

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2018-80114

(P2018-80114A)

(43) 公開日 平成30年5月24日(2018.5.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/40 (2006.01)	C07K 16/40 ZNA	2G045
C12N 15/02 (2006.01)	C12N 15/00 C	4B024
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 D	4B064
GO1N 33/48 (2006.01)	GO1N 33/48 P	4H045
C12P 21/08 (2006.01)	GO1N 33/53 Y	
審査請求 未請求 請求項の数 13 O L (全 18 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2015-110693 (P2015-110693)

(22) 出願日 平成27年5月29日 (2015.5.29)

(71) 出願人 592060271

株式会社アールテック・ウエノ
東京都千代田区内幸町一丁目1番7号

(74) 代理人 100101454

弁理士 山田 卓二

(74) 代理人 100062144

弁理士 青山 稜

(74) 代理人 100106518

弁理士 松谷 道子

(74) 代理人 100138911

弁理士 櫻井 陽子

(72) 発明者 松本 恒平

東京都千代田区内幸町一丁目1番7号 株
株式会社アールテック・ウエノ内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗ヒトVAP-1モノクローナル抗体

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 特異性の高い抗ヒトVAP-1モノクローナル抗体の提供。

【解決手段】 特定の配列を有する重鎖可変領域と軽鎖可変領域を有するモノクローナル抗体、別の特定配列を有する重鎖可変領域と軽鎖可変領域を有するモノクローナル抗体、および別の特定配列を有する重鎖可変領域と軽鎖可変領域を有するモノクローナル抗体から選択される、抗ヒトVAP-1モノクローナル抗体。また、前記抗ヒトVAP-1モノクローナル抗体を用いた免疫学的測定方法、並びに当該測定方法に用いられるキット。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記(1)～(3)いずれかに示される重鎖および軽鎖可変領域の組み合わせを含み、かつヒトVAP-1に対して特異的に結合するモノクローナル抗体またはその抗体断片：

(1)

配列番号1、または配列番号1の配列において1～数個、例えば1～3個のアミノ酸が欠失、置換または付加された配列、もしくは配列番号1と90、91、92、93、94、95、96、97、98、または99%の配列同一性を有する重鎖可変領域、および

配列番号2、または配列番号2の配列において1～数個、例えば1～3個のアミノ酸が欠失、置換または付加された配列、もしくは配列番号2と90、91、92、93、94、95、96、97、98、または99%の配列同一性を有する軽鎖可変領域

10

(2)

配列番号3、または配列番号3の配列において1～数個、例えば1～3個のアミノ酸が欠失、置換または付加された配列、もしくは配列番号3と90、91、92、93、94、95、96、97、98、または99%の配列同一性を有する重鎖可変領域、および

配列番号4、または配列番号4の配列において1～数個、例えば1～3個のアミノ酸が欠失、置換または付加された配列、もしくは配列番号4と90、91、92、93、94、95、96、97、98、または99%の配列同一性を有する軽鎖可変領域

(3)

配列番号5、または配列番号5の配列において1～数個、例えば1～3個のアミノ酸が欠失、置換または付加された配列、もしくは配列番号5と90、91、92、93、94、95、96、97、98、または99%の配列同一性を有する重鎖可変領域、および

配列番号6、または配列番号6の配列において1～数個、例えば1～3個のアミノ酸が欠失、置換または付加された配列、もしくは配列番号6と90、91、92、93、94、95、96、97、98、または99%の配列同一性を有する軽鎖可変領域。

20

【請求項 2】

下記重鎖および軽鎖可変領域を有する、請求項1に記載の抗ヒトVAP-1モノクローナル抗体：

配列番号1からなる重鎖可変領域、および

配列番号2からなる軽鎖可変領域。

30

【請求項 3】

下記重鎖および軽鎖可変領域を有する、請求項1に記載の抗ヒトVAP-1モノクローナル抗体：

配列番号3からなる重鎖可変領域、および

配列番号4からなる軽鎖可変領域。

【請求項 4】

下記重鎖および軽鎖可変領域を有する、請求項1に記載の抗ヒトVAP-1モノクローナル抗体：

配列番号5からなる重鎖可変領域、および

配列番号6からなる軽鎖可変領域。

40

【請求項 5】

マウスモノクローナル抗体である、請求項1～4のいずれかに記載のモノクローナル抗体。

【請求項 6】

受託番号NITE BP-02034、NITE BP-02035およびNITE BP-02036により独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センターに寄託されているハイブリドーマのいずれか1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。

【請求項 7】

受託番号NITE BP-02034、NITE BP-02035およびNITE

50

B P - 0 2 0 3 6 により独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センターに寄託されているハイブリドーマから選択される、ハイブリドーマ。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載のモノクローナル抗体またはその断片の少なくとも 1 つを用いる、ヒト V A P - 1 測定のためのイムノアッセイ方法。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載のモノクローナル抗体またはその断片の少なくとも 1 つおよびイムノアッセイ用試薬を備える、ヒト V A P - 1 測定用イムノアッセイキット。

【請求項 10】

請求項 1 に記載のモノクローナル抗体であって、前記 (1) または前記 (3) に記載の重鎖および軽鎖可変領域アミノ酸配列を有するものを含み、E C A 用である請求項 9 に記載のキット。

10

【請求項 11】

捕捉用モノクローナル抗体として請求項 1 に記載のモノクローナル抗体であって、前記 (1) または前記 (3) に記載の重鎖および軽鎖可変領域アミノ酸配列を有するものを含み、標識抗体として請求項 1 に記載のモノクローナル抗体であって、前記 (2) に記載の重鎖および軽鎖可変領域アミノ酸配列を有するものを含む、サンドイッチ E L I S A 用である請求項 9 に記載のキット。

【請求項 12】

請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載のモノクローナル抗体またはその断片の少なくとも 1 つを用いてヒト V A P - 1 を検出する、免疫組織染色方法。

20

【請求項 13】

請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載のモノクローナル抗体またはその断片の少なくとも 1 つ、および免疫組織染色用試薬を含有する、ヒト V A P - 1 検出のための免疫組織染色用キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は抗ヒト V A P - 1 モノクローナル抗体、当該抗体を用いたヒト V A P - 1 検出用キットに関する。

30

【背景技術】

【0002】

V A P - 1 (V a s c u l a r a d h e s i o n p r o t e i n - 1) は、S S A O (セミカルバジド感受性アミノキシダーゼ) とも呼ばれるタンパク質である。膜結合型の V A P - 1 は血管内皮表面に存在し、遊離型の S S A O は血清中に存在する。前者は白血球 (炎症に関連する顆粒球、炎症や免疫に関連するリンパ球や単球) との接着分子の機能を持ち、主に炎症に関連し、後者はアミノキシダーゼ活性により生体内のアミンの解毒を担う。糖尿病、アトピー性皮膚炎、乾癬、肥満、動脈硬化、心疾患等の患者の血清および種々の組織において V A P - 1 / S S A O 活性の増加が見られるとの報告がある。

【0003】

40

V A P - 1 に関する研究においては V A P - 1 を感度よく検出するための手段の確立が不可欠である。このような手段としては、抗体を用いて V A P - 1 を捕捉して活性を測定する系 (以下、E C A (E n z y m e C a p t u r e A s s a y) とする) が考えられる。発明者らは、既存の抗 V A P - 1 抗体を用いて評価した結果、抗 V A P - 1 ヤギポリクローナル抗体 (R & D 社、カタログ番号 : A F 3 9 5 7) のみが E C A として利用可能であることが分かった (後述の比較例を参照) 。しかし、ポリクローナル抗体にはロット差の問題があり、安定供給のリスクがある。また、ポリクローナル抗体の継続的な作製のためにはコストの問題がある。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

