

(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2004-51633

(P2004-51633A)

(43) 公開日 平成16年2月19日(2004.2.19)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>CO7K 16/18</b>	CO7K 16/18 ZNA	4B024
<b>C12P 21/08</b>	C12P 21/08	4B064
<b>GO1N 33/53</b>	GO1N 33/53 D	4H045
<b>GO1N 33/577</b>	GO1N 33/577 B	
<b>// C12N 15/09</b>	C12N 15/00 A	

審査請求 未請求 請求項の数 14 O L (全 18 頁)

(21) 出願番号	特願2003-191653 (P2003-191653)	(71) 出願人	398032751
(22) 出願日	平成15年7月4日 (2003.7.4)		デイド・ペーリング・マルブルク・ゲゼル
(31) 優先権主張番号	10230550.1		シャフト・ミット・ベシユレンクテル・ハ
(32) 優先日	平成14年7月5日 (2002.7.5)		フツング
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		ドイツ連邦共和国 マルブルク/ラーン (
(31) 優先権主張番号	03011334.4		番地なし)
(32) 優先日	平成15年5月19日 (2003.5.19)	(74) 代理人	100091731
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 高木 千嘉
		(74) 代理人	100080355
			弁理士 西村 公佑
		(74) 代理人	100105290
			弁理士 三輪 昭次
		(72) 発明者	ハーラルト・アルトハウス
			ドイツ連邦共和国 35083ヴェター. シ
			ュールシュトラッセ20アー
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 炭水化物欠失トランスフェリン (CDT) 特異的抗体、その製造および使用

## (57) 【要約】

【課題】トランスフェリン同族系炭水化物欠失トランスフェリン (CDT) と水溶液中で選択的に結合し、CDTを固相に結合させる必要がない抗体に関する。

【解決手段】CDTは、通常はトランスフェリンのAsn413および/またはAsn611に結合している2本のオリゴ糖鎖の少なくとも1本が完全に、または実質的に完全に欠落しており、本抗体は特異的にCDTと結合する。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

水溶液中で炭水化物欠失トランスフェリン ( C D T ) と選択的に結合し、該 C D T を固相に結合させることを必要としない抗体。

## 【請求項 2】

E P - 0 6 0 5 6 2 7 にしたがって調製したペプチド P 1 または P 2 とは結合しないか、または実質的に結合しない請求項 1 に記載の抗体。

## 【請求項 3】

その結合態様が、固相結合ペプチド P 1 もしくは P 2、または水溶液中に存在するペプチド P 1 もしくは P 2 に対して確認された請求項 2 に記載の抗体。

10

## 【請求項 4】

C D T と選択的に結合する抗体であって、この結合が C D T 配列の以下の ( 1 ) から ( 4 ) :

( 1 ) V V A R S M G G K E D L I W E L L、

( 2 ) T T E D S I A K I M N G E A D A M S L D G G F、

( 3 ) S K L S M G S G L N L S E P N、および

( 4 ) Y E K Y L G E E Y V K A V

のセグメント領域で発生する上記抗体。

## 【請求項 5】

結合が、前記配列の ( 1 ) から ( 4 ) のセグメントの 3 つの領域でのみ発生する請求項 4 に記載の抗体。

20

## 【請求項 6】

結合が、前記配列の ( 1 ) から ( 4 ) のセグメントの 2 つの領域でのみ発生する請求項 4 に記載の抗体。

## 【請求項 7】

抗体がモノクローナル抗体である、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の抗体。

## 【請求項 8】

寄託番号 D S M A C C 2 5 4 0 を有する細胞培養によって産生されるモノクローナル抗体。

## 【請求項 9】

寄託番号 D S M A C C 2 5 4 1 を有する細胞培養によって産生されるモノクローナル抗体。

30

## 【請求項 10】

請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の抗体から作成することができる抗原結合フラグメント。

## 【請求項 11】

以下の工程：適当な実験動物を非糖化トランスフェリンで免疫し；該実験動物の脾臓細胞をミエローム細胞と融合させ；抗体産生ハイブリッド細胞を得て；該ハイブリッド細胞をクローニングし；水溶液中で C D T と選択的に結合し、該 C D T を固相に結合させる必要がない抗体を産生するハイブリッド細胞クローンを選別し；さらにこのようにして選別したハイブリッド細胞クローンから当業者に公知の方法によって抗体を得ることによって請求項 1 に記載の抗体を製造する方法。

40

## 【請求項 12】

以下の工程：適当な実験動物を非糖化トランスフェリンで免疫し；該実験動物の脾臓細胞をミエローム細胞と融合させ；抗体産生ハイブリッド細胞を得て；該ハイブリッド細胞をクローニングし；エピトープマッピングの結果にしたがえば、結合が前記 C D T 配列の以下の ( 1 ) から ( 4 ) :

( 1 ) V V A R S M G G K E D L I W E L L、

( 2 ) T T E D S I A K I M N G E A D A M S L D G G F、

( 3 ) S K L S M G S G L N L S E P N、および

( 4 ) Y E K Y L G E E Y V K A V

50

のセグメント領域で発生する抗体を産生するハイブリッド細胞クローンを選別し：さらにこのようにして選別したハイブリッド細胞クローンから当業者に公知の方法によって抗体を得ることによって請求項 4 に記載の抗体を製造する方法。

【請求項 13】

以下の工程：請求項 1～9 のいずれかに記載の抗体または請求項 10 に記載の抗原結合フラグメントをサンプルと接触させ、さらに C D T を含む免疫複合体の生成を定性的または定量的に決定することを含むサンプル中の C D T を検出するイムノアッセイ。

