

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-506504

(P2017-506504A)

(43) 公表日 平成29年3月9日(2017.3.9)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 5/10 (2006.01)</b>	C 1 2 N 5/10	Z N A 4 B O 6 5
<b>C O 7 K 16/18 (2006.01)</b>	C O 7 K 16/18	4 H O 4 5
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00	A
<b>G O 1 N 33/53 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/53	D
	G O 1 N 33/53	Y
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 15 頁)

(21) 出願番号 特願2016-548739 (P2016-548739)  
 (86) (22) 出願日 平成27年1月23日 (2015.1.23)  
 (85) 翻訳文提出日 平成28年9月27日 (2016.9.27)  
 (86) 国際出願番号 PCT/DE2015/000029  
 (87) 国際公開番号 W02015/110115  
 (87) 国際公開日 平成27年7月30日 (2015.7.30)  
 (31) 優先権主張番号 102014000857.6  
 (32) 優先日 平成26年1月27日 (2014.1.27)  
 (33) 優先権主張国 ドイツ (DE)

(71) 出願人 511118492  
 マーティン＝ルター＝ユニヴェアズィテ  
 ト ハレ＝ヴィッテンベアク  
 Martin-Luther-Unive  
 rsitaet Halle-Witte  
 nberg  
 ドイツ連邦共和国 ハレ／ザーレ ユニヴ  
 ェアズィテツプラッツ 10  
 Universitaetsplatz  
 10, D-06108 Halle/S  
 aale, Germany  
 (74) 代理人 100114890  
 弁理士 アイゼル・フェリックス＝ライ  
 ンハルト

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ハイブリドーマ細胞系統 (My-C-cCOC2-235-3H8) および該細胞系統の、ヒトの心臓特異的なミオシン結合タンパク質C (C-タンパク質、MYBPC3、cMyBP-Cま

## (57) 【要約】

本発明の課題は、ヒトMy-Cの心臓特異的エピトープに対するインビトロで生産可能なモノクローナル抗体を、そのようなエピトープ特異性を有する特異抗体を産生する骨髄腫細胞クローンの生成によって製造することであった。これらのモノクローナル抗体は、とりわけ、血清、血漿または全血におけるMy-Cの特異的な交差反応性のない定量的な測定のためのELISA(酵素結合免疫吸着アッセイ)の構成を可能にするべきである。前記課題は、My-Cにおける心臓特異的なエピトープを認識して結合するとともに、骨格筋組織のミオシン結合タンパク質に対する交差反応性を示さないモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞クローンを生成することによって解決される。該ハイブリドーマ細胞系統は、骨髄腫細胞と、組換え型のMy-Cに対して免疫化された実験動物、特にマウスの脾臓細胞とを融合させることによって得られる。更に、本発明の主題は、該ハイブリドーマ細胞系統から産生されたエピトープ特異的な抗体および該抗体の使用である。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ヒトの心筋ミオシン結合タンパク質 C ( My - C ) に対するモノクローナル抗体 ( 抗 My - C - c C 0 C 2 - 2 3 5 - 3 H 8 ) を産生するハイブリドーマ細胞系統 D S M A C C 3 2 2 3 。

## 【請求項 2】

My - C の c C 0 C 2 ドメインに対して免疫化されたマウスの脾臓細胞 ( リンパ芽球 ) と骨髓腫細胞とを融合させることによって得られ、かつ該 My - C における心臓特異的なエピトープに対するモノクローナル抗体を産生することを特徴とする、請求項 1 に記載のハイブリドーマ細胞系統。

10

## 【請求項 3】

脾臓細胞として、Balb / c マウス由来の脾臓細胞が使用され、かつ骨髓腫細胞として、系統 P 3 X 6 3 A g 8 . 6 5 3 の骨髓腫細胞または該系統のサブクローンの骨髓腫細胞が使用されることを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載のハイブリドーマ細胞系統。

## 【請求項 4】

ヒトの心筋 My - C の配列のアミノ酸 A 1 2 4 ~ K 1 3 4 の範囲のエピトープに対する特異的モノクローナル抗体を産生することを特徴とする、請求項 1 から 3 までのいずれか 1 項に記載のハイブリドーマ細胞系統。

## 【請求項 5】

ヒトの心筋 My - C の配列のアミノ酸 A 1 2 4 ~ K 1 3 4 の範囲のエピトープを認識して結合することを特徴とする、モノクローナル抗体 ( 抗 My - C - c C 0 C 2 - 2 3 5 - 3 H 8 ) 。

