

(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2009-82075

(P2009-82075A)

(43) 公開日 平成21年4月23日(2009.4.23)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	4B024
C07K 16/18 (2006.01)	C07K 16/18	4B064
C07K 16/46 (2006.01)	C07K 16/46	4H045
C07K 19/00 (2006.01)	C07K 19/00	
C12P 21/08 (2006.01)	C12P 21/08	

審査請求 未請求 請求項の数 26 O L (全 42 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2007-256649 (P2007-256649)
 (22) 出願日 平成19年9月28日 (2007.9.28)

(出願人による申告) 平成18・19年度、経済産業省、委託事業(「新機能抗体創製技術開発」プロジェクト)、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願

(71) 出願人 803000056
 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団
 東京都中央区日本橋小伝馬町13-4
 (71) 出願人 504136568
 国立大学法人広島大学
 広島県東広島市鏡山1丁目3番2号
 (74) 代理人 100113044
 弁理士 木島 智子
 (72) 発明者 沢村 達也
 大阪府吹田市藤白台5丁目7番1号 国立循環器病センター内
 (72) 発明者 松田 治男
 広島県東広島市鏡山1丁目4番4号 国立大学法人広島大学大学院 生物圏科学研究科内

最終頁に続く

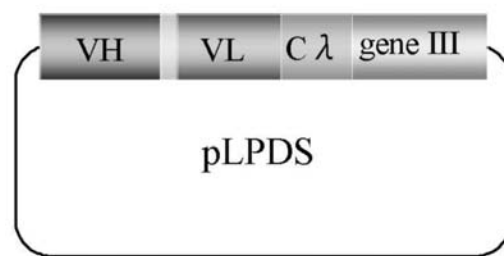
(54) 【発明の名称】 新規抗体及びその利用方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 ヒト及び齧歯類のapoB蛋白質を特異的に認識する抗体、及びその利用方法等を提供する。

【解決手段】 H鎖及びL鎖の可変領域のうち少なくとも一つに、特定の配列を有するポリペプチド及びこれらの配列中の1乃至数個のアミノ酸が、置換、欠失、付加、挿入されたポリペプチド、からなる群から選択されるポリペプチドを1~2含むことを特徴とする、ヒト及び齧歯類のapoB蛋白質に対して特異性を有する抗体及びその製造方法並びにその用途。

【選択図】 図8



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

H鎖及びL鎖の可変領域のうち少なくとも1つに、下記(Ⅰ)及び/又は下記(Ⅱ)を含むことを特徴とする、ヒト及び齧歯類のapoB蛋白質に対して特異性を有する抗体。

(Ⅰ)配列番号1乃至6のいずれかで表されるポリペプチド、及びこれらの配列中の1乃至数個のアミノ酸が、置換、欠失、付加、挿入されたポリペプチド、からなる群から選択されるポリペプチド。

(Ⅱ)配列番号7乃至12のいずれかで表されるポリペプチド、及びこれらの配列中の1乃至数個のアミノ酸が、置換、欠失、付加、挿入されたポリペプチドからなる群から選択されるポリペプチド。

10

【請求項 2】

(Ⅰ)及び(Ⅱ)の組合せが、下記(1)乃至(6)のいずれかであることを特徴とする、請求項1記載の抗体。

(1)配列番号1及び配列番号7

(2)配列番号2及び配列番号8

(3)配列番号3及び配列番号9

(4)配列番号4及び配列番号10

(5)配列番号5及び配列番号11

(6)配列番号6及び配列番号12

20

【請求項 3】

抗体が、ファージ抗体、ファージ抗体の可溶化フォーム、又はモノクローナル抗体であることを特徴とする、請求項1又は2記載の抗体。

【請求項 4】

ファージ抗体、又はファージ抗体の可溶化フォーム中の、2つの可変領域の間に、ペプチドリンカーを有していることを特徴とする、請求項3記載の抗体。

【請求項 5】

ペプチドリンカーが、(GGGGS)₃(配列番号31のペプチド)であることを特徴とする、請求項4記載の抗体。

【請求項 6】

ニワトリ抗体のL鎖定常領域を含むことを特徴とする、請求項3乃至5のいずれかに記載の抗体。

30

【請求項 7】

2つの可変領域が、ファージのコート蛋白質g3pとの融合蛋白質として発現していることを特徴とする、請求項4乃至6のいずれかに記載の抗体。

【請求項 8】

抗体が、ニワトリ抗体のH鎖定常領域の少なくとも一部、及びL鎖定常領域を含むモノクローナル抗体であることを特徴とする、請求項3記載の抗体。

【請求項 9】

請求項1乃至8のいずれかに記載の抗体をコードする遺伝子。

【請求項 10】

下記(Ⅲ)及び/又は下記(Ⅳ)を含むことを特徴とする、請求項9記載の遺伝子。

40

(Ⅲ)配列番号13乃至18からなる群から選択される遺伝子

(Ⅳ)配列番号19乃至24からなる群から選択される遺伝子

【請求項 11】

配列番号1~12のいずれかで表されるポリペプチド、又はその配列中の1乃至数個のアミノ酸が、置換、欠失、付加、挿入されたポリペプチドを含むことを特徴とする、ヒト及び齧歯類のapoB蛋白質に対して特異性を有する抗体を製造するためのポリペプチド。

【請求項 12】

請求項11記載のポリペプチドをコードする遺伝子。

【請求項 13】

50

配列番号 1 3 乃至 2 4 のいずれかの配列を含むことを特徴とする、請求項 1 2 記載の遺伝子。

【請求項 1 4】

(I)及び(II)を含むことを特徴とする、単鎖可変領域フラグメント。

(I)配列番号 1 乃至 6 のいずれかで表されるポリペプチド，及びこれらの配列中の 1 乃至数個のアミノ酸が、置換，欠失，付加，挿入されたポリペプチド，からなる群から選択されるポリペプチド。

(II)配列番号 7 乃至 1 2 のいずれかで表されるポリペプチド，及びこれらの配列中の 1 乃至数個のアミノ酸が、置換，欠失，付加，挿入されたポリペプチドからなる群から選択されるポリペプチド。

10

【請求項 1 5】

(I)と(II)の間に、ペプチドリンカーを有していることを特徴とする、請求項 1 4 記載の単鎖可変領域フラグメント。

【請求項 1 6】

ペプチドリンカーが、(GGGGS)₃ (配列番号 3 1 のペプチド)であることを特徴とする、請求項 1 5 記載の、単鎖可変領域フラグメント。

【請求項 1 7】

請求項 1 4 乃至 1 6 のいずれかに記載の単鎖可変領域フラグメントをコードする遺伝子。

【請求項 1 8】

配列番号 2 5 乃至 3 0 のいずれかの配列を含むことを特徴とする、請求項 1 7 記載の単鎖可変領域フラグメントをコードする遺伝子。

20

【請求項 1 9】

請求項 1 7 又は 1 8 記載の単鎖可変領域フラグメントをコードする遺伝子，ニワトリ抗体のL鎖定常領域C をコードする遺伝子，ファージのコート蛋白g3pをコードする遺伝子geneIIIを含むことを特徴とする、単鎖可変領域フラグメント発現用ベクター。

【請求項 2 0】

geneIIIの上流に、単鎖可変領域フラグメントが可溶化する際に必要な配列を含むことを特徴とする、請求項 1 9 記載の、単鎖可変領域フラグメント発現用ベクター。

【請求項 2 1】

下記のステップを有することを特徴とする、ヒト及び齧歯類の両方のapoB蛋白質に対して特異性を有する抗体を製造する方法。

30

(ステップ1)ヒトの低密度リポ蛋白質を動物に免疫するステップ。

(ステップ2)ステップ1で免疫した動物の産生する抗体の、VH領域及びVL領域の遺伝子を得るステップ。

(ステップ3)ステップ2で得られたVH領域とVL領域の遺伝子の、複数の組み合わせからなる単鎖可変領域フラグメント遺伝子を製造するステップ。

(ステップ4)単鎖可変領域フラグメント遺伝子を、ファージミドベクターに組み込むステップ。

(ステップ5)ステップ4で得られたベクターを、宿主に導入するステップ。

(ステップ6)更にヘルパーファージを感染させるステップ。

40

(ステップ7)ファージディスプレイされたファージ抗体を製造するステップ。

(ステップ8)ステップ7で得られた抗体から、ヒト及び齧歯類の両方のapoB蛋白質に対して特異性を有する抗体を選択するステップ。

【請求項 2 2】

免疫する動物が、ニワトリであることを特徴とする、請求項 2 1 記載の方法。

【請求項 2 3】

請求項 2 1 又は 2 2 記載の方法で選択された抗体の、VH領域及び/又はVL領域に相当する遺伝子を、H鎖定常領域遺伝子の少なくとも一部及び/又はニワトリL鎖定常領域遺伝子を含むベクターに組み込み、動物細胞中で発現させる工程を含むことを特徴とする、ニワトリモノクローナル抗体の製造方法。

50

【請求項 2 4】

請求項 1 乃至 8 のいずれかに記載の抗体，又は請求項 1 4 乃至 1 6 のいずれかに記載の単鎖可変領域フラグメントを含むことを特徴とする、ヒト又は齧歯類のapoB蛋白質の検出用キット。

【請求項 2 5】

請求項 1 乃至 8 のいずれかに記載の抗体，又は請求項 1 4 乃至 1 6 のいずれかに記載の単鎖可変領域フラグメント，及びレクチン酸化低密度リポ蛋白質受容体 - 1 又はその誘導体を含むことを特徴とする、ヒト又は齧歯類の酸化低密度リポ蛋白質の検出用キット。

【請求項 2 6】

請求項 2 4 又は 2 5 記載のキットを用いることを特徴とする、ヒト又は齧歯類から抽出した生体成分中の、或いは齧歯類生体中の、apoB蛋白質，低密度リポ蛋白質，又は酸化低密度リポ蛋白質の検出方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本願発明は、ヒト及び齧歯類のapoB蛋白質に対して特異性を有する抗体，その材料物質（遺伝子，ポリペプチド等），当該抗体の製造方法，低密度リポ蛋白質（Low-density lipoprotein：LDL）や酸化低密度リポ蛋白質（oxLDL）の関与する疾患の、診断・分析等への利用が可能なapoB蛋白質，LDL，又はoxLDLの検出キット，及びそれらの検出方法等に関するものである。

20

【背景技術】

【0 0 0 2】

LDLは、1分子のapoB蛋白質と種々の脂質から構成される粒子で、血管を介して肝臓からの全身の細胞に、細胞膜やホルモンの合成に必要なコレステロールの運搬を担う蛋白質である。LDLは、いわゆる悪玉コレステロールと呼ばれるように、メタボリックシンドロームと密接な関係のある粒子である。

【0 0 0 3】

従って、ヒトのLDLの検出は、高脂血症をはじめとして、脳卒中，狭心症，心筋梗塞等の急性冠症候群（ACS：acute coronary syndrome）などの診断的意義があることから、極めて重要である。

30

【0 0 0 4】

現在、我が国の死亡原因の第2位は、心疾患，第3位は脳疾患であり、また糖尿病や慢性腎不全等の様々な疾患に伴って、アテローム性動脈硬化症が進行することから、循環器系疾患診断におけるLDL，中でも特に、oxLDLの検出の重要性が指摘されている。

【0 0 0 5】

従来、LDLの検出は、主として、総コレステロール値及び高密度リポ蛋白質（High-density lipoprotein：HDL）値から割り出されていた。

【0 0 0 6】

oxLDLの検出については、ヒトの場合、酸化フォスファチジルコリン特異的マウスモノクローナル抗体と、ヒトapoB蛋白質特異的ポリクローナル抗体による、サンドイッチELISAで行われてきた。

40

【0 0 0 7】

一方、病態モデル動物としては、マウス等の齧歯類が広く用いられているが、このような循環器系疾患のモデル動物の利用に際しても、酸化LDLの検出が必要となってくる。

【0 0 0 8】

ところが、マウスのapoBに対するモノクローナル抗体がなかなか開発されないという現状のため、マウスoxLDLやマウスLDLの確立された検出方法というものが無く、一部、マウスapoB蛋白質特異的ポリクローナル抗体が実験的に活用され始めているに過ぎない。

【0 0 0 9】

従って、高脂血症や動脈硬化その他の疾患モデルマウスにおいて、より正確なマウスapoB

50

の検出が可能なモノクローナル抗体の開発が望まれていた。

【0010】

ところで、近年、ニワトリの産生する抗体の多様性を利用して、哺乳類の産生する蛋白質に対する抗体を、効率的に得る方法が開発されている（特許文献1，非特許文献1）。

【0011】

これは、哺乳類由来の蛋白質は、他の哺乳類に免疫しても、免疫対象となる哺乳類が本来有する同種の蛋白質との相同性が高いため、抗体を産生できる可能性が低いのに対し、哺乳類由来蛋白質を、ニワトリに免疫すると、その相同性の低さにより、抗体を産生できる確率が高いことを利用するものである。

【0012】

しかも、ニワトリは、偽V遺伝子が機能的V遺伝子領域内部に移動する、いわゆる遺伝子変換（gene conversion）を起こすことから、多種多様な抗体が産生されることが知られており、特定の蛋白質に特異的に結合するモノクローナル抗体を数多くの候補抗体の中から効率的に探すのには適している。

【0013】

しかしながら、ニワトリ抗体でマウスのapoB蛋白質に対する抗体を得ようとする試みは、従来無かった。

【0014】

一方、遺伝子工学技術を用いて、組換抗体（リコンビナント抗体）を、ファージのコート蛋白質中に発現させる、いわゆるファージディスプレイという技術が開発されている（非特許文献2）。

【0015】

そして更に、抗体遺伝子から単離した、L鎖可変領域（VL領域）及びH鎖可変領域（VH領域）遺伝子をシャッフリングさせることによって、この2つの領域の多様な組合せである、一本鎖の遺伝子断片（single chain Fragment of variable region：scFv）を得、この一本鎖遺伝子をファージのコート蛋白質遺伝子と連結することによって、融合蛋白質としてファージ表面に発現させる方法が開発されている（非特許文献3）。

【0016】

本発明者等は、上記の方法に従って、ニワトリに、ヒトLDLを免疫し、産生された様々な抗体の、L鎖可変領域（VL領域）及びH鎖可変領域（VH領域）各々の遺伝子を取り出し、人工的に多数の組合せを産み出すことで、効率的に多数の新たなファージ抗体を製造した。そして、これら多数の抗体の中から選択した、“ヒトLDLに対して高い特異性を有する”抗体が、“ヒトoxLDLに対しても高い特異性を有する”こと、つまり、これらの抗体が、LDLやoxLDLに含まれる“apoB蛋白質に対する抗体”であることを見出し、更に、選ばれた抗体の中に、驚くべきことに、マウスやラット等の齧歯類のLDLに対しても高い特異性を有するものが存在することを見出し、本発明に到達した。

【0017】

これは、マウスのapoB蛋白質に対するモノクローナル抗体が、従来、どうしても取れなかったことから考えると、画期的な出来事であった。

【0018】

ヒトと齧歯類のapoB蛋白質のいずれにも特異性を有する抗体は、病態モデルでの検出結果をもとに、より正確なヒトの疾患の判断ができ、同じ診断キットで診断が可能となるため、非常に有意義な抗体である。

【0019】

【特許文献1】特開2005-278633号公報

【非特許文献1】FEMS Immunol. Med. Microbiol. 23, 189-194, 1999, Matsuda, H. et al.[A chicken monoclonal antibody with specificity for the N-terminal of human prion protein.]

【非特許文献2】Nature349,293-299(1991),Winter,G.,etal.

【非特許文献3】Journal of Molecular Biology, 222, 581-597(1991), Marks, J.D. et

10

20

30

40

50

al.