【請求項 14】

請求項 1～9 のいずれかに記載の抗体または請求項 10 に記載の抗原結合フラグメントを含む、請求項 13 に記載のイムノアッセイを実施するための検査キット。

10

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、トランスフェリン同族系炭水化物欠失トランスフェリン (C D T) と水溶液中で選択的に結合し、C D T を固相に結合させる必要がない抗体に関する。C D T は、通常はトランスフェリンの A s n 4 1 3 および / または A s n 6 1 1 に結合している 2 本のオリゴ糖鎖の少なくとも 1 本が完全に、または実質的に完全に欠落していることを特徴とする。

【0002】

【従来技術】

アルコール中毒は世界的な問題である。アルコール中毒を診断する多数の診断検査がこれまでに開発された。しかしながらこれらの検査の大半は前記疾患に特異的ではない。もっとも最近に開発された検査は M a k h l o u f ら ( E P - 0 6 0 5 6 2 7 ) によって導入された。前記に開示された抗体は、アルコール中毒患者で見出されるがアルコール非中毒者では認められない C D T と特異的に反応する。このことは、それを用いて中毒患者の血清で C D T を検出することができるイムノアッセイをデザインすることを可能にした。しかしながら、この検査の欠点は、検出されるべき抗原は固相に堅固に結合させる必要があるということであった。なぜならば、E P - 0 6 0 5 6 2 7 に開示された抗体は、溶液中に存在する C D T とは結合しないか、または不適当な結合しかもたらさないからである。

20

【0003】

【発明が解決しようとする課題および課題を解決する手段】

30

したがって本発明の目的は、サンプルの溶液中に存在する C D T を直接検出することができ、したがって検出されるべき抗原をもはや固相に結合させる必要がないように C D T 検出を改善することであった。

驚くべきことには、前記目的は、水溶液中で C D T と選択的に結合し、C D T を固相に結合させることを必要としない抗体を提供することによって達成された。エピトープマッピング実験を用いて、従来技術の抗体とは対照的に、本発明の抗体は C D T 配列の異なるセグメントに同時に結合することが判明した。このことから、本発明の抗体が認識するエピトープは不連続エピトープであるということが推論された。

【0004】

本発明はしたがって、水溶液中で C D T と選択的に結合し、C D T を固相に結合させることを必要としない抗体に関する。本抗体は、E P - 0 6 0 5 6 2 7 にしたがって調製した P 1 または P 2 ペプチドと結合しないか、または実質的に結合せず、前記ペプチドが固相に結合されてあるか、溶液中に存在するかは重要ではないことが判明した。

40

選択的な結合とは、本発明の場合、一方の C D T と他方のヒトトランスフェリンとの間の識別を明瞭に可能にする十分に特異的な結合または実質的に特異的な結合を意味する。

【0005】

本発明の場合、“固相”という用語は、多孔性および / または無孔性の、通常水に不溶性である物質から成り、さらに多様な形状 (例えばうつわ、筒、マイクロタイタープレート、球、微粒子、棒状物、細片、ろ紙またはクロマトグラフィー紙など) を有するものを包含する。前記固相の表面は通常親水性であるか、または親水性にすることができる。前記

50

固相は多様な物質、例えば、無機および/または有機物質、合成、天然に存在する物質および/または改変された天然の物質から成るであろう。固相物質の例はポリマー、例えばセルロース、ニトロセルロース、酢酸セルロース、塩化ポリビニル、ポリアクリルアミド、架橋デキストラン分子、アガロース、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリメタクリレートまたはナイロン；セラミクス；ガラス；金属、特に貴金属（例えば金または銀）；磁鉄鉱；前記の混合物または組み合わせなどである。“固相”という用語にはまた細胞、リポソームまたはリン脂質担体も含まれる。

【0006】

前記固相は、例えば、サンプル構成物と固相との非特異的結合の減少もしくは防止のため、または例えば、粒子状固相の懸濁安定性、保存安定性、形状安定性、紫外線、微生物もしくは他の有害因子に対する耐性の改善のために、1層または2層以上の例えばタンパク質、炭水化物、親油性物質、バイオポリマー、有機ポリマーまたはその混合物のコーティングを有していてもよい。

10

【0007】

本発明はさらにCDTと選択的に結合する抗体に関し、この場合、前記結合はCDT配列の以下の(1)から(4)のセグメント領域で発生する：

(1) V V A R S M G G K E D L I W E L L、および

(2) T T E D S I A K I M N G E A D A M S L D G G F、および

(3) S K L S M G S G L N L S E P N、および

(4) Y E K Y L G E E Y V K A V。

20

本発明はさらに、その結合が、前述の配列の(1)から(4)のセグメントの3つまたは2つの領域でのみ発生するタイプの抗体に関する。

【0008】

好ましい実施態様では、本発明の抗体はモノクローナル抗体である。

特に好ましいモノクローナル抗体は、ブダペスト条約に基づいてDSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, 38124 Brunswick, Germany) に寄託された(寄託日：2002年4月16日)、以下の細胞培養によって産生される抗体である：

細胞培養01-102/01 寄託番号：DSM ACC 2541

30

細胞培養98-84/011 寄託番号：DSM ACC 2540

抗原結合フラグメント、例えばFab、Fab<sub>2</sub>、FvまたはF(ab)<sub>2</sub>フラグメントもまた本発明にしたがって用いることができる(前記フラグメントは当業者に公知の方法によって前述の本発明の抗体から製造できる)。

【0009】

本発明の目的のためには、“抗体”という用語は一般に、完全な抗体だけでなく、前記抗原またはハプテンとの結合特性が維持されているかぎり、抗体フラグメント(例えば既に述べたFab、Fv、F(ab)<sub>2</sub>またはFab<sub>2</sub>)、キメラ抗体、ヒト化抗体、二重特異性もしくは複数特異性抗体、または一本鎖抗体；さらに免疫グロブリンおよび/またはそのフラグメントの凝集物、ポリマーおよび共役物もまた意味する。抗体フラグメントは、例えば抗体を例えばペプシンまたはパピインのような酵素で切断して調製できる。抗体凝集物、ポリマーおよび共役物は、多様な方法、例えば熱処理、グルタルアルデヒドのような物質との反応、免疫グロブリン結合分子との反応、抗体のビオチン化とそれに続くストレプトアビジンまたはアビジンとの反応などによって生成することができる。

