

(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2006-513988

(P2006-513988A)

(43) 公表日 平成18年4月27日(2006.4.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/18 (2006.01)	C O 7 K 16/18 Z N A	4 B O 2 4
G01N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 D	4 B O 6 4
C12N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 B	4 B O 6 5
A61K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	4 C O 8 5
A61P 9/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 Y	4 H O 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 40 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2004-538886 (P2004-538886)	(71) 出願人	390033008
(86) (22) 出願日	平成15年9月9日 (2003.9.9)		ジヤンセン・ファーマシューチカ・ナーム
(85) 翻訳文提出日	平成17年3月23日 (2005.3.23)		ローゼ・フエンノートシャツプ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2003/010092		JANSSEN PHARMACEUT I
(87) 国際公開番号	W02004/029630		CA NAAMLOZE VENNOOT
(87) 国際公開日	平成16年4月8日 (2004.4.8)		SCHAP
(31) 優先権主張番号	PCT/EP02/11062		ベルギー・ビー-2340-ビールセ・ト
(32) 優先日	平成14年9月27日 (2002.9.27)		ウルンホウトセベーク30
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100060782
			弁理士 小田島 平吉
		(72) 発明者	メルケン, マルク・フベルト
			ベルギー・ビー-2340-ビールセ・トウ
			ルンホウトセベーク30・ジヤンセン・フ
			アーマシューチカ・ナームローゼ・フエン
			ノートシャツプ
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 N-11 短縮化アミロイド-ベータモノクローナル抗体、組成物、方法および使用

(57) 【要約】

本発明は、少なくともヒトアミロイド-ベータ11N末端部位、すなわちA 11-xペプチドに特異的な抗体に関し、特定された部分またはバリエーションを含む。さらに本発明は治療用製剤、投与およびデバイスを含む該抗体の作成および使用法を提供する。

J&JPRD/hAβ11/1 C1/6.1

β11 stub

β1 stub
β11 stub

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

A 11-x 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】

- セクレターゼ__11 切断部位の最初の 5～7 個のヒトのアミノ酸、すなわち配列番号 1 および配列番号 2、または - セクレターゼ__11 切断部位の最初の 5～7 個のマウスのアミノ酸、すなわち配列番号 3 および配列番号 4 を免疫原として特異的に認識する、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た請求項 1 または 2 に記載の抗体。

10

【請求項 4】

検出可能な標識が、放射性標識、酵素標識、発光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】

担体に固定化されている、請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 6】

2002 年 8 月 19 日にベルギーの細菌のカルチャーコレクションに寄託番号 LMBP 5896CB および LMBP 5897CB でそれぞれ寄託されたハイブリドーマ細胞 J & JPRD/hA 11/1 および J & JPRD/hA 11/2 により発現される、請求項 1 ないし 5 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体。

20

【請求項 7】

2002 年 8 月 19 日にベルギーの細菌のカルチャーコレクションに寄託番号 LMBP 5896CB および LMBP 5897CB でそれぞれ寄託されたハイブリドーマ細胞 J & JPRD/hA 11/1 および J & JPRD/hA 11/2。

【請求項 8】

サンプル中の A 11-x ペプチドを測定または検出するためのイムノアッセイ法であって、サンプルを請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載の A 11-x ペプチドに対する抗体と接触させ、そして免疫複合体が抗体と A 11-x ペプチドとの間に形成されるかどうかを決定することを含んでなる上記方法。

【請求項 9】

組織サンプル中に A 11-x ペプチドの存在を検出する方法であって：
個体の身体から組織サンプルを得；
組織サンプルを造影に有効な量の検出可能に標識された請求項 3 または 4 に記載の抗体と接触させ；そして
標識を検出して組織サンプル中の A 11-x ペプチドの存在を確立する、
ことを含んでなる上記方法。

30

【請求項 10】

検出可能に標識された抗体が請求項 7 に記載の少なくとも 1 つのハイブリドーマ細胞により発現される、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

体液サンプル中に A 11-x ペプチドの存在を検出する方法であって：
個体の身体から体液サンプルを得；
体液サンプルを造影に有効な量の検出可能に標識された請求項 3 または 4 に記載の抗体と接触させ；そして
標識を検出して体液サンプル中の A 11-x ペプチドの存在を確立する、
ことを含んでなる上記方法。

40

【請求項 12】

検出可能に標識された抗体が請求項 7 に記載の少なくとも 1 つのハイブリドーマ細胞により発現される、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】

50

請求項 9 または 10 に記載の方法における請求項 1 ないし 6 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体の使用。

【請求項 14】

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

【請求項 15】

請求項 1 ないし 6 のいずれかに記載の抗体および製薬学的に許容され得る担体を含んでなる診断用組成物。

【請求項 16】

請求項 2 ないし 5 のいずれかに記載の抗体および抗体の担体手段を含んでなる、 - アミロイド関連疾患を診断するためのイムノアッセイキット。 10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、少なくともヒトのアミロイド - ベータ₁₋₄₂ - 末端部位、すなわち Aβ₁₋₄₂ ペプチドに特異的な抗体、その特定部分またはパリアントに関する。さらに治療用製剤、投与およびデバイスを含む該抗体の作成および使用法を提供する。

【背景技術】

【0002】

本発明の背景

本発明は一般に - 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リングするための方法および組成物に関する。より詳細には本発明はアルツハイマー病および他のペータ - アミロイド関連疾患の診断、予後および治療に対する応答をモニタリングするためのそのような方法および組成物の使用、ならびにアルツハイマー病および他のペータ - アミロイド関連疾患の処置法として、受動免疫において開示された抗体の使用に関する。 20

【0003】

アルツハイマー病 (AD) は、次第に深い精神的衰退、そして最終的には死を導く記憶、認知、推理、判断および感情的安定性の進行的喪失を臨床的な特徴とする変性的脳障害である。AD は老人の進行的な精神機能不全 (痴呆) の大変よくある原因であり、そして米国では 4 番目に多い死亡の医学的原因を表すと考えられている。AD は世界中の種および民族群で観察され、そして現在および将来の主たる公衆衛生の問題を提示する。この疾患には現在、米国だけで約 2 ~ 3 百万人の個体が罹患していると予想される。AD は現時点では治療できない。AD を効果的に防止する、またはその症状および過程を逆転する処置は現在、知られていない。 30

【0004】

AD 個体の脳は、老人性 (またはアミロイド) 斑、アミロイド血管障害 (血管のアミロイド沈着) および神経原線維変化 (neurofibrillary tangle) と名付けられた特徴的損傷を表す。これら損傷の大多数、特にアミロイド斑および神経原線維変化は、一般に AD 患者の記憶および認知機能に重要なヒトの脳の幾つかの領域で見いだされる。より限定された解剖学的分布では、より少ない数のこれら損傷が臨床的には AD ではない最高齢のヒトの脳でも見いだされる。アミロイド斑およびアミロイド血管障害は、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のアミロイドーシスがある遺伝性脳出血 (HCHWA-D) の個体の能でも特徴的である。 40

【0005】

アミロイド斑の主成分は、 - アミロイド前駆体タンパク質 (APP) の切断により生成される種々のアミロイド - ベータ (Aβ) ペプチドである。過去には斑およびもつれ (tangle) が原因であるのか、またはアルツハイマー病の結果であるのかについて重要な科学的論争があったが、現在の知見はアミロイド斑が原因となる前駆体または因子であることを示す。特に Aβ ペプチドの生成はアミロイド前駆体タンパク質 (正常にプロセ 50

ッシングされた時、A ペプチドを生成しないタンパク質)をコードする遺伝子の突然変異から生じ得ることが見いだされた。家族性、若年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中の突然変異の同定は、アミロイド代謝がこの疾患の基にある病理プロセスの中心的出来事である強力な証拠である。現在、APPタンパク質の正常(非病原性)なプロセッシングは、タンパク質内のA ペプチド領域のアミノ酸16と17との間を切断する「アルファ-セクレターゼ」による切断を介して起こると考えられている。さらに病原性プロセッシングの一部は、前駆体タンパク質内のA ペプチド領域のアミノ末端で切断する「ベータ-セクレターゼ」を介しても起こると考えられている。

【0006】

最近、BACE-1がAPPの+1部位での切断に必要な主要な-セクレターゼであり、そしてBACE-1の過剰発現はA の+11部位でのさらなる切断をもたらし、より短いA 11-40およびA 11-42断片(今後A 11-xペプチドと言う)を生成することが示された。これらのA ペプチドはラットの初代ニューロン細胞培養のコンディショニングした培地中およびマウスN2a細胞で検出され、それらがニューロンで生成される正常なAPP切断産物であることを示唆している(非特許文献、1、2、3)。重要なことは、より短いこれらのA 断片が主な種のAD脳および正常な加齢した脳でも生化学的分析により(非特許文献4)、ならびにAD病のダウン症候群の脳でも免疫組織化学的実験で(非特許文献5)同定された点である。この出来事はアルツハイマー病の病因におけるA 11-40/42の役割、特にGlu11から始まるA 種がA の1位で始まるものよりも不溶性であることを示す事実の点から再評価を要する。

【0007】

ADおよび他のA -関連疾患の基にあるメカニズムを理解するためになされた進歩にもかかわらず、疾患(1つまたは複数)を診断および処置するための方法および組成物を開発する必要性が存在する。すなわちアミロイド前駆体タンパク質の細胞性プロセッシングをモニタリングする能力は、アルツハイマー病の診断、予後および治療的管理に重要な価値があるだろう。特に血清、脳脊髄液(CSF)等のような容易に得られる患者のサンプル中に検出可能な診断マーカーをスクリーニングし、そして評価するための侵襲性が最も少なく反復可能な手順を同定することが望ましい。非特許文献6に記載されているようなポリクローナル抗体は、生物サンプル中の種々のA ペプチドを検出するために有用であるが、各バッチのポリクローナル抗体は異なるという事実を仮定すると、これらの抗体は容易に得られる患者のサンプル中に、検出可能な診断マーカーをスクリーニングし、そして評価するための再現性のある手順を行うための道具を提供しない。さらにポリクローナル抗体を使用した非特異的結合は典型により高く、そしてウエスタンブロッティングにおける精度は典型的にはより低い。

【0008】

アルツハイマー病に関して多数の有力な診断マーカーが提案されてきた。中でも本発明で特に興味深いのは、APPタンパク質のベータ-セクレターゼ切断後に得られるA 前駆体タンパク質のより短いカルボキシ末端断片である。これらのマーカーはそれら自体で、および/または他の診断マーカーおよび手順と組み合わせて有用である。好ましくは診断マーカーは、CSF、血液、血漿、血清、尿のような体液中、組織等で検出できるので、侵襲性が最少な診断手順を利用することができる。

【0009】

A 11-x検出用の特異的アッセイは、再現性があり、しかも一貫した様式で流体サンプル中のA 11-xを大変低濃度で検出でき、ならびにA 11-xペプチドとサンプル中に存在し得るAPPの他の断片とを識別できるべきである。

【0010】

本発明のこれらのおよび他の観点を本明細書により詳細に記載する。

[参考文献]

【0011】

【非特許文献1】Gouras, G. K., et al., J. Neurochem.,

10

20

30

40

50

71 (1998) 1920 - 1925

【非特許文献2】Wang, R., et al., J. Biol. Chem., 271 (1996) 31894 - 31902

【非特許文献3】Vandermeeren, M., et al., Neurosci. Lett. 315 (2001) 145 - 148

【非特許文献4】Naslund, J., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91 (1994) 8378 - 8382

