

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号
WO2006/137354

発行日 平成21年1月15日 (2009. 1. 15)

(43) 国際公開日 平成18年12月28日 (2006. 12. 28)

(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	Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K	16/18	(2006. 01)	C O 7 K	16/18		4 B O 6 4
C 1 2 N	1/15	(2006. 01)	C 1 2 N	1/15		4 B O 6 5
C 1 2 N	1/19	(2006. 01)	C 1 2 N	1/19		4 C O 8 5
C 1 2 N	1/21	(2006. 01)	C 1 2 N	1/21		4 H O 4 5
			審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 50 頁)	最終頁に続く

出願番号	特願2007-522270 (P2007-522270)	(71) 出願人	390004097
(21) 国際出願番号	PCT/JP2006/312226		株式会社医学生物学研究所
(22) 国際出願日	平成18年6月19日 (2006. 6. 19)		愛知県名古屋市中区丸の内3丁目5番10号 住友商事丸の内ビル5F
(31) 優先権主張番号	特願2005-180334 (P2005-180334)	(71) 出願人	501304319
(32) 優先日	平成17年6月21日 (2005. 6. 21)		国立長寿医療センター総長
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		愛知県大府市森岡町源吾36の3
		(74) 代理人	100095577
			弁理士 小西 富雅
		(74) 代理人	100114362
			弁理士 萩野 幹治
		(72) 発明者	柳澤 勝彦
			愛知県大府市森岡町源吾36の3 国立長寿医療センター内
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 アミロイド線維形成に対する阻害活性を有する抗体

(57) 【要約】

アミロイド線維形成に対する阻害活性の高い抗体を提供する。所定の割合でQM1ガンゲリオシドを含むリポソームを免疫原として抗体を得る。アミロイド線維形成に対する阻害活性の高い4種の抗体の配列が開示される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

in vitroでのアミロイド β タンパク質重合阻害試験において阻害効果が50%以上である、アミロイド線維形成に対する阻害活性を有する単離された抗体。

【請求項 2】

GM1ガングリオシド結合型アミロイド β タンパク質を認識することを特徴とする、請求項1に記載の単離された抗体。

【請求項 3】

配列番号：2～4、10～12、18～20、及び26～28のいずれかのアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を含むCDRを有する重鎖可変領域と、

10

配列番号：6～8、14～16、22～24、及び30～32のいずれかのアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を含むCDRを有する軽鎖可変領域とを備え、

アミロイド線維形成に対する阻害活性を有する単離された抗体。

【請求項 4】

以下のa～hからなる群より選択される組合せの重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を備える、請求項3に記載の単離された抗体：

(a)配列番号：2のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1、配列番号：3のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2、及び配列番号：4のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3からなるCDRを有する重鎖可変領域と、配列番号：6のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号：7のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有するCDR2、及び配列番号：8のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有するCDR3からなるCDRを有する軽鎖可変領域との組合せ、

20

(b)配列番号：10のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1、配列番号：11のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2、及び配列番号：12のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3からなるCDRを有する重鎖可変領域と、配列番号：14のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号：15のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有するCDR2、及び配列番号：16のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有するCDR3からなるCDRを有する軽鎖可変領域との組合せ、

30

(c)配列番号：18のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1、配列番号：19のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2、及び配列番号：20のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3からなるCDRを有する重鎖可変領域と、配列番号：22のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号：23のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有するCDR2、及び配列番号：24のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有するCDR3からなるCDRを有する軽鎖可変領域との組合せ、

(d)配列番号：26のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1、配列番号：27のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2、及び配列番号：28のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3からなるCDRを有する重鎖可変領域と、配列番号：30のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号：31のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有するCDR2、及び配列番号：32のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有するCDR3からなるCDRを有する軽鎖可変領域との組合せ、

40

(e)配列番号：1のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と、配列番号：5のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域との組合せ、

50

(f)配列番号：9のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と、配列番号：13のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有する軽鎖変領域との組合せ、

(g)配列番号：17のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と、配列番号：21のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有する軽鎖変領域との組合せ、

(h)配列番号：25のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と、配列番号：29のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有する軽鎖変領域との組合せ。

【請求項5】

10

ヒト化抗体である、請求項1～4のいずれかに記載の単離された抗体。

【請求項6】

Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、又はdsFv抗体である、請求項1～5のいずれかに記載の単離された抗体。

【請求項7】

配列番号：2～4、6～8、10～12、14～16、18～20、22～24、26～28、及び30～32のいずれかのアミノ酸配列を含むCDR_H。

【請求項8】

請求項3若しくは4に記載の抗体の重鎖可変領域若しくは軽鎖可変領域、又は請求項8に記載のCDRをコードする単離された核酸分子。

20

【請求項9】

請求項8に記載の核酸分子を発現可能に保持するベクター。

【請求項10】

請求項8に記載の核酸分子が導入されている形質転換体。

【請求項11】

GM1ガングリオシドと、その他の脂質と、及び該GM1ガングリオシドに結合したアミロイドβタンパク質とを含有し、成分比率（分子比）が、

その他の脂質：GM1ガングリオシド＝90：10～60：40の範囲にある、動物免疫用の合成脂質膜。

【請求項12】

30

アミロイド線維形成に対する阻害活性を有する抗体をヒト生体内で産生させるために請求項11に記載の合成脂質膜を含むことを特徴とする、アルツハイマー予防ワクチン又は治療用組成物。

【請求項13】

請求項11に記載の合成脂質膜を非ヒト動物に免疫する免疫ステップと、

免疫後の前記非ヒト動物から取り出した抗体産生細胞を不死化細胞と融合し、ハイブリドーマを得るハイブリドーマ作製ステップと、

前記合成脂質膜に結合性を有する抗体を産生するハイブリドーマを選抜するハイブリドーマ選抜ステップと、及び

選抜されたハイブリドーマの発現する抗体を分離する抗体分離ステップと、

40

を含んでなる、アミロイド線維形成に対する阻害活性を有する抗体の作製方法。

【請求項14】

前記ハイブリドーマ選抜ステップにおいて、前記合成脂質膜に結合性を有し、且つモノマーアミロイドβタンパク質に結合性を有しない抗体を産生するハイブリドーマを選抜する、請求項13に記載の作製方法。

【請求項15】

抗体ライブラリーを、請求項11に記載の合成脂質膜に接触させる接触ステップと、

前記抗体ライブラリーの中から、前記合成脂質膜に結合性を有するクローンを選抜するクローン選抜ステップと、及び

選抜されたクローンの発現する抗体を分離する抗体分離ステップと、

50

を含んでなる、アミロイド線維形成に対する阻害活性を有する抗体の作製方法。

【請求項 16】

前記クローン選抜ステップにおいて、前記合成脂質膜に結合性を有し、且つモノマーアミロイド β タンパク質に結合性を有しないクローンを選抜する、請求項 15 に記載の作製方法。

【請求項 17】

請求項 13～16 のいずれかの作製方法で得られる単離された抗体。

【請求項 18】

被験抗体の存在下及び非存在下でそれぞれ、請求項 11 に記載の合成脂質膜にアミロイド β タンパク質を接触させるステップと、

10

被験抗体の存在下で前記ステップを実施した場合と、被験抗体の非存在下で前記ステップを実施した場合との間で、合成脂質膜へのアミロイド β タンパク質の結合及び／又はアミロイド β タンパク質の重合の程度を比較するステップと、

を含んでなる、被験抗体のアミロイド線維形成に対する阻害活性を測定する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明はアミロイド線維形成に対する阻害活性を有する抗体、及びその作製方法などに関する。詳しくは、本発明はアミロイド線維形成に対する阻害活性の高い抗体、その作製方法、その結合特性を決定する CDR (相補性決定領域)、並びに当該抗体又は CDR をコードする核酸に関する。アミロイド線維形成 (アミロイド β タンパク質の凝集・重合) はアルツハイマー病の発症、進行において本質的に関与していると考えられている。従って、本発明の抗体等は、アルツハイマー病の予防、治療、及び診断、並びにアルツハイマー病の機構の解明等に利用され得る。

20

【背景技術】

【0002】

現在、日本はかつて無いスピードで人口の高齢化が進展しており、それと共に痴呆症患者の数も増えつつある。国立社会保障・人口問題研究所の調査によれば、痴呆症患者数は西暦 2000 年には 165 万人、2015 年には 264 万人に及ぶと見積もられている。これら痴呆性疾患の患者の介護は経済的にも大きな負担となることから、一日も早い有効な治療法の開発が望まれている。

30

【0003】

老人性痴呆症のうち、主要なものはアルツハイマー病 (AD) であり、本疾患の病態生理の全体像は依然不明であるが、研究は急速に進展している。アルツハイマー病患者に共通してみられる特徴としては (1) 脳の萎縮 (2) 老人斑と呼ばれる斑状の蓄積物の形成を認めること (3) 神経細胞内に線維状の物質が蓄積した神経原線維変化、の 3 つがあり、この 3 つを認める場合にアルツハイマー病と診断される。アルツハイマー病の臨床症状である痴呆と密接に結びついているのが神経細胞の脱落であるが、神経細胞の脱落がどのような理由で起こるかについて、上記の病理変化が重要な手がかりを与える。1990 年代後半からの研究の進展により、老人斑がアミロイド β タンパク ($A\beta$) と呼ばれるペプチドが凝集して沈着したものであることが明らかになった。一方、神経原線維変化は神経細胞の骨格タンパク質の一つである tau タンパク質がリン酸化されて細胞内で凝集しているものであることが明らかにされた。

40

【0004】

アルツハイマー病には遺伝的要因によって引き起こされる家族性アルツハイマーと、遺伝的背景を持たない孤発性アルツハイマーが知られており、家族性アルツハイマーの原因遺伝子や危険因子が明らかにされつつある。家族性アルツハイマーの原因遺伝子の一つにアミロイド前駆体タンパク質 (Amyloid Precursor Protein ; APP) をコードする遺伝子があり、この遺伝子に突然変異があると必ずアルツハイマー病を引き起こすことが知られている。従って、これら変異体の作用、機能を見出せばアルツハイマー病の発症機構が明

50

らかになると考えられる。家族性アルツハイマーと孤発性アルツハイマーとの間には共通の機構が存在すると予測されるため、家族性アルツハイマー病の発症機構の研究から孤発性アルツハイマーの場合にも適用できる機構が浮かび上がってくると考えられる。

【0005】

$A\beta$ はAPPから β 及び γ セクレターゼによって切り出されるが、 $A\beta$ には切断点の違いにより $A\beta_{40}$ と $A\beta_{42}$ が存在し、 $A\beta_{42}$ の方が $A\beta_{40}$ よりも凝集しやすいこと、また病理学的観察により $A\beta_{42}$ が最初に凝集し、この $A\beta_{42}$ を核として $A\beta_{40}$ が凝集して線維形成が進むという説が提唱されている。最近の本発明者らの研究によれば、ADの脳においてGM1ガングリオシド（以下、略して「GM1」ともいう）、に結合することによって $A\beta$ の沈着が開始するとの知見が得られている(K. Yanagisawa, A. Odaka, N. Suzuki, Y. Ihara, Nat. Med. 1, 1062 (1995)、K. Yanagisawa, Y. Ihara, Neurobiol. Aging 19, S65 (1998))。また、本発明者らは、GM1結合型 $A\beta$ を特異的に認識するモノクローナル抗体(4396抗体)の作製に成功したことを報告した(FEBS Letters 420, 43-46 (1997))。本発明者らは、GM1結合型 $A\beta$ のユニークな分子特性に基づき、 $A\beta$ がGM1への結合によって構造を変化させ、そしてアミロイド線維形成の種(シード)として働くという仮説を立てた(K. Yanagisawa, A. Odaka, N. Suzuki, Y. Ihara, Nat. Med. 1, 1062 (1995))。その後、複数の研究者がin vitroでの研究を行い、この仮説を支持する結果、即ち、 $A\beta$ は膜上においてGM1に特異的に結合すること、in vitroにおいてはGM1を含有するリポソームの添加によって可溶性の $A\beta$ が凝集を開始しアミロイド線維を形成することが示されている(J. McLaurin, A. Chakrabartty, J. Biol. Chem. 271, 26482 (1996)、P. Choo-Smith, W. K. Surewicz, FEBS Lett. 402, 95 (1997)、McLaurin J, Chakrabartty A, Eur J Biochem. 245(2)355(1997)、P. Choo-Smith, W. Garzon-Rodriguez, C. G. Globe, W. K. Sutrewicz, J. Biol. Chem. 272, 22987 (1997)、K. Matsuzaki, C. Horikiri, Biochemistry 38, 4137 (1999)、V. Koppaka, P. H. Axelsen, Biochemistry 39, 10011 (2000))。

その後、GM1と $A\beta$ とが複合体を形成する分子メカニズムについて、 $A\beta$ のGM1への結合が、結合する膜のコレステロールの濃度に依存していること、即ち、高濃度のコレステロールにより膜上のGM1「クラスター」の形成が促され、これにより $A\beta$ とGM1との結合が促進されることが報告された(A. Kakio, S. Nishimoto, K. Yanagisawa, Y. Kozutumi, K. Matsuzaki, J. Biol. Chem. 276, 24985 (2001))。また、シナプス膜のexofacial leafletsにおけるコレステロール濃度は加齢及び/又はアポリポタンパク質E (Apo E)の欠乏とともに有意に増加することから(U. Igbavboa, N. A. Avdulov, F. Schroeder, W. G. Wood, J. Neurochem. 66, 1717 (1996)、U. Igbavboa, N. A. Avdulov, S. V. Chochina, W. G. Wood, J. Neurochem. 69, 1661 (1997))、 $A\beta$ は老化脳のシナプス膜においてGM1に結合することが推測された。一方、GM1及びコレステロールを豊富に含む膜ドメイン(raftsと呼ばれる)は生理的に多量の $A\beta$ を含有し、かつある種の家族性アルツハイマー病モデルマウスにおいて不溶性 $A\beta$ を蓄積することから、 $A\beta$ はこの膜ドメイン(rafts)においてGM1に結合する可能性も推測された(R. G. Parton, J. Histochem. Cytochem. 42, 155 (1994)、K. Simons, E. Ikonen, Nature 387, 569 (1997)、S. J. Lee et al., Nat. Med. 4, 730 (1998)、M. Morishima-Kawashima, Y. Ihara, Biochemistry 37, 15274 (1998)、N. Sawamura et al., J. Biol. Chem. 275, 27901 (2000))。

【0006】

その後、本発明者らは、抗体(4396C)を用いた免疫学的手法で生体中の $A\beta$ 線維形成の種(GA β 複合体)中にはGM1が含まれることを示すとともに、この抗体がアルツハイマー病脳からGA β 複合体を認識し、GA β 複合体を種とする $A\beta$ 重合を抑制することを明らかにした。これらの結果からアルツハイマー病発症機構を説明するアミロイド仮説の中でもその核心である $A\beta$ 線維形成の種形成機構が、実際に生体内で起きている可能性を示唆した。(国際公開第03/014162号公報、J Neurosci., 2004, 24: 4894-4902)

【0007】

【特許文献1】国際公開第03/014162号公報

【非特許文献1】K. Yanagisawa, A. Odaka, N. Suzuki, Y. Ihara, Nat. Med. 1, 1062 50

(1995)

- 【非特許文献 2】 K. Yanagisawa, Y. Ihara, *Neurobiol. Aging* 19, S65 (1998)
- 【非特許文献 3】 *FEBS Letters* 420, 43–46 (1997)
- 【非特許文献 4】 J. McLaurin, A. Chakrabartty, *J. Biol. Chem.* 271, 26482 (1996)
- 【非特許文献 5】 P. Choo-Smith, W. K. Surewicz, *FEBS Lett.* 402, 95 (1997)
- 【非特許文献 6】 McLaurin J, Chakrabartty A, *Eur J Biochem.* 245(2)355(1997)
- 【非特許文献 7】 P.Choo-Smith, W. Garzon-Rodriguez, C. G. Globe, W. K. Sutrewicz, *J. Biol. Chem.* 272, 22987 (1997)
- 【非特許文献 8】 K. Matsuzaki, C. Horikiri, *Biochemistry* 38, 4137 (1999)
- 【非特許文献 9】 V. Koppaka, P. H. Axelsen, *Biochemistry* 39, 10011 (2000) 10
- 【非特許文献 10】 A. Kakio, S. Nishimoto, K. Yanagisawa, Y. Kozutumi, K. Matsuza ki, *J.Biol.Chem.*, 276, 24985(2001)
- 【非特許文献 11】 U.Igbavboa, N.A.Avdulov, F.Schroeder, W.G.Wood, *J.Neurochem.* 66, 1717 (1996)
- 【非特許文献 12】 U.Igbavboa, N.A.Avdulov, S.V.Chochina, W.G.Wood, *J.Neurochem.* 69, 1661 (1997)
- 【非特許文献 13】 R.G.Parton, *J. Histochem. Cytochem.* 42, 155(1994)
- 【非特許文献 14】 K.Simons, E.Ikonen, *Nature* 387, 569 (1997)
- 【非特許文献 15】 S.J.Lee et al., *Nat. Med.* 4, 730 (1998)
- 【非特許文献 16】 M. Morishima-Kawashima, Y.Ihara, *Biochemistry* 37, 15274 (1998) 20
- 【非特許文献 17】 N.Sawamura et al., *J. Biol. Chem.* 275, 27901 (2000)
- 【非特許文献 18】 *J Neurosci.*, 2004, 24: 4894–4902
- 【発明の開示】
- 【発明が解決しようとする課題】
- 【0008】

アルツハイマー病を標的とする治療法や診断法の開発のためには、アミロイド線維形成 ($A\beta$ 重合) を効果的に阻害する抗体、特に $GA\beta$ 複合体に対する特異性の高い抗体を効率的に得る手段が必要である。従来、アルツハイマー治療にはワクチン療法などの免疫反応を起こす物質を直接接種または摂取することによって、身体の中に存在する免疫系を刺激し活性化する「能動免疫療法」や活性化リンパ球療法などの免疫反応を担うリンパ球などを身体の外で活性化して再び身体に戻す「受動免疫療法」も考慮されてきたが、アミロイド線維形成に対する十分な阻害活性を発揮する抗体は得られていなかった。本発明者らは、高い阻害活性を有する抗体が得られない原因が免疫原として使用される $A\beta$ にあり、 $A\beta$ に代えて $GA\beta$ 複合体を免疫原とすれば阻害活性の一層高い抗体を産生させることができると考えた。しかしながら、 $GA\beta$ 複合体をアルツハイマー病脳から大量に高純度で得ることは技術的にも材料の入手の点でも難しいことから、このアプローチは現実的でない。

ところで本発明者らは、4396抗体を用いて、アルツハイマー病患者脳および高齢カニクイザル脳内にこの抗体が反応する抗原が対照と比較して多量に存在し、かつ高齢カニクイザル脳内では GM1 および $A\beta$ と組織学的および物理的にも共存していることを示した (国際公開第 03/014162 号公報、*J Neurosci.*, 2004, 24: 4894–4902)。in vitro で GM1 を含むリポソームと $A\beta$ を反応させた実験によって、アルツハイマー病患者脳の $A\beta$ に富む粗分画を免疫原として得られた 4396 抗体 (*FEBS Letters* 420, 43–46 (1997)) が反応する抗原は $GA\beta$ であることが証明された。従来知られている $A\beta$ を認識する抗体の中には、 $A\beta$ だけでなく $GA\beta$ とも反応するものがある (たとえば BAN052, *J Neurosci.*, 2004, 24: 4894–4902) が、重合していない $A\beta$ およびその前駆タンパク質である APP を認識しない抗体でかつ $GA\beta$ と反応する抗体は 4396 抗体が初めてである。この抗体の特性を in vitro で Thioflavin T を用いた $A\beta$ の線維形成測定法で更に調べたところ、従来の $A\beta$ を認識する抗体には見られない線維形成阻害活性を用量依存的に示した。このことから、4396 抗体が認識する $GA\beta$ を in vitro で作製することで、生体中の $GA\beta$ と同等の性質を持っている大量かつ既知の組成からなる免疫原が得られる。この抗原から得られた抗体の中から、 $GA\beta$ と反応するが 50

その構成成分 ($A\beta$ と $GM1$) 単独とは反応しない性質を持つ抗体を選択することで、 $A\beta$ の線維形成を阻害するという、4396抗体の持つ性質と同様の性質を持つ抗体が取得できると期待された。しかしながら、至適な $GA\beta$ の調製法が確立されていなかった。