40

【0010】

本発明の目的のためには、抗体はモノクローナル抗体でもまたはポリクローナル抗体でもよい。前記抗体は、通常の方法、例えばヒトまたは動物(例えばマウス、ラット、モルモット、ウサギ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ)を免疫し(Messerschmid (1996) BIOforum, 11:500-502も参照されたい)、続いて抗血清を得ることによって；またはハイブリドーマ細胞の樹立とそれに続く分泌抗体の精製

50

によって；または、天然の抗体と前記抗原および／またはハプテンとの結合に必要なアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列もしくはその改変型のクローニングおよび発現によって製造してもよい。

【0011】

本発明はさらに以下の工程によって本発明の抗体を製造する方法に関する：適当な実験動物を非糖化トランスフェリンまたはCDTで免疫し、続いて前記実験動物の脾臓細胞をミエローマ細胞と融合させ、抗体産生ハイブリッド細胞を作製し、続いて前記ハイブリッド細胞をクローニングし、さらに、水溶液中のCDTと選択的に結合しCDTを固相に結合させる必要がない抗体を産生するハイブリッド細胞クローンを選別する。最終的には、抗体は、前記のように選別したハイブリッド細胞クローンから当業者に公知の方法によって得られる。

10

【0012】

本発明はさらに以下の工程によって本発明の抗体を製造する方法に関する：適当な実験動物を非糖化トランスフェリンまたはCDTで免疫し、続いて前記実験動物の脾臓細胞をミエローマ細胞と融合させ、抗体産生ハイブリッド細胞を作製し、続いて前記ハイブリッド細胞をクローニングし、さらに、エピトープマッピングの結果にしたがえば、その結合がCDT配列の以下のセグメント(1)から(4)：

(1) V V A R S M G G K E D L I W E L L、および

(2) T T E D S I A K I M N G E A D A M S L D G G F、および

(3) S K L S M G S G L N L S E P N、および

(4) Y E K Y L G E E Y V K A V

20

の領域で発生する抗体を産生するハイブリッド細胞クローンを選別し、続いて、前記のように選別したハイブリッド細胞クローンから最終的には当業者に公知の方法により抗体を得る。

【0013】

前述の方法の1つにしたがって適当な実験動物を免疫するために、非糖化トランスフェリンまたはCDTの代わりに、前記の配列の(1)から(4)のセグメントの1つまたは2つ以上を含むペプチドもまた用いることができる。前述の配列のセグメントの例えば1つだけまたは2つ以上から成る短いペプチドを、適切な場合には適当な担体分子に結合させて適切な免疫原性を得ることができることは、当業者には理解されることである。前記の目的に適した担体分子は、例えばペプチドまたはタンパク質であり、それらは当業者には公知である。

30

【0014】

上記に述べた製造方法には、当業者に公知のモノクローナル抗体の製造のためのハイブリドーマ技術が含まれる。前記技術は、最初Koe h l e r & M i l s t e i nによって1975年に報告され、以来多数の著者によって改変または改良されてきた。前記技術はマウスの細胞からモノクローナル抗体を製造するためにしばしば用いられてきたが、また別の由来をもつモノクローナル抗体の製造を述べた文献も存在する。さらに、抗体構築物、例えばヒト化抗体、または二重特異性もしくは複数特異性抗体、またはキメラ抗体の製造方法もまた開示されており、もちろん前記も同様に本発明の抗体の製造に利用することができる。

40

【0015】

本発明はまた、サンプル中のCDTを検出するイムノアッセイに関する。前記アッセイは、上記で述べた本発明の抗体または対応する抗体フラグメントとサンプルとを接触させ、続いてCDTを含む免疫複合体の生成を定性的または定量的に決定することを必要とする。

前述のイムノアッセイを実施することを目的とする検査キットも同様に本発明の特徴であり、前記キットは、本発明の抗体または本発明の抗体フラグメントを含む。

本発明を以下の実施例によってさらに説明する。これら実施例は、もっぱら本発明の個々の特徴を例示により詳述するために用いられ、制限と解されてはならない。

50

## 【0016】

## 【実施例】

実施例1：抗ヒトトランスフェリンセファロースの調製

ヒト血清（正常血清およびアルコール中毒患者血清）からトランスフェリンをアフィニティー精製するために、120mgの抗ヒトトランスフェリン（Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, Germany）を0.8gのCNBr活性化セファロースCL-4Bとカップリングさせてアフィニティー支持体を調製した。120mgの抗ヒトトランスフェリンを0.1MのNaHCO<sub>3</sub>溶液に対して透析する。0.8gのセファロースCL-4B（Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Germany）を0.1MのNaHCO<sub>3</sub>溶液で洗浄し、さらに冷却しながら1.28gの臭化シアン（5mLのアセトニトリルに溶解）を添加する。懸濁物をpH11で4～15分攪拌する。続いて前記懸濁物を0.1MのNaHCO<sub>3</sub>溶液で十分に洗浄する。前記活性化セファロースを0.1MのNaHCO<sub>3</sub>溶液に懸濁し、さらに前記の調製抗体溶液を添加して室温で6時間インキュベートする。前記のようにして調製した抗ヒトトランスフェリンセファロースをpH7.2のリン酸緩衝食塩水で洗浄し、リン酸緩衝食塩水（pH7.2）+NaN<sub>3</sub>（1g/L）中で使用まで保存する。

