

(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2016-103980

(P2016-103980A)

(43) 公開日 平成28年6月9日(2016.6.9)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 2	4 B 0 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 6 4
C 1 2 N 15/00 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A	4 B 0 6 5
C O 7 K 16/18 (2006.01)	C O 7 K 16/18	4 H O 4 5
C O 7 K 16/46 (2006.01)	C O 7 K 16/46	

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 13 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-46216 (P2013-46216)
 (22) 出願日 平成25年3月8日 (2013.3.8)

(71) 出願人 592031097
 パナソニックヘルスケア株式会社
 愛媛県東温市南方2 1 3 1 番地 1
 (74) 代理人 110000556
 特許業務法人 有古特許事務所
 (72) 発明者 福原 崇臣
 愛媛県東温市南方2 1 3 1 番地 1 パナソ
 ニックヘルスケア株式会社内
 (72) 発明者 曾我部 誠司
 愛媛県東温市南方2 1 3 1 番地 1 パナソ
 ニックヘルスケア株式会社内
 Fターム(参考) 4B024 AA01 BA41 CA01 CA04 CA09
 CA11 CA20 DA02 GA01 GA11
 HA01 HA11

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ハイブリドーマ及びモノクローナル抗体

(57) 【要約】

【課題】 抗原 A 4 3 ペプチドには実質的に反応せず、抗原 A 4 2 ペプチドに特異的に反応するモノクローナル抗体、及び、当該モノクローナル抗体を生産し得るハイブリドーマを提供すること。

【解決手段】 受託番号が N I T E P - 1 4 6 3 であるハイブリドーマ；当該ハイブリドーマにより産生される、抗原 A ペプチドに対するモノクローナル抗体；及び抗原 A 4 2 ペプチドに反応し、抗原 A 4 3 ペプチドに反応しないモノクローナル抗体。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

受託番号が N I T E P - 1 4 6 3 であるハイブリドーマ。

【請求項 2】

受託番号が N I T E P - 1 4 6 3 であるハイブリドーマにより生産される、抗原 A ペプチドに対するモノクローナル抗体。

【請求項 3】

抗原 A 4 2 ペプチドに反応し、抗原 A 4 3 ペプチドに反応しないモノクローナル抗体。

【請求項 4】

配列番号 8 で表される重鎖相補性決定領域 (C D R)、配列番号 9 で表される重鎖 C D R、配列番号 1 0 で表される重鎖 C D R、並びに、免疫グロブリン重鎖由来の重鎖フレームワーク配列から構成される重鎖可変領域と、

配列番号 1 3 で表される軽鎖 C D R、配列番号 1 4 で表される軽鎖 C D R、配列番号 1 5 で表される軽鎖 C D R、並びに、免疫グロブリン軽鎖由来の軽鎖フレームワーク配列から構成される軽鎖可変領域、又は、配列番号 2 1 で表される軽鎖 C D R、配列番号 2 2 で表される軽鎖 C D R、配列番号 2 3 で表される軽鎖 C D R、並びに、免疫グロブリン軽鎖由来の軽鎖フレームワーク配列から構成される軽鎖可変領域と、を含む、モノクローナル抗体。

10

【請求項 5】

配列番号 8 で表される重鎖相補性決定領域 (C D R)、配列番号 9 で表される重鎖 C D R、配列番号 1 0 で表される重鎖 C D R、並びに、免疫グロブリン重鎖由来のヒト化重鎖フレームワーク配列から構成される重鎖可変領域と、

配列番号 1 3 で表される軽鎖 C D R、配列番号 1 4 で表される軽鎖 C D R、配列番号 1 5 で表される軽鎖 C D R、並びに、免疫グロブリン軽鎖由来のヒト化軽鎖フレームワーク配列から構成される軽鎖可変領域、又は、配列番号 2 1 で表される軽鎖 C D R、配列番号 2 2 で表される軽鎖 C D R、配列番号 2 3 で表される軽鎖 C D R、並びに、免疫グロブリン軽鎖由来のヒト化軽鎖フレームワーク配列から構成される軽鎖可変領域と、を含む、ヒト化モノクローナル抗体。

20

【請求項 6】

請求項 2 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体を含む、A 検出又は測定キット。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗原 A ペプチドに対するモノクローナル抗体を生産し得るハイブリドーマ、及び、当該モノクローナル抗体に関する。

【背景技術】

【0002】

アルツハイマー病 (以下「AD」ともいう) は、初老期から老年期に起こる進行性の認知症を特徴とする疾患であり、現在、国内の患者数は 1 0 0 万人以上と言われている。今後、人口の高齢化に伴いその数は確実に増加すると予想される。

