

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2014 年 9 月 12 日(12.09.2014)



(10) 国際公開番号
WO 2014/136443 A1

- (51) 国際特許分類:
C07K 16/18 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01) *C12P 21/08* (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/001187
- (22) 国際出願日: 2014 年 3 月 4 日(04.03.2014)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2013-046216 2013 年 3 月 8 日(08.03.2013) JP
- (71) 出願人: パナソニックヘルスケア株式会社
(PANASONIC HEALTHCARE CO., LTD.) [JP/JP]; 〒
7910395 愛媛県東温市南方 2 1 3 1 番地 1 Ehime
(JP).
- (72) 発明者: 福原 崇臣(FUKUHARA, Takaomi). 曾我
部 誠司(SOGABE, Seiji).
- (74) 代理人: 鮫島 睦, 外(SAMEJIMA, Mutsumi et al.);
〒5300017 大阪府大阪市北区角田町 8 番 1 号梅
田阪急ビルオフィスタワー青山特許事務所
Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,

BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN,
IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH,
PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保
護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW,
MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシ
ア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ
(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR,
GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT,
NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

(54) Title: ANTI-A β 42 MONOCLONAL ANTIBODY

(54) 発明の名称: 抗 A β 4 2 モノクローナル抗体

(57) Abstract: The present invention provides a monoclonal antibody that reacts with an A β 42 peptide but not with an A β 43 peptide. The present invention additionally provides: a hybridoma for producing the antibody; an antibody fragment derived from the antibody; a method for manufacturing the antibody or antibody fragment; a kit including the antibody or the antibody fragment; a method for measuring A β 42 including usage of the antibody, antibody fragment, or kit; etc.

(57) 要約: 本発明は、A β 4 2 ペプチドに反応し、A β 4 3 ペプチドに反応しないモノクローナル抗体を提供する。また本発明は、前記抗体を産生するハイブリドーマ、前記抗体に由来する抗体断片、前記抗体または抗体断片の製造方法、前記抗体または抗体断片を含むキット、及び前記抗体、抗体断片またはキットの使用を含む A β 4 2 を測定する方法等も提供する。



WO 2014/136443 A1

明 細 書

発明の名称：抗 $A\beta 42$ モノクローナル抗体

技術分野

[0001] 本願は、2013年3月8日に出願された日本特許出願2013-046216号の優先権を主張するものであり、その明細書、特許請求の範囲、図面及び要約書の全内容をここに引用し、本発明の明細書の開示として、取り入れるものである。

[0002] 本発明は、 $A\beta 42$ ペプチドに特異的に反応するモノクローナル抗体、当該モノクローナル抗体を産生し得るハイブリドーマ、及び、当該モノクローナル抗体を含むキットに関する。

背景技術

[0003] アルツハイマー病（以下「AD」ともいう）は、初老期から老年期に起こる進行性の認知症を特徴とする疾患であり、現在、国内の患者数は100万人以上と言われている。今後、人口の高齢化に伴いその数は確実に増加すると予想される。

[0004] 早期にアルツハイマー病を診断するために、血液や髄液などの体液中に存在する β アミロイド（以下 $A\beta$ ともいう）ペプチドを検出する方法が知られている。 $A\beta$ ペプチドとは、40～43個のアミノ酸からなるペプチドであり、アルツハイマー病では $A\beta$ ペプチドが凝集してアミロイドとなって、脳内に沈着することが知られている。

[0005] $A\beta$ ペプチドの中でも、42個のアミノ酸からなるペプチドである $A\beta 42$ ペプチドはアルツハイマー病の因子マーカーと言われている。

[0006] 一方、 $A\beta$ ペプチドの凝集体である脳内老人斑を免疫組織学検査に付すると、43個のアミノ酸からなるペプチドである $A\beta 43$ ペプチドが脳内老人斑の中心に局在していることが最近の研究で明らかにされている（非特許文献1を参照）。

[0007] これらより、 $A\beta 42$ ペプチドと $A\beta 43$ ペプチドは異なる機能を有する

と考えられる。

[0008] $A\beta$ ペプチドに反応するモノクローナル抗体はすでに知られており（例えば特許文献1を参照）、このようなモノクローナル抗体を含む $A\beta$ ペプチド検出キットがすでに市販されている。

[0009] 最近になって、AD患者の剖検組織を用いた免疫組織化学染色により、 $A\beta$ が、鼻粘膜などの脳以外の組織にも存在していることが示されている（非特許文献2を参照）。

先行技術文献

特許文献

[0010] 特許文献1：特許第4738696号公報

非特許文献

[0011] 非特許文献1：Saito T, et al, “Potent amyloidogenicity and pathogenicity of $A\beta$ 43”, Nature Neurosci., 2011年、p. 1023-1032

非特許文献2：Hock, et al, “Histological Markers in Nasal Mucosa of Patients with Alzheimer's Disease”, Eur Neuro l, 1998年、40：31-36

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0012] 以上のように、 $A\beta$ ペプチドの中でも $A\beta$ 42ペプチドと $A\beta$ 43ペプチドは異なる機能を有すると考えられることから、血液や髄液などの体液中に存在する $A\beta$ ペプチドを検出するにあたっては、 $A\beta$ 42ペプチドと $A\beta$ 43ペプチドを区別して検出できることが好ましいと考えられる。また、近年報告されているように、老人班の中心に局在する $A\beta$ 43よりも、老人班の総量を左右する $A\beta$ 42の方がADとの関連性が高いと考えられることから

も、 $A\beta 42$ を特異的に検出できることが望まれる。しかしながら、従来知られている抗原 $A\beta$ ペプチドに反応するモノクローナル抗体は、 $A\beta 42$ ペプチドと $A\beta 43$ ペプチドの双方に反応するものであった。 $A\beta 43$ ペプチドには反応せず、アルツハイマー病の因子マーカーである $A\beta 42$ ペプチドに特異的に反応するモノクローナル抗体は従来知られていなかった。従って、本発明の解決課題は、 $A\beta 42$ ペプチドを $A\beta 43$ ペプチドと区別して検出するための抗体を提供することである。

課題を解決するための手段

[0013] 本発明者らは、鋭意研究を重ね、 $A\beta 43$ ペプチドには実質的に反応せず、 $A\beta 42$ ペプチドに特異的に反応するモノクローナル抗体を産生する特異なハイブリドーマを樹立することに成功し、本発明を完成するに至った。

[0014] すなわち、本発明は、以下のものを提供するものである：

(1) $A\beta 42$ ペプチドに反応し、 $A\beta 43$ ペプチドに反応しないモノクローナル抗体；

(2) 配列番号8で表されるアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域（CDR）1、配列番号9で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR2、配列番号10で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR3、及び、免疫グロブリン重鎖由来の重鎖フレームワーク配列から構成される重鎖可変領域；並びに

配列番号13で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1、配列番号14で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR2、配列番号15で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR3、及び、免疫グロブリン軽鎖由来の軽鎖フレームワーク配列から構成される軽鎖可変領域を含む、(1)に記載のモノクローナル抗体；

(3) 配列番号7で表されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域および配列番号12で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む、(1)に記載のモノクローナル抗体；

(4) 受託番号がNITE P-1463であるハイブリドーマにより産

生される、(1)に記載のモノクローナル抗体；

(5) 受託番号がN I T E P-1463であるハイブリドーマ；

(6) キメラモノクローナル抗体である、(1)または(2)に記載のモノクローナル抗体；

(7) ヒト化モノクローナル抗体である、(1)または(2)に記載のモノクローナル抗体；

(8) (1)～(4)、(6)または(7)のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体に由来する抗体断片であって、F a b、F a b'、F (a b')₂、一本鎖抗体 (s c F v)、二量体化V領域 (d i a b o d y)、ジスルフィド安定化V領域 (d s F v) 及びC D Rを含むペプチドから選ばれる、抗体断片；

(9) 受託番号がN I T E P-1463であるハイブリドーマを培養することを含む、(1)～(4)のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体または(8)に記載の抗体断片の製造方法；