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0020】

従って、本発明の目的とするところは、ヒト及び齧歯類のapoB蛋白質のいずれにも特異性を有する抗体及びその利用方法等を提供するにある。

【課題を解決するための手段】

【0021】

上述の目的は、下記第一の発明乃至第二十六の発明によって達成される。

【0022】

第一の発明：H鎖及びL鎖の可変領域のうち少なくとも1つに、下記(I)及び/又は下記(II)を含むことを特徴とする、ヒト及び齧歯類のapoB蛋白質に対して特異性を有する抗体。

(I)配列番号1乃至6のいずれかで表されるポリペプチド、及びこれらの配列中の1乃至数個のアミノ酸が、置換、欠失、付加、挿入されたポリペプチド、からなる群から選択されるポリペプチド。

(II)配列番号7乃至12のいずれかで表されるポリペプチド、及びこれらの配列中の1乃至数個のアミノ酸が、置換、欠失、付加、挿入されたポリペプチドからなる群から選択されるポリペプチド。

【0023】

第二の発明：

(I)及び(II)の組合せが、下記(1)乃至(6)のいずれかであることを特徴とする、第一の発明に記載の抗体。

(1)配列番号1及び配列番号7

(2)配列番号2及び配列番号8

(3)配列番号3及び配列番号9

(4)配列番号4及び配列番号10

(5)配列番号5及び配列番号11

(6)配列番号6及び配列番号12

【0024】

第三の発明：

抗体が、ファージ抗体、ファージ抗体の可溶化フォーム、又はモノクローナル抗体であることを特徴とする、第一の発明又は第二の発明に記載の抗体。

【0025】

第四の発明：ファージ抗体、又はファージ抗体の可溶化フォーム中の、2つの可変領域の間に、ペプチドリンカーを有していることを特徴とする、第三の発明に記載の抗体。

【0026】

第五の発明：ペプチドリンカーが、(GGGS)₃ (配列番号31のペプチド)であることを特徴とする、第四の発明に記載の抗体。

【0027】

第六の発明：ニワトリ抗体のL鎖定常領域を含むことを特徴とする、第三乃至第五の発明のいずれかに記載の抗体。

【0028】

第七の発明：2つの可変領域が、ファージのコート蛋白質g3pとの融合蛋白質として発現していることを特徴とする、第四乃至第六の発明のいずれかに記載の抗体。

【0029】

第八の発明：抗体が、ニワトリ抗体のH鎖定常領域の少なくとも一部、及びL鎖定常領域を含むモノクローナル抗体であることを特徴とする、第三の発明に記載の抗体。

【0030】

第九の発明：第一乃至第八の発明のいずれかに記載の抗体をコードする遺伝子。

10

20

30

40

50

【0031】

第十の発明：下記(III)及び/又は下記(IV)を含むことを特徴とする、第九の発明に記載の遺伝子。

(III) 配列番号13乃至18からなる群から選択される遺伝子

(IV) 配列番号19乃至24からなる群から選択される遺伝子

【0032】

第十一の発明：配列番号1～12のいずれかで表されるポリペプチド、又はその配列中の1乃至数個のアミノ酸が、置換、欠失、付加、挿入されたポリペプチドを含むことを特徴とする、ヒト及び齧歯類のapoB蛋白質に対して特異性を有する抗体を製造するためのポリペプチド。

10

【0033】

第十二の発明：第十一の発明に記載のポリペプチドをコードする遺伝子。

【0034】

第十三の発明：配列番号13乃至24のいずれかの配列を含むことを特徴とする、第十二の発明に記載の遺伝子。

【0035】

第十四の発明：(I)及び(II)を含むことを特徴とする、単鎖可変領域フラグメント。

(I) 配列番号1乃至6のいずれかで表されるポリペプチド、及びこれらの配列中の1乃至数個のアミノ酸が、置換、欠失、付加、挿入されたポリペプチド、からなる群から選択されるポリペプチド。

20

(II) 配列番号7乃至12のいずれかで表されるポリペプチド、及びこれらの配列中の1乃至数個のアミノ酸が、置換、欠失、付加、挿入されたポリペプチドからなる群から選択されるポリペプチド。

【0036】

第十五の発明：(I)と(II)の間に、ペプチドリンカーを有していることを特徴とする、第十四の発明に記載の単鎖可変領域フラグメント。

【0037】

第十六の発明：ペプチドリンカーが、(GGGG)₃(配列番号31のペプチド)であることを特徴とする、第十五の発明に記載の、単鎖可変領域フラグメント。

【0038】

第十七の発明：第十四乃至第十六の発明のいずれかに記載の単鎖可変領域フラグメントをコードする遺伝子。

30

【0039】

第十八の発明：配列番号25乃至30のいずれかの配列を含むことを特徴とする、第十七の発明に記載の単鎖可変領域フラグメントをコードする遺伝子。

【0040】

第十九の発明：第十七又は第十八の発明に記載の単鎖可変領域フラグメントをコードする遺伝子、ニワトリ抗体のL鎖定常領域Cをコードする遺伝子、ファージのコート蛋白g3pをコードする遺伝子geneIIIを含むことを特徴とする、単鎖可変領域フラグメント発現用ベクター。

40

【0041】

第二十の発明：geneIIIの上流に、単鎖可変領域フラグメントが可溶化する際に必要な配列を含むことを特徴とする、第十九の発明に記載の、単鎖可変領域フラグメント発現用ベクター。

【0042】

第二十一の発明：下記のステップを有することを特徴とする、ヒト及び齧歯類の両方のapoB蛋白質に対して特異性を有する抗体を製造する方法。

(ステップ1) ヒトの低密度リポ蛋白質を動物に免疫するステップ。

(ステップ2) ステップ1で免疫した動物の産生する抗体の、VH領域及びVL領域の遺伝子を得るステップ。

50

(ステップ3) ステップ2で得られたVH領域とVL領域の遺伝子の、複数の組み合わせからなる単鎖可変領域フラグメント遺伝子を製造するステップ。

(ステップ4) 単鎖可変領域フラグメント遺伝子を、ファージミドベクターに組み込むステップ。

(ステップ5) ステップ4で得られたベクターを、宿主に導入するステップ。

(ステップ6) 更にヘルパーファージを感染させるステップ。

(ステップ7) ファージディスプレイされたファージ抗体を製造するステップ。

(ステップ8) ステップ7で得られた抗体から、ヒト及び齧歯類の両方のapoB蛋白質に対して特異性を有する抗体を選択するステップ。

【0043】

第二十二の発明：免疫する動物が、ニワトリであることを特徴とする、第二十一の発明に記載の方法。

【0044】

第二十三の発明：第二十一又は第二十二の発明に記載の方法で選択された抗体の、VH領域及び/又はVL領域に相当する遺伝子を、H鎖定常領域遺伝子の少なくとも一部及び/又はニワトリL鎖定常領域遺伝子を含むベクターに組み込み、動物細胞中で発現させる工程を含むことを特徴とする、ニワトリモノクローナル抗体の製造方法。

【0045】

第二十四の発明：第一乃至第八の発明のいずれかに記載の抗体、又は第十四乃至第十六の発明のいずれかに記載の単鎖可変領域フラグメントを含むことを特徴とする、ヒト又は齧歯類のapoB蛋白質の検出用キット。

【0046】

第二十五の発明：第一乃至第八の発明のいずれかに記載の抗体、又は第十四乃至第十六の発明のいずれかに記載の単鎖可変領域フラグメント、及びレクチン酸化低密度リボ蛋白質受容体-1(LOX-1)又はその誘導体を含むことを特徴とする、ヒト又は齧歯類のoxLDLの検出用キット。

【0047】

第二十六の発明：第二十四又は第二十五の発明に記載のキットを用いることを特徴とする、ヒト又は齧歯類から抽出した生体成分中の、或いは齧歯類生体中の、apoB蛋白質又はoxLDLの検出方法。

【発明の効果】

【0048】

本発明の遺伝子を発現させたポリペプチド又は本発明のポリペプチド或いは本発明の抗体は、ヒトと齧歯類の両方のapoB蛋白質に対して特異性を有するため、ヒト疾患の試験と疾患モデルによる実験のいずれにおいても、apoB蛋白質の検出系を構築する等して、活用することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0049】

[本発明の抗体(第一の発明~第八の発明)]

本発明のヒト及び齧歯類のapoB蛋白質に対して特異性を有する抗体は、H鎖及びL鎖の可変領域のうち少なくとも1つに、下記(I)及び/又は下記(II)を含むことを特徴としている。

【0050】

下記(I)、(II)は、H鎖及びL鎖のいずれの可変領域に用いても良いが、(I)をVH鎖とし、(II)鎖をVL鎖とすることが好ましい。

また、H鎖及びL鎖の可変領域の一方が、(I)又は(II)であれば良いが、両方とも(I)又は(II)から選択されることが好ましく、その際には、一方が(I)であれば、他方は(II)から、逆に一方が(II)であれば、他方は(I)からというように、別のグループから選択することが好ましい。

【0051】

10

20

30

40

50

(I) 配列番号 1 乃至 6 のいずれかで表されるポリペプチド，及びこれらの配列中の 1 乃至数個のアミノ酸が、置換，欠失，付加，挿入されたポリペプチド，からなる群から選択されるポリペプチド。

【 0 0 5 2 】

(II) 配列番号 7 乃至 12 のいずれかで表されるポリペプチド，及びこれらの配列中の 1 乃至数個のアミノ酸が、置換，欠失，付加，挿入されたポリペプチドからなる群から選択されるポリペプチド。

【 0 0 5 3 】

上記で、1 乃至数個のアミノ酸が、置換，欠失，付加，挿入されたポリペプチドとしては、例えば、配列番号 10 の、6、10、11、14、17、35、40、43、62、66、67、91 番目のアミノ酸が、変化している配列番号 12 が、程度の差こそあれ、同様の特異性を得ていることから考えて（図 2 のファージ抗体 # 20（配列番号 4 と 10 のポリペプチドを含む）のデータ，及びファージ抗体 # 24（配列番号 6 と 12 のポリペプチドを含む）のデータ参照）、少なくとも、これらの位置については、他のアミノ酸に置換しても良いと考えられる。

10

【 0 0 5 4 】

特に、これらの置換されたアミノ酸のうち、下記のポジションで変化した前後のアミノ酸には、それぞれ、

各ポジションでのアミノ酸の特徴（類似点）

- 10（共に疎水性アミノ酸）
- 11（共に極性・無電荷アミノ酸）
- 40（共に疎水性アミノ酸）
- 43（共に疎水性アミノ酸）
- 62（共に極性・無電荷アミノ酸）
- 67（共に極性・無電荷アミノ酸）
- 91（共に疎水性アミノ酸）

20

等の共通点が見られることから、これらのポジションにおける極性や電荷等の性質が類似するアミノ酸への置換であれば、これ以外の置換でも、同様の特異性が得られると考えられる。

【 0 0 5 5 】

(I) 及び (II) の組合せとしては、下記 (1) 乃至 (6) のいずれかが好ましい。

30

（尚、下記で、# とは、ファージ抗体を表し、HUC とはモノクローナル抗体を表す。）

- (1) 配列番号 1 及び配列番号 7（下記実施例 1 の # 2，実施例 2 の HUC 2）
- (2) 配列番号 2 及び配列番号 8（下記実施例 1 の # 7，実施例 2 の HUC 7）
- (3) 配列番号 3 及び配列番号 9（下記実施例 1 の # 16，実施例 2 の HUC 16）
- (4) 配列番号 4 及び配列番号 10（下記実施例 1 の # 20，実施例 2 の HUC 20）
- (5) 配列番号 5 及び配列番号 11（下記実施例 1 の # 22，実施例 2 の HUC 22）
- (6) 配列番号 6 及び配列番号 12（下記実施例 1 の # 24，実施例 2 の HUC 24）

【 0 0 5 6 】

尚、上記の配列番号 1 ~ 12 のポリペプチドを発現させるための遺伝子配列としては、特に限定されないが、例えば、配列番号 13 ~ 24 の配列を有する遺伝子等が具体的な例として挙げられ、これらをベースに、一部の塩基を同じアミノ酸をコードする塩基と置換したも等であっても良い。

40

また、配列番号 1 ~ 12 のポリペプチドの変異体を発現させるための遺伝子配列としては、同様に、配列番号 13 ~ 24 の配列を有する遺伝子等をベースとして、ポリペプチドに起こっている変異に対応するような塩基に置換すれば良い。

【 0 0 5 7 】

本発明において、齧歯類とは、例えばマウス，ラット，ウサギ，ハムスター，モルモットなどを意味する。

【 0 0 5 8 】

50

本発明において、ヒト及び齧歯類のapoB蛋白質に対して特異性を有する抗体としては、ファージ抗体、ファージ抗体の可溶化フォーム、モノクローナル抗体等が含まれる。

以下、各々の抗体について、詳細に説明する。

【0059】

(A) 本発明のファージ抗体

(1) 本発明のファージ抗体の基本構成

ファージ抗体とは、抗体のH鎖及びL鎖の2つの可変領域を一本鎖として有するscFv (single chain Fragment of variable region) が、ファージのコート蛋白質との融合蛋白質として、ファージ粒子表面に発現しているものを言う。

本発明のファージ抗体の構成要素であるscFvは、後述の本発明のscFv遺伝子によって発現させることができる。

【0060】

(2) ペプチドリンカー

本発明のファージ抗体に含まれるscFvは、VH領域とVL領域の2つの可変領域を含んでいれば良いが、更に、この間に、ペプチドリンカーを含んでいることが好ましい。

融合蛋白質として、ファージ粒子表面に発現した際に、VH領域とVL領域が、有る程度離れおり、立体構造上、自由度がある方が、それぞれの抗原認識部位が、ヒト又は齧歯類のapoB蛋白質と結合し易いからである。

【0061】

ペプチドリンカーとしては、有る程度の長さを有し、それ自体がVH領域、VL領域、その他の抗体中の配列と相互作用しないものであれば、特に限定されないが、例えば、5～20アミノ酸が好ましい。

Argを導入したものなど、様々なリンカーペプチドが開発されているが、好ましいのは、GSリンカーと呼ばれる(GGGGS)₃ (配列番号31のペプチド)である。

尚、ペプチドリンカーとVL鎖との間に、更に、例えばAsp-Val等のような、数個のアミノ酸からなるスペーサーを有していても良い。

【0062】

尚、VH領域とVL領域の間にペプチドリンカーが組み込まれたファージ抗体は、ファージ抗体を製造する遺伝子において、VH遺伝子とVL遺伝子の間に、ペプチドリンカー(及び必要に応じて、上記のスペーサー)に相当する遺伝子を組み込むことによって製造することができる。

【0063】

(3) 検出用タグ(C)

本発明のファージ抗体は、更に、ニワトリ抗体のL鎖定常領域(C)を含んでいることが好ましい。VH鎖とVL鎖の組合せだけでも、抗原となるヒト及び齧歯類のapoB蛋白質との特異性は有するが、Cを含んでいれば、公知のC認識抗体(抗ニワトリIgY抗体等)を用いて、「apoB蛋白質と結合したファージ抗体」を検出することができ、Cが、いわゆる検出用タグの役割を果たすからである。

【0064】

ニワトリ抗体のL鎖定常領域(C)は、正常ニワトリ脾細胞から合成したcDNAをもとにPCRでニワトリC鎖を増幅させることによって、製造することができる。

【0065】

Cの組み込み位置は、VL鎖の後、即ち、scFvの後が好ましい。

【0066】

尚、scFvの後にCが組み込まれたファージ抗体は、ファージ抗体を製造する遺伝子において、scFv遺伝子の後に、C遺伝子を組み込むことによって製造することができる。

【0067】

(4) VH鎖とVL鎖の順序

VH鎖とVL鎖の順序は必ずしも限定されないが、VL鎖には、上述の通り、Cを連結しておくことが好ましい為、その場合には、VH鎖とVL鎖の間隔が開きすぎないように、まずVH鎖

10

20

30

40

50

にペプチドリンカー（及び必要に応じて、スパーサー）をつなぎ、その後、VL鎖（及びC）を繋ぐのが好ましい。

【0068】

（5）コート蛋白質

本発明のファージ抗体は、2つの可変領域が、ファージのコート蛋白質との融合蛋白質として発現していることが好ましい。

このコート蛋白質は、当該コート蛋白質をコードする遺伝子を、本発明の抗体を発現する遺伝子に組み込むことで、発現させることができる。

【0069】

組み込む位置は、例えば図8で表される通り、scFv遺伝子の後であれば良いが（図中、geneIIIで表されているのが、後述するコート蛋白質g3pの遺伝子である。）、ファージ抗体がCを含む場合には、Cの後が好ましい。

10

【0070】

コート蛋白質としては、g3pの他、g6g、g7p、g8p、g9p等が挙げられ、g3pやg8pが好ましく用いられる。比較的弱い特異性のファージ抗体で良い場合には、1個のファージ当たり、約3000分子の融合蛋白質を発現できるg8pの遺伝子を用いることができるが、強い特異性を有するファージ抗体だけを選抜したい場合には、1個のファージに5分子しか発現しないため融合蛋白質も1～5分子しか発現しない、g3pの遺伝子（geneIII）を用いることが好ましい。

【0071】

本発明のファージ抗体は、scFv遺伝子を、これらのコート蛋白質遺伝子と結合させておくことによって、コート蛋白質との融合蛋白質として、scFvを、ファージ粒子の表面に発現させることができるのである。

20

【0072】

（6）本発明のファージ抗体の用途

本発明のファージ抗体は、それ自体、検出用キット等の材料等として、ヒト及び齧歯類のいずれのapoB蛋白質の検出にも用いることができる他、ヒト及び齧歯類のapoB蛋白質に対する特異性を有するモノクローナル抗体を製造する際の、VH鎖及びVL鎖の好ましい組合せの選択用モデルとして用いることができる。

【0073】

また、実際にモノクローナル抗体を製造する際に、ファージ抗体に含まれる遺伝子を鋳型として、適当なプライマーを選択したPCR法等を用いることにより、モノクローナル抗体用の、VH鎖遺伝子、L鎖（完全長）遺伝子を増幅することもできる。

30

【0074】

（7）本発明のファージ抗体の製造方法

本発明のファージ抗体は、公知のファージ抗体の製造方法によって製造することができるが、例えば次のようにして、製造することができる。

【0075】

まず、後述する本発明のscFv遺伝子を、ファージのコート蛋白質遺伝子が予め組み込まれたプラスミドに組み込み、ファージミドベクターを製造する。

40

【0076】

尚、ファージミドベクターは、例えば公知のプラスミドpPDS内のマウスC鎖を、ニワトリC鎖に置換したプラスミドに、scFv遺伝子を導入することによって、製造することができる。

【0077】

次に、ファージミドベクターを、大腸菌等に感染させ形質転換した後、ヘルパーファージを、当該大腸菌に感染させる。ヘルパーファージとは、感染に必要なg3pおよびファージの形態形成に必要な残りの蛋白質を供給できるファージであり、scFvとg3pとの融合蛋白質とともにファージ粒子を形成する。

【0078】

50

ヘルパーファージとしては、VCSM13 (STRATAGENE社製), ExAssist (STRATAGENE社製)その他の、公知のものを用いることが出来るが、VCS M13が好ましいものとして挙げられる。

