

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2006/109533

発行日 平成20年10月23日(2008.10.23)

(43) 国際公開日 平成18年10月19日(2006.10.19)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/00 ZNAB	4B024
C12P 21/08 (2006.01)	C12P 21/08	4B064
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 D	4B065
GO1N 33/577 (2006.01)	GO1N 33/577 B	
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 21 頁)

出願番号	特願2007-512497 (P2007-512497)	(71) 出願人	504176911 国立大学法人大阪大学
(21) 国際出願番号	PCT/JP2006/306001		大阪府吹田市山田丘1番1号
(22) 国際出願日	平成18年3月24日(2006.3.24)	(71) 出願人	504150461 国立大学法人鳥取大学
(31) 優先権主張番号	特願2005-103072 (P2005-103072)		鳥取県鳥取市湖山町南4丁目101番地
(32) 優先日	平成17年3月31日(2005.3.31)	(71) 出願人	505117641 バイオメディクス株式会社
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		東京都文京区後楽1丁目1番10号
		(74) 代理人	100081422 弁理士 田中 光雄
		(74) 代理人	100084146 弁理士 山崎 宏
		(74) 代理人	100116311 弁理士 元山 忠行

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】細胞膜表面抗原エピトープに対する抗体の作製法及びアッセイ法

(57) 【要約】

本発明は、細胞膜表面抗原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の作製法およびそのハイブリドーマを用いる細胞膜表面抗原に対するモノクローナル抗体の作製法、ならびに、細胞膜表面抗原に対して結合する抗体の親和性を測定する方法、および、その測定方法を利用して、細胞膜表面抗原に対して結合する抗体をアッセイまたはスクリーニングする方法を提供する。抗体の作製のための免疫において、感作抗原として、該抗原を発現する、被免疫動物とは他の目に属する動物に由来する細胞株を用いる免疫と、感作抗原として、遺伝子組換えにより細胞膜表面上に該抗原を発現させた、被免疫動物と同目に属する動物に由来する細胞株を用いる免疫とを組み合わせる。抗原と抗体との親和性の測定において、抗原を細胞膜表面に提示する浮遊細胞を用いるとともに、B/F分離を遠心分離又は細胞を通さないフィルターにより行う。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

被免疫動物に複数回免疫することを含む、細胞膜抗原の細胞外ドメインのエピトープを認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを作製する方法であって、免疫の少なくとも1回は、感作抗原として、該抗原を発現する、被免疫動物とは他の目に属する動物に由来する細胞株を用いる免疫であり、かつ、免疫の少なくとも一回は、感作抗原として、遺伝子組換えにより細胞膜表面上に該抗原を発現させた、被免疫動物と同目に属する動物に由来する細胞株を用いる免疫であることを特徴とする、前記方法。

【請求項 2】

複数回の免疫のそれぞれが、感作抗原として、該抗原を発現する、被免疫動物とは他の目に属する動物に由来する細胞株を用いる免疫、または、感作抗原として、遺伝子組換えにより細胞膜表面上に該抗原を発現させた、被免疫動物と同目に属する動物に由来する細胞株を用いる免疫である請求項1記載の方法。 10

【請求項 3】

初回免疫、追加免疫、及び、最終免疫を行うことを含み、初回免疫及び追加免疫が、免疫の少なくとも1回は、感作抗原として、該抗原を発現する、被免疫動物とは他の目に属する動物に由来する細胞株を用いる免疫、及び、免疫の少なくとも一回は、感作抗原として、遺伝子組換えにより細胞膜表面上に該抗原を発現させた、被免疫動物と同目に属する動物に由来する細胞株を用いる免疫のいずれか一方であり、最終免疫が他方である請求項2記載の方法。 20

【請求項 4】

細胞膜抗原が正常動物細胞またはライン化した動物細胞株に発現する分子である請求項1～3のいずれか1項記載の方法。

【請求項 5】

細胞膜抗原を発現する正常動物細胞またはライン化した動物細胞株が白血球である請求項4記載の方法。

【請求項 6】

細胞膜抗原が膜貫通型分子である請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 7】

細胞膜抗原のエピトープを提示する細胞外ドメインが不溶性または可溶化し難い抗原である請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。 30

【請求項 8】

被免疫動物がげっ歯目の動物であり、被免疫動物と同目に属する動物に由来する細胞株がCHO細胞、NSO細胞、または、SP2/o細胞である請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 9】

請求項1～8のいずれか1項の方法により作製されたハイブリドーマを用いることを特徴とするモノクローナル抗体の作製方法。

【請求項 10】

(a) 該抗原を細胞膜表面に提示する浮遊細胞に被測定抗体を結合させ、(b) 該細胞の細胞膜表面抗原に結合した被測定抗体と遊離の被測定抗体を分離し、(c) 該細胞の細胞膜表面抗原に結合した被測定抗体に、被測定抗体の抗原認識部位とは異なる部位で被測定抗体に結合する物質であって標識された物質を結合させ、(d) 該細胞の細胞膜表面抗原に結合した被測定抗体に結合した該物質と、遊離の該物質を分離し、(e) 該物質の標識を検出することを含む、被測定抗体と細胞膜表面抗原との結合親和性を測定する方法であって、(b) 及び (d) の分離を、それぞれ、遠心分離又は細胞を通さないフィルターにより行うことを特徴とする前記方法。 40

【請求項 11】

(b) 及び (d) の分離を、遠心分離により行う請求項10に記載の方法。

【請求項 12】

50

(b) 及び (d) の分離を、細胞を通さないフィルターにより行う請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】

細胞が正常動物細胞、ライン化した動物細胞株または遺伝子操作された動物細胞株である請求項 10～12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

請求項 10～13 のいずれか 1 項に記載の方法を利用して細胞膜表面抗原に対して結合するモノクローナル抗体をアッセイする方法。

【請求項 15】

請求項 10～13 のいずれか 1 項に記載の方法を利用して細胞膜表面抗原に対して結合するモノクローナル抗体をスクリーニングする方法。 10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞膜表面抗原（細胞膜抗原の細胞外ドメイン）に対するモノクローナル抗体の作製法に関する。また、細胞膜表面抗原に対して結合する抗体をアッセイまたはスクリーニングする方法に関する。

【背景技術】

【0002】

サイトカイン、モノカインあるいは細胞膜からの遊離抗原といった可溶性の抗原は大腸菌などを宿主として遺伝子組換えにより調製されるのが一般的であり、糖鎖を含む一部の抗原タンパクについてはCHO細胞などのげっ歯類由来動物細胞を宿主として遺伝子組換えにより生産される。一方、受容体や接着分子などの細胞膜上に発現する分子は、不溶性の膜貫通部分を有するため分子全体を培養細胞から分離精製するかまたは細胞外ドメインを遺伝子組換えにより調製するのが一般的である。(非特許文献 1) 20

【0003】

しかしながら、受容体や接着分子はその性状や発現様式により、その抗原としての調製が必ずしも容易ではないものがある。例えば、細胞膜抗原分子は、単量体ではなく複合体を形成することが多く、また他の膜分子と連携してその機能をはたす事例が多数報告されている。例えば、CD3/TCR、CD11a/CD18、CD49b/CD29などである。従って、ナチュラルな状態で提示される抗原のエピトープや立体構造を認識するモノクローナル抗体を作製するためには、大腸菌や酵母を宿主とした遺伝子組換えで調製された分子を抗原として用いる方法では適当ではないかも知れない。また、こうした細胞膜抗原には膜貫通部分ばかりでなく細胞外ドメインも不溶性または可溶化し難いものがあり、その立体構造は動物細胞の細胞膜表面にあってはじめてナチュラルな状態と同様に提示されるかも知れない。例えば、CD20、Fc ϵ RIやMDR1がこれらに該当すると思われる。 30