【課題を解決するための手段】

【0009】

以上の背景の下、本発明者らは、アミロイド線維形成に対する阻害活性（以下、「 $A\beta$ 重合阻害活性」ともいう）の高い抗体を得ることを目的として鋭意検討した。まず、 $A\beta$ 重合阻害活性の高い抗体を得るための免疫原として、 $GM1$ とそれに結合した $A\beta$ を含有する合成脂質膜（リポソーム）を採用することとした。 $A\beta$ 重合阻害活性の高い抗体を得るための免疫原であるためには、それを核として $A\beta$ が効率的に重合すること、即ち $A\beta$ 重合開始活性が高いことが要求されると考えられた。そこで、形成される $GA\beta$ 量と $A\beta$ 線維伸長を制御し、より効率的に $A\beta$ の線維形成の阻害活性を持つ抗体を得るためには、 $GM1$ のリポソーム内の構成比変動と結合 $A\beta$ 量の関係を明らかにすることが重要であり、また、 $GM1$ 含有リポソームと $A\beta$ の反応時間の設定も重要であると考え、各種実験を施行した。その結果、合成脂質膜中の $GM1$ の含有量に注目して行った実験によって、合成脂質膜の $A\beta$ 重合開始活性が $GM1$ の含有量に依存することが明らかとなった。また、 $GM1$ 含有リポソームと $A\beta$ の反応時間は短いことが好ましいとの知見を得た。これらの知見に基づいて、適量の $GM1$ を含む合成脂質膜を免疫原とし、抗体の作製を試みた。得られた複数の抗体についてその $A\beta$ 重合阻害活性を検証したところ、通常 $A\beta$ 単独の免疫より $A\beta$ 重合阻害活性が遙かに高い抗体が得られていた。また、このようにして取得された抗体の中には、一度形成された $A\beta$ 線維を脱重合させる活性を有するものも認められた。これらの結果から、 $A\beta$ 重合阻害活性の高い抗体を作製するための材料として上記合成脂質膜が有効であることが確認された。

一方、 $A\beta$ 重合阻害活性の高い抗体についてはそのアミノ酸配列（及び塩基配列）を同定し、可変領域の配列の決定、及び相補性決定領域（CDR）の特定に成功した。可変領域の配列、特に CDR の配列情報は、 $A\beta$ 重合阻害活性の高い抗体を作製する上での極めて重要な情報であり、その利用価値は高い。

以上の検討によって得られた抗体は高い $A\beta$ 重合阻害活性を有することから、それ自体でアルツハイマー病の治療法等の開発に有用である。また、これらの抗体の CDR の情報は、 $A\beta$ 重合阻害活性の高い抗体の本質的特徴であって、これを基に $A\beta$ 重合阻害活性の高い抗体の創出や改変等が可能である。特に、 $A\beta$ 重合阻害活性の高いヒトキメラ抗体、ヒト化抗体等の作製が可能となる。

【0010】

本発明は少なくとも部分的には以上の成果に基づくものであり、次の構成を提供する。即ち、本発明の第1の局面はアミロイド線維形成に対する阻害活性を有する単離された抗体に関し、その一態様では *in vitro* でのアミロイド β タンパク質重合阻害試験において阻害効果が50%以上である。尚、後述のように被験抗体の阻害効果は原則として、 $GA\beta$ 複合体を核とした $A\beta$ 重合が生ずる環境において又は既に $A\beta$ 線維が存在する環境において、被験抗体を添加し所定時間反応させた後の $A\beta$ 重合量と、被験抗体を添加しない条件としたときの $A\beta$ 重合量とを比較することによって算出される。

本発明の抗体は好ましくは、 $GM1$ ガングリオシド結合型アミロイド β タンパク質 ($GA\beta$ 複合体) を認識する。かかる特徴を備えることによって、 $GA\beta$ 複合体を核としたアミロイド線維形成を有効に阻害できる抗体となる。

【0011】

本発明の抗体の一態様は、配列番号：2～4、10～12、18～20、及び26～28のいずれかのアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を含むCDRを有する重鎖可変領域と、配列番号：6～8、14～16、22～24、及び30～32のいずれかのアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を含むCDRを有する軽鎖可変領域とを備える。これらのアミノ酸配列は、アミロイド線維形成に対して高い阻害活性を有するものとして実際に取得及び同定に成功した抗体の配列に由来する。

本発明の抗体は、より具体的には以下のa~hからなる群より選択される組合せの重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を備える。

(a)配列番号：2のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1、配列番号：3のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2、及び配列番号：4のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3からなるCDRを有する重鎖可変領域と、配列番号：6のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号：7のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有するCDR2、及び配列番号：8のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有するCDR3からなるCDRを有する軽鎖可変領域との組合せ

(b)配列番号：10のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1、配列番号：11のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2、及び配列番号：12のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3からなるCDRを有する重鎖可変領域と、配列番号：14のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号：15のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有するCDR2、及び配列番号：16のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有するCDR3からなるCDRを有する軽鎖可変領域との組合せ

(c)配列番号：18のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1、配列番号：19のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2、及び配列番号：20のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3からなるCDRを有する重鎖可変領域と、配列番号：22のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号：23のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有するCDR2、及び配列番号：24のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有するCDR3からなるCDRを有する軽鎖可変領域との組合せ

(d)配列番号：26のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1、配列番号：27のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2、及び配列番号：28のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3からなるCDRを有する重鎖可変領域と、配列番号：30のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号：31のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有するCDR2、及び配列番号：32のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有するCDR3からなるCDRを有する軽鎖可変領域との組合せ

(e)配列番号：1のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と、配列番号：5のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域との組合せ

(f)配列番号：9のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と、配列番号：13のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域との組合せ

(g)配列番号：17のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と、配列番号：21のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域との組合せ

(h)配列番号：25のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と、配列番号：29のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域との組合せ

以上の重鎖可変領域と軽鎖可変領域の組合せは、アミロイド線維形成に対して高い阻害活性を有するものとして実際に取得及び同定に成功した抗体における重鎖可変領域と軽鎖可変領域の組合せに相当する。

【0012】

本発明の抗体をヒト化抗体として構築することができる。ヒト化抗体であることによ

て、本発明の抗体は特に治療目的に好適なものとなる。

本発明の抗体は、完全な抗体（即ち定常領域及び可変領域をそれぞれ備える重鎖及び軽鎖からなる抗体）であっても、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、又はdsFv抗体などの抗体断片であってもよい。

【0013】

本発明の他の局面は、アミロイド線維形成に対する阻害活性の高い抗体のCDR領域を提供する。具体的には配列番号：2～4、6～8、10～12、14～16、18～20、22～24、26～28、及び30～32のいずれかのアミノ酸配列を含むCDRが提供される。これらのCDRは、アミロイド線維形成に対する阻害活性の高い抗体を構築すること 10
に使用され得、その利用価値は高い。特に、ヒト型乃至ヒト化抗体を構築する上で重要な材料となる。

【0014】

本発明は更に、本発明の抗体の重鎖可変領域若しくは軽鎖可変領域、本発明の抗体の重鎖若しくは軽鎖、又は本発明のCDR領域をコードする単離された核酸分子を提供する。当該核酸分子を利用して、アミロイド線維形成に対する阻害活性の高い抗体を作製することが可能である。

【0015】

本発明はまた、上記核酸分子を発現可能に保持するベクター、及び上記核酸分子が導入されている形質転換体を提供する。当該ベクター及び形質転換体はそれぞれ例えばアミロイド線維形成に対する阻害活性の高い抗体を作製することに利用され得る。 20

【0016】

本発明の更なる局面では、アミロイド線維形成に対する阻害活性の高い抗体を作製することに利用可能な動物免疫用の合成脂質膜が提供される。本発明の合成脂質膜は、GM1ガングリオシドと、その他の脂質と、及び該GM1ガングリオシドに結合したアミロイドβタンパク質とを含有し、その他の脂質：GM1ガングリオシド＝90：10～60：40の範囲にあることを特徴とする。

本発明はさらに、上記合成脂質膜を利用した抗体作製方法を提供する。本発明の作製方法は、上記合成脂質膜を非ヒト動物に免疫する免疫ステップと、免疫後の前記非ヒト動物から取り出した抗体産生細胞を不死化細胞と融合し、ハイブリドーマを得るハイブリドーマ作製ステップと、上記合成脂質膜に結合性を有する抗体を産生するハイブリドーマを選 30
抜するハイブリドーマ選抜ステップと、及び選抜されたハイブリドーマの発現する抗体を分離する抗体分離ステップと、を含んで構成される。好ましい一形態では、前記ハイブリドーマ選抜ステップにおいて、上記合成脂質膜に結合性を有し且つモノマーアミロイドβタンパク質に結合性を有しない抗体を産生するハイブリドーマを選抜することが行われる。これによって、作製過程において、モノマーアミロイドβタンパク質（即ち非重合状態のアミロイドβタンパク質）に結合性を有する抗体が排除される。従って、合成脂質膜、即ちGAβ複合体に対して特異性の高い抗体を得ることが可能となる。

本発明はまた、抗体ライブラリーを利用した抗体作製方法も提供する。即ち、抗体ライブラリーを上記合成脂質膜に接触させる接触ステップと、抗体ライブラリーの中から上記合成脂質膜に結合性を有するクローンを選抜するクローン選抜ステップと、及び選抜され 40
たクローンの発現する抗体を分離する抗体分離ステップと、を含んで構成される抗体作製方法が提供される。この作製方法においても、GAβ複合体に対して特異性の高い抗体を得るため、前記クローン選抜ステップにおいて前記合成脂質膜に結合性を有し且つモノマーアミロイドβタンパク質に結合性を有しないクローンを選抜することが好ましい。

本発明はさらに、上記作製方法で得られる単離された抗体も提供する。

【0017】

本発明はまた、抗体のアミロイド線維形成に対する阻害活性を測定する方法を提供する。本発明の測定方法では、被験抗体の存在下及び非存在下でそれぞれ、上記合成脂質膜にアミロイドβタンパク質を接触させるステップと、被験抗体の存在下で上記ステップを実施した場合と、被験抗体の非存在下で上記ステップを実施した場合との間で、合成脂質膜 50

へのアミロイド β タンパク質の結合及び／又はアミロイド β タンパク質の重合の程度を比較するステップとが実施される。本発明の測定方法は例えば、本発明の抗体の阻害活性を測定すること、本発明の抗体作製方法において目的の抗体をスクリーニングすること、本発明の抗体作製方法で得られた抗体の阻害活性を確認すること等に利用される。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】図1は、 ^{125}I 標識アミロイド β タンパク質(1-40)のGM1含有リポソームへの結合量を、リポソームを構成する脂質中のGM1とコレステロールのモル比(分子比)を変動させて測定した結果をまとめたグラフである。GM1組成が10-40%で構成されるリポソームに結合するアミロイド β タンパク質(1-40)量は多い。特に、スフィンゴミエリン：コレステロール：GM1(分子比)が64：16：20の場合が最も結合量が多い。 10

【図2】図2は、 ^{125}I 標識アミロイド β タンパク質(1-42)のGM1含有リポソームへの結合量をそのリポソームを構成する脂質中のGM1とコレステロールの分子比を変動させて測定した結果をまとめたグラフである。GM1組成が10-40%で構成されるリポソームに結合するアミロイド β タンパク質(1-42)量は多い。特に、スフィンゴミエリン：コレステロール：GM1(分子比)が64：16：20の場合が最も結合量が多い。

【図3】図3は、GM1リポソームへのA β 結合実験に使用したGM1リポソームの組成(分子比)をまとめた表である。SM：スフィンゴミエリン、Chol：コレステロール、GM1：GM1ガングリオシド。GM1を含まないリポソームはこの組成中のGM1分子比を0とした。各成分の濃度の合計(総濃度)が4600 μM となるように混合した。 20

【図4】図4は、取得した抗体のアミロイド β タンパク質重合阻害活性を三種の重合系(A.A β 線維断片を添加することで開始される重合、B.GA β 40から開始されるA β 40の重合、C.GA β 42から開始されるA β 42の重合)で測定した結果である。*抗体を加えないで重合させた場合の蛍光強度を100%としたときの相対蛍光強度。実験は三回行い、典型的な結果を示した。**線維状A β を添加することで開始される重合反応、GA β 40から開始されるA β 40の重合反応、GA β 42から開始されるA β 42の重合反応をあらわす。***遊離のA β ペプチドと反応するモノクローナル抗体(陰性対照)。

【図5】図5は取得した抗体2E12のアミロイド β タンパク質脱重合活性を測定した結果である。抗体2E12をGA β 添加と同時にA β 40溶液に添加し、経時的にThioflavin Tを用いたA β 40の線維形成測定を行った。2E12添加により明らかな測定値の低下が見られる。 30

【図6】図6は取得した抗体3G11のアミロイド β タンパク質脱重合活性を測定した結果である。抗体3G11をGA β 添加と同時にA β 40溶液に添加し、経時的にThioflavin Tを用いたA β 40の線維形成測定を行った。3G11添加により明らかな測定値の低下が見られる。

【図7】図7は、A β 線維重合に対する抗体2E12と3G11の作用を示す。GM1リポソーム添加から4時間経過後に抗体2E12と3G11を添加した。添加後、経時的にThioflavin T蛍光測定を行った結果をグラフに表した。抗体2E12および3G11の添加により明らかな測定値の低下が見られる。陽性対照としての4396Cを添加した場合はA β 線維伸長反応の抑制が見られ、2E12および3G11を添加した場合には、形成されたA β 線維の破壊効果が見られる。

【図8】図8は、A β 線維重合に対する抗体2E12と3G11の作用を示す。GM1リポソーム添加から24時間経過後に取得抗体2E12と3G11を添加した。添加後、経時的にThioflavin T蛍光測定を行った。2E12および3G11の添加により明らかな測定値の低下が見られる。2E12および3G11を添加した場合には、形成されたA β 線維の破壊効果が見られる。対照として用いた4396Cにはこの作用は認められない。 40

【図9】図9は、GM1含有リポソームの免疫によって得られた、GM1ガングリオシド結合型アミロイド β タンパク質重合を阻害する抗体1C9のH鎖可変領域の遺伝子配列(シーケンスサイズ：363)及びアミノ酸配列を示す図である。CDRは相補性決定部位(complementarity determining region)を表す。

【図10】図10は、GM1含有リポソームの免疫によって得られた、GM1ガングリオシド結合型アミロイド β タンパク質重合を阻害する抗体1C9のL鎖可変領域の遺伝子配列(シーケンスサイズ：327)及びアミノ酸配列を示す図である。CDRは相補性決定部位(complementarity determining region)を表す。 50

ntarity determing region) を表す。

【図 1 1】図 1 1 は、GM1 含有リポソームの免疫によって得られた、GM1 ガングリオシド結合型アミロイド β タンパク質重合を阻害する抗体 2E12 の H 鎖可変領域の遺伝子配列（シーケンスサイズ：345）及びアミノ酸配列を示す図である。CDR は相補性決定部位（complementarity determing region）を表す。

【図 1 2】図 1 2 は、GM1 含有リポソームの免疫によって得られた、GM1 ガングリオシド結合型アミロイド β タンパク質重合を阻害する抗体 2E12 の L 鎖可変領域の遺伝子配列（シーケンスサイズ：327）及びアミノ酸配列を示す図である。CDR は相補性決定部位（complementarity determing region）を表す。

【図 1 3】図 1 3 は、GM1 含有リポソームの免疫によって得られた、GM1 ガングリオシド結合型アミロイド β タンパク質重合を阻害する抗体 3G11 の H 鎖可変領域の遺伝子配列（シーケンスサイズ：339）及びアミノ酸配列を示す図である。CDR は相補性決定部位（complementarity determing region）を表す。 10

【図 1 4】図 1 4 は、GM1 含有リポソームの免疫によって得られた、GM1 ガングリオシド結合型アミロイド β タンパク質重合を阻害する抗体 3G11 の L 鎖可変領域の遺伝子配列（シーケンスサイズ：339）及びアミノ酸配列を示す図である。CDR は相補性決定部位（complementarity determing region）を表す。

【図 1 5】図 1 5 は、GM1 含有リポソームの免疫によって得られた、GM1 ガングリオシド結合型アミロイド β タンパク質重合を阻害する抗体 4E11 の H 鎖可変領域の遺伝子配列（シーケンスサイズ：366）及びアミノ酸配列を示す図である。CDR は相補性決定部位（complementarity determing region）を表す。 20

【図 1 6】図 1 6 は、GM1 含有リポソームの免疫によって得られた、GM1 ガングリオシド結合型アミロイド β タンパク質重合を阻害する抗体 4E11 の L 鎖可変領域の遺伝子配列（シーケンスサイズ：342）及びアミノ酸配列を示す図である。CDR は相補性決定部位（complementarity determing region）を表す。

【図 1 7】図 1 7 は発現ベクターの構成例を示した図である。図 1 7 (A) には、H 鎖発現ベクター（BCMGSneo-H）の構成が示される。図 1 7 (B) には、L 鎖発現ベクター（BCMGSneo-L）の構成が示される。

【図 1 8】図 1 8 は、ヒト型 CDR 移植抗体可変領域 DNA の作製方法を模式的に示した図である。 30

【発明を実施するための最良の形態】

【0019】

（用語の説明）

説明の便宜上、本明細書に使用される用語の一部についてその定義をまとめて以下に示す。

本明細書において、アミロイド β タンパク質を略して「A β 」ともいう。また、GM1 ガングリオシドを略して「GM1」ともいう。同様に、GM1 ガングリオシド結合型アミロイド β タンパク質を略して「GA β タンパク質」又は「GA β 複合体」ともいう。

本明細書において「アミロイド β タンパク質重合阻害活性」は、特に記載のない限り、アミロイド β タンパク質の重合を抑制する活性、及び重合したアミロイド β タンパク質を脱重合させる活性を含む用語として用いられる。 40

【0020】

本明細書において用語「～を含む」又は「～を含んでなる」は、「～からなる」の意味をも含む表現として使用される。したがって例えば、「複数の要素（部材）を含んで構成される物（又は方法）」と記載した場合には、それが意味するものとして「当該複数の要素（部材）から構成される物（又は方法）」も当然に考慮される。

【0021】

「単離された」とは、その本来の環境（例えば天然の物質の場合は天然の環境）から取り出された状態、即ち人為的操作によって本来の存在状態と異なる状態で存在していることを意味する。従って用語「単離された抗体」には、天然であって且つ何ら外的操作（人 50

為的操作)が施されていない抗体、即ちある個体の体内で産生され、そこに留まっている状態の抗体は含まれない。尚、単離された抗体は、典型的には、他の種類の抗体が混在していない状態、即ち単独で(同種の抗体の集合として)存在している。CDR領域の場合の「単離された」状態には、単独で存在している状態に加え、抗体の他の領域とともに存在している状態も含まれる。即ち、用語「単離されたCDR」には、単独で存在しているCDRは勿論のこと、単離された抗体の一部として存在しているCDRも含まれる。核酸については、それがベクターや組成物の一部として存在しているても又は外来性分子として細胞内に存在しているても、人為的操作の結果として存在している限り「単離された核酸」に該当する。

【0022】

10

アミノ酸配列に関して使用する用語「実質的に同一」とは、比較される二つのアミノ酸配列間で配列上の相違が比較的小さく且つ配列上の相違がアミロイド β タンパク質重合阻害能に関して実質的な影響を与えないことを意味する。基準となるアミノ酸配列に対して、アミロイド β タンパク質重合阻害活性に実質的な影響を与えない範囲で一部の改変を含んでいるとみることができるアミノ酸配列は実質的に同一なアミノ酸配列である。ここでの「アミノ酸配列の一部の改変」とは、アミノ酸配列を構成する1～数個のアミノ酸の欠失、置換、若しくは1～数個のアミノ酸の付加、挿入、又はこれらの組合せによりアミノ酸配列に変化が生ずることをいう。アミノ酸配列の変異の位置は特に限定されず、複数の位置で変異を生じていてもよい。ここでの複数とはアミノ酸配列を構成する全アミノ酸の例えば10%以内に相当する数であり、好ましくは全アミノ酸の5%以内に相当する数である。さらに好ましくは全アミノ酸の1パーセント以内に相当する数である。

20

二つのアミノ酸が実質的に同一であるか否かは、各アミノ酸配列を含む抗体(他の領域の配列は同一)のアミロイド β タンパク質重合阻害活性(以下、特に記載のない限り「阻害活性」は「アミロイド β タンパク質重合阻害活性」を意味する)を比較することによって判定できる。具体的には、基準となるアミノ酸配列を含む抗体の阻害活性を100%とし、これに対する比率として比較対象のアミノ酸配列を含む抗体の阻害活性が例えば50%以下である場合など、阻害活性の差が顕著であれば実質的な同一性を認定できない。一方で、例えば70%～130%である場合など阻害活性に大きな差が認められなければ実質的な同一性を認定できる。