50

【 0 0 0 4 】

かかる問題は特異的反応性の高いモノクローナル抗体を用いることによって解消することができる。

本願は、ヒトVAP-1に高い特異性を有するモノクローナル抗体を提供することを目的とする。本願はまた、ヒトVAP-1を正確かつ効率よく、安定して測定可能なヒトVAP-1検出方法並びに当該方法に用いられるキットを提供することを目的とする。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 5 】

本願発明は、下記の(1)~(3)から選択される重鎖および軽鎖可変領域アミノ酸配列の組み合わせを有する抗ヒトVAP-1モノクローナル抗体またはその抗体断片を提供する：

(1) 1 G 3 重鎖

MGWSCIIILFLVATATGVHSQVQLQQPGAELVRPGSSVKLSCKASGHTFTSYWINWVKQRPGQGLEWIGNIYPSDSYTNYNQKFKDTATLTVDKSSSSAYMQLSSPTSSEDSAVYYCTRSHYSSSPDYWGQGTTLTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLG (配列番号 1) 、

1 G 3 軽鎖

MESQTQVFVYMLLWLSGVDGDIVMTQSREFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGANVAWYQQKPGQSPKALIYSASYRYSYGVPRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFCLQYNSFPLTFGSGTKLEIKRADAAPTVISFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINV (配列番号 2) 、

【 0 0 0 6 】

(2) 3 F 1 0 重鎖

MECNWILPFIILSVTSGVYSEVQLQQSGTVLARPGASVKMSCKASGYTFNTFWMHWVKQRPGKGLEWIGAIIYPGNSDITTYQKFKGKAKLTAVTSTSTAYMELSSLTNEDSAVYYCTIYYASSHFDSWGQGTTLTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLG (配列番号 3) 、

3 F 1 0 軽鎖

MDFHVQIFSFMLISVTVILSSGEIVLTQSPALMAASPGEKVTITCSVSSSISSSNLHWYQQKSETSPKPWIYGTSNLASGVPRFSGSGSGTSYSLTISMEAEADAATYYCQQWSTYPLTFGAGTKLELKRADAAPTVISFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINV (配列番号 4) 、

【 0 0 0 7 】

(3) 3 G 6 重鎖

MEWPCIFLFLLSVTEGVHSQVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYTFSSYWNWVKQRPGQGLEWIGQIYPGDGDITNQNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARSDYDYGSGMDYWGQGTSTVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDITGSSVTLG (配列番号 5) 、

3 G 6 軽鎖

MVFTPQILGLMLFWISASRGDIVLIQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQSI SNYLHWYQQKSHESPRLLIKYASQISGIPSRFSGSGSGTDFTLINSLETEDFGMYFCQQSYWPHTFGGGTKLEIKRADAAPTVISFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINV (配列番号 6)

【 0 0 0 8 】

本願はまた、各重鎖および/または軽鎖のアミノ酸配列に対して1または数個、例えば1, 2または3個のアミノ酸が欠失、置換、または付加されたアミノ酸配列を有する重鎖および/または軽鎖を有し、かつヒトVAP-1に特異的に結合する抗ヒトVAP-1モノクローナル抗体またはその抗体断片を提供する。

【 0 0 0 9 】

本願はまた、各重鎖および/または軽鎖のアミノ酸配列に対して90、91、92、93、94、95、96、97、98、または99%の同一性を有するアミノ酸配列を有する重鎖および/または軽鎖可変領域を有し、かつヒトVAP-1に特異的に結合する抗ヒトVAP-1モノクローナル抗体またはその抗体断片を提供する。

【 0 0 1 0 】

さらに、上記抗ヒトVAP-1モノクローナル抗体またはその抗体断片のアミノ酸配列をコードする核酸配列を有するDNAを提供する。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 1 】

本願はさらに、受託番号 N I T E B P - 0 2 0 3 4、N I T E B P - 0 2 0 3 5 および N I T E B P - 0 2 0 3 6 とし て 寄 託 さ れ て い る ハ イ ブ リ ド - マ な ら び に 当 該 ハ イ ブ リ ド - マ が 産 生 す る モ ノ ク ロ - ナ ル 抗 体 を 提 供 す る。

【 0 0 1 2 】

他 の 態 様 と し て、本 願 は 上 記 モ ノ ク ロ - ナ ル 抗 体 ま た は そ の 抗 体 断 片 の 1 ま た は 2 種 類 を 用 い て ヒ ト V A P - 1 を 測 定 す る、イ ム ノ ア ッ セ イ 法 を 提 供 す る。

【 0 0 1 3 】

他 の 態 様 と し て、本 願 は 上 記 モ ノ ク ロ - ナ ル 抗 体 ま た は そ の 抗 体 断 片 の 1 ま た は 2 種 類 と 共 に イ ム ノ ア ッ セ イ 用 プ レ ー ト、お よ び イ ム ノ ア ッ セ イ 用 試 薬 を 含 む V A P - 1 検 出 用 イ ム ノ ア ッ セ イ 用 キ ャ ッ ト を 提 供 す る。本 願 の キ ャ ッ ト と し て は、E C A ア ッ セ イ (E n z y m e C a p t u r e A s s a y) お よ び E L I S A ア ッ セ イ 用 キ ャ ッ ト が 例 示 さ れ る。

10

【 0 0 1 4 】

別 の 態 様 に お い て、本 願 は 上 記 モ ノ ク ロ - ナ ル 抗 体 を 含 有 す る、ヒ ト V A P - 1 検 出 用 免 疫 組 織 染 色 用 組 成 物 を 提 供 す る。本 発 明 は ま た、そ の 組 成 物 を 利 用 し た 免 疫 組 織 染 色 用 キ ャ ッ ト を 提 供 す る。

【 発 明 の 効 果 】

【 0 0 1 5 】

本 願 の モ ノ ク ロ - ナ ル 抗 体 は ヒ ト V A P - 1 に 対 し て 高 い 特 異 性 並 び に 結 合 力 を 有 し て お り、イ ム ノ ア ッ セ イ 用 抗 体 と し て 好 適 に 用 い る こ と が で き る。

20

【 図 面 の 簡 単 な 説 明 】

【 0 0 1 6 】

【 図 1 - 1 】 図 1 - 1 は、実 施 例 1 で 得 た 各 ハ イ ブ リ ド - マ の 培 養 上 清 の 力 価 を、H T G - V A P - 1 を 固 相 化 し た 抗 原 E L I S A 法 に よ り 測 定 し た 結 果 を 示 す。

【 図 1 - 2 】 図 1 - 2 は、実 施 例 1 で 得 た 各 ハ イ ブ リ ド - マ の 培 養 上 清 か ら 精 製 し た モ ノ ク ロ - ナ ル 抗 体 の 力 価 を、H T G - V A P - 1 を 固 相 化 し た 抗 原 E L I S A 法 に よ り 測 定 し た 結 果 を 示 す。

【 図 2 - 1 】 図 2 - 1 は、比 較 例 と し て 用 い た 抗 ヒ ト V A P - 1 ヤ ギ ポ リ ク ロ - ナ ル 抗 体 の E C A 法 に お け る 性 能 を 示 す 図 を 示 す。

【 図 2 - 2 】 図 2 - 2 は、抗 ヒ ト V A P - 1 マ ウ ス モ ノ ク ロ - ナ ル 抗 体 1 G 3 の E C A 法 に お け る 性 能 を 示 す (実 施 例 2) 。

30

【 図 2 - 3 】 図 2 - 3 は、抗 ヒ ト V A P - 1 マ ウ ス モ ノ ク ロ - ナ ル 抗 体 3 F 1 0 の E C A 法 に お け る 性 能 を 示 す (実 施 例 2) 。

【 図 2 - 4 】 図 2 - 4 は、抗 ヒ ト V A P - 1 マ ウ ス モ ノ ク ロ - ナ ル 抗 体 3 G 6 の E C A 法 に お け る 性 能 を 示 す (実 施 例 2) 。