40

【0003】

早期にアルツハイマー病を診断するために、血液や髄液などの体液中に存在する アミロイド (以下 A ともいう) ペプチドを検出する方法が知られている。A ペプチドとは、4 0 ~ 4 3 個のアミノ酸からなるペプチドであり、アルツハイマー病では A ペプチドが凝集してアミロイドとなつて、脳内に沈着することが知られている。

【0004】

A ペプチドの中でも、4 2 個のアミノ酸からなるペプチドである A 4 2 ペプチドは

50

アルツハイマー病の因子マーカーと言われている。

【0005】

一方、A ペプチドの凝集体である脳内老人斑を免疫組織学検査に付すると、43個のアミノ酸からなるペプチドであるA 43ペプチドが脳内老人斑の中心に局在していることが最近の研究で明らかにされている（非特許文献1を参照）。

【0006】

抗原A ペプチドに反応するモノクローナル抗体はすでに知られており（例えば特許文献1を参照）、このようなモノクローナル抗体を含むA ペプチド検出キットがすでに市販されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】特許第4738696号公報

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Saito T, et al, "Potent amyloidogenicity and pathogenicity of A 43", Nature Neurosci., 2011年, p. 1023 - 1032

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

以上のように、A ペプチドの中でもA 42ペプチドとA 43ペプチドは異なる機能を有することから、血液や髄液などの体液中に存在するA ペプチドを検出するにあたっては、A 42ペプチドとA 43ペプチドを区別して検出できることが好ましいと考えられる。

【0010】

しかしながら、本発明者らの検討によると、従来知られている抗原A ペプチドに反応するモノクローナル抗体は、A 42ペプチドとA 43ペプチドの双方に反応するものであった。このように、A 43ペプチドには反応せず、アルツハイマー病の因子マーカーであるA 42ペプチドに特異的に反応するモノクローナル抗体は従来知られていなかった。

【0011】

本発明は、上記現状に鑑み、抗原A 43ペプチドには実質的に反応せず、抗原A 42ペプチドに特異的に反応するモノクローナル抗体、及び、当該モノクローナル抗体を生産し得るハイブリドーマ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】

【0012】

本発明は、受託番号がNITE P - 1463であるハイブリドーマに関する。

【0013】

また、当該ハイブリドーマにより産生される、抗原A ペプチドに対するモノクローナル抗体にも関する。

【0014】

さらには、抗原A 42ペプチドに反応し、抗原A 43ペプチドに反応しないモノクローナル抗体にも関する。

【0015】

配列番号8で表される重鎖相補性決定領域（CDR）、配列番号9で表される重鎖CDR、配列番号10で表される重鎖CDR、並びに、免疫グロブリン重鎖由来の重鎖フレームワーク配列から構成される重鎖可変領域と、

さらにまた、配列番号13で表される軽鎖CDR、配列番号14で表される軽鎖CDR、配列番号15で表される軽鎖CDR、並びに、免疫グロブリン軽鎖由来の軽鎖フレーム

10

20

30

40

50

ワーク配列から構成される軽鎖可変領域、又は、配列番号 2 1 で表される軽鎖 C D R、配列番号 2 2 で表される軽鎖 C D R、配列番号 2 3 で表される軽鎖 C D R、並びに、免疫グロブリン軽鎖由来の軽鎖フレームワーク配列から構成される軽鎖可変領域と、を含む、モノクローナル抗体にも関する。

【 0 0 1 6 】

さらにまた、配列番号 1 3 で表される軽鎖 C D R、配列番号 1 4 で表される軽鎖 C D R、配列番号 1 5 で表される軽鎖 C D R、並びに、免疫グロブリン軽鎖由来のヒト化軽鎖フレームワーク配列から構成される軽鎖可変領域、又は、配列番号 2 1 で表される軽鎖 C D R、配列番号 2 2 で表される軽鎖 C D R、配列番号 2 3 で表される軽鎖 C D R、並びに、免疫グロブリン軽鎖由来のヒト化軽鎖フレームワーク配列から構成される軽鎖可変領域と、を含む、ヒト化モノクローナル抗体にも関する。

10

【 0 0 1 7 】

また本発明は、上述したいずれかのモノクローナル抗体を含む、A 検出又は測定キットにも関する。

【 発明の効果 】

【 0 0 1 8 】

本発明により提供されるモノクローナル抗体は、A 4 3 ペプチドには実質的に反応せず、A 4 2 ペプチドに特異的に反応するので、アルツハイマー病の因子マーカーである A 4 2 ペプチドを特異的に検出することができる。本発明のモノクローナル抗体を含む A 検出キットは、従来検出キットでは不可能であった A 4 2 ペプチドの特異的な検出が可能となるので、極めて有用性が高い。