【0023】

30

アミロイド線維の形成を阻害する抗体、即ちアミロイド線維形成に対する阻害活性を有する抗体のことを本明細書では「A β 重合阻害抗体」ともいう。また、A β 重合阻害抗体の中で、GM1ガングリオシド結合型アミロイド β タンパク質(GA β 複合体)を特異的に認識する抗体のことを特に「抗GA β 抗体」ともいう。

【0024】

本明細書における用語「核酸」はDNA(cDNA及びゲノムDNAを含む)、RNA(mRNAを含む)、DNA類似体、及びRNA類似体を含む。本発明の核酸の形態は限定されず、即ち1本鎖及び2本鎖のいずれであってもよい。好ましくは2本鎖DNAである。またコドンの縮重も考慮される。即ちタンパク質をコードする核酸の場合には、その発現産物として当該タンパク質が得られる限り任意の塩基配列を有してよい。本明細書において「あるタンパク質(例えば抗体)をコードする核酸」は、それを発現させた場合に当該タンパク質が得られる核酸のことをいい、当該タンパク質のアミノ酸配列に対応する塩基配列を有する核酸は勿論のこと、そのような核酸にアミノ酸配列をコードしない配列が付加されてなる核酸(例えば1又は複数個のイントロンを含むDNA)をも含む。

40

【0025】

本明細書において用語「単離された核酸」とは、もともと天然に存在している核酸(例えばヒト生体内の核酸)の場合、典型的には、天然状態において共存するその他の核酸から分離された状態の核酸をいう。但し、天然状態において隣接する核酸配列など一部の他の核酸成分を含んでもよい。例えばゲノムDNAの場合の「単離された核酸」の好ましい形態では、天然状態において共存する他のDNA成分(天然状態において隣接するDNA配

50

列を含む)を実質的に含まない。

例えばcDNA分子など遺伝子組み換え技術によって生産される核酸の場合の「単離された核酸」は好ましくは、細胞成分や培養液などを実質的に含まない状態の核酸をいう。同様に、化学合成によって生産される核酸の場合の「単離された核酸」は好ましくは、dNTPなどの前駆体(原材料)や合成過程で使用される化学物質等を実質的に含まない状態の核酸をいう。

ベクターや組成物の一部として核酸が存在していても、又は外来性分子として細胞内に核酸が存在していても、人為的操作の結果として存在している限り「単離された核酸」と言える。尚、特に言及しない限り、本明細書において単に「核酸」と記載した場合には「単離された状態の核酸」を意味する。

10

【0026】

本明細書では必要に応じて、慣習に従い以下の略号(括弧内)を使用する。

重鎖(H鎖)、軽鎖(L鎖)、重鎖可変領域(VH)、軽鎖可変領域(VL)、相補性決定領域(CDR)、第1相補性決定領域(CDR1)、第2相補性決定領域(CDR2)、第3相補性決定領域(CDR3)重鎖の第1相補性決定領域(VH CDR1)、重鎖の第2相補性決定領域(VH CDR2)、重鎖の第3相補性決定領域(VH CDR3)軽鎖の第1相補性決定領域(VL CDR1)、軽鎖の第2相補性決定領域(VL CDR2)、軽鎖の第3相補性決定領域(VL CDR3)

【0027】

本発明の第1の局面は、アミロイド線維形成に対する阻害活性を有する単離された抗体(A β 重合阻害抗体)に関する。ここでの用語「抗体」はポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、CDRグラフト抗体、ヒト化抗体、又はこれらの断片等を含む。

20

本発明のA β 重合阻害抗体は、in vitroでのアミロイド β タンパク質重合阻害試験(以下参照)において阻害効果が50%以上であることを特徴とする。このような高い阻害効果によって、本発明の抗体はアミロイド線維の形成を効果的に阻害することができる。

本発明の抗体のA β 重合に対する阻害効果は好ましくは70%以上であり、さらに好ましくは80%以上であり、より一層好ましくは90%以上であり、最も好ましくは実質的に100%である。

本発明の抗体は、好ましくは、QM1ガングリオシド結合型アミロイド β タンパク質(GA β 複合体)を認識する。当該抗体ではアミロイド線維形成の初期段階を阻害する効果を期待できる。従って、アルツハイマー病の発症の防止、アルツハイマー病の初期診断などにおいて特に有用性の高い抗体となる。

30

【0028】

本明細書における「アミロイド線維形成に対する阻害活性(A β 重合阻害活性)」は原則として以下のいずれかの試験(1.~3.)によって測定・評価される。但し、以下の試験と同等であると見なされる他の試験、又はその試験結果を以下の試験で得られる結果へ換算して同等の評価が可能な他の試験によってアミロイド β タンパク質重合阻害活性を測定・評価してもよい。

【0029】

1. A β 重合阻害試験1(A β 線維を添加することで開始される重合に対する阻害効果)

40

1-1. A β 溶液の調製

A β 溶液を以下の手順で調製する。まず、合成A β_{1-40} (例えばLot.501001(ペプチド研究所、大阪、日本)又はLot.519599(Bachem AG, スイス))を最初に0.002%のアンモニア溶液に約500 μ Mとなるように溶解し、100,000rpmで3時間遠心する(TLA120.0ローター、Optima TL、ベックマン、カルフォルニア州、米国)。上清の上3分の2を集め、A β の濃度を決定する。A β 溶液は小分けして使用時まで-80℃に保存する。使用直前に溶解し、生理的トリス緩衝液(TBS:150mM NaCl及び10mM Tris-HCl, pH7.4)で適切な濃度に希釈する。

【0030】

1-2. 線維状A β 溶液の調製

50

線維状A β 溶液を以下の手順で調製する。まず、合成A β_{1-40} （例えばLot.501001（ペプチド研究所、大阪、日本）又はLot.519599（Bachem AG, スイス））を4℃で約500 μ Mのアンモニア溶液に短時間ボルテックスすることにより溶解し、インキュベーションバッファー（50mMリン酸緩衝液、pH7.5；100mM NaCl）で50 μ Mに希釈する。37℃で24時間インキュベートした後、混合液を 1.6×10^4 g、4℃で3時間遠心する。エッペンドルフチューブ内で沈渣を0.005%NaN₃を含む氷冷したインキュベーションバッファーに再懸濁し、マイクロチップ（TP-030、TOMY、東京、日本）を備えた超音波破碎機（UD-201、TOMY、東京、日本）を用いて氷上で超音波処理し、使用時まで4℃で保存する。

【0031】

1-3. 阻害効果の評価

10

(1)被験抗体の存在下（試験群）又は非存在下（対照群）において、線維状A β 溶液（5 μ l）と、A β 溶液（100 μ l）とを混合し、37℃でインキュベーションする。

(2)Thioflavin Tを用いたA β の線維形成測定を、Naiki H and Gejyo F(1999) Methods Enzymol 309, 305-318に従って行う。まず、インキュベーション開始から所定時間経過後（例えば4時間）の溶液の一部（5 μ l）をサンプリングし、これに終濃度5 μ MとなるようにThioflavin T (Sigma) を添加する。1mlの50mMグリシン水酸化ナトリウム緩衝液で希釈した後、A β 線維の蛍光強度（励起波長446nm、蛍光波長490nm）を分光蛍光光度計（例えばRF-5300PC、島津製作所）で測定する。

(3)以下の計算式で被験抗体の阻害効果（阻害活性）を求める。

$$\text{阻害効果 (\%)} = (\text{対照群の蛍光強度} - \text{試験群の蛍光強度}) / \text{対照群の蛍光強度} \times 100$$

【0032】

2. A β 重合阻害試験2（GA β 40から開始されるA β 40の重合に対する阻害効果）

2-1. A β 溶液の調製方法

上記1-1.と同様の手順でA β 溶液を調製する。

【0033】

2-2. GM1ガングリオシドを含む合成脂質の調製

GM1ガングリオシドを含む合成脂質を以下の手順で調製する。まず、コレステロールとスフィンゴミエリン（シグマ-アルドリッチ、セントルイス、ミズーリー州、米国）及びGM1（和光純薬工業株式会社、大阪、日本）をクロロホルム/メタノール混液（1:1）に2:2:1の割合で1モル濃度に溶解する。この混液を窒素ガスで1時間乾燥し、-40℃で使用時まで保存する。使用直前に乾燥した脂質混合物をGM1濃度が2.5mMになるようにTBSに再懸濁し、液体窒素を用いて10回凍結溶解を行う。この脂質懸濁液を13,000rpmで15分間遠心し（MX-160、TOMY、東京、日本）、沈渣を再度GM1が同濃度になるようTBSに再懸濁する。最後にこの懸濁液を氷上で5分間マイクロチップ（TP-030、TOMY、東京、日本）を備えた超音波破碎機（UD-201、出力レベル2、TOMY、東京、日本）を用いて超音波処理し、これを3回繰り返す。

【0034】

2-3. 阻害効果の評価

(1)被験抗体の存在下（試験群）又は非存在下（対照群）において、GM1ガングリオシドを含む合成脂質とA β 溶液とを混合し、37℃でインキュベーションする。

(2)Thioflavin Tを用いたA β の線維形成測定を、Naiki H and Gejyo F(1999) Methods Enzymol 309, 305-318に従って行う。まず、インキュベーション開始から所定時間経過後（例えば20時間）の溶液の一部（5 μ l）をサンプリングし、これに終濃度5 μ MとなるようにThioflavin T (Sigma) を添加する。1mlの50mMグリシン水酸化ナトリウム緩衝液で希釈した後、A β 線維の蛍光強度（励起波長446nm、蛍光波長490nm）を分光蛍光光度計（例えばRF-5300PC、島津製作所）で測定する。

(3)以下の計算式で被験抗体の阻害効果（阻害活性）を求める。

$$\text{阻害効果 (\%)} = (\text{対照群の蛍光強度} - \text{試験群の蛍光強度}) / \text{対照群の蛍光強度} \times 100$$

40

尚、GM1ガングリオシドを含む脂質膜は通常、ポリスチレン樹脂、ポリカーボネート樹脂、シリコン樹脂、ナイロン樹脂等の樹脂やガラス等からなるビーズ、マイクロプレート等の不溶性支持体に結合した状態で使用される。

【0035】

3. $A\beta$ 重合阻害試験2 (GA β 42から開始される $A\beta$ 42の重合に対する阻害効果)

合成 $A\beta_{1-40}$ に代えて合成 $A\beta_{1-42}$ (例えば、Amyloid β -Protein (Human, 1-42)、コード4349-v、ペプチド研究所、大阪) を使用して上記1-1.の手順に従い $A\beta$ 溶液を調製する。一方、上記2-2.と同様の手順でGM1ガングリオシドを含む合成脂質を調製する。これら二つの溶液を用いて、上記2-3.と同様の手順で阻害効果を評価する。

【0036】

10

以下の実施例に示すように、本発明者らはアミロイド線維形成に対する阻害活性の高い4種類の抗体(1C9抗体、2E12抗体、3G11抗体、4E11抗体)を取得することに成功した。各抗体の可変領域の配列を解析した結果、以下の配列情報が得られた。尚、抗体名に続けて、重鎖可変領域のアミノ酸配列；重鎖CDR1のアミノ酸配列；重鎖CDR2のアミノ酸配列、重鎖CDR3のアミノ酸配列；軽鎖可変領域のアミノ酸配列；軽鎖CDR1のアミノ酸配列；軽鎖CDR2のアミノ酸配列、軽鎖CDR3のアミノ酸配列の順で記載する。

【0037】

(1)1C9抗体

配列番号：1 (VH)；配列番号：2 (VH CDR1)；配列番号：3 (VH CDR2)；配列番号：4 (VH CDR3)；配列番号：5 (VL)；配列番号：6 (VL CDR1)；配列番号：7 (VL CDR2)；配列番号：8 (VL CDR3) 20

【0038】

(2)2E12抗体

配列番号：9 (VH)；配列番号：10 (VH CDR1)；配列番号：11 (VH CDR2)；配列番号：12 (VH CDR3)；配列番号：13 (VL)；配列番号：14 (VL CDR1)；配列番号：15 (VL CDR2)；配列番号：16 (VL CDR3)

【0039】

(3)3G11抗体

配列番号：17 (VH)；配列番号：18 (VH CDR1)；配列番号：19 (VH CDR2)；配列番号：20 (VH CDR3)；配列番号：21 (VL)；配列番号：22 (VL CDR1)；配列番号：23 (VL CDR2)；配列番号：24 (VL CDR3) 30

【0040】

(4)4E11抗体

配列番号：25 (VH)；配列番号：26 (VH CDR1)；配列番号：27 (VH CDR2)；配列番号：28 (VH CDR3)；配列番号：29 (VL)；配列番号：30 (VL CDR1)；配列番号：31 (VL CDR2)；配列番号：32 (VL CDR3)

【0041】

本発明の抗体の可変領域は、本発明者らが取得に成功した $A\beta$ 重合阻害抗体のCDRの少なくとも一部又はそれと実質的に同一なアミノ酸配列を含む。尚、以下の説明において特定のアミノ酸配列を記載したときには、それ自体のみを表すことが明かである場合を除いて、それは「当該特定のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一なアミノ酸」を意味する。例えば配列番号：1のアミノ酸配列と記載した場合には通常、「配列番号：1のアミノ酸配列又はそれと実質的に同一なアミノ酸」を意味する。 40

具体的には例えば、本発明の抗体の重鎖可変領域は以下の群、即ち(1)配列番号：2のアミノ酸配列、(2)配列番号：3のアミノ酸配列、(3)配列番号：4のアミノ酸配列、(4)配列番号：10のアミノ酸配列、(5)配列番号：11のアミノ酸配列、(6)配列番号：12のアミノ酸配列、(7)配列番号：18のアミノ酸配列、(8)配列番号：19のアミノ酸配列、(9)配列番号：20のアミノ酸配列、(10)配列番号：26のアミノ酸配列、(11)配列番号：27のアミノ酸配列、及び(12)配列番号：28のアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列をCDRの一部又は全部として少なくとも一つ含み (例えばCDR3として含 50

む)、好ましくは二つ含む(例えばCDR2及びCDR3として含む)、更に好ましくは三つ含む(即ちCDR1~3として含む)。ここで上記(1)、(4)、(7)及び(10)は、それが可変領域のCDRとして含まれる場合、CDR1として含まれることが好ましい。同様に上記(2)、(5)、(8)及び(11)はCDR2として含まれることが好ましく、上記(3)、(6)、(9)及び(12)はCDR3として含まれることが好ましい。

一方、本発明の抗体の軽鎖可変領域は以下の群、即ち(13)配列番号：6のアミノ酸配列、(14)配列番号：7のアミノ酸配列、(15)配列番号：8のアミノ酸配列、(16)配列番号：14のアミノ酸配列、(17)配列番号：15のアミノ酸配列、(18)配列番号：16のアミノ酸配列、(19)配列番号：22のアミノ酸配列、(20)配列番号：23のアミノ酸配列、(21)配列番号：24のアミノ酸配列、(22)配列番号：30のアミノ酸配列、(23)配列番号：31のアミノ酸配列、及び(24)配列番号：32のアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列をCDRの一部又は全部として少なくとも一つ含む(例えばCDR3として含む)、好ましくは二つ含む(例えばCDR2及びCDR3として含む)、更に好ましくは三つ含む(即ちCDR1~3として含む)。ここで上記(13)、(16)、(19)及び(22)は、それが可変領域のCDRとして含まれる場合、CDR1として含まれることが好ましい。同様に上記(14)、(17)、(20)及び(23)はCDR2として含まれることが好ましく、上記(15)、(18)、(21)及び(24)はCDR3として含まれることが好ましい。

【0042】

本発明の好ましい一形態の抗体では、重鎖可変領域のCDR1が上記(1)、(4)、(7)及び(10)のいずれかのアミノ酸配列を有し、重鎖可変領域のCDR2が上記(2)、(5)、(8)及び(11)のいずれかのアミノ酸配列を有し、重鎖可変領域のCDR3が上記(3)、(6)、(9)及び(12)のいずれかのアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域のCDR1が上記(13)、(16)、(19)及び(22)のいずれかのアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域のCDR2が上記(14)、(17)、(20)及び(23)のいずれかのアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域のCDR3が上記(15)、(18)、(21)及び(24)のいずれかのアミノ酸配列を有する。

【0043】

本発明の更に好ましい一形態の抗体では重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のCDR3が以下の(A)~(D)のいずれかの組合せである。

(A)重鎖CDR3：配列番号：4のアミノ酸配列、軽鎖CDR3：配列番号：8のアミノ酸配列の組合せ

(B)重鎖CDR3：配列番号：12のアミノ酸配列、軽鎖CDR3：配列番号：16のアミノ酸配列の組合せ

(C)重鎖CDR3：配列番号：20のアミノ酸配列、軽鎖CDR3：配列番号：24のアミノ酸配列の組合せ

(D)重鎖CDR3：配列番号：28のアミノ酸配列、軽鎖CDR3：配列番号：32のアミノ酸配列の組合せ

これらは上から順に1C9抗体、2E12抗体、3G11抗体、及び4E11抗体におけるCDR3の組合せであり、高いA β 重合阻害活性を期待できる。

【0044】

本発明の一層好ましい一形態の抗体では重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のCDR2とCDR3が以下の(E)~(H)のいずれかの組合せである。

(E)重鎖CDR2：配列番号：3のアミノ酸配列、重鎖CDR3：配列番号：4のアミノ酸配列、軽鎖CDR2：配列番号：7のアミノ酸配列、軽鎖CDR3：配列番号：8のアミノ酸配列の組合せ

(F)重鎖CDR2：配列番号：11のアミノ酸配列、重鎖CDR3：配列番号：12のアミノ酸配列、軽鎖CDR2：配列番号：15のアミノ酸配列、軽鎖CDR3：配列番号：16のアミノ酸配列の組合せ

(G)重鎖CDR2：配列番号：19のアミノ酸配列、重鎖CDR3：配列番号：20のアミノ酸配列、軽鎖CDR2：23のアミノ酸配列、軽鎖CDR3：配列番号：24のアミノ酸配列の組合せ

(H)重鎖CDR2：配列番号：27のアミノ酸配列、重鎖CDR3：配列番号：28のアミノ酸配列、軽鎖CDR2：配列番号：31のアミノ酸配列、軽鎖CDR3：配列番号：32のアミノ酸配列の組合せ

これらは上から順に1C9抗体、2E12抗体、3G11抗体、及び4E11抗体におけるCDR2とCDR3の組合せであり、一層高いA β 重合阻害活性を期待できる。

【0045】

本発明の最も好ましい一形態の抗体では重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のCDR1～CDR3が以下の(I)～(L)のいずれかの組合せである。

(I)重鎖CDR1：配列番号：2のアミノ酸配列、重鎖CDR2：配列番号：3のアミノ酸配列、重鎖CDR3：配列番号：4のアミノ酸配列、軽鎖CDR1：配列番号：6のアミノ酸配列、軽鎖CDR2：配列番号：7のアミノ酸配列、軽鎖CDR3：配列番号：8のアミノ酸配列の組合せ 10

(J)重鎖CDR1：配列番号：10のアミノ酸配列、重鎖CDR2：配列番号：11のアミノ酸配列、重鎖CDR3：配列番号：12のアミノ酸配列、軽鎖CDR1：配列番号：14のアミノ酸配列、軽鎖CDR2：配列番号：15のアミノ酸配列、軽鎖CDR3：配列番号：16のアミノ酸配列の組合せ

(K)重鎖CDR1：配列番号：18のアミノ酸配列、重鎖CDR2：配列番号：19のアミノ酸配列、重鎖CDR3：配列番号：20のアミノ酸配列、軽鎖CDR1：配列番号：22のアミノ酸配列、軽鎖CDR2：配列番号：23のアミノ酸配列、軽鎖CDR3：配列番号：24のアミノ酸配列の組合せ

(L)重鎖CDR1：配列番号：26のアミノ酸配列、重鎖CDR2：配列番号：27のアミノ酸配列、重鎖CDR3：配列番号：28のアミノ酸配列、軽鎖CDR1：配列番号：30のアミノ酸配列、軽鎖CDR2：配列番号：31のアミノ酸配列、軽鎖CDR3：配列番号：32のアミノ酸配列の組合せ 20

これらは上から順に1C9抗体、2E12抗体、3G11抗体、及び4E11抗体におけるCDR1～CDR3の組合せであり、より一層高いA β 重合阻害活性を期待できる。