(10) (1)～(4)、(6)または(7)のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体または(8)に記載の抗体断片を含む、A β 4 2 検出又は測定キット；

(11) E L I S Aキットである、(10)に記載のキット；

(12) 鼻から採取された検体中のA β 4 2を検出又は測定するための、(10)または(11)に記載のキット；

(13) (1)～(4)、(6)または(7)のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体、(8)に記載の抗体断片または(10)または(11)に記載のキットの使用を含む、検体中のA β 4 2を検出又は測定する方法；
および

(14) 検体が鼻から採取される、(13)に記載の方法。

発明の効果

[0015] 本発明により提供されるモノクローナル抗体は、A β 4 3 ペプチドには実質的に反応せず、A β 4 2 ペプチドに特異的に反応するので、アルツハイマ

一病の因子マーカーである $A\beta 42$ ペプチドを特異的に検出することができる。本発明のモノクローナル抗体または該抗体を含む $A\beta$ 検出キットを用いれば、従来の抗体または検出キットでは不可能であった $A\beta 42$ ペプチドの特異的な検出又は測定が可能となるので、極めて有用性が高い。

図面の簡単な説明

[0016] [図1]本発明のモノクローナル抗体 6C10H3 と市販の抗 $A\beta$ 抗体が示す $A\beta 40$ ペプチドに対する反応性を示すグラフである。

[図2]本発明のモノクローナル抗体 6C10H3 と市販の抗 $A\beta$ 抗体が示す $A\beta 42$ ペプチドに対する反応性を示すグラフである。

[図3]本発明のモノクローナル抗体 6C10H3 と市販の抗 $A\beta$ 抗体が示す $A\beta 43$ ペプチドに対する反応性を示すグラフである。

[図4]本発明のモノクローナル抗体 6C10H3 と別の市販の抗 $A\beta$ 抗体が示す $A\beta 42$ ペプチドに対する反応性を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0017] 一つの態様において、本発明は、 $A\beta 42$ ペプチドに反応し、 $A\beta 43$ ペプチドに反応しないモノクローナル抗体に関する。

[0018] 一実施形態では、本発明は：

配列番号 8 で表されるアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域 (CDR 1)、配列番号 9 で表されるアミノ酸配列からなる重鎖 CDR 2、配列番号 10 で表されるアミノ酸配列からなる重鎖 CDR 3、及び、免疫グロブリン重鎖由来の重鎖フレームワーク配列から構成される重鎖可変領域；並びに

配列番号 13 で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR 1、配列番号 14 で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR 2、配列番号 15 で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR 3、及び、免疫グロブリン軽鎖由来の軽鎖フレームワーク配列から構成される軽鎖可変領域を含む、モノクローナル抗体に関する。

[0019] さらに、本発明のモノクローナル抗体には、 $A\beta 42$ ペプチドに反応し、 $A\beta 43$ ペプチドに反応しないモノクローナル抗体である限り、配列番号 8

で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR配列、配列番号9で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR配列、および配列番号10で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR配列からなる群から選択される少なくとも1つの重鎖CDR配列を含む抗体も含まれる。また、A β 42ペプチドに反応し、A β 43ペプチドに反応しないモノクローナル抗体である限り、配列番号13で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR配列、配列番号14で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR配列、および配列番号15で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR配列からなる群から選択される少なくとも1つの軽鎖CDR配列を含む抗体も含まれる。

[0020] またさらに、本発明のモノクローナル抗体には、A β 42ペプチドに反応し、A β 43ペプチドに反応しないモノクローナル抗体である限り、配列番号8で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR配列、配列番号9で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR配列、および配列番号10で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR配列からなる群から選択される少なくとも1つの重鎖CDR配列を含み、かつ配列番号13で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR配列、配列番号14で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR配列、および配列番号15で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR配列からなる群から選択される少なくとも1つの軽鎖CDR配列を含む抗体も含まれる。

[0021] 本発明のモノクローナル抗体には、A β 42ペプチドに反応し、A β 43ペプチドに反応しないモノクローナル抗体である限り、上述した本発明のモノクローナル抗体のCDR（重鎖CDR1～3および軽鎖CDR1～3）のアミノ酸配列のそれぞれと、例えば少なくとも60%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、または93%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するCDR配列を含む抗体も含まれる。

[0022] また、本発明のモノクローナル抗体には、A β 42ペプチドに反応し、A β 43ペプチドに反応しないモノクローナル抗体である限り、上述した本発

明のモノクローナル抗体のCDR（重鎖CDR 1～3および軽鎖CDR 1～3）のアミノ酸配列のそれぞれについて、1個または数個、例えば、2または3個のアミノ酸が置換、欠失もしくは付加されたアミノ酸配列を有するCDR配列を含む抗体も含まれる。

[0023] 本発明において、「ペプチドに反応しない」または「ペプチドに実質的に反応しない」とは、ペプチドに対する抗体および／または抗体断片の反応性を確認する試験において、反応性を示す結果が得られないこと、あるいは結果が検出限界以下であることを意味する。そのような試験とは、例えば、以下の実施例2に記載するような試験である。

[0024] 本明細書で用いる場合、「配列同一性」とは、二以上の配列（塩基配列又はアミノ酸配列）が、配列の一致度が最大となるように、ギャップおよび挿入を考慮してアラインメントされる場合の、二以上の配列における対応する位置での同一の塩基又はアミノ酸のパーセンテージを意味する。同一性を決定する方法は、アラインメントされる配列間に最大の一致度を与えるように設計される。二つの配列間の同一性を決定する方法は、限定するものではないが、BLASTP、BLASTN、FASTA等が挙げられる。また、DNASIS（日立ソフトウェアエンジニアリング（株）製）、GENETYX（（株）ジェネティクス製）を用いて決定することもできる。あるいは、短鎖ペプチドであれば、単純に配列を比較して決定することもできる。当業者であれば、上述のような方法で、配列間の同一性を決定することができる。

[0025] 本発明はまた、上述した本発明のモノクローナル抗体のCDR（重鎖CDR 1～3および軽鎖CDR 1～3）のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドに関する。当業者であれば、当技術分野で公知の技術を用いて、かかるポリヌクレオチドの配列を決定し、作製することができる。

[0026] 好ましい実施形態において、本発明のモノクローナル抗体は、受託番号がNITE P-1463であるハイブリドーマにより産生される、モノクローナル抗体である。

[0027] 従って、他の態様において、本発明は、本発明のモノクローナル抗体を産生する、ハイブリドーマに関する。当該ハイブリドーマは、2012年11月8日に寄託機関（千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8、日本、に住所を有する、独立行政法人製品評価技術基盤機構（NITE）、特許微生物寄託センター（NPMD））に寄託され、受託番号はNITE P-1463である。当該ハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体は、A β 40ペプチド及びA β 43ペプチドに反応せず、A β 42ペプチドにのみ反応する。そのため、A β の中でも、A β 42ペプチドを特異的に検出することができ、極めて有用である。また、当該ハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体は、市販の抗A β 抗体と比較して、A β 42ペプチドに対する反応性が高いという優れた特性を示す。さらに、脳由来検体中のA β 42ペプチドよりも、鼻由来検体中のA β 42ペプチドに対する反応性が高いという特性を示す。

[0028] 本発明のハイブリドーマの製造方法（免疫方法及び選択採取方法）は特に限定されない。抗原としてA β 42ペプチド又はその一部分を使用して、ハイブリドーマの通常の製造方法により製造することができる。すなわち、抗原をラット等の免疫動物に注射し、それに対する抗体の産生に関するリンパ細胞を取り出し、これをミエローマと混合して細胞融合させ、これをHAT培地上で培養することにより、本発明のハイブリドーマを製造することができる。