10

## 【0017】

実施例2：ヒト血清（正常血清およびアルコール中毒患者血清）からヒトトランスフェリンの単離

ヒト血清からトランスフェリンをアフィニティー精製するために、実施例1で調製した抗ヒトトランスフェリンセファロースをガラスのカラムに充填し、100mLのリン酸緩衝食塩水（pH7.2）+NaN<sub>3</sub>（1g/L）で洗浄した。10mLのヒト血清（正常血清およびアルコール中毒患者血清）を流速0.5mL/分でカラムにロードし、さらに、50mLのリン酸緩衝食塩水（pH7.2）+NaN<sub>3</sub>（1g/L）、50mLのNaCl溶液（1M）および50mLの水でカラムを洗浄して非結合タンパク質を除去する。結合トランスフェリンは50mLのグリシン溶液（0.5M）（塩酸でpH2.5に調節）で溶出させ、直ちに固体のトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンを添加して中和し、リン酸緩衝食塩水（pH7.2）+NaN<sub>3</sub>（1g/L）に対して透析する。

20

## 【0018】

実施例3：非糖化ヒトトランスフェリンa) リコンビナント非糖化ヒトトランスフェリン

リコンビナント非糖化トランスフェリンは、通常の遺伝子操作法および分子生物学を用いて調製する。前記は以下の文献に記載されている：Mason et al. (1993) *Biochemistry*, 32: 5472-5379。

30

b) ヒトトランスフェリンの酵素による脱糖化反応

60mgのヒトトランスフェリン（例えば以下から入手：Calbiochem - Novabiochem GmbH, Bad Soden, Germany）を、10mMのEDTAおよび1g/L（w/v）のデシル硫酸ナトリウム（Fluka, order No. 71443）を含む8mLのリン酸緩衝食塩水（pH7.2）に溶解する。前記のようにして調製したトランスフェリン溶液を水浴中で37℃に加熱し、NグリコシダーゼF（Roche, order No. 1365193）180単位（3単位/mgトランスフェリン）を添加する。前記混合物を水浴中で37℃で17時間インキュベートする。脱糖化反応の完了はSDS-PAGEで調べる（Duan et al. (1998) *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 69: 217-224）。

40

## 【0019】

実施例4：従来技術によるモノクローナル抗体の調製

従来技術によるモノクローナル抗体の調製は、欧州特許第605627B1号に記載されたように、トランスフェリン特異的ペプチド配列P1およびP2を用いて免疫することに

50

よって実施される。以下のハイブリッド/モノクローナル抗体が得られた：

【0020】

<u>抗体番号</u>	<u>特異性</u>
01-32/062	抗P1
00-177/012	抗P1
00-187/016	抗P2
00-187/027	抗P2

【0021】

実施例5：本発明のモノクローナル抗体の調製

a) マウスの免疫

完全フロイントアジュバント中の非糖化トランスフェリン20 $\mu$ gでBALB/cマウスの各々を腹腔内免疫した。ブースターは、4週間後に各々のマウスに不完全フロイントアジュバント(ICN Biomedical GmbH, Eschwege, Germany)中の20 $\mu$ gの非糖化トランスフェリンを、さらに8週間後に各々にフロイントアジュバントを含まない20 $\mu$ gの非糖化トランスフェリンを投与して実施した。融合前の最後の3日間に、マウスに静脈内ブースターとして各々に20 $\mu$ gの非糖化トランスフェリンを投与した。

【0022】

b) 融合

マウスをCO<sub>2</sub>吸入によって殺した後、脾臓を取り出し、血清を含まないダルベッコー改変イーグル培養液(DMEM)(CC Pro GmbH, Neustadt/W, Germany)中の単一細胞懸濁液を調製した。細胞を遠心分離し(652g)、DMEMで2回洗浄した。続いて細胞数をトリパンブルー染色によって決定した。2 $\times$ 10<sup>7</sup>のミエローマ細胞(Sp2/0)を約10<sup>8</sup>の脾臓細胞に添加した。遠心分離(360g)した後、上清を廃棄し、1mLのポリエチレングリコール溶液(PEG400、DMEM中で約50%の濃度)(Merck EuroLab, Bruchsal, Germany)を前記細胞ペレットに添加し、再度懸濁させた後37 $^{\circ}$ Cで1分インキュベートした。続いて約10mLのDMEMを一滴ずつ添加し、さらに前記混合物を室温で2~4分インキュベートした。融合細胞を遠心分離(326g)、ペレットをDMEM+20%FCS(ウシ胎児血清)(Biowhitaker Europe, Verviers, Belgium)+HAT溶液(CC Pro GmbH, Neustadt/W, Germany)中に再懸濁し、24ウェルの細胞培養プレート(Costar)に導入した。ウェル当たりのおおよその細胞濃度は5 $\times$ 10<sup>4</sup>~5 $\times$ 10<sup>6</sup>細胞であった。

2~3週間後に、得られた細胞コロニー(ハイブリッド)を取り出し新しい培養プレートに移した。

【0023】

c) 抗体の特異性の決定

免疫抗原被覆マイクロタイタープレート(Nunc, タイプB)(コーティング1 $\mu$ g/mL、約0.015 $\mu$ g/ウェル)を用いて、細胞培養中に放出された抗体の特異性を第一の検査工程で検査した。

100 $\mu$ Lの細胞培養上清(1:2希釈)をマイクロタイタープレートの各ウェルにピペットで加え、+15~+25で1時間インキュベートした。プレートを洗浄溶液POD(OSEW; Dade Behring, Marburg, Germany)で2回洗浄した後、100 $\mu$ Lの抗マウスIgG/F(ab)<sub>2</sub>-POD共役物(Dade Behring, Marburg, Germany)を各ウェルに導入し、続いて+15~+25で1時間インキュベートした。プレートをさらに2回洗浄した後、

