



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109072274 A

(43)申请公布日 2018.12.21

(21)申请号 201780023469.9

(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司  
72002

(22)申请日 2017.04.13

代理人 王灵菇

(30)优先权数据

2016-081030 2016.04.14 JP

(51)Int.Cl.

*G12P 21/02*(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.10.12

*C07K 14/47*(2006.01)

*A61K 39/00*(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2017/015089 2017.04.13

*A61P 25/28*(2006.01)

*A61P 37/04*(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/179646 JA 2017.10.19

*G12Q 1/02*(2006.01)

*G01N 33/53*(2006.01)

*G01N 33/68*(2006.01)

(71)申请人 道健康生活医药株式会社

地址 日本京都府

(72)发明人 星美奈子 荒井由江

权利要求书2页 说明书16页  
序列表1页 附图7页

(54)发明名称

淀粉样蛋白球体(ASPD)样结构体及医药组合物

(57)摘要

本发明提供细胞分泌型淀粉样蛋白球体样结构体及使用了该结构体的医药及疫苗以及它们的制法。本发明在一个实施方式中涉及一种制造方法,其包含下述工序:在培养液中对表达淀粉样蛋白前体蛋白(APP)或包含淀粉样蛋白β蛋白(Aβ)序列的APP的一部分的细胞进行培养,在该培养液中得到细胞分泌型淀粉样蛋白球体(ASPD)样结构体。

1. 一种细胞分泌型淀粉样蛋白球体样结构体即细胞分泌型ASPD样结构体的制造方法，其包含下述工序：

在培养液中对表达淀粉样蛋白前体蛋白即APP或包含淀粉样蛋白 $\beta$ 蛋白序列即A $\beta$ 序列的APP的一部分的细胞进行培养、在该培养液中得到细胞分泌型ASPD样结构体。

2. 根据权利要求1所述的制造方法，其进一步包含：

从所述培养液中回收细胞分泌型ASPD样结构体的工序。

3. 根据权利要求1或2所述的制造方法，其中，

所述细胞是导入有APP或包含A $\beta$ 序列的APP的一部分的表达系统的细胞。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的制造方法，其中，

所述APP是野生型或具有1个或多个氨基酸突变的所述野生型的突变体。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的制造方法，其中，

所述APP是在A $\beta$ 氨基酸序列的GXXXG基序中的甘氨酸中具有氨基酸突变的突变体的APP。

6. 一种细胞分泌型ASPD样结构体，

其是在培养过导入有表达APP或包含A $\beta$ 序列的APP的一部分的表达系统的细胞的培养液中得到的结构体，

其对ASPD特异性抗体显示抗原性。

7. 一种医药组合物，其以权利要求6所述的细胞分泌型ASPD样结构体为有效成分。

8. 一种疫苗，其包含权利要求6所述的细胞分泌型ASPD样结构体。

9. 一种试剂盒，其包含权利要求6所述的细胞分泌型ASPD样结构体和抗ASPD抗体。

10. 权利要求6所述的细胞分泌型ASPD样结构体作为主动疫苗的用途。

11. 权利要求6所述的细胞分泌型ASPD样结构体在疫苗制造中的用途。

12. 权利要求6所述的细胞分泌型ASPD样结构体作为ASPD测定中的标准物质的用途。

13. 一种预防、改善和/或治疗由ASPD引起的疾病的方法，其包含下述工序：

将权利要求6所述的细胞分泌型ASPD样结构体、权利要求7所述的所述医药组合物或权利要求8所述的疫苗给予对象。

14. 根据权利要求13所述的方法，其中，

由ASPD引起的疾病是阿尔兹海默病和/或路易体痴呆症。

15. 一种使对象获得针对ASPD、由ASPD引起的疾病、或阿尔兹海默病和/或路易体痴呆症的免疫的方法，其包含下述工序：

将权利要求6所述的细胞分泌型ASPD样结构体、权利要求7所述的医药组合物或权利要求8所述的疫苗给予对象。

16. 一种医药组合物或疫苗的制造方法，其包含下述工序：

将权利要求6所述的细胞分泌型ASPD样结构体与药学上可容许的赋形剂组合。

17. 一种试剂盒的制造方法，其包含下述工序：

将权利要求6所述的细胞分泌型ASPD样结构体与抗ASPD抗体组合。

18. 一种非人动物，其具有：

导入有表达APP或包含A $\beta$ 序列的APP的一部分的表达系统的细胞。

19. 一种对ASPD的形成产生影响的物质的筛选方法，其包含下述工序：

将在培养过导入有表达APP或包含A $\beta$ 序列的APP的一部分的表达系统的细胞的培养液中形成的且对ASPD特异性抗体显示抗原性的结构体的形成效率作为指标的工序。

20. 一种对A $\beta$ 的C末端剪切产生影响的物质的筛选方法,其中,

将选自在培养过导入有表达APP或包含A $\beta$ 序列的APP的一部分的表达系统的细胞的培养液中分泌的、A $\beta$ 40、A $\beta$ 41、A $\beta$ 42、A $\beta$ 43以及它们的组合中的至少一个作为指标。

21. 一种合成ASPD样结构体,其中,

其是通过搅拌含有在A $\beta$ 的第25~37个氨基酸序列中的GXXXG基序的甘氨酸中具有1个或多个替换突变的突变型A $\beta$ 的液体而形成的。

## 淀粉样蛋白球体 (ASPD) 样结构体及医药组合物

### 技术领域

[0001] 本发明涉及淀粉样蛋白球体 (ASPD) 样结构体、其制造方法及其用途、医药组合物、其制造方法及其用途以及筛选方法。

### 背景技术

[0002] 淀粉样蛋白球体 (amylospheroids (ASPD)) 是约30个淀粉样蛋白 $\beta$ 蛋白 (A $\beta$ ) 聚集而成的直径为约10nm的球状的A $\beta$ 集合体,其被认为是在阿尔兹海默病发病的不可逆阶段发挥重要作用的结构体。

[0003] ASPD作为显示强神经毒性的体外合成的A $\beta$ 集合体(即合成ASPD)而被分离(非专利文献1)。已制作了针对该合成ASPD的特异性抗体(专利文献1及2),并使用该抗体从阿尔兹海默病的人患者的脑中实际分离到在生物体内形成的ASPD(即天然ASPD)(非专利文献1)。

[0004] 天然ASPD以及合成ASPD同样地选择性地诱导成熟神经细胞发生细胞死亡。发现该神经细胞死亡中的ASPD的靶是对神经的生存和功能发挥极为重要的作用的突触蛋白“Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase泵的 $\alpha$ 3亚单位(以下称为NAK $\alpha$ 3)”,并清楚了通过ASPD的结合,NAK $\alpha$ 3的功能降低,神经细胞过度兴奋,由此导致神经细胞死亡(专利文献3、非专利文献2)。

[0005] 与阿尔兹海默病的临床症状最为相关的是神经细胞的脱落。清楚了可见神经细胞脱落的阿尔兹海默病患者的大脑皮层中的天然ASPD量与阿尔兹海默病的重症度相关地增加,而未明确可见神经细胞脱落的阿尔兹海默病患者的小脑中的天然ASPD量仅微量存在(非专利文献3)。因此认为淀粉样蛋白球体在阿尔兹海默病发病的不可逆阶段发挥重要的作用。此外,从路易体痴呆症患者的脑中也检测到天然ASPD(非专利文献3),认为对于路易体痴呆症,天然ASPD也在其发病中发挥重要的作用。

[0006] 被认为与天然ASPD等价的合成ASPD可通过缓慢搅拌含有A $\beta$ 的液体来制造(非专利文献1、专利文献4)。

[0007] 现有技术文献

[0008] 专利文献

[0009] 专利文献1:W02006/016644

[0010] 专利文献2:W02009/057664

[0011] 专利文献3:W02013/099806

[0012] 专利文献4:W02013/094614

[0013] 非专利文献

[0014] 非专利文献1:Hoshi et al., Spherical aggregates of  $\beta$ -amyloid (amylospheroid) show high neurotoxicity and activate tau protein kinase I/ glycogen synthase kinase-3 $\beta$ , PNAS May 27, 2003 vol.100 no.11 6370-6375

[0015] 非专利文献2:Ohnishi et al., Na, K-ATPase  $\alpha$ 3 is a death target of Alzheimer patient amyloid- $\beta$  assembly, PNAS August 11, 2015 vol.112 no.32 E4465-E4474

[0016] 非专利文献3:Noguchi et al., Isolation and characterization of patient-derived, toxic, high mass amyloid beta-protein (A $\beta$ ) assembly from Alzheimer disease brains, J Biol Chem. 2009 Nov 20; 284 (47) : 32895-905

## 发明内容

[0017] 发明所要解决的课题

[0018] 如上所述,淀粉样蛋白球体 (ASPD) 在阿尔兹海默病和路易体痴呆症中发挥重要的作用。目前,从患者脑中纯化天然ASPD并用于治疗药等的开发是非常困难的。因此,若能够容易地制造与存在于患者脑中的天然ASPD等价或部分等价的ASPD样结构体,则将对阿尔兹海默病和路易体痴呆症的研究、以及这些疾病的预防方法及预防药、和治疗方法及预防/治疗药的开发有很大帮助。

[0019] 通过缓慢搅拌含有淀粉样蛋白 $\beta$ 蛋白 (A $\beta$ ) 的液体,能够在体外制造与天然ASPD大致等价的合成ASPD(非专利文献1和专利文献4)。并且发现合成ASPD能够无佐剂地诱导兔子发生免疫,且发现对于老年猴子具有一定的疫苗效果,是安全的。另一方面,还发现合成ASPD在每个制造批次中ASPD量在某种程度上上下浮动,所制造的ASPD难以长期保管,制造量难以按比例增加等问题。

[0020] 因此,本发明在一个方式中提供ASPD样结构体及其制造方法。

[0021] 用于解决课题的手段

[0022] 本发明在一个方式中涉及一种细胞分泌型ASPD样结构体的制造方法,其包含在培养液中对表达APP或包含A $\beta$ 序列的APP的一部分的细胞进行培养、在该培养液中得到细胞分泌型ASPD样结构体的工序。

[0023] 本发明在另一个方式中涉及一种细胞分泌型ASPD样结构体,其是从培养过导入有表达APP或包含A $\beta$ 序列的APP的一部分的表达系统的细胞的培养液中得到的结构体,其对ASPD特异性抗体显示抗原性。

[0024] 本发明在另一个方式中涉及一种医药组合物,其以细胞分泌型ASPD样结构体为有效成分。

[0025] 本发明在另一个方式中涉及一种疫苗,其含有细胞分泌型ASPD样结构体。

[0026] 本发明在另一个方式中涉及细胞分泌型ASPD样结构体作为主动疫苗的用途。

[0027] 本发明在另一个方式中涉及细胞分泌型ASPD样结构体在疫苗制造中的用途。

[0028] 本发明在另一个方式中涉及细胞分泌型ASPD样结构体作为ASPD测定中的标准物质的用途。

[0029] 本发明在另一个方式中涉及一种预防、改善和/或治疗由ASPD引起的疾病的方法,其包含将细胞分泌型ASPD样结构体、所述医药组合物或所述疫苗给予对象的工序。

