

(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2014-520825

(P2014-520825A)

(43) 公表日 平成26年8月25日(2014.8.25)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 16/18 (2006.01)</b>	C07K 16/18 ZNA	4B064
<b>C12P 21/08 (2006.01)</b>	C12P 21/08	4H045
<b>G01N 33/53 (2006.01)</b>	G01N 33/53 D	
<b>G01N 33/536 (2006.01)</b>	G01N 33/536 B	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 22 頁)

(21) 出願番号	特願2014-519503 (P2014-519503)	(71) 出願人	397060175 ヤンセン ファーマシューティカ エヌ. ペー.
(86) (22) 出願日	平成24年7月6日 (2012.7.6)		
(85) 翻訳文提出日	平成26年1月14日 (2014.1.14)		
(86) 国際出願番号	PCT/EP2012/063213		ベルギー国 ペー. -2340 ベルセ トルンハウッサーヴェヒ 30
(87) 国際公開番号	W02013/010812	(74) 代理人	100092783 弁理士 小林 浩
(87) 国際公開日	平成25年1月24日 (2013.1.24)	(74) 代理人	100120134 弁理士 大森 規雄
(31) 優先権主張番号	11174224.3	(74) 代理人	100104282 弁理士 鈴木 康仁
(32) 優先日	平成23年7月15日 (2011.7.15)	(72) 発明者	マーケン, マーク ヒューバート ベルギー王国 ペーアセ ビー-2340 、 トゥルンハウゼウエグ 30, ヤンセン ファーマシューティカ エヌ. ペー. 内 最終頁に続く
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		

(54) 【発明の名称】 モノクローナル抗体に対して特異的なβ-アミロイドx-37およびその使用

## (57) 【要約】

本発明は、 - セクレターゼによって媒介されるAPPタンパク質の切断後に得られる、より短いA ペプチド、すなわちAs s 1 - 37、As s 3 - 37、As s 3 p - 37、As s 1 1 - 37、およびAs s 1 1 p - 37、および以下においてA x - 37ペプチドとも称されるAPPの37番目のアミノ酸で終結するその他の類似断片である、A - ペプチド断片を特異的に認識するモノクローナル抗体を提供する。これは、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞、ならびに抗体およびハイブリドーマ細胞を製造する方法；および本発明の抗体を使用する、競合法またはサンドイッチ法によるA x - 37ペプチドのための免疫測定法；および生物学的サンプルなどのサンプル中のA x - 37ペプチドレベルを測定する方法をさらに提供する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

A x - 37 ペプチドを特異的に認識する、モノクローナル抗体。

## 【請求項 2】

前記 A x - 37 ペプチドが、A - ペプチド断片 A s s 1 - 37、A s s 3 - 37、A s s 3 p - 37、A s s 1 1 - 37、および A s s 1 1 p - 37 からなる群から選択される、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体。

## 【請求項 3】

検出可能に標識される、請求項 1 または 2 に記載の抗体。

## 【請求項 4】

前記検出可能な標識が、放射性標識、酵素標識、ルミネセンス標識、または蛍光標識である、請求項 3 に記載の抗体。

## 【請求項 5】

担体上に固定化される、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の抗体。

## 【請求項 6】

2011年2月1日にそれぞれ受入番号 L M B P 8062CB および L M B P 8063CB の下に Belgian coordinated collection of microorganisms に寄託された、ハイブリドーマ細胞 J R D / A b 37 / 3 s c l 1 または J R D / A b 37 / 4 s c l 1 のいずれか、または 2011年3月30日に受入番号 L M B P 8064CB の下に Belgian Coordinate Collections of Microorganisms に寄託されたハイブリドーマ J R D / A b 37 / 10 s c l 1 による、請求項 1 から 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】

前記サンプルを請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の抗体に接触させて、前記抗体と前記 A x - 37 ペプチドとの間に免疫複合体が形成されかどうかを測定するステップを含んでなる、サンプル中の A x - 37 ペプチドを測定または検出するための免疫測定法。

## 【請求項 8】

前記サンプルが、哺乳類からの組織サンプルおよび体液サンプルからなる群から選択される、請求項 7 に記載の A x - 37 ペプチドの存在を測定または検出する方法。

## 【請求項 9】

- アミロイド関連疾患を診断するための請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の抗体の使用。

## 【請求項 10】

治療を受ける患者の生物学的サンプル中の A x - 37 ペプチド量および A 42 ペプチド量を一定時間毎に測定するステップと、

前記 A x - 37 ペプチド量および前記 A 42 ペプチド量の相対変化を経時的に測定するステップとを含んでなる、- アミロイド関連疾患の治療をモニタリングする方法。

## 【請求項 11】

前記 A x - 37 ペプチド量を測定するステップが、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の抗体を使用して実施される、請求項 10 に記載の方法。

## 【請求項 12】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の抗体と、前記抗体運搬手段とを含んでなる、- アミロイド関連疾患の診断、進行モニタリングまたは治療モニタリングのための免疫測定法キット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、- アミロイドペプチドに対して特異的な新しい抗体と、診断法、生物マーカー、または治療薬としてのそれらの使用とに関する。より特には、本発明は、- アミ

10

20

30

40

50

ロイドペプチドの A<sub>48</sub> - 37 断片に対して特異的な抗体について述べる。

【0002】

本発明は、一般に、 $\beta$ -アミロイド前駆体タンパク質のプロセッシングをモニターする方法および組成物に関する。より具体的には、本発明は、アルツハイマー病およびその他の $\beta$ -アミロイドペプチド関連疾患を診断し、予後診断し、治療法に対する応答をモニタリングのためのこのような方法および組成物の使用に関し、ならびにアルツハイマー病およびその他の $\beta$ -アミロイドペプチド関連疾患の治療法としての受動的免疫化における、開示された抗体の使用に関する。

【背景技術】

【0003】

アルツハイマー病 (AD) は、記憶、認知力、論理的思考力、判断、および情動安定性の進行性の喪失によって臨床的に特徴付けられ、著明な精神荒廃を徐々にもたらし、究極的には死に至る退行性脳障害である。AD は、高齢者における進行性精神衰退 (認知症) の非常に一般的な原因であり、米国における 4 番目の最も一般的な医学的死亡原因に相当すると考えられている。AD は世界中の民族で観察されており、主な現在のそして将来の公衆衛生問題を提示する。この疾患は、目下、米国のみで約 200 ~ 300 万人に影響を及ぼしていると推定されている。AD は、現在のところ不治である。AD を効果的に予防し、またはその症状および経過を逆転させる治療は、目下知られていない。

【0004】

AD がある個人の脳は、老人 (またはアミロイド) 斑、アミロイド血管症 (血管中のアミロイド沈着)、および神経原線維濃縮体と称される特徴的な病変を示す。多数のこれらの病変、特にアミロイドおよび神経原線維濃縮体は、AD 患者において、記憶および認知機能にとって重要なヒト脳のいくつかの領域に一般に見られる。これらの病変の内、解剖学的により限局的に分布するより少数のものは、臨床的 AD が無い高齢者の大多数の脳内にもまた見られる。アミロイド斑およびアミロイド血管症はまた、21 トリソミー (ダウン症候群)、びまん性レビー小体病、およびオランダ型アミロイド症を伴う遺伝性脳出血 (HCHWA-D) がある個人の脳に特徴的である。

【0005】

アミロイド斑の主要構成物は、 $\beta$ -アミロイド前駆体タンパク質 (APP) の切断によって生じる、変種アミロイド- $\beta$  (A $\beta$ ) ペプチドである。APP は I 型膜貫通タンパク質であり、それはいくつかのいわゆるセクレターゼタンパク質による、タンパク質分解プロセッシングを受ける。過去には、斑および濃縮体がアルツハイマー病の原因であるのか、または単なる結果であるのかどうかという、かなり大きい科学的論争があったが、最近の発見は、アミロイド斑が、原因となる前駆体または要素であることを示唆する。特に、正常にプロセッシングされれば A $\beta$  ペプチドを生じないタンパク質である、アミロイド前駆体タンパク質をコードする遺伝子の変異から、A $\beta$  ペプチドの生成が帰結し得ることが、発見されている。家族性早発性アルツハイマー病を引き起こす、アミロイド前駆体タンパク質遺伝子における変異の同定は、アミロイド代謝が、疾患に根本的な病原性過程の中心的事象であることの最も有力な証拠である。A $\beta$  は、目下、最重要の診断パラメータと見なされている。