【非特許文献5】Iwastubo, T., et al., Am. J. Pathol. 149 (1996) 1823 - 1830

【非特許文献6】Said T. C., et al., Neuroscience Letters 215 (1996), 173 - 176 10

【発明の開示】

【0012】

発明の要約

本発明は、Glu11でBACE-1により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Aペプチド断片A11-40およびA11-42（今後A11-xペプチドとも言う）を特異的に認識するモノクローナル抗体を提供する。本発明はさらにモノクローナル抗体を生産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の生産法；および抗体を使用した競合法またはサンドイッチ法によるAペプチドのイムノアッセイを提供する。 20

【0013】

特に本発明は、免疫原として - セクレターゼ__11切断部位の最初の5～7個のヒトのアミノ酸、すなわちEVHHQ-C（ヒトA__11（6AA）-配列番号1）およびEVHHQKI-C（ヒトA__11（8AA）-配列番号2）を使用して、あるいは - セクレターゼ__11切断部位の最初の5～7個のマウスのアミノ酸、すなわちEVRHQ-C（マウスA__11（6AA）-配列番号3）およびEVRHQKI-C（マウスA__11（8AA）-配列番号4）を使用して調製されるモノクローナル抗体を提供する。該抗体は他のAPP断片との交差反応性無しに、A11-x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病因におけるA11-xの役割を究明するイムノアッセイにおいて有用である。 30

【0014】

より具体的な態様では、モノクローナル抗体はヒトA__11（6AA）免疫原に対して反応性であり、そして2002年8月19日にベルギーの細菌のカルチャーコレクションに寄託番号LMBP5896CBおよびLMBP5897CBでそれぞれ寄託されたハイブリドーマ細胞J&JPRD/hA11/1およびJ&JPRD/hA11/2により発現される。このように本発明のモノクローナル抗体を発現する前記ハイブリドーマ細胞を提供することは本発明のさらなる態様である。

【0015】

本発明のさらなる観点では、本発明の抗体は、 - アミロイド関連疾患をモニタリング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リングするための細胞培養に由来するコンディショニングした培地を含め、存在し得る場合はどこでもA11-xペプチドを検出するための通例の免疫学的技術に使用される。適切な免疫学的技術は当業者には周知であり、そして例えばELISA、ウエスタンブロット分析、競合またはサンドイッチイムノアッセイ等を含み、免疫学的技法はすべて抗原-抗体免疫複合体の形成に依存することは周知であるので、ここでアッセイの目的に、抗体は例えば放射性、酵素または蛍光標識で検出可能に標識されることができ、あるいは抗体は不溶性担体に固定化されることができる。 40

【0016】

また本発明はアルツハイマー病、ダウン症候群、HCHWA-D、脳のアミロイド血管障害または他の - アミロイド関連疾患を処置、防止または反転させるために；臨床的ま 50

たは未だ病状が現れていないアルツハイマー病、ダウン症候群、H C H W A - D または脳のアミロイド血管障害における認知低下を処置、防止または反転させるために；あるいはヒトにおけるアミロイド斑の形成または毒性の可溶性 A 種の効果を抑制するための薬剤の製造に本発明のヒト化抗体の使用も含む。

詳細な説明

本発明は、G l u 1 1 で B A C E - 1 による A P P タンパク質の切断後に得られる、より短い A 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 の - セクレターゼ__1 1 切断部位の最初の 5 ~ 7 個のアミノ酸上、またはマウス A の - セクレターゼ__1 1 切断部位の最初の 5 ~ 7 個のアミノ酸上に存在する 1 以上のエピトープに対して特異性を有する。

10

【0017】

特に本発明は、免疫原として - セクレターゼ__1 1 切断部位の最初の 5 ~ 7 個のヒトのアミノ酸、すなわち E V H H Q - C (ヒト A __1 1 (6 A A) - 配列番号 1) および E V H H Q K I - C (ヒト A __1 1 (8 A A) - 配列番号 2) を使用して、あるいは - セクレターゼ__1 1 切断部位の最初の 5 ~ 7 個のマウスのアミノ酸、すなわち E V R H Q - C (マウス A __1 1 (6 A A) - 配列番号 3) および E V R H Q K I - C (マウス A __1 1 (8 A A) - 配列番号 4) からなるペプチドを使用して調製されるモノクローナル抗体を提供する。

【0018】

前記ペプチドは、アミノ酸が成長している鎖に順次加えられる周知なメリフィールド固相合成技術 (M e r r i f i e l d (1963)、J . A m . C h e m . S o c . 85 : 2149 - 2136) のような当該技術分野で知られている方法により調製生成することができる。アミノ酸配列は上で説明した A 断片の配列に基づくものでよく、または自然に存在するか、もしくは操作した変異体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それ自体を使用することができ、または適切な免疫を活性化する天然もしくは合成の担体、例えばウシ、ウサギおよびヒトのような哺乳動物のマレイミド活性化血清アルブミン、およびウシ、ウサギ、ヒトおよびヤギのような哺乳動物のチログロブリン、および鍵穴カサガイヘモシアニン (K L H)、または他の適当なタンパク質担体、例えばスチレンポリマー、アクリル酸ポリマー、ビニルポリマーおよびプロピレンポリマーを含む合成ポリマー担体に結合することかできる。免疫感作の詳細な説明は実施例に見いだすことができる。

20

30

【0019】

いったん十分量の免疫原が得られれば、A 1 1 - x ペプチドに特異的なポリクローナル抗体は、インビトロまたはインビボの技術を含む技術を使用した様々な方法で生産することができる。インビトロの技術には、免疫原に対するリンパ球の暴露が関与し、一方、インビボの技術には免疫原の適当な脊椎動物宿主への注射が必要である。適当な脊椎動物宿主は非ヒトであり、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ヤギ等を含む。免疫原は予め定めたスケジュールに従い動物に注射され、そして動物は周期的に採血され、向上した力価および特異性を有する連続的な出血を得る。注射は筋肉内、腹腔内、皮下等に行うことができ、そして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のようなアジュバントを抗体生産能を高めるために与えてもよい。血清力価レベルをスクリーニングする方法には、典型的には標準的な 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、A 1 1 - x ペプチドもしくは担体 (B S A のような) にカップリングした A 1 1 - x ペプチドのいずれかをコーティングした固相 (例えばマイクロプレートの底) に血清を加え、次いで検出可能な標識、例えば酵素、好ましくは西洋ワサビペルオキシダーゼもしくは放射性同位体、例えば¹²⁵I に結合した抗 - 免疫グロブリン抗体 (例えば免疫感作がマウスで行われる時、抗 - マウス免疫グロブリン抗体、例えばヒツジ - 抗マウス免疫グロブリン (I g) を使用する) を加える。

40

【0020】

所望により、モノクローナル抗体は当業者により十分理解されている技術を使用して、

50

ちょうど記載した方法により所望する免疫原で超免疫化したマウスのような脊椎動物宿主から調製することができる。都合よく高力価抗体を示す脊椎動物宿主を、所望の免疫原で免疫感作した動物から選択する。典型的には最終免疫感作から2～5日、好ましくは4日後に、脾臓またはリンパ節をそれらから集め、そして中に含まれる抗体生産細胞を不死化する。不死化の様式は重要ではない。現在、最も多い技術はミエローマ細胞融合パートナーとの融合である。融合手順は当該技術分野で既知の方法、例えばKohler and Milsteinの方法(Nature, 256, 495-497(1975))に従い行うことができる。他の技術にはEBV形質転換、裸のDNA、例えば癌遺伝子、レトロウイルス等を用いた形質転換、または細胞株の安定な維持およびモノクローナル抗体の生産を提供する任意の他の方法を含む。ポリエチレングリコール(PEG)およびセンダイウイルスを含む融合促進物質も使用することができる。特にPEGが好ましく使用される。ミエローマ細胞の例には、NS-1、P3U1、SP2/0およびAP-1を含み、SP2/0細胞が好ましく使用される。

10

20

30

40

50

【0021】

ヒトA₁₁の-セクレターゼ__11切断部位の最初の5～7個のアミノ酸上、またはマウスA₁₁の-セクレターゼ__11切断部位の最初の5～7個のアミノ酸上に見いだされるエピトープに対して特異的なモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマは、最初に例えばBalb/cマウスのようなハイブリドーマを生産できる動物を、フロイントアジュバント中の所望する免疫原の初回腹腔内注射により免疫感作し、続いて2週間毎に追加免疫注射することにより最も効果的に生産される。引き続き単離した脾臓の融合は、当業者により一般的に知られている技術、好ましくはSP2/0細胞を使用して、Kohler and Milsteinの改良手順(Eur. J. Immunol., 6, 292-295(1976))により行うことができる。どれがA₁₁-xペプチドに特異的な抗体を生産しているかを決定するためのハイブリドーマのスクリーニングは、標準的なELISAまたはRIAアッセイのいずれかで今までに記載したように行うことができる。所望のモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマの選択および育種は通常、10～20%のウシ胎児血清および例えばHAT(ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジン)、またはESGハイブリドーマサプリメントのような他の成分を補充した動物に関する培地(例えばダルベッコの改良イーグル培地(DMEM)またはイーグルの最少必須培地(MEM))中で行う。したがって本発明の1つの態様は、2002年8月19日にベルギーの細菌のカルチャーコレクションに寄託番号LMBP5896CBおよびLMBP5897CBでそれぞれ寄託されたハイブリドーマ細胞J&JPRD/hA₁₁/1およびJ&JPRD/hA₁₁/2を提供する。

【0022】

抗-A₁₁-xモノクローナル抗体の選択および精製は、塩沈殿、アルコール沈殿、等電点沈殿、電気泳動、イオン交換物質(例えばDEAE)での吸着および脱着、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もしくはプロテインGアフィニティクロマトグラフィーを含む特異的なイムノアフィニティ分離技術のようなポリクローナル抗体の通常分離および精製に順じて行う。適当なタンパク質精製技術は、Methods in Enzymology, Vol. 182, Deutcher, ed., アカデミック出版社、サンディエゴ, 1990に記載され、この開示は引用により本明細書に編入する。

【0023】

このように本発明の目的は前記ハイブリドーマ細胞により発現される単離されたモノクローナル抗体を提供することであり、該抗体はA₁₁-xペプチドを特異的に認識することができる。好ましくはこれらの単離されたモノクローナル抗体は、2002年8月19日にベルギーの細菌のカルチャーコレクションに寄託番号LMBP5896CBおよびLMBP5897CBでそれぞれ寄託されたハイブリドーマ細胞J&JPRD/hA₁₁/1およびJ&JPRD/hA₁₁/2により発現される。

【0024】

本発明の抗体は、 - アミロイド関連疾患をモニタリングするための生物学的サンプル、およびA P Pの細胞内プロセッシングをモニタリングするための細胞培養から得たコンディショニングした培地を含め、存在する場合はどこでもA 1 1 - xペプチドを検出するために通例の免疫学的技術で使用される。適当な免疫学的技術は当業者には周知であり、そして例えばE L I S A、ウエスタンブロット分析、競合もしくはサンドイッチイムノアッセイ等を含み、免疫学的技術はすべて抗原 - 抗体免疫複合体の形成に依存することは周知であるので、ここでアッセイの目的に、抗体は例えば放射性、酵素、発光または蛍光標識で検出可能に標識されることができ、あるいは抗体は不溶性担体に固定化されることができる。このように本発明の目的はサンプル中のA 1 1 - xペプチドの測定または検出のためのイムノアッセイを提供することであり、この方法はサンプルをA 1 1 - xペプチドに対する抗体と本発明に従い接触させ、そして抗体とA 1 1 - xペプチドとの間に免疫複合体が形成されるかどうかを決定することを含んでなる。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で行うことができ、そして一般に個体の身体に由来するサンプルを得；該サンプルを造影に有効量の検出可能に標識された抗体と本発明に従い接触させ；そして標識を検出してサンプル中のA 1 1 - xペプチドの存在を確立することを含んでなる。