[0029] 抗原としてA β 42ペプチドの一部を使用する場合には、特に、A β 42ペプチドのC末端を含むアミノ酸配列を使用することが好ましい。A β 40ペプチド（配列番号16）、A β 42ペプチド（配列番号17）、及びA β 43ペプチド（配列番号18）はそれぞれC末端のアミノ酸配列が異なるため、A β 42ペプチドのC末端を含むアミノ酸配列を使用することで、A β 42ペプチドに特異的に反応するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを取得することが可能となる。後述する実施例では、A β 42ペプチドのアミノ酸配列のうちC末端側の33位から42位のアミノ酸配列を含むア

ミノ酸配列を抗原ペプチドとして使用した。

[0030] 本発明のハイブリドーマの製造を確認する手法としては、当該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、例えば一般的な標識タンパク質により標識した上で、 $A\beta 42$ ペプチド、及び $A\beta 43$ ペプチドそれぞれに対する反応性を測定すればよい。これと、従来公知の抗 $A\beta$ 抗体が示す、 $A\beta 42$ ペプチド、及び $A\beta 43$ ペプチドそれぞれに対する反応性とを比較することで、 $A\beta 42$ ペプチドに特異的に反応するモノクローナル抗体を確認することができる。

[0031] 本発明者らが、本発明のハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体のアミノ酸配列を決定したところ、超可変領域である相補性決定領域（CDR）を同定することに成功した。モノクローナル抗体の重鎖の可変領域に含まれる3つのCDRは、配列番号8～10で表されるアミノ酸配列を有する。これに対し、モノクローナル抗体の軽鎖の可変領域に含まれる3つのCDRは、配列番号13～15で表されるアミノ酸配列で表されるアミノ酸配列を有する。

[0032] 配列番号8～10で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDRを、免疫グロブリン重鎖由来の重鎖フレームワーク配列に組み込んで重鎖可変領域を構成し、かつ、配列番号13～15で表されるアミノ酸配列で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDRを、免疫グロブリン軽鎖由来の軽鎖フレームワーク配列に組み込んで軽鎖可変領域を構成することで、抗体を作製することができる。このような抗体の作製方法については従来公知の方法を採用することができる。

[0033] 別の態様において、本発明は、上述した本発明のモノクローナル抗体のCDR配列を有する、キメラモノクローナル抗体またはヒト化モノクローナル抗体に関する。キメラ抗体は、典型的には、ある生物種に由来する抗体の可変領域と、異種の生物種に由来する抗体の定常領域とを連結したものであり、遺伝子組換え技術によって容易に構築できる。キメラ抗体を作製する方法は、当技術分野で公知である。例えば、” Roguska et al. ,

Proc Natl Acad Sci U S A, 1994 Feb 1; 91 (3) : 969-973.”に記載の方法により作製できる。ヒト化抗体は、典型的には、非ヒト種由来の一以上のCDR、ヒト免疫グロブリン由来のフレームワーク領域（FR）、及びヒト免疫グロブリン由来の定常領域を有する抗体である。ヒト化抗体を作製する方法は、当技術分野で公知である。例えば、ヒト化抗体は、重鎖フレームワーク配列及び軽鎖フレームワーク配列として、ヒト重鎖フレームワーク配列及びヒト軽鎖フレームワーク配列を適用することで、作製することができる。Almagro et al., Front Biosci. 2008 Jan 1; 13 : 1619-1633. 等を参照のこと。

[0034] CDRの定義およびその位置を決定する方法としては、例えばKabatの定義（Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)）、又はChothiaの定義（Chothia et al., J. Mol. Biol., 1987; 196: 901-917）を採用してもよい。また、場合によっては、Kabatの定義とChothiaの定義の両方を考慮して決定してもよく、例えば、各々の定義によるCDRの重複部分を、又は各々の定義によるCDRの両方を含んだ部分をCDRとすることもできる。そのような方法の例としては、Kabatの定義とChothiaの定義の折衷案である、Oxford Molecular's AbM antibody modeling softwareを用いたMartinらの方法（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989; 86: 9268-9272）がある。特に明記しない限り、本明細書におけるCDRの定義およびその位置の決定には、Kabatの定義が採用される。

[0035] さらに別の態様において、本発明は、上述した本発明の抗体に由来する抗

体断片に関する。「本発明の抗体に由来する抗体断片」とは、本発明の抗体の一部分（部分断片）又は本発明の抗体の一部分を含むペプチドであって、本発明の抗体の抗原への作用を保持するものである。このような抗体断片には、F a b、F a b'、F (a b')₂、一本鎖抗体 (s c F v)、二量体化 V 領域 (d i a b o d y)、ジスルフィド安定化 V 領域 (d s F v)、及び本発明のモノクローナル抗体に含まれる C D R を含むペプチドが挙げられるが、これらに限定されない。

[0036] F a b は、免疫グロブリンタンパク質をパパインで処理して得られる断片のうち、H鎖のN末端側約半分とL鎖全体がジスルフィド結合で結合した、抗原結合活性を有する抗体断片である。従って、本発明の F a b は、本発明のモノクローナル抗体をパパインで処理して得ることができる。また、本発明のモノクローナル抗体の F a b をコードする D N A を原核生物用発現ベクター又は真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物又は真核生物へ導入することにより発現させ、F a b を製造することもできる。

[0037] F (a b')₂ は、免疫グロブリンタンパク質のヒンジ領域のジスルフィド結合の下部をペプシンで処理して得られる、2つの F a b 領域がヒンジ部分で結合して構成された、抗原結合活性を有する断片である。従って、本発明の F (a b')₂ は、本発明のモノクローナル抗体をペプシンで処理して得ることができる。また、後述する F a b' をチオエーテル結合又はジスルフィド結合させ、作製することもできる。

[0038] F a b' は、上述の F (a b')₂ のヒンジ領域のジスルフィド結合を切断して得られる、抗原結合活性を有する抗体断片である。従って、本発明の F a b' は、本発明の F (a b')₂ をジチオスレイトールなどの還元剤で処理して得ることができる。また、本発明のモノクローナル抗体の F a b' 断片をコードする D N A を原核生物用発現ベクター又は真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物又は真核生物へ導入することにより発現させ、F a b' を製造することもできる。

[0039] 一本鎖抗体 (s c F v) は、1本の重鎖可変領域 (V H) と1本の軽鎖可

変領域（V_L）とを適当なペプチドリンカーを用いて連結したポリペプチドであって、抗原結合活性を有する抗体断片である。本発明のs c F vは、本発明のモノクローナル抗体のV_H及びV_Lをコードするc D N Aを取得し、s c F vをコードするD N Aを構築し、該D N Aを原核生物用発現ベクター又は真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物又は真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。

[0040] 二量体化V領域（d i a b o d y）は、上述のs c F vが二量体化した抗体断片であって、二価の抗原結合活性を有する抗体断片である。二価の抗原結合活性は、同一であってもよく、異なってもよい。本発明の二量体化V領域は、本発明のモノクローナル抗体のV_H及びV_Lをコードするc D N Aを取得し、s c F vをコードするD N Aを、適切な短いペプチドリンカーを含むように構築し、該D N Aを原核生物用発現ベクター又は真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物又は真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。

[0041] ジスルフィド安定化V領域（d s F v）は、V_H及びV_L中のそれぞれ1アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドを該システイン残基間のジスルフィド結合を介して結合させたものをいう。システイン残基に置換するアミノ酸残基は既知の方法（例えば、P r o t e i n E n g i n e e r i n g、7、697（1994））に従って、抗体の立体構造予測に基づいて選択することができる。本発明のd s F vは、本発明のモノクローナル抗体のV_H及びV_Lをコードするc D N Aを取得し、d s F vをコードするD N Aを構築し、該D N Aを原核生物用発現ベクター又は真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物又は真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。

[0042] C D Rを含むペプチドは、V_H又はV_LのC D R配列の少なくとも1領域以上を含んで構成される。複数のC D Rを含むペプチドは、直接又は適当なペプチドリンカーを介して結合させることができる。本発明のC D Rを含むペプチドは、本発明のモノクローナル抗体のV_H及びV_LのC D Rをコード