【0004】

細胞膜表面抗原の特定のエピトープに対する抗体作製が困難であることは知られている。例えばCD20抗原の細胞外ドメインは不溶性でありアポトーシスのシグナル誘導に関与するエピトープを有していることが判っているが、多くの文献によりこのエピトープを認識する高親和性の特異抗体を得ることは非常に難しいとされている(非特許文献 2, 非特許文献 3, 非特許文献 4)。このため、Rituxan (商標) のオリジンであるマウス抗体 2B8 はヒト B 細胞である SB 細胞株を免疫して得られたものであり、2H7 はやはりヒト B 細胞株である 6.16c1.3 を用いたものであるが、抗体産生クローンを得ることが困難を極めたことはよく知られているところである(非特許文献 5)。これらのヒト細胞株を免疫原として用いるには、細胞膜表面における目的抗原の発現量が充分ではないことが多く、かつ通常用いられる被免疫動物 (マウスまたはラット) に対して異種細胞であるために細胞膜抗原を含み細胞全体が抗原性を有することから、目的抗原に対する十分な免疫応答が得られないことも多い。 40

【非特許文献 1】 Francois Baneyx (Editor), Protein Expression Technologies: Curre 50

nt Status and Future Trends, BIOS Scientific Publishers, April 1, 2004. ; Barry Steven Selinsky (Editor), Membrane Protein Protocols: Expression, Purification, and Characterization., Methods in Molecular Biology, V.228, Clifton, N.J., June 1, 2003

【非特許文献2】Julie P.D. et al., *Immunol* 2002; 107:176-82

【非特許文献3】Maria J. Polyak and Julie P. Deans, *Studies of Existing CD Molecules*:93-95

【非特許文献4】M. S. Cragg et al., *Studies of Existing CD Molecules*:95-97

【非特許文献5】Anderson KC et al., *Blood* 1984; 63:1424-33, Data Sheet: FITC labeled CD20, Medical & Biological Laboratories Co., Ltd.

10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明の課題は、細胞膜表面抗原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の作製法およびそのハイブリドーマを用いる細胞膜表面抗原に対するモノクローナル抗体の作製法を提供することである。また、本発明の別の課題は、細胞膜表面抗原に対して結合する抗体の親和性を測定する方法、および、その測定方法を利用して、細胞膜表面抗原に対して結合する抗体をアッセイまたはスクリーニングする方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

20

【0006】

本発明者らは、CD20抗原を認識する抗体を作製するための免疫方法について試行錯誤を重ねたところ、特定の組み合わせ免疫の方法で、医薬として有用なことが知られている抗体c2B8と競合反応するモノクローナル抗体が得られることを見出した。その免疫方法によれば、得られるクローンのうち、目的とする細胞膜表面抗原に対する抗体を産生するクローンの割合が顕著に増加することが判明した。また、蛍光色素で標識した2次抗体を用いた簡便なアッセイ方法によれば、細胞膜表面抗原とそれに対する抗体との結合親和性を高感度で測定できることが判明した。本発明は、これらの知見に基づき、完成されたものである。

【0007】

30

本発明は、以下のものに関する。

(1) 被免疫動物に複数回免疫することを含む、細胞膜抗原の細胞外ドメインのエピトープを認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを作製する方法であって、免疫の少なくとも1回は、感作抗原として、該抗原を発現する、被免疫動物とは他の目に属する動物に由来する細胞株を用いる免疫であり、かつ、免疫の少なくとも1回は、感作抗原として、遺伝子組換えにより細胞膜表面上に該抗原を発現させた、被免疫動物と同目に属する動物に由来する細胞株を用いる免疫であることを特徴とする、前記方法。

(2) 複数回の免疫のそれぞれが、感作抗原として、該抗原を発現する、被免疫動物とは他の目に属する動物に由来する細胞株を用いる免疫、または、感作抗原として、遺伝子組換えにより細胞膜表面上に該抗原を発現させた、被免疫動物と同目に属する動物に由来する細胞株を用いる免疫である(1)記載の方法。

40

(3) 初回免疫、追加免疫、及び、最終免疫を行うことを含み、初回免疫及び追加免疫が、免疫の少なくとも1回は、感作抗原として、該抗原を発現する、被免疫動物とは他の目に属する動物に由来する細胞株を用いる免疫、及び、免疫の少なくとも1回は、感作抗原として、遺伝子組換えにより細胞膜表面上に該抗原を発現させた、被免疫動物と同目に属する動物に由来する細胞株を用いる免疫のいずれか一方であり、最終免疫が他方である(2)記載の方法。

(4) 細胞膜抗原が正常動物細胞またはライン化した動物細胞株に発現する分子である(1)～(3)のいずれか1項記載の方法。

(5) 細胞膜抗原を発現する正常動物細胞またはライン化した動物細胞株が白血球である

50

(4) 記載の方法。

(6) 細胞膜抗原が膜貫通型分子である(1)～(4)のいずれか1項に記載の方法。

(7) 細胞膜抗原のエピトープを提示する細胞外ドメインが不溶性または可溶化し難い抗原である(1)～(5)のいずれか1項に記載の方法。

(8) 被免疫動物がげっ歯目の動物であり、被免疫動物と同目に属する動物に由来する細胞株がCHO細胞、NSO細胞、または、SP2/o細胞である(1)～(7)のいずれか1項に記載の方法。

(9) (1)～(8)のいずれか1項の方法により作製されたハイブリドーマを用いることを特徴とするモノクローナル抗体の作製方法。

(10) (a) 該抗原を細胞膜表面に提示する浮遊細胞に被測定抗体を結合させ、(b) 10
該細胞の細胞膜表面抗原に結合した被測定抗体と遊離の被測定抗体を分離し、(c) 該細胞の細胞膜表面抗原に結合した被測定抗体に、被測定抗体の抗原認識部位とは異なる部位で被測定抗体に結合する物質であって標識された物質を結合させ、(d) 該細胞の細胞膜表面抗原に結合した被測定抗体に結合した該物質と、遊離の該物質を分離し、(e) 該物質の標識を検出することを含む、被測定抗体と細胞膜表面抗原との結合親和性を測定する方法であって、(b)及び(d)の分離を、それぞれ、遠心分離又は細胞を通さないフィルターにより行うことを特徴とする前記方法。

(11) (b)及び(d)の分離を、遠心分離により行う(10)に記載の方法。

(12) (b)及び(d)の分離を、細胞を通さないフィルターにより行う(10)に記載の方法。 20

(13) 細胞が正常動物細胞、ライン化した動物細胞株または遺伝子操作された動物細胞株である(10)～(12)のいずれか1項に記載の方法。

(14) (10)～(13)のいずれか1項に記載の方法を利用して細胞膜表面抗原に対して結合するモノクローナル抗体をアッセイする方法。

(15) (10)～(13)のいずれか1項に記載の方法を利用して細胞膜表面抗原に対して結合するモノクローナル抗体をスクリーニングする方法。

【発明の効果】

【0008】

本発明のハイブリドーマ作製法によれば、細胞膜表面抗原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を効率よく作製することができる。特に、従来は抗体を作製することが困難であるとされていた、分離精製や単なる遺伝子組換のみではナチュラルな立体構造提示が困難な不溶性または可溶化し難い細胞膜表面抗原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も作製できる。また、このようなハイブリドーマを作製することにより、細胞膜表面抗原に対するモノクローナル抗体を大量作製することができる。 30

