

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5054425号  
(P5054425)

(45) 発行日 平成24年10月24日(2012.10.24)

(24) 登録日 平成24年8月3日(2012.8.3)

(51) Int.Cl.			F I		
C 1 2 N	15/02	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	C
C 0 7 K	16/14	(2006.01)	C 0 7 K	16/14	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	1 0 2
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	S
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N

請求項の数 4 (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2007-122824 (P2007-122824)	(73) 特許権者	506404843
(22) 出願日	平成19年5月7日(2007.5.7)		大野 尚仁
(65) 公開番号	特開2008-273916 (P2008-273916A)		東京都八王子市堀之内1 4 3 2-1 東京
(43) 公開日	平成20年11月13日(2008.11.13)		薬科大学薬学部免疫学教室内
審査請求日	平成22年3月31日(2010.3.31)	(74) 代理人	100093230
微生物の受託番号	IPOD FERM P-21284		弁理士 西澤 利夫
		(72) 発明者	大野 尚仁
			東京都八王子市堀之内1 4 3 2-1 東京
			薬科大学 薬学部 免疫学教室内
		(72) 発明者	石橋 健一
			東京都八王子市堀之内1 4 3 2-1 東京
			薬科大学 薬学部 免疫学教室内
		審査官	吉森 晃

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗β-1, 6-グルカン・モノクローナル抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

Candida細胞壁から精製したβ-グルカン(CSBG)で免疫したマウス脾臓に由来するハイブリドーマBG2B8(FERM AP-21285)から産生され、β-1,6-グルカンに高い反応性を有し、β-グルカンによる血管透過性を亢進させるとともに、不溶性β-グルカンによるマクロファージの過酸化水素産生を上昇させることを特徴とする抗β-1,6-グルカン・モノクローナル抗体。

【請求項2】

請求項1記載の抗β-1,6-グルカン・モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマBG2B8(FERM AP-21285)。

【請求項3】

請求項1記載の抗β-1,6-グルカン・モノクローナル抗体を含むβ-1,6-グルカンの測定試薬。

【請求項4】

請求項1記載の抗β-1,6-グルカン・モノクローナル抗体を有効成分とするβ-1,6-グルカン関連疾患の治療薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願発明は、β-1,6-グルカンに対して高い反応性を有する抗β-1,6-グルカン・モノク

ローナル抗体と、この抗体を主成分とする測定試薬および治療薬に関するものである。

【背景技術】

【0002】

-グルカン（-glucan：以下、「BG」と記載することがある）は、接合菌を除く真菌において、基本的にアルカリ、水に不溶性の強固な細胞壁骨格を形成する腫瘍構成多糖成分として共通に存在している。さらに真菌のみならず海藻、細菌、高等植物など自然界に広く分布している。また、一般細菌の細胞壁には含まれず、真菌感染症患者血中に遊離されてくることから真菌感染症全般のスクリーニングのパラメーターとして臨床検査に用いられている（非特許文献1、2）。

【0003】

-グルカンは補体系活性化、ロイコトリエンやTNF- $\alpha$ などの炎症性メディエーター産生などの生物活性を有することがこれまで多くの研究者によって明らかにされており、-グルカンが生体に何かしらの影響を与えている可能性が示唆されている。また、腫瘍活性、アジュバンド活性、CD8+T細胞誘導活性、NOやINF- $\gamma$ などのサイトカイン産生などの免疫薬理活性を示すことも報告されている（非特許文献3、4）。また -グルカンは分子量、分岐、高次構造などにおいて多様性を示し、生物活性もそれらの物性に依存していることから、活性の強弱も一様ではない。

【0004】

-グルカンは癌や感染症治療に重要な生物学的応答調整剤（Biological Response Modifier）として用いられている。例えば、Lentinus edodes由来Lentinan（Berk）やSchizophyllum commune由来sonifilan（SPG）は癌治療薬として用いられている。また様々なキノコや酵母が食品や健康食品として流通している。

【0005】

-グルカンの生物活性発現に関与すると思われる宿主の認識機構もこれまで多くの研究者によって検討されてきおり、-グルカン特異的受容体（Dectin-1、CR3、lactosylceramide等）が同定され、これらの受容体が食作用（phagocytosis）や他の生物活性に関与することが報告されている（非特許文献5 - 7）。

【0006】

一方、抗体は獲得免疫における認識生体分子であり、食作用を促進することによって、抗原提示や副刺激分子（co-stimulatory molecule）の発現を上昇させる。また、Fc受容体の架橋、サイトカイン産生の修飾等によって病原体に対する生体防御を増強させるなどの重要な働きを担っている。

【0007】

-グルカンに対する抗体の報告はほとんど存在しなかったが、最近になって -グルカンを抗原として用いた固相化ELISA法によって、ヒト血清中に抗 -グルカン抗体（抗BG抗体）が存在することが確認された（非特許文献8）。従って、この内在性の抗BG抗体の有無を指標とすることによって、生体内の -グルカンを検出することが可能となり、それによって、腫瘍や真菌感染症、各種免疫疾患の診断、あるいはそれらの疾患治療の有効性を評価することが可能となるものと期待される。

【0008】

ただし、このような内在性の抗BG抗体の検出は被験者の血液を対象とすることを前提とするものであり、採血等の手続を含め、適用範囲に制限がある。

【0009】

一方、抗体はその生物学的、タンパク質化学的な特質を生かし、基礎科学から治療用薬剤に至るまで広い領域で利用されている。特にモノクローナル抗体は特異性が単一であるため、目的とする成分の分析や生体成分の検出、定量、濃縮、精製などに役立つ。特に、生体成分の検出等においては、血液以外の体液や生体組織を対象として目的成分の解析が可能である。また大量生産が可能で、得られた抗体の生体的意義、機能的メカニズムの解明や特異的な結合能力を応用し、目的分子の発現、量、局在性などを確認する手段として免疫学的検出方法（ウエスタンブロッティング、免疫沈降、ELISA法、フローサイトメト