【0079】

これによって、表面に、コート蛋白質との融合蛋白質としてscFvが発現されたファージ粒子が完成し、これがファージ抗体となる。

【0080】

(B) 本発明のファージ抗体の可溶化フォーム

(1) 本発明のファージ抗体の可溶化フォームの基本構成

ファージ抗体の可溶化フォームとは、scFv及びC 蛋白質が、ファージのコート蛋白質から遊離して、可溶化されたものである。

10

【0081】

(2) 本発明のファージ抗体の可溶化フォームの製造方法

ファージ抗体の可溶化フォームは、上記の、scFv発現ベクターの、C 鎖遺伝子とgeneII Iの間に、例えばTAG(アンバー配列)等のストップコドン挿入しておくことによって、製造することができる。

このようなベクターとしておくことによって、通常はsup Eの大腸菌株を用いることによりファージディスプレイ抗体を発現するが、例えば大腸菌 SOLR(Stratagene社)あるいはHB2151等の、ノンプレッサー大腸菌等で培養すれば、培養上清や培養菌体中に、可溶型抗体が分泌させることができる。

20

【0082】

可溶化フォームを分泌させる際の培養条件としては、大腸菌において、蛋白質を発現させる際の、一般的な条件で良く、例えば、蛋白質を発現させる際に用いられるIPTG(イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド)等を添加したLB培地等を用い、通常の培養温度より低めの30 前後で行うことができる。

【0083】

(3) 本発明のファージ抗体の可溶化フォームの用途

本発明のファージ抗体の可溶化フォームは、上述の本発明のファージ抗体と同様、それ自体、検出用キット等の材料等として、ヒト及び齧歯類のapoB蛋白質のいずれの検出にも用いることができる他、ヒト及び齧歯類のapoB蛋白質に対する特異性を有するモノクローナル抗体を製造する際の、VH鎖及びVL鎖の好ましい組合せの選択用モデルとして用いることができる。

30

【0084】

(C) 本発明のモノクローナル抗体

(1) 本発明のモノクローナル抗体の基本構成

本発明のモノクローナル抗体は、H鎖及びL鎖の可変領域のうち少なくとも1つに、上記の(1)及び/又は下記(II)を含むものである。

【0085】

(2) 定常領域

本発明のモノクローナル抗体は、更に定常領域として、ニワトリ抗体のH鎖定常領域の少なくとも一部、及びL鎖定常領域を含んでいることが好ましい。

40

【0086】

H鎖定常領域の少なくとも一部とは、例えば、H鎖のC末端側から7アミノ酸欠失するようにデザインされた領域(7aa-H鎖)、H鎖のCH2領域のシステイン残基を残して55アミノ酸残基を欠失するようにデザインされた領域(CH2-H鎖)、H鎖のCH3領域とCH4領域をともに欠失するようにデザインされた領域(Fc-H鎖)等が挙げられる。

【0087】

これらは、哺乳類のIgGより分子量が大きいニワトリ抗体分子を、哺乳類中の蛋白質の検出等に、より有効に利用するため、不必要なアミノ酸領域を削除あるいは改変して、哺乳類のIgGの分子量に近づけたものである。

【0088】

50

このようなH鎖定常領域を削除あるいは改変したモノクローナル抗体は、例えば、特許文献1（特開2005-278633号公報）に記載の方法に従い、目的とするモノクローナル抗体のH鎖用のプライマーを設計し、これを用いてPCR増幅する方法によって、製造することができる。

【0089】

(3) 本発明のモノクローナル抗体の用途

本発明のモノクローナル抗体は、上述の本発明のファージ抗体等と同様、それ自体、検出用キット等の材料等として、ヒト及び齧歯類のapoB蛋白質のいずれの検出にも用いることができる。

【0090】

(4) 本発明のモノクローナル抗体の製法

本発明のモノクローナル抗体は、例えばファージ抗体を鋳型として増幅した、VH鎖遺伝子やVL鎖遺伝子を、公知のニワトリ抗体を鋳型として得られた、モノクローナル抗体に必要な他の領域の遺伝子を含むプラスミドベクターに導入し、各々のベクターを適当な動物細胞中で、発現させること等によって、製造することができるが、本発明の可変領域と、公知の抗体の定常領域とを用いる場合には、全配列が分かっているため、遺伝子組み換え技術や、アミノ酸の結合技術等によって、目的とする抗体を、遺伝子から、あるいはポリペプチド自体を、人工的に合成することもできる。

【0091】

[本発明の抗体をコードする遺伝子（抗体遺伝子）（第九の発明～第十の発明）]

(1) 本発明の抗体をコードする遺伝子の構成

本発明の抗体をコードする遺伝子は、配列は特に限定されず、また、必要な遺伝子が、例えば、H鎖とL鎖が、別のプラスミド中に存在する等、1つの遺伝子中に存在していなくても良い。

【0092】

本発明の抗体をコードする遺伝子としては、具体的には、例えば、下記(III)及び/又は下記(IV)を含むものが挙げられる。

【0093】

下記(III)、(IV)は、H鎖可変領域及びL鎖可変領域のいずれの遺伝子として用いても良いが、(III)をVH鎖用遺伝子とし、(IV)鎖をVL鎖用遺伝子とすることが好ましい。

【0094】

(III) 配列番号13乃至18からなる群から選択される遺伝子

(IV) 配列番号19乃至24からなる群から選択される遺伝子

【0095】

ここで、配列番号13, 14, 15, 16, 17, 18で表される遺伝子は、それぞれ、配列番号1, 2, 3, 4, 5, 6で表されるポリペプチドに対応し、配列番号19, 20, 21, 22, 23, 24で表される遺伝子は、それぞれ、配列番号7, 8, 9, 10, 11, 12で表されるポリペプチドに対応するものである。

【0096】

中でも、下記の(III)及び(IV)の組合せを含む遺伝子が、好ましい。

【0097】

配列番号13, 19

配列番号14, 20

配列番号15, 21

配列番号16, 22

配列番号17, 23

配列番号18, 24

【0098】

(2) 本発明の抗体をコードする遺伝子の製造方法

上記の本発明の抗体をコードする遺伝子は、天然又は合成した抗体のmRNAから、RT-PCR

10

20

30

40

50

等で、cDNAとして得る方法，天然の抽出遺伝子から適当なプローブを用いて選択する方法，遺伝子組み換え技術を用いて、天然からの抽出遺伝子を改変する方法，又は一から人工的に合成する方法等によって得ることができる。

本発明において、遺伝子とは、DNA，RNAの他、これらのハイブリッドも含まれ、一本鎖，二本鎖のものも含まれる。

【0099】

[本発明のポリペプチド(第十一の発明)]

(1)本発明のポリペプチドの構成

本発明の、ヒト及び齧歯類のapoB蛋白質に対して特異性を有する抗体を製造する材料となりうるポリペプチドは、配列番号1～12のいずれかで表されるポリペプチド，又はその配列中の1乃至数個のアミノ酸が、置換，欠失，付加，挿入されたポリペプチドを含むことを特徴とするものである。

10

【0100】

このうち、配列番号1乃至6のいずれかで表されるポリペプチド，及びこれらの配列中の1乃至数個のアミノ酸が、置換，欠失，付加，挿入されたポリペプチド，からなる群から選択されるポリペプチドは、主に、抗体のVH鎖を形成するために好ましく用いられ、配列番号7乃至12のいずれかで表されるポリペプチド，及びこれらの配列中の1乃至数個のアミノ酸が、置換，欠失，付加，挿入されたポリペプチドからなる群から選択されるポリペプチドは、主に、抗体のVL鎖を形成するために好ましく用いられるが、VH鎖とVL鎖が逆であっても構わない。

20

【0101】

上記で、1乃至数個のアミノ酸が、置換，欠失，付加，挿入されたポリペプチドとしては、例えば、配列番号10の、6、10、11、14、17、35、40、43、62、66、67、91番目のアミノ酸が、変化している配列番号12が、程度の差こそあれ、同様の特異性を得ていることから考えて、少なくとも、これらの位置については、他のアミノ酸に置換しても良いと考えられる。

【0102】

特に、これらのポジションで変化した前後のアミノ酸には、それぞれ、下記のような、各ポジションでのアミノ酸の特徴(類似点)等の共通点が見られることから、極性や電荷等の性質が類似するアミノ酸への置換が好ましいと考えられる。

30

【0103】

- 10(共に疎水性アミノ酸)
- 11(共に極性・無電荷アミノ酸)
- 40(共に疎水性アミノ酸)
- 43(共に疎水性アミノ酸)
- 62(共に極性・無電荷アミノ酸)
- 67(共に極性・無電荷アミノ酸)
- 91(共に疎水性アミノ酸)

【0104】

上記のポリペプチドから、VH鎖及びVL鎖を選択して、抗体に用いる場合、次の組み合わせが好ましい。

40

【0105】

- (1)配列番号1及び配列番号7(下記実施例1の#2，実施例2のHUC2)
- (2)配列番号2及び配列番号8(下記実施例1の#7，実施例2のHUC7)
- (3)配列番号3及び配列番号9(下記実施例1の#16，実施例2のHUC16)
- (4)配列番号4及び配列番号10(下記実施例1の#20，実施例2のHUC20)
- (5)配列番号5及び配列番号11(下記実施例1の#22，実施例2のHUC22)
- (6)配列番号6及び配列番号12(下記実施例1の#24，実施例2のHUC24)

【0106】

(2)本発明のポリペプチドの製造方法

50

本発明のポリペプチドは、アミノ酸を酵素的に結合させるペプチド合成方法によっても製造することができるが、後述する本発明のポリペプチドをコードする遺伝子から発現させることができ、例えば当該遺伝子を、抗体用のベクターに組み込むことによって、発現させることができる。

【0107】

(3) 本発明のポリペプチドの用途

本発明のポリペプチドは、ヒト及び齧歯類のapoB蛋白質に対する特異性を利用して、上述の本発明の抗体の材料として、あるいはそれ自身で、apoB蛋白質の選択用のツールとして用いることも可能である。

【0108】

[本発明の遺伝子(ポリペプチド遺伝子)(第十二の発明~第十三の発明)]

(1) 本発明の、“ヒト及び齧歯類のapoB蛋白質に対して特異性を有する抗体を製造するためのポリペプチド”をコードする遺伝子は、配列は特に限定されないが、具体的には、例えば、配列番号13乃至24のいずれかの配列を含む遺伝子等が挙げられる。

【0109】

ここで、配列番号13, 14, 15, 16, 17, 18で表される遺伝子は、それぞれ、配列番号1, 2, 3, 4, 5, 6で表されるポリペプチドに対応し、配列番号19, 20, 21, 22, 23, 24で表される遺伝子は、それぞれ、配列番号7, 8, 9, 10, 11, 12で表されるポリペプチドに対応するものである。

【0110】

(2) 本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の製造方法

上記の本発明のポリペプチドをコードする遺伝子は、天然又は合成した抗体のmRNAから、RT-PCR等で、cDNAとして得る方法、天然の抽出遺伝子から適当なプローブを用いて選択する方法、遺伝子組み換え技術を用いて、天然からの抽出遺伝子を改変する方法、又は一から人工的に合成する方法等によって得ることができる。

【0111】

(3) 本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の用途

本発明のポリペプチドをコードする遺伝子は、ヒト及び齧歯類のapoB蛋白質に対する特異性を有する、上述の本発明の抗体の材料として用いられる。

【0112】

[本発明の単鎖可変領域フラグメント(scFv)(第十四の発明~第十六の発明)]

【0113】

(1) 本発明のscFvの構成

本発明のscFvは、下記(I)及び(II)を含むことを特徴とするものである。

【0114】

(I) 配列番号1乃至6のいずれかで表されるポリペプチド、及びこれらの配列中の1乃至数個のアミノ酸が、置換、欠失、付加、挿入されたポリペプチド、からなる群から選択されるポリペプチド。

(II) 配列番号7乃至12のいずれかで表されるポリペプチド、及びこれらの配列中の1乃至数個のアミノ酸が、置換、欠失、付加、挿入されたポリペプチドからなる群から選択されるポリペプチド。

【0115】

(2) ペプチドリンカー

本発明のscFvは、VH領域とVL領域の2つの可変領域を含んでいれば良いが、scFvがファージ抗体に用いられる際には、更に、これらの間に、ペプチドリンカーを含んでいることが好ましい。

融合蛋白質として、ファージ粒子表面に発現した際に、VH領域とVL領域が、有る程度離れおり、立体構造上、自由度がある方が、それぞれの抗原認識部位が、ヒト又は齧歯類のapoB蛋白質と結合し易いからである。

【0116】

10

20

30

40

50

ペプチドリンカーとしては、上述のファージ抗体のところで説明した通り、有る程度の長さを有し、それ自体がVH領域、VL領域、その他の抗体中の配列と相互作用しないものであれば、特に限定されないが、例えば、5～20アミノ酸が好ましい。

Argを導入したものなど、様々なリンカーペプチドが開発されているが、好ましいのは、GSRリンカーと呼ばれる(GGGGS)₃(配列番号31のペプチド)である。

尚、ペプチドリンカーとVL鎖との間に、更に、例えばAsp-Val等のような、数個のアミノ酸からなるスペーサーを有していても良い。

【0117】

(3) 本発明のscFvの製造方法

本発明のscFvは、アミノ酸を酵素的に結合させるペプチド合成方法によっても製造することができるが、後述する本発明のscFvをコードする遺伝子から発現させることができ、例えば当該遺伝子を、scFv発現用のベクターに組み込むことによって、発現させることができる。

尚、VH領域とVL領域の間にペプチドリンカー(及び必要に応じてスペーサー)が組み込まれたscFvは、scFvをコードする遺伝子において、VH遺伝子とVL遺伝子の間に、ペプチドリンカー(及びスペーサー)に相当する遺伝子を組み込むことによって製造することができる。

【0118】

本発明のscFvは、ペプチド合成の他、後述の遺伝子から製造することができる。

【0119】

(4) 本発明のscFvの用途

本発明のscFvは、本発明の抗体の材料として用いることができる。

【0120】

[本発明のscFvをコードする遺伝子(第十七の発明～第十八の発明)]

scFvをコードする遺伝子としては、特に限定されないが、例えば、配列番号25乃至30のいずれかの配列を含むことを特徴とする遺伝子等が挙げられる。

配列番号25(実施例1の#2の遺伝子)

配列番号26(実施例1の#7の遺伝子)

配列番号27(実施例1の#16の遺伝子)

配列番号28(実施例1の#20の遺伝子)

配列番号29(実施例1の#242の遺伝子)

配列番号30(実施例1の#24の遺伝子)

【0121】

[本発明のscFv発現ベクター(第十九の発明～第二十の発明)]

(1) 本発明のscFv発現ベクターの構成

本発明のscFv発現ベクターは、上記本発明のscFvをコードする遺伝子、C 遺伝子、gene IIIを含むことを特徴とするものである。

尚、ファージ抗体の可溶化フォームを製造する場合には、gene IIIの上流に、scFvの可溶化に必要な配列として、例えばTAG(アンバー配列)等を導入する。

【0122】

尚、このscFv発現ベクターは、ファージ粒子の構成に必要な遺伝子の全てを有している訳では無いので、ファージミドベクターに属し、後述する様に、ヘルパーファージとともに用いる必要がある。

【0123】

(2) フレームとなるプラスミド

本発明のscFv発現ベクターは、プラスミド等を基本枠として、上記の必須構成成分の遺伝子を組み込むことによって製造できる。

【0124】

プラスミドとしては、公知のものを用い、適当な遺伝子と置換する等して用いることができる。

10

20

30

40

50

例えば、公知のpPDS中の、C 遺伝子を、C 遺伝子に置き換えたものを使用できる。

【0125】

(3) 本発明のscFv発現ベクターの製造方法

上記の基本となるプラスミドに、適当な制限酵素等を利用して、上記のscFv遺伝子、C 遺伝子、geneIIIを組み込むことによって製造することができる。

【0126】

例えば、上記のpPDS中の、C 遺伝子を、C 遺伝子に置き換えたプラスミド等が挙げられる(以下、このベクターを「pLPDS」と記載することがある。)。

【0127】

このscFv発現ベクター(pLPDS)は、例えば、図8の模式図で表される(図8は、pLPDSに、scFvを組み込んだものである)。

10

【0128】

(4) 本発明のscFv発現ベクターの用途

本発明のscFv発現ベクターは、本発明のファージ抗体を製造するための材料として用いることができる。

【0129】

(5) 本発明のscFv発現ベクターの使用法

本発明のscFv発現ベクターを、サプレッサーを持つ宿主菌株に形質転換した後、当該宿主細胞に更にヘルパーファージを導入することによって、scFvがコート蛋白質(g3p等)との融合蛋白質としてファージ表面に発現された(ファージディスプレイ)、ファージ粒子(ファージ抗体)を製造することができる。

20

【0130】

サプレッサーを持つ菌株としては、大腸菌XLI-Blue等が、挙げられる。

【0131】

ヘルパーファージとしては、VCSM13 (STRATAGENE社製)、ExAssist (STRATAGENE社製)その他の、公知のものを用いることが出来るが、VCS M13が好ましいものとして挙げられる。

【0132】

[本発明のファージ抗体の製造方法(第二十一の発明~第二十二の発明)]