【0025】

本発明の抗体を使用した測定法は、特に限定されない。抗原の量、特に測定される溶液中のA 1 1 - x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り検出され、そして既知の量の抗原を含有する標準溶液の使用により調製された標準曲線から算出される限り任意の測定法を使用することができる。例えば比濁法、競合法、免疫測定法およびサンドイッチ法が適当に使用される。感度および特異性に関して、以下に記載するサンドイッチ法を使用することが特に好ましい。

【0026】

標識物質を使用する測定法では、放射性同位体、酵素、蛍光物質、発光物質等が標識剤として使用される。放射性同位体の例には、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^3H および ^{14}C を含む。酵素は通常、次いで検出可能な反応を触媒する適切な基質との結合により検出可能とされる。それらの例には例えばベータ - ガラクトシダーゼ、ベータ - 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マレイン酸デヒドロゲナーゼ、好ましくは西洋ワサビペルオキシダーゼを含む。発光物質には例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、エクオールおよびルシフェラーゼを含む。さらにアビジン - ビオチン系も、本発明の抗体および免疫原を標識するために使用することができる。

【0027】

免疫原または抗体が不溶性である時、通常、タンパク質または酵素の不溶化または固定化に使用する物理的吸着または化学的結合のいずれかを使用することができる。担体の例にはアガロース、デキストランおよびセルロースのような不溶性多糖、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のような合成樹脂、およびガラスを含む。

【0028】

サンドイッチ法では、試験溶液を不溶化した抗 - A 1 1 - xペプチド抗体（第1反応）と反応させ、さらに標識した抗 - A 1 1 - xペプチド抗体と反応させ（第2反応）、そして次に不溶化担体中の標識剤の活性をアッセイし、これにより試験溶液中のA 1 1 - xペプチドの量を決定することができる。第1反応および第2反応は、同時または順次に行うことができる。

【0029】

- アミロイド関連疾患を診断するためのさらなる態様では、組織、体液、例えばCSF、血液、血漿、血清、尿等を含む生物学的サンプルが含まれ、そして適当量の第1抗体と接触させて免疫複合体を形成する。接触には典型的にはサンプルを、第1抗体でコーティングした固体マトリックスに加えることを含む。サンプルと第1抗体との接触から生成した複合体は、溶出によりサンプルから分離する。しかし他の回収法を使用することもできる。回収した複合体は、抗原上の抗原決定基に向けられ、そして複合体中の抗原に結合

することができる少なくとも1つの第2抗体と接触させる。第2抗体が向けられる抗原決定基は、抗原実体のマルチエピトープ性により第1抗体が向けられる抗原決定基と同じであることができる。第1または第2抗体のいずれかを、上記の任意の標識を使用して検出可能にすることができる。好適な態様では、第2抗体を検出可能とする。第1および第2抗体に結合した抗原からなる複合体に結合した検出可能な抗体の存在は、技術的に知られている技法を使用して容易に検出することができる。生物学的サンプルで得られた結果を、対照サンプルで得られた結果と比較することにより、変化したA₁₁-xペプチドレベルの存在が測定される。

【0030】

したがって本発明の目的は、固体マトリックスにコーティングされた第1抗体（今後コーティング抗体と言う）が、A₁₁-xペプチドおよび完全長のA₄₀またはA₄₂を認識する抗体からなり、そして第2抗体（これは検出可能にされている）が、A₁₁-xペプチド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である。好ましくはコーティング抗体はヒトのA₁₁-xペプチドおよび完全長のヒトA₄₀またはA₄₂を認識し、より好ましい態様では、コーティング抗体はA₁₁-40および完全長のA₄₀を特異的に認識するモノクローナル抗体JRF/cA₄₀/10からなり、該モノクローナル抗体は配列番号5のアミノ酸配列を有する少なくとも1つの重鎖可変領域、および/または配列番号6のアミノ酸配列を有する少なくとも1つの軽鎖可変領域を含んでなることを特徴とし（今後モノクローナル抗体JRF/cA₄₀/10と言う）、あるいはコーティング抗体はA₁₁-42および完全長のA₄₂を特異的に認識するモノクローナル抗体JRF/cA₄₂/12からなり、該モノクローナル抗体は配列番号7のアミノ酸配列を有する少なくとも1つの重鎖可変領域、および/または配列番号8のアミノ酸配列を有する少なくとも1つの軽鎖可変領域を含んでなることを特徴とする（今後モノクローナル抗体JRF/cA₄₂/12と言う）。したがって好適な態様では、第2抗体は2002年8月19日にベルギーの細菌のカルチャーコレクションに寄託番号LMBP5896CBおよびLMBP5897CBでそれぞれ寄託されたハイブリドーマ細胞J&JPRD/hA₁₁/1またはJ&JPRD/hA₁₁/2により発現されるモノクローナル抗体の1つである。また本発明の目的は、完全長A₄₀またはA₄₂に対するA₁₁-xペプチドの比率を決定するためのサンドイッチアッセイを提供することである。この態様では、完全長A₄₀およびA₄₂の両方を認識するが、A₁₁-xペプチドとは交差反応を示さないさらなる第2抗体も使用する。好ましくはこのさらなる第2抗体は、配列番号9のアミノ酸配列を有する少なくとも1つの重鎖可変領域、および/または配列番号10のアミノ酸配列を有する少なくとも1つの軽鎖可変領域を含んでなることを特徴とするJRF/A_{N25}からなる。したがって本発明の1つの目的は、コーティング抗体が例えば2002年8月19日にベルギーの細菌のカルチャーコレクションに寄託番号LMBP5896CBおよびLMBP5897CBでそれぞれ寄託されたハイブリドーマ細胞J&JPRD/hA₁₁/1またはJ&JPRD/hA₁₁/2により発現されるモノクローナル抗体のような、A₁₁-xペプチドを特異的に認識するが、完全長A₄₀またはA₄₂ペプチドに交差反応性を示さない抗体を、例えばこれまでに特性付けたようなJRF/cA₄₂/12またはJRF/cA₄₀/10のようなA₁₁-40またはA₁₁-42を特異的に認識する第2抗体と組み合わせる、サンドイッチアッセイを提供することである。具体的な態様では、コーティング抗体はJ&JPRD/hA₁₁/1からなり、そして第2抗体はA₁₁-42および完全長A₄₂を特異的に認識するJRF/cA₄₂/26からなり、該モノクローナル抗体は、配列番号11のアミノ酸配列を有する少なくとも1つの重鎖可変領域、および/または配列番号12のアミノ酸配列を有する少なくとも1つの軽鎖可変領域を含んでなることを特徴とする（今後モノクローナル抗体JRF/cA₄₂/26と言う）。

【0031】

完全長A₄₀またはA₄₂に対するA₁₁-xペプチドの比率を測定するための

別のサンドイッチアッセイでは、コーティング抗体はA 11-xペプチド、好ましくはヒトのA 11-xペプチドを特異的に認識する抗体、およびペプチドA 11-40またはA 11-42、好ましくはヒトのA 11-40またはヒトのA 11-42を特異的に認識する、検出可能にされた第2抗体からなる。この別のサンドイッチアッセイでは、コーティング抗体は2002年8月19日にベルギーの細菌のカルチャーコレクションに寄託番号LMBP5896CBおよびLMBP5897CBでそれぞれ寄託されたハイブリドーマ細胞J&JPRD/hA 11/1またはJ&JPRD/hA 11/2により発現されるモノクローナル抗体の1つからなり、そして第2の検出可能に標識された抗体は、これまでに特性付けたモノクローナル抗体JRF/cA 40/10またはモノクローナル抗体JRF/cA 42/12のいずれかからなる。

10

【0032】

本発明のモノクローナル抗体は、サンドイッチ法以外のアッセイ系、例えば競合法および比濁法にも使用することができる。競合法では、試験溶液中の抗原および標識免疫原を抗体と競合的に反応させ、続いて未反応の標識免疫原(F)を抗体に結合した標識免疫原(B)から分離する(B/F分離)。次いでBまたはFの標識量を測定して、試験溶液中の免疫原の量を決定する。これらの反応法には液相法(これは抗体として可溶性抗体が使用され、そしてポリエチレングリコールおよび上に挙げた抗体に対する第2抗体がB/F分離に使用される)、および固体化法(これは第1抗体として固体化された抗体を使用するか、または第1抗体として可溶性抗体を使用し、そして第2抗体として固体化された抗体を使用する)を含む。

20

【0033】

比濁法には抗体-抗原反応の結果としてゲルまたは溶液中に生成される不溶性沈殿物の量を測定する。たとえ抗原の量がわずかであり、そして得られた沈殿物が少量のみであっても、レーザー散乱を使用したレーザー比濁計が適切に使用される。

【0034】

さらなる観点では、本発明はヒトにおけるベータ-アミロイドタンパク質を含有する斑の形成を特徴とする状態を処置し、そして防止するための方法を対象とし、この方法はそのような処置が必要なヒトに治療に、または予防に有効量の本発明のヒト化モノクローナル抗体またはその免疫学的に反応性の断片を投与、好ましくは末梢的に投与することを含んでなり、この抗体はヒトまたはマウスA ペプチドの セクレターゼ__11切断部位の最初の5~7個のアミノ酸上に存在する1以上のエピトープに特異的に結合する。別の観点では、本発明はアミロイド斑の形成を阻害し、そしてヒトのアミロイド斑を取り除く(clear)方法を対象とし、この方法はそのような阻害が必要なヒト個体に、A ペプチドがその循環から血中に形成されることを封鎖し、そして脳から流出ならびに血漿および脳における改変A の排出を誘導する有効量のヒト化抗体を投与することを含んでなる。さらなる観点では、本発明はその免疫学的に効果的な部分を含むそのようなヒト化抗体、およびそれらの調製法を対象とする。

30

【0035】

「ヒト化抗体」とは、非ヒト相補性決定領域(CDR)を有する抗体の配列を改変することによるヒト抗体生殖細胞系に由来するアミノ酸配列の一部または全部からなる抗体を意味する。「CDR」は免疫グロブリン重および軽鎖の超可変性領域である抗体の相補性決定領域のアミノ酸配列と定める。例えば、Kabata et al.、免疫学的に興味深いタンパク質の配列(Sequences of proteins of immunological interest)、第4版、米国保健福祉省、国立衛生研究所(1987)を参照にされたい。免疫グロブリンの可変部分には3つの重鎖および3つの軽鎖CDR(またはCDR領域)がある。すなわち本明細書で使用する「CDR」は、3つすべての重鎖CDRまたは3つすべての軽鎖CDR(または適当ならば軽および重鎖CDRの両方)を指す。

40

【0036】

最も単純なそのような改変は、マウス定常領域に代えて単にヒト抗体の定常領域を使用

50

することであり、これにより製薬学的使用に許容され得る十分に低い免疫原性を有することができるヒト/マウスキメラを生じる。

【0037】

しかし好ましくは、抗体の可変領域およびさらにCDRも、今では当該技術分野で周知である技術によりヒト化される。可変領域の骨格領域は、対応するヒトの骨格領域により置換され非ヒトCDRを実質的に完全なままとするか、またはさらにCDRをもヒトゲノムに由来する配列に置き換える。完全なヒト抗体は、免疫系が対応するヒト免疫系に改変された遺伝的に修飾されたマウスで生産される。上に述べたように本発明の方法での使用については、単鎖形を表す断片を含め、抗体の免疫学的に特異的な断片を使用することで十分である。

