

(19) 日本国特許庁(JP)

## 再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2008/013257

発行日 平成21年12月17日(2009.12.17)

(43) 国際公開日 平成20年1月31日(2008.1.31)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 16/28 (2006.01)</b>	C07K 16/28 ZNA	2G045
<b>C12N 15/02 (2006.01)</b>	C12N 15/00 C	4B024
<b>C12N 5/10 (2006.01)</b>	C12N 5/00 B	4B064
<b>GO1N 33/53 (2006.01)</b>	GO1N 33/53 D	4B065
<b>GO1N 33/15 (2006.01)</b>	GO1N 33/15 Z	4H045
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 41 頁) 最終頁に続く		

出願番号	特願2008-526828 (P2008-526828)	(71) 出願人	000001926 塩野義製薬株式会社
(21) 国際出願番号	PCT/JP2007/064750		大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番8号
(22) 国際出願日	平成19年7月27日(2007.7.27)	(74) 代理人	100065215 弁理士 三枝 英二
(31) 優先権主張番号	特願2006-207054 (P2006-207054)	(74) 代理人	100108084 弁理士 中野 睦子
(32) 優先日	平成18年7月28日(2006.7.28)	(74) 代理人	100115484 弁理士 林 雅仁
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(72) 発明者	小南 悟郎 大阪府大阪市福島区鷺洲5丁目12番4号 塩野義製薬株式会社内
		(72) 発明者	中村 昌弘 大阪府摂津市三島2丁目5番1号 塩野義 製薬株式会社内
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 可溶性LOX-1に対するモノクローナル抗体

## (57) 【要約】

ヒト可溶性LOX-1を特異的に認識するモノクローナル抗体、特にヒト可溶性LOX-1との解離定数(Kd)が、 $1 \times 10^{-9}$  (M)以下であるモノクローナル抗体を提供する。当該抗体は、下記工程を含む方法で調製されるハイブリドーマから産生することができる：(1)非ヒト動物に、原核細胞由来のヒトLOX-1細胞外ドメインを免疫する工程、(2)当該動物から抗体産生細胞を回収する工程、(3)当該抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合する工程、(4)上記工程で得られた融合細胞のなかから、前記ヒトLOX-1細胞外ドメインと反応するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選択する工程、および(5)当該選択したハイブリドーマのなかから、真核細胞由来のヒトLOX-1細胞外ドメインと反応するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選択する工程。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

ヒト可溶性LOX-1に特異的に結合する特性を備えた、モノクローナル抗体もしくはその一部、またはこれらの標識物。

## 【請求項2】

ヒト可溶性LOX-1との解離定数(Kd)が、 $1 \times 10^{-9}$  (M)以下であることを特徴とする、請求項1に記載するモノクローナル抗体もしくはその一部、またはこれらの標識物。

## 【請求項3】

下記の工程を含む方法で調製されるハイブリドーマにより産生される、請求項1に記載するモノクローナル抗体もしくはその一部、またはこれらの標識物： 10

(1) 非ヒト動物に、原核細胞由来のヒトLOX-1細胞外ドメインの一部を免疫する工程、

(2) 当該動物から抗体産生細胞を回収する工程、

(3) 当該抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合する工程、

(4) 上記工程で得られた融合細胞のなかから、前記ヒトLOX-1細胞外ドメインの一部を含む画分と反応するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選択する工程、および

(5) 当該選択したハイブリドーマのなかから、真核細胞由来のヒトLOX-1細胞外ドメインの一部と反応するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選択する工程。 20

## 【請求項4】

「Mouse-Mouse hybridomas LOX-1 1A7」(受託番号：FERM BP-10645)、または「Mouse-Mouse hybridomas LOX-1 6B11」(受託番号：FERM BP-10646)により産生される、請求項1に記載するモノクローナル抗体もしくはその一部、またはこれらの標識物。

## 【請求項5】

急性冠症候群の診断に使用される、請求項1に記載のモノクローナル抗体もしくはその一部、またはこれらの標識物。

## 【請求項6】

急性冠症候群の治療薬または治療候補薬の薬効評価に使用される、請求項1に記載のモノクローナル抗体もしくはその一部、またはこれらの標識物。 30

## 【請求項7】

請求項1乃至4のいずれかに記載するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

## 【請求項8】

「Mouse-Mouse hybridomas LOX-1 1A7」(受託番号：FERM BP-10645)、または「Mouse-Mouse hybridomas LOX-1 6B11」(受託番号：FERM BP-10646)である、請求項7に記載のハイブリドーマ。

## 【請求項9】

下記の工程を含む、ハイブリドーマの調製方法： 40

(1) 非ヒト動物に、原核細胞由来のヒトLOX-1細胞外ドメインの一部を免疫する工程、

(2) 当該動物から抗体産生細胞を回収する工程、

(3) 当該抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合する工程、

(4) 上記工程で得られた融合細胞のなかから、前記ヒトLOX-1細胞外ドメインの一部と反応するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選択する工程、および

(5) 当該選択したハイブリドーマのなかから、真核細胞由来のヒトLOX-1細胞外ドメインの一部と反応するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選択する工程。

## 【請求項10】

請求項9に記載する方法によって調製されたハイブリドーマ。 50

## 【請求項 1 1】

請求項 1 乃至 4 のいずれかに記載のモノクローナル抗体もしくはその一部、またはこれらの標識物を含む、ヒト可溶性 L O X - 1 検出用試薬キット。

## 【請求項 1 2】

急性冠症候群診断キットである請求項 1 1 に記載する試薬キット。

## 【請求項 1 3】

請求項 1 乃至 4 のいずれかに記載のモノクローナル抗体もしくはその一部、またはこれらの標識物を、ヒト可溶性 L O X - 1 に対する特異的結合試薬または特異的検出試薬として用いる工程を有する、ヒト可溶性 L O X - 1 の特異的検出方法。

## 【請求項 1 4】

請求項 1 乃至 4 のいずれかに記載のモノクローナル抗体もしくはその一部、またはこれらの標識物を用いて、ヒト体液中の可溶性 L O X - 1 を測定する工程を有する、急性冠症候群の診断方法。

## 【請求項 1 5】

急性冠症候群の治療薬または治療候補薬が投与されたヒトの体液を対象として、請求項 1 乃至 4 のいずれかに記載のモノクローナル抗体もしくはその一部、またはこれらの標識物を用いて、当該体液中の可溶性 L O X - 1 を測定する工程を有する、急性冠症候群の治療薬または治療候補薬の薬効の評価方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0 0 0 1】

本発明は、酸化低比重リポタンパク（以下、「酸化 LDL」という）の受容体であるレクチン様酸化低比重リポタンパク質受容体-1（Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1）（以下、「L O X - 1」という）の一部が開裂して生じる可溶性分子（以下、「可溶性 L O X - 1」という）に特異的親和性を有して結合するモノクローナル抗体、および当該抗体を産生するハイブリドーマに関する。さらに本発明は、当該モノクローナル抗体の用途に関する。

## 【背景技術】

## 【0 0 0 2】

不安定狭心症から急性心筋梗塞、さらにはこれらに合併する心臓性突然死までの一連の病態は包括的に急性冠症候群（ACS）と呼ばれる。いずれも心臓に栄養を供給する冠動脈の動脈硬化により生じた粥腫（プラーク）が崩壊し、これに血栓が付着した結果、冠動脈の狭窄や閉塞が生じて発症するとされる。現代社会において、急性冠症候群は増加の一端をたどっているが、その大部分は何の前兆もなく突然に発症するため、救命できず突然死の経過をたどることも多い。また、たとえ速やかに病院に収容された場合でも、救命のために緊急心臓手術、緊急経皮経管冠動脈血管形成術（PCI）等が必要になることも多く、その医療経済上の負担は計り知れない。

## 【0 0 0 3】

急性冠症候群の発症は、粥状動脈硬化プラークの破綻あるいは糜爛に続発して生じる閉塞性の血栓形成に起因することが近年明らかになってきた（非特許文献 1）。プラークの破綻、糜爛には血管壁内での炎症反応、酸化ストレスが重要な役割を担うことが示されてきたが、中でも酸化変性を受けた LDL（低比重リポタンパク質）により惹起された、プロテアーゼ活性の増加及びアポトーシス（細胞死）を中心とする血管壁の機能障害がその主要な原因として知られている。L O X - 1 は、この酸化 LDL の受容体タンパク質として同定されたものである（非特許文献 2）。この L O X - 1 は、生体内において通常、膜タンパク質として細胞表面に発現しているが、プロテアーゼの作用により膜貫通部近傍の細胞外ドメインにて切断されて可溶性（soluble）L O X - 1 として血中に遊離することが知られている（非特許文献 3）。また急性冠症候群の急性期においては、この可溶性 L O X - 1 の血中濃度が著明に上昇することから、急性冠症候群の一次的診断マーカーとしての可能性が報告されている（非特許文献 4）。

10

20

30

40

50

## 【0004】

そのため、血中に存在する可溶性LOX-1の量を早期の段階で正確に定量できれば、急性冠症候群(ACS)を未然に防止することができるといえる。一方、LOX-1に対する抗体についての報告はあるが、いずれも一般的な記載に止まっており、上記の目的にかなうELISAなどの免疫化学的測定系に使用できる高い親和性を有するモノクローナル抗体は、報告されていないのが現状である(特許文献1~3)。

【非特許文献1】Medical Tribune, 1999, Vol. 32, No.31, p.6

【非特許文献2】Nature, 1997, Vol.386, p.73-77

【非特許文献3】Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 2000, 20(3), p.715-720

【非特許文献4】Circulation, 2005, 112(6), p.812-818

10

【特許文献1】特開平9-98787号公報

【特許文献2】特開2000-109435号公報

【特許文献3】特表2002-510710号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

## 【0005】

本発明の目的は、ヒト酸化LDL受容体であるLOX-1の可溶性分子である、ヒト可溶性LOX-1を特異的に認識して結合するモノクローナル抗体、特にヒト可溶性LOX-1との解離定数が $1 \times 10^{-9}$  (M)以下の、ヒト可溶性LOX-1に対して高い親和性を有するモノクローナル抗体を提供することである。また、本発明は、当該モノクローナル抗体の用途、例えば当該抗体が有するヒト可溶性LOX-1に対する特異的親和性および結合性を利用した免疫学的試薬(例えば、ヒト可溶性LOX-1の特異的結合試薬または特異的検出試薬)、及び当該試薬を利用したヒト可溶性LOX-1の特異的かつ高感度な検出法を提供することを目的とする。

20

## 【0006】

さらに本発明は、血中に存在するヒト可溶性LOX-1を検出または定量することによって、心筋梗塞に代表される急性冠症候群を診断する方法、ならびに急性冠症候群の治療薬やその候補薬の薬効を評価する方法を提供することを目的とする。

## 【0007】

急性冠症候群の診断や急性冠症候群に対する被験薬物の薬効評価は、上記モノクローナル抗体を用いて血中に存在するヒト可溶性LOX-1を検出または定量することにより、従来法よりも容易且つ早期に行うことが可能になる。ゆえに、本発明は、かかる急性冠症候群の診断や薬効評価におけるモノクローナル抗体の用途を提供することをも目的とする。

30

【課題を解決するための手段】

## 【0008】

上記課題を解決すべく、本発明者らは鋭意研究を行ったところ、ヒトLOX-1細胞外ドメインとの結合を指標として調製したハイブリドーマから産生されたモノクローナル抗体が、ヒト可溶性LOX-1に対して、解離定数が $1 \times 10^{-9}$  (M)以下と極めて高い親和性を有していることを見出し、さらに、これらのモノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISA法によれば、急性冠症候群の病態を反映する血中の可溶性LOX-1の存在を高感度に検出測定することができることを確認した。これらの知見から、本発明にかかるモノクローナル抗体を使用した検査キットを用いれば、急性冠症候群の高精度な診断が可能になること、また急性冠症候群に対する被験薬の薬効が高い精度で評価できることを確信した。

40

## 【0009】

本発明はかかる知見に基づいて完成したものであり、下記の態様を含む：

## (I) モノクローナル抗体

(I-1) ヒト可溶性LOX-1に特異的に結合する性質を有する、モノクローナル抗体もしくはその一部、またはこれらの標識物。

50

## 【0010】

(I-2) ヒト可溶性LOX-1との解離定数(Kd)が、 $1 \times 10^{-9}$  (M)以下であることを特徴とする、(I-1)に記載するモノクローナル抗体もしくはその一部、またはこれらの標識物。

## 【0011】

(I-3) 下記の工程を含む方法で調製されるハイブリドーマにより産生される、(I-1)または(I-2)に記載するモノクローナル抗体もしくはその一部、またはこれらの標識物

- (1) 非ヒト動物に、原核細胞由来のヒトLOX-1細胞外ドメインを免疫する工程、
- (2) 当該動物から抗体産生細胞を回収する工程、
- (3) 当該抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合する工程、
- (4) 上記工程で得られた融合細胞のなかから、前記ヒトLOX-1細胞外ドメインと反応するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選択する工程、および
- (5) 当該選択したハイブリドーマのなかから、真核細胞由来のヒトLOX-1細胞外ドメインと反応するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選択する工程。

10

## 【0012】

(I-4) ハイブリドーマ「Mouse-Mouse hybridoma sLOX-1 1A7」(受託番号:FERM BP-10645)、または「Mouse-Mouse hybridoma sLOX-1 6B11」(受託番号:FERM BP-10646)により産生されるモノクローナル抗体もしくはヒト可溶性LOX-1に特異的に結合するその一部、またはこれらの標識物。

20

## 【0013】

(I-5) モノクローナル抗体の一部が、ヒト可溶性LOX-1に特異的に結合するモノクローナル抗体のFab'断片である、(I-1)～(I-4)のいずれかに記載するモノクローナル抗体もしくはその一部、またはこれらの標識物。

## 【0014】

(II) モノクローナル抗体もしくはその一部、またはこれらの標識物の用途

上記のモノクローナル抗体またはその一部は、血液などの体液に存在するヒト可溶性LOX-1の高感度検出に有効に利用でき、急性冠症候群の診断に応用することが可能である。また、これらのモノクローナル抗体またはその一部は、急性冠症候群の治療薬または治療候補薬の薬効評価に有効に利用することができる。よって、本発明には下記の態様が含まれる。

30

## 【0015】

(II-1) 急性冠症候群の診断に使用される、(I-1)～(I-5)のいずれかに記載するモノクローナル抗体もしくはその一部、またはこれらの標識物。

## 【0016】

(II-2) (I-1)～(I-5)のいずれかに記載するモノクローナル抗体もしくはその一部、またはこれらの標識物を用いて、ヒト体液中の可溶性LOX-1を測定する工程を有する、急性冠症候群の診断方法。

## 【0017】

(II-3) 急性冠症候群の治療薬または治療候補薬の薬効評価に使用される、(I-1)～(I-5)のいずれかに記載するモノクローナル抗体もしくはその一部、またはこれらの標識物。

40

## 【0018】

(II-4) 急性冠症候群の治療薬または治療候補薬が投与されたヒトの体液を対象として、(I-1)～(I-5)のいずれかに記載するモノクローナル抗体もしくはその一部、またはこれらの標識物を用いて、当該ヒト体液中の可溶性LOX-1を測定する工程を有する、急性冠症候群の治療薬または治療候補薬の薬効の評価方法。

