

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2013-135667

(P2013-135667A)

(43) 公開日 平成25年7月11日(2013.7.11)

(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	2 G O 4 5
C O 7 K 16/18 (2006.01)	C O 7 K 16/18	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 C	4 B O 6 4
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 2	4 B O 6 5
G O 1 N 33/15 (2006.01)	G O 1 N 33/15 Z	4 C O 8 5
審査請求 有 請求項の数 14 O L (全 44 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2012-270745 (P2012-270745)	(71) 出願人	511292334 T A Oヘルスライフファーマ株式会社
(22) 出願日	平成24年12月11日 (2012.12.11)		京都府京都市中京区新樞木町通竹屋町上る
(62) 分割の表示	特願2009-539096 (P2009-539096) の分割		西葦堂町176番地
原出願日	平成20年10月29日 (2008.10.29)	(74) 代理人	110000040 特許業務法人池内・佐藤アンドパートナーズ
(31) 優先権主張番号	特願2007-280187 (P2007-280187)	(72) 発明者	星 美奈子 京都府京都市左京区吉田近衛町 国立大学 法人京都大学大学院医学研究科内
(32) 優先日	平成19年10月29日 (2007.10.29)	(72) 発明者	佐藤 道夫 東京都町田市高ヶ坂101-8
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(72) 発明者	井手野 祥次 大阪府大阪市中央区北浜二丁目6番18号 田辺三菱製薬株式会社内
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 抗体及びその利用

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 アミロイド前駆蛋白質に対する反応性が低く、かつアミロスフェロイドに対する反応性が、アミロイド線維またはアミロイドモノマー蛋白質に対する反応性よりも高い抗体等を提供することを目的とする。

【解決手段】 アミロスフェロイドに対する反応性が、アミロイド前駆蛋白質に対する反応性よりも高く、かつ以下の何れか1以上の特徴を有する抗体が提供される。(i) アミロスフェロイドに対する反応性が、アミロイド線維に対する反応性よりも高い；(ii) アミロスフェロイドに対する反応性がアミロイドモノマー蛋白質に対する反応性よりも高い；(iii) アミロスフェロイドによる神経細胞死誘導に対する阻害活性を有する。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

アミロスフェロイドに対する反応性が、アミロイド前駆蛋白質に対する反応性よりも高く、かつ以下の何れか1以上の特徴を有する抗体。

(i)アミロスフェロイドに対する反応性が、アミロイド線維に対する反応性よりも高い;

(ii)アミロスフェロイドに対する反応性が、アミロイドモノマー蛋白質に対する反応性よりも高い;

(iii)アミロスフェロイドによる神経細胞死誘導に対する阻害活性を有する。

## 【請求項 2】

抗体のアミロスフェロイド及びアミロイド線維に対する反応性を同一抗体濃度及び抗体量並びに同一の抗原蛋白質濃度及び抗原蛋白質量を用いて比較する系において、抗体のアミロスフェロイドに対する反応性がアミロイド線維に対する反応性の3倍以上である、請求項 1 に記載の抗体。

10

## 【請求項 3】

抗体のアミロスフェロイド及びアミロイド線維に対する反応性を同一の抗体濃度及び抗体量並びに同一の抗原蛋白質濃度及び抗原蛋白質量を用いて比較する系において、抗体のアミロスフェロイドに対する反応性がアミロイド線維に対する反応性の5倍以上である、請求項 1 又は 2 に記載の抗体。

## 【請求項 4】

抗体のアミロスフェロイド及びアミロイドモノマー蛋白質に対する反応性を同一の抗体濃度及び抗体量並びに同一の抗原蛋白質濃度及び抗原蛋白質量を用いて比較する系において、抗体のアミロスフェロイドに対する反応性がアミロイドモノマー蛋白質に対する反応性の50倍以上である、請求項 1 から 3 の何れかに記載の抗体。

20

## 【請求項 5】

抗体のアミロスフェロイド及びアミロイドモノマー蛋白質に対する反応性を同一の抗体濃度及び抗体量並びに同一の抗原蛋白質濃度及び抗原蛋白質量を用いて比較する系において、抗体のアミロスフェロイドに対する反応性がアミロイドモノマー蛋白質に対する反応性の500倍以上である、請求項 1 から 4 の何れかに記載の抗体。

## 【請求項 6】

アミロスフェロイドを抗原として得られる、請求項 1 から 5 の何れかに記載の抗体。

30

## 【請求項 7】

モノクローナル抗体である、請求項 1 から 6 の何れかに記載の抗体。

## 【請求項 8】

アミロスフェロイドに対する解離定数が $10^{-9}$ 以下である、請求項 7 に記載の抗体。

## 【請求項 9】

ヒト正常組織への有意な交叉反応性を示すことなく、アルツハイマー病脳に特異的に反応する請求項 1 から 8 の何れかに記載の抗体。

## 【請求項 10】

アミロスフェロイドの立体構造特異的なエピトープを認識する請求項 1 から 9 の何れかに記載の抗体。

40

## 【請求項 11】

ハムスター由来の抗体である、請求項 1 から 10 の何れかに記載の抗体。

## 【請求項 12】

受託番号FERM BP-10871またはFERM BP-10872を有するハイブリドーマにより産生される、請求項 1 から 11 のいずれかに記載のモノクローナル抗体。

## 【請求項 13】

受託番号FERM BP-10871またはFERM BP-10872を有するハイブリドーマにより産生されるハムスターモノクローナル抗体をヒト化することにより得られるヒト化抗体。

## 【請求項 14】

受託番号FERM BP-10872を有するハイブリドーマにより産生されるハムスターモノクロー

50



## 【化2】

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

10

20

[式中、第2位のXaaはSerまたはAlaであり、第8位のXaaはSerまたはAlaであり、第48位のXaaはTyrまたはPheであり、第49位のXaaはLeuまたはPheであり、第51位のXaaはLys、PheまたはArgであり、第74位のXaaはAlaまたはThrであり、第79位のXaaはGlyまたはAlaである]

を含む、請求項13に記載のヒト化抗体またはその断片。

30

## 【請求項16】

配列番号5に記載のアミノ酸配列の重鎖可変領域及び、配列番号7に記載のアミノ酸配列の軽鎖可変領域を有する、請求項15に記載のヒト化抗体またはその断片。

## 【請求項17】

被験物質と請求項1から16の何れかに記載の抗体とをアミロスフェロイドに接触させ、被験物質のアミロスフェロイドへの結合性を指標として候補物質を選択することを含む、アルツハイマー病の治療及び/又は予防薬のスクリーニング方法。

## 【請求項18】

アルツハイマー病の疑いのある個体から取得した生体試料を請求項1から16の何れかに記載の抗体と接触させ、該サンプル中の該抗体と反応する物質の有無を測定することを含む、アルツハイマー病個体の検出方法。

40

## 【請求項19】

請求項1から16の何れかに記載の抗体を含む、神経細胞保護剤。

## 【請求項20】

請求項1から16の何れかに記載の抗体を含む、アルツハイマー病の検出のための試薬。

## 【請求項21】

請求項1から16の何れかに記載の抗体を含む、医薬。

## 【請求項22】

請求項1から16の何れかに記載の抗体を含む、アルツハイマー病の治療及び/または予防薬。

50

## 【請求項 2 3】

アミロスフェロイドを被覆してなることを特徴とする、請求項 1 から 1 6 の何れかに記載の抗体を検出するための固相担体。

## 【請求項 2 4】

請求項 7 又は 8 に記載の抗体を産生するハイブリドーマ。

## 【請求項 2 5】

受託番号 FERM BP-10871 または FERM BP-10872 を有するハイブリドーマ。

## 【請求項 2 6】

請求項 1 3 から 1 6 のいずれかに記載のヒト化抗体の重鎖あるいは軽鎖をコードする配列またはその断片を含む核酸。

10

## 【請求項 2 7】

請求項 1 3 から 1 6 のいずれかに記載のヒト化抗体または断片を発現するための発現ベクターであって、該抗体または断片をコードするヌクレオチド配列を含むベクター。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、アミロイド前駆蛋白質に対する反応性が低く、かつアミロスフェロイドに対する高い反応性を有する新規な抗体及びその利用法に関するものである。

## 【背景技術】

## 【0002】

20

アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン舞蹈病、プリオン病等の加齢に伴って発症する複数の神経変性疾患において、現在「異常構造蛋白質」が共通の発症機構として注目され、その分子実体の探索が行われている。アルツハイマー病については、アミロイド蛋白質(A<sub>β</sub>)を主成分とする老人斑(Selkoe, D.J., *Annu. Rev. Neurosci.*, 12, 463-490 (1989)、及びGlennner, G. G. and Wong, C. W., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 120(3), 885-890 (1984)を参照)と、リン酸化されたタウ蛋白質を主成分とする神経原線維変化(Paired Helical Filament; PHF)(Ihara, Y. et al., *J. Biochem.*, 99, 1807-1810 (1986)、及びGrundke-Iqbal, I. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 83, 4913-4917 (1986)を参照)の2種の線維性凝集体が脳に沈着することが病理学的特徴として報告されている。また近年、複数の多様な病因により発症すると考えられてきたアルツハイマー病研究において、アミロイド蛋白質の凝集が全てに共通な発症経路であると考えられるようになってきた。アミロイド蛋白質は、その前駆体物質(アミロイド前駆蛋白質: Amyloid Precursor Protein; APP)から主として40残基(A<sub>β</sub><sub>1-40</sub>)ないしは42残基(A<sub>β</sub><sub>1-42</sub>)の分子種として切り出されて生じるペプチドであり、正常人においても恒常的にモノマーとして生成・分解過程が進んでいるが、アルツハイマー病においてはアミロイド蛋白質が凝集し最終的に過剰な沈着となって観察される。これは、切り出しの過程、又は分解の過程での脱制御の結果であると考えられる。本明細書では、前者(A<sub>β</sub><sub>1-40</sub>)を「アミロイド 40」、「アミロイド 40モノマー」または「アミロイド 40モノマー蛋白質」と、また後者(A<sub>β</sub><sub>1-42</sub>)を「アミロイド 42」、「アミロイド 42モノマー」または「アミロイド 42モノマー蛋白質」と、称することがある。また、43残基(A<sub>β</sub><sub>1-43</sub>)の分子種としても微量ながら切り出されて生じ、これを「アミロイド 43」、「アミロイド 43モノマー」または「アミロイド 43モノマー蛋白質」と、称することがある。

30

40

## 【0003】

凝集したアミロイド蛋白質は神経細胞に対し神経毒として作用してシナプスの変性とそれに続く神経細胞死を引き起こし、これがアルツハイマー病の進行性認知障害の原因となる神経細胞脱落の機構であると考えられている。また、アミロイド蛋白質は水溶性のモノマーペプチドとして細胞外に放出された状態では神経細胞死活性(以下、本明細書中において神経細胞死活性を「毒性」と称することがある)を示さず、自己会合しアミロイド線維を形成して初めて毒性を獲得することが報告されている(Lorenzo, A. and Yankner, B. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 91, 12243-12247 (1994)を参照)。このアミロ

50

イド 線維を含む毒性アミロイド 蛋白質含有液を神経系の培養細胞に高濃度で添加すると、これらの細胞を死に至らしめることが知られているため、アルツハイマー病においてはこのアミロイド 線維が神経細胞死を誘発している本体であると考えられてきた。

【0004】

従って、このアミロイド 線維を含む毒性アミロイド 蛋白質の添加により神経系細胞等に細胞死を誘発する実験系は、アルツハイマー病における神経細胞死を反映していると思われ、神経細胞死抑制剤のスクリーニング等に多く用いられてきた。しかし近年、(1)アミロイド 線維を含む毒性アミロイド 蛋白質含有液で神経細胞死を誘導するのに必要な濃度は数10 $\mu$ Mであり(Yankner, B. A., et. al., Science, 250, 279-282 (1990)を参照)、アルツハイマー病患者の脳に存在するアミロイド 蛋白質濃度の1000倍以上高い濃度である、(2)アルツハイマー病患者の脳においてアミロイド 線維の沈着量が、記憶や認知機能などの高次機能の障害程度と必ずしも相関せず、大量のアミロイド 線維の沈着を持ちながら何の臨床症状を示さない場合もあること、(3)さらに、脳内のアミロイドの沈着部位と神経細胞脱落部位が必ずしも一致していない、(4)APP過剰発現マウスの脳においてアミロイド 線維の沈着以前、又は沈着なしに学習行動異常が生じる、(5)アルツハイマー病患者の脳における可溶性のアミロイド 蛋白質含量の増加は難溶性の線維沈着よりも10年以上先行する等、アミロイド 蛋白質の毒性の本体がアミロイド 線維ではないことを示唆する事実が報告されるようになってきた。

10

【0005】

本発明者らは、先に、アルツハイマー病等の患者の生体内に存在する自己会合したアミロイド 蛋白質と同等の濃度で神経系細胞に細胞死を誘導する、高い毒性を有する自己会合型アミロイド 蛋白質含有液、及びその調製方法を提案した(特開2001-247600号公報)。さらに、上記自己会合型アミロイド 蛋白質含有液に含まれる神経細胞毒性の本体を分離する方法を見だし、解析を行ったところ、粒径約10~約20nm程度の粒状の形態を有する自己会合型アミロイド 蛋白質であることがわかり、これをアミロスフェロイドと命名した(Hoshi, M., et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 100, 6370-6375 (2003)を参照)。本明細書では、この命名に従い、粒径約10~約20nm程度の粒状の形態を有する自己会合型アミロイド 蛋白質を「アミロスフェロイド」と称することがある。

20

【0006】

アミロスフェロイドは、アルツハイマー病患者の脳内に存在するアミロイド 蛋白質と同等の濃度で神経細胞死を誘導し、またアミロスフェロイドによって神経が死に至る過程でもう一つの病理学的マーカーであるタウ蛋白質のリン酸化を引き起こすなど、アルツハイマー病で起きている病態と合致するため、脳内におけるアミロイド 蛋白質の毒性の本体であると考えられた。したがって、(1)アミロスフェロイドの形成を阻害する抗体、あるいは(2)アミロスフェロイドの神経系細胞に対する毒性を阻害する抗体を取得すれば、アルツハイマー病の治療または予防薬として用いることができる。また、(3)アミロスフェロイドに対する反応性が、アミロイド前駆蛋白質、アミロイド モノマーやアミロイド 線維等に対する反応性よりも高い抗体を取得すればアルツハイマー病の診断のための測定への応用も可能である。

30

【0007】

アミロスフェロイドを抗原とした抗体の作製方法は、既に公知の方法ではある。また、ウサギポリクローナル抗アミロスフェロイド抗体(ASD2、ASD3)やマウスモノクローナル抗アミロスフェロイド抗体(MASD1、MASD2、MASD3)が既に取得されている(WO2006/016644号)(アミロスフェロイドに反応する抗体を、「抗アミロスフェロイド抗体」と称することがある)。しかし、アミロイド前駆蛋白質に対する反応性が低く、かつアミロスフェロイドに特異的に反応し、該蛋白質の神経系細胞に対する毒性を阻害する抗体は取得されていなかった。なお、WO2006/016644号で記載されているウサギポリクローナル抗アミロスフェロイド抗体(ASD2、ASD3)およびマウスモノクローナル抗アミロスフェロイド抗体(MASD1、MASD2、MASD3)は、本願明細書においてはそれぞれ以下のように表記する。

40

50

ASD3      rpASD3  
 MASD1     mASD1  
 MASD2     mASD2  
 MASD3     mASD3

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】特開2001-247600号公報

【特許文献2】WO2006/016644号

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Selkoe, D.J., Annu. Rev. Neurosci., 12, 463-490 (1989)

【非特許文献2】Glennner, G. G. and Wong, C. W., Biochem. Biophys. Res. Commun., 120(3), 885-890 (1984)

【非特許文献3】Ihara, Y. et al., J.Biochem., 99, 1807-1810 (1986)

【非特許文献4】Grundke-Iqbal, I. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 83,4913-4917 (1986)

【非特許文献5】Lorenzo, A. and Yankner, B. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 91,12243-12247 (1994)

【非特許文献6】Yankner, B. A., et. al., Science, 250, 279-282 (1990)

【非特許文献7】Hoshi, M., et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 100, 6370-6375 (2003)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明は、アミロスフェロイドに対する反応性が、アミロイド前駆蛋白質に対する反応性よりも高く、アミロスフェロイドに対する反応性が、アミロイド線維またはアミロイドモノマー蛋白質に対する反応性よりも高い抗体、又はアミロスフェロイドに対する反応性が、アミロイド前駆蛋白質に対する反応性よりも高く、アミロスフェロイドによる神経細胞死誘導に対する阻害活性を有する抗体を取得することを解決すべき課題とする。さらに本発明は、上記抗体を用いたアルツハイマー病の治療及び/又は予防薬のスクリーニング方法、及びアルツハイマー病個体の検出方法を提供することを解決すべき課題とする。さらに本発明は、上記抗体を用いた神経細胞保護剤、アルツハイマー病の検出のための試薬、及びアルツハイマー病の治療及び/又は予防薬などの医薬を提供することを解決すべき課題とする。さらに本発明は、上記抗体を検出するための固相担体を提供することを解決すべき課題とする。さらに本発明は、上記抗体を産生するハイブリドーマを提供することを解決すべき課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討した結果、ハムスターに対し、アミロスフェロイドを皮下に免疫し、この動物から取得した脾細胞から樹立したハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体を取得したところ、該抗体はアミロイド前駆蛋白質に対する反応性が低く、アミロスフェロイドに対する反応性が、アミロイド線維またはアミロイドモノマー蛋白質に対する反応性よりも高いこと、さらにアミロスフェロイドによる神経細胞死誘導に対する阻害活性を有するものであることを見出した。また、該抗体は、ヒト正常組織への交叉反応性が低くアルツハイマー病脳に特異的に反応することを見出した。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。

【0012】

すなわち本発明によれば、以下の発明が提供される。

(1) アミロスフェロイドに対する反応性が、アミロイド前駆蛋白質に対する反応性よりも

10

20

30

40

50

高く、かつ以下の何れか1以上の特徴を有する抗体。

- (i) アミロスフェロイドに対する反応性が、アミロイド線維に対する反応性よりも高い;
- (ii) アミロスフェロイドに対する反応性が、アミロイドモノマー蛋白質に対する反応性よりも高い;
- (iii) アミロスフェロイドによる神経細胞死誘導に対する阻害活性を有する。