20

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 9 】

【 図 1 】本発明のモノクローナル抗体 6 C 1 0 H 3 と市販の抗 A 抗体が示す A 4 0 ペプチドに対する反応性を示すグラフ

【 図 2 】本発明のモノクローナル抗体 6 C 1 0 H 3 と市販の抗 A 抗体が示す A 4 2 ペプチドに対する反応性を示すグラフ

【 図 3 】本発明のモノクローナル抗体 6 C 1 0 H 3 と市販の抗 A 抗体が示す A 4 3 ペプチドに対する反応性を示すグラフ

【 図 4 】本発明のモノクローナル抗体 6 C 1 0 H 3 と別の市販の抗 A 抗体が示す A 4 2 ペプチドに対する反応性を示すグラフ

30

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 2 0 】

本発明者らは、抗原 A ペプチドに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樹立する過程で、抗原 A 4 3 ペプチドには実質的に反応せず、抗原 A 4 2 ペプチドに特異的に反応するモノクローナル抗体を産生する特異なハイブリドーマを樹立することに成功し、本発明を完成するに至った。

【 0 0 2 1 】

当該ハイブリドーマは、寄託機関に寄託され、受託番号は N I T E P - 1 4 6 3 である。当該ハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体は、抗原 A 4 0 ペプチド及び抗原 A 4 3 ペプチドに反応せず、抗原 A 4 2 ペプチドにのみ反応する。そのため、A の中でも、A 4 2 ペプチドを特異的に検出することができるため、極めて有用である。また、当該ハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体は、市販の抗 A 抗体と比較して、A 4 2 ペプチドに対する反応性が高いという優れた特性を示す。

40

【 0 0 2 2 】

本発明のハイブリドーマの製造方法（免疫方法及び選択採取方法）は特に限定されない。抗原として A 4 2 ペプチド又はその一部を使用して、ハイブリドーマの通常の製造方法により製造することができる。すなわち、抗原をラット等の免疫動物に注射し、それに対する抗体の産生に関するリンパ細胞を取り出し、これをミエローマと混合して細胞融合させ、これを H A T 培地上で培養すればよい。

50

【0023】

抗原としてA₄₂ペプチドの一部を使用する場合には、特に、A₄₂ペプチドのC末端を含むアミノ酸配列を使用することが好ましい。A₄₀ペプチド(配列番号16)、A₄₂ペプチド(配列番号17)、及びA₄₃ペプチド(配列番号18)はそれぞれC末端のアミノ酸配列が異なるため、A₄₂ペプチドのC末端を含むアミノ酸配列を使用することで、A₄₂ペプチドに特異的に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取得することが可能となる。後述する実施例では、A₄₂ペプチドのアミノ酸配列のうちC末端側の33位から42位のアミノ酸配列を含むアミノ酸配列を抗原ペプチドとして使用した。

【0024】

本発明のハイブリドーマの製造を確認する手法としては、当該ハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体を、例えば一般的な標識タンパク質により標識した上で、A₄₂ペプチド、及びA₄₃ペプチドそれぞれに対する反応性を測定すればよい。これと、従来公知の抗A₄₂抗体が示す、A₄₂ペプチド、及びA₄₃ペプチドそれぞれに対する反応性とを比較することで、A₄₂ペプチドに特異的に反応するモノクローナル抗体を確認することができる。

【0025】

本発明者が、本発明のモノクローナル抗体のアミノ酸配列を決定したところ、超可変領域である相補性決定領域(CDR)を同定することに成功した。モノクローナル抗体の重鎖の可変領域に含まれる3つのCDRは、配列番号8~10で表されるアミノ酸配列を有する。これに対し、モノクローナル抗体の軽鎖の可変領域に含まれる3つのCDRは、配列番号13~15で表されるアミノ酸配列、又は、配列番号21~23で表されるアミノ酸配列を有する。

【0026】

配列番号8~10で表されるアミノ酸配列からなる重鎖CDRを、免疫グロブリン重鎖由来の重鎖フレームワーク配列に組み込んで重鎖可変領域を構成し、かつ、配列番号13~15で表されるアミノ酸配列、又は、配列番号21~23で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖CDRを、免疫グロブリン重鎖由来の軽鎖フレームワーク配列に組み込んで軽鎖可変領域を構成することで、抗体を作製することができる。このような抗体の作製方法については従来公知の方法を採用することができる。また、前記重鎖フレームワーク配列及び軽鎖フレームワーク配列としてヒト化重鎖フレームワーク配列及びヒト化軽鎖フレームワーク配列を適用することで、ヒト化抗体を作製することができる。

