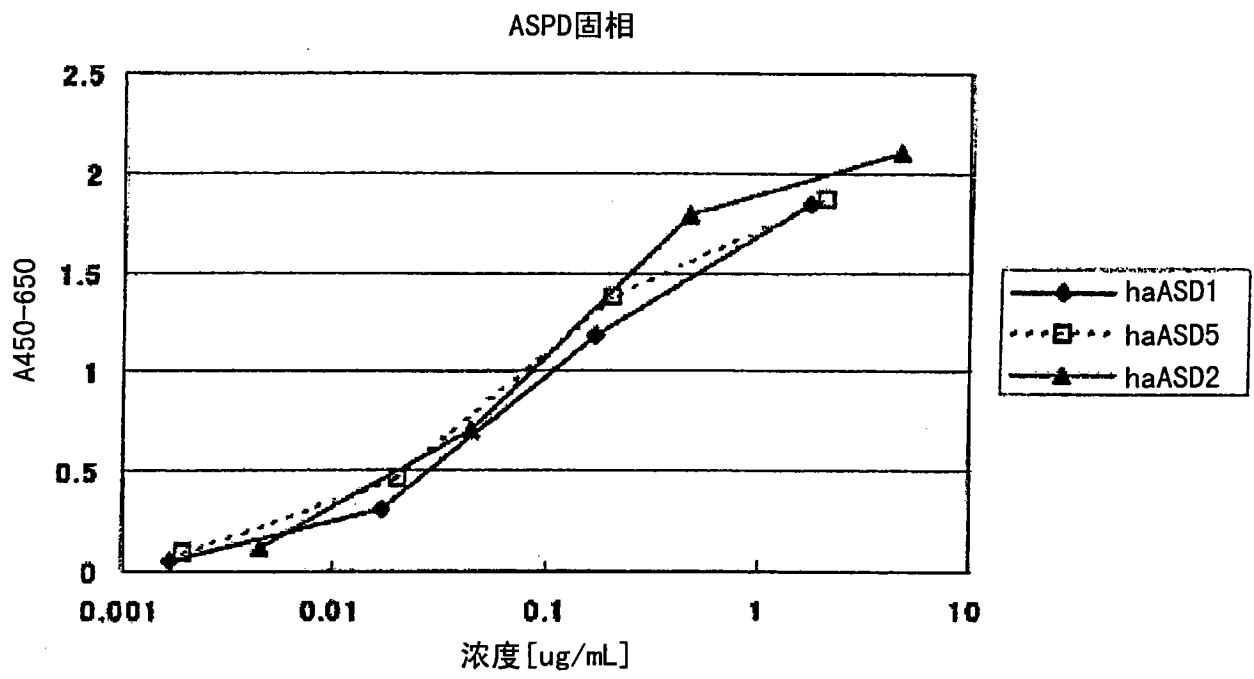


图 1

a

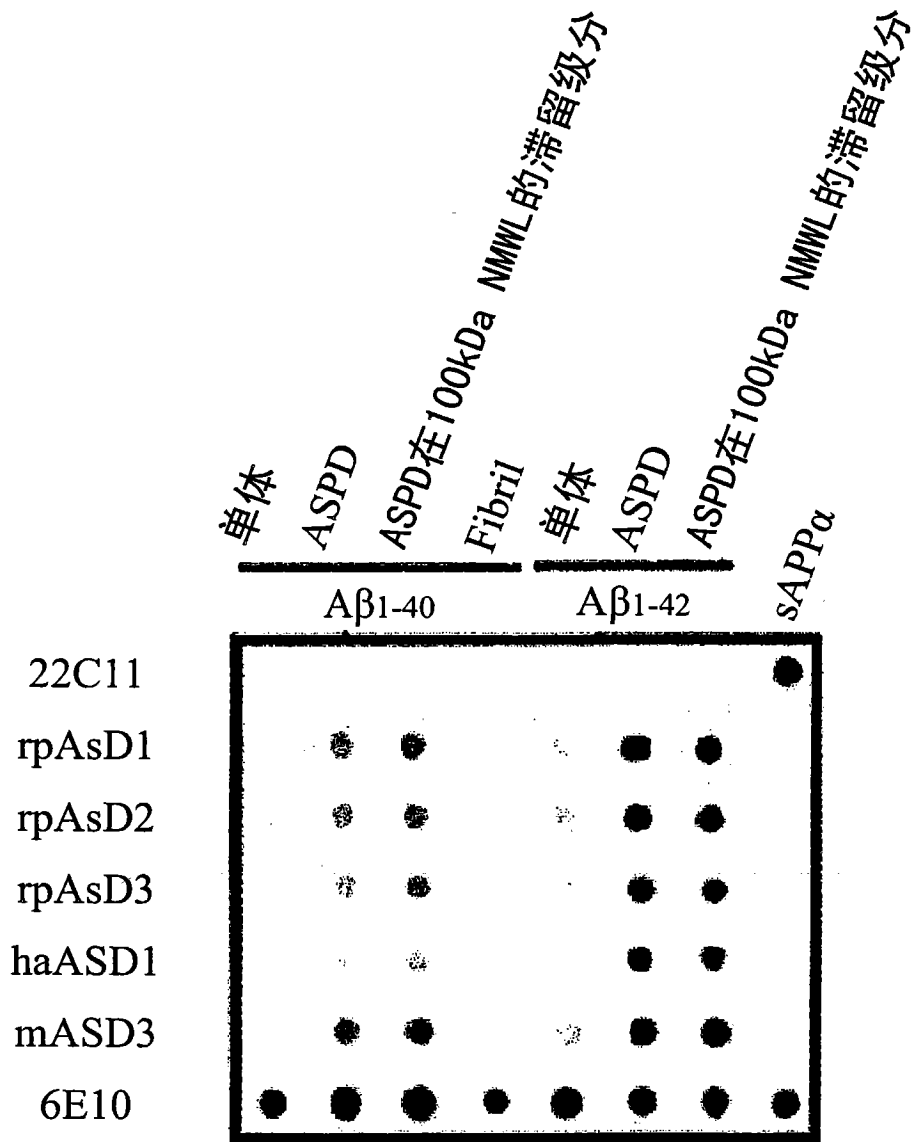


图 2

表型分析

	ASD抗体			N-末端 抗体 (82E1)
	haASD1	haASD2	haASD3	
Aβ1-5	ND	++++	ND	++++
Aβ2-6	ND	ND	ND	ND
Aβ3-7	ND	ND	ND	ND
Aβ4-8	ND	ND	ND	ND
Aβ5-9	ND	ND	ND	ND
Aβ6-10	ND	ND	ND	ND
Aβ7-11	ND	ND	ND	ND
Aβ8-12	ND	ND	ND	ND
Aβ9-13	ND	ND	ND	ND
Aβ10-14	ND	ND	ND	ND
Aβ11-15	ND	ND	ND	ND
Aβ12-16	ND	ND	ND	ND
Aβ13-17	ND	ND	ND	ND
Aβ14-18	ND	ND	ND	ND
Aβ15-19	ND	ND	ND	ND
Aβ16-20	ND	ND	ND	ND
Aβ17-21 <sup>a</sup>				
Aβ18-22 <sup>a</sup>				
Aβ18-23	ND	ND	ND	ND
Aβ20-24	ND	ND	ND	ND
Aβ21-25	ND	ND	ND	ND
Aβ22-26	ND	ND	ND	ND
Aβ23-27	ND	ND	ND	ND
Aβ24-28	ND	ND	ND	ND
Aβ25-29	ND	ND	ND	ND
Aβ26-30	ND	ND	ND	ND
Aβ27-31	ND	ND	ND	ND
Aβ28-32	ND	ND	ND	ND
Aβ29-33	ND	ND	ND	ND
Aβ30-34	ND	ND	ND	ND
Aβ31-35	ND	ND	ND	ND
Aβ32-36	ND	ND	ND	ND
Aβ33-37	ND	ND	ND	ND
Aβ34-38	ND	ND	ND	ND
Aβ35-39	ND	ND	ND	ND
Aβ36-40	ND	ND	ND	ND
Aβ37-41	ND	ND	ND	ND
Aβ38-42	ND	ND	ND	ND