【0013】

(2) 抗体のアミロスフェロイド及びアミロイド線維に対する反応性を同一の抗体濃度及び抗体量並びに同一の抗原蛋白質濃度及び抗原蛋白質量を用いて比較する系において、抗体のアミロスフェロイドに対する反応性がアミロイド線維に対する反応性の3倍以上である、(1)に記載の抗体。

10

(3) 抗体のアミロスフェロイド及びアミロイド線維に対する反応性を同一の抗体濃度及び抗体量並びに同一の抗原蛋白質濃度及び抗原蛋白質量を用いて比較する系において、抗体のアミロスフェロイドに対する反応性がアミロイド線維に対する反応性の5倍以上である、(1)又は(2)に記載の抗体。

【0014】

(4) 抗体のアミロスフェロイド及びアミロイドモノマー蛋白質に対する反応性を同一の抗体濃度及び抗体量並びに同一の抗原蛋白質濃度及び抗原蛋白質量を用いて比較する系において、抗体のアミロスフェロイドに対する反応性がアミロイドモノマー蛋白質に対する反応性の50倍以上である、(1)から(3)の何れかに記載の抗体。

20

(5) 抗体のアミロスフェロイド及びアミロイドモノマー蛋白質に対する反応性を同一の抗体濃度及び抗体量並びに同一の抗原蛋白質濃度及び抗原蛋白質量を用いて比較する系において、抗体のアミロスフェロイドに対する反応性がアミロイドモノマー蛋白質に対する反応性の500倍以上である、(1)から(4)の何れかに記載の抗体。

(6) アミロスフェロイドを抗原として得られる、(1)から(5)の何れかに記載の抗体。

【0015】

(7) モノクローナル抗体である、(1)から(6)の何れかに記載の抗体。

(8) アミロスフェロイドに対する解離定数が $10^{-9}$ 以下である、(7)に記載の抗体。

(9) ヒト正常組織への有意な交叉反応性を示すことなく、アルツハイマー病脳に特異的に反応する(1)から(8)の何れかに記載の抗体。

30

(10) アミロスフェロイドの立体構造特異的なエピトープを認識する(1)から(9)の何れかに記載の抗体。

(11) ハムスター由来の抗体である、(1)から(10)の何れかに記載の抗体。

(12) 受託番号FERM BP-10871またはFERM BP-10872を有するハイブリドーマにより産生される、(1)から(11)のいずれかに記載のモノクローナル抗体。

【0016】

(13) 受託番号FERM BP-10871またはFERM BP-10872を有するハイブリドーマにより産生されるハムスターモノクローナル抗体をヒト化することにより得られるヒト化抗体。

【0017】

(14) 受託番号FERM BP-10872を有するハイブリドーマにより産生されるハムスターモノクローナル抗体由来の3つの重鎖相補性決定領域(CDRs)およびヒト免疫グロブリン重鎖由来の重鎖可変領域フレームワーク配列を含むヒト化重鎖;並びに受託番号FERM BP-10872を有するハイブリドーマにより産生されるハムスターモノクローナル抗体由来の3つの軽鎖相補性決定領域(CDRs)およびヒト免疫グロブリン軽鎖由来の軽鎖可変領域フレームワーク配列を含むヒト化軽鎖を含み、

40

3つの重鎖相補性決定領域(CDRs)がそれぞれ以下のアミノ酸配列を有し:

重鎖CDR1: Asp Tyr Phe Met Ser (配列番号11);

重鎖CDR2: Gly Ile Glu Ile Lys Ser Tyr Phe Tyr Ala Thr Tyr Tyr Phe Gly Ser Val Lys Gly (配列番号12);及び

重鎖CDR3: Asn Arg Glu Val Gly Gly Leu Asp Asn (配列番号13):

3つの軽鎖相補性決定領域(CDRs)がそれぞれ以下のアミノ酸配列を有する:

50

軽鎖CDR1: Thr Leu Arg Ser Gly Ile Ser Val Gly Gly Lys Asn Ile Tyr (配列番号14);

軽鎖CDR2: Tyr Ser Ser Tyr Ser Asn Lys Gln Leu Gly Pro (配列番号15); 及び

軽鎖CDR3: Ser Ile His Glu Ser Asn Ala Tyr Val (配列番号16):

(13)に記載のヒト化抗体またはその断片。

【0018】

(15)以下のアミノ酸配列(配列番号17)を含むヒト化重鎖可変領域:

【化1】

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1                    5                    10                    15

10

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr

20                    25                    30

Phe Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35                    40                    45

Xaa Gly Ile Glu Ile Lys Ser Tyr Phe Tyr Ala Thr Tyr Tyr Phe Gly

50                    55                    60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr

65                    70                    75                    80

20

Xaa Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr

85                    90                    95

Tyr Cys Thr Xaa Asn Arg Glu Val Gly Gly Leu Asp Asn Trp Gly Gln

100                    105                    110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115                    120

30

[式中、第49位のXaaはGlyまたはAlaであり、第81位のXはLeuまたはValであり;ならびに第100位のXaaはThrまたはArgである]

および、以下のアミノ酸配列(配列番号18)を含む軽鎖可変領域:

## 【化2】

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

10

20

[式中、第2位のXaaはSerまたはAlaであり、第8位のXaaはSerまたはAlaであり、第48位のXaaはTyrまたはPheであり、第49位のXaaはLeuまたはPheであり、第51位のXaaはLys、PheまたはArgであり、第74位のXaaはAlaまたはThrであり、第79位のXaaはGlyまたはAlaである]を含む、(13)に記載のヒト化抗体またはその断片。

## 【0019】

(16) 配列番号5に記載のアミノ酸配列の重鎖可変領域及び、配列番号7に記載のアミノ酸配列の軽鎖可変領域を有する、(15)に記載のヒト化抗体またはその断片。

(17) 被験物質と(1)から(16)の何れかに記載の抗体とをアミロスフェロイドに接触させ、被験物質のアミロスフェロイドへの結合性を指標として候補物質を選択することを含む、アルツハイマー病の治療及び/又は予防薬のスクリーニング方法。

(18) アルツハイマー病の疑いのある個体から取得した生体試料を(1)から(16)の何れかに記載の抗体と接触させ、該サンプル中の該抗体と反応する物質の有無を測定することを含む、アルツハイマー病個体の検出方法。

## 【0020】

(19) (1)から(16)の何れかに記載の抗体を含む、神経細胞保護剤。

(20) (1)から(16)の何れかに記載の抗体を含む、アルツハイマー病の検出のための試薬。

(21) (1)から(16)の何れかに記載の抗体を含む、医薬。

(22) (1)から(16)の何れかに記載の抗体を含む、アルツハイマー病の治療及び/または予防薬。

## 【0021】

(23) アミロスフェロイドを被覆してなることを特徴とする、(1)から(16)の何れかに記載の抗体を検出するための固相担体。

(24) (7)又は(8)に記載の抗体を産生するハイブリドーマ。

(25) 受託番号FERM BP-10871またはFERM BP-10872を有するハイブリドーマ。

## 【0022】

30

40

50

(26) (13)から(16)のいずれかに記載のヒト化抗体の重鎖あるいは軽鎖をコードする配列またはその断片を含む核酸。

(27) (13)から(16)のいずれかに記載のヒト化抗体または断片を発現するための発現ベクターであって、該抗体または断片をコードするヌクレオチド配列を含むベクター。

【発明の効果】

【0023】

本発明の抗体は、アミロイド前駆蛋白質に対する反応性が低く、かつアミロスフェロイドに対する反応性が、アミロイド線維またはアミロイドモノマー蛋白質に対する反応性よりも高く、さらにアミロスフェロイドによる神経細胞死誘導に対する阻害活性を有することから、アルツハイマー病の治療または予防薬として用いることができ、また、アルツハイマー病個体の検出への応用も可能である。

10

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1】本発明のモノクローナル抗アミロスフェロイド特異抗体の反応性を解析したアミロスフェロイド固相ELISAの結果を示すグラフである。

【図2】本発明のモノクローナル抗アミロスフェロイド特異抗体の反応性を解析したドットプロットの結果を示すグラフである。

【図3】本発明のモノクローナル抗アミロスフェロイド特異抗体のエピトープを解析した結果を示す図である。

【図4】本発明のモノクローナル抗アミロスフェロイド特異抗体のアミロスフェロイドによる神経細胞死誘導に対する阻害活性を解析した結果を示すグラフである。

20

【図5】市販抗体(6E10)の反応性を解析したウエスタンプロットの結果を示すグラフである。

【図6】マウスモノクローナル抗アミロスフェロイド抗体(mASD1, mASD2, mASD3)の反応性を解析したウエスタンプロットの結果を示すグラフである。

【図7】本発明のハムスターモノクローナル抗アミロスフェロイド特異抗体の反応性を解析したウエスタンプロットの結果を示すグラフである。

【図8】代表的なマウスモノクローナル抗体およびハムスターモノクローナル抗体のヒト正常組織パネルへの反応性を示す図である。

【図9】線維状アミロイドとASPDに対する抗体特異性を示す電子顕微鏡写真である。

30

【図10】ヒト化抗体RHA/RLA(huASD2)の重鎖可変領域のDNA配列、アミノ酸配列およびCD R1,2,3の位置を示したものである。

【図11】ヒト化抗体RHA/RLA(huASD2)の軽鎖可変領域のDNA配列、アミノ酸配列およびCD R1,2,3の位置を示したものである。

【図12】ヒト化抗体RHB/RLBの重鎖可変領域のアミノ酸配列およびCD R1,2,3の位置を示したものである。

【図13】ヒト化抗体RHB/RLBの軽鎖可変領域のアミノ酸配列およびCD R1,2,3の位置を示したものである。

【図14】ヒト化抗体RHC/RLCの軽鎖可変領域のアミノ酸配列およびCD R1,2,3の位置を示したものである。

40

【図15】本発明にて得られた三種類のヒト化抗体の、重鎖および軽鎖のアミノ酸配列を対比しCD R1,2,3の位置を示したものである。RHA/RLA(huASD2)、RHB/RLBおよびRHC/RLCの重鎖をそれぞれ、ADS2RHA、ADS2RHBおよびASD2RHCとして示した。ただし、ASD2RHCは、ADS2RHAと同じ配列であるので、割愛した。RHA/RLA(huASD2)、RHB/RLBおよびRHC/RLCの軽鎖をそれぞれ、ADS2RLA、ADS2RLBおよびASD2RLCとして示した。

【図16】DF-ASPDによるアポトーシス誘導に対するhuASD2抗体の抑制効果を示した図である。

【図17】DF-ASPDによる細胞死誘導に対する、haASD2およびhuASD2抗体の抑制効果を示した図である。

50

【発明を実施するための最良の形態】

## 【0025】

本発明の抗体は、アミロスフェロイドに対する反応性の方が、アミロイド前駆蛋白質に対する反応性よりも高く、かつ以下の何れか1以上の特徴を有する抗体である(以下、これらを「抗アミロスフェロイド特異抗体」と称することがある)。

(i)アミロスフェロイドに対する反応性が、アミロイド線維に対する反応性よりも高い;

(ii)アミロスフェロイドに対する反応性が、アミロイドモノマー蛋白質に対する反応性よりも高い;

(iii)アミロスフェロイドによる神経細胞死誘導に対する阻害活性を有する。

## 【0026】

本発明はさらに、上記抗体を用いたアルツハイマー病の治療及び/又は予防薬のスクリーニング方法、アルツハイマー病個体の検出方法、アルツハイマー病の治療及び/又は予防薬などの医薬、並びに上記抗体を産生するハイブリドーマに関する。これらを以下に詳細に説明するが、以下に記載する本発明の説明は、本発明の実施態様の一例(代表例)であり、本発明の範囲はこれらの内容に限定されるものではない。

## 【0027】

## (1)抗アミロスフェロイド特異抗体

本発明の抗アミロスフェロイド特異抗体は、アミロスフェロイドに対する反応性が、アミロイド前駆蛋白質に対する反応性よりも高い抗体であることを特徴とし、さらに以下の態様を示す。

## 【0028】

第一の態様によれば、本発明の抗アミロスフェロイド特異抗体は、アミロスフェロイドに対する反応性が、アミロイド線維に対する反応性よりも高い抗体である。「アミロスフェロイドに対する反応性」とは、下述する方法で形成されたアミロスフェロイドに反応することを意味する。該抗体の反応性の測定は、それ自体通常用いられる方法により行うことができ、それらの方法で測定した場合に、アミロスフェロイドに対する反応性の方が、アミロイド線維に対する反応性よりも高ければ、その抗体は、本発明の抗体に含まれる。好ましい態様によれば、抗体のアミロスフェロイドに対する反応性は、アミロイド線維に対する反応性の3倍以上であり、さらに好ましくは4倍以上であり、最も好ましくは5倍以上である。この場合、同じ抗体濃度及び量、同じ抗原蛋白質濃度及び抗原蛋白質量を用いたときの反応性で比較することができる。また、アミロスフェロイドに特異的に反応し、アミロイド線維に反応しないことを特徴とする抗体も本発明の抗アミロイド特異抗体に含まれる。

## 【0029】

第二の態様によれば、本発明の抗アミロスフェロイド特異抗体は、アミロスフェロイドに対する反応性が、アミロイドモノマー蛋白質に対する反応性よりも高い抗体である。この場合の抗アミロスフェロイド特異抗体のアミロスフェロイドに対する反応性は、好ましくは、アミロイドモノマー蛋白質(A<sub>42</sub>)に対する反応性の50倍以上であり、更に好ましくは100倍以上、最も好ましくは500倍以上である。この場合、同じ抗体濃度及び量、同じ抗原蛋白質濃度及び抗原蛋白質量を用いた時の反応性で比較することができる。

## 【0030】

アルツハイマー病モデル動物や臨床試験における抗A<sub>42</sub>抗体投与において、脳出血が誘発されることが確認されている。この出血は、脳血管アミロイドへの抗体の結合による炎症反応に起因すると考えられ、抗A<sub>42</sub>抗体による治療の副作用である。脳血管アミロイドの沈着は、アルツハイマー病患者の80~90%にみられ、A<sub>40</sub>型脳アミロイドアンギオパチー(Cerebral Amyloid Angiopathy: CAA)と呼ばれる。アルツハイマー病における老人斑のアミロイドがA<sub>42</sub>を主要成分であるのに対し、CAAにおける沈着はA<sub>40</sub>を主体とする。このことより、本発明における抗体としては、特にアミロスフェロイドに選択的に反応し、A<sub>40</sub>への反応性が低い抗体がのぞましい。具体的には、本発明における抗アミロスフェロイド特異抗体のアミロスフェロイドに対する反応性は、好ましくは、A<sub>40</sub>に対する反応性の50倍以上であり、更に好ましくは100倍以上、最も好ましくは500倍以上である。

10

20

30

40

50

## 【0031】

本発明の抗アミロスフェロイド特異抗体が高い反応性を示す「アミロスフェロイド」とは、アミロイドモノマー蛋白質が自己会合し、粒状の形態を有するものである。「粒状の形態」とは粒状を呈していればいかなる形状でもよく、顆粒状、細粒状、結晶、凝集塊等をすべて含む。粒径は、通常約10～約20nm、好ましくは約10～約15nm、より好ましくは約10～約12nm、特に好ましくは約12nm付近である。また、アミロスフェロイドは蛋白質濃度約1μg/ml以下、好ましくは約0.45μg/ml以下で神経系細胞に細胞死を誘導する高い神経細胞死活性を有する。また、かかる物性を有するアミロスフェロイドは、グリセロール密度勾配遠心法により分画したときに、グリセロール濃度が約15%以上の画分に得られる。

10

## 【0032】

本発明の抗アミロスフェロイド特異抗体の抗原に対する反応性の測定方法としては、例えば、ウェスタンブロットティング法、ドットブロットティング法、ELISA法などのそれ自体既知の免疫学的測定法や、電子顕微鏡観察による方法等が挙げられる。またこの場合の比較対照としてのアミロイド蛋白質モノマーとは、約40のアミノ酸残基からなる蛋白質であり、生体においてはアミロイド前駆体蛋白質(APP)からプロテアーゼによるプロセッシングで産生される。このプロテアーゼの種類やその後の修飾によって様々な種類が存在することが知られているが、分泌直後にはC末端のアミノ酸残基の長さの違いによりアミロイド40(A<sub>1-40</sub>:配列番号1)とアミロイド42(A<sub>1-42</sub>:配列番号2)が主として存在し、またアミロイド43(A<sub>1-43</sub>:配列番号3)が微量に存在し、アミロイド蛋白質モノマーは、これらのいずれをも含む。また、これらの部分ポリペプチドや誘導体も含まれる。さらに、アミロイド線維とは、アミロイド蛋白質が自己会合して線維状になったものを意味し、神経細胞死活性を有する。このようなアミロイド線維は、例えば、生体内から取得されるものや、Lorenzo, A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 91, 12243-12247(1994)に記載の方法で製造されるものも含む。

20

## 【0033】

第三の態様によれば、本発明の抗アミロスフェロイド特異抗体は、アミロスフェロイドによる神経細胞死誘導に対する阻害活性を有する抗体である。「アミロスフェロイドによる神経細胞死誘導」とは、上記のまたは後述の方法で調製されるアミロスフェロイドが、神経細胞に対して細胞死を誘導する活性を意味し、誘導される細胞死は、アポトーシス又はネクローシスのいずれでもよい。また、神経細胞とは、神経系細胞であれば特に制限はなく、哺乳動物(ヒト、ラット、マウス、サル、ブタ等)由来の神経系細胞が用いられる。ES細胞等から分化誘導させた神経細胞も用いられる。初代培養細胞としては、上記動物の海馬、及び前脳基底野・大脳皮質等から取得したものが挙げられる。また上記動物の海馬等の器官を培養した細胞も含まれる。このような活性を有する抗アミロスフェロイド特異抗体の特徴としては、例えば、アミロスフェロイドに対する反応性の方が、アミロイド前駆蛋白質、アミロイド線維やアミロイドモノマー蛋白質に対する反応性よりも高いこと等が挙げられる。これらのうち、アミロスフェロイドへの反応性がアミロイド前駆蛋白質への反応性の約10～約20倍の抗アミロスフェロイド特異抗体が好ましく用いられる。

30

## 【0034】

本発明の抗アミロスフェロイド特異抗体が有する、神経細胞死誘導に対する阻害活性とは、好ましくは、上記のアミロスフェロイドによる神経細胞死誘導を完全に阻害する能力を有することを意味するが、抗体の投与量によっては部分的に阻害する場合も含む。阻害活性の具体的な測定方法については、後述のとおりである。