【0006】

Takami et al. ( $\beta$ -secretase: successive tripeptide and tetrapeptide release from the transmembrane domain of  $\beta$ -carboxyl terminal fragment, J Neurosci. (October 14, 2009); 29(41): 13042-13052) は、 $\beta$ -カルボキシル末端断片 (CTF) プロセッシングの概要を示す。A $\beta$  は、CTF が、2 つの長い A $\beta$  である A $\beta_{48}$  および A $\beta_{49}$  に切断されることで、生成すると思われる。これらは、各段階における 3 または 4 個の残基の除去によってさらにプロセッシングされ、A $\beta_{42}$  および A $\beta_{40}$  が生成する。A $\beta_{49}$  が、2 または 3 個のトリペプチドの連続的遊離によって A $\beta_{43}$  /

10

20

30

40

50

4<sub>0</sub>に変換される一方で、A<sub>4<sub>8</sub></sub>は、2個のトリペプチドおよびさらなるテトラペプチドの連続的遊離によって、A<sub>4<sub>2</sub>/3<sub>8</sub></sub>に変換される。

【0007】

病的状態では、および疾患修飾剤を使用した場合は、その他の断片が生じる。

【0008】

ADおよびその他のAss-関連疾患の根本的な機構の理解における進歩にもかかわらず、疾患を診断して治療するための方法および組成物を開発する必要性がなおもある。したがってアミロイド前駆体タンパク質の細胞プロセッシングをモニターする能力は、アルツハイマー病の診断、予後診断、および治療管理において、顕著な価値を有するであろう。特に、血清、脳脊髄液(CSF)などの容易に得られる患者サンプル中で、検出可能な診断マーカーをスクリーニングして評価するための、低侵襲的で再現可能な手順を同定することが望ましいであろう。前出のT.C., et al., *Neuroscience Letters* 215 (1996); 173-176に記載されるようなポリクローナル抗体は、生物学的サンプル中の異なるA-ペプチドを検出するのに有用であるが、各バッチのポリクローナル抗体が異なる事実を踏まえると、これらの抗体は、容易に得られる患者サンプル中で、検出可能な診断マーカーをスクリーニングして評価する、再現可能な手順を実施するツールを提供しない。これに加えて、ポリクローナル抗体の使用では、典型的に非特異的結合がより高く、典型的にウエスタンブロット法の正確度が低下する。

10

【0009】

アルツハイマー病のためのいくつかの可能な診断マーカーが、提案されている。本発明にとって特に興味深いのは、APPタンパク質の-カルボキシル末端断片プロセッシング後に得られる、A前駆体タンパク質の断片である。これらのマーカーは、それ自体が、および/またはその他の診断マーカーおよび手順と組み合わせて、有用なはずである。好ましくは、診断マーカーは、低侵襲診断手順を利用し得るように、CSF、血液、血漿、血清、尿などの体液、組織などの中で検出可能である。また、例えば臨床試験モニタリングなどの新しい治療の開発、または現行の治療の双方で使用される、疾患および/または治療の進行をモニタリングするための生物マーカーに対する必要性がある。

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

30

【0010】

A<sub>x-37</sub>検出のための特異的アッセイは、液状サンプル中の非常に低濃度のA<sub>x-37</sub>を再現可能な一貫した様式で検出し、ならびにサンプル中に存在してもよい、A<sub>x-37</sub>ペプチドとその他のAPP断片とを識別できるはずである。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明は、-セクレターゼによって媒介されるAPPタンパク質の切断後に得られる、より短いAペプチド、すなわちAss1-37、Ass3-37、Ass3p-37、Ass11-37、およびAss11p-37、および以下A<sub>x-37</sub>ペプチドとも称されるAPPの37番目のアミノ酸で終結するその他の類似断片である、A-ペプチド断片を特異的に認識するモノクローナル抗体を提供する。これは、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞、ならびに抗体およびハイブリドーマ細胞を製造する方法；および本発明の抗体を使用する競合法またはサンドイッチ法によるA<sub>x-37</sub>ペプチドのための免疫測定法；および生物学的サンプルなどのサンプル中のA<sub>x-37</sub>ペプチドレベルを測定する方法をさらに提供する。

40

【0012】

特に本発明は、免疫原としてポリペプチドH<sub>2</sub>N-CAIIGLMVGG-COOHを使用して調製された、モノクローナル抗体を提供する。前記抗体は、その他のAPP断片との交差反応性なしにA<sub>x-37</sub>ペプチドと特異的に反応し、したがってアルツハイマー病の発病におけるA<sub>x-37</sub>の役割を評価する免疫測定法において有用である。

50

## 【0013】

より具体的な実施形態では、モノクローナル抗体は、免疫原としてのポリペプチドCAIIGLMVGに反応性であり、2011年2月1日にそれぞれ受入番号LMBP 8062CBおよびLMBP 8063CBの下に、Belgian Coordinated Collection of Microorganismsに寄託された、ハイブリドーマJRD/Ab37/3 scl1またはJRD/Ab37/4 scl1によって、または2011年3月30日に受入番号LMBP 8064CBの下に、Belgian Coordinated Collections of Microorganismsに寄託された、ハイブリドーマJRD/Ab37/10 scl1によって発現される。したがって本発明に従ったモノクローナル抗体を発現する、前述のハイブリドーマ細胞を提供することが、本発明のさらなる実施形態である。

10

## 【0014】

本発明のさらなる態様では、本発明に従った抗体は、 $\alpha$ -アミロイド関連疾患をモニターするための生物学的サンプル、およびAPPの細胞内プロセッシングをモニターするための細胞培養からの馴化培地をはじめとして、A $\beta$ -37ペプチドのあらゆる出現を検出する従来の免疫学的技術で使用される。適切な免疫学的技術は当業者に良く知られており、例えば、ELISA、ウエスタンブロット分析、競合またはサンドイッチ免疫測定法などが挙げられ、その他の点では周知のように、それらは全て、抗原-抗体免疫複合体の形成に依存し、そこではアッセイの目的で、抗体が例えば放射性、酵素または蛍光性標識で標識されて検出可能であり得て、またはそれは不溶性担体上に固定化され得る。

20

## 【図面の簡単な説明】

## 【0015】

【図1】JRD/Ab37/3ハイブリドーマ細胞によって産生される、抗A $\beta$ -37抗体の特異性を図示する。

## 【図2】

【図3】それぞれイヌではGSM ( $\alpha$ -セクレターゼ調節因子) AおよびB、サルではE2012による処置後の、イヌおよびサルCSF中のA $\beta$ -37増大の測定をそれぞれ示す。

【図4】健常対照(HC)、神経学的対照(NC)、およびアルツハイマー病患者(AD)で測定された、異なるA $\beta$ 断片のレベルを示す。

30

【図5】健常対照(HC)、神経学的対照(NC)、およびアルツハイマー病患者(AD)で測定された、A $\beta$ 断片間の比率を比較する。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0016】

本発明は、CTFプロセッシングによるAPPタンパク質切断後に得られる、より短いA $\beta$ ペプチドを特異的に認識するモノクローナル抗体を提供する。本発明の抗体は、ヒトA $\beta$ のA $\beta$ -37ペプチド上、またはマウスA $\beta$ のA $\beta$ -37ペプチド上に存在する、1つまたは複数のエピトープに対する特異性を有する。

## 【0017】

特に、本発明は、免疫原としてH<sub>2</sub>N-CAIIGLMVG-COOHからなるペプチドを使用して調製された、モノクローナル抗体を提供する。

40

## 【0018】

前述のペプチドは、アミノ酸が成長鎖に順次付加される、良く知られているMerrifield固相合成技術などの当該技術分野で公知の方法によって、調製製造されてもよい(Merrifield(1963)J. Am. Chem. Soc. 85: 2149-2156)。アミノ酸配列は、上記の(seth forth above)A $\beta$ 断片の配列に基づいてもよく、または天然のまたは遺伝子操作された変異配列を利用してもよい。免疫原として使用するために、このように得られたペプチドは、単独で使用してもよく、またはウシ、ウサギ、およびヒトなどの哺乳類のマレイミド活性化血清アルブミン；ウシ、ウサギ、ヒト、およびヒツジなどの哺乳類のチログロブリン；およびキーホールリン

50

ペットヘモシアニン ( K L H ) や、またはスチレンポリマー、アクリルポリマー、ビニルポリマー、およびプロピレンポリマーをはじめとする合成ポリマー担体などのその他の適切なタンパク質担体などの適切な免疫活性化天然または合成担体とコンジュゲートしてもよい。免疫化のさらに詳細な説明は、実施例にある。