【0027】

本発明はA₄₂検出又は測定キットにも関し、当該A₄₂検出キットは、本発明のモノクローナル抗体を含む。本発明のA₄₂検出キットは、A₄₂のうちA₄₂ペプチドを特異的に検出又は測定することができる。本発明のA₄₂検出キットは、本発明のモノクローナル抗体以外に、洗浄液、2次抗体溶液、検出された測定値の濃度回帰に必要な検量線試薬等を含むことができる。また、発色反応によりA₄₂ペプチドを検出する系の場合、本発明のA₄₂検出キットは、さらに、発色液、発色停止液等を含むことができる。しかし、蛍光または発色によりA₄₂ペプチドを検出する系の場合、発色液、発色停止液を含む必要はない。

【実施例】

【0028】

以下に実施例を掲げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【0029】

(実施例1)ハイブリドーマの取得

以下の手順により、本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを取得した。

【0030】

(1)抗原デザイン及びペプチド合成

10

20

30

40

50

抗原ペプチドとして、配列番号1で表されるアミノ酸配列のペプチドを合成した。このペプチドは、A 42ペプチドのアミノ酸配列のうちC末端側の33位から42位のアミノ酸配列に対して、そのN末端にCysを付加したものである。Cysの付加は、キャリアタンパク質とのコンジュゲーションのためである。

【0031】

(2) ペプチドコンジュゲーション

以下の内容で、前記(1)で合成した抗原ペプチドとキャリアタンパク質のペプチドコンジュゲーションを行った。

- ・方法：MBS法
- ・キャリアタンパク質：KLH(免疫用)/BSA(ELISA用)
- SDS-PAGEでのペプチド-BSA結合物のバンドシフトにより、ペプチドコンジュゲーションの完了を確認した。

10

【0032】

(3) 免疫

以下の内容で免疫を実施した。

- ・抗原調製：ペプチド-KLH結合物とフロイントコンプリートアジュバントを体積比1:2で混合し、エマルジョンを作製した。
 - ・抗原量：約170 μ g(キャリアタンパク質換算)
 - ・免疫動物：ラット(WKY/Izm) 10週齢 雌1匹
 - ・免疫箇所：foot pad/皮下注射
- 免疫後にラットの健康状態に問題がないことを確認した。

20

【0033】

(4) 細胞融合

以下の内容で細胞融合を実施した。目視にて腸骨リンパ節の腫れが十分であることを確認した。

- ・方法：PEG法
- ・リンパ球採取組織：腸骨リンパ節
- ・リンパ球数：1.0 \times 10⁸個
- ・ミエローマ：SP2(マウス)
- ・ハイブリドーマの培養：96ウェルプレート8枚に細胞を播種し、HAT選択培地にて培養した。

30

【0034】

また、スクリーニング前日には、培養中の全ウェルの培地を除き、新たなHAT選択培地を加えた。本作業は培養液中に含まれる死滅したリンパ球由来の抗体を除去する目的で行った。

【0035】

(5) 第一回ELISAスクリーニング

前記(4)により得られたハイブリドーマの培養上清を用い、以下に記載の実験条件にてELISAスクリーニングを実施し、A42ペプチドに対しては反応性を示すが、A40ペプチドに対しては反応性を示さないウェルを選抜した。

40

【0036】

(実験条件)

- ・プレート：costar 2797
- ・抗原：ペプチド-BSA結合物/10mM リン酸Naバッファー(pH7.0)、濃度3 μ g/ml(キャリアタンパク質換算)、1ウェルあたり50 μ L、反応条件：4/一晚
- ・ブロッキング：1%BSA/PBS、1ウェルあたり100 μ L、反応条件：室温/30分
- ・1次抗体：培養上清/ブロッキング、希釈率20倍、1ウェルあたり50 μ L、反応条件：室温/60分

50

・ 2次抗体：a-RatIgG(HRP標識)/ブロッキング(SIGMA社製、A5795-1ML)、希釈率20000倍、1ウェルあたり50 μ L、反応条件：室温/30分

・ 発色：HRP/H₂O₂/TMBZ 発色系

抗原である上記ペプチドとしては、A42ペプチド及びA40ペプチドを使用した。なお、A40ペプチドはネガティブコントロールである。

【0037】

スクリーニングの結果、800ウェル中、12個の陽性ウェルが得られた。

【0038】

(6)ハイブリドーマのクローニング

前記12個の陽性ウェルからハイブリドーマをクローニングし、下記試験を実施した。

・ 限界希釈による細胞の播種

・ ELISAによる反応性のチェック(A42ペプチドに対して反応性を示し、A40ペプチドに対して反応性を示さないことを確認)