10

20

30

40

50

100  $\mu$ L の色素原 TMB 溶液 (Dade Behring, Marburg, Germany) を各ウェルに導入し、+15 ~ +25 でさらに30分インキュベートした。前記インキュベーションの後、100  $\mu$ L の停止溶液 POD (Dade Behring, Marburg, Germany) を各ウェルに導入し、マイクロタイタープレートを BEPII (Behring ELISA Processor II; Dade Behring, Marburg, Germany) で450 nm で調べた。

【0024】

第二の検査工程では、ヒトトランスフェリン (例えば以下から入手: Calbiochem - Novabiochem GmbH, Bad Soden, Germany) で被覆したマイクロタイタープレート (Nunc タイプ B) を用い上記のようにハイブリッドをチェックした。コーティング 1  $\mu$ g/mL、約 0.015  $\mu$ g/ウェル。

10

結果は表 1 に示す。

【0025】

【表 1】

表 1: BEP II (Behring ELISA processor II) 450 nm を用いたマイクロタイタープレート検定による抗体特異性の決定

ハイブリッド番号	450 nm での吸光	
	非糖化ヒトトランスフェリン	ヒトトランスフェリン
98-22/026 (569)	> 2.5	陰性
98-23/07 (45)	> 2.5	陰性
98-22/0104 (572)	1.739	陰性
98-84/011 (1)	> 2.5	陰性
01-102/01 (113)	> 2.5	陰性

20

註: 陰性 = 吸光 (450 nm) < 0.1 OD; 検査ハイブリッドの希釈に応じたシグナルの減衰無し。

30

【0026】

#### d) クローニング

本発明の抗体 (非糖化ヒトトランスフェリンと結合するが、ヒトトランスフェリンとは結合しない) を産生するハイブリッドの単細胞をマイクロマニピュレーター (Leitz, Wetzlar, Germany) を用いてクローニングした。このようにして得たクローン 98-84/011 および 01-102/01 を 2002 年 4 月 16 日に下記の機関に寄託した: DSMZ Deutsche Sammlung Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, Brunswick, Germany)。受託番号 DSM ACC 2540 (98-84/011) および DSM ACC 2541 (01-102/01)。

40

【0027】

#### e) 抗体のサブクラスの決定

抗体 98-84/011 および 01-102/01 のサブクラスをアイソストリップ (IsoStrip (登録商標)) マウスモノクローナル抗体アイソタイプ判定キット (Boehringer Mannheim, Germany) を用いて調べ、98-84/011 および 01-102/01 は IgG<sub>1</sub> と決定された。

50

## 【0028】

## f) 抗体の製造

大量の抗体を製造するために、適当な細胞クローンをローラーボトル (Corning Costar Deutschland, Bodenheim) に移し、+37 で所望の最終容積に増殖させた。続いて前記ローラー培養浮遊液の0.22 μmろ過を実施して細胞を除去する。前記抗体溶液 (この時点で細胞を含まない) を限外ろ過により濃縮し (分離限界30000ダルトン)、続いて精製する。

## 【0029】

## g) 抗体精製

得られた抗体溶液を再度0.14 Mのリン酸緩衝液 (pH 8.6) で処理し、r-プロテインAセファロースファストフロー (Amersham) を充填したクロマトグラフィーカラムにロードした (精製すべき抗体10 mg 当たり1 mLのr-プロテインAセファロースファストフローを用いた)。0.14 Mのリン酸緩衝液 (pH 8.6) でカラムを洗浄して全ての非結合成分を除去する。結合抗体は0.1 Mのクエン酸 (pH 3.0) でカラムから溶出させ、以下に対して透析する: 0.05 M酢酸ナトリウム + 0.5 MのNaCl + 0.05 Mのトリス + 0.01%のアジ化ナトリウム (pH 7.0)。

## 【0030】

実施例6: 固相結合抗原に対する抗体の特異性の決定: 本発明の抗体と従来技術の抗体との比較

得られた抗体の特異性は以下を用いてテストした: a) 非糖化トランスフェリンで被覆したマイクロタイタープレート (Nunc, タイプB) (コーティング1 μg/mL、約0.015 μg/ウェル)、b) ヒトトランスフェリンで被覆したマイクロタイタープレート (Nunc, タイプB) (コーティング1 μg/mL、約0.015 μg/ウェル)、c) ペプチドP1で被覆したマイクロタイタープレート (Nunc, タイプB) (コーティング3 μg/mL、約0.045 μg/ウェル)、およびd) ペプチドP2で被覆したマイクロタイタープレート (Nunc, タイプB) (コーティング3 μg/mL、約0.045 μg/ウェル)。

## 【0031】

100 μLのモノクローナル抗体 (1 μg/mL) を前記マイクロタイタープレートの各ウェルにピペットで加え、+15 ~ +25 で1時間インキュベートした。プレートを洗浄溶液POD (OSEW; Dade Behring, Marburg, Germany) で2回洗浄した後、100 μLの抗マウスIgG/F(ab)<sub>2</sub>-POD共役物 (Dade Behring, Marburg, Germany) を各ウェルに導入し、続いて+15 ~ +25 で1時間インキュベートした。プレートをさらに2回洗浄した後、100 μLの色素原TMB溶液 (Dade Behring, Marburg, Germany) を各ウェルに導入し、+15 ~ +25 でさらに30分インキュベートした。前記インキュベーションの後、100 μLの停止溶液POD (Dade Behring, Marburg, Germany) を各ウェルに導入し、マイクロタイタープレートをBEPII (Behring ELISA Processor II; Dade Behring, Marburg, Germany) で450 nmで調べた。

