

(19) 日本国特許庁 (JP)

再 公 表 特 許 (A1)

(11) 国際公開番号

W02016/092865

発行日 平成29年9月21日 (2017. 9. 21)

(43) 国際公開日 平成28年6月16日 (2016. 6. 16)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 2 9
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/18 Z N A	4 B 0 6 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C 0 8 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 51 頁) 最終頁に続く		

出願番号	特願2016-563527 (P2016-563527)	(71) 出願人	504132272 国立大学法人京都大学 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1
(21) 国際出願番号	PCT/JP2015/006224	(71) 出願人	304021831 国立大学法人 千葉大学 千葉県千葉市稲毛区弥生町 1 番 3 3 号
(22) 国際出願日	平成27年12月14日 (2015.12.14)	(71) 出願人	399032282 株式会社 免疫生物研究所 群馬県藤岡市中字東田 1 0 9 1 番地 1
(31) 優先権主張番号	特願2014-251898 (P2014-251898)	(74) 代理人	100120293 弁理士 中谷 智子
(32) 優先日	平成26年12月12日 (2014.12.12)	(72) 発明者	入江 一浩 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 国立大学法人京都大学内
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		
(31) 優先権主張番号	特願2015-104411 (P2015-104411)		
(32) 優先日	平成27年5月22日 (2015.5.22)		
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 アミロイド β の 2 2 位及び 2 3 位のターン構造を極めて特異的に認識する抗体

(57) 【要約】

本発明は A β の特定のターン構造を有する A β (A β の毒性コンホマー) のみを標的とする抗体又はその免疫反応性断片を提供する。また、本発明は、A β の毒性コンホマーを特異的に認識する抗体を有効成分として含有する医薬組成物、又は A β の毒性コンホマーの測定キット若しくはアルツハイマー病の診断薬等に関する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

22位及び23位のアミノ酸にターン構造を有するA β を極めて特異的に認識するが、他の構造を有するA β は認識しない抗体又はその免疫反応性断片。

【請求項 2】

更に、A β のオリゴマーを認識する、請求項1に記載の抗体又はその免疫反応性断片。

【請求項 3】

A β のオリゴマーがダイマーである、請求項2に記載の抗体又はその免疫反応性断片。

【請求項 4】

A β がA β 42である、請求項1～請求項3のいずれか1項に記載の抗体又はその免疫反応性断片。 10

【請求項 5】

A β の他の構造が、少なくとも、以下の群から選択される1種類以上の構造を含む、請求項1～請求項4のいずれか1項に記載の抗体又はその免疫反応性断片：A β の21位及び22位のアミノ酸におけるターン構造、A β の23位及び24位のアミノ酸におけるターン構造、A β の24位及び25位のアミノ酸におけるターン構造、A β の25位及び26位のアミノ酸におけるターン構造、及びA β の35位及び36位のアミノ酸におけるターン構造。

【請求項 6】

VHが、配列番号4に記載のアミノ酸配列を有し、かつ、VLが配列番号11に記載のアミノ酸配列を有する抗体が結合するエピトープを極めて特異的に認識するが、VHが、配列番号4に記載のアミノ酸配列を有し、かつ、VLが配列番号11に記載のアミノ酸配列を有する抗体が結合しないエピトープを認識しない抗体又はその免疫反応性断片。 20

【請求項 7】

VHが、配列番号4に記載のアミノ酸配列を有し、かつ、VLが配列番号11に記載のアミノ酸配列を有する抗体とその抗原との結合を競合阻害するが、VHが、配列番号4に記載のアミノ酸配列を有し、かつ、VLが配列番号11に記載のアミノ酸配列を有する抗体が結合しないエピトープには結合しない抗体又はその免疫反応性断片。

【請求項 8】

重鎖可変領域のCDR1、CDR2、及びCDR3が、それぞれ、配列番号5、配列番号6、及び配列番号7に記載のアミノ酸配列を有する抗体又はその免疫反応性断片。 30

【請求項 9】

更に、軽鎖可変領域のCDR1、CDR2、及びCDR3が、それぞれ、配列番号12、配列番号13、及び配列番号14に記載のアミノ酸配列を有する、請求項8に記載の抗体又はその免疫反応性断片。

【請求項 10】

重鎖可変領域のCDR1、CDR2、及びCDR3が、それぞれ、配列番号5、配列番号6、及び配列番号7に記載のアミノ酸配列を有する、請求項1～請求項7のいずれか1項に記載の抗体又はその免疫反応性断片。

【請求項 11】

更に、軽鎖可変領域のCDR1、CDR2、及びCDR3が、それぞれ、配列番号12、配列番号13、及び配列番号14に記載のアミノ酸配列を有する、請求項10に記載の抗体又はその免疫反応性断片。 40

【請求項 12】

VHが、配列番号4に記載のアミノ酸配列を有する抗体又はその免疫反応性断片。

【請求項 13】

更に、VLが配列番号11に記載のアミノ酸配列を有する、請求項12に記載の抗体又はその免疫反応性断片。

【請求項 14】

配列番号4に記載のアミノ酸配列を有する抗体又はその免疫反応性断片をコードする核 50

酸分子。

【請求項 15】

配列番号 1 の 126 番目～479 番目のヌクレオチド配列からなる核酸分子である、請求項 14 に記載の核酸分子。

【請求項 16】

配列番号 11 に記載のアミノ酸配列を有する抗体又はその免疫反応性断片をコードする核酸分子。

【請求項 17】

配列番号 8 の 130 番目～465 番目のヌクレオチド配列からなる核酸分子である、請求項 16 に記載の核酸分子。

【請求項 18】

配列番号 4 に記載のアミノ酸配列を有する抗体又はその免疫反応性断片、及び／又は、配列番号 11 に記載のアミノ酸配列を有する抗体又はその免疫反応性断片を発現可能なベクター。

【請求項 19】

請求項 14 又は請求項 15 に記載の核酸分子、及び／又は、請求項 16 又は請求項 17 に記載の核酸分子を含有する、請求項 18 に記載のベクター。

【請求項 20】

請求項 18 又は請求項 19 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 21】

請求項 1～請求項 13 のいずれか 1 項に記載の抗体又はその免疫反応性断片を含有する医薬組成物。

【請求項 22】

A D の予防用、治療用又は改善用である、請求項 21 に記載の医薬組成物。

【請求項 23】

A D 患者の認知機能を改善するための、請求項 21 に記載の医薬組成物。

【請求項 24】

A D 患者の記憶障害を改善するための、請求項 21 に記載の医薬組成物。

【請求項 25】

請求項 1～請求項 13 のいずれか 1 項に記載の抗体又はその免疫反応性断片を含有する診断用組成物。

【請求項 26】

A D の診断に使用するための請求項 25 に記載の診断用組成物。

【請求項 27】

請求項 1～請求項 13 のいずれか 1 項に記載の抗体又はその免疫反応性断片を含有する、A β の毒性コンホマーを測定するためのキット。

【請求項 28】

請求項 1～請求項 13 のいずれか 1 項に記載の抗体又はその免疫反応性断片を含有する、A β の毒性コンホマーの測定に使用するための組成物。

【請求項 29】

検体と請求項 1～請求項 13 のいずれか 1 項に記載の抗体又はその免疫反応性断片とを接触させるステップを備える、検体中における A β の毒性コンホマーレベルの測定方法。

【請求項 30】

以下のステップを備える、A D の診断方法：

- a) 被験者由来の試料と、少なくとも 1 つの請求項 1～請求項 13 のいずれか 1 項に記載の抗体又はその免疫反応性断片とを *in vitro* で接触させるステップ、
- b) 前記抗体又はその免疫反応性断片と結合した抗原のレベルを測定するステップ、並びに、
- c) 決定された抗原レベルから、前記被験者における A D の有無又は程度を診断するステップ。

10

20

30

40

50

ここで、請求項 1～請求項 13 のいずれか 1 項に記載の抗体又はその免疫反応性断片に結合する抗原のレベルが健常人由来の試料における同レベルと比較して高い場合には、AD に罹患している可能性が高いと診断される、方法。

【請求項 31】

以下のステップを備える、AD の診断方法：

- a) 被験者由来の試料と、少なくとも 1 つの請求項 1～請求項 13 のいずれか 1 項に記載の抗体又はその免疫反応性断片とを接触させるステップ、
- b) 前記抗体又はその免疫反応性断片と結合した抗原のレベルを測定するステップ、
- c) A β の構造非特異的な抗 A β 抗体と被験者由来の試料とを接触させ、その結合物の量を測定することにより、被験者由来の試料における総 A β 量を測定するステップ、並びに、
- d) 被験者由来の試料における、請求項 1～請求項 13 のいずれか 1 項に記載の抗体又はその免疫反応性断片に結合する抗原のレベルと総 A β のレベルの比を計算し、決定された比から、前記被験者における AD の有無又は程度を判定するステップ、

ここで、総 A β のレベルに対する、請求項 1～請求項 13 のいずれか 1 項に記載の抗体又はその免疫反応性断片に結合する抗原のレベルが健常人由来の試料における同比と比較して高い場合には、AD に罹患している可能性が高いと判定される、方法。

【請求項 32】

検体中のアミロイド β の毒性コンホマーの存否を決定する方法であって、

- (a) 請求項 1～請求項 13 のいずれか 1 項に記載の抗体又はその免疫反応性断片と検体とを接触させるステップ、
- (b) 前記抗体又はその免疫反応性断片へ結合したアミロイド β の毒性コンホマーを検出するステップ、
- (c) 前記ステップにおいてアミロイド β の毒性コンホマーが検出された場合には、検体中にアミロイド β の毒性コンホマーが存在すると判定し、前記ステップにおいてアミロイド β の毒性コンホマーが検出されなかった場合には、検体中にアミロイド β の毒性コンホマーが存在しないと判定するステップを備える、方法。

【請求項 33】

検体中のアミロイド β の毒性コンホマーのレベルを決定する方法であって、

- (a) 請求項 1～請求項 13 のいずれか 1 項に記載の抗体又はその免疫反応性断片と検体とを接触させるステップ、
- (b) 前記抗体又はその免疫反応性断片へ結合したアミロイド β の毒性コンホマー量を測定するステップ、
- (c) 前記検出された毒性コンホマー量から、検体中のアミロイド β の毒性コンホマーのレベルを算出するステップを備える、方法。

【発明の詳細な説明】

【クロスリファレンス】

【0001】

本出願は、2014 年 12 月 12 日に日本国において出願された特願 2014-251898 号、及び、2015 年 5 月 22 日に日本国において出願された特願 2015-104411 号に基づく優先権を主張するものであり、当該出願に記載された内容は全て、参照によりそのまま本明細書に援用される。また、本願において引用した全ての特許、特許出願及び文献に記載された内容は全て、参照によりそのまま本明細書に援用される。

【技術分野】

【0002】

本発明は、22 位及び 23 位のアミノ酸にターン構造を有するアミロイド β を極めて特異的に認識する抗体、当該抗体を利用した 22 位及び 23 位のアミノ酸にターン構造を有するアミロイド β の測定方法、並びに、アルツハイマー病の診断方法及び治療方法に関する。

【背景技術】

【0003】

アルツハイマー病（以下、「AD」という）は、一般に老人斑におけるアミロイドの蓄積により特徴づけられる。アミロイドは、アミロイドβタンパク質（以下、「Aβ」という）、特に、40及び42残基のアミノ酸からなるAβ（以下、それぞれ、「Aβ40」及び「Aβ42」という）から構成される。これらのタンパク質は、アミロイド前駆体タンパク質（APP）から、β-及びγ-セクレターゼの2つのプロテアーゼによる分解を受けて生成する。ADの発症において、Aβ42は、その凝集傾向や神経毒性からAβ40よりも重要な役割を担っていると考えられている。最近の研究により、酸化ストレスがADに関連する神経変性に寄与することが示されている。ラジカルの形成を介したAβ42の神経毒性は、活性酸素種の生成を伴う10位のチロシン及び35位のメチオニンにおけるラジカル化と緊密に関連している。一方で、Aβのオリゴマーの集積がシナプス毒性を通じてADを誘導する証拠が示されている。

10

【0004】

ADモデルマウスにAβ凝集体をワクチンとして接種すると、脳内におけるAβの沈着を減少させ、認識機能障害を抑制することから、Aβによる免疫付与は、AD治療の有望な方法と考えられている。そこで、Aβ42によりAD患者を免疫した臨床試験（AN1792）が行われたが、過剰な免疫活性化という深刻な副作用から中止されている。その後、抗Aβ抗体がAD治療薬として期待され、現在に至るまで開発が続けられている。

20

【0005】

本発明者らは、これまで系統的プロリン置換法と共に固体NMR法を用いた研究により、Aβ42の22位及び23位にターン構造を有する毒性コンホマーと、Aβ42の25位及び26位にターン構造を有する生理的コンホマーが区別されること、及び、前者のコンホマーは、強力な凝集能と神経毒性を示すことを報告してきた（非特許文献1、特許文献1）。

【0006】

更に、本発明者らは、Aβの22位のグルタミン酸をプロリンに置換して当該部位におけるターン構造を固定したペプチドを抗原として用いることにより、Aβ42の22位及び23位のアミノ酸にターン構造を有する毒性コンホマーを特異的に認識する抗体を作製できることを報告している（特許文献2）。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】特開2006-265189号

【特許文献2】国際公開WO2011/045945号

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】K. Murakamiら（2005）J. Am. Chem. Soc. , 127:15168-15174

【発明の概要】

40

【0009】

本発明者らは、これまで、Aβが22位及び23位のアミノ酸においてターン構造をとることによりアミロイドの凝集が促進され、AD発症につながるのではないかと考え、既に報告した22位及び23位のアミノ酸にターン構造を有するAβ（以下、「22, 23-ターンAβ」という）を特異的に認識する抗体として、IBL-101抗体（寄託機関：独立行政法人産業技術総合研究所、特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東1-1-1 つくばセンター中央第6）；受託日：2009年10月14日；受託番号：FERM BP-11290）を用いてADの診断及び治療への応用について検討してきた。特に、IBL-101抗体は、重合した野生型Aβへの結合力も強く、かつ、ターン構造をもたないAβに対する結合力が弱いという特異性があるため、ADの診断及び治療へ

50

の応用が期待されていた。しかし、IBL-101抗体について検討を進めた結果、ADモデルマウスを用いた治療実験において、一定の効果は示唆されたものの、治療薬としての実用化可能な程度に至らないと考えられた。そこで、本発明者らは、IBL-101抗体におけるこのような問題の原因について更なる解析を行った。

【0010】

その結果、本発明者らは、IBL-101抗体は22位及び23位のアミノ酸におけるターン構造を有するA β 及び野生型A β のオリゴマーを比較的高く認識するものの、22位及び23位にターン構造をとらない他のA β にも若干結合し得ることに注目した。また、本発明者らは、IBL-101抗体以外の22, 23-ターンA β に特異的な様々な抗体について検討した結果、IBL-101抗体と比較して、特異性において優れる抗体がADモデルマウスを用いた治療実験において優れた認知機能改善効果等を有することを見出した。特に、このような抗体は、単回投与でもAD発症後のマウスの記憶能力を改善するというこれまでの抗体に見られない優れた効果を示した。また、本抗体を用いて、AD患者と健常人の脳脊髄液(CSF)におけるA β 量を測定した結果、AD患者において、本抗体に結合するA β 量が多いことが確認された。さらに、解析を進めた結果、AD患者において、総A β 量に対する本抗体に結合するA β 量の比が大きいことが確認された。そこで、本発明の抗体の結合特性について更に詳細な検討を行った結果、複数のターン構造や直線状構造などの様々な構造を持つA β の中で、特に22, 23-ターンA β に対する特異性が極めて高く、他の構造を有するA β への結合がほとんど見られないことが確認された。更に、ADにおいて最も毒性を発揮すると考えられているA β オリゴマーへの本抗体の結合特性を解析した結果、22, 23-ターンA β モノマーへの結合より更に強く22, 23-ターンA β のオリゴマーと結合することが見出された。これらの結果から、本発明者らはADの診断及び治療には、22, 23-ターンA β モノマーと非常に特異的に結合する(即ち、他の構造のA β とはほとんど結合しない)、好ましくは、更に22, 23-ターンA β のオリゴマーに強く結合する抗体を利用することが重要であることを見出した。言い換えれば、本発明者らは、22, 23-ターンA β を極めて特異的に認識する抗体、又は、22, 23-ターンA β を極めて特異的に認識し、かつ、22, 23-ターンA β のオリゴマーに強く結合する抗体を用いることにより、ADの治療及び診断が可能であることを見出した。

【0011】

これまでのA β を標的とした免疫療法、特にA β ワクチン(AN1792)や、抗A β モノマー抗体における副作用や効果の低さの理由の一つとして、生理的な(毒性の無い)A β 42への結合が考えられている。実際に、A β モノマーには抗炎症作用などの利点も存在することが知られており(Sci Transl Med. 2012 August 1; 4(145): 145ra105.)、生理的に重要な役割も担い得ることが知られていた。抗A β モノマー抗体の副作用の高さに加え、A β はオリゴマーとなることで毒性を発揮するが、更に凝集してフィブリルになると毒性を持たないことが知られていることから、現在のA β を標的とした抗体医薬品開発は、生理的A β と区別して毒性のあるA β のみを標的化するための戦略として、A β モノマーやフィブリルと結合せず、A β オリゴマーのみに結合する抗体を利用している(Aducanumab、Creneluma、BAN2401)。すなわち、従来の発想は、A β モノマーを構造で区別することなく、その重合化の程度により毒性の有無の根拠としていた。本発明者らは、同じA β モノマーであっても、その構造の中に毒性を発揮し得る構造が存在するとの仮説をこれまで報告してきたが、本発明により、ADの治療効果・診断効果を発揮するためには、抗体が22, 23-ターンA β を“極めて”特異的に認識することが重要であることを初めて見出したものである。即ち、本発明者らは、これまで構造で区別することなく理解されてきたA β モノマーが、実際には極めて緻密にその構造により機能が制御されており、22, 23-ターンA β は凝集性の高い(毒性の高い)A β であるのに対し、その他の構造を有するA β は凝集性の低い(毒性の低い、生理的な)A β であること、並びに、22, 23-ターンA β を極めて特異的に標的化することが抗A β 抗体をAD治療薬・診断薬

として開発する上で最も重要であり、副作用の問題や効果の低さの問題を解決し得ることを初めて見出したものである。更に、本発明の抗体は、A β オリゴマーのみならず、A β モノマーをも標的とすることができるため、A β の凝集が進行する前（A β オリゴマー発生前）のモノマーの段階からA β の凝集を抑制可能な点において、従来開発されてきた抗体医薬と比較してもよりすぐれた医薬を提供可能とするものである。

【0012】

よって、本発明は、22位及び23位のアミノ酸にターン構造を有するA β を極めて特異的に認識する抗体及びその利用に関する。本発明は、特に、22, 23-ターンA β とは結合するが、それ以外の構造を有するA β とは結合しない、22, 23-ターンA β に特異的な抗体及びその利用に関する。具体的には、本発明は、以下の発明に関する。なお、以下の(1)～(31)又は本明細書全体において、「22位及び23位のアミノ酸にターン構造を有するA β 」の語は、「E22P-A β 」、又は、「IBL-102抗体が結合するA β 」と置き換えてもよい。

(1) 22位及び23位のアミノ酸にターン構造を有するA β を極めて特異的に認識するが、他の構造を有するA β は認識しない抗体又はその免疫反応性断片。

(2) 更に、A β のオリゴマーを認識する、(1)に記載の抗体又はその免疫反応性断片。

(3) A β のオリゴマーがダイマーである、(2)に記載の抗体又はその免疫反応性断片。

(4) A β がA β 42である、(1)～(3)のいずれか1項に記載の抗体又はその免疫反応性断片。

(5) A β の他の構造が、少なくとも、以下の群から選択される1種類以上の構造を含む、(1)～(4)のいずれか1項に記載の抗体又はその免疫反応性断片：A β の21位及び22位のアミノ酸におけるターン構造、A β の23位及び24位のアミノ酸におけるターン構造、A β の24位及び25位のアミノ酸におけるターン構造、A β の25位及び26位のアミノ酸におけるターン構造、及びA β の35位及び36位のアミノ酸におけるターン構造。

(6) VHが、配列番号4に記載のアミノ酸配列を有し、かつ、VLが配列番号11に記載のアミノ酸配列を有する抗体が結合するエピトープを極めて特異的に認識するが、VHが、配列番号4に記載のアミノ酸配列を有し、かつ、VLが配列番号11に記載のアミノ酸配列を有する抗体が結合しないエピトープを認識しない抗体又はその免疫反応性断片。

(7) VHが、配列番号4に記載のアミノ酸配列を有し、かつ、VLが配列番号11に記載のアミノ酸配列を有する抗体とその抗原との結合を競合阻害するが、VHが、配列番号4に記載のアミノ酸配列を有し、かつ、VLが配列番号11に記載のアミノ酸配列を有する抗体が結合しないエピトープには結合しない抗体又はその免疫反応性断片。

(8) 重鎖可変領域のCDR1、CDR2、及びCDR3が、それぞれ、配列番号5、配列番号6、及び配列番号7に記載のアミノ酸配列を有する抗体又はその免疫反応性断片。

(9) 更に、軽鎖可変領域のCDR1、CDR2、及びCDR3が、それぞれ、配列番号12、配列番号13、及び配列番号14に記載のアミノ酸配列を有する、(8)に記載の抗体又はその免疫反応性断片。

(10) 重鎖可変領域のCDR1、CDR2、及びCDR3が、それぞれ、配列番号5、配列番号6、及び配列番号7に記載のアミノ酸配列を有する、(1)～(7)のいずれか1項に記載の抗体又はその免疫反応性断片。

(11) 更に、軽鎖可変領域のCDR1、CDR2、及びCDR3が、それぞれ、配列番号12、配列番号13、及び配列番号14に記載のアミノ酸配列を有する、(10)に記載の抗体又はその免疫反応性断片。

(12) VHが、配列番号4に記載のアミノ酸配列を有する抗体又はその免疫反応性断片。

10

20

30

40

50

(13) 更に、VLが配列番号11に記載のアミノ酸配列を有する、(12)に記載の抗体又はその免疫反応性断片。

(14) 配列番号4に記載のアミノ酸配列を有する抗体又はその免疫反応性断片をコードする核酸分子。

(15) 配列番号1の126番目～479番目のヌクレオチド配列からなる核酸分子である、(14)に記載の核酸分子。

(16) 配列番号11に記載のアミノ酸配列を有する抗体又はその免疫反応性断片をコードする核酸分子。

(17) 配列番号8の130番目～465番目のヌクレオチド配列からなる核酸分子である、(16)に記載の核酸分子。

(18) 配列番号4に記載のアミノ酸配列を有する抗体又はその免疫反応性断片、及び／又は、配列番号11に記載のアミノ酸配列を有する抗体又はその免疫反応性断片を発現可能なベクター。