## 【0019】

(III) ハイブリドーマおよびその調製方法

50

(III-1) (I-1) ~ (I-5) のいずれかに記載するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【0020】

(III-2) ヒトLOX-1細胞外ドメインの可溶性画分とCHO細胞由来可溶性LOX-1との競合的結合をスクリーニングの指標として調製される(III-1)記載のハイブリドーマ。

【0021】

(III-3) 「Mouse-Mouse hybridoma sLOX-1 1A7」(受託番号:FERM BP-10645)、または「Mouse-Mouse hybridoma sLOX-1 6B11」(受託番号:FERM BP-10646)である、  
10 (II-1) または (II-2) に記載するハイブリドーマ。

【0022】

(III-4) 下記の工程を含む、(III-1) に記載するハイブリドーマの調製方法。

(1) 非ヒト動物に、原核細胞由来のヒトLOX-1細胞外ドメインを免疫する工程、

(2) 当該非ヒト動物から抗体産生細胞を回収する工程、

(3) 当該抗体産生細胞とミエロマ細胞とを融合する工程、

(4) 上記で得られた融合細胞のなかから、前記ヒトLOX-1細胞外ドメインと反応するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選択する工程、および

(5) 当該選択したハイブリドーマのなかから、真核細胞由来のヒトLOX-1細胞外ドメインと反応するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選択する工程。  
20

【0023】

(III-5) (III-4) に記載される方法によって調製されたハイブリドーマ。

【0024】

(III-6) (III-4) に記載される方法によって調製される(III-1) ~ (III-3) のいずれかに記載されるハイブリドーマ。

【0025】

(IV) ヒト可溶性LOX-1検出用試薬キットおよびその用途

(IV-1) (I-1) ~ (I-5) のいずれかに記載のモノクローナル抗体もしくはその一部、またはこれらの標識物を、ヒト可溶性LOX-1に対する特異的結合試薬またはヒト可溶性LOX-1の特異的検出試薬として含む、ヒト可溶性LOX-1検出用試薬キット。  
30

【0026】

(IV-2) 急性冠症候群診断キットである、(IV-1) に記載する試薬キット。

【0027】

なお、当該試薬キットは、「(I-1) ~ (I-5) のいずれかに記載のモノクローナル抗体もしくはその一部、またはこれらの標識物を含む、急性冠症候群診断キット。」と言い換えることができる。

【0028】

(V) ヒト可溶性LOX-1の特異的検出方法

(V-1) (I-1) ~ (I-5) のいずれかに記載のモノクローナル抗体もしくはその一部、またはこれらの標識物を、ヒト可溶性LOX-1に対する特異的結合試薬または特異的検出試薬として用いる工程を有する、ヒト可溶性LOX-1の特異的検出方法。  
40

【0029】

急性冠症候群の病態に関連して血液中の可溶性LOX-1量が増加することから、上記検出方法を利用することにより、被験者について急性冠症候群の病態の有無やその程度を診断することが可能となる。

【発明の効果】

【0030】

本発明のモノクローナル抗体は、ヒト可溶性LOX-1を特異的に認識し、高い親和性でもって結合するため、当該ヒト可溶性LOX-1の特異的検出及び特異的結合に有用である。かかる本発明のモノクローナル抗体、その一部またはこれらの標識物(またはこれ  
50

らのいずれかを含むヒト可溶性LOX-1検出試薬)並びにそれを利用したヒト可溶性LOX-1の特異的検出法によれば、生体組織または生体試料における可溶性LOX-1の発現分布や存在を免疫化学的に調べることができ、可溶性LOX-1の生理学的作用並びに意義をより詳細に解明することが可能となる。また、本発明のモノクローナル抗体、その一部またはこれらの標識物(またはこれらのいずれかを含むヒト可溶性LOX-1検出試薬)並びにそれを利用したヒト可溶性LOX-1の特異的検出法によれば、LOX-1の発現(発現亢進、発現不全/減少)に関連して生じる種々の疾患や病態を、免疫化学的または免疫組織学的に診断することが可能となる。これらの疾患または病態としては、LOX-1の発現亢進を伴う(または発現亢進に起因する)疾患または病態、例えば動脈硬化およびそれがより進展した病態である例えば心血管疾患(虚血性心疾患、心不全)、すなわち急性冠症候群を例示することができる。 10

#### 【0031】

特に、実施例に示すように、本発明のモノクローナル抗体を2種類組みあわせて用いた2サイトサンドイッチELISAによれば、ヒト血清1mLあたり約0.1ng/mLの定量限界でもって、ヒト可溶性LOX-1の血中濃度を測定することができる。かかる測定感度は、従来の測定方法の約10倍に相当する。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0032】

##### I. モノクローナル抗体、及びその製造方法

以下、本発明で用いられる各種用語の意味を明らかにすることにより、本発明のモノクローナル抗体、およびその製造方法を詳細に説明する。 20

#### 【0033】

本発明において「LOX-1」とは、哺乳動物に由来する酸化LDL(Oxidized low density lipoprotein)の受容体である。ここで哺乳動物としては、ヒト、ウシ、ヤギ、ウサギ、マウス、ラット、ハムスター、及びモルモット等を挙げることができるが、好ましくは既報に記載されるヒト、ウシ、ウサギ、ラットまたはマウスの酸化LDL受容体(Oxidized low density lipoprotein receptor)である(Nature, Vol.386, p.73-77, 1997; 脂質生化学研究, Vol. 39, p.83-84, 1997; 特開平9-98787号公報; GenBank Accession No.BAA81912; Biochem. J., Vol.330 (Pt.3), p.1417-1422, 1998)。具体的には、配列番号1に記載されるアミノ酸配列を有するヒトLOX-1を挙げることができる。 30

#### 【0034】

かかるLOX-1は、糖鎖が付加された約50kDaのII型膜タンパク質でN末より細胞内ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞外ドメインからなり、さらに当該細胞外ドメインは、ネックドメインとレクチン様ドメインの2つのドメインからなる(計4つのドメイン)。このうちレクチン様ドメインが酸化LDLの認識部位として働いている(沢村達也、臨床検査, Vol.45, No.3, p297)。ヒトLOX-1(配列番号1)の場合、具体的には、そのアミノ酸1-36領域が細胞内ドメイン、アミノ酸37-57領域が膜貫通ドメイン、アミノ酸58-273領域が細胞外ドメインに相当する。

#### 【0035】

本発明において「LOX-1細胞外ドメイン」とは、前述するLOX-1の全構造のうち「細胞外ドメイン」の全部またはその一部を意味する。具体的には、膜貫通タンパクであるLOX-1において、細胞膜の外界側に存在する部分構造(部分領域)の全部または一部を意味する。換言すれば、「LOX-1細胞外ドメイン」とは、膜内に取り込まれている膜貫通ドメイン及び当該ドメインに引き続いて細胞質内に存在する細胞内ドメインを除いた領域の全部または一部を意味する。ヒトLOX-1(配列番号1)の場合、前述するように、そのアミノ酸配列の58-273の領域が「LOX-1細胞外ドメイン」の全部に相当する。 40

#### 【0036】

「ヒトLOX-1細胞外ドメインの一部」とは「LOX-1細胞外ドメイン」の一部をさし、ヒトLOX-1のアミノ酸配列(配列番号1)の85-273領域(配列番号2) 50

の他、「可溶型L O X - 1」など可溶性を示す部分領域を挙げることができる。

【0037】

本発明において「可溶型L O X - 1」とは、膜中に存在するL O X - 1の一部（普通は「細胞外ドメイン」の一部）が切断されて（解離して）血中に放出（分泌）された、L O X - 1の一部を意味する。

【0038】

より具体的には、ヒト可溶型L O X - 1とはヒトL O X - 1の細胞外ドメインの一部からなる可溶型レセプターのことである。ヒトL O X - 1細胞外ドメインの一部に相当する可溶型レセプター分子の例としては、ヒトL O X - 1のアミノ酸配列（配列番号1）の88-273領域（配列番号3）からなる分子、または当該アミノ酸配列（配列番号1）の92-273領域（配列番号4）からなる分子を例示することができる。またヒトL O X - 1細胞外ドメインの一部に相当する分子には、ヒトL O X - 1細胞外ドメインのN端側に位置するペプチドが含まれる。当該ペプチドとして、具体的には、可溶型分子のアミノ酸配列（配列番号3）の1-10領域に相当するペプチド（配列番号5）、および可溶型分子のアミノ酸配列（配列番号4）の1-10領域に相当するペプチド（配列番号6）を例示することができる。なお、これらのペプチドは、ヒトL O X - 1のアミノ酸配列（配列番号1）のそれぞれ88-97領域および92-101領域に相当する。

10

【0039】

本発明が対象とする「モノクローナル抗体」とは、前述するヒト可溶型L O X - 1に特異的に結合するモノクローナル抗体である。ヒト血液中には、L O X - 1の一部が開裂して生成する配列番号3または4で示されるアミノ酸配列を有する可溶型L O X - 1が存在しており、その量は急性冠症候群の進展に伴って増加することから、当該可溶型L O X - 1は急性冠症候群、具体的は動脈硬化やそれ起因して発症する虚血性心疾患の病態を反映する診断指標となり得ると考えられている（林田ら、Circulation、2005、112(6)、p.812-818）。

20

【0040】

よって本発明が対象とする「モノクローナル抗体」は、好適には、配列番号3または4で示されるアミノ酸配列を有するヒト可溶型L O X - 1に対して高い親和性を有する抗体である。

【0041】

かかるヒト可溶型L O X - 1に対して特異的結合性を有する本発明の「モノクローナル抗体」は、ヒトL O X - 1細胞外ドメインの一部（天然体、組換え体、合成物、細胞培養上清を含む）を免疫原として用いて調製することができる。具体的には、まずヒトL O X - 1細胞外ドメインの一部を免疫原として、また必要に応じてフロイントアジュバントとともに、非ヒト哺乳動物、好ましくは、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、ネコ、イヌ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、ロバ、ウマあるいはウシ（ヒト抗体産生トランスジェニックマウスのような他の動物由来の抗体を産生するように作出されたトランスジェニック動物を含む）、より好ましくはマウス、ラット、ハムスター、モルモットまたはウサギの皮下内、筋肉内、静脈内、フッドパッド内あるいは腹腔内に1乃至数回注射することにより免疫感作を施す。通常、初回免疫から約1~21日毎に1~4回免疫を行って、最終免疫より約1~10日後に免疫感作された該非ヒト哺乳動物から抗体産生細胞を取得することができる。免疫を施す回数及び時間的インターバルは、使用する免疫原の性質などにより、適宜変更することができる。

30

40

【0042】

なお、標準物質、免疫原（ハプテン）及びスクリーニングに、使用される「ヒトL O X - 1細胞外ドメインの一部」としては、例えば下記のを例示することができる。なお、いずれもヒトL O X - 1細胞外ドメインの一部を高濃度で含むものであればよく、画分であってもよい。

【0043】

（イ）ヒトL O X - 1を細胞表面に発現する細胞もしくは細胞表面に発現するように人

50

工的に樹立した細胞株、またはヒトLOX-1を細胞表面に発現するように遺伝子組換え技術を用いて作成した遺伝子組換え細胞を培養して得た培養上清、または当該培養上清から精製されたヒト可溶性LOX-1；

(ロ) ヒトLOX-1細胞外ドメインの部分領域をタンパク質として発現するように遺伝子組換え技術を用いて作成された遺伝子組換え細胞を培養して得た培養上清もしくは当該培養上清から精製されたヒトLOX-1細胞外ドメインの部分領域；または

(ハ) 化学的に合成されたヒトLOX-1細胞外ドメインのN末端領域。

#### 【0044】

具体的には (イ) のヒト可溶性LOX-1としては、例えば、細胞の培養液中に分泌されるヒト可溶性LOX-1を挙げることができる。これは細胞の培養液中に分泌される可溶性LOX-1が、天然のヒト可溶性LOX-1に最も近いからである。当該ヒト可溶性LOX-1は、実施例1(2)に記載する方法のように、遺伝子工学的に調製することができる(特開2002-17353号公報など参照)。

10

#### 【0045】

また (ロ) のヒトLOX-1細胞外ドメインの部分領域としては、ヒトLOX-1細胞外ドメイン(配列番号1のアミノ酸配列58-273領域)の一部(例えば、配列番号2)を挙げることができる。当該部分領域は、実施例1(1)に記載する方法のように、遺伝子工学的に調製することができる。

#### 【0046】

さらに (ハ) のヒトLOX-1細胞外ドメインのN末端領域としては、配列番号5または6に記載するアミノ酸配列を有するペプチドを挙げることができる。当該ペプチドは、ハプテンとして使用する場合は、ウシ血清アルブミン(BSA)などの高分子とコンジュゲートさせる必要がある。

20

#### 【0047】

本発明で使用される免疫原として、好ましくは、(ロ)の大腸菌など原核細胞由来のヒトLOX-1細胞外ドメインの部分領域である。

#### 【0048】

モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマの調製は、ケーラー及びミルシュタインらの方法(Nature, 1975, Vol.256, p.495-497)、及びそれに準じた方法に従って行うことができる。即ち、前述の如く免疫感作された非ヒト哺乳動物から取得される脾臓、リンパ節、骨髄あるいは扁桃等、好ましくは脾臓に含まれる抗体産生細胞と、好ましくはマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギまたはヒト等の哺乳動物、より好ましくはマウス、ラットまたはヒト由来の自己抗体産生能のないミエローマ細胞を細胞融合させることによってハイブリドーマを調製することができる。

30

#### 【0049】

細胞融合に用いられるミエローマ細胞としては、例えばマウス由来ミエローマP3/X63-AG8.653(653)、P3/NSI/1-Ag4-1(NS-1)、P3/X63-Ag8.U1(P3U1)、SP2/O-Ag14(Sp2/O、Sp2)、PAI、F0あるいはBW5147、ラット由来ミエローマ210RCY3-Ag.2.3、ヒト由来ミエローマU-266AR1、GM1500-6TG-A1-2、UC729-6、CEM-AGR、DIR11あるいはCEM-T15を使用することができる。

40

#### 【0050】

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スクリーニングは、まず、ハイブリドーマを、例えばマイクロタイタープレート中で培養し、増殖が見られたウェルの培養上清の、前述する非ヒト動物への免疫感作に用いた免疫原(上記(イ)~(ハ)のいずれか。好ましくは(ロ)の方法で調製した原核細胞由来のヒトLOX-1細胞外ドメインの一部)に対する反応性を、RIAやELISA等の免疫測定法によって測定し、当該免疫原に対して特異的親和性を示すモノクローナル抗体を産生するクローンを選択することによって行う。この方法において、通常は、免疫原を固相化し、そこに結合する培養上清中の抗体を、酵素で標識した第二抗体で検出するという、非競合法ELISAが用いら