結果は表2に示されている。

## 【0032】

## 【表2】

表 2: BEP II 450 nm を用いたマイクロタイタープレート検定  
による抗体特異性の決定

抗 体		450 nm での吸光			
		非糖化 ヒトトランス フェリン	ヒトトランス フェリン	ペプチド P1	ペプチド P2
本発明の 抗体	98-22/026	1.578	陰 性	陰 性	陰 性
	98-23/07	2.497	陰 性	陰 性	陰 性
	98-22/0104	1.179	陰 性	陰 性	陰 性
	98-84/011	> 2.5	陰 性	陰 性	陰 性
	01-102/01	2.432	陰 性	陰 性	陰 性
従来技術 の抗ペプ チド P1 抗体	00-177/012	1.063	0.157	> 2.5	陰 性
	01-32/062	> 2.5	0.151	> 2.5	陰 性
従来技術 の抗ペプ チド P2 抗体	00-187/016	2.339	陰 性	陰 性	> 2.5
	00-187/027	> 2.5	陰 性	陰 性	> 2.5

註：陰性 = 吸光(450nm) < 0.1 OD ; 検査ハイブリッドの希釈に応じた  
シグナルの減衰無し。

### 【 0 0 3 3 】

本発明の抗体は非糖化トランスフェリンとのみ反応し、一方、従来技術の抗体はそれぞれのペプチドおよび固相に結合させた非糖化トランスフェリンとの反応を示した。

### 【 0 0 3 4 】

実施例 7 : 溶液中の抗原に対する抗体の特異性の決定 : 本発明の抗体と従来技術の抗体との比較

a) マイクロタイタープレート (Nunc, タイプ B) を本発明のモノクローナル抗体および従来技術のモノクローナル抗体で被覆した。コーティング濃度は  $1 \mu\text{g} / \text{mL}$ 、約  $0.015 \mu\text{g} / \text{ウェル}$ 。

$200 \mu\text{g} / \text{mL}$  から出発した二倍段階希釈の、a) ヒトトランスフェリン、b) 酵素により脱糖化処理したヒトトランスフェリン、c) 正常血清由来ヒトトランスフェリンおよび d) アルコール中毒患者血清由来ヒトトランスフェリンの  $100 \mu\text{L}$  をマイクロタイタ

10

20

30

50

ープレートのウェルにピペットで加え、+15 ~ +25 で1時間インキュベートした。プレートを洗浄溶液POD (OSEW; Dade Behring, Marburg, Germany) で2回洗浄した後、100  $\mu$ Lの抗ヒトトランスフェリン-POD共役物 (Dade Behring, Marburg, Germany) を各ウェルに導入し、続いて+15 ~ +25 で1時間インキュベートした。プレートをさらに2回洗浄した後、100  $\mu$ Lの色素原TMB溶液 (Dade Behring, Marburg, Germany) を各ウェルに導入し、+15 ~ +25 でさらに30分インキュベートした。前記インキュベーションの後、100  $\mu$ Lの停止溶液POD (Dade Behring, Marburg, Germany) を各ウェルに導入し、マイクロタイタープレートをBEPII (Behring ELISA Processor II; Dade Behring, Marburg, Germany) で450 nmで調べた。

結果は表3.1および3.2に示されている。

【0035】

【表3】

表3.1: B E P II、450nmでのマイクロタイタープレート検定による反応性の決定

		吸 光 (450nm)															
抗 原	濃 度 [ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ]	本発明の抗体				従来技術の抗体				本発明の抗体				従来技術の抗体			
		98- 23/07	98- 84/011	01- 102/01	01- 32/062	00- 187/016	00- 187/027	01- 102/01	98- 84/011	98- 23/07	98- 84/011	01- 102/01	01- 32/062	00- 187/016	00- 187/027		
ヒト トランス フェリン	200	1.790	2.5	0.137	陰性	0.508	0.553	陰性	2.500	2.500	1.773	0.388	2.500	2.500			
	100	0.664	2.5	陰性	0.230	0.291	陰性	2.500	2.500	1.582	0.262	2.193	2.500				
	50	0.541	2.5	陰性	0.123	0.170	陰性	2.500	2.500	1.570	0.160	1.406	2.133				
	25	0.491	2.5	陰性	陰性	陰性	陰性	2.500	2.500	1.601	0.104	0.714	1.134				
	12.5	0.320	2.5	陰性	陰性	陰性	陰性	2.500	2.500	1.274	陰性	0.442	0.588				
	6.25	0.158	2.5	陰性	陰性	陰性	陰性	2.500	2.500	1.238	陰性	0.233	0.320				
	3.125	陰性	1.880	陰性	陰性	陰性	陰性	2.500	2.500	1.230	陰性	0.133	0.183				
	1.56	陰性	0.604	陰性	陰性	陰性	陰性	2.500	2.500	0.880	陰性	陰性	陰性				
	0.781	陰性	0.407	陰性	陰性	陰性	陰性	2.500	2.500	0.890	陰性	陰性	陰性				
	0.391	陰性	0.284	陰性	陰性	陰性	陰性	2.500	2.500	0.722	陰性	陰性	陰性				
	0.195	陰性	0.169	陰性	陰性	陰性	陰性	2.500	2.500	0.436	陰性	陰性	陰性				