【 図 3 - 1 】 図 3 - 1 は、抗 ヒ ト V A P - 1 マ ウ ス モ ノ ク ロ - ナ ル 抗 体 1 G 3 の E C A ア ッ セ イ に お け る 抗 体 感 作 濃 度 の 違 い に よ る 感 度 を 検 討 し た 結 果 を 示 す グ ラ フ (実 施 例 2、5 μ g / m l) を 示 す。

【 図 3 - 2 】 図 3 - 2 は、抗 ヒ ト V A P - 1 マ ウ ス モ ノ ク ロ - ナ ル 抗 体 1 G 3 の E C A ア ッ セ イ に お け る 抗 体 感 作 濃 度 の 違 い に よ る 感 度 を 検 討 し た 結 果 を 示 す グ ラ フ (実 施 例 2、1 0 μ g / m l) を 示 す。

40

【 図 3 - 3 】 図 3 - 3 は、抗 ヒ ト V A P - 1 マ ウ ス モ ノ ク ロ - ナ ル 抗 体 1 G 3 の E C A ア ッ セ イ に お け る 抗 体 感 作 濃 度 の 違 い に よ る 感 度 を 検 討 し た 結 果 を 示 す グ ラ フ (実 施 例 2、2 0 μ g / m l) を 示 す。

【 図 4 - 1 】 図 4 - 1 は、抗 ヒ ト V A P - 1 モ ノ ク ロ - ナ ル 抗 体 1 G 3 を 捕 捉 抗 体 と し て プ レ ー ト に 感 作 し、ビ オ チ ン 化 し た モ ノ ク ロ - ナ ル 抗 体 1 G 3、3 F 1 0、3 G 6 並 び に T K 8 - 1 4 を 標 識 抗 体 と し て 用 い て 健 常 人 血 清 中 の V A P - 1 並 び に H T G - V A P - 1 に 対 す る E L I S A サ ン ド イ ャ ッ ア ッ セ イ を 行 っ た 結 果 を 示 す。

【 図 4 - 2 】 図 4 - 2 は、抗 ヒ ト V A P - 1 モ ノ ク ロ - ナ ル 抗 体 3 F 1 0 を 捕 捉 用 抗 体 と し て プ レ ー ト に 感 作 し、ビ オ チ ン 化 し た モ ノ ク ロ - ナ ル 抗 体 1 G 3、3 F 1 0、3 G 6 並

50

びにTK8-14をdetectorとして用いて健常人血清中のVAP-1並びにHTG-VAP-1に対するELISAサンドイッチアッセイを行った結果を示す。

【図4-3】図4-3は、抗ヒトVAP-1モノクローナル抗体3G6を捕捉用抗体としてプレートに感作し、ビオチン化したモノクローナル抗体1G3、3F10、3G6並びにTK8-14を標識抗体として用いて健常人血清中のVAP-1並びにHTG-VAP-1に対するELISAサンドイッチアッセイを行った結果を示す。

【図4-4】図4-4は、抗ヒスタグモノクローナル抗体を捕捉用抗体としてプレートに感作し、ビオチン化したモノクローナル抗体1G3、3F10、3G6並びにTK8-14を標識抗体として用いて健常人血清中のVAP-1並びにHTG-VAP-1に対するELISAサンドイッチアッセイを行った結果を示す。

【図5-1】図5-1は、抗ヒトVAP-1モノクローナル抗体1G3または3G6を捕捉用抗体としてプレートに感作し、ビオチン標識化した3F10抗体を標識抗体として用いて、HTG-VAP-1のELISAサンドイッチアッセイを行った結果を示す。

【図5-2】図5-2は、抗ヒトVAP-1モノクローナル抗体1G3または3G6を捕捉用抗体としてプレートに感作し、ビオチン標識化した3F10抗体を標識抗体として用いて、健常人血清中のVAP-1に対するELISAサンドイッチアッセイを行った結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0017】

本発明は、抗ヒトVAP-1モノクローナル抗体またはその抗体断片を提供する。

本願のモノクローナル抗体は、下記(1)～(3)いずれかに示される重鎖および軽鎖可変領域の組み合わせを含み、かつヒトVAP-1に対して特異的に結合する抗体を含む：

(1)

配列番号1、または配列番号1の配列において1～数個、例えば1～3個のアミノ酸が欠失、置換または付加された配列、もしくは配列番号1と90、91、92、93、94、95、96、97、98、または99%の配列同一性を有する重鎖可変領域、および

配列番号2、または配列番号2の配列において1～数個、例えば1～3個のアミノ酸が欠失、置換または付加された配列、もしくは配列番号2と90、91、92、93、94、95、96、97、98、または99%の配列同一性を有する軽鎖可変領域

【0018】

(2)

配列番号3、または配列番号3の配列において1～数個、例えば1～3個のアミノ酸が欠失、置換または付加された配列、もしくは配列番号3と90、91、92、93、94、95、96、97、98、または99%の配列同一性を有する重鎖可変領域、および

配列番号4、または配列番号4の配列において1～数個、例えば1～3個のアミノ酸が欠失、置換または付加された配列、もしくは配列番号4と90、91、92、93、94、95、96、97、98、または99%の配列同一性を有する軽鎖可変領域

【0019】

(3)

配列番号5、または配列番号5の配列において1～数個、例えば1～3個のアミノ酸が欠失、置換または付加された配列、もしくは配列番号5と90、91、92、93、94、95、96、97、98、または99%の配列同一性を有する重鎖可変領域、および

配列番号6、または配列番号6の配列において1～数個、例えば1～3個のアミノ酸が欠失、置換または付加された配列、もしくは配列番号6と90、91、92、93、94、95、96、97、98、または99%の配列同一性を有する軽鎖可変領域。

【0020】

本明細書における「抗ヒトVAP-1モノクローナル抗体」は、ヒトVAP-1に結合する抗体を意味する。抗体の種は特に限定されず、例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ヒト由来の抗体が挙げられる。モノクローナル抗体には、キメラ抗体およびヒト化抗

10

20

30

40

50

体が含まれる。本願のモノクローナル抗体のイムノグロブリンクラスは特に限定されない。

【0021】

「配列同一性」は、比較対象の配列の全領域にわたって、最適な状態にアラインメントされた2つの配列を比較することにより決定される。ここで、比較対象の配列は、2つの配列の最適なアラインメントにおいて、付加または欠失（例えばギャップ等）を有していてもよい。配列同一性は、公共のデータベース（例えば、DDBJ（<http://www.ddbj.nig.ac.jp>））で提供されるFASTA、BLAST、CLUSTAL W等のプログラムを用いて算出することができる。あるいは、市販の配列解析ソフトウェア（例えば、Vector NTI（登録商標）ソフトウェア、GENETYX（登録商標）ver.12）を用いて求めることもできる。

10

【0022】

「抗体断片」は、抗原と特異的に結合する抗体の一部である。抗体の断片には、Fab（fragment of antigen binding）、F(ab')₂、Fab'、一本鎖抗体（single chain Fv）、ジスルフィド安定化抗体（disulfide stabilized Fv）、2量体V領域断片、CDRを含むペプチド等を挙げることができる（エキスパート・オピニオン・オン・セラピューティック・パテント、第6巻、第5号、第441～456頁、1996年）。抗体および抗体の断片は、当業界にて周知の方法により調製可能である（例えば、Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988、<http://www.gene.mie-u.ac.jp/Protocol/Original/Antibody.html>、米国特許第6331415号、米国特許第5693761号、米国特許第5225539号、米国特許第5981175号、米国特許第5612205号、米国特許第5814318号、米国特許第5545806号、米国特許第7145056号、米国特許第6492160号、米国特許第5871907号、米国特許第5733743号）。