10

20

30

40

50

リー、免疫組織染色など)の試薬やその他様々な利用方法が期待される。さらには、抗体は人間の免疫反応を利用しているため副作用が少なく、また患部の目的箇所のみピンポイントで作用させることができるなどの高い治療効果が見込まれる医薬品をして期待されており、実際にキメラ抗体などの遺伝子技術を応用したヒト化抗体が、特にガンやリウマチなどの難病への有望な治療薬として臨床で用いられている。

【0010】

なお、 $\beta$ -グルカンには、 $\beta$ -1,4-グルカン、 $\beta$ -1,3-グルカンおよび $\beta$ -1,6-グルカンがあるが、 $\beta$ -1,4-グルカンはセルロースであり、真菌細胞壁の構成成分として生物活性を有するものは $\beta$ -1,3-グルカンおよび $\beta$ -1,6-グルカンである。このうち、 $\beta$ -1,3-グルカンに対する抗体は、特許文献1に記載されている。

10

【特許文献1】特開平11-196895号公報

【非特許文献1】宿前利郎： $\beta$ -グルカンの魅力，東洋医学舎，2000

【非特許文献2】Obayashi T., Yoshida M., Mori T., Goto H., Yasuoka A., Iwasaki H., Teshima H., Kohno S., Horiuchi A., Ito A., et al. : Plasma (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes. *Lancet*, 345, 17-20, 1995.

【非特許文献3】大野尚仁：真菌 $\beta$ -1,3-グルカン類の構造と宿主応答性，ドージンニュース，114，1-10，2004，<http://www.dojindo.co.jp/news/index.html>

【非特許文献4】宿前利郎：真菌 $\beta$ -1,3-グルカンの構造と活性，薬学雑誌，120，413-431，2000

20

【非特許文献5】Ross GD, Cain JA, Myones BL, Newman SL, Lachmann PJ. Specificity of membrane complement receptor type three (CR3) for  $\beta$ -glucans. *Complement*. 4(2):61-74, 1987.

【非特許文献6】Zimmerman JW, Lindermuth J, Fish PA, Palace GP, Stevenson TT, DeMong DE. A novel carbohydrate-glycosphingolipid interaction between a  $\beta$ -(1-3)- $\beta$ -glucan immunomodulator, PGG-glucan, and lactosylceramide of human leukocytes. *J Biol Chem*. 273(34):22014-20, 1998.

【非特許文献7】Brown GD, Gordon S. Immune recognition. A new receptor for  $\beta$ -glucans. *Nature*. 413(6851):36-7, 2001.

【非特許文献8】Masuzawa S., Yoshida M., Ishibashi K., Saito N., Akashi M., Yoshikawa N., Suzuki T., Nameda S., Miura N. N., Adachi Y., Ohno N., Solubilized *Candida* cell wall  $\beta$ -glucan, CSBG, is an epitope of natural human antibody, *Drug Develop. Res.*, 58, 179-189 (2003).

30

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

真菌細胞壁主要構成成分である $\beta$ -グルカンに対する抗体は、試薬の範囲に留まらず、感染症や $\beta$ -グルカンの生物活性修飾に対する抗体医薬として有用である。特に、真菌細胞壁の構成成分である $\beta$ -1,3-グルカンと $\beta$ -1,6-グルカンとのそれぞれに選択性の高い抗体(特にモノクローナル抗体)は、試薬や医薬としての有用性が極めて高いことが期待される。

40

【0012】

なお、前記特許文献1は、 $\beta$ -1,3-グルカンに対する抗体と、その利用(真菌感染の診断)について言及しているが、抗 $\beta$ -1,3-グルカン抗体に関する実際の作成例等は開示していない。

【0013】

すなわち、本発明者らの研究によれば、抗原として使用する $\beta$ -グルカンと抗体作成生物種との関係によって、抗 $\beta$ -グルカン抗体の作成の正否が決定される。例えば、抗 $\beta$ -1,6-グルカン・モノクローナル抗体を作成する場合には、 $\beta$ -1,3,1,6-グルカンを主成分とする *Laminaria digitata*由来の $\beta$ -グルカン(LAM)を免疫原とすることが有効であると期

50

待されるが、このLAMを使用してマウスを免疫しても、モノクローナル抗体の作成に十分なマウス抗体価は得られない。従って、 $\alpha$ -1,6-グルカンに対するモノクローナル抗体の作成は容易ではなく、その報告も存在していない。

【課題を解決するための手段】

【0014】

本発明者らは、 $\alpha$ -1,3-グルカンと $\alpha$ -1,6-グルカンの両方を構成成分とするCandida細胞壁由来の $\alpha$ -グルカン(CSBG)をマウスに免疫することによって、モノクローナル抗体の作成に十分な抗体価が得られ、しかも作成したハイブリドーマのクローンから、 $\alpha$ -1,6-グルカンに特異性の高い特殊なクローンを取得することに成功し、本発明を完成させた。

10

【0015】

本発明は、以上のとおりの新規な知見に基づき、Candida細胞壁から精製した $\alpha$ -グルカン(CSBG)で免疫したマウス脾臓に由来するハイブリドーマBG2B8(FERM AP-21285)から産生され、 $\alpha$ -1,6-グルカンに高い反応性を有する抗 $\alpha$ -1,6-グルカン・モノクローナル抗体を提供する。

【0016】

また本発明は、前記の抗 $\alpha$ -1,6-グルカン・モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマBG2B8(FERM AP-21285)を提供する。

【0017】

さらに本発明は、前記の抗 $\alpha$ -1,6-グルカン・モノクローナル抗体を含む $\alpha$ -1,6-グルカンの測定試薬を提供する。

20

【0018】

さらにまた、本発明は、前記の抗 $\alpha$ -1,6-グルカン・モノクローナル抗体を有効成分とする $\alpha$ -1,6-グルカン関連疾患の治療薬を提供する。

