

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-532984
(P2008-532984A)

(43) 公表日 平成20年8月21日(2008.8.21)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C07K 16/18 (2006.01)	C07K 16/18 Z N A	2 G 04 1
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/00 B	4 B 02 4
G01N 33/53 (2006.01)	G01N 33/53 D	4 B 06 4
G01N 33/577 (2006.01)	G01N 33/577 B	4 B 06 5
G01N 33/543 (2006.01)	G01N 33/543 5 4 1 A	4 H 04 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 42 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-500220 (P2008-500220)
 (86) (22) 出願日 平成18年3月9日 (2006.3.9)
 (85) 翻訳文提出日 平成19年11月2日 (2007.11.2)
 (86) 國際出願番号 PCT/ES2006/070027
 (87) 國際公開番号 WO2006/095041
 (87) 國際公開日 平成18年9月14日 (2006.9.14)
 (31) 優先権主張番号 P200500550
 (32) 優先日 平成17年3月9日 (2005.3.9)
 (33) 優先権主張国 スペイン(ES)

(71) 出願人 507301176
 コンセホ スペリオール デ インベステ
 ィガシオネス シエンティフィカス
 スペイン国 エ - 28006 マドリ
 ード、カルレ セラーノ、113
 (74) 代理人 100066692
 弁理士 浅村 畏
 (74) 代理人 100072040
 弁理士 浅村 肇
 (74) 代理人 100088926
 弁理士 長沼 崑夫
 (74) 代理人 100102897
 弁理士 池田 幸弘

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】モノクローナル抗体を使用するアルツハイマー病の *in vitro* 診断の方法

(57) 【要約】

本発明は、モノクローナル抗体を用いるアルツハイマー病の *in vitro* 診断の方法に関する。前記抗体は、-アミロイドペプチドのアミノ酸 12 ~ 16 に少なくとも結合することができ、アルツハイマー病に特有な神経炎性ブラークを特異的に検出し、該疾患の特性を定義しないび慢性ブラークを検出しない。神経炎性ブラーク内で、該モノクローナル抗体は、疾患の進行の段階に関連する -アミロイドペプチドの異なる沈着イソ型の組成物における異なるサブグループを検出することができる。さらに、該抗体は、尿などの生物学的液体中の -アミロイドペプチドのイソ型に結合することができる。結果として、本発明のモノクローナル抗体、前記抗体を產生する細胞系及び同じものを含む組成物は、アルツハイマー病の *in vitro* 診断及び該疾患の進行の段階を判断するのに用いることができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- アミロイドペプチドにおいて、少なくとも配列

V a l - H i s - H i s - G l n - L y s (配列番号 3)

に対応するエピトープを認識し、前記配列を含有するヒト - アミロイドペプチドのイソ型に結合することができる、モノクローナル抗体。

【請求項 2】

アルツハイマー病に罹患した人の脳組織におけるヒト - アミロイドペプチドの沈着物に結合することができる請求項 1 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 3】

- アミロイドペプチドにおいて、少なくとも配列

V a l - H i s - H i s - G l n - L y s (配列番号 3)

に対応するエピトープを認識し、前記配列を含有するヒト - アミロイドペプチドのイソ型に結合することができる、モノクローナル抗体のフラグメント。

【請求項 4】

アルツハイマー病に罹患した人の脳組織におけるヒト - アミロイドペプチドの沈着物に結合することができる請求項 3 記載のモノクローナル抗体のフラグメント。

【請求項 5】

請求項 1 記載のモノクローナル抗体又は請求項 3 記載のモノクローナル抗体のフラグメントを産生することができるハイブリドーマ細胞系。

【請求項 6】

配列 V a l - H i s - H i s - G l n - L y s (配列番号 3) を含有する少なくとも 1 つのペプチドで免疫化した B A L B / c マウスの脾臓細胞のマウス骨髄腫系 P 3 / X 6 3 - A g . 6 5 3 との融合により得られる、請求項 5 記載のハイブリドーマ細胞系。

【請求項 7】

ペプチド A 1 - 4 0 で免疫化した B A L B / c マウスの脾臓細胞のマウス骨髄腫系 P 3 / X 6 3 - A g . 6 5 3 との融合により得られる、請求項 6 記載のハイブリドーマ細胞系。

【請求項 8】

K L H に結合したペプチド A 1 - 4 0 で免疫化した B A L B / c マウスの脾臓細胞のマウス骨髄腫系 P 3 / X 6 3 - A g . 6 5 3 との融合により得られる、請求項 7 記載のハイブリドーマ細胞系。

【請求項 9】

アルツハイマー病に罹患した人から採取した脳組織のサンプルからの前記疾患のイン・ビトロ (in vitro) 診断における、請求項 1 又は 2 に記載のモノクローナル抗体あるいは少なくとも 1 つの請求項 3 又は 4 に記載のモノクローナル抗体のフラグメントの使用。

【請求項 10】

アルツハイマー病に罹患した人から採取した脳組織のサンプルからの前記疾患のイン・ビトロ (in vitro) 診断における、 - アミロイドペプチドと異なる少なくとも 1 つの配列領域に対して特異的な少なくとも 1 つの他の抗体と組み合わせた、請求項 1 又は 2 に記載のモノクローナル抗体あるいは少なくとも 1 つの請求項 3 又は 4 に記載のモノクローナル抗体のフラグメントの使用。

【請求項 11】

抗体 E M 2 と及び / 又は抗体 E M 3 と組み合わせた、請求項 1 又は 2 に記載のモノクローナル抗体あるいは少なくとも 1 つの請求項 3 又は 4 に記載のモノクローナル抗体のフラグメントの請求項 10 記載の使用。

【請求項 12】

前記抗体又はそのフラグメントが検出されることを可能にする物質に結合した、請求項 1 又は 2 に記載のモノクローナル抗体あるいは少なくとも 1 つの請求項 3 又は 4 に記載の

10

20

30

40

50

モノクローナル抗体のフラグメントを含む、組成物。

【請求項 1 3】

モノクローナル抗体又はそのフラグメントが結合した物質が第1抗体又は抗体のフラグメントに結合することができる第2抗体であり、この第2抗体が、特定の物質の、検出することができる他の物質への変換を触媒することができる酵素に結合している、請求項12記載の組成物。

【請求項 1 4】

変換が酵素により触媒される物質が色素原である請求項13記載の組成物。

【請求項 1 5】

第2抗体がアルカリホスファターゼに結合しており、用いる色素原がニトロブルー¹⁰テトラゾリウムである、請求項13又は14に記載の組成物。

【請求項 1 6】

第2抗体が西洋ワサビペルオキシダーゼに結合しており、用いる色素原がジアミノベンジンである、請求項13又は14に記載の組成物。

【請求項 1 7】

- アミロイドペプチドと異なる少なくとも1つの配列領域に対して特異的な少なくとも1つの他の抗体を含む、請求項12～16のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 8】

検出することができる物質に結合している請求項1又は2に記載のモノクローナル抗体あるいは請求項3又は4に記載のモノクローナル抗体のフラグメント、及び同様に検出することができる種々の物質に結合している、-アミロイドペプチドと異なる1以上の配列領域に対して特異的なもう1つの抗体又は他の複数の抗体を含む、請求項17記載の組成物。²⁰

【請求項 1 9】

-アミロイドペプチドと異なる配列領域を対象とする第2抗体が抗体EM2である請求項18記載の組成物。

【請求項 2 0】

請求項1又は2に記載のモノクローナル抗体あるいは請求項3又は4に記載のモノクローナル抗体のフラグメントが、西洋ワサビペルオキシダーゼに結合している第2抗体に結合しており、色素原ジアミノベンジン(DAB)を、検出することができる変換のための物質として用い、抗体EM2が、アルカリホスファターゼに結合している第2抗体に結合しており、色素原ニトロブルー³⁰テトラゾリウムを、検出することができる変換のための物質として用いる、請求項19記載の組成物。

【請求項 2 1】

-アミロイドペプチドと異なる配列領域を対象とする第2抗体が抗体EM3である請求項18記載の組成物。

【請求項 2 2】

請求項1又は2に記載のモノクローナル抗体あるいは請求項3又は4に記載のモノクローナル抗体のフラグメントが、西洋ワサビペルオキシダーゼに結合している第2抗体に結合しており、色素原ジアミノベンジン(DAB)を、検出することができる変換のための物質として用い、抗体EM3が、アルカリホスファターゼに結合している第2抗体に結合しており、色素原ニトロブルー⁴⁰テトラゾリウムを、検出することができる変換のための物質として用いる、請求項21記載の組成物。

【請求項 2 3】

アルツハイマー病に罹患した人から採取した脳組織のサンプルからの前記疾患の診断における、請求項12～22のいずれか一項に記載の組成物の使用。

【請求項 2 4】

アルツハイマー病に罹患した人から採取した脳組織のサンプルからの前記疾患のイン・ビトロ(in vitro)診断の方法であって、前記サンプルから、少なくとも配列Val-His-His-Gln-Lys(配列番号3)を含有する-アミロイドペプチ⁵⁰

ドの少なくとも 1 つのイソ型を、その請求項 1 又は 2 に記載のモノクローナル抗体あるいは請求項 3 又は 4 に記載のモノクローナル抗体のフラグメントへの結合により検出することを含む、方法。

【請求項 25】

アルツハイマー病に罹患した人から採取した脳組織のサンプルからの前記疾患のイン・ビトロ (in vitro) 診断の方法であって、前記サンプルから、少なくとも配列 Val-His-His-Gln-Lys (配列番号 3) を含有する - アミロイドペプチドの少なくとも 1 つのイソ型を、その請求項 1 又は 2 に記載のモノクローナル抗体あるいは請求項 3 又は 4 に記載のモノクローナル抗体のフラグメントへの結合により検出することを含み、前記抗体又は抗体のフラグメントは請求項 12 ~ 22 のいずれか一項に記載の組成物中に含有される、方法。 10

【請求項 26】

アルツハイマー病に罹患した人から採取した脳組織のサンプルからの前記疾患のイン・ビトロ (in vitro) 診断の方法であって、前記サンプルから、少なくとも配列 Val-His-His-Gln-Lys (配列番号 3) を含有する - アミロイドペプチドの少なくとも 1 つのイソ型を、その請求項 1 又は 2 に記載のモノクローナル抗体あるいは請求項 3 又は 4 に記載のモノクローナル抗体のフラグメントへの結合により検出することを含み、並びに - アミロイドペプチドの少なくとも 1 つのイソ型を、その - アミロイドペプチドと異なる領域を対象とする少なくとも 1 つの第 2 抗体への結合により検出することを含み、両方の抗体又は請求項 1 又は 2 に記載のモノクローナル抗体のフラグメント及び第 2 抗体又はアミロイドペプチドと異なる領域を対象とする他の付加的な抗体は請求項 17 ~ 22 のいずれか一項に記載の組成物中に含有される、方法。 20

【請求項 27】

発明のモノクローナル抗体が結合することができる、 - アミロイドペプチドの沈着物の存在が脳組織において検出される、請求項 24 ~ 26 のいずれか一項に記載のアルツハイマー病のイン・ビトロ (in vitro) 診断の方法。

【請求項 28】

発明のモノクローナル抗体が結合することができる、 - アミロイドペプチドの沈着物の存在が、請求項 12 ~ 23 のいずれか一項に記載の組成物の使用によって脳組織において検出される、請求項 27 記載のアルツハイマー病のイン・ビトロ (in vitro) 診断の方法。 30

【請求項 29】

発明のモノクローナル抗体が結合することができる、 - アミロイドペプチドの沈着物の存在、並びに前記ペプチドと異なる領域を対象とする少なくとも 1 つの第 2 抗体が結合することができる - アミロイドペプチドの少なくとも 1 つの付加的なイソ型を含有する沈着物の存在が、請求項 17 ~ 22 のいずれか一項に記載の組成物の使用によって脳組織において検出される、請求項 28 記載のアルツハイマー病のイン・ビトロ (in vitro) 診断の方法。

【請求項 30】

生物学的液体又はそれから得られる溶液のサンプル中の可溶型のヒト - アミロイドペプチドに結合することができる、請求項 1 記載のモノクローナル抗体。 40

【請求項 31】

脳脊髄液、血液、血漿又は尿のサンプル中の可溶型のヒト - アミロイドペプチドに結合することができる、請求項 30 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 32】

尿のサンプル中の可溶型のヒト - アミロイドペプチドに結合することができる請求項 31 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 33】

生物学的液体又はそれから得られる溶液のサンプル中の可溶型のヒト - アミロイドペプチドに結合することができる、請求項 3 記載のモノクローナル抗体のフラグメント。 50

【請求項 3 4】

脳脊髄液、血液、血漿又は尿のサンプル中の可溶型のヒト - アミロイドペプチドに結合することができる、請求項 3 3 記載のモノクローナル抗体のフラグメント。

【請求項 3 5】

尿のサンプル中の可溶型のヒト - アミロイドペプチドに結合することができる請求項 3 4 記載のモノクローナル抗体のフラグメント。

【請求項 3 6】

請求項 3 0 ~ 3 2 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体又は請求項 3 3 ~ 3 5 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体のフラグメントを含む組成物であって、抗体又はそのフラグメントが、抗原 - 抗体又は抗原 - 抗体フラグメントの複合体が発生する溶液からの該抗原 - 抗体又は抗原 - 抗体フラグメントの複合体の抜き取りを促進する物質又は粒子に結合している、組成物。

10

【請求項 3 7】

抗原 - 抗体又は抗原 - 抗体フラグメントの複合体が発生する溶液からの該抗原 - 抗体又は抗原 - 抗体フラグメントの複合体の抜き取りを促進する物質又は粒子が磁性粒子である、請求項 3 6 記載の組成物。

【請求項 3 8】

抗体又はそのフラグメントと磁性粒子との結合が共有結合である請求項 3 7 記載の組成物。

20

【請求項 3 9】

生物学的液体又はそれから得られる溶液のサンプルからのアルツハイマー病のイン・ビトロ (in vitro) 診断における、請求項 3 0 ~ 3 2 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体又は請求項 3 3 ~ 3 5 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体のフラグメントの使用。

【請求項 4 0】

モノクローナル抗体又はそのフラグメントが、請求項 3 6 ~ 3 8 のいずれか一項に記載の組成物に含有される、請求項 3 9 記載の使用。

30

【請求項 4 1】

モノクローナル抗体又はそのフラグメントが請求項 3 8 記載の組成物に含有される請求項 4 0 記載の使用。

【請求項 4 2】

生物学的液体又はそれから得られる溶液のサンプル中に存在する - アミロイドペプチドの型と抗原 - 抗体又は抗原 - 抗体フラグメントの複合体を形成するために、請求項 3 8 記載の組成物を生物学的液体又はそれから得られる溶液のサンプルに加える、請求項 4 1 記載の使用。

40

【請求項 4 3】

抗原 - 抗体又は抗原 - 抗体フラグメントの複合体が発生する生物学的液体又は溶液からの形成した該抗原 - 抗体又は抗原 - 抗体フラグメントの複合体の抜き取りが磁界の使用によってもたらされる、請求項 4 2 記載の使用。

【請求項 4 4】

抗原 - 抗体又は抗原 - 抗体フラグメントの複合体の形で生物学的液体又はそれから得られる溶液から抜き取られる - アミロイドペプチドの型を、それらが発生した生物学的液体又は溶液からのそれらの抜き取りの後、それらの同定及び / 又は定量を受ける前に抗体又は抗体のフラグメントから分離する、請求項 4 3 記載の使用。