【0046】

可変領域の相補性決定領域（CDR）以外の部分はCDRの構造を保持するための「フレームワーク」と呼ばれる。本発明の抗体の可変領域においてフレームワーク領域（FR領域）の配列は、A β 重合阻害活性に実質的な影響のない限り、特に限定されない。例えば、1C9抗体、2E12抗体、3G11抗体、又は4E11抗体のFR領域又はその一部を改変したアミノ酸配列を本発明の抗体のFR領域として採用することができる。後述のように本発明の抗体をヒト化抗体として構築する場合には、公知のヒト抗体のFR領域を用いることができる。また、検出用の試薬として使用される抗体又はヒト以外の動物種への適用に使用される抗体を構築する場合など、ヒト抗体FR領域を使用しなくとも期待される効果が奏される場合やヒト抗体FR領域を使用することがむしろ適当でない場合がある。このような場合には、ヒト以外の動物種（例えばマウスやラット）のFR領域を用いることができる。 30

【0047】

本発明の抗体は一態様において、可変領域に加えて定常領域を含む（例えばIgG型抗体の場合など）。当該態様における定常領域の配列は特に限定されない。例えば、後述のように本発明の抗体をヒト化抗体として構築する場合には、公知のヒト抗体の定常領域を用いることができる。また、上記定常領域と同様に、ヒト以外の動物種（例えばマウスやラット）の定常領域を用いることもできる。以上のアミノ酸配列又はその一部を改変したアミノ酸配列である。 40

【0048】

本発明の抗体の一形態はヒト化抗体である。ここでの「ヒト化抗体」とは、ヒトの抗体に構造を類似させた抗体のことをいい、抗体の定常領域のみをヒト抗体のものに置換したヒト型キメラ抗体、及び定常領域及び可変領域に存在するCDR（相補性決定領域）以外の部分をヒト抗体のものに置換したヒト型CDR移植（CDR-grafted）抗体（P.T.Johns et al., Nature 321, 522(1986)）を含む。ヒト型CDR移植抗体の抗原結合活性を高めるため、マウス抗体と相同性の高いヒト抗体FRを選択する方法、相同性の高いヒト型化抗体を作製す 50

る方法、ヒト抗体にマウスCDRを移植した後さらにFR領域のアミノ酸を置換する方法の改良技術もすでに開発され（米国特許第5585089号、米国特許第5693761号、米国特許第5693762号、米国特許第6180370号、欧州特許第451216号、欧州特許第682040号、特許第2828340号などを参照）、本発明のヒト型抗体の作製に利用することもできる。

ヒト型キメラ抗体は例えば、上記のH鎖可変領域の構造及び／又はL鎖可変領域の構造を有する抗体（例えば1C9抗体、2E12抗体、3G11抗体又は4E11抗体）の定常領域をヒト抗体の定常領域に置換することにより作製することができる。ヒト抗体の定常領域としては公知のものを採用することができる。以下に、ヒト型キメラ抗体の作製方法の一例を示す。

まず、マウスA β 重合阻害抗体を産生するハイブリドーマよりmRNAを抽出し、常法に従ってcDNAを合成する。合成したcDNAをベクターに組み込みcDNAライブラリーを構築する。このcDNAライブラリーから、H鎖遺伝子フラグメント及びL鎖遺伝子フラグメントをプローブとして用いることにより、H鎖遺伝子及びL鎖遺伝子を含むベクターを選択する。選択されたベクターの挿入配列のシーケンシングを行うことにより、H鎖可変領域及びL鎖可変領域の遺伝子の配列が決定される。このようにして得られた配列データを基にH鎖可変領域をコードするDNAを化学合成、生化学的切断／再結合等により作製する。得られたH鎖可変領域をコードするDNAを、ヒトH鎖定常領域をコードするDNAとライゲーションして発現用ベクターに組込むことによりH鎖発現ベクターを作製する。発現ベクターとしては例えばSV40 virus basedベクター、EB virus basedベクター、BPV（パピローマウイルス）basedベクターなどを用いることができるが、これらに限定されるものではない。一方、同様の方法によりL鎖発現ベクターを作製する。これらH鎖発現ベクター及びL鎖発現ベクターにより宿主細胞を共形質転換する。宿主細胞としてはCHO細胞（チャイニーズハムスター卵巣）（A.Wright & S.L.Morrison, J.Immunol.160, 3393-3402 (1998)）、SP2/O細胞（マウスミエローマ）（K.Motmans et al., Eur.J.Cancer Prev.5, 512-519 (1996)）、R.P.Junghans et al., Cancer Res.50, 1495-1502 (1990)）などが好適に用いられる。また、形質転換にはリポフェクチン法（R.W.Malone et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86, 6077 (1989)）、P.L.Felgner et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84, 7413 (1987)、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法（F.L.Graham & A.J.van der Eb, Virology 52, 456-467 (1973)）、DEAE-Dextran法等が好適に用いられる。

形質転換体を培養した後、形質転換体の細胞内又は培養液よりヒト型キメラ抗体を分離する。抗体の分離、精製には、遠心分離、硫酸分画、塩析、限外濾過、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーなどの方法を適宜組み合わせる利用することができる。

【0049】

一方、ヒト型CDR移植抗体は例えば以下の方法により作製することができる。まず、上記キメラ抗体の製造方法の欄で述べた方法により、マウスA β 重合抗体のH鎖可変領域及びL鎖可変領域のアミノ酸配列及びそれをコードする塩基配列を決定する。併せて各CDR領域のアミノ酸配列及び塩基配列を決定する。

具体的なCDRの塩基配列として例えば以下の塩基配列を用いることができる。

H鎖CDR1 (VH CDR1) : 配列番号 : 34、42、50、及び58のいずれかの塩基配列

H鎖CDR2 (VH CDR2) : 配列番号 : 35、43、51、及び59のいずれかの塩基配列

H鎖CDR3 (VH CDR3) : 配列番号 : 36、44、52、及び60のいずれかの塩基配列

L鎖CDR1 (VL CDR1) : 配列番号 : 38、46、54、及び62のいずれかの塩基配列

L鎖CDR2 (VL CDR2) : 配列番号 : 39、47、55、及び63のいずれかの塩基配列

L鎖CDR3 (VL CDR3) : 配列番号 : 40、48、56、及び64のいずれかの塩基配列

【0050】

CDRの塩基配列として、以下のいずれかの組合せを用いることが好ましい。

(1) VH CDR1 : 配列番号 : 34の塩基配列、VH CDR2 : 配列番号 : 35の塩基配列、VH CDR3 : 配列番号 : 36の塩基配列、VL CDR1 : 配列番号 : 38の塩基配列、VL CDR2 : 配列番号 : 39の塩基配列、及びVL CDR3 : 配列番号 : 40の塩基配列の組合せ

(2) VH CDR1 : 配列番号 : 42の塩基配列、VH CDR2 : 配列番号 : 43の塩基配列、VH C

DR3: 配列番号: 44の塩基配列、VL CDR1: 配列番号: 46の塩基配列、VL CDR2: 配列番号: 47の塩基配列、及びVL CDR3: 配列番号: 48の塩基配列の組合せ

(3) VH CDR1: 配列番号: 50の塩基配列、VH CDR2: 配列番号: 51の塩基配列、VH CDR3: 配列番号: 52の塩基配列、VL CDR1: 配列番号: 54の塩基配列、VL CDR2: 配列番号: 55の塩基配列、及びVL CDR3: 配列番号: 56の塩基配列の組合せ

(4) VH CDR1: 配列番号: 58の塩基配列、VH CDR2: 配列番号: 59の塩基配列、VH CDR3: 配列番号: 60の塩基配列、VL CDR1: 配列番号: 62の塩基配列、VL CDR2: 配列番号: 63の塩基配列、及びVL CDR3: 配列番号: 64の塩基配列の組合せ

尚、これらは上から順に1C9抗体、2E12抗体、3G11抗体、及び4E11抗体における各CDRの組合せに相当する。

10

【0051】

次に、CDR領域を挟んで存在するFR（フレームワーク領域）を選択する。FRの選択には、およそ三つの方法が採用できる。1つめの方法は、NEWM、REIなど既に三次元構造の明らかとなったヒト抗体フレームを用いる方法である（Riechmann L. et al., Nature 332, 323-327 (1988); Tempst, PR. et al., Protein Engineering 7, 1501-1507 (1994); Ellis JH. et al., J. Immunol 155, 925-937 (1995)）。2つめの方法は、目的のマウス抗体可変領域と最も高いホモロジーを持つヒト抗体可変領域をデータベースより選択し、そのFRを用いる方法である（Queen C. et al., Proc Natl Acad Sci USA 86, 10029-10033 (1989); Rozak MJ. et al., J Biol Chem 271, 22611-22618 (1996); Shearman CW. et al., J. Immunol 147, 4366-4373 (1991)）。3つめの方法は、ヒト抗体のFRで最も共通に用いられるアミノ酸を選択する方法である（Sato K. et al., Mol Immunol 31, 371-381 (1994); Kobinger F. et al., Protein Engineering 6, 971-980 (1993); Kettleborough C A. et al., Protein Engineering 4, 773-783 (1991)）。本発明ではこれらいずれの方法を用いることもできる。

20

【0052】

尚、選択されたヒトFRのアミノ酸配列を改変したアミノ酸配列であっても、最終的に得られるヒト型CDR移植抗体がA β 線維の形成を効果的に阻害する限り、FRのアミノ酸配列として利用することができる。特に、選択されたヒトFRのアミノ酸の一部をCDRの由来となった抗体のFRのアミノ酸に変更した場合、抗体の特性が維持される可能性が高い。改変されるアミノ酸の数は好ましくはFR全体の30%以下であり、更に好ましくはFR全体の20%以下であり、更に更に好ましくはFR全体の10%以下である。

30

次に、これらいずれかの方法により選択したFRと上記CDRとを組み合わせることによりH鎖可変領域及びL鎖可変領域をコードするDNAを設計する。この設計を基にH鎖可変領域をコードするDNAとL鎖可変領域をコードするDNAを化学合成、生化学的切断／再結合等によりそれぞれ作製する。そしてH鎖可変領域をコードするDNAを、ヒト免疫グロブリンH鎖定常領域をコードするDNAとともに発現ベクターに組み込みH鎖発現ベクターを構築する。同様に、L鎖可変領域をコードするDNAを、ヒト免疫グロブリンL鎖定常領域をコードするDNAとともに発現ベクターに組み込みL鎖発現ベクターを構築する。発現ベクターとしては例えばSV40 virus basedベクター、EB virus basedベクター、BPV（パピローマウイルス）basedベクターなどを用いることができるが、これらに限定されるものではない。

40

以上の方法で作製されたH鎖発現ベクター及びL鎖発現ベクターにより宿主細胞を共形質転換する。宿主細胞としてはCHO細胞（チャイニーズハムスター卵巣）（A. Wright & S. L. Morrison, J. Immunol. 160, 3393-3402 (1998)）、SP2/O細胞（マウスミエローマ）（K. Motmans et al., Eur. J. Cancer Prev. 5, 512-519 (1996); R. P. Junghans et al., Cancer Res. 50, 1495-1502 (1990)）などが好適に用いられる。また、形質転換にはリポフェクション法（R. W. Malone et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 6077 (1989); P. L. Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7413 (1987)）、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法（F. L. Graham & A. J. van der Eb, Virology 52, 456-467 (1973)）、DEAE-Dextran法等が好適に用いられる。

形質転換体を培養した後、形質転換体の細胞内又は培養液よりヒト型CDR移植抗体を分

50

離する。抗体の分離、精製には、遠心分離、硫酸分画、塩析、限外濾過、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーなどの方法を適宜組み合わせる利用することができる。

【0053】

本発明の抗体を基にして又は本発明の抗体をコードする遺伝子の配列情報を基にして抗体断片を作製することができる。抗体断片としてはFab、Fab'、F(ab')₂、scFv、dsFv抗体が挙げられる。

Fabは、IgGをシステイン存在下パパイニン消化することにより得られる、L鎖とH鎖可変領域、並びにC_H1ドメイン及びヒンジ部の一部からなるH鎖フラグメントとから構成される分子量約5万の断片である。本発明では、上記抗体をパパイニン消化することにより得ることができる。また、上記抗体のH鎖の一部及びL鎖をコードするDNAを適当なベクターに組み込み、当該ベクターを用いて形質転換した形質転換体よりFabを調製することもできる。

Fab'は、後述のF(ab')₂のH鎖間のジスルフィド結合を切断することにより得られる分子量が約5万の断片である。本発明では、上記抗体をペプシン消化し、還元剤を用いてジスルフィド結合を切断することにより得られる。また、Fab同様に、Fab'をコードするDNAを用いて遺伝子工学的に調製することもできる。

F(ab')₂は、IgGをペプシン消化することにより得られる、L鎖とH鎖可変領域、並びにC_H1ドメイン及びヒンジ部の一部からなるH鎖フラグメントとから構成される断片(Fab')がジスルフィド結合で結合した分子量約10万の断片である。本発明では、上記抗体をペプシン消化することにより得られる。また、Fab同様に、F(ab')₂をコードするDNAを用いて遺伝子工学的に調製することもできる。

scFvは、H鎖可変領域とL鎖可変領域とからなるFvを、片方の鎖のC末端と他方のN末端とを適当なペプチドリンカーで連結し一本鎖化した抗体断片である。ペプチドリンカーとしては例えば柔軟性の高い(GGGGS)₃などを用いることができる。例えば、上記抗体のH鎖可変領域及びL鎖可変領域をコードするDNAとペプチドリンカーをコードするDNAを用いてscFv抗体をコードするDNAを構築し、これを適当なベクターに組み込み、当該ベクターを用いて形質転換した形質転換体よりscFvを調製することができる。

dsFvは、H鎖可変領域及びL鎖可変領域の適切な位置にCys残基を導入し、H鎖可変領域とL鎖可変領域とをジスルフィド結合により安定化させたFv断片である。各鎖におけるCys残基の導入位置は分子モデリングにより予測される立体構造に基づき決定することができる。本発明では例えば上記抗体のH鎖可変領域及びL鎖可変領域のアミノ酸配列から立体構造を予測し、かかる予測に基づき変異を導入したH鎖可変領域及びL鎖可変領域をそれぞれコードするDNAを構築し、これを適当なベクターに組み込み、そして当該ベクターを用いて形質転換した形質転換体よりdsFvを調製することができる。

尚、適当なリンカーを用いてscFv抗体、dcFv抗体などを連結させたり、ストレプトアビジンを融合させたりして抗体断片を多量体化することもできる。

本発明の抗体(抗体断片を含む)に低分子化合物、タンパク質、標識物質などを融合又は結合させることにより、融合抗体又は標識化抗体を構成することができる。標識物質としては¹²⁵I等の放射性物質、ペルオキシダーゼ、β-D-ガラクトシダーゼ、マイクロペルオキシダーゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、ローダミンイソチオシアネート(RITC)、アルカリホスファターゼ、ビオチンなどを用いることができる。

【0054】

本発明の抗体(抗体断片を含む)はアミロイド線維の形成を効果的に抑制することができるため、アルツハイマー病の診断、予防、治療等に有用である。即ち、本発明の抗体を用いてアルツハイマー病の診断、予防、又は治療を行うことができると考えられる。換言すれば、本発明の抗体を用いることによりアルツハイマー病の診断方法、予防方法、及び治療方法が提供される。また、本発明の抗体を用いてアルツハイマー病に対する薬剤(診断薬、予防薬、又は治療薬)を構成し得る。ここで、ヒト化した本発明の抗体を用いれば、ヒトに投与した場合であってもヒトタンパク質と認識されるため循環器系から排除され

にくく、またアレルギー反応もおこり難いので、好適な診断薬等として用いることができると考えられる。

【0055】

本発明者らの検討の結果、上記の $A\beta$ 重合阻害試験に使用される脂質膜（GM1を含む脂質膜）が $A\beta$ 重合阻害抗体を得るための抗原として有効であることが判明した。この知見に基づいて本発明のさらなる局面は、

GM1ガングリオシドと、その他の脂質と、及び該GM1ガングリオシドに結合したアミロイド β タンパク質（ $A\beta$ ）とを含有し、成分比率（分子比）が、その他の脂質：GM1ガングリオシド＝90：10～60：40の範囲である、動物免疫用の合成脂質膜を提供する。

本発明の合成脂質膜は典型的には3成分、即ち、GM1ガングリオシド、その他の脂質、及びアミロイド β タンパク質からなり、本発明の合成脂質膜の典型的な態様の成分比率は、その他の成分（但し、アミロイド β タンパク質の量は含まない）：GM1ガングリオシド＝90：10～60：40の範囲となる。

本明細書において「脂質」は、特に記載のない限り、単純脂質、複合脂質（例えばスフィンゴミエリン、ガングリオシド）、及び誘導脂質（例えばコレステロール）を包括的に表す用語として使用される。

本発明の合成脂質膜は、 $A\beta$ 重合阻害抗体を作製するための抗原として用いられ、特に、抗 $GA\beta$ 抗体を効率的に作製するための抗原として用いることができる。本発明の合成脂質膜による免疫に使用される動物は特に限定されず例えばマウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ヤギなどを用いることができる。免疫方法も特に限定されず、静脈注射、腹腔内注射、フットパッドへの注射などを採用できる。

本発明の好ましい一形態では、合成脂質膜の成分比率（分子比）が、その他の脂質：GM1ガングリオシド＝85：15～70：30の範囲である。更に好ましい一形態では、合成脂質膜の成分比率（分子比）が、その他の脂質：GM1ガングリオシド＝約80：20である。GM1ガングリオシドの含有量がこの範囲内の合成脂質膜は一層良好な $A\beta$ 重合開始活性を有し、それを用いれば $A\beta$ 重合阻害活性の高い抗体を一層効率的に作製することが可能となる。

本発明の合成脂質膜の構成成分の一つである脂質成分としてはスフィンゴミエリンが好適に使用される。

【0056】

本発明の合成脂質膜の好ましい一態様は脂質成分の一つとしてコレステロールを含有する。コレステロールにより膜上のGM1「クラスター」の形成が促され、これにより $A\beta$ とGM1との結合を促進することを期待できる。また、かかる合成脂質膜の構成はアミロイド線維が形成される脳内の神経細胞膜のそれに近いことから、アミロイド線維の形成をより有効に阻害する抗体の産生を促す抗原となる。

この態様での合成脂質膜の成分比率（分子比）は例えば、残りの脂質：コレステロール：GM1ガングリオシド＝80～20：10～40：10～40である。後述の実施例に示されるように、当該成分比率の合成脂質膜を用いることによって効率的に $A\beta$ 重合阻害抗体を作製できる。合成脂質膜の成分比率（分子比）が残りの脂質：コレステロール：GM1ガングリオシド＝70～50：10～20：20～30であることが好ましい。この成分比率の合成脂質膜は一層良好な $A\beta$ 重合開始活性を有し、それを用いれば $A\beta$ 重合阻害活性の高い抗体を一層効率的に作製することが可能となる。

好ましい合成脂質膜の具体例として、成分比率（分子比）がスフィンゴミエリン（残りの脂質に相当する）：コレステロール：GM1ガングリオシド＝64：16：20のものを挙げることができる。

GM1としては例えば市販のもの（和光純薬工業株式会社、大阪、日本が提供するもの等）を使用することができる。 $A\beta$ としては、例えば、市販の $A\beta_{1-40}$ （Amyloid β -Protein (Human, 1-40) コード4307-v Lot.501001、ペプチド研究所、大阪、日本、Lot.519599、Bachem AG、スイスなど）、 $A\beta_{1-42}$ （Amyloid β -Protein (Human, 1-42)、コード4349-v、ペプチド研究所、大阪）などを使用することができる。

10

20

30

40

50

本発明の合成脂質膜は、 $A\beta$ 以外の構成成分を含む脂質膜に $A\beta$ を接触させることによって調製することができる（調製方法の詳細については後述の実施例を参照されたい）。脂質膜と $A\beta$ との接触は短時間行われることが好ましく、更に好ましくは両者を瞬間的に接触させる。長時間の反応によれば、 $A\beta$ 線維形成が過度に進行してしまうためである。尚、本発明の合成脂質膜は通常、溶液内でリポソーム状に調製される。

【0057】

本発明の合成脂質膜を用いた $A\beta$ 重合阻害抗体の作製は免疫学的手法、抗体ライブラリーを用いたファージディスプレイ法やリポソームディスプレイ法等を利用して行われる。