【0019】

なお、「 $\alpha$ -1,6-グルカンに高い反応性を有する」とは、 $\alpha$ -1,6-グルカンに対して高い親和性で結合し、かつ、 $\alpha$ -1,6-グルカンの活性を阻害すること(さらには、 $\alpha$ -1,6-グルカンを細胞壁の成分とする真菌等の活性を阻害または増強すること)を意味する。

【0020】

「 $\alpha$ -1,6-グルカン関連疾患」とは、真菌感染症やb-グルカンの生物活性修飾に依拠する各種疾患( $\alpha$ -グルカンの腫瘍活性、アジュバンド活性、CD8+T細胞誘導活性、NOやINF- $\gamma$ などのサイトカイン産生などの免疫薬理活性に関連する疾患)を意味する。

30

【0021】

この発明におけるその他の用語や概念は、発明の実施形態の説明や実施例において詳しく規定する。なお、用語は基本的にはIUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによるものであり、あるいは当該分野において慣用的に使用される用語の意味に基づくものである。またこの発明を実施するために使用する様々な技術は、特にその出典を明示した技術を除いては、公知の文献等に基づいて当業者であれば容易かつ確実に実施可能である。例えば、モノクローナル抗体作製法は、「単クローン抗体」、長宗香明、寺田弘共著、廣川書店、1990年；"Monoclonal Antibody" James W. Goding, third edition, Academic Press, 1996等に従い作製することができ、抗体を含む薬剤の調製はRemington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, ed. A. Gennaro, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990等を参照することができる。

40

【発明の効果】

【0022】

本願発明の抗 $\alpha$ -1,6-グルカン・モノクローナル抗体によって、腫瘍や真菌感染症、各種免疫疾患の診断を可能とする検査薬や、あるいはそれら疾患の治療薬が提供される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0023】

本発明の抗 $\alpha$ -1,6-グルカン・モノクローナル抗体は、Candida細胞壁から精製した $\alpha$ -

50

グルカン（CSBG）で免疫したマウス脾臓とマウス骨髄腫細胞株との融合細胞により得られたハイブリドーマBG2B8（FERM AP-21285）から産生され、各種の $\alpha$ -1,6-グルカンに高い反応性を有することを特徴としている。

【0024】

ハイブリドーマBG2B8は、平成19年4月4日付で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「FERM AP-21285」の受領番号で特許生物寄託されている。従って、本発明の抗 $\alpha$ -1,6-グルカン・モノクローナル抗体は、この寄託ハイブリドーマBG2B8から通常の方法（具体的には下記実施例記載の方法）に従って取得することができる。

【0025】

このような抗 $\alpha$ -1,6-グルカン・モノクローナル抗体を用いて、 $\alpha$ -1,6-グルカンを測定するための試薬が提供される。試薬の組成等は、 $\alpha$ -1,6-グルカンの測定手続等に応じて適宜に決定される。

【0026】

測定手続としては、例えば、抗体と $\alpha$ -1,6-グルカンとの結合を液相系において検出する方法がある。例えば、抗体を標識化した標識化抗体と生体試料とを接触させて標識化抗体と $\alpha$ -1,6-グルカンを結合させ、この結合体を分離する。分離は、 $\alpha$ -1,6-グルカン+標識化抗体の結合体を公知の分離手段（クロマト法、固相等）によって分離する方法等によって行うことができる。また公知のウエスタンブロット法に準じた方法を採用することもできる。標識シグナルの測定は、標識として酵素を用いる場合には、酵素作用によって分解して発色する基質を加え、基質の分解量を光学的に測定することによって酵素活性を求め、これを結合抗体量に換算し、標準値との比較から抗体量が算出される。放射生同位体を用いる場合には、放射性同位体の発する放射線量をシンチレーションカウンター等により測定する。また、蛍光色素を用いる場合には、蛍光顕微鏡を組み合わせた測定装置によって蛍光量を測定すればよい。

【0027】

液相系での測定の別の方法は、抗体（一次抗体）と生体試料とを接触させて一次抗体と $\alpha$ -1,6-グルカンを結合させ、この結合体に標識化した別の抗体（二次抗体）を結合させ、この三者の結合体における標識シグナルを検出する。あるいは、さらにシグナルを増強させるためには、非標識の二次抗体を先ず抗体+ $\alpha$ -1,6-グルカン結合体に結合させ、この二次抗体に標識物質を結合させるようにしてもよい。このような二次抗体への標識物質の結合は、例えば二次抗体をビオチン化し、標識物質をアビジン化しておくことによて行うことができる。あるいは、二次抗体の一部領域（例えば、Fc領域）を認識する抗体（三次抗体）を標識し、この三次抗体を二次抗体に結合させるようにしてもよい。なお、一次抗体と二次抗体は、両方ともモノクローナル抗体を用いることもでき、あるいは、一次抗体と二次抗体のいずれか一方をポリクローナル抗体とすることもできる。液相からの結合体の分離やシグナルの検出は前記と同様とすることができる。

【0028】

さらに、抗体と $\alpha$ -1,6-グルカンとの結合を固相系において試験することもできる。この固相系における方法は、極微量の $\alpha$ -1,6-グルカンの検出と操作の簡便化のため好ましい方法である。すなわちこの固相系の方法は、抗体を樹脂プレートまたはメンブレン等に固定化し、この固定化抗体に $\alpha$ -1,6-グルカンを結合させ、非結合物質を洗浄除去した後、プレート上に残った抗体+ $\alpha$ -1,6-グルカン結合体に別の標識化抗体を結合させて、この標識化抗体のシグナルを検出する方法である。この方法は、いわゆる「サンドイッチ法」と呼ばれる方法であり、マーカーとして酵素を用いる場合には、「ELISA（enzyme linked immunosorbent assay）」として広く用いられている方法である。2種類の抗体は、両方ともモノクローナル抗体を用いることもでき、あるいは、いずれか一方をポリクローナル抗体とすることもできる。