20

【0023】

本願によって、モノクローナル抗体のいずれかを分泌するハイブリドーマが提供される。発明者らは、このようなハイブリドーマを、2015年4月17日（原寄託日）に独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター（千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 112号室）に国際寄託した。具体的には、モノクローナル抗体3F10、1G3、3G6それぞれを産生するハイブリドーマをVAP-1 CL.AF-3F10H7A11H9、VAP-1 CL.AF-1G3G5H2H1、VAP-1 CL.AF-3G6G7A5G8と名付け、上述の特許微生物寄託センターに寄託し、それぞれ受託番号NITE BP-02034、NITE BP-02035およびNITE BP-02036を得た。

30

【0024】

本願の抗体は、上記ハイブリドーマを常法により培養することによって、培養上清中に分泌される。培養上清を、プロテインAアフィニティーカラムを用いる精製法など、従来から使用されている精製法により単離、精製して用いることができる。

【0025】

本願のモノクローナル抗体またはその断片はまた、本願の特定の重鎖および軽鎖可変領域を含む抗体をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを細胞に導入して発現させることにより、得ることができる。具体的には、抗体またはその断片をコードする配列がエンハンサーやプロモーターなどの発現制御領域のもとで発現するよう発現ベクターを構築し、この発現ベクターで宿主細胞を形質転換して、抗体を発現させる。

40

【0026】

宿主細胞としては、例えば、動物細胞、植物細胞、真菌細胞などの真核細胞を用いることができる。動物細胞としては、哺乳類細胞（例えば、CHO、COS、NIH3T3、ミエローマ、BHK（baby hamster kidney）、HeLa、Vero）、両生類細胞（例えばアフリカツメガエル卵母細胞）、または昆虫細胞（例えば、Sf9、Sf21、Tn5）が挙げられる。真菌細胞としては、酵母（例えば、サッカロミセス（*Saccharomyces*）属、例えば、サッカロミセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*））、糸状菌（例えば、アスペルギルス（*Aspergillus*）

50

s) 属、例えば、アスペルギルス・ニガー (Aspergillus niger)) などが挙げられる。また、大腸菌 (E. coli) (例えば、JM109、DH5、HB101等)、枯草菌などの原核細胞を宿主細胞として用いることもできる。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、エレクトロポレーション法、リポフェクションなどの方法により行うことができる。

【0027】

本願のモノクローナル抗体またはその断片は、ヒトVAP-1に高い特異性を持って結合する。本発明のモノクローナル抗体またはその断片は、生体試料中のヒトVAP-1を検出するためのイムノアッセイに好適に用いられる。イムノアッセイとしては、抗原抗体反応を利用するアッセイ法全般を含み、例えばECA (Enzyme Capture Assay) 法、ELISA法、ラジオイムノアッセイ、蛍光抗体法などが例示される。なお、本願明細書および請求の範囲において、「Enzyme Capture Assay (ECA) 法」とは、固定化した抗体により目的の酵素を捕捉し、捕捉された酵素の活性を測定することによって捕捉された酵素の検出および/または定量を行う方法を意味する。

10

【0028】

本願はまた、本願の抗体またはその断片を1以上と、イムノアッセイ用試薬を含む、ヒトVAP-1測定用キットを提供する。抗体は必要に応じて標識されていてもよい。イムノアッセイ用試薬は公知であり、目的とするアッセイ方法によって適宜選択すればよい。

【0029】

ECAキットである場合、本願のモノクローナル抗体の1G3または3G6またはその抗体断片、プレート、ブロッキング溶液 (例えば、ウシ血清アルブミン (BSA) 溶液、乳蛋白質溶液等) ; 洗浄液 (界面活性剤を含むリン酸緩衝液 (例えば、Tween 20を含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS))) ; VAP-1基質 (例えばベンジルアミン)、および発色基質 (例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP)) を含むキットが例示される。本願のモノクローナル抗体またはその抗体断片はプレートに固相化した状態で提供されてもよい。

20

【0030】

サンドイッチELISA用キットの場合は、捕捉用抗体として本願のモノクローナル抗体またはその抗体断片のいずれか1つと、標識抗体として標識化した本願モノクローナル抗体またはその抗体断片の他の1つを含む。併せて、プレート、ブロッキング溶液、洗浄液、および発色基質を含むキットが例示される。抗体の標識は、例えば、HRP、ビオチンなどを用いることができる。ビオチンを用いる場合はビオチンに特異的に結合するアビジンを、シグナルを発する物質で標識してもよい。

30

【0031】

サンドイッチELISAの捕捉用抗体として1G3または3G6を用い、標識抗体を3F10とする組み合わせとすると、特に感度良い測定が可能である。捕捉用抗体が3G6、標識用抗体が3F10とする組み合わせがより好適に用いられる。

【0032】

本発明の抗ヒトVAP-1モノクローナル抗体はVAP-1検出のための免疫組織染色用抗体としても好適に用いられる。免疫組織染色は、確立された技術であり、本願のモノクローナル抗体を使用することを除いては、公知の方法に基づいて行うことが可能である。

40

【0033】

具体的には、免疫組織染色は、例えば以下のように行うことができる。生体組織を凍結切片として薄切、又は固定後パラフィン包埋したブロックから薄切し、組織切片を作製する。組織切片上に本願の抗ヒトVAP-1モノクローナル抗体を反応させる。この抗体を、シグナルを発する物質で標識しておくことにより、VAP-1の発現を組織切片上において可視化し、検出することができる。また、抗VAP-1抗体を標識せずに、抗VAP-1抗体に対する第2抗体を、シグナルを発する物質で標識してもよい。

【0034】

50

組織の可視化の方法としては、ジアミノベンジン染色法、蛍光抗体法（蛍光色素により標識した抗体を調製して、抗原抗体反応後にその蛍光色素の励起波長を照射して蛍光発症させ方法）などが挙げられるが、これらに限定されない

【0035】

従って、本発明は上記抗ヒトVAP-1モノクローナル抗体またはその断片と、免疫組織染色用試薬を含むヒトVAP-1検出のための免疫組織染色用キットを提供する。本発明のキットには、例えば標識された本発明の抗ヒトVAP-1モノクローナル抗体またはその断片並びに発色基質を含むもの、および、本発明の抗ヒトVAP-1モノクローナル抗体と、標識した二次抗体並びに発色試薬を有しているものが例示される。

【実施例1】

【0036】

（モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの樹立）

TALONカラムにて精製したHisタグ付加組み換えヒトVAP-1タンパク質（HTG-VAP-1）を免疫原として用いた。VAP-1タンパク質をフロイントアジュバントと混和し、マウス（Balb/c, メス）4匹へ免疫をおこなった。2週間隔で3回免疫した後、脾臓もしくはリンパ節から血球細胞を分離した。分離した血球細胞はマウスミエローマ細胞P3U1とPEG法により細胞融合させた。融合細胞は96穴プレートに分注し、コロニーが形成されるまで培養をおこなった。

コロニー形成が観察された時点で、96穴プレートの各ウェルの細胞培養上清を用いて、ECA法およびサンドイッチELISA法によるスクリーニングをおこなった。

【0037】

（ECA法によるスクリーニング）

プレート固相抗体：抗マウスIgG抗体

捕捉用抗体：各ウェルの細胞培養上清（モノクローナル抗体が含まれている）

測定検体：HTG-VAP-1および健常人血清

測定手順：抗マウスIgG抗体を96穴プレートの各ウェル上に固定化した。次いで各培養上清を各ウェルへ添加して培養上清中に含まれる抗体を固定化抗マウスIgG抗体に結合させることによって、培養上清中の抗体をウェルに結合させた。その後、抗体液を除去し、PBS/0.13% Tween 20でウェルを洗浄してスクリーニング用ECAキットを得た。