10

【0038】

ヒト化抗体は、再度、ヒト骨格、非ヒト抗体に由来する少なくとも1つのCDRを含んでなる抗体を称し、そしてここで存在する任意の定常領域はヒト免疫グロブリンの定常領域と実質的に同一であり、すなわち少なくとも約85、90%、好ましくは少なくとも95%同一である。したがってヒト化抗体のすべての部分（恐らくCDRを除く）は、1以上の天然のヒト免疫グロブリン配列の対応する部分に実質的に同一である。例えばヒト化免疫グロブリンは、典型的にはキメラマウス可変領域/ヒト定常領域抗体を包含しない。

【0039】

ヒト化抗体は、ヒトの治療に使用するために非ヒトおよびキメラ抗体よりも少なくとも3つの潜在的な利点を有する：

20

1) エフェクター部分がヒトであるので、ヒト免疫系の他の部分ともより良く相互反応することができる（例えば、補体依存性細胞傷害（CDC）または抗体依存性細胞傷害（ADCC）により、標的細胞をより効率的に破壊する）。

2) ヒトの免疫系はヒト化抗体の骨格またはC領域を外来とは認識しないはずなので、そのような注射された抗体に対する抗体応答は、全部が外来の非ヒト抗体または部分的に外来のキメラ抗体に対するよりも低いはずである。

3) 注射された非ヒト抗体は、ヒトの循環においてヒト抗体の半減期よりもはるかに短い半減期を有すると報告されてきた。注射されたヒト化抗体は自然に存在するヒト抗体と本質的に同一の半減期を有し、与える用量をより少なく、そして頻度を低くできる。

【0040】

30

ベータ-アミロイドタンパク質を含む斑の形成を特徴とする状態を処置または防止するための方法で抗体（免疫学的に反応性の断片を含む）は、臨床的もしくは症状発現前のアルツハイマー病、ダウン症候群、または臨床的もしくは症状発現前のアミロイド血管症のようなA β -関連症状または病状の危険性があるか、それらを現す個体に標準的な投与技術を使用して、好ましくは末梢に（すなわち中枢神経系による投与によるものではない）、静脈内、腹腔内、皮下、肺、経皮、筋肉内、鼻内、頬内、舌下または座薬投与により投与される。抗体は脳室系、脊髄液または脳の実質に直接投与してもよく、そしてこれらの位置へ向ける技術は当該技術分野では周知であるが、これらのより複雑な手法を利用する必要はない。本発明の抗体は末梢循環系に依る、より単純な技術により投与する時に効果的である。本発明の利点には、たとえ中枢神経系自体に直接提供されなくても、抗体がその有利な効果を発揮する能力を含む。実際に本明細書では血液脳関門をわたる抗体の量が<0.1%の血漿レベルであり、しかも本発明の抗体は末梢循環中のA β を封鎖し、ならびにCNSおよび血漿の可溶性A β 排出を改変する能力を発揮することが証明された。

40

【0041】

投与用の製薬学的組成物は、選択された投与様式に適するように計画され、そして分散剤、バッファー、表面活性剤、保存剤、可溶化剤、張性調節剤、安定化剤等のような製薬学的に許容され得る賦形剤が適切に使用される。レミングトンの製薬科学（Remington's Pharmaceutical Sciences）、マック出版社、イーストン、ペンシルバニア州、最新版（引用により本明細書に編入する）は、一般的に熟練者に知られている製剤技術の概論を提供する。

50

【 0 0 4 2 】

本発明の抗体の溶解性を改変すること、例えばそれらをリポソームにカプセル化することにより、または極性基をブロックングすることによりさらに親油性にすることは特に有用である。

【 0 0 4 3 】

静脈内または腹腔内または皮下注射による末梢全身送達が好適である。そのような注射に適当な賦形剤は簡単である。しかしさらに、投与は鼻用エアロゾルまたは座薬により粘膜を通して行うこともできる。そのような投与様式に適当な製剤は周知であり、そして典型的には膜を通る輸送を促進する表面活性剤を含む。そのような表面活性剤はしばしばステロイドに由来するか、または N - [1 - (2 , 3 - ジオレオイル) プロピル - N , N , N - トリメチルアンモニウムクロライド (D O T M A) のようなカチオン性脂質、またはコレステロールヘミスクシネート、ホスファチジルグリセロール等のような種々の化合物である。

10

【 0 0 4 4 】

製剤中のヒト化抗体の濃度は、わずかに約 0 . 1 % から 1 5 または 2 0 重量 % まで、そして主に流体容量、粘度等に基づき選択した特定の投与様式に従い選択される。このように注射用の典型的な製薬学的組成物は、リン酸緩衝化塩水の 1 m L の滅菌緩衝水および 1 ~ 1 0 0 m g の本発明のヒト化抗体を含むように作成することができる。製剤は製剤を作成した後に滅菌濾過することができ、あるいは微生物学的に許容され得るように作成することができる。静脈内注入用の典型的組成物は、滅菌リンゲル溶液のような 2 5 0 m L もの容量、および m l あたり 1 ~ 1 0 0 m g 以上の抗体濃度を有することができる。

20

【 0 0 4 5 】

本発明の治療薬は、貯蔵のために凍結または凍結乾燥し、そして使用前に適切な滅菌担体中に再構成することができる。凍結乾燥および再構成は程度が変動する抗体活性の損失を導く可能性がある（例えば通例の免疫グロブリンでは、I g M 抗体は I g G 抗体よりも大きな活性の損失を有する傾向がある）。投薬用量は補正するために調整されなければならないかもしれない。製剤の p H は抗体の安定性（化学的および物理的）と投与する時の患者の満足のバランスを取るよう選択される。

【 0 0 4 6 】

一般に、4 から 8 の間の p H で耐容される。

30

【 0 0 4 7 】

前記の方法はヒト化抗体のようなタンパク質の投与に最も便利かつ最も適切であると思われるが、適切に適合させることにより経皮的投与および経口投与のような他の投与技術も、適切な製剤が設計されれば採用することができる。

【 0 0 4 8 】

加えて、生分解性フィルムおよびマトリックス、または浸透圧ミニポンプ、またはデキストランビーズ、アルギネートまたはコラーゲンに基づく送達系を使用した放出制御製剤を使用することも望ましい。

【 0 0 4 9 】

まとめると製剤は本発明の抗体を投与するために利用可能であり、そして当該技術分野で周知であり、そして種々な選択肢から選ぶことができる。典型的な投薬用量レベルは、標準的な臨床的技術を使用して至適化することができ、そして投与様式および患者の状態に依存するだろう。

40

【 0 0 5 0 】

本発明はさらに上記方法に使用することができるキットを提供する。1つの態様では、キットは本発明の抗体、好ましくは精製された抗体、より好ましくはモノクローナル抗体、さらに一層好ましくは 2 0 0 2 年 8 月 1 9 日にベルギーの細菌のカルチャーコレクションに寄託番号 L M B P 5 8 9 6 C B および L M B P 5 8 9 7 C B でそれぞれ寄託されたハイブリドーマ細胞 J & J P R D / h A 1 1 / 1 および J & J P R D / h A 1 1 / 2 により発現される単離されたモノクローナル抗体を 1 以上の容器に含んでなる。具体的な態

50

様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む。さらなる態様では、このエピトープは免疫原として - セクレターゼ__1 1 切断部位の最初の 5 ~ 7 個のヒトのアミノ酸、すなわち E V H H Q - C (ヒト A __1 1 (6 A A) - 配列番号 1) および E V H H Q K I - C (ヒト A __1 1 (8 A A) - および配列番号 2)、または - セクレターゼ__1 1 切断部位の最初の 5 ~ 7 個のマウスのアミノ酸、すなわち E V R H Q - C (マウス A __1 1 (6 A A) - 配列番号 3) および E V R H Q K L - C (マウス A __1 1 (8 A A) - 配列番号 4) からなる群から選択される。好ましくは本発明のキットはサンドイッチアッセイに使用され、そしてさらに目的のポリペプチドとは特異的に反応しないコーティング抗体を含んでなり、具体的な態様では、このコーティング抗体は A 1 1 - x ペプチドおよび完全長の A 4 0 または A 4 2 を認識し、好ましくはこのコーティング抗体はヒト A 1 1 - x ペプチドおよび完全長のヒト A 4 0 または A 4 2 を認識し、さらに好適な態様では、このコーティング抗体は A 1 1 - 4 0 および完全長の A 4 0 を特異的に認識するモノクローナル抗体 J R F / c A 4 0 / 1 0 (すでに特性付けしたような) からなるか、またはコーティング抗体は A 1 1 - 4 2 および完全長の A 4 2 を特異的に認識するモノクローナル抗体 J R F / c A 4 2 / 1 2 (すでに特性付けしたような) からなる。本発明による別のサンドイッチアッセイでは、キットは A 1 1 - x ペプチド、好ましくはヒトの A 1 1 - x ペプチドを特異的に認識するコーティング抗体、およびさらに A 4 0 または A 4 2 の C - 末端、好ましくはヒト A 4 0 または A 4 2 の C - 末端に特異的な抗体を含んでなる。より好適な態様ではキットは、コーティング抗体として 2 0 0 2 年 8 月 1 9 日にベルギーの細菌のカルチャーコレクションに寄託番号 L M B P 5 8 9 6 C B および L M B P 5 8 9 7 C B でそれぞれ寄託されたハイブリドーマ細胞 J & J P R D / h A 1 1 / 1 および J & J P R D / h A 1 1 / 2 により発現される単離されたモノクローナル抗体、およびさらなる抗体としてモノクローナル抗体 J R F / c A 4 0 / 1 0 (これまでに特性付けしたような) およびモノクローナル抗体 J R F / c A 4 2 / 1 2 (これまでに特性付けしたような) を含んでなり、後者は検出可能な標識、物質に連結されている。

【 0 0 5 1 】

本発明の別の態様では、本発明のキットは抗体の目的とするポリペプチドへの結合を検出するための手段を含む (例えば抗体は蛍光化合物、酵素基質、放射性化合物または発光化合物のような検出可能物質、あるいは第 1 抗体を認識する第 2 抗体を検出可能な物質に結合することができる)。特にキットは A 1 1 - x ペプチドへの抗体の結合を検出するための、好ましくは - セクレターゼ__1 1 切断部位の最初の 5 ~ 7 個のヒトのアミノ酸、すなわち E V H H Q - C (ヒト A __1 1 (6 A A) - 配列番号 1) および E V H H Q K I - C (ヒト A __1 1 (8 A A) - および配列番号 2)、または - セクレターゼ__1 1 切断部位の最初の 5 ~ 7 個のマウスのアミノ酸、すなわち E V R H Q - C (マウス A __1 1 (6 A A) - 配列番号 3) および E V R H Q K L - C (マウス A __1 1 (8 A A) - 配列番号 4) からなる群から選択されるエピトープとの結合を検出するための手段を含む。前記サンドイッチアッセイでは、検出可能な物質に結合した抗体は、コーティング抗体ではない。

【 0 0 5 2 】

さらなる態様では、本発明は組織、体液、例えば C S F、血液、血漿、血清、尿等を含む生物学的サンプルのスクリーニングに使用するための診断キットを含む。該生物学的サンプルは A b 1 1 - x ペプチドを含む。この診断キットは A b 1 1 - x ペプチドと、特に - セクレターゼ__1 1 切断部位の最初の 5 ~ 7 個のヒトのアミノ酸、すなわち E V H H Q - C (ヒト A __1 1 (6 A A) - 配列番号 1) および E V H H Q K I - C (ヒト A __1 1 (8 A A) - および配列番号 2)、または - セクレターゼ__1 1 切断部位の最初の 5 ~ 7 個のマウスのアミノ酸、すなわち E V R H Q - C (マウス A __1 1 (6 A A) - 配列番号 3) および E V R H Q K L - C (マウス A __1 1 (8 A A) - 配列番号 4) からなる群から選択されるエピトープと特異的に免疫反応性の実質的に単離された抗体、