【0029】

本発明での $\alpha$ -1,6-グルカン検出はまた、免疫染色、例えば組織あるいは細胞染色、免疫電子顕微鏡、イムノアッセイ、例えば競合型イムノアッセイまたは非競合型イムノアッ

10

20

30

40

50

セイで行うことができ、放射免疫測定法(RIA)、蛍光免疫測定法(FIA)、ルミネッセント免疫測定法(LIA)、酵素免疫測定法(EIA)、ELISAなどを用いることができ、B-F分離を行ってもよいし、あるいは行わないでその測定を行うことができる。好ましくはRIA、EIA、FIA、LIAであり、さらにサンドイッチ型アッセイが挙げられる。サンドイッチ型アッセイには、同時サンドイッチ型アッセイ、フォワード(forward)サンドイッチ型アッセイあるいは逆サンドイッチ型アッセイなどが包含されてよい。

【0030】

本発明における -1,6-グルカン量の測定系としては、例えば組織に対しては免疫染色、免疫電子顕微鏡などの蛋白測定系、組織抽出物、血液、体液等に対してはEIA、RIA、FIA、LIA、ウエスタンブロッティングなどの蛋白測定系が好ましい。

10

【0031】

なお、抗体を標識する標識物質としては、酵素、酵素基質、酵素阻害物質、補欠分子類、補酵素、酵素前駆体、アポ酵素、蛍光物質、色素物質、化学ルミネッセンス化合物、発光物質、発色物質、磁気物質、金属粒子(例えば金コロイドなど)、非金属元素粒子(例えばセレンコロイドなど)、放射性物質などを挙げることができるが、酵素、放射性同位体または蛍光色素をふくむ化学物質が好ましい。また酵素標識を使用する場合には、使用する酵素の種類に応じて公知の基質を試薬に加えるようにする。

【0032】

標識物質からの蛍光や発光などの信号を検知するには、視覚によることもできるが、例えば蛍光光度計、プレートリーダーなどを使用できる。また、放射性同位体(アイソトープ)などの出す信号を検知するには、例えばガンマーカウンター、シンチレーションなども使用することができる。

20

【0033】

抗体を標識するには、チオール基とマレイミド基の反応、ピリジルジスルフィド基とチオール基の反応、アミノ基とアルデヒド基の反応などを利用した公知の方法により行うことができる。

【0034】

さらに、抗体を固相化するための担体としては、抗原抗体反応などに使用される公知のものの中から適宜に選択することができる。例えばガラスやシリカゲルなどの無機材料、天然または変成セルロース、ポリアミド、有機高分子物質等である。また、これらの担体は、任意の形状として使用することもできる。例えば、粒子、微粒子、マイクロパーティクル、メンブレン、ろ紙、ビーズ、チューブ、キュベット、ガラスセル、合成樹脂製セルなどの合成材料からなるセル、ガラス棒、合成材料からなる棒、末端を太くしたりあるいは細くしたりした棒、末端に丸い突起をつけたりあるいは偏平な突起をつけた棒、薄板状にした棒などの固体物質等である。

30

【0035】

また、これら担体へ抗 -1,6-グルカン・モノクローナル抗体との結合は、吸着などの物理的な手法、あるいは縮合剤などを用いたり、活性化されたものなどを用いたりする化学的な方法、さらには相互の化学的な結合反応を利用した手法などにより行うことができる。

40

【0036】

次に、本発明の治療薬について説明する。この治療薬は、抗 -1,6-グルカン・モノクローナル抗体を含むものとして製剤化される。すなわち、所望される程度の純度を持つ抗体を、親油性製剤または水性溶液の形態で、任意の製薬上許容される担体、賦形剤または安定化剤と混合することにより調製され保存される(Remington's Pharmaceutical Science 18th edition 1990)。許容される担体、賦形剤、または安定化剤は、用いられる用量および濃度において患者に非毒性であることを条件として、剤形や投与経路に応じて適宜に選択することができる。例えば、リン酸、クエン酸、および他の有機酸などのバッファー; アスコルビン酸およびメチオニンを含む酸化防止剤; 防腐剤(オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロライド; ヘキサメトニウムクロライド; ベンズアルコニウムク

50

ロライド；ベンズエトニウムクロライド；フェノール；ブチルまたはベンジルアルコール；メチルまたはプロピルパラベン等のアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；およびm-クレゾールなど）；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、またはリシン等のアミノ酸；グルコース、マンノース、またはデキストリンを含む単糖類、二糖類、および他の炭水化物EDTA等のキレート剤、スクロース、マンニトール、トレハロースまたはソルビトールなどの糖；ナトリウムなどの塩形成対イオン；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）またはトゥイーン(TWEEN)（商品名）、プルロニクス(PLURONICS)（商品名）、およびポリエチレングリコール(PEG)等の非イオン性界面活性剤等である。

10

## 【0037】

なお、体内に投与される薬剤は無菌でなければならない。これは、滅菌濾過膜を通した濾過により容易に達成される。徐放性製剤を調製してもよい。徐放性製剤の好適な例は、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリクス（例えば、フィルム、またはマイクロカプセルの形状）である。徐放性マトリクスの例は、ポリエステルヒドロゲル（例えば、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)またはポリ(ビニルアルコール)）、ポリアクチド（米国特許第3,773,919号）、L-グルタミン酸および-D-エチル-L-グルタメート、非分解性エチレン-酢酸ビニル、LUPRON DEPOT(商品名)（乳酸-グリコール酸コポリマーと酢酸リュプロリドの注射可能な小球）などの分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、ポリ-(D)-3-ヒドロキシブチル酸等である。また、エチレン-酢酸ビニルおよび乳酸-グリコール酸などのポリマーは分子を100日に渡って放出することができる。