(19) (14)又は(15)に記載の核酸分子、及び／又は、(16)又は(17)に記載の核酸分子を含有する、(18)に記載のベクター。

(20) (18)又は(19)に記載のベクターを含む宿主細胞。

(21) (1)～(13)のいずれか1項に記載の抗体又はその免疫反応性断片を含有する医薬組成物。

(22) ADの予防用、治療用又は改善用である、(21)に記載の医薬組成物。

(23) AD患者の認知機能を改善するための、(21)に記載の医薬組成物。

(24) AD患者の記憶障害を改善するための、(21)に記載の医薬組成物。

(25) (1)～(13)のいずれか1項に記載の抗体又はその免疫反応性断片を含有する診断用組成物。

(26) ADの診断に使用するための(25)に記載の診断用組成物。

(27) (1)～(13)のいずれか1項に記載の抗体又はその免疫反応性断片を含有する、A β の毒性コンホマーを測定するためのキット。

(28) (1)～(13)のいずれか1項に記載の抗体又はその免疫反応性断片を含有する、A β の毒性コンホマーの測定に使用するための組成物。

(29) 検体と(1)～(13)のいずれか1項に記載の抗体又はその免疫反応性断片とを接触させるステップを備える、検体中におけるA β の毒性コンホマーレベルの測定方法。

(30) 以下のステップを備える、ADの診断方法：

a) 被験者由来の試料と、少なくとも1つの(1)～(13)のいずれか1項に記載の抗体又はその免疫反応性断片とを*in vitro*で接触させるステップ、

b) 前記抗体又はその免疫反応性断片と結合した抗原のレベルを測定するステップ、並びに、

c) 決定された抗原レベルから、前記被験者におけるADの有無又は程度を診断するステップ。

ここで、(1)～(13)のいずれか1項に記載の抗体又はその免疫反応性断片に結合する抗原のレベルが健常人由来の試料における同レベルと比較して高い場合には、ADに罹患している可能性が高いと診断される、方法。

(31) 以下のステップを備える、ADの診断方法：

a) 被験者由来の試料と、少なくとも1つの(1)～(13)のいずれか1項に記載の抗体又はその免疫反応性断片とを接触させるステップ、

b) 前記抗体又はその免疫反応性断片と結合した抗原のレベルを測定するステップ、

c) A β の構造非特異的な抗A β 抗体と被験者由来の試料とを接触させ、その結合物の量を測定することにより、被験者由来の試料における総A β 量を測定するステップ、並びに、

d) 被験者由来の試料における、(1)～(13)のいずれか1項に記載の抗体又はその免疫反応性断片に結合する抗原のレベルと総A β のレベルの比を計算し、決定された比か

10

20

30

40

50

ら、前記被験者におけるA β の有無又は程度を判定するステップ、

ここで、総A β のレベルに対する、(1)～(13)のいずれか1項に記載の抗体又はその免疫反応性断片に結合する抗原のレベルが健常人由来の試料における同比と比較して高い場合には、A β に罹患している可能性が高いと判定される、方法。

(32) 検体中のアミロイド β の毒性コンホマーの存否を決定する方法であって、

(a) (1)～(13)のいずれか1項に記載の抗体又はその免疫反応性断片と検体とを接触させるステップ、

(b) 前記抗体又はその免疫反応性断片へ結合したアミロイド β の毒性コンホマーを検出するステップ；

(c) 前記ステップにおいてアミロイド β の毒性コンホマーが検出された場合には、検体中にアミロイド β の毒性コンホマーが存在すると判定し、前記ステップにおいてアミロイド β の毒性コンホマーが検出されなかった場合には、検体中にアミロイド β の毒性コンホマーが存在しないと判定するステップを備える、方法。

(33) 検体中のアミロイド β の毒性コンホマーのレベルを決定する方法であって、

(a) (1)～(13)のいずれか1項に記載の抗体又はその免疫反応性断片と検体とを接触させるステップ、

(b) 前記抗体又はその免疫反応性断片へ結合したアミロイド β の毒性コンホマー量を測定するステップ；

(c) 前記検出された毒性コンホマー量から、検体中のアミロイド β の毒性コンホマーのレベルを算出するステップを備える、方法。

【0013】

本明細書において、「22位及び23位のアミノ酸にターン構造を有するA β 」とは、22番目のアミノ酸及び23番目のアミノ酸における折れ曲がり（ターン）構造（立体構造）を有するA β （本明細書において、「22, 23-ターンA β 」という）を意味する。22, 23-ターンA β は、22, 23-ターンA β 42及び22, 23-ターンA β 40を含み、好ましくは、22, 23-ターンA β 42である。また、「アミロイド β の22位及び23位のアミノ酸におけるターン構造」とは、A β の22番目のアミノ酸及び23番目のアミノ酸における折れ曲がり（ターン）構造（立体構造）を意味する。以下、本明細書において、A β の22番目のアミノ酸及び23番目のアミノ酸におけるターン構造及び／又はこの構造を有するA β を総称して「A β の毒性コンホマー」という。アミロイド β の22位及び23位のアミノ酸におけるターン構造は、例えば、22番目のグルタミン酸がプロリンに置換されたA β 変異体（E22P-A β 42又はE22P-A β 40等のE22P-A β ）における、22番目のアミノ酸及び23番目のアミノ酸における折れ曲がり（ターン）構造であってもよい。また、別の表現においては、本発明のIBL-102抗体は、このような構造を有するA β のみ認識することから、「22位及び23位のアミノ酸にターン構造を有するA β 」は、「IBL-102抗体が認識するA β 」と置き換えてもよい。

【0014】

本明細書において、A β とはアミロイド β の略語であり、A β 42とは、配列番号15に記載のアミノ酸配列を有するペプチドのことであり、A β 40とは、配列番号16に記載のアミノ酸配列を有するペプチドのことである。本明細書において、「アミロイド β の22位及び23位」又は「22位及び23位のアミノ酸にターン構造を有するA β 」などの表現における、22位及び23位とは、それぞれ、配列番号15及び配列番号16における、22番目及び23番目のアミノ酸（それぞれ野生型ではグルタミン酸及びアスパラギン酸）の位置を意味する。

【0015】

本発明は、「22位及び23位のアミノ酸にターン構造を有するA β 」及び／又は「アミロイド β の22位及び23位のアミノ酸におけるターン構造」（A β の毒性コンホマー）を極めて特異的に認識する抗体又はその免疫反応性断片に関する。よって、本発明の抗体は、22, 23-ターンA β 42、及び／又は22, 23-ターンA β 40を極めて特

異的に認識する。

【0016】

本発明の抗体又はその免疫反応性断片による、A β の毒性コンホマーの認識は、22番目のアミノ酸の種類に依存しなくてもよい。即ち、本発明の抗体又はその免疫反応性断片が認識する「エピトープ」は、22位及び23位のアミノ酸にターン構造を有するA β に存在する構造及びアミノ酸（22番目のグルタミン酸を除く）を必須とするが、22番目のアミノ酸がグルタミン酸であることは必要としなくてもよい。また、本発明のA β の毒性コンホマーを極めて特異的に認識する抗体は、22位及び23位のアミノ酸においてターン構造を有するA β を極めて特異的に認識すれば、その認識部位が限定されるものではない。本発明のA β の毒性コンホマーを極めて特異的に認識する抗体が認識する部位は、例えば、A β の23位のアミノ酸（アスパラギン酸）、並びに／あるいは、その隣接したアミノ酸、例えば、A β の22位又は23位のアミノ酸から1～10残基（好ましくは、1～5、1～4、1～3残基）以内のアミノ酸であってもよい。例えば、本発明の抗体は、A β の毒性コンホマーを極めて特異的に認識し、かつ、A β の23位のアミノ酸（アスパラギン酸）を認識する抗体であってもよい。あるいは、本発明のA β の毒性コンホマーを極めて特異的に認識する抗体は、22位及び23位から遠位に存在するA β 上の立体エピトープであって、22位及び23位のアミノ酸にターン構造を有することにより生じ得るエピトープを認識していても良い。例えば、本発明の抗体は、A β が分子間 β シートを形成する領域を認識してもよい。より好ましくは、本発明の抗体は、このような領域に存在する27番目のアスパラギン及び31番目のイソロイシンを認識する。更に、本発明の抗体は、A β の3番目のグルタミン酸及び4番目のフェニルアラニンと結合してもよい。更に、本発明の抗体は、A β の11番目のグルタミン酸、12番目のバリン、13番目のヒスチジン、及び14番目のヒスチジンと結合していてもよい。

【0017】

A β は凝集してオリゴマーを形成し、更に凝集が進むとプロトフィブリルを形成し、より更に凝集が進むとフィブリルを形成する。AD発症においては、オリゴマーやプロトフィブリルなどの可溶性凝集体が何らかの毒性を発揮すると考えられている。本明細書において、「A β のオリゴマー」とは、A β のダイマーから二十量体又は90～650kDaのA β の凝集体を意味する。たとえば、A β のオリゴマーは、A β のダイマー、トライマー、テトラマー、ペンタマー、ヘキサマー、ヘプタマー、オクタマー、ノナマー、デカマー及びプロトフィブリルを含む。ある態様において、A β のオリゴマーは、分子間 β シートを形成している多量体である。

【0018】

本発明の抗体は、好ましくは、A β （好ましくは、22, 23-ターンA β 、又はE22P-A β 42）のオリゴマー（例えば、ダイマー）に結合してもよい。即ち、一態様において、本発明は、22, 23-ターンA β 及び／又はE22P-A β 42のモノマー及びオリゴマー（例えば、ダイマー）の両方に結合する抗体又はその免疫反応性断片に関する。

【0019】

A β は、22位及び23位のアミノ酸にターン構造を有する構造のほか、直線に近い構造や25位及び26位のアミノ酸においてターン構造を有する構造など、様々な構造を取り得ることが知られている。本明細書において、（22位及び23位のアミノ酸にターン構造を有する構造以外の）「他の構造」とは、22位及び23位のアミノ酸にターン構造を有する構造以外のA β の構造を意味し、具体的には、A β の21位及び22位のアミノ酸におけるターン構造、A β の23位及び24位のアミノ酸におけるターン構造、A β の24位及び25位のアミノ酸におけるターン構造、A β の25位及び26位のアミノ酸におけるターン構造、A β の35位及び36位のアミノ酸におけるターン構造、及び、直線状の構造（直線に近い構造、及びターン構造には含まれない構造を含む、以下同様）を含む。あるいは、「他の構造」は、A21P-A β 42、E22V-A β 42、D23P-A β 42、V24P-A β 42、G25P-A β 42、G33P-A β 42、L34P-

A β 42、M35P-A β 42、V36P-A β 42、G37P-A β 42、G38P-A β 42、V39P-A β 42、V40P-A β 42、及び／又はI41P-A β 42が有する構造、例えば、これらのペプチドが有するターン構造を含んでいても良い。また、「他の構造を有するA β 」とは、22位及び23位のアミノ酸におけるターン構造以外の構造を有するA β を意味し、具体的には、A β の21位及び22位のアミノ酸におけるターン構造を有するA β 、A β の23位及び24位のアミノ酸におけるターン構造を有するA β 、A β の24位及び25位のアミノ酸におけるターン構造を有するA β 、A β の25位及び26位のアミノ酸におけるターン構造を有するA β 、A β の33位及び34位のアミノ酸におけるターン構造を有するA β 、A β の34位及び35位のアミノ酸におけるターン構造を有するA β 、A β の35位及び36位のアミノ酸におけるターン構造を有するA β 、A β の36位及び37位のアミノ酸におけるターン構造を有するA β 、A β の37位及び38位のアミノ酸におけるターン構造を有するA β 、A β の38位及び39位のアミノ酸におけるターン構造を有するA β 、A β の40位及び41位のアミノ酸におけるターン構造を有するA β 、及び／又は、直線状の構造を有するA β を含む。あるいは、「他の構造を有するA β 」は、A21P-A β 42、E22V-A β 42、D23P-A β 42、V24P-A β 42、G25P-A β 42、G33P-A β 42、L34P-A β 42、M35P-A β 42、V36P-A β 42、G37P-A β 42、G38P-A β 42、V39P-A β 42、V40P-A β 42、及び／又はI41P-A β 42が有する構造を有するA β を含んでいても良い。

【0020】

一態様において、本発明は22, 23-ターンA β 及び／又はA β の22位及び23位のアミノ酸におけるターン構造を極めて特異的に認識する抗体に関する。別の態様において、本発明は22, 23-ターンA β 及び／又はA β の22位及び23位のアミノ酸におけるターン構造を特異的に認識するが、他の構造を有するA β 及び／又はA β の他の構造は認識しない抗体に関する。即ち、本発明の抗体又はその免疫反応性断片は、22, 23-ターンA β 又はA β の22位及び23位のアミノ酸におけるターン構造を特異的に認識するが、他の構造を有するA β 及び／又はA β の他の構造、例えば、A β の他の部位におけるターン構造は認識しない。本明細書において、「結合しない」及び「認識しない」とは、全く結合しないこと又は全く認識しないことを意味するのではなく、目的の抗原（A β の毒性コンホマー）と十分に識別可能な程度に他の構造への親和性が低いことを意味する。例えば、「結合しない」及び「認識しない」とは、被検抗体と他の構造を有するA β 又はA β の他の構造との結合について、ELISA又はEIAにより検出される強度（例えば、蛍光強度）が、当該被検抗体のA β の毒性コンホマーへの結合について同じELISA又はEIAにより検出される強度と比較して、1/3以下、1/4以下、1/5以下、1/6以下、1/7以下、1/8以下、1/9以下、1/10以下、1/20以下、1/30以下、1/40以下、1/50以下、1/100以下であることを意味してもよい。ELISA又はEIAによる検出は、後述の（抗体分子を用いた公知の測定方法）の記載に準じて行うことができる。例えば、本発明の抗体は、主反応（22, 23-ターンA β 又はE22P-A β 42に対する結合）に対する、A21P-A β 42、E22V-A β 42、D23P-A β 42、V24P-A β 42、G25P-A β 42、G33P-A β 42、L34P-A β 42、M35P-A β 42、V36P-A β 42、G37P-A β 42、G38P-A β 42、V39P-A β 42、V40P-A β 42、及びI41P-A β 42から選択される1種類以上の任意のペプチド（全ての場合を含む）への結合の交差反応率が、10%以下、8%以下、5%以下、4%以下、3%以下、2%以下、1%以下、0.5%以下、又は0.3%以下であってよい。あるいは、本発明の抗体は、主反応（22, 23-ターンA β 又はE22P-A β 42に対する結合）に対する、A21P-A β 42、E22V-A β 42、D23P-A β 42、V24P-A β 42、G25P-A β 42、及びM35P-A β 42への結合の交差反応率が、それぞれ順に、0.3%以下、0.3%以下、0.5%以下、0.4%以下、0.6%以下、及び0.7%以下で

あってもよく、更には、それぞれ順に、0.27%以下、0.28%以下、0.50%以下、0.33%以下、0.53%以下、及び0.68%以下であってもよい。交差反応率は、後述の（交差反応率）に記載の方法を用いて決定することができる。

【0021】

本明細書において、抗体又はその免疫反応性断片が「特異的に」認識する（結合する）とは、その抗体又はその免疫反応性断片が他のアミノ酸配列や他の立体構造を有するペプチド又はタンパク質に対する親和性よりも、Aβの毒性コンホマーに対して実質的に高い親和性で結合することを意味する。本明細書において、抗体又はその免疫反応性断片が「極めて特異的に」認識する（結合する）とは、該抗体又はその免疫反応性断片が、そのエピトープ又は抗原と非常に近似した他のアミノ酸配列や他の立体構造を有するペプチド又はタンパク質に対する親和性と比較して、実質的に高い親和性でそのエピトープ又は抗原と結合することを意味する。例えば、本発明の抗体が「極めて特異的に」認識する（結合する）とは、その抗原であるAβと同一のアミノ酸配列若しくはE22P-Aβ42と近いアミノ酸配列（1～2アミノ酸の相違）を有するペプチド、又は、その抗原であるAβと同一のアミノ酸配列若しくはE22P-Aβ42と近いアミノ酸配列（1～2アミノ酸の相違）を有し、かつ、非常に近い立体構造を有するペプチド又はタンパク、すなわち、Aβ（22, 23-ターンAβを除く）又はAβ変異体（例えば、A21P-Aβ42、D23P-Aβ42、V24P-Aβ42、G25P-Aβ42、G33P-Aβ42、L34P-Aβ42、M35P-Aβ42、V36P-Aβ42、G37P-Aβ42、G38P-Aβ42、V39P-Aβ42、V40P-Aβ42、及び／又はI41P-Aβ42）に対する親和性と比較して、実質的に高い親和性で22, 23-ターンAβ若しくはE22P-Aβ42（又はAβの22位及び23位のアミノ酸におけるターン構造）と結合することを意味しても良い。ここで、「実質的に高い親和性で結合する」とは、所望の測定装置または方法によって、目的とする特定のアミノ酸配列や立体構造を他のアミノ酸配列や立体構造から区別して検出することが可能な程度に高い親和性を意味する。例えば、実質的に高い親和性は、ELISA又はEIAにより検出された強度（例えば、蛍光強度）として、3倍以上、4倍以上、5倍以上、6倍以上、7倍以上、8倍以上、9倍以上、10倍以上、20倍以上、30倍以上、40倍以上、50倍以上、100倍以上であることを意味していてもよい。よって、一態様において、本発明は、E22P-Aβ42と極めて特異的に結合するが、以下の群から選択される1種類以上の（好ましくは全ての）ペプチドと結合しない抗体又はその免疫反応性断片に関する：A21P-Aβ42、D23P-Aβ42、V24P-Aβ42、G25P-Aβ42、G33P-Aβ42、L34P-Aβ42、M35P-Aβ42、V36P-Aβ42、G37P-Aβ42、G38P-Aβ42、V39P-Aβ42、V40P-Aβ42、及び／又はI41P-Aβ42。

【0022】

また、例えば、本発明の抗体が「極めて特異的に」認識する（結合する）とは、該抗体又はその免疫反応性断片が高濃度の場合でも、該抗体又はその免疫反応性断片のエピトープ又は抗原と非常に近似した他のアミノ酸配列や他の立体構造と結合しないことを意味してもよい。例えば、本発明の抗体が「極めて特異的に」認識する（結合する）とは、高濃度の該抗体又はその免疫反応性断片が、そのエピトープ又は抗原と非常に近似した他のアミノ酸配列や他の立体構造を有するペプチド又はタンパク質に対する親和性と比較して、実質的に高い親和性でそのエピトープと結合することを意味してもよい。ここで、高濃度の抗体又はその免疫反応性断片とは、例えば、15 ng/mL又はそれ以上、30 ng/mL又はそれ以上、40 ng/mL又はそれ以上、50 ng/mL又はそれ以上、60 ng/mL又はそれ以上、70 ng/mL又はそれ以上、80 ng/mL又はそれ以上、90 ng/mL又はそれ以上、100 ng/mL又はそれ以上、110 ng/mL又はそれ以上、120 ng/mL又はそれ以上、130 ng/mL又はそれ以上、140 ng/mL又はそれ以上、あるいは、150 ng/mL又はそれ以上であってもよい。また、このような特異性は、例えばELISA又はEIAアッセイにおいて測定されたものであって

も良い。

【0023】

本発明の抗体とA β の毒性コンホマー又はE22P-A β 42との結合における結合速度定数(K_a1)としては、例えば、 $1 \times 10^4 \text{ Ms}^{-1}$ 以上、 $1 \times 10^5 \text{ Ms}^{-1}$ 以上、 $2 \times 10^5 \text{ Ms}^{-1}$ 以上、 $2.3 \times 10^5 \text{ Ms}^{-1}$ 以上を挙げることができ、好ましくは、 2.32×10^5 以上である。また、本発明の抗体とA β の毒性コンホマー又はE22P-A β 42との結合における解離速度定数(K_d1)としては、例えば、 1×10^{-3} 以下、 9×10^{-4} 以下、 8×10^{-4} 以下であり、好ましくは、 7.09×10^{-4} 以下である。本発明の抗体とA β の毒性コンホマー又はE22P-A β 42との結合における結合定数(K_D)としては、例えば、 1×10^{-8} (M)以下、 7×10^{-8} (M)以下、 5×10^{-8} (M)以下、 4×10^{-9} 以下であり得、好ましくは、 3.05×10^{-9} 以下である。本明細書における抗体の結合速度定数(K_a1)、解離速度定数(K_d1)、及び結合定数(K_D)はB I A C O R E (G Eヘルスケアバイオサイエンス株式会社、B I A C O R E-X100)を用いて、製造者提供のマニュアルに従い、S Aチップにビオチン化E22P-A β 42又はビオチン化野生型A β 42を固定後、被検抗体を流し、結合速度定数K_a1、解離速度定数K_d1を測定し、b i v a l e n tフィッティングを用いて結合定数K_D値を決定することができる

【0024】

本発明の抗体は、ポリクローナル抗体であっても、モノクローナル抗体であってもよいが、好ましくは、モノクローナル抗体である。本発明において、「モノクローナル抗体」は、単一の抗原決定基と反応する、構造がほぼ均一な抗体である。更に、本発明の抗体は、非ヒト動物の抗体、非ヒト動物の抗体のアミノ酸配列とヒト由来の抗体のアミノ酸配列を有する抗体、及び、ヒト抗体を包含する。非ヒト動物の抗体としては、例えば、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ラビット、イヌ、サル、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ、アヒル等の抗体を挙げることができ、好ましくは、ハイブリドーマを作製することができる動物の抗体であり、より好ましくはマウス、ラット又はウサギの抗体である。非ヒト動物の抗体のアミノ酸配列とヒト由来の抗体のアミノ酸配列を有する抗体としては、ヒト型キメラ抗体、ヒト化抗体を挙げることができる。上記において、「キメラ抗体」とは、非ヒト動物由来であってA β の毒性コンホマーと極めて特異的に結合する抗体の定常領域をヒトの抗体と同じ定常領域を有するように遺伝子工学的に改変した抗体のことであり、好ましくは、ヒト・マウス・キメラ抗体(欧州特許公開公報E P 0 1 2 5 0 2 3参照)である。「ヒト化抗体」とは、非ヒト動物由来であってA β の毒性コンホマーと極めて特異的に結合する抗体のH鎖とL鎖の相補認識領域(CDR)以外の一次構造をヒトの抗体に対応する一次構造に遺伝子工学的に改変した抗体のことである。ここで、CDRとは、K a b a tら(“Sequences of Proteins of Immunological Interest”, Kabat, E.ら, U. S. Department of Health and Human Services, 1983)またはC h o t h i aら(C h o t h i a & L e s k (1987) J. Mol. Biol., 196: 901-917)のいずれの定義によるものであってもよい。「ヒト抗体」とは、完全にヒト由来の抗体遺伝子の発現産物であるヒト抗体のことであり、例えば、ヒトの抗体産生に参与する遺伝子を導入したトランスジェニック動物を用いて作製したモノクローナル抗体(欧州特許公開公報E P 0 5 4 6 0 7 3参照)等を挙げることができる。例えば、本発明の抗体を治療、予防、又は体内に投与することにより用いる診断に使用する場合には、本発明の抗体として好ましくは、ヒト・非ヒト動物のキメラ抗体、ヒト化抗体、又はヒト抗体である。