#### 【 0 0 1 9 】

ひとたび十分な量の免疫原が得られたら、生体外または生体内技術をはじめとする技術を使用して、様々な方法によって、A x - 3 7 ペプチドに対して特異的なポリクローナル抗体を製造してもよい。生体外技術が免疫原へのリンパ球の曝露を伴う一方で、生体内技術は適切な脊椎動物宿主への免疫原の注射を必要とする。適切な脊椎動物宿主は、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ヤギなどをはじめとする非ヒト動物である。免疫原は、所定のスケジュールに従って動物に注射され、動物は周期的に採血され、後続の採血は改善された力価と特異性を有する。注射は、筋肉内、腹腔内、皮下などで行ってもよく、フロイント完全アジュバントまたはフロイント不完全アジュバントなどのアジュバントを投与して、抗体産生能を増強してもよい。血清力価レベルをスクリーニングする方法は、典型的に標準 E L I S A または R I A アッセイを含む。例えば E L I S A スクリーニング形式では、( B S A などの ) 担体と共役している A x - 3 7 ペプチドまたは A x - 3 7 ペプチドのいずれかで被覆された固相 ( 例えばマイクロプレートの底 ) に血清を添加し、次に好ましくは西洋ワサビペルオキシダーゼである酵素、または <sup>1 2 5</sup> I などの放射性同位体などの検出可能な標識とコンジュゲートされた、抗免疫グロブリン抗体 ( 例えば免疫化がマウスで実施される場合は、例えばヒツジ - 抗マウス免疫グロブリン ( I g ) などの抗マウス免疫グロブリン抗体が使用される ) を追加する。

10

20

#### 【 0 0 2 0 】

所望ならば、モノクローナル抗体は、技術分野の当業者に良く知られている技術を使用して、直上に記載した方法によって、所望の免疫原で過免疫されたマウスなどの脊椎動物宿主から調製し得る。好都合には、高力価抗体を示す脊椎動物宿主は、所望の免疫原で免疫化された動物から選択される。典型的に最終免疫化の 2 ~ 5 日後、好ましくは 4 日後に、それから脾臓またはリンパ節を採取して、その中に含有される抗体産生細胞を不死化する。不死化の様式は、重要でない。現在のところ最も一般的な技術は、骨髓腫細胞融合パートナーとの融合である。融合手順は、例えば Kohler and Milstein ( Nature , 2 5 6 , 4 9 5 - 4 9 7 ( 1 9 7 5 ) ) の方法などの当該技術分野で公知の方法に従って実施し得る。その他の技術としては、E B V 形質転換、例えば発がん遺伝子、レトロウイルスなどの裸の ( b a r e ) D N A での形質転換、または安定した細胞系の維持と、モノクローナル抗体産生を提供する、あらゆるその他の方法が挙げられる。ポリエチレングリコール ( P E G ) およびセンダイウイルスをはじめとする融合促進剤を使用してもよい。特に P E G が、好ましくは使用される。骨髓腫細胞の例としては、N S - 1、P 3 U 1、S P 2 / 0、および A P - 1 が挙げられ、S P 2 / 0 細胞が好ましくは使用される。

30

#### 【 0 0 2 1 】

A x - 3 7 ペプチドの C 末端上に見られるエピトープに対して特異的なハイブリドーマ産生モノクローナル抗体は、例えば B a l b / c マウスなどのそれからハイブリドーマが生成され得る動物を、フロイントアジュバント中の所望の免疫原の初回腹腔内注射と、それに続く 2 週毎の追加免疫注射によって最初に免疫化することで、最も効果的に生成される。引き続き単離脾臓の融合は、Kohler and Milstein ( Eur . J . Immunol . , 6 , 2 9 2 - 2 9 5 ( 1 9 7 6 ) ) の変法によって、好ましくは S P 2 / 0 細胞を使用して、当業者に通常知られているあらゆる技術を使用して実施し得る。A x - 3 7 ペプチドに対して特異的な抗体をいずれのハイブリドーマが産生するかを判定するスクリーニングは、上文に記載される標準 E L I S A または R I A アッセイのいずれかで成し得る。所望のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの選択および育種は、1 0 ~ 2 0 % のウシ胎仔血清と、例えば H A T ( ヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジン ) または E S G ハイブリドーマ補給剤などのその他の成分とが添加さ

40

50

れた動物用培地（例えばダルベッコ変法イーグル培地（DMEM）またはイーグル最少必須培地（MEM））内で通常行われる。したがって一実施形態では、本発明は、2011年2月1日にそれぞれ受入番号LMBP 8062CBおよびLMBP 8063CBの下に、Belgian Coordinated Collection of Microorganismsに寄託されたハイブリドーマ細胞JRD/Ab37/3 scl1またはJRD/Ab37/4 scl1、または2011年3月30日に受入番号LMBP 8064CBの下に、Belgian Coordinated Collections of Microorganismsに寄託されたハイブリドーマJRD/Ab37/10 scl1を提供する。

【0022】

抗A<sub>x</sub>-37モノクローナル抗体の分離および精製は、塩析沈殿、アルコール沈殿、等電沈殿、電気泳動、イオン交換材料（例えばDEAE）の吸着および脱離、超遠心、ゲル濾過、および抗原結合固相およびプロテインAまたはプロテインG親和性クロマトグラフィーをはじめとする特定の免疫親和性分離技術などの、ポリクローナル抗体の通常分離および精製と同様に実施される。適切なタンパク質精製技術は、その開示を参照によって本明細書に援用するMethods in Enzymology, Vol. 182, Deutcher, ed., Academic Press, Inc., San Diego, 1990に記載される。

【0023】

したがって前述のハイブリドーマ細胞によって発現される単離モノクローナル抗体を提供することが、本発明の目的であり、前記抗体はA<sub>x</sub>-37ペプチドを特異的に認識できる。好ましくはこれらの単離モノクローナル抗体は、2011年2月1日にそれぞれ受入番号LMBP 8062CBおよびLMBP 8063CBの下にBelgian Coordinated Collection of Microorganismsに寄託された、ハイブリドーマ細胞JRD/Ab37/3 scl1またはJRD/Ab37/4 scl1、または2011年3月30日に受入番号LMBP 8064CBの下にBelgian Coordinated Collections of Microorganismsに寄託された、ハイブリドーマJRD/Ab37/10 scl1によって発現される。

【0024】

本発明に従った抗体は、  
- アミロイド関連疾患をモニターするための生物学的サンプル、およびAPPの細胞内プロセッシングをモニターするための細胞培養からの馴化培地をはじめとして、A<sub>x</sub>-37ペプチドのあらゆる出現を検出する従来の免疫学的技術で使用される。適切な免疫学的技術は当業者に良く知られており、例えばELISA、ウエスタンブロット分析、競合またはサンドイッチ免疫測定法などが挙げられ、さもなければ周知のように、それらは全て、抗原-抗体免疫複合体の形成に依存し、そこではアッセイの目的で、抗体が例えば放射性、酵素、ルミネセンスまたは蛍光性標識で標識されて検出可能であり得て、またはそれは不溶性担体上に固定化され得る。したがってサンプル中のA<sub>x</sub>-37ペプチドを測定または検出するための免疫測定法を提供することが、本発明の目的であり、方法は、抗体を含むサンプルを本発明に従ったA<sub>x</sub>-37ペプチドに接触させて、抗体とA<sub>x</sub>-37ペプチドの間に免疫複合体が形成されるかどうかを判定するステップを含んでなる。これらの方法は、組織サンプルまたは体液サンプルのいずれかにおいて実施し得て、一般に、対象の身体からサンプルを得るステップと；前記サンプルを、イメージング有効量の検出可能に標識された本発明に従った抗体に接触させるステップと；標識を検出して、サンプル中のA<sub>x</sub>-37ペプチドの存在を確立するステップとを含んでなる。

【0025】

本発明の抗体を使用する測定法は、特に限定的でない。測定溶液中の抗原の量、特にA<sub>x</sub>-37ペプチドの量に対応する、抗体、抗原または抗原-抗体複合体の量が、化学的または物理的手段によって検出され、既知量の抗原を含有する標準溶液の使用によって作

10

20

30

40

50

成された標準曲線から計算されさえすれば、あらゆる測定法を使用してもよい。例えば比濁分析、競合法、免疫測定法、およびサンドイッチ法が、適切には使用される。感度と特異性に関して、下述のサンドイッチ法を使用することが特に好ましい。

【0026】

標識物質を使用した測定法では、標識薬剤として、放射性同位体、酵素、蛍光性物質、発光性物質などが使用される。放射性同位体の例としては、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^3\text{H}$ 、および $^{14}\text{C}$ が挙げられる。酵素は、通常、検出可能な反応を触媒する適切な基質の共役によって検出可能にされる。その例としては、例えば、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、およびリンゴ酸デヒドロゲナーゼ (dehydrogenase)、好ましくは西洋ワサビペルオキシダーゼが挙げられる。発光性物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、エクオリン、およびルシフェラーゼが挙げられる。さらにアビジン-ビオチン系もまた、本発明の抗体および免疫原標識のために使用し得る。