20

## 【0038】

このようにして製剤化した薬物は、例えば、疾患の種類や症状に応じて、局所投与するか、あるいは静脈等を介して全身投与することができる。抗体の投与量は、患者の体重、症状等に応じて、1日当たり約100 µg / Kg体重 ~ 10mg / Kg体重程度とすることができる。

## 【実施例】

## 【0039】

以下、実施例を示して本願発明をさらに詳細かつ具体的に説明するが、本願発明は以下の例によって限定されるものではない。

30

## 実施例1：抗BGモノクローナル抗体の作製

DBA/2マウスに、complete freund adjuvantと共にCSBGを皮下投与して免疫し、追加免疫を行った後、抗BG抗体価をCSBG固相化ELISAプレート用いチェックした。抗体価の上昇したマウスの脾臓中の抗体産生細胞とミエローマ（骨髄腫細胞：X63）を細胞融合させ、ハイブリドーマ作製した。HAT選択培地による培養を行い、オリゴクローナルな抗体産生細胞を得た。得られたオリゴクローナル抗体産生細胞を96 well plateに、1, 2, 3 cells / wellになるように撒き、限界希釈を行った。得られた陽性クローンをさらに、0.3, 0.5, 1 cells/wellになるように撒き2回目の限界希釈を行った。抗BGモノクローナル抗体産生細胞のスクリーニングはCSBG固相化ELISA法により行い、抗BGモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ2B8を得た。このハイブリドーマを共雑タンパクの少ないハイブリドーマメディウムで培養し、インテグラセルラインにて高密度培養を行った。

40

## 【0040】

このハイブリドーマBG2B8が産生するモノクローナル抗体のアイソタイプおよびサブクラスをMOUSE MONOCLONAL ISOTYPING KIT (Serotec Ltd.) により検討した結果、ハイブリドーマ2B8はIgG3クラスの抗BGモノクローナル抗体を産生することが確認された。

## 実施例2：抗BGモノクローナル抗体の精製

抗BGモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ2B8培養上清をSpectra/Por (MW cut off : 20000) で透析した後、protein Gカラム (GE Healthcare Bio-Science AB) にて精製した。

50

### 実施例 3：抗BGモノクローナル抗体（BG2B8）の反応特異性

抗BGモノクローナル抗体（BG2B8）の反応特異性を検討するため、様々な抗原やBGを固相化したELISA plateを用い、抗BGモノクローナル抗体（BG2B8）の希釈系列を作製し、反応性を検討した。BGとしては、Candida細胞壁由来のCSBG（ $\alpha$ -1,6-グルカンと1,3-グルカンを構成成分とするBG）、Agaricus brasiliensis由来AgHWE（ $\alpha$ -1,6-グルカンを主成分とするBG）、Aspergillus細胞壁由来ASBG（ $\alpha$ -1,3-グルカンを主成分とするBG）、Grifola frondosa由来GRN（1分岐1,3-グルカン）、Yeast-mannanを使用した。

#### 【0041】

結果は図1に示したとおりである。抗BGモノクローナル抗体（BG2B8）はCSBGおよびAgHWE（ $\alpha$ -1,6-グルカンが主成分）に高力価を示した。一方、 $\alpha$ -1,3-グルカンを主要構成成分とするASBGには低力価を示し、GRNおよびYeast mannanに対しては反応しなかった。

#### 【0042】

また、CSBG固相抗原に対する可溶性抗原、BGによる競合ELISA法によっても同様な結果が得られた。

さらに、高次構造に対する反応特異性を検討するためにCSBG-OH、CSBG-autoclave、SPG、SPG-OH、SPG-autoclaveによる競合ELISA法を検討した。抗BGモノクローナル抗体（BG2B8）はCSBG添加で抑制され、いずれのSPGにおいても抑制されなかった。

#### 【0043】

以上の結果から、BG2B8は $\alpha$ -1,6-グルカン（特に真菌細胞壁由来の $\alpha$ -1,6-グルカン）に高力価を示すことが確認された。

### 実施例 4：抗BGモノクローナル抗体（BG2B8）の真菌細胞への結合

抗BGモノクローナル抗体（BG2B8）が病原性真菌Candida albicans (CA)細胞壁に結合するか否かを検討するため、蛍光標識抗体を用い共焦点顕微鏡により観察した。

#### 【0044】

YPG前培養CAを、YPG培地により酵母型、RPMI1640/FCS10%により一夜培養して菌糸型を誘導し、抗体の結合を観察した。結果は図2のとおりであり、抗体は酵母型にはほとんど結合しなかったが、菌糸型にOX-CAより非常に弱い結合が観察された。次に、培養条件によりCA細胞壁構成が異なることが知られているので、C-limiting培地にて前培養したCAを異なる培養条件で培養し、それぞれの抗体の結合性を検討した。YPG前培養CAと比較すると、C-limiting前培養CAの方が、より強く結合した。特に、菌糸部分および発芽している部分に結合が認められた。また、C-limiting前培養CAにおいては、酵母型においても隔壁など一部に結合が観察された。

#### 【0045】

以上の結果から、抗BGモノクローナル抗体（BG2B8）は病原性真菌Candida菌に存在する $\alpha$ -1,6-グルカンに結合することが確認された。またこのことから、病原性真菌の $\alpha$ -1,6-グルカンに対しても広い結合スペクトルを持つことが強く示唆される。

### 実施例 5：抗BGモノクローナル抗体（BG2B8）のカンジダ細胞壁BG刺激PEC過酸化酸素産生への影響

過酸化酸素は抗菌活性に關与する重要なメディエーターの一つである。カンジダ細胞壁由来BG（不溶性：OX-CA、可溶性：CSBG）のPEC過酸化酸素産生における抗BGモノクローナル抗体の影響を検討した。