20

## 【請求項 6】

請求項 1 から 4 までのいずれか 1 項に記載のハイブリドーマ細胞系統によって産生されることを特徴とする、請求項 5 に記載のモノクローナル抗体 ( 抗 My - C - c C 0 C 2 - 2 3 5 - 3 H 8 ) 。

## 【請求項 7】

請求項 1 から 4 までのいずれか 1 項に記載の骨髓腫細胞系統の製造方法であって、ヒト c C 0 C 2 ペプチドによって免疫化された実験動物 ( マウス ) の脾臓細胞が骨髓腫細胞 ( 系統 P 3 X 6 3 A g 8 . 6 5 3 ) と融合されたことを特徴とする、前記製造方法。

30

## 【請求項 8】

請求項 5 および / または 6 に記載のマウスのモノクローナル抗体の製造方法であって、請求項 1 から 4 までのいずれか 1 項に記載の骨髓腫細胞系統を培養し、そして産生されたモノクローナル抗体を単離することを特徴とする、前記製造方法。

## 【請求項 9】

請求項 5 および / または 6 に記載のモノクローナル抗体の、分析目的のための、特に血清中の My - C の濃度を測定するための、更に心筋梗塞の早期診断のための E L I S A における捕捉抗体または検出抗体としての使用。

## 【請求項 10】

請求項 5 および / または 6 に記載のモノクローナル抗体の、分析目的のための、特にイムノプロットにおける、免疫組織化学における、およびその他の分析法における使用。

40

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、モノクローナル抗体 ( 抗 My - C - c C 0 C 2 - 2 3 5 - 3 H 8 ; I g G 1 , ) であって、心筋ミオシン結合タンパク質 ( C - タンパク質、MYBPC3、c My B P - C または My - C ) に対するものであり、かつ該タンパク質を検出するが、骨格筋組織由来の My - C の近縁のアイソマーとは反応しないモノクローナル抗体を産生するマウスのハイブリドーマクローンに関する。このモノクローナル抗体は、心筋梗塞の早期診断のために血清、血漿、全血または他の体液中の My - C を定量的に測定する E L I S A

50

(酵素結合免疫吸着アッセイ)の構成のための捕捉抗体または検出抗体として適している。この診断法の範囲では、前記抗体は、心筋梗塞の明らかにより早期の療法を可能にする。

#### 【0002】

急激な命の危険のため、心筋梗塞は、即座に診断して他の胸郭の痛みの原因と区別せねばならない[1]。心筋壊死のためのバイオマーカーの決定は、こうしたなか、NSTE-AACS(非ST上昇型急性冠症候群)と推測された場合の梗塞の診断のために必須であるとともに、相応の臨床的関連において診断を下すためには決して欠かすことはできない。心筋トロポニン(cTn)は、目下、決定的なバイオマーカーとみなされている。該心筋トロポニンは、一般的な梗塞定義の構成要素である[2]。しかし、該心筋トロポニン(cTn)には欠点があるため、新たなバイオマーカーがあれば非常に有益であろうことが分かっている。血清中のcTn濃度は、症状が出だした最初の16時間~18時間で最大に到達し、今までのcTn試験の欠点は、それらの試験の、症状の始まりの最初の1時間における低いcTn濃度を把握するための分析感度不足である[4;5]。近年のcTn試験は、低いcTn値の確度の高い測定をするように努力がなされているが、cTn濃度は、健康な被験者の99パーセント近くでも見られるべきであるため、その値の梗塞に対して低下された特異性はその価値を下げる。しかし、その場合でも、該梗塞患者の25%以下でのcTn濃度は、その閾値を下回る[6]。cTn試験の限られた感度および特異性に鑑みて、相応のガイドライン(NICE)では、診断を確実なものにするために、症状(胸郭の範囲の痛み)の開始から10時間~12時間後にcTnを測定することを推奨している[1]。梗塞後に先んじて放出される一連のバイオマーカーが存在するにもかかわらず、それらのバイオマーカーは心臓特異的に発現されないため、そのうちのいずれも成果を収めることができなかつた[7]。この理由から、目下、cTn試験の裏付け能力を向上させるために、cTn濃度の時間的変化の程度の分析に尽力が寄せられている。この場合、意図した診断を下すためのcTn濃度の分析的および生物学的な変動の差が些細なものであるようにするためには、絶対的な濃度差がどれほど大きくなければならないかは不透明なままである。理想的なバイオマーカーは、梗塞後に心筋から素早く放出されねばならないが、匹敵する今までのマーカーとは異なり心臓特異的でなければならない。前記心筋ミオシン結合タンパク質C(C-タンパク質、MYBPC3、cMyBP-CまたはMy-C)は、この基準を満たすタンパク質である。該タンパク質は、虚血マウス心臓の冠動脈流出液のプロテオーム分析で同定された[8]。該タンパク質は、心筋中で非常に多く発現されるタンパク質(2300種のタンパク質のうち19番目)に該当し、cTnIおよびcTnT(2300種のタンパク質のうち92番目または118番目)の少なくとも二倍の濃度である[9]。異なる遺伝子によってコードされる3種の異なるMy-Cアイソマーが存在する。その心臓特異的アイソフォームは、速筋骨格筋組織のMy-Cおよび遅筋骨格筋組織のMy-Cと異なり、ユニークなN末端ドメイン(図1)と、特異的なエピトープとして用いることができるであろうもう一つの心臓特異的領域とを有する[10]。心筋梗塞または心筋損傷後のMy-Cの放出は検出されており[8;11;12;13;14]、その濃度上昇の時間的推移はcTnの時間的推移と比較されている。