符号表示: ++++: 超过75%;  
 +++: 50-75%; ++: 25-50%; +: 低于25%  
 ND: 未检测到  
 a: 未检测

图 3

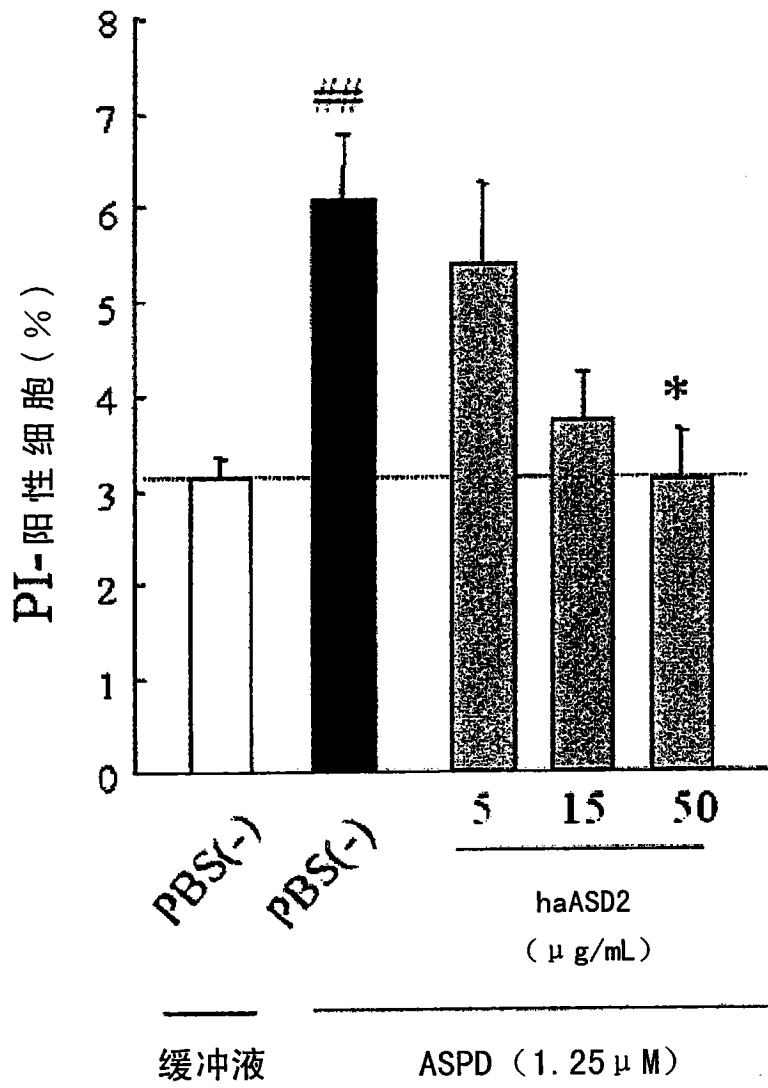


图 4

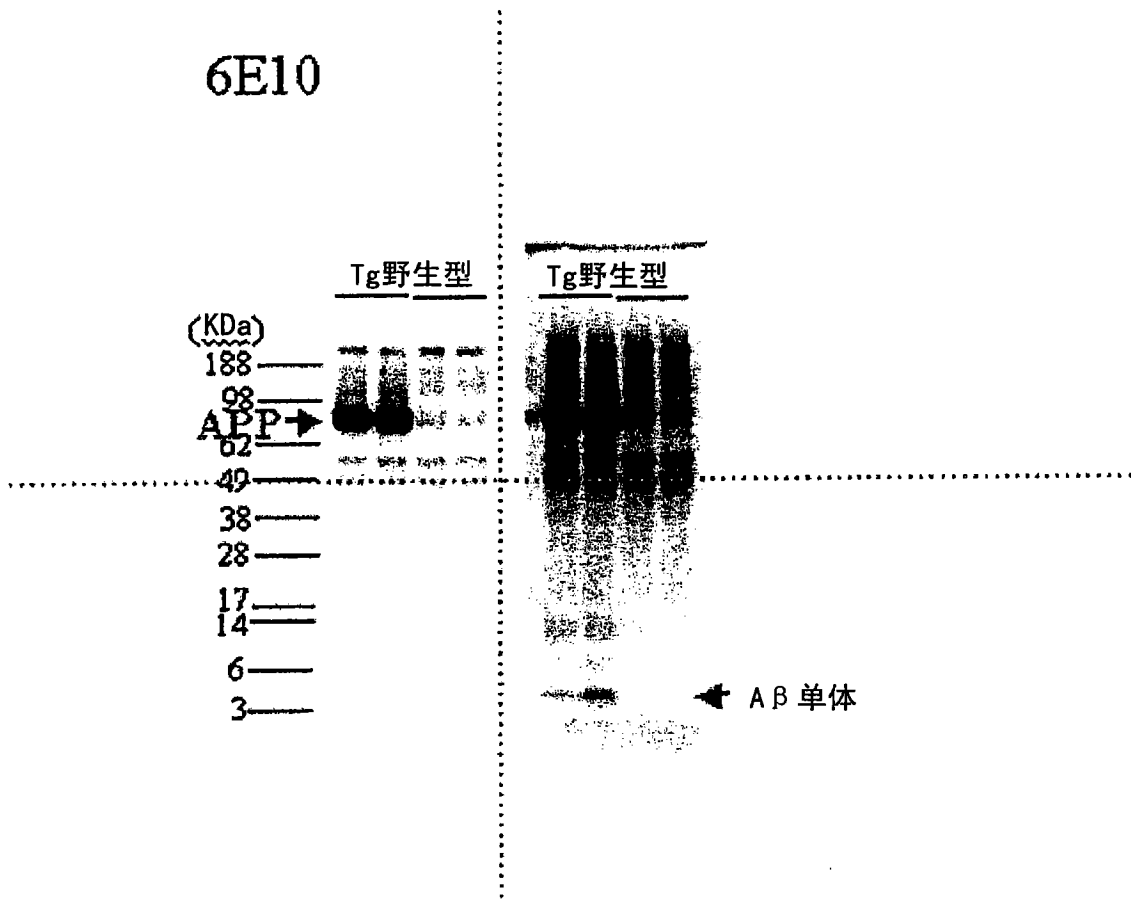


图 5

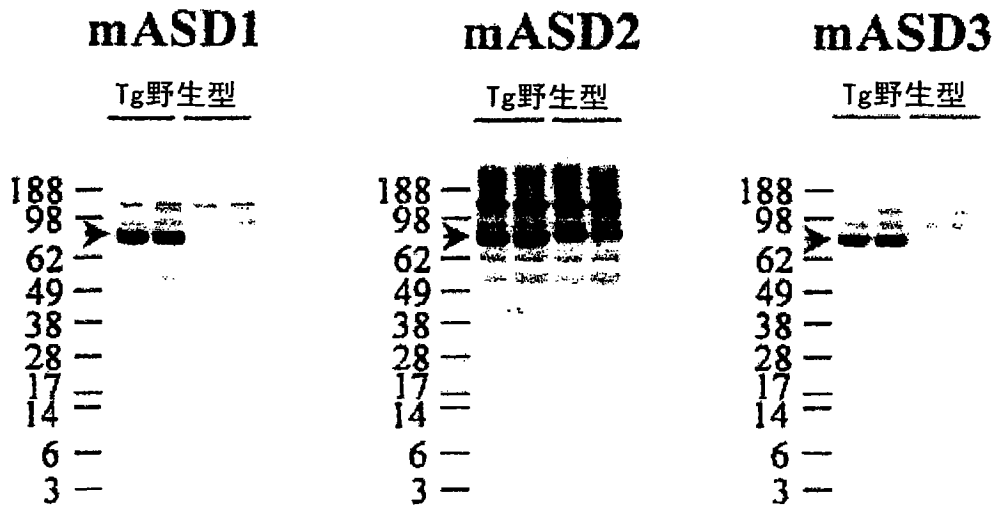


图 6

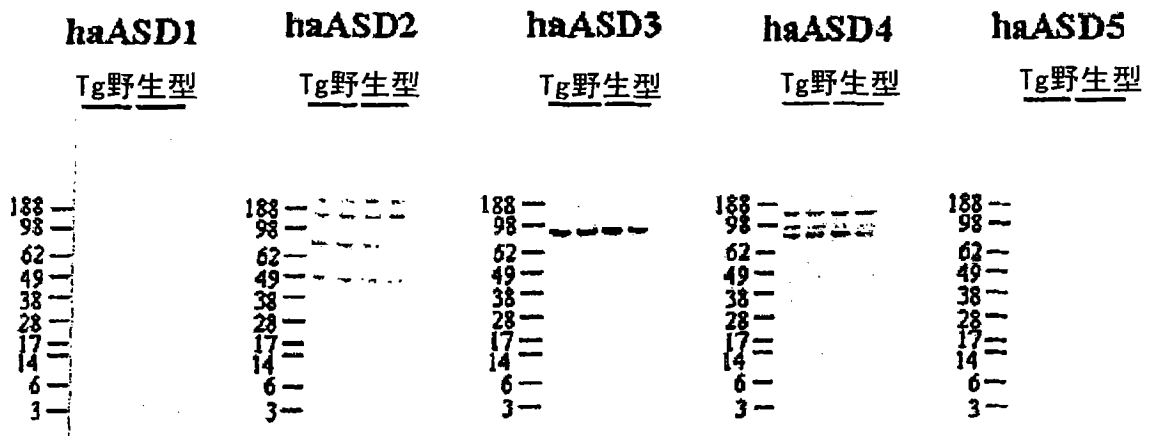


图 7

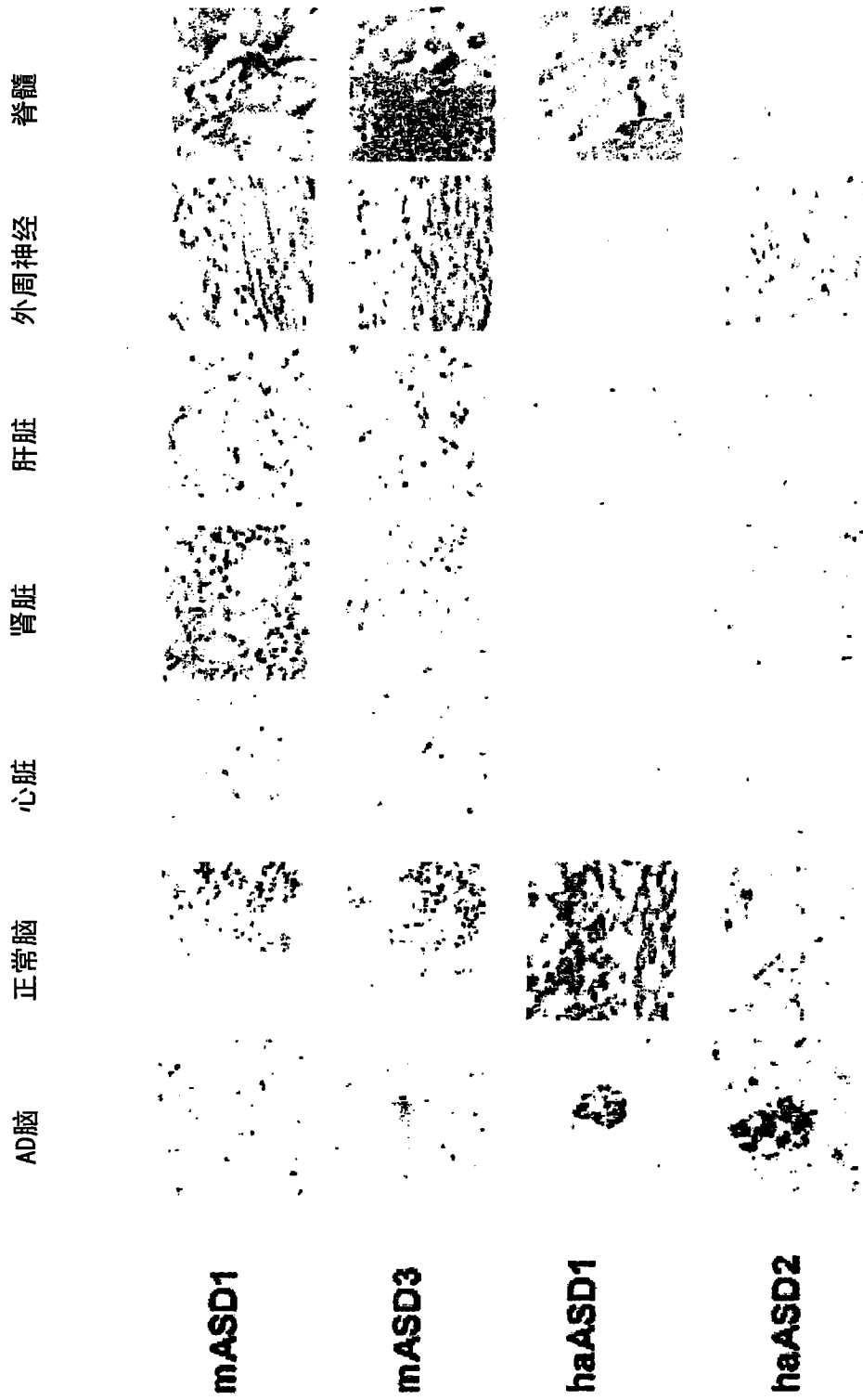


图 8

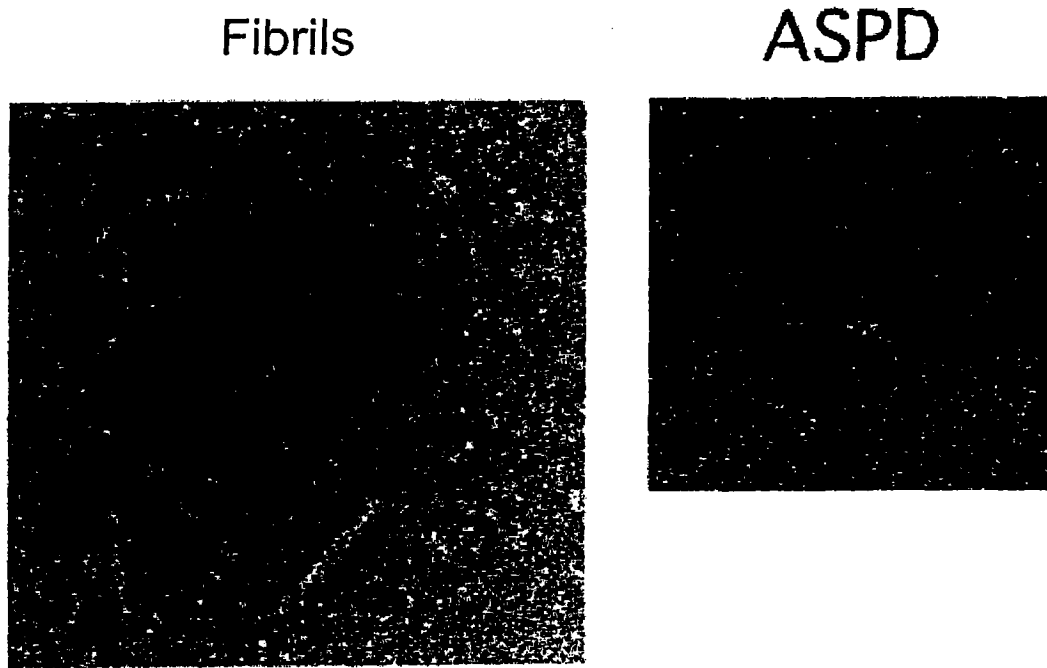


图 9

```

      10      20      30      40      50      60
GAAGTGCAGCTGGTTCGAGTCTGGCGGGCGGACTCGTGAAGCCTGGCGGGCTCCCTGCGGCTG
E V Q L V E S G G G L V K P G G S L R L

                        =====CDR1=====
      70      80      90      100     110     120