【請求項 4 5】

- アミロイドペプチドの型を M A L D I - T O F 質量分析により同定及び / 又は定量する、請求項 4 4 記載の使用。

【請求項 4 6】

生物学的液体のサンプルが尿のサンプルである、請求項 3 9 ~ 4 5 のいずれか一項に記載の使用。

50

【請求項 4 7】

生物学的液体又はそれから得られる溶液のサンプルからのアルツハイマー病のイン・ビトロ (in vitro) 診断の方法であつて、

a) 生物学的液体又はそれから得られる溶液のサンプルに請求項 3 7 又は 3 8 に記載の組成物を加える段階と、

b) - アミロイドペプチドの少なくとも 1 つのイソ型と組成物に含有される抗体又は抗体のフラグメントとの間で抗原 - 抗体又は抗原 - 抗体フラグメントの複合体が形成するのに十分な時間待つ段階と、

c) 溶液から抗原 - 抗体又は抗原 - 抗体フラグメントの複合体を抜き取るための磁界を印加する段階と、

d) 溶液を除去する段階と、

e) - アミロイドペプチドの分子から抗体又は抗体のフラグメントを分離する段階と、

f) 生物学的液体又はそれから得られる溶液のサンプルから抜き取られた - アミロイドペプチドのイソ型を同定し、定量する段階、

を含む、少なくとも配列 V a l - H i s - H i s - G l n - L y s (配列番号 3) を含有する - アミロイドペプチドの少なくとも 1 つのイソ型を、その請求項 3 0 ~ 3 2 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体又は請求項 3 3 ~ 3 5 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体のフラグメントへの結合により検出することを含む、方法。

【請求項 4 8】

生物学的液体のサンプルが尿のサンプルである、請求項 4 7 記載のアルツハイマー病のイン・ビトロ (in vitro) 診断の方法。

【請求項 4 9】

段階 a) で加える組成物が、モノクローナル抗体の F c 領域に存在する 1 以上の残基の修飾により、対応する磁性粒子に共有結合している請求項 3 0 ~ 3 2 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体を含む、請求項 4 8 記載のアルツハイマー病のイン・ビトロ (in vitro) 診断の方法。

【請求項 5 0】

尿のサンプルから抜き取られた - アミロイドペプチドのイソ型の同定及び定量を M A L D I - T O F 質量分析により行う、請求項 4 9 記載のアルツハイマー病のイン・ビトロ (in vitro) 診断の方法。

【請求項 5 1】

- アミロイドペプチドの分子から抗体又は抗体のフラグメントを分離する段階 e) を、トリフルオロ酢酸を含有する水性アセトニトリル中 - シアノ - 4 - ヒドロキシケイ皮酸中で行う、請求項 5 0 記載のアルツハイマー病のイン・ビトロ (in vitro) 診断の方法。

【請求項 5 2】

E C A C C 0 6 0 3 0 1 0 1 の実質的に純粹なサンプルを含む、請求項 8 に記載のハイブリドーマ細胞系。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0 0 0 1】**

本発明は、該疾患に関連する特定のペプチドと相互作用することができる抗体による神経疾患の診断、特にアルツハイマー病の診断に関する。

【背景技術】**【0 0 0 2】**

アルツハイマー病 (A D) は、脳のニューロンの死を引き起こす神経疾患である。一般的に、アルツハイマー病は、徐々に進行するものであり、50 歳以後に発症し、その最初の症状は高齢又は通常の健忘症に帰せられることがある。疾患が進行するにつれて、決定を下し、毎日の仕事を行う能力を含む認知能力の緩やかな低下があり、人格の変化並びに行動上の問題がある可能性がある。その進展した段階では、A D は痴呆及び最終的に死亡

をもたらす。現在のところ、該疾患は、不治であり、主要な死亡原因を構成する。

【0003】

現在のところ、確定診断は、脳組織におけるその独特の特徴の存在を明らかにする、脳サンプル（剖検又は生検）の組織学的検査に基づいて行うことができるにすぎないので、アルツハイマー病は通常、臨床像から診断されている。生存患者における脳生検に伴うリスクを考慮して、この方法は非常にまれにしか用いられておらず、したがって、この疾患の in vivo 診断の過誤率は約 20 ~ 30 % であると推定されている。

【0004】

アルツハイマー病の人の脳は、plaques (び漫性plaques及び神経炎性plaques、これらの最後に言及した形態が該疾患に特有のものであり、それらがニューロンの間及び内部に出現するので、それとして称される) の形態及び血管沈着物 (脳血管の壁に発生する) の形態の 2 つの主要な病理学的マーカー、すなわち、神経原線維変性 (線維状封入体、異常神経線維及び神経網糸状体の存在により確認される) 及びアミロイド物質の沈着物 (すなわち、いわゆる - アミロイドペプチド (一般的に A と略記される) の沈着物) を示す。神経原線維変性及びアミロイド沈着は、脳の正常な老化にも関連する変性過程を構成する。痴呆に罹患していない高齢対象において、A ペプチドは主としてび漫性plaquesの形態で沈着する。この種の沈着は、正常な認知能力を有する一部の対象において特に顕著であり、一部の著者にとっては、脳の正常な老化と AD の中間とみなされる「病的老化」の過程を構成する [1]。神経炎性plaquesの何年もの前のび漫性plaquesの特に強い早期の発生は、アミロイド前駆体タンパク質 (-APP) の過剰発現をもたらす第 21 染色体のトリソミーに起因するダウン症候群 (DS) においても起ると思われる。正常な認知能力を有する対象の脳に少数の神経炎性plaquesが認められることがあるが、高齢において AD に罹患した脳並びに DS に罹患した脳は、大量の成熟神経炎性plaquesの発生を特徴とする [2, 3]。非原線維形の A (「プレアミロイド」と称する) [4] を含むび漫性plaquesと対照的に、血管アミロイド沈着物及び神経炎性plaquesは、原線維形の A ペプチドを含み、コンゴレッド及びチオフラビン T などのアミロイド物質の染料と反応する。

【0005】

AD における認知低下は、神経原線維変化及び皮質シナプス喪失の進行と直線的に相關する [5]。び漫性plaquesに関連する局所的なシナプス喪失は認められなかった [6]。これと対照的に、神経炎性plaquesは、シナプス密度減少、神経原線維変化及び小神経膠細胞の活性化に関連している [7]。純粋な神経原線維変化及び A の沈着は、AD の進行の十分に立証されている連續的パターンに従う [8, 9]。しかし、認知低下の程度は神経原線維変化に基づく一連の病期とよく相關する [5] が、AD の神経病理的確定診断は、それにもかかわらず、痴呆の臨床像内で患者の年齢群に従って予想されるものと比較して、新皮質連合領域における神経炎性plaquesの有意に高い密度の組織学的実証に基づいている (CERAD : アルツハイマー病の登録を確立するためのコンソーシアム (Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease) の合意基準) [10]。神経炎性plaquesの形成は AD における中心的な病原性過程であり、したがって、これらの - アミロイド沈着物の分子組成及び前記組成に関するび漫性plaquesとの差は AD の現在の研究における主な関心分野の 1 つである。

【0006】

アルツハイマー病患者の脳組織における - アミロイド沈着物の分子組成に関する知識は、近年根本的に変化した。異なる形の A ペプチドを同定することを目的とした生化学的又は免疫組織化学的方法を用いた種々の試験は、古典的な形態学的所見の分子的解釈を可能にするかなり一貫性のある全体像を提供した。最近、主要な病原体としての可溶性 A オリゴマーの新たな役割を含めるために最初の仮説が再び公式化された [12] が、アミロイド仮説 [11] と呼ばれている該疾患の統一病原理論の基礎を提供したのはこれらの試験であった。AD における A ペプチドの中心的かつ主要な病原としての役割の仮説

10

20

30

40

50

は、今や、これらの沈着物の予防又は除去に向けた新たな治療戦略につながっている。

【0007】

A D に罹患している脳において知られている A ペプチドの沈着の局所解剖学的分布及び時間順序は、A 分子のカルボキシル末端、アミノ末端又は内部セグメントに対する抗体、並びに生化学的方法による A のイソ型の分離及び精製により解明された。それらのカルボキシル末端の特徴によって特徴づけられるペプチドの組織分布は、かなり規則的なよう定義されたパターンを示す。A_{x-40} は血管沈着物における支配的な形であり、C S F (脳脊髄液) 中で遭遇する主な形であるが、A_{x-42} は脳組織沈着物 (び漫性プラーカ及び神経炎性プラーカ) 中に検出される主な形である [13]。A D、ダウン症候群 (D S) [13、14] 及び正常な老化 [1] において、A_{x-42} はび漫性プラーカの唯一の成分及び神経炎性プラーカの主な成分である。後者は、主としてそれらの中心核の領域に A_{x-40} も含むこともある。A_{x-42} は初期に沈着する形であることも確認された。

10

【0008】

A_{x-40} 及び A_{x-42} はアミノ酸 A s p 1とともにほぼ完全に始まったと最初は考えられたが、アミノ末端で修飾され、切り詰められた A ペプチドの様々な異種のイソ型がび漫性及び神経炎性プラーカの構成に関与していることが免疫組織化学的及び生化学的に十分に立証された [15]。これらのイソ型はび漫性プラーカと神経炎性プラーカとの間の分布の規則的パターンを示す傾向もあり、その結果、様々な A ペプチドの局所解剖学的分布の完全な全体像が最終的に明らかになり始めた。それにもかかわらず、び漫性プラーカを構成し、それらの各々のアミロイド沈着物の相対量が表す、ペプチドのアミノ末端の特に特性に関して、試験の間にいくつかの矛盾がある。

20

【0009】

これらの矛盾は、特に p 3 ペプチド (A₁₇₋₄₂) を含む。一部の試験で A₁₇₋₄₂ がび漫性プラーカの主成分である可能性があることが示唆されている [16] が、他の試験ではこのレベルで比較的より大量のより長い形 (A s p 1 で始まる、又はアミノ末端で切り詰められた、若しくは他の修飾イソ型) が認められた [15]。A₁₇₋₄₂ は、 - セクレターゼによる - A P P の除去により產生され (いわゆる非アミロイド生産経路)、A のより長いイソ型と全く異なる物理化学的特性を示す (後者は - セクレターゼによる - A P P の除去により產生される) が、び漫性プラーカにおけるその選択的存在は、プラーカの発生において非常に重要な病原としての意味があると思われる。

30

【0010】

G owing ら [17] は、A D に罹患したび漫性プラーカに富む脳から回収された支配的な形としての A₁₇₋₄₂ ペプチドを最初に分離した。この沈着物は、血管アミロイド沈着物又は神経炎性プラーカには認められなかった。A₁₋₁₇ を認識する市販のモノクローナル抗体 6 E 10 は、A D 及び D S に罹患した一連の脳における (新皮質でも小脳でもない) び漫性プラーカの免疫染色をもたらさなかった [18]。しかし、神経炎性プラーカが欠けた状態で、び漫性プラーカが特に豊富である線条体は、6 E 10 抗体に対して陽性であるいくつかのプラーカを示した。H P L C 及び免疫組織化学的定量法を用いて、L a l o w s k i ら [19] は A₁₇₋₄₂ は小脳のび漫性プラーカにおける総アミロイド含量の 70 % を占めるが、A₁₋₄₂ は 12 % を占め、A_{x-42} の他の切り詰められた形は 5 % 以下を占めることを示した。D S に罹患した高齢者の脳において、S a i d o ら [20] は、抗 A N (1) 抗体によるよりも特異的抗 A N 3 (p y r o G l u) 抗体によるび漫性プラーカの大きい染色を認めた。I w a t s u b o ら [15] は、アミノ末端において切り詰められ、修飾された形の A_x を認識する抗体のパネルを用いて A D に罹患した、及び D S に罹患した高齢者の一連の脳におけるび漫性プラーカを試験した。この試験は、人工産物の出現に対するホルムアルデヒドを用いた常法による固定の影響を試験できるように、免疫組織化学的検査に用いた脳組織を 70 % エタノール又は 4 % ホルムアルデヒドで固定した点が独特である。70 % エタノールで固定したすべての組織サンプルにおいて、び漫性プラーカは、A N 1 (L - A s p)、A N 1 (L -

40

50

i s o A s p)、A N 1 (D - A s p)、A N 3 (p y r o G l u)及びA X - 4 2 の存在により強く染色された。弱い染色は、A N 1 1 (p y r o G l u)及びA N 1 7 により得られた。しかし、ホルムアルデヒドで固定した物質において、一部のび漫性 プラークはA N 1 (L - A s p)で染色され、A N 1 (L - i s o A s p)又はA N 1 (D - A s p)については染色は得られなかつたが、カルボキシル末端の染色のパターンは変化しなかつた。著者らはアミノ末端の修飾はホルムアルデヒドで固定した組織の免疫染色の結果を変化させ得ることを示したが、彼らはエタノールで固定した物質においてさえA N 1 7 について弱い反応性を得た。p 3 (A 1 7 - 4 2)に対して特異的なモノクローナル抗体 [1 6] を用いて、彼らは、このペプチドの沈着は主として、扁桃、海馬及び傍海馬の領域におけるび漫性 プラーク、異栄養神経線維及び神経炎性 プラークのコロナに限られていたことを見いだした。著者らは、アミロイド物質の初期の沈着及び神経炎性 プラークの起始におけるp 3 の特異的な役割を示唆した。Tekirianら [2 1] は、ADに罹患した一連の脳及び対照において、び漫性 プラークにおけるA N 3 (ペプチド) > A N 1 (D) > A N 1 7 (L) > A N 1 (r D) の存在を示した。

【0011】

カルボキシル末端における変動に関しては、A x - 4 0 、A x - 4 2 又はA x - 4 3 に対する抗体を用いた試験において、Parvathayal [2 2] は、A C 4 0 抗体に対してのみ反応する神経炎性 プラークのサブグループ及びA C 4 0 とA C 4 2 の両方に対して反応する プラークのより大きいサブグループを見いだした。

【0012】

初期の試験で、び漫性 プラークはカルボキシル末端において高度に特異的なA のプロファイル及びアミノ末端においてかなり特異的なプロファイルを示し、後者は患者間及び脳の異なる領域間のある程度の異質性にさらされることが確認された。それらにおけるより短いA 1 7 - 4 2 ペプチドの相対的含量に関して試験の間にかなりの変動があるが、A 1 7 - 4 2 の存在は主としてび漫性 プラークに限られているようと思われる。Kidala [1 8] により実施された試験において、皮質及び皮質下領域のび漫性 プラークにおける配列 1 2 ~ 1 6 を含むA ペプチドについて染色は得られなかつた。

【0013】

全体として考えると、最先端技術 (SA) の結果は、Larner [2 3] により提案されたように、アミノ末端において特異的であるA ペプチドの形はび漫性 プラークの発生に本質的な役割を果たすことができ、そのためそれらが神経炎性 プラークに変換されることを示唆している。したがって、切り詰められたアミノ末端を有する形を特異的に検出し、したがって、び漫性 プラークと神経炎性 プラークとを明確に区別することができる抗体は、アルツハイマー病の診断におけるツールとして極めて有用である。とりわけ、カルボキシル末端で終わるアミノ酸が異なるアミロイドペプチドの異なる形の割合によって神経炎性 プラークのサブグループを区別することができるものは、特に、それらが特異的な疾患マーカーを構成する プラークのサブセットの定義に用いることができるならば、特に有用であると思われる。-アミロイドペプチドのアミノ酸 1 2 ~ 1 6 から構成された配列に対して誘導され、A 4 0 形よりA 4 2 形に対してより大きい親和力を有する本発明のモノクローナル抗体は、両特性を満たしている。