#### 【0003】

本発明の課題は、ヒトMy-Cの心臓特異的エピトープに対するインビトロで生産可能なモノクローナル抗体を、そのようなエピトープ特異性を有する特異抗体を産生する骨髄腫細胞クローンの生成によって製造することであった。これらのモノクローナル抗体は、とりわけ、血清、血漿または全血におけるMy-Cの特異的な交差反応性のない定量的な測定のためのELISA(酵素結合免疫吸着アッセイ)の構成を可能にするべきである。

#### 【0004】

前記課題は、My-Cにおける心臓特異的なエピトープを認識して結合するとともに、骨格筋組織のミオシン結合タンパク質に対する交差反応性を示さないモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞クローンを生成することによって解決される。該ハイブリ

10

20

30

40

50

ドーマ細胞系統は、骨髄腫細胞と、組換え型の My - C に対して免疫化された実験動物、特にマウスの脾臓細胞とを融合させることによって得られる。該ハイブリドーマ細胞系統は、2013年12月10日に、ブダペスト条約の要件に準じて DSMZ で寄託番号 DSM ACC 3223 で寄託された。このハイブリドーマ細胞クローンから産生された抗体は、1種以上の別のモノクローナル抗体と組み合わせて、血清中の My - C の濃度の測定と、更に心筋梗塞の早期診断のための ELISA において適している。

【0005】

更に、本発明の主題は、該ハイブリドーマ細胞系統から産生されたエピトープ特異的な抗体および該抗体の使用である。

【0006】

ヒトの心臓特異的な My - C に対する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の生成のために、Balb/cマウスを、公知のようにして、6週間から8週間までの間隔において My - C の組換え型のドメイン cC0C2 (図2) で免疫化した。該マウスを、脾臓を取り出す前に追加免疫する。単離された脾臓細胞を、公知のようにしてマウス骨髄腫細胞系統 P3X63Ag8.653 (ATCC CCL 1580) の細胞と融合させ、そして適切な培地中で培養する [15]。ヒト My - C に対する抗体のみを産生するハイブリドーマを選択し、繰り返しクローニングし、そして増殖させる。この特異的ハイブリドーマの一次選択は、My - C の cC0C2 ペプチドがマイクロタイタープレートの表面に吸着された ELISA を用いて実施した。

【0007】

それらのクローンから前記基準に従って選択された本発明によるクローンのモノクローナル抗体のエピトープ特異性を、ペプチドスキニング (Peptiscan) によって測定した (16, 17, 18)。そのために、15のアミノ酸残基の長さを有するペプチド (免疫化のために使用される My - C の cC0C2 ドメインと配列的に同一) をメンブレン上に個々のスポットとして合成した。隣接したスポットの15マーのペプチドの配列は重複しているので、My - C の cC0C2 ドメインの全アミノ酸配列は、全体で111個のスポットにおいて重複して合成された。これらのペプチドを、マッピングメンブレン上で本発明によるモノクローナル抗体と一緒にインキュベートした。結合された抗体の検出は、フィルム上で ECL (商標) (増強化学発光 (Enhanced Chemiluminescent)) システムを用いて行った。この方法を用いて、本発明により製造されたモノクローナル抗体によって、前記15マーのどのペプチドが認識されるかを測定できた。検出された個々のスポット (図3を参照) におけるペプチドの既知の配列を通じて、該ハイブリドーマクローンのモノクローナル抗体によって認識されるヒト My - C のエピトープのアミノ酸配列を推定することができた (図4)。

【0008】

本発明により作製されたハイブリドーマクローンによって産生されるモノクローナル抗体 3H8 は、ヒト My - C において、配列 - A149 - P - D - D - P - I - G - L - F - V - M - を有するエピトープへと結合する。