【0025】

本発明の抗体のイムノグロブリンクラスは特に限定されるものではなく、I g G、I g M、I g A、I g E、I g D、又はI g Yのいずれのイムノグロブリンクラス(アイソタイプ)であってもよく、好ましくはI g Gである。また、本発明の抗体がI g Gの場合、いずれのサブクラス(I g G 1、I g G 2、I g G 3、又はI g G 4)であってもよい。

また、本発明の抗体は、モノスペシフィック、バイスペシフィック（二重特異性抗体）、トリスペシフィック（三重特異性抗体）（例えば、WO1991/003493号）であってもよい。

【0026】

抗体はその可変領域（特には、CDRs）が結合特性を付与していることが知られており、完全抗体でない抗体断片であってもその結合特性を利用可能であることが当業者に広く知られている。本明細書において、「免疫反応性断片」とは、抗体の一部分（部分断片）を含むタンパク質又はペプチドであって、抗体の抗原への作用（免疫反応性・結合性）を保持するタンパク質又はペプチドを意味する。このような免疫反応性断片としては、例えば、 $F(ab')_2$ 、 Fab' 、 Fab 、 Fab_3 、一本鎖 Fv （以下、「 $scFv$ 」という）、（タンデム）バイスペシフィック一本鎖 Fv （ $sc(Fv)_2$ ）、一本鎖トリプルボディ、ナノボディ、ダイバレント V_HH 、ペンタバレント V_HH 、ミニボディ、（二本鎖）ダイアボディ、タンデムダイアボディ、バイスペシフィクトリボディ、バイスペシフィックバイボディ、デュアルアフィニティリターゲティング分子（DART）、トリアボディ（又はトリボディ）、テトラボディ（又は $[sc(Fv)_2]_2$ ）、若しくは $(scFv-SA)_4$ ジスルフィド結合 Fv （以下、「 $dsFv$ 」という）、コンパクト IgG 、重鎖抗体、又はそれらの重合体を挙げることができる（Nature Biotechnology, 29(1):5-6 (2011); Maneesh Jain et al., TRENDS in Biotechnology, 25(7) (2007):307-316; 及び、Christoph steinら、Antibodies (1):88-123 (2012) 参照）。本明細書において、免疫反応性断片は、モノスペシフィック、バイスペシフィック（二重特異性）、トリスペシフィック（三重特異性）、及びマルチスペシフィック（多重特異性）のいずれであってもよい。

【0027】

本明細書の $A\beta$ の毒性コンホマーを極めて特異的に認識する抗体又はその免疫反応性断片の具体例として、IBL-102抗体又はその誘導体を挙げることができる。例えば、本発明の抗体は、(i) 重鎖可変領域のCDR1、CDR2、及びCDR3が、それぞれ、配列番号5、配列番号6、及び配列番号7に記載のアミノ酸配列を有する抗体又はその免疫反応性断片；(ii) 前記(i)の抗体又は免疫反応性断片であって、更に、軽鎖可変領域のCDR1、CDR2、及びCDR3が、それぞれ、配列番号12、配列番号13、及び配列番号14に記載のアミノ酸配列を有する、抗体又はその免疫反応性断片が挙げられる。あるいは、本明細書の「 $A\beta$ の22位及び23位のアミノ酸におけるターン構造を特異的に認識する抗体又はその免疫反応性断片」としては、例えば、以下の(ii)～(vii)からなる群から選択される抗体又はその免疫反応性断片が挙げられる：(iii) VH が、配列番号4に記載されたアミノ酸配列をコードする核酸配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸配列によりコードされたアミノ酸配列を有する抗体又はその免疫反応性断片であって、 $A\beta$ の22位及び23位のアミノ酸におけるターン構造を極めて特異的に認識するが、 $A\beta$ の他の部位におけるターン構造は認識しない抗体又はその免疫反応性断片、(iv) 前記(ii)の抗体又は免疫反応性断片であって、更に、 VL が配列番号11に記載されたアミノ酸配列をコードする核酸配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸配列によりコードされたアミノ酸配列を有する抗体又はその免疫反応性断片；(v) VH が、配列番号4のアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有する抗体又はその免疫反応性断片であって、 $A\beta$ の22位及び23位のアミノ酸におけるターン構造を極めて特異的に認識するが、 $A\beta$ の他の部位におけるターン構造は認識しない抗体又はその免疫反応性断片；(vi) 前記(v)の抗体又は免疫反応性断片であって、更に、 VL が、配列番号11のアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有する抗体又はその免疫反応性断片；(vii) VH が、配列番号4に記載のアミノ酸配列を有する抗体又はその免疫反応性断片；(viii) 前記(vii)の抗体又は免疫反応性断片であって、更に、 VL が配列番号11に記載のアミノ酸配列を有する抗体又はその免疫反応性断片。ここで、前記(ii)

i) ~ (v i) の抗体又はその免疫反応性断片は、更に、重鎖可変領域の C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 が、それぞれ、配列番号 5、配列番号 6、及び配列番号 7 に記載のアミノ酸配列を有し、かつ／又は、軽鎖可変領域の C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 が、それぞれ、配列番号 1 2、配列番号 1 3、及び配列番号 1 4 に記載のアミノ酸配列を有していてもよい。本明細書において、「I B L-1 0 2 モノクローナル抗体」との言及は、広義では（特にそのように解することが不整合である場合を除き）、前記 (i) ~ (v i i) に記載の抗体、及びそれらの免疫反応性断片を含むことがある。

【0028】

本明細書において、「配列番号 5、配列番号 6、及び配列番号 7 に記載のアミノ酸配列」は、図 10 において I B L-1 0 2 H C として示したアミノ酸配列において下線及び太字で示した 3 種類のアミノ酸配列の左上から左向きに読んで登場する順でそれぞれ置き換えても良い。すなわち、配列番号 5 (D Y N M D)、配列番号 6 (D I N P N T G V T I D N P K F K G)、配列番号 7 (L P D N Y V M D Y) であってよい。また、本明細書において、「配列番号 1 2、配列番号 1 3、及び配列番号 1 4 に記載のアミノ酸配列」の語は、図 10 において I B L-1 0 2 L C として示したアミノ酸配列において下線及び太字で示した 3 種類のアミノ酸配列を左上から左向きに読んで登場する順でそれぞれ置き換えても良い。すなわち、配列番号 1 2 (R C S Q S L V H R N G N T N L H)、配列番号 1 3 (K V S N R F S)、配列番号 1 4 (S Q S T Y V P L T) であってよい。本明細書において、「配列番号 4 に記載されたアミノ酸配列」の語は、図 10 において I B L-1 0 2 H C として示したアミノ酸配列における枠内のアミノ酸配列と置き換えても良い。また、本明細書において、「配列番号 1 1 に記載されたアミノ酸配列」の語は、図 10 において I B L-1 0 2 L C として示したアミノ酸配列における枠内のアミノ酸配列と置き換えても良い。

【0029】

本明細書において提供される I B L-1 0 2 モノクローナル抗体は、A D との相関関係が高い物質と結合することができ、また、一定の治療効果をもたらすことから、I B L-1 0 2 モノクローナル抗体が結合する抗原（又は I B L-1 0 2 モノクローナル抗体が結合するエピトープを有するタンパク質）は、A D の発症・増悪化や A β の毒性発揮に深く関係していることが示された。このような効果は、同じく A β の 2 2 位及び 2 3 位のアミノ酸におけるターン構造を含む抗原から取得された I B L-1 0 1 抗体においては確認されなかった。よって、I B L-1 0 2 モノクローナル抗体が結合する抗原（又エピトープ）と I B L-1 0 2 と同等の特異性で結合する抗体又はその免疫反応性断片は、I B L-1 0 2 モノクローナル抗体と同様に A D の診断及び治療に利用できることが示された。よって、別の態様において、本発明は、I B L-1 0 2 モノクローナル抗体が結合する抗原（又はエピトープ）に極めて特異的に結合する抗体又はその免疫反応性断片に関する。例えば、本発明は、I B L-1 0 2 抗体が結合する、A β 内に存在し得るエピトープを極めて特異的に認識するが、I B L-1 0 2 抗体が結合しない、A β 内に存在し得るエピトープを認識しない抗体又はその免疫反応性断片であってもよい。あるいは、本発明は、I B L-1 0 2 抗体が結合する A β （若しくは、E 2 2 P-A β 4 2）を極めて特異的に認識するが、I B L-1 0 2 抗体が結合しない他の構造を有する A β は認識しない抗体又はその免疫反応性断片であってもよい。別の態様において、本発明は、I B L-1 0 2 抗体と、A β （例えば、2 2、2 3-ターン A β 、E 2 2 P-A β 4 2、又は、A β オリゴマー（E 2 2 P-A β 4 2 のオリゴマーを含む））への特異的結合について競合する抗体又はその免疫反応性断片であり、好ましくは、更に、I B L-1 0 2 抗体が結合しない構造を有する A β とは結合しない抗体又はその免疫反応性断片に関する。

【0030】

本明細書において、被検抗体が、目的のエピトープ又は目的の抗原を極めて特異的に認識する（結合する）か否かは当該エピトープを有するペプチド又は当該抗原への当該抗体の結合、及び、その他のエピトープ、その他の構造を有する抗原、又はその他の抗原への当該抗体の結合を調べることにより判定することができる。このような結合の測定は、後

述の（抗体分子を用いた公知の測定方法）の記載に準じて行うことができる。また、被検抗体が、I B L-1 0 2抗体と、A β （例えば、2 2，2 3-ターンA β のモノマー若しくはオリゴマー、又は、E 2 2 P-A β 4 2）への特異的結合について競合するか否かは、I B L-1 0 2抗体を被検抗体と共に又はI B L-1 0 2抗体単独で抗原（例えば、2 2，2 3-ターンA β のモノマー若しくはオリゴマー、又は、E 2 2 P-A β 4 2）に接触させた後、抗原に結合したI B L-1 0 2抗体の量を比較することにより決定することができる。被検抗体を同時に反応させた場合のI B L-1 0 2抗体の抗原への結合量がI B L-1 0 2抗体を単独で添加した場合の同抗体の抗原への結合量よりも少ない場合には、当該被検抗体はI B L-1 0 2抗体と競合すると決定することができる。抗体の抗原への結合の測定は、後述の（抗体分子を用いた公知の測定方法）の記載に準じて行うことができる。

10

【0 0 3 1】

I B L-1 0 2モノクローナル抗体が結合する抗原（又はエピトープ）に極めて特異的に結合する抗体又はその免疫反応性断片は、I B L-1 0 2抗体と、A β （又は、E 2 2 P-A β 4 2）への特異的結合について競合するが、I B L-1 0 2抗体が結合しない構造を有するA β とは結合しない。I B L-1 0 2モノクローナル抗体が結合する抗原（又はエピトープ）に極めて特異的に結合する抗体又はその免疫反応性断片は、好ましくは、更に、A β （E 2 2 P-A β 4 2を含む）のオリゴマーに結合する。

【0 0 3 2】

（核酸分子・ベクター・宿主細胞）

別の態様において、本発明は、上述の本発明の抗体をコードするポリヌクレオチドを有する核酸分子に関する。具体的には、本発明の核酸分子は、V Hとして配列番号4に記載のアミノ酸をコードするポリヌクレオチドを有する核酸分子、V Lとして配列番号1 1に記載のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを有する核酸分子、又は、V Hとして配列番号4に記載のアミノ酸をコードするポリヌクレオチド、及び、V Lとして配列番号1 1に記載のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを有する核酸分子を含む。V Hとして配列番号4に記載のアミノ酸をコードするポリヌクレオチドとしては、例えば、配列番号1における1 2 6番目から4 7 9番目の塩基配列を有するポリヌクレオチドであってもよい。また、V Lとして配列番号1 1に記載のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドとしては、配列番号8の1 3 0番目から4 6 5番目の塩基配列を有するポリヌクレオチドであってもよい。更に、本発明は、前記核酸分子を有するベクターを包含する。このようなベクターとしては、抗体の発現に利用可能なベクターであれば特に制限されるものではなく、適切なプラスミドベクターなどを使用する宿主に応じて選択することができる。別の態様において、本発明は、前記ベクターを含有する宿主細胞に関する。宿主細胞としては、抗体の発現に利用可能な宿主細胞であれば特に制限されるものではなく、哺乳類細胞（マウス細胞、ラット細胞、ウサギ細胞、ヒト細胞など）、酵母、微生物（大腸菌など）を挙げることができる。

20

30

【0 0 3 3】

（医薬組成物）

また、別の態様において、本発明は、上述の本発明の抗体又はその免疫反応性断片を有効成分として含有する医薬組成物に関する。本発明の医薬組成物の対象疾患としては、A Dを挙げることができる。よって、本発明の医薬組成物は、A Dの予防薬、治療薬、進行抑制剤又は改善薬とすることができる。あるいは、本発明の医薬組成物は、A D患者における認知障害（短期若しくは長期の記憶障害、見当識障害、学習障害、注意障害、空間認知機能、及び／又は問題解決能力の障害）を改善するための医薬組成物とすることができる。あるいは、本発明は、前記医薬組成物を製造するための、本発明の抗体又はその免疫反応性断片の使用に関する。

40

【0 0 3 4】

本発明の医薬組成物は、患者に投与することができる製剤であれば経口又は非経口のいずれの製剤を採用してもよい。非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、点

50

鼻剤、坐剤、貼布剤、軟膏等を挙げることができる。好ましくは、注射剤である。本発明の医薬組成物の剤形は、例えば、液剤又は凍結乾燥製剤を挙げることができる。本発明の医薬組成物を注射剤として使用する場合、必要に応じて、プロピレングリコール、エチレンジアミン等の溶解補助剤、リン酸塩等の緩衝材、塩化ナトリウム、グリセリン等の等張化剤、亜硫酸塩等の安定剤、フェノール等の保存剤、リドカイン等の無痛化剤等の添加物（「医薬品添加物事典」薬事日報社、「Handbook of Pharmaceutical Excipients Fifth Edition」A Ph A Publications社参照）を加えることができる。また、本発明の医薬組成物を注射剤として使用する場合、保存容器としては、アンプル、バイアル、プレフィルドシリンジ、ペン型注射器用カートリッジ、及び、点滴用バッグ等を挙げることができる。

10

【0035】

（キット）

また、別の態様において、本発明は、上述の抗体又はその免疫結合性断片を備えるキットに関する。一態様において、本発明のキットは、IBL-102抗体が結合する抗原の検出用又は測定用のキットであり得る。また、別の態様において、本発明の測定用キットは、A β の毒性コンホマーの検出用又は測定用のキットであり得る。更に別の態様において、本発明のキットは、ADの診断用とすることができる。また、本発明は、このようなキットを製造するための、上述の本発明の抗体又はその免疫反応性断片の使用を含む。

【0036】

本発明のキットは、好ましくは、固相、ハプテン、及び不溶性担体からなる群より選択される担体を含む。本発明の測定キットは、抗体分子を用いた公知の検出及び／又は測定方法に基づくことができる。本明細書において、「抗体分子を用いた公知の検出及び／又は測定方法」は、例えば、酵素免疫測定法（EIA法）用キット、簡易EIA法用キット、酵素結合イムノソルベントアッセイ法（ELISA法）用キット、ラジオイムノアッセイ法（RIA法用キット）、蛍光免疫測定法（FIA法）用キット等の標識化免疫測定法用キット；ウェスタンブロッティング法用キット等のイムノブロッティング法用キット；金コロイド凝集法用キット等のイムノクロマト法用キット；イオン交換クロマトグラフィー法用キット、アフィニティークロマトグラフィー法用キット等のクロマトグラフィー法用キット；比濁法（TIA法）用キット；比ろう法（NIA法）用キット；比色法用キット；ラテックス凝集法（LIA法）用キット；粒子計数法（CIA法）用キット；化学発光測定法（CLIA法、CLEIA法）用キット；沈降反応法用キット；表面プラズモン共鳴法（SPR法）用キット；レゾナントミラーディテクター法（RMD法）用キット；比較干渉法用キット等を含む。本発明のキットが、所望の検出及び／又は測定を実施することが可能であるか否かは、標準検体又は目的の検体を用いて、各測定法を当業者周知の方法により実施することにより、検出及び／又は測定可能であるか否かを判定することにより確認することができる。

20

30

【0037】

例えば、本発明のキットは、（i）本発明の抗体又はその免疫反応性断片である第一抗体が固定化した固相又はハプテン、及び（ii）標識化された抗A β 抗体（抗A β 42抗体、及び抗A β 40抗体を含む、本明細書全体において同様）である第二抗体を含む免疫化学測定のキットとすることができる。また、本発明のキットがハプテンを含む場合、更にハプテンと特異的に結合する物質が固定化した固相をさらに含んでもよい。また、前記第一抗体を標識化抗体とし、前記第二抗体を固定化抗体としてもよい。

40

または、本発明のキットは、（i）本発明の抗体又はその免疫反応性断片である第一抗体が固定化した固相、及び、（ii）抗A β 抗体である第二抗体が固定化したハプテンを含む免疫化学測定のキットとすることができる。また、当該キットは更に、ハプテンと特異的に結合する、標識された物質を含んでもよい。また、前記第一抗体をハプテン結合抗体とし、前記第二抗体を固相固定化抗体としてもよい。

あるいは、本発明のキットは、（i）本発明の抗体又はその免疫反応性断片である第一抗体が固定化した不溶性担体、及び、（ii）抗A β 抗体である第二抗体が固定化した不

50

溶性担体を含む免疫化学測定キットとすることができる。

【0038】

上記のいずれのキットの例においても、前記第一抗体と前記第二抗体はA β （A β 42、A β 40を含む、本明細書全体において同様）の異なる部位を認識する。また、前記第一抗体をモノクローナル抗体又はその免疫反応性断片とし、第二抗体をポリクローナル抗体又はその免疫反応性断片としてもよいし、第一抗体をポリクローナル抗体又はその免疫反応性断片とし、第二抗体をモノクローナル抗体又はその免疫反応性断片としてもよいし、あるいは、第一及び第二の両方の抗体をモノクローナル抗体又はその免疫反応性断片としてもよい。本明細書のキットにおいて、例えば、第一抗体を上述の本発明の抗体とし、第二抗体をA β のN末近辺（N末から1～20アミノ酸）又はC末近辺（C末から1～20アミノ酸）を特異的に認識する抗体としてもよい。

10

【0039】

本発明のキットが標識化された抗体又はその免疫結合性断片を含む場合、当該標識としては、放射能標識、酵素、蛍光標識、生物発光標識、化学発光標識金属等の検出可能な標識を用いることができる。このような標識としては、これに限定されるものではないが例として、 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{14}C 等の放射能標識； β ガラクトシダーゼ、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、乳酸オキシダーゼ、アルコールオキシダーゼ、モノアミンオキシダーゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ等の酵素；FAD、FMN、ATP、ビオチン、ヘム等の補酵素又は補欠分子族；フルオレセイン誘導体（フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、フルオレセインチオフルバミル等）、ローダミン誘導体（テトラメチルローダミン、トリメチルローダミン（RITC）、テキサスレッド、ローダミン110等）、Cy色素（Cy3、Cy5、Cy5.5、Cy7）、Cyクロム、スペクトラムグリーン、スペクトラムオレンジ、プロピジウムイオダイド、アロフィコシアニン（APC）、R-フィコエリスリン（R-PE）等の蛍光標識；ルシフェラーゼ等の生物発光標識；あるいは、ルミノール、イソルミノール、N-（4-アミノブチル）-N-エチルイソルミノースエステル等のルミノール誘導体、N-メチルアクリジニウムエステル、N-メチルアクリジニウムアシルスルホンアミドエステル等のアクリジニウム誘導体、ルシゲニン、アダマンチルジオキセタン、インドキシル誘導体、ルテニウム錯体等の化学発光標識；金コロイド等の金属等の検出可能な標識を挙げることができる。

20

30

【0040】

本発明のキットは、必要に応じて、発色試薬、反応停止用試薬、標準抗原試薬、検体前処理用試薬、ブロッキング試薬等を含んでもよい。また、本発明のキットが標識化された抗体を含む場合、更に標識と反応する基質を含んでもよい。更に、本発明のキットは、紙箱又はプラスチックケース等のキットの構成物を格納するパッケージ、及び取扱説明書等を含んでもよい。

【0041】

本発明のキットに用いる検体としては、例えば、生検として被験者から採取した組織試料または液体を使用することができる。使用される生検は、所望の検出及び／又は測定の対象となるものであれば特に限定はなく、例えば、血液、血漿、血清、リンパ液、尿、漿液、髄液、脳脊髄液、関節液、眼房水、涙液、唾液、脳組織またはそれらの分画物若しくは処理物を挙げることができる。本発明のキットによる分析は、定性的、定量的または半定量的に行うことができる。

40

【0042】

（検出・測定・診断用の薬剤、検出・測定・診断用組成物）

別の態様において、本発明は、本発明の抗体又はその免疫反応性断片を含有する、IBL-102抗体が結合する抗原又はA β の毒性コンホマーの検出及び／又は測定に使用するための薬剤又は組成物（以下、「測定用の薬剤又は組成物」という）に関する。本明細書において、測定用の薬剤又は組成物は、ADの診断用途に用いられる物、即ち、ADの診断薬又はADの診断用組成物を含む。あるいは、本発明は、前記診断用組成物を製造す

50

るための、本発明の抗体又はその免疫反応性断片の使用に関する。

【0043】

例えば、生体外で使用する (in vitro 又は ex vivo) ことを目的とする場合、本発明の検出及び／又は測定用の薬剤又は組成物は、必要に応じて、上述の本発明のキットに準じた構成とすることができる。