・ ELISA陽性ウェルについて、顕微鏡観察によるシングルコロニー形成のチェック

以上の試験により、ELISA陽性シングルクローンのハイブリドーマを1つ得た。当該ハイブリドーマの名称を、6C10H3とした。

【0039】

(7)ハイブリドーマの寄託

前記ハイブリドーマを凍結保存し、独立行政法人製品評価技術基盤機構に寄託した。受託番号はNITE P-1463であり、寄託日は2012年11月8日である。

【0040】

(実施例2)モノクローナル抗体の特異性評価

(標識抗体の作製)

ハイブリドーマ6C10H3からモノクローナル抗体6C10H3を取得した。次いで、以下に示す手順でモノクローナル抗体6C10H3に対して標識を行い、標識抗体を得た。

【0041】

同仁化学研究所製のPeroxidase Labeling Kit-SHのプロトコルに従って処理を実施した。すなわち、抗体200 μ gを含むサンプル溶液とキット付属のSolution A 100 μ Lをキット付属のFiltration Tubeに加えた。ピペティングにより軽く混合した後、8000 \times gで10分間遠心処理を行った。Solution A 100 μ Lをキット付属のReducing Agentに加え、ピペティングにより溶解した。この溶液100 μ Lを、抗体が濃縮されているFiltration Tubeのメンブレン上加え、ピペティングにより抗体とよく混合した。37 $^{\circ}$ Cで30分間反応した後、キット付属のsolution B 100 μ LをFiltration Tubeに加え、8000 \times gで10分間遠心処理を行った。ろ液を捨てた後、solution B 200 μ LをFiltration Tubeに加え、8000 \times gで10分間遠心処理を行った。Reaction buffer 50 μ Lをキット付属のSH-Reactive Peroxidaseに加え、ピペティングにより溶解した。SH-Reactive Peroxidaseを含む溶液を、還元抗体が濃縮されているFiltration Tubeのメンブレン上加えた。ピペティングによりメンブレン上の抗体とよく混合した後、37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。Solution A 100 μ LをFiltration Tubeに加えた。8000 \times gで10分間遠心処理を行った。キット付属のStorage Buffer 200 μ Lを加えて、10回程度ピペティングし、標識抗体として回収した。

【0042】

(反応性の測定)

標識抗体を1000倍に希釈し、以下の手順でA40ペプチド、A42ペプチド、及びA43ペプチドそれぞれに対する反応性を測定した。次いで、比較例として、市販

10

20

30

40

50

のA 検出キット（和光社製）に含まれるモノクローナル抗体を用いて、同様に、各ペプチドに対する反応性を測定した。

【0043】

抗体（BNT77）固相化マイクロプレート（和光社製キット付属）の各ウェルに、A 40ペプチド、A 42ペプチド、A 43ペプチド（それぞれペプチド研究所製）を0、10、20、50、100、200、500、1000 pMを添加し、37 にて2時間反応させた（2セット準備した）。その後、洗浄処理を5回実施した。

【0044】

その後、1セットには、HRP標識抗体（BC05）溶液（和光キット付属）を各ウェルに100 μLずつ添加した。別の1セットには、HRP標識抗体（6C10H3）溶液を各ウェルに100 μLずつ添加した。添加後、室温下にて、攪拌しながら、5分間反応させた。洗浄処理を5回実施した後、100 μLのTMB溶液を加えて室温暗所で30分間反応させた。

10

【0045】

100 μLの停止液を加え、マイクロプレートリーダーで450 nmと620 nmの吸光度を測定した。

【0046】

結果を図1～図3に示す。

【0047】

図1より、本発明のモノクローナル抗体6C10H3及び市販のモノクローナル抗体のいずれも、A 40ペプチドに対して反応性を示さないこと、図2より、双方の抗体ともにA 42ペプチドに対して反応性を示すことが分かる。これらに対し、図3より、本発明のモノクローナル抗体6C10H3はA 43ペプチドに対して反応性を示さないが、市販のモノクローナル抗体はA 43ペプチドに対して反応性を示すことが分かる。

20

【0048】

以上より、市販のモノクローナル抗体はA 42ペプチドとA 43ペプチドの双方に反応性を示し、両ペプチドを識別できないのに対し、本発明のモノクローナル抗体6C10H3はA 42ペプチドに対して反応性を示すものの、A 43ペプチドに対しては反応性を示さないため、A 42ペプチドに特異的な反応性を有し、A 42ペプチドとA 43ペプチドを識別できることが分かる。