【0009】

本発明により製造されたモノクローナル抗体が前記 Peptiscan メンブレン上でペプチドを検出するだけでなく、前記エピトープを含むヒト My - C の cC0C2 ドメインの全分子も検出するということは、該抗体を ELISA で使用することによって立証された。モノクローナル抗体 3H8 を用いたそのような例示的な ELISA が、図5に示されている。上述のエピトープに特徴的なモノクローナル抗体 (IgG<sub>1</sub>, ) は、該抗体のネイティブな形態においてまたは断片として改変もしくは標識されてよい。この抗体または該抗体の改変された形態は、ヒト My - C のプロセッシング、その遊離のキネティックおよびその血清からのクリアランスの解明のために、前記 My - C の定性的検出およびその定量的測定 (例えば ELISA およびウエスタンブロット) のために、免疫組織化学において、または診断学として使用することができる。

【図面の簡単な説明】

10

20

30

40

50

## 【0010】

【図1】モノクローナル抗体の抗My-C-cC0C2-235-3H8によって検出されたエピトープ（印を付けた）の範囲内の心筋My-Cの一次構造と、骨格筋組織のMyCおよび平滑筋組織のMyC（MYC1\_\_HUMANおよびMYC2\_\_HUMAN）の一次構造との比較を示す図

【図2】心筋My-C（ミオシン結合タンパク質C）のcC0C2ドメインのアミノ酸配列を示す図

【図3】抗My-C-cC0C2-235-3H8のエピトープマッピングを示す図

【図4】エピトープマッピング：マッピングメンブレンのPeppspot1~41に含まれる重複した15マーのペプチドのリストを示す図

【図5】モノクローナル抗体cC0C2-235-3H8についてのELISAにおける組換え型のcC0C2への結合の検出を示す図

## 【0011】

本発明を以下に実施例によってより詳細に説明する。

## 【0012】

## 実施例

## 例1：

## ハイブリドーマ細胞系統の製造

My-CのcC0C2で公知のようにして免疫化されたマウスの脾臓を、滅菌条件下で取り出し、そして脾臓細胞を、脾臓皮膜内からシリンジを用いてRPMI1640培地（Life Technologies（商標）、カールスルーエ）ですすぎ出して、ばらばらにする。該脾臓細胞をペレット化（300×gで10分間）させ、RPMI1640培地で3回洗浄し、そしてRPMI1640培地中に再懸濁させる。次いで、該脾臓細胞を、系統P3X63Ag8.653（ATTC CPL 1580）の骨髓腫細胞と融合させる。そのために、対数増殖期にある培養された骨髓腫細胞を同様にピペットで取り、3回洗浄する。1×10<sup>8</sup>個の脾臓細胞と5×10<sup>7</sup>個の骨髓腫細胞を、遠心分離チューブ中にピペットで取り、激しく混ぜ、遠心分離し、その細胞沈降物に、1分以内で、1.5mlの予熱された50%のポリエチレングリコール1500（ロシュ、パーゼル）を37でその小さいチューブを連続的に回転させながら滴加する。次いで、その融合バッチを更に1分間にわたり37でインキュベートする。引き続き3分間で、予熱された培地（RPMI1640）を、最初の1分間で1mlで、2番目の1分間で3mlで、そして次に18mlで滴加する。引き続き、直ちに200×gで10分間にわたり遠心分離する。その細胞ペレットを、10%FCSおよびHATを含むRPMI1640培地中に取り。該ペレットの一部を、96ウェル培養プレート中に撒き、残りを液体窒素中で-196において凍結させる。その培養に際してフィーダー細胞として、前記融合前に1日間培養したマウス腹腔マクロファージ（1ウェル当たりHAT培地中1×10<sup>4</sup>個のマクロファージ）を用いる。それらの細胞を、CO<sub>2</sub>インキュベーター中で37でインキュベートする。培地をそれぞれ3日～5日後に新たなRPMI1640-HAT培地と交換し、前記融合された細胞の増殖に応じて、培養上清を、約2週間後にELISAで、抗原（My-C）に対するその反応性について試験する。

## 【0013】

## 例2：

## 抗体を産生するクローンの選択

増殖している全てのクローンまたは該クローンの抗体を、その反応性についてELISA（酵素結合免疫吸着アッセイ）を用いて試験した。免疫吸着剤は、免疫原、つまりMy-Cの組換え型のcC0C2ドメイン（約2μg/ml）であった。