50

れる。しかしながらこの非競合法は非特異的な結合も検出するため、特異的な結合をする抗体のみを検出することが難しい。さらに、一般にタンパクを大腸菌などの原核生物の細胞で発現させたとき、その立体構造は天然のものとは異なる。大腸菌で発現させたヒトLOX-1細胞外ドメインの一部についても、多くは沈殿物となる。このため、免疫原としてその沈殿と上清の懸濁液が用いられるが、この場合、産生する抗体も天然のヒト可溶性LOX-1とは異なる沈殿等の変性タンパクと結合するものが多く含まれることが予想される。

#### 【0051】

そこで本発明者らは、下記の(1)および(2)のスクリーニングを段階的に行い、その結果、天然型のヒト可溶性LOX-1と極めて高い親和性をもって結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選択した。 10

#### 【0052】

(1)固相化した第二抗体に、ハイブリドーマの培養上清中の抗体を結合させ、これに、まず原核細胞に由来するヒトLOX-1細胞外ドメインの一部を添加し、ビオチンで標識したヒト可溶性LOX-1と競合反応させて、原核細胞に由来するヒトLOX-1細胞外ドメインの一部と反応する抗体を産生するハイブリドーマを選択する。

#### 【0053】

(2)上記で選択されたハイブリドーマの培養上清を用いて、この中に含まれる抗体を、固相化した第二抗体に結合させ、これに、真核細胞に由来するヒトLOX-1細胞外ドメインの一部とビオチンで標識したヒト可溶性LOX-1を競合反応させて、真核細胞由来のヒトLOX-1細胞外ドメインの一部と反応する抗体を産生するハイブリドーマを選択する。 20

#### 【0054】

ハイブリドーマからのモノクローナル抗体の製造は、ハイブリドーマをインビトロで培養するか、またはマウス、ラット、モルモット、ハムスターまたはウサギ等の非ヒト哺乳動物、好ましくはマウスまたはラット、より好ましくはマウスの腹水中等で培養し、得られた培養上清、または哺乳動物の腹水から単離することにより行うことができる。インビトロで培養する場合には、培養する細胞種の特異性、試験研究の目的及び培養方法等の種々条件に合わせて、ハイブリドーマを増殖、維持及び保存させ、培養上清中にモノクローナル抗体を産生させるために用いられるような既知栄養培地あるいは既知の基本培地から誘導調製されるあらゆる栄養培地を用いて実施することが可能である。 30

#### 【0055】

基本培地としては、例えば、Ham' F12培地、MCDB153培地あるいは低カルシウムMEM培地等の低カルシウム培地及びMCDB104培地、MEM培地、DMEM培地、RPMI1640培地、ASF104培地あるいはRD培地等の高カルシウム培地等が挙げられ、該基本培地は、目的に応じて、例えば血清、ホルモン、サイトカイン及び/または種々無機あるいは有機物質等を含むことができる。モノクローナル抗体の単離、精製は、上述の培養上清あるいは腹水を、飽和硫酸アンモニウム、イオン交換クロマトグラフィー(DEAEまたはDE52等)、抗イムノグロブリンカラムあるいはプロテインAカラム等のアフィニティカラムクロマトグラフィーに供すること等により行うことができる。 40

#### 【0056】

本発明のモノクローナル抗体は、IgG(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、IgM、IgA(IgA1、IgA2)、IgDあるいはIgEのいずれのアイソタイプを有するモノクローナル抗体であることができる。好ましくはIgG(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、より好ましくはIgG1またはIgG2であり、特に好ましくはIgG1である。

#### 【0057】

本発明において「モノクローナル抗体の一部」とは、前述する本発明のモノクローナル抗体の一部であって、当該モノクローナル抗体と同様にヒト可溶性LOX-1に特異的に 50

結合性を有する領域を意味する（以下、これを単に「抗体断片」ともいう）。

【0058】

かかる抗体断片としては、具体的には、前述するヒト可溶性LOX-1に対して特異的結合性を有する、Fab (fragment of antigen binding)、F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、一本鎖抗体 single chain Fv; 以下、「scFv」と表記する)、2量体V領域断片(以下、Diabodyと表記する)、ジスルフィド安定化抗体(disulfide stabilized Fv; 以下、「dsFv」と表記する)、dAd(single domain antibody)、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)。

10

【0059】

Fabは、H鎖のN末端側約半分とL鎖全体で構成される、分子量約5万の抗原結合活性を有する抗体断片である。当該Fabは、IgGのヒンジ領域で2本のH鎖を架橋している2つのジスルフィド結合(S-S結合)の上部のペプチド部分を、酵素パパイニンで分解することによって調製することができる。本発明で使用されるFabも、上記本発明のモノクローナル抗体をパパイニン処理して得ることができる。または、上記本発明のモノクローナル抗体のFabをコードするDNAを動物細胞用発現ベクターに挿入し、該ベクターを動物細胞に導入して発現させることによってもFabを製造することができる。

【0060】

F(ab')<sub>2</sub>は、2つのFab'領域がヒンジ部分で結合して構成される、分子量約10万の抗原結合活性を有する抗体断片である。当該F(ab')<sub>2</sub>は、IgGのヒンジ領域の2つのS-S結合の下部を酵素ペプシンで分解することによって調製することができる。本発明で使用されるF(ab')<sub>2</sub>も、上記本発明のモノクローナル抗体をペプシン処理して得ることができる。または、当該モノクローナル抗体のF(ab')<sub>2</sub>をコードするDNAを動物細胞用発現ベクターに挿入し、該ベクターを動物細胞に導入して発現させることによってもF(ab')<sub>2</sub>を製造することができる。

20

【0061】

Fab'は、上記F(ab')<sub>2</sub>のヒンジ間のS-S結合を切断した分子量約5万の抗原結合活性を有する抗体断片である。本発明で使用されるFab'は、上記本発明のモノクローナル抗体のF(ab')<sub>2</sub>を還元剤ジチオスレイトール処理して得ることができる。または、当該モノクローナル抗体のFab'をコードするDNAを動物細胞用発現ベクターに挿入し、該ベクターを動物細胞に導入して発現させることによってもFab'を製造することができる。

30

【0062】

scFvは、一本のVHと一本のVLとを適当なペプチドリンカー(以下、Pと表記する)を用いて連結した、VH-P-VLないしはVL-P-VHポリペプチドで、抗原結合活性を有する抗体断片である。本発明で使用されるscFvに含まれるVHおよびVLは、上記本発明のモノクローナル抗体のものであればよい。本発明で使用されるscFvは、本発明のモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマよりVHおよびVLをコードするcDNAを取得し、scFv発現ベクターを構築し、大腸菌、酵母、あるいは動物細胞に導入して発現させることによっても製造することができる。

40

【0063】

dsFvは、VHおよびVL中のそれぞれ1アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドを、S-S結合を介して結合させたものをいう。システイン残基に置換するアミノ酸残基はReiterらにより示された方法(Protein Engineering、7、697(1994))に従って、抗体の立体構造予測に基づいて選択することができる。本発明で使用されるdsFvに含まれるVHあるいはVLは、本発明のモノクローナル抗体のものであればよい。本発明で使用されるdsFvは、本発明のモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマよりVHおよびVLをコードするcDNAを取得し、適当な発現ベクターに挿入してdsFv発現ベクターを構築し、該発現ベクターを大腸

50

菌、酵母、あるいは動物細胞に導入し、発現させることにより製造することができる。

【0064】

D i a b o d y は、抗原結合特異性の同じまたは異なる s c F v が 2 量体を形成した抗体断片で、同じ抗原に対する 2 価の抗原結合活性または異なる抗原に対する特異的な抗原結合活性を有する抗体断片である。例えば、本発明のモノクローナル抗体に特異的に反応する 2 価の D i a b o d y は、本発明のモノクローナル抗体の V H および V L をコードする c D N A を取得し、3 ~ 1 0 残基のペプチドリンカーを有する s c F v をコードする D N A を構築し、該 D N A を動物細胞用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを動物細胞に導入して D i a b o d y を発現させることにより、製造することができる。

【0065】

C D R を含むペプチドは、V H または V L の C D R の少なくとも 1 領域以上を含んで構成される。複数の C D R は、直接または適当なペプチドリンカーを介して結合させることができる。本発明で使用される C D R を含むペプチドは、本発明のモノクローナル抗体の V H および V L をコードする c D N A を取得した後、C D R をコードする D N A を構築し、該 D N A を動物細胞用発現ベクターに挿入し、該ベクターを動物細胞に導入して発現させることにより、製造することができる。また、C D R を含むペプチドは、F m o c 法 (フルオレニルメチルオキシカルボニル法)、t B o c 法 (t - ブチルオキシカルボニル法) 等の化学合成法によって製造することもできる。

【0066】

「モノクローナル抗体の一部」として好ましくは、本発明のモノクローナル抗体 ( I g G ) をペプシン処理して得られる F ( a b ' ) <sub>2</sub> を挙げるができる。

【0067】

モノクローナル抗体またはその一部の抗原に対する親和性を表す指標として用いられる解離定数 ( K d ) は、種々の方法に従って解析することができる。たとえば、各種標識剤で標識した抗原を用いた S c a t c h a r d 法や、市販の測定キットである B i a c o r e システム (アマシャムファルマシア社製) または類似のキットを用いて、当該キットに添付された取扱い説明書及び実験操作方法に従って容易に解析することができる。これらの方法を用いて求められる K d 値は M (モル) なる単位で表される。試験されたモノクローナル抗体は、解離定数 ( K d 値) が小さいほど強い親和性を有していることを示す。

【0068】

本発明が対象とするモノクローナル抗体またはその一部には、ヒト可溶性 L O X - 1 との解離定数 ( K d ) が、 $1 \times 10^{-9}$  ( M ) 以下、好ましくは  $5 \times 10^{-10}$  ( M ) 以下、より好ましくは  $2 \times 10^{-10}$  ( M ) 以下である、ヒト可溶性 L O X - 1 に特異的に結合するヒトモノクローナル抗体またはその一部が含まれる。

【0069】

本発明が対象とするモノクローナル抗体およびその一部は、解離定数が  $1 \times 10^{-9}$  ( M ) 以下と、ヒト可溶性 L O X - 1 に対する親和性が非常に高いことから、従来では達成できなかった、ヒト可溶性 L O X - 1 の高感度の検出及び定量が可能である。特に、本発明のモノクローナル抗体によれば、健常人においては血清中の可溶性 L O X - 1 の濃度が大変低く、従来の測定方法では正確な測定はできなかったという問題を、克服することができる。

【0070】

一方、類似の免疫原を用いたモノクローナル抗体の報告がなされているものの ( W O 0 1 / 6 4 8 6 2 ) 、治療を目的としたヒト型抗体であり、開示されているいずれのモノクローナル抗体も解離定数は  $1 \times 10^{-8}$  ( M ) より大きい値を示している。この程度の解離定数では、健常人もしくは慢性期のような血清中の可溶性 L O X - 1 の濃度が低い被験者を測定する場合において、感度の面から診断マーカーとしての目的は達成できないと考えられる (実施例 5 ( 9 ) 参照) 。

【0071】

本発明が対象とするモノクローナル抗体のうち、より好適なものとしては、実施例で示

10

20

30

40

50

すように、ハイブリドーマ6B11または1A7から産生されるモノクローナル抗体を挙げる事ができる。

【0072】

これらのハイブリドーマ6B11および1A7から産生される各モノクローナル抗体の「解離定数(Kd)」を下記に示す。

【0073】

【表1】

モノクローナル抗体	Kd ( $\times 10^{-10}$ M)
1A7	5.1
6B11	3.4

10

【0074】

当該ハイブリドーマ6B11および1A7については、それぞれ「Mouse-Mouse hybridoma sLOX-1 1A7」および「Mouse-Mouse hybridoma sLOX-1 6B11」として、2006年7月26日付けで、日本国茨城県つくば市東1丁目1番1 中央第6に住所を有する独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに、国際寄託されている。各ハイブリドーマの受領番号および受託番号は、下記の通りである。

【0075】

【表2】

ハイブリドーマの表示	受領番号	受託番号
「Mouse-Mouse hybridoma sLOX-1 1A7」	FERM ABP-10645	FERM BP-10645
「Mouse-Mouse hybridoma sLOX-1 6B11」	FERM ABP-10646	FERM BP-10646

20

【0076】

II. 可溶性LOX-1検出用試薬キットおよびそれを用いた可溶性LOX-1の特異的検出方法

前述する本発明のモノクローナル抗体およびその一部(抗体断片)は、ヒト可溶性LOX-1と高い親和性をもって特異的に結合する。

30

【0077】

このため、本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片によれば、免疫測定法を利用して、ヒト可溶性LOX-1を選択的且つ特異的に検出することができる。よって、本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片は、ヒト可溶性LOX-1の組織局在性やその発現の程度を調べたり、被験試料中に存在し得るヒト可溶性LOX-1を検出したり定量するための免疫学的試薬(例えば、免疫電気泳動用試薬や免疫測定用試薬など)として有効に使用することができる。すなわち、前述する本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片は、免疫電気泳動法または免疫測定法を利用してヒト可溶性LOX-1を検出し測定するにあたって、ヒト可溶性LOX-1に対する特異的結合試薬または特異的検出試薬(免疫学的試薬)として有効に使用することができる。ここで、免疫測定法の例としては、直接または間接の競合アッセイまたは非競合アッセイ(例えば、サンドイッチ法等)挙げることができる。また、免疫電気泳動法または免疫測定法には、ウエスタンブロット法、蛍光抗体法、免疫酵素抗体法(ELISA)、放射性物質標識免疫抗体法(RIA法)、免疫組織染色法や免疫細胞染色法などの免疫組織化学染色法(ABC法、CSA法など)、免疫沈降法などが含まれる(単クローン抗体実験マニュアル、講談社サイエンティフィック(1987); 続生化学実験講座5、免疫生化学研究会(東京化学同人(1986)など)。

40

【0078】

本発明は、ヒト可溶性LOX-1を免疫電気泳動法または免疫測定法を利用して特異的に検出または測定するための試薬キットを提供する。当該本発明は、被験試料中のヒト可

50

溶型LOX-1の存在またはその量を、抗原-抗体反応を利用して検出測定するための試薬キットであり、前述する本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片を、ヒト可溶型LOX-1に対する特異的結合試薬成分または特異的検出試薬成分として含むことを特徴とするものである。また、本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片に代えて、ヒト可溶型LOX-1に対する特異的結合を有するその一部（抗体断片）を用いることもできる。

#### 【0079】

本発明のモノクローナル抗体またはその一部（抗体断片）は、免疫測定用の試薬として、そのまま使用されても、また固体支持体に結合した形態で使用することもできる。ここでこれらのモノクローナル抗体または抗体断片を結合させる固体支持体としては、当業界で周知のものを任意に使用することができ、例えばガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然/変性セルロース、ポリアクリルアミド、寒天およびマグネタイトなどを挙げることができる。なお、これらの固体支持体には、反応トレイのウェル、試験管、ポリスチレンビーズ、マグネチックビーズ、ニトロセルロースストリップ、膜、ラテックス粒子等が含まれる。これらの固体支持体へのモノクローナル抗体または抗体断片の結合方法も公知であり、本発明もまた当該公知の方法を適用することができる。