[0030] 本发明在另一个方式中涉及一种使对象获得针对ASPD、由ASPD引起的疾病、或阿尔兹海默病和/或路易体痴呆症的免疫的方法,其包含将细胞分泌型ASPD样结构体、所述医药组合物或所述疫苗给予对象的工序。

[0031] 本发明在另一个方式中涉及一种药物组合物或疫苗的制造方法,其包含将细胞分泌型ASPD样结构体与药学上可容许的赋形剂组合的工序。

[0032] 本发明在另一个方式中涉及一种试剂盒,其包含细胞分泌型ASPD样结构体及抗

ASPD抗体。

[0033] 本发明在另一个方式中涉及一种试剂盒的制造方法,其包含将细胞分泌型ASPD样结构体和抗ASPD抗体组合的工序。

[0034] 本发明在另一个方式中涉及一种非人动物,其具有导入有表达APP或包含A $\beta$ 序列的APP的一部分的表达系统的细胞。

[0035] 本发明在另一个方式中涉及一种对ASPD的形成产生影响的物质的筛选方法,其包含将在培养过导入有表达APP或包含A $\beta$ 序列的APP的一部分的表达系统的细胞的培养液中形成的、对ASPD特异性抗体显示抗原性的结构体的形成效率作为指标的工序。

[0036] 本发明涉及一种对A $\beta$ 的C末端剪切产生影响的物质的筛选方法,其将选自在培养过导入有表达APP或包含A $\beta$ 序列的APP的一部分的表达系统的细胞的培养液中分泌的A $\beta$ 40、A $\beta$ 41、A $\beta$ 42、A $\beta$ 43以及它们的组合中的至少一个作为指标。

### 附图说明

[0037] 图1是说明所表达的APP的变体以及它们的突变体的突变位置的概略图。

[0038] 图2是表示试验例1~14的APP的表达系统中过量表达的细胞的培养液中的ASPD浓度的测定结果的图表。

[0039] 图3是表示试验例1~14的APP的表达系统中过量表达的细胞的培养液中的A $\beta$ 1-40浓度的测定结果的图表。

[0040] 图4是表示试验例1~14的APP的表达系统中过量表达的细胞的培养液中的A $\beta$ 1-42浓度的测定结果的图表。

[0041] 图5是表示使hAPP695<sub>sw</sub>-G33X过量表达的细胞的培养液中的ASPD浓度的测定结果的图表。

[0042] 图6是表示使hAPP695<sub>sw</sub>-G33X过量表达的细胞的培养液中的A $\beta$ 1-40浓度的测定结果的图表。

[0043] 图7是表示使hAPP695<sub>sw</sub>-G33X过量表达的细胞的培养液中的A $\beta$ 1-42浓度的测定结果的图表。

[0044] 图8是表示对合成ASPD的免疫原性进行评价的结果的一个例子的图表。

[0045] 图9是表示确认了合成ASPD(野生型)及合成ASPD(G33L型)的神经细胞毒性的结果的一个例子的图表。

[0046] 图10是表示试验例15~36的APP的表达系统中过量表达的细胞的培养液中的ASPD浓度的测定结果的图表。

[0047] 图11是表示试验例15~36的APP的表达系统中过量表达的细胞的培养液中的A $\beta$ 1-40浓度的测定结果的图表。

[0048] 图12是表示试验例15~36的APP的表达系统中过量表达的细胞的培养液中的A $\beta$ 1-42浓度的测定结果的图表。

### 具体实施方式

[0049] 本发明在一个或多个实施方式中基于在培养过表达淀粉样蛋白前体蛋白(APP)的细胞的培养液中确认到ASPD样结构体的存在。

[0050] 本发明在一个或多个实施方式中涉及简便且能够按比例增加的细胞分泌型ASPD样结构体的提供。

[0051] 本发明的细胞分泌型ASPD样结构体在一个或多个实施方式中,保存稳定性优异。

[0052] 本发明的细胞分泌型ASPD样结构体在一个或多个实施方式中,由于还能够极度降低A $\beta$ 单体的含有率地进行制造,因此通过超滤进行的A $\beta$ 单体的除去变得简单,能够提高疫苗等的制造效率。

[0053] 另外,本发明的细胞分泌型ASPD样结构体在一个或多个实施方式中,由于能够降低A $\beta$ 单体的含有率,因此例如与天然ASPD或合成ASPD相比,能够提高给予生物体时的安全性。

[0054] [淀粉样蛋白球体 (ASPD) 样结构体]

[0055] 本发明中,ASPD样结构体是指与ASPD特异性抗体发生抗原抗体反应的结构体,换言之,是指对ASPD特异性抗体显示抗原性的结构体。

[0056] 另外,本发明中,仅记载为淀粉样蛋白球体 (ASPD) 时,可包含天然ASPD及合成ASPD。

[0057] 作为ASPD特异性抗体,在一个或多个实施方式中,可以举出W02006/016644及W02009/057664中公开的多克隆抗ASPD抗体及单克隆抗ASPD抗体,在又一或多个实施方式中,可以举出兔多克隆抗ASPD抗体 (rpASD1、rpASD2及rpASD3)、小鼠单克隆抗ASPD抗体 (MASD1、MASD2及MASD3)、仓鼠单克隆抗ASPD抗体 (haASD1、haASD2、haASD3、haASD4及haASD5)、及人源化单克隆抗ASPD抗体 (huASD2) 等。

[0058] [细胞分泌型ASPD样结构体]

[0059] 本发明中,细胞分泌型ASPD样结构体是指通过本发明的制造方法制造的ASPD样结构体。在一个或多个实施方式中,是指在导入有APP或包含A $\beta$ 序列的APP的一部分的表达系统的细胞的培养液中发现的ASPD样结构体。本发明的细胞分泌型ASPD样结构体由于是在表达APP或包含A $\beta$ 序列的APP的一部分的细胞的培养液中得到的,因此可称为细胞分泌型。

[0060] 因此,本发明在一个方式中涉及一种细胞分泌型ASPD样结构体,其是从培养过导入有表达APP或包含A $\beta$ 序列的APP的一部分的表达系统的细胞的培养液中得到的结构体,其对ASPD特异性抗体显示抗原性。

[0061] 本发明的细胞分泌型ASPD样结构体在一个或多个实施方式中,可以与ASPD等价,在另一个或多个实施方式中,也可以与ASPD部分等价。部分等价是指是至少对ASPD特异性抗体发生抗原抗体反应的结构体,换言之,是对ASPD特异性抗体显示抗原性的结构体。

[0062] 本发明的细胞分泌型ASPD样结构体在一个或多个实施方式中,为A $\beta$ 集合体。本发明中,在仅记载为A $\beta$ 时,可以是指A $\beta$ 40 (A $\beta$ 1-40)、A $\beta$ 41 (A $\beta$ 1-41)、A $\beta$ 42 (A $\beta$ 1-42)、A $\beta$ 43 (A $\beta$ 1-43) 或它们的全部或一部分。

[0063] 本发明的细胞分泌型ASPD样结构体在一个或多个实施方式中,可以是与ASPD同样的分子量,在另一个或多个实施方式中,为100kDa以上或100~700kDa。

[0064] 本发明的细胞分泌型ASPD样结构体的ASPD样结构体在一个或多个实施方式中,ASPD的细胞毒性、即选择性地诱导功能性成熟的神经细胞死亡的特性可以与ASPD是同等的,或者也可以是比ASPD弱的毒性,或者也可以不具有细胞毒性,或者与ASPD相比毒性更高。

[0065] 本发明的细胞分泌型ASPD样结构体在一个或多个实施方式中,可以是与ASPD相同的形状,也可以是不同的形状。本发明的细胞分泌型ASPD样结构体在又一个或多个实施方式中,在电子显微镜观察下可以是直径为10~15nm的球状,也可以是与该形状不同的形状。

[0066] [细胞分泌型ASPD样结构体的制造方法]

[0067] 本发明的细胞分泌型ASPD样结构体在一个或多个实施方式中,可以通过在培养液中对表达淀粉样蛋白前体蛋白(APP)或包含淀粉样蛋白 $\beta$ 蛋白(A $\beta$ )序列的APP的一部分的细胞进行培养,在该培养液中得到。

[0068] 因此,本发明在一个方式中涉及一种细胞分泌型ASPD样结构体的制造方法,其包含在培养液中对表达APP或包含A $\beta$ 序列的APP的一部分的细胞进行培养、在该培养液中得到细胞分泌型ASPD样结构体的工序。以下,将所述制造方法简称为“本发明的制造方法”。

[0069] 本发明的制造方法中,在培养的细胞内表达的APP在一个或多个实施方式中,可以是人APP,也可以是人以外的动物的APP。人APP可以是hAPP770、hAPP751和hAPP695中的任一个的剪切突变体。APP以及A $\beta$ 的序列可以由公知的数据库得到。例如,hAPP770的NCBI的登录号为NP\_000475 (VERSION NP\_000475.1GI:4502167)。剪切突变体的序列例如可参照UniProtKB-P05067 (Modified:November 1,1991-v3)。

[0070] 另外,在本发明的制造方法的一个或多个实施方式中,从提高细胞分泌型ASPD样结构体的形成量的观点出发,在培养的细胞内表达的APP优选从导入至上述细胞的APP的表达系统表达,且/或优选在上述细胞中过量表达。在本发明的制造方法的一个或多个实施方式中,从提高细胞分泌型ASPD样结构体的形成量的观点出发,在培养的细胞内表达的APP优选具有APP的信号序列。

[0071] 在本发明的制造方法的一个或多个实施方式中,在培养的细胞内表达的APP可以是野生型,或者也可以是突变型的APP。作为突变型APP,可以举出家族性阿尔兹海默病连锁的突变,例如Swedish突变、Italian突变、Leuven突变、Icelandic突变、London突变、Iranian突变、Austrian突变、German突变、French突变、Florida突变、Iberian突变、Australian突变、Belgian突变、Flemish突变、Icelandic突变、British突变、Tottori突变、Italian突变、Arctic突变、Osaka突变、Iowa突变、Dutch突变等。其中,从提高细胞分泌型ASPD样结构体的形成量的观点出发,优选包含Swedish突变。

[0072] 此外,在本发明的制造方法的一个或多个实施方式中,从提高细胞分泌型ASPD样结构体的形成效率的观点出发,在培养的细胞内表达的APP优选在A $\beta$ 的第25~37个的氨基酸序列中的GXXXG基序的甘氨酸中具有1个或多个替换突变。即,优选具有选自相当于A $\beta$ 的第25个、第29个、第33个和第37个的甘氨酸中的1个或多个甘氨酸的替换突变,优选至少具有第33个的甘氨酸的替换突变。作为替换突变,从提高细胞分泌型ASPD样结构体的形成效率的观点及降低培养液中的A $\beta$ 量的观点出发,优选替换突变为亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、酪氨酸或半胱氨酸。本发明中,一个或多个是指1、2、3或4、或者1、2或3、或者1或2。