## 【0014】

## ELISAの実施：

1. マイクロタイタープレート（Costar、高結合）を1ウェル当たり50μlずつの免疫原溶液により4で一晩にわたりコーティングする。

10

20

30

40

50

2. 該マイクロタイタープレート (MTP) を、TBS (トリス緩衝生理食塩水、pH 7.4) で3回洗浄する。
3. 該MTPを、1ウェルあたりに200  $\mu$ lのブロッキング試薬 (ベーリンガー、マンハイム) を用いて37 で1時間にわたりブロッキングする。
4. 該MTPを、NaCl - Tween 20で3回洗浄する。
5. 1ウェルあたりに50  $\mu$ lずつのハイブリドーマ培養の培養上清と一緒に、TBS - Tween 20による約1:2希釈でインキュベートする。
6. 該MTPを、NaCl - Tween 20で3回洗浄する。
7. 1ウェルあたりに50  $\mu$ lのペルオキシダーゼに結合された抗マウスIg抗体と一緒に、室温で1時間にわたりインキュベートする。
8. 該MTPを、NaCl - Tween 20で3回洗浄する。
9. 1ウェルあたり50  $\mu$ lのABTS溶液 (100mlの基質バッファー [クエン酸塩、過ホウ酸ナトリウム、pH 4.4] 当たり100mgのABTS) と一緒にインキュベートする。
10. 60分間のインキュベーション時間後に室温でマイクロプレートリーダー (SLT) により405nmで測定する。

10

## 【0015】

例3:

ヒト心臓特異的My-Cにおけるモノクローナル抗体3H8についてのエピトープマッピング

20

モノクローナル抗体3H8の結合部位の同定は、ペプチドスキニング法により行った。その場合に、前記免疫化のために使用されたMy-CのヒトcC0C2ドメインの全アミノ酸配列は、全部で111種の、それぞれ15アミノ酸長の重複しているアミノ酸配列に分けられる。これらの配列は、個々のペプチドとしてスポットにおいてセルロースメンブレン上で直接的に合成される。前記メンブレンを、抗体を含有するハイブリドーマの培養上清と一緒にインキュベートし、そしてペルオキシド結合された抗マウスIg抗体と一緒にインキュベートすることによって抗体の結合部位を可視化させる。そのために、TBS - Tweenで3回洗浄した後に、該メンブレンを転写シート間に置き、次いでECL (商標) (増強化学発光 (Enhanced Chemiluminescent)) 検出試薬 (Amersham、ブラウンシュバイク) と一緒に3分間にわたりインキュベートする。フィルム (Hyperfilm - ECL (商標) [RPN 2103H Amersham、ブラウンシュバイク]) を載せて、それを引き続き30秒から3分の間露光させる。抗体により検知された配列の同定は、前記フィルムに露光されたスポット37と38 (図4) を、該スポットに局在する免疫原 (My-CのcC0C2ドメイン) の15マーの部分配列に割り当てることによって行われる。

30

## 【0016】

【表1】

スポット37	145	PTPGAPDDPIGLFVM	15	3H8
スポット38	149	APDDPIGLFVMRPQD	15	3H8

40

## 【0017】

2つの部分配列の認識された中心配列は、アミノ酸配列A149 - P - D - D - P - I - G - L - F - V - M - である。この配列は、ヒトMy-Cにおいて抗体3H8が結合すると検出されたエピトープである。