40

## 【0035】

なお、第一から第三の何れか1以上の態様に加えてさらにヒト正常組織への有意な交叉反応性を示すことなく、アルツハイマー病脳に特異的に反応することを特徴とする抗体も、本発明の抗アミロスフェロイド特異抗体に含まれる。

## 【0036】

また、第一から第三の何れか1以上の態様または前述の態様にさらにアミロスフェロイ

50

ドの立体構造特異的なエピトープを認識することを特徴とする抗体も本発明の抗アミロスフェロイド特異抗体に含まれる。これらのうち、アミロイドモノマー蛋白質のN末端をエピトープとして認識すること、又はアミロイドモノマー蛋白質上の一次配列をエピトープとして認識しないことを特徴とする抗アミロスフェロイド特異抗体が好ましい。「アミロスフェロイドの立体構造特異的なエピトープを認識することを特徴とする抗体」とは、具体的にはアミロスフェロイドがネイティブな状態であれば結合できるが、アミロスフェロイドが変性状態にある場合には結合できない抗体を意味する。

#### 【0037】

以下に、本発明の抗アミロスフェロイド特異抗体の具体的な製造方法、及び上記の特徴の解析方法について詳細に説明する。

#### 【0038】

##### (2)アミロスフェロイド(抗原)の作製

本発明の抗体は、以下の性質を有するアミロスフェロイドを抗原として得ることができる。本発明においてアミロスフェロイドとは、アミロイド蛋白質が自己会合し、粒状の形態を有するものである。「粒状の形態」とは粒状を呈していればいかなる形状でもよく、顆粒状、細粒状、結晶、凝集塊等をすべて含む。粒径は、通常約10~約20nm、好ましくは約10~約15nm、より好ましくは約10~約12nm、特に好ましくは約12nm付近である。また、アミロスフェロイドは蛋白質濃度約1 $\mu$ g/ml以下、好ましくは約0.45 $\mu$ g/ml以下で神経系細胞に細胞死を誘導する高い神経細胞死活性を有する。また、かかる物性を有するアミロスフェロイドは、グリセロール密度勾配遠心法により分画したときに、グリセロール濃度が約15%以上の画分に得られる。

#### 【0039】

このようなアミロスフェロイドは、まず、アミロイド蛋白質を含む水溶液を対流させる(第一の工程)ことにより調製することができる。さらに、アミロスフェロイドが、高効率に含有される溶液を調製するには、対流させた水溶液中のアミロスフェロイドを分画する(第二の工程)方法が用いられる。本発明の抗体の抗原には、上記のいずれのアミロスフェロイド含有液も用いることができる。

#### 【0040】

上記で「アミロイド蛋白質」とは、約40のアミノ酸残基からなる蛋白質であり、生体においてはアミロイド前駆体蛋白質(APP)からプロテアーゼによるプロセッシングで産生される。このプロテアーゼの種類やその後の修飾によって様々な種類が存在することが知られているが、分泌直後にはC末端のアミノ酸残基の長さの違いによりアミロイド40(A<sub>1-40</sub>:配列番号1)とアミロイド42(A<sub>1-42</sub>:配列番号2)が主として存在し、アミロイド43(A<sub>1-43</sub>:配列番号3)が微量に存在する。アミロスフェロイドの調製には、例えば、分泌直後のアミロイド蛋白質の全長分子種であるA<sub>X-40</sub>、A<sub>X-42</sub>もしくはA<sub>X-43</sub>、又はそれらの変異体あるいは誘導体が好ましく用いられるが、その中でも特にA<sub>1-40</sub>又はA<sub>1-42</sub>が好ましい。また、アミロイド蛋白質は、ペプチド合成機等を用いて合成したもの、市販のもの、又は生体試料から抽出精製したものなど、いかなるものを用いてもよい。アミロイド蛋白質として合成ペプチドを用いる場合、その合成、抽出精製方法は、それ自体公知の通常用いられている方法を用いることができる。また、合成ペプチドの精製度は高速液体クロマトグラフィーにおいて単一のピークが得られる程度行えば十分であるが、精製方法としては、例えば、ゲル濾過、高速液体クロマトグラフィー等が用いられる。本明細書では、「アミロイド蛋白質」を、「アミロイドモノマー」、「アミロイドモノマー蛋白質」、「A<sub>X</sub>」、「A<sub>X</sub>モノマー」と称することもある。このようにして得られたアミロイド蛋白質は、例えば滅菌精製水に溶解し、アミロスフェロイド含有液の調製に使用する。溶解に用いる滅菌精製水の量は、アミロイド蛋白質が溶解する範囲であればよいが、好ましくは水溶液中のアミロイド蛋白質の濃度が約50nM~約2mM、好ましくは約1 $\mu$ M~約1mM、さらに好ましくは約50~約700 $\mu$ Mとなる範囲である。この溶液を適当な塩濃度に調節することが望ましい。塩濃度は、アミロイド蛋白質が溶解される範囲であればいかなるものでもよいが、例えば、最終pHが約3~約11、好ましくは約5.5

10

20

30

40

50

～約8.5、より好ましくは約7.5で、塩が約1M以下であることが好ましい。このような塩濃度に調節する方法として、例えば、PBS(-)をアミロイド 蛋白質水溶液と等量加える方法が用いられる。溶解の方法はアミロイド 蛋白質が適当な量の適当な塩濃度の溶液に完全に溶解する方法であれば特に制限はない。

#### 【0041】

アミロスフェロイド含有液の調製方法の第一の工程は、例えば、特開2001-247600号公報に記載されているものが挙げられる。このようにして得られたアミロスフェロイド含有液は、このままでも神経細胞死を誘導する活性を有し、本発明の抗原として用いることは可能であるが、第二の工程として分画を行い、さらに高い神経細胞死活性を有する画分を得ることもできる。分画の方法としては、例えば、特開2002-105099号公報に記載の方法が用いられる。かくして得られるアミロスフェロイド含有液は必要に応じて濃縮等の処理を行った後、抗原として以下の免疫工程に用いられる。

10

#### 【0042】

アミロスフェロイドが形成されていることの確認方法としては、下述の神経細胞死活性を解析する方法や、電子顕微鏡により測定する方法等が挙げられる。電子顕微鏡の測定方法は、アミロスフェロイドの粒径が解析できる方法で、かつアミロスフェロイドの自己会合が損傷を受けずに観察できる方法であれば如何なる方法でもよい。具体的には、例えば、まず、直径18mm程度のシャーレ等に30～40 の蒸留水を入れ、その水面にコロジオン1.5%(W/V)酢酸イソアミル溶液等を約30 $\mu$ l程度滴下し、直ちに溶媒が揮発して生じる薄膜を得る。この支持膜をグリッドに張り付けて乾燥させた後、カーボン真空蒸着してグロー放電による親水化処理装置を用いて表面を親水化する。次に、該支持膜を張り付けたグリッド面を下にして調製したアミロスフェロイドを含む溶液の小滴を触れさせ、直ちにろ紙で余分な水分をふき取ってから、酢酸ウラニウム溶液を添加して観察を行う。電子顕微鏡は、安定させた100～120kVの高圧加速で使用し、試料の電子線による破損を防ぐためにグリッドの端等を利用して非点収差補正を行ったのち、電子線損傷低減法を用いて観察する方法等が好ましい。

20

#### 【0043】

##### (3)アミロスフェロイドを抗原とする抗体の調製

上記(2)に記載のアミロスフェロイドを抗原とした抗体を取得する方法は、アミロスフェロイドに対する反応性が、アミロイド前駆蛋白質に対する反応性よりも高く、かつ以下の何れか1以上の特徴を有する抗体が得られる方法であれば特に制限はない。具体的には、以下に詳細に記載する方法が好ましく用いられる。

30

- (i)アミロスフェロイドに対する反応性が、アミロイド 線維に対する反応性よりも高い;
- (ii)アミロスフェロイドに対する反応性が、アミロイド モノマー蛋白質に対する反応性よりも高い;
- (iii)アミロスフェロイドによる神経細胞死誘導に対する阻害活性を有する。

#### 【0044】

抗原は、上記(2)に記載のアミロスフェロイドを、一般的にはキャリアーとしてKLH(スカシ貝ヘモシアニン)、BSA(ウシ血清アルブミン)、OVA(オバルブミン)などの蛋白質または高分子体に結合もしくは重合させたものを免疫用抗原として使用するが、必ずしもキャリアーは必要ではない。また、免疫用抗原は異なるキャリアーの結合法により調製されたもの複数種を混合して免疫用抗原としてもよい。

40

#### 【0045】

免疫に使用する動物は特に限定されないが、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ハムスター、マウス、ラット、モルモット、ニワトリ、ヒト抗体を産生するヒト以外の動物等はいずれも使用できる。ハムスターを使用することが好ましい。免疫用抗原の動物への接種は、皮下、筋肉内、腹腔内に完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントと免疫用抗原をよく混和して行う。接種は、2週間から5週間ごとに実施し、接種した抗原に対する免疫動物の抗体の反応性が十分に上昇するまで続ける。1回に免疫する抗原は、免疫動物の抗体の反応性が十分に上昇する量であれば、特に制限はないが、具体的には、約1～約1

50

00 µgが好ましい。また、免疫の回数は、免疫した動物から採血を行って、該血中に含まれる抗体について後述する方法で抗原に対する反応性を測定し、アミロスフェロイドに対する反応性がアミロイドモノマー蛋白質より上がるまで繰り返すことが好ましい。具体的には5~20回が好ましい。

#### 【0046】

最後の免疫から7~10日後に、該動物から血液、腹水などを採取する。好ましくは、例えば全採血を行い、遠心分離等の方法で血清を調製する。該血清中に含まれる本発明の抗アミロスフェロイド特異抗体の反応性の測定方法は、上記(2)で調製したアミロスフェロイドとの反応性が解析できる方法であればいずれのものでもよいが、例えば、上記アミロスフェロイドを蛍光物質等で標識し、これを上記血清と反応させた後、該抗体に結合した標識剤の活性を測定する方法等が挙げられる。具体的には、上記の電子顕微鏡観察による方法や、後述するELISA法などの酵素免疫測定法、ウェスタンブロッティング法、あるいはドットブロッティング法等が挙げられる。このうち、本発明の抗アミロスフェロイド特異抗体において、アミロイド線維との反応性を測定比較する場合には、電子顕微鏡観察による方法が好ましく用いられ、またアミロイドモノマー蛋白質と、その自己会合体であるアミロスフェロイドとの反応性を測定比較する場合には、ドットブロッティング法やELISA法などの酵素免疫測定法が好ましく用いられる。また、アミロイド線維やアミロイドモノマー蛋白質、あるいはその部分ポリペプチドと特異的に反応する抗体との反応性を比較して、本発明の抗アミロスフェロイド特異抗体を選択取得することができる。

#### 【0047】

抗体の分離精製は、それ自体既知の免疫グロブリンの分離精製法により精製することができる。具体的には、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体による吸着法、超遠心分離法、ゲルろ過法、抗原抗体結合物あるいは活性吸着剤により特異的抗体のみを吸着分離する方法等が挙げられる。

#### 【0048】

このようにして作製された抗体は、ポリクローナル抗体であり、IgGを主たる成分とし、IgM、IgA等の他の免疫グロブリンを含むものでもよい。

#### 【0049】

一方、モノクローナル抗体を調製する場合、上記免疫動物に対して、通常抗原であるアミロスフェロイドのみの静脈注射を行い、その2~5日、好ましくは3日後に抗体産生細胞を含むと考えられる脾臓もしくはリンパ節を採取し、この脾臓細胞またはリンパ細胞を腫瘍細胞と細胞融合させる。この後、細胞融合して不死化した抗体産生細胞(ハイブリドーマ)を単離する。ここで使用する腫瘍細胞は、一般的に免疫を行った動物から調製される脾臓細胞もしくはリンパ細胞と同一種であることが望ましいが、異種動物間のものでも可能である。また不死化の方法としては、細胞融合以外の公知の方法を用いることもできる。例えば、エプスタイン・パールウイルス(Epstein-Barr virus)を用いたトランスフォーム法(D. Kozborら、Eur J Immunol, 14:23 (1984))により行うこともできる。

#### 【0050】

腫瘍細胞の例として、p3(p3/x63-Ag8)、P3U1、NS-1、MPC-11、SP2/0-Ag14、FO、x63.6.5.3、S194、R210等の骨髓腫細胞が使用される。細胞融合は、一般に行われている方法、例えば「単クローン抗体実験マニュアル」(講談社サイエンティフィック 1987年出版)、G.KOHLERANDC.MILSTEIN, Nature, 256, 495(1975)に記載の方法等に従って実施すればよい。細胞融合は、融合させる細胞を懸濁した融合培地に細胞融合促進剤を加えることに実施することができる。細胞融合促進剤としては、センダイウイルスや平均分子量1000~6000のポリエチレングリコールなどが挙げられる。この際、更に融合効率を高めるために、ジメチルスルホキシド等の補助剤やIL-6等のサイトカインを融合培地に添加することもできる。免疫を行った脾臓細胞もしくはリンパ細胞に対する腫瘍細胞の混合比は、例えば腫瘍細胞に対し、脾臓細胞もしくはリンパ細胞を約1倍から約10倍程度用いればよい。

#### 【0051】

上記の融合培地としてはERDF培地、RPMI-1640培地、MEM培地、GIT培地等の通常の各種

10

20

30

40

50

培地を使用することができ、融合時は通常、牛胎児血清(FBS)等の血清を培地から抜いておくのがよい。融合は、上記の免疫を行った脾臓細胞もしくはリンパ細胞と腫瘍細胞との所定量を上記の培地内でよく混合し、予め37 程度に加熱しておいたポリエチレングリコール溶液を約20～約50%程度加え、好ましくは30～37 で1～10分程度反応させることによって実施する。以降、適当な培地を逐次添加して遠心し、上清を除去する操作を繰り返す。

#### 【0052】

目的とするハイブリドーマは、通常の選択培地、例えばHAT培地(ヒポキチンサン、アミノプテリン及びチミジンを含む培地)で培養する。このHAT培地での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞(未融合細胞等)が死滅するのに十分な時間、通常では数日から数週間行えばよい。

10

#### 【0053】

得られたハイブリドーマが産生する抗体は、上記ハイブリドーマの培養上清に含まれる。この抗体の反応性や反応特異性などは上記ポリクローナル抗体を測定する方法と同様にして測定し、本発明の抗アミロスフェロイド特異抗体を産生するハイブリドーマを選択取得することができる。

#### 【0054】

得られたハイブリドーマは、限界希釈法によりクローニングすることにより、単一のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマクローンを得ることができる。このハイブリドーマクローンは、あらかじめFBS中に含まれるウシ抗体(IgG)を除いたFBSを約1～約10%程度加えた培地または無血清用培地を用いて培養を行い、得られた培養上清を目的のモノクローナル抗体を精製する原料とする。一方、得られたハイブリドーマクローンをあらかじめプリステンを投与したBalb/cマウス、またはBalb/c(nu/nu)マウスの腹腔内に移植し、10～14日後にモノクローナル抗体を高濃度を含む腹水を採取し、目的のモノクローナル抗体を精製する原料としてもよい。モノクローナル抗体を精製する方法は、通常の免疫グロブリン精製法を用いれば良く、例えば、硫酸分画法、ポリエチレン分画法、エタノール分画法、陰イオン交換クロマトグラフィー、プロテインA、プロテインGまたは抗マウス免疫グロブリン抗体等が結合したアフィニティークロマトグラフィー等により実施することができる。

20

#### 【0055】

このようにして得られる本発明の抗アミロスフェロイド特異抗体は、そのまま用いてもよいし、定法であるパイン処理によって得られるFabもしくはペプシン処理によって得られるF(ab')<sub>2</sub>またはFab'の形態として用いてもよい。また、該抗体のH鎖とL鎖の両可変ドメイン内の相補性決定領域(CDR)、または超可変領域などを含む断片や、これをコードする遺伝子をそれ自体既知の方法で取得し、さらにヒト型とした抗体も本発明の抗アミロスフェロイド特異抗体に含まれる。さらに、ファージディスプレイ法やヒト抗体産生マウスなどを用いて作成された完全ヒト抗体も本発明の抗アミロスフェロイド特異抗体に含まれる。さらに、上述のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞系も本発明に含まれる。本発明のハイブリドーマの具体例としては、以下の実施例で取得された受託番号FERM BP-10871またはFERM BP-10872を有するハイブリドーマを挙げることができる。

30

40

#### 【0056】

非ヒト(マウス、ラット、ハムスター、ウサギなど)抗体をヒト型とした抗体(以下ヒト化抗体と称する)とは、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖あるいはその断片(例えばFv、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>あるいは抗体の他の抗原結合サブ配列)であって、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むものである。ヒト化抗体としては特に、非ヒト抗体の相補性決定領域(CDR)を有する抗体の配列を変更することによって、ヒト抗体生殖系列由来のアミノ酸配列から部分的に、あるいは全体的に構成される抗体が好ましい。このような変更は、非ヒト抗体定常領域をヒト抗体の定常領域で置換することにより実現され、医薬的使用において許容される程度の低い免疫原性を有するヒト/非ヒトキメラを作成することが可能である。さらに好ましくは、抗体の可変領域およびCDRでさえもまた、現在までに

50

当分野に周知である技術によってヒト化される。可変領域のフレームワーク領域は対応するヒトフレームワーク領域により置換され、非ヒトCDRは実質的に変化がないか、あるいはそのヒトゲノム由来の配列で置換されることもある。

【0057】

ヒト化抗体とはさらに、ヒトフレームワークおよび少なくとも1つの非ヒト抗体由来CDRを含むものであり、そこに存在する任意の定常領域がヒト免疫グロブリン定常領域と実質的に同一であるものを表す。実質的に同一とは、少なくとも85~100%、好ましくは95~100%のアミノ酸配列が同一であることを表す。すなわち本ヒト化抗体は、CDR部分を除いた全ての部分が、1又はそれ以上の天然のヒト免疫グロブリン配列に対応する部分と同一となる。

10

【0058】

ヒト化抗体は、医薬品としてヒトの治療をする場合において、非ヒト抗体およびキメラ抗体と比して少なくとも3つの利点を有する。

1)エフェクター部分がヒトであるので、ヒト体内の免疫反応における他の因子との相互作用が良好である。例えば、補体依存性細胞障害性(CDC)または抗体依存性細胞障害性(ADCC)により、効率的に標的細胞を破壊する。