本発明の、ヒト及び齧歯類の両方のapoB蛋白質に対して特異性を有する抗体を製造する方法は、以下の様なステップを有する方法によって、実施することができる。

30

【0133】

(ステップ1) ヒトのLDLを動物に免疫するステップ。

(ステップ2) ステップ1で免疫した動物の産生する抗体の、VH領域及びVL領域の遺伝子を得るステップ。

(ステップ3) ステップ2で得られたVH領域とVL領域の遺伝子の、複数の組み合わせからなる単鎖可変領域フラグメント遺伝子を製造するステップ。

(ステップ4) 単鎖可変領域フラグメント遺伝子を、ファージミドベクターに組み込むステップ。

(ステップ5) ステップ4で得られたベクターを、宿主に導入するステップ。

(ステップ6) 更にヘルパーファージを感染させるステップ。

40

(ステップ7) ファージディスプレイされてファージ抗体を製造するステップ。

(ステップ8) ステップ7で得られた抗体から、ヒト及び齧歯類の両方のapoB蛋白質に対して特異性を有する抗体を選択するステップ。

【0134】

上記のステップは、必ずしも、この数字の順番に行わなければならないというものではなく、例えば、ステップ5とステップ6を入れ替えることは可能である。

【0135】

ステップ1において、ヒトLDLを免疫する動物としては、ニワトリが好ましい。

【0136】

ステップ8において、特定の特異性を有する抗体だけを選択する方法として、パニング選

50

択という方法が挙げられる。

このパニング選択とは、複数のファージ抗体から、標的蛋白質に対するファージを選別する操作であるが、基本的には、固定化した標的蛋白質に、ファージ抗体群を反応させ、結合しなかったファージを洗浄により除去し、結合したファージだけを溶出して大腸菌に感染させて増殖させる、という操作を、数回繰り返す事によって、標的蛋白質だけに特異性を有するファージを濃縮する方法である。

【 0 1 3 7 】

[本発明のモノクローナル抗体の製造方法 (第二十三の発明)]

(1) 本発明のモノクローナル抗体の製造に用いられる構成要素

本発明のモノクローナル抗体は、上記の方法によって選抜されたファージ抗体に含まれるVH鎖とVL鎖の組合せを、モノクローナル抗体のVH鎖及びVL鎖として有するものである。具体的なVH鎖及びVL鎖としては、例えば、下記(I) 及び / 又は下記(II) 等が挙げられる。

10

【 0 1 3 8 】

下記(I) , (II) は、H鎖及びL鎖のいずれの可変領域に用いても良いが、(I) をVH鎖とし、(II) 鎖をVL鎖とすることが好ましい。

【 0 1 3 9 】

(I) 配列番号 1 乃至 6 のいずれかで表されるポリペプチド、及びこれらの配列中の 1 乃至数個のアミノ酸が、置換、欠失、付加、挿入されたポリペプチド、からなる群から選択されるポリペプチド。

20

(II) 配列番号 7 乃至 1 2 のいずれかで表されるポリペプチド、及びこれらの配列中の 1 乃至数個のアミノ酸が、置換、欠失、付加、挿入されたポリペプチドからなる群から選択されるポリペプチド。

が挙げられ、(I) 及び(II) の好ましい組合せとしては、下記(1) 乃至(6) のいずれかである。

【 0 1 4 0 】

(1) 配列番号 1 及び配列番号 7

(2) 配列番号 2 及び配列番号 8

(3) 配列番号 3 及び配列番号 9

(4) 配列番号 4 及び配列番号 1 0

30

(5) 配列番号 5 及び配列番号 1 1

(6) 配列番号 6 及び配列番号 1 2

【 0 1 4 1 】

(2) VH領域又はVL領域遺伝子の、ベクターへの導入

本発明のモノクローナル抗体は、上記で選抜したファージ抗体の遺伝子と同じ配列を有する遺伝子を、公知のニワトリ抗体の定常領域遺伝子を含む、プラスミド等のようなベクターに組み込み、CHO細胞等の動物細胞中で発現させることによって製造されるが、VH、VL、CH、CLとして、全て配列の明らかなものを使用することから、ペプチド合成等によって、直接合成することも可能である。

40

【 0 1 4 2 】

尚、通常は、VH領域遺伝子とVL領域遺伝子は、各々別のベクターに組み込んで用いられるが、同一のベクター中に組み込んで、各々発現させても良い。

【 0 1 4 3 】

[本発明のヒト又は齧歯類のapoB蛋白質の検出用キット (第二十四の発明)]

本発明のヒト又は齧歯類のapoB蛋白質の検出用キットは、本発明の抗体、又は本発明の単鎖可変領域フラグメントを含むことを特徴としている。

【 0 1 4 4 】

ここで、キットには、サンドイッチELISAの際に、本発明の抗体や単鎖可変領域フラグメントと対になって、apoB蛋白質を挟み込むための物質として、酸化フォスファチジルコリン特異的マウスモノクローナル抗体の他、ヒトLOX-1 (hLOX-1) のようなLOX-1、又はその

50

誘導体等も含めることができる。

【0145】

キットには、この他、apoB蛋白質に結合した本発明の抗体を検出するための二次抗体や、二次抗体に結合させた標識を検出するための基質等を含むことができる。

【0146】

二次抗体としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）標識抗ニワトリIgY抗体等が挙げられる。IgYとは、動物のIgGに相当する、ニワトリのイムノグロブリンである。

【0147】

HRP検出用の基質としては、発色基質OPD（オルトフェニレンジアミン）や発色基質TMB（テトラメチルベンジジン）等が挙げられる。

10

このキットによって、ヒト及び齧歯類のapoB蛋白質が検出できるため、LDL又はoxLDLが関与する疾患の診断も可能となる。

【0148】

[本発明のヒト又は齧歯類のoxLDLの検出用キット（第二十五の発明）]

本発明のヒト又は齧歯類のoxLDLの検出用キットは、上記のapoB蛋白質の検出用キットにおいて、サンドイッチELISAの際に、本発明の抗体や単鎖可変領域フラグメントと対になって、oxLDLを挟み込むための物質として、hLOX-1又はその誘導体等を用いることを特徴としている。

このキットによって、ヒト及び齧歯類のoxLDLの特異的な検出ができるため、oxLDLが関与する疾患の診断も可能となる。

20

【0149】

[本発明のapoB蛋白質又はoxLDLの検出方法（第二十六の発明）]

本発明の、ヒト又は齧歯類から抽出した生体成分中の、或いは齧歯類生体中の、apoB蛋白質又はoxLDLの検出方法は、上記の本発明のキットを用いることを特徴とする。

【0150】

ヒト又は齧歯類から抽出した生体成分としては、ヒト又は齧歯類由来の組織、細胞、細胞抽出成分、体液等が挙げられる。

【0151】

組織としては、脾臓、リンパ節等が挙げられる。

【0152】

細胞としては、脾細胞、リンパ細胞、抗体産生細胞等が挙げられる。

30

【0153】

体液としては、血液、血清、血漿、尿、汗等が挙げられる。

【0154】

検出の容易性などを考慮すると、生体試料としては体液、特に血清・血漿が好ましい。

【実施例】

【0155】

[実施例1：ファージ抗体の製造（ヒト及び齧歯類のapoB蛋白質に対して特異性を有するポリペプチドを発現するVH鎖遺伝子とVL鎖遺伝子の組み合わせの取得）]

【0156】

(1)ニワトリへの免疫

ヒトLDLをニワトリに免疫した。

40

【0157】

(2)RT-PCRによる、ニワトリ抗体の、様々なVH領域とVL領域の遺伝子（cDNA）の回収

【0158】

(3)単鎖可変領域フラグメント（scFv）遺伝子の製造

上記(2)で得られたVH領域とVL領域の遺伝子の複数の組合せを、リンカー（GGGGS）₃（配列番号31のペプチド）をコードする遺伝子及びスペーサー（Asp-Val）をコードする遺伝子を介して結合させ、scFv遺伝子を製造する。

50

【 0 1 5 9 】

(4) ファージミドベクターの製造

ニワトリのC と、g3p遺伝子をプラスミド(社製)に組み込んだプラスミド(pPDS)に、(3)のscFvを導入し、ファージミドベクター-pLPDSを製造した。

【 0 1 6 0 】

(5) 大腸菌への感染

上記(4)で製造したファージミドベクターを、大腸菌(E.coli(XL1-Blue))に形質転換した。

【 0 1 6 1 】

(6) ヘルパーファージの感染

ファージミドベクターには、ファージ粒子を精製する遺伝子が揃っていないため、ヘルパーファージを同じ大腸菌に感染させた。

ヘルパーファージとしては、VCSM13 (STRATAGENE社製)を用いた。

【 0 1 6 2 】

(7) ファージディスプレイによる抗体(ファージ抗体)の製造

ファージミドベクターとヘルパーファージを感染させた大腸菌を、約30 で培養し、scFvを融合蛋白質として発現するファージ14種を採取した。

【 0 1 6 3 】

(8) パニング選択による、ヒトのapoB蛋白質に特異性を有するファージ抗体の選抜

ヒトLDLを固定化し、採取したファージ抗体を反応させ、結合しなかったファージを洗浄した。結合したファージを溶出し、大腸菌に再度感染させ、増殖させた。この操作を5回繰り返し、ヒトLDLに特異性を有するファージ抗体を選抜したところ、6種類のファージ抗体を収集することができた。

選抜された6種のファージ抗体を、以下、# 2 , # 7 , # 1 6 , # 2 0 , # 2 2 , # 2 4 と記載する。

ここで、

2 は、配列 1 + ペプチドリンカー + スペーサー + 配列番号 7

7 は、配列 2 + ペプチドリンカー + スペーサー + 配列番号 8

1 6 は、配列 3 + ペプチドリンカー + スペーサー + 配列番号 9

2 0 は、配列 4 + ペプチドリンカー + スペーサー + 配列番号 1 0

2 2 は、配列 5 + ペプチドリンカー + スペーサー + 配列番号 1 1

2 4 は、配列 6 + ペプチドリンカー + スペーサー + 配列番号 1 2

である。

【 0 1 6 4 】

[試験例 1 : サンドイッチELISAによるファージ抗体の特異性の確認]

上記で選択されたファージ抗体の、ヒトapoB蛋白質, マウスVLDL/LDL, 及びマウスHDLに対する特異性を、ELISAによって、確認した。

尚、VLDLとは、超低密度のリポ蛋白質である。

【 0 1 6 5 】

(サンドイッチELISAの条件)

蛋白質吸着プレートに、リコンビナントhLOX-1 (rhLOX-1) を吸着させ、ここに特異性を確認する対象であるヒトapoB蛋白質, マウスVLDL/LDL, 又はマウスHDLのいずれかを含む試料溶液を添加した。

【 0 1 6 6 】

上記で得られた6種類のファージ抗体を各々添加し、二次抗体としては、HRPで標識した、抗ニワトリIgY抗体を用いた。

【 0 1 6 7 】

この試験方法の模式図を図1に示す。模式図中では、特異性を確認する対象である蛋白質の代表として、ヒトapoB蛋白質を記載し、当該蛋白質を認識するファージ抗体の代表として、# 20を記載してある。

10

20

30

40

50

【 0 1 6 8 】

特異性は、490nmの吸光度（二次抗体の標識であるHRPの、発色基質OPDの検出波長）によって評価し、その結果を図2に表す。

【 0 1 6 9 】

図2において、6種類のファージ抗体#2, #7, #16, #20, #22, #24の、特異性の結果を示す。

図2の結果から、特にファージ抗体#16及び#20が、ヒトと齧歯類の両方のapoB蛋白質に対する特異性に優れていることが分かる。

【 0 1 7 0 】

尚、この6種類のファージ抗体が有するscFvの遺伝子配列は、配列番号25乃至30で表されるものであった。

10

【 0 1 7 1 】

配列番号25 : No. 13 + ペプチドリンカー-遺伝子 + スペーサー-遺伝子 + No. 19

配列番号26 : No. 14 + ペプチドリンカー-遺伝子 + スペーサー-遺伝子 + No. 20

配列番号27 : No. 15 + ペプチドリンカー-遺伝子 + スペーサー-遺伝子 + No. 21

配列番号28 : No. 16 + ペプチドリンカー-遺伝子 + スペーサー-遺伝子 + No. 22

配列番号29 : No. 17 + ペプチドリンカー-遺伝子 + スペーサー-遺伝子 + No. 23

配列番号30 : No. 18 + ペプチドリンカー-遺伝子 + スペーサー-遺伝子 + No. 24

上記で、No.とは、配列番号を意味する。

【 0 1 7 2 】

ファージ抗体の特異性は、同じ可変領域（VH及びVL）のセットを有するモノクローナル抗体の特異性と共通する傾向が強いので、上記配列番号25乃至30で表されるscFv遺伝子がコードする2つの可変領域を持つモノクローナル抗体、即ち、下記の組合せのポリペプチド配列を有するモノクローナル抗体は、同様に、ヒトと齧歯類のapoB蛋白質に対する特異性を有するものと考えられる。

20

【 0 1 7 3 】

(1) 配列番号1及び配列番号7（下記実施例2のHUC2）

(2) 配列番号2及び配列番号8（下記実施例2のHUC7）

(3) 配列番号3及び配列番号9（下記実施例2のHUC16）

(4) 配列番号4及び配列番号10（下記実施例2のHUC20）

(5) 配列番号5及び配列番号11（下記実施例2のHUC22）

(6) 配列番号6及び配列番号12（下記実施例2のHUC24）

30

【 0 1 7 4 】

[実施例2 : 完全抗体の製造]

実施例1で得られた、#2, #7, #16, #20, #22, #24の6種の、ヒト及び齧歯類のapoB蛋白質に対して特異性を有するファージ抗体と同様のVH鎖及びVL鎖の組合せを用い、同様の特異性を有するモノクローナル抗体を製造した。

これらのモノクローナル抗体を、HUC2, HUC7, HUC16, HUC20, HUC22, HUC24とした。

【 0 1 7 5 】

具体的には、上記実施例1で得られたファージ抗体を鋳型として増幅した、VH鎖遺伝子やVL鎖遺伝子を、公知のニワトリ抗体を鋳型として得られた、モノクローナル抗体に必要な他の領域の遺伝子を含むプラスミドベクターに導入し、各々のベクターを適当な動物細胞中で、発現させることによって、製造した。

40

【 0 1 7 6 】

H鎖発現ベクター及びL鎖発現ベクターは、より具体的には、以下の条件に従って、RT-PCR法やオーバーラップPCR等を用いて製造した。

【 0 1 7 7 】

< H鎖発現ベクターの調製 >

1. VH領域の増幅

50

scFv抗体遺伝子を保有する大腸菌懸濁液またはファージ抗体を鑄型として使用した。

【0178】

(プライマー配列)

【0179】

センスプライマー;VH-bivalent-F

5' -CCCCACAGGGCTGATGGCGGCCGTGACGTTGGACG-3' (配列番号32)

【0180】

アンチセンスプライマー;3-15HR1

5' -ACGATGACTTCGGTCCCGTG-3' (配列番号33)

【0181】

(PCR反応組成)

10xKOD plus buffer 5 μ l, 2 mM dNTP 5 μ l, 25 mM MgSO₄ 3.2 μ l, 25 μ M 各プライマー-1.5 μ l, KOD plus DNA polymerase (東洋紡社製) 1 μ l, 鑄型1 μ l, H₂O 31.8 μ l (合計50 μ l)

【0182】

(PCR条件)

94°C 2分を1回、(94°C 15秒、62°C 30秒、68°C 30秒)を35回、68°C 2分を1回、4°C 一定

【0183】

2.CH1領域の増幅

HUC2-13 (非特許文献1や、特開2001-238676等に記載されている、公知の抗ヒトプリオン蛋白質(PrP)抗体産生ハイブリドーマ)よりRNAを抽出し、Oligo-dTプライマー法によりcDNAを合成し、鑄型として使用した。

【0184】

尚、HUC2-13は、非特許文献1等に記載の方法で製造することができる。

【0185】

具体的には、チミジンキナーゼ欠損、ウアバイン耐性のニワトリB細胞株MuH1と、プリオン蛋白質を免疫したニワトリ脾臓細胞を細胞融合した、哺乳動物プロリンタンパクPrPの25-29残基を認識する抗PrPニワトリモノクローナル抗体HUC2-13産生ハイブリドーマを作製する。そしてこれを、10%FBS(Fetal bovine serum)(SIGMA)含有IMDM(Iscove's modified Dulbecco's medium)(GIBCO BRL)培地を用い、38.5、5%CO₂インキュベーター内で培養し、その培養上清から抽出することによって、HUC2-13モノクローナル抗体を製造した。

【0186】

(プライマー配列)

【0187】

センスプライマー;3-15HF1

5' -CACGGGACCGAAGTCATCGT -3' (配列番号34)

【0188】

アンチセンスプライマー;CH1-R Hinc II

5' -GACCTGCACCTCCGGGGGTACAGGC -3' (配列番号35)

【0189】

(PCR反応組成)

10 x KOD plus buffer 5 μ l, 2 mM dNTP 5 μ l, 25 mM MgSO₄ 3.2 μ l, 25 μ M 各プライマー-1.5 μ l, KOD plus DNA polymerase 1 μ l, 鑄型cDNA 1 μ l, H₂O 31.8 μ l (合計50 μ l)

【0190】

(PCR条件)

VHと同一

【0191】

10

20

30

40

50

3.H鎖リーダー配列の増幅

HUC2-13 よりDNA を抽出し、鋳型として用いた。

【 0 1 9 2 】

(プライマー配列)

【 0 1 9 3 】

センスプライマー; HUC2-HF4

5' - TTGGTACCACCACCATGAGCCCACTCGTCTCC -3' (配列番号 3 6)