【0009】

本発明の測定法によれば、細胞膜表面抗原に対する抗体の親和性を高感度で測定でき、また、これを利用して抗体をアッセイまたはスクリーニングする方法も提供される。本発明の測定法は、特に、一般的な方法では結合親和性測定が困難である細胞膜表面抗原またはその細胞外ドメインのナチュラルなエピトープに対して結合するモノクローナル抗体の親和性の測定に適している。 40

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】 タンパク発現用ベクター pNOWの構造を示す。

【図2】 イメージアナライザーによる測定結果(中間調画像の写真)を示す。

【図3】 飽和曲線を示す。(X軸:添加抗体量(ng)、Y軸:蛍光強度)

【図4】 スキャッチャード解析結果を示す。(X軸:結合量nM、Y軸:結合量 / 遊離量)

【符号の説明】

【0011】

Pcmv: CMVプロモーター

Pabgh: 成長ホルモン遺伝子polyA付加シグナル

Psvd: 改変SV40プロモーター

DHFR: マウスジヒドロ葉酸還元酵素cDNA

Pasv: SV40遺伝子 polyA付加シグナル

PBR322ori: 大腸菌中での複製起点

Amp^r: 大腸菌中での選択マーカー (アンピシリン耐性)

Neo^r: 哺乳動物細胞中での選択マーカー (G418耐性)

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

<1>本発明のハイブリドーマ作製法及びモノクローナル抗体作製法

本発明のハイブリドーマ作製法は、被免疫動物に複数回免疫することを含む、細胞膜抗原の細胞外ドメインのエピトープを認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを作製する方法であって、免疫の少なくとも1回は、感作抗原として、該抗原を発現する、被免疫動物とは他の目に属する動物に由来する細胞株を用いる免疫であり、かつ、免疫の少なくとも一回は、感作抗原として、遺伝子組換により細胞膜表面上に該抗原を発現させた、被免疫動物と同目に属する動物に由来する細胞株を用いる免疫であることを特徴とする。

【0013】

本発明のハイブリドーマ作製法は、被免疫動物の免疫が上記の特定の様式で行われる他は、通常モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの作製法と同様でよい。モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通常には、(1)被免疫動物の免疫、(2)免疫された動物からのリンパ球の調製、(3)親細胞の調製、(4)リンパ球と親細胞の細胞融合、(5)スクリーニング及びクローニングによって作製される。これらのそれぞれのステップの詳細は、たとえばAilsa M. Campbell (著)、大沢 利昭 (訳) 生化学実験法 モノクローナル抗体、東京化学同人、1989年に記載されている。

【0014】

被免疫動物は、特に限定されないが、通常に、抗体の作製に用いられる動物であることが好ましい。このような動物としては、げっ歯類の動物、より具体的には、マウス、ラット、ハムスターなどが挙げられる。

【0015】

被免疫動物の免疫は、通常には、感作抗原の注射(免疫)を複数回行うことにより行われる。これらの複数回の免疫の回数、免疫の間隔、感作抗原の注射量などの各免疫の条件は、被免疫動物の免疫が上記の特定の様式で行われる他は、通常の方法と同様でよい。一般に、3回以上の免疫が行われる場合、最初の免疫を初回免疫、最後の免疫を最終免疫(ブースト)、初回免疫後で最終免疫前の免疫を追加免疫と呼ばれ、それらに適した条件が選択される。

【0016】

本発明のハイブリドーマ作製法においては、免疫の少なくとも1回が、感作抗原として、該抗原を発現する、被免疫動物とは他の目に属する動物に由来する細胞株を用いる免疫であり、かつ、免疫の少なくとも一回が、感作抗原として、遺伝子組換により細胞膜表面上に該抗原を発現させた、被免疫動物と同目に属する動物に由来する細胞株を用いる免疫であればよく、その順序は限定されない。

【0017】

本発明のハイブリドーマ作製法においては、複数回の免疫のそれぞれが、感作抗原として、該抗原を発現する、被免疫動物とは他の目に属する動物に由来する細胞株を用いる免疫、または、感作抗原として、遺伝子組換により細胞膜表面上に該抗原を発現させた、被免疫動物と同目に属する動物に由来する細胞株を用いる免疫であることが好ましい。さらに、初回免疫、追加免疫、及び、最終免疫を行うことを含み、初回免疫及び追加免疫が、免疫の少なくとも1回は、感作抗原として、該抗原を発現する、被免疫動物とは他の目に属する動物に由来する細胞株を用いる免疫、及び、免疫の少なくとも一回は、感作抗原として、遺伝子組換により細胞膜表面上に該抗原を発現させた、被免疫動物と同目に属する

動物に由来する細胞株を用いる免疫のいずれか一方であり、最終免疫が他方であることが好ましい。

【0018】

細胞膜抗原は、特に限定されず、CD20、TNFR (tumor necrosis factor receptor)やTGF- β (腫瘍増殖因子) レセプターなどがあげられる。細胞膜抗原は、正常動物細胞またはライン化した動物細胞株に発現する分子であることが好ましい。細胞膜抗原を発現する正常動物細胞またはライン化した動物細胞株の例としては白血球が挙げられる。

【0019】

本発明のハイブリドーマ作製法では、従来の方法では、モノクローナル抗体の作製が困難であった、細胞膜抗原が膜貫通型分子である場合や、細胞膜抗原のエピトープを提示する細胞外ドメインが不溶性または可溶化し難い抗原である場合でも、そのような抗原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を作製することができる。

10

【0020】

被免疫動物とは他の目に属する動物に由来する細胞株は、標的とする細胞膜抗原を発現する限り、特に限定されず、用いる被免疫動物に応じて選択される。たとえば、被免疫動物がげっ歯類の場合は、ヒト由来の細胞株を用いることができる。たとえば、細胞膜抗原がCD20である場合、ヒト由来細胞株としては、SB細胞、Raji細胞などが挙げられる。

【0021】

被免疫動物とは他の目に属する動物に由来する細胞株における細胞膜抗原の発現量は、多い方が好ましく、たとえば、SDS電気泳動法後CBB染色による染色による検出やウェスタンブロットティング法でその抗原に対する抗体を用いて発現量を検出した場合、 10^7 個の細胞に少なくとも数 μ gの抗原の存在することが望ましい。

20

【0022】

遺伝子組換えにより細胞膜表面上に標的とする細胞膜抗原を発現させた、被免疫動物と同日に属する動物に由来する細胞株は、標的とする細胞膜抗原を発現する限り、特に限定されず、用いる被免疫動物に応じて選択される。たとえば、被免疫動物がげっ歯目の動物である場合、CHO細胞、NSO細胞、SP2/o細胞などが挙げられる。

【0023】

被免疫動物と同目に属する動物に由来する細胞株の細胞膜表面における細胞膜抗原の発現密度は、高いことが好ましく、たとえば、FITC標識モノクローナル抗体で発現細胞を染色した場合、本来その抗原を有する細胞と比べて5倍以上の蛍光強度の検出されることが好ましい。