【0014】

-アミロイドペプチドの形を検出することができる抗体が特に有用である他の様は、生物学的液体中のこのペプチドの異なる形の濃度の分析によるアルツハイマー病の診断にあると思われ、生化学的パラメーターに基づいて診断を促進し、病状発現前症例又は該疾患を発現する特別のリスクがある症例を特定するために、また臨床試験に登録された患者をモニタリングするために検討されている様である。この目的のために、多くの試験が脳脊髄液 (CSF) に焦点を合わせており、患者と健常対照とを区別することを可能にするこの液体中に存在する-アミロイドペプチドの可溶性の形の濃度の変動があるかどうかを検出することを目標としている。しかし、侵襲的な手技である腰椎穿刺を用いることを必要とするCSFの分析を臨床診療におけるアルツハイマー病患者の診断及び日常的

10

20

30

40

50

モニタリングに適用することはむしろ考え難い。したがって、今までにほとんど研究が公表されていないが、他の系統の研究は、該疾患の出現及び発生と相關すると思われる生物学的マーカー（ - アミロイドペプチドの可溶性の形を含む）の血液及び尿中の濃度の変動の検討に焦点を合わせている。これらによれば、A_{x-42} 及び A_{x-40} の血漿中濃度は、ダウン症候群が存在する場合には増加するように思われ、また、正常者において年齢とともに増加する。血漿中のこれらの種の濃度の測定は現在診断に適用することができないが、A_{x-42} の血漿中濃度 (A_{x-40} の血漿中濃度はそうではない) はアルツハイマー病患者において上昇し、疾患が進展するにつれて低下する [28, 29]。患者と対照との比較試験は未だ実施されていないが、 - アミロイドペプチドの可溶性の形の存在が尿中にも検出された [30]。血漿及び尿中に検出される - アミロイドペプチドの濃度の大きさの程度が、健常者及び該疾患の異なる病期にある患者に対応するプロファイルを定義することを困難にしており、 - アミロイドペプチドの可溶性形と前記生物学的液体中に存在する他のタンパク質との可能な関連性は克服すべき他の困難であるが、これは積極的に追求されているアプローチであり、そのため、 - アミロイドペプチドを検出することを可能にするための、生物学的液体中に存在する - アミロイドペプチドの形と相互作用することができるモノクローナル抗体は、アルツハイマー病の診断における非常に有用なツールであり得る。 - アミロイドペプチドの可溶性形と相互作用し、尿などの生物学的液体中のそれらの存在を検出することができる本発明の抗体は、これらの診断技術を実施するために有用であると思われる抗体の 1 つである。さらに、それが - アミロイドペプチドのアミノ末端に近い領域に対して特異的に誘導されているという事実は、前記末端が切り詰められている形のアミノ末端を保存する - アミロイドペプチドの形の区別における問題に特有なものである。

10

20

30

【0015】

- アミロイドペプチドのアミノ末端に近い領域に対して特異的に誘導された他のモノクローナル抗体並びに A D に関する診断法におけるそれらの使用が記載された。例えば、米国特許第 4,666,829 号は、アミノ末端に最も近いアミロイドペプチドの一部に対して発生するモノクローナル抗体の生産を記載している。具体的には、配列番号 1 によって表される前記ペプチドの最初の 10 残基 (Asp - Ala - Glu - Phe - Arg - His - Asp - Ser - Gly - Tyr) を含む合成ペプチドを調製した。この抗体によって認識されるエピトープはこれらのアミノ酸 1 ~ 10 に含まれるが、本発明において請求する抗体は 12 ~ 16 のアミノ酸を含むエピトープを少なくとも認識する。このモノクローナル抗体を認識する特定の配列と本発明のそれとが異なることと同様に、確定するものは、異なる長さ及び / 又はアミノ及びカルボキシル末端の変化を有するペプチドの他の形に対する結合を考慮することなく、アミロイドペプチドのアミノ酸 1 ~ 28 により構成されているアルツハイマー病に特有なペプチドである、この特許で考慮されているものに対する用いる抗体の結合のみであるので、提案された診断技術のデザインも異なる。さらに、生物学的液体中に存在するアミロイドペプチドの形を検出するその能力を実証する実験的な証明は示されていない。

【0016】

40

さらに、特許出願 P C T WO 90/12871 は、S V 17 - 6 E 10 と称するモノクローナル抗体の調製を記載している。この抗体は、アミロイドペプチドのアミノ酸 1 ~ 17 の配列と同等であるとみなされる配列番号 2 により表されるペプチド配列 Asp - Ala - Glu - Phe - Arg - His - Asp - Ser - Gly - Tyr - Glu - Val - His - His - Glu - Lys - Leu で免疫化することにより発生する。アミノ酸 1 ~ 17 を含む領域に対する他のモノクローナル抗体は、前述の市販のモノクローナル抗体 6 E 10 であり、これは、該製品に対応するデータシートの記述 <http://www.alexis-corp.com/monoclonal:antibodies-SIG-9320/opfa.1.1.SIG-9320.386.4.1.html> に指摘されているように、特に、 - アミロイドペプチドのアミノ酸 1 ~ 17 内でアミノ酸 3 ~ 8 を含むエピトープを認識する。このエピトープは、本発明の E M S モノクロ-

50

ナル抗体の領域よりアミノ末端に近い異なる領域に対応する。それは、び漫性plaquesを染色せず、神経炎性plaques及び血管沈着物の異なる染色をもたらすことができるが、この抗体はペプチドA 42とA 40との間の親和力の差を示すと思われない。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0017】

したがって、EM5と称される本発明のモノクローナル抗体は、-アミロイドペプチドの配列における、既知の最先端技術において記述される抗体のいずれによても認識されない少なくとも1つのエピトープを認識するので、新規のツールである。したがって、本発明の抗体は、アルツハイマー病の診断における適用に有用である。本発明の抗体は、該疾患に本質的に関連しないび漫性plaquesを検出せずに、神経炎性plaquesを本質的に検出する。神経炎性plaquesのうちで、本発明のモノクローナル抗体は、-アミロイドペプチドの沈着物と比較してそれらの分子組成が異なる神経炎性plaquesのサブグループを検出することを可能にする。さらに、本発明のモノクローナル抗体は、溶液が尿などの生物学的液体である場合を含んで、溶液中に存在する-アミロイドペプチドの形に結合することが可能であり、前記ペプチドのその後の検出及び定量が可能である。

10

【0018】

本発明は、-アミロイドペプチドにおける以下の配列に対応するエピトープを認識し
、
、

V a l - H i s - H i s - G l n - L y s (配列番号3)

20

A 40イソ型に対するよりA 42イソ型に対して大きい親和力を示すが、ペプチドが可溶形、凝集形又はSDSにより変性されているかどうかにかかわりなく、前記配列を含む-アミロイドペプチドのイソ型に結合することができるモノクローナル抗体に関する。
。

20

【0019】

本発明はまた、前記配列番号3を含む-アミロイドペプチドのイソ型に結合することができる前記抗体のフラグメントに関する。

30

【0020】

本発明はまた、前記モノクローナル抗体を産生することができるハイブリドーマ細胞系に関し、また、該モノクローナル抗体の産生を可能にする条件でハイブリドーマ細胞系及び前記細胞系の培養を得ることによる前記抗体を産生する方法に関する。

30

【0021】

さらに、本発明は、配列番号3に結合することができる本発明の抗体又はその少なくとも1つのフラグメントを含む組成物に関する。本発明の組成物の可能な実施形態は、抗体又はそのフラグメントがそれを検出することができる物質に結合し、前記物質が、本発明の抗体又はそのフラグメントに結合することができ、特定の物質の検出することができる他の物質、例えば色素原への変換を触媒することができる酵素などのそれを検出することができる物質に結合している第2抗体であることである。本発明の組成物の可能な他の実施形態は、抗体又はそのフラグメントが、磁界が印加される場合に形成された抗原-抗体又は抗原-抗体フラグメント複合体の溶液の分離を可能にする磁性粒子などの溶液中に存在する-アミロイドペプチドのイソ型の抜き出しを促進するある種の物質又は粒子に結合しており、それにより、前記溶液中に存在する-アミロイドペプチドのイソ型を濃縮し、それらのその後の検出、同定及び/又は定量を促進することができるることである。
。

40

【0022】

本発明はまた、配列番号3を含む-アミロイドペプチドのイソ型を検出するための配列番号3に結合することができる本発明のモノクローナル抗体又はその少なくとも1つのフラグメントの使用に関する。検出される-アミロイドペプチドのイソ型は、個人から採取した脳組織のサンプル中に、生物学的液体のサンプルのような溶液又はそれから得られる溶液中に存在し得る、或いは-アミロイドペプチドのイソ型の可能な存在を検出す

50

ることが同様に望ましいある種の他の非生物学的種類のサンプル中にさえ含まれ得る。

【0023】

最後に、本発明は、配列番号3に結合することができる本発明の抗体又はその少なくとも1つのフラグメントを使用することによる - アミロイドペプチドのイソ型の検出に基づくアルツハイマー病の *in vitro* 診断の方法に関する。本発明の好ましい実施形態において、 - アミロイドペプチドのイソ型は個人から採取した脳組織のサンプル中に検出される。この場合、抗体又はそのフラグメントがそれらの検出を可能にできる物質に結合しており、前記物質が、本発明の抗体又はそのフラグメントに結合することができるおそらく第2抗体であり、その検出を可能にできる他の物質に結合している、本発明の組成物が特に有用であり得る。

10

【0024】

本発明の診断技術の他の好ましい実施形態において、 - アミロイドペプチドのイソ型は、溶液中、好ましくは脳脊髄液、尿又は血液などの生物学的液体のサンプルから得られる、或いは血漿などの生物学的液体から得られる溶液中に検出される。本発明のこの第2の実施形態において、抗体又はそのフラグメントが、磁界が印加される場合に、溶液から形成された抗原 - 抗体又は抗原 - 抗体フラグメント複合体の分離を可能にする磁性粒子などの溶液中に存在する - アミロイドペプチドのイソ型の抜き出しを促進するある種の物質又は粒子に結合しており、それにより、前記溶液中に存在する - アミロイドペプチドのイソ型を濃縮し、それらのその後の検出、同定及び / 又は定量を促進することが可能である、本発明の組成物を使用することが好ましい。したがって、本発明の診断の方法は以下の段階を含む。

20

a) 生物学的液体又はそれから得られる溶液のサンプルに磁性粒子に結合した配列番号3に結合することができる本発明の抗体又はその少なくとも1つのフラグメントを含む組成物を加える段階と、

b) - アミロイドペプチドの少なくとも1つのイソ型と組成物に含まれている抗体又は抗体のフラグメントとの間で抗原 - 抗体又は抗原 - 抗体フラグメント複合体が形成するのに十分な時間待つ段階と、

c) 溶液から抗原 - 抗体又は抗原 - 抗体フラグメント複合体を抜き取るための磁界を印加する段階と、

30

d) 溶液を除去する段階と、

e) - アミロイドペプチドの分子から抗体又は抗体のフラグメントを分離する段階と、

f) 生物学的液体又はそれから得られる溶液のサンプルから抜き取られた - アミロイドペプチドのイソ型を同定し、定量する段階。

40

【0025】

- アミロイドペプチドのイソ型を抜き出す溶液は、脳脊髄液のサンプル、或いは血液サンプルから得られる血漿サンプルの場合よりも得ることが簡単であるので、血液又は尿のサンプルが好ましい。血液又は血漿及び尿の間では、生物学的液体のサンプルは、侵襲的方法を使用せずに得ることができる尿サンプルであることが特に好ましい。しかし、MALDI - TOF質量分析などの - アミロイドペプチドのイソ型を同定し、定量する非常に感度の高い方法を用いることが必須である。

【0026】

本発明者らによっても開発されたポリクローナル抗体EM2及びEM3は、本発明の診断の方法における付加的ツールとしても用いることができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0027】

既に述べたように、本発明は、 - アミロイドペプチドにおける以下の配列に対応するエピトープを認識するモノクローナル抗体EM5に関する。

V a l - H i s - H i s - G l n - L y s (配列番号3)

【0028】

この配列は、ヒト - アミロイドペプチドの残基12～16の配列に対応する。したが

50

つて、前記抗体は、前記配列を含む - アミロイドペプチドのイソ型に結合することができ、それを欠くもの、例えば、いわゆる p 3 ペプチド (A₁₇₋₄₂) 及び切り詰められたアミノ末端を有する他の形 (A_{17-x}) を認識しないことが望まれる。下に示す実施例で詳細に述べるモノクローナル抗体の特性評価において、EM5は、ヒトAの配列の残基12～16を含むペプチド（この領域外の修飾を有するにもかかわらず）に結合し、前記領域を欠くペプチドを認識しないことが示されている。該領域が修飾されている場合、位置13並びに位置5及び10にアミノ酸の変化を有するペプチドA₁₋₂₈（げっ歯類）の場合と同様に、該ペプチドはもはやEM5によって認識されない。

【0029】

さらに、試験により、該抗体は、可溶性形、凝集形又は変性された（SDSで）かどうかにかかわりなく、残基12～16を含むAペプチドのイソ型に結合することが示されている。特に、下に示す実施例で述べる試験は、本発明の抗体は、脳組織のサンプル中に存在するplaquesの一部を構成する凝集した - アミロイドペプチドのイソ型、及び溶液が尿などの生物学的液体のサンプルである場合を含む、溶液中に存在する - アミロイドペプチドのイソ型に結合することができる事を示している。したがって、本発明の他の態様は、その検出及び/又はその濃縮を可能にする物質に結合した、配列番号3に結合することができる本発明の抗体又はその少なくとも1つのフラグメントを含む組成物に関し、また、アルツハイマー病の診断におけるその使用に関する。

10

【0030】

本発明の抗体又はそのフラグメントがそれを検出することを可能にする物質に結合しているとき、抗体又はそのフラグメントに結合した - アミロイドペプチドのイソ型の存在の検出及び/又はその定量は、本発明の抗体により認識される特定の配列を含む - アミロイドペプチドのイソ型に結合した抗体又はそのフラグメントの検出及び/又は定量によって可能である。本発明の好ましい実施形態において、配列番号3に結合することができる抗体又はそのフラグメントが結合している物質は、本発明のモノクローナル抗体に結合することができる第2抗体であり、第2抗体は、特定の物質の、その存在の検出を促進する特性を有する他の物質への変換を触媒することができる酵素に結合している。本発明の最も好ましい実施形態において、酵素に結合した第2抗体がDako Laboratories製のEnvisionシステムの一部であり、変換が酵素によって触媒される物質が色素原であり、反応を触媒する酵素がアルカリホスファターゼ（ニトロブルーテトラゾリウムを色素原として用いる場合）又は西洋ワサビペルオキシダーゼ（ジアミノベンジンを色素原として用いる場合）のいずれかである。

20

30

【0031】

他の可能性は、本発明の抗体又はそのフラグメントが、前記抗体又はそのフラグメントに結合した - アミロイドペプチドのイソ型の濃縮を促進する物質又は粒子に結合していることである。この実施形態は、本発明の組成物を、溶液、特に、血液又は血漿、尿又は脳脊髄液のようにそれらの濃度が低い溶液中に存在する - アミロイドペプチドのイソ型の検出及び/又は定量に用いる場合に好ましい。該物質又は粒子は、例えば、免疫沈降による前記溶液からの抗原 - 抗体複合体の容易な分離を可能にするようなものである。前記粒子の好ましい例は、本発明の抗体により認識される特定の配列を含む - アミロイドペプチドのイソ型に結合することができる本発明の抗体又はそのフラグメントに結合しているとき、抗体又はそのフラグメントに結合した - アミロイドペプチドのイソ型が、適切な磁界が印加された場合に溶液から抜き出されることを可能にする磁性粒子である。その後、 - アミロイドペプチドのイソ型は、抗体又はそのフラグメントから分離することができ、次いで、検出、同定及び/又は定量することができる。適切な方法は、特に、MALDI-TOF（マトリックス支援レーザー脱離イオン化時間飛行）として知られている質量分析である。