【0038】

（ECA法による測定）

スクリーニング用ECAキットの96穴プレートの各ウェルに100 μ lの健常人血清（2倍希釈）を加えて、室温で1時間反応させ、血清中に含まれるVAP-1をウェルに結合した抗体へ結合させた。次に、各ウェルを緩衝液で洗浄し、そこにVAP-1の基質となるベンジルアミン（2mM）と蛍光物質前駆体ADHP（400 μ M）、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP；2U/ml）を含む反応液100 μ lを加えて、室温で3時間反応させた。VAP-1がベンジルアミンを酸化することにより生じる過酸化水素が、ADHPと反応することにより生じる蛍光物質レゾルフィンの蛍光強度を、蛍光プレートリーダーを用いて測定する。この蛍光強度から、蛍光物質レゾルフィン量を決定した。このレゾルフィン量を反応時間で除算することで、VAP-1の酵素活性を得た。

VAP-1の酵素活性が認められた培養上清を特定した。

【0039】

（サンドイッチELISA法によるスクリーニング）

プレート固相（捕捉）抗体：抗VAP-1ヤギポリクローナル抗体（R&D社, カタログ番号：AF3957）

測定用抗原：HTG-VAP-1タンパク質および健常人血清（2倍希釈）

検出用抗体：各ウェルの細胞培養上清（モノクローナル抗体が含まれている）

2次抗体：抗マウスIgG抗体（西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）で標識）

測定手順：96穴プレートの各ウェルに捕捉用抗体を固定した。補足用抗体と測定用抗

10

20

30

40

50

原を反応させた後、96穴プレートの各ウェルへ細胞培養上清をそれぞれ添加した。培養上清中の抗体を抗原へ結合させた後、洗浄し、次いで検出用抗体を各ウェルに添加した。検出用抗体により抗原をサンドイッチできる抗体が含まれている細胞培養上清を特定した。

【0040】

両スクリーニングのどちらかにおいて陽性となった96穴プレートの各ウェルについて3～4回、限界希釈法によりクローニングをおこない、最終的にモノクローナル抗体産生細胞（ハイブリドーマ）を3クローン（1G3、3F10および3G6）樹立した。

【0041】

得られた各クローンは2015年4月17日（原寄託日）に独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センター（千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 112号室）に国際寄託した。クローン3F10、1G3、3G6の受託番号はそれぞれNITE BP-02034、NITE BP-02035およびNITE BP-02036である。

10

【0042】

（ハイブリドーマ培養上清からのモノクローナル抗体の精製）

樹立したハイブリドーマ3クローンを小スケールで培養し、培養上清を100mlずつ回収した。培養上清よりプロテインAアフィニティーカラムを用いて各抗ヒトVAP-1モノクローナル抗体の精製をおこなった。結果を表1に示す。

【0043】

20

【表1】

クローン	原料培養上清 (ml)	精製抗体濃度 (mg/ml)	精製抗体収量 (mg)
1G3	100	1.15	2.3
3F10	100	0.56	1.12
3G6	100	0.68	1.36

30

【0044】

精製されたモノクローナル抗体の吸光度から収量を算出した結果、100mlの培養上清からクローン1G3は2.3mg、クローン3F10は1.12mg、クローン3G6は1.36mgであった（表1）。

【0045】

精製されたモノクローナル抗体の重鎖および軽鎖の可変領域の配列を常套法に従って確認した。各可変領域の配列は、下記のとおりである：

1G3 重鎖 配列番号1、軽鎖 配列番号2
 3F10 重鎖 配列番号3、軽鎖 配列番号4
 3G6 重鎖 配列番号5、軽鎖 配列番号6

40

また、軽鎖のクラスはいずれも であった。

【0046】

（モノクローナル抗体の力価）

免疫原であるHTG-VAP-1に対する各モノクローナル抗体の力価を、抗原であるHTG-VAP-1を固相化した抗原ELISA法により確認した。

まず、力価測定用のプレートを作製した。HTG-VAP-1をPBSで希釈し10μg/mlとした。それを96穴プレートへ100μlずつ添加し、4で1晩静置して抗原をウェル上に感作させた。上記で添加した溶液を除去してブロッキング液（PBS/1

50

% B S A) を 2 0 0 μ l ずつ添加し、再び 4 で 1 晩静置した後に、ブロッキング液を除去し、室温で 6 時間放置して完全にブロッキング液を乾燥除去した。

【 0 0 4 7 】

培養上清 (図 1 - 1 参照) および精製した抗体 (図 1 - 2 参照) を所定濃度に希釈し、 1 0 0 μ l / ウェルずつ添加して次に、抗体希釈液で 1 0 0 0 倍に希釈した H R P 標識 2 次抗体を 1 0 0 μ l ずつウェルへ添加し、室温で 1 時間反応させ、ウェル上の捕捉された抗体と結合させた。室温で 1 時間反応させたのち、未結合の抗体を除去後、洗浄液 (P B S / 0 . 1 3 % T w e e n 2 0) でウェルを洗浄した。

【 0 0 4 8 】

次に、H R P に対する基質溶液を加えることで発色反応を起こさせ、発色反応停止後、吸光度 A 4 5 0 を測定した。精製抗体は、精製の原料である細胞培養上清とほぼ同じ強さを持つことが確認できた (図 1 - 1、図 1 - 2)。以上より、培養上清からプロテイン A アフィニティーカラムを用いることで、失活などの問題なく、これらのモノクローナル抗体を精製できることが確認された。

10

【 実施例 2 】

【 0 0 4 9 】

(E C A 用抗体としての評価)

実施例 1 で得た精製した抗ヒト V A P - 1 モノクローナル抗体の各々を、9 6 穴プレートへ直接感作し、E C A 法において使用可能であるかどうかを検討した。測定対象として健常人血清 (2 倍希釈) を用いた。健常人血清には V A P - 1 が含まれている。

20

【 0 0 5 0 】

(抗ヒト V A P - 1 モノクローナル抗体を用いた E C A キットの作製)

抗ヒト V A P - 1 モノクローナル抗体の各々を P B S で希釈し 2 μ g / m l とした。それを 9 6 穴プレートへ 1 0 0 μ l ずつ添加し、4 で 1 晩静置して抗体をウェル上に結合させた。抗体液を除去してブロッキング液 (P B S / 1 % B S A) を 2 0 0 μ l ずつ添加し、再び 4 で 1 晩静置した後に、ブロッキング液を除去し、室温で 6 時間放置して完全にブロッキング液を乾燥除去して試験用 E C A キットを得た。

【 0 0 5 1 】

(比較例 : 抗 V A P - 1 ヤギポリクローナル抗体の E C A キット (試作 E C A キット) の作製)

30

抗 V A P - 1 ヤギポリクローナル抗体 (R & D 社 , カタログ番号 : A F 3 9 5 7) を備えた E C A キット (以下、試作 E C A キット) を作製した。抗体を P B S で希釈し 1 0 μ g / m l とした。希釈した抗体を 9 6 穴プレートへ 1 0 0 μ l ずつ添加し、4 で 1 晩静置してウェル上に感作させた。上記で添加した溶液を除去してブロッキング液 (P B S / 1 % B S A) を 2 0 0 μ l ずつ添加し、再び 4 で 1 晩静置した後に、ブロッキング液を除去し、室温で 6 時間放置して完全にブロッキング液を乾燥除去して試作 E C A キットを得た。

【 0 0 5 2 】

各モノクローナル抗体を用いて作製した試験用 E C A キットおよび抗ヒト V A P - 1 ヤギポリクローナル抗体を用いて作製した比較例の試作用 E C A キットを用いた。希釈液で予め調製しておいた健常人血清を各ウェルへ 1 0 0 μ l ずつ添加した。室温で 1 時間反応させて健常人血清中 V A P - 1 をウェル上に捕捉させた。添加した健常人血清を除去後、洗浄液 (P B S / 0 . 1 3 % T w e e n 2 0) でウェルを洗浄した。ネガティブコントロールとしては、健常人血清に代えて健常人血清の希釈に用いた溶液を 1 0 0 μ l 添加した。