TCCTGCGCCGCCTCCGGCTTTACCTTCTCCGACTACTTCATGTCCTGGGTGCGGCAGGCT
S C A A S G F T F S D Y F M S W V R Q A

                        =====CDR2=====
      130     140     150     160     170     180
CCTGGCAAGGGCCTGGAATGGGTGGGGGGATCGAGATCAAGTCCTACTTCTACGCCACC
P G K G L E W V G G I E I K S Y F Y A T

=====
      190     200     210     220     230     240
TACTACTTCGGCTCCGTGAAGGGCCGGTTCCACCATCTCCCGGGACGACTCCAAGAACACC
Y Y F G S V K G R F T I S R D D S K N T

      250     260     270     280     290     300
CTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAAAACCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCACCACC
L Y L Q M N S L K T E D T A V Y Y C T T

=====CDR3=====
      310     320     330     340     350     360
AACCGGGAAGTGGGGGGCCTGGACAACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGTCTCC
N R E V G G L D N W G Q G T L V T V S S

```

图 10

```

      10      20      30      40      50      60
CAGTCCGTGCTGACCCAGCCTTCCTCCCTGTCCGCCTCCCCTGGCGCCTCCGCCTCCCTG
Q S V L T Q P S S L S A S P G A S A S L

=====CDR1=====
      70      80      90      100     110     120
ACCTGCACCCTGCGGTCCGGCATCTCCGTGGGCGGCAAGAACATCTACTGGTATCAGCAG
T C T L R S G I S V G G K N I Y W Y Q Q

=====CDR2=====
      130     140     150     160     170     180
AAGCCTGGCTCCCCTCCTCAGTACCTGCTGAAGTACTCCTCCTACTCCAACAAGCAGCTG
K P G S P P Q Y L L K Y S S Y S N K Q L

=====
      190     200     210     220     230     240
GGACCTGGCGTGCCTTCCCGGTTCTCCGGCTCCAAGGACGCCAGCGCCAACGCCGGCATC
G P G V P S R F S G S K D A S A N A G I

=====
      250     260     270     280     290     300
CTGCTGATCTCTGGACTGCAGAGCGAGGACGAGGCCGACTACTACTGCTCCATCCACGAG
L L I S G L Q S E D E A D Y Y C S I H E

CDR3=====
      310     320     330     340     350     360
TCCAACGCCTACGTGTTTGGCGGCGGAACAAAGCTGACAGTCCTGGGCCGG
S N A Y V F G G G T K L T V L G R