【0044】

また、本発明の検出及び／又は測定用の薬剤又は組成物は、画像診断用を含む、生体内に投与して使用されるための形態（以下、「in vivo 検出及び／又は測定用の薬剤又は組成物」という）であっても良い。本発明の in vivo 検出及び／又は測定用の薬剤又は組成物において、本発明の抗体又はその免疫反応性断片は、標識物質を含有し又は標識物質と結合している。標識物質としては、例えば、放射性同位元素等の当業者周知の物質を用いることができ、好ましくは陽電子放出放射性同位元素又は γ 線放射性同位元素であり、これに限定されるものではないが、例えば ^{131}I 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^8Y 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{111}In 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{18}F 、 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O および ^{75}Br を挙げることができる。本発明の in vivo 検出及び／又は測定用の薬剤又は組成物における、本発明の抗体又はその免疫反応性断片は、好ましくは、キメラ抗体、ヒト化抗体又はヒト抗体である。また、本発明の in vivo 検出及び／又は測定用の薬剤又は組成物は、ヒトへの投与に適した医薬上許容される形態であって、生理学的に許容し得る添加剤、例えば、薬学的に許容し得る希釈剤、緩衝剤、可溶化剤、無痛化剤、溶剤、安定化剤又は酸化防止剤を含んでいてもよい。本発明の in vivo 検出及び／又は測定用の薬剤又は組成物の投与量は、対象部位、用いる検出・測定・診断方法、被験者の年齢、性別その他の条件、疾患の程度により適宜選択することができる。

【0045】

本明細書において、「XNY」（X 及び Y はアミノ酸一文字表記；N は自然数）は、N 位のアミノ酸 X がアミノ酸 Y に置換されていることを示し、「A β p-q」（p 及び q は自然数）は、A β の p 位のアミノ酸から q 位のアミノ酸からなるペプチドを示す。特に A β 1-40 及び A β 1-42 は、それぞれ、A β 40 及び A β 42 と記載する。例えば、E22P-A β 42 は、22 位のグルタミン酸がプロリンに置換された A β の 1 位から 42 位までのアミノ酸からなるペプチドを示し、G9C、E22P-A β 9-35 は、9 位のグリシンがシステインに置換され、22 位のグルタミン酸がプロリンに置換された A β の 9 位-35 位までのアミノ酸からなるペプチドを示す。

【発明の効果】

【0046】

本発明の抗体は、A β の毒性コンホマーと極めて高い特異的で結合することができることから、A β の毒性コンホマーを標的とした各種用途において優れた効果を発揮することができる。例えば、本発明の抗体は、AD の診断用途に用いることができる。また、本発明の抗体は、A β の毒性コンホマーのモノマー及びダイマーの両方の状態と結合することができることから、A β の重合体化が発症又は増悪に寄与する疾患、例えば、AD の治療又は予防用途に使用することができる。

【図面の簡単な説明】

【0047】

【図1】アルツハイマー病患者 (AD) 及び健常人 (Control) 由来の脳脊髄液中における IBL-102 抗体と結合する A β 量の比較を示すグラフである。縦軸は A β の毒性コンホマー (IBL-102 抗体と結合する A β) 量 (pg/mL) を示す。

【図2】ラットプライマリーニューロンを用いて、A β 42 誘発神経毒性に対する IBL-102 抗体の神経毒性保護効果について検討した結果を示すグラフである。左のグラフは野生型 A β 42 (Wt-A β 42) 添加群、右のグラフは E22P-A β 42 添加群の結果を示す。縦軸は、細胞毒性刺激無しかつ抗体添加無し (Veh) 群に対する生存率 (%) の平均値を示し、エラーバーは標準誤差を示す。それぞれのグラフにおいて、左から

順に細胞毒性刺激無しかつ抗体添加無し (V e h)、細胞刺激有しかつ抗体添加無し (—)、細胞刺激有しかつ I g G 添加 (I g G)、及び、細胞刺激有しかつ I B L-1 0 2 添加 (I B L-1 0 2) を示す。***は、v e h に対して $p < 0.001$ を示し、# は、 $p < 0.05$ を示し、### は、 $p < 0.001$ を示す。

【図 3】A D モデルマウスの脳切片を用いて、8 2 E 1、I B L-1 0 1、I B L-1 0 2 の老人斑に対する染色性を免疫組織化学染色により検討した染色像である。写真の下の数値は、それぞれ免疫染色に用いた抗体の濃度を示す。

【図 4】A D モデルマウスが示す神経症状に対する I B L-1 0 2 抗体の神経症状抑制効果について E l e v a t e d p l u s - m a z e t e s t を用いて検討した結果である。縦軸は、c l o s e d a r m に滞在した時間の割合 (%) の平均値を示し、エラーバーは標準誤差を示す。グラフは左から順に、抗体非投与野生型マウス (W t)、I g G 投与 A D モデルマウス (T g + I g G)、I B L-1 0 1 投与 A D モデルマウス (T g + I B L-1 0 1)、及び I B L-1 0 2 投与 A D モデルマウス (T g + I B L-1 0 2) を示す。* は、 $p < 0.05$ を示す。

【図 5】A D モデルマウスが示す神経症状に対する I B L-1 0 2 抗体の神経症状抑制効果について N e s t i n g t e s t を用いて検討したグラフを示す。縦軸はスコアの平均値を示し、エラーバーは標準誤差を示す。グラフは左から順に、抗体非投与野生型マウス (W t)、I g G 投与 A D モデルマウス (T g + I g G)、I B L-1 0 1 投与 A D モデルマウス (T g + I B L-1 0 1)、及び I B L-1 0 2 投与 A D モデルマウス (T g + I B L-1 0 2) を示す。* は、 $p < 0.05$ を示す。

【図 6】A D モデルマウスの脳内での老人斑の蓄積に対する I B L-1 0 2 抗体の抑制効果について免疫組織化学染色を用いて検討した染色像および老人斑の計数結果を示すグラフである。グラフの縦軸は、8 2 E 1 抗体により染色された老人斑の数の平均値を示し、エラーバーは標準誤差を示す。横軸は、それぞれ投与した抗体を示す。

【図 7】A D モデルマウスの海馬内での老人斑の蓄積に対する I B L-1 0 2 抗体の抑制効果について免疫組織化学染色を用いて検討した染色像および老人斑の計数結果を示すグラフである。グラフの縦軸は、8 2 E 1 抗体により染色された老人斑の数の平均値を示し、エラーバーは標準誤差を示す。横軸は、それぞれ投与した抗体を示す。

【図 8】A D モデルマウスの脳内での A β の蓄積に対する I B L-1 0 2 抗体の抑制効果について E L I S A 法を用いて検討したグラフである。縦軸は、上から順に、脳内不溶性画分中の A β 4 0 濃度、脳内不溶性画分中の A β 4 2 濃度、及び、脳内可溶性画分中の A β 4 0 濃度 (全て、 $\mu\text{g}/\text{mg}$ タンパク質) の平均値を示し、エラーバーは標準誤差を示す。横軸は、それぞれ投与した抗体を示す。

【図 9】I B L-1 0 2 抗体の塩基配列 (重鎖は配列番号 1、軽鎖は配列番号 8) である。

【図 10】I B L-1 0 2 抗体のアミノ酸配列である。重鎖 (H C) は配列番号 2、軽鎖 (L C) は配列番号 9 に記載されている。斜線はシグナル配列を示し、下線は C D R を示し、枠内は可変領域を示す。

【図 11】A β 重合体への結合能を測定した結果を表すグラフである。縦軸は 4 9 2 n m における吸光度を表し、横軸は被検抗体の濃度 (ng/mL) を表す。グラフは上から順に、被検抗体として、I B L-1 0 1、I B L-1 0 2、4 G 8 を用いた結果を示す。

【図 12】I B L-1 0 2 単回投与のプロトコルを表す図である。

【図 13】I B L-1 0 2 単回投与試験の結果を表すグラフである。A は対照群および T g 2 5 7 6 マウスに P B S または I B L-1 0 2 を投与したときの、各群の R e - e x p l o r i n g s c o r e を示す。B は、T g 2 5 7 6 マウスの各個体ごとにおける、P B S 投与時と I B L-1 0 2 抗体投与時の R e - e x p l o r i n g s c o r e の比較である。縦軸は再探索スコア (R e - e x p l o r i n g s c o r e) を表す。

【図 14】アルツハイマー病患者 (A D 患者群) 及び非 A D 対照群 (非 A D 対照群) 由来の脳脊髄液中における、総 A β 4 2 (右図)、及び総 A β 4 2 に対する I B L-1 0 2 抗体と結合する A β の比 (左図) を示すグラフである。縦軸は、それぞれ、A β 4 2 (ng

10

20

30

40

50

／mL) (右図)、及びAβの毒性コンホマー (IBL-102抗体と結合するAβ) ／総Aβの比 (左図) を示す。

【図15】IBL-102抗体とIBL-101抗体の各抗原への結合能をエンザイムイムノアッセイにより測定した結果を表すグラフである。上段のグラフは抗体としてIBL-101を使用した結果を示し、下段は抗体としてIBL-102を使用した結果を示す。両グラフにおいて横軸は使用した抗原を示し、左から、野生型Aβ40、野生型Aβ42、E22P-Aβ42、E22V-Aβ42、G33P-Aβ42、L34P-Aβ42、V36P-Aβ42、G37P-Aβ42、G38P-Aβ42、V39P-Aβ42、V40P-Aβ42、I41P-Aβ42を表す。縦軸は492nmにおける吸光度を表す。各抗原について示された4本の棒グラフは、左から順に抗体量として15ng/mL、30ng/mL、60ng/mL、及び120ng/mLを使用した結果を表す。

【図16】単回投与試験のスケジュール及び結果を表す。縦軸は、(新奇物体Bへの接触回数) ／ ((既知物体Aへの接触回数) + (新奇物体Bへの接触回数)) (Novel)、又は(既知物体Aへの接触回数) ／ ((既知物体Aへの接触回数) + (新奇物体Bへの接触回数)) (Similar)を表す。「Wt」は野生型マウス、「IgG」はIgG投与Tg2576マウス、「IBL-102」は、IBL-102投与Tg2576マウスを示し、nは各群で使用したマウスの数を示す。***はP<0.0005を表す。

【発明を実施するための形態】

【0048】

1. 抗体の作製

(抗体の取得)

本発明の抗体は、Aβ42の22位及び23位のアミノ酸におけるターン構造を備える物質、好ましくは、E22P-Aβ42、Aβ-ラクタム(22K-23E)、又は、P3-Aβ42(特開2006-265189号; K. Murakamiら(2005) J. Am. Chem. Soc., 127: 15168-15174)を免疫源として、必要に応じて免疫賦活剤(例えば、鉱油若しくはアルミニウム沈殿物と加熱死菌若しくはリポ多糖体、フロインドの完全アジュバント、または、フロインドの不完全アジュバント等)とともに、非ヒト哺乳動物または鳥類に免疫することにより作製することができる。免疫動物としては、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ラビット、イヌ、サル、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ、アヒル等ハイブリドーマを作製することが可能な動物であれば特に限定はないが、好ましくは、マウスまたはラットであり、より好ましくはマウスである。動物への免疫原の投与は、例えば、0.1~1000μgを1回または適当な間隔をあけて数回(通常1~6週毎に1回の免疫を合計2~10回程度)、皮下注射、腹腔内注射、静脈内注射、皮内注射、筋肉内注射または足蹠注射により行うことができる。最後の免疫から1~2週間後に、免疫した動物の眼窩または尾静脈から採血を行い、その血清を用いて抗体価の測定を行う。本発明の抗体は、十分な抗体価を示す動物の血清から精製することにより得ることができる。

【0049】

モノクローナル抗体は、上記方法により免疫した免疫感作動物から得た抗体産生細胞と、骨髓腫系細胞(ミエローマ細胞)を融合することにより得られるハイブリドーマを培養することにより得ることができる。当該融合方法としては、例えば、ミルス테인らの方法(Galfré, G. & Milstein, C. (1981) Methods Enzymol., 73: 3-46)を挙げることができる。使用する抗体産生細胞は、上記方法により免疫し血清が十分な抗体価を示したマウスまたはラットの脾臓、脾臓、リンパ節、末梢血より採取することができる。使用する骨髓腫系細胞は、例えば、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ラビット又はヒト等の哺乳動物に由来する細胞であって、in vitroで増殖可能な細胞であれば特に限定はない。このような細胞としては、例えば、P3-X63Ag8(X63)(Nature, 256, 495, 1975)、P3/NS1/1-Ag4-1(NS1)(Eur. J. Immunol., 6, 292, 1976)、P3X63Ag8U1(P3U1)(Curr. Top. Microbio

l. Immunol., 81, 1, 1978)、P3X63Ag8.653(653)(J. Immunol., 123, 1548, 1979)、Sp2/O-Ag14(Sp2/O)(Nature, 276, 269, 1978)、Sp2/O/FO-2(FO-2)(J. Immunol. Methods, 35, 1, 1980)等を挙げることができ、好ましくは、抗体産生細胞と同種動物由来の細胞であり、より好ましくは、抗体産生細胞と同系統の動物由来の細胞である。例えば、マウス由来の骨髓腫系細胞として、好ましくは、P3U1又はP3X63-Ag8-653である。

【0050】

抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合させてハイブリドーマを形成させる方法としては、ポリエチレングリコール(以下、「PEG」という)等を用いる方法(PEG法)、センダイウイルスを用いる方法、電気融合装置を用いる方法などがあげられる。モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞の選別は、公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。通常、HAT(ヒポキサンチン-アミノプテリン-チミジン)を添加した動物細胞用培地で通常、5日～3週間、好ましくは1週間～2週間選択的に増殖させることにより、ハイブリドーマ細胞の選別を行なうことができる。

【0051】

培養後、培養上清を採取し、ELISA等により、A β の毒性コンホマー結合が極めて特異的であるクローンを選択する。選択されたクローンについて、限界希釈法を1～5回繰り返すことにより単一細胞化を行い、当該単一細胞化されたクローンが産生する抗体のうち、A β への毒性コンホマーへの特異性が極めて高い抗体をスクリーニングすることにより、安定して高い特異性を示す抗体を産生する細胞を選択することができる。本発明のA β の毒性コンホマーと極めて特異的に結合する抗体のスクリーニングは、22位及び23位に β -ターン構造をとるA β 変異体(E22P-A β 42)(K. Murakamiら(2003) J. Biol. Chem., 278:46179-46187)への結合能が高く、それ以外のA β の構造(例えば、A21P-A β 42、D23P-A β 42、V24P-A β 42、G25P-A β 42、M35P-A β 42、E22V-A β 42)から選択される1種類以上のペプチド又はこれらの全てのペプチド)への結合能が低いことを指標とし、結合力よりは特異性を優先して特異性の高いクローンを選択することを繰り返すことにより行うことができる。

【0052】

得られた抗体は、均一にまで精製することができる。抗体の分離、精製は通常タンパク質で使用されている分離、精製方法を使用することができる。例えば、アフィニティークロマトグラフィ等のカラムクロマトグラフィ、フィルター、限外濾過、塩析、透析、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動等を適宜選択、組み合わせることにより、抗体を分離、精製することができる(Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)。アフィニティークロマトグラフィに用いるカラムとしては、例えば、プロテインAカラム、プロテインGカラムを挙げることができる。更に、抗体のクラスによらず、E22P-A β 42固相化カラム、イオン交換クロマトグラフィ、疎水相互作用クロマトグラフィ等を用いることも

【0053】

あるいは、VHが、配列番号4に記載されたアミノ酸配列をコードする核酸配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズする核酸配列によりコードされたアミノ酸配列を有し、かつ、VLが配列番号11に記載されたアミノ酸配列をコードする核酸配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズする核酸配列によりコードされたアミノ酸配列を有する抗体又はその免疫反応性断片；VHが、配列番号4のアミノ酸配列と80%、85%、90%、95%、98%、又は99%の相同性を有するアミノ酸配列を有し、かつ、VLが、配列番号11のアミノ酸配列と80%、85%、90%、95%、98%、又は99%の相同性を有するアミノ酸配列を有する抗体又はその免疫反応性断片；CDRH1

、CDRH2及びCDRH3が、それぞれ、配列番号5、6、及び7に記載のアミノ酸配列を有し、かつ、CDRL1、CDRL2及びCDRL3が、それぞれ、配列番号12、13、及び14に記載のアミノ酸配列を有する抗体又はその免疫反応性断片のアミノ酸配列をデザインし、当該デザインされたアミノ酸配列をコードするDNAを調製し、発現ベクターに組み込み、適当な宿主細胞に当該ベクターを導入して発現させることにより得た抗体から、上述の方法に従ってAβの毒性コンホマーへの特異性が極めて高い抗体をスクリーニングすることにより得ることができる。

【0054】

また、例えば、本発明の抗体は、配列番号2（シグナルペプチドを有する重鎖）、配列番号3（シグナルペプチドを含まない重鎖）、及び配列番号4（重鎖可変領域）のいずれかに記載のアミノ酸配列をコードするDNA、並びに、配列番号9（シグナルペプチドを有する重鎖）、配列番号10（シグナルペプチドを含まない重鎖）、及び配列番号11（軽鎖可変領域）のいずれかに記載のアミノ酸配列をコードするDNAを合成し、あるいは、配列番号1及び8に記載の核酸配列を有するDNAを合成し、当該DNAからそれぞれ配列番号2～配列番号4、並びに配列番号9～11に記載のアミノ酸配列を有するH鎖及びL鎖又はそれらの可変領域を得ることにより製造することができる。

【0055】

（ヒト型キメラ抗体作製）

本発明の抗体がヒト型キメラ抗体の場合、Aβの毒性コンホマーを極めて特異的に認識する非ヒト動物モノクローナル抗体（例えば、IBL-102モノクローナル抗体）のVH及びVLをコードするDNAを調製し、これをヒト免疫グロブリンの定常領域cDNAと結合して発現ベクターに組み込み、適当な宿主細胞に当該ベクターを導入して発現させることにより得ることができる（Morrison, S. L. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 6851-6855, 1984）。

【0056】

（ヒト化抗体作製）

本発明の抗体がヒト化抗体の場合は、Aβの毒性コンホマーを特異的に認識する非ヒト動物モノクローナル抗体（例えば、IBL-102モノクローナル抗体）のVH及びVLのCDRをコードするアミノ酸配列をヒト抗体のVH及びVLのFRに移植したV領域をコードするDNAを構築し、構築したDNAをヒト由来免疫グロブリンの定常領域cDNAと結合して発現ベクターに組み込み、適当な宿主細胞に当該ベクターを導入して発現させることにより得ることができる（L. Riehmら, Nature, 332, 323, 1988; Kettlborough, C. A. ら, Protein Eng., 4, 773-783, 1991; Clark M., Immunol. Today, 21, 397-402, 2000参照）。非ヒト動物モノクローナル抗体のCDRは、上述の方法によって得られた非ヒト動物モノクローナル抗体のVH及びVLをコードするDNA配列から予測されるアミノ酸配列と、既知の抗体のVH及びVLの全アミノ酸配列とを比較して得ることができる。既知の抗体のアミノ酸配列は、例えば、プロテイン・データ・バンク等のデータベースに登録されている抗体のアミノ酸配列より得ることができる。また、ヒト化抗体のFRとしては、移植後の抗体が本発明の効果を奏するものであれば特に限定は無いが、好ましくは、ヒト化抗体の可変領域（以下、「V領域」という）がCDRが由来する非ヒト動物モノクローナル抗体のV領域と類似の立体構造となるヒト抗体のFR、又は、使用する非ヒト動物モノクローナル抗体のFRのアミノ酸配列と同一性が高いヒト抗体FRである。ヒト化抗体において、ヒト抗体に由来するFRを構成するアミノ酸の一部（特には、立体的にCDRと近接した位置に存在するアミノ酸）は、必要に応じてCDRが由来する非ヒト動物モノクローナル抗体のFR配列に置換されていてもよい（Queenら、米国特許第5585089号参照）。使用するヒト化抗体のV領域をコードするDNA配列は、非ヒト動物モノクローナル抗体のCDRのアミノ酸配列とヒト抗体のFRのアミノ酸配列を結合したアミノ酸配列に対応するDNA配列として設計する。ヒト化抗体のV領域をコードするDNAは、設計したDNA配列を基に、当業者周知の

10

20

30

40

50

方法によって作製することができる。

【0057】

(ヒト抗体)

ヒト抗体は、例えば、ヒト抗体ファージライブラリー又はヒト抗体産生トランスジェニックマウスを利用することにより得ることができる(富塚ら, Nature Genet., 15, 146-156 (1997))。ヒト抗体ファージライブラリーを利用する場合、例えば、E22P-A β 42を固相に固定化し、ファージ抗体ライブラリーを反応させて、非結合のファージを洗浄除去した後、結合したファージを回収することにより、所望のクローンを得ることができる(パンニング)。ヒト抗体産生トランスジェニックマウスは、内因性免疫グロブリン(Ig)遺伝子をノックアウトしたマウスにヒト抗体のIg遺伝子を導入したマウスである。ヒト抗体産生トランスジェニックマウスを免疫動物として、上述の本発明の抗体作製方法に準じて抗原(好ましくは、E22P-A β 42)を免疫することにより、A β の毒性コンホマーを特異的に認識するヒト抗体を得ることができる。

10

【0058】

(交差反応率)

例えば、本発明の抗体は、主反応(E22P-A β 42に対する結合)に対する、A21P-A β 42、E22V-A β 42、D23P-A β 42、V24P-A β 42、G25P-A β 42、及びM35P-A β 42から選択される1種類以上の任意の数(全てを含む)のペプチドへの結合の交差反応率が、5%以下、3%以下、又は1%以下であってよい。あるいは、本発明の抗体は、主反応(E22P-A β 42に対する結合)に対する、A21P-A β 42、E22V-A β 42、D23P-A β 42、V24P-A β 42、G25P-A β 42、及びM35P-A β 42から選択される1種類以上の任意の数(全てを含む)のペプチドへの結合の交差反応率が、それぞれ順に、0.3%以下、0.3%以下、0.5%以下、0.4%以下、0.6%以下、及び0.7%以下であってもよく、更には、それぞれ順に、それぞれ順に、0.27%以下、0.28%以下、0.50%以下、0.33%以下、0.53%以下、及び0.68%以下であってもよい。

20

【0059】

よって、例えば、前記選択は、A β の毒性コンホマーとそれ以外の構造を有するA β (例えば、A21P-A β 42、及びE22V-A β 42)との交差反応性を指標として行うことができる。すなわち、交差反応率が前記範囲内に含まれる抗体として選択することができる。交差反応率は、まず、測定対象所望の測定系において、A β の毒性コンホマー(例えば、E22P-A β 42、又はE22P-A β 40)を標準物質として用いて検量線を作成した上で、非毒性コンホマー(例えば、A21P-A β 42、及びE22V-A β 42)について得られた測定値(例えば、吸光度)を、A β の毒性コンホマーを用いて作成した検量線に当てはめて濃度を算出し、算出された濃度(実測値)/(非毒性コンホマーの実際の添加濃度) $\times$ 100(%)により、求めることができる。交差反応率の決定方法における測定は、抗体分子を用いた公知の測定方法であれば特に限定されるものではなく、後述のA β の毒性コンホマーの測定方法に準じて行うことができる。