#### 【0046】

結果は図3のとおりであり、OX-CAについては過酸化酸素を産生したが、他のLPS（リボ多糖）やCSBGにおいては過酸化酸素産生がみられなかった。OX-CAの過酸化酸素産生を抗体濃度別に比較してみると、抗体濃度に比例して過酸化酸素産生が上昇していることから、本発明の抗体は抗菌作用に關与するマクロファージの過酸化酸素産生を上昇させることが示唆された。

10

20

30

40

50

**実施例 6 : 抗BGモノクローナル抗体 (BG2B8) の血中クリアランス**

ICRマウスに抗BGモノクローナル抗体 (2B8) (100 µg/マウス) を腹腔内投与および静脈内投与し、投与後1、2、4、8、24、48、72時間に尾静脈より採血した。得られたサンプルの抗体価をCSBG固相化ELISA法にて測定した。

【0047】

結果は図4、図5に示したとおりであり、腹腔内投与およびいずれの場合でも、抗BGモノクローナル抗体 (BG2B8) は投与後血中から速やかにクリアランスされ、8時間後には血中から消失した。

10

**実施例 7 : 抗BGモノクローナル抗体 (BG2B8) のCSBG血管透過性亢進に与える影響**

ICRマウスにCSBG (100 µg/mouse)、抗BGモノクローナル抗体2B8 (100 µg/mouse)、エバンスブルー (色素) (2mg/mouse) を静脈内に同時投与し、投与後1時間のエバンスブルーの腹腔内への浸出を吸光度を測定することで検討した。

【0048】

結果は図6に示したとおりであり、CSBGを投与することにより、若干ではあるが腹腔内へのエバンスブルーの浸出が上昇した。さらにモノクローナル抗体BG2B8を投与した場合、エバンスブルーの浸出が高まった。この結果から、モノクローナル抗体BG2B8は血管透過性の亢進を上昇させることが示された。

【図面の簡単な説明】

20

【0049】

【図1】各種BGに対する抗BGモノクローナル抗体 (BG2B8) の反応特異性を検討した結果である。

【図2】各種真菌細胞に対する抗BGモノクローナル抗体 (BG2B8) の結合を観察した顕微鏡像である。上段左は、*C. albicans* NBRC 1385株をYPG前培養の後、YPGで一夜培養したもの；下段左は、*C. albicans* NBRC 1385株をYPG前培養の後、RPMI1640/FCS10%で一夜培養したもの；上段中央は、*C. albicans* NBRC 1385株をC-limiting前培養の後、C-limitingで一夜培養したもの；下段中央は、*C. albicans* NBRC 1385株をC-limiting前培養の後、RPMI1640/FCS10%で一夜培養したもの；上段右は、*C. albicans* NBRC 1385株をC-limiting前培養の後、M199/20mMグルコサミンで一夜培養したもの；下段右は、OX-CAである。

30

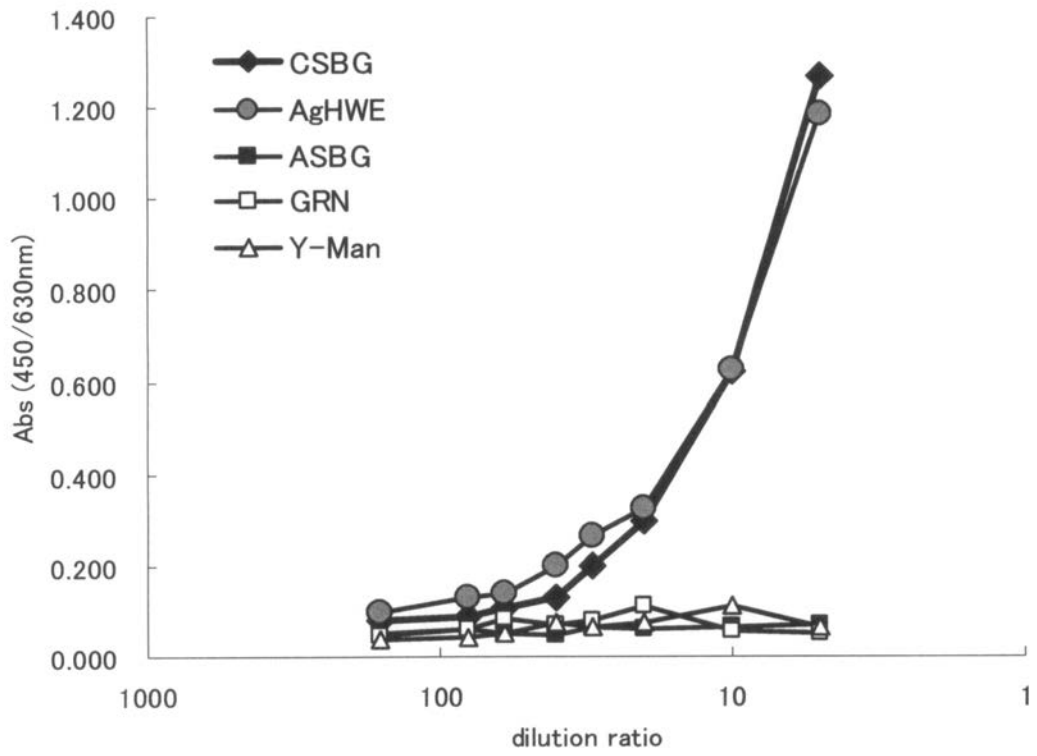
【図3】カンジダ細胞壁由来BGのPEC過酸化水素産生における抗BGモノクローナル抗体の影響を検討した結果である。