【 0 1 9 4 】

アンチセンスプライマー; VH-leader-R

5' -CGCCATCAGCCCTGTGGGGA -3' (配列番号 3 7)

【 0 1 9 5 】

(PCR 反応組成)

10 x KOD plus buffer 5 μ l, 2 mM dNTP 5 μ l, 25 mM MgSO₄ 3.2 μ l, 25 μ M 各プライマー-1.5 μ l, KOD plus DNA polymerase 1 μ l, 鋳型DNA 1 μ l, H₂O 31.8 μ l (合計50 μ l)

【 0 1 9 6 】

(PCR 条件)

VH と同一

【 0 1 9 7 】

4. オーバーラップPCR によるH鎖遺伝子の増幅

上記1-3 の遺伝子を鋳型にオーバーラップPCR してH鎖遺伝子を調製した。

【 0 1 9 8 】

(プライマー配列)

【 0 1 9 9 】

センスプライマー; HUC2-HF4 (配列番号 3 6)

【 0 2 0 0 】

アンチセンスプライマー; CH1-R Hinc II (配列番号 3 5)

【 0 2 0 1 】

(PCR 反応組成)

10 x KOD plus buffer 5 μ l, 2 mM dNTP 5 μ l, 25 mM MgSO₄ 3.2 μ l, 25 μ M 各プライマー-1.5 μ l, KOD plus DNA polymerase 1 μ l, VH, CH1, リーダー配列遺伝子各0.125 p mol, H₂O 合計50 μ l になるように添加した。

【 0 2 0 2 】

(PCR 条件)

94 °C 2 分を 1 回、(94 °C 15秒、62 °C 30 秒、68 °C 1分) を35回、68 °C 2 分を 1 回、4 °C 一定

【 0 2 0 3 】

5. 制限酵素処理、ベクターへのライゲーション

得られたH鎖遺伝子断片は、Kpn I (New England Biolabs 社製) およびHind III (同社) により制限酵素処理した。制限酵素処理は試薬添付の説明書に従って行った。

また、HUC2-13 H鎖遺伝子全長を挿入してあるpcDNA4/myc-His (A) (Invitrogen 社製) (あらかじめベクターの持つHind III をセルフライゲーションにより欠失させたもの) も同様に同制限酵素で処理し、得られたH鎖遺伝子断片をLigation High (東洋紡社製) を用いてライゲーションした。ライゲーションは、試薬添付の説明書に従った。

【 0 2 0 4 】

< L鎖発現ベクターの調製 >

1. VL 領域の増幅

scFv 抗体遺伝子を保有する大腸菌懸濁液またはファージ抗体を鋳型として使用した。

【 0 2 0 5 】

(プライマー配列)

10

20

30

40

50

【 0 2 0 6 】

センスプライマー; VL-bivalent-F

5' - AGGTTCCCTGGTGCAGGCAGCAGTGACTCAGCCGC -3' (配列番号 38)

【 0 2 0 7 】

アンチセンスプライマー; 3-15 LR1

5' - AGGACGGTCAGGGTTGTCC -3' (配列番号 39)

【 0 2 0 8 】

(PCR 反応組成)

10 x KOD plus buffer 5 μ l, 2 mM dNTP 5 μ l, 25 mM MgSO₄ 3.2 μ l, 25 μ M 各プライマー-1.5 μ l, KOD plus DNA polymerase (東洋紡社製) 1 μ l, 鋳型1 μ l, H₂O 31.8 μ l (合計50 μ l)

10

【 0 2 0 9 】

(PCR 条件)

94 °C 2 分を 1 回、(94 °C 15秒、62 °C 30 秒、68 °C 30秒) を35回、68 °C 2 分を 1 回、4 °C 一定

【 0 2 1 0 】

2. C 領域の増幅

CH1 と同様、HUC2-13 由来cDNA を鋳型として使用した。

【 0 2 1 1 】

(プライマー配列)

20

【 0 2 1 2 】

センスプライマー; 3-15 LF1

5' - GGACAACCCTGACCGTCCT-3' (配列番号 40)

【 0 2 1 3 】

アンチセンスプライマー; HUC2-LR4

5' - TCTCTAGATTAGCACTCGGACCTCTTCAG-3' (配列番号 41)

【 0 2 1 4 】

(PCR 反応組成)

10 x KOD plus buffer 5 μ l, 2 mM dNTP 5 μ l, 25 mM MgSO₄ 3.2 μ l, 25 μ M 各プライマー-1.5 μ l, KOD plus DNA polymerase 1 μ l, 鋳型cDNA 1 μ l, H₂O 31.8 μ l (合計50 μ l)

30

【 0 2 1 5 】

(PCR 条件)

VL と同一

【 0 2 1 6 】

3. L鎖リーダー配列の増幅

H鎖リーダー配列と同様、HUC2-13 由来DNA を鋳型として用いた。

【 0 2 1 7 】

(プライマー配列)

40

【 0 2 1 8 】

センスプライマー; HUC2-VLF3

5' - ATATATAAGCTTGCCATGGCCTGGGCTCCTCTCCT -3' (配列番号 42)

【 0 2 1 9 】

アンチセンスプライマー; VL-leader-R

5' TGCCTGCACCAGGGAACCTG-3' (配列番号 43)

【 0 2 2 0 】

(PCR 反応組成)

10 x KOD plus buffer 5 μ l, 2 mM dNTP 5 μ l, 25 mM MgSO₄ 3.2 μ l, 25 μ M 各プライマー-1.5 μ l, KOD plus DNA polymerase 1 μ l, 鋳型DNA 1 μ l, H₂O 31.8 μ l (合計50 μ l)

50

【 0 2 2 1 】

(PCR 条件)

VL と同一

【 0 2 2 2 】

4. オーバーラップPCR によるL 鎖遺伝子の増幅

上記1-3 の遺伝子を鋳型にオーバーラップPCR してL 鎖遺伝子を調製した。

【 0 2 2 3 】

(プライマー配列)

センスプライマー; HUC2-VLF3 (配列番号 4 2)

アンチセンスプライマー; HUC2-LR4 (配列番号 4 1)

【 0 2 2 4 】

(PCR 反応組成)

10 x KOD plus buffer 5 μ l, 2 mM dNTP 5 μ l, 25 mM MgSO₄ 3.2 μ l, 25 μ M 各プライマー-1.5 μ l, KOD plus DNA polymerase 1 μ l, VH, CH1, リーダー配列遺伝子各0.125 p mol, H₂O 合計50 μ l になるように添加した。

【 0 2 2 5 】

(PCR 条件)

H 鎖遺伝子のオーバーラップPCR と同条件

【 0 2 2 6 】

5. 制限酵素処理、ベクターへのライゲーション

得られたL鎖遺伝子断片は、Hind III (New England Biolabs 社製) およびXba I (同社) により制限酵素処理した。制限酵素処理は試薬添付の説明書に従って行った。

また、pcDNA3.1/myc-His (A) (Invitrogen 社製) も同様に同制限酵素で処理し、得られたL鎖遺伝子断片をLigation High (東洋紡社製) を用いてライゲーションした。ライゲーションは、試薬添付の説明書に従った。

【 0 2 2 7 】

得られたモノクローナル抗体を、HUC 2 , HUC 7 , HUC 1 6 , HUC 2 0 , HUC 2 2 , HUC 2 4 と名付けた (数字は、同じVH及びVLが含まれるファージ抗体 # 2 , # 7 , # 1 6 , # 2 0 , # 2 2 , # 2 4 と対応している。)

【 0 2 2 8 】

[試験例 2 : サンドイッチELISAによるモノクローナル抗体によるoxLDL検出]

【 0 2 2 9 】

実施例 1 と同様の、rhLOX-1を固相化したプレートを用いるサンドイッチELISAにおいて、hLOX-1と対になってoxLDLを挟み込む抗体として、ファージ抗体に替えて、HUC20モノクローナル抗体を用いた。

ヒトoxLDL又はヒトLDL (= nLDL (normal LDL) : 非酸化LDL) を抗原に用いた検出試験を、それぞれ行った。

【 0 2 3 0 】

この試験方法の模式図を図 3 に示す。

【 0 2 3 1 】

固相化したrhLOX-1は、ヒトoxLDLに特異的に結合し、ヒトnLDLには、殆ど結合しないため、oxLDLを含む試料の場合だけ、本発明のモノクローナル抗体 (HUC20) によって、抗原が検出されることになる。

【 0 2 3 2 】

抗体の特異性は、450nmの吸光度 (二次抗体の標識である、HRPの発色基質TMBの検出波長) によって評価し、その結果を図 4 に表す。

【 0 2 3 3 】

図 4 から分かる通り、本発明のモノクローナル抗体は、oxLDLを含む試料溶液からは、rhLOX-1に結合したoxLDLを効果的に検出できたが、nLDLを含む試料溶液からは、殆どnLDLを検出出来なかった。

10

20

30

40

50

【 0 2 3 4 】

[試験例 3 : サンドイッチELISAによるヒト血漿中のoxLDL検出]

また、ヒトの血漿中のoxLDL量を、上記と同様の検出方法を用いて測定したところ、312ng/mlであることが確認できた。

【 0 2 3 5 】

[試験例 4 : サンドイッチELISAによるマウス血漿中のoxLDL検出]

更に、普通餌 (Normal chow) マウスと、高脂肪餌 (HF chow) マウスの血漿中のoxLDLについても、上記と同様の検出方法を用いて測定した。結果を下記表 1 に示す。

【 0 2 3 6 】

【表 1】

10

Mouse	Normal chow	HF chow (2w)
C57BL6 11w	5ng/ml	71ng/ml
ApoEKO 11w	30ng/ml	1145ng/ml

【 0 2 3 7 】

尚、表 1 中の、「ApoEKO」とは、動脈硬化症モデルとして公知の、Apoリポ蛋白質E遺伝子ノックアウトマウスを表し、「11w」とは、11週齢を表し、「2w」とは「2週間」を表す。

20

【 0 2 3 8 】

表 1 の結果から、確かに、野生型マウスの場合も、普通餌と高脂肪餌では、血中のoxLDL量に差があり、動脈硬化モデルマウスの場合には、その差が更に大きいことが確認できた。

このことは、oxLDLが、高脂肪餌によって引き起こされ、動脈硬化の原因となっていると言う、近年の見解と一致するものであった。

【 0 2 3 9 】

[試験例 5 : モノクローナル抗体の特異性の確認 (ウェスタンブロッティング分析)]
実施例 2 で製造したモノクローナル抗体のうち、ファージ抗体の特異性試験 (試験例 1) で、ヒトapoB蛋白質と強く反応した # 16 , # 20 に対応する、IgY型に改変したモノクローナル抗体HUC16及びHUC20について、ウェスタンブロッティングにより、oxLDL , nLDLとの反応性を確認した。

30

結果を図 5 に示す。

【 0 2 4 0 】

図 5 から分かる通り、HUC16抗体 , HUC20抗体ともに、ヒト及びマウスのoxLDL及びLDLに対し、強い反応性を示したが、マウスHDLに対しては反応しなかった。

【 0 2 4 1 】

[試験例 6 : 脳卒中発症高血圧ラットにおける、ビタミンE食投与時のoxLDL量の検出]
脳卒中発症高血圧ラット (SHR-SP) ラット (1 群 6 匹) に、低ビタミンE食又は高ビタミンE食を、7日間与えた。

40

【 0 2 4 2 】

各々の、プラズマ (血漿) 中のoxLDLを、本発明のモノクローナル抗体 (HUC20) を用いた、上記と同様のサンドイッチELISAによって測定したところ、図 6 の結果が得られた。

【 0 2 4 3 】

図 6 から分かる通り、過酸化脂質を分解すると言われているビタミンEを多く摂取したラットでは、プラズマ中のoxLDLが有意に低いことが、本発明の抗体によって、裏付けられた。

50

またこの結果は、本発明のモノクローナル抗体が、マウス以外の齧歯類であるラットのapoB蛋白質にも結合している事をも示すものである。

【0244】

[試験例7：ApoEKOマウスの組織中のoxLDLの検出]

24週齢のApoEKOマウス(雄)の大動脈の付け根(aortic root)2箇所(図7の上段及び下段)において、連続スライス切片を用い、公知の各種方法及び、本発明のモノクローナル抗体(HUC20)を用いた本発明の検出方法によって、apoB蛋白質の検出を行った。結果を図7に示す。

【0245】

図中、「Oil Red O」とあるのは、脂質を検出するアザ色素の一種を用いた実験結果であるとの意味である。

10

【0246】

「anti-macrophage」とあるのは、抗マクロファージ抗体を用いて、oxLDLの受容体であるLOX-1を発現すると言われているマクロファージを、検出した結果であるとの意味である。

【0247】

「anti-apoB HUC20」とあるのは、本発明のモノクローナル抗体(HUC20)で、apoBを検出した結果であるとの意味である。

【0248】

尚、本発明のapoBに特異性を有する抗体の場合、oxLDLのみならず、LDLにも反応するが、動脈硬化部位における検出であることから、殆どがoxLDLであったと考えられる。

20

【0249】

「LOX1 ligand」とあるのは、本モデルマウス中に存在するoxLDLと反応させた「外来LOX-1」を、検出した結果であるとの意味である。

【0250】

図7から分かる通り、本発明のモノクローナル抗体を用いた、本発明のoxLDLの検出方法によって検出したoxLDLの位置は、従来の方法によってLDLやoxLDLの存在が推定される位置に一致していた。

【0251】

つまり、本発明の検出方法が、齧歯類生体中のoxLDLの検出方法としても、有用であることが裏付けられた。

30

【0252】

上記試験例1～7の結果から、本発明のファージ抗体及びモノクローナル抗体、及び本発明の検出キット、本発明の検出方法が、apoB蛋白質を有するリポ蛋白質(LDLやoxLDL)の検出に有用であり、特に、rhLOX-1等のようなoxLDLを特異的に認識する受容体等との組合せによって、oxLDLだけを、特異的に認識することも可能であることが分かった。また、ヒトのみならず、マウスやラット等の齧歯類のapoB蛋白質をも検出できることが分かった。

【産業上の利用可能性】

【0253】

本発明は、ヒト及び齧歯類のapoB蛋白質を特異的に認識する抗体及びその材料遺伝子、並びに抗体の製造方法に関するものであり、oxLDLの関与する疾患の、診断・分析等への利用が可能な技術である。

40

【図面の簡単な説明】

【0254】

【図1】本発明のファージ抗体を用いた、サンドイッチELISAの原理を示す模式図である。図中の、「HRP-anti IgY」とは、HRP標識抗ニワトリIgY抗体を意味している。rhLOX-1と対になってヒトapoB蛋白質を挟み込んでいる#20は、6種類のファージ抗体の代表を示す。

【図2】rhLOX-1を固相化したプレートを用いたサンドイッチELISAによる、ファージ抗体

50

の特異性確認試験結果を示す図である。縦軸は、HRPの発色基質OPDの検出波長（490nm）の吸光度によって評価した。

【図3】本発明のモノクローナル抗体（HUC20）を用いた、サンドイッチELISAの原理を示す模式図である。図中の、「HRP-anti IgY」とは、HRP標識抗ニワトリIgY抗体を意味している。

【図4】rhLOX-1を固相化したプレートを用いるサンドイッチELISAによる、完全抗体の特異性確認試験結果を示す図である。縦軸は、HRPの発色基質TMBの検出波長（450nm）の吸光度によって評価した。

【図5】ウェスタンブロッティング分析による、モノクローナル抗体の特異性確認試験結果を示す図である。

【図6】SHR-SPラットにおける、ビタミンE食投与時のoxLDL量の検出結果を示す図である。尚、図中の*は、 $p < 0.05$ で有意差有りということを表し、**は、 $p < 0.01$ で有意差有りということを表す。

【図7】本発明の検出方法による、ApoEKOマウスの組織中のapoB蛋白質の検出結果を示す図である。

【図8】scFv遺伝子を、プラスミドpLPDSに組み込んだ、本発明のscFv発現ベクター（ファージミドベクター）の構造を示す模式図である。VH遺伝子とVL遺伝子の間にあるのは、ペプチドリンカーである。