2)ヒト免疫系は、ヒト化抗体のフレームワークまたは定常領域を外来物として認識しないと考えられる。したがって本ヒト化抗体をヒト体内に投与した場合の抗原抗体反応は、非ヒト抗体またはキメラ抗体に対するものより低くなると考えられる。

3)投与された非ヒト抗体は、ヒトの循環系において、半減期がヒト抗体のそれよりも短いことが報告されている。ヒト化抗体が投与された場合は、天然のヒト抗体本質的に同一の半減期を有することが期待され、投与量および投与頻度をより少なくできると考えられる。

20

【0059】

非ヒト抗体をヒト化する方法は、この分野でよく知られている。例えば、Winterらの方法(特許第2912618号公報)、Jonesらの方法(Nature, 321: 522 (1986))、Riechmannらの方法(Nature, 332: 323 (1988))、Verhoeyenらの方法(Science, 239: 1534 (1988))、Queenらの方法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 2869 (1991))などによって実施される。ヒト化抗体取得作業においては、ヒト化抗体を発現させる宿主細胞での発現最適化を目的として、コドンのサイレント変異を行うことが望ましい(例えばNakamuraらの方法:Nucleic Acid Res 29: 292 (2000))。このようにして得られた抗体は、本願に記載の特異性を有するものであれば、前記可変領域において、1個以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列を有することを特徴とするヒト化抗体も本願発明に含まれる。

30

【0060】

(4)抗アミロスフェロイド特異抗体の抗原に対する反応性の測定

本発明の抗アミロスフェロイド特異抗体の抗原に対する反応性を測定するためのELISA、ドットプロットングの具体的方法の例を以下に説明する。ELISAとして、例えば、固相ELISA、液相ELISAなどが挙げられる。また、本発明の抗アミロスフェロイド特異抗体の抗原に対する解離定数を測定してもよい。抗体の解離定数の測定は、BIAcore(BIACORE社製)等の機器を用いてまたはそれに準じた方法により行うことができる。

40

【0061】

(a)アミロスフェロイドを被覆する固相担体及びアミロスフェロイド固相ELISA

アミロスフェロイドを被覆した固相担体を用いて、抗アミロスフェロイド特異抗体の抗原に対する反応性を測定することにより、抗アミロスフェロイド特異抗体を検出することができる。ここで固相担体としては、ポリスチレン、ポリプロピレン等のプラスチック製の球状、棒状、プレート状等の担体が挙げられるが、プラスチック製プレートが好ましい。固相担体にアミロスフェロイドを被覆させるには、常法例えば吸着法、架橋化剤を用いる方法等が挙げられるが、簡便性からアミロスフェロイドを物理的に吸着させる吸着法を用いるのが好ましい。

【0062】

50

アミロスフェロイドを被覆する固相担体を用いた測定法として、具体的には、アミロスフェロイドELISAが挙げられる。まず、Nunc社製等のELISAプレートに上記(2)で調製したアミロスフェロイドをコートする。この場合、溶媒はアミロスフェロイドを脱会合せないものであれば如何なるものでもよいが、例えばPBS(-)が好ましく用いられる。このプレートを適当な溶液、例えば0.05%Tween20等の界面活性剤と含む生理的食塩水等により洗浄し、牛血清アルブミン/リン酸緩衝液(Phosphate buffered saline:PBS)等でブロッキングした後に、上記で得られた抗体と反応させる。その後、さらに洗浄した後に二次抗体として免疫動物の免疫グロブリンと反応する抗体を接触させる。同様に洗浄後、プレートに結合している該二次抗体を標識化物質の活性等を指標として検出する。このような標識化物質の活性は、例えばELISAプレートリーダー等を用いて測定することができる。また、アミロスフェロイドELISAを用いて、本発明の抗アミロスフェロイド特異抗体の抗原決定部位(エピトープ)を決定することができる。具体的には、アミロスフェロイドELISAにより、アミロイドモノマー蛋白質の断片と抗アミロスフェロイド特異抗体の結合競合阻害を測定してエピトープを決定することができる。アミロイドモノマー蛋白質の断片は、複数組み合わせてもよい。さらに、アミロスフェロイドELISAにより、エピトープが既知の抗体と抗アミロスフェロイド特異抗体の結合競合阻害を測定してエピトープを決定することができる。なお、エピトープの決定は、"Antibodies: A LABORATORY MANUAL"(Ed Harlow et al., Cold Spring Harbor Laboratory(1988))等の実験書に記載の方法またはそれに準じた方法によっても行うことができる。

10

20

30

40

50

#### 【0063】

##### (b)アミロスフェロイド液相ELISA

アミロスフェロイドと、アミロスフェロイドに対する抗体を含む検体、たとえばハイブリドーマ培養上清を、室温1時間以上混和し反応させる。あらかじめ、適当量のウサギ抗アミロスフェロイドIgGをコートし、例えば、牛血清アルブミン/PBSでブロッキングしたELISAプレートに、一定量の上記混合液を添加して室温1時間以上反応させる。その後、さらに洗浄した後に二次抗体として検体中の免疫グロブリンと反応する抗体、例えば抗マウスIgG抗体、抗マウスIgM、抗マウス免疫グロブリン、を接触させる。同様に洗浄後、プレートに結合している該二次抗体を標識化物質の活性等を指標として検出する。このような標識化物質の活性は、例えばELISAプレートリーダー等を用いて測定することができる。

#### 【0064】

##### (c)アミロイドモノマーELISA

N末端にビオチンが結合したアミロイドモノマー蛋白質あるいはC末端にビオチンが結合したアミロイドモノマー蛋白質と、抗体を含む検体、例えばハイブリドーマ培養上清を混合し室温1時間以上反応させる。この混合液をあらかじめ牛血清アルブミン/PBSでブロッキングしたストレプトアビジンELISAプレートに添加し室温30分以上反応させる。その後、洗浄した後に二次抗体として検体中の免疫グロブリンと反応する抗体、例えば抗マウスIgG抗体、抗マウスIgM、抗マウス免疫グロブリン、を接触させる。同様に洗浄後、プレートに結合している該二次抗体を標識化物質の活性等を指標として検出する。このような標識化物質の活性は、例えばELISAプレートリーダー等を用いて測定することができる。

#### 【0065】

##### (d)ドットブロッキング

本発明の抗アミロスフェロイド特異抗体の抗原に対する反応性を測定するためのドットブロッキングの具体的方法の例を以下に説明する。まず、Bio Rad社製等の市販のプロッター等を用いて、上記(2)で調製したアミロスフェロイドをニトロセルロース膜等に適当量プロットする。この場合、溶媒はアミロスフェロイドを脱会合せないものであれば如何なるものでもよいが、例えばPBS(-)が好ましく用いられる。ブロッキングは、アミロスフェロイド以外にも、対照として、アミロイドモノマー蛋白質またはその部分ペプチドや、溶媒のみについても行うことが好ましい。この膜を適当な緩衝液、例えばリン酸緩衝液(Phosphate buffered saline:PBS)等により洗浄し、スキムミルク/TTBS(Tween-Tris buffered saline)等でブロッキングした後に、上記で得られた抗体と膜を接触させ、その

後、さらにTTBS等で洗浄した後に、二次抗体として免疫動物の免疫グロブリンと反応する抗体を接触させ、これも同様に洗浄した後、膜に結合している該二次抗体を標識化物質の活性等を指標として検出する。対照として、アミロイドモノマー蛋白質に反応する抗体を用いることが好ましい。このような抗体としては、例えば、「6E10」(Senetek社製)等が上げられる。

【0066】

(5)アミロスフェロイドによる神経細胞死誘導に対する阻害活性の解析

本発明の抗アミロスフェロイド特異抗体が有する、アミロスフェロイドによる神経細胞死誘導を阻害する活性(以下、これを「神経細胞毒性中和活性」または「神経細胞死誘導阻害活性」と称することがある)の解析方法の例を以下に説明する。

10

【0067】

まず、アミロスフェロイドを用いた神経細胞死の誘導は、神経系の細胞等の培養液に上記アミロスフェロイドを添加し、通常の方法に従って培養することにより行うことができる。そこで、本発明の抗アミロスフェロイド特異抗体がこの神経細胞毒性中和活性を有するかどうかを解析する場合には、抗アミロスフェロイド特異抗体の存在下で上記の神経細胞とアミロスフェロイドとの培養を行い、神経細胞死が誘導されないことを確認することにより行うことができる。アミロスフェロイドにより誘導される細胞死は、アポトーシス又はネクローシスのいずれでもよい。また、用いられる細胞としては、神経系細胞であれば特に制限はなく、哺乳動物(ヒト、ラット、マウス、サル、ブタ等)由来の神経系細胞が好ましい。また、初代培養細胞が好ましい。初代培養細胞としては、上記した動物の海馬、及び前脳基底野・大脳皮質等から取得したものが好ましい。また上記動物の海馬等の器官を培養したものをそのまま用いることも可能である。また、ES細胞等から分化誘導させた神経細胞を用いることも可能である。

20

【0068】

これらの細胞や器官は、通常の方法に従って培養することができる。具体的には、神経系細胞の初代培養、及び神経系樹立細胞株の培養方法としては、Hoshi, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 93, 2719-2723 (1996)、及びSchubert, D. et al., Nature, 249 (454), 224-227 (1974)に記載されている方法等を用いることができ、器官培養は、Gary Banker and Kimberly Goslin, Culturing nerve cells, 2nd Edition, MIT Press, Cambridge (1998)に記載されている方法等を用いることができる。このようにして培養された神経系の細胞、及び器官に細胞死を誘導するために添加するアミロスフェロイドの量は適宜選択可能であるが、アミロスフェロイドは、通常、アルツハイマー病等の患者の脳内に存在する毒性アミロイド蛋白質と実質的に同等の濃度で細胞死を誘導できる。例えば、上記(2)で得られるアミロスフェロイドは、前記のとおり、初代培養細胞に対して培養液中のアミロイド蛋白質濃度約1 $\mu$ g/ml以下、さらに好ましくは約0.45 $\mu$ g/ml以下等の量で細胞死を誘導することができる。もっとも、上記の濃度は例示のためのものであり、この量に限定されることはない。

30

【0069】

この培養中に存在させる本発明の抗アミロスフェロイド特異抗体の量は用いられる抗体の抗原に対する反応性によって適宜選択されるが、具体的には、例えば、約0.0001~約1mg/mlを存在させることが好ましい。また、抗アミロスフェロイド特異抗体の該培養液への添加の時期は、神経細胞毒性中和活性が確認できるのであれば特に制限はないが、アミロスフェロイドによる神経細胞死誘導は、培養後約6時間程度から誘導されるので、その前、好ましくは培養初期に添加しておく。さらには、アミロスフェロイドと抗アミロスフェロイド特異抗体を、別の容器でインキュベーションした後、該培養液へ添加する。また、対照として、アミロスフェロイドとは反応しない抗体又はアミロスフェロイドに対する反応性が低くその反応性が神経細胞死誘導に影響しない抗体を用いることが好ましい。このような抗体としては、例えば、アミロイドモノマー蛋白質に対する抗体、具体的には、例えば「6E10」(Senetek社製)等が好ましく用いられる。

40

【0070】

50

アミロスフェロイドによって誘導される神経細胞死は、通常、アミロスフェロイドの有効量を添加した後、約6時間程度から起こり、約48時間程度の後には顕著な細胞死の様子が観察できる。従って、この解析方法において、神経細胞死の誘導を測定する場合には培養を始めてから約20時間以降が好ましいが、用いるアミロスフェロイドの細胞死活性系に応じて適宜選択される。

#### 【0071】

これらの神経細胞死活性を測定する方法としては、通常用いられる細胞死検出法を用いることができる。具体的には、MTT活性測定法(Mossman, T., J. Immunol. Methods, 65, 55 (1983))、プロピディウムイオダイド(Ankarcrona, M. et al., Neuron, 15, 961 (1995))等による染色法、又はトリパンブルーダイエクスクルージョン法(Woo, K. B., Funkhouser, W. K., Sullivan, C. and Alabaster, O., Cell Tissue Kinet., 13 (6), 591-604 (1980))、TUNELや断片化DNAを検出するELISA(Roche社製)等が用いられる。このうち、プロピディウムイオダイド等による染色法あるいは断片化DNAを検出するELISAが特に好ましい。プロピディウムイオダイド等による染色法は、死細胞を選択的に染色するプロピディウムイオダイドのみによる単一染色でもよいし、他の複数の染色色素と組み合わせてもよい。組み合わせられる染色色素としては、具体的には、生細胞を選択的に染色するCalcein-AM(Molecular Probes社製)、全細胞を染色するHoechst33258(H33258; Bisbenzimidazole H33258)等が好ましい。

10

#### 【0072】

また、本発明の抗アミロスフェロイド特異抗体の神経細胞死誘導阻害活性は、本発明の抗アミロスフェロイド特異抗体を動物個体に直接投与することにより行うこともできる。アミロスフェロイドにより誘導される細胞死は、アポトーシス又はネクローシスのいずれでもよい。また、用いられる動物としては、哺乳動物(マウス、ラット、霊長類等)等の神経系細胞を有する動物であれば特に制限はないが、アルツハイマー病のモデル動物等の特に神経細胞死が起こっている動物が好ましく用いられる。また、投与方法は、脳等の神経系細胞の存在する部位に直接投与する方法の他、経口投与方法、静脈注射法、腹腔投与方法等の通常薬物の投与に用いられる方法を用いることができる。脳等の神経系細胞の存在する部位に直接投与する方法としては、具体的には、例えば、ラットあるいはマウス等の脳組織の場合、オスモティックポンプを用いて目標部位近傍の脳室内に投与する方法、マイクロピペット等を用いて目標部位の脳実質にマイクロフュージョンする方法等が用いられ、一定期間投与した後、脳機能の変異をPET・MRIを用いて計測した後に、投与部位周辺の組織を速やかに取り出し、組織切片を作製して、神経細胞死の有無を検証することができる。神経細胞死の有無の検証は、組織染色法やウェスタンブロット法等によって行うことができ、組織染色法としては、TUNEL染色、又は抗Caspase抗体等による免疫染色等が挙げられる。

20

30

#### 【0073】

##### (6)アルツハイマー病の治療/及び予防薬及びスクリーニング方法

アミロスフェロイドは、神経系の培養細胞に添加すると該細胞を死に至らしめることができることから、アルツハイマー病においては、同様にアミロイド蛋白質が自己会合したアミロスフェロイドが神経変性を誘導していると考えられている。

40

#### 【0074】

本発明の抗アミロスフェロイド特異抗体は、このアミロスフェロイドに対する高い反応性を示し、アミロスフェロイドによる神経細胞死誘導に対する阻害活性を有するので、被検物質を本発明の抗アミロスフェロイド特異抗体と競合させてアミロスフェロイドに結合させ、その反応性を指標として物質を選択することにより、アルツハイマー病の治療/及び予防薬のスクリーニングを行うことができる。また、本発明の抗アミロスフェロイド特異抗体そのものもアルツハイマー病の治療/及び予防薬の有効成分となりえる。すなわち、本発明の抗アミロスフェロイド特異抗体は、アミロイド前駆蛋白質をはじめアミロイドのモノマーや、それが形成しうる他の構造体に対する反応性が低く、また脳への特異性が高いので、WO2006/016644号公報で知られている従来の抗アミロスフェロイド抗体に比

50

べ、より安全性の高いアルツハイマー病の治療薬になりうる。

【0075】

この物質のスクリーニング方法の具体例について以下に説明する。被検物質としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液等が挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。アミロスフェロイドとの反応性は、上記(4)の抗アミロスフェロイド特異抗体とアミロスフェロイドとの反応性を解析する方法において、反応液中に上記被検物質を添加して行う方法等が挙げられる。アミロスフェロイド、抗アミロスフェロイド特異抗体、及び被検物質の混合量はそれぞれ適当な濃度を選択して行うことができる。

10

【0076】

被検物質は、標識物質等で標識化しておくことが好ましい。この解析により、アミロスフェロイドに結合した物質は、アルツハイマー病の治療/及び予防薬の有効成分として用いると判断することができる。さらに、選択された物質を上記(5)に記載の方法における抗アミロスフェロイド特異抗体の代わりに用いて、アミロスフェロイドによる神経細胞死誘導を阻害するかを確認することが好ましい。

【0077】

かくして選択された物質及び本発明の抗アミロスフェロイド特異抗体は、それ自体アルツハイマー病の予防及び/又は治療のための医薬の有効成分として有用であるが、生理学的に許容されるそれらの塩、水和物並びに溶媒和物等であってもよい。また、FeやZn等の金属イオンや糖鎖、糖タンパク質が付加したものも好ましい。生理学的に許容される塩としては、例えば、塩酸塩、硫酸塩などの鉱酸類の塩、クエン酸塩、シュウ酸塩、p-トルエンスルホン酸塩などの有機酸の塩、グリシンなどのアミノ酸の塩等を挙げることができる。また、抗アミロスフェロイド特異抗体は、上記の方法により、ヒト型に改変したもまたは完全ヒト抗体がより好ましく用いられる。抗体のヒトなどへの投与に適した改変は、それ自体公知の方法を組み合わせる行うことができる。

20

【0078】

本発明により提供される医薬は、本発明のスクリーニング方法により神経細胞死に対して抑制作用を有すると判定された物質または本発明の抗アミロスフェロイド特異抗体を有効成分として含み、アルツハイマー病の予防及び/又は治療のための医薬として用いることができる。本発明のスクリーニング方法により神経細胞死に対して抑制作用を有すると判定された物質及び抗アミロスフェロイド特異抗体は、それ自体を医薬として患者に投与してもよいが、一般には、これらの有効成分の1種又は2種以上を含む医薬組成物を製造して患者に投与することが好適である。このような医薬組成物として、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、丸剤、トローチ、舌下剤、又は液剤などの経口投与の製剤、あるいは注射剤、座剤、軟膏、貼付剤などの非経口投与用の製剤を例示することができる。

30

【0079】

経口投与用の錠剤又はカプセル剤は、通常は単位投与物として提供され、結合剤、充填剤、希釈剤、打錠剤、滑沢剤、崩壊剤、着色剤、香味剤及び湿潤剤のような通常の製剤用担体を添加して製造することができる。錠剤は、この当業界で周知の方法に従って、例えば、腸溶性コーティング剤等を用いてコーティングすることができ、例えば充填剤、崩壊剤、滑沢剤、湿潤剤等を用いて製造してもよい。