免疫学的手法によるポリクローナル抗体の調製は次の手順で行うことができる。抗原（上記合成脂質膜）を調製し、これをマウス、ラット、ウサギ、ヤギ等の非ヒト動物に免疫する。低分子量のために有効な免疫惹起作用を期待できない場合には、キャリアタンパク質を結合させた抗原を用いることが好ましい。キャリアタンパク質としてはKLM (Keyhole Light Hemocyanin)、BSA (Bovine Serum Albumin)、OVA (Ovalbumin) などが使用される。また、キャリアタンパク質の結合にはカルボジイミド法、グルタルアルデヒド法、ジアゾ縮合法、MBS (マレイミドベンゾイルオキシコハク酸イミド) 法などを使用できる。

必要に応じて免疫を繰り返し、十分に抗体価が上昇した時点で採血し、遠心処理などによって血清を得る。得られた抗血清から抗体を分離する。目的の抗体の分離には、抗原として用いた合成脂質膜を利用することができる。具体的にはまず、抗血清と合成脂質膜とを接触させる。その結果、合成脂質膜に結合する成分を分離し、目的の抗体を得る。以上の分離ステップに加えて、分離された抗体とモノマーアミロイド β タンパク質とを接触させ、モノマーアミロイド β タンパク質に結合性を有しない抗体を選抜するステップを実施することが好まし。このステップを実施することにより、モノマーアミロイド β タンパク質を認識せず、 $GA\beta$ 複合体のみを認識する抗体が得られる。即ち、 $GA\beta$ 複合体に対して特異性の高い抗体を得ることが可能となる。かかる抗体はその特異性の高さ故に、 $GA\beta$ 複合体をターゲットとした用途に好適なものとなる。また、それを基に、 $GA\beta$ 複合体に対する特異性が高く、従ってアルツハイマー病の予防、治療、及び診断等において優れた効果を奏するヒト化抗体乃至ヒト型抗体を構築することができる。

【0058】

一方、モノクローナル抗体については次の手順で調製することができる。まず上記と同様の手順で免疫操作を実施する。必要に応じて免疫を繰り返し、十分に抗体価が上昇した時点で免疫動物から抗体産生細胞を摘出する。次に、得られた抗体産生細胞と骨髓腫細胞とを融合してハイブリドーマを得る。続いて、このハイブリドーマをモノクローナル化した後、本発明の合成脂質膜に対して高い特異性を有する抗体を産生するクローンを選抜する。具体的には、ハイブリドーマの培養上清を合成脂質膜に接触させることによって、培養上清中に合成脂質膜に結合性を有する抗体が存在するか否かを調べ、存在が確認されたハイブリドーマクローンを選抜する。この選抜ステップにおいて、モノマーアミロイド β タンパク質に結合性を有する抗体を産生するクローンを排除することが好ましい。即ち、合成脂質膜に結合性を有し且つモノマーアミロイド β タンパク質に結合性を有しない抗体を産生するハイブリドーマを選抜することが好ましい。モノマーアミロイド β タンパク質を認識せず、 $GA\beta$ 複合体のみを認識する抗体を産生するクローンが得られるからである。尚、合成脂質膜と結合性を有する抗体を産生するハイブリドーマクローンをまず選抜し、その後モノクローナル化を実施してもよい。

次に、選抜されたクローンの培養液から目的の抗体を分離する。一方、選抜されたクローン（ハイブリドーマ）を非ヒト動物（例えばマウス）の腹腔内に移植して腹水内で増殖させ、そして腹水から目的の抗体を分離することもできる。

ハイブリドーマの培養液又は腹水からの抗体の分離には、プロテインG、プロテインA等を用いたアフィニティークロマトグラフィーが好適に用いられる。また、抗原を固相化したアフィニティークロマトグラフィーを用いることもできる。更には、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、硫酸分画、及び遠心分離等の方法を用いることもできる。これらの方法は単独ないし任意に組み合わせられて用いられる。尚、抗体の

作製方法に関してKohler and Milstein (1975) Nature 256:495-497; Brown et al. (1981) J. Immunol. 127:539-46; Brown et al. (1980) J. Biol. Chem. 255:4980-83; Yeh et al. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:2927-31; Yeh et al. (1982) Int. J. Cancer 29:269-75; Kozbor et al. (1983) Immunol. Today 4:72; Kenneth, R.H. in Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses, Plenum Publishing Corp., New York, New York (1980); Lerner, E.A. (1981) Yale J. Biol. Med. 54:387-402; Gefter, M.L. et al. (1977) Somatic Cell Genet. 3:231-36等を参照することができる。

【0059】

ファージディスプレイ法とは、M13などの線維状ファージのコードタンパク質 (cp3、cp 10 8) との融合タンパク質として外来遺伝子を発現させるシステムである。ファージディスプレイ法では、異なるタンパク質又はペプチドの混合物の遺伝子をファージDNAに組みこことによって、 $10^6 \sim 10^{12}$ 程度のファージライブラリーが構築される。いくつかのファージ抗体ライブラリーが商業的又は非商業的に提供されており (例えば Huca1 GOLD (Morpho Sys社)、Griffin.1 library: Griffiths, AD et al. EMBO J.13: 3245-3260 (1994) “Nissim Library” (Nissim, A et al. EMBO J.13::692-698) 、これらの中から適当なものを選択して用いることができる。

ファージライブラリーからの特定ファージの選択はパンニングと呼ばれる操作によって行われる。パンニングは、典型的には、標的タンパク質とファージライブラリーとの反応 (接触)、非結合ファージの除去 (洗浄)、結合ファージの溶出、及び回収されたファージの大腸菌への感染 (ファージの増殖) の一連のステップから構成される。パンニングによって、標的タンパク質に結合性を有するタンパク質を提示するファージが濃縮される。通常、十分な濃縮が確認されるまでパンニングが繰り返される。このようにして選別・濃縮されたファージを適当な宿主細胞に感染させることによって、当該ファージが提示していたタンパク質 (ペプチド) を可溶性分子として発現させることができる。または、選別・濃縮されたファージから外来遺伝子を切り出し、回収された外来遺伝子を適当な発現ベクターに組み込み、そして適当な発現系を利用して当該外来遺伝子を発現させることによって、提示されていたタンパク質 (ペプチド) を可溶性に得てもよい。発現産物の回収は、遠心分離、硫酸分画、塩析、限外濾過、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーなどの方法を適宜組み合わせで行うことができる。

ファージディスプレイ法に関しては種々の文献、例えばHuse et al. (1989) Science 246:1275-1281; McCafferty et al. (1990) Nature 348:552-554; Fuchs et al. (1991) Bio/Technology 9:1370-1372; Barbas et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7978-7982; Hoogenboom et al. (1991) Nucleic Acids Res. 19:4133-4137; Gram et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:3576-3580; Hay et al. (1992) Hum. Antibod. Hybridomas 3:81-85; Griffiths et al. (1993) EMBO J 12:725-734; PCT国際公開第WO 90/02809号; PCT国際公開第 WO 92/20791号; PCT国際公開第 WO 92/15679号; PCT国際公開第 WO 92/09690号等を参照することができる。また、ファージディスプレイライブラリーの作製及びスクリーニング用のキットが市販されており、それらを好適に利用することができる。

【0060】

リボソームディスプレイ法とは、終止コドンを変異させることによって鋳型DNAの転写産物と翻訳産物とをリボソームに結合させた状態とし、このようにして得られたタンパク質/mRNA/リボソーム複合体 (ARM) を用いて、例えばターゲットに対するスクリーニングなどを行う方法をいう。リボソームディスプレイを抗体ライブラリーの製造に適用した例が米国特許第5,643,768号、及び同第5,658,754号に開示されている。

【0061】

ファージディスプレイ法やリボソームディスプレイ法などの遺伝子工学的手法を用いて抗体を調製する場合には例えば、抗原を動物に免疫した後、免疫系細胞より mRNA や DNA を 50

取り出してPCR、RT-PCR等の遺伝子増幅法によって抗原結合ドメインを含む抗体遺伝子を取得し、これを用いてファージディスプレイライブラリー等の抗体ライブラリーを構築する。次に、このようにして構築された抗体ライブラリーの中から抗原（合成脂質膜）に特異的結合性を有するクローンを選択する。即ち、抗体ライブラリーと本発明の合成脂質膜を接触させ、合成脂質膜に結合性を示すクローンを選抜する。この方法においても、モノマーアミロイド β タンパク質に結合性を有するクローンを排除することが好ましい。GA β 複合体のみに結合性を有する、特異性の高い抗体を得ることができるからである。

尚、特異的結合性分子を有する（又は発現する）クローンを含む限りにおいて、ポリクローン、オリゴクローン、及びモノクロンのいずれの状態であってもよい。目的のクローンが選択されたら、それが提示する抗体を上記の手順で分離する。

10

【0062】

本発明のさらなる局面は、本発明の抗体、即ちA β 線維の形成を阻害する抗体（A β 重合阻害抗体）又は抗体断片をコードするDNAに関する。当該局面では、A β 線維形成に対する阻害活性を有するヒト型キメラ抗体、ヒト型CDR移植抗体をコードするDNA、及びヒト型抗体断片をコードするDNAも提供される。また、これらの抗体又は抗体断片のH鎖又はL鎖をコードするDNAも本発明の一つである。更に、これらの抗体又は抗体断片のH鎖可変領域又はL鎖可変領域をコードするDNAも本発明の一つである。この場合において、シグナル部分を除いて構成されるDNAであってもよい。具体的なH鎖可変領域のDNA配列として配列番号：33、41、49、又は57に示すものを例示できる。同様にL鎖可変領域のDNA配列として配列番号：37、45、53、又は61に示すものを例示できる。

20

【0063】

更には、A β 重合阻害抗体の可変領域CDRをコードする核酸の配列も本発明の一つである。具体例として、配列番号：2～4、6～8、10～12、14～16、18～20、22～24、26～28、及び30～32のいずれかのアミノ酸配列をコードする塩基配列（例えば配列番号：34～36、38～40、42～44、46～48、50～52、54～56、58～60、及び62～64のいずれかの塩基配列）を挙げることができる。以上の核酸は生化学的手法、遺伝子工学的手法などを適宜用いて調製することができ、A β 重合阻害抗体（又は抗体断片）の作製等に利用することができる。

本発明の核酸は、本明細書又は添付の配列表が開示する配列情報を参考にし、標準的な遺伝子工学的手法、分子生物学的手法、生化学的手法などを用いることによって、単離された状態に調製することができる。例えば、その相補配列の全体又は一部をプローブとしたハイブリダイゼーション法を利用して特定の核酸を単離することができる。また、当該塩基配列の一部に特異的にハイブリダイズするようにデザインされた合成オリゴヌクレオチドプライマーを用いた核酸増幅反応（例えばPCR）を利用して増幅及び単離することができる。尚、オリゴヌクレオチドプライマーは一般に、市販の自動化DNA合成装置などを用いて容易に合成することができる。

30

【0064】

本発明のさらに他の局面は、本発明の核酸を含有するベクターに関する。本明細書において用語「ベクター」は、それに挿入された核酸を細胞等のターゲット内へと輸送することができる核酸性分子をいい、プラスミドベクター、コスミドベクター、ファージベクター、ウイルスベクター（アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター等）を含む。

40

使用目的（クローニング、タンパク質の発現）に応じて、また宿主細胞の種類を考慮して適当なベクターが選択される。例えば大腸菌を宿主とするベクター（M13ファージ又はその改変体、 λ ファージ又はその改変体、pBR322又はその改変体（pB325、pAT153、pUC8など）など）、酵母を宿主とするベクター（pYepSec1、pMFa、pYES2等、昆虫細胞を宿主とするベクター（pAc、pVLなど）、哺乳類細胞を宿主とするベクター（pCDM8、pMT2PCなど）を用いることができる。

【0065】

本発明のベクターは好ましくは発現ベクターである。「発現ベクター」とは、それに挿

50

入された核酸を目的の細胞（宿主細胞）内に導入することができ、且つ当該細胞内において発現させることが可能なベクターをいう。発現ベクターは通常、挿入された核酸の発現に必要なプロモーター配列や発現を促進させるエンハンサー配列等を含む。選択マーカーを含む発現ベクターを使用することもできる。かかる発現ベクターを用いた場合には選択マーカーを利用して発現ベクターの導入の有無（及びその程度）を確認することができる。

。本発明の核酸のベクターへの挿入、選択マーカー遺伝子の挿入（必要な場合）、プロモーターの挿入（必要な場合）等は標準的な組換えDNA技術（例えば、Molecular Cloning, Third Edition, 1.84, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New Yorkを参照することができる、制限酵素及びDNAリガーゼを用いた周知の方法）を用いて行うことができる。

具体的には例えば、本発明の核酸を発現ベクターに組み込み、これを用いて宿主細胞を形質転換することができる。また、本発明の核酸の中で抗体H鎖（又はH鎖可変領域）をコードする核酸を一のベクターに組み込み、他方、抗体L鎖（又はL可変領域）をコードする核酸を他のベクターに組み込み、得られた二つの発現ベクターで宿主細胞を共形質転換させることもできる。さらには、本発明の核酸の中で抗体H鎖（又はH鎖可変領域）をコードする核酸及び抗体L鎖（又はL鎖可変領域）をコードするDNAを一のベクターに組み込み、これを用いて宿主細胞を形質転換することもできる。

【0066】

宿主細胞としてはヒト、サル、マウス、ラット等の哺乳類細胞（COS細胞、CHO細胞など）、大腸菌などの細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞等を挙げることができる。

【0067】

本発明の他の局面は、本発明の核酸が導入された宿主細胞（即ち形質転換体）に関する。本発明の形質転換体は、好ましくは、上記本発明のベクターを用いたトランスフェクション乃至はトランスフォーメーションによって得られる。トランスフェクション等はリン酸カルシウム共沈降法、エレクトロポレーション(Potter, H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 7161-7165(1984))、リポフェクション(Felgner, P.L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 7413-7417(1984))、マイクロインジェクション(Graessmann, M. & Graessmann, A., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73, 366-370(1976))等によって実施することができる。

【0068】

本発明の形質転換体は、本発明の抗体又は抗体断片を生産することを利用することができる。即ち、本発明の他の局面は、上記形質転換体を用いた、本発明の抗体等の生産方法を提供する。本発明の生産方法は、本発明の抗体等が産生される条件下で上記形質転換体を培養するステップを少なくとも含む。通常はこのステップに加えて、産生された抗体等を回収（分離及び精製）するステップが実施される。形質転換体の細胞内又は培養液中からの目的の抗体の回収は、遠心分離、硫酸分画、塩析、限外濾過、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーなどの方法を適宜組み合わせることで実施することができる。

本発明の抗体等を生産する目的ではなく、例えば特定の細胞内において本発明の抗体等を発現させた場合の挙動を調べる目的や、特定の細胞内で本発明の抗体等を発現させることによって当該細胞の状態を変化させる目的（例えば治療目的）で形質転換体を得ることもできる。また、トランスジェニック動物（ヒトを含まない）を作製する目的で形質転換体を得ることもできる。即ち、本発明の形質転換体を非ヒトトランスジェニック動物の作製に利用することも可能である。例えば、形質転換体として、本発明のタンパク質等をコードする核酸を導入した受精卵母細胞又は胚性幹細胞を作製し、これからトランスジェニック動物を発生させることができる。トランスジェニック動物は、受精卵の前核に直接DNAの注入を行うマイクロインジェクション法、レトロウイルスベクターを利用する方法、ES細胞を利用する方法などを用いて作製することができる。以下、トランスジェニック動物の作製方法の一例としてマイクロインジェクション法を利用した方法を説明する。

マイクロインジェクション法ではまず、交尾が確認された雌マウスの卵管より受精卵を

採取し、そして培養した後にその前核にDNAコンストラクト（本発明のタンパク質等をコードしたDNA）の注入を行う。使用するDNAコンストラクトには導入遺伝子の効率的な発現を可能とするプロモーター配列が含まれていることが好ましい。このようなプロモーターとしては例えばチキン β -アクチンプロモーター、プリオン蛋白プロモーター、ヒトARプロモーター、ニューロフィラメントL鎖プロモーター、L7プロモーター、サイトメガロウイルスプロモーターなどを用いることができる。注入操作を終了した受精卵を偽妊娠マウスの卵管に移植し、移植後のマウスを所定期間飼育して仔マウス（F0）を得る。仔マウスの染色体に導入遺伝子が適切に組込まれていることを確認するため、仔マウスの尾などからDNAを抽出し、導入遺伝子に特異的なプライマーを用いたPCR法や導入遺伝子に特異的なプローブを用いたドットハイブリダイゼーション法等を行う。

10

本明細書における「トランスジェニック動物」の種は特に限定されないが、好ましくは哺乳類であって、より好ましくはマウス、ラットなどの齧歯類である。

【0069】

本発明の抗体（抗体断片を含む）を利用して $\text{GA}\beta$ 複合体に結合する活性を有する化合物のスクリーニング方法を構成することができる。即ち本発明は、以下の工程を含む、 $\text{GA}\beta$ 複合体に結合する活性を有する化合物のスクリーニング方法も提供する。

i)本発明の抗体又は抗体断片に結合する第1の化合物を選択する工程、及びii)前記第1の化合物に結合する第2の化合物を選択する工程である。このスクリーニング方法においても、アミロイド線維の形成が抑制されることを確認する工程を含ませることにより、スクリーニング方法により選択される化合物が $\text{GA}\beta$ 複合体に結合性を有し、かつアミロイド線維の形成を抑制する活性を有することを確認することが可能となる。

20

工程i)では、抗体又は抗体断片と試料との結合性が調べられ、結合性を有する第1の化合物が選択される。ここでの試料には、植物、動物、細菌などから抽出した天然タンパク質、天然ペプチド、天然高分子化合物等の他、合成タンパク質、合成ペプチド、合成高分子化合物、合成低分子化合物、抗体（本発明の抗体を含む）、細胞抽出液、培養上清等を例示できる。

工程i)において、使用される抗体を固相に固定化しておき、これに試料を接触させることができる。これとは逆に試料側を固相に固定化しておくこともできる。

使用する抗体を予め標識化しておくことにより選択（検出）の容易化、選択（検出）効率の向上を図ることもできる。標識化には ^{125}I 等の放射性物質、ペルオキシダーゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ等の酵素等を用いることができる。また、使用する抗体を認識する二次抗体を用いて選択（検出）効率の向上を図ることもできる。

30

【0070】

本発明の抗体（抗体断片を含む）を、 $\text{A}\beta$ 重合阻害抗体に結合する化合物のスクリーニング方法に利用することもできる。即ち、以下の工程A)及びB)を含む、 $\text{A}\beta$ 重合阻害抗体に結合する化合物のスクリーニング方法を構成することができる。

A)本発明の抗体に試料を接触させる工程、及び

B)前記抗体に結合した化合物を回収する工程。

ここでの試料としては、植物、動物、細菌などから抽出した天然タンパク質、天然ペプチド、天然高分子化合物等の他、合成タンパク質、合成ペプチド、合成高分子化合物、合成低分子化合物、抗体（本発明の抗体を含む）、細胞抽出液、培養上清等を例示できる。

40

【0071】

また、以下の工程を含む、 $\text{A}\beta$ 重合阻害抗体に結合する化合物のスクリーニング方法を構成することもできる。

C)本発明の抗体の可変領域の立体構造を予測する工程、

D)前記立体構造に相補的な立体構造を有する化合物を選択する工程。

抗体可変領域の立体構造は、NMR（核磁気共鳴）法（Wuthrich, K. : NMR of Protein and Nucleic Acids, John Wiley & Sons, New York, 1986）、X線結晶構造解析（Blundell, T.L. and John, L.N. : Protein Crystallography, Academic Press, Oxford, pp.1-565, 1976、McPherson, A. : Preparation and Analysis of Protein Crystals, John Wiley &

50

Sons, New York, pp.1-371,1982、松島正明ら：蛋白工学研究法,第7章,立体構造解析,廣川書店,東京,160-200,1990)等の方法により予測することができる。

工程D)における候補化合物としては、植物、動物、細菌などから抽出した天然タンパク質、天然ペプチド、天然高分子化合物等の他、合成タンパク質、合成ペプチド、合成高分子化合物、合成低分子化合物、抗体等を例示できる。

以上のスクリーニング方法で取得される化合物は $A\beta$ 重合阻害抗体に結合する活性を有することから、生体に投与されれば $A\beta$ 重合阻害抗体の産生を惹起することができると考えられる。即ち、生体の備える免疫防御機構に作用して $A\beta$ 重合阻害抗体を産生させることができ、その結果、生体において形成された $GA\beta$ 複合体に $A\beta$ が重合してアミロイド線維が形成されることをこの抗体の作用により抑制することができると考えられる。従って、当該化合物を用いてアルツハイマー病を予防、又は治療することが可能と考えられる。換言すれば、当該化合物を用いることによりアルツハイマー病の予防方法、及び治療方法が提供される。また、当該化合物を有効成分として含有するアルツハイマー病に対する薬剤、即ちワクチン又は治療薬を構成できる。一方、上記本発明の合成脂質膜についても $A\beta$ 重合阻害抗体に認識され得るため、これを生体に投与することにより $A\beta$ 重合阻害抗体の産生を惹起する作用を奏することができると考えられる。従って、アミロイド線維形成に対する阻害活性を有する抗体をヒト生体内で産生させるために当該合成脂質膜を使用することができるといえる。そこで本発明は更に、上記の合成脂質膜 (GM1を含む脂質膜)を含むアルツハイマー予防ワクチン又は治療用組成物を提供する。