【図9】配列番号1～12を表す図である。

【図10】配列番号13～18を表す図である。

【図11】配列番号19～24を表す図である。

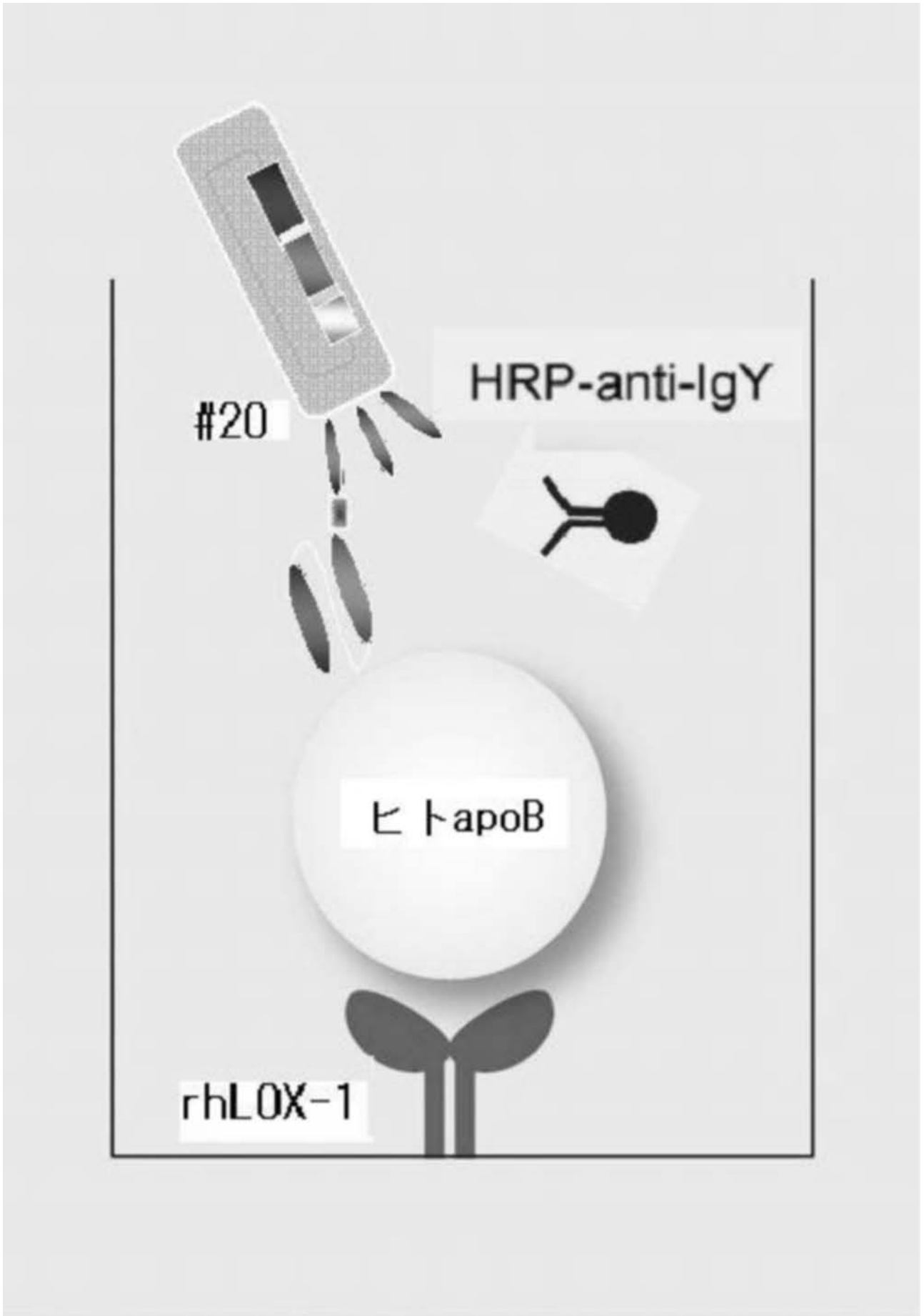
【図12】配列番号25～27を表す図である。図中の太字斜体は、ペプチドリンカー(GGGG)₃及び、スペーサー配列(DV)をコードする遺伝子を表す。