30

【0049】

（実施例3）モノクローナル抗体の認識能力評価

モノクローナル抗体6C10H3と、一般的に研究者の使用頻度の高い抗A 抗体である1F115抗体（IBL社製）を使用して、A 42ペプチドの認識能力を比較した。

【0050】

（事前準備）

まず、ビオチン標識キット（SH標識、同仁堂社製）を使用し、4G8抗体のビオチン化を行った。

【0051】

次いで、HRP標識キット（SH標識、同仁堂社製）を使用し、6C10H3抗体及び1F115抗体（IBL社製）のHRP標識を行った。

40

【0052】

また、A 42ペプチド（Human, 1-42、ペプチド研究所社製）を希釈し、濃度が0, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 又は500 pMのA 42ペプチド溶液を得た。

【0053】

（評価方法）

まず、ビオチン化した4G8抗体をストレプトアビジン標識プレートに固定した。次に、N101（日油社）を使用し、ブロッキングを行った後、1×PBSでプレートを洗浄した。

50

【0054】

次いで、調製した A 42 ペプチド溶液 (0, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 pM) を 100 μL ずつ、プレートに添加し、室温で 2 時間、反応させた後、A 42 ペプチド溶液をプレートから除去した。洗浄液を使用して、プレートの洗浄を各 5 回実施した。

【0055】

各プレートに、同濃度の HRP 標識抗体 (6C10H3 抗体及び 1F115 抗体) のいずれかを添加し、反応を行った。その後、洗浄液を使用して、プレートの洗浄を各 5 回実施した (各 5 回)。

【0056】

次いで、HRP 酵素用基質 (SIGMA 社製) を 100 μL ずつ添加し、室温で 30 分間、反応させた。その後、停止液 (KPL 社製) を添加し、波長 450 nm - 620 nm での発色測定を実施した。

【0057】

図 4 では、2500 倍に希釈した A 42 ペプチド溶液を用いた場合の HRP 標識 6C10H3 抗体 (黒色正方形) 及び HRP 標識 1F115 抗体 (白色正方形) の発色値を示す。この図より、本発明の 6C10H3 抗体は、市販されている抗 A 抗体である 1F115 抗体よりも、A 42 ペプチドに対する反応性が優れていることが分かる。

【0058】

(実施例 4) モノクローナル抗体の CDR 配列決定

以下の手順により本発明の 6C10H3 抗体の相補性決定領域 (CDR) の配列を決定した。

【0059】

(1) 全 RNA 抽出手順

ハイブリドーマ 6C10H3 (約 1×10^7 細胞) を用い、次に示す手順をこの順で行って全 RNA を回収した。

・ホモジナイズ工程: TRIzol Reagent (Life Technologies (Invitrogen) 社製, No. 15596-026) 1 mL をピペッティングで添加、室温で 5 分間処理。

・RNA 抽出工程: クロロホルム 0.2 mL を添加、転倒混和、室温で 3 分間処理。その後、遠心分離 (12000 g, 4, 15 分間) を行い、水層を回収。

・第一回洗浄工程: イソプロパノール 0.5 mL を添加、転倒混和、室温で 10 分間処理。その後、遠心分離 (12000 g, 4, 10 分間) を行い、沈殿を回収 (上清を吸引除去)。

・第 2 回洗浄工程: 75% エタノール 1 mL を添加、転倒混和。その後、遠心分離 (12000 g, 4, 5 分間) を行い、沈殿を回収 (上清を吸引除去) し、風乾。

・調整工程: RNase free water 0.02 mL を添加し、55 で 10 分間処理。

【0060】

(2) cDNA 作製手順

前記 (1) で回収した全 RNA を用いて、以下の手順で cDNA を作製した。

・変性工程: 全 RNA 5 μg を 20 μL に希釈。その後、65 で 10 分間処理した後、急冷。その後、GE Healthcare 社製の First-Strand cDNA 合成キットから、Bulk first-strand reaction mix を 1

1 μL、DTT 溶液を 1 μL、プライマー (Not Id(T) 18) を 1 μL 添加。

・インキュベーション工程: 37 で 1 時間保持した。

【0061】

(3) RT-PCR

前記 (2) で得られた cDNA を用いて RT-PCR を行った。ここでは、重鎖プライマーとして、配列番号 2 及び 3 で表される配列のプライマーを、軽鎖プライマーとして、

10

20

30

40

50

配列番号4及び5で表される配列のプライマーを使用した。

【0062】

(4) 切り出し

前記RT-PCRで増幅されたバンドを、QIAGEN社製のゲル抽出キットを用いて切り出した後、Promega社製のpGEM-T Easy Vector System Iを用いてTAクローニングを行った。