40

【0032】

既に述べたように、本発明の抗体により認識される特定の配列を含む - アミロイドペプチドのイソ型に結合することができる本発明の抗体又はそのフラグメント、並びにそれ

50

らのうちの少なくとも 1 つを含む組成物は、アルツハイマー病の *in vitro* 診断に用いることができる。本発明の抗体により認識される特定の配列を含む - アミロイドペプチドのイソ型に結合することができる本発明の抗体又はそのフラグメントを利用する、並びに前記抗体又は前記フラグメントを含む組成物を利用するアルツハイマー病の *in vitro* 診断の方法は、本発明の範囲内にある。前記診断は、本発明のモノクローナル抗体により認識される配列を含むアミロイドペプチドのイソ型が支配的である沈着物の存在（アルツハイマー病の発現に特有な沈着物である神経炎性ブラーク及び血管沈着物）が選択的に明らかにされる脳組織において行うことができ、支配的イソ型が本発明のモノクローナル抗体により認識される配列を欠くもの、すなわち、該モノクローナル抗体又はそのフラグメントの結合を示さないイソ型 A_{17-x} である沈着物（び漫性ブラーク）で起ることと対照的に、前記抗体により認識される特定の配列に結合することができる本発明のモノクローナル抗体又はそのフラグメントの前記沈着物に対する結合の存在を検出する。神経炎性ブラーク及び血管沈着物に対する抗体の結合は、本発明の抗体又はそのフラグメントに加えて、本発明のモノクローナル抗体に結合することができ、定義された物質の、その存在の検出を促進する特性を有する色素原などの他の物質への変換を触媒することができる酵素に結合している第 2 抗体を含むものの 1 つのような組成物により明らかにされる。脳組織における本発明の診断技術の最も好ましい実施形態において、診断の方法は、 A_{x-4_2} (EM3) 又は A_{x-4_0} (EM2) のいずれかを認識するポリクローナル抗体 EM2 及び EM3 の付加的使用により補足される。両抗体はまた、本発明の著者らのグループによって以前に開発された [24]。

【0033】

本発明の診断の他の実施形態は、脳脊髄液、尿又は血液、或いはこの最後に言及した場合においては、それから得られる血漿などの - アミロイドペプチドのイソ型を含むことが知られている生物学的液体において実施することができる。脳脊髄液を得るために穿刺が必要であるので、侵襲的方法を用いて得ることができる血漿又は尿、特に後者を使用することが好ましい。本発明の診断の方法は、本発明の抗体又はそのフラグメントに結合する - アミロイドペプチドのイソ型の濃縮を促進するある種の物質又は粒子に結合した前記抗体又はそのフラグメントを含む組成物を用いることが好ましい。既に述べたように、 - アミロイドペプチドのイソ型の濃縮を促進する粒子は、 - アミロイドペプチドのイソ型との間で形成する複合体を含む溶液に磁界の作用を受けさせると、吸引などの方法を用いて容易に廃棄することができる溶液から磁性粒子を抜き出すことができるよう、抗体又はそのフラグメントに結合している磁性粒子であることが好ましい。完全な抗体を用いる場合、磁性粒子への抗体の結合がその安定性を増大させるために共有結合によってもたらされることが特に好ましいが、抗体の結合能力を低下させないように、前記共有結合の成立はできる限り抗原結合部位を避けるようにし、したがって、結合が抗体の Fc フラグメントのヒスチジンに富むゾーン又は前記ゾーンのグリコシド鎖において優先的に起る方法が好ましい。これに関連して、Fuentés ら [26] により記載された磁性粒子に抗体を結合させる方法が特に好ましい。

【0034】

- アミロイドペプチドのイソ型の結合複合体が溶液から分離されたならば、アセトニトリル及びトリフルオロ酢酸を用いることができる、抜き取られた - アミロイドペプチドのイソ型の検出及び / 又は定量の前に抗体又はそのフラグメントの前記イソ型の分離が好ましい。尿中の - アミロイドペプチドのイソ型の濃度は通常かなり低いので、検出及び / 又は定量は、MALDI - TOF 質量分析などの非常に感度の高い方法を用いて行うことが好ましい。

【0035】

本発明の他の態様は、本発明のモノクローナル抗体を產生することができるハイブリドーマ細胞系である。本発明の好ましい実施形態において、前記細胞系は、KLH (スカシガイヘモシアニン) に結合したペプチド A_{1-4_0} で免疫化した BALB/c マウスの脾細胞のマウスミエローマ系 P3 / X63 - Ag. 653 との融合により得られる。

10

20

30

40

50

【0036】

最後に、本発明の他の態様は、ハイブリドーマ細胞から開始する本発明のモノクローナル抗体の產生及び精製の方法である。本発明の好ましい実施形態において、該方法は、前述のハイブリドーマ細胞系の生成、及び事前にプリスタンを投与した B A L B / c マウスの腹水としてそれを増殖させることを含む。モノクローナル抗体は、プロテイン A - セファロース (Pharmacia) のカラム中のアフィニティクロマトグラフィーによりこの復水から精製する。本発明の特に好ましい実施形態において、用いるハイブリドーマ細胞は、European Collection of Cell Cultures (ECACC) (CAMR、Porton Down、Salisbury、Wiltshire、United Kingdom) において 2006 年 3 月 1 日に寄託が要求され、アクセス番号 06030101 が付与された「EM5 クローン A」と称される系統からのものである。

10

【0037】

本発明及びその好ましい実施形態を以下の実施例を用いてより詳細に述べる。

【実施例】**【0038】****(実施例 1)****抗体の產生**

本発明で用いるポリクローナル抗体 EM2 及び EM5 は、以前に報告した方法 [24] で生成させた。

20

【0039】

EM5 モノクローナル抗体の產生のために以下の処置を行った。

【0040】**ハイブリドーマの生成**

B A L B / c マウスに、K L H (スカシガイヘモシアニン) に結合させ、リン酸緩衝生理食塩水 (P B S) に溶解し、同量のフロイント完全アジュバントで乳化した 40 μg のペプチド A₁₋₄₀ を皮下注射した。マウスにフロイント不完全アジュバントで隔週ごとに 3 回注射を繰り返した。融合の 3 日前に、マウスに P B S 中 25 μg の A₁₋₄₀ - K L H を腹腔内注射した。融合当日に、マウスミエローマ系 P 3 / X 6 3 - A g . 6 5 3 で免疫化した動物の脾細胞を確立された方法 [25] に従ってポリエチレングリコール 1400 (S i g m a) を用いて融合させた。融合細胞を 1 ウエル当たり 105 細胞の密度で無菌の 96 ウエルプレートに分配し、ヒポキサンチン、チミジン及びアミノブテリンを含む培地内で選択した。抗体産生ハイブリドーマは、後に述べる E L I S A により同定した。

30

【0041】**ハイブリドーマのスクリーニング**

ポリスチレン製マイクロタイタープレート (M a x i s o r b、N u n c) を炭酸緩衝液 50 mM、pH 9.6 (被覆緩衝液) 中 5 μg / ml の A₁₋₄₀ で 4 度一夜被覆した。プレートを P B S 中 0.05% の T w e e n 2 0 (P B S - T) で洗浄し、非特異的結合部位を P B S - T 中 2% のウシ血清アルブミン (B S A) (ブロッキング溶液) で 37 度 1 時間ブロックした。洗浄後、プレートを、ブロッキング溶液で 2 倍に希釈した組織培養上清とともに 1 時間インキュベートした。プレートを再び洗浄し、西洋ワサビペルオキシダーゼ (S i g m a) を結合させたヤギ抗マウス Ig G とともに 37 度 1 時間インキュベートした。洗浄後、基質 (クエン酸緩衝液 100 mM、pH 5.0 中 0.05% o - フェニレンジアミン及び 0.015% 過酸化水素) を溶液に加えた。10 分後に 2.5 M 硫酸を用いて反応を停止させ、492 nm での吸光度をマイクロプレートリーダーにより測定した。上清が無関係のハイブリドーマ (抗グリアジン抗体) の上清について得られた値の少なくとも 2 倍の吸光度値をもたらしたハイブリドーマを選択した。特異抗体を產生したハイブリドーマを限界希釈法を用いて繰返しクローンし、ゲル免疫沈降により濃縮した細胞培養上清中のモノクローナル抗体のイソ型を特異抗血清 (S i g m a) を用

40

50

いて定量した。選択したハイブリドーマを事前にプリスタンを投与した B A L B / c マウスの腹水として増殖させた。

【0042】

モノクローナル抗体の精製

腹水からの E M 5 モノクローナル抗体をプロテイン A - セファロース (P h a r m a c i a) のカラムを用いたアフィニティクロマトグラフィーにより精製した。精製した抗体を P B S 中で十分に透析し、使用するまで - 8 5 °C で保存した。

【0043】

(実施例 2)

見かけの解離定数の計算：ペプチド A_{1 - 40} 及び A_{1 - 42} に対する親和力

N - t - ブチルオキシカルボニル法を用いて Y a l e 大学の W M K e c k プラントで合成された最近溶解した固定化ペプチド A_{1 - 40} 及び A_{1 - 42} を用いて E M 5 及び 6 E 1 0 モノクローナル抗体の親和力を検討するために E L I S A を用いた。

【0044】

ポリスチレンマイクロタイタープレート (I mm u l o n 2 、 D y n e x T e c h n o l o g y I n c . 、 C h a n t i l l y 、 V A) を炭酸 / 重炭酸緩衝液、 p H 9 . 6 中で最近溶解又は凝集した 0 . 5 μ g のペプチド A_{1 - 40} 又は A_{1 - 42} で 4 °C で 16 時間被覆した。 S u p e r b l o c k (P i e r c e C h e m i c a l C o .) でロックした後、漸増濃度の精製 E M 5 (T B S - T 中 0 ~ 0 . 5 n M 、 1 ウエル当たり 1 0 0 μ l) を A_{1 - 40} で被覆したウエルに加え、 3 7 °C で 3 時間インキュベートした。結合した E M 5 を西洋ワサビペルオキシダーゼを結合させたヤギ抗マウス I g G の F (a b ') 2 フラグメント (1 : 3 0 0 0 、 A m e r s h a m) により検出した。 3 , 3 ' , 5 , 5 ' - テトラメチルベンジジン (T M B) (B i o R a d 、 H e r c u l e s 、 C A) を用いて 15 分間反応を起こさせ、反応を 2 M 硫酸を用いて停止させ、マイクロプレートリーダー (C a m b r i d g e T e c h n o l o g y 、 W a t e r t o w n 、 M A) で 4 5 0 n m で定量した。市販の抗体 6 E 1 0 (S e n e t e k 、 P L C) の親和力を精製 I g G 抗体の調製物を用いて同様なプロトコールに従って検討した。非線型回帰分析、見かけの解離定数の推定及び F 比を計算することにより統計的有意性を見いだすためのタンパク質結合データの比較を G r a p h P a d 製の P r i s m ソフトウェア (G r a p h P a d 、 S a n D i e g o 、 C A) を用いて評価した。

【0045】

図 1 に最近溶解し、凝集させた A_{1 - 40} ペプチドに対する E M 5 及び 6 E 1 0 モノクローナル抗体の E L I S A における結合に対応する飽和曲線を示す。すべての場合に高い親和力が認められ、見かけの解離定数はピコモル範囲にあった。これらの抗体のいずれも最近調製又は凝集形の A_{1 - 40} に対する特異な親和性を示さなかった。興味深いことに、 6 E 1 0 は A_{1 - 40} 及び A_{1 - 42} に対して同等の親和力を示したが、 E M 5 は A_{1 - 42} に対して A_{1 - 40} に対するよりも大きい親和力を示した (p < 0 . 0 1) (最近調製及び凝集した A_{1 - 42} に対してそれぞれ 1 3 . 7 p M 及び 1 5 . 5 p M 、並びに最近調製及び凝集した A_{1 - 40} に対してそれぞれ 3 7 . 5 p M 及び 3 7 . 0 p M) 。

【0046】

(実施例 3)

免疫転移分析

E M 5 による A_{1 - 40} 及び A_{1 - 42} の特異的認識を検討し、免疫転移分析により E M 2 及び E M 3 ポリクローナル抗体と比較した。このために、 A_{1 - 40} ペプチド (0 . 5 μ g / レーン) を 1 6 % アクリルアミド、トリス - トリシン - S D S 中 P A G E 電気泳動に供した。 1 0 % メタノールを含む 3 - シクロヘキシリアルアミノ - 1 - プロパンスルホン酸、 p H 1 1 を用いてペプチドを 4 0 0 m A で 4 °C で 1 時間電気泳動によりポリ (フッ化ビニリデン) 膜 (I m m o b i l o n - P 、 M i l l i p o r e) に転移させた。膜を 5 % 粉末スキムミルクを含む T B S - T で 4 °C で 16 時間ロックし、次いで、 2 μ g / m l の I g G s E M 2 、 E M 3 又は E M 5 とともに室温で 1 時間インキュベートした。西洋

10

20

30

40

50

ワサビペルオキシダーゼ (A m e r s h a m) に結合させ、1 : 2 0 0 0 に希釈したヤギ抗ウサギ Ig G (E M 2 及び E M 3) 又はヤギ抗マウス Ig G (E M 5) を第2抗体として用いた。製造業者の仕様に従って化学ルミネセンス (A m e r s h a m) により免疫転移を可視化した。

【0047】

結果を図2に示す。これに見られるように免疫転移実験において、E M 5 は A_{1 - 4}₀ 及び A_{1 - 4}₂ ペプチドの両方に対する免疫反応性を示した (ELISAによって得られた結果を裏づけている) が、抗体 E M 2 及び E M 3 は、以前に記載されたように [24] それぞれペプチド A_{1 - 4}₀ 又は A_{1 - 4}₂ を認識することができたにすぎなかった。これらの結果は、E M 5 モノクローナル抗体が、SDSで処理したサンプル中で保存されている両ペプチドに共通の特定の直線エピトープに結合するという見解を裏づけている。全体として、本発明者らの結果は、E M 5 が可溶形、凝集形及び変性形 (SDSで) の A ペプチドを認識することができることを示しており、A₄₂に対するわずかな優先的な結合はおそらく該ペプチドの疎水性の増加の結果であると考えられる。

10

【0048】

(実施例4)

エピトープの位置推定

E M 5 抗体により認識された正確なエピトープの正確な位置推定のために、一連の合成 A ペプチドに対する抗体の結合を解析した。ペプチド A_{1 - 1}₆、A_{1 - 2}₈ 及び A₂₅ - ₃₅ は、Sigma (San Luis, MO) から入手し、ペプチド A_{1 - 4}₂、A_{1 - 4}₂ (E 22 Q)、A_{1 - 4}₀、A_{1 - 4}₀ (E 22 G)、A_{1 - 4}₀ (E 22 Q)、A_{1 - 2}₈ (げつ歯類)、A_{1 - 2}₈ (E 22 Q)、A_{1 - 7}₄₀、A₁₆ - ₄₂ 及び A₂₅ - ₃₅ は、N-t-ブチルオキシカルボニル法を用いてYale大学のWM Keckプラントで合成され、A₂₁ - ₂₈、A₂₁ - ₂₈ (E 22 Q)、A₃₇ - ₄₁ 及び A₃₇ - ₄₀ は、通常のFmoc法を用いてPeptide Synthesis Unit (National Biotechnology Center, Madrid) において合成された。ペプチド A₃₇ - ₄₂ 及び A₃₇ - ₄₉ の設計は、配列 C S G G S G G G (配列番号4) を有していた結合のためのシステイン残基を有するアミノ末端におけるテイルを含んでいた。すべてのペプチドを高速液体クロマトグラフィーにより逆相モードで精製し、それらの純度をMALDI-TOF質量分析により評価した。