陰性：吸光 (450nm) < 0.1 OD  
陽性：吸光 (450nm)  $\geq$  0.1 OD

【 0 0 3 6 】

【 表 4 】

10

20

30

40

表3.2: BEP II、450nmでのマイクロタイタープレート検定による反応性の決定

抗原		吸光 (450nm)													
		本発明の抗体				従来技術の抗体				本発明の抗体				従来技術の抗体	
濃度 [μg/ml]	濃度 [μg/ml]	98- 23/07	98- 84/011	01- 102/01	01- 32/062	00- 187/016	00- 187/027	濃度 [μg/ml]	98- 23/07	98- 84/011	01- 102/01	01- 32/062	00- 187/016	00- 187/027	
200	200	1.309	2.5	0.188	陰性	0.142	0.192	200	0.508	2.5	陰性	陰性	0.118	0.133	
100	100	0.229	2.5	0.116	陰性	陰性	0.158	100	0.660	2.5	陰性	陰性	陰性	陰性	
50	50	0.177	2.5	陰性	陰性	陰性	0.111	50	0.306	2.5	陰性	陰性	陰性	陰性	
25	25	0.141	2.5	陰性	陰性	陰性	陰性	25	0.252	2.5	陰性	陰性	陰性	陰性	
12.5	12.5	0.100	2.5	陰性	陰性	陰性	陰性	12.5	0.181	2.5	陰性	陰性	陰性	陰性	
6.25	6.25	陰性	2.5	陰性	陰性	陰性	陰性	6.25	0.101	2.5	陰性	陰性	陰性	陰性	
3.125	3.125	陰性	2.5	陰性	陰性	陰性	陰性	3.125	陰性	2.5	陰性	陰性	陰性	陰性	
1.56	1.56	陰性	1.234	陰性	陰性	陰性	陰性	1.56	陰性	2.5	陰性	陰性	陰性	陰性	
0.781	0.781	陰性	0.745	陰性	陰性	陰性	陰性	0.781	陰性	2.5	陰性	陰性	陰性	陰性	
0.391	0.391	陰性	0.450	陰性	陰性	陰性	陰性	0.391	陰性	1.676	陰性	陰性	陰性	陰性	
0.195	0.195	陰性	0.245	陰性	陰性	陰性	陰性	0.195	陰性	0.920	陰性	陰性	陰性	陰性	

陰性: 吸光 (450nm) < 0.1 OD  
陽性: 吸光 (450nm) ≥ 0.1 OD

10

20

30

40

50

【0037】

b) マイクロタイタープレート (Nunc, タイプB) を本発明のモノクローナル抗体および従来技術のモノクローナル抗体で被覆した。コーティング濃度は 3 μg/ml、約 0.045 μg/ウェル。

1:10 希釈から出発した二倍段階希釈の、a) 正常血清および d) アルコール中毒患者血清の 100 μL をマイクロタイタープレートのウェルにピペットで加え、+15 ~ +

25 で1時間インキュベートした。プレートを洗浄溶液POD (OSEW; Dade Behring, Marburg, Germany)で2回洗浄した後、100 $\mu$ Lの抗ヒトトランスフェリン-POD共役物 (Dade Behring, Marburg, Germany)を各ウェルに導入し、続いて+15 ~ +25 で1時間インキュベートした。プレートをさらに2回洗浄した後、100 $\mu$ Lの色素原TMB溶液 (Dade Behring, Marburg, Germany)を各ウェルに導入し、+15 ~ +25 でさらに30分インキュベートした。前記インキュベーションの後、100 $\mu$ Lの停止溶液POD (Dade Behring, Marburg, Germany)を各ウェルに導入し、マイクロタイタープレートをBEPII (Behring ELISA Processor II; Dade Behring, Marburg, Germany)で450nmで調べた。結果は表4に示されている。

【0038】

【表5】

表4：BEP II、450nmでのマイクロタイタープレート検定による反応性の決定

		吸光 (450nm)																	
抗原	希釈	本発明の抗体				従来技術の抗体				抗原	希釈	本発明の抗体				従来技術の抗体			
		98-23/07	98-22/0104	98-84/011	01-102/01	01-32/062	00-187/016	98-23/07	98-22/0104			98-84/011	01/102/01	01-32/062	00-187/016				
正常ヒト血清	1:10	0.318	0.512	2.5	0.150	陰性	陰性	陰性	0.603	0.861	2.5	0.220	陰性	陰性	陰性				
	1:20	0.212	0.313	2.5	陰性	陰性	陰性	0.367	0.545	2.5	0.148	陰性	陰性	陰性	陰性				
	1:40	0.146	0.193	2.5	陰性	陰性	陰性	0.259	0.391	2.5	0.103	陰性	陰性	陰性	陰性				
	1:80	0.107	0.104	2.5	陰性	陰性	陰性	0.165	0.205	2.5	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性				
	1:160	陰性	陰性	2.5	陰性	陰性	陰性	0.128	0.155	2.5	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性				
	1:320	陰性	陰性	1.605	陰性	陰性	陰性	0.110	0.118	2.5	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性				
	1:640	陰性	陰性	0.936	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	2.5	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性				

陰性：吸光 (450nm) < 0.1 OD  
陽性：吸光 (450nm) ≥ 0.1 OD

10

20

30

40

50

【0039】

本発明の抗体は、（正常血清中の）トランスフェリンと（アルコール中毒患者血清中の）CDTとの明確な識別を可能にし、一方、従来技術の抗体は両血清と反応しない。

【0040】

実施例8：エピトープマッピング

ヒトトランスフェリン配列に由来するオーバーラップペプチド（13量体ペプチド、11

アミノ酸のオーバーラップ)のスキャンは、SPOT合成技術を用いて調製した。前記方法は以下の文献に記載されている：H. Wenschuh et al. (2000) Coherent membrane supports for parallel microsynthesis and screening of bioactive peptides, Biopolymers (Peptide Science), 55:188-206。前記ペプチドはセルロース支持体とそのC末端で結合し、さらにそのN末端に反応性タグを保持する。前記ペプチドを切離しSPOTとして切断した後(96ウェルのマイクロタイタープレート)、活性化ガラスチップに結合させた。これらガラスチップのインキュベーションプロトコルは以下のとおりである：

## 【0041】

従来技術のモノクローナル抗体

- TBS緩衝液(pH8.0)で平衡化
- 封鎖緩衝液(pH8.0)で2時間
- 抗体のインキュベーション(封鎖緩衝液(pH8.0)に3µg/mL)、2時間
- TBS(0.05%ツイーン20)で洗浄
- 封鎖緩衝液(pH8.0)中の抗マウスIgG-PODとインキュベーション、2時間
- TBS(0.05%ツイーン20)で洗浄、3回、5分
- 化学発光の検出(Lumi-Imager, Roche Diagnostics)