30

【0024】

たとえば、CD20を発現する組換えCHO細胞(CD20/CHO)はナチュラルなB細胞株に較べてCD20分子を細胞表面に圧倒的に多く提示することが可能であり免疫原として有効である。組換えタンパク発現ベクターの性能に依存するが、CD20全配列をもつpNOWでトランスフェクトしたCD20/CHOの抗原提示は極めて高密度であることが明らかとなっている。このことは、市販のFITC標識抗CD20モノクローナル抗体(DAKO, カタログ番号F0799)を用いた結合反応試験で証明されている。

【0025】

また、本発明により、本発明のハイブリドーマ作製方法により作製されたハイブリドーマを用いることを特徴とするモノクローナル抗体の作製方法も提供される。

40

【0026】

ハイブリドーマを用いてモノクローナル抗体を作製する方法は、本発明のハイブリドーマ作製法で作製されたハイブリドーマを用いることの他は、通常の、モノクローナル抗体の作製の方法と同様でよい。大量作製の場合には、細胞培養による方法、マウスの腹水として作製する方法などが挙げられる。

【0027】

<2>本発明の親和性測定法

本発明の親和性測定法は、(a) 該抗原を細胞膜表面に提示する浮遊細胞に被測定抗体

50

を結合させ、(b) 該細胞の細胞膜表面抗原に結合した被測定抗体と遊離の被測定抗体を分離し、(c) 該細胞の細胞膜表面抗原に結合した被測定抗体に、被測定抗体の抗原認識部位とは異なる部位で被測定抗体に結合する物質であって標識された物質を結合させ、(d) 該細胞の細胞膜表面抗原に結合した被測定抗体に結合した該物質と、遊離の該物質を分離し、(e) 該物質の標識を検出することを含む、被測定抗体と細胞膜表面抗原との結合親和性を測定する方法であって、(b) 及び (d) の分離を、それぞれ、遠心分離又は細胞を通さないフィルターにより行うことを特徴とする。

【0028】

本発明の親和性測定法は、抗原を細胞膜表面に提示する浮遊細胞を用いること、被測定抗体の抗原認識部位とは異なる部位で被測定抗体に結合する物質であって標識された物質を用いること、結合したものと遊離のものとの分離 (B/F分離) を遠心分離又は細胞を通さないフィルターにより行うことの他は、通常の、抗原と抗体との親和性を測定する方法と同様でよいが、浮遊細胞の量は、この測定系において1チューブ当たり 5×10^5 個前後にすることが好ましい。また、抗体を直接RI標識せずに、二次抗体を用いて測定することが可能である。

【0029】

たとえば、被測定抗体の抗原認識部位とは異なる部位で被測定抗体に結合する物質としては、被測定抗体に対する抗体 (たとえば、Fc部位に対する抗体)、プロテインAやプロテインGなどが挙げられる。標識としては、蛍光物質、磁気ビーズなどが挙げられる。

【0030】

本発明の親和性測定法においては、分離方法が同じであることが好ましい。

【0031】

用いる細胞は、標的とする抗原を細胞膜表面に提示する浮遊細胞である限り、特に限定されないが、正常動物細胞、ライン化した動物細胞株または遺伝子操作された動物細胞株であることが好ましい。このような細胞としては、抗原がCD20である場合、Raji細胞などが挙げられる。

【0032】

具体的な手順の例としては、次のものが挙げられる。(1) 浮遊細胞とマウスモノクローナル抗体 (一次抗体) を反応後、(2) 遊離 (フリー) の一次抗体を洗浄および遠心により除去し、(3) 蛍光標識された抗マウス二次抗体を反応させ、(4) 洗浄および遠心により遊離の二次抗体を除去し、その後(5) 細胞に一次抗体を介して結合した二次抗体の蛍光量を蛍光イメージアナライザーで測定する。さらに(6) 用いた蛍光標識二次抗体について濃度と蛍光量を測定することで検量線を作成し、測定値を濃度に換算することで結合した二次抗体量を求め、添加抗体量から結合量を引くことで遊離の抗体量を算出する。

【0033】

より具体的な手順の例としては、以下に記載するステップよりなる方法が挙げられる。

- 1) 細胞膜上の抗原発現量が多い細胞または細胞株を選択し、十分な細胞数が得られるまで培養する。
- 2) 遠心により該細胞を回収し洗浄する。
- 3) 被検モノクローナル抗体又は陽性コントロール抗体を含む溶液中に細胞を懸濁する。
- 4) 一定時間振とう反応させた後、遠心して細胞を回収し、すばやく洗浄する。
- 5) 回収した細胞を蛍光標識二次抗体を含む溶液中に懸濁する。
- 6) 一定時間振とう反応させた後、遠心して細胞を回収し、洗浄する。
- 7) 細胞を再度懸濁して96ウエルプレートのウエルに移し、蛍光強度をイメージアナライザーで検出する。
- 8) 検出後、結合した抗体量とフリーの抗体量を画像から数値化し、スキッチャード・プロットから解離定数 (Kd値) を求める。

【0034】

本方法においては、細胞をホルムアルデヒドなどの架橋剤で固定せずに用いるため、細

胞表面上の立体構造を維持したままの標的とする細胞膜表面抗原とモノクローナル抗体との親和性を測定することが可能である。

【0035】

本発明の親和性測定法を利用して、細胞膜表面抗原に対して結合するモノクローナル抗体をアッセイしたり、細胞膜表面抗原に対して結合するモノクローナル抗体をスクリーニングしたりすることができる。アッセイ及びスクリーニングの方法は、親和性測定法として本発明の親和性測定法を利用する他は、通常の、親和性測定法を利用して、細胞膜表面抗原に対して結合するモノクローナル抗体をアッセイする方法、及び、細胞膜表面抗原に対して結合するモノクローナル抗体をスクリーニングする方法と同様でよい。

【0036】

本発明の効果が得られる理由は、以下の説明によって拘束されるものではないが、以下のように考えられる。

【0037】

感作抗原として、被免疫動物と異種の細胞（該抗原を発現する、被免疫動物とは他の目に属する動物に由来する細胞株）と、同種または近縁種の細胞（遺伝子組換により細胞膜表面上に該抗原を発現させた、被免疫動物と同目に属する動物に由来する細胞株）を組み合わせることによって、標的分子のみの免疫原性が高められるため、標的分子に特異的なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの割合が増加すると思われる。

【0038】

抗体c2B8は、医薬品として有用なことが知られていることから分かるようにナチュラルな状態にあるエピトープを認識すると考えられ、CD20との結合反応においてこの抗体と競合するモノクローナル抗体を産生するクローンが多数得られていることは、本発明の方法における標的分子はナチュラルな状態にあることを示唆している。この利点は、特に、標的とする分子上のエピトープの立体構造を一般的な抗原調製方法では再現し得ない場合に有効である。一般的な抗原調製方法とは、抗原分子を発現している細胞を溶解し、その抗原を分離精製する方法である。ナチュラルな状態の抗原の立体構造は、抗原を細胞表面上に発現させることによって再現できると思われるが、このような抗原を細胞表面上に発現させた細胞を抗原として単に用いるだけでは、目的のモノクローナル抗体を得ることは困難である。上記のような特定の組合せ免疫を用いることにより、このような場合でも、実用的な割合で、目的のモノクローナル抗体が得られるようになると思われる。