40

【 0 0 5 3 】

予め調製しておいた 4 0 0 μ M A D H P (1 0 - アセチル - 3 , 7 - ジヒドロキシフェノキサジン)、2 U / m l H R P、2 m M ベンジルアミンを含む反応液を 1 0 0 μ l ずつ添加して反応を開始させた。所定の時間に蛍光強度を測定した。反応温度は 3 0 で行った。比較例の抗ヒト V A P - 1 ヤギポリクローナル抗体を用いた場合の結果を図 2

50

- 1 に、各モノクローナル抗体を用いた結果を図 2 - 2、図 2 - 3、および図 2 - 4 に示す。健常人血清の測定結果は Assay Control と、健常人血清の希釈に用いた溶液（またはネガティブコントロール）の測定結果は No Enzyme として図中に示す。

【0054】

今回樹立された 3 クローン中、1 G 3 および 3 G 6 の 2 つの抗体が E C A 法で好適に使用できることが確認された（図 2 - 2、図 2 - 4）。抗 V A P - 1 ヤギポリクローナル抗体を用いた試作 E C A キット（図 2 - 1）に比べて、クローン 1 G 3 ではより強いシグナルを、クローン 3 G 6 ではほぼ同等のシグナルを得ることができた。

【0055】

試作 E C A キットよりも強いシグナルを示したクローン 1 G 3 を $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度として、上記と同様にして 96 穴プレートへ直接感作した。次いで、上記と同じ方法にて E C A をおこなったが、濃度の差によるシグナルには大きな違いは見られなかった（図 3 - 1、図 3 - 2 および図 3 - 3）。

【実施例 3】

【0056】

（E L I S A 用抗体の組み合わせの検討）

3 種類の抗ヒト V A P - 1 モノクローナル抗体 1 G 3、3 F 1 0、3 G 6 について、E L I S A 用に抗体サンドイッチの組み合わせの評価を行った。

【0057】

（E L I S A 用プレートの作製）

3 種類それぞれの抗体を実施例 2 と同様にして 96 穴プレートに感作させて、抗体プレートを作製した。コントロールとして、H i s T a g に結合する抗体プレート（抗 H i s 抗体感作）も同様に作製した。

【0058】

各モノクローナル抗体を P B S で希釈し $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ とした。96 穴プレートへ $100 \mu\text{l}$ ずつ添加し、4 で 1 晩静置してそれぞれの抗体をウェル上に感作させた。抗体液を除去してブロッキング液（P B S / 1 % B S A）を $200 \mu\text{l}$ ずつ添加し、再び 4 で 1 晩静置した後に、ブロッキング液を除去し、室温で 6 時間放置して完全にブロッキング液を乾燥除去した。

【0059】

また、各モノクローナル抗体を常法によりビオチン標識した。コントロールとして市販の抗 V A P - 1 マウスモノクローナル抗体 T K 8 - 1 4（S a n t a C r u z、s c - 3 3 6 7 0）をビオチン標識したものをを用いた。

【0060】

P B S / 1 % B S A で調製したサンプルである H T G - V A P - 1 $500 \text{ ng}/100 \mu\text{l}$ / ウェルおよび健常人血清の 2 倍希釈液、4 倍希釈液を $100 \mu\text{l}$ ずつ添加し、室温で 1 時間反応させ、H T G - V A P - 1 または健常人血清中 V A P - 1 をウェル上の抗体に結合させた。サンプルを除去し、洗浄液（P B S / 0 . 1 3 % T w e e n 2 0）でウェルを洗浄後、ビオチン標識した各抗体を P B S で希釈し $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ とし、ウェルへ $100 \mu\text{l}$ ずつ添加した。室温で 1 時間反応させ、ウェル上の捕捉された H T G - V A P - 1 または健常人血清中 V A P - 1 と結合させた。未結合のビオチン標識化抗体を除去後、洗浄液（P B S / 0 . 1 3 % T w e e n 2 0）でウェルを洗浄した。次に、P B S で 1000 倍に希釈した H R P 標識ストレプトアビジンを $100 \mu\text{l}$ ずつウェルへ添加した。室温で 1 時間反応させ、未結合の H R P 標識ストレプトアビジンを除去後、P B S / 0 . 1 3 % T w e e n 2 0 でウェルを洗浄した。H R P に対する基質溶液を加えることで発色反応を起こさせ、発色反応停止後、吸光度 A 4 5 0 を測定した。

【0061】

上記の方法により、健常人血清および H T G - V A P - 1（抗体作製時に抗原に用いた H i s タグ付き V A P - 1 タンパク）をサンドイッチが可能な組み合わせを調べた。その結果を図 4 - 1、図 4 - 2、図 4 - 3 および図 4 - 4 に示す。

【0062】

1G3、3G6をプレートに、標識抗体を3F10にした条件で、血清サンプルで高いシグナルが得られた。(健常人血清50 μ Lは頭打ちしている。)

ポジティブコントロールの抗His tag抗体プレートでは、HTG-VAP-1に対して全ての抗体が反応し、His tagがない血清中VAP-1ではシグナルがみられなかった。ビオチン化TK8-14は、1G3、3G6、3F10の抗体プレートに対してはシグナルが弱かった。

【0063】

1G3と3G6の抗体同士では、プレート感作および標識抗体のいずれに置き換えてもシグナルが弱かったことから、この2種類の抗体はエピトープ部位が近く、この組み合わせでのELISA測定には適さない。TK8-14も同様である。また、実施例1において力価が弱かった3F10が、1G3、3G6を感作したプレートに対しては強いシグナルが得られたことから、3F10と、1G3および3G6とはエピトープ部位が離れているものと考えられる。一方、3F10を感作した場合に全般的にはシグナルが低かったのは、3F10の力価が他の2種類の抗体よりも低いためと考えられる。

10

【0064】

なお、抗His Tagプレートでは、His Tagの無い血清中VAP-1は全ての抗体でシグナルがみられず、HTG-VAP-1のみにシグナルがみられることから、用いた全ての標識抗体はHis Tag抗体に結合したHTG-VAP-1を認識して結合していること、ビオチン化により抗体特異性が失われていないことが確認された。

20

【0065】

上記結果より、プレート用の抗体としては、力価が強い1G3と3G6を候補とし、標識抗体としては力価は比較的低いが、他の抗体とエピトープが異なる3F10を候補として以下の試験を行った。

【実施例4】

【0066】

(ELISAキットのための最適組み合わせ)

1G3、3G6感作抗体プレートと、3F10ビオチン標識抗体を用いて、血清およびHTG-VAP-1を希釈して、どちらの組み合わせで強いシグナルが得られるか評価した。

30

【0067】

1G3、3G6の各マウスモノクローナル抗体をPBSで所定の濃度に希釈し96穴プレートへ100 μ Lずつ添加し、4で1晩静置してそれぞれの抗体をウェル上に感作させた。抗体液を除去してブロッキング液(PBS/1%BSA)を200 μ Lずつ添加し、再び4で1晩静置した後に、ブロッキング液を除去し、室温で6時間放置して完全にブロッキング液を乾燥除去した。