および抗体の免疫原への結合を検出する手段を含む。1つの態様では、抗体が固体支持体に結合している。具体的な態様では、抗体はモノクローナル抗体、特に2002年8月19日にベルギーの細菌のカルチャーコレクションに寄託番号LMBP5896CBおよびLMBP5897CBでそれぞれ寄託されたハイブリドーマ細胞J&JPRD/hA 11/1およびJ&JPRD/hA 11/2により発現されるモノクローナル抗体であることができる。

【0053】

キットの検出手段には第2の標識されたモノクローナル抗体を含むことができ、好ましくはこの第2の標識されたモノクローナル抗体は、JRF/cA 40/10またはJRF/cA 42/12からなり、ここでJRF/cA 40/10との前記固定化モノクローナル抗体の組み合わせはA 1-40との交差反応無しでA 11-40を特異的に認識し、そしてここでJRF/cA 42/12との前記固定化モノクローナル抗体の組み合わせはA 1-42との交差反応無しでA 11-42を特異的に認識する。あるいは、または加えて、検出手段は標識された競合抗原を含んでなることができる。

10

【0054】

上記アッセイにおける固体表面試薬は、タンパク質材料をポリマー性ビーズ、浸漬棒、96ウェルプレートまたはフィルター材料のような固体支持体材料に結合させるために知られている技術により調製される。これらの結合法は一般にタンパク質の支持体への非特異的吸着、または典型的には遊離アミノ基を介するタンパク質の、固体支持体上の化学的な反応性基、例えば活性化カルボキシル、ヒドロキシルまたはアルデヒド基への共有結合を含む。あるいはストレプトアビジンをコートしたプレートをビオチン化抗原(1つまたは複数)との結合に使用することができる。

20

【0055】

このように本発明はこの診断法を行うためのアッセイ系またはキットを提供する。このキットは一般に本発明に従い表面に結合した抗体を含む支持体、および抗体と免疫原との結合を検出するためのレポーターである標識された抗体を含む。

【0056】

本発明は以下の実験の詳細を参照にすることによりより良く理解されるであろうが、当業者にはこれらが添付する特許請求の範囲でより詳細に記載するような本発明の単なる具体的説明であることは明らかであろう。さらに本出願を通して、種々の刊行物が引用されている。これら刊行物の開示は引用により本出願に編入して、本発明に係わる技術分野の状況をより完全に説明する。

30

【実施例】

【0057】

実験

材料および方法

モノクローナル抗体の作成

Balb/cマウスを、完全フロイントアジュバント中の4種のペプチドで初回免疫した。最初の2つの合成ペプチドは - セクレターゼ__11切断部位の最初の5~7個のヒトのアミノ酸(AA)からなった: EVHHQ(KI)-C(ヒトA__11(6~8AA))。免疫感作用の他の2つのペプチドは、マウスA__11AA配列を含んだ; EVRHHQ(KL)-C。すべてのペプチドは、ピアス(Pierce)のImject Maleimide Activated mckLH/BSAキットのような市販されているキットを使用して、製造元(ピアス、ロックフォード、イリノイ州)の使用説明に従いペプチドをCOOH-末端システイン残基を介してマレイミド活性化mc(鍵穴カサガイ: Megathura crenulata)KLH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することにより調製した。マウスは2週間毎に100μgのKLHにカップリングしたペプチドで、最初は完全そして続いて不完全フロイントアジュバント中で追加免疫した。

40

【0058】

50

すべてのマウスの脾臓を単離し、そしてヒトの A₁₁(6AA) ペプチドで免疫感作したマウスの1つの脾臓を除き、液体窒素中で凍結した。選択したマウスは最高の血清力価を示し、したがって融合に選択した。融合または脾臓摘出の4日前に、すべてのマウスは塩水中の m c K L H にカップリングされた 100 μ g の A₁₁ ペプチドで腹腔内に追加免疫された。マウスの脾臓細胞を S P 2 / 0 細胞と Kohler and Milstein (8) の改良手順により融合した。ハイブリドーマは 30 x 96 ウェルプレートにまき、そして10日後に B S A がカップリングした 6 A A の h A₁₁ ペプチドで直接的 E L I S A によりスクリーニングし、そしてカップリングしていない A₁₁-40 ペプチドで確認した。遊離 h A₁₁-40 について陽性細胞を直ちにサブクローン化し、そして陽性クローンを液体窒素中で凍結した。

10

【0059】

すべてのハイブリドーマは、10%ウシ胎児血清（ハイクローン（Hyclone）、ヨーロッパ）、2.5% E S G ハイブリドーマサプリメント（エルスコラボ（Elscolab）、クワイベーク、ベルギー）、2% H T（シグマ（Sigma）、米国）、1mM ビルビン酸ナトリウム、2mM L - グルタミン酸およびペニシリン（100 U / ml）およびストレプトマイシン（50 mg / ml）を補充したダルベッコの改良イーグル培地で成長させた。すべての製品は市販されており、そしてライフ・テクノロジーズ（Life-Technologies）（ペーズリー、英国）から購入した。細胞は加湿した8%CO₂エアークューベーター中でインキュベーションした。

20

E L I S A 抗体の選択

抗-A₁₁抗体の検出に使用したスクリーニング E L I S A は、1 μ g / ml の遊離ヒト/マウス A₁₁-40 または B S A がカップリングしたヒト/マウス A₁₁ ペプチドを4に overnight、50 μ l / ウェルのコーティングバッファー（10mM Tris、10mM NaCl および 10mM NaH₂PO₄、pH 8.5）中で N U N C（ライフテクノロジーズ）の U 底高結合 96 ウェルマイクロタイタープレートにコーティングした直接 E L I S A であった。翌日、プレートは 85 μ l / ウェルの 0.1% カゼイン（P B S 中）で 37 で 60 分間コーティングされて非特異的結合を減少させた。ついで 50 μ l のハイブリドーマ上清を加え、そして 37 で 1 時間、インキュベーションした。洗浄後、結合したモノクローナル抗体は、西洋ワサビペルオキシダーゼに結合した 50 μ l / ウェルの ヒツジ - 抗 - マウス I g で 37 で 1 時間、検出した（アマシャム - ファルマシア バイオテック）。両試薬は 0.1% カゼイン / P B S で希釈した。プレートを洗浄し、そして 50 μ l の 0.42mM 3, 5, 3', 5' - テトラメチル - ベンジジン、0.003（容量 / 容量）% H₂O₂ の溶液（100mM のクエン酸および 100mM リン酸水素二ナトリウム（pH 4.3）中）を基質として加えた。反応は室温でプレート振盪機上で最大 15 分間進め、その後、発色を 2N H₂SO₄、50 μ l / ウェルで止め、そしてプレートをマイクロタイタープレートリーダー上で 450nm にて読んだ（Thermomax、モレキュラーデバイス（Molecular Devices）。選択したモノクローナル抗体と完全サイズのヒト遊離 A₁₁-40 ペプチドとの交差反応性は、スクリーニングアッセイと同一の直接的 E L I S A で試験したが、ただし完全サイズの遊離ヒト A₁₁-40 ペプチドを B S A にカップリングした h A₁₁(6AA) ペプチドの代わりに使用した。第2の確認 E L I S A では、選択した陽性カルチャーを遊離ヒト A₁₁-40 ペプチドで再試験した。

30

40

アミロイド 検出のためのサンドイッチ E L I S A

h A₁₁(1-40) または h A₁₁(11-40) 標準希釈（アメリカンペプチドカンパニー：American Peptide Company）の測定用の E L I S A は、以下のように行った：簡単に説明すると、モノクローナル抗体 J R F / A₁₁N / 25、J & J P R D / h A₁₁N 11 / 1 および J & J P R D / h A₁₁N 11 / 2 を、5 μ g / ml で 4 に overnight、100 μ l / ウェルのコーティングバッファー中で N U N C 平底高結合 96 ウェルマイクロタイタープレートにコーティングした。翌日、プレートは 125 μ l / ウェルの 0.1% カゼイン（P B S 中）で 37 で 30 分間オーバーコーティングさ

50

れて非特異的結合を減少させ、そして100 μ l / ウェルのhA (1 - 40) またはhA (11 - 40) ペプチド希釈サンプルと37 で90分間、インキュベーションした。プレートを洗浄した後、100 μ l / ウェルのHRP標識化JRF / cA 40 / 10 - HRP Oとインキュベーションした。プレートを洗浄し、そして100 μ lの0.42 mM 3, 5, 3', 5' - テトラメチル - ベンジジン、0.003 (容量 / 容量) % H₂O₂の溶液(100 mMのクエン酸および100 mMリン酸水素二ナトリウム(pH 4.3)中)を基質として加えた。反応はRTでプレート振盪機上にて最大15分間進め、その後、発色を2N H₂SO₄、50 μ l / ウェルで止め、そしてプレートをマイクロタイタープレートリーダー上で450 nmにて読んだ(Thermomax、モレキュラーダイナミクス(Molecular Dynamics))。

10

APP CTFの免疫検出

CTF (STUBS) 断片の免疫検出には、ヒトAPP^{sw}およびヒトBACE1で安定にトランスフェクトされたHEK細胞を、75 cm² フラスコ(ライフテクノロジーズ、ベーズリー、英国)中でコンフルエンスになるまで成長させ、そして続いて細胞を溶菌させ、そして50 mM Tris : pH = 7.0、0.15 M NaCl、1% Triton X - 100および市販のプロテアーゼ - インヒビター - カクテル(ロッシュ(Roche)、ベーリンガーマンハイム、独国)中で超音波処理した。粗溶菌液を4 で10000 gにて10分間遠心して核および屑を除いた。清澄化した細胞ライセートをタンパク質含量について標準化し、そしてサンプルを95 にて2 x トリシンレムリー(Tricine Laemmli)バッファー中で5分間変性させ、そしてプレキャストの10 ~ 20% Tris Tricine SDS 勾配ゲル(NONEX、インビトロジェン(Invitrogen)、グロニンゲン、オランダ)にのせ、そして0.22 μ mのHybond - ECLナイロン膜(APB)に1.5 mA / cm²で45分間、セミドライブロットングした。低分子量タンパク質のラダーを分子量標準(Magic Mark Western標準、インビトロジェン)として使用した。膜は10 (重量 / 容量) %の無脂肪ドライミルク(バイオラッド: BioRad) (PBS中)で1時間ブロックした。次いで膜を適切な5 μ g / mlのモノクローナル抗体と4 で一晩インキュベーションした(APPのC末端エピトープに対するモノクローナル抗体C1 / 6.1は、オレンジベルグ、Nathan S. Kline研究所のMatthews博士の好意により得られた)。次いで膜はバッファーを5回変えながらPBS - 0.1% Tween 20で5分間洗浄し、HRP結合ヤギ抗 - マウス(シグマ) 1 : 2000希釈物と室温(RT)で1時間インキュベーションした。洗浄後、目的バンドは製造元(ロッシュ、ベーリンガーマンハイム、独国)の使用説明に従い化学発光により視覚化した。スキャンはLumi - Image r(ロッシュ、ベーリンガーマンハイム、独国)で取った。