10

#### 【0080】

また本発明のモノクローナル抗体及びその抗体断片は、免疫電気泳動用及び免疫測定用などの免疫学的試薬として、そのままでもよいし、また任意の標識剤で標識された標識物の形態で使用することもできる。本発明で使用可能な標識剤としては、モノクローナル抗体への結合標識剤として当業界で公知の酵素〔例えばアルカリホスファターゼ（ALP）、ペルオキシダーゼ（HRP）等〕、放射性同位体（例えば、<sup>125</sup>I、<sup>3</sup>H、<sup>14</sup>C等）、蛍光性化合物〔例えばフルオレセインイソチオシアネート（FITC）、テトラメチルローダミンイソチオシアネート（RITC）等〕、化学発光性化合物、及び生物発光性化合物等を広く挙げることができる。なお、これらを標識剤として使用する免疫測定法は、エンザイムイムノアッセイ（EIA）、エンザイムイムノメトリックアッセイ（ELISA）、ラジオイムノアッセイ（RIA）、蛍光イムノアッセイ、発光イムノアッセイ等と称されている。

20

#### 【0081】

好ましくは、酵素を標識剤として使用する免疫測定法（EIA、ELISA）であり、具体的には酵素としてアルカリホスファターゼ（ALP）、検出用の発色基質として化学発光基質APS-5（phosphoric acid mono-[(4-chloro-phenyl)sulfanyl]-(10-methyl-10H-acridin-9-ylidene)-methyl] ester disodium salt（Lumigen APS-5、オリエンタル酵母）を用いたELISA法や酵素としてペルオキシダーゼ（HRP）、検出用の発色基質として比色基質テトラメチルベンジジンを用いたELISA法を挙げることができる。

30

#### 【0082】

本発明が提供する好適なヒト可溶型LOX-1検出用試薬キットは、ヒト可溶型LOX-1に特異的に結合する2つのモノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISA用の試薬キットである。当該試薬キットには、少なくとも、固体支持体に固定化されてなる本発明のモノクローナル抗体またはその断片、前述する標識剤で標識されてなる本発明のモノクローナル抗体またはその断片、および当該標識剤と反応して発色、発蛍光または発光する基質が含まれる。この場合、標識剤として、好ましくは前述する酵素、特にアルカリホスファターゼ（ALP）を挙げることができ、また基質として好ましくはAPS-5を挙げることができる。かかるサンドイッチELISAによれば、より高い感度で可溶型LOX-1を検出することができる。

40

#### 【0083】

尚、これらの標識剤による標識方法や間接的な標識化による修飾方法、並びにそれらの検出方法等は、自体公知の方法に従って行うことができる（「単クローン抗体」岩崎辰夫他著、講談社サイエンティフィク、1984年；「酵素免疫測定法」第2版、石川栄治 他著

50

、医学書院、1982年等）。

【0084】

本発明の試薬キットには、上記本発明のモノクローナル抗体、その抗体断片またはこれらから標識物のほか、免疫電気泳動法または免疫測定法などその用途に応じて、更に適当な反応液、希釈液、洗浄液、ヒト可溶性LOX-1の標準液、転写溶液、泳動溶液、反応停止液、抗体検出試薬、標識活性測定試薬、染色液、反応プレート、ニトロセルロースフィルター、ポリアクリルアミドゲル等が含まれていてもよい。なお、ここで抗体検出試薬としては、本発明のモノクローナル抗体と結合する二次抗体、例えば放射性物質や酵素などで標識した抗IgG抗体やプロテインA等を挙げることができる。

【0085】

10

本発明のモノクローナル抗体、抗体断片またはこれらの標識物を結合または検出試薬として含む上記試薬キットを利用することにより、一般の免疫電気泳動法及び免疫測定法に従い、ヒト可溶性LOX-1を簡便に、特異的にかつ高感度に検出及び測定することができる。

【0086】

ゆえに本発明は、さらに、本発明のモノクローナル抗体、抗体断片またはこれらの標識物をヒト可溶性LOX-1に対する特異的結合試薬または特異的検出試薬として用いることを特徴とするヒト可溶性LOX-1の特異的測定方法を提供する。

【0087】

20

本発明の測定方法は、前述する本発明のモノクローナル抗体、抗体断片またはこれらの標識物をヒト可溶性LOX-1に対する特異的結合試薬または特異的検出試薬として使用することを必須とするものであって、その限りにおいて、他の基本的操作等は特に制限されることなく、通常免疫電気泳動法または免疫測定法における慣用の方法を広く採用することができる。故に、本発明のモノクローナル抗体、抗体断片またはこれらの標識物を利用した抗原-抗体反応、及び生じた抗原-抗体結合物と抗体検出試薬との反応条件も特に制限されず、通常免疫反応における条件が採用される。通常、45℃以下、好ましくは約4～40℃、より好ましくは25～40℃程度の温度条件下、pHが約5～9程度の下で、約0.5～40時間、好ましくは1～20時間程度放置するかもしくはインキュベーションする方法を挙げることができる。

【0088】

30

本発明が提供する好適なヒト可溶性LOX-1の測定法は、ヒト可溶性LOX-1に特異的に結合する2つのモノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISA法である（2サイトサンドイッチELISA法）。当該方法は、ヒト可溶性LOX-1に特異的に結合する本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片が固定化された固体支持体（固相化抗体）に、被験試料およびヒト可溶性LOX-1の標準液（抗原）を結合させ、次いで標識剤で標識した本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片（標識抗体）を反応させて、固相化抗体-抗原（ヒト可溶性LOX-1）-標識抗体のサンドイッチ型複合体を形成させ、斯くして形成された複合体を、その標識剤と基質との反応による発光に基づいて検出または定量するというものである。

【0089】

40

本発明のモノクローナル抗体、その抗体断片およびこれらの標識物は、ヒト可溶性LOX-1を特異的に認識して高い親和性で結合するため、当該抗体を含む上記試薬キットを利用したヒト可溶性LOX-1測定法は、被験試料（例えば、血液、尿等）や各種組織中のヒト可溶性LOX-1の特異的検出や定量、ヒト可溶性LOX-1発現組織の分布測定、及びアフィニティを利用したヒト可溶性LOX-1の精製に利用されるほか、ヒトLOX-1の発現の増加を伴う（またはヒトLOX-1発現の増加に起因する）種々の疾患の免疫化学的及び免疫組織学的診断に有用である。

【0090】

従来の技術の欄で述べるように、LOX-1は酸化LDL受容体として機能しており、動脈硬化病変における粥腫の形成には、血管内膜に集簇したマクロファージにおける酸化

50

LDL受容体(LOX-1)を介した取り込みによるコレステロールエステルの細胞内蓄積が、主要な役割を占めることが知られている。また実際に動脈硬化の初期病変を覆う血管内皮細胞と進行した動脈硬化プラークの内膜平滑筋細胞とマクロファージにはLOX-1の発現が増強されていることが示されている。このように、酸化LDL受容体(LOX-1)を介した酸化LDLの取り込みは、血管内皮細胞における機能障害のみならず、血管平滑筋細胞の機能障害やマクロファージの泡沫細胞化にも関与し、粥状動脈硬化の進展に深くかかわっている。さらに、LOX-1は、その一部が細胞外ドメインの膜近傍部位にて切断され、血液中で可溶性分子(可溶性LOX-1)として存在することが示されている。このように、可溶性LOX-1の血中濃度は、*in vivo*細胞におけるLOX-1発現の程度を反映するため、急性冠症候群の病態を反映する診断マーカーとして注目されており、これを測定することによって、急性冠症候群の早期診断が可能であると考えられている (Medical Tribune, 1999, Vol.32, No.31, p6; Circulation, 2005, 112(6), p.812-818)。

10

#### 【0091】

ゆえに、上記本発明のモノクローナル抗体、その抗体断片またはこれらの標識物を含む試薬キットを利用したヒト可溶性LOX-1測定法によれば、被験者の血液中のヒト可溶性LOX-1を測定することにより、当該被験者について急性冠症候群のリスクの程度を診断することができる。特に、急性冠症候群の再発のリスクの程度の診断にも有効である (WO 2007/072896)。

#### 【0092】

20

また上記するように、ヒト可溶性LOX-1の血中濃度は、急性冠症候群の病態を反映するバイオマーカーとなることから、当該濃度を指標とすることで、急性冠症候群に対する被験薬の薬効を評価することが可能である。具体的には、本発明のモノクローナル抗体、その抗体断片またはこれらの標識物を含む試薬キットを利用したヒト可溶性LOX-1測定法によれば、例えば、急性冠症候群の臨床試験にあたって、被験者に対する治験薬の薬効を、当該被験者の血液中のヒト可溶性LOX-1を測定することにより、容易に判断することができる。また、上記ヒト可溶性LOX-1測定法によれば、急性冠症候群の患者に対する被験薬の治療効果を、当該被験者の血液中のヒト可溶性LOX-1を測定することにより、容易に判断することができる。

30

#### 【実施例】

#### 【0093】

以下、実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

#### 【0094】

##### 実施例1 [標準物質の調製]

標準物質として、下記に示すように(1)ヒトLOX-1細胞外ドメイン、および(2)CHO細胞由来の可溶性LOX-1を調製した。

#### 【0095】

##### (1) LOX-1細胞外ドメインタンパク

ヒトLOX-1細胞外ドメインの一部をコードする配列(配列番号2)をpQEベクター(キアゲン)に組み込んでプラスミド(pQE-hLOX-1)を作製し、これを大腸菌(高速形質転換大腸菌DH5 $\alpha$ 、(株)ニッポンジーン製)に導入した。この大腸菌をアンピシリンナトリウム100 $\mu$ g/mL及び硫酸カナマイシン25 $\mu$ g/mLを含むLB(Luria-Bertani)培地50mLで一晩培養してスターターを作り、これを1Lの培地に移した後、0.5 mol/L IPTG(Isopropyl  $\beta$ -D-Thiogalactoside)を添加して4時間培養した。

40

#### 【0096】

培地を遠心分離(8,000min<sup>-1</sup>、10分間)し、集菌した大腸菌をProtease inhibitor cocktail(シグマ製)0.5mL及びリゾチーム20mgを含む緩衝液A(1mM EDTAを含む0.05Mトリス塩酸緩衝液、pH8. 50

0) 10 mLに懸濁し氷冷下で1時間放置した。次いで、超音波処理(1分間で10回)で破碎し、遠心(9000 min<sup>-1</sup>、15分間)して沈殿を集めた。この不溶性画分を緩衝液B(8M尿素、0.1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>・2H<sub>2</sub>Oを含む0.01Mトリス塩酸緩衝液、pH8.0)8mLで可溶化し、これにNi-NTA agaroseゲル(キアゲン製)8mLを加え室温で1時間混合した。次に、ゲルを空カラム(1.1 id x 13 cm)に移し、20mmol/Lイミダゾールを含む緩衝液Bで十分洗浄した後、250mmol/Lイミダゾールを含む緩衝液BでLOX-1細胞外ドメインタンパク(sLOX-1-D)を溶出させた。このタンパク溶出画分を0.05mol/Lリン酸塩緩衝液(pH9.0)に対して透析した。透析時に加える尿素濃度を4、2、1、および0 mol/Lと段階的に薄めてタンパクのリフォールディングを行った。

10

## 【0097】

透析により全成分の90%以上が沈殿し、最終的に得られたヒトLOX-1細胞外ドメインタンパク可溶画分(以下、「sLOX-1-D」という)は2.4 mg/15 mLであった。得られたsLOX-1-DをSDS-PAGEでチェックしたところ、ほぼ1バンドで、ほぼ単一のsLOX-1-Dであることが確認された。

## 【0098】

## (2) CHO細胞由来の可溶型LOX-1

ヒトLOX-1発現CHO細胞の培養液中に分泌されるsLOX-1が、天然のヒト可溶型LOX-1に最も近いと考えられる。そこで、ヒトLOX-1をコードするcDNAをpVP22/myc-hisベクター(インビトロジェン製)に組み込んでpVP22/myc-his-LOX-1を作製し、これをCHO細胞にトランスフェクトして、stable cell(ヒトLOX-1(C-myc-Hisタグ付き)発現CHO細胞)をつくった。このヒトLOX-1(C-myc-Hisタグ付き)発現CHO細胞を20mLの培養液(10 vol % FCS(Fetal Calf Serum)及び0.04 g/dL G-418を含むHam's F-12培地)を入れた培養フラスコ(80 cm<sup>2</sup>)で培養(37℃、5%CO<sub>2</sub>)し、その培養細胞から次の方法に従って継代を行った。

20

## 【0099】

まず、培養のフラスコを3~4日ごとに培地交換して細胞が集密状態になったとき、トリプシン-EDTA処理を行い、集めた細胞を数個の培養フラスコに移して継代培養した。また、細胞は一方を凍結保管し、他方を拡大培養に用いた。拡大培養には、細胞約5×10<sup>6</sup>個を入れた3層培養フラスコ(500 cm<sup>2</sup>、培養液150 mL)中で37℃、4~6日間、さらに無血清の培養液に交換して2日間培養した後、その培養上清を限外ろ過(0.22 μm filter)し、10倍濃縮のProtease Inhibitor Cocktailを0.33 mLを加えて凍結保存した。

30

## 【0100】

このLOX-1(C-myc-Hisタグ付き)発現CHO細胞培養上清を集めて、硫酸塩析・透析・濃縮後、Ni-NTA agarose(キアゲン)カラムを用いてアフィニティ精製した。Ni-NTA agaroseカラムからの溶出時にイミダゾール濃度を5、10、20、50及び100 mmol/Lと細かく変えて洗浄し、及び250 mmol/Lのイミダゾールを用いて目的のタンパク(CHO細胞由来sLOX-1)を溶出採取した。

40

## 【0101】

## 実施例2 [TR-FIA法、並びにそれを使用した抗体価及びアフィニティの測定]

抗体のスクリーニング法としてTR-FIA(time-resolved fluoroimmunoassay)法を構築した。当該方法は、第二抗体固相化プレートに被験抗体試料を加え、そこにビオチン標識した抗原(ビオチン標識sLOX-1-D)を結合させて複合体を生成させ、生成した複合物(第二抗体-抗sLOX-1抗体-ビオチン標識sLOX-1-D)を、ユウロピウム(Eu)標識アビジン(またはEu標識ストレプトアビジン)で標識して、時間分解蛍光法により検出することを原理とするものである

50

(図1参照)。

【0102】

当該反応系に、実施例1(1)または(2)で調製した標準物質(sLOX-1-DまたはCHO細胞由来sLOX-1)を添加して、ビオチン標識sLOX-1-Dと競合させて、被験抗体試料とビオチン標識sLOX-1-Dとの結合を阻害することにより、被験抗体試料の上記各標準物質(sLOX-1-DまたはCHO細胞由来sLOX-1)に対するアフィニティを測定することができる。

【0103】

(1) sLOX-1-Dのビオチン化(ビオチン標識sLOX-1-Dの調製)

実施例1(1)で調製したヒトLOX-1細胞外ドメインタンパク(sLOX-1-D) 10  
 )をビオチン化試薬(sulfo-NHS-LC-biotin、ピアス製)を用いてビオチン化した。すなわち、マニュアルに従って下記の方法を行った。