【0072】

本発明の抗体等を薬剤として利用する場合には、製剤上許容される他の成分（例えば、生理食塩水、賦形剤、防腐剤、）を含有させることができる。また、種々の形態に製剤化できる。例えば、カプセル剤、シロップ剤、錠剤、顆粒剤などとして調製でき、経口投与、非経口投与（静脈内、動脈内、皮下、筋肉、腹腔内注射など）により適用することができる。

投与量については、症状、患者の年齢、体重などによって異なるが、当業者であれば適宜適当な投与量を選択、設定することが可能である。

【実施例】

【0073】

1. GM1ガングリオシドを含むリポソーム (GM1リポソーム) への $A\beta_{1-40}$ および $A\beta_{1-42}$ の定量的結合

1-1. $A\beta$ 溶液の調製方法

$A\beta$ 溶液を以下の手順で調製する。まず、合成 $A\beta_{1-40}$ （例えばLot.501001（ペプチド研究所、大阪、日本）又はLot.519599（Bachem AG, スイス））を最初に0.002%のアンモニア溶液に約500 μ Mとなるように溶解し、100,000rpmで3時間遠心する（TLA120.0ローター、Optima TL、ベックマン、カルフォルニア州、米国）。上清の上3分の2を集め、 $A\beta$ の濃度を決定する。 $A\beta$ 溶液は小分けして使用時まで-80℃に保存する。使用直前に溶解し、生理的トリス緩衝液（TBS：150mM NaCl及び10mM Tris-HCl, pH7.4）で適切な濃度に希釈する。

この方法によれば、市販の $A\beta$ から調製した $A\beta$ 溶解液からアミロイド線維形成の種を遠心除去することができる。Thioflavin Tを用いた $A\beta$ の線維形成測定で37℃インキュベーション時の $A\beta_{1-40}$ と $A\beta_{1-42}$ の $A\beta$ の線維形成を観察したところ、それぞれ、少なくとも96時間と6時間は蛍光強度の上昇が見られないことを本発明者らは明らかにした(J Neurosci., 2004, 24: 4894-4902)。この調製法の性質は、 $A\beta$ の線維形成における種活性を測定するために重要である。

【0074】

1-2. GM1ガングリオシドを含む合成脂質 (GM1リポソーム溶液) の調製方法

GM1ガングリオシドを含む合成脂質を以下の手順で調製する。まず、コレステロールとスフィンゴミエリン（シグマ-アルドリッチ、セントルイス、ミズーリー州、米国）及びGM1（和光純薬工業株式会社、大阪、日本）をクロロホルム/メタノール混液(1:1)に所定

比率（例えば2:2:1）で溶解する。この混液を窒素ガスで1時間乾燥し、 -40°C で使用時まで保存する。使用直前に乾燥した脂質混合物をGM1濃度が 2.5mM になるようにTBSに再懸濁し、液体窒素を用いて10回凍結溶解を行う。この脂質懸濁液を $13,000\text{rpm}$ で15分間遠心し（MX-160、TOMY、東京、日本）、沈渣を再度GM1が同濃度になるようTBSに再懸濁する。最後にこの懸濁液を氷上で5分間マイクロチップ（TP-030、TOMY、東京、日本）を備えた超音波破碎機（UD-201、出力レベル2、TOMY、東京、日本）を用いて超音波処理し、これを3回繰り返す。得られた溶液をGM1リポソーム溶液とした。

【0075】

1-3. GM1リポソーム溶液と $A\beta$ との反応

GM1リポソーム溶液と $A\beta$ 溶液を混合し、ボルテックスで1分間攪拌して水中に分散させる。100000 $\times g$ で10分間、遠心した後、上清を吸い取り、沈殿にトリス緩衝液（10mM Tris-HCl buffer pH7.4/150mM NaCl）1mlを加え、十分に攪拌して水中に分散させる。

【0076】

1-4. GM1リポソームへの $A\beta$ 結合実験

放射性ヨード（ ^{125}I ）標識 $A\beta_{1-40}$ （アマシャム、ファルマシア、IM-2394, 370 KBq）を用いてGM1を含むリポソーム（GM1リポソーム）への $A\beta$ 結合量を定量した（図1）。

まず、1-2.の方法に準じて、表2に示す成分比率のGM1リポソーム溶液をそれぞれ用意した。尚、各成分の総濃度（つまりリポソーム濃度）が $4600\mu\text{M}$ となるように各GM1リポソーム溶液を調製した。一方、1-1.の方法で調製した $A\beta$ 溶液へ、同様に超遠心分離（100000rpm、2時間、 4°C ）処理した放射性 $A\beta$ を100nCi混合し $A\beta$ 濃度 $46\mu\text{M}$ の溶液 $100\mu\text{l}$ を調製した。この $A\beta$ 溶液に対してそれぞれ上記のGM1リポソーム溶液を $100\mu\text{l}$ 添加し、 37°C で1分間インキュベートした。続いて、1mlのトリス緩衝液（10mM Tris-HCl buffer pH7.4/150mM NaCl）を加え遠心分離で沈殿させることを4度繰り返した後、GM1リポソームに結合しなかった $A\beta$ を洗浄除去した。沈殿した放射活性量を求めることによって、GM1リポソームに結合した $A\beta$ 量を測定した（図1）。

同様に、放射性ヨード（ ^{125}I ）標識 $A\beta_{1-42}$ （Amyloid β -Protein (Human, 1-42)、コード4349-v、ペプチド研究所、大阪）を用いてGM1を含むリポソーム（GM1リポソーム）への $A\beta$ 結合量を定量した（図2）。即ち、1-1.と同様の方法で調製した $A\beta_{1-42}$ 溶液に同様に超遠心分離（100000rpm、2時間、 4°C ）処理した放射性ヨード（ ^{125}I ）標識 $A\beta_{1-42}$ （アマシャム、ファルマシア、IM-336, 370 KBq）を混合し $A\beta_{1-42}$ のGM1リポソームへの結合量を測定した（図2）。

以上の実験結果からGM1を10~40%（分子比）含むリポソームは、 $A\beta_{1-40}$ 及び $A\beta_{1-42}$ いずれの $A\beta$ 重合開始活性も持つことがわかる。 $A\beta_{1-40}$ を使用した場合と $A\beta_{1-42}$ を使用した場合を比較すれば、両者ともリポソーム組成に依存してリポソームへの結合量は変化するが、その結合量変動に実質的な差はない（図1、2）。調べた範囲で特に重合開始に有効なGM1分子比は20%であった（図1、2）。この濃度で作製したGM1リポソームに $A\beta$ を短時間（1分間）反応させることで形成されるGM1リポソーム- $A\beta$ 複合体（合成 $GA\beta$ ）を、免疫原またはスクリーニング用抗原として、以下の各実験に使用した。

【0077】

2. $A\beta$ プロテオリポソームの免疫による抗 $A\beta$ モノクローナル抗体の作製

2-1. in vitroで調製した $GA\beta$ のマウスへの免疫

重合阻害活性を有するモノクローナル抗体を得るため、1.の結果から最も $GA\beta$ 形成量が多くなる至適条件（スフィンゴミエリン：コレステロール：GM1=64：16：20の成分比（分子比）のリポソームに対して $A\beta$ を1分間接触）で免疫原（合成 $GA\beta$ ）を作製した。 $100\mu\text{l}$ を1回分として、この合成 $GA\beta$ をマウス（Balb/c）の腹腔に1週間おきに数回免疫し、5回免疫後の翌週にマウスより眼てい採血し抗体価を確認した。抗体価の高いマウスの脾臓を取り出し、以下の手順で細胞融合を行った。

【0078】

2-2. 細胞融合、及びハイブリドーマの選択

摘出したマウスの脾臓細胞と、同系マウスの骨髓腫細胞Sp2/O-Ag14とを約10:1の割合で

40

50

混合し、50%ポリエチレングリコール4000を融合促進剤として細胞融合することによってハイブリドーマを作製した。融合後の細胞を 1×10^6 cells/mlの濃度となるように10%ウシ血清含有HAT培地(ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジンを含む培地)に懸濁した。得られた細胞懸濁液を、96ウェルのマイクロタイタープレート(ヌンク社製マキシソープ、以下同じ)に1ウェルあたり $50 \mu\text{l}$ ずつ分注した。

【0079】

融合細胞を CO_2 インキュベータ ($5\%\text{CO}_2$ 、 37°C) 内で培養し、HAT培地で培地交換を行い増殖させて、脾臓細胞と骨髓腫細胞からなる融合細胞のスクリーニングを行った。ついでHT培地中で馴化し、さらに10%FCS(ウシ胎児血清)-DMEM培地で馴化した。

【0080】

HATセレクションの後、生存しているハイブリドーマの培養上清中に含まれる抗体の結合性を、合成 $\text{GA}\beta$ を感作したマイクロタイタープレートを用いて以下のELISA法により検出した。このように結合活性を指標にスクリーニングを行った。

【0081】

2-3. $\text{GA}\beta$ 結合マイクロプレートを用いたELISAによる融合細胞クローンの一次スクリーニング

まず、GM1をスフィンゴミエリン及びコレステロールと混合し、クロロホルム-エタノール(クロロホルム:エタノール=1:1)に溶解後、96穴ELISAプレート(ポリカーボネイト製)に $50 \mu\text{l}$ ずつ分注した。続いて室温で乾燥させ、脂質膜(lipid film)を形成させた。これを1%スキムミルク/PBSでブロッキングした後、 $20 \mu\text{g/ml}$ の $\text{A}\beta$ を入れ、短時間(1分間)反応させて $\text{GA}\beta$ を形成させた。洗浄後、上記のようにして調製したハイブリドーマの培養上清を各ウェルに $100 \mu\text{l}$ ずつ加え、室温で2時間インキュベートした。ウェル内の液を除去し、続いてPBSで洗浄した後、0.1% Tween 20-TBSで3000倍希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)標識ヤギ抗マウスIgG+IgM(H+L)抗体(Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.)を各ウェルに $100 \mu\text{l}$ ずつ分注し、室温に1時間静置した(二次反応)。二次反応後、同様にPBSで洗浄した後、 $750 \mu\text{M}$ TMB (Tetramethylbenzidine)溶液をウェルあたり $100 \mu\text{l}$ 添加し、 30°C で5~20分間発色させた(発色反応)。1.5 NH_4PO_4 を各ウェルに $100 \mu\text{l}$ ずつ加えて発色反応を停止させ、マイクロタイタープレートリーダーを用いて、450 nmにおける吸光度を東ソー(株)MPR A4iにて測定した。対照として、 $\text{A}\beta$ を添加しない系を用意し、これに対して陰性であるとともに、遊離状態の $\text{A}\beta$ $20 \mu\text{g/ml}$ を感作させたプレート及び脂質膜(lipid film)に対する反応が陰性なものを選択した。

選択されたウェルに対して限界希釈法によるクローニングを2回繰り返し、融合細胞クローンを樹立した。得られたクローンを以下の $\text{A}\beta$ 重合評価系を用いた選択(2次スクリーニング)に供した。

【0082】

3. 3種のin vitro $\text{A}\beta$ 重合評価系によるモノクローナル抗体の評価

本発明者らの報告(J Neurosci., 2004, 24: 4894-4902)に記載したin vitroでの3種の $\text{A}\beta$ 重合評価系((A) $\text{A}\beta$ 線維断片を添加することで開始される重合、(B) $\text{GA}\beta$ 40から開始される $\text{A}\beta$ 40の重合、(C) $\text{GA}\beta$ 42から開始される $\text{A}\beta$ 42の重合)を用いて、上記2. で得られた各融合細胞クローンが産生する抗体の $\text{A}\beta$ 重合反応に対する効果をみた。使用した $\text{A}\beta$ 重合評価系($\text{A}\beta$ 重合阻害試験A~C)を以下に示す。尚、陽性対照及び陰性対照としてそれぞれ、重合抑制活性のある4396C抗体(国際公開第03/014162号公報、J Neurosci., 2004, 24: 4894-4902)及び4G8抗体(フリーの $\text{A}\beta$ を認識する抗体)を用いた。

【0083】

A. $\text{A}\beta$ 重合阻害試験1 ($\text{A}\beta$ 線維を添加することで開始される重合に対する阻害効果)

A-1. $\text{A}\beta$ 溶液の調製

上記1-1.と同様の手順で $\text{A}\beta$ 溶液を調製する。

【0084】

A-2. 線維状 $\text{A}\beta$ 溶液の調製

線維状 $\text{A}\beta$ 溶液を以下の手順で調製する。まず、合成 $\text{A}\beta_{1-40}$ (例えばLot.501001(ペプ 50

チド研究所、大阪、日本)又はLot.519599 (Bachem AG, スイス))を4℃で約500 μ Mのアンモニア溶液に短時間ボルテックスすることにより溶解し、インキュベーションバッファー (50mMリン酸緩衝液、pH7.5; 100mM NaCl) で50 μ Mに希釈する。37℃で24時間インキュベートした後、混合液を 1.6×10^4 g、4℃で3時間遠心する。エッペンドルフチューブ内で沈渣を0.005%NaN₃を含む氷冷したインキュベーションバッファーに再懸濁し、マイクロチップ (TP-030、TOMY、東京、日本) を備えた超音波破碎機 (UD-201、TOMY、東京、日本) を用いて氷上で超音波処理し、使用時まで4℃で保存する。

【0085】

A-3. 阻害効果の評価

(1)被験抗体の存在下 (試験群、抗体添加濃度1 μ M) 又は非存在下 (対照群) において、線維状A β 溶液 (5 μ l) と、A β 溶液 (100 μ l) とを混合し、37℃でインキュベーションする。 10

(2)Thioflavin Tを用いたA β の線維形成測定を、Naiki H and Gejyo F(1999) Methods Enzymol 309, 305-318に従って行う。まず、インキュベーション開始から4時間後の溶液の一部 (5 μ l) をサンプリングし、これに終濃度5 μ MとなるようにThioflavin T (Sigma) を添加する。1mlの50mMグリシン水酸化ナトリウム緩衝液で希釈した後、A β 線維の蛍光強度 (励起波長446nm、蛍光波長490nm) を分光蛍光光度計 (例えばRF-5300PC、島津製作所) で測定する。

(3)以下の計算式で被験抗体の阻害効果 (阻害活性) を求める。

$$\text{阻害効果 (\%)} = (\text{対照群の蛍光強度} - \text{試験群の蛍光強度}) / \text{対照群の蛍光強度} \times 100$$

【0086】

B. A β 重合阻害試験2 (GA β 40から開始されるA β 40の重合に対する阻害効果)

B-1. A β 溶液の調製方法

上記1-1.と同様の手順でA β 溶液を調製する。

【0087】

B-2. GM1ガングリオシドを含む合成脂質の調製

上記1-2.と同様の手順でGM1ガングリオシドを含む合成脂質を調製する。

【0088】

B-3. 阻害効果の評価

(1)被験抗体の存在下 (試験群、抗体添加濃度1 μ M) 又は非存在下 (対照群) において、GM1ガングリオシドを含む合成脂質とA β 溶液とを混合し、37℃でインキュベーションする。 30

(2)Thioflavin Tを用いたA β の線維形成測定を、Naiki H and Gejyo F(1999) Methods Enzymol 309, 305-318に従って行う。まず、インキュベーション開始から20時間後の溶液の一部 (5 μ l) をサンプリングし、これに終濃度5 μ MとなるようにThioflavin T (Sigma) を添加する。1mlの50mMグリシン水酸化ナトリウム緩衝液で希釈した後、A β 線維の蛍光強度 (励起波長446nm、蛍光波長490nm) を分光蛍光光度計 (例えばRF-5300PC、島津製作所) で測定する。

(3)以下の計算式で被験抗体の阻害効果 (阻害活性) を求める。 40

$$\text{阻害効果 (\%)} = (\text{対照群の蛍光強度} - \text{試験群の蛍光強度}) / \text{対照群の蛍光強度} \times 100$$

尚、GM1ガングリオシドを含む脂質膜は通常、ポリスチレン樹脂、ポリカーボネート樹脂、シリコン樹脂、ナイロン樹脂等の樹脂やガラス等からなるビーズ、マイクロプレート等の不溶性支持体に結合した状態で使用される。

【0089】

C. A β 重合阻害試験2 (GA β 42から開始されるA β 42の重合に対する阻害効果)

合成A β_{1-40} に代えて合成A β_{1-42} (例えば、Amyloid β -Protein (Human, 1-42)、コード4349-v、ペプチド研究所、大阪) を使用して上記1-1.の手順に従いA β 溶液を調製する。一方、上記1-2.と同様の手順でGM1ガングリオシドを含む合成脂質を調製する。これ 50

ら二つの溶液を用いて、上記B-3.と同様の手順で阻害効果を評価する。

【0090】

A β 重合阻害試験の結果、A β 重合阻害効果の高い抗体としてクローン1C9、2E12、3G11、及び4E11を選択した（二次選択）。各クローンのA β 線維形成阻害効果を図4の表に示す。クローン1C9は線維状A β を添加することで開始される重合を強く阻害し、GA β から開始されるA β 40の重合およびGA β から開始されるA β 42の重合に対する阻害活性は弱い。また、クローン2E12と3G11では三種の重合系それぞれにおいて強い阻害活性が認められた。これらのクローンは、4396C抗体に比較して、GA β から開始されるA β 40の重合とGA β から開始されるA β 42の重合に対して強い活性を持つ。一方、クローン4E11にも三種の重合系において同等の阻害活性が認められた。

10

尚、陰性対照の4G8抗体はフリーのA β を認識する抗体であるが、この阻害試験では阻害活性は見られない。これに対して陽性対照の4396C抗体はいずれの重合系においてもA β 重合阻害効果を示したが、(B)GA β 40から開始されるA β 40の重合、又は(C)GA β 42から開始されるA β 42の重合に対してよりも、(A)A β 線維断片を添加することで開始される重合に対して強い阻害活性を有するという特徴が認められた。

【0091】

4. クローン2E12、3G11抗体のin vitro A β 重合に対する阻害作用の解析

クローン2E12と3G11は共に三種の重合系（(A)A β 線維断片を添加することで開始される重合、(B)GA β 40から開始されるA β 40の重合、(C)GA β 42から開始されるA β 42の重合）において阻害活性を有し、特に4396C抗体と比較して、GA β 40から開始されるA β 40の重合とGA β 42から開始されるA β 42の重合に対して強い活性を有するという性質がある（上記3.）。この阻害活性の分子機構を調べるために、GA β 40から開始されるA β 40の重合系をこれら抗体で阻害し、経時的にA β 線維形成をモニターした。陰性対照として4396C抗体を用いた。抗体濃度は2 μ Mとした。尚、この解析における線維形成の反応温度は全て37℃とした。

20

【0092】

図5は、2E12を添加した場合の測定結果（Thioflavin Tを用いたA β 40の線維形成を測定した結果）である。A β 溶液はGM1リポソームを添加しないと蛍光強度の上昇は20時間見られない。抗体添加はGM1リポソームの添加と同時に行い、経時的に少量サンプルを取り出してThioflavin T液を混合し蛍光強度を測定した。GM1リポソームには自家蛍光があるので、その添加により反応系の蛍光強度は上昇する。抗体を添加しない系は添加時点から蛍光強度の上昇を開始し、4時間まで蛍光強度が上昇した。その後、蛍光強度は20時間まで一定値を保った。この結果は、GM1リポソームの添加によりGA β 40が形成され、これからA β 40の線維形成が時間とともに進行して線維が伸長し、溶液中のA β が線維形成に消費されて濃度が減少し、線維形成の臨界濃度以下になったと解釈される。陽性対照である2 μ Mの4396C抗体の添加系では、無添加系に比較してより早い2時間で蛍光強度の上昇がとまり、その蛍光強度は20時間まで維持された。この結果は、A β の線維形成がこの抗体により停止し、それ以後の線維伸長は抑制されると解釈される。一方、2E12の場合、蛍光強度の上昇は、添加濃度が0.5 μ Mの場合は4時間で、添加濃度が1又は2 μ Mの場合は2時間で停止し、それ以後は抗体濃度に依存する速度で蛍光強度が低下した。この結果から2E12は、GA β 40から開始されるA β の線維形成開始時には影響を与えないが、線維伸長が進行した後は、形成されたA β 線維長を決めることになる、A β の重合反応による線維伸長とA β の脱重合による線維の短縮の平衡関係を、線維の短縮のほうに傾かせる作用があると考えられる。