【0039】

親和性測定において、浮遊細胞を用いることにより感度が上昇する理由としては、固定化すると固相表面の面積により細胞量が限定される一方、浮遊細胞では細胞数を多くすることができるためと考えられる。また浮遊状態での細胞には表面全体の抗原に抗体が結合可能であるのに対し、固定化すると抗体が結合可能な細胞表面積が減少することも理由の一つである。加えて、細胞を架橋して固相化する場合には、固相化に伴いエピトープが消滅したり、その立体構造が変化したりする可能性があり、ナチュラルな状態の抗原に対する親和性が測定できなかつたり、親和性が低く評価される恐れがあるが、本発明の親和性測定法においてはこのような恐れがない。

【実施例1】

【0040】

不溶性膜表面抗原を有するCD20分子に対するモノクローナル抗体の作製と、得られた抗体の結合親和性の定量的測定を、実施例を参照して説明する。

【0041】

<1>モノクローナル抗体の作製

(1) マウス感作用免疫抗原の準備

まずCD20を発現している代表的なB細胞株であるSB細胞とRaji細胞をin vitroで培養した。

次にMultiple Choice cDNA human spleen, Origene Technologies, Inc. 6 Taft Court Suite 100 Rockville, MD 20850から、CD20の全分子をコードするDNAを特異的なプライ

10

20

30

40

50

マーhCD20-S-GK-Not aatgctggccgcccaccatgacaacacccagaaattc (配列番号1)、及びhCD20-E-Xba gctctagattaaggagagctgtcattttc (配列番号2)を用いてクローニングし、それを哺乳動物細胞用高発現ベクターであるpNOW (特許第3582965号公報、図1)に組み込み、構築されたベクターをCHO細胞にトランスフェクトした。FACS分析により、細胞表面にCD20分子を高発現している組換えCHO細胞 (CD20/CHO細胞) を樹立した。なお、FITC標識抗CD20モノクローナル抗体で染色した場合にSB細胞に比べて蛍光強度が5倍以上のものを高発現しているものとした。

【0042】

(2) 免疫原の調製

SB細胞またはRaji細胞は10% FCS添加RPMI1640培地を用いて培養を行った。

10

CD20/CHO細胞は、G418を800 μ g/ml添加したCHO-S-SFM II培地 (GIBCO、Cat. No. 12052-098) を用いて培養を行った。これらの培養液を遠心分離 (1100rpm、5分) した後、細胞にDulbecco's PBS(-)を加えて懸濁させ再度遠心分離した。この洗浄操作をもう一度繰り返す、細胞に生理食塩水を加えて調製した懸濁液 (1ml当たりの細胞数は1~3 $\times 10^7$ である) を免疫に用いた。

【0043】

(3) 免疫

7~11週令のBalb/c系雌性マウスへ、免疫原の調製液をいずれも腹腔内投与した。使用した免疫原の組み合わせを表1に示した。SB細胞、Raji細胞またはCD20/CHO細胞のうち、いずれか同じ細胞をさまざまな日数間隔で2~3回繰り返して投与した後、最終免疫には異なる細胞を投与した。投与した細胞数はいずれもマウス1匹当たり1~3 $\times 10^7$ 個であった。

20

【0044】

(4) 細胞融合

最終免疫の3日後、2匹のマウスから脾臓細胞を調製し、マウスミエロマ(NS-1)との融合反応をPEG-1500の存在下で行なった。方法は、Oi, V.T. and L.A. Herzenberg, 1980, in: Selected Methods in Cellular Immunology, eds. B. Mishell and S.M. Shiigi (Freeman and Co. San Francisco, CA) p.351. に従った。

【0045】

(5) 1次、2次スクリーニング

30

CD20/CHO細胞またはCHO細胞 (親株) を付着させた96ウエルプレートを用いてCell ELISAを行い、CD20に特異的に反応する抗体を産生しているウエルを選択した。さらに、同じCD20/CHO細胞を付着させた96ウエルプレートを用い、医薬品として有用であることが知られている抗体c2B8 (抗CD20マウスモノクローナル抗体2B8から作製されたヒト・マウスキメラ抗体である) との競合反応を行って、c2B8のエピトープと類似したところに反応する抗体 (ウエル) を選択した。

【0046】

(6) Cell ELISA

Poly-L-Lysineコート96ウエルプレート (旭テクノグラス、Cat.No.11-023-018) に付着させたCD20/CHO細胞またはCHO細胞 (親株) をCell ELISAに用いた。その各ウエルにブロッキング液 (0.2% Gelatine, 0.5% BSAのPBS溶液) を150 μ l入れて37 $^{\circ}$ Cで1時間静置した。150mM NaCl, 0.05% Tween20水溶液を用いてプレートを5回洗浄した後、サンプル (培養上清の希釈液) を各ウエルに100 μ l入れて1次反応を37 $^{\circ}$ Cで1時間行なった。洗浄後、標識抗体の希釈液 [HRP標識抗マウスIgG(H+L) ウサギ抗体 (Jackson Lab. Code No. 315-035-003)、またはHRP標識抗マウスIgG(Fc γ) ウサギ抗体 (Jackson Lab. Code No. 315-035-008)] を各ウエルに100 μ l入れて2次反応を37 $^{\circ}$ Cで1時間行なった。1次、2次の反応液の調製には、ブロッキング液と同じものを用いた。洗浄後、発色液 (OPD) を各ウエルに100 μ l入れ30分後に4N-H₂SO₄を50 μ l加えて反応を停止し、A492を測定した。

40

【0047】

(7) Cell ELISAでの競合反応

50

サンプル（培養上清の希釈液）とキメラ抗体（10~40ng/ml）の混合溶液を調製した。

上記のCell ELISAと同様にブロッキング反応をしたあと、この混合溶液を各ウエルに100 μ l入れて1次反応を37 $^{\circ}$ Cで1時間行なった。洗浄後、標識抗体の希釈液〔HRP標識抗ヒトIgG(H+L)ウサギ抗体（Jackson Lab. Code No. 309-035-082）〕を各ウエルに100 μ l入れて2次反応を37 $^{\circ}$ Cで1時間行なった。洗浄後、発色液（OPD）を各ウエルに100 μ l入れ30分後に4N-H₂SO₄を50 μ l加えて反応を停止し、A492を測定した。

【0048】

標識抗体はキメラ抗体のみに反応するので、1次反応で添加したサンプル中の抗体がキメラ抗体と競合すれば、測定値の低下が認められた。

【0049】

10

（8）クローニング

限界希釈法で行った。細胞を96ウエルプレートに撒いて培養後、1コロニーのウエルの培養上清についてCell ELISAを行い、特異抗体の産生クローンを選択した。

【0050】

（9）精製抗体の調製

特異抗体の産生クローンを10%FCS添加RPMI1640培地で培養し、細胞密度が 5×10^5 /ml前後になった時点で無血清培地ASF-104N（味の素）に培地を交換して培養を行った。その2~4日後に培養液を遠心分離して培養上清を回収したあと、プロテインGカラムを用いて精製を行い、溶出されたモノクローナル抗体溶液を150mM-NaClに対して透析した。0.2 μ mのフィルターでろ過滅菌を行ない、試験抗体（抗ヒトCD20マウスモノクローナル抗体）とした。