【図13】配列番号28～30を表す図である。図中の太字斜体は、ペプチドリンカー(GGGG)₃及び、スペーサー配列(DV)をコードする遺伝子を表す。

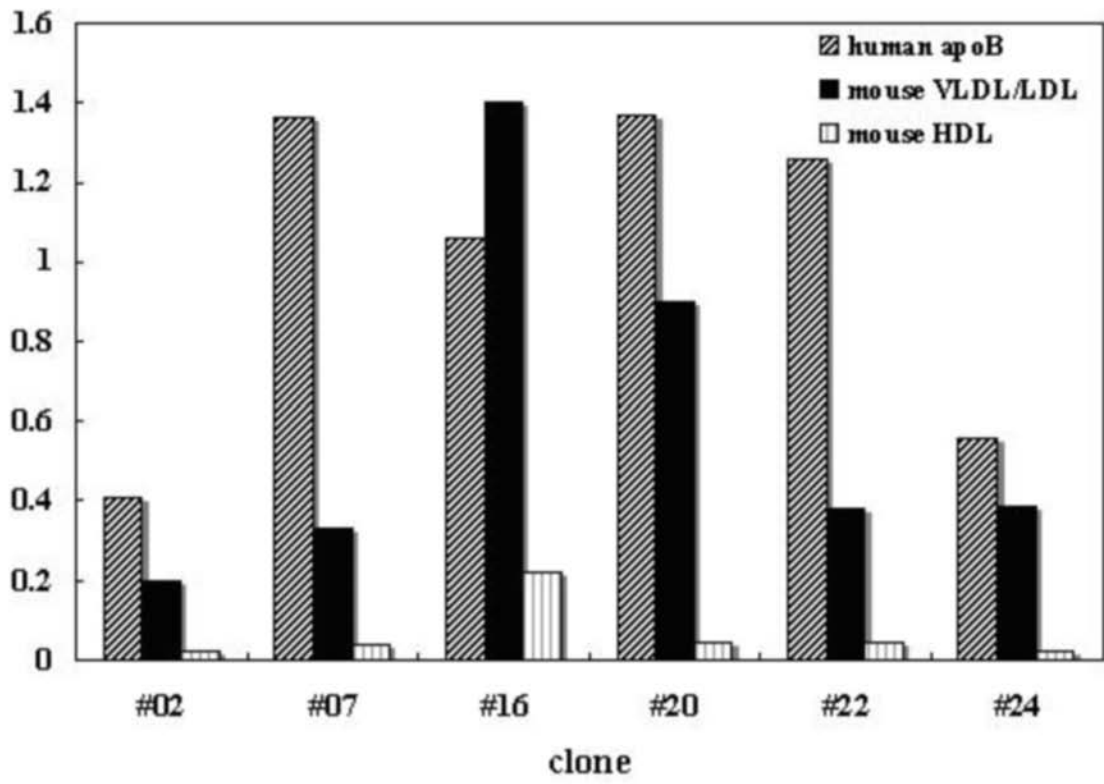
10

20

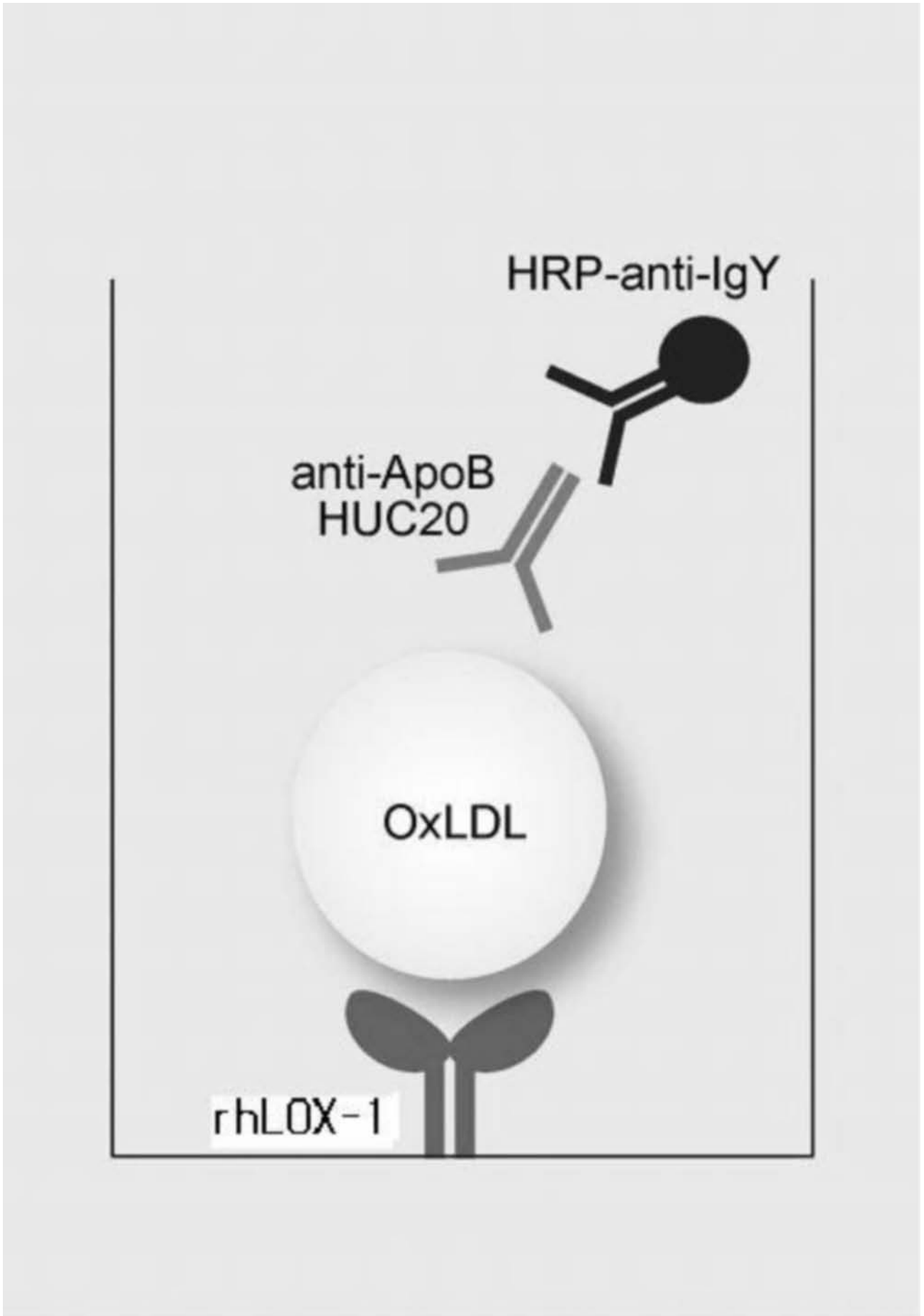
【 図 1 】



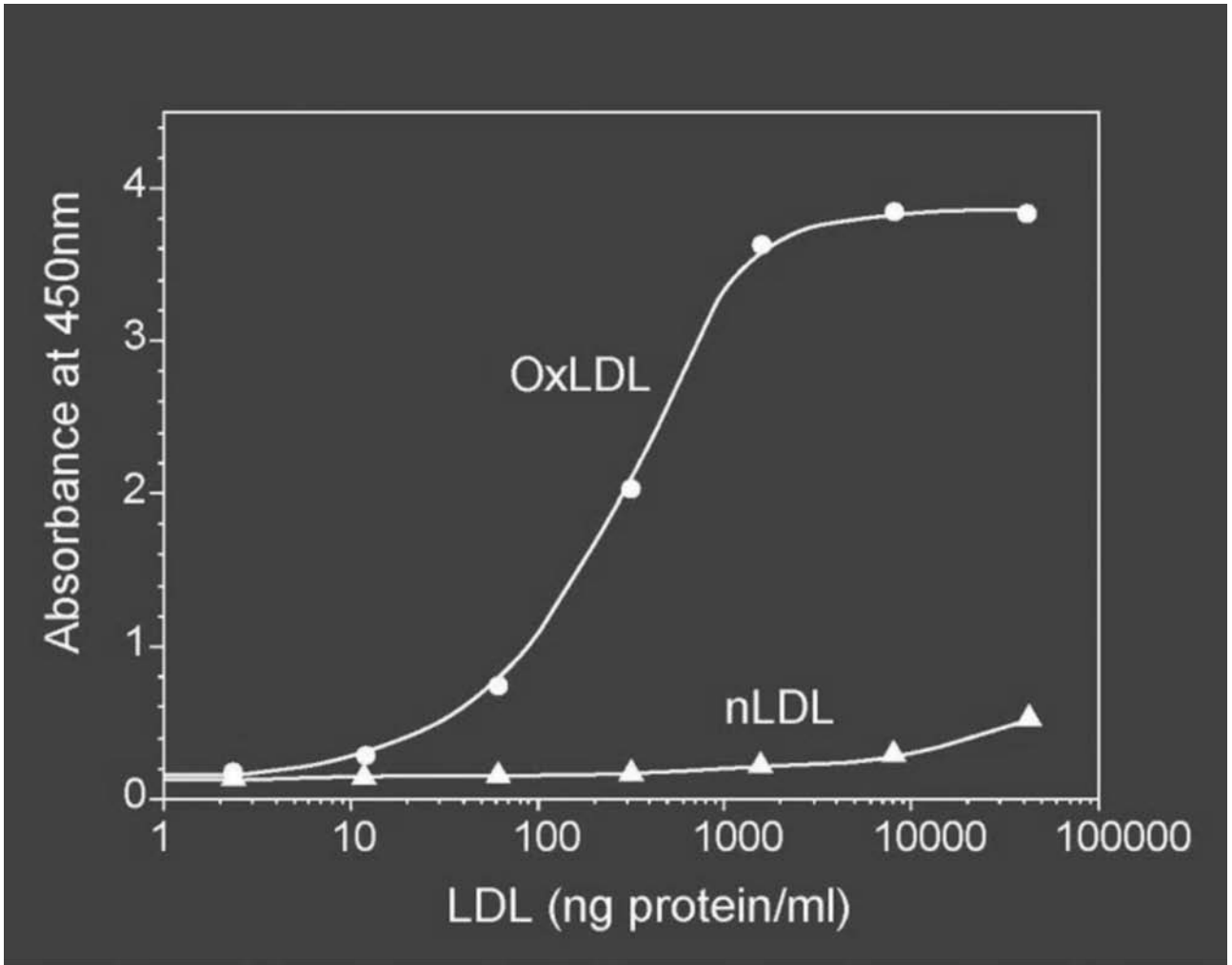
【 図 2 】



【 図 3 】

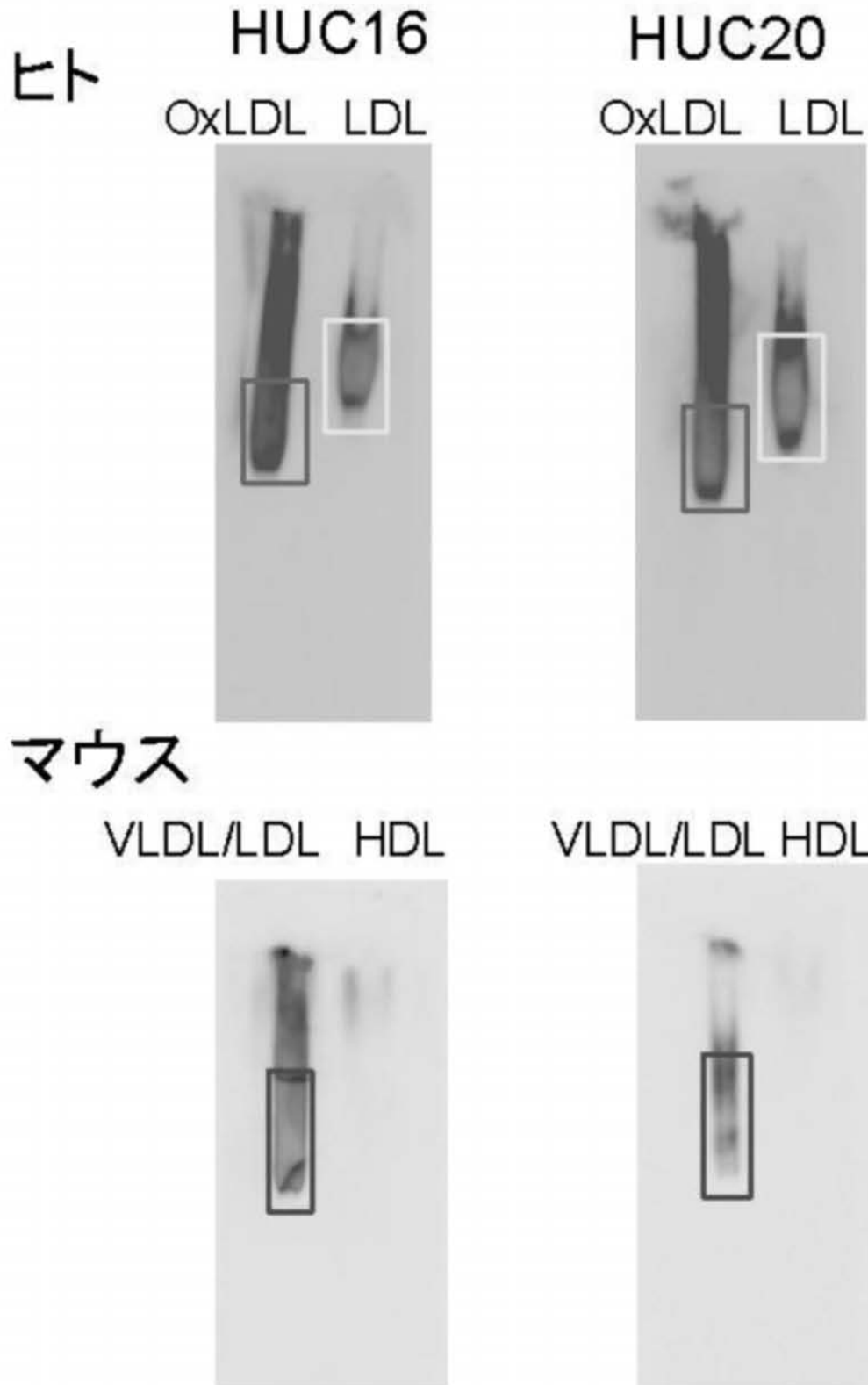


【 図 4 】

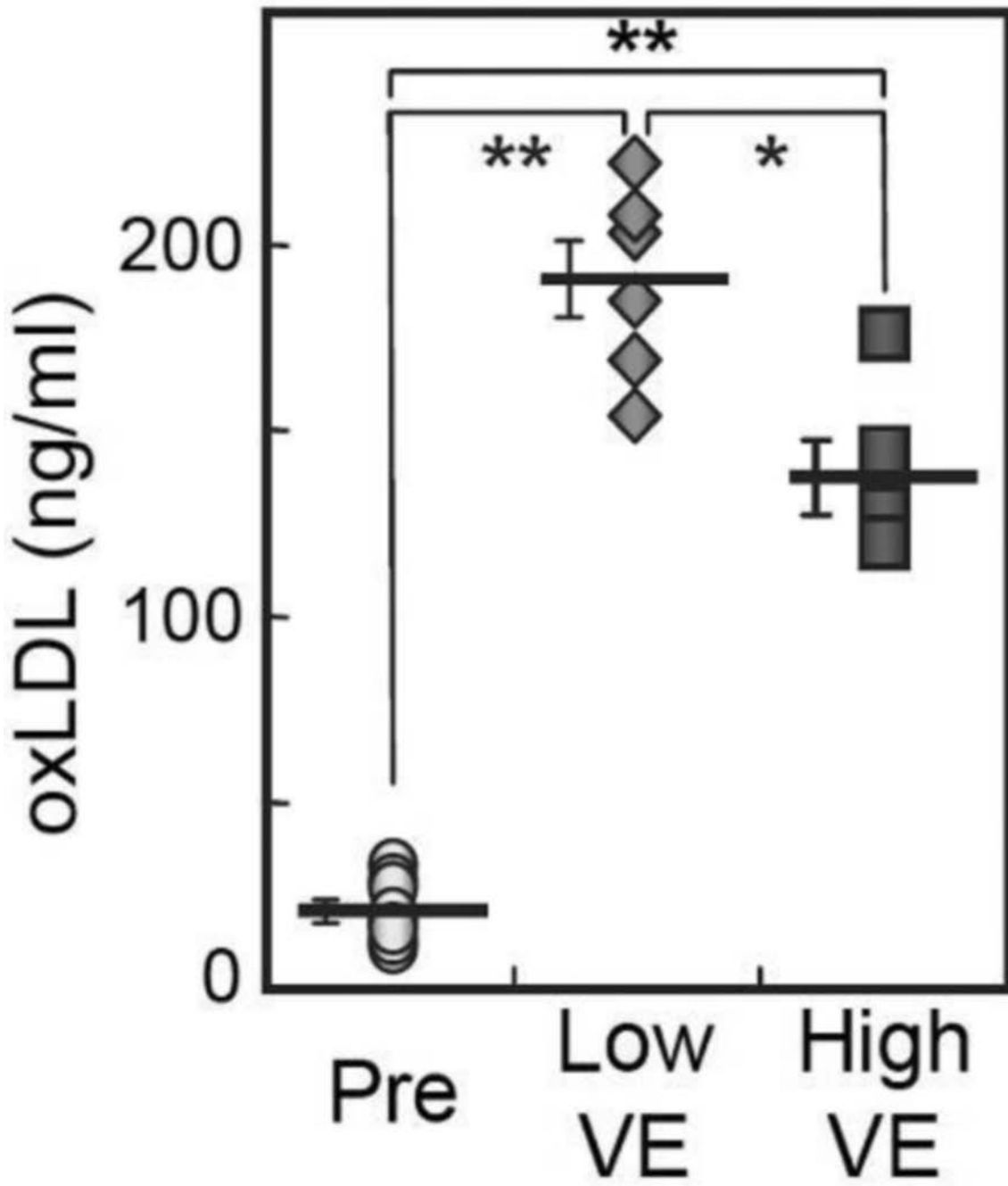


【 図 5 】

Western blotting

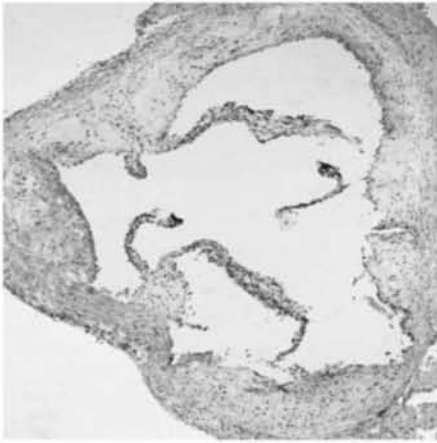


【 図 6 】

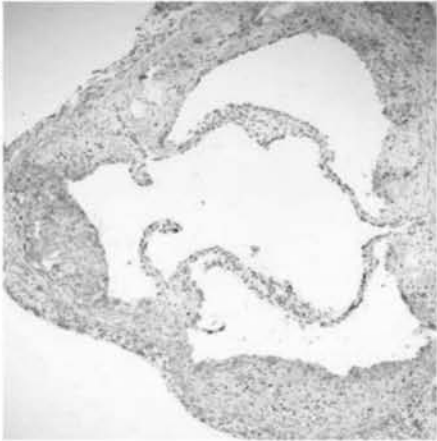


【 図 7 】

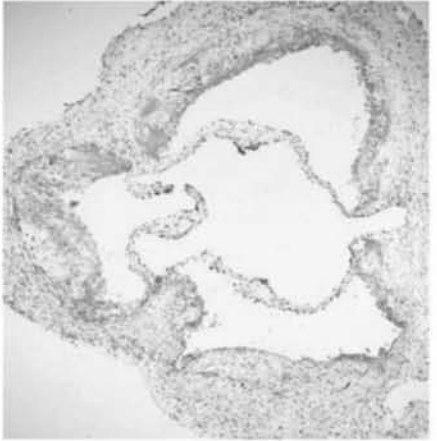
LOX1 ligand



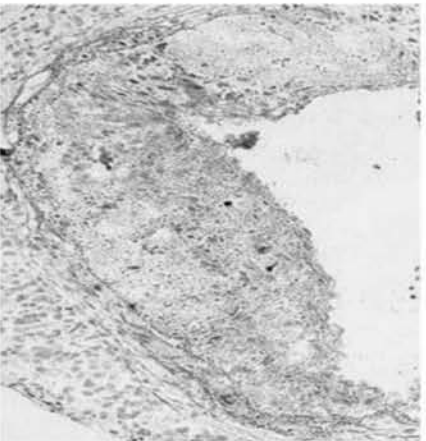
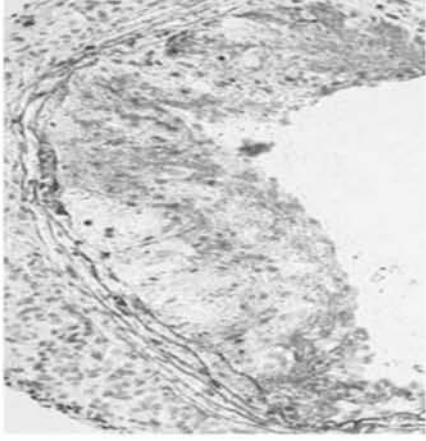
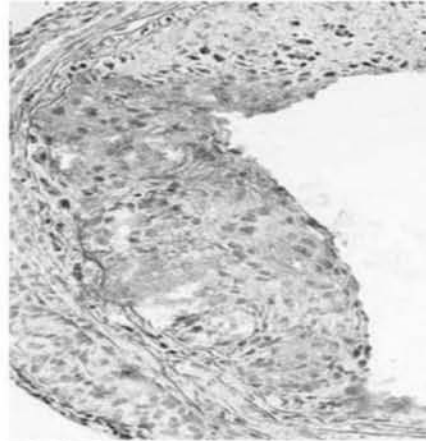
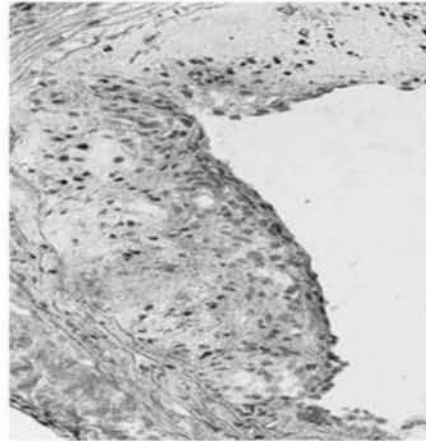
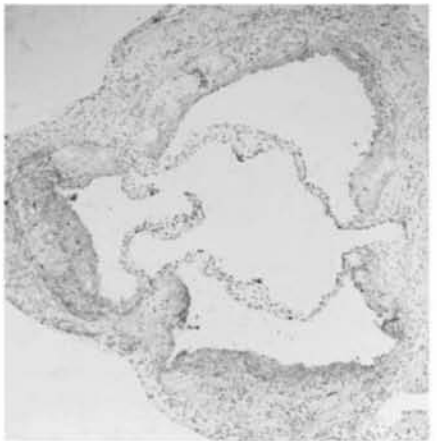
anti-macrophage



anti-ApoB HUC20

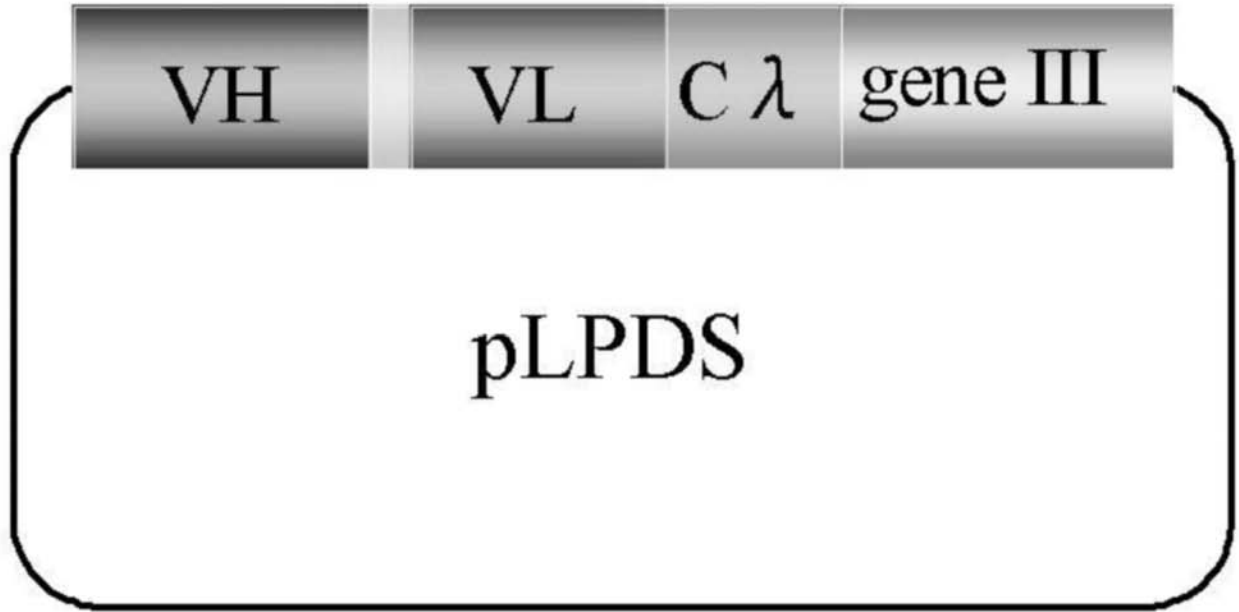


Oil Red O



24w ApoEKO ♂ aortic root

【 図 8 】



【 図 9 】

配列番号 1 :

AVTLDESGGGLQTPGGTSLVCKASGFDFSSYGMQWVRQAPGKGLEWVAGIDDDGSFTAYGPAVDGREVTVSRDNGQSTA
RLQLNNLRAEDTGTYYCAKAAGTGWGGRSGSYGNIDAWGHGTEVIVST

配列番号 2 :

AVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFDFSNAMGWVRQAPGKGLEFVAGIGSFGRYIDYGAAVKGRATISRDDGQSTL
RLQLNNLRAEDTATYFCAKHTCSGGWCATWDGYAGTIDAWGHGTEVTVST

配列番号 3 :

AVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFDFRSYGMGWVRQAPGKGLEWVADIDDDGRYTDYASAVKGRATISRDNQSTV
RLQLDNLRAEDTATYYCAKSAVSVITASDIDAWGHGTEVIVST

配列番号 4 :

AVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFTFSSYDMAWVRQAPGKGLEFVAGIFSDDSDISYGPAVKGRATISRDNQRTVR
LQLNNLRAEDTGIYFCARSPGDFSYSYGIDAWGHGTEVTVST

配列番号 5 :

AVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFDFSNAMGWVRQAPGKGLEFVAGIGSIGRYIDYGAAVKGRATISRDDGQSTVR
LQLNNLRAEDTGIYYCAKHSCSDGWCATWEGYSGTIDAWGHGTEVTVST

配列番号 6 :

AVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFTFSSYDMAWVRQAPGKGLEFVAGIFSDDSDISYGPAVKGRATISRDNQRTVR
LQLNNLRAEDTGIYFCARSPGDFSYSYGIDAWGHGTEVTVST

配列番号 7 :

ALTQQPASVSGNPGETVKITCSGGGNSNGYQWYQQKSPGNLVTVIYNNDKRPSGIPSRFSGSTSGSTATLTITGVQADDE
AIYYCGSADSSDGAGMFGAGTTLTVLK

配列番号 8 :

ALTQPASVSANPGETVKITCSGGGNSNGWFQQKSPGSAPVTLIYNNNRPSDIPSRFSGSKSGSTATLTITGVQAEDEAVY
FCGSADSSAGIFGAGTTLTVLK

配列番号 9 :

ALTQPASVSANLGGTVKITCSGGGYYAWYQQKSPGSAPVTLIYNNNRPSDIPSRFSGSKSDSTGTLTITGVQAEDEAVY
FCGSYEDNSYVDIFGAGTTLTVLK

配列番号 10 :

ALTQPSSVSANPGTVEITCSGSSGSYYGWYQQKAPGSAPVTLIYDNTKRPSNIPSRFSGSSSGSANTLTITGVQAEDEAV
YFCGSYDSSVGHGDIFGAGTTLTVLK

配列番号 11 :

ALTQPSSVSANPGETVKITCSGGGSYAGSYYYGWYQQKSPGSAPVTVIYGNTGRPSNIPSRFSGSLSGSTNTLTITGVQVE
DEAVYYCGSIDSSTYAAFAGTTLTVLK

配列番号 12 :

ALTQPASVSVGPGETVKITCSGSSGSYYGWYQQKSPGSALVTVIYDNTKRPSNIPSRFSGSTSGSTSTLTITGVQAEDEAVY
FCGSYDSSAGHGDIFGAGTTLTVLK

【 図 1 0 】

配列番号 1 3 :

GCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGGCCTCCAGACGCCCGGAGGAACGCTCAGCCTCGTCTGCAAGGCCTCCGG
GTTTCGACTTCAGCAGTTATGGCATGCAGTGGGTGCGACAGGCGCCCGGCAAGGGGCTGGAATGGTTCGCTGGTATTG
ATGATGATGGTAGTTTACAGCATACGGGCGCGCGGTGGATGGCCGTGTCACCGTCTCGAGGGACAACGGGCAGAGC
ACAGCGAGGCTGCAGCTGAACAACCTCAGGGCTGAGGACACCGGCACCTATTACTGCGCCAAGGCTGCTGGTACTGG
TTGGGGTGGTTCGCTGGTAGTTATGGTAACATCGACGCATGGGGCCACGGGACCGAAGTCATCGTGTGCGACA

配列番号 1 4 :

GCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGGCCTCCAGACGCCCGGAGGAGCGCTCAGCCTCGTCTGCAAGGCCTCCG
GGTTTGACTTCAGCAATAATGCCATGGGTTGGGTGCGACAGGCGCCCGGCAAGGGGCTGGAGTTTCGTCGCTGGTATTG
GCAGTTTTGGTAGATACATAGACTATGGGGCGCGCGTGAAGGGCCGTGCCACCATCTCGAGGGACGACGGGCAGAGC
ACACTGAGGCTGCAGCTGAACAACCTCAGGGCTGAGGACACCGCCACCTACTTCTGCGCCAAAACATACTTGTAGTGGT
GGTTGGTGTGCTACTTGGGATGGTTATGCTGGTACCATCGACGCATGGGGCCACGGGACCGAAGTCACCGTGTGCGACA

配列番号 1 5 :

GCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGGCCTCCAGACGCCCGGAGGAGCGCTCAGCCTCGTCTGCAAGGCCTCCG
GGTTTGACTTCAGAAGTTACGGCATGGGCTGGGTGCGACAGGCGCCCGGCAAGGGGCTGGAATGGTTCGCTGATATT
GATGATGATGGTAGATATACAGACTACGCGTCCGCGAGTGAAGGGCCGTGCCACCATCTCGAGGGACAACGGACAGAGC
ACAGTGAGGCTGCAGCTGGACAACCTCAGGGCTGAGGACACCGCCACCTACTACTGCGCCAAAAGTGTGTGTCTGT
GATTACTGCTTCTGACATCGACGCATGGGGCCACGGGACCGAAGTCATCGTGTGCGACA

配列番号 1 6 :

GCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGGCCTCCAGACGCCCGGAGGAGCGCTCAGCCTCGTCTGCAAGGCCTCCG
GATTCACCTTCAGTAGTTACGACATGGCCTGGGTGCGCCAGGCGCCCGGCAAGGGGCTGGAATTCGTCGCGGGTATTT
TTAGTGATGATAGTGACATATCATAACGGGCGCGCGTGAAGGGCCGTGCCACCATCTCGAGGGACAACGGGCAGAGGA
CAGTGAGGCTGCAGCTGAACAACCTCAGGGCTGAGGACACCGGCATCTACTTCTGCGCCAGAAGTCTGGTGTATTTA
GTTATGGTAGTGGTATCGACGCATGGGGCCACGGGACCGAAGTCACCGTGTGCGACA