20

30

AD患者の脳切片におけるAPPの免疫検出

脳切片は10 (重量 / 容量) %の無脂肪 - 乾燥ミルク(バイオラッド) (PBS中)で1時間ブロックした。次いで切片を5 μ g / mlの適切なモノクローナル抗体と4 で一晩インキュベーションした。次いで膜はバッファーを5回変えながらPBS - 0.1% Tween 20で室温(RT)にて5分間洗浄し、HRP結合ヤギ抗 - マウス(シグマ) 1 : 2000希釈物と室温(RT)で1時間インキュベーションした。洗浄後、目的バンドは製造元(ロッシュ、ベーリンガーマンハイム、独国)の使用説明に従い化学発光により視覚化した。スキャンはLumi - Image r(ロッシュ、ベーリンガーマンハイム、独国)で取った。

40

結果および考察

「融合マウス」の選択

4種のm c K L Hをカップリングしたペプチドのパネルをマウスに注射した。各ペプチドについて、3種のマウスを免疫感作した。1回目の追加免疫感作後、各マウスから採血し、そして血清を単離し、そして直接コーティングしたBSA - ヒトA (6AA) ELISAで試験した。hA ___11 (6AA)で免疫感作したマウスの免疫感作プロトコールは、注射したすべてのマウスについて同一であり、そして表1に示す。図1. aでは、

50

K L H __h A 1 1 (6 A A) (配列番号 1) で免疫感作したマウス 1 が、遊離のヒト A 1 1 - 4 0 ペプチドに関して大変高い血清力価を示すことが明らかに証明された。この理由から、h A __1 1 (6 A A) で免疫感作したマウス 1 を融合に選択した。

h A 1 1 (6 a a) の融合、脾臓 1

この高免疫感作マウスの多数の脾臓細胞により (全部で 6.5×10^8 の脾臓細胞)、融合手順は半数の脾臓細胞で 2 回行った。すべての細胞は、E S G を補充した培地に播種し、そして 30×96 のハイブリドーマプレートを 10 日後にスクリーニングした。

【 0 0 6 0 】

これらのハイブリドーマの中から、65 のカルチャーウェルが B S A をカップリングしたペプチドでのスクリーニング E L I S A アッセイで明らかな陽性シグナルを最初に示した。これらの陽性上清を I g G 特異的 E L I S A で遊離ペプチドについて試験した。わずか 5 つのカルチャーが陽性と確認され、すなわち最初の陽性ウェルの 10 % 未満であった。これらすべてのカルチャーは完全長のヒト A 1 - 40 には陰性であり、h A 1 1 - 40 / 42 の末端にある (e n d - s t a n d i n g) A A に対する反応性を示した。

【 0 0 6 1 】

カルチャーは直ちにクローン化し、そして母のカルチャーを凍結した。これら 5 つのうち、29B5 (J & J P R D / h A 1 1 / 1) および 5 C 4 (J & J P R D / h A 1 1 / 2) と命名された 2 つのハイブリドーマは成功裏にクローン化され、そして液体窒素中に凍結した。これら 2 つのハイブリドーマから 4 種のサブクローンをそれぞれ培養し、そして凍結した。表 2 では陽性のサブクローンをまとめる。

【 0 0 6 2 】

【 表 1 】

表 2

J&JPRD/hAβ11/1 (29B5cl1F3)	J&JPRD/hAβ11/2 (5C4cl3D6)
J&JPRD/hAβ11/1 (29B5cl2F5)	J&JPRD/hAβ11/2 (5C4cl3F5)
J&JPRD/hAβ11/1 (29B5cl4C1)	J&JPRD/hAβ11/2 (5C4cl5B4)
J&JPRD/hAβ11/1 (29B5cl4D11)	

【 0 0 6 3 】

非 A D のヒト対照、ビーグル犬およびモルモットの C S F サンプル中の A 1 - 40 / 42 および短縮化 A 1 1 - 40 の決定

C S F サンプル中の A 1 - 40 / 42 および短縮化 A 1 1 - 40 の測定に関する E L I S A は以下のように行った：簡単に説明すると、モノクローナル抗体 J & J P R D / h A 1 1 / 1 または特異的 A x - 40 および A x - 42 モノクローナル抗体 (V a n d e r m e e r e n M . , e t a l . , 2001 ; P y p e S . , e t a l . , 2003) J R F / c A 40 / 10 および J R F / c A 42 / 26 を、 $5 \mu\text{g} / \text{mL}$ で 4 にて一晚、 $100 \mu\text{L} / \text{ウェル}$ のコーティングバッファー中で N U N C 平底高結合 96 ウェルマイクロタイタープレートにコーティングした。翌日、プレートは $150 \mu\text{L} / \text{ウェル}$ の 0.1 % カゼイン (P B S 中) で 37 で 30 分間オーバーコーティングされて非特異的結合を減少させ、そして $100 \mu\text{L} / \text{ウェル}$ の P B S バッファーで希釈した C S F サンプルと 37 で 90 分間、インキュベーションした。プレートを洗浄した後、 $100 \mu\text{L} / \text{ウェル}$ の H R P 標識化 J R F / A N / 25 - H R P O または J R F / c A 40 / 28 - H R P O とインキュベーションした。プレートを洗浄し、そして $100 \mu\text{L}$ の 0.42 mM MgCl_2 , 5 mM MgSO_4 , 5 mM MgCl_2 - テトラメチル - ベンジジン、0.003 (容量 / 容量) % H_2O_2 の溶液 (100 mM のクエン酸および 100 mM リン酸水素二ナトリウム (p H 4.3) 中) を基質として加えた。反応は R T でプレート振盪機上にて最大 1

10

20

30

40

50

5 分間進め、その後、発色を $2\text{ N } \text{H}_2\text{SO}_4$ 、 $50\text{ }\mu\text{l}$ / ウェルで止め、そしてプレートマイクロタイタープレートリーダー上で 450 nm にて読んだ (Thermomax、モレキュラーダイナミックス)。

【0064】

本発明のモノクローナル抗体を使用して、短縮化 $11-40$ ベータ - アミロイドのアイソフォームを非 AD のヒト対照、ビーグル犬およびモルモットの CSF サンプル ($n = 6$) で定量的に検出することができた ($\text{ng} \pm$ 標準偏差)。

【0065】

【表 2】

	ヒト ng/ml	イヌ ng/ml	モルモット ng/ml
A ベータ 1-40	5.70 ± 0.63	5.61 ± 0.35	5.94 ± 0.42
A ベータ 11-40	0.20 ± 0.04	0.30 ± 0.34	0.36 ± 0.05
A ベータ 1-42	0.92 ± 0.31	1.25 ± 0.05	1.17 ± 0.16

10

【0066】

結論

全部で 30,000 以上のハイブリドーマの中から、我々はヒト A $11-40$ ペプチドの遊離 N - 末端を特異的に認識する 2 つの異なるハイブリドーマクローンを選択した。これらのモノクローナル抗体は、完全サイズのヒト A $1-40$ では陰性である。抗体の特異性を評価するために、抗体をプロテイン G アフィニティクロマトグラフィーで精製し、そして特異的抗 - ヒト c A 40 および c A 42 mA b を用いたサンドイッチ ELISA に使用した。検出抗体として JRF / c A $40 / 10$ - HRP O と組み合わせて、JRF / A $N / 25$ を A $1-40$ の特異的モノクローナル抗体として使用した。検出抗体は A の C 末端部を特異的に認識し、したがって検出抗体として JRF / A $N / 25$ および J & JPRD / h A $11 / 1$ および J & JPRD / h A $11 / 2$ (A 11 - x ペプチドに特異的な抗体) の両方と一緒に使用することができる。図 2 A では、JRF / A $N / 25$ が A $11-40$ との交差反応性無しで A $1-40$ と特異的に反応することが確認される。図 2 B および 2 C からは、抗体 J & JPRD / h A $11 / 1$ および J & JPRD / h A $11 / 2$ がヒト A $1-40$ に対する交差反応無しで h A $11-40$ を特異的に認識することが分かる。

20

30

【0067】

生物学的サンプル中の A $11-x$ ペプチドを特異的に標識するための本発明の抗体の能力は、ヒト APP およびヒト BACE 1 で安定にトランスフェクトされた HEK 細胞の膜抽出物でのウエスタンブロット (図 3)、ならびに AD 患者のアミロイド斑中の脳切片で証明された (表 3)。したがってサンドイッチ ELISA においてこれら抗体を特異的な抗 - ヒト c A 40 および抗 - ヒト c A 42 モノクローナル抗体と組み合わせて使用することにより、生物学的流体および脳のホモジネートを含む種々の生物学的サンプル中のヒト A $11-x$ ペプチドを特異的に検出する感受性のあるアッセイが得られる。

40

【0068】

【表 3】

参考文献

1. Jarrett, J.T., Berger, E.P., Lansbury, P.T., The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochem.* 32 (1993) 4693-4697.
2. Selkoe, DJ., Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol. Rev.* 81 (2001):741-766
3. Gouras, G.K., Xu, H., Jovanovic, J.N., Buxbaum, J.D., Wang, R., Relkin, N.R., Gandy, S., Generation and regulation of beta-amyloid peptide variants by neurons, *J. Neurochem.*, 71 (1998) 1920-1925.
4. Wang, R., Sweeney, D., Gandy, S.E., Sisodia, S.S., The profile of soluble amyloid beta protein in cultured cell media. Detection and quantification of amyloid beta protein and variants by immunoprecipitation-mass spectrometry, *J. Biol. Chem.*, 271 (1996) 31894-31902.
5. Vandermeeren, M., Geraerts, M., Pype, S., Dillen, L., Van Hove, C., Mercken, M., The functional inhibitor DAPT prevents production of amyloid β 1-34 in human and murine cell lines. *Neurosci. Lett.* 315 (2001) 145-148.
6. Naslund, J., Schierhorn, A., Hellman, U., Lannfelt, L., Roses A.D, Tjernberg, L.O., Silberring, J., Gandy, S.E., Winblad, B., Greengard, P., Nordstedt, C., Terenius, L., Relative abundance of Alzheimer A beta amyloid peptide variants in Alzheimer disease and normal aging, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 91 (1994) 8378-8382.
7. Iwatsubo, T., Saido, T.C., Mann D.M., Lee, V.M.-Y., Trojanowski, J.Q. Full-length amyloid-beta (1-42(43)) and amino-terminally modified and truncated amyloid-beta 42(43) deposit in diffuse plaques. *Am. J. Pathol.* 149 (1996) 1823-1830.
8. Kohler, G., Howe, S.C., Milstein, C., Fusion between immunoglobulin-secreting and nonsecreting myeloma cell lines. *Eur J Immunol* 6 (1976) 292-295.
9. Pype, S., Moechars, D., Dillen, L., Mercken, M., Characterization of amyloid beta peptides from brain extracts of transgenic mice overexpressing the London mutant of human amyloid precursor protein, *J. Neurochem.* 84(3) 602-609.

