

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6667443号
(P6667443)

(45) 発行日 令和2年3月18日(2020.3.18)

(24) 登録日 令和2年2月27日(2020.2.27)

(51) Int.Cl.	F I	
C 1 2 N 5/18 (2006.01)	C 1 2 N 5/18	Z N A
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
C O 7 K 16/18 (2006.01)	C O 7 K 16/18	
C 1 2 N 15/06 (2006.01)	C 1 2 N 15/06	1 0 0
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53	D
請求項の数 8 (全 11 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2016-548721 (P2016-548721)
 (86) (22) 出願日 平成27年1月23日 (2015.1.23)
 (65) 公表番号 特表2017-505618 (P2017-505618A)
 (43) 公表日 平成29年2月23日 (2017.2.23)
 (86) 国際出願番号 PCT/DE2015/000028
 (87) 国際公開番号 W02015/110114
 (87) 国際公開日 平成27年7月30日 (2015.7.30)
 審査請求日 平成30年1月17日 (2018.1.17)
 (31) 優先権主張番号 102014000856.8
 (32) 優先日 平成26年1月27日 (2014.1.27)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 ドイツ (DE)
 微生物の受託番号 DSMZ DSM ACC3224

(73) 特許権者 500532757
 キングス カレッジ ロンドン
 KINGS COLLEGE LONDON
 N
 イギリス国, WC2R 2LS ロンドン
 , ストランド (番地なし)
 (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
 (74) 代理人 100098501
 弁理士 森田 拓
 (74) 代理人 100116403
 弁理士 前川 純一
 (74) 代理人 100135633
 弁理士 二宮 浩康

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-cCOC2-259-1A4) 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) 【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を産生するハイブリドーマ細胞系統 DSM ACC3224。

【請求項2】

脾臓細胞として、Balb/cマウス由来の脾臓細胞が使用され、かつ骨髄腫細胞として、系統P3X63Ag8.653の骨髄腫細胞または該系統のサブクローンの骨髄腫細胞が使用され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。

【請求項3】

ヒトの心筋My-Cの配列のアミノ酸A125~K135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A125~K135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。

【請求項5】

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によって産生されることを特徴とする、請求項4に記載のモノクローナル抗体。

【請求項6】

請求項4または5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7】

請求項4または5に記載のモノクローナル抗体の、分析目的のための、血清中のMy-Cの濃度を測定するための、心筋梗塞の早期診断のためのELISAにおける捕捉抗体または検出抗体としての使用。

【請求項8】

請求項4または5に記載のモノクローナル抗体の、分析目的のための、イムノプロットにおける、免疫組織学における、およびその他の分析法における使用。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

本発明は、モノクローナル抗体(抗My-C-cC0C2-259-1A4; IgG1,)であって、心筋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ELISA(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。

20

【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-ACS(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った[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、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、

30

40

50

c T n Iおよびc T n T (2 3 0 0 種のタンパク質のうち9 2 番目または1 1 8 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M y - 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M y - C および遅筋骨格筋組織のM y - 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[1 0]。心筋梗塞または心筋損傷後のM y - C の放出は検出されており[8 ; 1 1 ; 1 2 ; 1 3 ; 1 4]、その濃度上昇の時間的推移はc T n の時間的推移と比較されている。

【 0 0 0 3 】

本発明の課題は、ヒトM y - 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M y - C の特異的な交差反応性のない定量的な測定のためのE L I S A (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。

【 0 0 0 4 】

前記課題は、M y - 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M y - 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、2 0 1 3 年1 2 月1 0 日に、ブダペスト条約の要件に準じてD S M Z で寄託番号D S M A C C 3 2 2 4 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M y - C の濃度の測定と、更に心筋梗塞の早期診断のためのE L I S A において適している。

【 0 0 0 5 】

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。

【 0 0 0 6 】

ヒトの心臓特異的なM y - 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、B a l b / 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M y - C の組換え型のドメインc C 0 C 2 (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P 3 X 6 3 A g 8 . 6 5 3 (A T C C C P L 1 5 8 0) の細胞と融合させ、そして適切な培地中で培養する[1 5]。ヒトM y - 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、M y - C のC 0 C 2 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E L I S A を用いて実施した。

【 0 0 0 7 】

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(P e p s c a n) によって測定した(1 6 , 1 7 , 1 8)。そのために、1 5 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M y - C のc C 0 C 2 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1 5 マーのペプチドの配列は重複しているので、M y - C のc C 0 C 2 ドメインの全アミノ酸配列は、全体で1 1 1 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E C L (商標) (増強化学発光(E n h a n c e d C h e m i l u m i n e s c e n t)) 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1 5 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、

10

20

30

40

50

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1A4は、ヒトMy - Cにおいて、配列 - A 1 2 9 - A - E - L - G - E - S - A - P - S - P - K - 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P e p s p o t膜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c C 0 C 2ドメインの全分子も検出するという事は、該抗体をE L I S A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1A4を用いたそのような例示的なE L I S A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(I g G₁,)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E L I S Aおよびウエスタンブロット)のために、免疫組織学において、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】