[0073] 在另一个或多个实施方式中,从提高细胞分泌型ASPD样结构体的形成效率的观点出发,在培养的细胞内表达的APP优选具有A $\beta$ 的第33个和第37个甘氨酸的替换突变。本实施方式中,作为替换突变,从提高细胞分泌型ASPD样结构体的形成效率的观点及降低培养液中的A $\beta$ 量的观点出发,优选替换突变为亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、酪氨

酸或半胱氨酸,更优选第33个和第37个中的至少一个替换突变为异亮氨酸。

[0074] 在本发明的制造方法的一个或多个实施方式中,从提高细胞分泌型ASPD样结构体的形成效率的观点出发,在培养的细胞内表达的APP可以举出具有Swedish突变和选自相当于A $\beta$ 的第25个、第29个、第33个和第37个的甘氨酸中的1个或多个甘氨酸的替换突变。在另一个或多个实施方式中,本发明中的APP可以举出在hAPP770或hAPP695中具有Swedish突变以及选自相当于A $\beta$ 的第25个、第29个、第33个和第37个的甘氨酸中的1个或多个甘氨酸的替换突变。此外,在另一个或多个实施方式中,本发明中的APP可以举出在hAPP770或hAPP695中具有Swedish突变以及相当于A $\beta$ 的第33个的甘氨酸的替换突变。此外,在另一个或多个实施方式中,本发明中的APP可以举出在hAPP770或hAPP695中具有Swedish突变以及相当于A $\beta$ 的第33个和第37个的甘氨酸的替换突变(优选至少一个替换突变为异亮氨酸)。在本发明的制造方法的一个或多个实施方式中,在培养的细胞内表达的APP可以在不显著妨碍ASPD样结构体形成的范围内具有其他突变。作为其他突变,可以包含突变为修饰氨基酸、非天然氨基酸、D-氨基酸等的突变。作为修饰氨基酸,在一个或多个实施方式中,可以举出氨基修饰、羧基修饰、硫醇基修饰、羟基修饰、糖化修饰、PEG化修饰等。

[0075] 在本发明的制造方法的一个或多个实施方式中,在培养的细胞内表达的APP可以是作为APP的一部分的包含淀粉样蛋白 $\beta$ 蛋白(A $\beta$ )序列的部分肽(以下也将该部分肽简称为“APP的一部分”)。这是因为ASPD是从APP切出的A $\beta$ 的集合体的一个形态。

[0076] 在本发明的制造方法的一个或多个实施方式中,在培养的细胞内表达的APP的一部分可以是N末端被剪切的形态,在又一个或多个实施方式中,也可以是N末端在 $\beta$ -分泌酶的剪切部位被剪切的形态。

[0077] 在本发明的制造方法的一个或多个实施方式中,在培养的细胞内表达的APP的一部分可以举出为包含A $\beta$ 的第1~43个、第1~42个或第1~40个的部分,在又一个或多个实施方式中,可以举出具有A $\beta$ 的第1~43个、第1~42个或第1~40个的部分及APP的信号序列。

[0078] 培养的细胞内的APP或其一部分的表达可以在导入有能够表达APP或其一部分的表达系统的细胞中进行。APP或其一部分的表达可以由瞬时表达系统进行,也可以由稳定表达细胞株进行。从提高ASPD样结构体的形成量的观点出发,APP或其一部分的表达优选在不妨碍ASPD样结构体形成的范围内为高表达或过量表达。APP或其一部分的表达系统可以是可控的。

[0079] 能够表达APP或其一部分的表达系统在一个或多个实施方式中,可以举出在编码APP或其一部分的序列中具有与所导入的宿主细胞对应的表达调节序列有效地连接的核酸的表达盒。作为表达调节序列,可以举出启动子、增强子、转录终止子等,除此之外,还可以举出起始密码子、内含子的剪切信号以及终止密码子等。

[0080] APP或其一部分表达系统在一个或多个实施方式中,可以适当选择并导入与欲使其表达的细胞(宿主)对应的表达载体。该表达载体在一个或多个实施方式中,可以举出具有上述表达盒的载体。作为表达载体,在一个或多个实施方式中,可以举出质粒、粘粒、YACS、病毒(例如腺病毒、逆转录病毒、episome EBV等)载体和噬菌体载体。

[0081] 本发明的制造方法中培养的细胞是表达APP或其一部分的细胞。本发明的制造方法中培养的细胞从提高细胞分泌型ASPD样结构体的形成量的观点出发,优选为导入有能够表达APP或其一部分的表达系统的细胞,更优选为能够高表达或过量表达APP或其一部分的

细胞。在本发明的制造方法的另一实施方式中,表达APP或其一部分的细胞也可以是通过基因导入或基因组编辑而使基因组APP基因过量表达的细胞。

[0082] 另外,在本发明的制造方法中培养的细胞在一个或多个实施方式中,优选为能够产生A $\beta$ 的细胞,更优选为表达 $\gamma$ -分泌酶和 $\beta$ -分泌酶这两者的细胞。

[0083] 导入有APP或其一部分的表达系统的宿主细胞在一个或多个实施方式中,可以举出动物细胞、植物细胞、昆虫细胞、微生物等以及它们的细胞株。作为动物细胞,可以举出哺乳类细胞、人细胞、人以外的哺乳类细胞。

[0084] 导入有APP或其一部分的表达系统的宿主细胞在一个或多个实施方式中,从操作性的观点出发,优选细胞株。作为不受限定的具体的细胞株,可以举出CHO细胞、HEK293细胞、Neuro2a细胞等。

[0085] 关于本发明的制造方法中的表达APP或其一部分的细胞的培养条件,本领域技术人员可以根据该细胞的种类、导入至该细胞的表达系统的种类、以及该表达系统的导入方式(瞬时导入或稳定导入)等来适当设定培养基、温度、CO<sub>2</sub>浓度等。

[0086] 在一个或多个实施方式中,作为使用瞬时的APP表达系统时的培养,可以举出在生长培养基中培养、转导,然后更换为无血清培养基、培养24小时~48小时。然后,在所述培养后,从培养基中得到细胞分泌型ASPD样结构体。

[0087] 在细胞为动物细胞的情况下,作为培养基,可以举出Medium 199培养基、Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) 培养基、 $\alpha$ MEM培养基、Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) 培养基、Ham's F12培养基、RPMI 1640培养基、Fischer's培养基以及它们的混合培养基等。这些培养基中可以含有血清或血清替代物,或者也可以为无血清。根据需要,培养基也可含有脂质、氨基酸、必需氨基酸、维生素、生长因子、低分子化合物、抗生素、抗氧化剂、丙酮酸、缓冲剂、无机盐类等中的一种以上的物质。

[0088] 本发明的制造方法在一个或多个实施方式中,还包含从上述培养液中回收细胞分泌型ASPD样结构体的工序。

[0089] 培养液中的细胞分泌型ASPD样结构体的回收在一个或多个实施方式中,可以通过回收对孔径为0.22 $\mu$ m过滤器的滤液进行50kDa或100kDa的超滤得到的保持液的工序进行。但是,ASPD的回收方法也可以不限于该方法。

[0090] 为本发明的制造方法时,细胞分泌型ASPD样结构体的制造变得容易,在一个或多个实施方式中,以细胞分泌型ASPD样结构体本身为抗原的主动疫苗疗法的开发、作为主动疫苗发挥作用的医药组合物的开发、神经细胞死亡抑制药的开发变得容易。

[0091] [疫苗]

[0092] 报告了尝试将构成ASPD的A $\beta$ 本身导入生物体内来引发免疫的结果是A $\beta$ 的序列的一部分(第16~33个残基)使T细胞活化而引起炎症性反应(Monsonego, A. et al. J. Clin. Invest. 112:415-422 (2003), Monsonego, A. et al. PNAS 103:5048-5053 (2006))。因此,难以将A $\beta$ 本身用作疫苗。

[0093] 另一方面得到了下述数据:ASPD将使T细胞活化的A $\beta$ 的序列(第16~33个残基)折叠到球状结构的内部而将其大致隐藏(Ohnishi et al. PNAS 112:E4465-E4474 (2015)),不引起使用A $\beta$ 疫苗时成为问题的炎症性T细胞应答。

[0094] 而且发现,对于合成ASPD,不使用佐剂地对兔子进行免疫,其免疫量以通常的肽抗

原的1/5~1/10这样的少量即足够了。此外,还发现当使用ASPD通过老年食蟹猴的皮下给药进行免疫时,脑的糖代谢(神经活动)提高。

[0095] 根据这些认知,可以说ASPD能够作为安全性高的主动疫苗使用。而且,本发明的细胞分泌型ASPD样结构体也可用作主动疫苗,另外,可用于疫苗的制造。

[0096] 因此,本发明在一个方式中涉及一种以ASPD为有效成分的药物组合物,或者涉及含有ASPD的疫苗。

[0097] 在使用合成ASPD制造例如疫苗等这样的医药组合物时,发现有以下问题。即发现,在合成ASPD的以往的制造方法中,在每个制造批次中ASPD量均在某种程度上上下浮动,并且所制造的ASPD难以长期保管,而且制造量难以按比例增加、并且制造合成ASPD后需要除去残留的A $\beta$ 、制造效率下降等问题。

[0098] 为使用了本发明的细胞分泌型ASPD样结构体的疫苗等医药组合物时,在一个或多个实施方式中,能够消除这些问题中的一个或一部分或其以上。

[0099] 因此,本发明在一个方式中涉及一种以细胞分泌型ASPD样结构体为有效成分的医药组合物。作为本发明的医药组合物的一个或多个实施方式,可以举出含有细胞分泌型ASPD样结构体的疫苗。本发明的医药组合物和疫苗也可以含有药学上可容许的赋形剂和/或佐剂。

[0100] 本发明的医药组合物和疫苗在一个或多个实施方式中,可以用于预防、改善和/或治疗由ASPD引起的疾病。本发明的医药组合物及疫苗在一个或多个实施方式中,可用于阿尔兹海默病和/或路易体痴呆症的预防、改善和/或治疗。

[0101] 本发明的医药组合物及疫苗在一个或多个实施方式中,可给予有可能患由ASPD引起的疾病的对象、有可能已经患病的对象、或已患病的对象。本发明的医药组合物在一个或多个实施方式中,可以给予有可能患阿尔茨海默病和/或路易体痴呆症的对象、有可能已经患病的对象或已患病的对象。作为该对象,可以举出哺乳类、人、人以外的哺乳类。

[0102] 利用本发明的医药组合物及疫苗使对象获得针对ASPD、由ASPD引起的疾病、或阿尔兹海默病和/或路易体痴呆症的免疫的一个或多个实施方式进行说明。本发明的医药组合物和疫苗的给药方法在一个或多个实施方式中,可以包括在肌肉内、腹腔内、皮内或皮下的注射、或者向口腔、消化管、呼吸道、泌尿生殖道的经粘膜给药。作为本发明的医药组合物及疫苗中的细胞分泌型ASPD样结构体的给药量,可以举出不对给药对象带来显著副作用地诱导免疫防御应答的量。本发明的医药组合物和疫苗的给药量在一个或多个实施方式中,可以预计在0.01 $\mu$ g~10mg、0.1~1000 $\mu$ g、1~100 $\mu$ g、5~50 $\mu$ g、或5~25 $\mu$ g的范围内含有细胞分泌型ASPD样结构体。也可以在初始给药之后,间隔足够的期间地进行1次或多次的加强给药。