20

【0049】

a) 抗体捕捉ELISA

試験を行うために、平底ポリスチレン製マイクロタイプレート (Immulation、Dynex Technology Inc.、Chantilly、VA) を炭酸-重炭酸緩衝液 0.1M、pH 9.6 中 1 μg / ウエルの対応する A ペプチドで 4 度 16 時間被覆した。2% BSA を含む NaCl 150 mM、トリス 20 mM、0.05% Tween 20、pH 7.4 (TBS-T) でブロックした後、E M 5 抗体の連続希釈物 (20 ~ 0.02 mg / ml の IgG フラクション) を 37 度 1 時間インキュベートした。ペルオキシダーゼに結合させた抗マウス Ig G (Sigma, San Luis, MO) を 1 : 2 0 0 0 に希釈し、37 度 30 分間適用した。反応を TMB (BioRad、CA) で発生させ、2 M 硫酸で停止し、450 nm で定量した。非特異的結合を測定し、第1抗体を除去した。

30

【0050】

結果を図3に示す。図の上部に各ペプチドと 20 μg / ml の抗体とのインキュベーションに対応して得られた吸光度値に対応する棒グラフを示す。E M 5 は、ヒト A の配列の残基 12 ~ 16 を含むペプチドに結合することが示され、この領域を欠くペプチドを認識することができなかった。さらに、この領域外の修飾を有する突然変異体 (A_{1 - 4}₂ (E 22 Q)、A_{1 - 4}₀ (A 21 G)、A_{1 - 4}₀ (E 22 G)、A_{1 - 4}₀ (E 22 Q)) は野生型ペプチドと比較したとき同様な結合を示したが、位置 5、10 及

40

50

び 13 にアミノ酸の 3 つの変化を示す A_{1 - 2 8} (げっ歯類) ペプチドは E M 5 により認識されなかった。

【 0 0 5 1 】

b) 消化し、免疫沈降させた - アミロイドペプチドの質量分析

結果を確認するために、トリプシン又は - キモトリプシンによる消化により得られた A_{1 - 4 2} 由来の一連のペプチドを、 E M 5 抗体を被覆した磁性粒子と接触させ、以下のステップを行う追加の試験を行った。

【 0 0 5 2 】

ペプチドを消化するために、 0 . 0 2 5 μ g の酵素を含む 0 . 5 μ l のトリプシン又は - キモトリプシンを、 1 μ g のペプチドを含む重炭酸アンモニウム 5 0 m M 中 - アミロイドペプチドの 1 0 μ l 分割量に加えた。インキュベーションは、 3 7 で 2 時間行った。行った消化の概略を表 1 に示す。

10

【 0 0 5 3 】

E M 5 モノクローナル抗体を磁性粒子上に固定化するために、 E M 5 の 5 μ l 分割量 (1 . 1 m g / m l) をヤギ抗マウス I g G を被覆した 5 0 μ l の D y n a b e a d s M 4 5 0 とともに室温で 2 時間インキュベートした。複合体を二方向攪拌 (ローターで) しながら P B S で 4 回洗浄した。

20

【 0 0 5 4 】

免疫沈降を行うために、トリプシン (又は - キモトリプシン) で消化した - アミロイドペプチドの 1 0 μ l 分割量を磁性粒子上に固定化した 5 0 μ l の E M 5 とともにローターで 3 7 で 1 時間インキュベートした。磁性 - 免疫沈降物複合体を同じローターで P B S で 4 回洗浄し、上清を吸引し、廃棄した。

20

【 0 0 5 5 】

消化免疫沈降 - アミロイドペプチドの質量分析のために、磁性複合体に含まれた免疫沈降ペプチドを 2 0 μ l の 5 0 % アセトニトリル / 0 . 3 % トリフルオロ酢酸を用いて遊離させた。 5 μ l のこの溶液を 5 μ l の 0 . 1 % トリフルオロ酢酸 / アセトニトリル (2 : 1) 中飽和 - シアノ - 4 - ヒドロキシケイ皮酸と混合した。次いで、容積 0 . 5 μ l のこの溶液を先細リストンレススチールプローブにのせ、室温で乾燥させた。可視化光学器械構成部分及び N₂ レーザー (3 3 7 n m) を備えたイオン源を装着した B r u k e r 製 M A L D I - T O F 質量分析計 R e f l e x I I でサンプルを測定した。質量スペクトルは、リニアディテクタで 2 8 . 5 k V 及び 1 . 5 k V の加速電圧でポジティブリニアモードで記録し、放射束密度閾値以下の 2 0 0 レーザー単一ショットスペクトルを累積した。 3 ~ 5 選択入射点から放射された高強度の良好な分解能を有する質量シグナルのみを考慮に入れた。すべての M A L D I スペクトルをペプチドの標準化混合物 [アンジオテンシン I I (1 0 4 7 . 2) 、副腎皮質刺激ホルモンの 1 8 ~ 3 9 フラグメント (2 4 6 6 . 7) 及びインスリン (5 7 3 4 . 6) ; S i g m a] を用いて外部較正した。

30

【 0 0 5 6 】

分析したペプチドの特性並びに得られたデータを以下の表 1 に要約する。

【 0 0 5 7 】

【表1】

表1- β -アミロイドペプチドの消化により得られたフラグメントの
MALDI-TOF質量分析データ

フラグメント番号	含まれていたアミノ酸	用いた酵素	実験的質量(m/z)	予測値(m/z)
1	1-16	トリプシン	1956.57	1955.0
2	1-17	α -キモトリプシン	2067.37	2068.2
3	5-17	α -キモトリプシン	1606.62	1605.7
4	6-16	トリプシン	1337.12	1336.4
5	11-17	α -キモトリプシン	888.66	890.0

【0058】

これらのペプチドの各々(1～5)及び消化を行わなかったペプチド(6)の配列を図4に示す。図において免疫沈降物質のMALDI-TOF質量分析の結果により、EM5抗体によって認識されたエピトープに対応すると思われるゾーンに陰影を付した。

【0059】

前記図4でわかるように、MALDI-TOF質量分析による免疫沈降物質の分析は、EM5が消化混合物から残基11～16(陰影を付した領域)を含むペプチドの各フラグメントを抜き出すことができたことを示す。この領域外のペプチドのフラグメントは溶液から回収されなかった。これらの結果は、ELISA及び免疫転移分析によって得られたデータを確認するものである。

【0060】

結論すると、一連のAペプチドに対する抗体の差別的反応性は、EM5がAペプチドの残基11～16を認識することを示している。とりわけ、げっ歯類A₁₋₂₈ペプチド(1～28R)における残基12の突然変異は抗体によるその認識を阻害するという事実によって示されるように、残基12～16の関与が基本的である。得られたデータからは十分には確認されていないが、その一部として、エピトープのコンフォーメーションにおける残基11(E)の関与は除外することはできない。

【0061】

(実施例5)

免疫組織化学：抗体の組織反応性

び漫性plaqueに対立するものとしてのアルツハイマー病に特有の沈着物(神経炎性plaques及び血管沈着物)を明らかにするためのEM5抗体の妥当性を実証するために、アルツハイマー病に罹患した脳組織の切片の免疫染色を、抗体EM2(A₄₀ペプチドのカルボキシル末端に対するポリクローナル抗体)、EM3(A₄₂ペプチドのカルボキシル末端に対するポリクローナル抗体)及びEM5(Aペプチドの残基12～16に対する特異性が実証されたモノクローナル抗体)を用いて行った。EM2及びEM3は、初期の試験[24]で用いた。

【0062】

脳組織の処理及び免疫組織化学に選択した部位

脳組織は、Tissue Bank for Neurological Investigations(Madrid)により供給された。明確なADを有する男性3例、女性3例の6例の対象を試験に含めた。それらの年齢範囲は、68～75歳であった。すべての場合に、ADの診断はCERAD(アルツハイマー病の登録を確立するためのコン

ソーシアム(Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease) [10]の臨床病理ガイドラインに基づくものであった。いずれの患者も他の神経学的所見、例えば、パーキンソン病又は著しい血管変化を有さなかった。すべての脳を脳バンクの切断、固定及び包埋のプロトコールに従って組織学的検査用に処理した。死後期間は、10～18時間であった。剖検直後に脳の半分(大脳半球、小脳及び脳幹の中央矢状切断により得た)を4%リン酸塩で緩衝したホルムアルデヒドで固定した。3～4週間の固定後に、ADに有意な関わりのあるすべての皮質及び皮質下部位から組織のブロックを得、エタノールで徐々に脱水し、キシレンによる組織の清澄化した後、パラフィンに包埋した。すべての場合に、頭頂後頭外側皮質、側頭側方皮質(これらの2つの部位はCERADガイドライン[10]により推奨されている)、海馬、尾状核-被殼(尾状核の頭部)及び小脳半球の皮質に対応する5μm組織切片を免疫組織化学検査のために最初のパラフィンブロックから得た。非特異的アミロイド染色の対照として、アミロイド免疫組織化学用に処理したものに連続する切片について修正メテナミン-銀染色を行った。

10

【0063】

抗体及び免疫染色プロトコール

用いた一次抗体は、EM2、EM3及びEM5であった。EM2及びEM3は、初期の試験[24]で用いた。切片を一次抗体とともに室温で30分間インキュベートした。ポリクローナル抗体は、ニトロブルーテトラゾリウム(NBT)を色素原として用いてアルカリホスファターゼ(APh)を含むEnvisionシステム(Dako Laboratories)により検出し、EM5は、前述のシステム又はジアミノベンジジン(DAB)を色素原として用いて西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)を含むEnvisionシステム(Dako Laboratories)のいずれかにより検出した。共局在法の場合、ポリクローナル抗体は常にAPhを含むEnvisionシステム(色素原としてNBTを用いた)により検出だが、EM5はHRPを含むEnvisionシステム(色素原としてDABを用いた)により検出した。

20

【0064】

二重及び単一免疫染色

抗体の各対の共局在の程度並びにそれらの各々の最適作業希釈の確立の目的ための予備的操作として、第1の一次抗体としてEM5を、第2の一次抗体としてEM2又はEM3を用いた二重免疫染色法を用いた。2症例の頭頂後頭皮質の組織切片に限定した試験のこの段階中、第1の一次抗体としてのEM5の使用は、二重免疫染色法において第1の抗体として用いたとき、他の2つの抗体のマスキング効果を除外したことが立証された。両選択パラフィンブロックの連続切片において、EM5の漸増希釈物(1:50、1:100、1:500、1:1000及び1:2000)をEM2又はEM3の漸減希釈物(1:2000、1:1000、1:500、1:100及び1:50)で共局在した。EM2抗体がEM5により高度に共局在されたことが認められたので、試験の残りは、EM5及びEM3により示される反応性の異なるパターンを実証することを目的とした。この目的のために、すべての選択した部位の切片におけるその後の二重免疫染色をすべての例において第1の一次抗体としてのEM5(1:1000希釈)及び第2の一次抗体としてのEM3(1:1000希釈)の使用に限定した。さらに、同じ組織における各抗体により示される反応性のパターンのより正確な可視化のために、EM5、EM2又はEM3を一次抗体として用いて各ブロックの連続切片における単一染色を行った。試験のこの部分の主目的が抗体の間の定量的な差ではなく、免疫反応性の異なるパターンを定性的に比較することであるので、染色の結果は定量化しなかった。

30

【0065】

結果

症例のうちの1例の結果は、前述した分布とともに示した図5で確認することができる、すなわち、

(A)及び(B)：色素原としてNBTを用いて一次抗体としてのEM5(A)及びE

40

50

M3(B)で免疫染色した後頭皮質の同じゾーンの連続切片。plaquesの位置の推定を容易にするために血管(V)を標識している。EM3(B)は、び漫性plaques(DP)及び神経炎性plaques(NP)並びに血管(V)中の沈着物を明らかにしているが、EM5(A)は、び漫性plaquesに対してはそうではないが、血管及び一部の神経炎性plaquesのより強い染色をもたらす。

(C)：一次抗体としてEM3(色素原としてNBT(青色)を用いた)及びEM5(色素原としてDAB(褐色)を用いた)を用いた二重免疫染色法の高倍率の顕微鏡写真。神経炎性plaques及び血管の壁の二重免疫染色が認められる。

(D)及び(E)：EM5(D)又はEM2(E)のいずれかを用いて免疫染色した後頭皮質の同じ部位の連続切片。再び、plaquesの同定を促進するために血管(V)を標識した。血管及び神経炎性plaquesが両抗体と反応することを確認することができる。より少数の神経炎性plaquesがEM5よりEM2により染色され、び漫性plaquesはそれらのいずれとも反応しない。

(F)：後頭皮質の組織の同じ切片における一次抗体としてEM2(色素原としてNBT(青色)を用いた)及びEM5(色素原としてDAB(褐色)を用いた)を用いた二重免疫染色法による高倍率の顕微鏡写真。血管壁及び神経炎性plaquesにおける両抗体の反応性の正確な共局在が認められる。

【0066】

1例を除くすべての症例が、試験したすべての抗体と反応する顕著な軟膜及び皮質内血管アミロイド沈着物を示している。すべての陽性症例において、血管アミロイド沈着物の免疫反応性は、EM3(図5B)とよりもEM2(図(5E))及びEM5(図(5A)及び(5D))との間で顕著(より広範かつより強い)であった。EM2及びEM5は、このレベルで顕著に共局在している(図(5F))。予想通り、新皮質領域及び海馬はび漫性及び神経炎性plaquesの高い密度を示したが、小脳皮質及び線条体はび漫性アミロイド沈着物のみを示した。EM3抗体とともにインキュベートした切片は、び漫性及び神経炎性plaquesとの反応性を示した(図(5B))。それらを修正メテナミン銀法により染色した連続切片と比較したとき、EM3は各切片に存在したすべてのplaquesを染色したことが示された。さらに、EM3抗体は一部のニューロン体を染色した。EM2及びEM5は、未熟神経炎性plaques(核を含まない)及び成熟神経炎性plaques(核を含む)を染色し、再び高度の共局在を示した(図(5F))。EM2は、皮質領域においても皮質下領域においてもび漫性plaquesと反応しなかった(図(3E))。EM5及びEM2による二重免疫染色は、一部の神経炎性plaquesにおいて両抗体の共局在を示しているが、EM5を非常に低い希釈度(1:50)でインキュベートしたとき、このレベルである程度の共局在が認められたが、び漫性plaquesにおいては示していない(図(5C))。線条体の切片において豊富なEM3陽性及び漫性plaquesを示した1症例においてのみ、それらの一部が作業希釈度(1:500)でEM5によって非常にわずかに染色された。この同じ症例は、小脳皮質におけるび漫性plaquesのEM5との反応性を示さなかった。線条体及び小脳の切片が可変量のび漫性plaquesを示した他のすべての症例において、それらのいずれもEM5抗体に対して反応性でなかった。EM2もEM5も存在するすべての神経炎性plaquesを染色するとは限らないように思われた(図(5A、D)を参照)。しかし、血管アミロイド沈着物の免疫反応性の場合に認められたように、EM2又はEM5に対して反応性の神経炎性plaquesは、EM3によるより強く染色された。1症例におけるすべての抗体に対する血管の陰性及びこの同じ脳における線条体の一部のび漫性plaquesの軽度の陽性は別として、すべての症例が試験した各抗体に対して染色の同様なパターンを示すとみなすことができる。