30

【0060】

(核酸、ベクター、宿主細胞)

本発明の核酸は、上述において得られた抗体を産生するハイブリドーマからクローニングするか、あるいは、上述において得られた抗体またはその免疫反応性断片のアミノ酸配列を基に、適宜核酸配列を設計することにより得ることができる。本発明のベクターは、得られた核酸を適宜発現に適したベクターに組み込むことにより得ることができる。本発明のベクターは、本発明の核酸の他、発現に必要な領域(プロモーター、エンハンサー、ターミネーター等)を含んでいてもよい。また、本発明の宿主細胞は、本発明のベクターを適切な細胞株(例えば、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母、大腸菌等の微生物)に導入することにより得ることができる。

40

【0061】

50

(標識)

抗体又はその免疫反応性断片への標識の結合は当分野において一般的な方法により行うことができる。例えば、タンパク質又はペプチドを蛍光標識する場合、タンパク質又はペプチドをリン酸緩衝液で洗浄した後、DMSO、緩衝液等で調整した色素を加え、混合した後室温で10分間静置することにより結合させることができる。また、市販の標識キットとして、ビオチン標識キット(Biotin Labeling Kit-NH₂、Biotin Labeling Kit-SH:株式会社同仁化学研究所)、アルカリフォスファターゼ標識用キット(Alkaline Phosphatase Labeling Kit-NH₂、Alkaline Phosphatase Labeling Kit-SH:株式会社同仁化学研究所)、ペルオキシダーゼ標識キット(Peroxidase Laberining Kit-NH₂、Peroxidase Laberining Kit-NH₂:株式会社同仁化学研究所)、フィコビリプロテイン標識キット(Allophycocyanin Labeling Kit-NH₂、Allophycocyanin Labeling Kit-SH、B-Phycocerythrin Labeling Kit-NH₂、B-Phycocerythrin Labeling Kit-SH、R-Phycocerythrin Labeling Kit-NH₂、R-Phycocerythrin Labeling Kit-SH:株式会社同仁化学研究所)、蛍光標識キット(Fluorescein Labeling Kit-NH₂、HiLyte Fluor(登録商標) 555 Labeling Kit-NH₂、HiLyte Fluor(登録商標) 647 Labeling Kit-NH₂:株式会社同仁化学研究所)、DyLight 547、DyLight 647(テクノケミカル株式会社)、Zenon(登録商標) Alexa Fluor(登録商標)抗体標識キット、Qdot(登録商標)抗体標識キット(インビトロゲン社)、EZ-Label Protein Labeling Kit(フナコシ株式会社)等を用いて標識することもできる。また、標識した抗体又はその断片の検出は、適宜標識に適した機器を使用することにより行うことができる。

【0062】

(キット)

また、本発明は、上述の本発明の抗体又はその免疫反応性断片を含有する、A β の毒性コンホマー測定キットに関する。本発明のキットは、上述の方法に従って作製した抗体又はその免疫反応性断片を用いて、目的に応じて当業者に慣用の技術を用いて製造することができる。

【0063】

(A β の毒性コンホマーの検出及び／又は測定方法)

別の態様において、本発明は、A β の毒性コンホマーの検出及び／又は測定方法に関する。本発明のA β の毒性コンホマーの検出及び／又は測定方法は、基本的な構成として、検体と本願発明の抗体又はその免疫反応性断片を接触させるステップ、及び、本願発明の抗体又はその免疫反応性断片に結合したA β の毒性コンホマーを検出及び／又は測定するステップを備える。また、本発明の検出及び／又は測定方法は、*in vitro*及び*in vivo*のいずれで行われるものであってもよいが、好ましくは、*in vitro*で行われる。例えば、本発明の検出及び／又は測定方法は、抗体分子を用いた公知の検出及び／又は測定方法に基づき行うことができる。

【0064】

より具体的には、本発明の検出方法は、例えば、以下の方法を含む：

(a) A β の22位及び23位のアミノ酸におけるターン構造を極めて特異的に認識するが、A β の他の部位におけるターン構造は認識しない抗体又はその免疫反応性断片と検体とを接触させるステップ、

(b) 前記抗体又はその免疫反応性断片へ結合したアミロイド β の毒性コンホマーを検出するステップ；

(c) 前記ステップにおいてアミロイド β の毒性コンホマーが検出された場合には、検体

中にアミロイドβの毒性コンホマーが存在すると判定し、前記ステップにおいてアミロイドβの毒性コンホマーが検出されなかった場合には、検体中にアミロイドβの毒性コンホマーが存在しないと判定するステップを備える、検体中のアミロイドβの毒性コンホマーの存否を決定する方法。

【0065】

また、本発明の測定方法は、例えば、以下の方法を含む：

(a) Aβの22位及び23位のアミノ酸におけるターン構造を極めて特異的に認識するが、Aβの他の部位におけるターン構造は認識しない抗体又はその免疫反応性断片と検体とを接触させるステップ；

(b) 前記抗体又はその免疫反応性断片へ結合したアミロイドβの毒性コンホマー量を測定するステップ；

(c) 前記検出された毒性コンホマー量から、検体中のアミロイドβの毒性コンホマーのレベルを算出するステップを備える、検体中のアミロイドβの毒性コンホマーのレベルを決定する方法。

【0066】

本発明の測定方法を定量的に行う場合、予め適宜既知の濃度に段階希釈された標準物質（例えば、E22P-Aβ42）を検体の検出と同時に又は別々に用いて検量線を作成し、検体中の測定値から当該検量線を基にアミロイドβの毒性コンホマーの濃度を計算して求めることができる。

【0067】

本明細書において、「抗体又はその免疫反応性断片と検体とを接触させるステップ」及び「検体中のアミロイドβの毒性コンホマーを検出し又は定量するステップ」は、例えば、サンドイッチELISAで行うことができる。具体的には、固相に固定化された本発明の抗体又はその免疫反応性断片に被験試料（検体）を接触させ、洗浄後、検出対象物質（アミロイドβの毒性コンホマー）と結合可能な標識化抗体を添加した後、非結合抗体を洗浄により除去し、当該抗体の標識を検出又は標識量（又は強度）を測定することにより行うことができる。また、イムノクロマトにより行う場合には、固定化されていない検出対象物質（アミロイドβの毒性コンホマー）と結合可能な標識化抗体に検体を接触させた後、当該混合物を本発明の抗体又はその免疫反応性断片が特定部位に固定化された担体と接触させ、当該部位における前記標識化抗体を検出又は標識量（又は強度）を測定することにより行うことができる。本段落の記載においては、検出対象物質（アミロイドβの毒性コンホマー）と結合可能な標識化抗体の代わりに、標識化された本発明の抗体又はその免疫反応性断片を使用し、かつ、本発明の抗体又はその免疫反応性断片の代わりに、検出対象物質（アミロイドβの毒性コンホマー）と結合可能な抗体を試用してもよい。

【0068】

あるいは、本発明の抗体又はその免疫反応性断片は、*in vivo*におけるAβの毒性コンホマーの検出及び／又は測定に使用することもできる。例えば、本発明は、蛍光又は放射性物質で標識した本発明の抗体又はその免疫反応性断片を生体内に投与するステップ、生体内における前記標識を検出及び／又は測定するステップを備える、生体内におけるAβの毒性コンホマーの検出方法又は測定方法を含む。例えば、その応用された態様として、本発明は、蛍光又は放射性物質で標識した本発明の抗体又はその免疫反応性断片を生体内に投与するステップ、生体内における前記標識を検出してその存在位置を決定するステップを備える、生体内におけるAβの毒性コンホマーの存在位置の決定方法であってもよい。又は、本発明は、蛍光又は放射性物質で標識した本発明の抗体又はその免疫反応性断片を生体内に投与するステップ、生体内における前記標識の量又は強度を測定するステップ、測定された標識量又は強度からAβの毒性コンホマーのレベルを決定するステップを備える、生体内におけるAβの毒性コンホマー量を決定する方法であってもよい。あるいは、本発明は、蛍光又は放射性物質で標識した本発明の抗体又はその免疫反応性断片を生体内に投与するステップ、生体内における前記標識の存在位置及び量又は強度を測定するステップ、測定された標識量又は強度からAβの毒性コンホマーのレベルを決定する

ステップ、A β の毒性コンホマーの存在位置とレベルとを相関させるステップを備える、生体内におけるA β の毒性コンホマーの存在位置とその量を決定する方法であってもよい。

【0069】

(A Dの診断方法)

A β の毒性コンホマーは、A Dの発症及び増悪化と関連する。即ち、従来はA β 40又はA β 42のレベル(総A β 量)がA Dの発症及び増悪化と関連すると考えられてきたが、現在では、総A β 量の増加よりも、これらのA β のうち特定の立体構造(毒性コンホマー)をとるものの増加がA D発症に関与することが示唆されている。A β は様々な立体構造をとり得ることが知られているが、本発明の抗体及びその免疫反応性断片は、A β の毒性コンホマーだけを極めて特異的に認識する。よって、本発明の抗体及びその免疫反応性断片は、より正確なA Dの診断を達成することができる。よって、本発明は、上述の本発明の抗体及びその免疫反応性断片を有効成分として含有する、A Dの診断薬を含む。また、本発明は、上述の本発明の抗体又はその免疫反応性断片を用いてA β の毒性コンホマーを測定することを含む、A Dの診断方法、A Dの診断のための情報を提供する方法、A Dの状態又は進行をモニターする方法、及び、候補A D治療薬の治療効果の判定方法(以下、総称して「本発明の診断方法等」という)を含む。本明細書全体に亘って、「A Dの診断」及び「A Dを診断する」の用語は、そのように解することが不整合である場合を除き、「A Dの診断のための情報を提供する」、「A Dの状態又は進行のモニター」及び「A Dの状態若しくは進行をモニターする」、又は、「候補A D治療薬の治療効果の判定」及び「候補A D治療薬の治療効果を判定する」と読み替えてもよい。別の態様において、本発明は、A Dを診断する(又は、A Dの状態若しくは進行をモニターする、又は、候補A D治療薬の治療効果を判定する)ための、本発明の抗体又はその免疫反応性断片の使用を含む。あるいは、本発明は、A Dを診断する(又は、A Dの状態若しくは進行をモニターする、又は、候補A D治療薬の治療効果を判定する)ための薬剤又は組成物を製造するための本発明の抗体又はその免疫反応性断片の使用に関する。

【0070】

本明細書において、「診断」の語は、特にそのように解することが不整合である場合を除き、A Dであるか否かを判定し、及び／又はA Dの重症度を判定すること(狭義の診断)の他に、その目的に応じて、A Dの診断のための情報を提供すること、又は、A Dの状態又は進行をモニターすることと解釈しても良い。本発明の診断方法等における、A β の毒性コンホマーの存否の検出又はレベルの測定は、例えば、上述のA β の毒性コンホマーの測定方法に準じて行うことができる。

【0071】

本発明のA Dの診断方法等は、検体中のA β の毒性コンホマーを測定するステップを備え、A β の毒性コンホマー量を指標として診断を行う。より具体的には、本発明の診断方法等は、以下の方法を含む：

- a) 少なくとも1つのA β の22位及び23位のアミノ酸におけるターン構造を極めて特異的に認識するが、A β の他の部位におけるターン構造は認識しない抗体又はその免疫反応性断片と、被験者由来の検体を接触させるステップ、
- b) 該抗体又はその免疫反応性断片に結合したA β の毒性コンホマーを測定し、測定値からA β の毒性コンホマーのレベルを決定するステップ、並びに、
- c) 測定されたA β の毒性コンホマーのレベルから、該被験者におけるA D発症の有無又は程度を判定するステップを備える、A Dの診断方法、

ここで、A β の毒性コンホマーのレベルが高い被験者は、A Dに罹患している又は罹患の重症度が高いと判定される。

【0072】

ここで、本発明の診断方法等がA Dの診断のための情報を提供する方法である場合、以下の方法を含む：

- a) 少なくとも1つのA β の22位及び23位のアミノ酸におけるターン構造を極めて特

異的に認識するが、A β の他の部位におけるターン構造は認識しない抗体又はその免疫反応性断片と、被験者由来の検体を接触させるステップ、

b) 該抗体又はその免疫反応性断片に結合したA β の毒性コンホマーを測定し、測定値からA β の毒性コンホマーのレベルを決定するステップ、並びに、

c) 測定されたA β の毒性コンホマーのレベルから、該被験者におけるAD発症の有無又は程度を判定した結果の情報を提供するステップを備える、ADの診断のための情報を提供する方法であって、

ここで、A β の毒性コンホマーのレベルが高い被験者は、ADに罹患している又は罹患の重症度が高いと判定される。

【0073】

また、本発明の診断方法等がADの状態又は進行をモニターする方法の場合、以下の方法を含む：

a) 少なくとも1つのA β の22位及び23位のアミノ酸におけるターン構造を極めて特異的に認識するが、A β の他の部位におけるターン構造は認識しない抗体又はその免疫反応性断片と、被験者由来の検体を接触させるステップ、

b) 該検体中のA β の毒性コンホマーと、該抗体又はその免疫反応性断片との結合を測定し、測定値からA β の毒性コンホマーのレベルを決定するステップ、並びに、

c) 決定されたA β の毒性コンホマーのレベルと、当該決定以前に当該決定とは別に同じ方法により決定されたA β の毒性コンホマーのレベルとを比較することにより、該被験者におけるAD発症の変化を判定するステップを備えるADの状態又は進行をモニターする方法であって、

ここで、当該決定以前に当該決定とは別に同じ方法により決定されたA β の毒性コンホマーのレベルと比較して、決定されたA β の毒性コンホマーのレベルが上昇した場合には、ADが進行していると判定される。

【0074】

また、本発明の診断方法等において、A β の毒性コンホマーと特異的に結合する抗体又はその免疫結合性断片を生体内に投与する場合、画像診断により診断することができる。画像診断により測定する場合、本発明の診断方法等は以下の方法を含む：

a) 少なくとも1つのA β の22位及び23位のアミノ酸におけるターン構造を極めて特異的に認識するが、A β の他の部位におけるターン構造は認識しない抗体又はその免疫反応性断片を投与された被験者について、画像診断装置（例えば、シンチグラフィー、PET又はSPECTモダリティ）を用いて前記抗体又はその免疫反応性断片の一部以上の画像を生成させることにより、生体内における前記抗体又はその免疫反応性断片を検出及び／又は測定するステップ、

b) 検出及び／又は測定された前記抗体又はその免疫反応性断片の位置又は値（例えば、強度）から、該被験者の体内におけるA β の毒性コンホマーの存否、局在、及び／又はレベルを決定するステップ、並びに、

c) A β の毒性コンホマーが存在し若しくはレベルが高いと決定された被験者、脳内においてA β の毒性コンホマーが検出された被験者、又は脳内におけるA β の毒性コンホマーのレベルが高い被験者は、ADに罹患しているか又はADの重症度が高いと判定するステップを備える、ADの診断方法。

【0075】

あるいは、本発明のADの診断方法等は、検体中のA β の毒性コンホマーを測定するステップを備え、かつ、総A β 量とA β の毒性コンホマー量と比を指標として診断を行う。より具体的には、本発明の診断方法等は、以下の方法を含む：

以下のステップを備える、ADの診断方法：

a) 被験者由来の試料と、少なくとも1つの本発明の抗体又はその免疫反応性断片とを接触させるステップ、

b) 前記本発明の抗体又はその免疫反応性断片と結合した、本発明の抗体又はその免疫反応性断片に結合する抗原のレベルを測定するステップ、

10

20

30

40

50

c) A β の構造非特異的な抗A β 抗体と被験者由来の試料とを接触させ、その結合物の量を測定することにより、被験者由来の試料における総A β 量を測定するステップ、並びに、

d) 被験者由来の試料における、本発明の抗体又はその免疫反応性断片に結合する抗原のレベルと総A β のレベルの比を計算し、決定された比から、前記被験者におけるADの有無又は程度を判定するステップ、

ここで、総A β のレベルに対する、本発明の抗体又はその免疫反応性断片に結合する抗原のレベルが健常人由来の試料における同比と比較して高い場合には、ADに罹患している可能性が高いと判定される、方法。

【0076】

総A β 量とA β の毒性コンホマー量と比を指標として診断を行う方法は、上述のADの診断のための情報を提供する方法、ADの状態又は進行をモニターする方法に準じた方法とすることもできる。

【0077】

本発明の診断方法等における「判定ステップ」は、A β の毒性コンホマーのレベル、又は総A β 量に対するA β の毒性コンホマー量と比を利用して行うことができる。本発明の診断方法等においてA β の毒性コンホマーのレベル又は総A β 量に対するA β の毒性コンホマー量と比を利用する場合、判定ステップは、被験者におけるA β の毒性コンホマーのレベル又は総A β 量に対するA β の毒性コンホマー量と比を、健常人、ADではない患者、及び／又はADではないと信じられている患者（以下、総称して「陰性比較対照」という）におけるA β の毒性コンホマーのレベル又は総A β 量に対するA β の毒性コンホマー量と比と比較することにより行うことができる。被験者由来の検体におけるA β の毒性コンホマーのレベル又は総A β 量に対するA β の毒性コンホマー量と比が、このような陰性比較対照由来の検体におけるA β の毒性コンホマーのレベル又は総A β 量に対するA β の毒性コンホマー量と比よりも高い場合には、「A β の毒性コンホマーレベル又は総A β 量に対するA β の毒性コンホマー量と比が高い」、即ち、ADに罹患している又はADの重症度が高いと判定することができ、被験者由来の検体におけるA β の毒性コンホマーのレベル又は総A β 量に対するA β の毒性コンホマー量と比が、このような比較対照由来の検体におけるA β の毒性コンホマーのレベル又は総A β 量とA β の毒性コンホマー量と比と比較して高くない（即ち、同等か低い）場合には、「A β の毒性コンホマーレベル又は総A β 量に対するA β の毒性コンホマー量と比が高くない」、即ち、ADに罹患していないか又はADの重症度が低いと判定することができる。

【0078】

本明細書全体に亘って、検体中のA β の毒性コンホマーのレベル又は総A β 量に対するA β の毒性コンホマー量と比が、それぞれ、比較対照となる検体におけるA β の毒性コンホマーのレベル又は総A β 量に対するA β の毒性コンホマー量と比より高いか否かは、統計的分析により決定することができる。統計学的有意性は、2以上の検体を比較し、信頼区間及び／又はp値を決定することにより決定される（Dowdy and Wearden, Statistics for Research, John Wiley & Sons, New York, 1983）。本発明の信頼区間は、例えば、90%、95%、98%、99%、99.5%、99.9%又は99.99%であってもよい。また、本発明のp値は、例えば、0.1、0.05、0.025、0.02、0.01、0.005、0.001、0.0005、0.0002又は0.0001であってもよい。

【0079】

本明細書全体に亘って、「比較対照」（陽性・陰性含む）におけるA β の毒性コンホマーのレベルは、被験者におけるA β の毒性コンホマーのレベルの測定と同様にして測定することができる。あるいは、既にこのような比較対照において測定したA β の毒性コンホマーのレベルに関する情報があれば、そのような情報を比較対照におけるA β の毒性コンホマーのレベル又は総A β 量とA β の毒性コンホマー量と比として利用することもできる。

10

20

30

40

50

【0080】

また、判定ステップは、例えば、予め得られた陰性比較対照におけるA β の毒性コンホマーのレベル又は総A β 量に対するA β の毒性コンホマー量と比、並びに、AD患者、又はADであると信じられている患者（以下、総称して「陽性比較対照」という）におけるA β の毒性コンホマーのレベル又は総A β 量に対するA β の毒性コンホマー量と比（及びそのAD発症の重症度に関する情報）から、A β の毒性コンホマーのレベル又は総A β 量に対するA β の毒性コンホマー量と比についてAD罹患の有無の指標又はAD罹患の重症度の指標として閾値レベル又は比を設定し、被験者由来の検体におけるA β の毒性コンホマーのレベルを、設定された閾値レベル又は比と比較することにより行っても良い。

【0081】

特に、「AD罹患の重症度」として診断する場合、判定ステップは、シンプルに予め得られた陰性比較対照及び陽性比較対照におけるA β の毒性コンホマーのレベル又は総A β 量に対するA β の毒性コンホマー量と比と比較して、同程度の β の毒性コンホマーレベル又は総A β 量に対するA β の毒性コンホマー量と比を示す対照のADの重症度として診断することもできる。あるいは、「AD罹患の重症度」の判定ステップは、同程度のAD罹患の重症度に関するいくつかのグループ群（クラス）（例えば、重度、中程度、軽度、未発症等、あるいは、認知障害の程度）を設定することにより行うことができる。即ち、予め得られた陰性比較対照及び陽性比較対照におけるA β の毒性コンホマーのレベル又は総A β 量とA β の毒性コンホマー量と比、及び、陽性比較対照のADの重症度に関する情報から、A β の毒性コンホマーの閾値レベルを2種類以上設定し、最も低い閾値レベル又は総A β 量に対するA β の毒性コンホマー量と比を上限値とするグループ、最も近い2つの閾値レベル又は総A β 量に対するA β の毒性コンホマー量と比を上限値・下限値とするグループ、最も高い閾値レベルを下限値とするグループの、少なくとも3つのグループを作成し、それぞれのグループに属する比較対照の重症度（健常人、未発症、軽度AD、中程度AD、又は重度ADなど）を当該グループの重症度クラスとして決定することにより、各クラス（グループ）についてAD罹患の重症度を対応付けさせる。被験者由来の検体におけるA β の毒性コンホマーのレベルを測定し、当該レベルが含まれるクラスを決定し、決定されたクラスに対応付けされたADの重症度クラスを、当該被験者のADの重症度として判定しても良い。上述において、「AD発症の重症度に関する情報」は、既に確立されたAD発症に関する各種指標を用いて決定することができる。なお、前記クラス分けにおいては、A β の毒性コンホマーのレベル又は総A β 量に対するA β の毒性コンホマー量と比が高いほど、AD発症の重症度が高いクラスとして分類される。

【0082】

上述のような閾値レベルは、感度が、50、55、60、65、70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、又は、98%以上となるように設定することができる。また、閾値レベルは、特異度が、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、又は、98%以上となるように設定することができる。