【0010】

【図1】モノクローナル抗体の抗My - C - c C 0 C 2 - 2 5 9 - 1 A 4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My Cおよび平滑筋組織のMy C(M Y C 1 __ H U M A NおよびM Y C 2 __ H U M A N)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c C 0 C 2ドメインのアミノ酸配列を示す図

【図3】抗My - C - c C 0 C 2 - 2 5 9 - 1 A 4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P e p s p o t 1 ~ 4 1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の抗My - C - c C 0 C 2 - 2 5 9 - 1 A 4についてのE L I S Aにおける組換え型のc C 0 C 2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c C 0 C 2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R P M I 1 6 4 0培地(L i f e T e c h n o l o g i e s(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 x gで10分間)させ、R P M I 1 6 4 0培地で3回洗浄し、そしてR P M I 1 6 4 0培地中に再懸濁させる。次いで、該脾臓細胞を、系統P 3 X 6 3 A g 8 . 6 5 3(A T T C C P L 1 5 8 0)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 x 10⁸個の脾臓細胞と5 x 10⁷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、1.5 ml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、その融合パッチを更に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(R P M I 1 6 4 0)を、最初の1分間で1 mlで、2番目の1分間で3 mlで、そして次に18 mlで滴加する。引き続き、直ちに200 x 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RPMI 1640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 1×10^4 個のマクロファージ)を用いる。それらの細胞を、CO₂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RPMI 1640-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。
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ウェル当たり200μlのブロッキング試薬(ペーリンガー、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ウェル当たり50μl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ウェル当たり50μl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ウェル当たり50μl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。

【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1A4についてのエピトープマッピング

モノクローナル抗体1A4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

10

20

30

40

50

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 31 と 32 (図 4) を、該スポットに局在する免疫原 (My - C の c C 0 C 2 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。

【 0 0 1 6 】

【表 1】

スポット 31	121 PAPAAELGESAPSPK	15 1A4
スポット 32	125 AELGESAPSPKGSSS	15 1A4

【 0 0 1 7 】

2つの部分配列の認識された中心配列は、アミノ酸配列 - A₁₂₄ - A - E - L - G - E - S - A - P - S - P - K - である。この配列は、ヒト My - C において抗体 1 A 4 が結合すると検出されたエピトープである。

10

【 0 0 1 8 】

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, Gheorghiade 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 10
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 20
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 30
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 40
10. Sadayappan S, de Tombe PP. Cardiac myosin binding protein-c: Redefining its structure and function. *Biophys Rev*. 2012;4:93-106

【表 3】

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
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 10
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
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 20
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;
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-cCOC2-259-1A4によって検出されたエピートプ (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
PAPAELGESAPSPKIGSSSAALNGPTPGAPDDPIGLFVMRPQDGEVTVGGSITFSARVAG
180 Q14896 MYC3_HUMAN
40 PEDQS PT AEEPTGVFLKPKDPSVSVETGKDAVVVAKVNG
77 Q14324 MYC2_HUMAN
43 PGEEQ AKQNANSQLSILFIEKPGQGTVKVGEDITFIKVKVA
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

1 MPEPGKKPVSAFSKPPRSVVAAGSPAIVEAETERAGVKV
61 GTRHLLTVRE VGPADQGSYAVIAGSSKVKF DLKVIKAEKA
121 PAPAAELGESAPSPKIGSSSAALNGPTPGAPDDPIGLFVMR
181 ASLLKPPVWKFVKGWVDLS SKVQHLQLHDSYDRASKVY
241 VSTKDKFECSNFNLTVHEAMGTGDLDLLSFRRTSLAGGG
301 KRDSFRTPRDSKLEAPAEEDVWEILRQAPPSEYERIAFOY
361 KSTAFQKKLEPAYQVSKGHKIRLTVELADHDAEVKWLKNG
421 LTISSQCLADDAAYQCVVGG EKCSTELFVK E

【 図 3 】

抗My-C-cCOC2-259-1A4のエピートプマッピング
ECLフィルム: My-C-cCOC2-Pepsipotメンブレンのスポット31およびスポット32に結合された
モノクローナル抗体1A4の検出



【 図 5 】

モノクローナル抗体の抗My-C-cCOC2-259-1A4についてのELISAにおける相換え型の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)
+ cCOC2-259-1A4 (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 (a): 精製抗体 (0.4 mg/ml) の希釈 1:10 → 1: 20000

列 B (b): コントロール



【 図 4 】

エピートプマッピング: マッピングメンブレンのPepsipot1~41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: スポット, 開始アミノ酸, ペプチド配列, ペプチド長. Lists peptide sequences and their lengths for spots 1 through 41.