40

【0080】

経口投与用の液剤は、例えば水性又は油性懸濁液、溶液、エマルジョン、シロップ剤又はエリキシル剤等の他、使用前に水又は適当な媒体により再溶解されうる乾燥製剤として提供される。このような液剤には、通常は添加剤、例えば沈殿防止剤、乳化剤、保存剤及び必要に応じて通常の香味剤又は着色剤を配合することができる。

【0081】

経口投与剤の製剤は、混合、充填、又は打錠などの当業界で周知の方法により製造することができる。また、反復配合操作を用いて多量の充填剤等を使用した製剤中に有効成分

50

を分布させてもよい。非経口投与用の製剤は、一般には有効成分である物質と滅菌媒体とを含有する液体担体投与量製剤として提供される。非経口投与用の溶剤は、通常、有効成分である物質を媒体に溶解させて滅菌濾過し、次に適当なバイアル又はアンプルに充填して密封することにより製造される。安定性を高めるために組成物を凍結させた後にバイアル中に充填し、水を真空下で除去してもよい。非経口懸濁液は実質的に非経口溶液の場合と同じ方法で製造されるが、有効成分を媒体に懸濁させてエチレンオキッド等により滅菌することにより好適に製造できる。また、有効成分が均一分布となるように必要に応じて界面活性剤、湿潤剤等を添加してもよい。

#### 【0082】

有効成分である物質の投与量は、物質の活性の強度、治療や予防の目的、患者の症状、体重、年齢や性別等を考慮して適宜決定すればよい。また、1日あたり1～数回に分けて投与するのが望ましい。例えば、本発明の抗アミロスフェロイド特異抗体が有効成分である場合、その投与量は、1回の投与において1kg体重あたり一般的には約1 $\mu$ g～約100mg、好ましくは約10 $\mu$ g～約50mgの量で投与することができる。

#### 【0083】

(7)抗アミロスフェロイド特異抗体を用いたアルツハイマー病個体の検出方法及び検出用試薬

アミロスフェロイドは、神経系の培養細胞に添加すると該細胞を死に至らしめることができることから、アルツハイマー病においては、同様にアミロイドモノマー蛋白質が自己会合したアミロスフェロイドが神経変性を誘導していると考えられている。本発明の抗アミロスフェロイド特異抗体は、このアミロスフェロイドに対する高い反応性を有するので、該抗体を用いて生体試料中にアミロスフェロイドを検出することによりアルツハイマー病個体の検出を行うことができる。

#### 【0084】

生体試料としては、アルツハイマー病の疑いのある個体から得られる血液、脳脊髄液、尿等の体液等が挙げられるが、中でも特に血液が好ましい。該試料の取得は、例えば、血液の場合には、アルツハイマー病の疑いのある個体の肘静脈等から採血管等によって採血し、遠心分離等の方法により血漿又は血清を分離することによって得られる。また、脳脊髄液を試料とする場合は、アルツハイマー病の疑いのある個体から、例えば麻酔下の腰椎穿刺によって採取し、遠心分離することによって得られる。取得された生体試料は、試料中のアミロスフェロイドの変化や、血液の凝固等を防止するために、酵素阻害剤を試料採取時又はサンプル採取後に加えるのが好ましい。酵素阻害剤としては、蛋白質分解酵素阻害剤として、例えば、アプロチニン、アンチパイン、ペプスタチン、ロイペプチン、EGTA、PMSF(フェニルメタンスルフォニルフルオリド)、TLCK(トリシルリシンクロロメチルケトン)等が用いられる。取得された生体サンプルは、さらに必要に応じて濃縮などを行うことによって、アミロスフェロイドの検出感度を上げることができる。

#### 【0085】

この抗アミロスフェロイド特異抗体を用いた生体試料中のアミロスフェロイドの検出は、それ自体既知の免疫学的測定法を用いることができる。具体的には、例えば、サンドイッチ法、競合法、イムノメトリック法、ネフロメトリー等が用いられる。サンドイッチ法においては、固相化した本発明の抗アミロスフェロイド特異抗体に生体試料を接触させ、さらに標識化した抗アミロスフェロイド特異抗体を反応させた後に、固相に結合した標識物質の信号を測定することにより、生体試料中のアミロスフェロイド量を測定することができる。このような免疫学的測定方法により生体試料中のアミロスフェロイド量を測定する場合には、既知量のアミロスフェロイドを含む標準液を用いて作製した標準曲線により算出することが好ましい。詳細は、生化学実験法11「エンザイムイムノアッセイ」(Tijssen P. 著、東京化学同人)、"Antibodies: A LABORATORY MANUAL"(Ed Harlow et al., Cold Spring Harbor Laboratory(1988))等の実験書に従って、適宜選択組み合わせを行うことができる。また、本発明には、これらの検出に用いられる、抗アミロスフェロイド特異抗体を含むアルツハイマー病個体検出のための試薬も含まれる。

10

20

30

40

50

## 【実施例】

## 【0086】

以下、実施例により本発明を説明するが、本発明はこれの実施例より何ら限定されるものではない。なお、下記の実施例及び本明細書中において、「PBS」は「Phosphate Buffered Saline」、「TTBS」は「Tween-Tris Buffered Saline」、「HRP」は「Horseradish Peroxidase」を示す。

## 【0087】

## 実施例1 アミロスフェロイド含有液の調製

## (1)アミロイド 40(配列番号1)樹脂の製造

Fmoc-Val樹脂342mg(アミン含量0.73mmol/g樹脂)をパーキンエルマーアブライドバイオシステムズ社製A433型自動ペプチド合成機にセットし、これにFmoc-Val-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OHを供給し、HBTU[2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate]を縮合剤として順次縮合させて側鎖保護アミロイド 40樹脂1.515gを得た。

## 【0088】

## (2)トリフルオロ酢酸処理

上記(1)で得た側鎖保護アミロイド 40樹脂中の304mgを採取し、これにフェノール0.75mlとチオアニソール0.5mlとトリフルオロ酢酸8.25mlとエタンジチオール0.25mlと蒸留水0.5mlを加え、氷冷下5分、続いて室温で1.5時間反応させた。反応終了後、氷冷したジエチルエーテル200mlを加えてペプチドを沈殿させた。全内容物をガラスフィルターで濾取し、冷ジエチルエーテルで洗浄した後、35%のアセトニトリルを含む0.1%トリフルオロ酢酸(約200ml)で抽出処理してH-Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-OHで表される粗ペプチド191mgを得た。

## 【0089】

## (3)ペプチドの精製

この粗ペプチドを35%のアセトニトリルを含む0.1%トリフルオロ酢酸(40ml)に溶解しODS(オクタデシルシラン)をシリカに結合した逆相系のカラム(内径2cm、長さ25cm)を用いたHPLCにより精製した。溶出は0.1%トリフルオロ酢酸中、アセトニトリル濃度を22%から42%へ直線的に20分間で上昇させることにより行った。精製物の収量は35mgであった。本物質の構造はMALDI-TOF質量分析により確認された。測定値[M+H]<sup>+</sup>4330.99に対して、計算値は(C<sub>194</sub>H<sub>295</sub>N<sub>53</sub>O<sub>58</sub>S<sub>1</sub>+H)4330.89であった。なお、アミロイド 42については、上記の方法に準じて合成・生成を行ったものと、Bachem社より購入したものの双方を以降の実験に供した。

## 【0090】

## (4)アミロスフェロイド含有液の調製

上記(3)で精製を行った10nmolのアミロイド 40を1.5ml容量のエッペンドルフチューブに入れ、これに500μlの超純水と500μlのダルベッコリン酸緩衝液(-)(ニッスイ社製;以下、PBS(-)と称する)を順次加え、アミロイド 蛋白質を完全に溶解させた。このアミロイド 蛋白質水溶液の入ったエッペンドルフチューブをダックローター(TAITEC社製、ローター:RT50)に取り付け、37℃において35rpmの速度で7日間回転させ、アミロスフェロイド40を調製した。アミロイド 42(上記(3)で精製を行ったものまたはBachem社製)についても、上記の方法に準じ、約10時間回転させ、アミロスフェロイド42を調製した。

## 【0091】

### 実施例2 ハムスターモノクローナル抗アミロスフェロイド特異抗体の調製

PBS中で調製したアミロスフェロイド42と等量の完全フロイントアジュバント(WAKO社製)を混合して乳化し、アルメニアハムスター背部皮下に、0.2 mlを免疫した(16  $\mu$ g/0.2 ml/hamster)。2週間おきに不完全フロイントアジュバント(Sigma-Aldrich社製)で乳化したアミロスフェロイドを同様に免疫した。5回免疫後に頸動脈から採血して血漿を調製した。1%牛血清アルブミン(BSA, fraction V;Sigma-Aldrich社製)溶液(PBS(-)中)で血漿を連続希釈し、下記のアミロスフェロイド固相ELISA法アミロスフェロイドに対する反応性を測定した。

#### 【0092】

6~12回免疫して、十分に反応性が上昇した個体について、最終的にアミロスフェロイド 16  $\mu$ g(PBS(-) 0.2 ml中)を腹腔内に投与してブーストした。ブースト3日後に脾細胞を回収し、ポリエチレングリコール4000を用いた常法により、脾細胞数の1/2数のマウスミエローマ細胞(SP2/0-Ag14)と細胞融合した。融合した細胞を10%牛胎児血清、10% BM conditioned H-1 (Roche Diagnostics社製)及びHAT(Sigma-Aldrich社製)を含むGIT培地(WAKO社製)中に懸濁し、各穴5 x 10<sup>4</sup>ミエローマ細胞/0.1 ml培養液となるように96穴プレート(FALCON社製)中に播種した。3日後培養液を追加、7日後に培養液を交換し、さらに2~3日培養して上清を回収した。下記のELISA法にて上清中の抗アミロスフェロイド特異抗体を調べ、特異的な抗体を産生する細胞を24穴プレート(IWAKI社製)に拡大した。限界希釈法にてクローニングするさいには、96穴プレートに200  $\mu$ l培養液中で0.3 cell/wellになるようハイブリドーマを播種し、1週間に一度培養液を半量交換しながら培養した。

#### 【0093】

このようにして得られたハムスターモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマH3-17-2-2(ハイブリドーマhaASD1)、H5-3-2-45(ハイブリドーマhaASD2)、H5-24-7、H5-47-10、H4-3-5-4から得られる抗体をそれぞれhaASD1、haASD2、haASD3、haASD4、haASD5と称する。

#### 【0094】

ハイブリドーマhaASD1はFERM BP-10871として、そしてハイブリドーマhaASD2はFERM BP-10872として、2007年(平成19年)7月13日付で、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター(日本国茨城県つくば市東一丁目1番地1 中央第6)に寄託されている。

#### 【0095】

ハイブリドーマH3-17-2-2、H5-3-2-45、H5-24-7、H5-47-10、H4-3-5-4からの抗体の分離精製は以下のように行った。約1LのCD Hybridoma培地(インビトロジェン社製)で1週間ハイブリドーマを培養し、培養上清を遠心分離で回収した。これを0.45  $\mu$ mのフィルターでろ過し、これをPBS(-)で平衡化した2mlのProtein-Aセファロースに添加し、以下、W02006/016644号の実施例2(1)と同様にIgG抗体を分離精製した。

#### 【0096】

### 実施例3 抗体の性状解析

#### (1)アミロスフェロイド固相ELISA法 (アミロスフェロイドとの反応性の確認)

96穴ELISAプレート(Nunc社製マキシソープ)に1/2濃度PBS(-)中で1  $\mu$ g/mlに希釈したアミロスフェロイド42を 50  $\mu$ l添加し、4 ー晩コートした。1%牛血清アルブミン(BSA, fraction V;Sigma-Aldrich社製)溶液(PBS(-)中)を室温1時間以上添加して、非特異的結合部位をブロックしたのち、水でプレートを洗浄した。1%牛血清アルブミン溶液(PBS(-)中)で希釈した抗血清あるいはハイブリドーマ培養上清50  $\mu$ lを添加して室温1時間以上反応させた。プレートを0.05% Tween20を含む生理食塩液で5回洗浄したのち同様に1  $\mu$ g/mlに希釈したペルオキシダーゼ標識2次抗体[抗ハムスターIgG抗体(ROCKLAND社製)]を添加して室温1時間反応させた。5回洗浄後、基質溶液を添加して一定時間発色させ、プレートリーダーにて吸光度を測定した。

#### 【0097】

実施例2で樹立したハムスターモノクローナル抗体の代表例結果を図1に示す。実施例2で樹立した抗体は低い濃度でアミロスフェロイドに対して強い反応性を示した。

## 【0098】

(2)ドットプロット解析(アミロスフェロイド、アミロイド 線維、アミロイド モノマー及びアミロイド前駆蛋白質との反応性の確認)

プロッター(BioRad社製)を用い、溶媒である1,1,1,3,3,3,-hexafluoro-2-propanol(Sigma-Aldrich社製)に溶かしたアミロイド 40または42モノマー蛋白質と実施例1で調製したアミロスフェロイド40、または42含有液と、アミロイド 40から調製したA 線維および市販のアミロイド前駆蛋白質sAPP (シグマ社製)をそれぞれ5ngずつニトロセルロース膜(Sc hleicher&Schuell,0.2 $\mu$ )にプロットし、この膜をPBS(-)にて洗浄後、プロッターよりは ずした。

## 【0099】

上記蛋白質をプロットした膜を、5%スキムミルク/0.05%TTBSで1時間ブロックした後、ウサギポリクローナル抗アミロスフェロイド特異抗体(rpASD1、 rpASD2、 rpASD3)(0.01 $\mu$ g/mL)、マウスモノクローナル抗アミロスフェロイド抗体(mASD3)(0.05 $\mu$ g/mL)、及び実施例2で取得した抗体haASD1(0.01 $\mu$ g/mL)に浸し、湿潤箱中で一晩、4 で反応させた。その後、該膜を0.05%TTBSで洗浄し、二次抗体として0.05~1 $\mu$ g/mlの西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼが結合した抗ウサギIgGあるいは抗マウスIgGまたは抗ハムスターIgGと1時間反応させた。その後、0.05%TTBSで洗浄して未反応の二次抗体を除去し、SuperSignal West-Femto(Pierce社製)に浸して5分間インキュベートした後、イメージアナライザー「LAS-1000 plus」(富士写真フィルム社製)で化学発光シグナルの検出及び画像データの取り込みを行った。上記抗体の反応性のコントロールとしては、1次抗体に0.5 $\mu$ g/mLの抗アミロイド 抗体「6E10」(Senetek社製)および0.04 $\mu$ g/mLの抗APP N-terminal抗体「22C11」(C hemicon社製)を用いた。

## 【0100】

この結果を図2に示す。

## 【0101】

図2では、A 1-40およびA 1-42は、それぞれ、モノマーと実施例1で調製したアミロスフェロイド40含有液ならびにその100kDa限外濾過膜保持画分およびアミロスフェロイド42含有液ならびにその100kDa限外濾過膜保持画分のドットを、fibrilはA 1-40から調製したA 線維のドットを、また、sAPP は市販のアミロイド前駆蛋白質(シグマ社製)のドットを示す。市販の抗アミロイド 抗体「6E10」は実施例1で調製したアミロスフェロイド40、アミロスフェロイド42、モノマー、線維、sAPP 蛋白質のいずれにも反応するのに対し、実施例2で樹立したハムスターモノクローナル抗体(haASD1)はアミロスフェロイド40及びアミロスフェロイド42に選択的に高く反応し、アミロイド前駆蛋白質sAPP には全く反応性を示さないことが判った。

## 【0102】

## (3)解離定数測定

BIAcore3000(BIAcore社製)のCM5センサーチップに、50 mM酢酸緩衝液中で10 $\mu$ g/ml アミロスフェロイド(42ASPD)、アミロイド モノマー(42A 、40A )、40A から調製したA 線維(fibril)をカップリングした。10 mM HEPES, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.05% Surfactant P20中で、最高濃度100 nMから連続2倍希釈した抗体溶液を用いて、結合速度定数及び解離速度定数を求めた。これら定数より次式により解離定数を計算した。

解離定数 = 解離速度定数 / 結合速度定数

## 【0103】

表1にマウスモノクローナル抗アミロスフェロイド抗体、ハムスターモノクローナル抗アミロスフェロイド特異抗体及び市販抗体(6E10)のアミロスフェロイドに対する解離定数(Kd)を示した。

ハムスターモノクローナル抗アミロスフェロイド特異抗体はマウスモノクローナル抗アミロスフェロイド抗体同様、ASPDに対して強い親和性(Kd  $10^{-11}$  ~  $10^{-9}$ M)を有し、かつアミロイド モノマーや線維に対するよりも(1オーダーから2オーダー)高い選択性を示した。

## 【0104】

10

20

30

40

50

【表1】

表1：各種抗アミロスフェロイド抗体の解離定数

antibody	affinity, KD(nM)			
	42ASPD	42A $\beta$	40A $\beta$	fibril
mASD1	0.19	1.2	8.1	1.61
mASD3	0.036	1.0	2.6	0.35
haASD1	0.49	2.4	44.6	8.49
haASD2	0.022	0.97	7.6	0.87
6E10	18.3	17.2	37.3	1.33

10

## 【0105】

実施例4: 抗アミロスフェロイド抗体の抗原決定部位(エピトープ)の決定

20

## (1) 抗アミロスフェロイド抗体の抗原決定部位(エピトープ)

抗アミロスフェロイド抗体のエピトープを決定する目的で、アミロイドモノマー蛋白質の部分配列をN端より5残基ずつ順次化学合成することで、38通りのアミロイド5残基部分配列ペプチド(今後、本実施例の中でAと略し、N端側からA1-5, A2-6, A3-7, ……A38-42と呼ぶことにする。)を得た。AはHPLCによって単一ピークになるまで精製した後、一定量ごとに凍結乾燥を行い、使用直前まで-20にて保存した。

## 【0106】

上記の各Aを滅菌済み0.5×PBS(-)に溶かし、IgGに精製した各抗アミロスフェロイド抗体に対して各Aがモル比で100~100万倍になるようA-抗体混合溶液を調製した。実施例3(1)で調製したアミロスフェロイド40固相プレートに各A-希釈液を添加し、4にて一晩振とうし、0.01%Tween 20-PBS(-)溶液で洗浄後、1万分の1に希釈したペルオキシダーゼが結合した2次抗体(ポリクローナル抗体の場合抗ウサギ抗体、モノクローナル抗体の場合抗マウス抗体あるいは抗ハムスター抗体)を添加し1時間振とうした。これを0.01%Tween 20-PBS(-)溶液にて洗浄し、TMB Substrate Kit(PIERCE社製)を用いて発色を行った。発色を停止後、450 nmの吸収をプレートリーダー(Benchmark; BioRad社製)で測定し結果を得た。