【図4】腹腔内投与した抗BGモノクローナル抗体の血中濃度を経時的に測定した結果である。

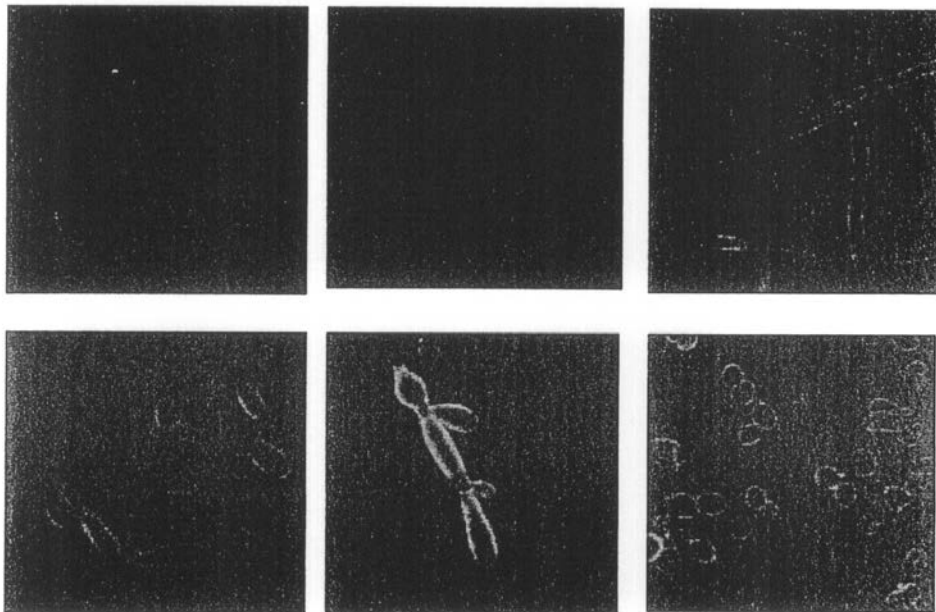
【図5】静脈内投与した抗BGモノクローナル抗体の血中濃度を経時的に測定した結果である。