【0104】

(i) sLOX-1-D 0.06 mg ( $3 \times 10^{-9}$  mole)を反応バッファー(0.1 mol/Lリン酸塩バッファー、pH7.4) 0.25 mLに溶解し、そこにsulfo-NHS-LC-biotin(ピアス製) 0.025 mg ( $4.5 \times 10^{-8}$  mole)を溶解した反応バッファー0.025 mLを加える。

【0105】

(ii) 室温で2時間、攪拌し反応を行なう。

(iii) 反応後、ゲルろ過(PD-10、アマシヤム製)により目的物(ビオチン標識sLOX-1-D) 20  
 )を分取後、濃縮する。

【0106】

(2) 第二抗体固相化プレートの調製

第二抗体として、ヤギ抗マウスIgG血清(シバヤギ)からMAPS-IIキット(バイオラッド製)により精製して得られたIgG画分(15.8 mg/mL)を用いた。当該IgG画分を用時、固相化バッファー(0.05 g/dL窒化ナトリウム含有0.05 mol/Lトリスバッファー、pH7.8)にて10 µg/mLに調製し、マイクロタイタープレート(マキシソープフルオロ、ヌンク)の各ウェルに100 µLずつ分注した。室温で一晩以上静置した後、ブロッキングバッファー(20 g/dLシュークロース及び 30  
 ブロックエース(1包4 g、雪印乳業)を精製水100 mLと固相化バッファー 100 mLを加え溶解したもので2回洗浄し、さらにブロッキングバッファー200 µLを加えて5時間以上静置した。ブロッキングバッファーを吸引し、このプレートを減圧下室温で乾燥して第二抗体固相化ドライプレート(4℃保管)とした。

【0107】

(3) 抗体量(抗体価)の測定方法

(2)で調製した第二抗体固相化プレートを洗浄液(0.01 g/dL Tween 20及び0.05 g/dL窒化ナトリウムを含む生理食塩液)で2回洗浄した後、各ウェルに被験抗体試料の希釈液50 µL、および標識抗原混液(ビオチン標識sLOX-1-DとEu標識ストレプトアビジンの等量混合物) 100 µLを加え、4℃で16時間インキュベーションし、3回洗浄する。次いで増強試薬150 µL(フタル酸水素カリウム1. 40  
 39 g、酢酸6.0 g、TOPO(tri-n-octylphosphine oxide) 19.3 mg、NFA(2-naphthoyl trifluoroacetone) 4.59 mg及びTriton X-100 1.0 gを精製水で1 Lとしたもの)を加え、固相に固定化されたユウロピウム(Eu)の時間分解蛍光強度をマルチラベルカウンタ(1420アルボSX、ワラック製)により測定する。斯くして、蛍光強度が100000カウントを与える被験抗体の希釈倍数から、被験抗体試料の抗体価を求めることができる。

【0108】

なお、本測定で試薬の調製等に用いるアッセイバッファーとしては、0.5 g/dL BSA、0.05 g/dL窒化ナトリウム、0.98 mg/dL DTPA、Tween 80 50

0.1 g 及び 0.9 g / d L 塩化ナトリウムを含む 0.05 mol / L トリスバッファー (pH 7.4) を挙げることができる。

#### 【0109】

(4) 抗体のヒト可溶性 LOX-1 に対するアフィニティの評価方法 (阻害曲線)

(2) で調製した第二抗体固相化プレートのウェルに、被験抗体試料の希釈液 50  $\mu$  L、ヒト可溶性 LOX-1 の標準物質 (s LOX-1-D または CHO 細胞由来 s LOX-1) 溶液 50  $\mu$  L、標識抗原混液 (ビオチン標識 s LOX-1-D と Eu 標識ストレプトアビジンの等量混合物) 50  $\mu$  L を加えた後、4  $^{\circ}$ C で一晩インキュベーションし、3 回洗浄する。次いで増強試薬 150  $\mu$  L を加え、固相に固定化されたユウロピウム (Eu) の時間分解蛍光強度をマルチラベルカウンタ (1420 アルボ SX、ワラック製) により測定する。配合する標準物質の濃度を段階的に変えて被験抗体試料とビオチン標識 s LOX-1-D との結合を測定し、標準物質 (s LOX-1-D または CHO 細胞由来 s LOX-1) の濃度に応じて阻害曲線を作成する。阻害曲線データのスキッチャード解析により、被験抗体のヒト可溶性 LOX-1 に対するアフィニティ (解離定数、Kd) を求めることができる。

10

#### 【0110】

実施例 3 [モノクローナル抗体の作製]

(1) 免疫原

免疫原として実施例 1 (1) で調製した s LOX-1-D (沈殿を含む懸濁液)、およびヒト LOX-1 細胞外ドメインの N 端側に位置する配列番号 5 および 6 に示すアミノ酸配列からなるペプチド (ペプチド 1、ペプチド 2) をハプテンとした。これは、実施例 1 (2) の CHO 細胞由来 s LOX-1 の培養液中の含量は大腸菌などに比べて非常に少なく、また培養液中の夾雑物が多いため、この s LOX-1 を免疫原として使用するには、必要量を確保するのが困難だからである。上記のハプテンとウシ血清アルブミン (BSA、シグマ製) のコンジュゲートを免疫原として用いた。

20

#### 【0111】

各ペプチドの C 端には架橋試薬との結合のため、Cys を導入した。BSA に架橋試薬 N-( $\epsilon$ -マレイミドカプロキシ)スクシニイミド エステル (sulfo-EMCS、ピアス製) を用いてマレイミド基を導入し、これと上記の SH 基含有ペプチドフラグメントを反応させてハプテン-BSA コンジュゲートを得た。すなわち BSA 27 mg (4  $\times$  10<sup>-7</sup> mole) を反応バッファー (0.05 mol / L リン酸塩バッファー、pH 7.0) 1 mL に溶解し、そこに sulfo-EMCS 8.21 mg (2  $\times$  10<sup>-5</sup> mole) を溶解した反応バッファー 0.2 mL を加えた。室温で 90 分間、攪拌し反応した。反応後、反応液全量についてゲルろ過カラム (PD-10、アマシャム製) を用いたゲルろ過を行ってマレイミド化 BSA を分取した。

30

#### 【0112】

マレイミド基導入 BSA 溶液 2 mL (全体の 1 / 2 量) に、反応バッファー 0.5 mL に溶解した配列番号 5 に示すペプチド 1 (但し C 端に cys 導入、8.68 mg、6.8  $\times$  10<sup>-6</sup> mole) を加え、室温で 1.5 時間攪拌した後、4  $^{\circ}$ C で一夜反応した。精製水に対して透析後、凍結乾燥した (ペプチド 1-BSA)。

40

#### 【0113】

また、配列番号 6 に示すペプチド 2 (Cys 付き) の 8.33 mg (6.6  $\times$  10<sup>-6</sup> mole) について、マレイミド基導入 BSA 溶液 2 mL を用いて同様に反応を行った (ペプチド 2-BSA)。

#### 【0114】

(2) 免疫

免疫動物としては A / J マウス (6 ~ 8 週齢、雌、10 ~ 20 g (体重) 日本エスエルシーより入手) を用いた。A / J マウスは 20 匹用い、4 匹ずつ 5 群 [1-1 群 (No. 1101 ~ 1104)、2-1 群 (No. 2101 ~ 2104)、3-1 群 (No. 3101 ~ 3104)、4-1 群 (No. 4101 ~ 4104) および 5-1 群 (No. 5101

50

～5104) ]に分けた。免疫原 (sLOX-1-D、ペプチド1-BSA、およびペプチド2-BSA) を生理食塩液に溶解し、等量のフロイント完全アジュバント (ディフコ) を加えて乳化させた。このエマルジョンの約100  $\mu$ g / 100  $\mu$ Lを表3に示すように、各マウスの腹腔内に3週間隔で4回投与した。

【0115】

【表3】

群	免疫原	系統 (マウス No.)	接種量	免疫回数 (間隔)
1-1	sLOX-1-D	A/J (1101-1104)	約100 $\mu$ g	4回 (3週間)
2-1	ペプチド1-BSA	A/J (2101-2104)	約100 $\mu$ g	4回 (3週間)
3-1	ペプチド2-BSA	A/J (3101-3104)	約100 $\mu$ g	4回 (3週間)
4-1	ペプチド1-BSA	A/J (4101-4104)	約100 $\mu$ g	4回 (3週間)
5-1	sLOX-1-D	A/J (5101-5104)	約100 $\mu$ g	4回 (3週間)

10

【0116】

3～4回感作した後に採取した抗血清を被験抗体試料として、実施例2で説明するTR-FIA法を行うことにより、各抗血清の抗体価を調べた。1-1群 (No.1101～1104)、2-1群 (No.2101～2104)、3-1群 (No.3101～3104) のマウスから得られた抗血清の抗体価を表4に示す。

20

【0117】

【表4】

マウス抗 sLOX-1 抗血清の抗体価

マウス No.	免疫原	系統	抗体価 (1/V)		
			2回免疫	3回免疫	4回免疫
1101	sLOX-1-D	A/J	>100000	>200000	-
1102	sLOX-1-D	A/J	>100000	100000	-
1103	sLOX-1-D	A/J	>100000	200000	-
1104	sLOX-1-D	A/J	>100000	200000	-
2101	ペプチド1-BSA	A/J	10000	20000	-
2102	ペプチド1-BSA	A/J	20000	30000	50000
2103	ペプチド1-BSA	A/J	2000	2000	2000
2104	ペプチド1-BSA	A/J	2000	20000	5000
3101	ペプチド2-BSA	A/J	30000	80000	200
3102	ペプチド2-BSA	A/J	2000	2000	500
3103	ペプチド2-BSA	A/J	70000	80000	30000
3104	ペプチド2-BSA	A/J	3000	5000	10000

30

40

Titer (1/V) : dilution at 100000 cps

【0118】

これらの結果から、sLOX-1-Dで免疫して得られた抗血清の抗体価 (蛍光強度が100000 cpsにおける希釈倍数) はそれぞれ10万以上であり、2～3回免疫でほぼプラトーに達することがわかった。また抗体価から、いずれの群のマウスの脾臓細胞も細胞融合に使用可能であると判断された。

【0119】

さらに、この中から以下の方法によりマウスの選択を行った。具体的には、実施例2 ( 50

4) のTR-FIA法により、抗血清（3回感作した後に採取したもの）を被験抗体試料として、まず免疫原として使用したsLOX-1-Dに対するアフィニティを調べた。次いで、sLOX-1-Dに対してアフィニティが高かった抗血清を被験抗体試料として、CHO細胞由来sLOX-1に対するアフィニティを調べた。図2に、1-1群のマウスについて調べた結合阻害曲線を示す。いずれのマウスも免疫原であるsLOX-1-Dとは50%阻害濃度は低く（ウェルあたり2~3 ng）値は近似しているが、CHO細胞由来sLOX-1についてはマウスにより差があるが結合阻害を示している。また、ペプチド2をハプテンとするBSAコンジュゲートを免疫したマウスの抗血清では、ペプチド2との反応性は高かったが、CHO細胞由来のsLOX-1とは結合阻害を示さなかった。このことからペプチド2ハプテンを免疫したマウスについては細胞融合を行わなかった。 10

【0120】

### (3) 細胞融合

上記のようにして 抗血清が、免疫原として使用したsLOX-1-DおよびCHO細胞由来sLOX-1のいずれに対してもアフィニティの高かったマウス（No. 1103、No. 2101、No. 4103、No. 5101）から、脾臓細胞を採取し、ミエローマ細胞との細胞融合を行った。ミエローマ細胞としてはP3U1細胞（P3-X63.Ag8.U1細胞の社内継代系）を選んだ。使用前に、液体窒素中で保管してあるミエローマ細胞を解凍後、ミエローマ継代用培地（RPMI-HEPES：RPMI 1640 450 mLに1 mol/L HEPES（pH6.8）5 mL、OPK溶液（オキサリ酢酸 7.5 mg/mL、ピルビン酸Na 7.5 mg/mL、カナマイシン5 mg/mL）10 mL及びFBS（Fetal Bovine Serum）50 mLを加えたもの）を用いて7~10日間継代培養して細胞融合に供した。 20

【0121】

細胞融合3日前に追加免疫した当該マウスの脾臓をエーテル麻酔下にて摘出し、RPMI-HEPES（RPMI 1640 225 mL及び1 mol/L HEPES（pH 6.8）2.5 mL）で洗浄後、メッシュ上で処理を行って脾臓細胞の浮遊液を調製した。この脾臓細胞約 $1 \times 10^8$  cellとP3U1ミエローマ細胞約 $2 \times 10^7$  cellを混和し、遠沈して上清を除去した後37℃に保って800  $\mu$ Lの50 g/dLポリエチレングリコール4000（PEG4000）（ガスクロマトグラフ用、メルク）を振り混ぜながら1分間で添加し、さらに1.5分間攪拌した。続いて1 mLのRPMI-HEPESを1分間内に攪拌しながら滴下するのを2回繰り返し、更に30秒間内に1 mLのRPMI-HEPESを攪拌しながら滴下するのを2回繰り返した。次いで6 mLのRPMI-HEPESを2分間かけて攪拌しながら追加し、最後に12 mLのHEPES-RPMIを加えた。 30

【0122】

RPMI-HEPESに懸濁している細胞を遠心し、上清を完全に除いた後、HAT培地（RPMI 1640 350 mL、NCTC109（GIBCO）50 mL、OPK溶液10 mL、NEAA（non-essential amino acids、GIBCO）5 mL、1 mol/L HEPES（pH6.8）5 mL、HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）5 mL、FCS100 mL及び10 vol% 40  
BM-Condimed H1（ロシユアプライドサイエンス）を含む培地）170 mLに懸濁させ、培養用96ウェルマイクロプレート約9枚（878ウェル）に分注して（ $1.1 \times 10^5$  cell/0.19 mL/well）、5%炭酸ガス培養器内で37℃にて培養した。各細胞融合の詳細な条件を表5に示す。

【0123】

【表 5】  
細胞融合の条件

マウス No.	PEG4000 mL	脾臓細胞数 × 10 <sup>8</sup>	P3U1 細胞数 × 10 <sup>8</sup>
1103	0.8	1.0	0.2
2101	0.5	0.57	0.11
4103	0.8	0.68	0.16
5101	0.8	0.84	0.17

10

## 【0124】

PEG4000を用いた細胞融合の結果、融合効率はほぼ100%でウェルあたり数個～10数個のコロニーが認められた。

## 【0125】

## (4) HAT培地による融合細胞の選別

融合細胞を培養して5日目に、37℃に加温したHAT培地0.1 mLを各ウェルに追加した。位相差顕微鏡を用いて、毎日ハイブリドーマの成長を観察しウェル全体の1～5%にハイブリドーマが増殖したら、各ウェルの培養上清を0.1 mLずつサンプリングした。これを被験抗体試料として、実施例2で説明するTR-FIA法を行って、抗体価が高いものの中から、さらにアフィニティ及び細胞増殖の強いものを選んで下記のクローニングに供した。