20

【0051】

<結果>

免疫方法と、その免疫方法により得られたハイブリドーマのスクリーニングおよびc2B8との競合反応の結果を表1に示す。

【0052】

【表 1】

細胞融合 シリーズ	免疫方法			1次、2次スクリーニング CD20/CHO細胞のCD20に対する特異性		
	初回、追加免疫、回数	最終免疫	免疫マウス数	選択ウェル数		測定ウェル数
				A	B	
1K18	SB細胞、3回	Raji細胞	2	7	2	576
1K20	Raji細胞、3回	SB細胞	2	7	0	576
1K14	SB細胞、2回	CD20/CHO細胞	1	20	9	576
	SB細胞、3回	CD20/CHO細胞	1			
1K17	CD20/CHO細胞、2回	Raji細胞	1	21	>10	576
	CD20/CHO細胞、3回	Raji細胞	1			

選択ウェル数-A : CD20/CHO細胞に反応し、CHO細胞には反応しない抗体を産生したウェル

選択ウェル数-B : 選択ウェル数-Aのうち、対照抗体 (C2B8) との競合反応が認められる抗体を産生したウェル

10

20

30

【0053】

表1に示されるように、ヒト由来細胞 (SB細胞又はRaji細胞) による免疫と、遺伝子組換えによりCD20を発現させた、マウスと同目に属する動物に由来するCHO細胞 (CD20/CHO細胞) による免疫の両方を組み合わせて行った場合、ヒト由来細胞による免疫のみを行った場合と比較してCD20に対する特異抗体の産生細胞が細胞融合によって多く得られることが分かった。また、選択されたクローンの中には、対照抗体c2B8との競合反応の認められる抗体を産生するクローンが多く含まれていた。

【0054】

< 2 > 結合親和性測定

目的とする抗原を細胞表面で発現しているヒトB細胞株由来の浮遊細胞Raji及び、CD20抗原を発現していない細胞としてヒトT細胞株由来の浮遊細胞Jurkatを用いた。共にRPMI1640 (ナカライ、Cat.No.30264-85、Lot L4K2844) に10%ウシ胎仔血清FCS(BIOLOGICAL IND. Cat.No.04-001-1A、Lot 815242、補体成分を非働化するためあらかじめ56度30分加温したもの) を添加した培地で37度CO₂ 濃度5%のCO₂ インキュベーター (SANYO MCO-175M) で培養、週2回の継代により維持した。

40

【0055】

細胞数の測定は、Burker-Turk血球計算盤(エルマ販売(株)Cat.No.03-303-1)を用いて行った。

【0056】

継代後3~4日目のコンフルエントな細胞の培養液を多本架冷却遠心機LX-120 (TOMY)で

50

室温、3000r.p.m.で3分間遠心し、上清を除き、細胞を回収した。ここで用いた回転数と時間は遠心分離と上清除去を繰り返して行っても細胞数が変化しない条件である。細胞の表面に残った培地及びFCSを除くため（洗浄）、回収した細胞をDulbecco's Phosphate Buffered Saline(-) without Ca and Mg [PBS(-)、(NaCl : Wako, Cat.No.191-01665、Na₂HP O₄ : Wako, Cat.No.197-02865、Lot ASF2635、KCl : Wako, Cat.No.163-0334T、Lot CEQ712 2、KH₂PO₄ : Wako, Cat.No.169-0425、Lot ELG7616]で懸濁後、3000 r.p.m.で3分間遠心して上清を除く操作を2回行った。洗浄を終えた細胞を1%BSA (Wako Cat No.013-07492 Lot PKH3483)-PBS溶液で懸濁し、細胞密度を5x10⁶個/mlに調整した。

【0057】

一次抗体として、試験抗体又は陽性コントロール抗体(2B8) 15, 30, 50, 75, 100, 12 10
5, 150, 200 ng (1.5~5 μ l)を各々、1.5mlチューブ（ビーエム機器、BMリングロックチューブ Cat.No.BM-15)に分注し、同時に抗体を入れないチューブも4本用意した。また、各々の試験抗体あたり3点のサンプルを準備した。そこに、1%BSA (Wako Cat No.013-07492 Lot PKH3483)-PBS溶液で懸濁液を100 μ l (細胞数5x10⁵個)ずつ加えて混和し、室温で1時間振とう反応させた。

【0058】

反応後、微量高速冷却遠心機MX-100 (TOMY) で室温、3000 r.p.m. 3分間遠心分離し、細胞を回収後、細胞の表面に残った未反応の一次抗体を除くため200 μ lのPBSで懸濁し、3 000 r.p.m.で3分間遠心し上清を除く操作を2回行った。

【0059】

次に細胞に結合した一次抗体を検出するため、細胞と結合した一次抗体に対して過剰量 (500ng) のFITC標識抗マウスIgG (H&L)二次抗体 [GOAT Anti-mouse IgG(H&L) Fluorescein conjugated, affinity purified Secondary antibody, Chemicon, Cat.No.AP124F、Lot 24021014] 1% BSA-PBS溶液100 μ l (500ng/100 μ l) を上記細胞に添加・懸濁し、遮光、室温のもと1時間振とう反応した。反応後、3000 r.p.m.で3分間遠心し、細胞を回収後、細胞の表面に残った未反応のFITC標識抗マウスIgG (H&L)抗体を除くため、200 μ lのPBSで懸濁し3000 r.p.m.で3分間遠心し上清を除く操作を2回行った。

【0060】

こうして得た細胞を100 μ l PBSで懸濁し、96ウェル平底プレート（住友ベークライトEL ISA PLATE Cat.No.8496F)へ移した。二次抗体の蛍光量をTyphoon9210イメージアナライ 30
ザー (Amersham Bioscience)を用いて、Fluorescence mode, 600v, 526SP/green(532nm)、Focus底面+3mmの検出条件で測定した。この際、FITC標識二次抗体を0, 12.5, 25, 50, 75, 100, 125, 150 ng添加したPBS溶液100 μ lを検量線作成用のコントロールとして用いた。

【0061】

検出後、画像を画像解析ソフトImage Quant (Amersham Bioscience)を使用し、数値化を行った後、Excel (Microsoft)で解析を行った。この際、プレート、PBS溶液、および細胞に非特異的に結合したFITC標識二次抗体に由来するバックグラウンド値として、細胞とFITC標識二次抗体のみを反応させたものの測定値を求め、その4点の平均値を各サンプルの蛍光強度の値から差し引いた。こうして、細胞に結合したFITC標識二次抗体の 40
蛍光量を得た。更に、コントロールとして用いた各濃度のFITC標識二次抗体での蛍光量を測定することで検量線を作成し、細胞に結合している二次抗体の量（モル数または重量）を求めた。各一次抗体とFITC標識二次抗体が1 : 2の割合で反応していると仮定し、結合している一次抗体量を算出した。また遊離の一次抗体量は添加量から結合量を差し引いて求めた。抗体濃度をモル濃度に換算する際、モノクローナル抗体の分子量を150000とした。

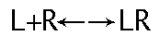
【0062】

添加する一次抗体の増加に伴い結合反応が飽和して蛍光強度が一定量に達することを確認するとともに、細胞表面の抗原数及び解離定数 (Kd値) を算出するため、スキヤッチャード解析 (Scatchard, G.; Ann.N.Y.Acad.Sci., 51: 660-672, 1949、分子生物学研究のための新培養細胞実験法；羊土社、実験医学別冊バイオマニュアルUPシリーズ改訂第2版、21 50