【0063】

(5) 配列決定

Life technologies (Invitrogen)社製のBigDye (登録商標) Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kitから、pGEM-T Easy Vectorに特異的なプライマーを用いて配列決定を行った。

10

【0064】

結果、6C10H3抗体の重鎖は配列番号7で表されるアミノ酸配列からなり、そのうち、重鎖CDRは配列番号8~10で表されるアミノ酸配列からなることが判明した。一方、6C10H3抗体の軽鎖は2つ確認された。軽鎖No.1は、配列番号12で表されるアミノ酸配列からなり、そのうち、軽鎖CDRは配列番号13~15で表されるアミノ酸配列からなること、及び軽鎖No.2は、配列番号20で表されるアミノ酸配列からなり、そのうち、軽鎖CDRは配列番号21~23で表されるアミノ酸配列からなることが判明した。配列番号6は、6C10H3抗体の重鎖をコードする塩基配列、配列番号11は、6C10H3抗体の軽鎖No.1をコードする塩基配列、配列番号19は、6C10H3抗体の軽鎖No.2をコードする塩基配列である。

20

【0065】

(実施例5) キメラ抗体の作製

以下の手順によりキメラ抗体(ヒト化抗体)を作製した。

【0066】

(1) 抗体遺伝子CDR領域増幅

Ab 6C10H3抗体遺伝子(重鎖および軽鎖)を組み込んだpGEM-Tベクターを鋳型とし、以下のプライマーを用いてPCR法によりCDR領域を増幅した。ここでは、重鎖プライマーとして、配列番号24及び25で表される配列のプライマーを、軽鎖No.1プライマーとして、配列番号26及び27で表される配列のプライマーを使用した。

30

【0067】

(2) 制限酵素処理

上記PCR産物を、下記制限酵素を用いて切断した。

重鎖: Afl II & Nhe I

軽鎖: EcoR V & BsiW I

【0068】

(3) キメラ抗体発現用ベクターに組み込み

T4ライゲースを用いて、制限酵素処理した各PCR産物を、同じ制限酵素処理した下記ベクターに組み込んだ。なお、両ベクターともヒトIgG1遺伝子Fc領域がすでに組み込まれたものである。

40

重鎖: pCAGGSベクター

軽鎖: pCAGGSベクター

【0069】

(4) 配列確認

各ベクターに組み込んだMab 6C10H3由来CDR領域遺伝子配列をDNAシーケンサーにより確認した。

【0070】

(5) キメラ抗体の発現

50

ヒト胎児腎細胞HEK293Tを宿主として用い、5mLスケールで培養を行った。培養は全て37℃、5%CO₂の条件下で行った。まず、6cmディッシュ1枚にHEK293T細胞を10% FBS DMEM中で培養した。80~90%コンフルエントになったところで、トランスフェクションを行った。トランスフェクションの際には事前に、0% FBS DMEM 293μlにプラスミド7.0μg(重鎖:3.5μg、軽鎖:3.5μg)を混ぜたものと、0% FBS DMEM 293μlに1mg/mlポリエチレンイミン溶液10.6μlを混ぜたものをそれぞれ用意した。この2つの溶液を混合し、20分間静置後、2% FBS DMEM 3.5mlに加え、これをトランスフェクション溶液とした。細胞を播種したディッシュから培地を除いた後、ディッシュにトランスフェクション溶液を全量注ぎ、16時間培養した。FBSを含む培地を除き、PBSで洗浄した後、0% FBS DMEMを5ml注ぎ、さらに3日間培養した。培養上清を回収し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)と、抗ヒトFc抗体及び抗ヒト軽鎖抗体を用いたウェスタンブロッティングとによって発現を確認した。

10

【0071】

(6)キメラ抗体の反応性の確認

ELISA法を用いて、上記で得られたキメラ抗体がAβ42ペプチドを認識することを確認した。

【産業上の利用可能性】

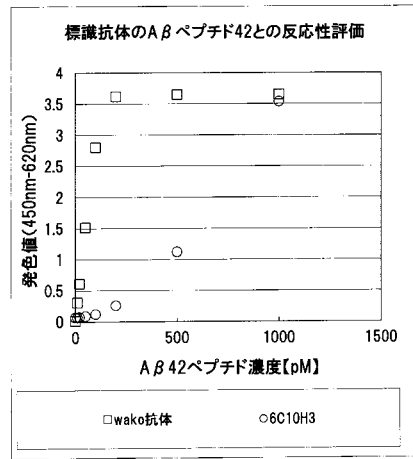
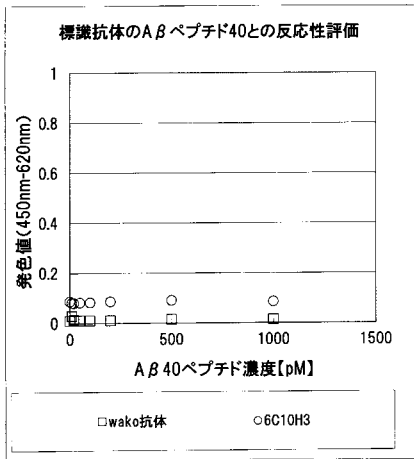
【0072】