10

【0027】

免疫原または抗体が不溶化される場合、タンパク質または酵素の不溶化または固定化のために通常用いられる、物理吸着または化学結合のいずれかを使用してもよい。担体の例としては、アガロース、デキストラン、およびセルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、およびシリコンポリマーなどの合成樹脂、およびガラスが挙げられる。

20

【0028】

サンドイッチ法では、試験溶液を不溶化された抗 A<sub>x</sub>-37 ペプチド捕捉抗体と反応させ (第1の反応)、さらに標識された抗 A<sub>x</sub>-37 ペプチド検出抗体を反応させて (第2の反応)、次に不溶化担体上の標識薬剤の活性をアッセイし、それによって検査溶液中の A<sub>x</sub>-37 ペプチドの量を判定し得る。第1の反応および第2の反応は、同時にまたは順次実施してもよい。

【0029】

$\alpha$ -アミロイド関連疾患を診断するためのさらなる実施形態では、組織や、CSF、血液、血漿、血清、尿などの体液をはじめとする生物学的サンプルを収容して、適切量の初回抗体と接触させ、免疫複合体を生成させる。接触は、典型的に、第1の抗体で被覆された固体マトリックスに、サンプルを添加することを伴う。サンプルを第1の抗体に接触させることで生じる複合体は、溶出によってサンプルから分離される。しかしその他の回収方法を用いてもよい。回収された複合体は、抗原上の抗原決定基を対象として複合体中の抗原と結合できる、少なくとも1つの第2の抗体に接触させる。抗原性実体の多エピトープ性のために、第2の抗体が対象とする抗原決定基は、第1の抗体が対象とするものと同であってもよい。上で説明した標識のいずれかを使用して、第1のまたは第2の抗体のいずれかを検出可能にしてもよい。特定の実施形態では、第2の抗体が検出可能にされる。第1のおよび第2の抗体に結合する抗原からなる複合体に結合する、検出可能な抗体の存在は、技術分野で既知の技術を使用して容易に検出されてもよい。生物学的サンプルで得られる結果と、対照サンプルで得られる結果とを比較することで、改変 A<sub>x</sub>-37 ペプチドレベルの存在を判定してもよい。

30

40

【0030】

したがって以下被覆抗体と称される、固体マトリックスに被覆された第1の抗体が、A<sub>x</sub>-37 ペプチドを認識する抗体からなり、検出可能にされた第2の抗体が、A<sub>x</sub> ペプチドのN-末端を特異的に認識する、サンドイッチアッセイを提供することが、本発明の目的である。有利には、被覆抗体は、ヒト A<sub>x</sub>-37 ペプチドを認識し、より具体的な実施形態では、被覆抗体は、A<sub>x</sub>-37 を特異的に認識する、モノクローナル抗体 JRF/A b 37 / 3、JRF/A b 37 / 4、および JRF/A b 37 / 10 からなる群から選択される。有利な実施形態では、第2の抗体は、ハイブリドーマ細胞 JRF/A / N 25 によって発現されるモノクローナル抗体である。

【0031】

50

サンドイッチアッセイを提供して、A<sub>x-37</sub>ペプチドと、A<sub>38</sub>、A<sub>40</sub>またはA<sub>42</sub>ペプチドとの比率を判定することもまた、本発明の目的である。この実施形態では、A<sub>38</sub>、A<sub>40</sub>またはA<sub>42</sub>ペプチドを認識し、その上A<sub>x-37</sub>ペプチドとの交差反応性を示さない、追加的な第2の抗体が使用される。したがって被覆抗体が、A<sub>x-37</sub>ペプチドを特異的に認識するが、完全長A<sub>40</sub>およびA<sub>42</sub>ペプチド、モノクローナル抗体JRF/A<sub>b37/3</sub>、JRF/A<sub>b37/4</sub>、およびJRF/A<sub>b37/10</sub>との交差反応性を示さない抗体からなる、サンドイッチアッセイを提供することが本発明の目的である。

#### 【0032】

本発明のモノクローナル抗体はまた、例えば、競合法および比濁分析などのサンドイッチ法以外のアッセイシステムで使用し得る。競合法では、試験溶液中の抗原と標識免疫原が、抗体と競合的に反応し、それに続いて、未反応の標識免疫原(F)が、標識免疫原(immunogens)(B)に結合する抗体から分離される(B/F分離)。次にBまたはFのいずれかの標識量を測定して、試験液中の免疫原の量を判定する。これらの反応法としては、可溶性抗体が抗体として使用され、ポリエチレングリコールと、前述の抗体に対する第2の抗体とがB/F分離のために使用される液相法、および固化抗体が第1の抗体として使用され、または可溶性抗体が第1の抗体として使用され、固化抗体が第2の抗体として使用される、固化法が挙げられる。

10

#### 【0033】

比濁分析では、ゲルまたは溶液中において、抗体-抗原反応の結果として生成した不溶性沈殿物の量が測定される。抗原の量が軽微であり、沈殿物が少量のみ得られる場合でさえも、レーザー散乱を使用するレーザー比濁分析が、適切に使用される。

20

#### 【0034】

さらなる態様では、本発明は、本発明の抗体を用いた治療をモニターする方法を対象とする。より特には、本発明の抗体および検出法を使用して、アルツハイマー病患者における、多様な疾患修飾薬の効果をモニターし得る。このような疾患修飾薬の例としては、いわゆるGSM(セクレターゼ調節因子)、GSI(セクレターゼ阻害剤)またはBACE阻害化合物が挙げられるが、これに限定されるものではない。

#### 【0035】

本発明は、前述の方法で使用し得るキットをさらに提供する。一実施形態では、キットは、1つまたは複数の容器内に、2011年2月1日にそれぞれ受入番号LMBP 8062CBおよびLMBP 8063CBの下に、Belgian coordinated collection of microorganismsに寄託された、ハイブリドーマ細胞JRD/A<sub>b37/3</sub> scl1またはJRD/A<sub>b37/4</sub> scl1、または2011年3月30日に受入番号LMBP 8064CBの下にBelgian Coordinated Collections of Microorganismsに寄託された、ハイブリドーマJRD/A<sub>b37/10</sub> scl1によって発現される、好ましくは精製抗体、より好ましくはモノクローナル抗体、なおもより好ましくは単離モノクローナル抗体である、本発明の抗体を含んでなる。特定の実施形態では、本発明のキットは、キットに含まれる抗体と特異的に免疫反応性であるエピトープを含んでなる、実質的に単離されたポリペプチドを含有する。さらなる実施形態では、このエピトープは、A<sub>x-37</sub>ペプチドのC末端上に存在する。好ましくは、本発明のキットは、サンドイッチアッセイで使用するために準備され、対象ポリペプチドと特異的に反応しない被覆抗体をさらに含んでなり、特定の実施形態では、この被覆抗体は、ヒトA<sub>1-37</sub>ペプチドなどのA<sub>1-37</sub>ペプチド、ヒトA<sub>1-38</sub>、A<sub>1-40</sub>またはA<sub>1-42</sub>などのA<sub>1-38</sub>、A<sub>1-40</sub>またはA<sub>1-42</sub>を認識する。特定の実施形態では、被覆抗体はJRF/A<sub>b37/10</sub>である。本発明に従った代案のサンドイッチアッセイでは、キットは、ヒトA<sub>x-37</sub>ペプチドなどのA<sub>x-37</sub>ペプチドを特異的に認識する、被覆抗体を含んでなる。より具体的な実施形態では、キットは、被覆抗体として、2011年2月1日にそれぞれ受入番号LMBP 8062CBおよびLMBP 806

30

40

50

3CBの下にBelgian Coordinated Collection of Microorganismsに寄託された、ハイブリドーマ細胞JRD/Ab37/3 scl1またはJRD/Ab37/4 scl1によって、または2011年3月30日に受入番号LMBP 8064CBの下にBelgian Coordinated Collections of Microorganismsに寄託された、ハイブリドーマJRD/Ab37/10 scl1によって発現される単離モノクローナル抗体と、さらなる抗体として、検出可能な標識にコンジュゲートされたモノクローナル抗体JRF/A/N25とを含んでなる。

【0036】

別の特定の実施形態では、本発明のキットは、抗体と対象ポリペプチドとの結合を検出する手段を含有する（例えば抗体は、蛍光性化合物、酵素基質、放射性化合物またはルミネセンス化合物などの検出可能な基質とコンジュゲートしていてもよく、または第1の抗体を認識する第2の抗体は、検出可能な基質とコンジュゲートしていてもよい）。特にキットは、抗体とA<sub>x</sub>-37ペプチドとの結合を検出する、好ましくはA<sub>x</sub>-37ペプチドのC末端に存在するエピトープとの結合を検出する手段を含有する。前述のサンドイッチアッセイでは、検出可能な基質にコンジュゲートされる抗体は、被覆抗体でない。