20

## 【0126】

## (5) クローニング (限界希釈法)

クローニングを行なうウェルのハイブリドーマをパスツールピペットではがして、24穴の培養プレートに移動・拡大した。一部を計数して約50 cell/mLになるようにHT培地 (RPMI 1640 350 mL、NCTC 10950 mL、OPK溶液 10 mL、NEAA 5 mL、1 mol/L HEPES (pH 6.8) 5 mL、HT (ヒポキサンチン、チミジン) 5 mL、FBS 100 mL及び10 vol% BM-Condimed H1を含む培地) で倍々希釈した (8段階)。この0.2 mL (細胞数にして0.1～10 cell/well) を培養プレートに分注した。3～6日後に位相差顕微鏡にて観察し、各ウェルの細胞数をチェックした。ハイブリドーマがある程度増殖したら、ウェルあたり約2個以下のものについて培養上清を被験抗体試料として、TR-FIA法を用いてスクリーニングを行い、抗体価・アフィニティ及び増殖性のよいものの中で、単クローンであるウェルを選んだ (一次クローニング)。選んだウェルは速やかに再度クローニング (二次クローニング) を行い、一次クローニングと同様にTR-FIA法を用いてスクリーニングをして目的の抗体を選んだ。単クローンになっていないものについては再度クローニング (三次クローニング) を行った。確立したクローンは、継代を繰り返しながら、徐々に大きな培養フラスコへ移し、約5～10×10<sup>6</sup> cell/mLの濃度に調製して、セラムチューブに0.5 mLずつ分注 (約5本) し、液体窒素中に保管した。このときの培養上清を分取して、抗体価をチェックした。なお、確立したハイブリドーマは凍結後、確認のため再び、培養を行い細胞の増殖性及び抗体価をチェックした。

30

40

## 【0127】

sLOX-1-Dを免疫したマウス (No. 1103) から得られたハイブリドーマは、細胞融合の10日目にスクリーニングし、計11個の陽性ウェル (>100000 cps) を検出した。その中で増殖の良い5ウェルについて限界希釈法にて一次クローニングを行い、ほぼ単クローンと思われる10ウェルを得た。さらに、二次クローニングを行い、その10日目にスクリーニングして、単クローンと思われる3ウェルを得た。これらは、いずれも6B11のクローンから得られたものであった。

## 【0128】

50

また、マウス (No. 5101) から同様に作製したハイブリドーマでは、計48個の陽性ウェルが<sup>5</sup>検出された。その中でsLOX-1-Dに対してアフィニティの強い9ウェルについて一次クローニングを行った。クローニング後の10日目にスクリーニングし、抗体価及びアフィニティが良好でシングルに近いものを選んで二次クローニングを行った。その結果、計8クローン (1G2、2E4、2E5、2G11、3E12、7G1、1B8、1A7) が得られた。

【0129】

さらに、ペプチド1をハプテンとするBSAコンジュゲートを3回免疫した後のA/Jマウス (No. 2101) から得られたハイブリドーマについても2回のクローニングにより、クローン (5C11) を確立した。同様にして、マウス (No. 4103) から、<sup>10</sup> 2回のスクリーニング及びクローニングによりクローン (4D1) を確立した

以上のクローニング結果を表6に示す。

【0130】

【表6】

マウス No.	免疫原	ハイブリドーマ 陽性/全ウェル	2回スクリーニング後の単クローン ウェル番号 (クローン番号)
1103	sLOX-1-D	11/784	6B11
2101	ペプチド1-BSA	2/803	5C11
4103	ペプチド1-BSA	121/1144	4D1
5101	sLOX-1-D	48/580	1G2, 2E4, 2E5, 2G11, 3E12, 7G1, 1B8, 1A7

20

【0131】

(6) モノクローナル抗体の採取 (培養上清及び腹水)

(5) で調製したハイブリドーマのうち、LOX-1の細胞外ドメインタンパク (sLOX-1-D) ならびにLOX-1の細胞外ドメインのN端ペプチドであるペプチド1のBSAコンジュゲートを免疫原として調製した11種類のハイブリドーマ (1G2、2E4、2E5、2G11、3E12、7G1、1B8、1A7、6B11、5C11、4D1) を大量培養して、無血清培地に置き換えその培養上清を集めることによりモノクローナル抗体を採取した。<sup>30</sup>

【0132】

また、上記のハイブリドーマのうちLOX-1の細胞外ドメインタンパク (sLOX-1-D) を免疫原として調製したハイブリドーマ (1G2、2G11、6B11および1A7) ならびにペプチド1をハプテンとして調製したハイブリドーマ (5C11、4D1) を、あらかじめプリスタン1mLで処理したマウス (Balb/c及びBalb/c nu (ヌードマウス)) 腹腔に約 $2 \sim 3 \times 10^6$  cellずつ接種した。なお、ハイブリドーマは液体窒素での凍結状態から解凍し、7~10日間拡大培養した後にマウスに腹腔内投与した。このマウスを観察し腹部が膨れてきたマウス (投与後8~17日) についてエーテル麻酔下にて死亡させた後、腹腔内の腹水を採取した。各ハイブリドーマを接種したマウスから1匹につき1.2~4.9mLの腹水を取得し、抗体価を測定した (表7)。<sup>40</sup>

【0133】

【表7】  
モノクローナル抗体の採取

クローン No.	免疫原	マウス系統	抗体価	マウス1匹当たりの 腹水量 (mL)
6B11	LOX-1-D	Balb/c nu	++	4.7
6B11	LOX-1-D	Balb/c	++	2.4
1G2	LOX-1-D	Balb/c nu	++	4.6
1G2	LOX-1-D	Balb/c	++	2.7
2G11	LOX-1-D	Balb/c nu	++	4.9
2G11	LOX-1-D	Balb/c	++	3.0
1A7	LOX-1-D	Balb/c nu	++	2.5
1A7	LOX-1-D	Balb/c	++	1.2
5C11	ペプチド1-BSA	Balb/c nu	++	2.6
5C11	ペプチド1-BSA	Balb/c	++	3.1
4D1	ペプチド1-BSA	Balb/c nu	++	3.2
4D1	ペプチド1-BSA	Balb/c	++	2.8

10

20

## 【0134】

## (7) モノクローナル抗体の精製

(6) で調製したハイブリドーマの培養上清及びマウス腹水に含まれるモノクローナル抗体を、プロテインAアフィニティカラム (アフィゲルプロテインAMAPS-IIキット、バイオラッド) に供して、IgGに精製した。具体的には、まず、空カラムに約1mLのプロテインA固定化ビーズのゲル (懸濁液にして約1.5~2mL) を充填し、結合バッファー (キットに添付) 10mLで洗浄してプロテインAアフィニティカラムを作成した。ハイブリドーマの培養上清またはマウス腹水0.5mLと結合バッファー0.5~1mLと混合し、遠心分離して調製した上清を、上記で作成したプロテインAアフィニティ

30

## 【0135】

得られたモノクローナル抗体 (IgG) のアイソタイプをMAb-BASED MOUSE Ig ISOTYPING KIT (PHARMINGEN) により決定した。その結果、11種類 (6B11、1G2、2E4、2E5、2G11、3E12、7G1、1A7、1B8、5C11、4D1) のうち9種類がIgG1で残りがIgG2aとIgG2bであった (表8)。また、これらのモノクローナル抗体の解離定数 (Kd) の一部を以下に示す (表9)。なお、上述のKdの各々の値は、ヒトLOX-1細胞外ドメインの一部 (配列番号2) に対するものであるが、ヒト可溶性LOX-1 (配列番号3及び4) とアミノ酸配列の差異は非常に少ないため、ヒト可溶性LOX-1に対するKdもほぼ同等と考えられる。

40

## 【0136】

【表 8】  
モノクローナル抗体の性質

マウス No.	免疫原	クローン No.	sLOX-1-D と の親和性	sLOX-1 (CHO) との親和性	増殖	サブクラス
1103	sLOX-1-D	6B11	++	++	++	IgG1
2101	ペプチド1-BSA	5C11	+++	+	++	IgG1
4103	ペプチド1-BSA	4D1	++	+	++	IgG2a
5101	sLOX-1-D	1G2	+++	+++	++	IgG1
5101	sLOX-1-D	2E4	+++	+++	++	IgG1
5101	sLOX-1-D	2E5	++	++	++	IgG1
5101	sLOX-1-D	2G11	++	++	++	IgG1
5101	sLOX-1-D	3E12	++	++	++	IgG1
5101	sLOX-1-D	7G1	++	++	++	IgG1
5101	sLOX-1-D	1A7	++	++	++	IgG1
5101	sLOX-1-D	1B8	++	++	++	IgG2b

10

【0137】

20

【表 9】

スキッチャードプロットによる解離定数

ハイブリドーマ	解離定数 (nM)
6B11	0.34
4D1	0.36
2G11	0.16
3E12	1.32
7G1	0.12
1A7	0.51

30

【0138】

実施例 4 モノクローナル抗体の組み合わせ

実施例 3 で得られた 11 種類のモノクローナル抗体（培養上清の IgG 画分）のうち 1B8 抗体を除く 10 種類を、実施例 2（1）で説明する方法に従ってビオチン標識した。これらの 10 種のビオチン標識抗体と上記 11 種類のモノクローナル抗体とを、実施例 2（2）の方法に従って固相化したプレートを用いて 2 サイトサンドイッチ ELISA を構築し、110 通りの抗体の組み合わせについて、sLOX-1-D と CHO 細胞由来 sLOX-1 を標準物質としたときの ELISA 標準曲線を調べた。

40

【0139】

ペプチド 1（配列番号 5 で示されるポリペプチドの末端に結合用のシステインを付加したものに BSA をコンジュゲートさせたペプチド 1-BSA を免疫原として実施例 3 に従って調製した抗体（4D1 抗体及び 5C11 抗体）を固相にしたとき、ブランクは高いものの、どのビオチン標識モノクローナル抗体（6B11、1G2、2E4、2E5、2G11、3E12、7G1、1A7、1B8）との組み合わせの ELISA においても良好なレスポンスを示した（表 10）。

【0140】

50

【表10】  
sLOX-1 ELISAにおけるモノクローナル抗体の組み合わせ

No.		6B11	1A7	3E12	1G2	2G11	2E4	7G1	5C11	4D1	2E5	1B8	
ビオチン標識 抗体	6B11		++	-	-	-	-	-	++	++	-	-	
	1A7	++		-	-	-	-	-	+	++	-	-	
	3E12	+	-		-	-	-	-	+	+	-	-	
	1G2	+	-	-		-	-	-	++	++	+	-	
	2G11	+	-	-	-		-	-	++	++	+	-	
	2E4	-	-	-	-	-		-	++	++	-	-	
	7G1	-	-	-	-	-	-		+	+	-	-	
	5C11	++	++	++	++	++	++	++		-	++	++	
	4D1	++	++	++	++	++	++	++	++	-		++	++
	2E5	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++		-
	1B8	None	None	None	None	None	None	None	None	None	None	None	

10

20

## 【0141】

このことからsLOX-1-Dを免疫して得られた9種類のモノクローナル抗体(6B11、1G2、2E4、2E5、2G11、3E12、7G1、1A7、1B8)は、sLOX-1 N端ペプチドに対する抗体と同時に結合をしていることを示しsLOX-1のN端(ネオエピトープ)とは異なる部位を認識していることがわかった。

30

## 【0142】

sLOX-1-Dを免疫して得られた抗体同士(6B11、1G2、2E4、2E5、2G11、3E12、7G1、1A7、1B8)では、1A7抗体と6B11抗体との組み合わせでのみ強いレスポンスを示し、これ以外の抗体はどれも認識部位が近接している可能性が示唆された(表10)。

## 【0143】

なお、上記で得られたモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマのうち、ハイブリドーマ1A7および6B11についてはハイブリドーマの表示「Mouse-Mouse hybridoma sLOX-1 1A7」及び「Mouse-Mouse hybridoma sLOX-1 6B11」として、2006年7月26日付けで、日本国茨城県つくば市東1丁目1番1中央第6に住所を有する独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに、国際寄託した。各ハイブリドーマの受領番号および受託番号は、下記の通りである：

40

## 【0144】

## 【表 11】

ハイブリドーマの表示	受領番号	受託番号
「Mouse-Mouse hybridoma sLOX-1 1A7」	FERM ABP-10645	FERM BP-10645
「Mouse-Mouse hybridoma sLOX-1 6B11」	FERM ABP-10646	FERM BP-10646

## 【0145】

## 実施例 5 [化学発光ELISA]

## (1) モノクローナル抗体の断片化方法

モノクローナル抗体 (IgG) の  $0.02 \text{ mol/L}$  酢酸バッファー溶液 (pH 4.0)  $0.25 \text{ mL}$  にペプシン (シグマ) 希釈液 ( $50 \mu\text{g/mL}$ )  $50 \mu\text{L}$  を加え攪拌後、 $37^\circ\text{C}$  で 3 時間反応する。反応終了後、ゲルろ過 HPLC システム (島津 LC-6A、カラム: TSK-gel G3000SWXL、 $6.8 \times 300 \text{ mm}$ 、溶離液:  $0.2 \text{ mol/L}$  塩化ナトリウムを含む  $0.1 \text{ mol/L}$  リン酸塩バッファー、pH 7.0、流速:  $0.5 \text{ mL/min}$ 、検出:  $280 \text{ nm}$ ) により、保持時間約 18 分の  $\text{F(ab')}_2$  画分 (分子量約 9.2 万) を分取した。

## 【0146】

分取した  $\text{F(ab')}_2$  画分を遠心限外ろ過 (YM-30、セントリコン) で濃縮後、 $0.32 \text{ mg}$  をバッファー A ( $5 \text{ mmol/L}$  EDTA を含む  $0.1 \text{ mol/L}$  リン酸塩バッファー、pH 6.0)  $0.25 \text{ mL}$  に  $0.1 \text{ mol/L}$  2-メルカプトエチルアミン  $0.025 \text{ mL}$  を加えて  $37^\circ\text{C}$  で 90 分間還元した。反応終了後、ゲルろ過 HPLC システムにより保持時間約 20 分の Fab' の画分 (分子量約 4.6 万) を採取した。分取した Fab' 画分は遠心限外ろ過 (YM-30) で濃縮した。

## 【0147】

## (2) アルカリホスファターゼによる抗体の標識方法

アルカリホスファターゼ (ALP、ウシ小腸由来、キッコーマン)  $1 \text{ mg}$  を  $0.1 \text{ mol/L}$  リン酸塩バッファー (pH 7.0)  $0.2 \text{ mL}$  に溶解し、精製水  $0.05 \text{ mL}$  に溶解した N-(8-maleimidocapryloxy)sulfosuccinimide, sodium salt (sulf-HMCS、同仁化学)  $0.1 \text{ mg}$  を加えて、室温で 2 時間反応させる。反応終了後、PD-10 カラム (溶離液: バッファー A) で精製後、その高分子画分を遠心限外ろ過 (YM-10、セントリコン) で濃縮し、マレイミド化 ALP とした。