20

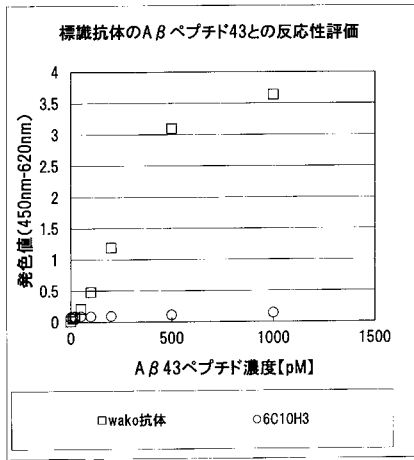
本発明により提供されるモノクローナル抗体は、AD患者やADの可能性がある健常者から採取した検体を利用した体外でのAD診断を行うに際し、検体に含まれるAβペプチドの検出を可能とする。また、本発明により提供されるモノクローナル抗体は、ヒト化抗体とすることにより抗体医薬として使用できる可能性がある。

【図1】

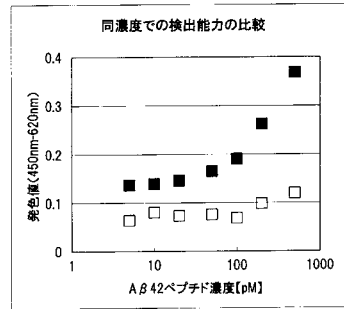
【図2】



【 図 3 】



【 図 4 】



【 配 列 表 】

[2016103980000001.app](#)

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 33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53		D
C 1 2 P 21/08	(2006.01)	C 1 2 P	21/08		

Fターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA01 DA13
4B065 AA90X AA90Y AA91X AA91Y AA93X AA93Y AB01 AB04 AC14 BA01
BA08 CA24 CA25 CA44 CA46
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA76 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	杂交瘤和单克隆抗体		
公开(公告)号	JP2016103980A	公开(公告)日	2016-06-09
申请号	JP2013046216	申请日	2013-03-08
[标]申请(专利权)人(译)	松下寿电子工业株式会社		
申请(专利权)人(译)	松下保健有限公司		
[标]发明人	福原崇臣 曾我部誠司		
发明人	福原 崇臣 曾我部 誠司		
IPC分类号	C12N5/10 C12N15/09 C12N15/00 C07K16/18 C07K16/46 G01N33/53 C12P21/08		
CPC分类号	C07K16/18		
FI分类号	C12N5/00.102 C12N15/00.A C12N15/00.ZNA C07K16/18 C07K16/46 G01N33/53.D C12P21/08 C12N15/00 C12N15/06.100 C12N5/16		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA41 4B024/CA01 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/GA01 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA11 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AA91X 4B065/AA91Y 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB04 4B065/AC14 4B065/BA01 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)	(21) 出願番号 特願2013-46216 (P2013-46216) (22) 出願日 平成25年3月8日 (2013.3.8)	(71) 出願人 592031097 パナソニックヘルスケア株式会社 愛媛県温市南方2131番地1 (74) 代理人 110000556 特許業務法人 有古特許事務所 (72) 発明者 福原 崇臣 愛媛県温市南方2131番地1 パナソニックヘルスケア株式会社内 (72) 発明者 曾我部 誠司 愛媛県温市南方2131番地1 パナソニックヘルスケア株式会社内 Fターム(参考) 4B024 AA01 BA41 CA01 CA04 CA09 CA11 CA20 DA02 GA01 GA11 HA01 HA11
要解决的问题：本发明提供的单克隆抗体基本上不与抗原反应的Aβ43肽和反应的Aβ抗原42肽;并提供一种能够产生单克隆antibody.SOLUTION的杂交瘤：本发明提供了具有杂交瘤保藏号NITE P-1463;单克隆抗体由杂交瘤产生的抗原的Aβ肽;和反应抗原Aβ42肽和没有反应抗原Aβ43peptide. SELECTED绘制单克隆抗体：无		最終頁に続く