## 【0042】

本発明の抗体98-84/011

- TBS緩衝液(pH8.0)で平衡化
- 封鎖緩衝液(pH8.0)で2時間
- 抗体のインキュベーション(封鎖緩衝液(pH8.0)に3µg/mL)、2時間
- TBS(0.05%ツイーン20)で洗浄、3回、5分
- 化学発光の検出(Lumi-Imager, Roche Diagnostics)

## 【0043】

本発明の抗体はペルオキシダーゼで直接標識した。本方法は以下の文献に記載されている：M.B. Wilson & P.K. Nakane (1978) Recent developments in the periodate method conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies, In: Immunofluorescence and Related Staining Techniques (Eds.: W. Knap, K. Holubar, G. Wick), pp.215-224。

## 【0044】

前記実験の結果、従来技術の抗体に対する結合ペプチドは以下のとおりであることが判明した：

ペプチド1に対する従来技術の抗体

1. VLAENY NKSDNCE
2. AENY NKSDNCEDT
3. NY NKSDNCEDTPE
4. NKSDNCEDTPEAG

## 【0045】

ペプチド2に対する従来技術の抗体

1. VHKILRQQQH LFG
2. KILRQQQH LFGSN
3. LRQQQH LFGSNVT
4. QQQH LFGSNVTDC
5. QH LFGSNVTDCSG

前記認識される配列は免疫に用いられたペプチドと同一である。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 4 6 】

本発明の抗体 9 8 - 8 4 / 0 1 1 は、当該配列の以下の 4 つの優性セグメントと反応する  
:

- 1 . V V A R S M G G K E D L I
- 2 .       A R S M G G K E D L I W E
- 3 .               S M G G K E D L I W E L L
- 4 . T T E D S I A K I M N G E
- 5 .               S I A K I M N G E A D A M
- 6 .               A K I M N G E A D A M S L
- 7 .                       I M N G E A D A M S L D G
- 8 .                               N G E A D A M S L D G G F
- 9 . S K L S M G S G L N L S E
- 1 0 .       L S M G S G L N L S E P N
- 1 1 . Y E K Y L G E E Y V K A V

領域 1 から 3 はトランスフェリンの N 末端ドメインに位置し、一方 4 から 8、9 から 1 0  
および 1 1 は C 末端ドメインに位置し、不連続エピトープを示している。

---

フロントページの続き

Fターム(参考) 4B024 AA11 BA41 GA01 GA18 GA27 HA15  
4B064 AG27 CA10 CA20 CE12 DA13  
4H045 AA11 AA20 AA30 CA40 DA76 EA50 FA72 GA26

专利名称(译)	碳水化合物缺乏的转铁蛋白 ( CDT ) 特异性抗体，其生产和使用		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004051633A</a>	公开(公告)日	2004-02-19
申请号	JP2003191653	申请日	2003-07-04
[标]申请(专利权)人(译)	日徳白令maru堡ゲゼルシヤフトミツトベシユレンクテルハフツング		
申请(专利权)人(译)	徳灵公司马尔堡，Gezerushiyafuto-Mitsuto-Beshiyurenkuteru-有限公司		
[标]发明人	ハーラルトアルトハウス		
发明人	ハーラルト・アルトハウス		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/18 C12N15/09 C12P21/08 G01N33/577 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/6842 C07K16/18 C07K2317/34 G01N33/68 Y10S435/81		
FI分类号	C07K16/18.ZNA C12P21/08 G01N33/53.D G01N33/577.B C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA41 4B024/GA01 4B024/GA18 4B024/GA27 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CE12 4B064/DA13 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/GA26		
代理人(译)	西村 公佑		
优先权	10230550 2002-07-05 DE 2003011334 2003-05-19 EP		
其他公开文献	JP5492366B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种在水溶液中选择性结合转铁蛋白同源碳水化合物缺陷型转铁蛋白 ( CDT ) 且不要求CDT与固相结合抗体。解决方案：在CDT中，通常与转铁蛋白的Asn413和/或Asn611结合的两条寡糖链中的至少一条被完全或基本上完全缺失，并且该抗体具有特异性。特异性结合CDT。[选择图]无

		(43) 公開日	平成16年2月19日 (2004.02.19)
(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	FI	ターマコード (参考)	
<b>C07K 16/18</b>	C07K 16/18 ZNA	4B024	
<b>C12P 21/08</b>	C12P 21/08	4B064	
<b>G01N 33/53</b>	G01N 33/53 D	4H045	
<b>G01N 33/577</b>	G01N 33/577 B		
<b>// C12N 15/09</b>	C12N 15/00 A		
		審査請求 未請求 請求項の数 14 O.L. (全 14)	
(21) 出願番号	特願2003-191653 (P2003-191653)	(71) 出願人	398032751 デイド・ベリング・マルブルク・ウ シヤフト・ミツト・ベシユレンクテル ハフツング
(22) 出願日	平成15年7月4日 (2003.7.4)		
(31) 優先権主張番号	10230550.1		
(32) 優先日	平成14年7月5日 (2002.7.5)		
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		
(31) 優先権主張番号	03011334.4		
(32) 優先日	平成15年5月19日 (2003.5.19)	(74) 代理人	100091731 弁理士 高木 千嘉
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		
		(74) 代理人	100080355 弁理士 西村 公佑
		(74) 代理人	100105290 弁理士 三輪 昭次
		(72) 発明者	ハーラルト・アルトハウス ドイツ連邦共和国35083ヴェター ユールシュトラーセ20アー 最終頁に註