[0103] 因此,本发明在一个方式中涉及一种预防、改善和/或治疗由ASPD引起的疾病(例如阿尔兹海默病和/或路易体痴呆症)的方法,其包含将细胞分泌型ASPD样结构体或本发明的医药组合物或疫苗给予对象的工序。

[0104] 本发明在另一个方式中涉及一种使对象获得针对ASPD、由ASPD引起的疾病、或阿尔兹海默病和/或路易体痴呆症的免疫的方法,其包含将细胞分泌型ASPD样结构体或本发明的医药组合物或疫苗给予对象的工序。

[0105] 另外,本发明在一个方式中还涉及一种医药组合物或疫苗的制造方法,其包含将

细胞分泌型ASPD样结构体与赋形剂和/或佐剂组合的工序。

[0106] 本发明在另一个方式中涉及以细胞分泌型ASPD样结构体为有效成分的医药组合物、或具有细胞分泌型ASPD样结构体的疫苗的制造方法,其包含通过本发明的制造方法制造细胞分泌型ASPD样结构体的工序。

[0107] 本发明在另一个方式中涉及一种用于本发明的制造方法的试剂盒,其包含导入有APP或其一部分的表达系统的细胞株。根据本发明的试剂盒,细胞分泌型ASPD样结构体的制造变得容易。本发明的试剂盒还可以包含培养容器、培养基和说明书中的至少一种。本发明的制造方法中使用的试剂盒在一个或多个实施方式中,也可以代替导入有APP或其一部分的表达系统的细胞株而是具有APP或其一部分的表达系统的载体。

[0108] [动物模型]

[0109] 本发明在另一个方式中涉及具有导入有表达APP或包含A $\beta$ 序列的APP的一部分的表达系统的细胞的非人动物。所述细胞由于分泌细胞分泌型ASPD样结构体,因此所述非人动物可成为由ASPD引起的疾病、例如阿尔兹海默病和/或路易体痴呆症的动物模型。作为所述细胞,从制备该动物模型的观点出发,优选脑的细胞,或者优选神经细胞。所述表达系统的导入方法没有特别限制,可以举出使用基因导入技术的方法、使用基因组编辑技术的方法等。作为非人动物,可以举出人以外的哺乳类、人以外的灵长类。本方式的一个或多个实施方式是具有经基因改变以表达APP或包含A $\beta$ 序列的APP的一部分的细胞的基因改变动物。

[0110] 本方式的动物模型中,在经基因改变的细胞内表达的APP例如可以是如本发明中公开的APP的突变体或A $\beta$ 的突变体。即,在所述细胞中表达的APP与上述同样,优选具有选自相当于A $\beta$ 的第25个、第29个、第33个和第37个的甘氨酸中的1个或多个甘氨酸的替换突变,优选至少具有第33个的甘氨酸的替换突变。作为替换突变,优选替换突变为亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、酪氨酸或半胱氨酸。

[0111] 在另一个或多个实施方式中,在所述细胞中表达的APP优选具有A $\beta$ 的第33个和第37个甘氨酸的替换突变。本实施方式中,作为替换突变,优选替换突变为亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、酪氨酸或半胱氨酸,更优选第33个和第37个中的至少一个替换突变为异亮氨酸。

[0112] [标准物质]

[0113] 细胞分泌型ASPD样结构体在一个或多个实施方式中,可以用作ASPD测定中的ASPD的标准物质。在另一个或多个实施方式中,细胞分泌型ASPD样结构体可以用于测定ASPD的试剂盒。即,本发明在一个方式中涉及一种试剂盒,其包含细胞分泌型ASPD样结构体和抗ASPD抗体。作为抗ASPD抗体,可以举出上述ASPD特异性抗体。另外,本发明在一个方式中涉及一种试剂盒的制造方法,其包含将细胞分泌型ASPD样结构体与抗ASPD抗体组合的工序。这些试剂盒例如可以用于ASPD的测定。

[0114] [筛选方法1]

[0115] 本发明在一个方式中涉及一种对ASPD的形成产生影响的物质的筛选方法,其包含将在培养过导入有表达APP或包含A $\beta$ 序列的APP的一部分的表达系统的细胞的培养液中形成的、对ASPD特异性抗体显示抗原性的结构体(即细胞分泌型ASPD样结构体)的形成效率作为指标的工序。

[0116] 上述指标在一个或多个实施方式中,可以是细胞分泌型ASPD样结构体的形成量,

也可以是相对于Aβ40、Aβ41、Aβ42、Aβ43或它们的合计量的相对量。该方式的筛选方法也可以通过比较在培养液中添加有测试物质时和未添加有测试物质时的细胞分泌型ASPD样结构体的形成效率,判断是否为对ASPD的形成产生影响的物质。例如,当培养液中添加有测试物质时该形成效率降低,则可以判断该物质有阻碍ASPD形成的影响。另外,例如,当培养液中添加有测试物质时该形成效率亢进,则可以判断该物质有促进ASPD形成的影响。

[0117] 在本方式的筛选方法中,在培养的细胞内表达的APP例如可以是如本发明中公开的APP的突变体或Aβ的突变体。

[0118] [筛选方法2]

[0119] 本发明在一个方式中涉及对Aβ的C末端剪切产生影响的物质的筛选方法,其包含将选自在培养过导入有表达APP或包含Aβ序列的APP的一部分的表达系统的细胞的培养液中形成的、Aβ40、Aβ41、Aβ42、Aβ43以及它们的组合中的至少一种Aβ作为指标的工序。

[0120] 上述指标在一个或多个实施方式中,可以是Aβ40、Aβ41、Aβ42、Aβ43以及它们的组合的分泌量或培养液中的浓度,或者例如也可以是Aβ42相对于Aβ40的比例(Aβ42/Aβ40)这样的相对量。该方式的筛选方法可以通过比较在培养液中添加有测试物质时和未添加有测试物质时的上述指标,判断是否为对Aβ的C末端剪切产生影响的物质、或者是否为对γ分泌酶产生影响的物质。例如,当在培养液中添加有测试物质时,如果“Aβ42/Aβ40”降低,则可以判断该物质有抑制Aβ42产生的影响。

[0121] 本方式的筛选方法中,在培养的细胞内表达的APP例如可以是如本发明中公开的APP的突变体或Aβ的突变体。

[0122] [突变型合成ASPD]

[0123] 本发明在另一个方式中涉及一种突变型合成ASPD。本发明中,突变型合成ASPD是指使用突变型的Aβ、通过与合成ASPD的制造方法同样的制法合成的合成ASPD样结构体。即,本发明中,突变型合成ASPD是指通过搅拌含有在Aβ的第25~37个的氨基酸序列中的GXXXG基序的甘氨酸中具有1个或多个替换突变的突变型Aβ的液体而形成的合成ASPD样结构体。从提高突变型合成ASPD的形成效率的观点出发,上述液体中可以含有例如邻苯二甲酸酯等增塑剂。在一个或多个实施方式中,突变型合成ASPD可以通过包含下述工序的制造方法合成:将所述突变型Aβ溶解在含有所述增塑剂的有机溶剂中、用水性溶液稀释所述突变型Aβ的溶液、以及搅拌所述稀释后的溶液。

[0124] 作为所述突变型Aβ,优选具有选自相当于Aβ的第25个、第29个、第33个和第37个的甘氨酸中的1个或多个甘氨酸的替换突变,优选至少具有第33个的甘氨酸的替换突变。作为替换突变,从提高合成ASPD的形成效率的观点出发,优选替换突变为亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、酪氨酸、半胱氨酸。

[0125] 作为所述突变型Aβ,在另一个或多个实施方式中,优选具有Aβ的第33个和第37个的甘氨酸的替换突变。本实施方式中,作为替换突变,从提高合成ASPD的形成效率的观点出发,优选替换突变为亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、酪氨酸或半胱氨酸,更优选第33个和第37个中的至少一个替换突变为异亮氨酸。

[0126] 本发明的突变型ASPD在一个或多个实施方式中,对ASPD特异性抗体显示抗原性。另外,本发明的突变型ASPD在另一个或多个实施方式中,对成熟神经细胞显示细胞毒性。

[0127] 本发明在一个或多个实施方式中可以涉及以下方案;

[0128] [1]一种细胞分泌型淀粉样蛋白球体(ASPD)样结构体的制造方法,其包含下述工序:在培养液中对表达淀粉样蛋白前体蛋白(APP)或包含淀粉样蛋白 $\beta$ 蛋白(AB)序列的APP的一部分的细胞进行培养、在该培养液中得到细胞分泌型ASPD样结构体。

[0129] [2]根据[1]所述的制造方法,其进一步包含从所述培养液中回收细胞分泌型ASPD样结构体的工序。

[0130] [3]根据[1]或[2]所述的制造方法,其中,所述细胞是导入有APP或包含AB序列的APP的一部分的表达系统的细胞。

[0131] [4]根据[1]至[3]中任一项所述的制造方法,其中,所述APP是野生型或具有1个或多个氨基酸突变的所述野生型的突变体。

[0132] [5]根据[1]至[4]中任一项所述的制造方法,其中,所述APP是在AB氨基酸序列的GXXYG基序中的甘氨酸中具有氨基酸突变的野生型或突变体的APP。

[0133] [6]一种细胞分泌型ASPD样结构体,其是在培养过导入有表达APP或包含AB序列的APP的一部分的表达系统的细胞的培养液中得到的结构体,其对ASPD特异性抗体显示抗原性。

[0134] [7]一种医药组合物,其以[6]所述的细胞分泌型ASPD样结构体为有效成分。

[0135] [8]一种疫苗,其包含[6]所述的细胞分泌型ASPD样结构体。

[0136] [9]一种试剂盒,其包含[6]所述的细胞分泌型ASPD样结构体和抗ASPD抗体。

[0137] [10][6]所述的细胞分泌型ASPD样结构体作为主动疫苗的用途。

[0138] [11][6]所述的细胞分泌型ASPD样结构体在疫苗制造中的用途。

[0139] [12][6]所述的细胞分泌型ASPD样结构体作为ASPD测定中的标准物质的用途。

[0140] [13]一种预防、改善和/或治疗由ASPD引起的疾病的方法,其包含下述工序:将[6]所述的细胞分泌型ASPD样结构体、[7]所述的所述医药组合物或[8]所述的疫苗给予对象。

[0141] [14]根据[13]所述的方法,其中,由ASPD引起的疾病是阿尔兹海默病和/或路易体痴呆症。

[0142] [15]一种使对象获得针对ASPD、由ASPD引起的疾病、或阿尔兹海默病和/或路易体痴呆症的免疫的方法,其包含下述工序:将[6]所述的细胞分泌型ASPD样结构体、[7]所述的所述医药组合物或[8]所述的疫苗给予对象。