30

40

【0093】

図6は3G11を添加した場合の測定結果（Thioflavin Tを用いたA β 40の線維形成を測定した結果）である。この図6の結果は図5の結果とは異なり、すべての測定値からGM1リポソーム添加直後の蛍光強度の値を減じた数値をプロットしてある。抗体を添加しない系ではGM1リポソーム添加時から急激に蛍光強度が上昇し、20時間まで上昇速度を減少させながら蛍光速度が上昇し続けた。4396C抗体を添加した場合、無添加の場合と比較して

50

蛍光強度が低値であり、また蛍光強度の上昇は6時間まで見られた。陰性対照として用いた3F1はフリーのA β 40ペプチドのC末端を認識する抗体であるが、これを添加した場合の蛍光強度変化は無添加の場合とほぼ同一であった。この結果から、この抗体はA β 40の線維形成に影響を与えないことが分かる。3G11抗体を添加した場合、いずれの添加濃度（1、2および3 μ M）でも反応初期1時間まで蛍光強度は上昇したものの、それ以後は蛍光強度が減少し、最終的にGM1リポソーム添加時とほぼ同等になった。以上の結果から3G11は2E12と同様に、GA β 40から開始されるA β の線維形成開始時には影響を与えないが、線維伸長が進行した後は、形成されたA β 線維長を決めるA β の重合反応による線維伸長とA β の脱重合による線維の短縮の平衡関係を、線維の短縮のほうに傾かせる作用があると考えられる。

10

【0094】

次に、A β 線維伸長をしていると考えられるGM1リポソームを添加して4時間経過後に抗体を添加する実験を行った（図7）。先の実験ではA β 濃度は23 μ Mであったが、この実験では100 μ Mに増加させた。抗体を添加しない系の蛍光強度は測定開始時から24時間まで連続的に上昇した。陰性対照として用いた2 μ Mの3F1を添加した場合の蛍光強度変化は無添加の場合とほぼ同一であって、測定開始時から24時間まで連続的に上昇した。4396Cを2 μ M添加した場合、蛍光強度が測定開始から24時間後までほぼ一定値を維持した。2E12を添加した場合と3G11を添加した場合はいずれも、測定開始時から蛍光強度は減少を続け、24時間後には測定開始時の約60%となった。これらの現象から、4396CはA β 線維の新たな伸長を抑制していると考えら得るが、2E12と3G11はこれとは異なり、形成されたA β 線維の分断化またはA β 線維の脱重合を促進していると考えられる。そこで、実験的にすでにThioflavin T蛍光測定値が最大値付近に達したサンプルに抗体を添加して蛍光強度を測定した（図8）。A β 濃度を23 μ Mし、GM1リポソーム添加後、24時間経過したサンプルを用いた。これに2 μ Mの抗体を加え、経時的にThioflavin T蛍光測定を行った。無添加の場合、蛍光強度は測定開始時から8時間まで非常に緩やかに上昇した（約10%）。2 μ Mの3F1を添加した場合の蛍光強度変化は、無添加の場合とほぼ同一で測定開始時から8時間まで約10%上昇した。また、4396Cを2 μ M添加した場合、測定開始から8時間後まで、無添加の場合及び3F1を添加した場合とほぼ同一の蛍光強度変化を示した。2E12を添加した場合と3G11を添加した場合は同様の蛍光強度変化を示し、測定開始時から8時間までの間に蛍光強度が約20%減少した。以上の結果から、2E12と3G11は明らかに、A β の線維分断化またはA β 線維の脱重合を促進してThioflavin T蛍光測定値を減少させている。

20

30

以上の実験結果から、4396CはA β 線維の新たな伸長を抑制するのに対して、2E12と3G11はA β 線維の分断化またはA β 線維の脱重合を促進する活性を持っていることがわかる。

【0095】

5. VH、VL遺伝子の単離

5-1. VH遺伝子の増幅(PCR)

遺伝子データベースからマウスVHの5'末端のPrimer (VH primers) を調べ、sfiIサイトを付加しプライマーをデザイン、等量ずつ混ぜそのmixプライマーを作成した。

Vhprimers (一例として)

40

Name : 5'末端側→3'末端側

[1]mVH1A : act tac tcg cgg ccc agc cgg cca tgg ccg a(g/t)g tgc agc ttc agg agt ca g g(52 mer、配列番号 : 65)

[2]mVH1B1 : act tac tcg cgg ccc agc cgg cca tgg ccc agg tgc agc tga agg agt cag g (52 mer、配列番号 : 66)

[3]mVH1B2 : act tac tcg cgg ccc agc cgg cca tgg ccc agg tgc agc tga agc agt cag g (52 mer、配列番号 : 67)

[4]mVH2A1 : act tac tcg cgg ccc agc cgg cca tgg ccg agg tcc agc tgc a(a/g)c a(a/g)t ctg g (52 mer、配列番号 : 68)

[5]mVH2A2 : act tac tcg cgg ccc agc cgg cca tgg ccg agg ttc agc tgc agc agt ctg g 50

(52 mer、配列番号：69)

[6]mVH2B1: act tac tcg cgg ccc agc cgg cca tgg ccc agg tcc aac tgc agc agc ctg g

(52 mer、配列番号：70)

[7]mVH2B2: act tac tcg cgg ccc agc cgg cca tgg ccc agg tcc acc tgc agc agt ctg g

(52 mer、配列番号：71)

[8]mVH3A: act tac tcg cgg ccc agc cgg cca tgg ccg agg tga agc tgg tgg a(a/g)t ct g g (52 mer、配列番号：72)

[9]mVH3B: act tac tcg cgg ccc agc cgg cca tgg ccg agg tga agc ttc tgg agt ctg g

(52 mer、配列番号：73)

[10]mVH3C1: act tac tcg cgg ccc agc cgg cca tgg ccg aag tga agc ttg agg agt ctg g (52 mer、配列番号：74) 10

[11]mVH3C2: act tac tcg cgg ccc agc cgg cca tgg ccg agg tga agc tgg atg aga ctg g (52 mer、配列番号：75)

[12]mVH3C3: act tac tcg cgg ccc agc cgg cca tgg ccg aag tga agc tgg tgg agt ctg a (52 mer、配列番号：76)

[13]mVH3D1: act tac tcg cgg ccc agc cgg cca tgg ccg aag tgc agc tgg tgg agt ctg g (52 mer、配列番号：77)

[14]mVH3D2: act tac tcg cgg ccc agc cgg cca tgg ccg aag tga tgc tgg tgg agt ctg g (52 mer、配列番号：78)

[15]mVH3D3: act tac tcg cgg ccc agc cgg cca tgg ccg aag tga agc tgg tgg agt ctg g (52 mer、配列番号：79) 20

[16]mVH5A1: act tac tcg cgg ccc agc cgg cca tgg ccg agg ttc agc ttc agc agt ctg g (52 mer、配列番号：80)

[17]mVH5A2: act tac tcg cgg ccc agc cgg cca tgg ccc agg tcc agc tgc agc agt ctg g (52 mer、配列番号：81)

尚、(a/g)、(g/t)は2塩基ミックスを表す。

【0096】

同様に3'末端のPrimers (JH Primers) を調べ、相補鎖の配列にXhoIサイトを付加しプライマーデザイン、等量混ぜそのmixプライマーを作成した。

JH Primers (一例として)

30

Name: 5'末端側→3'末端側

[1]mJH1Xho: cgt ttt ggc gct cga gac ggt gac cgt ggt ccc tgc g (37 mer、配列番号：82)

[2]mJH2Xho: cgt ttt ggc gct cga gac tgt gag agt ggt gcc ttg g (37 mer、配列番号：83)

[3]mJH3Xho: cgt ttt ggc gct cga gac agt gac cag agt ccc ttg g (37 mer、配列番号：84)

[4]mJH4Xho: cgt ttt ggc gct cga gac ggt gac tga ggt tcc ttg a (37 mer、配列番号：85)

【0097】

40

2次スクリーニング(上記3.)の結果選択された陽性ハイブリドーマを細胞培養し、常法によりcDNAを取得した。次に、得られたcDNAをテンプレートとし、上記プライマーVH Primers(200pmol/ μ l)とJH Primers (200pmol/ μ l)をそれぞれ20 μ l用いてLA Taq(TAKARA)でMgCl₂、dNTPmix存在下でPCR(サイクル94℃、1分、65℃、2分、72℃、1分を30サイクル)を実施した。これによってVH遺伝子を単離した。

【0098】

5-2. VL遺伝子の増幅(PCR)

上記VH遺伝子の増幅と同様に、L鎖 κ mixプライマーを5'末端のVLマウス配列及びC κ (κ constant領域)配列からそれぞれ作成し、PCRで同様にVL遺伝子を単離した。或いは、L鎖 λ mixプライマーを5'末端のVLマウス配列及びC λ (λ constant領域)配列からそれぞれ 50

れ作成し、PCRで同様にVL遺伝子を単離する。

VHとVLの組合せが実際に機能しているか否かは、各組合せをSfiI、XhoIで発現ベクターに組み込み発現させて得られた精製タンパク質を上記2.のELISA試験に供することによって検証した。

遺伝子配列はCEQ 2000 DNA Analysis System(BECKMAN COULTER)にて、インストラクションに基づき決定した。

2次スクリーニングで選択されたクローン1C9、2E12、3G11、及び4E11のアミノ酸配列及び塩基配列は次の通り同定された。

a. アミノ酸配列

(1)1C9抗体 (図9、10)

10

配列番号：1 (VH)；配列番号：2 (VH CDR1)；配列番号：3 (VH CDR2)；配列番号：4 (VH CDR3)；配列番号：5 (VL)；配列番号：6 (VL CDR1)；配列番号：7 (VL CDR2)；配列番号：8 (VL CDR3)

(2)2E12抗体 (図11、12)

配列番号：9 (VH)；配列番号：10 (VH CDR1)；配列番号：11 (VH CDR2)；配列番号：12 (VH CDR3)；配列番号：13 (VL)；配列番号：14 (VL CDR1)；配列番号：15 (VL CDR2)；配列番号：16 (VL CDR3)

(3)3G11抗体 (図13、14)

配列番号：17 (VH)；配列番号：18 (VH CDR1)；配列番号：19 (VH CDR2)；配列番号：20 (VH CDR3)；配列番号：21 (VL)；配列番号：22 (VL CDR1)；配列番号：23 (VL CDR2)；配列番号：24 (VL CDR3)

(4)4E11抗体 (図15、16)

配列番号：25 (VH)；配列番号：26 (VH CDR1)；配列番号：27 (VH CDR2)；配列番号：28 (VH CDR3)；配列番号：29 (VL)；配列番号：30 (VL CDR1)；配列番号：31 (VL CDR2)；配列番号：32 (VL CDR3)

【0099】

b. 塩基配列

(1)1C9抗体 (図9、10)

配列番号：33 (VH)；配列番号：34 (VH CDR1)；配列番号：35 (VH CDR2)；配列番号：36 (VH CDR3)；配列番号：37 (VL)；配列番号：38 (VL CDR1)；配列番号：39 (VL CDR2)；配列番号：40 (VL CDR3)

(2)2E12抗体 (図11、12)

配列番号：41 (VH)；配列番号：42 (VH CDR1)；配列番号：43 (VH CDR2)；配列番号：44 (VH CDR3)；配列番号：45 (VL)；配列番号：46 (VL CDR1)；配列番号：47 (VL CDR2)；配列番号：48 (VL CDR3)

(3)3G11抗体 (図13、14)

配列番号：49 (VH)；配列番号：50 (VH CDR1)；配列番号：51 (VH CDR2)；配列番号：52 (VH CDR3)；配列番号：53 (VL)；配列番号：54 (VL CDR1)；配列番号：55 (VL CDR2)；配列番号：56 (VL CDR3)

(4)4E11抗体 (図15、16)

40

配列番号：57 (VH)；配列番号：58 (VH CDR1)；配列番号：59 (VH CDR2)；配列番号：60 (VH CDR3)；配列番号：61 (VL)；配列番号：62 (VL CDR1)；配列番号：63 (VL CDR2)；配列番号：64 (VL CDR3)

【0100】

6. マウスーヒトキメラ抗体の作製

6-1. ヒト γ 鎖定常領域遺伝子、及びヒト λ 鎖定常領域遺伝子の単離

ヒト γ 鎖定常領域DNA、及びヒト λ 鎖定常領域DNAは、ヒトリンパ球cDNAライブラリーより各DNAの一部に相補的なDNAをテンプレートにして取得される。

【0101】

6-2. キメラH鎖ベクター、及びキメラL鎖ベクターの作製

50

まず、ヒト γ 鎖定常領域DNAと上記5. で得られるマウスH鎖可変領域DNAとをライゲーションし、これを発現ベクター「BCMGS Neoベクター」(鳥山一「ウシバピローマウイルスベクター」, 村松正実および岡山博人編, 実験医学別冊 遺伝子工学ハンドブック, 羊土社, p.297-299 (1991)に組み込みキメラH鎖ベクターを作製する。同様に、ヒト λ 定常領域DNAと上記5. で得られるマウスL鎖可変領域DNAとをライゲーションし、これをBCMGS Neoベクターに組み込み、キメラL鎖ベクターを作製する(図17)。

【0102】

6-3. トランスフェクション

2種類のベクター(キメラH鎖ベクター、キメラL鎖ベクター)をCHO(チャイニーズハムスター卵巣)細胞にリポフェクション法を用いて同時にトランスフェクションし、37℃で所定時間培養した後、96穴プレートに移植し、ネオマイシン500 μ g/mlを含むDMEM/10% FCSで選択する。

培養液中のIgG量は以下のようにして測定する。抗ヒト γ 鎖(株式会社医学生物学研究所: code 103AG)を10 μ g/mlにPBSで希釈調製し、ポリスチレン製マイクロプレートに100 μ l/ウェルずつ分注し、4℃で一晩感作させる。次に、5% BSA/5% ショ糖/PBSを用いて4℃で一晩ブロッキングする。100 μ lのサンプルを37℃で1時間反応させた後、PBS/0.05% Tween20で洗浄する。洗浄後、4000倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgG(株式会社医学生物学研究所: code 208)を37℃で1時間反応させ、PBS/0.05% Tween20で洗浄後、酵素基質液を100 μ l分注して室温で15分反応させる。そして、各ウェルに2N硫酸を100 μ lずつ分注し、 A_{492} を測定する。コントロールには、ヒト血清(IgG量: 200ng/ml, 20ng/ml, 2ng/ml, 0.2ng/ml)を用いる。このようにして、最も発現量の多いクローンを選択し、その培養上清を回収する。回収された培養上清より、protein Aアガロースカラムを用いて抗体を精製する。

【0103】

7. ヒト型CDR移植抗体の作製

7-1. ヒト型CDR移植抗体の設計

H鎖及びL鎖について、公知のデータベース(例えば、Fasta database search)より、上記5. で取得した抗体のH鎖及びL鎖とホモロジーの高い配列をそれぞれ選択する。そして、これらの配列のFRと阻害抗体のCDRを備える配列を設計する。

【0104】

7-2. ヒト型CDR移植抗体発現ベクターの作製

7-1. で設計されたH鎖可変領域DNA及びL鎖可変領域DNAは次のように作製することができる。

最初に、合成DNAを図18に示すように8本作製した。これら合成DNAは可変領域の約400bpをカバーし、且つそれぞれ約20bpずつオーバーラップするように作製されている。これら合成DNA 10 μ mol/10 μ lを100℃で5分処理した後、急冷し、合成DNAの1と2、3と4、5と6、7と8をそれぞれ混ぜ、ヒートブロックで65℃、30分加熱したのち、12時間放置し、ゆっくりとアニールさせる。次に、20mM dNTPを1 μ l、シーケナーゼ(アマシャム社)1 μ l、5 $\times$ シーケナーゼバッファー10 μ lを加え、滅菌水で最終的に50 μ lとし、37℃、1時間インキュベートする。このDNAフラグメント(1-2、3-4、5-6、7-8)を2%アガロースで泳動し、切り出し、30 μ lの滅菌水に溶解する。次に、切り出したDNAフラグメント1-2と3-4、5-6と7-8、それぞれ2 μ lに、Pfuポリメラーゼ1 μ l、DMSO 5 μ l、10 $\times$ Pfuバッファー9 μ lを加え、滅菌水を加え90 μ lとしたのち、PCRを94℃1分、55℃1分、72℃2分の条件で6サイクル行う。次に、10 $\times$ バッファー1 μ l、20 μ Mプライマー(aとb、またはcとd)をそれぞれ5 μ l加え、PCRをさらに94℃1分、55℃1分、72℃2分で25サイクル行う。増幅されたDNAフラグメント(1-2-3-4と5-6-7-8)を切り出し、30 μ lの滅菌水に溶解し、それぞれのDNA 2 μ lを用いてPCRを前述の条件で6サイクル行い、プライマーe、fを加えてさらにPCRを前述の条件で25サイクル行う。得られたDNAフラグメントを切り出し、pT7blueベクターにクローニングし、配列を確認する。

次に、上記6. と同様に、発現ベクターである「BCMGS Neoベクター」と、PCRにて制限

酵素サイトを付けた合成H鎖可変領域DNAと、ヒト γ 鎖DNAとをライゲーションし、CDRH鎖ベクターを作製する。同様に、合成L鎖可変領域DNAとヒト λ 鎖DNAとが組込まれたCDRL鎖ベクターを作製する。

【0105】

7-3. トランスフェクション

CDRH鎖ベクター及びCDRL鎖ベクターをCHO細胞にリポフェクション法を用いて同時にトランスフェクションし、37℃、12時間培養した後、96穴プレートにまき直し、ネオマイシン500 μ g/mlを含むDMEM/10%FCSで選択する。その後、ELISAにて最も発現量の多いクローンを選択する。培養上清を回収し、Protein Aアガロースカラムを用いて抗体を精製する。

【産業上の利用可能性】

10

【0106】

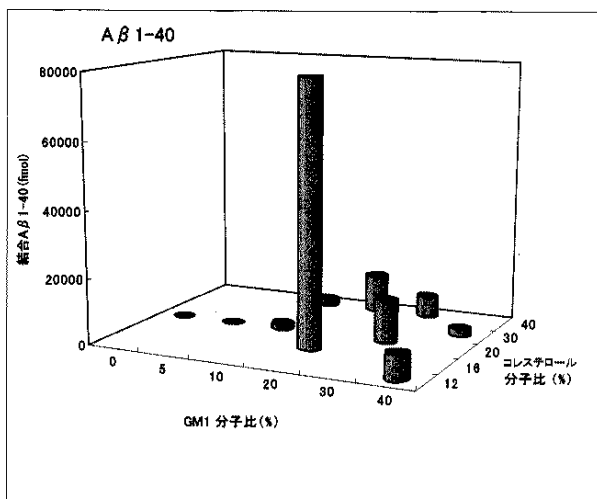
本発明により、アミロイド線維形成に対する阻害活性の高い抗体の情報（アミノ酸配列、DNA配列）が提供される。また、当該活性を有する抗体（抗体断片を含む）が提供される。特に、CDRの情報を基にヒト化抗体の作製が可能となる。これらの抗体は、アルツハイマー病の診断、予防、治療等における有効な手段として利用され得る。

【0107】

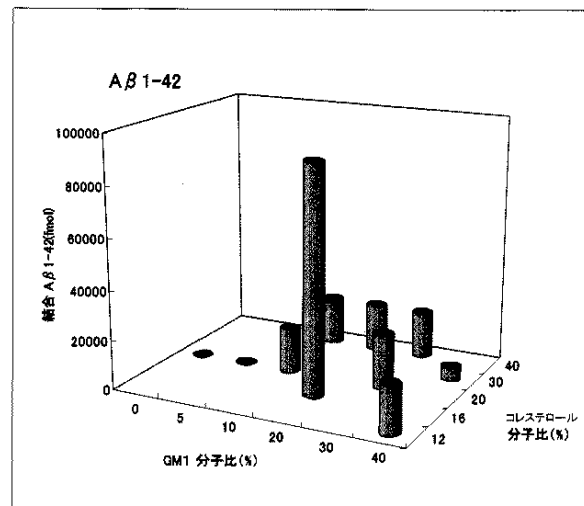
この発明は、上記発明の実施の形態及び実施例の説明に何ら限定されるものではない。特許請求の範囲の記載を逸脱せず、当業者が容易に想到できる範囲で種々の変形態様もこの発明に含まれる。