10

20

30

40

【表 4】

表 1

免疫感作／採血	日付	マウス	注射	
初回免疫	23/01/2002	1	100 μ g	
	23/01/2002	2	100 μ g	
	23/01/2002	3	100 μ g	
追加免疫 1	06/02/2002	1	100 μ g	
	06/02/2002	2	100 μ g	
	06/02/2002	3	100 μ g	
採血 1	20/02/2002	1		
	20/02/2002	2		
	20/02/2002	3		
追加免疫 2	27/02/2002	1	100 μ g	
	27/02/2002	2	100 μ g	
	27/02/2002	3	100 μ g	
採血 2	08/03/2002	1		
	08/03/2002	2		
	08/03/2002	3		
最終免疫	11/03/2002	1	100 μ g	腹水が貯まったマウス！
	11/03/2002	2	100 μ g	腹水が貯まったマウス！
	11/03/2002	3	100 μ g	腹水なし、力価なし！
脾臓凍結	マウス	日付		脾臓細胞
hA β _11(6aa).10exp6 cellen	2	14/03/2002		105.10exp6/バイアル(4バイアル)
融合	マウス	日付		脾臓細胞
hA β _11(6aa) 30pl.	1	15/03/2002		655.10exp6
				各 3 2 5 * 1 0 ⁶ 脾臓細胞で 2 回

10

20

30

【 0 0 7 0 】

【表 5】

表 3

		海馬				脈絡叢
Ab 型	希釈	ニューロン	斑	血管	その他	
J&JPRD/hAβ11/1	1 μg	-	+	-	- 裂 ++ - 白質 ++ 白斑状パターン および拡散染色	+++
J&JPRD/hAβ11/1	5 μg	+	+	-	- 裂 ++ - 白質 ++ 白斑状パターン および拡散染色	+++
J&JPRD/hAβ11/2	1 μg	-	-	-	- 裂 ++ - 白質 ++ 白斑状パターン および拡散染色	+++
J&JPRD/hAβ11/2	5 μg	-	+	-	- 裂 :+++ + 白質中の斑状パターン	+++

		皮質（内側嗅および紡錘状回）			
Ab 型	希釈	ニューロン	n 斑	強度	白質
J&JPRD/hAβ11/1	1 μg	-	++	+	++ (斑状)
J&JPRD/hAβ11/1	5 μg	+	+++	++	++ (斑状)
J&JPRD/hAβ11/2	1 μg	-	++	+	+++ (斑状)
J&JPRD/hAβ11/2	5 μg	-	+++	++	+++ (斑状)

【図面の簡単な説明】

【0071】

【図 1】図 1 A : - セクレターゼ __1 1 切断部位の最初の 5 ~ 7 個のヒトのアミノ酸、すなわち EVHHQ - C (ヒト A __1 1 (5 AA) - 配列番号 1) および EVHHQKI - C (ヒト A __1 1 (7 AA) - 配列番号 2)、または - セクレターゼ __1 1 切断部位の最初の 5 ~ 7 個のマウスのアミノ酸、すなわち EVRHQ - C (マウス A __1 1 (5 AA) - 配列番号 3) および EVRHQKL - C (マウス A __1 1 (7 AA) - 配列番号 4) を免疫原として注射したマウスの血清力価。使用したコーティング抗原は、2 . 0 μg / ml の hA (1 1 - 4 0) (アメリカンペプチドカンパニー) であった。

【0072】

表 1 EVHHQ - C (ヒト A __1 1 (5 AA) - 配列番号 1) を注射したマウスに関する免疫感作手順および脾臓回収および融合のスケジュール表

表 3 AD 患者の脳切片中の A 1 1 - x ペプチドの特異的検出を示すウエスタンブロッティングの結果

【図 2】捕捉抗体として精製したモノクローナル抗体 JRF / A N / 2 5、J & JPRD / hA 1 1 / 1 および J & JPRD / hA 1 1 / 2 を、そして検出抗体として JRF / cA 4 0 / 1 0 - HRPO を使用したサンドイッチ ELISA。抗体の組み合わせは、ヒト A 1 - 4 0 およびヒト A 1 1 - 4 0 (アメリカンペプチドカンパニー) との

反応性について評価する。A : J R F / A N / 2 5 と J R F / c A 4 0 / 1 0 - H R P O との組み合わせは、h A 1 1 - 4 0 に対する交差反応無しでヒト A 1 - 4 0 と特異的に反応する (A 1 - 4 0 検出に関する陽性対照)。B : J & J P R D / h A 1 1 / 1 と J R F / c A 4 0 / 1 0 - H R P O との組み合わせは、ヒト A 1 - 4 0 に対する交差反応無しで h A 1 1 - 4 0 と特異的に反応する。C : J & J P R D / h A 1 1 / 2 と J R F / c A 4 0 / 1 0 - H R P O との組み合わせは、ヒト A 1 - 4 0 に対する交差反応無しで h A 1 1 - 4 0 と特異的に反応する。

【図 3】 J & J P R D / h A 1 1 / 1 と、ヒト A P P s w e およびヒト B A C E 1 で安定にトランスフェクトされた H E K 細胞の膜抽出物中の A P P の 1 1 - 切断 C T F 断片との特異的反応を示すウエスタンブロッティング。C 6 / 6 . 1 は A P P の C 末端に向けられ、そして A P P の 1 および 1 1 - 切断 C T F 断片の両方と反応する。

10

【配列表】

SEQUENCE LISTING

5 <110> Janssen Pharmaceutica N.V.

10 <120> Amyloid-Beta monoclonal antibodies, compositions, methods and
uses

15 <130> PRD 32 10

20 <150> PCT/EP02/11062

20 <151> 2002-09-27

25 <160> 12

30 <170> PatentIn version 3.1

35 <210> 1 20

35 <211> 5

35 <212> PRT

40 <213> Artificial Sequence

45 <220>

45 <223> Immunogen consisting of the first 5 amino acids of the BACE1 cleavage site of human amyloid beta

50 <400> 1 30

50 Glu Val His His Gln
1 5

55 <210> 2

55 <211> 7

55 <212> PRT

60 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Immunogen consisting of the first 7 amino acids of the BACE1 cleavage site of human amyloid beta
 5
 <400> 2
 Glu Val His His Gln Lys Ile
 1 5
 10
 <210> 3
 <211> 5
 15
 <212> PRT 10
 <213> Artificial Sequence
 20
 <220>
 <223> Immunogen consisting of the first 5 amino acids of the BACE1 cleavage site of mouse amyloid beta
 25
 <400> 3
 Glu Val Arg His Gln
 1 5
 30
 <210> 4 20
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 40
 <220>
 <223> Immunogen consisting of the first 7 amino acids of the BACE1 cleavage site of mouse amyloid beta
 45
 <400> 4
 50
 Glu Val Arg His Gln Lys Leu
 1 5
 55
 <210> 5
 <211> 136
 <212> PRT
 60
 <213> Mus sp.

<220>
 <221> CDR1
 5 <222> (50)..(54)
 <223>
 10
 <220>
 <221> CDR2
 15 <222> (69)..(85)
 <223>
 20
 <220>
 <221> CDR3
 25 <222> (118)..(125)
 <223>
 30
 <400> 5
 Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Ile Gly
 1 5 10 15
 35 Ile Asn Ser Glu Gly Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg
 20 25 30
 40 Ser Gly Ala Ser Leu Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile
 35 40 45
 45 Lys Asp His Tyr Val His Trp Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu
 50 55 60
 50 Asp Trp Ile Gly Trp Ile Ala Pro Lys Asn Gly Tyr Ser Glu Ser Ala
 65 70 75 80
 55 Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Ser Met Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn
 85 90 95
 Thr Val Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 60 Tyr Tyr Cys Phe Ala Gly Phe Tyr Asp Ser Ser Leu Tyr Trp Gly Gln
 115 120 125

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 130 135

5 <210> 6
 <211> 133

10 <212> PRT
 <213> Mus sp.

15 <220>
 <221> CDR1

20 <222> (44) .. (59)
 <223>

25 <220>
 <221> CDR2

30 <222> (75) .. (81)
 <223>

35 <220>
 <221> CDR3

40 <222> (114) .. (122)
 <223>

45 <400> 6

Met Met Ser Pro Ala Gln Phe Leu Phe Leu Leu Val Leu Trp Ile Arg
 1 5 10 15

50 Glu Thr Asn Gly Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ala
 20 25 30

55 Val Thr Ile Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Gly Gln Ser
 35 40 45

60 Leu Leu Ala Arg Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Ser Trp Leu Leu Gln Arg
 50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp
 65 70 75 80

5 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 85 90 95

10 Thr Leu Lys Ile Asn Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr
 100 105 110

15 Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Asn
 115 120 125 10

Leu Glu Ile Lys Arg
 130

20 <210> 7
 <211> 133

25 <212> PRT
 <213> Mus sp.

30 <220> 20
 <221> CDR1

35 <222> (50)..(54)
 <223>

40 <220>
 <221> CDR2

45 <222> (69)..(85)
 <223> 30

50 <220>
 <221> CDR3

55 <222> (118)..(122)
 <223>

60 <400> 7
 Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly

	1	5	10	15													
5	Val	Leu	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Asp	Leu	Val	Lys	
		20						25						30			
10	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Thr	Ser	Cys	Lys	Thr	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	
		35						40					45				
15	Thr	Glu	Tyr	Ile	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ser	His	Gly	Lys	Ser	Leu	
		50					55					60					
20	Glu	Trp	Ile	Gly	Ser	Ile	Asn	Pro	Asn	Thr	Gly	Gly	Ser	Arg	Tyr	Asn	
	65					70					75					80	
25	Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	
					85					90					95		
30	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Phe	Arg	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	
				100					105					110			
35	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gly	Asp	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	
			115					120					125				
40	Leu	Thr	Val	Ser	Ser												
			130														
45	<210>	8															
	<211>	133															
50	<212>	PRT															
	<213>	Mus sp.															
55	<220>																
	<221>	CDR1															
60	<222>	(44) .. (59)															
	<223>																
65	<220>																
	<221>	CDR2															
70	<222>	(75) .. (81)															
	<223>																

<220>
 5 <221> CDR3
 <222> (114)..(122)
 10 <223>
 <400> 8
 15 Met Arg Phe Ser Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Val Leu Trp Ile Pro
 1 5 10 15
 20 Gly Ser Thr Ala Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Phe Ser Asn Pro
 20 25 30
 Val Thr Leu Gly Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Asn
 25 35 40 45
 Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Arg
 50 55 60
 30 Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Ser Arg Val Ser Asn Leu Ala
 65 70 75 80
 35 Ser Gly Val Pro Asn Arg Phe Ser Gly Ser Glu Ser Gly Thr Asp Phe
 85 90 95
 40 Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
 100 105 110
 Cys Ala Gln Leu Leu Glu Leu Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys
 45 115 120 125
 Leu Glu Ile Lys Arg
 130
 50 <210> 9
 <211> 138
 55 <212> PRT
 <213> Mus sp.
 60 <220>

10

20

30

<221> CDR1
 <222> (50)..(54)
 5 <223>

 <220>
 10 <221> CDR2
 <222> (69)..(85)
 15 <223> 10

 <220>
 20 <221> CDR3
 <222> (118)..(127)
 25 <223>

 <400> 9
 30 Met Glu Trp Thr Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly 20
 1 5 10 15
 35 Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Met Lys
 20 25 30
 40 Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 45 Ser Thr Ser Trp Ile Glu Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu
 50 55 60
 50 Glu Trp Ile Gly Glu Val Leu Pro Gly Ser Gly Lys Ser Asn His Asn 30
 65 70 75 80
 55 Ala Asn Phe Lys Gly Arg Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ala Ser Asn
 85 90 95
 60 Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Ser Asn Asn Asn Ala Leu Ala Tyr Trp
 115 120 125
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala 40

	130	135	
5	<210> 10		
	<211> 128		
	<212> PRT		
10	<213> Mus sp.		
15	<220>		10
	<221> CDR1		
	<222> (46) .. (55)		
20	<223>		
25	<220>		
	<221> CDR2		
	<222> (60) .. (67)		
30	<223>		20
35	<220>		
	<221> CDR3		
	<222> (110) .. (117)		
40	<223>		
45	<400> 10		
	Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser		
	1 5 10 15		30
50	Val Ile Ile Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile		
	20 25 30		
55	Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser		
	35 40 45		
60	Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser		
	50 55 60		
	Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Ser Ser Arg Leu Ala Ser Gly Val Pro		
	65 70 75 80		40