するDNAを構築し、該DNAを原核生物用発現ベクター又は真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物又は真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。また、CDRを含むペプチドは、Fmoc法、又はtBoc法などの化学合成法によって製造することもできる。

[0043] 本発明のモノクローナル抗体には、本発明のモノクローナル抗体又はその抗体断片に放射性同位元素、低分子薬剤、高分子薬剤、タンパク質などを化学的又は遺伝子工学的に結合させた、抗体の誘導体が含まれる。抗体の誘導体を、後述するA β 42検出又は測定キットにおける検出用又は測定用試薬として使用する場合には、本発明のモノクローナル抗体又はその抗体断片に結合する薬剤として、通常の免疫学的検出又は測定法で用いられる標識体、例えば、アルカリフォスファターゼ、ペルオキシダーゼもしくはルシフェラーゼ等、が挙げられる。

[0044] 他の態様において、本願発明は、受託番号がNITE P-1463であるハイブリドーマを培養することを含む、本発明の抗体または抗体断片の製造方法に関する。ハイブリドーマの培養は、従来公知の方法を採用することができる。

[0045] また別の態様において、本発明は、上述した本発明の抗体または抗体断片を含む、A β 42検出又は測定キットに関する。本発明のA β 42検出キットは、本発明の抗体または抗体断片以外に、緩衝液、希釈液、洗浄液、二次抗体溶液、検出された測定値の濃度回帰に必要な検量線試薬、プレート、使用説明書、検体採取器具、検体採取用のチューブ等を含むことができる。また、本発明のキットが発色反応によりA β 42ペプチドを検出する系の場合、本発明のキットは、さらに、発色液、発色停止液等を含むことができる。本発明のキットが蛍光または発色によりA β 42ペプチドを検出する系の場合、発色液、発色停止液を含む必要はない。好ましい実施形態では、本発明のキットはELISAキットである。

[0046] さらに別の態様において、本発明は、上述した本発明の抗体、抗体断片ま

たはキットの使用を含む、検体中の $A\beta 42$ を検出又は測定する方法に関する。

[0047] 本発明において、「検体」は、動物、好ましくはほ乳類、より好ましくは霊長類、さらに好ましくはヒト、特に好ましくはADを患っている可能性があるヒト、AD型の軽度認知障害を患っているヒトもしくはAD患者から採取される。検体を採取する部位は、AD患者において $A\beta 42$ が存在すると知られている部位であれば、特に限定されない。従って、検体とは、例えば、脳脊髄液、血液、鼻腔拭い液などの鼻（例えば鼻粘膜）からの採取物、口腔拭い液などの口腔（例えば口腔粘膜）からの採取物等である。これらの検体は、溶解液、バッファーまたは希釈液などを用いて、本発明のキットまたは方法において用いるために適した状態へと調製されてもよい。

[0048] 好ましい実施形態では、本発明のキットまたは方法において用いられる検体は、鼻（例えば鼻粘膜）から採取される。さらに好ましい実施形態では、本発明のキットまたは方法において用いられる検体は、鼻腔拭い液である。

実施例

[0049] 以下に実施例を掲げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

[0050] （実施例1）ハイブリドーマの取得

以下の手順により、本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを取得した。

[0051] （1）抗原デザイン及びペプチド合成

抗原ペプチドとして、配列番号1で表されるアミノ酸配列のペプチドを合成した。このペプチドは、 $A\beta 42$ ペプチドのアミノ酸配列のうちC末端側の33位から42位のアミノ酸配列に対して、そのN末端にCysを付加したものである。Cysの付加は、キャリアタンパク質とのコンジュゲーションのためである。

[0052] （2）ペプチドコンジュゲーション

以下の内容で、前記（1）で合成した抗原ペプチドとキャリアタンパク

質のペプチドコンジュゲーションを行った。

- ・方法：MBS法

- ・キャリアタンパク質：KLH（免疫用）／BSA（ELISA用）

SDS-PAGEでのペプチド-BSA結合物のバンドシフトにより、ペプチドコンジュゲーションの完了を確認した。

[0053] (3) 免疫

以下の内容で免疫を実施した。

- ・抗原調製：ペプチド-KLH結合物とフロイントコンプリートアジュバントを体積比1：2で混合し、エマルジョンを作製した。

- ・抗原量：約170 μ g（キャリアタンパク質換算）

- ・免疫動物：ラット（WKY／Izm） 10週齢 雌1匹

- ・免疫箇所：foot pad／皮下注射

免疫後にラットの健康状態に問題がないことを確認した。

[0054] (4) 細胞融合

以下の内容で細胞融合を実施した。目視にて腸骨リンパ節の腫れが十分であることを確認した。

- ・方法：PEG法

- ・リンパ球採取組織：腸骨リンパ節

- ・リンパ球数：1.0 $\times$ 10⁸個

- ・ミエローマ：SP2（マウス）

- ・ハイブリドーマの培養：96ウェルプレート8枚に細胞を播種し、HAT選択培地にて培養した。

[0055] また、スクリーニング前日には、培養中の全ウェルの培地を除き、新たなHAT選択培地を加えた。本作業は培養液中に含まれる死滅したリンパ球由来の抗体を除去する目的で行った。

[0056] (5) 第一回ELISAスクリーニング

前記(4)により得られたハイブリドーマの培養上清を用い、以下に記載の実験条件にてELISAスクリーニングを実施し、A β 42ペプチドに対

しては反応性を示すが、 $A\beta 40$ ペプチドに対しては反応性を示さないウェルを選抜した。

[0057] (実験条件)

・プレート：costar 2797

・抗原：ペプチド-BSA結合物／10mM リン酸Naバッファー (pH 7.0)、濃度 $3\mu\text{g}/\text{mL}$ (キャリアタンパク質換算)、1ウェルあたり $50\mu\text{L}$ 、反応条件： 4°C ／一晩

・ブロッキング：1%BSA／PBS、1ウェルあたり $100\mu\text{L}$ 、反応条件：室温／30分

・1次抗体：培養上清／ブロッキング、希釈率20倍、1ウェルあたり $50\mu\text{L}$ 、反応条件：室温／60分

・2次抗体：a-Rat IgG (HRP標識)／ブロッキング (SIGMA社製、A57

95-1ML)、希釈率20000倍、1ウェルあたり $50\mu\text{L}$ 、反応条件：室温／30分

・発色：HRP／ H_2O_2 ／TMBZ 発色系

抗原である上記ペプチドとしては、 $A\beta 42$ ペプチド及び $A\beta 40$ ペプチドを使用した。なお、 $A\beta 40$ ペプチドはネガティブコントロールである。

[0058] スクリーニングの結果、800ウェル中、12個の陽性ウェルが得られた。

[0059] (6) ハイブリドーマのクローニング

前記12個の陽性ウェルからハイブリドーマをクローニングし、下記試験を実施した。

・限界希釈による細胞の播種

・ELISAによる反応性のチェック ($A\beta 42$ ペプチドに対して反応性を示し、 $A\beta 40$ ペプチドに対して反応性を示さないことを確認)

・ELISA陽性ウェルについて、顕微鏡観察によるシングルコロニー形成のチェック

以上の試験により、E L I S A陽性シングルクローンのハイブリドーマを1つ得た。当該ハイブリドーマの名称を、6 C 1 0 H 3とした。

[0060] (7) ハイブリドーマの寄託

前記ハイブリドーマを凍結保存し、独立行政法人製品評価技術基盤機構（N I T E）、特許微生物寄託センター（N P M D）に寄託した。受託番号はN I T E P - 1 4 6 3であり、寄託日は2 0 1 2年1 1月8日である。

[0061] (実施例2) モノクローナル抗体の特異性評価

(1) 標識抗体の作製

ハイブリドーマ6 C 1 0 H 3からモノクローナル抗体6 C 1 0 H 3を取得した。次いで、以下に示す手順でモノクローナル抗体6 C 1 0 H 3に対して標識を行い、標識抗体を得た。