【0068】

PBS/1%BSAで所定の濃度および希釈倍数に調製したサンプルであるHTG-VAP-1および健常人血清を100 μ Lずつ添加し、室温で1時間反応させ、HTG-VAP-1または健常人血清中VAP-1をウェル上の抗体に結合させた。サンプルを除去し、洗浄液(PBS/0.13%Tween20)でウェルを洗浄後、ビオチン標識した3F10抗体をPBSで希釈し5 μ g/mLとし、ウェルへ100 μ Lずつ添加した。室温で1時間反応させ、ウェル上の捕捉されたHTG-VAP-1または健常人血清中VAP-1と結合させた。未結合のビオチン化3F10抗体を除去後、洗浄液(PBS/0.13%Tween20)でウェルを洗浄した。次に、PBSで1000倍に希釈したHRP標識ストレプトアビジンを100 μ Lずつウェルへ添加した。室温で1時間反応させ、未結合のHRP標識ストレプトアビジンを除去後、洗浄液(PBS/0.13%Tween20)でウェルを洗浄した。HRPに対する基質溶液を加えることで発色反応を起こさせ、発色反応停止後、吸光度A450を測定した。結果を図5-1および図5-2に示す。

40

50

【 0 0 6 9 】

いずれの組み合わせでも問題無く E L I S A アッセイが可能であった。特に血清およびタンパクのいずれでも希釈倍数が大きい条件において 3 G 6 (プレート、捕捉用抗体) - 3 F 1 0 (ビオチン標識抗体) の組み合わせが強いシグナルが得られたことから、この組み合わせが最適であると判断される。

【 実施例 5 】

【 0 0 7 0 】

(免疫組織染色用の抗体の評価)

本明細書に記載のモノクローナル抗体が、ヒト皮膚組織の免疫組織染色に使用できるか評価した。具体的には、次のような手順に従い当該抗体が免疫組織染色に利用できることを確認した。

10

【 0 0 7 1 】

(標本の調製および染色方法)

まず、発明者らは、2種の標本、すなわち、凍結したヒト皮膚組織をそのまま薄切した標本と、O . C . T . コンパウンド(サクラファインテック)で包埋した後に薄切した標本を作製した。

2種類の標本に対して D A B (ジアミノベンジジン) 染色法を行い、3種類の抗体の染色性能を評価した。

【 0 0 7 2 】

1次抗体を 0 . 4 ~ 4 μ g / m l の濃度に調製し、上記標本と約1時間にわたり反応させた。その後、標本を洗浄した後、抗マウス I g G 酵素標識抗体を反応させてから洗浄し、D A B を反応させて組織を染色した(本工程では One - Step Polymer - H R P (B i o G e n e x 、 H K 5 9 5 - 5 0 K を用いた)。

20

【 0 0 7 3 】

(染色の評価)

モノクローナル抗体の各々を、次の項目により、免疫組織染色における利用の可否を評価した：(a) V A P - 1 の発現が知られている血管内皮が染色されることと、および(b) ヒト V A P - 1 を染色可能であることが確認されている抗 V A P - 1 マウスモノクローナル抗体 T K 8 - 1 4 (S a n t a C r u z 、 s c - 3 3 6 7 0) の染色像と対比した際に、同じ部位が染色されていること。

30

【 0 0 7 4 】

(結果)