【0083】

また、本発明の診断方法等が候補AD治療薬の治療効果の判定方法の場合、以下の方法を含む：

- a) 少なくとも1つのA β の22位及び23位のアミノ酸におけるターン構造を極めて特異的に認識するが、A β の他の部位におけるターン構造は認識しない抗体又はその免疫反応性断片と、候補AD治療薬が投与されていない被験者由来の検体、及び／又は、候補AD治療薬が投与された被験者由来の検体とを、それぞれ接触させるステップ、
- b) 前記抗体又はその免疫反応性断片に結合したA β の毒性コンホマーを測定して、測定値からA β の毒性コンホマーのレベル又は総A β 量に対するA β の毒性コンホマー量と比を決定するステップ、並びに、
- c) 候補AD治療薬が投与されていない被験者由来の検体、及び、候補AD治療薬が投与された被験者由来の検体における測定されたA β の毒性コンホマーのレベル又は総A β 量

に対するA β の毒性コンホマー量と比を比較することにより、被験者における候補AD治療薬の奏効性を判定するステップを備える候補AD治療薬の治療効果の判定方法であって、

ここで、候補AD治療薬が投与されていない被験者由来の検体と比較して、候補AD治療薬が投与された被験者由来の検体においてA β の毒性コンホマーのレベル又は総A β 量に対するA β の毒性コンホマー量と比が低い場合には、候補AD治療薬にAD治療効果があると判定される、

【0084】

本発明の診断方法等は、既にADの指標として用いられているその他の指標と組み合わせて行ってもよい。

【0085】

本明細書において、「AD」とは、DSM-IV分類によるAlzheimer型痴呆の診断基準(American Psychiatric Association: Diagnostic and statistical manual of mental disorders, 4th ed (DSM-IV). American Psychiatric Association, Washington D. C., 1994)、又は、NINCDS-ADRDA Work GroupのAlzheimer病の臨床診断基準(McKahn et al: Clinical diagnosis of Alzheimer's disease-report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's disease. Neurology 34:939, 1984)により、AD又はAD型痴呆と診断されることを意味する。具体的には、記憶障害及び認知機能の障害(失語、失行、失認又は実行機能);認知障害による社会的または職業的機能の著しい障害等;ゆるやかな発症と持続的な認知の低下により特徴づけられる経過を示し;他の中枢神経疾患、全身性疾患、又は、外因性物質による痴呆ではなく;前記障害が、意識障害(せん妄)の期間中だけに出現するものではなく;前記障害が他の主要精神疾患により説明されない場合には、AD又はAD型痴呆と診断されてもよい。あるいは、認知機能のうち二つ以上が障害され、記銘と他の認知機能が進行性に悪化し、意識障害がなく、痴呆の原因となる全身疾患やAD以外の脳疾患がない場合に、AD又はAD型痴呆と診断されてもよい。あるいは、生検か剖検で得られた脳で病理組織学的にADを確認してもよい。

【0086】

(レベル)

本明細書全体において、「レベル」とは、数値化された存在量に関する指標を意味し、例えば、濃度、量あるいはその代わりとして用いることができる指標を含む。よって、レベルは蛍光強度等の測定値そのものであってもよいし、濃度に換算された値であってもよい。また、レベルは、絶対的な数値(存在量、単位面積当たりの存在量など)であってもよいし、又は必要に応じて設定された比較対照と比較した相対的な数値であってもよい。

【0087】

(検体)

上述の全ての本発明の方法において、使用する検体は、本発明の方法においてA β の毒性コンホマーを測定可能な検体であれば特に限定されず、利用目的に応じて適宜選択することができる。例えば、本明細書において、「検体」とは、細胞培養上清、細胞溶解物、生検として被験者から採取した組織試料または液体等を含む。被験者由来の体液としては、例えば、血液、血漿、血清、リンパ液、尿、漿液、髄液、脳脊髄液、関節液、眼房水、涙液、唾液等の体液またはそれらの分画物若しくは処理物を挙げることができる。また、被験者由来の組織試料としては、脳組織、又は脳組織溶解物を挙げることができる。また、本発明の方法において使用する検体は、被験者由来の試料を測定試験に先立ち前処理したものであってもよいし、被験者から採取した試料をそのまま検体として使用してもよい

10

20

30

40

50

。ここで、被験者とは、ヒト及びヒト以外の動物を含む。また、本発明の方法における分析は、定性的、定量的または半定量的に行うことができる。

【0088】

(抗体分子を用いた公知の測定方法)

抗体分子を用いた公知の測定方法のうち、EIA法を採用する場合、A β の毒性コンホマーと特異的に結合する抗体又はその免疫結合性断片と検体中のA β の毒性コンホマーとを反応させた後、前記A β の毒性コンホマーと結合する抗体又はその免疫結合性断片と、当該抗体又はその免疫結合性断片を認識する標識化した抗体とを結合させ、非結合抗体を除去後、標識物質に適した方法で測定して形成された複合体を測定することにより、A β の毒性コンホマーと特異的に結合する抗体又はその免疫結合性断片と検体中のA β の毒性コンホマーとの結合を測定することができる。定量的な測定を行う場合には、予め濃度の判明している標準物質(E22P-A β 42)を段階希釈した標準液を利用して検量線を作成し、当該検量線から測定値に該当する濃度を計算することにより決定することができる。

10

【0089】

イムノクロマト法により測定する場合、検体を標識抗体と結合させた後、ニトロセルロース膜の毛細管現象を利用したクロマトグラフィを行い、固相化したA β の毒性コンホマーと特異的に結合する抗体又はその免疫結合性断片と結合させることにより検出することができる。なお、イムノクロマト法において、標識として金コロイドを利用することにより、固相化抗体と検体／標識抗体複合体との結合を目視により確認することもできる。

20

【0090】

(医薬組成物(治療薬、予防薬)及びin vivo検出及び／又は測定用の薬剤又は組成物)

本発明の抗体又はその免疫反応性断片は、必要により精製した後、常法に従って製剤化することにより、医薬組成物(A Dの治療薬及び予防薬を含む)又はin vivo検出及び／又は測定用の薬剤又は組成物として用いることができる。また、本発明は、医薬組成物(A Dの治療薬及び予防薬を含む)又はin vivo検出及び／又は測定用の薬剤又は組成物を製造するための、本発明の抗体又はその免疫反応性断片の使用を含む。あるいは、本発明は、本発明の抗体又はその免疫反応性断片の、A Dの治療若しくは予防又はin vivo検出若しくは測定のための使用を含む。

30

【0091】

例えば、本発明の医薬組成物(治療薬若しくは予防薬)又はin vivo検出若しくは測定用の薬剤又は組成物は、注射剤として利用することができ、静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤などの剤形を包含する。このような注射剤は、公知の方法に従って、例えば、上記抗体等を通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール、その他の補助薬を含む等張液等が用いることができ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール(例、エタノール)、ポリアルコール(例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール)、非イオン界面活性剤〔例、ポリソルベート80、ポリソルベート20、HCO-50(polyoxyethylene(50mol) adduct of hydrogenated castor oil)〕等と併用することができる。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などを用いることができ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコール等と併用することができる。調製された注射液は、通常、適当なアンプル、バイアル、シリンジに充填される。また、本発明の抗体又はその免疫反応性断片に適当な賦形剤を添加することにより、凍結乾燥製剤を調製し、用時、注射用水、生理食塩水などで溶解して注射液とすることもできる。なお、一般的に抗体などのタンパク質の経口投与は消化器により分解されるため困難とされるが、抗体断片や修飾した抗体断片と剤形の創意工夫により、経口投与の可能性もある。経口投与の製剤としては、例えば、カプセル剤、錠剤、シロップ剤、顆粒剤等を挙げることができる。

40

50

【0092】

本発明の医薬組成物（治療薬若しくは予防薬）又は *in vivo* 検出若しくは測定用の薬剤又は組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好適である。このような投薬単位の剤形としては、注射剤（アンプル、バイアル、プレフィルドシリンジ）が例示され、投薬単位剤形当たり通常 5～500mg、5～100mg、10～250mg の本発明の抗体又はその免疫反応性断片を含有していても良い。

【0093】

本発明の医薬組成物（治療薬若しくは予防薬）又は *in vivo* 検出若しくは測定用の薬剤又は組成物の投与は、局所的であってもよく、全身的であってもよい。投与方法には特に制限はなく、上述のとおり非経口的又は経口的に投与される。非経口的投与経路としては、皮下、腹腔内、血中（静脈内、若しくは動脈内）又は脊髄液への注射又は点滴等が挙げられ、好ましくは血中への投与である。本発明の医薬組成物（治療薬若しくは予防薬）又は *in vivo* 検出若しくは測定用の薬剤又は組成物は、一時的に投与してもよいし、持続的又は断続的に投与してもよい。例えば、投与は、1分間～2週間の持続投与することもできる。

【0094】

本発明の医薬組成物の投与量は、所望の治療効果又は予防効果が得られる投与量であれば特に限定は無く、症状、性別、年齢等により適宜決定することができる。本発明の医薬組成物の投与量は、例えば、ADの治療効果又は予防効果を指標として決定することができる。例えば、AD患者の予防および／または治療のために使用する場合には、本発明の医薬組成物の有効成分の1回量として、通常 0.01～20mg/kg 体重程度、好ましくは 0.1～10mg/kg 体重程度、さらに好ましくは 0.1～5mg/kg 体重程度を、1月1～10回程度、好ましくは1月1～5回程度、静脈注射により投与するのが好都合である。他の非経口投与および経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合には、その症状に応じて増量または投与回数を増加させてもよい。

【0095】

また、本発明の *in vivo* 検出若しくは測定用の薬剤又は組成物の投与量は、所望の検出、測定又は診断が可能である投与量であれば特に限定は無く、症状、性別、年齢等により適宜決定することができる。例えば、AD患者の診断のために使用する場合には、本発明の *in vivo* 検出若しくは測定用の薬剤又は組成物の有効成分の1回量として、通常 0.01～20mg/kg 体重程度、好ましくは 0.1～10mg/kg 体重程度、さらに好ましくは 0.1～5mg/kg 体重程度を、1回～数回程度、静脈注射により投与することができる。他の非経口投与および経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。

【0096】

以下、本発明をより詳細に説明するため実施例を示すが、本発明はこれに限定されるものではない。なお、本願全体を通して引用される全文献は参照によりそのまま本願に組み込まれる。

【0097】

（実施例1）A β 42の22位及び23位にターン構造を有する毒性コンホマーに対する抗体の作製

実施例1の実験において、マウスの維持及び実験は、免疫生物研究所の動物保護委員会の承認を受けたプロトコルに従って行った。G9C、E22P-A β 9-35及びE22P-A β 9-35の分子量はMALDI-TOF-MSを用いて確認した（K. Murakamiら（2010）ACS. Chem. Neurosci., 1:747-756）。

【0098】

報告されている方法（K. Murakamiら（2002）Biochem. Biophys. Res. Commun., 294:5-10；K. Murakamiら（200

10

20

30

40

50

7) ChemBioChem, 8: 2308-2314) に従って、G9C、E22P-A β 9-35 ペプチド (CYEVHHQKL VFFAPDVGSNKGA I IGLM: 配列番号1) を合成し、免疫原として使用した。N末には、9番目のグリシンの代わりにシステインを付加し、キャリアタンパク質であるウシサイログロブリンと結合させた (Y. Horikoshi ら (2004) Biochem. Biophys. Res. Commun., 319: 733-737)。BALB/c マウス (日本チャールスリバー株式会社、日本) を、50 mg/マウスの G9C、E22P-A β 9-35 ペプチド融合体で週に1回、1月間免疫した。得られたクローンは、50 mg/mL の様々な抗体変異体でコートされた96穴のMaxisorp プレート (Nunc 社、デンマーク) 中、室温で1時間培養後、西洋ワサビペルオキシダーゼ結合抗マウス IgG 抗体 (シグマ社、セントルイス、ミズーリ州、米国) で処理し、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン (Pierce 社、ロックフィールド、イリノイ州、米国) 又は o-フェニレンジアミン二塩酸塩基質 (シグマ社) で定量した。得られた45クローンを、22位及び23位に β -ターン構造をとる傾向にあるA β 変異体 (E22Q-A β 42、E22G-A β 42、E22K-A β 42、E22P-A β 42、及びD23N-A β 42) (K. Murakami ら (2003) J. Biol. Chem., 278: 46179-46187) への結合能の高いクローンをスクリーニングし、選択されたクローンをサブクローニングした。スクリーニングを繰り返して、陽性度が低いか又は擬陽性のクローンを除いた。得られたクローンについて、ウエスタンブロットによりさらにスクリーニングを行うことにより、クローン IBL-102 を得た。

10

20

【0099】

(実施例2) IBL-102 抗体の結合特異性の測定1

得られたクローン IBL-102 が産生するモノクローナル抗体 (以下、IBL-102 抗体) というものの、次の各抗原への結合能をエンザイムイムノアッセイにより測定した: 22, 23 ラクタム-A β 、E22P-A β 42、E22G-A β 42、E22G-A β 40、E22K-A β 42、E22Q-A β 40、E22 Δ -A β 42、E22 Δ -A β 40、25, 26 ラクタム-A β 、A21P-A β 42、E22V-A β 42、D23P-A β 42、V24P-A β 42、G25P-A β 42、M35P-A β 42、野生型A β 38、野生型A β 40、野生型A β 42、recom. A β 42、野生型A β 43、及び野生型A β 46。具体的には、1 μ g/ウェルの82E1抗体 (A β 配列の1-16残基 (ターン構造部分ではない) を認識する; Y. Horikoshi ら (2004) Biochem Biophys Res Commun. 2004 Jul 2; 319 (3): 733-7. 参照; 以下同じ) を0.1 M炭酸緩衝液で固相化 (コート) した96穴プレートに、4000, 1000, 250, 62.5 pg/mL の前記各抗原、又はコントロールとして0.1% (w/v) BSA を添加した。4°Cで一晩静置後、ウェルの反応液を除去し、洗浄した。各ウェルにホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗A β マウスモノクローナル抗体 IBL-102 を100 μ L 添加した。4°Cで60分間静置後、ウェルの反応液を除去し、洗浄した。3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン (TMB) 基質液を100 μ L 添加し、遮光して室温で30分間静置後、1 N H₂SO₄ を100 μ L 加えて発色反応を停止させた。450 nmにおける吸光度を測定した。

30

40

【0100】

IBL-102 抗体の前記各抗原への結合能を測定した結果を表1に示す。数値は、表1は450 nmにおける吸光度を表す。IBL-102 抗体はE22P-A β 42に極めて特異的な免疫反応性を示し、その他の抗原に対しては低いアフィニティを示した。この結果は、IBL-102 抗体は22位及び23位にターン構造を有するA β 42のみを非常に特異的に認識することを示している。表1に示したE22P-A β 42のデータから検量線を作成し、A21P-A β 42、E22V-A β 42、D23P-A β 42、V24P-A β 42、G25P-A β 42、及びM35P-A β 42のそれぞれについて4000 pg/mLを測定したOD値を作成した検量線に当てはめてE22Pとしての濃度を

50

算出し、実際に測定した濃度（4000 pg/mL）との比（%）として交差反応率を求めた。その結果、IBL-102抗体の主反応（E22P-Aβ42に対する結合）に対する、A21P-Aβ42、E22V-Aβ42、D23P-Aβ42、V24P-Aβ42、G25P-Aβ42、及びM35P-Aβ42への交差反応率は、それぞれ順に、0.27%、0.28%、0.50%、0.33%、0.53%、及び0.68%であった。

【0101】

【表1】

抗原	抗原量(pg/mL)			
	4000	1000	250	62.5
22,23lactam-Aβ42	0.057	0.011	-0.001	-0.005
E22P-Aβ42	3.92	3.92	3.489	1.119
E22G-Aβ42	0.321	0.111	0.121	0.051
E22G-Aβ40	0.55	0.074	0.009	-0.007
E22K-Aβ42	0.093	0.018	0.001	-0.001
E22Q-Aβ40	0.863	0.092	0.01	-0.007
E22Δ-Aβ42	0.25	0.118	0.163	0.031
E22Δ-Aβ40	1.818	0.437	0.194	0.116
25,26lactam-Aβ42	0.188	0.049	0.027	0.017
A21P-Aβ42	0.193	0.047	0.011	-0.003
E22V-Aβ42	0.198	0.085	0.021	0.054
D23P-Aβ42	0.358	0.086	0.023	0.004
V24P-Aβ42	0.233	0.116	0.05	0.064
G25P-Aβ42	0.383	0.127	0.035	0.014
M35P-Aβ42	0.489	0.18	0.107	0.047
WT-Aβ38	0.433	0.161	0.052	0.009
WT-Aβ40	0.404	0.193	0.087	0.054
WT-Aβ42	0.283	0.085	0.021	0.002
recom.Aβ42	0.358	0.2	0.062	0.113
WT-Aβ43	0.384	0.213	0.091	0.042
WT-Aβ46	0.124	0.126	0.09	0.087

【0102】

（実施例 3） I B L - 1 0 2 抗体の結合特異性の測定 2

得られたモノクローナル抗体 I B L - 1 0 2（以下、「I B L - 1 0 2 抗体」という）の、次の各抗原への結合能をエンザイムイムノアッセイにより測定した：E 2 2 P - A β 4 2、E 2 2 V - A β 4 2、野生型 A β 4 2、野生型 A β 4 0、及びコントロールとしての牛血清アルブミン（B S A）。各抗原を固相用緩衝液（0. 1 M炭酸緩衝液 P H 9. 5）で 5 0 n g / w e l l の濃度で E L I S A 用 9 6 穴プレートに加え、4 °C で一晚反応させ固相化させた。P B S で洗浄後、ブロッキング液（1 % B S A、0. 0 5 % T w e e n 2 0 / P B S）にてブロッキングした。このようにして各抗原を固相化した後、I B L - 1 0 2 抗体を、1, 0. 5, 0. 2 5, 0. 1 2 5 μ g / m L の濃度に希釈し、5 0 μ L / ウェルで各固相抗原に加える。3 7 °C、3 0 分間の反応後、洗浄し、標識抗体（A n t i - M o u s e I g G（H + L）G o a t F a b ' - H R P）を 5 0 μ L / ウェルに加え、3 7 °C、3 0 分間反応後、洗浄した。発色用基質液（o - フェニレンジアミン二塩酸塩；O P D）を加え発色（遮光して室温、1 5 分間）、停止液（1 N H ₂ S O ₄）を加え停止した後、4 9 0 n m における吸光度を測定した。コントロールとして I B L - 1 0 1 抗体（# 1 0 3 7 9、A n t i - H u m a n A m y l o i d β E 2 2 P（1 1 A 1）M o u s e I g G M o A b 株式会社免疫生物研究所、日本）も同様に試験した。

【0 1 0 3】

I B L - 1 0 2 抗体と I B L - 1 0 1 抗体の前記各抗原への結合能を測定した結果を表 2 に示す。数値は 4 9 0 n m における吸光度を表す。I B L - 1 0 2 抗体は E 2 2 P - A β 4 2 に極めて特異的な免疫反応性を示し、その他の抗原に対しては低いアフィニティを示した。I B L - 1 0 1 抗体は E 2 2 V - A β 4 2、野生型 A β 4 2、野生型 A β 4 0 などに対しても弱く反応するのに対して、この結果は、I B L - 1 0 2 抗体は 2 2 位及び 2 3 位にターン構造を有する A β 4 2 のみを非常に特異的に認識することを示している。

【0 1 0 4】

【表 2】

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

【0 1 0 5】

（実施例 4） I B L - 1 0 2 抗体を利用したアルツハイマー病患者の診断

京都府立医科大学神経内科を受診した認知症患者で文書による同意を得た上で髄液を採取した患者のうち、その後の臨床経過及び画像診断等により A D と診断された患者を A D 患者とした。また、様々な神経疾患の診断の過程で髄液検査を行い、その検体を研究目的で使用するについて文書による同意を得た患者を対照（健常人）とした。髄液サンプルは、以下の方法により採取した。空腹時に腰椎穿刺により脳脊髄液を滅菌個装スピッツ（アジア器材、P P スクリュースピッツ 1 5 m L）に直接採取した。

【0 1 0 6】

96ウェルプレートに抗A β マウスモノクローナル82E1抗体（ヒトA β のN末（1～16番目のアミノ酸）を認識する抗体；Horikoshi Yら、Biochem Biophys Res Commun.（2004）319（3）：733-7；株式会社免疫生物研究所、#10323。以下同じ）を1 μ g/ウェルで0.1M炭酸緩衝液を用いて固相化（コート）した。検体、段階希釈した標準物質（E22P A β -40 dimer）、及び希釈用緩衝液（ブランク）を各100 μ Lそれぞれのウェルに入れた。4 $^{\circ}$ Cで一晩静置後、ウェルの反応液を除去し、洗浄した。各ウェルにHRP標識抗A β マウスモノクローナル抗体IBL-102を100 μ L添加した。4 $^{\circ}$ Cで60分静置後、ウェルの反応液を除去し、洗浄した。TMB基質液を100 μ L添加し、遮光して室温で30分静置後、1N H₂SO₄を100 μ Lして発色反応を停止させた。450nmにおける吸光度を測定した。標準物質により得られた検量線を用いて、各サンプル中の毒性コンホマーを有するA β の量を決定した。

10

【0107】

また、既に報告された方法に従って、同じ髄液サンプル中のA β 42の量を測定し、全A β 42の量を決定した。決定された全A β 42量に対する、毒性コンホマーを有するA β の量を計算し、AD発症との相関を調べた。

【0108】

アルツハイマー病患者（AD）及び健常人（Control）由来の脳脊髄液中における、IBL-102抗体と結合する物質（A β の毒性コンホマー：Toxic A β ）を測定した結果を図1に示す。また、同じ脳脊髄液中における全A β 42、及び全A β 42の量に対する、毒性コンホマーを有するA β の量の比を算出した結果を図14に示す。AD患者ではIBL-102抗体を用いることにより、Toxic A β レベルが高い値を示したのに対し、健常人ではToxic A β レベルは低い値を示した。Mann Whitney testにより検定した結果、 $P=0.0635$ であった。このようなAD患者と健常人における明確な違いはIBL-101抗体では見出すことができなかった（非図示）。更に、この差は全A β 42の量に対する、毒性コンホマーを有するA β の量の比として算出するとより顕著であることが示された。すなわち、AD患者の全A β 42の量に対する、毒性コンホマーを有するA β の量の比は、非AD患者の同比よりも有意（ $p<0.05$ ）に高いことが示された。よって、IBL-102抗体は、ADの診断に利用可能であることが示された。