[0143] [16]一种医药组合物或疫苗的制造方法,其包含下述工序:将[6]所述的细胞分泌型ASPD样结构体与药学上可容许的赋形剂组合。

[0144] [17]一种试剂盒的制造方法,其包含下述工序:将[6]所述的细胞分泌型ASPD样结构体与抗ASPD抗体组合。

[0145] [18]一种非人动物,其具有导入有表达APP或包含AB序列的APP的一部分的表达系统的细胞。

[0146] [19]一种对ASPD的形成产生影响的物质的筛选方法,其包含下述工序:将在培养过导入有表达APP或包含AB序列的APP的一部分的表达系统的细胞的培养液中形成的且对ASPD特异性抗体显示抗原性的结构体的形成效率作为指标。

[0147] [20]一种对AB的C末端剪切产生影响的物质的筛选方法,其将选自在培养过导入有表达APP或包含AB序列的APP的一部分的表达系统的细胞的培养液中分泌的、AB40、AB41、AB42、AB43以及它们的组合中的至少一个作为指标。

[0148] [21]一种合成ASPD样结构体,其是通过搅拌含有在Aβ的第25~37个氨基酸序列中的GXXXG基序的甘氨酸中具有1个或多个替换突变的突变型Aβ的液体而形成的。

[0149] 以下,使用实施例进一步说明本发明的一个或多个实施方式。

[0150] 实施例

[0151] 1.表达hAPP的培养细胞的构建

[0152] (1-1)人淀粉样蛋白前体蛋白(hAPP)

[0153] 作为表达的淀粉样蛋白前体蛋白(APP),使用下述表1和图1中所示的试验例1~14的APP。图1的序列(序列号1)是包含人的Aβ的hAPP的部分氨基酸序列。

[0154] 试验例1~7的APP是hAPP770野生型、hAPP770Swedish突变型以及GXXXG基序中的1个或2个甘氨酸发生了突变的hAPP770Swedish型。

[0155] 试验例8~14的APP是hAPP695野生型、hAPP695Swedish突变型以及GXXXG基序中的1个或2个甘氨酸发生了突变的hAPP695Swedish型。

[0156] 表1

| 表 1          | 表达的 APP              | APP 中的突变    |           |
|--------------|----------------------|-------------|-----------|
| 试验例 1        | hAPP770-野生型          | -           |           |
| 试验例 2        | hAPP770-swedish (SW) | KM670/671NL |           |
| 试验例 3        | hAPP770-sw-G25/29L   | KM670/671NL | G696/700L |
| 试验例 4        | hAPP770-sw-G29/33L   | KM670/671NL | G700/704L |
| 试验例 5        | hAPP770-sw-G33/37L   | KM670/671NL | G704/708L |
| 试验例 6        | hAPP770-sw-G33L      | KM670/671NL | G704L     |
| [0157] 试验例 7 | hAPP770-sw-G33I      | KM670/671NL | G704I     |
| 试验例 8        | hAPP695-野生型          | -           |           |
| 试验例 9        | hAPP695-swedish (SW) | KM595/596NL |           |
| 试验例 10       | hAPP695-sw-G25/29L   | KM595/596NL | G621/625L |
| 试验例 11       | hAPP695-sw-G29/33L   | KM595/596NL | G625/629L |
| 试验例 12       | hAPP695-sw-G33/37L   | KM595/596NL | G629/633L |
| 试验例 13       | hAPP695-sw-G33L      | KM595/596NL | G629L     |
| 试验例 14       | hAPP695-sw-G33I      | KM595/596NL | G629I     |

[0158] (1-2)过量表达hAPP的培养细胞

[0159] 如下制作过量表达上述试验例1~14的hAPP的CHO细胞。

[0160] 将CHO/K1细胞用生长培养基以 $2.5 \times 10^4$ 个细胞/cm<sup>2</sup>的密度接种于12孔板,以37℃、5%CO<sub>2</sub>维持。24小时后,使用基因导入试剂(FuGENE HD)将表达载体导入至CHO/K1细胞。导入方法为:每1孔混合Opti-MEM 25μL和质粒DNA 0.5μg,再加入1.5μL的FuGENE HD,在室温下使其反应10分钟。在其间更换0.5mL生长培养基,反应结束后,添加反应液25μL。24小时后,更换为新的1mL生长培养基,进一步进行培养。

[0161] 生长培养基:在含10%FBS的Ham's F-12培养基中加入有100单位/mL青霉素和100μg/mL链霉素的培养基

[0162] 2.ASPD的形成和回收

[0163] (2-1)过量表达hAPP的培养细胞的培养和上清的回收

[0164] 基因导入的48小时后,用1×PBS(-)清洗细胞2次,然后更换为1mL无血清培养基。

更换为无血清培养基24小时后,回收用0.22 $\mu$ m过滤器过滤得到的培养上清液,立即用液氮冷冻,在-80 $^{\circ}$ C下保存。

[0165] 无血清培养基:DMEM/F-12中加入有1 $\times$ ITS-X的培养基

[0166] (2-2)分析

[0167] 回收培养过APP过量表达细胞的培养液,通过下述条件的ELISA法确认培养液中的ASPD、A $\beta$ 1-40和A $\beta$ 1-42的含量。将其结果示于图2~4。

[0168] [ASPD ELISA]

[0169] 对于所回收的培养上清液,利用使用了2种抗ASPD抗体(rpASD1、MASD3)的夹心ELISA进行定量。

[0170] 详细而言,在测定前一天将抗ASPD多克隆抗体(rpASD1)按照500ng/孔的方式分注到白色96孔板中,在4 $^{\circ}$ C下固相化过夜。第二天,用PBS-T清洗孔3次,然后用3%BSA进行30分钟封闭,再次清洗3次。向各孔中分注100 $\mu$ L的标准液或样品,在室温下孵育1小时后,清洗3次,按照达到100ng/孔的方式添加抗ASPD单克隆抗体(MASD3),进一步在室温下孵育1小时。再次进行3次清洗,按照100 $\mu$ L/孔的方式分注经1/10000稀释的二次抗体(抗小鼠IgG-HRP),在室温下孵育1小时。清洗3次后,添加100 $\mu$ L的发光底物,遮光1分钟使其反应,用发光光度计检测发光。

[0171] [A $\beta$ ELISA]

[0172] 对于所回收的培养上清液,使用可市售获得的A $\beta$ monomer ELISA kit进行测定。所使用的试剂盒如下。测定按照试剂盒附带的说明书进行。

[0173] A $\beta$ 1-40:人 $\beta$ 淀粉样蛋白(1-40)ELISA kit Wako(Wako#292-62301)

[0174] A $\beta$ 1-42:人 $\beta$ 淀粉样蛋白(1-42)ELISA kit Wako高灵敏度品(Wako#296-64401)

[0175] 如图2~4所示,在试验例1~14的使APP过量表达的任一情况下,均确认到培养液中的ASPD形成。

[0176] 将hAPP770和hAPP695比较时,虽未见因突变导致的大的差异,但hAPP695有培养上清液中的ASPD浓度稍高的倾向。另外,关于突变的位置和数量,无论是2个位置还是1个位置,G704或G629的G/L突变对于ASPD形成均是重要的。此外启示,与野生型(wt)相比,Swedish(sw)突变中分泌更多的淀粉样蛋白,此外通过在GXXXG基序中加入突变,大部分的淀粉样蛋白被用作ASPD的构成要素。

[0177] 3.hAPP695sw-G33X的过量表达

[0178] 与上述(1-2)同样地制作过量表达使hAPP695Swedish突变型的第629位(A $\beta$ 的第33位)的甘氨酸突变为19种氨基酸的APP的细胞,与上述2.同样地进行培养,在该培养液中确认培养液中的ASPD、A $\beta$ 1-40和A $\beta$ 1-42的含量。将其结果示于表2和图5~7。

[0179] 表2

| APP      | ASPD 样结构体      |
|----------|----------------|
|          | 相对于 sw 的比例 (%) |
| sw       | 100            |
| sw-G629L | 251            |
| sw-G629I | 249            |
| sw-G629F | 245            |
| sw-G629M | 156            |
| sw-G629V | 196            |
| sw-G629S | 103            |
| sw-G629P | 81             |
| sw-G629T | 87             |
| sw-G629A | 114            |
| sw-G629Y | 123            |
| sw-G629H | 94             |
| sw-G629Q | 82             |
| sw-G629N | 81             |
| sw-G629K | 89             |
| sw-G629D | 78             |
| sw-G629E | 70             |
| sw-G629C | 147            |
| sw-G629W | 121            |
| sw-G629R | 65             |

[0181] 如表2及图5~7所示,确认到通过将hAPP695Swedish突变型的第629位(A $\beta$ 的第33位)的甘氨酸替换成规定的氨基酸、例如亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸、缬氨酸、酪氨酸、半胱氨酸,能够显著降低培养液中的A $\beta$ 量,并且能够提高细胞分泌型ASPD样结构体的形成量。另一方面,通过替换成脯氨酸(或苏氨酸),A $\beta$ 1-40、A $\beta$ 1-42和ASPD样结构体中的任一个都确认到培养液中浓度的降低。由该结果启示,通过利用这些氨基酸进行的第629位(A $\beta$ 的第33位)的突变,抑制了A $\beta$ 从APP的切出,且抑制了ASPD样结构体的形成。根据以上内容考虑,也可以利用突变为针对淀粉样蛋白 $\beta$ 产生和ASPD形成这两者的抑制剂筛选的突变体。

[0182] 3. 使用其他宿主细胞的细胞分泌型ASPD样结构体的制造

[0183] 除了CHO以外,在HEK293和Neuro2a的细胞株中,通过制备导入有APP或包含A $\beta$ 序列的APP的一部分的表达系统的细胞,也可见在细胞内形成了ASPD样结构体。

[0184] 4. 细胞分泌型ASPD样结构体的稳定性确认: -80℃的保存稳定性

[0185] 使用2种ASPD特异性抗体(中和抗体)的夹心ELISA测定将通过使试验例14的hAPP695-sw-G33I表达而得到的细胞分泌型ASPD结构体在-80℃保存0个月、3个月及6个月期间后的样品,制作标准曲线。

[0186] 其结果,该标准曲线的一次回归直线的斜率在3个样品中显示出大致恒定的值。因此,认为对夹心ELISA中使用的2种中和抗体的反应性稳定,不会因保存而劣化。

[0187] 另一方面,认为通过现有方法制造的合成ASPD在-80℃保存后,一次回归直线中的斜率的偏差大,相对于ASPD浓度的信号的大小的偏差也大,保存稳定性低。

[0188] 5. 合成ASPD的免疫原性

[0189] 对新西兰白兔(各条件3只)在弗氏佐剂、氢氧化铝佐剂、无佐剂下利用合成ASPD进行6次100 $\mu$ g免疫,之后,进行全采血,通过点印迹评价对血清中的合成ASPD的反应性。将其结果的一个例子示于图8。可知在所有兔子中即使没有佐剂也能够得到充分的反应性。