【0067】

したがって、び漫性plaquesにおいて認められた染色のより均一なパターンと対照的に、抗体のパネルは神経炎性plaquesにおける不均一性を検出した。これは、び漫性plaquesの発生及び神経炎性plaquesへのそれらの変換の過程における実際の段階を示すことが妥当であることを実証している。EM5抗体は、EM2により染色され、EM3により様

10

20

30

40

50

々な程度に染色されたすべての構造（神経炎性plaques及び血管壁）の強い染色をもたらした。神経炎性plaquesのサブセットは、EM 2 及び EM 5 に対する反応性の高い共局在を有する血管アミロイドと同じ染色のパターンを有することが認められた。本発明は、EM 5 が $A_{<11-40}$ 又は $A_{<11-42}$ を含むすべての構造と反応するはずであることを示している。実際、ここに示したELISA結果は、最近溶解し、凝集した形のAペプチドをEM 5 抗体が認識することを示す。しかし、組織切片において、本発明者は、EM 5 に対する強い反応性のEM 2との高い共局在に加えて、ポリクローナル抗体によるよりもEM 5 による神経炎性plaques間の染色の大きい変動を認めた（AC 40）。これらの陽性plaquesにおける比較的により強い染色は、長Aペプチドの特に高い含量又はAC 40 の選択的に高い含量を有する神経炎性plaquesのサブグループを、或いは $A_{<11-40}$ 及び $A_{<11-42}$ のコード位置を示す構造（血管又はplaques）におけるEM 5 によって認識されるエピトープの特別な接近可能性さえ明らかにすると思われる。本発明の抗体は、Parvathayら[22]によって以前に検出された神経炎性plaques AC 40 (+)の同じサブセットを検出すると思われる。長Aペプチドの特に高い含量を有する神経炎性plaquesのこのサブセットは、本発明のモノクローナル抗体が検出することができるADにおけるアミロイド病変の進行における重要な里程碑であると思われる。したがって、EM 5 の使用によって、疾患の進行の段階の特異的マーカーを構成するplaquesのサブセットを定義することができる。

10

20

【0068】

（実施例6）

尿中の - アミロイドペプチドの形と反応する抗体の能力

生物学的液体中の - アミロイドペプチドの形の存在を検出するEM 5 抗体の有効性を実証するために、該尿サンプルを入手した後に - アミロイドペプチドの異なる長さの形に対応した合成ペプチドの混合物を加えた健常患者からの尿サンプル中のそれらを検出する試験を行った。このために、磁性粒子に結合させたモノクローナル抗体を尿サンプルに加え、結合したペプチドをMALDI-TOF質量分析を用いて検出した。用いた方法の詳細を下に示す。

30

【0069】

磁性粒子への抗体の結合

免疫グロブリンのグリコシド残基の緩やかな酸化によりアルデヒド基を生成させ、これを、エチレンジアミンによる修飾により表面上にアミノ基を生成させた磁性粒子と反応させることに基づく、Fuentesら[26]によって記載された方法に従って、EM 5 抗体に結合した磁性粒子を調製した。簡単に述べると、EM 5 抗体の酸化は、過ヨウ素酸ナトリウム10 mMとともに2時間インキュベートすることにより誘発し、その後、酸化抗体を4%の蒸留水中で透析した。表面上にカルボキシル基を有するEM / 100-30磁性粒子（Merck Co, France）を10 mg / mlの濃度で1MエチレンジアミンpH 4.75とともに90分間インキュベートして修飾した後、蒸留水で十分に洗浄する前に、固体EDC1(1-エチル-3-(3'-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドヒドロクロリド)を10 mMの最終濃度で加え、90分間放置して反応させた。

40

【0070】

pH 7.5のリン酸ナトリウム緩衝液150 mMに溶解した10 mgの酸化EM 5 抗体を表面上にアミノ基を有する2 mlの磁性粒子（10 mg / ml）に4%で加え、一夜インキュベートした後に抗体を磁性粒子上に固定化した。形成したシップ塩基及び未反応アルデヒド基を1 mg / mlの濃度に達するまで水素化ホウ素ナトリウムを加えてpH 8.5、4%で還元した。調製物を十分な量の蒸留水で洗浄した。固定化抗体の量は、Bradfordの方法[27]を用いて固定化の前後の上清中のタンパク質の濃度の差を定量することにより測定した。

【0071】

溶液中の - アミロイドペプチドの検出

尿などの生物学的液体のサンプル中に存在する - アミロイドペプチドのイソ型に対す

50

る結合に関するその有効性を確認する前に、本発明者らは、溶液中の - アミロイドペプチドの形に結合する本発明の抗体の能力、並びにその後の同定及び / 又は定量に進むために、磁性粒子に結合した抗体が、 - アミロイドペプチドが発生した溶液から - アミロイドペプチドの形を抜き出すことを可能にするかどうかを試験した。したがって、蒸留水に溶解した - アミロイドペプチドの形 A₁₂₋₂₉、A₁₋₄₀ 及び A₁₋₄₂ のに対応した合成ペプチドをともに蒸留水に混合して、A₁₂₋₂₉ 及び A₁₋₄₂ の 0.44 μg / μl 並びに A₁₋₄₀ の 0.11 μg / μl の最終濃度を有する混合物を得た。4 μl のこのペプチドの混合物を 981 μl の水に加えた。

【0072】

次に、水中溶液中に存在する - アミロイドペプチドの形を磁性粒子に結合した本発明の抗体を用いて分離した。溶液から分離されたペプチドの混合物の質量分析を図 6 に示す。図中部分 A は抗体で事前に処理しなかった溶液 (C tr 1.) の分析に対応し、部分 B は磁性粒子に結合した抗体 (EM5 + PM) の使用に対応する。わかるように、抗体は、溶液中の - アミロイドペプチドの形に結合し、それらと複合体を形成することができ、そのため、それらを前記溶液から分離することができる。

【0073】

尿サンプルの調製

別の日に、尿の 10 ml のサンプルを健常者から採取し、室温で 3500 rpm で 5 分間遠心分離した。尿を PBS 緩衝液中 1 M NaOH で pH 7.0 に中和した。

【0074】

- アミロイドペプチドの形 A₁₂₋₂₈、A₁₋₄₀ 及び A₁₋₄₂ のに対応した合成ペプチドをともに蒸留水中で混合して、A₁₂₋₂₈ 及び A₁₋₄₂ の 0.44 μg / μl 並びに A₁₋₄₀ の 0.11 μg / μl の最終濃度を有する混合物を得た。4 μl のこのペプチドの混合物を 981 μl の尿に加えた。

【0075】

尿中の - アミロイドペプチドの形の最終濃度は、A₁₂₋₁₈ 及び A₁₋₄₂ の場合は 1.76 μg / ml であり、A₁₋₄₀ の場合は 0.44 μg / ml であった。

【0076】

免疫沈降

EM5 モノクローナル抗体を被覆した 15 μl の磁性粒子 (PBS 緩衝液で 1 : 4 に希釈した) を、3 種の - アミロイドペプチド (A₁₂₋₁₈、A₁₋₄₀ 及び A₁₋₄₂) を含んでいた上記の 981 μl の尿サンプルとともに 37 °C で 1 時間インキュベートした。

【0077】

インキュベーションの後に、管を磁性粒子の磁気分離器に入れ、尿をピペットを用いて注意深く抜き出した。

【0078】

分離器の磁界の作用により保持された、ペプチドが結合した磁性粒子を H₂O で 3 回洗浄した。

【0079】

磁性粒子に結合したペプチドを、0.1% (v/v) のトリフルオロ酢酸 (TFA) を含む 30% (v/v) の水性アセトニトリル中 - シアノ - 4 - ヒドロキシケイ皮酸のマトリックスの 12 μl の溶液を用いて磁性粒子から分離し、MALDI - TOF 質量分析により分析した。

【0080】

質量分析による免疫沈降ペプチドの検出

- シアノ - 4 - ヒドロキシケイ皮酸のマトリックス中の免疫沈降により得られた 1.5 μl のサンプル混合物を、100 サンプルの容量を有するステンレススチールプローブに入れ、室温で 5 分間乾燥させた。

【0081】

10

20

30

40

50

サンプルは、機器のデフォルト構成を用いた P E B i o s y s t e m s 製の M A L D I - T O F 質量分析 V o y a g e r D E - P R O 用ワークステーションで測定した。質量スペクトルは、20 kV の加速電圧、75 % のコレクタ電圧、0.002 % のガイドフィラメント、150 ナノ秒の遅れ時間でポジティブレフラクタモードで記録し、闇照射を下回る個別レーザー点火の 200 スペクトルを累積した。3 ~ 5 選択入射点から放射された高強度の良好な分解能を有する質量シグナルのみを考慮に入れた。装置は、アンジオテンシン (1297 Da)、A C T H 1 ~ 17 (2094 Da)、A C T H 18 ~ 39 (2466 Da)、A C T H 7 ~ 38 (3660 Da) 及びウシインスリン (2867 Da) からなる、A p p l i e d B i o s y s t e m s (T r e s C a n t o s, M a d r i d, S p a i n) により供給された較正混合物を用いて外部較正した。

10

【0082】

図 7 に他を代表するサンプルのうちの 1 つを用いて得られたグラフを示す。尿サンプルに加えたペプチドに対応するピークを確認することができ、これは、本発明の抗体の尿サンプル中のそれらに結合する能力を実証するものである。生物学的液体のサンプルを用いて分析を行ったので、サンプル中に自然に存在し、磁性粒子に結合した抗体にも結合した他の分子に対応する他のピークも確認することができる。

【0083】

ハイブリドーマの寄託

E M 5 抗体を產生するハイブリドーマを E u r o p e a n C o l l e c t i o n o f C e l l C u l t u r e s (E C A C C) (C A M R, S a l i s b u r y, W i l t s h i r e, U n i t e d K i n g d o m) に寄託した。寄託の日付及びアクセス番号は以下のとおりである。

ハイブリドーマの名称	寄託の日付	アクセス番号
E M 5 クローン A	2006 年 3 月 1 日	06030101

【0084】

前述したように、これらのハイブリドーマ細胞は、a) K L H (スカシガイヘモシアニン) に結合した、- アミロイドペプチドのアミノ酸 1 ~ 40 を含む A_{1 - 40} と称する - アミロイドペプチドの形を免疫原として用いたマウスの免疫化の後に得られた B A L B / c マウスの脾臓リンパ球と b) 融合における不死部分として働いたマウス骨髄腫系 P 3 / X 6 3 - A g 6 5 3 の細胞の 2 種の細胞の融合によって得た。種々のクローニングが得られ、本発明者らはそれらから「E M 5 クローン A」と称されるクローニングを選択した。これは、E L I S A 型の抗体捕捉試験により確認されるペプチド A_{1 - 40} である、免疫化のために用いる抗原を特異的に認識することができる典型的 Ig G 1 抗体である「E M 5」と称するモノクローナル抗体を產生する。このクローニングは、10 % ウシ胎児血清、10 % D M S O、グルタミン 2 mM 及びピルビン酸ナトリウム 1 mM を含む R P M I 1 6 4 0 培地中、5 % C O₂ を含む雰囲気中 37 °C で、細胞の 95 % が懸濁液中で生育し、残りの 5 % が培養容器に付着する条件で増殖させた。細胞を限界希釈法により 2 回クローニングし、その後、4 × 10⁶ 細胞の分割量を取り、バイアルに入れた。細菌の非存在、マイコプラスマの非存在及び真菌の非存在の管理の後、これらのバイアルのいくつかを、それらの寄託の許可を要求した E u r o p e a n C o l l e c t i o n o f C e l l C u l t u r e s (E C A C C) に送った。

20

【0085】

(参考文献)

30

40

1. Dickson DW, Crystal HA, Mattiace LA, Masur DM, Blau AD, Davies P, Yen S. and Aronson MK. Identification of normal and pathological aging in prospectively studied nondemented elderly humans. *Neurobiol Aging* 13: 1-11 (1992).

2. Iwatsubo T, Mann DAM, Odaka A, Suzuki N and Ihara Y. Amyloid β protein (A β) deposition: A β 42(43) precedes A β 40 in Down's syndrome. *Ann Neurol* 37: 294-299 (1995). 10

3. Fukumoto H, Asami-Okada A, Suzuki N, Shimada H, Ihara Y and Iwatsubo T. Amyloid β protein deposition in normal aging has the same characteristics as that in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 148: 259-265 (1996).

【 0 0 8 6 】

4. Giaccone G, Tagliavini F, Linoli G, Bouras C, Frigerio L, Frangione B and Bugiani O. Down syndrome patients: extracellular preamyloid deposits precede neuritic degeneration and senile plaques. *Neurosci Lett* 97: 232-238 (1989).

5. Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, Hansen LA, Katzman R. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol* 30: 572-580 (1991).
10

6. Masliah E, Terry RD, Mallory M, Alford M and Hansen LA. Diffuse plaques do not accentuate synapse loss in Alzheimer Disease. *Am J Pathol* 137: 1293-97 (1990).

7. Dickson DW. The pathogenesis of senile plaques. *J Neuropathol Exp Neurol* 56: 321-339 (1997).
20

8. Braak H and Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathologica (Berl)* 82: 239-259 (1991).

9. Thal DR, Rüb U, Schultz Ch, Sassin I, Ghebremedhin S, Del Tredici K, Braak E and Braak H. Sequence of A β -protein deposition in the human medial temporal lobe. *J Neuropathol Exp Neurol* 59 (8): 733-748 (2000).
30

10. Mirra SS, Heyman A, McKeel D, Sumi SM, Crain BJ, Brownlee LM, Vogel FS, Hughes JP, van Belle G and Berg L. The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology* 41: 479-486 (1991).

11. Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genotypes, phenotype and treatments. *Science* 275(5300):630-1 (1997).
40

12. Hardy J, and Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297: 353-356 (2002).

13. Vigo-Pelfrey C, Lee D, Keim P, Lieberberg I and Schenk DB. Characterization of β -amyloid peptide from human cerebrospinal fluid. *J. Neurochem* 61: 1965-1968 (1993).

14. Iwatsubo T, Mann DAM, Odaka A, Suzuki N and Ihara Y. Amyloid β protein ($A\beta$) deposition: $A\beta$ 42(43) precedes $A\beta$ 40 in Down's syndrome. *Ann. Neurol* 37: 294-299 (1995). 10

15. Iwatsubo T, Saido TC, Mann DMA, Lee V M-Y and Trojanowski JQ. Full-length amyloid- β (1-42(43)) and amino-terminally modified and truncated amyloid- β 42(43) deposit in diffuse plaques. *Am J Pathol* 149: 1823-1830 (1996).

16. Higgins L, Murphy Jr GM, Forno LS, Catalano R and Cordell B. P3 β -amyloid peptide has a unique and potentially pathogenic immunohistochemical profile in Alzheimer's disease brain. *Am J Pathol* 149: 585-596 (1996). 20

17. Gowing E, Roher AE, Woods AS, Cotter RJ, Chaney M, Little SP and Ball MJ. Chemical characterization of $A\beta$ 17-42 peptide, a component of diffuse amyloid deposits of Alzheimer disease. *J Biol Chem* 269: 10987-10990 (1994).

18. Kida E, Wisniewski KE and Wisniewski HM. Early amyloid- β deposits show different immunoreactivity to the amino- and carboxy-terminal regions of β -peptide in Alzheimer's disease and Down's syndrome brain. *Neurosci Lett* 193: 105-108 (1995). 30

19. Lalowski M, Golabek A, Lemere A, Selkoe DJ, Wisniewski HM, Beavis RC, Frangione B and Wisniewski T. The "nonamyloidogenic" p3 fragment (amyloid β 17-42) is a major constituent of Down's syndrome cerebellar preamyloid. *J Biol Chem* 271: 33623-33631 (1994). 40

20. Saido TC, Iwatsubo T, Mann DMA, Shimada H, Ihara Y and Kawashima S. Dominant and differential deposition of distinct β -amyloid peptide species, $A\beta$ N3(peptide) in senile plaques. *Neuron*, 14: 457-466 (1995).