20

30

【0109】

（実施例5）IBL-102抗体のA β 42誘導神経細胞毒性への効果

IBL-102抗体がA β 42の細胞毒性を抑制できるか否かを決定するため、ラットプライマリーニューロンでのA β 42誘導神経細胞毒性をMTTアッセイにより評価した（K. Murakamiら（2003）J. Biol. Chem., 278：46179-46187）。培養したラットプライマリーニューロンに、1 μ Mの野生型A β 42又はE22P-A β 42を添加して細胞毒性刺激を与えた。細胞毒性刺激非添加群をコントロール（刺激無）とした。A β 42又はE22P-A β 42添加後、被検薬剤として、それぞれ0.1mg/mLのIBL-102抗体およびIgG抗体（陰性コントロール）を添加した。抗体非添加群をコントロール（薬剤無）とした。37 $^{\circ}$ Cで4日間培養した。使用したA β の濃度は、野生型A β 42のIC50値に近い 10^{-6} Mとした。統計学的な有意差は、一元配置分散分析後のTukey's testにより評価した。

40

【0110】

結果を図2に示す。1 μ Mの野生型A β 42及びE22P-A β 42で処理したラットプライマリーニューロンは、コントロール細胞と比較して低い生存能を示した。IBL-102抗体を添加することにより、A β 42及びE22P-A β 42の細胞毒性が阻害された。よって、IBL-102抗体は、A β 42及びA β の毒性コンホマーによる細胞毒性を顕著に阻害することができることが示された。

【0111】

（実施例6）ADモデルマウス（促進型APPトランスジェニックマウス）脳の免疫染色

50

A Dモデルマウスとして、A P Pトランスジェニックマウス、T g 2 5 7 6 (K. H s i a oら (1996) S c i e n c e , 274:99-102)にA β 42産生酵素であるP r e s e n i l i n 2を過剰発現させたマウス、P S 2, T g 2 5 7 6 (T. T o d aら (2011) J. B i o m e d. B i o t e c h. , 2011, 617974)を用いた。ジエチルエーテル麻酔下でマウスの脳を摘出し、4% P a r a f o r m a l d e h y d eにより固定した。パラフィンにより包埋し、5 μ mの厚さで薄切することで切片を作製した。。切片は脱パラフィン処理、親水化処理の後、ギ酸により抗原を賦活化し、内因性ペルオキシダーゼを不活性化した後、血清ブロッキングを行った。一次抗体として、1 μ g / m lまたは5 μ g / m lの8 2 E 1 (陽性対照), 5 μ g / m lまたは2 0 μ g / m lのI B L - 1 0 1および5 μ g / m lまたは2 0 μ g / m lのI B L - 1 0 2を4 $^{\circ}$ Cで一晩反応させ、洗浄後、二次抗体としてビオチン化抗マウスI g G抗体を用いて室温で反応させた。アビジンビオチン複合体キットを用いて免疫反応強度を増強し、3, 3' - D i a m i n o b e n z i d i n eにより染色した。

10

【0112】

結果を図3に示す。陽性対照である8 2 E 1は、1 μ g / m lおよび5 μ g / m lの濃度での適用により老人斑を明瞭に染色した。I B L - 1 0 1は、5 μ g / m lでの適用により、老人斑に加えて脳実質の染色が見られ、2 0 μ g / m lでの適用では染色性が増強された。一方、I B L - 1 0 2は、5 μ g / m lおよび2 0 μ g / m lのいずれの濃度での適用においても、老人斑および脳実質の染色は見られなかった。I B L - 1 0 2は、I B L - 1 0 1と異なり老人斑には反応せず、特徴的な反応性を示すことが明らかとなった。

20

【0113】

(実施例7) A Dモデルマウス (促進型A P Pトランスジェニックマウス) における薬効評価試験

A Dモデルマウスとして、P S 2, T g 2 5 7 6を使用した。マウス誕生を0日目として、3月目から抗体投与を開始し、6月目に行動試験を行った。投与抗体としては、I g G、I B L - 1 0 1抗体、及び、I B L - 1 0 2抗体を用いた (各群n = 5 ~ 9)。各抗体は、10 m g / k gの投与量で、週1回の頻度で3ヶ月間投与を行った。

【0114】

評価は、神経症状の行動評価として、E l e v a t e d p l u s - m a z e t e s t、N e s t i n g t e s tを行った。また、病理学的評価として、老人斑の免疫組織化学染色 (8 2 E 1抗体を使用)、並びに、E L I S Aによる脳内 (可溶性画分及び不溶性画分) のA β 量の測定を行った。可溶性画分及び不溶性画分の調製は常法に従って行った。統計学的な有意差は、一元配置分散分析後のT u k e y ' s t e s tにより評価した。

30

【0115】

E l e v a t e d p l u s - m a z e t e s tの結果を図4に示す。P S 2, T g 2 5 7 6は、I g G投与群においてC l o s e d a r mへの指向性の低下を示した。このような神経症状は、I B L - 1 0 1の投与では改善できなかったが、I B L - 1 0 2の投与では顕著な改善を示した。以上の結果は、毒性コンホマーに対する選択性の高さが、A Dの抗体治療には重要であり、選択性の高いI B L - 1 0 2は顕著な治療・予防効果を示すことが示された。

40

【0116】

N e s t i n g t e s tの結果を図5に示す。N e s t i n g t e s tは、6 c m四方の正方形の紙片10枚が入ったケージにマウスを入れ、4日後の巣作りの様子を以下の基準に従いスコアリングすることにより行った。スコア0: 巣作り無し (N o N e s t i n g); スコア1: 隅に全ての細片を集める (G a t h e r a l l s t r i p s a t a c o r n e r); スコア2: 隅に全ての細片を集めて作業する (G a t h e r a n d p r o c e s s a l l s t r i p s); スコア3: 集めて細かい断片に裂く (G a t h e r a n d t e a r t o s m a l l p i e c e s)。P S 2,

50

T g 2 5 7 6 は、I g G 投与群において巢作りスコアの低下を示した。このような神経症状は、I B L-1 0 1 の投与では改善できなかったが、I B L-1 0 2 の投与では改善を示した。以上の結果は、毒性コンホマーに対する選択性の高さが、A D の抗体治療には重要であり、選択性の高い I B L-1 0 2 は治療・予防効果を示すことが示された。

【0 1 1 7】

老人斑の免疫染色の結果を図 6（脳）及び図 7（海馬）に示す。P S 2, T g 2 5 7 6 の脳内および海馬では、I g G 投与群において老人斑の存在が確認された。この老人斑の沈着を、I B L-1 0 1 および I B L-1 0 2 の投与は、抑制できなかった。以上の結果より、I B L-1 0 1 および I B L-1 0 2 は老人斑の数を減少させる効果はないことが明らかとなった。また I B L-1 0 2 は、老人斑の数とは無関係に神経症状を改善したと

10

【0 1 1 8】

E L I S A による脳内の A β 量を測定した結果を図 8 に示す。P S 2, T g 2 5 7 6 の脳内では、I g G 投与群において A β 4 0 および A β 4 2 が検出された。この A β 4 0 および A β 4 2 を、I B L-1 0 1 および I B L-1 0 2 の投与は、減少させることはできなかった。以上の結果より、I B L-1 0 1 および I B L-1 0 2 は脳内の A β 4 0 および A β 4 2 の総量を減少させる効果はないことが明らかとなった。また I B L-1 0 2 は、A β 4 0 および A β 4 2 の総量とは無関係に神経症状を改善したと考えられる。

【0 1 1 9】

（実施例 8）I B L-1 0 2 抗体の配列決定

20

I B L-1 0 2 抗体の遺伝子配列を決定するため、重鎖（以下、「H c」という）及び軽鎖（以下、「L c」という）のクローニングを行った。I B L-1 0 2 抗体を産生するハイブリドーマから m R N A を抽出し、c D N A を作製した。常法に従って、5'-R a p p i d a m p l i f i c a t i o n c D N A e n d (5'-R A C E) を行い、H c 及び L c 遺伝子の 5' 末端の塩基配列を決定した。H c、L c に特異的なプライマーを使用して、それぞれの全長 c D N A をクローニングした。決定された H c 及び L c の遺伝子配列は図 9（配列番号 1 及び配列番号 8）、アミノ酸配列（シグナル配列を含む）は図 1 0（配列番号 2 及び配列番号 9）にそれぞれ記載の通りであった。また、I B L-1 0 2 抗体の V H 及び V L の配列は、それぞれ順に配列番号 4 及び配列番号 1 1 に記載のとおりであった。また、I B L-1 0 2 抗体の C D R H 1、C D R H 2、C D R H 3、C D R L 1、C D R L 2 及び C D R L 3 の配列は、それぞれ順に、配列番号 5、6、7、1 2、1 3、及び 1 4 に記載のとおりであった。

30

【0 1 2 0】

（実施例 9）B I A C O R E による解離定数の測定

I B L-1 0 2 抗体及び I B L-1 0 1 抗体について、当該抗体と抗原との解離定数（K D）を B I A C O R E（G Eヘルスケアバイオサイエンス株式会社，B I A C O R E-X 1 0 0）を用いて測定した。B I A C O R E（G Eヘルスケアバイオサイエンス株式会社，B I A C O R E-X 1 0 0）のマニュアルに従い、S A チップにビオチン化 E 2 2 P-A β 4 2 又はビオチン化野生型 A β 4 2 を固定後、I B L-1 0 1 抗体又は I B L-1 0 2 抗体を流し、結合速度定数 K a 1、解離速度定数 K d 1 を測定し、b i v a l e n t

40

フィッティングを用いて結合定数 K D 値を決定した。

【0 1 2 1】

K a 1、K d 1、及び K D 値の結果を以下の表 3 に示す。以下のとおり、I B L-1 0 2 抗体は I B L-1 0 1 抗体と比較して、E 2 2 P-A β 4 2 及び E 2 2 P-A β 4 2 ダイマーに強く結合した。

【0 1 2 2】

【表 3】

Table 3. The dissociation constant (K_D) together with the association (k_a) and dissociation (k_d) rate constants of IBL-102 and IBL-101 for A β derivatives.

Antibody	Immobilized A β	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	K_D (nM)
IBL-102	A β 42	<5.0 x 10 ⁴	>5.0 x 10 ⁻⁷	>100
	E22P-A β 42	2.3 x 10 ⁵	7.1 x 10 ⁻⁴	3.1
	E22P-A β 42 dimer	2.3 x 10 ⁵	3.9 x 10 ⁻⁴	1.7
IBL-101	A β 42	3.4 x 10 ⁴	4.9 x 10 ⁻⁴	14
	E22P-A β 42	4.0 x 10 ⁴	9.2 x 10 ⁻⁴	23
	E22P-A β 42 dimer	9.5 x 10 ²	1.1 x 10 ⁻⁵	11

10

20

【0123】

(実施例10) A β 重合体への結合能測定

A β は互いに結合してオリゴマーとなることにより毒性を有すると考えられている。IBL-102抗体のA β オリゴマーへの結合を調べるため、次の各抗原への結合能をエンザイムイムノアッセイにより測定した：野生型A β 42；E22P-A β 42；E22P，V40L，LDap-A β 42ダイマー；及び、E22P，A β 30L，LDap-A β 40ダイマー。各抗原を固相用緩衝液（0.1M炭酸緩衝液PH9.5）で50ng/wellの濃度でELISA用96穴プレートに加え、4℃で一晩反応させ固相化させた。PBSで洗浄後、ブロッキング液（1%BSA，0.05%Tween 20/PBS）にてブロッキングした。このようにして各抗原を固相化した後、IBL-102抗体を、1，0.5，0.25，0.125 μ g/mLの濃度に希釈し、100 μ L/ウェルで各固相抗原に加える。室温で、60分間の反応後、洗浄し、標識抗体（Anti-Mouse IgG（H+L）Goat Fab'-HRP）を50 μ L/ウェルに加え、室温で60分間反応後、洗浄した。発色用基質液（オ－フェニレンジアミン二塩酸塩；OPD）を加え発色（遮光して室温、30分間）、停止液（2N H₂SO₄）を加え停止した後、492nmにおける吸光度を測定した。コントロールとしてIBL-101抗体及び4G8抗体（A β 配列の18-22残基（ターン構造部分ではない）にエピトープを有するモノクローナル抗体；H. M. Wisniewskiら（1989）Acta. Neuropathol.，78：22-27）も同様に試験した。

30

40

【0124】

結果を図11に示す。IBL-101抗体は、野生型のA β 42、E22P-A β 42のモノマー、E22P，V40L，LDap-A β 42のダイマー、E22P，V40L，LDap-A β 40のダイマーのいずれともほぼ同等の弱い結合力を示した。それに対し、IBL-102抗体は、野生型のA β 42への結合力はIBL-101と同等であったが、E22P-A β 42のモノマーに強く結合し、更に、E22P，V40L，LDap-A β 42のダイマー、及びE22P，V40L，LDap-A β 40のダイマーには更に強く結合した。コントロールとして用いた4G8抗体は、野生型のA β 42には強く結合したが、E22P変異型のA β 42には弱くしか結合しなかった。このことから、IBL-102抗体がA β オリゴマーと特異的に強く結合することが示された。

50

【0125】

(実施例11) ワクチン単回投与試験

I B L-102 抗体の静脈内への単回投与の効果について調べるため、18月齢のADモデルマウスTg2576にI B L-102 抗体を投与した。実験のスケジュールを図12に示す。初回抗体投与から1週間間隔で合計2回、I B L-102 抗体(10-20mg/kg)又はPBSを交互に投与した。マウスをA群及びB群の2群(各n=7)に分け、A群には、初回:I B L-102 抗体、2回目:PBSを投与し、B群には、初回:PBS、2回目:I B L-102 抗体を投与した。初回及び2回目投与の前(Pre test)および後(Post test)に行動試験を行い、抗体投与による効果を調べた。行動試験は、新規物体に対する接触時間(匂いをかいでいる時間)を計測し、対照マウス(若齢B6)との比較により好奇心の指標をスコア化した。具体的には、再探索スコア(Re-exploring score)は、I B L-102 投与群又はPBS投与群の各個体の(Post testでの接触回数)/(Pre testでの接触回数)を、対照マウス群の(Post testでの接触回数)/(Pre testでの接触回数)の平均値で割って求めた。初回と2回目投与の行動試験では、異なる物体を使用した。

10

【0126】

結果を図13に示す。PBS投与群においては、Pre testで一度接触したことを忘れ、Post testにおいて再度同じ物体を新規物体と認識して探索行動を取ったマウスが対照と比較して多かったのに対し、I B L-102 抗体を投与することにより、Pre testで一度接触した物体には接触しないマウスの数が増えた。このことから、I B L-102 抗体の投与はA β による記憶障害を改善することが示された。

20

【0127】

(実施例12) I B L-102 抗体の結合特異性の測定3

I B L-102 抗体とI B L-101 抗体の、次の各抗原への結合能をエンザイムイムノアッセイにより測定し、比較した:野生型A β 40、野生型A β 42、E22P-A β 42、E22V-A β 42、G33P-A β 42、L34P-A β 42、L34P-A β 42、V36P-A β 42、G37P-A β 42、G38P-A β 42、V39P-A β 42、V40P-A β 42、I41P-A β 42。具体的には、1 μ g/ウェルの82E1抗体(A β 配列の1-16残基(ターン構造部分ではない)を認識する;Y. Horikoshiら(2004) Biochem Biophys Res Commun. 2004 Jul 2;319(3):733-7. 参照;以下同じ)を0.1M炭酸緩衝液で固相化(コート)した96穴プレートに、2.5 μ g/ウェルの前記各抗原を添加した。室温で2時間静置後、ウェルの反応液を除去し、洗浄した後、4 $^{\circ}$ Cで一晩ブロッキングした。各ウェルに抗A β マウスモノクローナル抗体I B L-101及びHRP標識抗A β マウスモノクローナル抗体I B L-102を100 μ L添加した(120, 60, 30, 15ng/mL)。室温で60分間静置後、ウェルの反応液を除去し、洗浄した後、HRP標識二次抗体を室温で一時間反応させた。オ-フェニレンジアミン(OPD)基質液を100 μ L添加し、遮光して室温で30分間静置後、2M H₂SO₄を50 μ L加えて発色反応を停止させた。492nmにおける吸光度を測定した。

30

40

【0128】

I B L-102 抗体とI B L-101 抗体の前記各抗原への結合能を測定し、比較した結果を図15に示す。数値は、492nmにおける吸光度を表す。I B L-102 抗体はE22P-A β 42に極めて特異的な免疫反応性を示し、その他の抗原に対しては低いアフィニティを示した。この結果は、I B L-102 抗体は22位及び23位にターン構造を有するA β 42のみを非常に特異的に認識することを示した。

【0129】

(実施例13) ワクチン単回投与試験(IgGコントロール)

I B L-102 抗体の静脈内への単回投与の効果について調べるため、16-19カ月齢のADモデルマウスTg2576にI B L-102 抗体を投与した。野生型マウスおよ

50

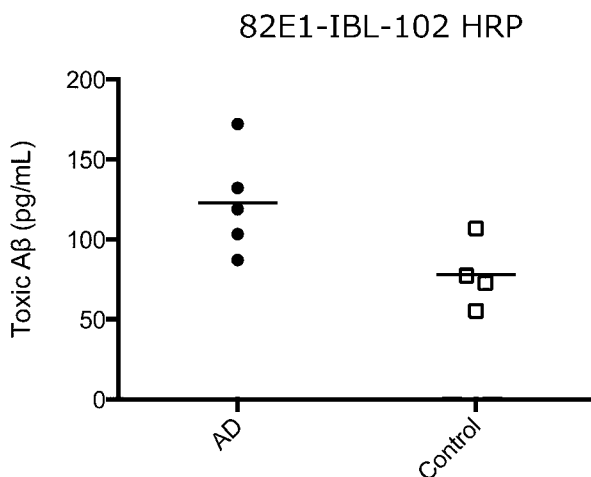
び T g 2 5 7 6 に対して、2つの非常に類似した物体 A 1 および A 2 を 1 日 1 0 分間ずつ 3 日間記憶させた。その翌日、野生型マウスには P B S を、T g 2 5 7 6 には I g G または I B L - 1 0 2 (2 0 m g / k g) を投与した。投与の翌日、2つの記憶させた物体 A 1 および A 2 のうち、一方 (A 1) および新規な物体 B の 2 つに対するマウスの接触回数を計数し、それぞれ、(物体 A 1 への接触回数) / ((物体 A 1 への接触回数) + (物体 B への接触回数)) および (物体 B への接触回数) / ((物体 A 1 への接触回数) + (物体 B への接触回数)) を、マウスの記憶力の指標として評価した。

【 0 1 3 0 】

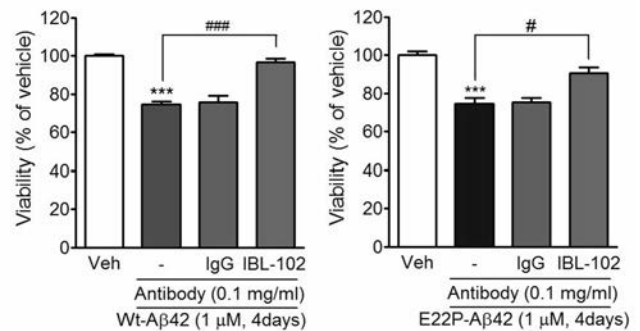
結果を図 1 6 に示す。野生型マウスでは、新奇物体 (N o v e l : B) に対して有意に高い指向性を示した ($p = 0.0003$) が、I g G 投与 T g 2 5 7 6 ではその傾向が見られず、記憶力の低下を示した。一方、I B L - 1 0 2 投与 T g 2 5 7 6 は、新奇物体に対する有意な指向性を示し ($p = 0.0002$) 、記憶力の低下を示さなかった。このことから、I B L - 1 0 2 抗体の投与は A β による記憶障害を改善することが示された。