30

## 【0107】

その結果を図3に示す。haASD2および市販抗体の82E1(IGBL社(株式会社免疫生物研究所)製)はアミロイドモノマー蛋白質のN末端のペプチド(A1-5)によって最も強く競合阻害がかかることが明らかとなった。一方、haASD1およびhaASD3はいずれのアミロイド5残基部分配列ペプチドとも(抗体に対してモル比で100万倍になるようA混合比を上げてても)競合阻害がかからなかった。このことは本発明の抗アミロスフェロイド特異抗体は従来知られている抗体とは認識するエピトープが異なり、ASPDの立体構造特異的なエピトープを認識する抗体であることが強く示唆された。

40

## 【0108】

実施例5 アミロスフェロイドの細胞毒性の中和活性の評価

## (1) モノクローナル抗アミロスフェロイド抗体によるアミロスフェロイド毒性の中和

実施例2で得た各モノクローナル抗アミロスフェロイド抗体を用いて、アミロスフェロイド毒性の中和活性を評価した。評価方法としては、ラット海馬初代培養神経細胞を用いて行った。海馬の初代培養は基本的にW02006/016644の実施例5に記載された前脳基底野の場

50

合と同様に調製を行ったが、培養密度は $1.0 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>に播種した。アミロスフェロイドは、実施例1に記載した方法に従い調製したアミロスフェロイド42を用いた。なお、実験条件は以下の通りである。

アミロスフェロイド42の濃度:1.25  $\mu$ M

アミロスフェロイド暴露時間:45時間

細胞:ラット海馬ニューロン

PI染色にて検出

#### 【0109】

モノクローナル抗アミロスフェロイド抗体haASD2は海馬初代培養神経細胞においても、アミロスフェロイドによる神経毒性を中和する効果を発揮していた。図4の通り、haASD2は、アミロスフェロイドによる神経毒性に対して、濃度(5~50  $\mu$ g/ml)依存的な中和活性を示した。

#### 【0110】

実施例6 アミロイド前駆蛋白質に対する反応性

(1)Western blot

アルツハイマー病のモデル動物であり、ヒト型APP(hAPP)を脳に過剰発現するTg2576マウス(Science 1996 Oct 4; 274 (5284):99-102)の脳抽出物をサンプルとしてwestern blotを行い、ASPD抗体および6E10の反応性を調べた。具体的には、Tg2576マウス(15ヶ月齢)の大脳皮質および海馬のTBS(Tris buffered saline)可溶性画分をNuPAGE LDS Sample bufferで処理し、約50  $\mu$ gのサンプルをNuPAGE Novex Bis-Tris Gel (4-12%)にアプライし、電気泳動(200V)を行った。その後、ニトロセルロース膜に転写(30V, 60分間)し、転写された膜を、5%スキนมilkを含むTTBS(0.05% Tween 20を含むTBS)でブロッキングした(室温、2時間)。次に、同溶液で希釈した各抗体(1  $\mu$ g/ml)と反応(4、一晩)し、洗浄後、HRP-標識2次抗体で検出した(SuperFemto)。

#### 【0111】

その結果、Tg2576マウスのサンプルにおいて、6E10は、A $\beta$ モノマーおよびhAPPに反応し(図5、それぞれA $\beta$  monomer, APPと記したバンド)、WO2006/016644記載のマウスASPDモノクローナル抗体(mASD1, mASD2, mASD3)は、A $\beta$ モノマーに反応しなかったが、hAPPに反応した(図6、矢印のバンド)。一方、本発明のハムスターASPDモノクローナル抗体は、6E10およびマウス抗体でみられたようなA $\beta$ モノマーおよびhAPPに対する反応性を示さなかった(図7)。

#### 【0112】

(2)競合ELISA

ASPDを固相化したELISAプレートにおいて、各ASPD抗体および6E10による競合ELISAを行った。予め別プレートで、ASPDまたはsAPP (Sigma)と各抗体を反応させ(室温、1時間)、これを、ASPD固相化プレート(1% BSAでブロッキング済み)に添加した。次に、室温で1時間反応し、洗浄後、HRP標識2次抗体で検出を行った。

#### 【0113】

その結果、表1のように、6E10およびWO2006/016644記載のマウスASPDモノクローナル抗体は、ASPD(IC<sub>50</sub>=2.1~13nM)だけでなく、sAPPにも反応性(IC<sub>50</sub>=9.6~33.8nM)を示した。一方、ハムスター抗体は、ASPDに反応性(IC<sub>50</sub>=3.2~6.4nM)を示したが、sAPPに対して、明らかな反応性を示さなかった(IC<sub>50</sub> >100nM)。以上の結果から、本発明の抗体はアミロスフェロイドに特異的に反応し、APPとは有意には反応しない抗体であることから、副作用が低下されたより安全性の高い優れた医薬になり得る。

#### 【0114】

10

20

30

40

## 【表 2】

表 2 :

抗体	競合ELISA/IC <sub>50</sub> (nM)	
	ASPD	sAPP $\alpha$
mASD1	2.1	9.6
mASD2	13.0	33.8
mASD3	2.7	18.9
haASD1	4.0	>100
haASD2	4.5	>100
haASD3	6.4	>100
haASD4	4.4	>100
haASD5	3.2	>100
6E10	3.7	16.1

10

## 【 0 1 1 5 】

## 実施例7 臓器特異性に関する試験

抗体の正常ヒト組織に対する反応性を評価した。

マウス抗体を用いた免疫染色では、ヒト組織凍結切片をアセトン固定し、DAKO社Envisionキット中のPeroxidase blocking溶液と5分間反応させた。0.5%カゼイン、1%ウシ血清アルブミン、1.5%正常ヤギ血清、2%正常ヒト免疫グロブリン、1 mg/mL熱変性ヒト免疫グロブリンを含む蛋白質ブロッキング溶液と20分間反応させた後、1%ウシ血清アルブミンを含むPBS中で2あるいは10 mg/mLの濃度に希釈した抗体を添加して、室温1時間反応させた。DAKO社Envisionキット中のPeroxidase labeled polymerを30分間反応させた後に、DAKO社Envisionキット中のDAB溶液を添加して8分間反応させた。以上のすべてのステップの終了後は、次のステップに移る前にPBSで標本を洗浄した。免疫染色終了後、標本を水道水で洗浄し、ヘマトキシリンでカウンター染色した。

20

## 【 0 1 1 6 】

ハムスター抗体を用いた免疫染色では、アセトン固定した凍結切片に、グルコースオキシデ-ス(2 U/mL)/グルコース(10 mM)およびアジ化ナトリウム(1 mM)を35 1時間添加して内在性ペルオキシダ-ゼを失活させた。アビジン溶液で室温15分、さらにビオチン溶液で室温15分ブロックした後に、0.5%カゼイン、1%ウシ血清アルブミン、1.5%正常ヤギ血清、5%ヒト免疫グロブリン、1 mg/mL熱変性ヒト免疫グロブリンを含む蛋白質ブロッキング溶液と室温20分間反応させた。1%ウシ血清アルブミンを含むPBS中で2あるいは10 mg/mLに希釈したハムスター抗体を添加して、室温1時間反応させた後に、ビオチン標識ヤギ抗アルメニアハムスター-IgG(H+L)抗体を添加して室温30分間反応させた。さらにABC Elite試薬を30分間反応させ、その後DAB溶液を室温4分間反応させた。

30

## 【 0 1 1 7 】

調べたすべてのマウス抗ASPD抗体ならびにハムスター抗ASPD抗体は、アルツハイマー患者大脳の凍結切片で老人斑様の構造物を染色し、アルツハイマー病患者脳大脳に、これらの抗体が認識する物質が存在することが示された。

40

## 【 0 1 1 8 】

正常ヒト小脳、脊髄、末梢神経、心臓、肝臓、腎臓を調べたところ、多くのマウス抗アミロスフェロイド抗体は、血管内あるいは周囲の蛋白様物質、正常脳組織の神経網および神経細胞核、平滑筋、筋線維芽細胞、マクロファージ、クッパー細胞などを染色した。

## 【 0 1 1 9 】

ハムスター抗アミロスフェロイド抗体の一部は骨格筋や心筋細胞を染色したが、マウス抗体と比較して正常ヒト組織への反応性は弱かった。haASD1およびhaASD2は、正常ヒト組織をほとんど染色せず、特にhaASD2については、各正常組織において陽性像は全く認められなかった。結果を図8および表3に示す。

50

【 0 1 2 0 】

【 表 3 】

表 3：ヒト組織パネルで確認された免疫陽性反応の比較

	mASD 1	mASD 3	haASD1	haASD2
アルツハイマー病 (老人斑、神経原線維変化)	+++	+++	+++	+++
小脳 (プルキンエ、グリア)	+	±	±	—
心臓	+	—	±	—
腎臓	+	+	—	—
肝臓	++	±	—	—
末梢神経	++ (シュワン細胞も)	±	—	—
脊髄	++	++	+	—
血管 (内皮、血管内タンパク)	++	—	—	+ (脈絡叢内の血管)

10

20

【 0 1 2 1 】

以上の結果から、本発明のハムスターモノクローナル抗アミロスフェロイド抗体は従来知られているマウスモノクローナル抗アミロスフェロイド抗体に比べてヒト正常組織への交叉反応性が低くアルツハイマー病脳に特異的な抗体であることが明らかとなった。これにより、これらハムスター抗体の特異性を元にした治療用抗体は、標的臓器以外の組織には影響しない副作用の少ないアルツハイマー病治療薬となりうるということが予想できる。

【 0 1 2 2 】

実施例8 免疫電子顕微鏡観察による抗体特異性の検証

ASPDないしは線維状のアミロイド会合体を生理的溶媒環境において、10 µg/mlのハムスター抗体haASD1と反応させた。反応は1.5 mlチューブあるいは、カーボン蒸着をしたフォルムバールグリッド上で直接行った。その後、6 nmの金コロイドが結合した二次抗体とともに反応させ、酢酸ウランによってネガティブ染色を行い、電子顕微鏡観察を行った。図9に示したとおり、ハムスター抗体は線維状の会合体には反応せず、アミロスフェロイドに結合した。

30

【 0 1 2 3 】

実施例9 免疫組織化学分析

10名のアルツハイマー病である個体(年齢80.4 ± 9.2歳、脳重量964 ± 82 g、罹患期間10.1 ± 5.5年)由来と、7名の対照健常個体(年齢71.3 ± 15.2歳、脳重量1226 ± 96 g)由来の、optimum cutting temperature compoundに埋め込んだ冷凍脳の凍結切片又はパラフィンに埋め込んだホルマリン固定脳の10 µm厚の切片を用い、定法に従って免疫組織化学分析を行った。アミロスフェロイドを認識する抗体として、マウスモノクローナル抗体mASD3、ハムスターモノクローナル抗体haASD1、ウサギポリクローナル抗体rpASD2を用いた。また抗アミロイド抗体として、アミロイド蛋白質(A 1-42)のC末端を認識する市販の抗アミロイド抗体「IBL18582」(IBL社製)及びA 8-17を認識する市販の抗アミロイドモノクローナル抗体「6F/3D」を用いた(DAKO社製)。

40

【 0 1 2 4 】

その結果、アミロスフェロイドを認識する全ての抗体(rpASD1、rpASD2、rpASD3、mASD3、haASD1)は、アルツハイマー病脳凍結切片の前頭皮質、側頭皮質、海馬にあるプラーク(老人斑、びまん性老人斑)を強く染めた。このことよりアミロスフェロイド様構造物がブ

50

ラーク内に存在していることがin situで示された。またこれらの抗体は、haASD1を除いて、電子レンジ処理やギ酸処理の有無に係わらず、ホルマリン固定パラフィン切片脳のプラークも染めた。なお、同年齢の正常対照脳においては、微小プラーク以外の構造体は染色されなかった。一方、アミロイド 蛋白質(A 1-42)のC末端を認識する市販の抗アミロイド 抗体「IBL18582」及びA 8-17を認識する市販の抗アミロイド モノクローナル抗体「6F/3D」は、電子レンジ処理やギ酸処理をしないアルツハイマー病脳の凍結切片やパラフィン切片では、プラークを殆ど染めなかった。以上の結果より、アミロスフェロイドを認識する抗体はアミロスフェロイドの構造を特異的に認識しており、そのなかでも特にhaASD1は、より立体構造を繊細に認識する抗体であることが分かった。このことは、実施例8の免疫電子顕微鏡観察による抗体特異性の検証において、アミロスフェロイド抗体は線維状の会合体には反応せず、アミロスフェロイドに結合したこととよく整合した。

10

## 【 0 1 2 5 】

## 実施例10 ヒト化抗体の取得とその解析

## (1) ヒト化抗体取得

実施例2にて得られた、ハムスターモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマhaASD2から、QIAGEN製RNeasy mini kit (Cat.No. 74106) を用いてRNAを取得した。このRNAを鋳型にして、GE Life Sciences製1st strand cDNA synthesis kit (Cat.No. 27-9261-01) を用いてcDNAを合成した。軽鎖可変領域は、プライマー-haVK1とhaCK およびFinnzymes製Phusion High-Fidelity PCR Master Mix (Cat.No. F-531S)を用いてcDNAを増幅しInvitrogen製Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (Cat.No. 450245)のpCR-Blunt II-TOPOベクターに連結した。重鎖可変領域は、プライマー-haVHf とMHCG3 およびClontech製AdvantageR-HF 2 PCR Kit (Cat.No. 639123)を用いてcDNAを増幅しInvitrogen製TOPO-TA cloning kit (Cat.No. 450641)のpCR2.1-TOPOベクターに連結した。これらが大腸菌コンピテントセルInvitrogen製TOP10 (Cat.No. 404003)に導入後、目的の大きさの挿入DNA (VH:約730bp、VL:約850 bp)をもつクローンについてGATC Biotech社に委託して塩基配列解析し、DNA配列を決定した。

20

## 【 0 1 2 6 】

## 【表4】

表4 PCR primers for cloning hamster lambda VL

30

Name	Sequence (5' → 3' )
haVK1	ATGGCTTGGACTCCTGGC(配列番号19)
haCK	GTCTTCACCCCATCATTGATAG(配列番号20)

## 【 0 1 2 7 】

## 【表5】

表5 PCR primers for cloning hamster VH

40

Name	Sequence (5' → 3' )
haVHf	ATGGGGTTGGGGCTGCACTGGG(配列番号21)
MHCG3	CAAGGGATAGACAGATGGGGC(配列番号22)

## 【 0 1 2 8 】

ハムスター抗体の軽鎖および重鎖可変領域における相補性決定領域(CDRs)は、Kabatら

50

の方法に従って決定し("Sequences of Proteins of Immunological Interest", Kabat, E., et al., US Department of Health and Human Services, (1983))、特許第2912618号公報に記載のWinterの方法に従って、ハムスター抗体huASD2のヒト化を行った。その結果、2種類のヒト化抗体が得られ、それぞれの名称をRHA/RLA(以降huASD2と称することもある)およびRHB/RLBとした。

【0129】

ヒト化抗体huASD2の重鎖cDNAを導入した発現プラスミドを作成し、これをASD2RHApG1D200とした。またヒト化抗体RHA/RLAの軽鎖cDNAを導入した発現プラスミドを作成し、これをASD2RLApLN100とした。ASD2RHApG1D200は受領番号FERM ABP-11040(受託番号:FERM BP-11040)として、ASD2RLApLN100は受領番号FERM ABP-11041(受託番号:FERM BP-11041)として、2008年10月17日付で、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター(日本国茨城県つくば市東一丁目1番地1 中央第6(郵便番号305-8566))に寄託されている。

10

【0130】

ヒト化抗体huASD2は、ASD2RHApG1D200およびASD2RLApLN100を公知の動物細胞(例えば、CHO、NS0、HEK293、COSなど)にコトランスフェクトし、発現させることにより得ることができる。一例として、Invitrogen製FREESTYLE MAX 293 EXP SYSTEM (Cat.No. K9000-10)を用いたHEK293による一過性発現がある。

【0131】

配列表の配列番号4及び5、並びに図10に、ヒト化抗体huASD2の重鎖可変領域のDNAおよびアミノ酸配列を示す。図10中にCDR1,2,3それぞれの位置を示した。配列表の配列番号6及び7、並びに図11に、ヒト化抗体huASD2の軽鎖可変領域のDNAおよびアミノ酸配列を示す。図11中にCDR1,2,3それぞれの位置を示した。ヒト化抗体RHB/RLBもヒト化抗体huASD2と同様に、重鎖および軽鎖それぞれを発現するプラスミドを作成し、それらを動物細胞にコトランスフェクトして発現させることにより得ることができる。

20

【0132】

配列表の配列番号8および図12に、ヒト化抗体RHB/RLBの重鎖可変領域のアミノ酸配列を示す。図12中にCDR1,2,3それぞれの位置を示した。配列表の配列番号9および図13に、ヒト化抗体RHB/RLBの軽鎖可変領域のアミノ酸配列を示す。図13中にCDR1,2,3それぞれの位置を示した。

30

【0133】

さらに、ヒト化抗体huASD2を改変することにより、ヒト化抗体RHC/RLCを得ることができる。ヒト化抗体RHC/RLCの重鎖可変領域のアミノ酸配列は、ヒト化抗体huASD2の重鎖可変領域と同一である。ヒト化抗体RHC/RLCの軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号10および図14に示したとおりである。

【0134】

(2) ヒト化抗体の解析

ヒト化抗体huASD2、RHB/RLBおよびRHC/RLCの重鎖可変領域および軽鎖可変領域アミノ酸配列を比較した図が図15である。図中、ヒト化抗体huASD2の重鎖可変領域配列をASD2RHA、軽鎖可変領域配列をASD2RLA、ヒト化抗体RHB/RLBの重鎖可変領域配列をASD2RHB、軽鎖可変領域配列をASD2RLB、およびヒト化抗体RHC/RLCの軽鎖可変領域配列をASD2RLCとして記した。ヒト化抗体RHC/RLCの重鎖可変領域のアミノ酸配列は、ヒト化抗体huASD2の重鎖可変領域アミノ酸配列(図15のASD2RHA)と同一であるため、図15では省略した。