21. Tekirian TL, Saido TC, Markesberry WR, Russell MJ, Wekstein DR, Patel E and Geddes JW. N-terminal heterogeneity of parenchymal and cerebrovascular A β deposits. *J Neuropathol Exp Neurol* 57: 76-94 (1998).
22. Parvathy S, Davis P, Haroutunian V, Purohit DP, Davis KL, Mohs RC, Park H, Moran TM, Chan JY and Buxbaum JD. Correlation between A β x-40-, A β x-42-, and A β x-43-containing amyloid plaques and cognitive decline. *Arch Neurol* 58: 2025-2032 (2001). 10
23. Larner AJ. Hypothesis: amyloid β -peptides truncated at the N-terminus contribute to the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 20: 65-69 (1999).
24. Jimenez-Huete A, Alfonso P, Soto C, Alvar JP, Rabano A, Ghiso J, Frangione B and Mendez E. Antibodies directed to the carboxyl terminus of amyloid β -peptide recognize sequence epitopes and distinct immunoreactive deposits in Alzheimer's disease brain. *Alzheimer's Reports* 1: 41-48 (1998). 20
25. Campbell A. Monoclonal antibody technology In: '*Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*' (Eds: Burdon RH, Knippenberg PH) Elsevier, Amsterdam, p. 120-134 (1984).
26. Fuentes M, Mateo C, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R. Preparation of inert magnetic nano-particles for the directed immobilization of antibodies. *Biosensors and Bioelectronics* 20: 1380-1387. (2005) 30
27. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 278-254. (1976)
28. Mayeux R, Ong LS, Tang M-X, Manly J, Stern Y, Schupf N, Mehta PD. Plasma A β 40 and A β 42 and Alzheimer disease. Relation to age, mortality and risk. *Neurology* 61: 1185-1190. (2003). 40

29. Vanderstichele H, van Kerschaver E, Hesse C, Davidsson P, Buyse M, Andreasen N, Minthon L, Tallin A, Blennow K, Vanmechelen E. Standardization of measurement of beta-amyloid (1-42) in cerebrospinal fluid and plasma. *Amyloid* 7: 245-258. (2000).

30. Ghiso J, Calero M, Matsubara E, Govemale S, Chuba J, Beavis R, Wisniewski T, Frangione B. Alzheimer's soluble amyloid beta is a normal component of human urine. *FEBS Lett* 408: 105-108 (1997).

10

【図面の簡単な説明】

【0 0 9 0】

【図1】固定化されたAペプチドに対する抗体EM5(上部)及び6E10(下部)の結合の曲線を示す図である。両方の場合に凝集した()又は凝集しない()、A40ペプチド(塗りつぶし記号)及びA42ペプチド(中抜き記号)に対する抗体の異なる濃度(横軸; 濃度nM単位)に対応する結果を示す。各ポイントは、3回行った実験の平均値を表す。450nmにおける光学濃度(O.D.)を縦軸に示す。

【図2】合成ペプチドA1-40及びA1-42に対する抗体EM2、EM3及びEM5の免疫転移分析の結果を示す図である。

20

【図3】上は、 $20\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗体に対応する吸光度(450nmにおけるO.D.)の値を用いたELISAによる一連の合成Aペプチドに対するEM5の反応性の棒グラフであり、下は、このELISAで得られた結果によるEM5により認識されたエピトープの局在化を示す図である。1-28R=げっ歯類A1-28。カッコ内は種々の変異体。

【図4】説明における表に示した種々のタンパク質分解酵素で消化した免疫沈降-アミロイドペプチド(ペプチド1~5)の質量分析の解析により決定されたEM5モノクローナル抗体により認識されたAペプチドのエピトープの局在化を示す図である。配列6は、消化しなかった-アミロイドペプチドに対応する。

30

【図5】EM2、EM3、EM5及び前記の各々とEM5との組合せを用いたアルツハイマー病に罹患した脳組織の免疫染色を示す写真である。染色された構造は、V(血管)、DP(び漫性プラーカ)及びNP(神経炎性プラーカ)として表示する。写真は以下に対応する。(A)及び(B):色素原としてニトロブルーテトラゾリウム(NBT)を用いて一次抗体としてEM5(A)及びEM3(B)で免疫染色した後頭皮質の同じゾーンの連続切片。(C):一次抗体としてEM3(色素原:NBT)及びEM5(色素原:DAB)を用いた二重免疫染色法による高倍率の顕微鏡写真。(D)及び(E):EM5(D)又はEM2(E)のいずれかを用いて免疫染色した後頭皮質の同じ部位の連続切片。(F):EM2(色素原:ニトロブルーテトラゾリウム、NBT)及びEM5(色素原:ジアミノベンジン、DAB)を用いた二重免疫染色法による高倍率の顕微鏡写真。

40

【図6】異なる長さの-アミロイドペプチドの形のMALDI-TOF質量分析による分析で得られたグラフである。各場合に、縦軸は質量/電荷比(m/z)から得られた異なる質量(Mass.)のピークの各々に対応する相対強度(%Int.)を示す。文字Aで示し、右に「Ctrl.」と記した上のグラフは、-アミロイドペプチドのアミノ酸12~29(Pep.A.12~29)、1~40(Pep.A.1~40)及び1~42(Pep.A.1~42)を含むペプチドを含む溶液から得られた。文字Bで示し、右に「EM5+PM」と記した下のグラフは、磁性粒子に共有結合したEM5抗体及び磁界を用いることによる形成した複合体の分離を用いることによりそれらを含む溶液のペプチドの濃縮の後に得られた。右下の図は考慮しているペプチドの各々に対する抗体の

50

結合領域を表す。

【図7】 - アミロイドペプチドのアミノ酸12～28（ピークはP e p . 12～28と記す）、1～40（ピークはP e p . 1～40と記す）及び1～42（ピークはP e p . 1～42と記す）を含む付加的な量のペプチドを加え、その後サンプルを磁性粒子に共有結合したEM5抗体で処理し、形成した複合体を磁界の印加により分離した健常者の尿サンプルのMALDI-TOF質量分析による分析により得られたグラフである。縦軸は、質量/電荷比（m/z）から得られた異なる質量（M s .）のピークの各々に対応する相対強度（% I n t .）を示す。尿サンプルに加えた - アミロイドペプチドの形の各々に対応するピークを示す。

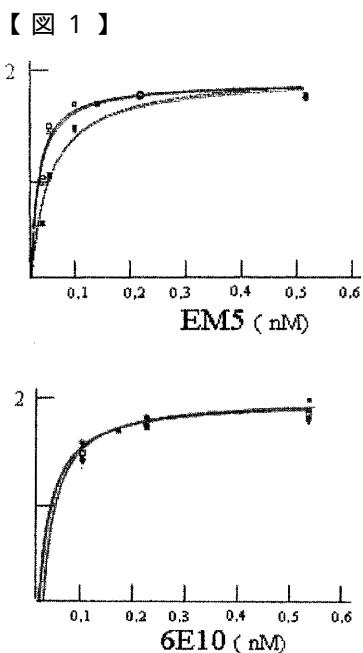


Figura 1

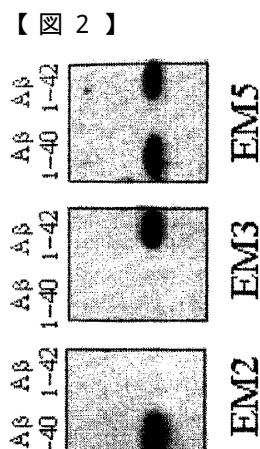
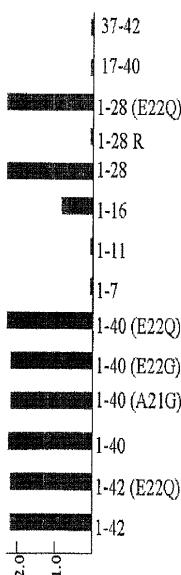


Figura 2

【図3】



【 四 4 】

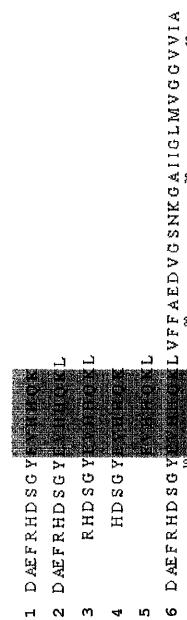


Figura 4

(5)

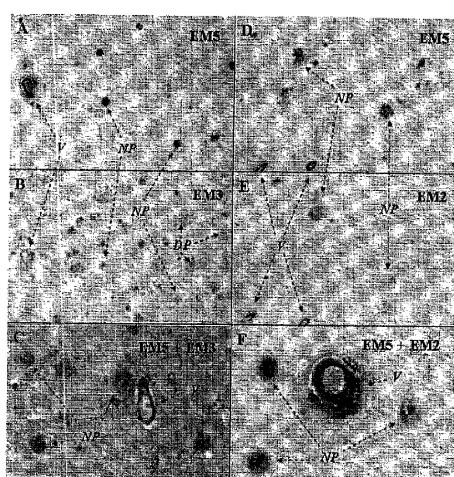


Figura 5

〔 図 6 〕

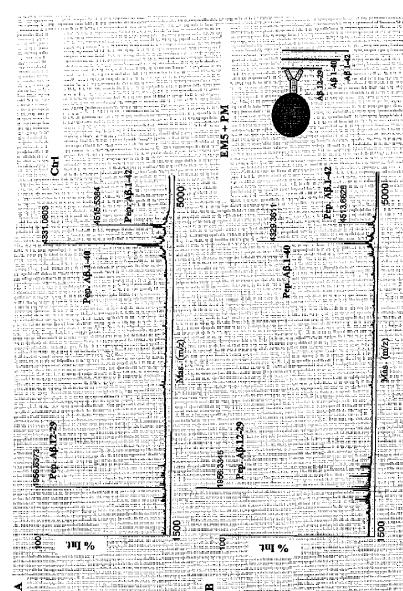


Figura 6

【図7】

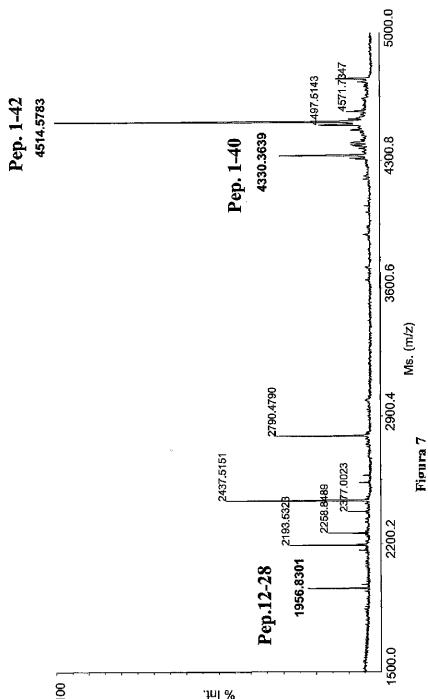


Figure 7

【配列表】

2008532984000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成19年1月17日(2007.1.17)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

- アミロイドペプチド(A)において、少なくとも配列

Val-His-His-Gln-Lys(配列番号3)

に対応するエピトープを認識し、前記配列を含むヒト-アミロイドペプチドのイソ型に結合することができるモノクローナル抗体。

【請求項2】

両方共ELISAにより測定されるA₁₋₄₂に対する結合親和力がA₁₋₄₀に対する結合親和力より大きい、請求項1記載のモノクローナル抗体。

【請求項3】

アルツハイマー病に罹患した人の脳組織におけるヒト-アミロイドペプチドの沈着物に結合することができる、請求項1又は2に記載のモノクローナル抗体。

【請求項4】

神経炎性plaques及び血管アミロイド沈着物に選択的に結合することができる、請求項3記載のモノクローナル抗体。

【請求項5】

血管アミロイド沈着物のサブセットと同様な組成を有する神経炎性plaquesのサブセットに対してより大きい結合親和力を示すことができる、請求項4記載のモノクローナル抗体。

【請求項6】

ハイブリドーマ細胞系E C A C C 0 6 0 3 0 1 0 1により產生される、請求項1～5のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。

【請求項7】

請求項1～5のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体を产生することができるハイブリドーマ細胞系。

【請求項8】

配列V a l - H i s - H i s - G l n - L y s(配列番号3)を含む少なくとも1つのペプチドで免疫化したB A L B / cマウスの脾臓細胞のマウス骨髄腫系P 3 / X 6 3 - A g . 6 5 3との融合により得られる、請求項7記載のハイブリドーマ細胞系。

【請求項9】

ペプチドA 1 - 4 0で免疫化したB A L B / cマウスの脾臓細胞のマウス骨髄腫系P 3 / X 6 3 - A g . 6 5 3との融合により得られる、請求項7記載のハイブリドーマ細胞系。

【請求項10】

K L Hに結合したペプチドA 1 - 4 0で免疫化したB A L B / cマウスの脾臓細胞のマウス骨髄腫系P 3 / X 6 3 - A g . 6 5 3との融合により得られる、請求項9記載のハイブリドーマ細胞系。

【請求項11】

E C A C C 0 6 0 3 0 1 0 1の実質的に純粋なサンプルを含む、請求項10記載のハイブリドーマ細胞系。

【請求項12】

アルツハイマー病に罹患した人から採取した脳組織のサンプルからの前記疾患のin vivo診断における、請求項1～6のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体の使用。

【請求項13】

前記疾患の進行の段階が、モノクローナル抗体へのその結合により明らかにされる神経炎性plaquesのサブセットのサンプル中の存在と相関関係にある、請求項12記載の使用。

【請求項14】

前記抗体又はそのフラグメントが検出されることを可能にする物質に結合した請求項1～6のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体を含む組成物。

【請求項15】

モノクローナル抗体が結合した物質が第1抗体に結合することができる第2抗体であり、この第2抗体が、特定の物質の、検出することができる他の物質への変換を触媒することができる酵素に結合している、請求項14記載の組成物。

【請求項16】

変換が酵素により触媒される物質が色素原である、請求項15記載の組成物。

【請求項17】

第2抗体がアルカリホスファターゼに結合しており、用いる色素原がニトロブルーテトラゾリウムである、請求項15又は16に記載の組成物。

【請求項18】

第2抗体が西洋ワサビペルオキシダーゼに結合しており、用いる色素原がジアミノベンジンである、請求項15又は16に記載の組成物。

【請求項19】

-アミロイドペプチドと異なる少なくとも1つの配列領域に対して特異的な少なくとも1つの他の抗体を含む、請求項14～18のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 20】

検出することができる物質に結合している請求項1～6のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体、及び同様に検出することができる種々の物質に結合している、-アミロイドペプチドの1つ又は複数の異なる配列領域に対して特異的な他の抗体又は他の複数の抗体を含む、請求項19記載の組成物。

【請求項 21】

-アミロイドペプチドの異なる配列領域を対象とする第2抗体が抗体EM2である、請求項20記載の組成物。

【請求項 22】

請求項1～6のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体が西洋ワサビペルオキシダーゼに結合している第2抗体に結合しており、色素原ジアミノベンジン(DAB)を、検出することができる変換のための物質として用い、抗体EM2がアルカリホスファターゼに結合している第2抗体に結合しており、色素原ニトロブルートラゾリウムを、検出することができる変換のための物質として用いる、請求項21記載の組成物。