## 【0018】

文献目録

## 【表 2】

1. Cooper A, Timmis A, Skinner J. Assessment of recent onset chest pain or discomfort of suspected cardiac origin: Summary of nice guidance. *BMJ*. 2010;340:c1118
2. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Simoons ML, Chaitman BR, White HD, Katus HA, Lindahl B, Morrow DA, Clemmensen PM, Johanson P, Hod H, Underwood R, Bax JJ, Bonow RO, Pinto F, Gibbons RJ, Fox KA, Atar D, Newby LK, Galvani M, Hamm CW, Uretsky BF, Steg PG, Wijns W, Bassand JP, Menasche P, Ravkilde J, Ohman EM, Antman EM, Wallentin LC, Armstrong PW, Januzzi JL, Nieminen MS, Gheorghide M, Filippatos G, Luepker RV, Fort-mann SP, Rosamond WD, Levy D, Wood D, Smith SC, Hu D, Lopez-Sendon JL, Robertson RM, Weaver D, Tendera M, Bove AA, Parkhomenko AN, Vasilieva EJ, Mendis S.  
Third universal definition of myocardial infarction. *Circulation*. 2012;126:2020-2035
3. Gerszten RE, Carr SA, Sabatine M. Integration of proteomic-based tools for improved biomarkers of myocardial injury. *Clin.Chem*. 2010;56:194-201
4. Katus HA, Remppis A, Neumann FJ, Scheffold T, Diederich KW, Vinar G, Noe A, Matern G, Kuebler W. Diagnostic efficiency of troponin t measurements in acute myocardial infarction. *Circulation*. 1991;83:902-912
5. Morrow DA, Cannon CP, Jesse RL, Newby LK, Ravkilde J, Storrow AB, Wu AH, Christenson RH. National academy of clinical biochemistry laboratory medicine practice guidelines: Clinical characteristics and utilization of biochemical markers in acute coronary syndromes. *Circulation*. 2007;115:e356-375
6. Hoeller R, Rubini Gimenez M, Reichlin T, Twerenbold R, Zellweger C, Moehring B, Wildi K, Freese M, Stelzig C, Hartmann B, Stoll M, Mosimann T, Reiter M, Haaf P, Mueller M, Meller B, Hochgruber T, Balmelli C, Sou SM, Murray K, Freidank H, Steuer S, Minners J, Osswald S, Mueller C. Normal presenting levels of high-sensitivity troponin and myocardial infarction. *Heart*. 2013
7. Baker JO, Reinhold J, Redwood S, Marber MS. Troponins: Redefining their limits. *Heart*. 2011;97:447-452
8. Jacquet S, Yin X, Sicard P, Clark J, Kanaganayagam GS, Mayr M, Marber MS. Identification of cardiac myosin-binding protein c as a candidate biomarker of myocardial infarction by proteomics analysis. *Mol Cell Proteomics*. 2009;8:2687-2699
9. Aye TT, Scholten A, Taouatas N, Varro A, Van Veen TA, Vos MA, Heck AJ. Proteome-wide protein concentrations in the human heart. *Mol Biosyst*. 2010;6:1917-1927

## 【表 3】

10. Sadayappan S, de Tombe PP. Cardiac myosin binding protein-c: Redefining its structure and function. *Biophys Rev.* 2012;4:93-106
11. Baker JO, Devaraj R, Reinhold J, Kanaganayagam G, Sadayappan S, Gautel M, Redwood S, Marber M. Cardiac myosin-binding protein c as a potential new serum biomarker of myocardial infarction. *Circulation.* 2010;122:A15438 10
12. Govindan S, Kuster DW, Lin B, Kahn DJ, Jeske WP, Walenga JM, Leya F, Hoppensteadt D, Fareed J, Sadayappan S. Increase in cardiac myosin binding protein-c plasma levels is a sensitive and cardiac-specific biomarker of myocardial infarction. *Am J Cardiovasc Dis.* 2013;3:60-70
13. Govindan S, McElligott A, Muthusamy S, Nair N, Barefield D, Martin JL, Gongora E, Greis KD, Luther PK, Winegrad S, Henderson KK, Sadayappan S. Cardiac myosin binding protein-c is a potential diagnostic biomarker for myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 2012;52:154-164 20
14. Liebetrau C, Mollmann H, Nef H, Szardien S, Rixe J, Troidl C, Willmer M, Hoffmann J, Weber M, Rolf A, Hamm C. Release kinetics of cardiac biomarkers in patients undergoing trans-coronary ablation of septal hypertrophy. *Clin Chem.* 2012;58:1049-1054
15. Köhler, G., Milstein, C., *Nature*, 1975, 256 (5517): 495-497;
16. Kearney, J.F., Radbruch, A., Liesegang, B., Rajewsky, K., *J. Immunol.*, 1979, 123(4): 1548 - 50; 30
17. Galfre, G., Milstein, C., *Methods Enzymol.*, 1981, 73(Pt B): 3-46
18. Geysen, H.M., Rodda, S.J., Mason, T.J., Tribbick, G., Schoofs, P.G., *J. Immunol. Methods*, 1987, 102(2): 259-274

【 図 1 】

モノクローナル抗体の抗My-C-cCOC2-235-3H8によって検出されたエピトープ（印を付けた）の範囲内の心筋My-Cの一次構造と、骨格筋組織のMyCおよび平滑筋組織のMyC (MYC1\_HUMAN および MYC2\_HUMAN) の一次構造との比較

121
PAPAAELGESAPSPKGSSSAALNGPTPGAPDDPIGLFVMR
180 Q14896 MYC3\_HUMAN
40 PEDQS PT AEEPTGVFLKPKDPSVSVETGKDAVVAVKNG
77 Q14324 MYC2\_HUMAN
43 PGEEQ AKQNANSQLSILFIEKPQGGTVKVGEDITFIAKVKA
83 Q00872 MYC1\_HUMAN

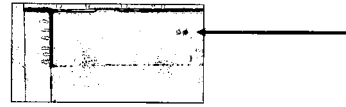
【 図 2 】

心筋My-C(ミオシン結合タンパク質C)のcCOC2ドメインのアミノ酸配列

Table with 4 columns: Position, Amino Acid 1, Amino Acid 2, Amino Acid 3, Amino Acid 4. Rows 1-42.