2-217参照)を行った。このとき、数値は各サンプルについて3点の値の平均値を用いた。

【0063】

試験抗体：リガンド (L) と細胞表面抗原：レセプター (R) の結合はリガンド・レセプター複合体 (LR) と次の反応式で示される。



遊離リガンド濃度 [L]、非結合型レセプター濃度 [R]、レセプターと結合したリガンド濃度 [LR] として、平衡下での解離定数Kdは

$$Kd = [L] [R] / [LR] \quad \dots \text{I}$$

用いるリガンドの全量 [L total] は遊離型とレセプターに結合したものの和になる。

$$[L \text{ total}] = [L] + [LR] \quad \dots \text{II}$$

一方、レセプターも総量 [R total] はリガンドに結合していないものと結合したものの和になる。

$$[R \text{ total}] = [R] + [LR] \quad \dots \text{III}$$

このレセプターの数 [R total] (試験抗体の最大結合量) とレセプターとリガンドとの親和性をScatchard解析で推定する。上記I,II,IIIの式を変形、代入すると、

$$[LR] / [L] = -1/Kd [LR] + [R \text{ total}] / Kd$$

[LR] をB (bound)、[L] をF (free) で表し、[R total] をB max (定数) で示すと

$$B / F = -1 / Kd B + Bmax / Kd$$

が得られる。この式はB/Fをy軸にBをx軸にとる一次関数となる。直線の傾きからKd値を得、y切片からBmaxを得ることができる。Kd値は濃度の次元をもち、低い値ほど高い親和性を示す。(結合定数Ka = 1/ Kd)

【0064】

<結果>

陽性コントロール (2B8)、試験抗体A (表1の1K17シリーズのクローン1k1773が産生する抗体) 及び試験抗体B (同じく1K17シリーズの1k1782が産生する抗体) を用いて親和性測定を行った場合の、イメージアナライザー画像を図2に、飽和曲線を図3に、スキヤッチャード (Scatchard) 解析の結果を図4に示す。また、上記スキヤッチャード解析より得られた一次関数の傾きより、解離定数 (Kd値) を求めた。同様の実験を繰り返し行い、得られたKd値 (平均) は以下のとおりであった。

【0065】

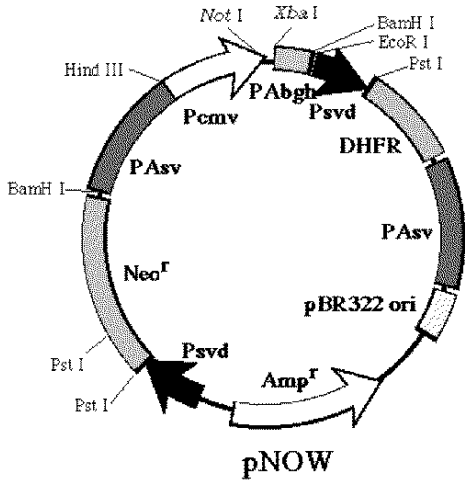
【表2】

被検測定抗体	陽性コントロール 2B8	試験抗体A 1k1773	試験抗体B 1k1782
Kd値 (nM)	6.8	1.3	0.40

【0066】

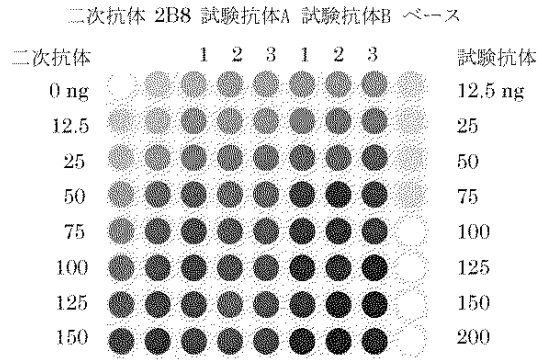
陽性コントロールとして用いた抗体2B8について得られたKd値は6.8nMであった。Mitchell ER et al., Blood 1994; 82:435-445に報告されている2B8のKd値は3.5nMであるので、近似したKd値が本発明の親和性測定法でも得られた。

【図 1】

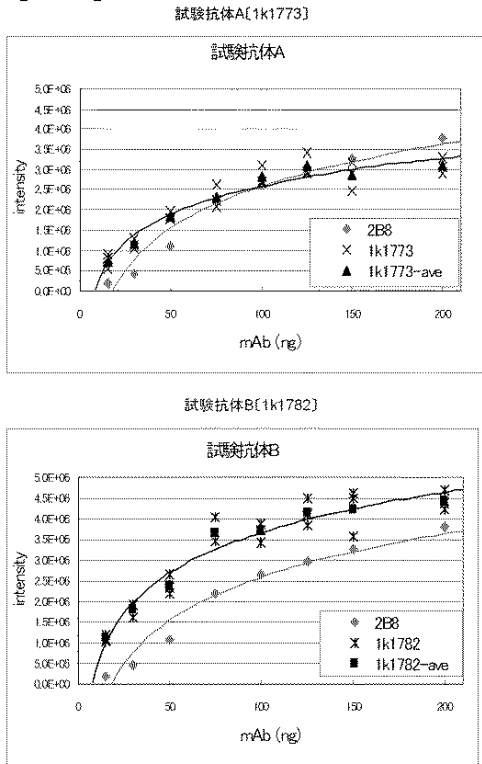


Pcmv: CMVプロモーター
 Pabgh: 成長ホルモン遺伝子polyA付加シグナル
 Psvd: 改変SV40プロモーター
 DHFR: マウスジヒドロ葉酸還元酵素cDNA
 PAsv: SV40遺伝子 polyA付加シグナル
 pBR322ori: 大腸菌中での複製起点
 Amp^r: 大腸菌中での選択マーカー (アンピシリン耐性)
 Neo^r: 哺乳動物細胞中での選択マーカー (G418耐性)

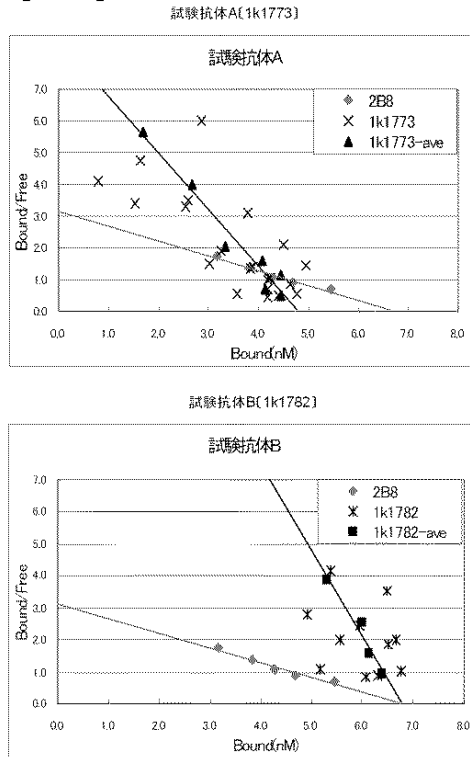
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【配列表】
2006109533000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2006/306001
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N15/02 (2006.01), C12N5/06 (2006.01), C12P21/08 (2006.01), G01N33/566 (2006.01) 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) C12N15/02 (2006.01), C12N5/06 (2006.01), C12P21/08 (2006.01), G01N33/566 (2006.01) 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) CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> A	WO 94/01547 A2 (CETUS ONCOLOGY CORP.), 20 January, 1994 (20.01.94), Full text; particularly, examples 4, 6 & US 5397703 A & EP 651797 A1 & JP 7-509359 A & DE 69333403 A	<u>10-15</u> 1-9
<u>X</u> A	WO 2002/088186 A1 (Kirin Brewery Co., Ltd.), 07 November, 2002 (07.11.02), Full text; particularly, example 4 & US 2003/59427 A1 & EP 1391464 A1 & JP 2002-585483 A	<u>10-15</u> 1-9
<u>X</u> A	WO 00/37503 A1 (RAVEN BIOTECHNOLOGIES, INC.), 29 June, 2000 (29.06.00), Full text; particularly, example 3 & EP 1141026 A1 & US 2004/146990 A1 & JP 2002-538772 A	<u>10-15</u> 1-9
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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 05 June, 2006 (05.06.06)		Date of mailing of the international search report 13 June, 2006 (13.06.06)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/306001