10

【0037】

追加的な実施形態では、本発明は、組織や、CSF、血液、血漿、血清、尿などの体液などをはじめとする生物学的サンプルのスクリーニングで使用される、診断キットを含む。前記生物学的サンプルは、A<sub>x</sub>-37ペプチドを含有する。診断キットは、A<sub>x</sub>-37ペプチドと、特にA<sub>x</sub>-37ペプチドのC末端上に存在するエピトープと、特異的に免疫反応性である実質的に単離された抗体と、抗体と免疫原の結合を検出する手段とを含む。一実施形態では、抗体は固体支持体に付着する。特定の実施形態では、抗体は、モノクローナル抗体、特に、2011年2月1日にそれぞれ受入番号LMBP 8062CBおよびLMBP 8063CBの下にBelgian Coordinated Collection of Microorganismsに寄託された、ハイブリドーマ細胞JRD/Ab37/3 scl1またはJRD/Ab37/4 scl1によって、または2011年3月30日に受入番号LMBP 8064CBの下にBelgian Coordinated Collections of Microorganismsに寄託された、ハイブリドーマJRD/Ab37/10 scl1によって発現されるモノクローナル抗体であってもよい。

20

30

【0038】

上記アッセイの固体表面試薬は、タンパク質材料をポリマービーズ、ディップスティック、96ウェルプレートまたは濾過材料などの固体支持体材料に付着させる既知の技術によって調製される。これらの付着法としては、支持体へのタンパク質の非特異的吸着、または典型的に遊離アミン基を通じた、固体支持体上の活性化カルボキシル、ヒドロキシル、またはアルデヒド基などの化学的反応基へのタンパク質の共有結合が、一般に挙げられる。代案としては、ビオチン化抗原と併用して、ストレプトアビジン被覆プレートを使用し得る。

【0039】

したがって本発明は、この診断方法を実施するためのアッセイシステムまたはキットを提供する。キットは、一般に、本発明に従った表面結合抗体がある支持体と、抗体と免疫原との結合を検出するレポーター標識抗体とを含む。

40

【0040】

本発明は、以下の実験の詳細を参照してより良く理解されるが、当業者は、これらが、その後続く特許請求の範囲でより詳しく説明される本発明を単に例証するものであることを容易に理解するであろう。さらに本出願全体を通じて、様々な刊行物が引用される。これらの刊行物の開示は、本発明に係る最先端技術をより詳しく説明するために、参照によって本出願の明細書に援用される。

【実施例】

50

## 【0041】

## 実験

## 材料と方法

## モノクローナル抗体の作成

2匹のBalb/cマウスを完全フロイントアジュバント中のH2N-C A I I G L M V G - C O O H (配列番号01)で初回刺激した。製造会社の使用説明書に従って、PierceのImject Maleimide Activated mc K L H / B S Aキット(Pierce、Rockford、IL)などの市販されるキットを使用して、COOH-末端システイン(cysteine)残基を介して、ペプチドをマレイミド活性化mc(鍵穴カサガイ(Megathura crenulata))K L Hに、またはマレイミド活性化ウシ血清アルブミンにカップリングして、免疫化のために準備した。マウスを、最初に完全フロイントアジュバント中の、引き続いて不完全フロイントアジュバント中の100µgまたは200µgのK L H共役ペプチドで、2週毎に追加免疫した。

10

## 【0042】

最高血清力価を示すマウスを融合のために選択した一方で、第2のマウスの脾臓を単離して液体窒素中で冷凍した。融合または脾臓抽出の4日前に、生理食塩水中のmc K L Hと共役する100µgのH2N-C A I I G L M V G - C O O Hで、全てのマウスに腹腔内追加免疫した。Kohler and Milstein(Eur. J. Immunol., 6, 292-295(1976))の変法によって、マウス脾臓細胞をSP2/0細胞と融合した。30×96ウェルプレート内にハイブリドーマを接種して、0.5µg/ウェルの非共役ペプチドAss1-37上の直接ELISA(AnaSpec, Fremont, USA)で、10日後にスクリーニングした。0.5µg/mlの被覆Ass1-37、Ass1-38、およびAss1-39ペプチド(AnaSpec, Fremont, USA)上で、陽性細胞を交差反応性について試験して、即座にサブクロニングした。陽性クローンを液体窒素中で冷凍した。

20

## 【0043】

全てのハイブリドーマは、10%ウシ胎仔血清(Hyclone, Europe)、Hybridoma Fusion Cloning Supplement(2%)(Roche, Brussels, Belgium)、2%HT(Sigma, USA)、1mMのナトリウムピルビン酸、2mMのLグルタミン、およびペニシリン(100U/ml)およびストレプトマイシン(50mg/ml)を添加した、ダルベッコ変法イーグル培地中で培養した。製品は全て、Life-Technologies(Paisley, U.K.)から市販され、購入された。細胞を加湿8%CO2空気インキュベーター内で培養した。

30

## 【0044】

## 抗体選択のための直接ELISA

抗Assx-37抗体の検出のために使用されたスクリーニングELISAは、50µl/ウェルの被覆緩衝液(10mMトリス、10mMのNaCl、および10mMのNaN3、pH8.5)中で、NUNC Maxisorp(Life Technologies)平底高結合型96ウェルマイクロタイタープレート内に4で一晚被覆させた、0.5µg/ml遊離ヒトAss1-37ペプチドによる、直接ELISAであった。翌日、プレートを75µl/ウェルのPBS中0.1%カゼインによって、室温で60分間被覆して、非特異的結合を低下させた。次に50µlのハイブリドーマ上清を添加して、37で1時間インキュベートした。洗浄後、50µl/ウェルの西洋ワサビペルオキシダーゼ共役ヒツジ抗マウスIgGによって、37、1時間で結合モノクローナル抗体を検出した(Amersham-Pharmacia Biotech)。双方の試薬を0.1%カゼイン/PBS中で希釈した。プレートを洗浄して、50µlの100mMクエン酸および100mMリン酸水素二ナトリウム中の0.42mMの3,5,3',5'-テトラメチル-ベンジジンおよび0.003%(vol/vol)のH2O2溶液(pH

40

50

4.3) を基質として添加した。プレート振盪機上で反応を室温で最大15分間進行させ、その後、50  $\mu$ l / ウェルの2 NH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で発色を停止させて、450 nmのマイクロタイタープレートリーダー (Thermomax, Molecular Devices) 上でプレートを読み取った。選択されたモノクローナル抗体と全長ヒト遊離Ass1-38およびAss1-39ペプチドとの交差反応性を、スクリーニングアッセイと同一の直接ELISAで試験した。

【0045】

選択性試験のためのサンドイッチELISA

ヒトA<sub>1-37</sub>、A<sub>1-38</sub>、A<sub>1-39</sub>、A<sub>1-40</sub>、およびA<sub>1-42</sub>標準物質を0.1 mg/mLでジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解して、-80 10  
で保存した。ELISAで使用するために、ペプチドをPBS中の0.1%カゼインで1 pg/mLにさらに希釈した。被覆緩衝液中の濃度1.5  $\mu$ g/mLのモノクローナル抗体で、96ウェルプレート(ハーフエリア黒色プレート、Costar)を4 で一晚被覆した。JRD/A<sub>37/3</sub>をA<sub>1-37</sub>の捕捉抗体として使用した。翌日、プレートをPBS中の0.1%カゼインで、室温で1~4時間洗浄してブロックした。HRPO標識二次抗体JRF/A<sub>N/25</sub>(全長ヒトA<sub>1-37</sub>ペプチドのN末端を特異的に認識する抗体(Mercken, M. et al., Neurobiol Aging 21, S41(2000))と共に、標準物質および未希釈サンプルを4 で一晚培養した。一晚のインキュベーション後プレートを洗浄し、製造会社の推奨事項に従って、Quanta 20  
blu基質(Pierce)でA<sub>1-37</sub>アッセイを発色させた。