[0062] 同仁化学研究所製のP e r o x i d a s e L a b e l i n g K i t - S Hのプロトコルに従って処理を実施した。すなわち、抗体2 0 0 μ gを含むサンプル溶液とキット付属のS o l u t i o n A 1 0 0 μ Lをキット付属のF i l t r a t i o n T u b uに加えた。ピペッティングにより軽く混合した後、8 0 0 0 $\times$ gで1 0分間遠心処理を行った。S o l u t i o n A 1 0 0 μ Lをキット付属のR e d u c i n g A g e n tに加え、ピペッティングにより溶解した。この溶液1 0 0 μ Lを、抗体が濃縮されているF i l t r a t i o n T u b eのメンブレン上に加え、ピペッティングにより抗体とよく混合した。3 7 $^{\circ}$ Cで3 0分間反応した後、キット付属のs o l u t i o n B 1 0 0 μ LをF i l t r a t i o n T u b eに加え、8 0 0 0 $\times$ gで1 0分間遠心処理を行った。ろ液を捨てた後、s o l u t i o n B 2 0 0 μ LをF i l t r a t i o n T u b eに加え、8 0 0 0 $\times$ gで1 0分間遠心処理を行った。R e a c t i o n b u f f e r 5 0 μ Lをキット付属のS H - R e a c t i v e P e r o x i d a s eに加え、ピペッティングにより溶解した。S H - R e a c t i v e P e r o x i d a s eを含む溶液を、還元抗体が濃縮されているF i l t r a t i o n T u b eのメンブレン上に加えた。ピペッティングによりメンブレン上

の抗体とよく混合した後、37℃で1時間反応させた。Solution A 100 μ LをFiltration Tubeに加えた。8000 $\times$ gで10分間遠心処理を行った。キット付属のStorage Buffer 200 μ Lを加えて、10回程度ピペティングし、標識抗体として回収した。

[0063] (2) 反応性の測定

標識抗体を1000倍に希釈し、以下の手順でA β 40ペプチド、A β 42ペプチド、及びA β 43ペプチドそれぞれに対する反応性を測定した。比較例として、市販のA β 検出キット（和光純薬工業株式会社製）に含まれるモノクローナル抗体を用いて、同様に、各ペプチドに対する反応性を測定した。

[0064] 抗体（BNT77）固相化マイクロプレート（和光純薬工業株式会社製キット付属）の各ウェルに、A β 40ペプチド、A β 42ペプチド、A β 43ペプチド（それぞれペプチド研究所製）を、0、10、20、50、100、200、500、1000 pM添加し、37℃にて2時間反応させた（2セット準備した）。その後、洗浄処理を5回実施した。

[0065] その後、1セットには、HRP標識抗体（BC05）溶液（和光純薬工業株式会社製キット付属）を各ウェルに100 μ Lずつ添加した。別の1セットには、HRP標識抗体（6C10H3）溶液を各ウェルに100 μ Lずつ添加した。添加後、室温下にて、攪拌しながら、5分間反応させた。洗浄処理を5回実施した後、100 μ LのTMB溶液を加えて室温暗所で30分間反応させた。

[0066] 100 μ Lの停止液を加え、マイクロプレートリーダーで450 nmと620 nmの吸光度を測定した。

[0067] 結果を図1～図3に示す。

[0068] 図1より、本発明のモノクローナル抗体6C10H3及び市販のモノクローナル抗体のいずれも、A β 40ペプチドに対して反応性を示さないこと、図2より、双方の抗体ともにA β 42ペプチドに対して反応性を示すことが

分かる。これらに対し、図3より、本発明のモノクローナル抗体6C10H3はA β 43ペプチドに対して反応性を示さないが、市販のモノクローナル抗体はA β 43ペプチドに対して反応性を示すことが分かる。

[0069] 以上より、市販のモノクローナル抗体はA β 42ペプチドとA β 43ペプチドの双方に反応性を示し、両ペプチドを識別できないのに対し、本発明のモノクローナル抗体6C10H3はA β 42ペプチドに対して反応性を示すものの、A β 43ペプチドに対しては反応性を示さないため、A β 42ペプチドに特異的な反応性を有し、A β 42ペプチドとA β 43ペプチドを識別できることが分かる。

[0070] (実施例3) モノクローナル抗体の認識能力評価

モノクローナル抗体6C10H3と、一般的に研究者の使用頻度の高い抗A β 抗体である1F115抗体(IBL社製)を使用して、A β 42ペプチドの認識能力を比較した。

[0071] (1) 事前準備

まず、ビオチン標識キット(SH標識、同仁堂社製)を使用し、4G8抗体のビオチン化を行った。

[0072] 次いで、HRP標識キット(SH標識、同仁堂社製)を使用し、6C10H3抗体及び1F115抗体(IBL社製)のHRP標識を行った。

[0073] また、A β 42ペプチド(Human、1-42、ペプチド研究所社製)を希釈し、濃度が0、5、10、20、50、100、200、又は500 pMのA β 42ペプチド溶液を得た。

[0074] (2) 評価方法

まず、ビオチン化した4G8抗体をストレプトアビジン標識プレートに固定した。次に、N101(日油社)を使用し、ブロッキングを行った後、1×PBSでプレートを洗浄した。

[0075] 次いで、調製したA β 42ペプチド溶液(0、5、10、20、50、100、200、500 pM)を100 μ Lずつ、プレートに添加し、室温で2時間、反応させた後、A β 42ペプチド溶液をプレートから除去した。洗

浄液を使用して、プレートの洗浄を各5回実施した。

[0076] 各プレートに、同濃度のHRP標識抗体（6C10H3抗体及び1F115抗体）のいずれかを添加し、反応を行った。その後、洗浄液を使用して、プレートの洗浄を各5回実施した（各5回）。

[0077] 次いで、HRP酵素用基質（SIGMA社製）を100 μ Lずつ添加し、室温で30分間、反応させた。その後、停止液（KPL社製）を添加し、波長450nm－620nmでの発色測定を実施した。

[0078] 図4では、2500倍に希釈したA β 42ペプチド溶液を用いた場合のHRP標識6C10H3抗体（黒色正方形）及びHRP標識1F115抗体（白色正方形）の発色値を示す。この図より、本発明の6C10H3抗体は、市販されている抗A β 抗体である1F115抗体よりも、A β 42ペプチドに対する反応性が優れていることが分かる。

[0079] （実施例4）モノクローナル抗体のCDR配列決定

以下の手順により本発明の6C10H3抗体の相補性決定領域（CDR）の配列を決定した。

[0080] （1）全RNA抽出手順

ハイブリドーマ6C10H3（約1 $\times$ 10⁷細胞）を用い、次に示す手順をこの順で行って全RNAを回収した。

・ホモジナイズ工程：TRIzol Reagent（Life technologies（Invitrogen）社製、No. 15596-026）1mLをピペティングで添加、室温で5分間処理。

・RNA抽出工程：クロロホルム0.2mLを添加、転倒混和、室温で3分間処理。その後、遠心分離（12000g、4℃、15分間）を行い、水層を回収。

・第一回洗浄工程：イソプロパノール0.5mLを添加、転倒混和、室温で10分間処理。その後、遠心分離（12000g、4℃、10分間）を行い、沈殿を回収（上清を吸引除去）。

・第2回洗浄工程：75%エタノール1mLを添加、転倒混和。その後、遠

心分離（12000g、4℃、5分間）を行い、沈殿を回収（上清を吸引除去）し、風乾。

・調整工程：Rnase free water 0.02mLを添加し、55℃で10分間処理。

[0081] (2) cDNA作製手順

前記(1)で回収した全RNAを用いて、以下の手順でcDNAを作製した。

・変性工程：全RNA 5μgを20μLに希釈。その後、65℃で10分間処理した後、急冷。その後、GE Healthcare社製のFirst-Strand cDNA合成キットから、Bulk first-strand reaction mixを11μL、DTT溶液を1μL、プライマー（Not Id (T) 18）を1μL添加。