【図6】抗BGモノクローナル抗体のCSBG血管透過性亢進に与える影響を検討した結果である。

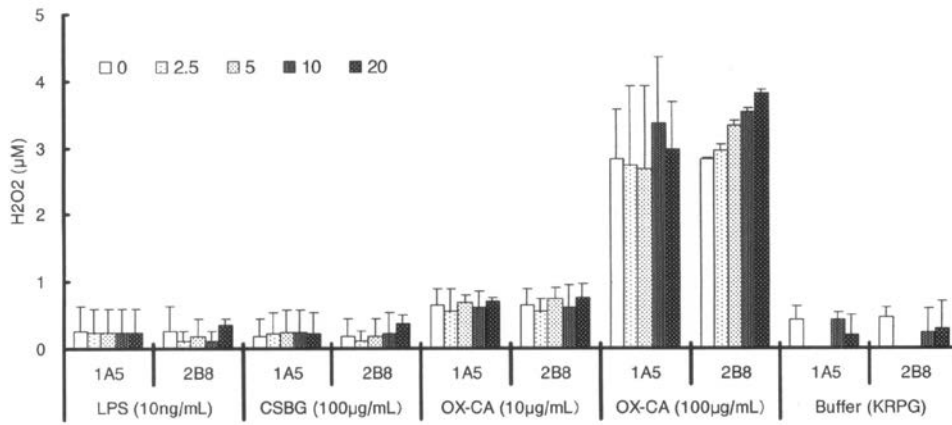
【 図 1 】



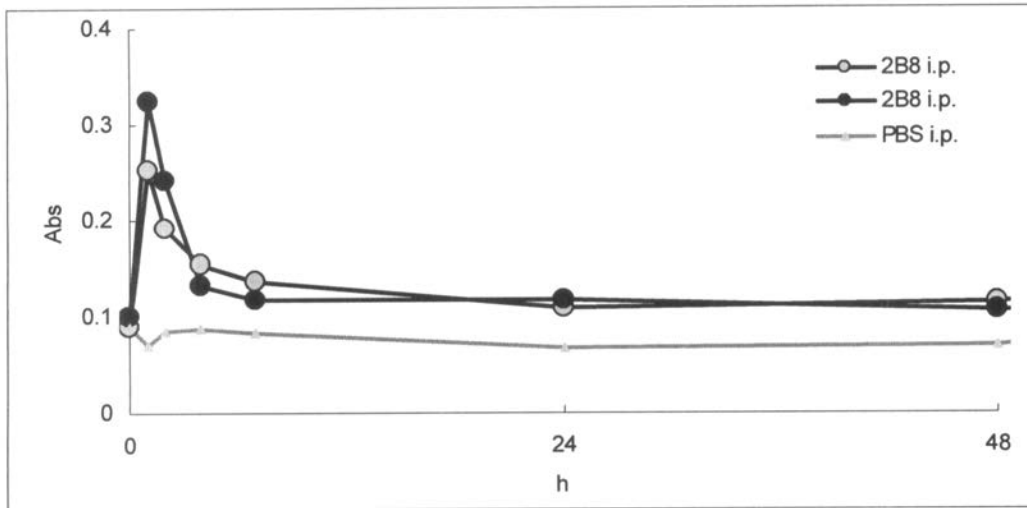
【 図 2 】



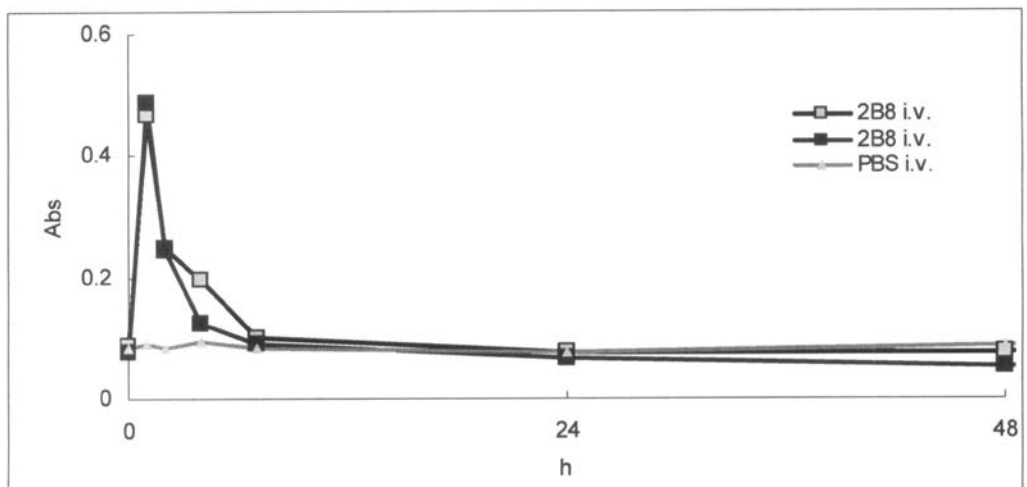
【 図 3 】



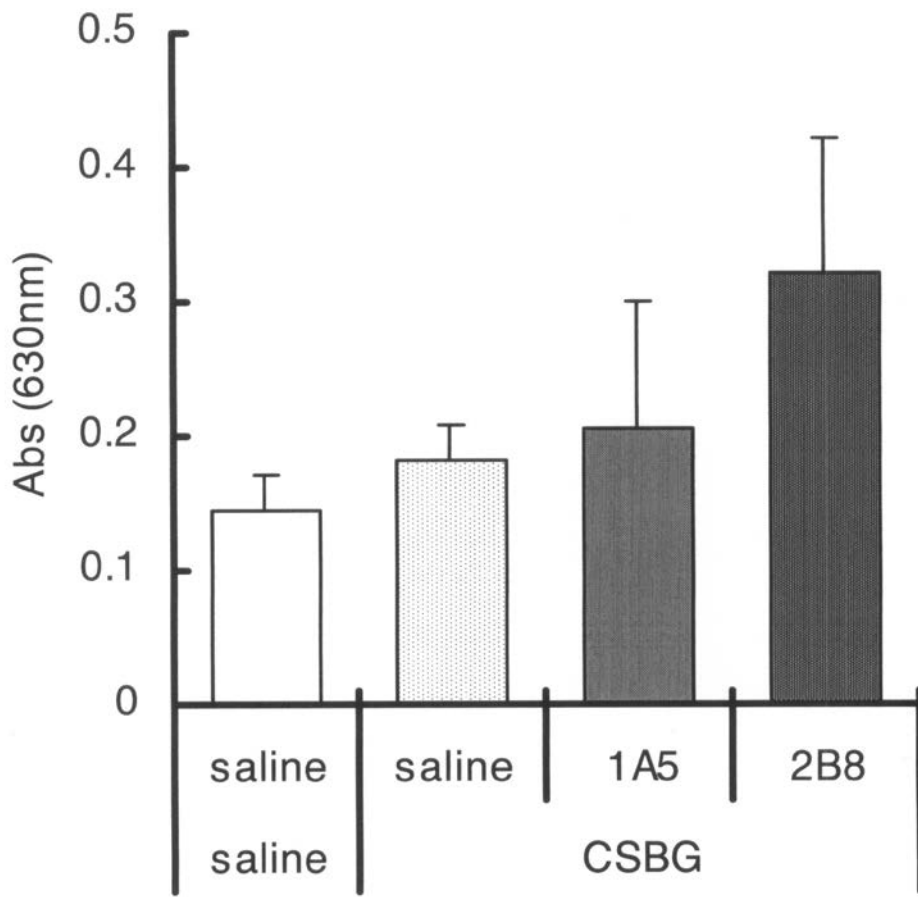
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



---

フロントページの続き

- (56)参考文献 国際公開第2004/036222(WO, A1)  
国際公開第2006/030318(WO, A1)  
Microbiol., 1995年, Vol.141, p.1545-1551  
Microbiol., 1996年, Vol.142, p.2255-2262  
Biol. Pharm. Bull., 2000年, Vol.23, No.5, p.672-676  
Int. J. Immunopharm., 2000年, Vol.22, p.383-394  
Biol. Pharm. Bull., 2003年, Vol.26, No.8, p.1225-1228  
Drug Dev. Res., 2003年, Vol.58, p.179-189  
J. Immunol., 2004年, Vol.173, p.797-806  
第47回日本医真菌学会総会プログラム・抄録集, 2003年, p.88, P-B-13

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90  
CAPLUS/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)  
PubMed  
Science Direct

专利名称(译)	抗β-1,6-葡聚糖单克隆抗体		
公开(公告)号	<a href="#">JP5054425B2</a>	公开(公告)日	2012-10-24
申请号	JP2007122824	申请日	2007-05-07
[标]申请(专利权)人(译)	大野 尚仁		
申请(专利权)人(译)	大野 尚仁		
当前申请(专利权)人(译)	大野 尚仁		
[标]发明人	大野尚仁 石橋健一		
发明人	大野 尚仁 石橋 健一		
IPC分类号	C12N15/02 C07K16/14 C12N5/10 G01N33/53 A61K39/395		
FI分类号	C12N15/00.C C07K16/14 C12N5/00.102 G01N33/53.S A61K39/395.N A61K39/395.M A61P31/10 A61P35/00 A61P37/02 C12N5/00.B C12N5/20 C12P21/08		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA41 4B024/GA01 4B024/HA03 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA13 4B064/DA15 4B065/AA90X 4B065/AB05 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA14 4C085/BB24 4C085/CC05 4C085/DD61 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	西泽俊夫		
其他公开文献	JP2008273916A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供与真菌衍生的β-1,6-葡聚糖高度反应的单克隆抗体。  
 解决方案：由从念珠菌细胞壁提取的β-葡聚糖 (CSBG) 免疫的小鼠脾脏产生的杂交瘤BG2B8 (FERM AP-21285) 产生的抗β-1,6-葡聚糖单克隆抗体，该抗体高度获得公开了对β-1,6-葡聚糖具有反应性。