```

图 11

```

                                CDR1=                                =====CDR2=
      10      20      30      40      50      60
EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS DYFMSWVRQA PGKGLEWVAG IEIKSYFYAT

=====
                                ==CDR3==
      70      80      90      100     110     120
YYFGSVKGRF TISRDDSKNT VYLMNSLKT EDTAVYYCTR NREVGGLDNW GQGTLTVSS

```

图 12

```

          =====CDR1=====          ==CDR2==
      10      20      30      40      50      60
QSVLTQPSSL SASPGASASL TCTLRSGISV GGKNYIYWYQQ KPGSPPQFFL FYSSYSNKQL

==
          ==CDR3==
      70      80      90      100      110      120
GPGVPSRFSG SKDTSANAAI LLISGLQSED EADYYCSIHE SNAYVFGGGT KLTVLG

```

图 13

```

          =====CDR1=====          ==CDR2==
      10      20      30      40      50      60
QAVLTQPASL SASPGASASL TCTLRSGISV GGKNYIYWYQQ KPGSPPQYLL RYSSYSNKQL

==
          ==CDR3==
      70      80      90      100      110      120
GPGVPSRFSG SKDASANAGI LLISGLQSED EADYYCSIHE SNAYVFGGGT KLTVLG

```

图 14

A. 重链可变区

	CDR1	CDR2	CDR3
ASD2RHA	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYELKSLWVRQAPGKGLIEWGQDLESLYAFVFGSFKGRFTISRDTSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTRREGGIDNHWGGGTLVTSS		
ASD2RHB	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYELKSLWVRQAPGKGLIEWAGDLESLYAFVFGSFKGRFTISRDTSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTRREGGIDNHWGGGTLVTSS		
ASD2RHC	*与ASD2RHA相同		

B. 轻链可变区

	CDR1	CDR2	CDR3
ASD2RLA	QSVLTQFSS-LSASPGASASLTCTHRSGLSYGGKNIWYDQKPGSPPQYLLKSSSSKDKLQFVGPSPRFSGSKDASANAGILLISGLQSEDEADYYCSYTESNAVAFGGGTLTVLG		
ASD2RLB	QSVLTQFSS-LSASPGASASLTCTHRSGLSYGGKNIWYDQKPGSPPQFFLFKSSSSKDKLQFVGPSPRFSGSKDTSANAAILLISGLQSEDEADYYCSYTESNAVAFGGGTLTVLG		
ASD2RLC	QAVLTQFAS-LSASPGASASLTCTHRSGLSYGGKNIWYDQKPGSPPQYLLRYSYSSSKDKLQFVGPSPRFSGSKDASANAGILLISGLQSEDEADYYCSYTESNAVAFGGGTLTVLG		