・インキュベーション工程：37℃で1時間保持した。

[0082] (3) RT-PCR

前記(2)で得られたcDNAを用いてRT-PCRを行った。ここでは、重鎖プライマーとして、配列番号2及び3で表される配列のプライマーを、軽鎖プライマーとして、配列番号4及び5で表される配列のプライマーを使用した。

[0083] (4) 切り出し

前記RT-PCRで増幅されたバンドを、QIAGEN社製のゲル抽出キットを用いて切り出した後、Promega社製のpGEM-T Easy Vector System 1を用いてTAクローニングを行った。

[0084] (5) 配列決定

Life technologies (Invitrogen) 社製のBigDye (登録商標) Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kitから、pGEM-T Easy Vectorに特異的なプライマーを用いて配列決定を行った。

[0085] 結果、6C10H3抗体の重鎖は配列番号7で表されるアミノ酸配列から

なり、そのうち、重鎖CDRは配列番号8～10で表されるアミノ酸配列からなることが判明した。また、6C10H3抗体の軽鎖は配列番号12で表されるアミノ酸配列からなり、そのうち、軽鎖CDRは配列番号13～15で表されるアミノ酸配列からなることが判明した。配列番号6は、6C10H3抗体の重鎖をコードする塩基配列であり、配列番号11は、6C10H3抗体の軽鎖をコードする塩基配列である。

[0086] (実施例5) キメラ抗体の作製

以下の手順によりキメラ抗体を作製した。

[0087] (1) 抗体遺伝子CDR領域増幅

6C10H3抗体遺伝子（重鎖および軽鎖）を組み込んだpGEM-Tベクターを鋳型とし、以下のプライマーを用いてPCR法によりCDR領域を増幅した。ここでは、重鎖プライマーとして、配列番号19及び20で表される配列のプライマーを、軽鎖プライマーとして、配列番号21及び22で表される配列のプライマーを使用した。

[0088] (2) 制限酵素処理

上記PCR産物を、下記制限酵素を用いて切断した。

重鎖：A f l I I & N h e I

軽鎖：E c o R V & B s i W I

[0089] (3) キメラ抗体発現用ベクターへの組み込み

T4ライゲースを用いて、制限酵素で処理した各PCR産物を、同じ制限酵素で処理した下記ベクターに組み込んだ。なお、両ベクターともヒトIgG1遺伝子Fc領域がすでに組み込まれたものである。

重鎖：pCAGGSベクター

軽鎖：pCAGGSベクター

得られた6C10H3抗体由来重鎖CDRを含むベクターは、ラット由来重鎖可変領域（VH）およびヒト由来重鎖定常領域（CH1、CH2およびCH3）を含む。また、得られた6C10H3抗体由来軽鎖CDRを含むベクターは、ラット由来軽鎖可変領域（VL）およびヒト由来軽鎖定常領域（

CL)を含む。

[0090] (4) 配列確認

各ベクターに組み込んだモノクローナル抗体6C10H3由来CDR領域遺伝子配列をDNAシーケンサーにより確認した。

[0091] (5) キメラ抗体の発現

ヒト胎児腎細胞HEK293Tを宿主として用い、5mLスケールで培養を行った。培養は全て37℃、5%CO₂の条件下で行った。まず、6cmディッシュ1枚にHEK293T細胞を10% FBS含有DMEM中で培養した。80～90%コンフルエントになったところで、トランスフェクションを行った。トランスフェクションの際には事前に、DMEM(0% FBS) 293μLにプラスミド7.0μg(重鎖:3.5μg、軽鎖:3.5μg)を混ぜたものと、DMEM(0% FBS) 293μLに1mg/mLポリエチレンジアミン溶液10.6μLを混ぜたものをそれぞれ用意した。この2つの溶液を混合し、20分間静置後、2% FBS含有DMEM 3.5mLに加え、これをトランスフェクション溶液とした。細胞を播種したディッシュから培地を除いた後、ディッシュにトランスフェクション溶液を全量注ぎ、16時間培養した。FBSを含む培地を除き、PBSで洗浄した後、DMEM(0% FBS)を5mL注ぎ、さらに3日間培養した。培養上清を回収し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)と、抗ヒトFc抗体及び抗ヒト軽鎖抗体を用いたウェスタンブロッティングとによって発現を確認した。

[0092] (6) キメラ抗体の反応性の確認

ELISA法を用いて、上記で得られたキメラ抗体がAβ42ペプチドを認識することを確認した。

[0093] (実施例6) 異なる組織由来のAβ42に対する認識能力評価

鼻周辺組織から採取した検体及び脳から採取した検体を用い、異なる組織由来のAβ42に対するモノクローナル抗体6C10H3の認識能力を評価した。測定には、実施例2で作製した標識したモノクローナル抗体6C10

H3を用いた。比較例として、市販のA β 検出キット（和光純薬工業株式会社製）に含まれるモノクローナル抗体を用いた。

[0094] (1) 鼻周辺組織からの検体の採取

アルツハイマー病モデルマウスであるTg2576を脱血（0.01M PBS）し、眼球のくぼみの部分より鼻寄りで切断して、鼻骨を摘出した。この際、嗅球、表皮、筋肉等をできるかぎり除いた。得られた検体を細片化し、3倍量の2%SDSを加えてホモジナイズし、超音波処理を行った。次いで、得られた溶液を超遠心（100,000×rpm、1時間、4℃）にかけ、上清（SDS抽出上清）および沈殿物を回収した。得られた沈殿物に1mLの70%ギ酸を加え、超遠心（100,000×rpm、1時間、4℃）にかけ、上清を回収した（FA抽出上清）。

[0095] (2) 脳からの検体の採取

APPマウスを脱血（0.01M PBS）し、脳を摘出した。さらに、小脳と嗅球を切断し、嗅球を除く前脳半球を採取した。得られた検体を細片化し、3倍量の2%SDSを加えてホモジナイズし、超音波処理を行った。得られた溶液を超遠心（100,000×rpm、1時間、4℃）にかけ、上清（SDS抽出上清）および沈殿物を回収した。得られた沈殿物に1mLの70%ギ酸を加え、超遠心（100,000×rpm、1時間、4℃）にかけ、上清を回収した（FA抽出上清）。

[0096] (3) 反応性の測定

標識抗体を1000倍に希釈し、以下の手順で鼻周辺組織から採取した検体及び脳から採取した検体それぞれに対する反応性を測定した。比較例として、市販のA β 検出キット（ヒト β アミロイド（1-42）ELISAキットワコー、高感度品、和光純薬工業株式会社製）に含まれるモノクローナル抗体を用いて、同様に、各検体に対する反応性を測定した。

[0097] 抗体（BAN50）固相化マイクロプレート（和光純薬工業株式会社製キット付属）の各ウェルに、鼻周辺組織から採取した検体及び脳から採取した検体それぞれに由来するSDS抽出上清及びFA抽出上清を100 μ L添加

し、37℃にて2時間反応させた（2セット準備した）。その後、洗浄処理を5回実施した。

[0098] その後、1セットには、HRP標識抗体（BC05）溶液（和光純薬工業株式会社製キット付属）を各ウェルに100μLずつ添加した。別の1セットには、HRP標識抗体（6C10H3）溶液を各ウェルに100μLずつ添加した。添加後、室温下にて、攪拌しながら、5分間反応させた。洗浄処理を5回実施した後、100μLのTMB溶液を加えて室温暗所で30分間反応させた。

[0099] 100μLの停止液を加え、マイクロプレートリーダーで450nmと620nmの吸光度を測定した。

[0100] 上記の実験により、本発明のモノクローナル抗体6C10H3が、脳から採取した検体よりも鼻周辺組織から採取した検体に対する反応性が高いことが示された。一方、市販のモノクローナル抗体では、脳から採取した検体に対する反応性と鼻周辺組織から採取した検体に対する反応性に差が見られなかった。これより、本発明のモノクローナル抗体が、鼻組織に由来するAβ42に対して、より特異的に反応することが示された。