40

【0135】

図15中、ヒト化抗体huASD2の重鎖可変領域におけるアミノ酸番号第49位(G)、第81位(L)および第100位(T)を、それぞれA、VおよびRに置換することにより、ヒト化抗体RHB/RLB重鎖可変領域を作成することができる。また、ヒト化抗体huASD2軽鎖可変領域におけるアミノ酸番号第48位(Y)、第49位(L)、第51位(K)、第74位(A)および第79位(G)を、それぞれF、F、F、TおよびAに置換することにより、ヒト化抗体RHB/RLBの軽鎖可変領域を作成することができる。

50

## 【0136】

図15に示すアミノ酸残基において、ヒト化抗体huASD2の重鎖可変領域(ASD2RHA)および軽鎖可変領域(ASD2RLA)のCDRs以外の配列については、特許第2912618号公報に記載のWinterの方法に従いメディカルリサーチカ운スル社(以下MRCTと称す)の解析により構造的に重要と判断されたものであり、これらを置換することでhuASD2の性状をより効果的に修飾/改変することができる。具体的には、ヒト化抗体huASD2とハムスター抗体haASD2において機能的差異があった場合、これらのうち一箇所又は数箇所あるいは全てを元のハムスター抗体haASD2の配列に戻すこと(Back mutation)によりその差異を縮小又は解消することが期待できる。一例として、配列RHB/RLB(配列番号8および9、図15のASD2RHBおよびASD2RLB)を挙げる。但し、ヒト化の目的である異種リード抗体のもつヒトに対する免疫原性の低減の視点に立てば、ここで述べたアミノ酸置換は好ましい操作ではなく、免疫原性への影響を上回る効果が無ければ実施する必要は無い。

10

## 【0137】

一方、huASD2の可変領域フレームワークの設計に利用されたヒト抗体AB021517(GenBank番号)とAJ241418(同)の配列を、それぞれが由来するゲノム配列(各Vセグメント、Jセグメント)と比較すると、軽鎖(配列番号6及び7)に超変異が認められた。超変異は、抗体の抗原特異的な成熟過程にみられる変異であり、個人の遺伝背景を反映した免疫学的環境のなかで生じる。従って、遺伝背景が異なれば免疫原性を示す可能性があり、完全ヒト抗体Humiraにみられる予想外の免疫原性の一因とも考えられている。

20

## 【0138】

これを回避する手段として、超変異を受けたアミノ酸残基をヒト共通のゲノム配列に戻すことが考えられる。具体的には、抗体の性状への影響が許容される範囲において、huASD2軽鎖可変領域(図15 ASD2RLA)の超変異アミノ酸残基3つ(配列番号7のアミノ酸第2位(S)、第8位(S)および第51位(K))のうち一箇所又は2箇所あるいは全てをそれぞれのゲノム配列であるA、AおよびRにそれぞれ置換することである(配列番号10、図15 ASD2RLC)。

## 【0139】

## 実施例11 ヒト化抗体の性状解析

## (1) 解離定数測定

実施例3(3)と同様の手順で、CM5センサーチップに、42ASPD、40A (A モノマー)および42A から調製したA 線維(42fibril)をカップリングし、ハムスター抗体haASD2、ヒト化抗体huASD2および抗A 抗体3D6(US20030165496A1)の上記蛋白質に対する解離定数を測定した。抗A 抗体3D6は、US20030165496A1に記載のマウス抗体軽鎖可変領域3d6vl.aaおよび同重鎖可変領域3d6vh.aaに対応する合成遺伝子を既存の方法で作製し、同特許の情報に基づき、既知のマウス抗体の軽鎖定常領域および重鎖定常領域にそれぞれ連結して、マウスIgG2b/ 分子として作製した。

30

## 【0140】

その結果を表6に示す。ヒト化抗体huASD2はASPDに対して強い親和性を示し( $K_d$   $1.8 \times 10^{-10}$  M)、かつその親和性はアミロイド モノマーに対して約580倍高く、アミロイド線維に対して約6.4倍高かった。一方抗A 抗体3D6のASPDに対する親和性は、アミロイド モノマーに対して約34倍高く、アミロイド線維に対して約2.0倍高かった。すなわち今回我々が得たヒト化抗体huASD2は、公知のA 抗体3D6よりもASPDに対する選択性が高いことが示された。すなわち本発明に係るヒト化抗体huASD2は、脳血管に沈着しているA 40への結合が低いことから、脳微小血管出血の副作用が低いことが期待される。

40

## 【0141】

## 【表 6】

表 6：各種抗体の解離定数

Antibody	Affinity, Kd (nM)		
	42ASPD	40A $\beta$	42fibril
haASD2	0.0989	13.2	0.187
huASD2	0.180	105	1.15
3D6	0.115	3.93	0.231

## 【0142】

10

(2) ヒト化抗体huASD2の抗原決定部位(エピトープ)の決定

実施例4と同様の方法を用いて、ヒト化抗体huASD2がどのA $\beta$ 5残基ペプチドに結合するか調査した。その結果、ヒト化抗体huASD2はハムスター抗体haASD2と同様にアミロイドモノマー蛋白質のN末端のペプチド(A $\beta$ 1-5)によってもっとも強く競合阻害がかかることが明らかとなった。

## 【0143】

実施例12 ヒト化抗体RHA/RLAの細胞毒性の中和活性の評価

妊娠17日齢のラット(SD、日本チャールスリバー)より胎児を取り出し、これの脳より海馬を摘出した。海馬初代培養神経細胞はW02006/016644の実施例5の記載と同様に調製を行った。具体的には、海馬神経細胞を神経細胞培養液(SUMILON)にて5日間培養した(37 $^{\circ}$ C、5%CO $_2$ )。ASPDとしては、公知の方法に従い(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100, 6370-6375 (2003))得られたものを用い、これをDF-ASPDと称する。DF-ASPD(0.35 $\mu$ M)と、haASD2またはhuASD2(7.5、25および75 $\mu$ g/ml)を共に室温2時間インキュベーションした後、これを培養液に直接添加し、24および45時間培養した。コントロールとしては、抗体を含まないPBS(-)を用いた。その後、神経細胞死をcell death ELISA(ロシュ)およびPropidium Iodide (PI)染色により検出した。

20

## 【0144】

DF-ASPDによる神経細胞死に対するhaASD2およびhuASD2の中和活性を、アポトーシスの検出系であるcell death ELISAにより評価した結果を図16に示す。図16中、F12とはDF-ASPDを含まないコントロールである。DF-ASPDの添加によりOD(405-492nm)値が増加し、アポトーシス誘導が確認された(DF-ASPD(0.35 $\mu$ M)、PBS(-)のカラム)。これに対し、ハムスター抗体haASD2のヒト化抗体であるhuASD2添加群は、OD値が有意に低下し(DF-ASPD(0.35 $\mu$ M)、huASD2(7.5、25および75)のカラム)、DF-ASPDにより誘導される神経細胞死の抑制効果が高いことが示された。

30

## 【0145】

次に、DF-ASPDによる神経細胞に対するhaASD2およびhuASD2抗体(25 $\mu$ g/ml)の中和活性を、PI染色を用いて細胞死を検出することにより評価した結果を図17に示す。細胞死の検出は、一視野あたりのPI陽性細胞数を計測することにより行った。図16と同様、F12はDF-ASPDを含まないコントロールであり、PBS(-)は抗体を含まないコントロールである。DF-ASPD(0.35 $\mu$ M)の添加により有意にPI陽性細胞が増加し、細胞死の誘導が確認された(DF-ASPD(0.35 $\mu$ M)、PBS(-)のカラム)。これに対し、haASD2およびhuASD2は、PI陽性細胞数の有意な抑制作用を示し、DF-ASPDにより誘導される細胞死による神経細胞死の抑制効果が高いことが示された。

40

## 【産業上の利用可能性】

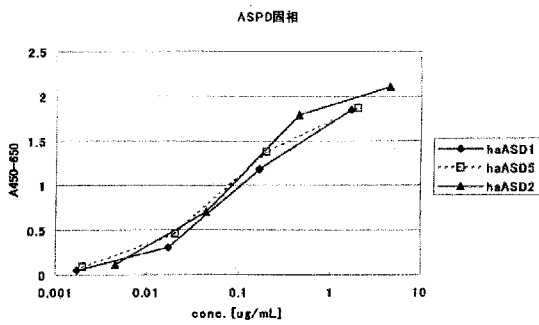
## 【0146】

本発明の抗体は、アミロイド前駆蛋白質に対する反応性が低く、かつアミロスフェロイドに対する反応性の方が、アミロイド線維またはアミロイドモノマー蛋白質に対する反応性よりも高く、さらにアミロスフェロイドによる神経細胞死誘導に対する阻害活性を有する。アミロスフェロイドは、アルツハイマー病患者の脳内に存在するアミロイド蛋白質と同等の濃度で神経細胞死を誘導するため、(1)アミロスフェロイドの形成に対する

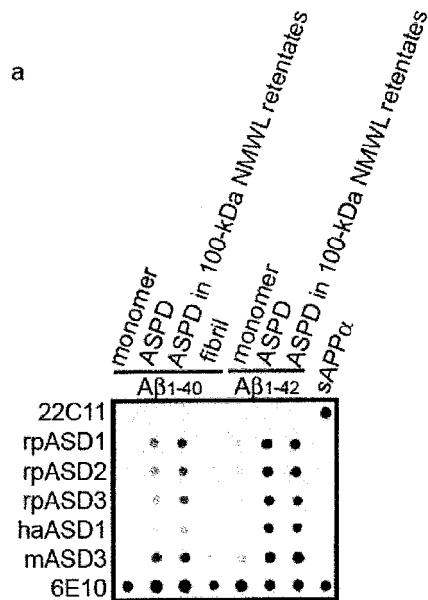
50

阻害活性を有する抗体、あるいは(2)アミロスフェロイドによる神経細胞死誘導に対する阻害活性を有する抗体を取得すれば、アルツハイマー病の治療または予防薬として用いることができる。また、(3)アミロスフェロイドに対する反応性が、アミロイドモノマー蛋白質やアミロイド線維に対する反応性よりも高い抗体を取得すればアルツハイマー病個体の検出への応用も可能である。本発明の抗体は、アミロイド前駆蛋白質に対する反応性が低く、また脳への特異性が高いので、従来から知られている抗アミロスフェロイド抗体に比べ、より安全性の高いアルツハイマー病の治療薬になりうる。

【 図 1 】



【 図 2 】



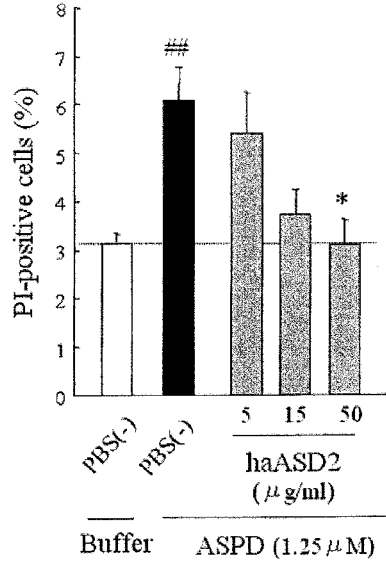
【 図 3 】

The Epitope Analysis

	ASD antibodies			N-terminal antibody (β2E1)
	haASD1	haASD2	haASD3	
Αβ1-5	ND	++++	ND	++++
Αβ2-6	ND	ND	ND	ND
Αβ3-7	ND	ND	ND	ND
Αβ4-8	ND	ND	ND	ND
Αβ5-9	ND	ND	ND	ND
Αβ6-10	ND	ND	ND	ND
Αβ7-11	ND	ND	ND	ND
Αβ8-12	ND	ND	ND	ND
Αβ9-13	ND	ND	ND	ND
Αβ10-14	ND	ND	ND	ND
Αβ11-15	ND	ND	ND	ND
Αβ12-16	ND	ND	ND	ND
Αβ13-17	ND	ND	ND	ND
Αβ14-18	ND	ND	ND	ND
Αβ15-19	ND	ND	ND	ND
Αβ16-20	ND	ND	ND	ND
Αβ17-21*				
Αβ18-22*				
Αβ19-23	ND	ND	ND	ND
Αβ20-24	ND	ND	ND	ND
Αβ21-25	ND	ND	ND	ND
Αβ22-26	ND	ND	ND	ND
Αβ23-27	ND	ND	ND	ND
Αβ24-28	ND	ND	ND	ND
Αβ25-29	ND	ND	ND	ND
Αβ28-30	ND	ND	ND	ND
Αβ27-31	ND	ND	ND	ND
Αβ28-32	ND	ND	ND	ND
Αβ29-33	ND	ND	ND	ND
Αβ30-34	ND	ND	ND	ND
Αβ31-35	ND	ND	ND	ND
Αβ32-36	ND	ND	ND	ND
Αβ33-37	ND	ND	ND	ND
Αβ34-38	ND	ND	ND	ND
Αβ35-39	ND	ND	ND	ND
Αβ36-40	ND	ND	ND	ND
Αβ37-41	ND	ND	ND	ND
Αβ38-42	ND	ND	ND	ND

The symbols are: +++, more than 75%;  
 +, 50-75%; ++, 25-50%; +, less than 25%;  
 ND, not detected.  
 a: not determined

【 図 4 】



【 図 1 0 】

```

10      20      30      40      50      60
GAAGTCAAGCTGCTGAGTCTGGCGGGGACTCGTGAAGCCCTGGCGGCTCCCTGGGGTG
E V Q L V E S G G G L V K P G G S L R L

=====CDR1=====
70      80      90      100     110     120
TCCTGCGCGGCTCCGGCTTACCTTCTCCGACTACTCATGTCTCGGTGGGCGAGGCT
S C A A S G F T F S D Y F M S W V R Q A

=====CDR2=====
130     140     150     160     170     180
CCTGGCAAGGGCTGGAAATGGGTGGGGGATCGAGATCAAGTCTCTACTTACGCCACC
P G K G L E W V G G I E I K S Y F Y A T

=====
190     200     210     220     230     240
TACTACTTCGGCTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGAGCAGCACCAGAACACC
Y Y F G S V K G R F T I S R D D S K N T

250     260     270     280     290     300
CTGTACTCGCAGATGAAGTCCCTGAAACCGAGGACCCGCGTGTACTACTGCACACC
L Y L Q M N S L K T E D T A V Y Y C T T

=====CDR3=====
310     320     330     340     350     360
AACCGGAAGTGGGGGCTGGCAACTGGGGCAGGGACCCCTGGTGGACCGTGTCTCTCC
N R E V G G L D N W G Q G T L V T V S S

```

【 図 1 1 】

```

10      20      30      40      50      60
CAGTCCGTGCTGAACCCAGCCTTCCCTGCTGGCGCTCCCGTGGCGGCTCCGGCTCCCTG
Q S V L T Q P S S L S A S P G A S A S L

=====CDR1=====
70      80      90      100     110     120
ACCTGCACCCCTGGGTCGGGATCTCCGTTGGGGGCAAGAACATCTACTGGTATCAGCAG
T C T L R S G I S V G G K N I Y W Y Q Q

=====CDR2=====
130     140     150     160     170     180
AAGCCTGGCTCCCTCCCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
K P G S P P Q Y L L K Y S S Y S N K Q L

=====
190     200     210     220     230     240
GGAAGTGGGCTGCTCCGGTTCCTCCGCTCCAGGAGCCAGCCAGCCAGCCAGCCAGCCAG
G P G V P S R F S G S K D A S A N A G I

=====
250     260     270     280     290     300
CTGCTGATCTCTGGACTGAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
L L I S G L Q S E D E A D Y Y C S I H E

CDR3=====
310     320     330     340     350     360
TCCAGCGCTACTGTTTGGCGGGGAAACAAAGCTGACAGTCTCTGGGGGG
S N A Y V F G G G T K L T V L G R

```

【 図 1 2 】

```

CDR1=
10      20      30      40      50      60
EVQLVESGGG LVKPGSLRL SCAASGFTFS DYFMSWVRQA PKGLEWVAG IEIKSYFYAT

=====CDR2=====
70      80      90      100     110     120
YFVGSVGRF TISRDSKNT VYQWNSLKT EDTAVYYCTR NREVGGLDNW GGGTLVTVSS

```

【 図 1 3 】

```

=====CDR1=====
10      20      30      40      50      60
DSVLTQPSLL SASPGASAL TGLRSGISV GGNLYWYQQ KPSGPPQFFL FYSSYSKQL

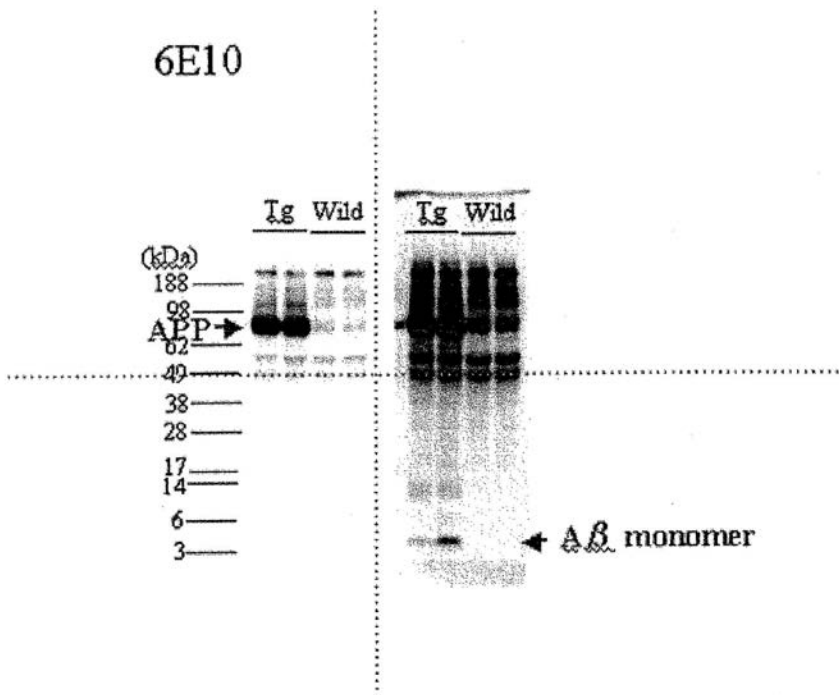
=====CDR2=====
70      80      90      100     110     120
GPGVPSRFSG SKDTSANAAI LLISGLQSED EADYYCSIFE SNAYVGGGT KLTVLG