5 Ser Arg Phe Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Pro Thr Ile
 85 90 95
 10 Ser Asn Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Asn Trp
 100 105 110
 15 Arg Ser Ser Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 115 120 125
 20 <210> 11
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 25 <220>
 <221> CDR1
 <222> (50)..(54)
 30 <223>
 35 <220>
 <221> CDR2
 <222> (69)..(85)
 40 <223>
 45 <220>
 <221> CDR3
 <222> (118)..(122)
 50 <223>
 55 <400> 11
 Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly
 1 5 10 15
 60 Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Thr Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ser Phe
 35 40 45
 5 Thr Glu Tyr Ile Met Ser Trp Val Arg Gln Ser His Gly Lys Ser Leu
 50 55 60
 10 Glu Trp Ile Gly Ser Ile Asn Pro Asn Thr Gly Gly Ser Arg Tyr Asn
 65 70 75 80
 15 Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95 10
 Thr Ala Tyr Met Glu Phe Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110
 20 Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 115 120 125
 25 Leu Thr Val Ser Ser
 130
 30 <210> 12
 <211> 133
 <212> PRT
 35 <213> Mus musculus
 40 <220>
 <221> CDR1
 <222> (44)..(59)
 45 <223>
 50 <220>
 <221> CDR2
 <222> (75)..(81)
 55 <223>
 60 <220>
 <221> CDR3

<222> (114)..(122)
 <223>
 5
 <400> 12
 10 Met Arg Phe Ser Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Val Leu Trp Ile Pro
 1 5 10 15
 Gly Ser Thr Ala Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Phe Ser Asn Pro
 15 20 25 30 10
 Val Thr Leu Gly Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Asn
 35 40 45
 20 Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Arg
 50 55 60
 25 Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Ser Arg Val Ser Asn Leu Ala
 65 70 75 80
 30 Ser Gly Val Pro Asn Arg Phe Ser Gly Ser Glu Ser Gly Thr Asp Phe
 85 90 95
 20 Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
 100 105 110
 35 Cys Ala Gln Leu Leu Glu Leu Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys
 115 120 125
 40 Leu Glu Ile Lys Arg
 130

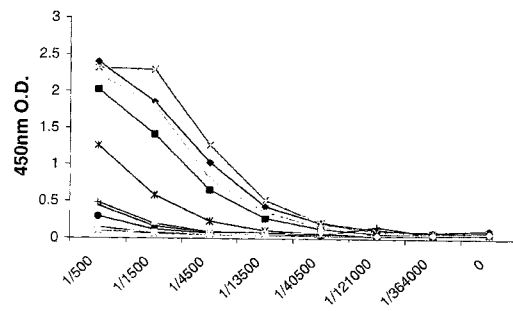
10

20

30

【 図 1 A 】

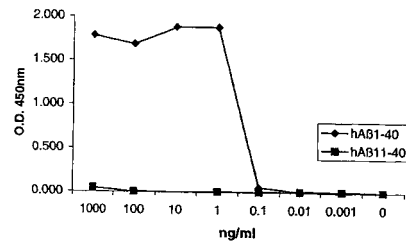
Fig.1.A.



● マウス1, 配列番号 :1 ■ マウス2, 配列番号 :1 ○ マウス3, 配列番号 :1 △ マウス1, 配列番号 :2
 × マウス2, 配列番号 :2 ● マウス3, 配列番号 :2 ▲ マウス1, 配列番号 :3 ▼ マウス2, 配列番号 :3
 ◆ マウス3, 配列番号 :3 マウス1, 配列番号 :4 マウス2, 配列番号 :4 マウス3, 配列番号 :4
 ☆ 雄性対照マウス

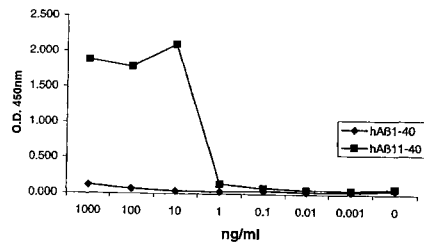
【 図 2 A 】

Fig2A



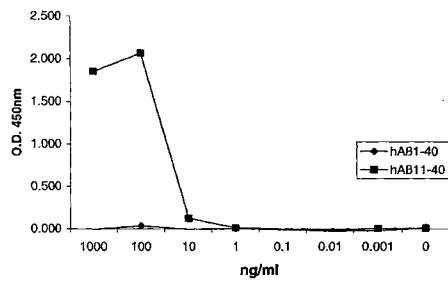
【 図 2 B 】

Fig2B



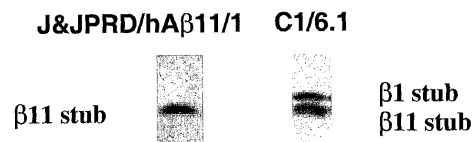
【 図 2 C 】

Fig2C



【 図 3 】

Fig.3



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		PCT/EP 03/10092
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/68 C12N5/20 C07K16/18		
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) IPC 7 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 practical, search terms used) BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, MEDLINE, EMBASE, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SAITO TAKANOMI C ET AL: "Amino- and carboxyl-terminal heterogeneity of beta-amyloid peptides deposited in human brain." NEUROSCIENCE LETTERS, vol. 215, no. 3, 1996, pages 173-176, XP002236342 ISSN: 0304-3940 page 173 --- -/--	1-16
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 document 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
17 December 2003		02/01/2004
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Wagner, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/EP 03/10092

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	NASLUND JAN ET AL: "Relative abundance of Alzheimer A-beta amyloid peptide variants in Alzheimer disease and normal aging." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 91, no. 18, 1994, pages 8378-8382, XP002236343 1994 ISSN: 0027-8424 cited in the application the whole document	1-16
A	VASSAR R ET AL: "BETA-SECRETASE CLEAVAGE OF ALZHEIMER'S AMYLOID PRECURSOR PROTEIN BY THE TRANSMEMBRANE ASPARTIC PROTEASE BACE" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, US, vol. 286, no. 5440, 1999, pages 735-741, XP000914811 ISSN: 0036-8075 the whole document	1-16
A	WO 01 62801 A (VASQUEZ MAXIMILIANO ;BALES KELLY R (US); PAUL STEVEN M (US); DEMAT) 30 August 2001 (2001-08-30) the whole document	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/EP 03/10092

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 9-12 are directed to a method which comprises a surgical step carried out on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged method without the surgical step.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/EP 03/10092

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0162801 A	30-08-2001	AU 4178601 A	03-09-2001
		BR 0108676 A	07-01-2003
		CA 2400559 A1	30-08-2001
		CN 1426423 T	25-06-2003
		CZ 20022851 A3	17-09-2003
		DE 1257584 T1	28-05-2003
		EP 1257584 A2	20-11-2002
		ES 2184660 T1	16-04-2003
		HU 0204074 A2	28-03-2003
		JP 2003523764 T	12-08-2003
		NO 20023957 A	22-10-2002
		TR 200202799 T3	21-03-2003
		WO 0162801 A2	30-08-2001

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 25/28 (2006.01)		A 6 1 P 9/00	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)		A 6 1 P 25/28	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)		C 1 2 P 21/08	
		C 1 2 N 15/00	A

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

(72) 発明者 バンデルメーレン, マルク・マリア・ピエール・ペラジエ
 ベルギー・ビー - 2 3 4 0 ビールセ・トウルンホウトセバーク 3 0・ジヤンセン・ファーマシユー
 チカ・ナムローゼ・フエンノートシャツプ

F ターム(参考) 4B024 BA43 BA44 GA03 GA27 HA15
 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA13
 4B065 AA90X AB04 BA08 CA25 CA46
 4C085 AA14 AA16 AA34 BB11 DD62 DD63 DD88 EE01 GG02 GG04
 GG06 GG10
 4H045 AA11 AA30 BA09 CA40 DA76 EA50 FA74

专利名称(译)	N-11截短的淀粉样蛋白-β单克隆抗体，组合物，方法和用途		
公开(公告)号	JP2006513988A	公开(公告)日	2006-04-27
申请号	JP2004538886	申请日	2003-09-09
[标]申请(专利权)人(译)	詹森药业有限公司		
申请(专利权)人(译)	Jiyansen杉机郁吃喀-Namuroze和非日元纸币施家伙翻牌		
[标]发明人	メルケンマルクフベルト バンデルメーレンマルクマリアピエールペラジエ		
发明人	メルケン,マルク・フベルト バンデルメーレン,マルク・マリア・ピエール・ペラジエ		
IPC分类号	C07K16/18 G01N33/53 C12N5/10 A61K39/395 A61P9/00 A61P25/28 C12P21/08 C12N15/09 C12N5/18 C12N5/20 G01N33/68		
CPC分类号	A61P9/00 A61P25/28 C07K16/18 G01N33/6896 G01N2333/4709 G01N2800/2821 G01N2800/52 C07K2317/34		
FI分类号	C07K16/18.ZNA G01N33/53.D C12N5/00.B A61K39/395.N A61K39/395.Y A61P9/00 A61P25/28 C12P21/08 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/BA43 4B024/BA44 4B024/GA03 4B024/GA27 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AB04 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA46 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/AA34 4C085/BB11 4C085/DD62 4C085/DD63 4C085/DD88 4C085/EE01 4C085/GG02 4C085/GG04 4C085/GG06 4C085/GG10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA09 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	PCT/EP2002/011062 2002-09-27 WO		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及至少对人淀粉样β11 N-末端位点即A&bgr 11-x肽具有特异性的抗体，包括特定部分或变体。 它还提供了制备和使用所述抗体的方法，包括治疗制剂，给药和装置。

				(43) 公表日	平成18年4月27日 (2006. 4. 27)	(P2006-519884)
(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)		
C07K	16/18	(2006.01)	C07K	16/18	ZNA	4B024
G01N	33/53	(2006.01)	G01N	33/53	D	4B064
C12N	5/10	(2006.01)	C12N	5/00	B	4B065
A61K	39/395	(2006.01)	A61K	39/395	N	4C085
A61P	9/00	(2006.01)	A61K	39/395	Y	4H045
審査請求				未請求	予備審査請求	有 (全40頁) 最終頁に続く
(21) 出願番号	特願2004-538886 (P2004-538886)		(71) 出願人	390033008		
(86) (22) 出願日	平成15年9月9日 (2003. 9. 9)		ジャンセン・ファーマシューチカ・ナムローゼ・フエンノトシャツブ			
(85) 翻訳文提出日	平成17年3月23日 (2005. 3. 23)		JANSEN PHARMACEUTICA NAAMLOZE VENNOOTSCHAP			
(86) 国際出願番号	PCT/EP2003/010092		ベルギー・ビー-2340-ビルセ・トゥルンホウトセベーク30			
(87) 国際公開番号	W02004/029630		(74) 代理人	100060782		
(87) 国際公開日	平成16年4月8日 (2004. 4. 8)		弁理士 小田島 平吉			
(31) 優先権主張番号	PCT/EP02/11062		(72) 発明者	メルケン, マルク・フベルト		
(32) 優先日	平成14年9月27日 (2002. 9. 27)		ベルギー・ビー-2340ビルセ・トゥルンホウトセベーク30・ジャンセン・ファーマシューチカ・ナムローゼ・フエンノトシャツブ			
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		最終頁に続く			
[54] 【発明の名称】 N-11糖鎖化アミロイド-betaモノクローナル抗体、組成物、方法および使用						

(54) 【発明の名称】 N-11 糖基化アミロイド-βペプチドモノクローナル抗体、組成物、方法および使用