産業上の利用可能性

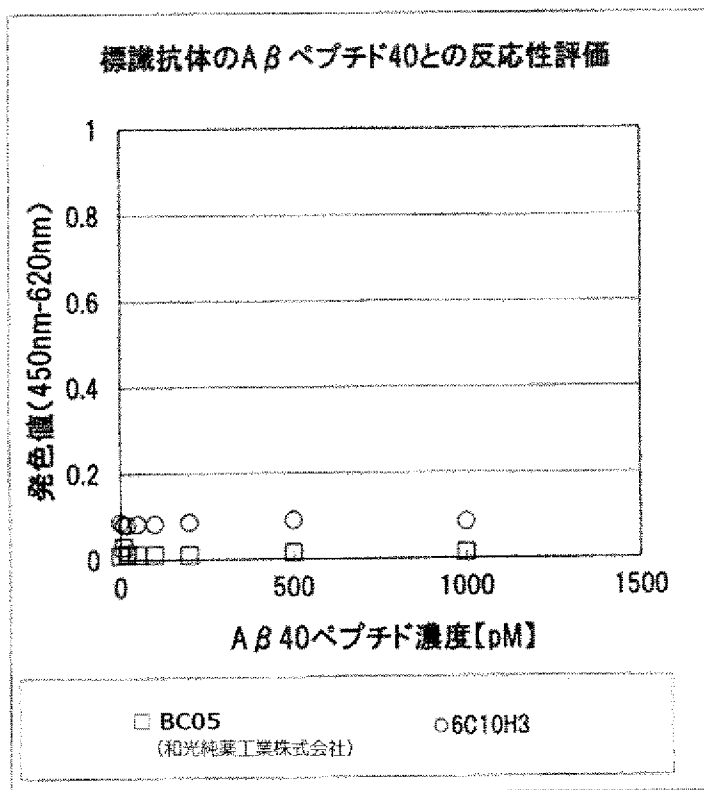
[0101] 本発明により提供されるモノクローナル抗体は、AD患者やADの可能性のある健常者から採取した検体を利用した体外でのAD診断を行うに際し、検体に含まれるAβ42ペプチドの検出を可能とする。また、本発明により提供されるモノクローナル抗体は、ヒト化抗体とすることにより抗体医薬として使用できる可能性がある。したがって、本発明は、医薬品、診断薬および検査薬などの分野において利用可能である。

請求の範囲

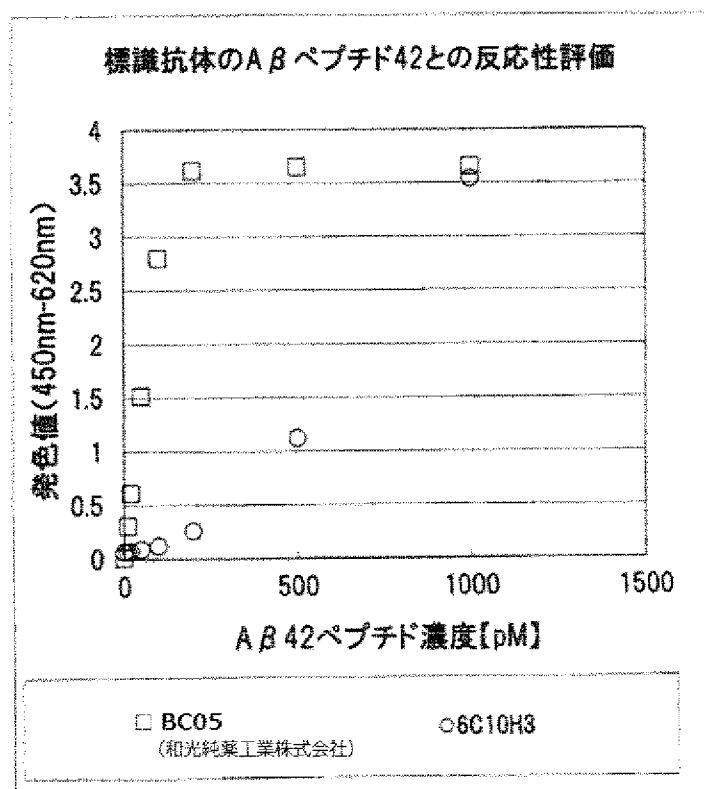
- [請求項1] $A\beta 42$ ペプチドに反応し、 $A\beta 43$ ペプチドに反応しないモノクローナル抗体。
- [請求項2] 配列番号8で表されるアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域（CDR）1、配列番号9で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR2、配列番号10で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDR3、及び、免疫グロブリン重鎖由来の重鎖フレームワーク配列から構成される重鎖可変領域；並びに
配列番号13で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1、配列番号14で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR2、配列番号15で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDR3、及び、免疫グロブリン軽鎖由来の軽鎖フレームワーク配列から構成される軽鎖可変領域を含む、請求項1に記載のモノクローナル抗体。
- [請求項3] 配列番号7で表されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域および配列番号12で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む、請求項1に記載のモノクローナル抗体。
- [請求項4] 受託番号がN I T E P-1463であるハイブリドーマにより産生される、請求項1に記載のモノクローナル抗体。
- [請求項5] 受託番号がN I T E P-1463であるハイブリドーマ。
- [請求項6] キメラモノクローナル抗体である、請求項1または2に記載のモノクローナル抗体。
- [請求項7] ヒト化モノクローナル抗体である、請求項1または2に記載のモノクローナル抗体。
- [請求項8] 請求項1～4、6または7のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体に由来する抗体断片であって、Fab、Fab'、F(ab')₂、一本鎖抗体（scFv）、二量体化V領域（diabody）、ジスルフィド安定化V領域（dsFv）及びCDRを含むペプチドから選ばれる、抗体断片。

- [請求項9] 受託番号がN I T E P - 1 4 6 3であるハイブリドーマを培養することを含む、請求項1～4のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体または請求項8に記載の抗体断片の製造方法。
- [請求項10] 請求項1～4、6または7のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体または請求項8に記載の抗体断片を含む、A β 4 2検出又は測定キット。
- [請求項11] E L I S Aキットである、請求項10に記載のキット。
- [請求項12] 鼻から採取された検体中のA β 4 2を検出又は測定するための、請求項10または11に記載のキット。
- [請求項13] 請求項1～4、6または7のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体、請求項8に記載の抗体断片または請求項10または11に記載のキットの使用を含む、検体中のA β 4 2を検出又は測定する方法。
- [請求項14] 検体が鼻から採取される、請求項13に記載の方法。

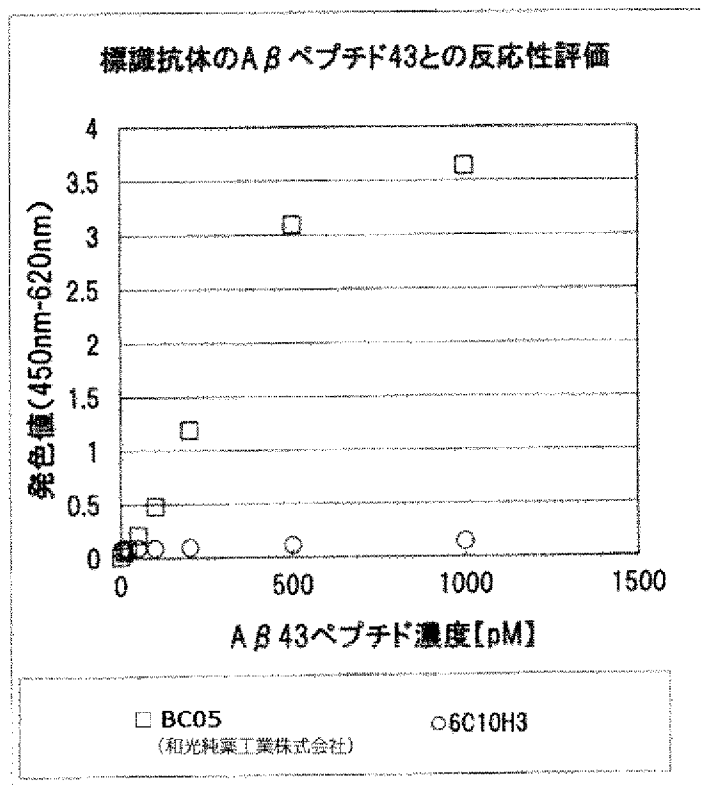
[図1]