配列番号 1 7 :

GCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGGCCTCCAGACGCCCGGAGGAGCGCTCAGCCTCGTCTGCAAGGCCTCCG
GGTTTGACTTCAGCAATAATGCCATGGGTTGGGTGCGACAGGCGCCCGGCAAGGGGCTGGAGTTTCGTCGCTGGTATTG
GCAGCATTGGTAGATACATAGACTACGGGCGAGCGGTGAAGGGCCGTGCCACCATCTCGAGGGACGACGGGCAGAGC
ACAGTGAGGCTGCAGCTGAACAACCTCAGGGCTGAGGACACCGGCATATACTACTGCGCCAAAACATAGTTGTAGTGAT
GGTTGGTGCCTACTTGGGAGGGTTATAGTGGTACCATCGACGCATGGGGCCACGGGACCGAAGTCACCGTGTGCGACA

配列番号 1 8 :

GCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGGCCTCCAGACGCCCGGAGGAGCGCTCAGCCTCGTCTGCAAGGCCTCCG
GATTCACCTTCAGTAGTTACGACATGGCCTGGGTGCGCCAGGCGCCCGGCAAGGGGCTGGAATTCGTCGCGGGTATTT
TTAGTGATGATAGTGACATATCATAACGGGCGCGCGTGAAGGGCCGTGCCACCATCTCGAGGGACAACGGGCAGAGGA
CAGTGAGGCTGCAGCTGAACAACCTCAGGGCTGAGGACACCGGCATATACTACTGCGCCAAAACATAGTTGTAGTGAT
GTTATGGTAGTGGTATCGACGCATGGGGCCACGGGACCGAAGTCACCGTGTGCGACA

【 図 1 1 】

配列番号 19 :

GCGCTGACTCAGCAGCCGGCCTCGGTGTCAGGAAACCCAGGAGAAACCGTCAAGATCACCTGCTCCGGGGGTGGCAG
TAACAGTGGTTATGGCTGGTATCAGCAGAAGTCTCCCGCAATATCCTAGTCACTGTGATCTATAACAACGACAAGAGA
CCCTCGGGCATCCCTTCCCGATTCTCCGGTCCACATCCGGCTCCACAGCCACACTAACCATCACTGGGGTCCAAGCC
GACGACGAGGCTATATATTACTGTGGGAGTGCAGACAGCAGGATGGTGTGCTGGTATGTTTGGGGCCGGGACAACCCCTG
ACCGTCCTTAAG

配列番号 20 :

GCGCTGACTCAGCCGGCCTCGGTGTCAGCAAACCCAGGAGAAACCGTCAAGATCACCTGCTCCGGGGGTGGTGGCAG
TAATGGCTGGTCCAGCAGAAGTCTCCTGGCAGTGCCCTGTCACTCTGATCTATAACAACAATAACAGACCCCTCGGAC
ATCCCTTACGATTCTCCGGTCCAAATCCGGCTCCACAGCCACATTAACCATCACTGGGGTCCAAGCCGAGGACGAG
GCTGTCTATTTCTGTGGGAGTGCAGACAGCAGTGTGGGATATTTGGGGCCGGGACAACCCCTGACCGTCCTTAAG

配列番号 21 :

GCGCTGACTCAGCCGGCCTCAGTGTGTCAGCAAACCTGGGAGGAACCGTCAAGATCACCTGCTCCGGGGGTGGTGGCTA
TTATGCCTGGTATCAGCAGAAGTCACTGGCAGTGCCCTGTCACTCTGATCTATTACAACAACAACAGACCCCTCGGAC
ATCCCTTACGATTCTCCGGTCCAAATCCGACTCCACGGGCACATTAACCATCACTGGGGTCCAAGCCGAGGACGAG
GCTGTCTATTTCTGTGGGAGCTACGAAGACAACAGCTATGTTGATATCTTTGGGGCCGGGACAACCCCTGACCGTCCTTA
AG

配列番号 22 :

GCGCTGACTCAGCCGTCTCGGTGTCAGCAAACCCGGGAGGAACCGTCCGAGATCACCTGCTCCGGGAGTAGTGGCAG
CTACTATGGCTGGTATCAGCAGAAGGCACCTGGCAGTGCCCTGTCACTCTGATATATGACAACACCAAGAGACCCCTCG
AATATCCCTTACGATTCTCCGGTCCATCCGGCTCTGCAAACACATTAACCATCACTGGGGTCCAAGCCGAGGACG
AGGCTGTCTATTTCTGTGGGAGTTACGACAGCAGTGTGGTTCATGGTATATATTTGGGGCCGGGACAACCCCTGACCG
TCCTTAAG

配列番号 23 :

GCGCTGACTCAGCCGTCTCGGTGTCAGCGAACCCAGGAGAAACCGTCAAGATCACCTGCTCCGGGGGTGGCAGCTA
TGCTGGAAGTTACTACTATGGCTGGTACCAGCAGAAGTCTCCTGGCAGTGCCCTGTCACTGTGATCTATGGTAACACC
GGTAGACCCCTCGAACATCCCTTACGATTCTCCGGTCCCTATCCGGCTCCACAAACACATTAACCATCACTGGGGTCC
AAGTCGAGGACGAGGCTGTCTATTACTGTGGGAGCATAGACAGCAGCACTTATGCTGCTATATTTGGGGCCGGGACAA
CCCTGACCGTCCTTAAG

配列番号 24 :

GCGCTGACTCAGCCGGCCTCGGTGTCGGTAGGCCAGGAGAAACCGTCAAGATCACCTGCTCCGGGAGTAGTGGCAG
CTACTATGGCTGGTACCAGCAGAAGTCTCCTGGCAGTGCCCTGTCACTGTGATCTATGACAACACCAAGAGACCCCTCG
AACATCCCTTACGATTCTCCGGTCCACATCTGGCTCCACAAGCACATTAACCATCACTGGGGTCCAAGCCGAGGACG
AGGCTGTCTATTTCTGTGGGAGCTACGACAGCAGTGTGGTTCATGGGATATATTTGGGGCCGGGACAACCCCTGACCG
TCCTTAAG

【 図 1 2 】

配列番号 2 5 :

GCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGGCGCCCTCCAGACGCCCGGAGGAACGCTCAGCCTCGTCTGCAAGGCCTCCGG
 GTTCGACTTCAGCAGTTATGGCATGCAGTGGGTGCGACAGGCCCGGCAAGGGGCTGGAATGGGTGCTGTTATTG
 ATGATGATGGTAGTTTCACAGCATAACGGGCCGGCGGTGGATGGCCGTGTCACCGTCTCGAGGGACAACGGGCAGAGC
 ACAGCGAGGCTGCAGCTGAACAACCTCAGGGCTGAGGACACCGGCACCTATTACTGCGCCAAGGCTGCTGGTACTGG
 TTGGGGTGGTGGTCTGGTAGTTATGGTAACATCGACGCATGGGGCCACGGGACCGAAGTCATCGTGTGACA **GGTGC**
AGGGGGCTCTGGTGGCGGTGGCAGTGGCGGGGAGGTTCTGACGTCCGCGCTGACTCAGCAGCCGGCCTCGGTGTCA
 GGAAACCCAGGAGAAACCGTCAAGATCACCTGCTCCGGGGGTGGCAGTAACAGTGGTTATGGCTGGTATCAGCAGAA
 GTCTCCCGGCAATATCCTAGTCACTGTGATCTATAACAACGACAAGAGACCCCTCGGGCATCCCTTCCCATTCTCCGGT
 TCCACATCCGGCTCCACAGCCACACTAACCATCACTGGGTCCAAGCCGACGACGAGGCTATATATTACTGTGGGAGT
 GCAGACAGCAGCGATGGTGTGGTATGTTTGGGGCCGGGACAACCCCTGACCGTCCTTAAG

配列番号 2 6 :

GCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGGCGCCCTCCAGACGCCCGGAGGAGCGCTCAGCCTCGTCTGCAAGGCCTCCG
 GGTTTGACTTCAGCAATAATGCCATGGGTGGGTGCGACAGGCCCGGCAAGGGGCTGGAGTTGCTGCGCTGGTATTG
 GCAGTTTTGGTAGATACATAGACTATGGGGCGGCGGTGAAGGGCCGTGCCACCATCTCGAGGGACGACGGGCAGAGC
 AACTGAGGCTGCAGCTGAACAACCTCAGGGCTGAGGACACCGCCACCTACTTCTGCGCCAAACATACTTGTAGTGGT
 GTTGGTGTGCTACTTGGGATGGTTATGCTGGTACCATCGACGCATGGGGCCACGGGACCGAAGTCACCGTGTGACA
GGTGGAGGGGCTCTGGTGGCGGTGGCAGTGGCGGGGAGGTTCTGACGTCCGCGCTGACTCAGCCGGCCTCGGTGT
 CAGCAAACCCAGGAGAAACCGTCAAGATCACCTGCTCCGGGGGTGGTGGCAGTAATGGCTGGTCCAGCAGAAGTCT
 CCTGGCAGTGGCCCTGTCACTCTGATCTATAACAACAATAACAGACCCCTCGGACATCCCTTACGATTCTCCGGTTCCA
 AATCCGGCTCCACAGCCACATTAACCATCACTGGGTCCAAGCCGAGGACGAGGCTGTCTATTTCTGTGGGAGTGCAG
 ACAGCAGTGTGGATATTTGGGGCCGGGACAACCCCTGACCGTCCTTAAG

配列番号 2 7 :

GCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGGCGCCCTCCAGACGCCCGGAGGAGCGCTCAGCCTCGTCTGCAAGGCCTCCG
 GGTTTGACTTCAGAAGTTACGGCATGGGCTGGGTGCGACAGGCCCGGCAAGGGGCTGGAATGGGTGCTGATATT
 GATGATGATGGTAGATATACAGACTACGCGTGGCAGTGAAGGGCCGTGCCACCATCTCGAGGGACAACGGACAGAGC
 ACAGTGAGGCTGCAGCTGGACAACCTCAGGGCTGAGGACACCGCCACCTACTACTGCGCCAAAAGTGTGTGTCTGT
 GATTACTGCTTCTGACATCGACGCATGGGGCCACGGACCGAAGTCATCGTGTGACA **GGTGGAGGGGCTCTGGTG**
GCGGTGGCAGTGGCGGGGAGGTTCTGACGTCCGCGCTGACTCAGCCGGCCTCAGTGTGAGCAAACCTGGGAGGAACC
 GTCAAGATCACCTGCTCCGGGGGTGGTGGCTATTATGCCTGGTATCAGCAGAAGTCACCTGGCAGTGGCCCTGTCACT
 CTGATCTATTACAACAACAACAGACCCCTCGGACATCCCTTACGATTCTCCGGTTCCAAATCCGACTCCACGGGCACAT
 TAACCATCACTGGGTCCAAGCCGAGGACGAGGCTGTCTATTTCTGTGGGAGCTACGAAGACAACAGCTATGTTGATAT
 CTTTGGGGCCGGGACAACCCCTGACCGTCCTTAAG

【 図 1 3 】

配列番号 2 8 :

GCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGGCCTCCAGACGCCCGGAGGAGCGCTCAGCCTCGTCTGCAAGGCCTCCG
 GATTCACCTTCAGTAGTTACGACATGGCCTGGGTGCGCCAGGCGCCCGGCAAGGGGCTGGAATTCGTGCGGGTATTT
 TTAGTGATGATAGTGACATATCATA CGGGCCGGCGGTGAAGGGCCGTGCCACCATCTCGAGGGACAACGGGCAGAGGA
 CAGTGAGGCTGCAGCTGAACAACCTCAGGGCTGAGGACACCGGCATCTACTTCTGCGCCAGAAGTCTGGTGATTTTA
 GTTATGGTAGTGGTATCGACGCATGGGGCCACGGGACCGAAGTCACCGTGTGACA **GGTGGAGGGGGCTCTGGTGGC**
GGTGGCAGTGGCGCCGAGCTTCTGACGTCGCGCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGTGAGCAAACCCGGGAGGAACCGT
 CGAGATCACCTGCTCCGGGAGTAGTGGCAGCTACTATGGCTGGTATCAGCAGAAGGCACCTGGCAGTGCCCTGTGAC
 TCTGATATATGACAACACCAAGAGACCTCGAATATCCCTTCACGATTCTCCGGTTCCTCATCCGGCTCTGCAAAACACAT
 TAACCATCACTGGGGTCCAAGCCGAGGACGAGGCTGTCTATTTCTGTGGGAGTTACGACAGCAGTGTGGTGCATGGTG
 ATATATTTGGGGCCGGGACAACCCTGACCGTCCTTAAG

配列番号 2 9 :

GCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGGCCTCCAGACGCCCGGAGGAGCGCTCAGCCTCGTCTGCAAGGCCTCCG
 GGTTTGACTTCAGCAATAATGCCATGGGTGGGTGCGACAGGCGCCCGGCAAGGGGCTGGAGTTTCGTGCGTGGTATTG
 GCAGCATTGGTAGATACATAGACTACGGGCGAGCGGTGAAGGGCCGTGCCACCATCTCGAGGGACGACGGGCAGAGC
 ACAGTGAGGCTGCAGCTGAACAACCTCAGGGCTGAGGACACCGGCATATACTACTGCGCCAAACATAGTTGTAGTGAT
 GGTTGGTGGCTACTTGGGAGGGTTATAGTGGTACCATCGACGCATGGGGCCACGGGACCGAAGTCACCGTGTGACA
GGTGGAGGGGGCTCTGGTGGCGGTGGCAGTGGCGCCGAGGTTCTGACGTCGCGCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGT
 CAGCGAACCCAGGAGAAAACCGTCAAGATCACCTGCTCCGGGGGTGGCAGCTATGCTGGAAGTTACTACTATGGCTGGT
 ACCAGCAGAAGTCTCCTGGCAGTGCCCTGTCACTGTGATCTATGGTAACACCGGTAGACCTCGAACATCCCTTCAC
 GATTCTCCGGTTCCTATCCGGCTCCACAACACATTAACCATCACTGGGGTCCAAGTCGAGGACGAGGCTGTCTATTA
 CTGTGGGAGCATAGACAGCAGCACTTATGCTGCTATATTTGGGGCCGGGACAACCCTGACCGTCCTTAAG

配列番号 3 0 :

GCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGGCCTCCAGACGCCCGGAGGAGCGCTCAGCCTCGTCTGCAAGGCCTCCG
 GATTCACCTTCAGTAGTTACGACATGGCCTGGGTGCGCCAGGCGCCCGGCAAGGGGCTGGAATTCGTGCGGGTATTT
 TTAGTGATGATAGTGACATATCATA CGGGCCGGCGGTGAAGGGCCGTGCCACCATCTCGAGGGACAACGGGCAGAGGA
 CAGTGAGGCTGCAGCTGAACAACCTCAGGGCTGAGGACACCGGCATCTACTTCTGCGCCAGAAGTCTGGTGATTTTA
 GTTATGGTAGTGGTATCGACGCATGGGGCCACGGGACCGAAGTCACCGTGTGACA **GGTGGAGGGGGCTCTGGTGGC**
GGTGGCAGTGGCGCCGAGCTTCTGACGTCGCGCTGACTCAGCCGGCCTCGGTGTCCGTAGGCCAGGAGAAAACCGT
 CAAGATCACCTGCTCCGGGAGTAGTGGCAGCTACTATGGCTGGTACCAGCAGAAGTCTCCTGGCAGTGCCCTGTGAC
 TGTGATCTATGACAACACCAAGAGACCTCGAACATCCCTTCACGATTCTCCGGTTCACATCTGGCTCCACAAGCACA
 TTAACCATCACTGGGGTCCAAGCCGAGGACGAGGCTGTCTATTTCTGTGGGAGCTACGACAGCAGTGTGGTGCATGGC
 GATATATTTGGGGCCGGGACAACCCTGACCGTCCTTAAG

【 配 列 表 】

200908207500001.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 W

(72)発明者 西道 教尚

広島県東広島市鏡山 1 丁目 4 番 4 号 国立大学法人広島大学大学院 生物圏科学研究科内

F ターム(参考) 4B024 AA11 BA43 BA44 CA04 CA07 CA10 DA02 DA06 EA04 GA03
4B064 AG27 CA02 CA19 CC24 DA13
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA76 EA50 FA74

专利名称(译)	新型抗体及其使用方法		
公开(公告)号	JP2009082075A	公开(公告)日	2009-04-23
申请号	JP2007256649	申请日	2007-09-28
[标]申请(专利权)人(译)	NAT癌症CENT		
申请(专利权)人(译)	日本健康科学基金会 国立大学法人広島大学		
[标]发明人	沢村達也 松田治男 西道教尚		
发明人	沢村 達也 松田 治男 西道 教尚		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/18 C07K16/46 C07K19/00 C12P21/08 G01N33/53		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/18 C07K16/46 C07K19/00 C12P21/08 G01N33/53.W C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA43 4B024/BA44 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/CA10 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA03 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA13 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA74		
其他公开文献	JP5298299B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种特异性识别人和啮齿动物的apoB蛋白的抗体及其使用方法。 解决方案：具有特定序列且这些序列中具有1至几个氨基酸的多肽被取代，缺失，添加或插入H链和L链可变区中的至少一个之中。 对人和啮齿动物apoB蛋白具有特异性的抗体，其特征在于包含1-2个选自多肽组成的组的多肽，其制备方法及其用途。 [选择图]图8