10

【 図 1 】

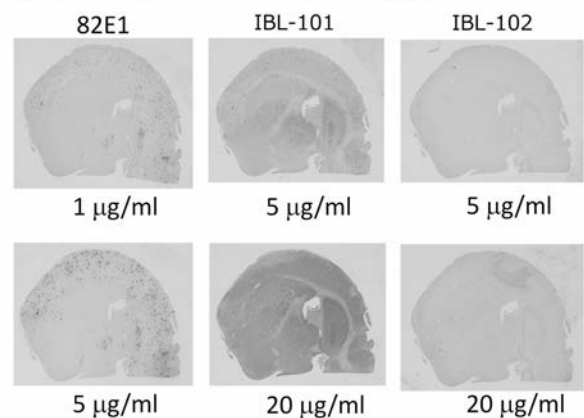


【 図 2 】

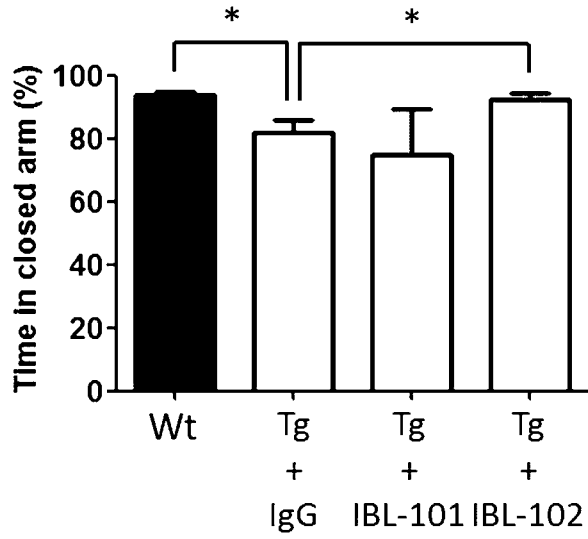


【 図 3 】

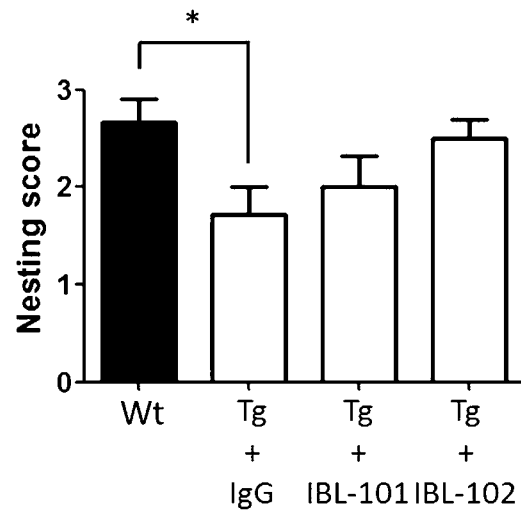
PS2,Tg2576マウスに対する抗体の反応性



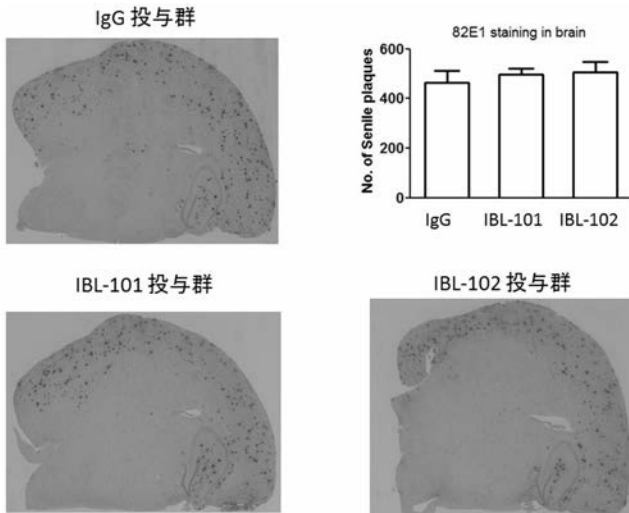
【図 4】



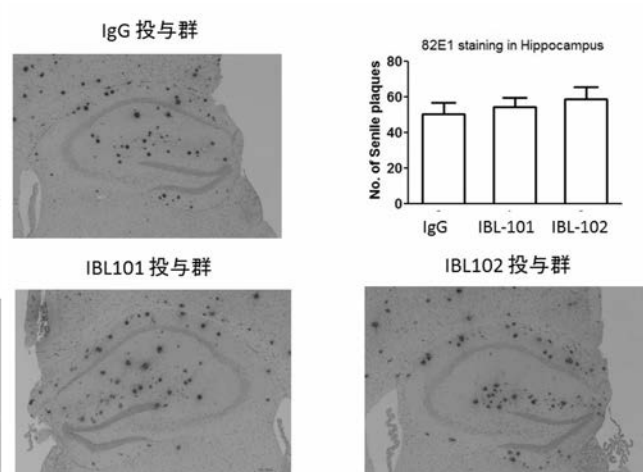
【図 5】



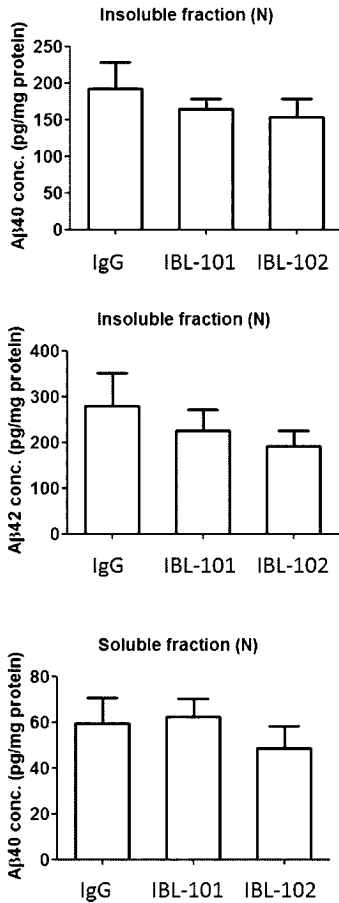
【図 6】



【図 7】



【図 8】



【図 10】

IBL-102 HC

MGWSWIFLLFLSGTAGVLSEVQLQQSGPELVKPGASVKIFCKASGYTFT
DYNMDVWKQSHGKRLEWIG**DINPNTGV**TIDN**PKFKG**KATLTVDSSSTV
 YMELRSLSSSEDATVYYCAR**LPDNYVMDY**WGQGSTVTVSAAKTTPPSVY
 PLAPGSAQAQTNMVTTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQ
 SDLYTLSSSVTPVPSQHLAQPDHRCNVHPASSTKVDDKIVPRDCGCKPCI
 CTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITITLTPKVTQCVVVDISKDDPEVQSFVWFDV
 EVHTAQTKPREEQINSTRFSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAPPAPI
 EKTISKTKGRPKAPQVYTIPTPPKEQMAKDKVSLTCMITNFFPEDITVEWQ
 WNGQPAENYKNTQPMIDTGSYFVYSKLVNQKSNWEAGNTFTCSVLHE
 GLHNHHTKSLSHSPGK

IBL-102 LC

MKLPRVRLVLWMFIPASSDVMQTPLSLPVSLGDAQSIS**CRCSQSLVH**
RNGNTNLHWYLLQKSGQSPKLLIY**KVSNRFS**GVPDFRSGSGSDFTLKI
 SRVEAEDLGVIYFC**SQSTYVPLT**FGVGTKELEK**RADA**APTIVSIFPPSSEQL
 TSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDY
 SMSSTLTLLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNNEC

下線は順にCDR1,2,3領域を示す

【図 9】

IBL-102 重鎖

CTACAGCGTTTAAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTCCAGTGTGGTGAATTCCTAACCC
 ATGGGATGGAGCTGGATCTTTCTCCTCTTCCTGTGAGGAACCTGACAGGTGTCTCTCTGAGGCTCAGCT
 GCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCTGGGGCTTCAGTGAAGATATTCGCAAGGCTTCTGGAT
 ACATTTTCACTGACTAATATGACTGGGTGAAGCAGAGTCAATGGAAGAGACTTGAAGTGGATGGA
 GATATTAACTCTAACACTGGTGTCTTACTATCGACAATCCGAAGTTCAGAGGCAAGGCCACATGACTGTGA
 GACGAATCTCTCAGTACAGTCTACATGGAAGCTCCGCAACCTGTCTATCTGAAGACACTGCGGTCTATTAT
 CTGTGCAAGATTACCGGATACTATGTTAGACTATTGGGCTCAAGGAACCTCACTCAACCTCTCCCG
 AGCCAAAACGACACCCCATCTGTCTATCTCACTGGCCCTTGGATCTGTGCCAAACTAACTCCATGG
 TGACCTCGGGATGCTTGGTCAAGGCTATTTCCTGAGCCAGTGCAGTGAACCTGGAACCTCTGGATCC
 CTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCAGCTGTCTGCTGAGTCTGACCTCTACACTCTGAGCAGCTCAGT
 GACTTCCCTCCAGCACTGGCCAGCCAGACCGTCACTCTCAACCTTGCACCCCGGCCAGCAGC
 ACCAAGTGGACAAGAAAATTGTGCCAGGATTTGGTGTGTAAAGCTTGCATATGTACAGTCCAGA
 AGTATCATCTGTCTCTCTCCCTCCAAAGCCAAAGGATGTGTCTCACTTACTCTGACTCTCAAGG
 CACGTGTGTGTGGTAGACATCAGCAAGGATGATCCGAGGTCCAGTTCAGCTGGTTGTAGATGATG
 TGGAGGTGCACAGCTCAGACGAAACCCCGGAGGAGCAGATCAACAGCACTTCCGTTTCAGTCAAG
 TGAACCTCCCATCATGCACAGGACTGGCTCAATGGCAAGGAGTTCAATGTCAGGCTCAACAGTGCAG
 CTTTCCCTGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAGGAGAGCCGAGGCTCCACAGGTGTAC
 ACCATTCCACTCCCAAGGAGCAGATGGCCAAAGGATAAGTCACTGTGACCTGATGATAAGCAAACTT
 CTTCCCTGAAAGACATTACTGTGGAGTGGCAGTGGGAATGGCCAGCCAGCGAGGAACATCAAGAACACT
 CAGCCCATCATGGACACAGATGGCTCTTACTCTGCTACAGCAAGCTCAATGTGCAGAAAGGCAACTG
 GGAGGCGAGGAATACTTTCACCTGCTGTGTACATGAGGCTGTGCACAAACCACTACTGAGAAGA
 GCTCTCCCACTCTCTGGTAAATAAGCGGCCGCTCGAGTCTAGAGTCCGATG

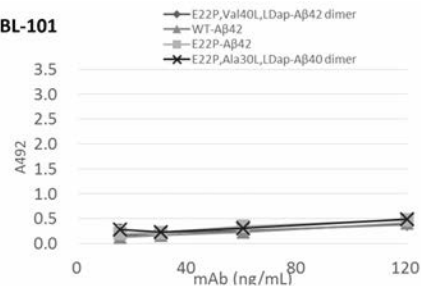
IBL-102 軽鎖

CATACCAAGCGTTTACTTAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTCCAGTGTGGTGGGAATTC
 CTCAAATGAAGTGTGCTGTAGGCTGTGGTGTCTGATGTTCTGGATTCCTGCTCCAGCAGTGTAT
 GTTGTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCTGTGAGTCTTGGAGATCAAGCTCCATCTCTTGC
 AGATGTAGTCAGAGCCTTGTACACAGAAATGGAAACCACTTACATGTTGTTACTCTGAGAAAGTCA
 GGCCAGTCTCCAAAGCTCTCTGATCTACAAAGTTTCAACCGATTCTGGGGTCCGACAGCAGGTTTC
 AGTGGCAGTGGATCAGGAGCAGATTTCACACTCAAGTCAAGCAGTGGAGGCTGAGGATCTGGG
 AGTTTATTTCTGCTCTCAAGTACATATGTTCCGCTCAGCTTCCGCTTGGGAGCAAGCTGGAGCTG
 AAACGGCTGATGTGCACCACTGTATCCATCTTCCCACTCCAGTGGCAGTGAACATCTGGA
 GGTGCTCAGTGTGTCTTCTGAACAACCTTCTACCCCAAGACATCAATGTCAAGTGGAAAGATT
 GATGGCAGTGAACGACAAATGGCTCTGGAACAGTGTGAGTATCAGGACAGCAAGACAGCAGC
 CTACAGCATGAGCAGCAGCTCAGTGTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTG
 TGAGGCCACTCACAAGACATCACTTCACCCATGTCTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGTAGGC
 GGGCCGCTCGAGTCTAGAGGCGCCGTTA

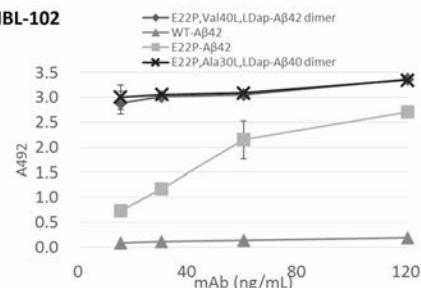
下線はコーディング領域を表す

【図 11】

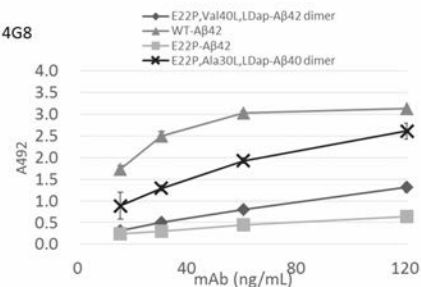
IBL-101



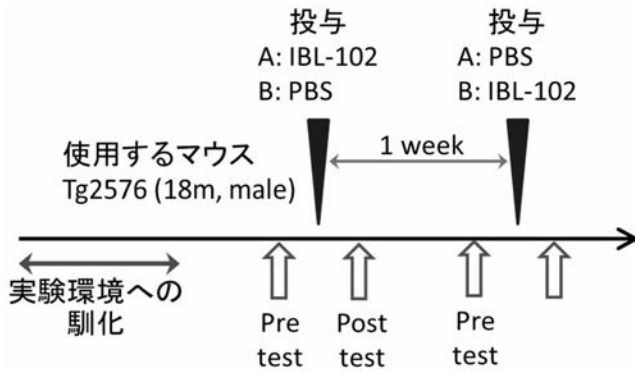
IBL-102



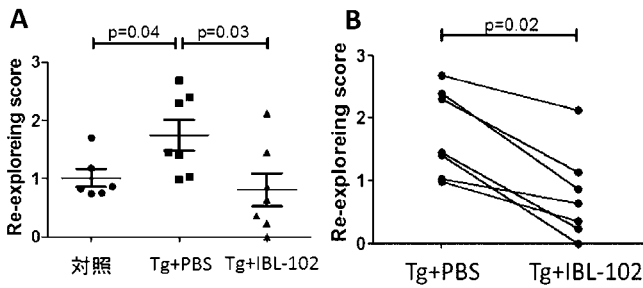
4G8



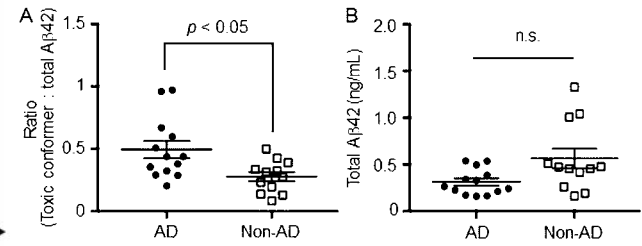
【図 1 2】



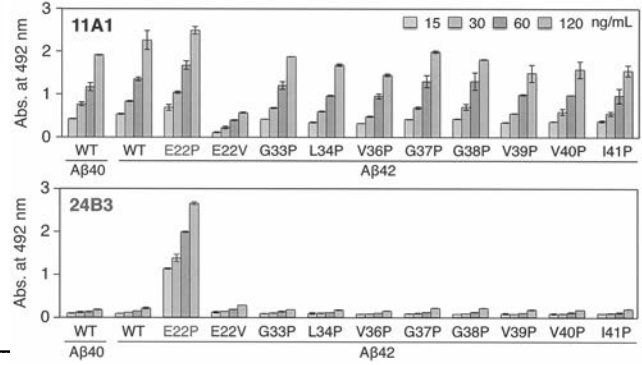
【図 1 3】



【図 1 4】

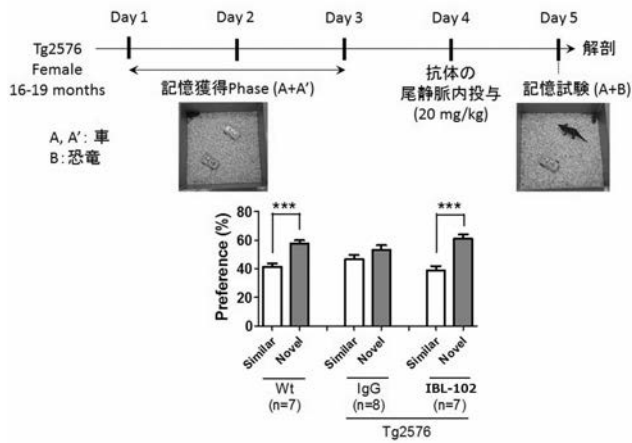


【図 1 5】



【図 1 6】

IBL-102の静脈内単回投与によるAD症状改善効果の検討



【配列表】

2016092865000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/006224

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P25/28(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)i, C12N15/02(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09, A61K39/395, A61P25/28, C07K16/18, C12N15/02, G01N33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	WO 2011/045945 A1 (Kyoto University), 21 April 2011 (21.04.2011), claims 1 to 6, 8, 10; paragraphs [0015], [0095] to [0098]; example 4; fig. 10 & EP 2489675 A1 claims 1 to 6, 8, 10; paragraphs [0015], [0094] to [0097]; example 4 & US 2012/0219552 A1 & CN 102596999 A	1-12, 14-33 25-33 13
X Y A	MURAKAMI, Kazuma et al., Monoclonal Antibody Against the Turn of the 42-Residue Amyloid β - Protein at Positions 22 and 23, ACS Chem. Neurosci., 2010, Vol. 1, No. 11, pp. 747-756, particularly, fig. 2, 7, page 752, right column, 1st to 4th lines from the bottom, page 753, left column, lines 1 to 33	1-12, 14-24 25-33 13

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ 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

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
14 January 2016 (14.01.16)Date of mailing of the international search report
26 January 2016 (26.01.16)Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/006224

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	About Alzheimer's Disease: Alzheimer's Basics, National Institute on Aging, National Institutes of Health [online], 2014.11.23 [retrieval date 2016.01.14], Internet: <URL: https://web.archive.org/web/20141123064420/http://www.nia.nih.gov/alzheimers/topics/alzheimers-basics >, "What is Alzheimer's disease?", "What is dementia?"	1-33
A	JP 2006-265189 A (Kyoto University), 05 October 2006 (05.10.2006), (Family: none)	1-33
A	MASUDA, Yuichi et al., Identification of physiological and toxic conformations in A β 42 aggregates, Chembiochem., 2009, Vol. 10, pp. 287-295	1-33
A	MURAKAMI, Kazuma et al., Neurotoxicity and physicochemical properties of A β mutant peptides from cerebral amyloid angiopathy: implication for the pathogenesis of cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer's disease, J. Biol. Chem., 2003, Vol. 278, No. 46, pp. 46179-46187	1-33

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 5 / 0 0 6 2 2 4									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P25/28(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)i, C12N15/02(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09, A61K39/395, A61P25/28, C07K16/18, C12N15/02, G01N33/53											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2016年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2016年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2016年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2016年	日本国実用新案登録公報	1996-2016年	日本国登録実用新案公報	1994-2016年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2016年										
日本国実用新案登録公報	1996-2016年										
日本国登録実用新案公報	1994-2016年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CApplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
X Y A	WO 2011/045945 A1 (国立大学法人京都大学) 2011.04.21, 請求項 1-6, 8, 10, 段落[0015], [0095]-[0098], 実施例 4, 図 10 & EP 2489675 A1, 請求項 1-6, 8, 10, 段落[0015], [0094]-[0097], 実施例 4 & US 2012/0219552 A1 & CN 102596999 A	1-12, 14-33 25-33 13									
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。											
<table border="0"> <tr> <td> * 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 </td> <td> の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献 </td> </tr> </table>				* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献						
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献										
国際調査を完了した日 14.01.2016		国際調査報告の発送日 26.01.2016									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		<table border="1"> <tr> <td>特許庁審査官 (権限のある職員)</td> <td>4B</td> <td>6220</td> </tr> <tr> <td colspan="3"> 長谷川 茜 電話番号 03-3581-1101 内線 3448 </td> </tr> </table>		特許庁審査官 (権限のある職員)	4B	6220	長谷川 茜 電話番号 03-3581-1101 内線 3448				
特許庁審査官 (権限のある職員)	4B	6220									
長谷川 茜 電話番号 03-3581-1101 内線 3448											

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 5 / 0 0 6 2 2 4
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y A	MURAKAMI, Kazuma et al., Monoclonal Antibody Against the Turn of the 42-Residue Amyloid β -Protein at Positions 22 and 23, ACS Chem. Neurosci., 2010, Vol. 1, No. 11, pp. 747-756, 特に Figure 2, 7, 第 752 頁右欄下から第 1-4 行, 第 753 頁左欄第 1-33 行	1-12, 14-24 25-33 13
A	About Alzheimer's Disease: Alzheimer's Basics, National Institute on Aging, National Institutes of Health [online], 2014.11.23 [検索日 2016.01.14], インターネット: <URL: https://web.archive.org/web/20141123064420/http://www.nia.nih.gov/alzheimers/topics/alzheimers-basics >, "What is Alzheimer's disease?", "What is dementia?"	1-33
A	JP 2006-265189 A (国立大学法人京都大学) 2006.10.05, (ファミリーなし)	1-33
A	MASUDA, Yuichi et al., Identification of physiological and toxic conformations in A β 42 aggregates, Chembiochem., 2009, Vol. 10, pp. 287-295	1-33
A	MURAKAMI, Kazuma et al., Neurotoxicity and physicochemical properties of A β mutant peptides from cerebral amyloid angiopathy: implication for the pathogenesis of cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer's disease, J. Biol. Chem., 2003, Vol. 278, No. 46, pp. 46179-46187	1-33

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10
C 1 2 M	1/34	(2006.01)	C 1 2 M	1/34
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	25/28
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P	21/08

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

(72)発明者 村上 一馬

京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 国立大学法人京都大学内

(72)発明者 清水 孝彦

千葉県千葉市中央区亥鼻 1 - 8 - 1 国立大学法人千葉大学大学院医学研究院内

(72)発明者 泉尾 直孝

千葉県千葉市中央区亥鼻 1 - 8 - 1 国立大学法人千葉大学大学院医学研究院内

(72)発明者 清藤 勉

群馬県藤岡市中字東田 1 0 9 1 番地 1 株式会社免疫生物研究所内

F ターム (参考) 4B029 AA07 BB15 CC01 FA12

4B064 AG27 CA19 CA20 CC24 DA01 DA13

4B065 AA92X AA92Y AA94X AA94Y AB01 AB04 AC14 BA08 CA25 CA44
CA46

4C085 AA14 CC03 CC05 CC07 CC23 DD21 DD62 DD63 EE01 GG01
GG08 GG10

4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 CA40 DA76 EA21 EA50 FA72 FA74

(注) この公表は、国際事務局 (W I P O) により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願 (日本語実用新案登録出願) の国際公開の効果は、特許法第 1 8 4 条の 1 0 第 1 項 (実用新案法第 4 8 条の 1 3 第 2 項) により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	非常具体地识别淀粉样蛋白 β 的22和23位的转角结构的抗体		
公开(公告)号	JPWO2016092865A1	公开(公告)日	2017-09-21
申请号	JP2016563527	申请日	2015-12-14
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人京都大学 株式会社 免疫生物研究所		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人京都大学 国立大学法人千叶 株式会社 免疫生物研究所		
[标]发明人	入江一浩 村上一馬 清水孝彦 泉尾直孝 清藤勉		
发明人	入江 一浩 村上 一馬 清水 孝彦 泉尾 直孝 清藤 勉		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12M1/34 A61K39/395 A61P25/28 G01N33/53 C12P21/08		
CPC分类号	A61K39/395 C07K16/18 C12N15/02 C12N15/09 G01N33/53 A61K2039/505 C07K2317/92 G01N33/6896 G01N2333/4709 G01N2800/2821 C07K2317/33 C07K2317/76		
FI分类号	C12N15/00.A C07K16/18.ZNA C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12M1/34.F A61K39/395.N A61P25/28 G01N33/53.D C12P21/08		
F-TERM分类号	4B029/AA07 4B029/BB15 4B029/CC01 4B029/FA12 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA92X 4B065/AA92Y 4B065/AA94X 4B065/AA94Y 4B065/AB01 4B065/AB04 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA14 4C085/CC03 4C085/CC05 4C085/CC07 4C085/CC23 4C085/DD21 4C085/DD62 4C085/DD63 4C085/EE01 4C085/GG01 4C085/GG08 4C085/GG10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA21 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	中谷智子		
优先权	2014251898 2014-12-12 JP 2015104411 2015-05-22 JP		
其他公开文献	JPWO2016092865A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了一种抗体或其免疫反应性片段，其仅靶向具有特定的A β 转角结构（A β 的毒性构象体）的A β 。本发明还涉及包含特异性识别A β 毒性构象体的抗体作为有效成分的药物组合物，A β 毒性构象体的测定试剂盒，阿尔茨海默氏病的诊断剂等。[选择图]无