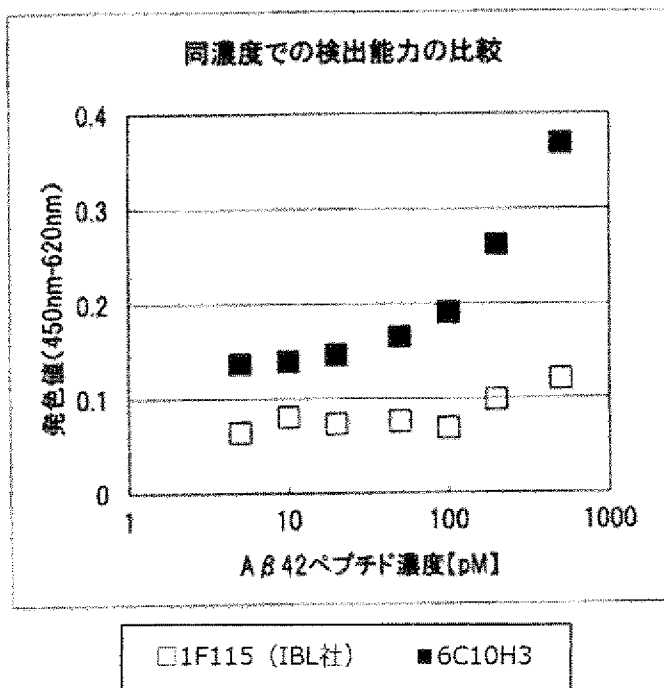
[図2]



[図3]



[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/001187

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K16/18(2006.01)i, C07K16/46(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K16/18-16/36, C07K16/46, C12N5/10, C12N15/09, C12P21/08, G01N33/53

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), UniProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 10-509736 A (Bayer Corp.), 22 September 1998 (22.09.1998), claims; page 9, line 20 to page 10, line 2; examples	1-14 10-14
X Y	JP 2005-531509 A (Mindset Biopharmaceuticals USA Inc.), 20 October 2005 (20.10.2005), claims	1-9 10-14
X	WO 2005/080435 A1 (Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd.), 01 September 2005 (01.09.2005), claims; paragraphs [0055], [0056]; examples	1-14

☒ 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
24 April, 2014 (24.04.14)

Date of mailing of the international search report
13 May, 2014 (13.05.14)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/001187

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009/016734 A1 (University of Tsukuba), 05 February 2009 (05.02.2009), claims; paragraph [0021]; examples	1-14
X	WO 2006/046644 A1 (Sanko Junyaku Co., Ltd.), 04 May 2006 (04.05.2006), claims; paragraph [0025]; examples	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2014/001187

JP 10-509736 A 1998.09.22

US 5786180 A
US 5679531 A
US 5693753 A
EP 1160256 A2
EP 1842859 A2
WO 1996/025435 A1
DE 69617916 T
DE 69637150 T
AT 210681 T
DK 809656 T
CA 2212887 A
ES 2167548 T
PT 809656 E
AT 365750 T
DK 1160256 T
ES 2288896 T
MX 9706189 A
PT 1160256 E
ES 2400674 T

JP 2005-531509 A 2005.10.20

JP 2002-503092 A
JP 2005-320349 A
JP 2009-173680 A
US 2003/0073655 A1
US 2012/0244159 A1
US 2002/0086847 A1
US 2009/0069258 A1
US 2011/0027279 A1
EP 2006303 A1
EP 2305709 A1
WO 2003/074081 A1
WO 1998/044955 A1
DE 69839808 D
CN 1649623 A
ZA 200409186 A
AU 2002367734 A
AU 7103498 A
NZ 337765 A
CA 2286305 A
IL 132262 A
AU 743827 B
CN 1254294 A
AT 402717 T
DK 994728 T
ES 2312185 T
SI 994728 T
PT 994728 E

WO 2005/080435 A1 2005.09.01

JP 4824547 B
US 2008/0025988 A1
US 2011/0008339 A1
EP 1717250 A1

WO 2009/016734 A1 2009.02.05

(Family: none)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2014/001187

WO 2006/046644 A1 2006.05.04

US 2008/0199879 A1
EP 1813947 A1
CA 2585148 A
NO 20072206 A
CN 101048662 A
AU 2005297854 A
MX 2007005053 A
RU 2007119535 A
KR 10-2007-0073778 A
BRA PI0516674
IL 182540 D

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C07K16/18(2006.01)i, C07K16/46(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/09(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. C07K16/18-16/36, C07K16/46, C12N5/10, C12N15/09, 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

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 4 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 4 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 4 年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), UniProt/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	JP 10-509736 A（バイエル コーポレイション）1998.09.22, 特許請求の範囲、第9頁第20行-第10頁第2行、実施例	1 - 1 4 1 0 - 1 4
X Y	JP 2005-531509 A（マインドセット・バイオフィーマスーティカル ズ・ユーエスエイ・インコーポレイテッド）2005.10.20, 特許請求の範囲	1 - 9 1 0 - 1 4
X	WO 2005/080435 A1（株式会社免疫生物研究所）2005.09.01, 請求の範囲、段落 [0 0 5 5]、[0 0 5 6]、実施例	1 - 1 4

☒ 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

2 4 . 0 4 . 2 0 1 4

国際調査報告の発送日

1 3 . 0 5 . 2 0 1 4

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）

中根 知大

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 8 8

4 N

4 0 4 7

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 請求項の番号
X	WO 2009/016734 A1 (国立大学法人筑波大学) 2009. 02. 05, 請求の範囲、段落 [0 0 2 1]、実施例	1 — 1 4
X	WO 2006/046644 A1 (三光純薬株式会社) 2006. 05. 04, 請求の範囲、段落 [0 0 2 5]、実施例	1 — 1 4

JP 10-509736 A	1998. 09. 22	US 5786180 A
		US 5679531 A
		US 5693753 A
		EP 1160256 A2
		EP 1842859 A2
		WO 1996/025435 A1
		DE 69617916 T
		DE 69637150 T
		AT 210681 T
		DK 809656 T
		CA 2212887 A
		ES 2167548 T
		PT 809656 E
		AT 365750 T
		DK 1160256 T
		ES 2288896 T
		MX 9706189 A
		PT 1160256 E
		ES 2400674 T
JP 2005-531509 A	2005. 10. 20	JP 2002-503092 A
		JP 2005-320349 A
		JP 2009-173680 A
		US 2003/0073655 A1
		US 2012/0244159 A1
		US 2002/0086847 A1
		US 2009/0069258 A1
		US 2011/0027279 A1
		EP 2006303 A1
		EP 2305709 A1
		WO 2003/074081 A1
		WO 1998/044955 A1
		DE 69839808 D
		CN 1649623 A
		ZA 200409186 A
		AU 2002367734 A
		AU 7103498 A
		NZ 337765 A
		CA 2286305 A
		IL 132262 A
		AU 743827 B
		CN 1254294 A
		AT 402717 T

		DK 994728 T
		ES 2312185 T
		SI 994728 T
		PT 994728 E
WO 2005/080435 A1	2005.09.01	JP 4824547 B
		US 2008/0025988 A1
		US 2011/0008339 A1
		EP 1717250 A1
WO 2009/016734 A1	2009.02.05	ファミリーなし
WO 2006/046644 A1	2006.05.04	US 2008/0199879 A1
		EP 1813947 A1
		CA 2585148 A
		NO 20072206 A
		CN 101048662 A
		AU 2005297854 A
		MX 2007005053 A
		RU 2007119535 A
		KR 10-2007-0073778 A
		BRA PI0516674
		IL 182540 D