本明細書の中で明示した論文、公開特許公報、及び特許公報などの内容は、その全ての 20
内容を援用によって引用することとする。

【図1】



【図2】



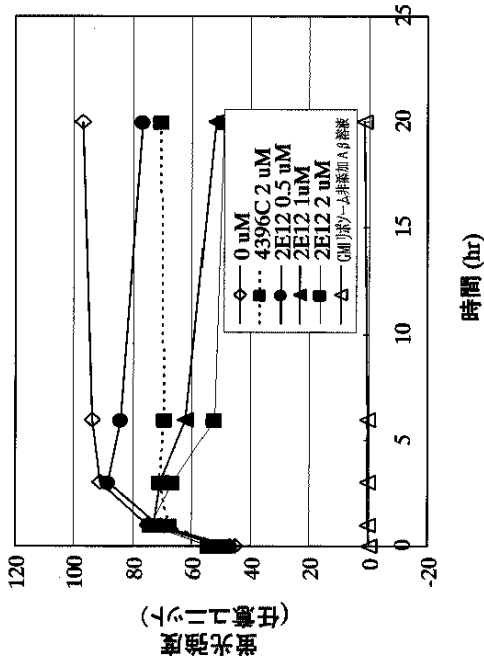
【図 3】

リポソーム	分子比
SM : Cho1 : GM1	①75 : 20 : 5
	②50 : 40 : 10
	③70 : 20 : 10
	④64 : 16 : 20
	⑤40 : 40 : 20
	⑥50 : 20 : 30
	⑦30 : 40 : 30
	⑧30 : 30 : 40
	⑨48 : 12 : 40

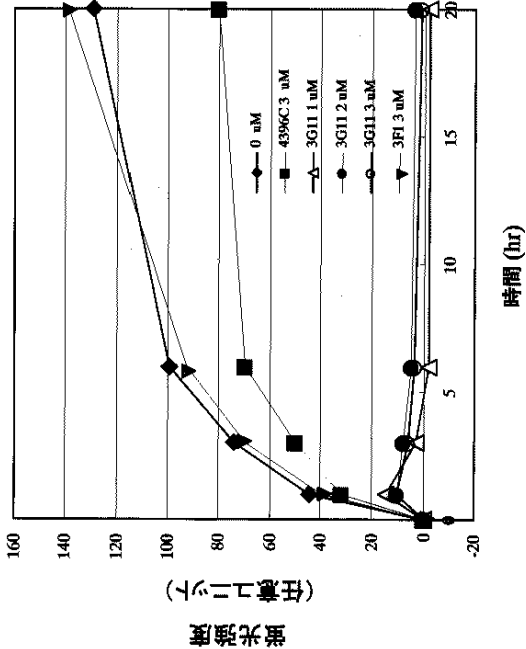
【図 4】

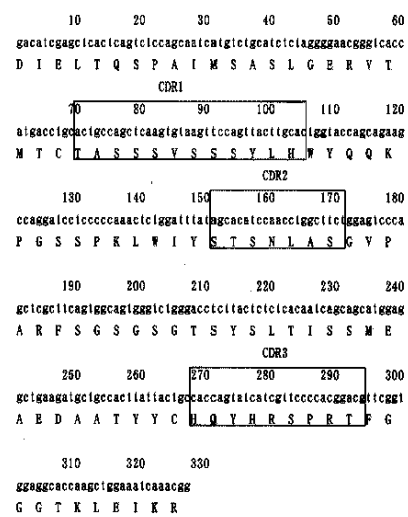
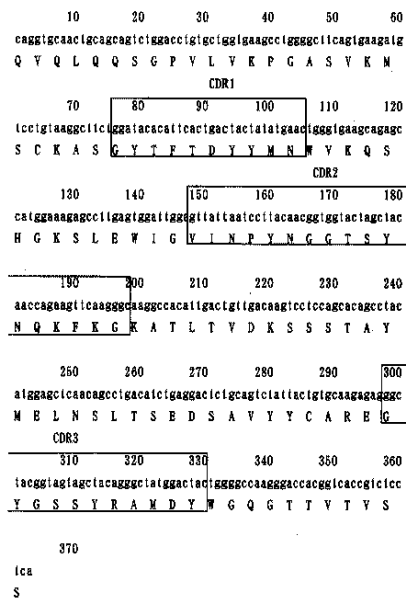
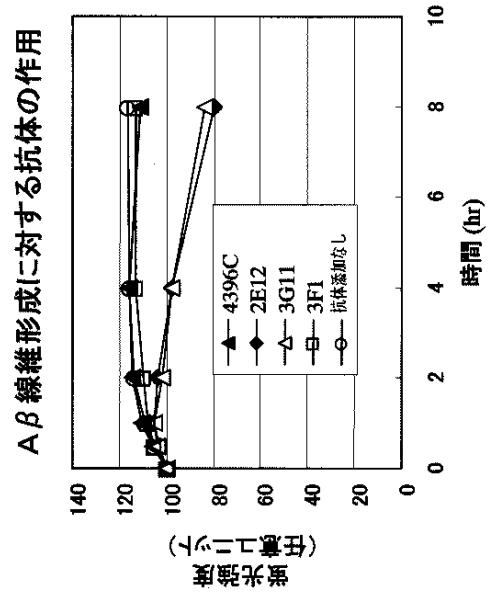
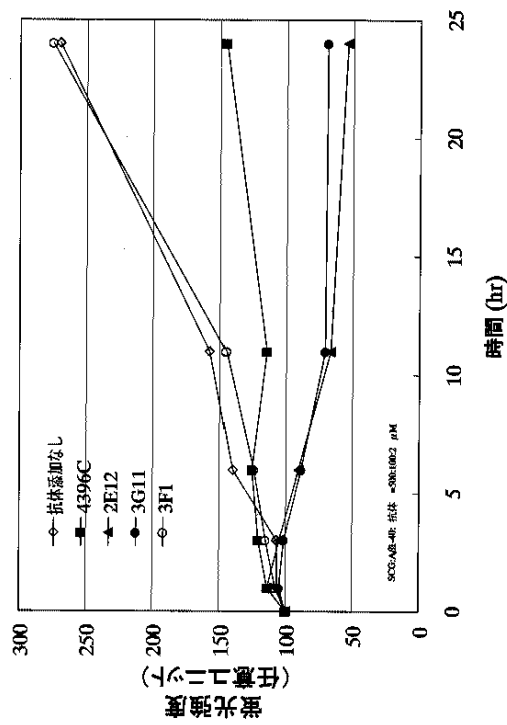
クローン	クラス	A β 線維形成率 (%) *		
		線維化 $A\beta_{42}$	cap40	cap42
4396C	IgG2a	5.4	90.6	86.2
4G8+++	IgG1	87	89.5	95.4
1C9	IgM	11.1	91	87.6
2E12	IgM	18.2	-4.9	-4.9
3G11	IgM	21.3	-2	-0.4
4E11	IgG2b	10.7	27.7	-4.9

【図 5】



【図 6】





【例 12】

```

      10          20          30          40          50          60
gacatccagcagtgacacagctccacagctccctgctccatgcatataggagaaaagcgc
D I Q N T Q S P A S L S M A I G E K V Y

      CDR1

      70          80          90          100          110          120
atcagatgataaccacacatgataigatgataatgaatggatcaccagcagaagcca
I R C T T S T D I D D M N W Y Q K Q P

      CDR2

      130          140          150          160          170          180
ggagagccctcctaagctctctatccagacacatcctctcctgctcagctccatcc
G E P P K L L I S E G N T L R P G V F S

      CDR3

      190          200          210          220          230          240
cgatctccacagcagctgctatgatacagaattgttgttaccattgaaacacgctctca
R F S S S G Y G T D F V F T I E N M L S

      CDR3

      250          260          270          280          290          300
gaagatgttcagatattactactgttcgaagtgataactgtccacttcgctgtcagc
E D V A D Y Y C L Q S D N L L T F G A G

      310          320          330
accacgtagaattcacacgtaggic
T K L E I K R M Y

```

【图 14】

10 20 30 40 50 60

gacatccagcagtcaggcgcgtctcatctcccctggcgctgtagcacgcaggagagagaggttact
D I Q M T I Q S P S S L A V T A G E K V T

CDR1

70 80 90 100 110 120

aigagcltgacgaagtcaggcgcagctcgtllaaacnctggaaatcaaaagcaactacttacc
M S C K S S Q S L L N S G N O K N Y I L T

CDR2

130 140 150 160 170 180

lgttacccaagaacaacacagcgcctcctaactcgtlgaactctagctgacccattccacc
W Y Q Q K E P G Q P P K L L I Y F A A S T R

190 200 210 220 230 240

gaatcgggtccccgatgactcttcacagccagtcgactcggacagcaattttactcttacc
E S G V P D R F T G S G S G T D F T L T

CDR3

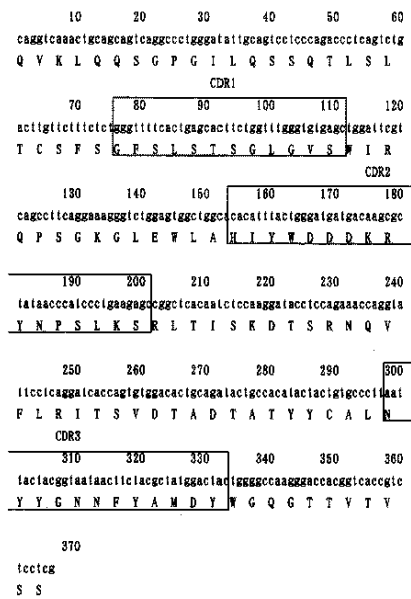
250 260 270 280 290 300

atccagcagtctgacgcctggagacctggcagcttatattactctcagaatgallatagttat
I S S V Q A E D L A V Y Y C Q N D Y S Y

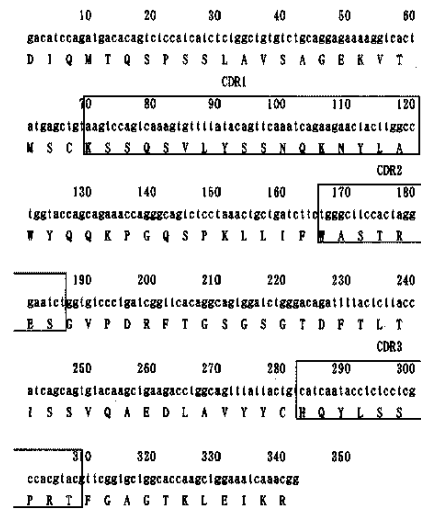
310 320 330 340

ccatcactctctgccctcggagaccagctggagatgct
P F T F G S G T K L E M Y

【図 15】

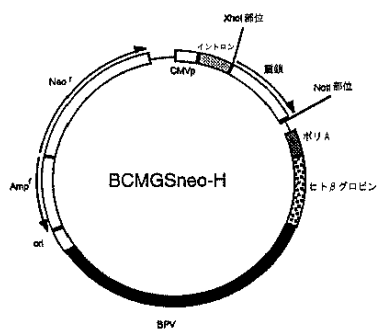


【図 16】

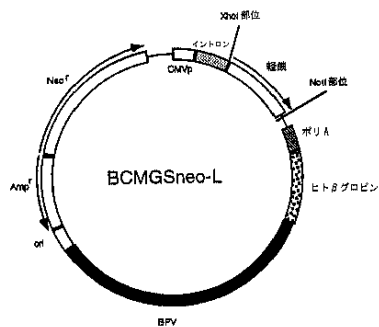


【图 17】

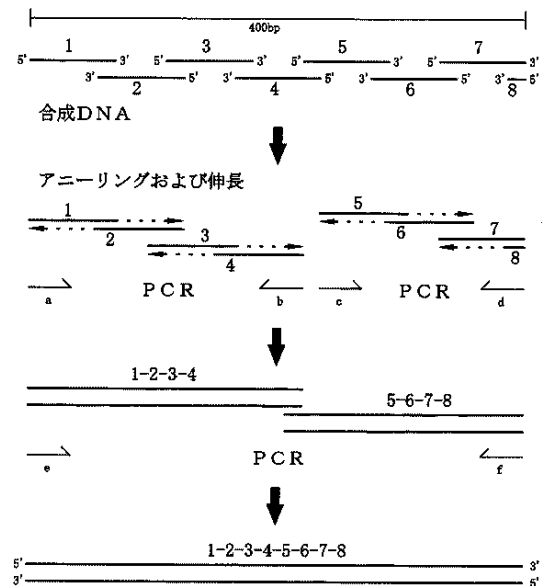
(A)



(B)



【图 18】



【配列表】
2006137354000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2006/312226
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C12N15/09(2006.01)i, A61K39/00(2006.01)i, A61P25/28(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)i, C07K16/46(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i,</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) <i>C12N15/09, A61K39/00, A61P25/28, C07K16/18, C07K16/46, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12P21/08, G01N33/53</i>		
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) BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JMEDPlus (JDream2), JST7580 (JDream2), JSTPlus (JDream2)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	YANAGISAWA, K. et al., Amyloid beta-protein (A beta) associated with lipid molecules: immunoreactivity distinct from that of soluble A beta, FEBS Lett., 1997, Vol.420, No.1, pages 43 to 46	1-10
Y	HAYASHI, H. et al., A seed for Alzheimer amyloid in the brain, J.Neurosci., 2004, Vol.24, No.20, pages 4894 to 4902	1-10
Y	WO 2003/014162 A1 (MEDICAL & BIOLOGICAL LAB CO., LTD.), 20 February, 2003 (20.02.03), & EP 1420032 A1 & US 2004/181042 A1 & AU 2002323760 A1	1-10
☒ 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 31 August, 2006 (31.08.06)		Date of mailing of the international search report 12 September, 2006 (12.09.06)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/312226

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Katsuhiko YANAGISAWA, "Amyloid β Tanpaku Chikuseki Kaishi Kijo no Kenkyu, Alzheimer's Disease no Hassho Bunshi Kiko ni Kansuru Kenkyu", Heisei 14 Nendo Sokatsu · Buntan Kenkyu Hokokusho, 2004, pages 11 to 14	1-10
A	Yoshio YAGUCHI et al., "Ko-Amyloid β Tanpaku Kotai", The Cell, 2001, Vol.33, No.2, pages 56 to 57	1-10
A	YANAGISAWA, K. et al., GM1 ganglioside-bound amyloid beta-protein (A beta): a possible form of preamyloid in Alzheimer's disease, Nat Med., 1995, Vol.1, No.10, pages 1062 to 1066	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/312226

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
(International Patent Classification (IPC))

G01N33/53(2006.01)i

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/312226

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 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:

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 No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

The technical feature of the inventions of claims 1-10 relates to an antibody having an inhibitory effect on amyloid fibril formation, which shows the inhibitory effect by 50% or higher as determined in an *in vitro* inhibition test on the polymerization of amyloid β protein. The technical feature of the inventions of claims 11-18 relates to a synthetic lipid membrane for use in the immunization of an animal comprising GM1 ganglioside, other lipid and amyloid β protein bound to GM1 ganglioside, the compositional ratio of the other lipid to GM1 ganglioside being 90:10 to 60:40. Since it does not appear that there is a technical relationship between the two groups of inventions

(continued to extra sheet)

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.: 1-10

Remark on Protest
the

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee..
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/312226

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)

involving one or more of the same or corresponding special technical features, these inventions are not considered to be so linked as to form a single general inventive concept.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 6 / 3 1 2 2 2 6	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))			
Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A61K39/00(2006.01)i, A61P25/28(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)i, C07K16/46(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12P21/08(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 (I P C))			
Int.Cl. C12N15/09, A61K39/00, A61P25/28, C07K16/18, C07K16/46, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12P21/08, 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			
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)			
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JMEDPlus (JDream2), JST7580 (JDream2), JSTPlus (JDream2)			
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 請求の範囲の番号	
Y	YANAGISAWA, K. et al., Amyloid beta-protein (A beta) associated with lipid molecules: immunoreactivity distinct from that of soluble A beta, FEBS Lett., 1997, Vol.420, No.1, p.43-46	1-10	
Y	HAYASHI, H. et al., A seed for Alzheimer amyloid in the brain, J Neurosci., 2004, Vol.24, No.20, p.4894-4902	1-10	
Y	WO 2003/014162 A1 (MEDICAL & BIOLOGICAL LAB CO LTD) 2003.02.20, & EP 1420032 A1 & US 2004/181042 A1 & AU 2002323760 A1	1-10	
☒ 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。			
* 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 3 1 . 0 8 . 2 0 0 6		国際調査報告の発送日 1 2 . 0 9 . 2 0 0 6	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (I S A / J P) 郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 飯室 里美 電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8	

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 6 / 3 1 2 2 2 6

C (続き) . 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 請求の範囲の番号
Y	柳澤勝彦, アミロイド β 蛋白蓄積開始機序の研究, アルツハイマー病の発症分子機構に関する研究 平成 1 4 年度 総括・分担研究報告書, 2004, p. 11-14	1-10
A	矢口義男, 他, 抗アミロイド β 蛋白抗体, 細胞, 2001, Vol. 33, No. 2, p. 56-57	1-10
A	YANAGISAWA, K. et al., GM1 ganglioside-bound amyloid beta-protein (A beta): a possible form of preamyloid in Alzheimer's disease, Nat Med., 1995, Vol. 1, No. 10, p. 1062-1066	1-10

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 6 / 3 1 2 2 2 6

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-10に係る発明の技術的特徴は、in vitroでのアミロイドβタンパク質重合阻害試験において阻害効果が50%以上である、アミロイド線維形成に対する阻害活性を有する抗体に関し、請求の範囲11-18に係る発明の技術的特徴は、GM1ガングリオシドと、その他の脂質と、及び該GM1ガングリオシドに結合したアミロイドβタンパク質とを含有し、成分比率が、その他の脂質：GM1ガングリオシド=90：10～60：40の範囲にある動物免疫用の合成脂質膜に関するものであり、両発明は、一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的な関係にないから、単一の一般的発明概念を形成するように連関しているものとは認められない。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲1-10

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付を伴う異議申立てがなかった。

様式PCT/ISA/210（第1ページの続葉（2））（2005年4月）

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 5/00	A
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	C
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	H
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
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	D

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

(72)発明者 柴田 昌夫

神奈川県川崎市高津区坂戸 3-2-1 かながわサイエンスパーク R&D D棟 11階 OM
A b P h a r m a 株式会社内

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA31 BA43 CA04 DA02 EA04 GA03 GA11
4B064 AG26 CA10 CA20 CC24 DA01 DA13
4B065 AA91X AA92X AB01 AB05 AC14 BA02 BA08 CA25 CA44 CA45
4C085 AA03 AA13 CC02 CC03 CC04 DD23 DD62 EE03
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA75 EA21 EA50 FA72 FA74

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)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184条の10第1項(実用新案法第48条の13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)	一种对淀粉样蛋白原纤维形成具有抑制活性的抗体		
公开(公告)号	JPWO2006137354A1	公开(公告)日	2009-01-15
申请号	JP2007522270	申请日	2006-06-19
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社医学生物学研究所 国家中心长寿通用		
申请(专利权)人(译)	株式会社医学生物学研究所 国家中心长寿通用		
[标]发明人	柳澤勝彦 柴田昌夫		
发明人	柳澤 勝彦 柴田 昌夫		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 C12N15/02 A61K39/00 A61K39/395 A61P25/28 G01N33/53		
CPC分类号	A61P25/28 C07K16/18 C07K16/3084 C07K2317/24 C07K2317/32 C07K2317/565 C07K2317/76 G01N33/6896 G01N2500/00 G01N2800/2821		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A C12P21/08 C12N15/00.C A61K39/00.H A61K39/395.D A61P25/28 G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/BA43 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024 /GA03 4B024/GA11 4B064/AG26 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA91X 4B065/AA92X 4B065/AB01 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA08 4B065 /CA25 4B065/CA44 4B065/CA45 4C085/AA03 4C085/AA13 4C085/CC02 4C085/CC03 4C085/CC04 4C085/DD23 4C085/DD62 4C085/EE03 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045 /CA40 4H045/DA75 4H045/EA21 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	萩野 干治		
优先权	2005180334 2005-06-21 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了一种对淀粉样蛋白原纤维形成具有高抑制作用的抗体。通过使用含有预定比例的GM1神经节苷脂的脂质体作为免疫原来产生抗体。因此，可以提供四种类型的抗体的序列，每种抗体对淀粉样蛋白原纤维形成具有高抑制作用。