【0046】

免疫プロット - A<sub>37</sub>モノクローナル抗体の特異性

5  $\mu$ gの各合成ペプチド(A<sub>1-37</sub>、A<sub>1-38</sub>、A<sub>1-39</sub>、A<sub>1-40</sub>、A<sub>1-42</sub>)をNuPAGE(登録商標)Novex(登録商標)ビス-トリス12%ゲル上に装填し、製造会社の使用説明書に従って、iBlotシステム(Invitrogen)の使用によって、ニトロセルロース膜上にプロットした。脱脂粉乳(NFDM)(5%w/v; Biorad)を含有する、トリス緩衝食塩水Tween-20(TBS-T; 1Mトリス、150mM NaCl、および0.05% Tween-20、pH 8.5)で膜を1時間ブロックし、TBS-T中で3回洗浄した。NFDM(5%w/v)含有TBS-Tで希釈された一次抗体(5  $\mu$ g/mL)と共に、4 で一晚インキュベ 30  
ーションした。West Dura(登録商標)増強化学発光(Pierce, Thermoscientific)によって、HRPO(TBS-T中の1:20000、Amersham Biosciences)共役ヒツジ抗マウスIgを使用して、一次抗体を検出した。Lumi-imaging system(Roche Diagnostic)によって、シグナルを捕捉した。

【0047】

一次抗体としてのJRD/A<sub>37/3</sub>で検出することにより、選択されたA<sub>37</sub>モノクローナル抗体と、ヒトA<sub>1-38</sub>、A<sub>1-39</sub>、A<sub>1-40</sub>、およびA<sub>1-42</sub>合成ペプチドとの交差反応性を評価した。JRF/A<sub>N/25</sub>モノクローナル抗体による検出を実施して、異なるペプチドの正しい装填を確認した。 40

【0048】

結果を図1に示す。レーンは次のように装填した。

【0049】

【表1】

1	2	3	4	5	6	7	8
Seeblu	MagicM	Ab37	Ab38	Ab39	Ab40	Ab42	MagicM

【0050】

10

20

30

40

50

イヌCSF中のA<sub>1-37</sub>の定量化

12匹のビーグル犬に、流動食と共にメトセル懸濁液中の2つのGSM化合物（国際公開第2011/006903パンフレットからのGSM A：化合物97およびGSM B：化合物157）の1つを経口投与した。処置に先だて、および投薬の4、8、24、および48時間後に、脳脊髄液（CSF）を採取した。流動食は、120mlの濃縮流動食（Convalescence support（登録商標）、1袋を112.5mlの温水に溶解した）であり、投薬は給餌直前に実施した。

## 【0051】

選択性試験のために、上述したような直接ELISA中で、JRD/A<sub>37/3</sub>によってイヌ中のA<sub>1-37</sub>レベルを定量化した。

## 【0052】

結果を図2に示す。

## 【0053】

サルCSF中のA<sub>1-37</sub>の定量化

大槽（cistern magna）カテーテルが外科的に埋め込まれた、7匹の幼若カニクイザル（Macaca fascicularis）をGSM E-2012の単回経口投与で処置した。処理に先だて（0時間）および投与後の複数の時点（0.5、1、2、4、6、8、12、16、24、48時間）で、脳脊髄液（CSF）および血液を採取した。動物を臨床徴候について毎日観察し、投薬に先だて体重を記録した。

## 【0054】

AlphaScreen（商標）法で、CSFサンプル中のA<sub>1-37</sub>レベルを定量化した。A<sub>1-37</sub>合成ペプチド標準物質を0.1mg/mlでDMSOに溶解して、-80で保存した。アッセイで使用するために、0.05% Tween-20添加PBS中の0.1%カゼインで、ペプチドを10pg/mlにさらに希釈した。製造会社の使用説明書に従って、非結合受容体ビーズ（Perkin Elmer, Little Chalfont, UK）をモノクローナル抗体と共役させた。A<sub>1-37</sub>アッセイで使用するために、抗体JRD/A<sub>37/3</sub>を受容体ビーズと共役させた。製造会社の使用説明書に従って、ChromaLink（商標）ビオチン354S（Soluliink Biosciences）を使用して、JRF/A<sub>N/25</sub>をビオチン化した。

## 【0055】

384ウェルOptiplate内で、共役結合受容体ビーズ（12.5μg/ml）およびJRF/A<sub>N/25</sub>ビオチン化抗体と共に、標準物質および予備希釈CSFサンプル（1/2希釈）を室温で1時間インキュベートした。引き続いて、ストレプトアビジン標識ドナービーズ（25μg/ml; Perkin Elmer）を反応混合物に添加した。室温で30分のインキュベーション後、Envisionマイクロタイタープレートリーダー（Perkin Elmer）上でプレートを読み取った。結果を図3に示す。

## 【0056】

図2および3で提示されるデータは、GSM処置をモニターするための薬力学マーカーとして、Ass1-37ペプチド定量化を使用し得ることを示す。

## 【0057】

ヒトCSF中のA<sub>1-37</sub>の定量化

MSD Sector装置SI6000およびMSDプロトタイプ4-plexプレートを使用して、A<sub>37</sub>、A<sub>38</sub>、A<sub>40</sub>、およびA<sub>42</sub>について、9人の健常対照、6人の神経学的対照、および9人のアルツハイマー病患者からのCSFサンプルをスクリーニングした。このアッセイでは、Abeta<sub>37</sub>（JRD/A<sub>37/3</sub>）、Abeta<sub>38</sub>（J&JPRD/A<sub>38/5</sub>）、Abeta<sub>40</sub>（JRF/cA<sub>40/28</sub>）、およびAbeta<sub>42</sub>（JRF/cA<sub>42/26</sub>）に対して特異的な精製モノクローナル抗体で、MSD 4-plexプレートを被覆して、スルホタグ標識JRF/A<sub>N/25</sub>抗体を検出抗体として使用した。MSDの電気化学発光検出技術を使用して、A

10

20

30

40

50

beta37、Abeta38、Abeta40、およびAbeta42の同時の特異的検出を実施した。スルホタグは、4-plexプレートの電極表面で開始される電気化学刺激時に、発光する。

【0058】

結果を表2および図4に示す。

【0059】

【表2】

		濃度 (pg/ml)			
	ID	Aβ37	Aβ38	Aβ40	Aβ42
健康対照	1	653,6501	1283,717	3847,112	501,2267
	2	660,4071	1503,224	4098,037	551,0089
	3	1166,451	2813,172	7749,327	1020,566
	4	728,8013	1487,931	3657,584	627,8834
	5	1321,41	2995,137	6976,366	1272,656
	6	1393,55	3783,929	8570,242	1803,956
	7	656,6728	1616,908	4245,79	712,2321
	8	1114,129	3020,726	7984,909	1001,475
	9	1098,714	2902,689	7981,896	1023,682
神経学的対照	1	724,738	1874,41	5627,762	556,9327
	2	904,0785	2054,187	5856,235	482,1726
	3	655,5548	1556,124	4315,03	456,8318
	4	1080,013	2368,43	6188,724	1083,708
	5	865,9594	1581,803	3903,329	395,0011
	6	534,8445	1242,524	3292,696	324,8352
AD患者	1	476,4525	1140,943	3360,445	289,5164
	2	936,4183	2345,013	5535,373	319,7071
	3	670,7609	1657,716	4997,462	360,6308
	4	957,4371	2192,229	6581,381	396,8105
	5	929,3731	2079,159	5554,406	344,065
	6	932,241	1782,768	5348,286	572,7802
	7	1474,76	3211,914	8343,712	743,708
	8	481,5436	1315,199	3112,098	267,7054
	9	907,7838	2224,667	5631,433	502,2027

表1

【0060】

A 断片の相対量間で、平均比を計算し得る。結果を表3および図5に示す。

【0061】

【表 3】

	比率 (平均值)					
	Aβ38/Aβ40	Aβ40/Aβ42	Aβ38/Aβ42	Aβ37/Aβ38	Aβ37/Aβ40	Aβ37/Aβ42
健常对照	0,3849	6,7217	2,5543	0,4240	0,1627	1,0805
神经学的对照	0,3683	9,5708	3,5079	0,4470	0,1656	1,5745
AD 患者	0,3709	13,2114	4,9127	0,4291	0,1583	2,0851