【 図 3 】

抗My-C-cCOC2-235-3H8のエピトープマッピング
ECLフィルム: My-C-cCOC2-Pepspotメンブレンのスポット37およびスポット38に結合されたモノクローナル抗体3H8の検出



【 図 4 】

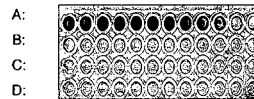
エピトープマッピング: マッピングメンブレンのPepspot1~41に含まれる重複した15マーのペプチドのリスト

Table with 4 columns: Spot, Start Amino Acid, Peptide Sequence, Peptide Length. Rows 1-41.

【 図 5 】

モノクローナル抗体cCOC2-235-3H8についてのELISAにおける組換え型のcCOC2への結合の検出

ELISAの構成
cCOC2の検出:
a: 吸着された抗原: 1ウエル当たり 50 µl cCOC2 (2 µg/ml)
+ cCOC2-235-3H8 (精製済み, 0.4 mg/ml)
+ 二次抗マウス-IgG, POD- 標識付, 1: 5000
+ ABTS
コントロール:
b: 吸着された抗原: 1ウエル当たり 50 µl cCOC2 (2 µg/ml)
+ 二次抗マウス-IgG, POD- 標識付, 1: 5000
+ ABTS
測定:
405nmでの吸収
列 A + B (a): 精製抗体 (0.4 mg/ml) の希釈 1:10 → 1: 160000
列 C + D (b): コントロール



【配列表】

2017506504000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/DE2015/000029
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C07K16/18 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2008/104289 A1 (BAYER HEALTHCARE AG [DE]; GOLZ STEFAN [DE]; SUMMER HOLGER [DE]; GEERTS) 4 September 2008 (2008-09-04) example 2 -----	1-10
X	Jeanne Theis: "Expression Patterns of Cardiac Myofilament Proteins", 13 May 2009 (2009-05-13), pages 325-333, XP55197660, Retrieved from the Internet: URL:http://circheartfailure.ahajournals.org/content/2/4/325 [retrieved on 2015-06-23] the whole document -----	1-10
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
23 June 2015		03/07/2015
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Scheffzyk, Irmgard

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/DE2015/000029

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2008104289	A1	NONE	
-----			

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2015/000029

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES INV. C07K16/18 ADD.		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE		
Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationsymbole) C07K		
Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, WPI Data		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	
	Betr. Anspruch Nr.	
X	WO 2008/104289 A1 (BAYER HEALTHCARE AG [DE]; GOLZ STEFAN [DE]; SUMMER HOLGER [DE]; GEERTS) 4. September 2008 (2008-09-04) Beispiel 2	1-10
X	----- Jeanne Theis: "Expression Patterns of Cardiac Myofilament Proteins", 13. Mai 2009 (2009-05-13), Seiten 325-333, XP55197660, Gefunden im Internet: URL:http://circheartfailure.ahajournals.org/content/2/4/325 [gefunden am 2015-06-23] das ganze Dokument -----	1-10
<input type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen		<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :		*T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
*A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist		*X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
*E* frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist		*Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
*L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)		*Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist
*O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht		
*P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts	
23. Juni 2015	03/07/2015	
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter  Scheffzyk, Irmgard	

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2015/000029

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 2008104289	A1	04-09-2008	KEINE
-----			

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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, 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

(74)代理人 100116403  
弁理士 前川 純一

(74)代理人 100135633  
弁理士 二宮 浩康

(74)代理人 100162880  
弁理士 上島 類

(72)発明者 エッケハート ヴェーバー  
ドイツ連邦共和国 ハレ(ザーレ) ヴァルター - ヒュルゼ - シュトラーセ 10

(72)発明者 リータ メデク  
ドイツ連邦共和国 ハレ(ザーレ) パーフューサーシュトラーセ 1

Fターム(参考) 4B065 AA90X AA90Y AA91X AA91Y AA93X AA93Y AB01 AB02 AB04 AB06  
AC14 BA01 BA08 CA25 CA46  
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA16 BA17 CA40 DA76 EA50 FA74

(54)【発明の名称】ハイブリドーマ細胞系統(My - C - c C 0 C 2 - 2 3 5 - 3 H 8)および該細胞系統の、ヒトの心臓特異的なミオシン結合タンパク質(C - タンパク質、MYBPC3、cMyBP - CまたはMy - C)に対するモノクローナル抗体の製造のための使用