【請求項 23】

-アミロイドペプチドの異なる配列領域を対象とする第2抗体が抗体EM3である請求項20記載の組成物。

【請求項 24】

請求項1～6のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体が西洋ワサビペルオキシダーゼに結合している第2抗体に結合しており、色素原ジアミノベンジン(DAB)を、検出することができる変換のための物質として用い、抗体EM3がアルカリホスファターゼに結合している第2抗体に結合しており、色素原ニトロブルートラゾリウムを、検出することができる変換のための物質として用いる、請求項23記載の組成物。

【請求項 25】

アルツハイマー病に罹患した人から採取した脳組織のサンプルからの前記疾患の診断における、請求項14～24のいずれか一項に記載の組成物の使用。

【請求項 26】

アルツハイマー病に罹患した人から採取した脳組織のサンプルからの前記疾患のイン・ビトロ(in vitro)診断の方法であって、少なくとも配列Val-His-His-Gln-Lys(配列番号3)を含み、神経炎性plaques及び/又は血管アミロイド沈着物に存在する-アミロイドペプチドの少なくとも1つのイソ型への請求項1～6のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体の結合により神経炎性plaques及び血管アミロイド沈着物の前記サンプル中の存在の検出を含む方法。

【請求項 27】

モノクローナル抗体が請求項14～18のいずれか一項に記載の組成物に含まれている、請求項26記載の方法。

【請求項 28】

請求項1～6のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体により検出される神経炎性plaquesの存在が疾患の進行の段階と相関関係にある、請求項26記載の方法。

【請求項 29】

モノクローナル抗体により検出される神経炎性plaquesにおける-アミロイドペプチドのA₁₋₄₀イソ型の存在が-アミロイドペプチドのA₁₋₄₀イソ型のカルボキシ末端に対して特異的な抗体の結合により確認される、請求項26～28のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 30】

-アミロイドペプチドのA₁₋₄₀イソ型のカルボキシ末端に対して特異的な抗体がEM2である、請求項29記載の方法。

【請求項 31】

さらなる神経炎性plaques及び/又はび漫性plaquesの存在が-アミロイドペプチドのA₁₋₄₂イソ型のカルボキシ末端に対して特異的な抗体の結合により検出される、

請求項 26～30 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 32】

- アミロイドペプチドの A₁₋₄₂ イソ型のカルボキシ末端に対して特異的な抗体が E M 3 である、請求項 31 記載の方法。

【請求項 33】

生物学的液体又はそれから得られる溶液のサンプル中の可溶形のヒト - アミロイドペプチドに結合することができる、請求項 1～6 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 34】

脳脊髄液、血液、血漿又は尿のサンプル中の可溶形のヒト - アミロイドペプチドに結合することができる、請求項 33 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 35】

尿のサンプル中の可溶形のヒト - アミロイドペプチドに結合することができる、請求項 34 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 36】

抗体が、抗原 - 抗体フラグメント複合体が発生する溶液からの該抗原 - 抗体フラグメント複合体の抜き取りを促進する物質又は粒子に結合している、請求項 33～35 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体を含む組成物。

【請求項 37】

抗原 - 抗体複合体が発生する溶液からの該抗原 - 抗体複合体の抜き取りを促進する物質又は粒子が磁性粒子である、請求項 36 記載の組成物。

【請求項 38】

抗体と磁性粒子との結合が共有結合である、請求項 37 記載の組成物。

【請求項 39】

生物学的液体又はそれから得られる溶液のサンプルからのアルツハイマー病のイン・ビトロ (in vitro) 診断における、請求項 33～35 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体の使用。

【請求項 40】

モノクローナル抗体が請求項 36～38 のいずれか一項に記載の組成物に含まれている、請求項 39 記載の使用。

【請求項 41】

モノクローナル抗体が請求項 38 記載の組成物に含まれている、請求項 40 記載の使用。

【請求項 42】

生物学的液体又はそれから得られる溶液のサンプル中に存在する - アミロイドペプチドの形を有する抗原 - 抗体を形成するために、請求項 38 記載の組成物を生物学的液体又はそれから得られる溶液のサンプルに加える、請求項 41 記載の使用。

【請求項 43】

抗原 - 抗体複合体が発生する生物学的液体又は溶液からの形成した該抗原 - 抗体複合体の抜き取りが磁界の使用によってもたらされる、請求項 42 記載の使用。

【請求項 44】

生物学的液体又はそれから得られる溶液から抜き取られる抗原 - 抗体複合体の形の - アミロイドペプチドの形を、それらが発生した生物学的液体又は溶液からのそれらの抜き取りの後、それらの同定及び / 又は定量を受ける前に抗体から分離する、請求項 43 記載の使用。

【請求項 45】

- アミロイドペプチドの形を M A L D I - T O F 質量分析により同定及び / 又は定量する、請求項 44 記載の使用。

【請求項 46】

生物学的液体のサンプルが尿のサンプルである、請求項 39～45 のいずれか一項に記

載の使用。

【請求項 4 7】

アルツハイマー病の進行の段階がサンプル中の A_{1 - 4₂} イソ型の濃度と相関関係にある、請求項 3 9 ~ 4 6 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 4 8】

生物学的液体又はそれから得られる溶液のサンプルからのアルツハイマー病のイン・ビトロ (in vitro) 診断の方法であつて、

a) 生物学的液体又はそれから得られる溶液のサンプルに請求項 3 7 又は 3 8 に記載の組成物を加える段階と、

b) - アミロイドペプチドの少なくとも 1 つのイソ型と組成物に含まれている抗体との間で抗原 - 抗体複合体が形成するのに十分な時間待つ段階と、

c) 溶液から抗原 - 抗体複合体を抜き取るための磁界を印加する段階と、

d) 溶液を除去する段階と、

e) - アミロイドペプチドの分子から抗体を分離する段階と、

f) 生物学的液体又はそれから得られる溶液のサンプルから抜き取られた - アミロイドペプチドのイソ型を同定し、定量する段階と

を含む、請求項 3 3 ~ 3 5 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体へのその結合により、少なくとも配列 Val - His - His - Glu - Lys (配列番号 3) を含む - アミロイドペプチドの少なくとも 1 つのイソ型の前記サンプルからの検出を含む方法。

【請求項 4 9】

生物学的液体のサンプルが尿のサンプルである、請求項 4 8 記載のアルツハイマー病のイン・ビトロ (in vitro) 診断の方法。

【請求項 5 0】

段階 a) で加える組成物が、モノクローナル抗体の Fc 領域に存在する 1 つ又は複数の残基の修飾により対応する磁性粒子に共有結合している請求項 3 0 ~ 3 2 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体を含む、請求項 4 9 記載のアルツハイマー病のイン・ビトロ (in vitro) 診断の方法。

【請求項 5 1】

尿のサンプルから抜き取られた - アミロイドペプチドのイソ型の同定及び定量を MALDI - TOF 質量分析により行う、請求項 5 0 記載のアルツハイマー病のイン・ビトロ (in vitro) 診断の方法。

【請求項 5 2】

- アミロイドペプチドの分子から抗体又は抗体のフラグメントを分離する段階 e) をトリフルオロ酢酸を含む水性アセトニトリル中 - シアノ - 4 - ヒドロキシケイ皮酸中で行う、請求項 5 1 記載のアルツハイマー病のイン・ビトロ (in vitro) 診断の方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/ ES 2006/070027
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<i>C07K 16/18 (2006.01) C07K 7/06 (2006.01) C12N 5/18 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)</i>		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
c07k, c12n, g01n		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
CIBEPAT,EPODOC, WPI, CAS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5958883 A (SNOW) 28. 09. 1999 Column 15, line 20 - column 16 line 10; seq. Id. n° 3	1- 52
Y	EP 0683234 A (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES) 04.08.1994 page 4, line 15 - page 8, line 13	1-52
A	US 4666829 A (GLENNER et al) 19.05.1987 Column 1, line 60 - column 4, line 17	1-52
A	WO 9012871 A (RESEARCH FOUNDATION FOR MENTAL HYGIENE, INC) 01.11.1990 Example 2	1-52
A	US 5688651 A (SOLOMON) 18.11.1997 The whole document	1-52
A	WO 9721728 A (KAROLIN -SKA INNOVATIONS) 19.06.1997 Page 3, line 13 - page 10, line 25	1-52
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 29 MAY 2006 (29-05-2006)		Date of mailing of the international search report 6 June 2006 (06.06.06)
Name and mailing address of the ISA/ SPTO Facsimile No.		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/ ES 2006/070027

US 5958883 A	28.09.1999	US 6340783 B	22.01.2002 22.01.2002 22.01.2002
EP 0683234 A	22.11.1995	WO 9417197 A EP 19940904758 US 5750349 A US 5955317 A EP 1308461 A EP 20020027099 AT 239797 T DE 69432629 D DE 69432629 T JP 2005170951 A	04.08.1994 24.01.1994 12.05.1998 21.09.1999 07.05.2003 24.01.1994 15.05.2003 12.06.2003 25.03.2004 30.06.2005
US 4666829 A	19.05.1987	CA 1268131 A	24.04.1990 24.04.1990 24.04.1990
WO 9012871 A	01.11.1990	AU 5439790 A	16.11.1990 16.11.1990 16.11.1990
US 5688651 A	18.11.1997	WO 9618900 A AU 4597596 A	20.06.1996 03.07.1996
WO 9721728 A	19.06.1997	AU 1072897 A EP 0866805 A EP 19960940740 US 6331440 B US 2002094957 A US 2004157781 A	03.07.1997 30.09.1998 09.12.1996 18.12.2001 18.07.2002 12.08.2004

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº PCT/ ES 2006/070027

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver hoja adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
c07k, c12n, g01n

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT, EPODOC, WPI, CAS

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
Y	US 5958883 A (SNOW) 28.09.1999 Columna 15, línea 20 - columna 16 línea 10; seq. id. nº 3	1-52
Y	EP 0683234 A (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES) 04.08.1994 página 4, línea 15 - página 8, línea 13	1-52
A	US 4666829 A (GLENNER et al) 19.05.1987 Columna 1, línea 60 - columna 4, línea 17	1-52
A	WO 9012871 A (RESEARCH FOUNDATION FOR MENTAL HYGIENE, INC) 01.11.1990 Ejemplo 2	1-52
A	US 5688651 A (SOLOMON) 18.11.1997 Todo el documento	1-52
A	WO 9721728 A (KAROLIN -SKA INNOVATIONS) 19.06.1997 Página 3, línea 13 - página 10, línea 25	1-52

En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

- * Categorías especiales de documentos citados:
- "A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.
- "E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.
- "L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de "T" prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).
- "O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.
- "P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.
- "&" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
- "X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
- "Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
- "& X" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. 29 MAYO 2006 (29-05-2006)	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional 06 JUNIO 2006 (06-06-2006)
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M. Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España. Nº de fax 34 91 3495304	Funcionario autorizado A. Collados Martín Posadillo Nº de teléfono + 34 91 349

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ ES 2006/070027

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
US 5958883 A	28.09.1999	US 6340783 B	22.01.2002 22.01.2002 22.01.2002
EP 0683234 A	22.11.1995	WO 9417197 A EP 19940904758 US 5750349 A US 5955317 A EP 1308461 A EP 20020027099 AT 239797 T DE 69432629 D DE 69432629 T JP 2005170951 A	04.08.1994 24.01.1994 12.05.1998 21.09.1999 07.05.2003 24.01.1994 15.05.2003 12.06.2003 25.03.2004 30.06.2005
US 4666829 A	19.05.1987	CA 1268131 A	24.04.1990 24.04.1990 24.04.1990
WO 9012871 A	01.11.1990	AU 5439790 A	16.11.1990 16.11.1990 16.11.1990
US 5688651 A	18.11.1997	WO 9618900 A AU 4597596 A	20.06.1996 03.07.1996
WO 9721728 A	19.06.1997	AU 1072897 A EP 0866805 A EP 19960940740 US 6331440 B US 2002094957 A US 2004157781 A	03.07.1997 30.09.1998 09.12.1996 18.12.2001 18.07.2002 12.08.2004

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES 2006/070027

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD*C07K 16/18* (2006.01)*C07K 7/06* (2006.01)*C12N 5/18* (2006.01)*G01N 33/53* (2006.01)

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
G 01 N 27/62 (2006.01)	G 01 N 27/62	V
C 12 P 21/08 (2006.01)	C 12 P 21/08	
C 12 N 15/02 (2006.01)	C 12 N 15/00	C

(81) 指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72) 発明者 メンデス、エンリケ

スペイン国、マドリッド、カントブランコ、セ/ ダーウィン ヌメロ 3、キャンパス ユニベルシダッド アウトノマ デ マドリッド、セントロ ナシオナル デ バイオテクノロジア、ウニダッ デ グルテン

F ターム(参考) 2G041 CA01 DA04 EA03 EA13 FA12 GA06 JA07 LA07 LA08
 4B024 AA11 BA44 CA04 DA02 GA05 GA18 GA27 HA03
 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 CE12 DA13
 4B065 AA91X AA92X AA93Y AB05 AC14 BA08 BA24 CA25 CA46
 4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA40 CA45 DA76 EA50 FA72 FA74
 GA26

专利名称(译)	用单克隆抗体体外诊断阿尔茨海默病的方法		
公开(公告)号	JP2008532984A	公开(公告)日	2008-08-21
申请号	JP2008500220	申请日	2006-03-09
[标]申请(专利权)人(译)	科学研究高等机关		
申请(专利权)人(译)	Konseho高级DE库存Sutiga SHIO内斯表实体榕		
[标]发明人	メンデスエンリケ		
发明人	メンデス、エンリケ		
IPC分类号	C07K16/18 C12N5/10 G01N33/53 G01N33/577 G01N33/543 G01N27/62 C12P21/08 C12N15/02		
CPC分类号	A61P25/28 C07K14/4711 C07K16/18 C07K2317/34 C07K2317/92 G01N33/6896 G01N2800/2821 C07K7/06 G01N33/53		
FI分类号	C07K16/18.ZNA C12N5/00.B G01N33/53.D G01N33/577.B G01N33/543.541.A G01N27/62.V C12P21/08 C12N15/00.C		
F-TERM分类号	2G041/CA01 2G041/DA04 2G041/EA03 2G041/EA13 2G041/FA12 2G041/GA06 2G041/JA07 2G041/LA07 2G041/LA08 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/GA05 4B024/GA18 4B024/GA27 4B024/HA03 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA13 4B065/AA91X 4B065/AA92X 4B065/AA93Y 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/BA24 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/CA45 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	池田幸		
优先权	2005000550 2005-03-09 ES		
其他公开文献	JP5117373B2 JP2008532984A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

通过单克隆抗体体外诊断阿尔茨海默病的方法。所述抗体能够至少结合至 β -淀粉样蛋白肽的12-16氨基酸，特异性地检测阿尔茨海默病特征性的神经炎斑块，而不检测弥散性斑块，其不是该疾病的指标，在神经炎斑块中。单克隆抗体使得可以检测沉积的 β -淀粉样肽的各种同种型的组成不同的亚组，其与疾病的进展阶段相关。此外，该抗体能够与生物体液如尿液中的 β -淀粉样肽的同种型结合。因此，本发明的单克隆抗体，产生它的细胞系和含有它的组合物可用于阿尔茨海默病的体外诊断和疾病进展阶段的确定。

フラグメント番号	含まれていたアミノ酸	用いた酵素	実験的質量(m/z)	予測値(m/z)
1	1-16	トリプシン	1956.57	1955.0
2	1-17	α -キモトリプシン	2067.37	2068.2
3	5-17	α -キモトリプシン	1606.62	1605.7
4	6-16	トリプシン	1337.12	1336.4
5	11-17	α -キモトリプシン	888.66	890.0