これらを基準に染色性能の評価を行い、全ての抗体で標本中のヒト V A P - 1 を染色できることを確認した。

【 受託番号 】

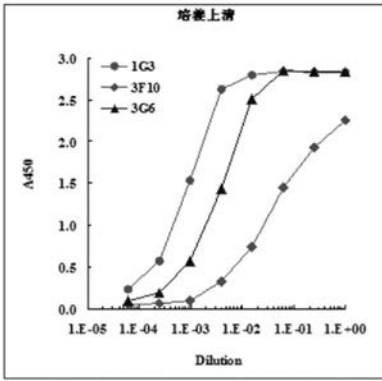
【 0 0 7 5 】

N I T E B P - 0 2 0 3 4

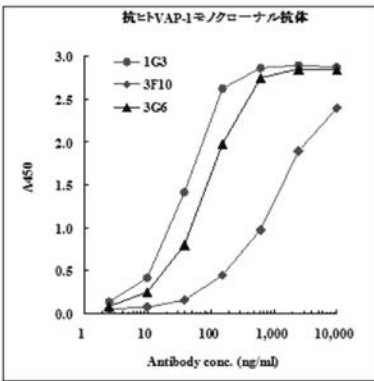
N I T E B P - 0 2 0 3 5

N I T E B P - 0 2 0 3 6

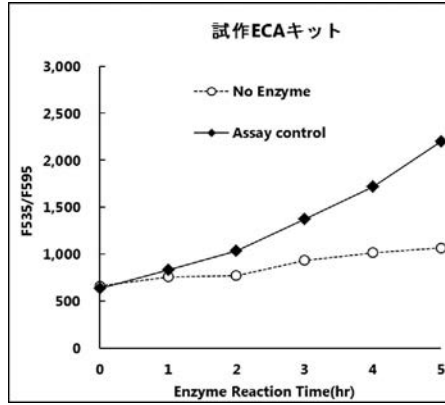
【 図 1 - 1 】



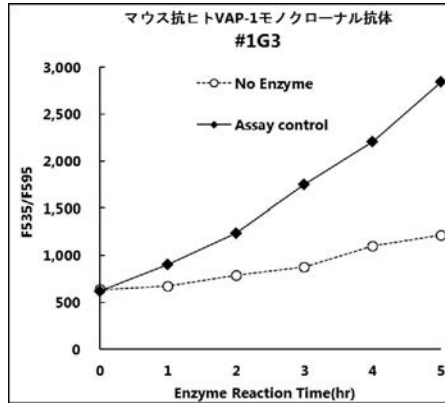
【 図 1 - 2 】



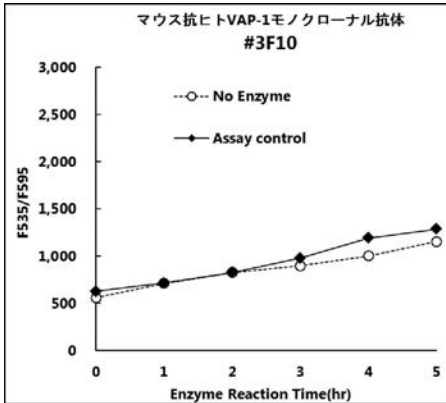
【 図 2 - 1 】



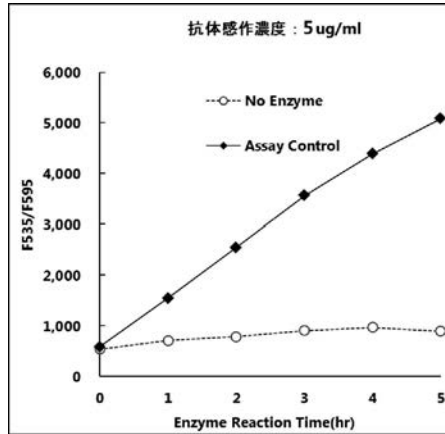
【 図 2 - 2 】



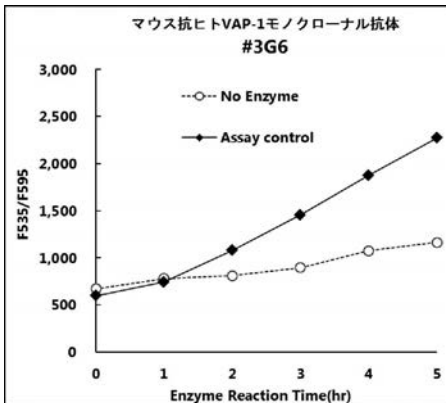
【 図 2 - 3 】



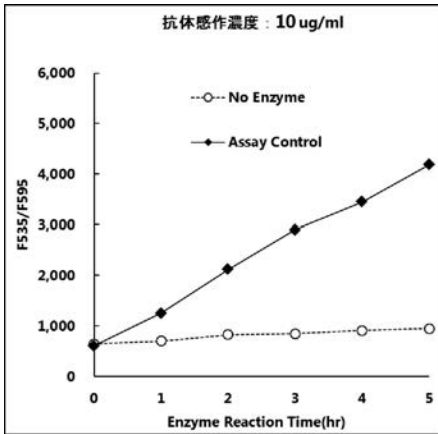
【 図 3 - 1 】



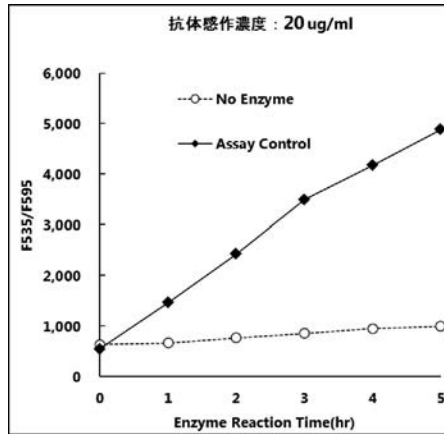
【 図 2 - 4 】



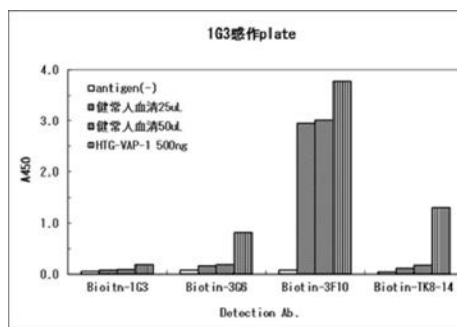
【 図 3 - 2 】



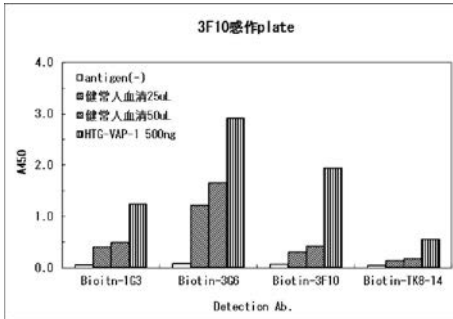
【 図 3 - 3 】



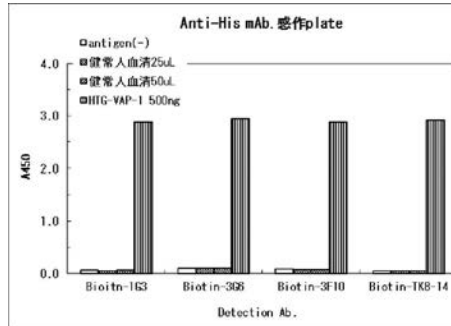
【 図 4 - 1 】



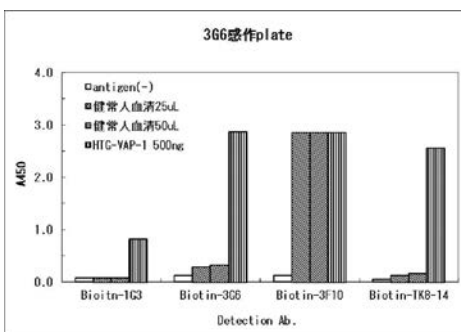
【 図 4 - 2 】



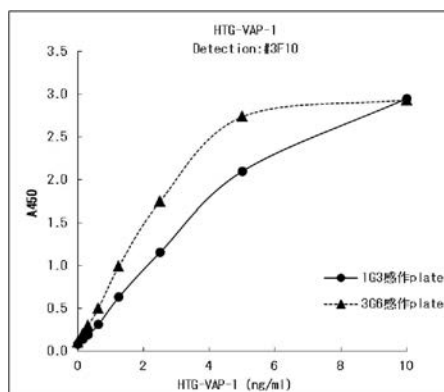
【 図 4 - 4 】



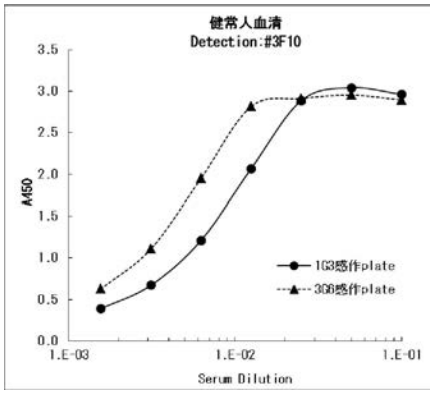
【 図 4 - 3 】



【 図 5 - 1 】



【 図 5 - 2 】



【 配列表 】

201808011400001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

テーマコード(参考)

C 1 2 P 21/08

(72)発明者 川 崎 晶子

東京都千代田区内幸町一丁目1番7号 株式会社アールテック・ウエノ内

(72)発明者 今川 貴仁

東京都千代田区内幸町一丁目1番7号 株式会社アールテック・ウエノ内

(72)発明者 西村 章子

長野県伊那市手良沢岡1063-103 株式会社サイクレックス内

Fターム(参考) 2G045 DA36

4B024 AA11 BA44 GA03 HA15

4B064 AG27 BJ12 CA20 CC24 DA13

4H045 AA11 AA20 AA30 CA40 DA76 EA50 FA72

专利名称(译)	抗人vap-1单克隆抗体		
公开(公告)号	JP2018080114A	公开(公告)日	2018-05-24
申请号	JP2015110693	申请日	2015-05-29
[标]申请(专利权)人(译)	艾德克 上野股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	有限公司的R-技术野		
[标]发明人	松本恒平 川崎晶子 今川貴仁 西村章子		
发明人	松本 恒平 川▲崎▼ 晶子 今川 貴仁 西村 章子		
IPC分类号	C07K16/40 C12N15/02 G01N33/53 G01N33/48 C12P21/08		
CPC分类号	C07K16/40 G01N33/573 G01N2333/90638		
FI分类号	C07K16/40.ZNA C12N15/00.C G01N33/53.D G01N33/48.P G01N33/53.Y C12P21/08		
F-TERM分类号	2G045/DA36 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/GA03 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/BJ12 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72		
代理人(译)	山田卓司 櫻井洋子		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供高度特异性的抗人VAP-1单克隆抗体。解决方案：选自具有重链可变区和具有特定序列的轻链可变区的单克隆抗体的抗人VAP-1单克隆抗体，具有重链可变区和具有另一特定序列的轻链可变区的单克隆抗体，和具有重链可变区和具有另一特定序列的轻链可变区的单克隆抗体。此外，使用抗人VAP-1单克隆抗体的免疫学测量方法和用于测量方法的试剂盒。图纸：无

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 公開特許公報(A)	(11) 特許出願公開番号 特開2018-80114 (P2018-80114A)
	(43) 公開日	平成30年5月24日(2018.5.24)
(51) Int. Cl.	F I	テーマコード(参考)
C07K 16/40 (2006.01)	C07K 16/40 ZNA	2G045
C12N 15/02 (2006.01)	C12N 15/00 C	4B024
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 D	4B064
GO1N 33/48 (2006.01)	GO1N 33/48 P	4H045
C12P 21/08 (2006.01)	GO1N 33/53 Y	
	審査請求 未請求 請求項の数 13 O L (全 18 頁) 最終頁に続く	
(21) 出願番号	特願2015-110693 (P2015-110693)	(71) 出願人
(22) 出願日	平成27年5月29日(2015.5.29)	株式会社アールテック・ウエノ 東京都千代田区内幸町一丁目1番7号
		(74) 代理人
		100101454 弁理士 山田 卓二
		(74) 代理人
		100062144 弁理士 青山 稔
		(74) 代理人
		100106518 弁理士 松谷 道子
		(74) 代理人
		100138911 弁理士 櫻井 陽子
		(72) 発明者
		松本 恒平 東京都千代田区内幸町一丁目1番7号 株式会社アールテック・ウエノ内
		最終頁に続く
(54) 【発明の名称】	抗ヒトVAP-1モノクローナル抗体	