```

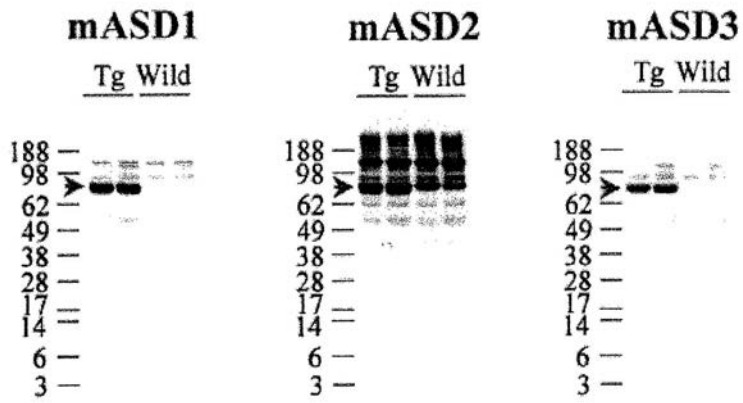
【 図 1 4 】

```
====CDR1====          ==CDR2==  
10      20      30      40      50      60  
QAVLTQPASL SASPGASASL TCTLRSGLSV GGNIIYWYGG KPGSPPYLL RYSSYSNKQL  
  
==          ==CDR3==  
70      80      90      100     110     120  
GPGVPSRFSG SKDASANAGI LLISGLQSED EADYYCSIHE SNAYVFGGT KLTVLG
```

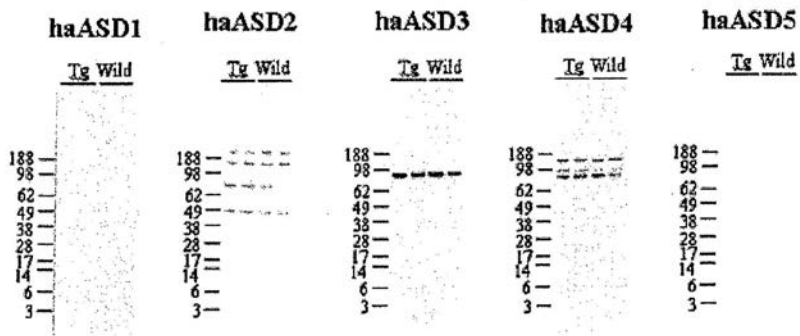
【 図 5 】



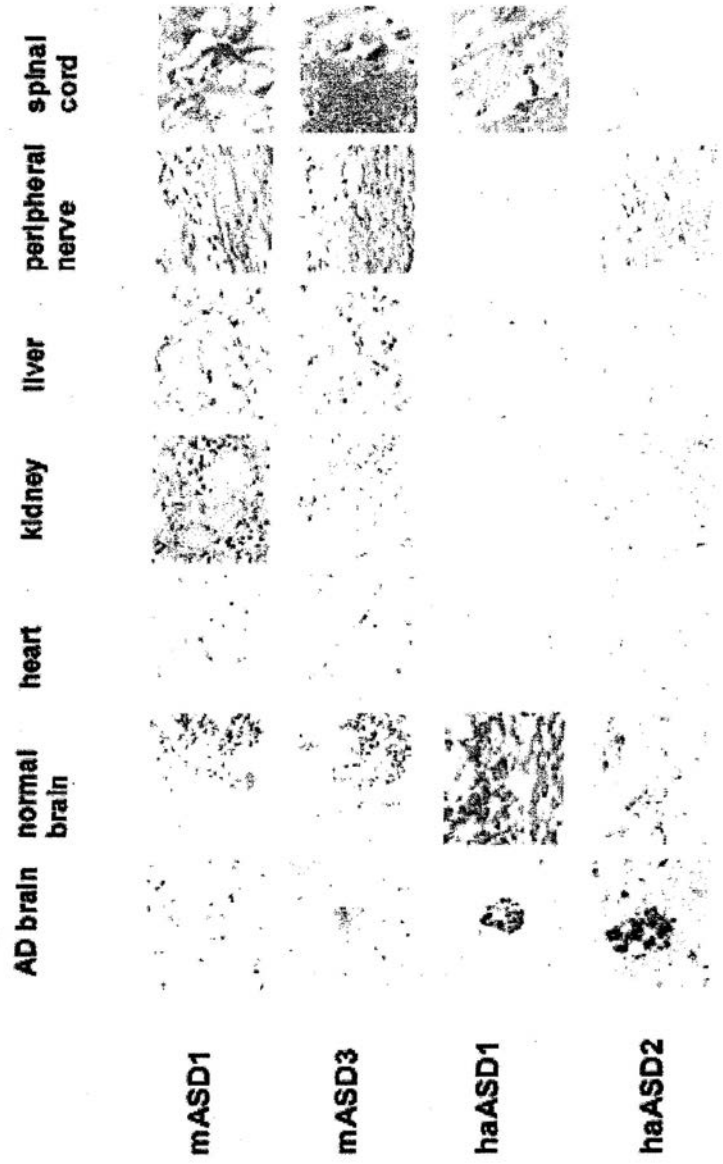
【 図 6 】



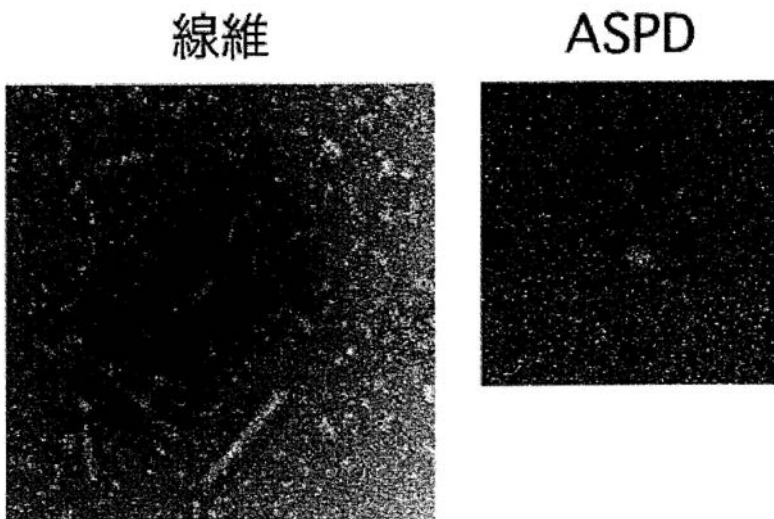
【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】



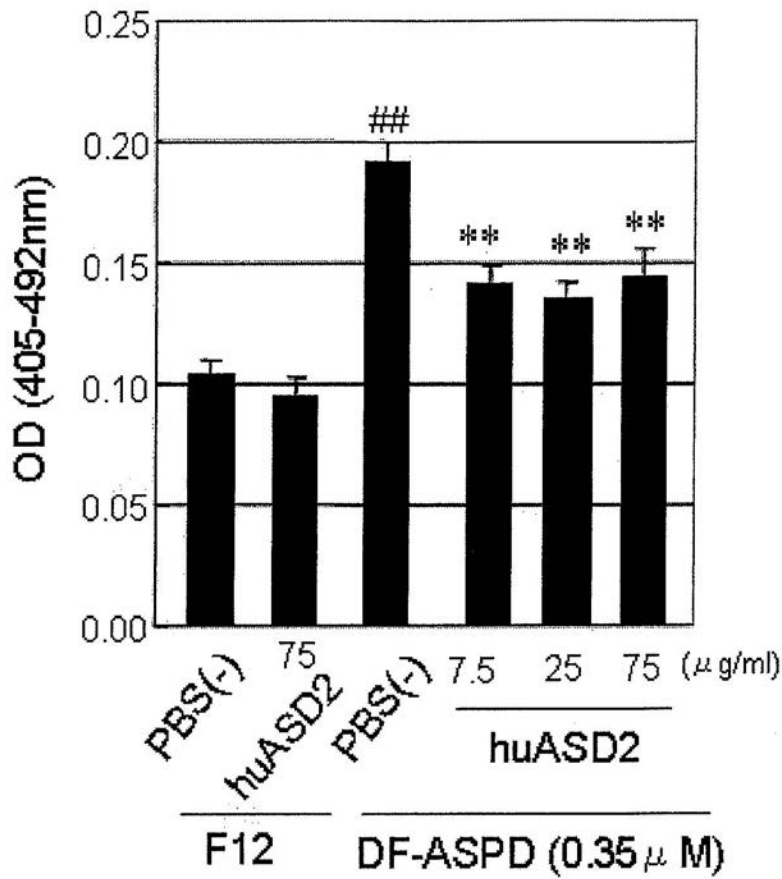
A. 重鎖可変領域

	CDR1	CDR2	CDR3
ASD2RHA	EVQLVESGGGLYKPGGSLRLSCAASGFTTSDYEMISWYRDAPGKGLEHWGGIEIKSYEATYFEGSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTFRREVGGLDNWGGGTLVTVSS		
ASD2RHB	EVQLVESGGGLYKPGGSLRLSCAASGFTTSDYEMISWYRDAPGKGLEHWAGIEIKSYEATYFEGSVKGRFTISRDDSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCTFRREVGGLDNWGGGTLVTVSS		
ASD2RHC	※ASD2RHA と同じ		

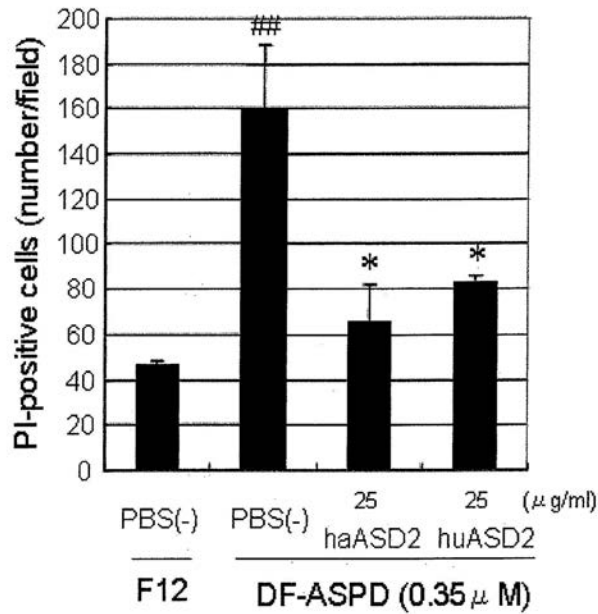
B. 軽鎖可変領域

	CDR1	CDR2	CDR3
ASD2RLA	QSVLTQPS-LSASPGASASLTCTLRSGISVGGKNIWYQKPGSPQYLLKFSYISNKGIGFVPSRFSGSKDASANAGILLISGLQSEDEADYYCSIHESNAYYFGGGKLTVLG		
ASD2RLB	QSVLTQPS-LSASPGASASLTCTLRSGISVGGKNIWYQKPGSPQYLLKFSYISNKGIGFVPSRFSGSKDASANAAILLISGLQSEDEADYYCSIHESNAYYFGGGKLTVLG		
ASD2RLC	QAVLTQPAS-LSASPGASASLTCTLRSGISVGGKNIWYQKPGSPQYLLRFSYISNKGIGFVPSRFSGSKDASANAGILLISGLQSEDEADYYCSIHESNAYYFGGGKLTVLG		

【 図 1 6 】



【 図 1 7 】



Data are means ± SEM (n=3).  
##: p<0.01 vs. F12/PBS(-)-group (student's t-test)  
\*: p<0.05 vs. DF-ASPD/PBS(-)-group (student's t-test)

【 配 列 表 】

2013135667000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成25年1月9日(2013.1.9)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

アミロスフェロイドに対する反応性が、アミロイド前駆蛋白質に対する反応性よりも高く、かつ以下の何れか1以上の特徴を有する、ハムスター由来の抗体又は該ハムスター由来の抗体をヒト型としたヒト化抗体である、抗アミロスフェロイドモノクローナル抗体。

(i) アミロスフェロイドに対する反応性が、アミロイド線維に対する反応性よりも高い；

(ii) アミロスフェロイドに対する反応性が、アミロイドモノマー蛋白質に対する反応性よりも高い；

(iii) アミロスフェロイドによる神経細胞死誘導に対する阻害活性を有する。

【請求項2】

sAPP に対する反応性が、IC<sub>50</sub> 100 nMである、請求項1記載の抗体。

【請求項3】

アミロスフェロイドへの反応性がアミロイド前駆体蛋白質への反応性の10～20倍である、請求項1又は2に記載の抗体。

【請求項4】

抗体のアミロスフェロイド及びアミロイド線維に対する反応性を同一抗体濃度及び抗体量並びに同一の抗原蛋白質濃度及び抗原蛋白質量を用いて比較する系において、抗体のアミロスフェロイドに対する反応性がアミロイド線維に対する反応性の3倍以上である、請求項1から3のいずれかに記載の抗体。

【請求項5】

抗体のアミロスフェロイド及びアミロイドモノマー蛋白質に対する反応性を同一の抗体濃度及び抗体量並びに同一の抗原蛋白質濃度及び抗原蛋白質量を用いて比較する系において、抗体のアミロスフェロイドに対する反応性がアミロイドモノマー蛋白質に対する反応性の50倍以上である、請求項1から4のいずれかに記載の抗体。

【請求項6】

アミロスフェロイドに対する解離定数が $10^{-9}$ 以下である、請求項1から5のいずれかに記載の抗体。

【請求項7】

ヒト正常組織への有意な交叉反応性を示すことなく、アルツハイマー病脳に特異的に反応する、請求項1から6のいずれかに記載の抗体。

【請求項8】

アミロスフェロイドの立体構造特異的なエピトープを認識する、請求項1から7のいずれかに記載の抗体。

【請求項9】

被験物質と請求項1から8のいずれかに記載の抗体とをアミロスフェロイドに接触させ、被験物質のアミロスフェロイドへの結合性を指標として候補物質を選択することを含む、アルツハイマー病の治療及び/又は予防薬のスクリーニング方法。

【請求項10】

アルツハイマー病の疑いのある個体から取得した生体試料を請求項1から8のいずれかに記載の抗体と接触させ、該サンプル中の該抗体と反応する物質の有無を測定することを含む、アルツハイマー病個体の検出方法。

## 【請求項 1 1】

請求項 1 から 8 のいずれかに記載の抗体を含む、神経細胞保護剤。

## 【請求項 1 2】

請求項 1 から 8 のいずれかに記載の抗体を含む、アルツハイマー病の検出のための試薬。

## 【請求項 1 3】

請求項 1 から 8 のいずれかに記載の抗体を含む、医薬。

## 【請求項 1 4】

請求項 1 から 8 のいずれかに記載の抗体を含む、アルツハイマー病の治療及び/または予防薬。

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード(参考)
<b>G 0 1 N 33/53</b>	<b>(2006.01)</b>	G 0 1 N	33/53	D	4 H 0 4 5
<b>G 0 1 N 33/50</b>	<b>(2006.01)</b>	G 0 1 N	33/53	N	
<b>A 6 1 K 39/395</b>	<b>(2006.01)</b>	G 0 1 N	33/50	Z	
<b>A 6 1 P 25/28</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K	39/395	N	
<b>C 1 2 P 21/08</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P	25/28		
		C 1 2 P	21/08		

(72)発明者 内藤 幸嗣  
大阪府大阪市中央区北浜二丁目6番18号 田辺三菱製薬株式会社内

(72)発明者 保理江 智  
大阪府大阪市中央区北浜二丁目6番18号 田辺三菱製薬株式会社内

(72)発明者 野田 宗宏  
大阪府大阪市中央区北浜二丁目6番18号 田辺三菱製薬株式会社内

(72)発明者 堀井 肇  
大阪府大阪市中央区北浜二丁目6番18号 田辺三菱製薬株式会社内

Fターム(参考) 2G045 AA25 BB20 BB24 CA26 CB01 DA36 DA37 FA16 FB03  
4B024 AA01 BA44 CA01 EA04 HA15  
4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA01  
4B065 AA92X AA92Y AB05 AC14 BA08 CA25 CA44  
4C085 AA14 BB11 DD62 DD63 EE01  
4H045 AA11 AA20 AA30 CA40 DA76 EA21 EA28 FA74

专利名称(译)	抗体及其用途		
公开(公告)号	<a href="#">JP2013135667A</a>	公开(公告)日	2013-07-11
申请号	JP2012270745	申请日	2012-12-11
[标]申请(专利权)人(译)	道健康生活醫藥株式會社		
申请(专利权)人(译)	陶健康生活制药有限公司		
[标]发明人	星美奈子 佐藤道夫 井手野祥次 内藤幸嗣 保理江智 野田宗宏 堀井肇		
发明人	星美奈子 佐藤道夫 井手野祥次 内藤幸嗣 保理江智 野田宗宏 堀井肇		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/18 C12N15/02 C12N5/10 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/50 A61K39/395 A61P25/28 C12P21/08		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P25/28 C07K16/18 C07K2317/24 C07K2317/56 C07K2317/565 C07K2317/76 C07K2317/92 G01N33/6896 G01N2800/2821		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/18 C12N15/00.C C12N5/00.102 G01N33/15.Z G01N33/53.D G01N33/53.N G01N33/50.Z A61K39/395.N A61P25/28 C12P21/08 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N15/13 C12N5/20		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/BB20 2G045/BB24 2G045/CA26 2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/DA37 2G045/FA16 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/BA44 4B024/CA01 4B024/EA04 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B065/AA92X 4B065/AA92Y 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA44 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/DD62 4C085/DD63 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA21 4H045/EA28 4H045/FA74		
优先权	2007280187 2007-10-29 JP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明提供的抗体与淀粉样蛋白前体蛋白的反应性低，与淀粉样蛋白2原纤维或单体淀粉样蛋白2蛋白相比，与淀粉样蛋白球体的反应性更高。根据本发明，提供了一种抗体，其与淀粉样蛋白前体蛋白具有更高的与淀粉样蛋白球体的反应性，并且具有以下任何一种或多种性质：(i)与淀粉样蛋白2原纤维相比，淀粉样蛋白球体的活性更高；(ii)与淀粉样蛋白的单体淀粉样蛋白相比，与淀粉样蛋白球体的反应性更高；(iii)抑制由淀粉样蛋白球体诱导的神经细胞死亡的活性。

antibody	affinity, KD(nM)			
	42ASPD	42A $\beta$	40A $\beta$	fibril
mASD1	0.19	1.2	8.1	1.61
mASD3	0.036	1.0	2.6	0.35
haASD1	0.49	2.4	44.6	8.49
haASD2	0.022	0.97	7.6	0.87
6E10	18.3	17.2	37.3	1.33