图 15

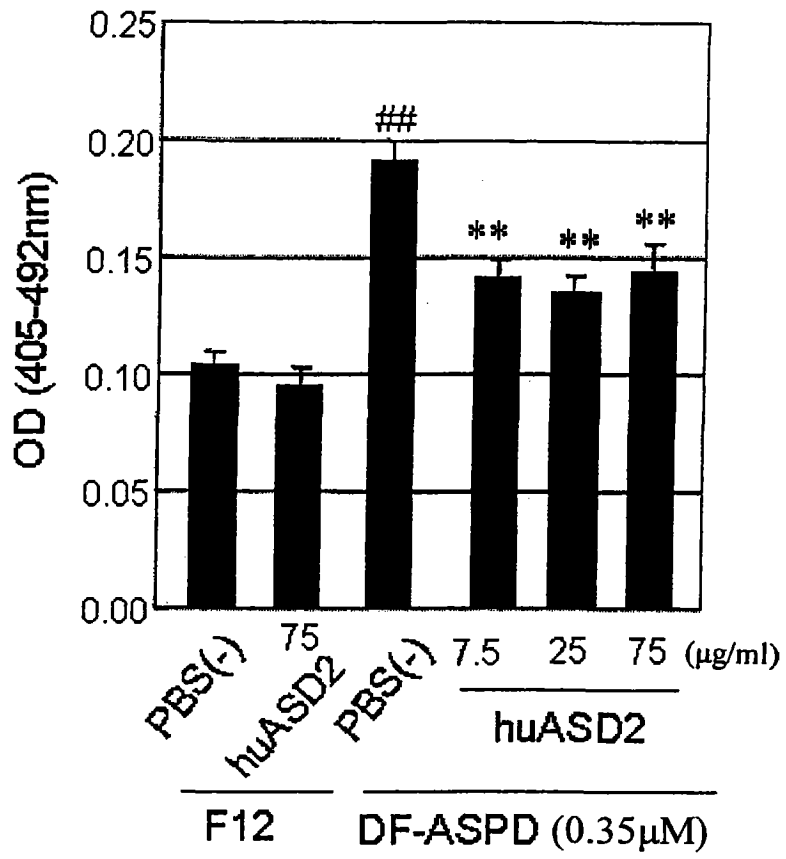
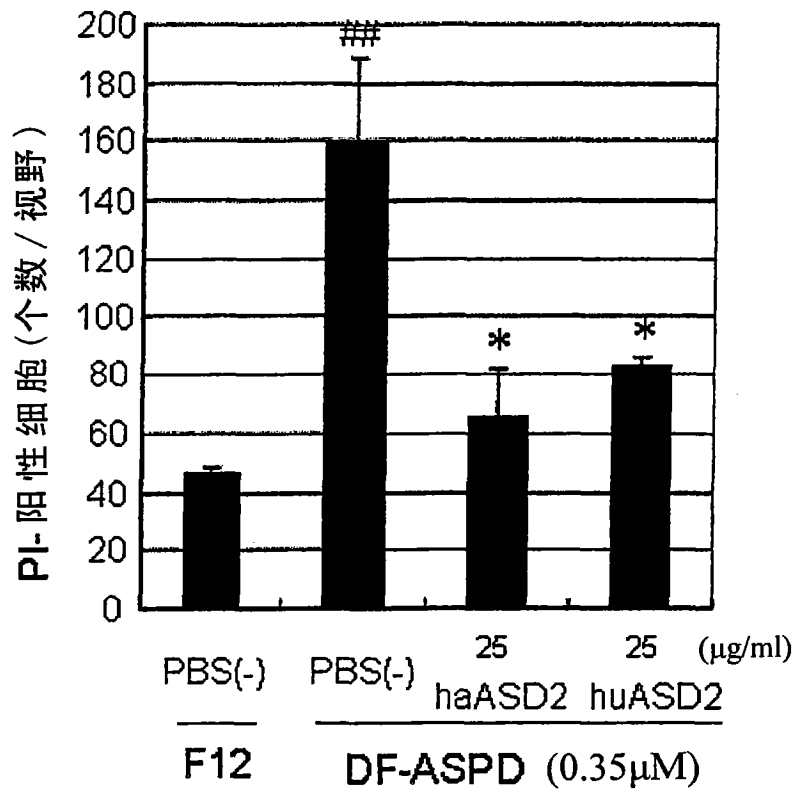


图 16



数字为平均值±SEM (n=3)。

##:  $p < 0.01$  vs. F12/PBS (-) 组 (student's t检验)

\*:  $p < 0.05$  vs. DF-ASPD/PBS (-) 组 (student's t检验)

图 17

专利名称(译)	抗体及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN101878301B</a>	公开(公告)日	2014-08-20
申请号	CN200880113862.8	申请日	2008-10-29
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人京都大学		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人京都大学		
当前申请(专利权)人(译)	道健康生活医药株式会社		
[标]发明人	星美奈子 佐藤道夫 井手野祥次 内藤幸嗣 保理江智 野田宗宏 堀井肇		
发明人	星美奈子 佐藤道夫 井手野祥次 内藤幸嗣 保理江智 野田宗宏 堀井肇		
IPC分类号	C12N15/02 A61K39/395 A61P25/28 C07K16/18 C12N5/10 G01N33/53 C12P21/08		
CPC分类号	C07K2317/24 C07K2317/565 G01N33/6896 G01N2800/2821 C07K2316/96 C07K16/18 A61K2039/505 C07K2317/56 C07K2317/92 A61P25/28 C07K2317/76		
代理人(译)	白丽 陈建全		
审查员(译)	张蕊		
优先权	2007280187 2007-10-29 JP		
其他公开文献	CN101878301A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明的目的在于提供一种对淀粉样前体蛋白的反应性低、且对淀粉样蛋白球体的反应性比对 $\beta$ 淀粉样蛋白纤维或 $\beta$ 淀粉样蛋白单体蛋白的反应性高的抗体等。根据本发明，能够提供对淀粉样蛋白球体的反应性比对淀粉样前体蛋白的反应性高、且具有下述任意1个以上的特征的抗体。(i)对淀粉样蛋白球体的反应性比对 $\beta$ 淀粉样蛋白纤维的反应性高；(ii)对淀粉样蛋白球体的反应性比对 $\beta$ 淀粉样蛋白单体蛋白的反应性高；(iii)具有抑制淀粉样蛋白球体对神经细胞死亡的诱导的活性。

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