【配列表】

0006667443000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 33/53 Y

(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) バーフューサーシュトラーセ 1

審査官 清野 千秋

(56)参考文献 特開平03 - 198794 (JP, A)

国際公開第2008 / 104289 (WO, A1)

国際公開第2009 / 104289 (WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 5 / 1 2

C 0 7 K 1 6 / 1 8

C 1 2 N 1 5 / 0 9 - 1 5 / 9 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / W P I D S / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

(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 5 9 - 1 A 4)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)	抗杂交瘤细胞系 (my-c-cc0c2-259-1a4) 和抗人心脏特异性肌球蛋白结合蛋白c (c蛋白 , mybpc3 , cmybp-c或my-c) 细胞株的产生 用于		
公开(公告)号	JP6667443B2	公开(公告)日	2020-03-18
申请号	JP2016548721	申请日	2015-01-23
申请(专利权)人(译)	马丁 - 路德 - 鸫鹑Neveah罗卡泰特哈莉 - 威滕熊点击		
当前申请(专利权)人(译)	伦敦大学国王学院		
发明人	エッケハート ヴェーバー リータ メデク		
IPC分类号	C12N5/18 C12P21/08 C07K16/18 C12N15/06 G01N33/53		
CPC分类号	C07K16/18 C07K2317/34 C07K2317/14 C12N5/16 G01N33/577 G01N2333/4712		
FI分类号	C12N5/18.ZNA C12P21/08 C07K16/18 C12N15/06.100 G01N33/53.D G01N33/53.Y		
代理人(译)	前川純一 二宮和也HiroshiYasushi		
优先权	102014000856 2014-01-27 DE		
其他公开文献	JP2017505618A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

通过产生可产生具有表位特异性的此类特异性抗体的骨髓瘤细胞克隆，可产生针对人My-C的心脏表位的单克隆抗体，其可在体外产生。这些单克隆抗体尤其可以创建酶联免疫吸附测定 (ELISA) ，用于特异性，无交叉反应的定量测定血清，血浆，全血或其他体液中的My-C。具体地，提供了产生单克隆抗体的杂交瘤细胞克隆，所述单克隆抗体检测并结合My-C中的心脏表位，其相对于骨骼肌的肌球蛋白结合蛋白没有交叉反应性。杂交瘤细胞系可以通过将骨髓瘤细胞与针对重组My-C免疫的测试动物，特别是小鼠的脾细胞融合而获得。

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 特 許 公 報 (B2)	(11) 特許番号 特許第6667443号 (P6667443)
(45) 発行日 令和2年3月18日 (2020.3.18)	(24) 登録日 令和2年2月27日 (2020.2.27)	
(51) Int. Cl.	F I	
C 1 2 N 5 / 1 8 (2 0 0 6 . 0 1)	C 1 2 N 5 / 1 8	Z N A
C 1 2 P 2 1 / 0 8 (2 0 0 6 . 0 1)	C 1 2 P 2 1 / 0 8	
C 0 7 K 1 6 / 1 8 (2 0 0 6 . 0 1)	C 0 7 K 1 6 / 1 8	
C 1 2 N 1 5 / 0 6 (2 0 0 6 . 0 1)	C 1 2 N 1 5 / 0 6	I O O
G O 1 N 3 3 / 5 3 (2 0 0 6 . 0 1)	G O 1 N 3 3 / 5 3	D
請求項の数 8 (全 11 頁) 最終頁に続く		
(21) 出願番号 特願2016-548721 (P2016-548721)	(73) 特許権者 500532757	
(86) (22) 出願日 平成27年1月23日 (2015.1.23)	キングス カレッジ ロンドン	
(65) 公表番号 特表2017-505618 (P2017-505618A)	K I N G S C O L L E G E L O N D O N	
(43) 公表日 平成28年2月23日 (2017.2.23)	N	
(88) 国際出願番号 PCT/DE2015/000028	イギリス国, WC 2 R 2 L S ロンドン	
(87) 国際公開日 W02015/110114	, ストランド (書地なし)	
(87) 国際公開日 平成27年7月30日 (2015.7.30)	(74) 代理人 100114890	
審査請求日 平成30年1月17日 (2018.1.17)	弁理士 アインゼル・フェリックス=ライ	
(31) 優先権主張番号 102014000856.8	ンハルト	
(32) 優先日 平成26年1月27日 (2014.1.27)	(74) 代理人 100098501	
(33) 優先権主張国・地域又は機関 ドイツ (DE)	弁理士 森田 拓	
微生物の受託番号 DSMZ DSM ACC3224	(74) 代理人 100116403	
	弁理士 前川 純一	
	(74) 代理人 100135633	
	弁理士 二宮 浩康	
	最終頁に続く	
(54) 【発明の名称】 ハイブリドマ細胞系統 (My - C - c C O C 2 - 2 5 9 - 1 A 4) 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		