表 2

【图 1】

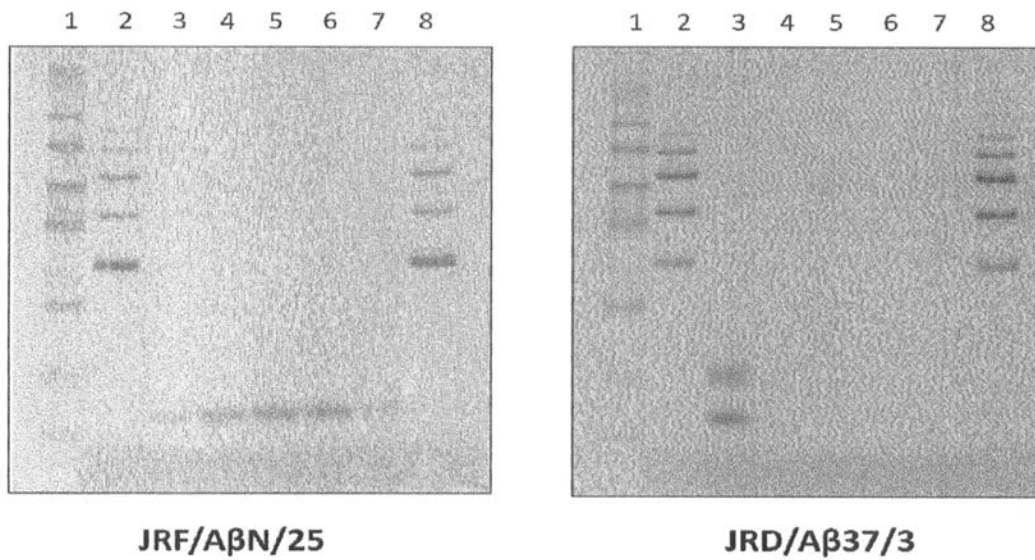


Fig. 1

【 図 2 】

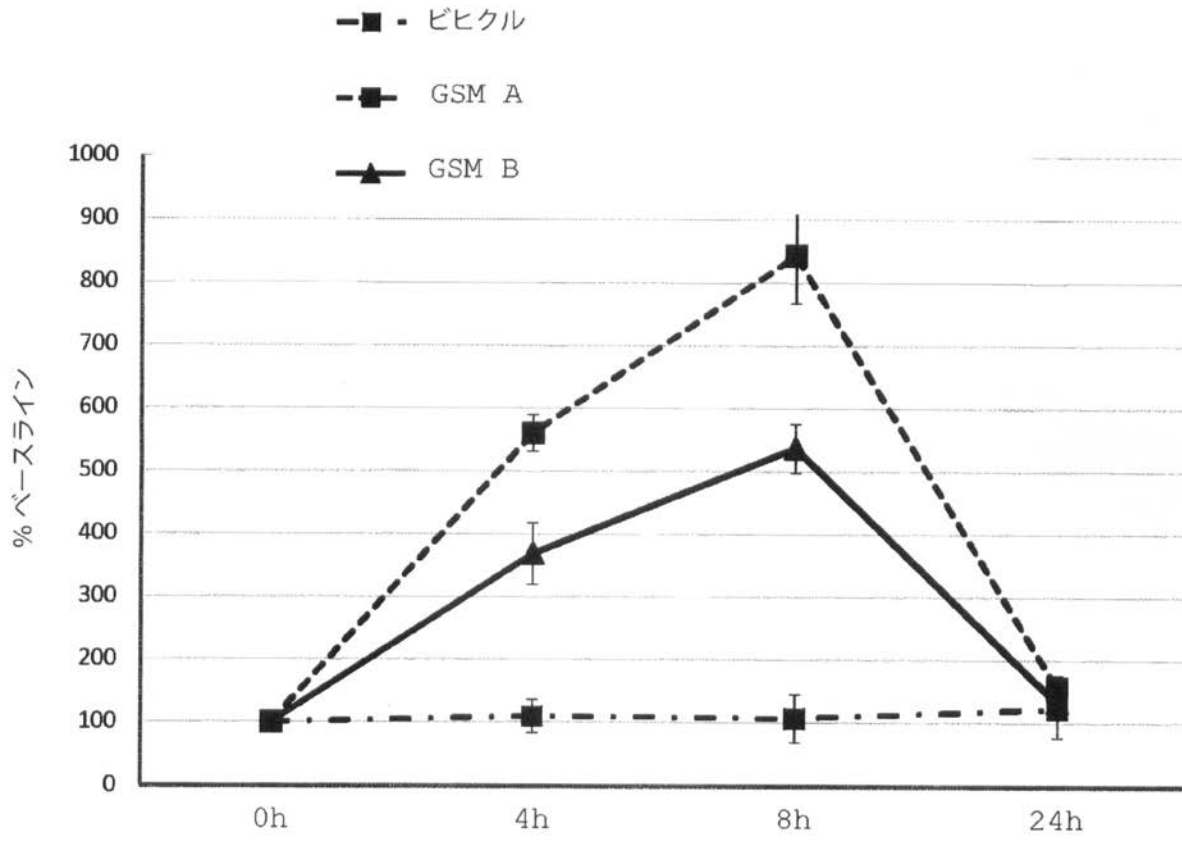


図 2

【 図 3 】

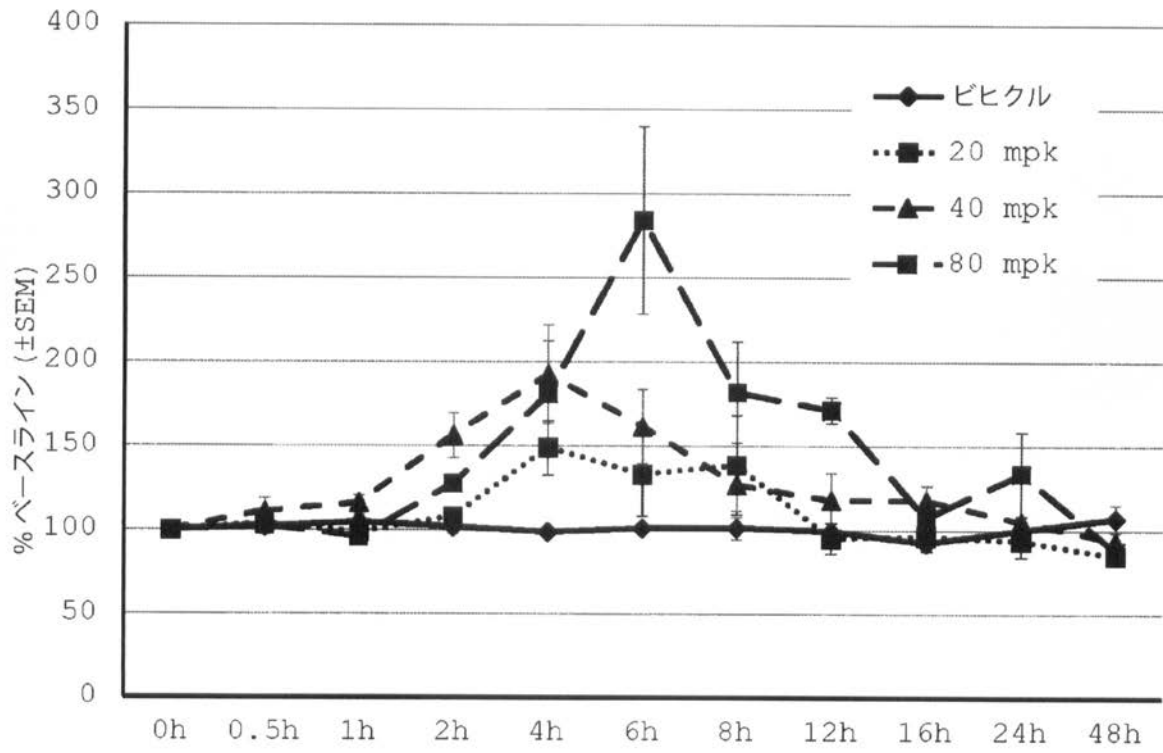


図 3

【 図 4 】

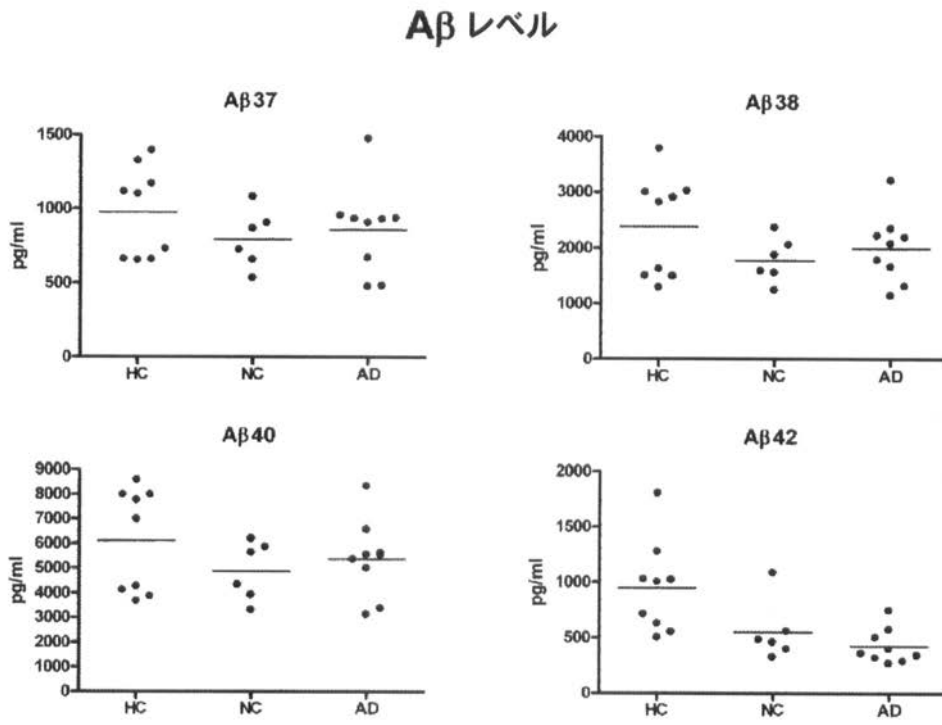


図 4

【 図 5 】

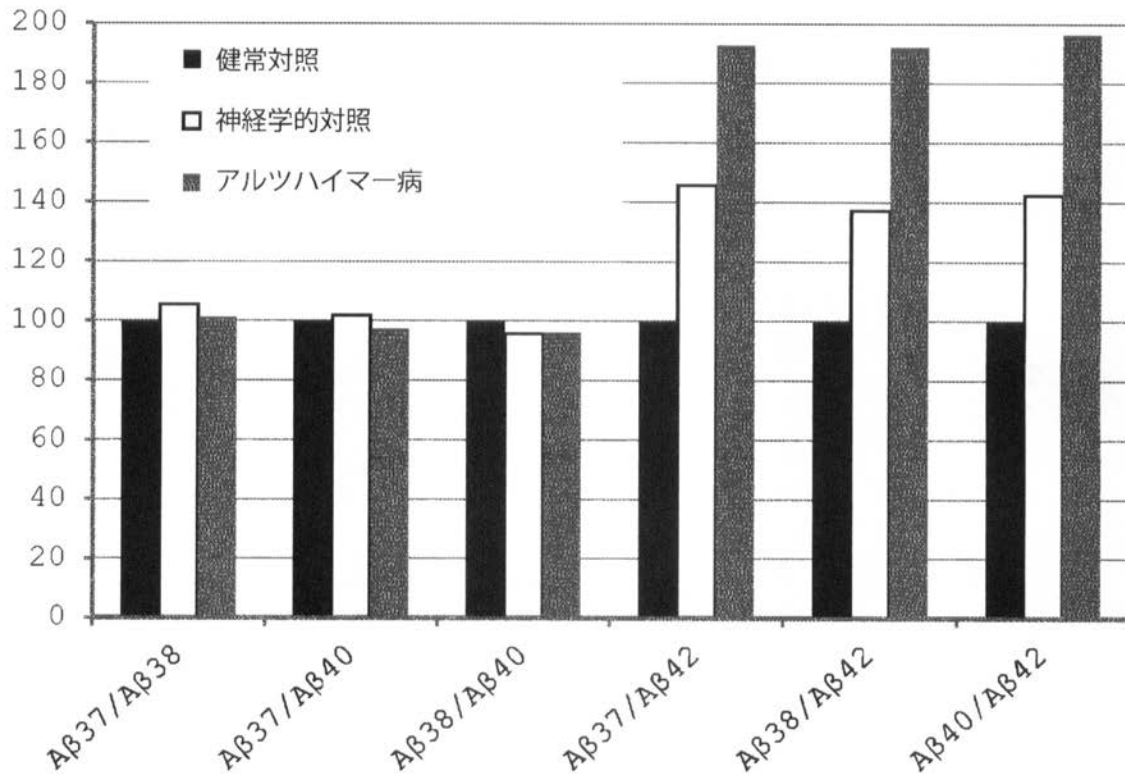


図 5

【 配 列 表 】

[2014520825000001.app](#)

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2012/063213
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C07K16/18 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K		
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) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EL MOUEDDEN M ET AL: "Development of a specific ELISA for the quantitative study of amino-terminally truncated beta-amyloid peptides", JOURNAL OF NEUROSCIENCE METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHER B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 145, no. 1-2, 30 June 2005 (2005-06-30), pages 97-105, XP004910337, ISSN: 0165-0270, DOI: 10.1016/J.JNEUMETH.2004.12.001 the whole document ----- -/--	1-12
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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 "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		Date of mailing of the international search report
16 October 2012		03/12/2012
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Kalsner, Inge

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2012/063213
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>HOGLUND K ET AL: "Prediction of Alzheimer's disease using a cerebrospinal fluid pattern of C-terminally truncated beta-amyloid peptides", NEURODEGENERATIVE DISEASES, KARGER AG, BASEL, CH, vol. 5, no. 5, 2008, pages 268-276, XP009154325, ISSN: 1660-2854 the whole document</p> <p>-----</p>	1-12
A	<p>WILTFANG J ET AL: "Highly conserved and disease-specific patterns of carboxyterminally truncated Abeta peptides 1-37/38/39 in addition to 1-40/42 in Alzheimer's disease and in patients with chronic neuroinflammation", JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY, WILEY INTERSCIENCE, NEW YORK, NY, US, vol. 81, no. 3, 1 May 2002 (2002-05-01), pages 481-496, XP002398797, ISSN: 0022-3042, DOI: 10.1046/J.1471-4159.2002.00818.X the whole document</p> <p>-----</p>	1-12