[0190] 6. 合成ASPD及突变型合成ASPD(G33L)的神经细胞毒性

[0191] 将使用野生型A $\beta$ 1-42制造的合成ASPD的神经细胞毒性和使用G33L突变型A $\beta$ 1-42制造的突变型合成ASPD(G33L)的神经细胞毒性进行比较。

[0192] 具体而言,将一定浓度的合成ASPD(0.58 $\mu$ M)及突变型合成ASPD(0.53 $\mu$ M)分别给予来自成熟大鼠海马的原代培养神经细胞并放置过夜后,添加荧光试剂(Thermo Fisher公司制CyQUANT),使用共聚焦定量细胞成像仪CQ1确认细胞存活率。将其结果示于图9的右侧。如该图所示,突变型合成ASPD(G33L型)与合成ASPD(野生型)同样地,对成熟神经细胞表现出同等程度的细胞毒性。

[0193] 7. 突变型合成ASPD和rpASD1抗体的解离常数

[0194] 将合成ASPD或突变型合成ASPD(G33L)作为配体固相化在传感器芯片上,流过作为分析物的抗ASPD多克隆抗体(rpASD1),通过表面等离子体共振(SPR)求出解离常数( $K_D$ )。其结果,对抗ASPD多克隆抗体(rpASD1)的反应性在合成ASPD和突变型合成ASPD(G33L)是同等的。

[0195] 8. hAPP695sw的1和2个氨基酸突变体的过量表达

[0196] 作为表达的淀粉样蛋白前体蛋白(APP),使用下述表3和图1中所示的试验例15~36的APP。与上述1和2的记载同样地回收培养过APP过量表达细胞的培养液,用下述条件的ELISA法确认培养液中的ASPD、A $\beta$ 1-40和A $\beta$ 1-42的含量。将其结果示于图10~12。

[0197] 表3

| 表 3    | 表达的 APP<br>(hAAP695) | hAAP695 中的突变 |             | A $\beta$ 中的突变 |
|--------|----------------------|--------------|-------------|----------------|
| 试验例 15 | 野生型 (WT)             | -            |             | -              |
| 试验例 16 | swedish (SW)         | KM595/596NL  |             | -              |
| 试验例 17 | sw-G621L             | KM595/596NL  | G621L       | G25L           |
| 试验例 18 | sw-G625L             | KM595/596NL  | G625L       | G29L           |
| 试验例 19 | sw-G629L             | KM595/596NL  | G629L       | G33L           |
| 试验例 20 | sw-G633L             | KM595/596NL  | G633L       | G37L           |
| 试验例 21 | sw-G621/625L         | KM595/596NL  | G621/625L   | G25/29L        |
| 试验例 22 | sw-G625/629L         | KM595/596NL  | G625/629L   | G29/33L        |
| 试验例 23 | sw-G629/633L         | KM595/596NL  | G629/633L   | G33/37L        |
| 试验例 24 | sw-G621I             | KM595/596NL  | G621I       | G25I           |
| 试验例 25 | sw-G625I             | KM595/596NL  | G625I       | G29I           |
| 试验例 26 | sw-G629I             | KM595/596NL  | G629I       | G33I           |
| 试验例 27 | sw-G633I             | KM595/596NL  | G633I       | G37I           |
| 试验例 28 | sw-G621/625I         | KM595/596NL  | G621/625I   | G25/29I        |
| 试验例 29 | sw-G625/629I         | KM595/596NL  | G625/629I   | G29/33I        |
| 试验例 30 | sw-G629/633I         | KM595/596NL  | G629/633I   | G33/37I        |
| 试验例 31 | sw-GG621/625LI       | KM595/596NL  | GG621/625LI | GG25/29LI      |
| 试验例 32 | sw-GG621/625IL       | KM595/596NL  | GG621/625IL | GG25/29IL      |
| 试验例 33 | sw-GG625/629LI       | KM595/596NL  | GG625/629LI | GG29/33LI      |
| 试验例 34 | sw-GG625/629IL       | KM595/596NL  | GG625/629IL | GG29/33IL      |
| 试验例 35 | sw-GG629/633LI       | KM595/596NL  | GG629/633LI | GG33/37LI      |
| 试验例 36 | sw-GG629/633IL       | KM595/596NL  | GG629/633IL | GG33/37IL      |

[0198] 如图10~12所示,在使试验例15~36的APP过量表达的任一情况下,均确认到在培养液中的ASPD形成。

[0200] 在突变为亮氨酸的1个氨基酸或2个氨基酸替换突变和异亮氨酸的这些替换突变中,上清液中的ASPD、A $\beta$ 1-40和A $\beta$ 1-42的含量未见大的差异。但是,A $\beta$ 的第33个和第37个甘氨酸二者都突变为异亮氨酸的APP(试验例30)的ASPD形成量与A $\beta$ 的第33个和第37个甘氨酸二者都突变为亮氨酸的APP(试验例23)相比显著增加。

[0201] 另外,在使2个位置突变成亮氨酸和异亮氨酸的APP(试验例31-36)中,A $\beta$ 的第33个和第37个甘氨酸突变为亮氨酸和异亮氨酸的APP(试验例35-36)的ASPD的形成量与A $\beta$ 的第33个和第37个甘氨酸二者均突变为异亮氨酸的APP(试验例30)同等程度地增加。