## 【0148】

(1) で調製したモノクローナル抗体の Fab' を  $0.13 \text{ mg}$  含むバッファー A  $0.25 \text{ mL}$  に、上記マレイミド化 ALP 溶液  $0.026 \text{ mL}$  ( $0.128 \text{ mg}$ ) を加えて攪拌後、室温で 16 時間反応させた。反応終了後、反応液  $0.15 \text{ mL}$  をゲルろ過 HPLC システム (溶離液:  $0.2 \text{ mol/L}$  塩化ナトリウムを含む  $0.1 \text{ mol/L}$  リン酸塩バッファー、pH 7.0) にて分離・精製し (保持時間約 15 分)、ALP 標識抗体 (ALP 標識 Fab') とした。

## 【0149】

(3) ALP 標識モノクローナル抗体 (1G2、2G11、6B11) の至適量の検討 40  
培養上清あるいは腹水から得られた 3 種類のモノクローナル抗体 (1G2、2G11、6B11) の IgG 画分 (1G2:  $2.0 \text{ mg}$ 、2G11:  $1.9 \text{ mg}$  及び 6B11:  $1.3 \text{ mg}$ ) を、上記 (1) および (2) の方法に従って、ペプシン処理後還元して Fab' とし、マレイミド化 ALP と反応させて、ゲルろ過 HPLC により、3 種類の Fab'-ALP コンジュゲート (酵素標識抗体) を分取した。得られた酵素標識抗体はそれぞれ  $0.41 \text{ mg}$ 、 $0.42 \text{ mg}$  及び  $0.29 \text{ mg}$  であった。

## 【0150】

得られた 3 種類の酵素標識抗体 (1G2、2G11 及び 6B11) の評価を、3 種類の固相抗体 (5C11、4D1、1A7) を用いて調べた。その結果、どの酵素標識抗体 (1G2、2G11 及び 6B11) も 3 種類の固相抗体 (5C11、4D1、1A7) に対 50

して良好なレスポンスを示し、作製した酵素標識抗体がいずれもELISAに使用できることがわかった。なお、酵素標識抗体のウェルあたりの使用量は1G2では170 ng/mL、2G11では150 ng/mL及び6B11では190 ng/mLのものを100 μL使用することとした。

【0151】

(4) 化学発光ELISAによるヒト血清試料の測定方法

モノクローナル抗体IgG (1A7のIgG) の固相化バッファー希釈液100 μL (1 μg/100 μL) を用いて、実施例2 (2) 項に述べた第二抗体固相化プレート作製方法に準じて操作して、抗体固相化ドライプレートを作製した。

【0152】

この抗体固相化プレートを洗浄液 (0.01 g/dL Tween 20 及び 0.05 g/dL 窒化ナトリウムを含む生理食塩液) で2回洗浄した後、各ウェルにsLOX-1-D標準溶液あるいはCHO細胞由来sLOX-1精製液100 μL (ヒト血清試料測定の場合はアッセイバッファー100 μLに試料10 μL) を加えて、5時間静置した。3回洗浄後、ALP標識抗体溶液 (6B11のFab'-ALPコンジュゲート) 100 μLを加えた。室温で一晩インキュベーションし、4回洗浄後、固相に化学発光基質溶液 (100 μL) を加え、直ちに各ウェルの発光強度をマルチラベルカウンターにより測定した。発光基質にはLumigen APS-5 (オリエンタル酵母) を用いた。なお、固相化抗体とALP標識抗体の組み合わせとして、1A7-6B11 (固相化抗体-ALP標識抗体) を用いた。

10

20

【0153】

なお、試薬の調製等に用いるアッセイバッファーには、0.5 g/dL BSA、0.05 g/dL 窒化ナトリウム、0.01 g/dL Tween 80、1 mmol/L 塩化マグネシウム、0.1 mmol/L 塩化亜鉛及び0.9 g/dL 塩化ナトリウムを含む0.05 mol/L トリスバッファー (pH 7.4) を用いた。

【0154】

(5) ELISA系の選択

実施例5 (4) 項に従って、3種類の酵素標識抗体 (1G2、2G11及び6B11) と、モノクローナル抗体1A7、5C11及び4D1のIgGを固相化 (1 μg/0.1 mL) したプレートを用いて、LOX-1細胞外ドメインタンパクを標準物質とした化学発光2サイトサンドイッチELISAの標準曲線 (0.24-250 pg/well) を作成した。いずれの組み合わせも高いレスポンスを示し、特に固相化抗体と標識抗体 (Fab'-ALPコンジュゲート) の組み合わせがそれぞれ1A7-6B11、5C11-1G2、4D1-2G11のとき高感度な標準曲線が得られた。その中でもややブランクは高いが最もレスポンスの高いものは1A7-6B11の組み合わせであった (推定検出限界0.24 pg/well (約6 amol/well)) 。

30

【0155】

CHO細胞由来sLOX-1を標準物質とした化学発光2サイトサンドイッチELISAの標準曲線でも、1A7-6B11の組み合わせはペプチド1に対する抗体を固相に使用した5C11-1G2、4D1-2G11と比べて100倍程度感度が良いことがわかった (図3) 。

40

【0156】

(6) 血清成分のELISAに及ぼす影響

ヒト血清 (ボランティア5人分の血清をプールしたもの)、ウサギ血漿及び牛胎児血清を1/1~1/64まで希釈し、その50 μL (血清量として0.78~50 μL/well) を上記の3種類のアッセイ系を用いて測定した。1A7-6B11 (固相化抗体-ALP標識抗体) のELISA系において、動物血清ではほとんどレスポンスはなかったが、ヒト血清では血清量に応じてレスポンスを示し、0.78~12.5 μLの範囲で希釈直線性が見られた。これらの結果は、この測定系が、ヒト血清中のヒトsLOX-1を特異的に測定することができることを示している (図4) 。

50

【0157】

また、ヒト血清のサンプリング量が10 μL以下では血清成分の影響はきわめて小さいと推定されたことから、血清のサンプリング量は10 μLとし、標準溶液はヒト血清を含まないアッセイバッファーで調製することとした。

【0158】

(7) マウスγグロブリンのELISAに及ぼす影響

血中に抗マウス抗体 (human anti-mouse antibody、HAMA) を持つヒトが無視できない割合で存在することが知られており、マウス抗体を使用するELISAにおいてこれらのヒトの血液試料は異常高値を示す。この妨害はアッセイバッファーにあらかじめマウスγグロブリン (IgG) を添加することにより抑えることができ、本ELISAにおいてもマウスγグロブリンをアッセイバッファーに添加してその影響を除くこととした。ELISA標準曲線に及ぼすマウスγグロブリン濃度の影響を調べたところ、20 μg/mLまでならほとんど影響せず、アッセイバッファーには10 μg/mLのマウスγグロブリンを添加することとした。なお、ここで使用したボランティア5人の血清中にHAMAは存在しなかった。図5にマウスγグロブリンを含むアッセイバッファーで作成したELISA標準曲線を示す。

10

【0159】

(8) プレバリデーションと定量限界の推定

sLOX-1濃度の低いボランティア血清 (No. 3) にsLOX-1-Dを0.100~12.8 ng/mL (1~128 pg/well) の濃度に添加した試料を用いてプレバリデーションを行った。表12に示すように、0.100~6.40 ng/mLの範囲における実験内の精度・真度は良好であった (1.7~15.7%及び-10.5~+14.4%)。同濃度範囲における実験間の精度・真度も良好であった (5.3~12.3%及び-8.3~+7.5%)。一方、高濃度 (12.8 ng/mL) ではやや真度が悪いが、標準曲線のポイントと回帰計算方法を見直すことで改善できると思われる。これらの結果から、定量限界は約0.1 ng/mLと推定された。ポリクローナル抗体を用いたELISA (定量限界: 1 ng/mL) よりも10倍の感度向上を達成できた。

20

【0160】

本ELISAの第一及び第二反応の時間 (それぞれ5時間及び一晩) はポリクローナル抗体仕様のものに合わせたが、モノクローナル抗体を用いていることから反応時間を短縮できる可能性があり、第一反応を4時間、第二反応を1時間としたときの実験内の精度・真度を調べたところ、表13に示すように問題のない結果が得られた (それぞれ2.3~14.7%及び-14.1~16.0%)。

30

【0161】

【表12】

添加量 測定値	測定1 (ng/mL)					測定2 (ng/mL)					測定3 (ng/mL)				
	0.100	0.40	1.60	6.40	12.8	0.100	0.40	1.60	6.40	12.8	0.100	0.40	1.60	6.40	12.8
	0.116	0.384	1.68	5.87	11.0	0.127	0.33	1.65	5.49	9.41	0.085	0.403	1.57	6.52	12.0
	0.101	0.342	1.74	5.77	11.2	0.102	0.34	1.57	5.67	9.72	0.109	0.373	1.95	5.92	10.6
	0.108	0.416	1.65	6.01	10.7	0.103	0.38	1.69	5.48	9.33	0.102	0.385	1.83	5.66	11.0
	0.111	0.335	1.67	5.99	10.7	0.083	0.36	1.68	5.82	9.36	0.127	0.374	1.90	6.07	11.0
	0.110	0.393	1.69	5.90	10.5	0.094	0.39	1.58	5.47	9.33	0.121	0.349	1.90	6.42	12.0
平均	0.109	0.374	1.69	5.91	10.9	0.102	0.358	1.63	5.59	9.4	0.109	0.377	1.83	6.12	11.3
実験内 標準偏差	0.005	0.035	0.03	0.10	0.3	0.016	0.023	0.06	0.15	0.2	0.017	0.020	0.15	0.36	0.6
精度・真度変動係数	4.6	9.4	1.8	1.7	2.8	15.7	6.4	3.7	2.7	2.1	15.6	5.3	8.2	5.9	5.3
バイアス	9.0	-6.5	5.6	-7.7	-14.8	2.0	-10.5	1.9	-12.7	-26.6	9.0	-5.8	14.4	-4.4	-11.7
平均											0.106	0.370	1.72	5.87	10.5
実験間 標準偏差											0.013	0.026	0.12	0.31	0.9
精度・真度変動係数											12.3	7.0	7.0	5.3	8.6
バイアス											6.0	-7.5	7.5	-8.3	-18.0

40

【0162】

## 【表 1 3】

sLOX-1 ELISA の短時間測定条件における精度と真度  
(第一反応時間：4時間、第二反応時間：1時間)

実験内精度・真度 (ng/mL)					
添加量	0.100	0.40	1.60	6.40	12.8
測定値	0.110	0.394	1.64	6.13	11.7
	0.096	0.387	1.89	6.04	10.8
	0.106	0.369	1.69	6.31	10.7
	0.133	0.410	1.92	6.03	11.2
	0.133	0.388	1.97	6.30	10.6
平均	0.116	0.39	1.82	6.16	11.0
標準偏差	0.017	0.015	0.15	0.14	0.4
変動係数	14.7	3.8	8.2	2.3	3.6
バイアス	16.0	-2.5	13.8	-3.8	-14.1

10

## 【0163】

(9) 血清中 sLOX-1 の測定

本アッセイ系を用いて健常ボランティア5人から得た血清中の sLOX-1 濃度 (sLOX-1-D を標準物質としたときの免疫リアクティビティ) を測定した。表 1 4 に示すように健常ヒト血清の sLOX-1 の値は 0.15 ~ 0.57 ng/mL で、本 ELISA により従来の方法 (ポリクローナル抗体仕様の ELISA) では測定できなかった健常ヒト血清中の sLOX-1 の測定が可能であった。なお、この測定結果からは性別あるいは年齢との関連は認められなかった。

20

## 【0164】

## 【表 1 4】

sLOX-1 ELISA による健常人ボランティア血清の測定結果

血清 No.	ボランティア 性別と年齢	sLOX-1 ng/mL
No.1	M 40	0.37
No.2	F 34	0.21
No.3	M 51	0.15
No.4	M 51	0.54
No.5	F 26	0.57
平均		0.37
±標準偏差		0.19
プール		0.35

30

## 【0165】

健常人の sLOX-1 の血中平均濃度は 0.35 ng/mL であることからその分子量を考慮すると、血清中のモル濃度は  $2 \times 10^{-11}$  M 程度となり、これを 10 倍に希釈して測定に供することから測定時のモル濃度は  $2 \times 10^{-12}$  M 程度と計算される。一方、本発明のモノクローナル抗体のような高親和性 ( $K_d = 1 \times 10^{-10}$  M 以下) 抗体の 0.1% が sLOX-1 と結合しているときの sLOX-1 の総濃度は  $2 \times 10^{-12}$  M 程度と見積もられる。このように高親和性モノクローナル抗体を用いることにより健常人の血清中の sLOX-1 の濃度を測定でき、正確な診断が可能となる。

40

【図面の簡単な説明】

## 【0166】

【図 1】本発明のモノクローナル抗体のスクリーニングに用いた 2 サイトサンドイッチ ELISA の概略図を示す。

50

【図2】 sLOX-1-Dを免疫して作成したA/Jマウス〔No.1101（丸マーク）、No.1102（三角マーク）、No.1103（四角マーク）、No.1104（菱形マーク）〕の抗血清を用いて、標準物質sLOX-1-D（黒マーク）およびCHO細胞由来sLOX-1（白抜きマーク）を阻害物質としてTR-FIA法を行った結果を阻害曲線として描いたグラフである（実施例3）。縦軸は各濃度（B）の蛍光強度のゼロの濃度（B<sub>0</sub>）の蛍光強度に対するパーセントを、横軸はLOX-1細胞外ドメインタンパク質（sLOX-1-D）濃度あるいはLOX-1発現CHO細胞からの可溶性LOX-1（sLOX-1）の推定濃度（ng/well）を示す。

【図3】 固相化抗体-標識抗体として、1A7-6B11（●）、5C11-1G2（▲）、4D1-2G11（■）を用いた2サイトサンドイッチELISAの標準曲線を示す 10  
 図Aは、標準物質としてsLOX-1-Dを用いて行ったELISAの標準曲線、図Bは、標準物質としてCHO細胞由来sLOX-1を用いて行ったELISAの標準曲線を示す（実施例5（4））。縦軸は蛍光強度（cps）を、横軸は各標準物質の添加濃度（pg/well）を示す。

【図4】 固相化抗体-標識抗体として、1A7-6B11を用いた2サイトサンドイッチELISAの各血清（ヒト血清◆、正常家兎血清▲）に対するレスポンスを示す（実施例5（6））。縦軸は蛍光強度（cps）を、横軸は血清の添加量（μl）を示す。

【図5】 固相化1A7抗体-標識6B11抗体を用いた2サイトサンドイッチELISAの標準曲線を示す。図Aはlog-logプロット、図Bはsemi-logプロットを示す。縦軸は蛍光強度（cps）を、横軸は標準物質（sLOX-1-D）の添加濃度（pg/well）を示す。添加したγグロブリンの濃度は0μg/mL（○）、5μg/mL（●）、10μg/mL（◆）、20μg/mL（■）である。 20

【配列表フリーテキスト】

【0167】

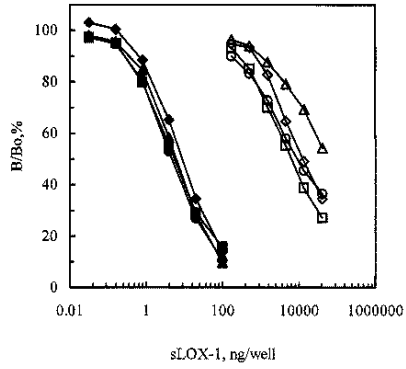
配列番号5は、可溶性分子（配列番号3）のアミノ酸配列の1-10の領域に相当するペプチドのアミノ酸配列を示す。ヒトLOX-1（配列番号1）のアミノ酸配列の88-97領域に相当する。