A	<p>SAIDO TAKAOMI C ET AL: "Amino- and carboxyl-terminal heterogeneity of beta-amyloid peptides deposited in human brain", NEUROSCIENCE LETTERS, LIMERICK, IE, vol. 215, no. 3, 1 January 1996 (1996-01-01), pages 173-176, XP002236342, ISSN: 0304-3940, DOI: 10.1016/0304-3940(96)12970-0 the whole document</p> <p>-----</p>	1-12
A,P	<p>H. SCHIEB ET AL: "-Amyloid Peptide Variants in Brains and Cerebrospinal Fluid from Amyloid Precursor Protein (APP) Transgenic Mice: COMPARISON WITH HUMAN ALZHEIMER AMYLOID", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 286, no. 39, 30 September 2011 (2011-09-30), pages 33747-33758, XP055012867, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M111.246561 the whole document</p> <p>-----</p>	1-12

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA

(72)発明者 ボージャーズ, マリアンヌ

ベルギー王国 バーレン ビー - 2 4 9 0 , ウォーターストラート 1 9

(72)発明者 ヴァンデルメーレン, マーク マリア ピエール ペラジエ

ベルギー王国 ベーアセ ビー - 2 3 4 0 , トゥルンハウゼウエグ 3 0 , ヤンセン ファーマシ  
ユーティカ エヌ . ベー . 内

(72)発明者 ヴァン プロエック, ビアンカ ジュリア ジェイ

ベルギー王国 ベーアセ ビー - 2 3 4 0 , トゥルンハウゼウエグ 3 0 , ヤンセン ファーマシ  
ユーティカ エヌ . ベー . 内

Fターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA13

4H045 AA11 AA30 BA09 CA40 CA45 DA76 EA50 FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2014520825A5</a>	公开(公告)日	2016-12-01
申请号	JP2014519503	申请日	2012-07-06
[标]申请(专利权)人(译)	詹森药业有限公司		
申请(专利权)人(译)	扬森制药, 锡卡NV.基地.		
[标]发明人	マーケンマークヒューバート ボージャーズマリアンヌ ヴァンデルメーレンマークマリアピエールペラジエ ヴァンプロエックピアンカジュリアジェイ		
发明人	マーケン,マーク ヒューバート ボージャーズ,マリアンヌ ヴァンデルメーレン,マーク マリア ピエール ペラジエ ヴァン プロエック,ピアンカ ジュリア ジェイ		
IPC分类号	C07K16/18 C12P21/08 G01N33/53 G01N33/536		
CPC分类号	G01N33/577 C07K16/18		
FI分类号	C07K16/18.ZNA C12P21/08 G01N33/53.D G01N33/536.B		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA09 4H045/CA40 4H045/CA45 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	小林 浩 铃木康仁		
优先权	2011174224 2011-07-15 EP		
其他公开文献	JP2014520825A		

#### 摘要(译)

本发明提供了特异性识别在 $\gamma$ -分泌酶介导的APP蛋白切割后获得的较短A $\beta$ 肽的单克隆抗体, 即A $\beta$ -肽片段A $\beta$ 1-37, A $\beta$ 3-37, A $\beta$ 3p-37, A $\beta$ 1-37和A $\beta$ 11p-37, 以及在APP的第37个氨基酸处结束的其他类似片段, 下文也称为A $\beta$ x-37肽。它进一步提供产生单克隆抗体的杂交瘤细胞以及产生抗体和杂交瘤细胞的方法;和通过竞争方法或使用本发明的抗体的夹心法对A $\beta$ x-37肽进行免疫测定;和测量样品中A $\beta$ x-37肽水平的方法, 例如生物样品。