专利名称(译)	产生针对人类心脏特异性肌球蛋白结合蛋白C ( C蛋白 , MYBPC3 , cMyBP-C或My-C ) 的杂交瘤细胞系 ( My-C-cC0C2-235-3H8 ) 和细胞系的单克隆抗体用于		
公开(公告)号	<a href="#">JP2017506504A</a>	公开(公告)日	2017-03-09
申请号	JP2016548739	申请日	2015-01-23
申请(专利权)人(译)	马丁 - 路德 - 鹈鹕Neveah罗卡泰特哈莉 - 威滕熊点击		
发明人	エッケハート ヴェーバー リータ メデク		
IPC分类号	C12N5/10 C07K16/18 C12N15/09 G01N33/53		
CPC分类号	C07K16/18 C07K2317/34 G01N33/6893 G01N2333/4712 G01N2800/324 C07K16/32 C07K2317/14 C07K2317/20 G01N33/5748		
FI分类号	C12N5/10.ZNA C07K16/18 C12N15/00.A G01N33/53.D G01N33/53.Y		
F-TERM分类号	4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AA91X 4B065/AA91Y 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/AB04 4B065/AB06 4B065/AC14 4B065/BA01 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA16 4H045/BA17 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	前川純一 二宮和也HiroshiYasushi		
优先权	102014000857 2014-01-27 DE		
其他公开文献	JP6608834B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

**摘要(译)**  
 本发明的目的是通过产生骨髓瘤细胞克隆产生单克隆抗体，所述单克隆抗体可在体外针对人My-C的心脏特异性表位产生，所述骨髓瘤细胞克隆产生具有这种表位特异性的特异性抗体。那是这些单克隆抗体尤其应允许构建ELISA ( 酶联免疫吸附测定 ) ，用于特异性，非反应性，定量测定血清，血浆或全血中的My-C。有。通过产生杂交瘤细胞克隆来解决上述问题，所述杂交瘤细胞克隆识别并结合My-C中的心脏特异性表位，并不产生不显示与骨骼肌组织肌球蛋白结合蛋白交叉反应的单克隆抗体。它通过将骨髓瘤细胞与针对重组My-C，特别是小鼠免疫的实验动物的脾细胞融合来获得杂交瘤细胞系。此外，本发明的主题是由所述杂交瘤细胞系产生的表位特异性抗体和所述抗体的用途。

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 公表特許公報 (A)	(11) 特許出願公表番号 特表2017-506504 (P2017-506504A) (43) 公表日 平成29年3月9日 (2017. 3. 9)
(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5 / 1 0 (2006. 01)	C 1 2 N 5 / 1 0 Z N A	4 B 0 6 5
C 0 7 K 1 6 / 1 8 (2006. 01)	C 0 7 K 1 6 / 1 8	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1 5 / 0 9 (2006. 01)	C 1 2 N 1 5 / 0 0 . A	
G 0 1 N 3 3 / 5 3 (2006. 01)	G 0 1 N 3 3 / 5 3 . D	
	G 0 1 N 3 3 / 5 3 . Y	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 15 頁)		
(21) 出願番号 特願2016-548739 (P2016-548739)	(71) 出願人 511118492	
(66) (22) 出願日 平成27年1月23日 (2015. 1. 23)	マーティン-ルター-ユニヴァーシテート	
(65) 翻訳文提出日 平成28年9月27日 (2016. 9. 27)	ハレ-ヴィッテンベーク	
(68) 国際出願番号 PCT/DE2015/000029	Martin-Luther-Unive	
(87) 国際公開番号 W02015/110115	rsitaet Halle-Witte	
(87) 国際公開日 平成27年7月30日 (2015. 7. 30)	nberg	
(31) 優先権主張番号 102014000857.6	ドイツ連邦共和国 ハレ/ザール ユニ	
(32) 優先日 平成26年1月27日 (2014. 1. 27)	ヴァーシテーツプラッツ	
(33) 優先権主張国 ドイツ (DE)	10	
	Universitaetsplatz	
	10, D-06108 Halle/S	
	aale, Germany	
	(74) 代理人 100114890	
	弁理士 アインゼル・フェリックス=ライ	
	ンハルト	
最終頁に続く		
(54) 【発明の名称】 ハイブリドマ細胞系統 (My-C-cC0C2-235-3H8) および該細胞系統の、ヒトの心臓特異的なミオシン結合タンパク質C (C-タンパク質、MYBPC3、cMyBP-Cま		