配列番号6は、可溶性分子（配列番号4）のアミノ酸配列の1-10の領域に相当するペプチドのアミノ酸配列を示す。ヒトLOX-1（配列番号1）のアミノ酸配列の92-101の領域に相当する。 30

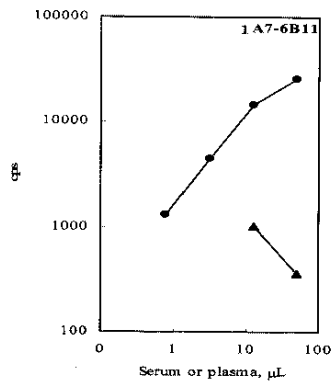
【図 1】



【図 2】

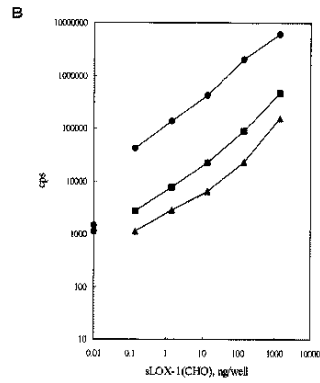
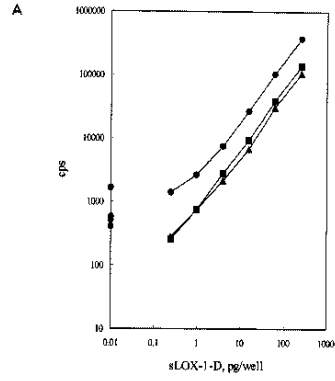


【図 4】

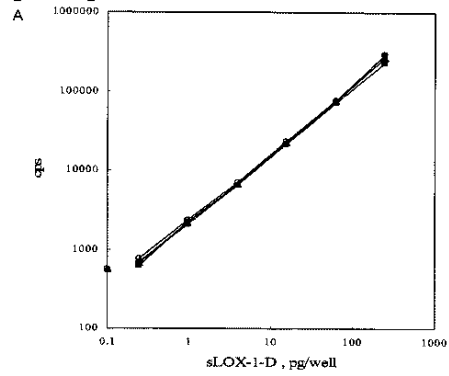


ヒト血清(◆)、正常家兎血漿(▲)

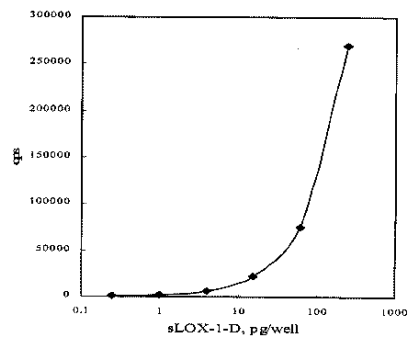
【図 3】



【図 5】



B



## 【配列表】

2008013257000001.app

## 【手続補正書】

【提出日】平成20年5月27日(2008.5.27)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

(削除)

【請求項2】

ヒト可溶性LOX-1に特異的に結合する特性を備え、ヒト可溶性LOX-1との解離定数(Kd)が、 $1 \times 10^{-9}$  (M)以下であることを特徴とする、モノクローナル抗体もしくはその一部、またはこれらの標識物。

【請求項3】

下記の工程を含む方法で調製されるハイブリドーマにより産生される、請求項2に記載するモノクローナル抗体もしくはその一部、またはこれらの標識物：

(1) 非ヒト動物に、原核細胞由来のヒトLOX-1細胞外ドメインの一部を免疫する工程、

(2) 当該動物から抗体産生細胞を回収する工程、

(3) 当該抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合する工程、

(4) 上記工程で得られた融合細胞のなかから、前記ヒトLOX-1細胞外ドメインの一部を含む画分と反応するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選択する工程、および

(5) 当該選択したハイブリドーマのなかから、真核細胞由来のヒトLOX-1細胞外ドメインの一部と反応するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選択する工程。

【請求項4】

「Mouse-Mouse hybridoma sLOX-1 1A7」(受託番号：FERM BP-10645)、または「Mouse-Mouse hybridoma sLOX-1 6B11」(受託番号：FERM BP-10646)により産生される、請求項2に記載するモノクローナル抗体もしくはその一部、またはこれらの標識物。

【請求項5】

(削除)

【請求項6】

(削除)

【請求項7】

請求項2乃至4のいずれかに記載するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項8】

「Mouse-Mouse hybridoma sLOX-1 1A7」(受託番号：FERM BP-10645)、または「Mouse-Mouse hybridoma sLOX-1 6B11」(受託番号：FERM BP-10646)である、請求項7記載のハイブリドーマ。

【請求項9】

(削除)

【請求項10】

(削除)

【請求項11】

請求項 2 乃至 4 のいずれかに記載のモノクローナル抗体もしくはその一部、またはこれらの標識物を含む、ヒト可溶性 L O X - 1 検出用試薬キット。

【請求項 1 2】

急性冠症候群診断キットである請求項 1 1 に記載する試薬キット。

【請求項 1 3】

請求項 2 乃至 4 のいずれかに記載のモノクローナル抗体もしくはその一部、またはこれらの標識物を、ヒト可溶性 L O X - 1 に対する特異的結合試薬または特異的検出試薬として用いる工程を有する、ヒト可溶性 L O X - 1 の特異的検出方法。

【請求項 1 4】

(削除)

【請求項 1 5】

急性冠症候群の治療薬または治療候補薬が投与されたヒトの体液を対象として、請求項 2 乃至 4 のいずれかに記載のモノクローナル抗体もしくはその一部、またはこれらの標識物を用いて、当該体液中の可溶性 L O X - 1 を測定する工程を有する、急性冠症候群の治療薬または治療候補薬の薬効の評価方法。

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2007/064750
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K16/28(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K16/28, C12N5/10, C12P21/08		
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) BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JMEDPlus (JDream2), JST7580 (JDream2), JSTPlus (JDream2)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Toru KITA, Noriaki KUME, "Kyoketsusei Shin Shikkan ni okeru Kecchu Kayosei LOX-1 Nodo Sokutei no Igi", Kosei Rodo Kagaku Kenkyu Kenkyuhi Joseikin Choju Kagaku Sogo Kenkyu Jigyo Ko-Remnant Lipoprotein Kessho ni Gappei suru Kyoketsusei Shin Shikkan Oyobi Nokosoku no Yobo-Chiryoho Kakuritsu no Tame no Daikibo Rinsho Kenkyu Heisei 17 Nendo Sokatsu Kenkyu Hokokusho, 2006. 03, pages 17 to 19, full text	1, 2, 8
X	JP 2005-272383 A (Nihon Medi-Physics Co., Ltd.), 06 October, 2005 (06.10.05), Full text (Family: none)	7
<input 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 27 September, 2007 (27.09.07)		Date of mailing of the international search report 09 October, 2007 (09.10.07)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/064750

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See extra sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Claims 1 and 2, and claims 7 and 8 (part referring to claim 2)

**Remark on Protest**  
the

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee..
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/064750

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)

(1) The matter common to the invention described in claims 1-8, 11-13 and 15 and the invention described in claims 9 and 10 relates to a "monoclonal antibody having a property of specifically binding to human soluble LOX-1", however, the "monoclonal antibody having a property of specifically binding to human soluble LOX-1" is known (e.g., document 1: Large-Scale Clinical Study for Establishment of Method for Preventing/Treating Ischemic Heart Diseases and Cerebral Infarction Occurring with Remnant Hyperlipoproteinemia, Research Report in 2006, Health and Labour Sciences Research Grant for Research on Longevity Science, 2006.03, pp. 17-19), therefore, there is no common "special technical feature" between the invention described in claims 1-8, 11-13 and 15 and the invention described in claims 9 and 10.

(2) The matter common to the inventions described in claims 1, 2 and claims 7,8, 11-13, 15 (part referring to claim 2), claims 1, 3 and claims 7,8, 11-13, 15 (part referring to claim 3), claims 1, 4 and claims 7,8, 11-13, 15 (part referring to claim 4), claims 1, 5 and claims 1, 6, claims 1, 7, and claim 8 (part referring to claim 7), claims 1, 11 and claim 12 (part referring to claim 11), claims 1, 13 and claims 1, 15 relates to a "monoclonal antibody having a property of specifically binding to human soluble LOX-1" described in claim 1, however, as described above, the "monoclonal antibody having a property of specifically binding to human soluble LOX-1" is known, therefore, there is no common "special technical feature" among the above inventions.

(3) The matter common to the inventions described in claims 1, 2 and claims 7,8 (part referring to claim 2), claims 1,2 and claims 11,12 (part referring to claim 2), claims 1,2 and claim 13 (part referring to claim 2), claims 1,2 and claim 15 (part referring to claim 2) relates to a "monoclonal antibody with a dissociation constant (Kd) for human soluble LOX-1 of  $10 \times 10^{-9}$  (M) or less" described in claim 2. However, the quantification limit of the antibody is 0.1 ng/mL from the description on page 39, line 6 in this specification. Meanwhile, the quantification limit of the antibody described in the document 1 is 10 pg/mL, and both have a similar property. Therefore, a possibility that the antibody described in the document 1 has a dissociation constant (Kd) for human soluble LOX-1 of  $10 \times 10^{-9}$  (M) or less is high, and the inventor of this application is included in the author of the document 1. Thus, a rational assumption that the antibody described in the document 1 and the antibody described in claim 2 are the same substance can be made. Accordingly, the "monoclonal antibody with a dissociation constant (Kd) for human soluble LOX-1 of  $10 \times 10^{-9}$  (M) or less" described in claim 2 is described in document 1 and known, therefore, there is no common "special technical feature" among the above inventions.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 7 / 0 6 4 7 5 0	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K16/28 (2006.01) i, C12N5/10 (2006.01) i, C12P21/08 (2006.01) i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K16/28, C12N5/10, C12P21/08			
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			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JMEDPlus (JDream2), JST7580 (JDream2), JSTPlus (JDream2)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
X	北徹/久米典昭, 虚血性心疾患における血中可溶性LOX-1濃度測定の意義, 厚生労働科学研究研究費助成金長寿科学総合研究事業 高レムナントリポ蛋白血症に合併する虚血性心疾患および脳梗塞の予防・治療法確立のための大規模臨床研究 平成17年度総括研究報告書, 2006.03, p.17-19, 全文	1, 2, 8	
X	JP 2005-272383 A (日本メジフィジックス株式会社) 2005.10.06, 全文 (ファミリーなし)	7	
<input 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		の日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 27.09.2007		国際調査報告の発送日 09.10.2007	
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) 柴原 直司 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 3534

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 7 / 0 6 4 7 5 0

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。  
特別ページ参照

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲 1, 2 及び請求の範囲 7, 8 (請求の範囲 2 を引用する部分)

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付を伴う異議申立てがなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(2)) (2005年4月)

(1) 請求の範囲 1-8, 11-13, 15 に記載された発明と請求の範囲 9, 10 に記載された発明との間に共通する事項は、「ヒト可溶性 LOX-1 に特異的に結合する特性を備えたモノクローナル抗体」に関するものであるが、「ヒト可溶性 LOX-1 に特異的に結合する特性を備えたモノクローナル抗体」は公知(例えば、文献 1: 厚生労働科学研究費助成金長寿科学総合研究事業 高レムナントリポ蛋白質血症に合併する虚血性心疾患および脳梗塞の予防・治療法確立のための大規模臨床研究 平成 17 年度総括研究報告書, 2006.03, p.17-19)であるから、請求の範囲 1-8, 11-13, 15 に記載された発明と請求の範囲 9, 10 に記載された発明との間に共通する「特別な技術的特徴」は存在しないといえる。

(2) 請求の範囲 1, 2 及び請求の範囲 7, 8, 11-13, 15(請求の範囲 2 を引用する部分)、請求の範囲 1, 3 及び請求の範囲 7, 8, 11-13, 15(請求の範囲 3 を引用する部分)、請求の範囲 1, 4 及び請求の範囲 7, 8, 11-13, 15(請求の範囲 4 を引用する部分)、請求の範囲 1, 5、請求の範囲 1, 6、請求の範囲 1, 7 及び請求の範囲 8(請求の範囲 7 を引用する部分)、請求の範囲 1, 11 及び請求の範囲 12(請求の範囲 11 を引用する部分)、請求の範囲 1, 13、及び、請求の範囲 1, 15 に記載された発明に共通する事項は、請求の範囲 1 に記載される「ヒト可溶性 LOX-1 に特異的に結合する特性を備えたモノクローナル抗体」に関するものであるが、上述したように「ヒト可溶性 LOX-1 に特異的に結合する特性を備えたモノクローナル抗体」は公知であるから、上述した発明との間に共通する「特別な技術的特徴」は存在しないといえる。

(3) 請求の範囲 1, 2 及び請求の範囲 7, 8(請求の範囲 2 を引用する部分)、請求の範囲 1, 2 及び請求の範囲 11, 12(請求の範囲 2 を引用する部分)、請求の範囲 1, 2 及び請求の範囲 13(請求の範囲 2 を引用する部分)、及び、請求の範囲 1, 2 及び請求の範囲 15(請求の範囲 2 を引用する部分)に記載された発明に共通する事項は、請求の範囲 2 に記載される「ヒト可溶性 LOX-1 との解離定数(Kd)が  $10 \times 10^{-9}$  (M) 以下であるモノクローナル抗体」に関するものである。しかしながら、本願明細書の第 39 頁の第 6 行目の記載から該抗体の定量限界は 0.1ng/mL であり、一方、文献 1 に記載される抗体の定量限界は 10pg/mL であり、両者は類似した性質を有していることから、文献 1 に記載される抗体もヒト可溶性 LOX-1 との解離定数(Kd)が  $10 \times 10^{-9}$  (M) 以下である蓋然性が極めて高いこと、及び、本願発明の発明者が文献 1 の著者に含まれていることを勘案すると、文献 1 に記載される抗体と請求の範囲 2 に記載された抗体は同一のものであるとの一応の合理的な疑いが成り立つ。したがって、請求の範囲 2 に記載された「ヒト可溶性 LOX-1 との解離定数(Kd)が  $10 \times 10^{-9}$  (M) 以下であるモノクローナル抗体」は、文献 1 に記載され公知なものであるから、上述した発明との間に共通する「特別な技術的特徴」は存在しないといえる。

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	

(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,MT,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,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,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,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 久米 典昭

京都府京都市左京区吉田近衛町 国立大学法人京都大学大学院医学研究科内

(72)発明者 太田 英樹

大阪府大阪市福島区鷺洲5丁目1番4号 塩野義製薬株式会社内

Fターム(参考) 2G045 AA25 AA40 DA36 DA77  
 4B024 AA11 BA44 DA02 GA03 HA15  
 4B064 AG27 CA20 CC24 DA13  
 4B065 AA91X AA91Y AB05 AC14 BA08 CA46  
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA76 EA50 FA72

(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。