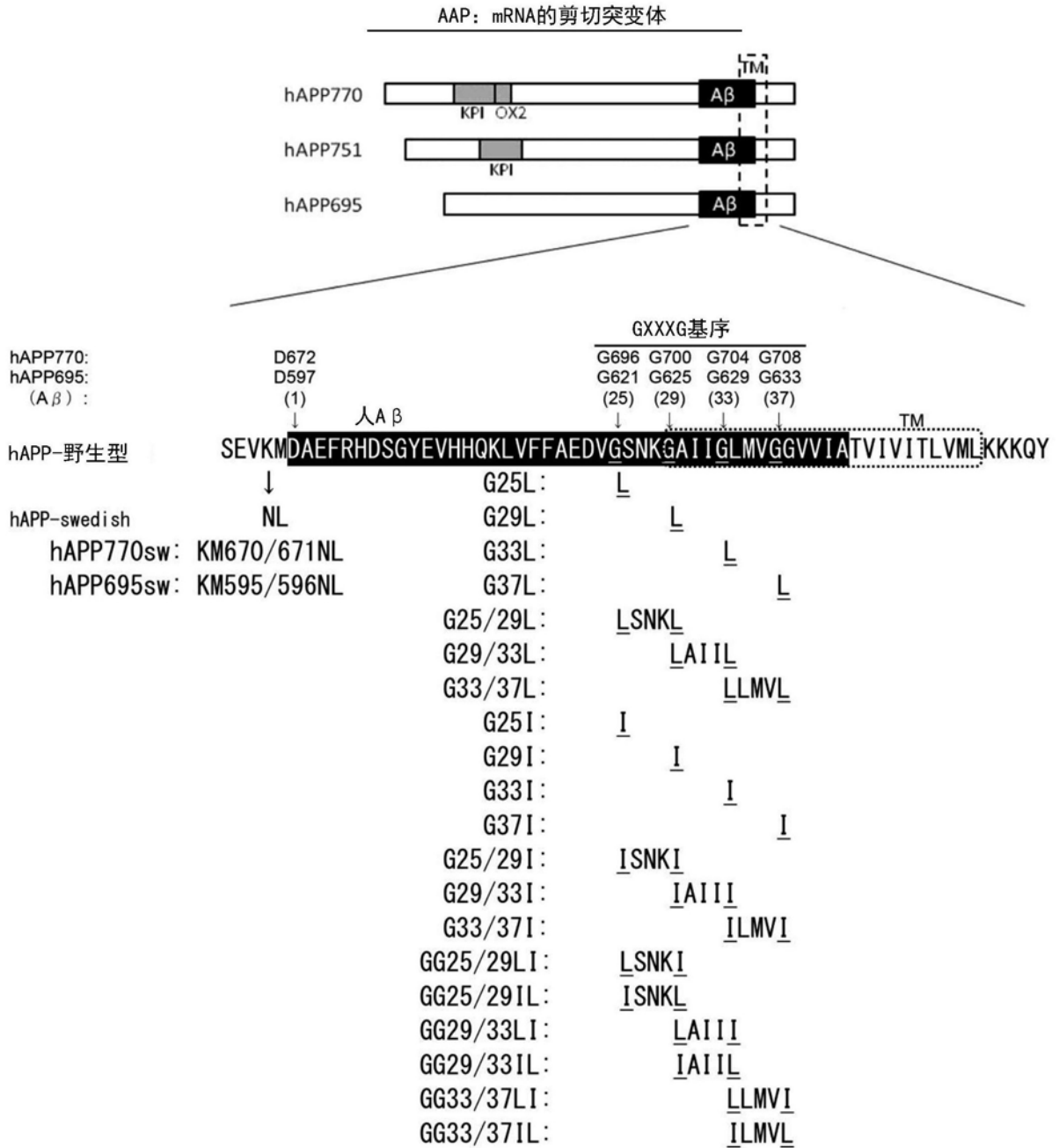


图1

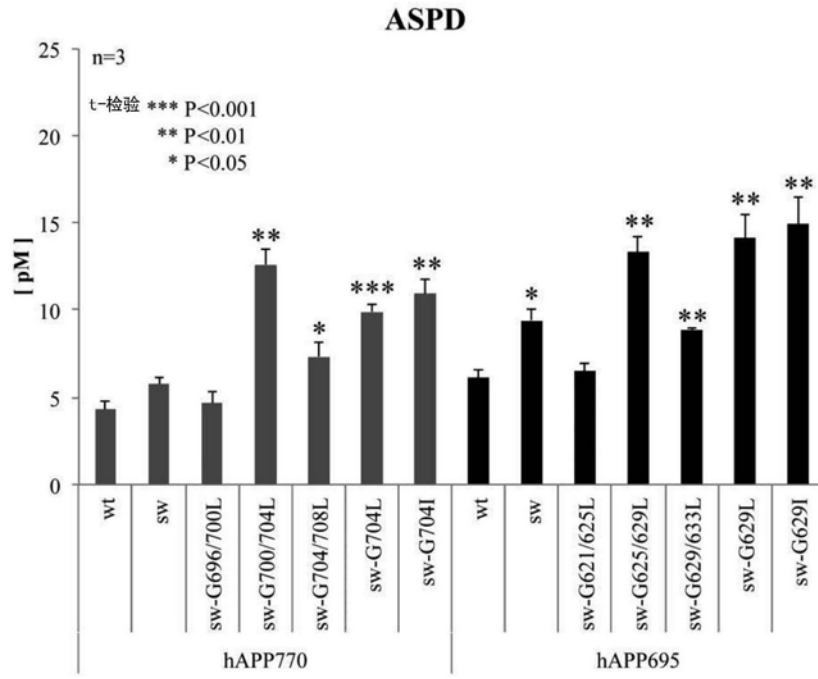


图2

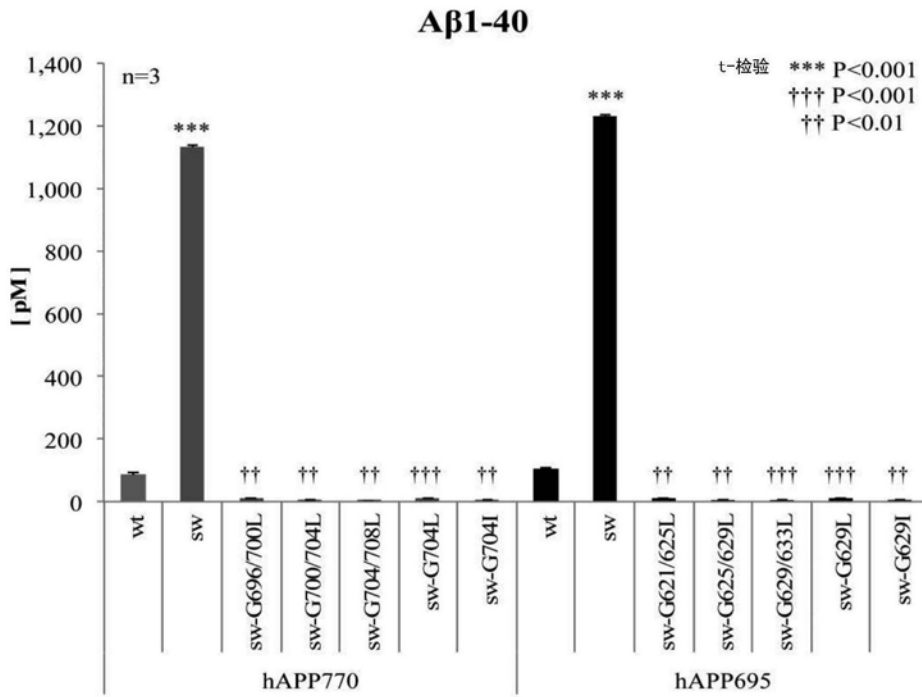


图3

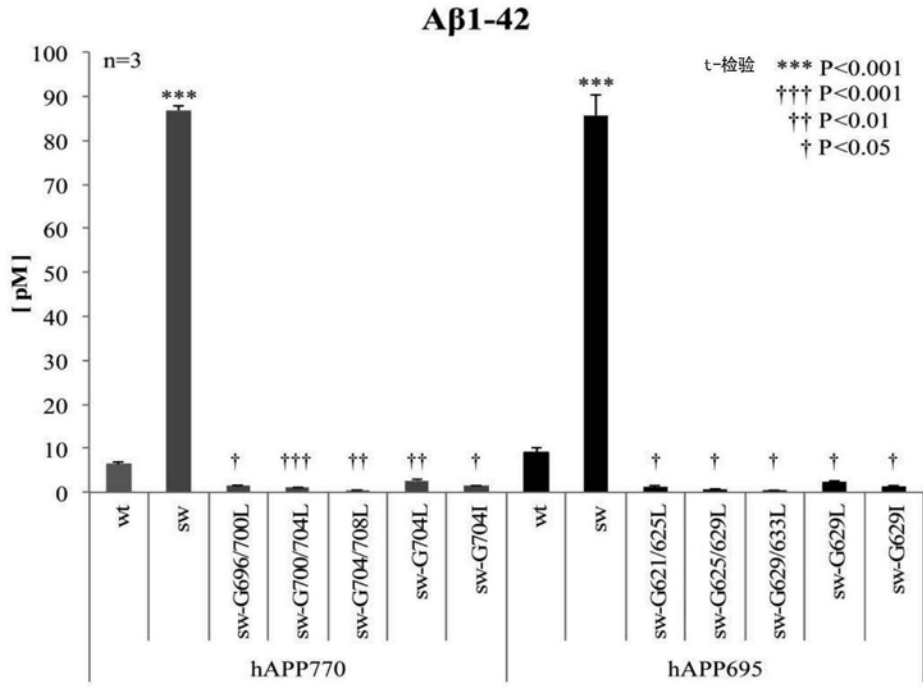


图4

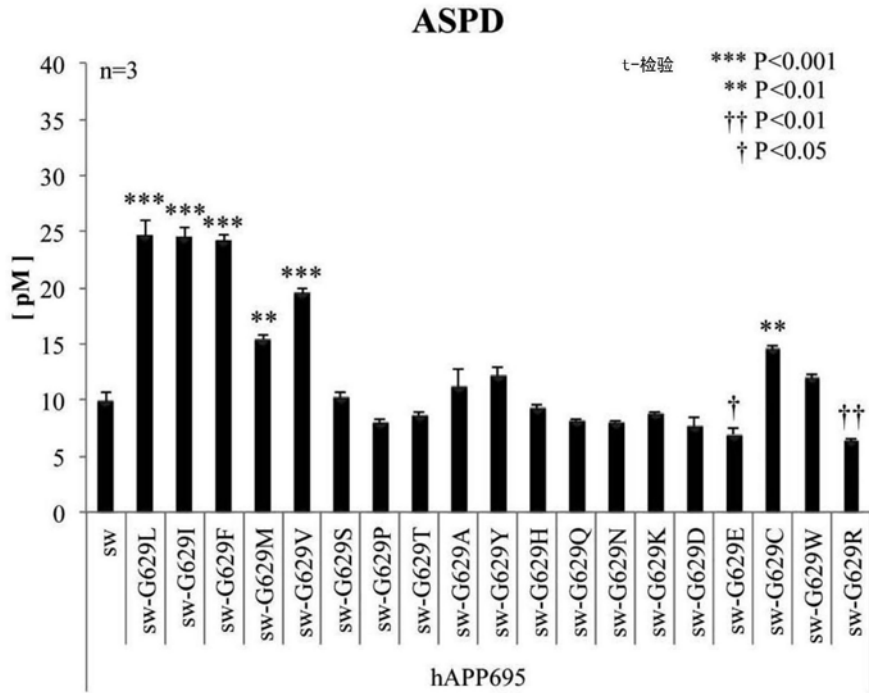


图5

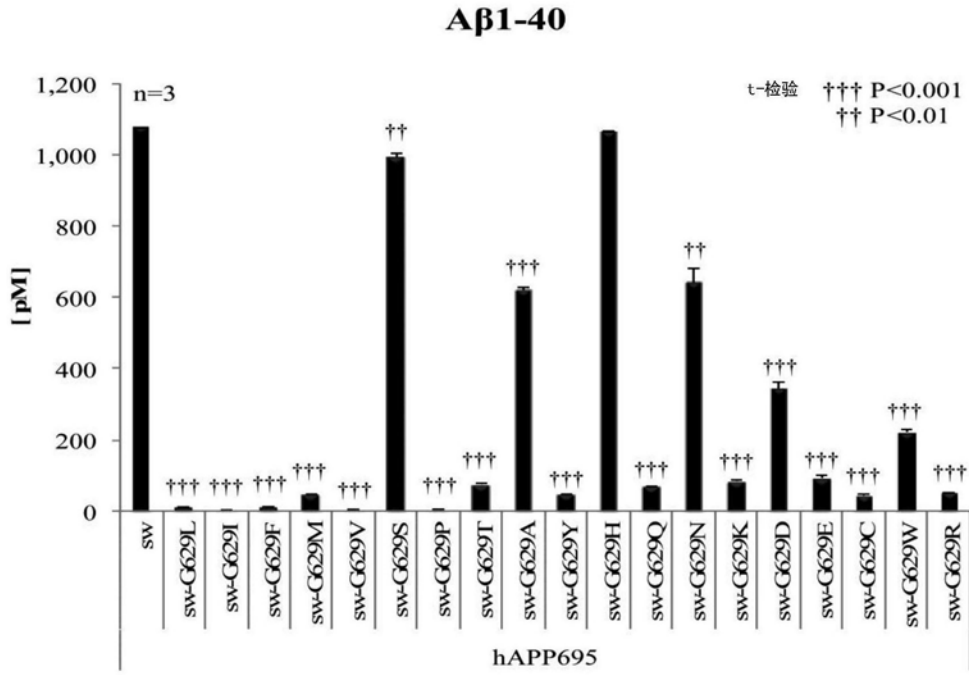


图6

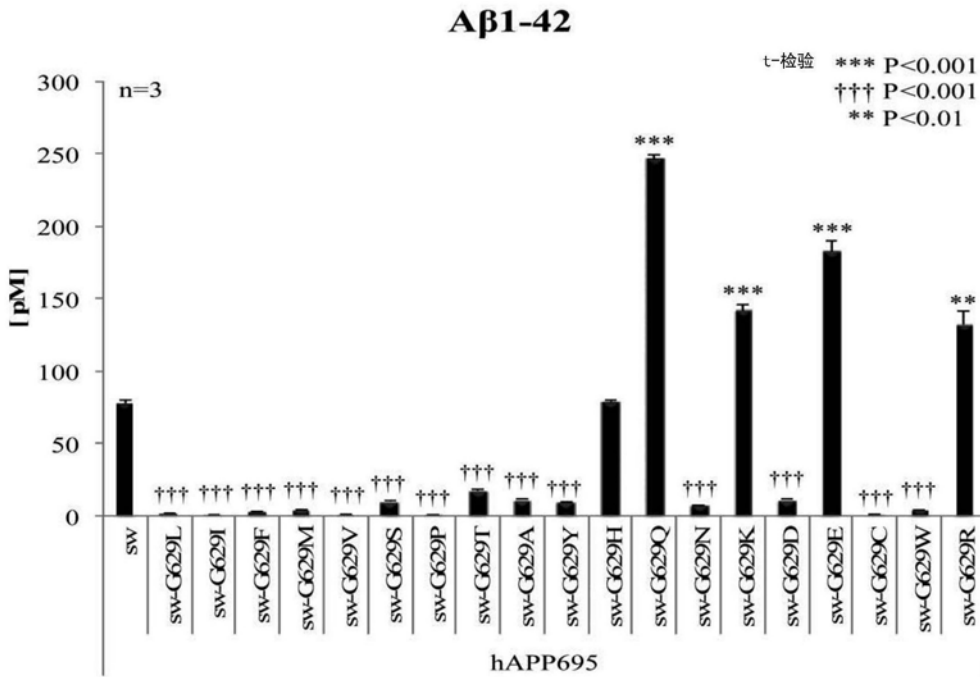


图7

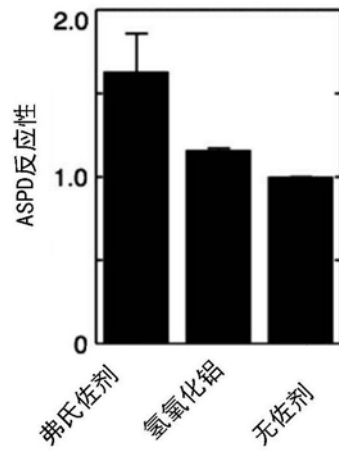


图8

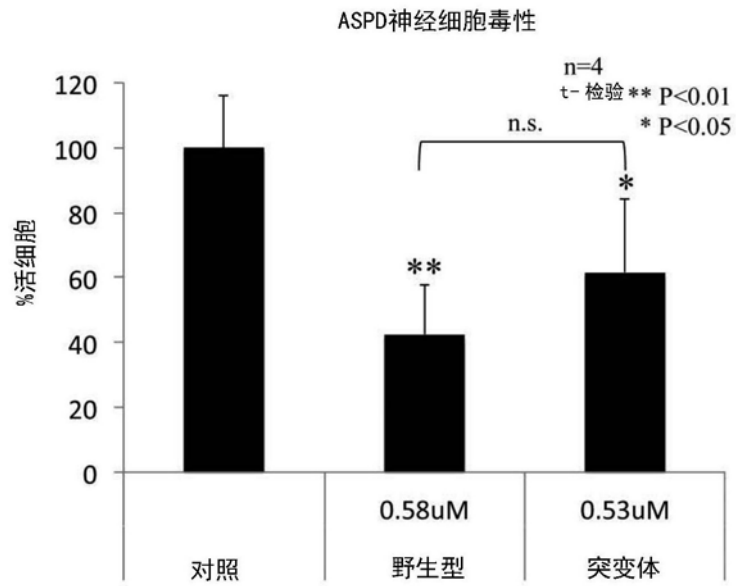


图9

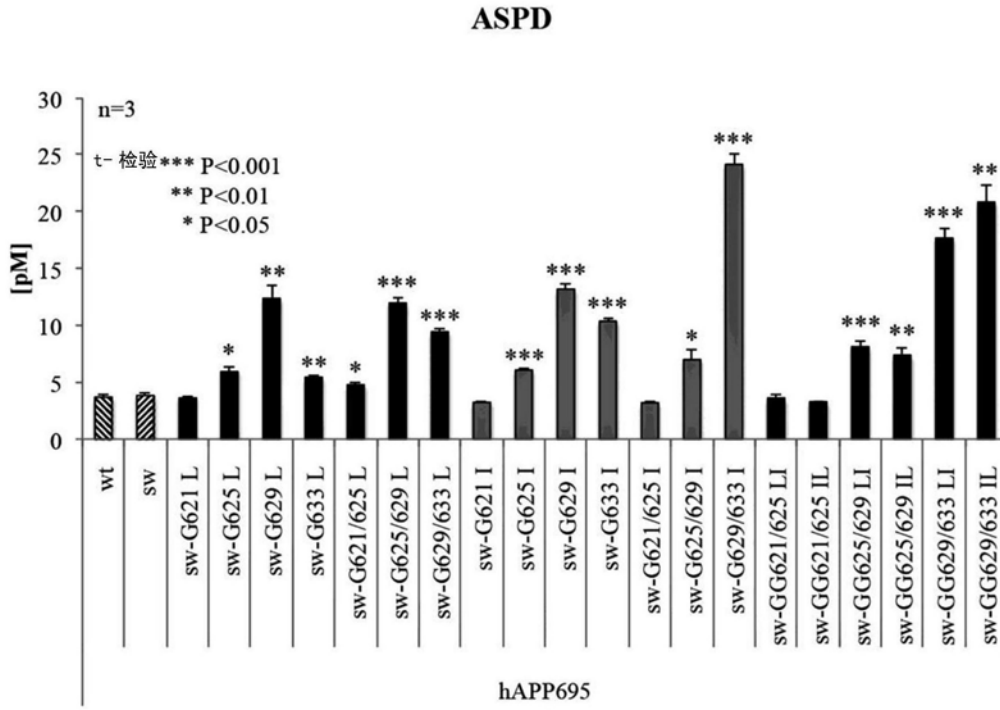


图10

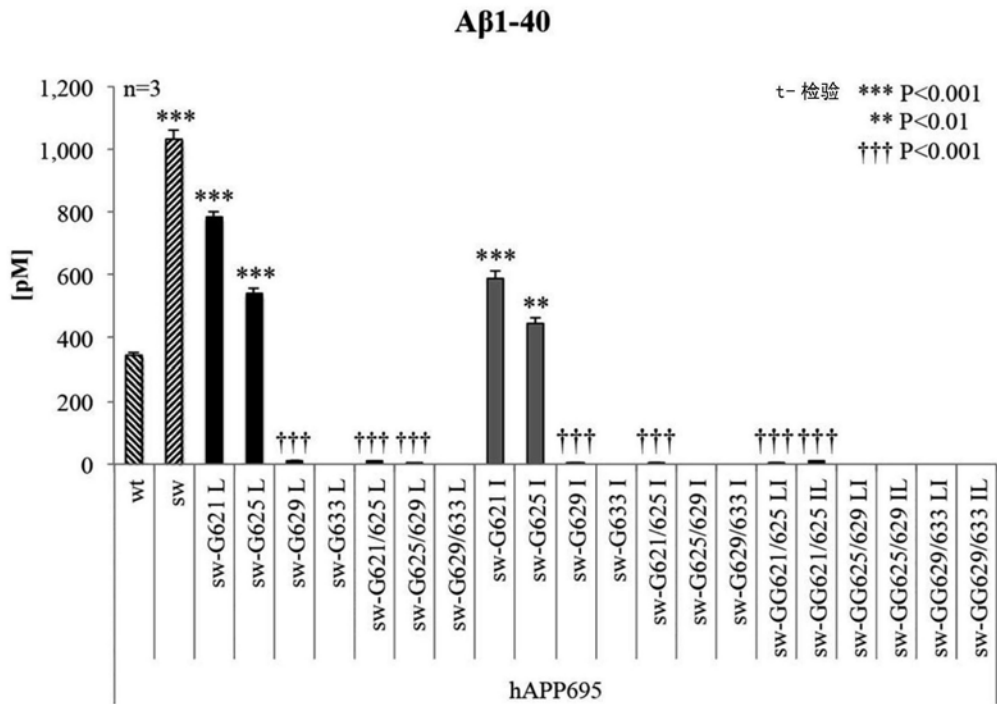


图11

Aβ1-42

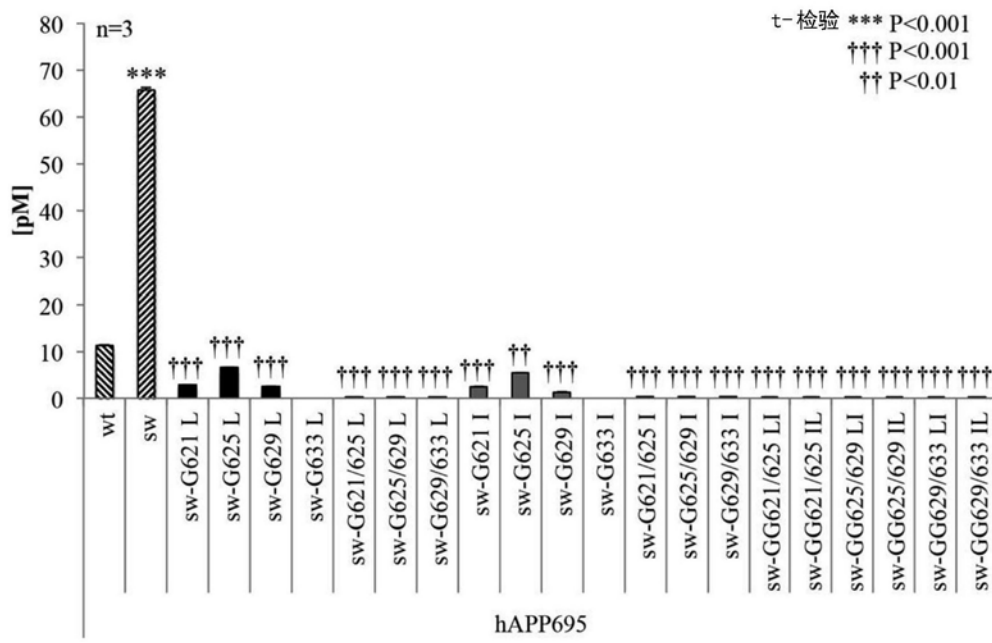


图12

|                |                                                                                                                                                                                                        |         |            |
|----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 淀粉样蛋白球体 ( ASPD ) 样结构体及医药组合物                                                                                                                                                                            |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN109072274A</a>                                                                                                                                                                           | 公开(公告)日 | 2018-12-21 |
| 申请号            | CN201780023469.9                                                                                                                                                                                       | 申请日     | 2017-04-13 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 道健康生活醫藥株式會社                                                                                                                                                                                            |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 道健康生活医药株式会社                                                                                                                                                                                            |         |            |
| 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<br>荒井由江                                                                                                                                                                                           |         |            |