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2005/000901 A2 (DUKE UNIVERSITY), 06 January, 2005 (06.01.05), Full text; particularly, example 1 & EP 1626993 A2	1-9
A	WO 94/11026 A2 (IDEC PHARMACEYTICALS CORP.), 26 May, 1994 (26.05.94), Full text & EP 669836 A1 & DE 69303494 A & US 5736137 A & JP 8-503468 A	1-9
E,X	WO 2005/108989 A2 (GENENTECH, INC.), 17 November, 2005 (17.11.05), Full text (Family: none)	10-15

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 6 / 3 0 6 0 0 1	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/02 (2006.01), C12N5/06 (2006.01), C12P21/08 (2006.01), G01N33/566 (2006.01)			
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 (IPC)) Int.Cl. C12N15/02 (2006.01), C12N5/06 (2006.01), C12P21/08 (2006.01), G01N33/566 (2006.01)			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で利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) CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)			
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、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
X A	WO 94/01547 A2 (CETUS ONCOLOGY CORPORATION) 1994.01.20 文献全体、特に実施例 4 及び 6 参照, & US 5397703 A & EP 651797 A1 & JP 7-509359 A & DE 69333403 A	10-15 1-9	
X A	WO 2002/088186 A1 (麒麟麦酒株式会社) 2002.11.07 文献全体、特に実施例 4 参照, & US 2003/59427 A1 & EP 1391464 A1 & JP 2002-585483 A	10-15 1-9	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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 05.06.2006		国際調査報告の発送日 13.06.2006	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 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) 坂崎 恵美子 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4N 9451

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 6 / 3 0 6 0 0 1
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	WO 00/37503 A1 (RAVEN BIOTECHNOLOGIES, INC.) 2000.06.29 文献全体、特に実施例 3 参照, & EP 1141026 A1 & US 2004/146990 A1 & JP 2002-538772 A	<u>10-15</u> 1-9
A	WO 2005/000901 A2 (DUKE UNIVERSITY) 2005.01.06 文献全体、特に実施例 1 参照, & EP 1626993 A2	1-9
A	WO 94/11026 A2 (IDEC PHARMACEUTICALS CORPORATION) 1994.05.26 文献全体参照, & EP 669836 A1 & DE 69303494 A & US 5736137 A & JP 8-503468 A	1-9
E, X	WO 2005/108989 A2 (GENENTECH, INC.) 2005.11.17 文献全体参照, (ファミリーなし)	10-15

フロントページの続き

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

(74)代理人 100122301

弁理士 富田 憲史

(72)発明者 内山 進

大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内

(72)発明者 福井 希一

大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内

(72)発明者 鈴木 定彦

鳥取県鳥取市湖山町南4丁目101番地 国立大学法人鳥取大学内

(72)発明者 横山 雅美

大阪府大阪市都島区都島本通5-10-28

(72)発明者 臼田 定和

東京都文京区後楽1丁目1番10号 バイオメディクス株式会社内

Fターム(参考) 4B024 AA15 BA53 CA05 CA09 DA02 GA01 HA01 HA15

4B064 AG27 AG31 CA10 CA19 CA20 CC24 CD25 DA13

4B065 AA90 AB04 AC14 BA01 BA08 CA25 CA46

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	制备针对细胞膜表面抗原表位的抗体的方法和测定		
公开(公告)号	JPWO2006109533A1	公开(公告)日	2008-10-23
申请号	JP2007512497	申请日	2006-03-24
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人大阪大学 国立大学法人鸟取大学 生物医药股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人大阪大学 国立大学法人鸟取大学 生物梅迪克斯有限公司		
[标]发明人	内山進 福井希一 鈴木定彦 横山雅美 白田定和		
发明人	内山 進 福井 希一 鈴木 定彦 横山 雅美 白田 定和		
IPC分类号	C12N5/10 C12P21/08 G01N33/53 G01N33/577 C12N15/09		
CPC分类号	C07K16/2887 A61K2039/515 C07K2317/92		
FI分类号	C12N5/00.ZNA.B C12P21/08 G01N33/53.D G01N33/577.B C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA15 4B024/BA53 4B024/CA05 4B024/CA09 4B024/DA02 4B024/GA01 4B024/HA01 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/AG31 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CD25 4B064/DA13 4B065/AA90 4B065/AB04 4B065/AC14 4B065/BA01 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA46		
代理人(译)	田中，三夫 山崎 宏 富田健二		
优先权	2005103072 2005-03-31 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明公开了一种产生能够产生针对细胞膜表面抗原的单克隆抗体的杂交瘤的方法。通过使用杂交瘤生产针对细胞膜表面抗原的单克隆抗体的方法;确定能够结合细胞膜表面抗原的抗体对抗原的亲合力的方法;以及通过利用该测定方法测定或筛选能够结合细胞膜表面抗原的抗体的方法。在用于产生抗体的动物的免疫中,用作为致敏抗原的细菌菌株免疫,所述细胞菌株来源于与可以表达细胞膜表面抗原的免疫动物不同的动物。用作为致敏抗原的细菌来源,通过遗传重组在细胞膜表面表达细胞膜表面抗原的细菌来源于与被免疫动物相同的动物。相互结合。在确定抗体对抗原的亲合力时,使用在细胞膜表面上呈递抗原的漂浮细胞,并且通过离心或在细胞不能通过的过滤器上进行细胞的B / F分离。通过。

細胞融合 シリーズ	免疫方法			1次、2次スクリーニング CD20/CHO細胞のCD20に対する特異性		
	初回、追加免疫、回数	最終免疫	免疫マウス数	選択ウェル数		測定ウェル数
				A	B	
1K18	SB細胞、3回	Raj細胞	2	7	2	576
1K20	Raj細胞、3回	SB細胞	2	7	0	576
1K14	SB細胞、2回	CD20/CHO細胞	1	20	9	576
	SB細胞、3回	CD20/CHO細胞	1			
1K17	CD20/CHO細胞、2回	Raj細胞	1	21	>10	576
	CD20/CHO細胞、3回	Raj細胞	1			

選択ウェル数-A: CD20/CHO細胞に反応し、CHO細胞には反応しない抗体を産生したウェル