| 发明人            | 星美奈子<br>荒井由江                                                                                                                                                                                           |         |            |
| IPC分类号         | C12P21/02 C07K14/47 A61K39/00 A61P25/28 A61P37/04 C12Q1/02 G01N33/53 G01N33/68                                                                                                                         |         |            |
| CPC分类号         | A61K35/12 A61K39/0007 A61P25/28 A61K39/00 C07K16/00 C12Q1/02 C12Q1/37 G01N33/50 G01N33/53 A01K67/027 A01K2267/0312 A01K2267/0318 A61K38/00 C07K14/4711 C07K16/18 G01N33/6896 G01N2333/4709 G01N2500/00 |         |            |
| 优先权            | 2016081030 2016-04-14 JP                                                                                                                                                                               |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>                                                                                                                                                         |         |            |

#### 摘要(译)

本发明提供细胞分泌型淀粉样蛋白球体样结构体及使用了该结构体的医药及疫苗以及它们的制法。本发明在一个实施方式中涉及一种制造方法，其包含下述工序：在培养液中对表达淀粉样蛋白前体蛋白(APP)或包含淀粉样蛋白β蛋白(Aβ)序列的APP的一部分的细胞进行培养，在该培养液中得到细胞分泌型淀粉样蛋白球体(ASPD)样结构体。

| 表 1    | 表达的 APP              | APP 中的突变    |           |
|--------|----------------------|-------------|-----------|
| 试验例 1  | hAPP770-野生型          | -           |           |
| 试验例 2  | hAPP770-swedish (SW) | KM670/671NL |           |
| 试验例 3  | hAPP770-sw-G25/29L   | KM670/671NL | G696/700L |
| 试验例 4  | hAPP770-sw-G29/33L   | KM670/671NL | G700/704L |
| 试验例 5  | hAPP770-sw-G33/37L   | KM670/671NL | G704/708L |
| 试验例 6  | hAPP770-sw-G33L      | KM670/671NL | G704L     |
| 试验例 7  | hAPP770-sw-G33I      | KM670/671NL | G704I     |
| 试验例 8  | hAPP695-野生型          | -           |           |
| 试验例 9  | hAPP695-swedish (SW) | KM595/596NL |           |
| 试验例 10 | hAPP695-sw-G25/29L   | KM595/596NL | G621/625L |
| 试验例 11 | hAPP695-sw-G29/33L   | KM595/596NL | G625/629L |
| 试验例 12 | hAPP695-sw-G33/37L   | KM595/596NL | G629/633L |
| 试验例 13 | hAPP695-sw-G33L      | KM595/596NL | G629L     |
| 试验例 14 | hAPP695-sw-G33I      | KM595/596NL | G629I     |