

(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2005-23074

(P2005-23074A)

(43) 公開日 平成17年1月27日(2005.1.27)

(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>C12N 5/10</b>	C12P 21/08	4B064
<b>C12N 15/02</b>	GO1N 33/53 D	4B065
<b>C12P 21/08</b>	GO1N 33/577 B	4H045
<b>GO1N 33/53</b>	C12N 15/00 C	
審査請求 未請求 請求項の数 56 O L (全 28 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2004-174045 (P2004-174045)	(71) 出願人	504194719 株式会社ベネシス 大阪府大阪市中央区平野町二丁目6番9号
(22) 出願日	平成16年6月11日 (2004.6.11)	(71) 出願人	000231729 日本赤十字社 東京都港区芝大門1丁目1番3号
(31) 優先権主張番号	特願2003-166824 (P2003-166824)	(71) 出願人	000231648 日本製薬株式会社 東京都千代田区東神田1丁目9番8号
(32) 優先日	平成15年6月11日 (2003.6.11)	(71) 出願人	000231796 日本臓器製薬株式会社 大阪府大阪市中央区平野町2丁目1番2号
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(71) 出願人	000173555 財団法人化学及血清療法研究所 熊本県熊本市大窪一丁目6番1号 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗ヒトプリオン抗体

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 ヒトの異常型プリオン蛋白質に結合する抗体およびその調製方法を提供する。

【解決手段】 ヒトプリオン蛋白質と結合する抗体であって、特定の配列における所定のアミノ酸配列またはその一部の配列がエピトープの構成部分として含まれることを特徴とする前記抗体、その調製方法、該抗体を使用する異常型プリオン蛋白質検出システム。

【選択図】 なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

ヒトプリオン蛋白質と結合する抗体であって、配列表の配列番号 42 における第 43 ~ 62 番目のアミノ酸配列またはその一部の配列が、エピトープの構成部分として含まれることを特徴とする前記抗体。

**【請求項 2】**

モノクローナル抗体であり、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに受託番号 F E R M P - 1 9 3 4 9 として寄託されるモノクローナル抗体産生ハイブリドーマから調製される請求項 1 記載の抗体。

**【請求項 3】**

ヒトプリオン蛋白質と結合する抗体であって、配列表の配列番号 42 における第 158 ~ 172 番目のアミノ酸配列またはその一部の配列が、エピトープの構成部分として含まれることを特徴とする前記抗体。

**【請求項 4】**

モノクローナル抗体であり、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに受託番号 F E R M P - 1 9 3 6 6 として寄託されるモノクローナル抗体産生ハイブリドーマから調製される請求項 3 記載の抗体。

**【請求項 5】**

ヒトプリオン蛋白質と結合する抗体であって、配列表の配列番号 42 における第 43 ~ 62 番目のアミノ酸配列またはその一部の配列、第 153 ~ 167 番目のアミノ酸配列またはその一部の配列、第 158 ~ 172 番目のアミノ酸配列またはその一部の配列、第 163 ~ 177 番目のアミノ酸配列またはその一部の配列および第 213 ~ 227 番目のアミノ酸配列またはその一部の配列が、エピトープの構成部分として含まれることを特徴とする前記抗体。

**【請求項 6】**

エピトープが、立体配置的（コンフォメーション）エピトープであることを特徴とする請求項 5 記載の抗体。

**【請求項 7】**

モノクローナル抗体であり、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに受託番号 F E R M P - 1 9 3 4 6 として寄託されるモノクローナル抗体産生ハイブリドーマまたは受託番号 F E R M P - 1 9 3 4 8 として寄託されるモノクローナル抗体産生ハイブリドーマから調製される請求項 5 または 6 記載の抗体。

**【請求項 8】**

ヒトプリオン蛋白質と結合する抗体であって、配列表の配列番号 42 における第 43 ~ 62 番目のアミノ酸配列またはその一部の配列および第 158 ~ 172 番目のアミノ酸配列またはその一部の配列が、エピトープの構成部分として含まれることを特徴とする前記抗体。

**【請求項 9】**

エピトープが、立体配置的（コンフォメーション）エピトープであることを特徴とする請求項 8 記載の抗体。

**【請求項 10】**

モノクローナル抗体であり、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに受託番号 F E R M P - 1 9 3 4 7 として寄託されるモノクローナル抗体産生ハイブリドーマから調製される請求項 8 または 9 記載の抗体。

**【請求項 11】**

ヒトプリオン蛋白質と結合する抗体であって、配列表の配列番号 42 における第 153 ~ 167 番目のアミノ酸配列またはその一部の配列、第 158 ~ 172 番目のアミノ酸配列またはその一部の配列、第 163 ~ 177 番目のアミノ酸配列またはその一部の配列および第 213 ~ 227 番目のアミノ酸配列またはその一部の配列が、エピトープの構成部分として含まれることを特徴とする前記抗体。

10

20

30

40

50

## 【請求項 1 2】

エピトープが、立体配置的（コンフォメーション）エピトープであることを特徴とする請求項 1 1 記載の抗体。

## 【請求項 1 3】

モノクローナル抗体であり、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに受託番号 F E R M P - 1 9 3 6 5 として寄託されるモノクローナル抗体産生ハイブリドーマから調製される請求項 1 1 または 1 2 記載の抗体。

## 【請求項 1 4】

ヒトプリオン蛋白質と結合する抗体であって、配列表の配列番号 4 2 における第 1 3 5 ~ 1 7 4 番目のアミノ酸配列上のエピトープを認識することを特徴とする前記抗体。

10

## 【請求項 1 5】

ヒトプリオン蛋白質と結合する抗体であって、配列表の配列番号 4 2 における第 1 4 3 ~ 1 5 2 番目のアミノ酸配列またはその一部の配列が、エピトープの構成部分として含まれることを特徴とする請求項 1 4 記載の抗体。

## 【請求項 1 6】

モノクローナル抗体であり、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに受託番号 F E R M P - 1 9 3 4 3 として寄託されるモノクローナル抗体産生ハイブリドーマから調製される請求項 1 4 または 1 5 記載の抗体。

## 【請求項 1 7】

ヒトプリオン蛋白質と結合する抗体であって、配列表の配列番号 4 2 における第 1 3 5 ~ 2 2 4 番目のアミノ酸配列上のエピトープを認識することを特徴とする前記抗体。

20

## 【請求項 1 8】

配列表の配列番号 4 2 における第 1 3 5 ~ 1 4 9 番目のアミノ酸配列またはその一部の配列および第 2 0 8 ~ 2 1 6 番目のアミノ酸配列またはその一部の配列が、エピトープの構成部分として含まれることを特徴とする請求項 1 7 記載の抗体。

## 【請求項 1 9】

エピトープが、立体配置的（コンフォメーション）エピトープであることを特徴とする請求項 1 7 または 1 8 記載の抗体。

## 【請求項 2 0】

モノクローナル抗体であり、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに受託番号 F E R M P - 1 9 3 4 4 として寄託されるモノクローナル抗体産生ハイブリドーマから調製される請求項 1 7 ないし 1 9 のいずれかに記載の抗体。

30

## 【請求項 2 1】

ヒトプリオン蛋白質と結合する抗体であって、配列表の配列番号 4 2 における第 1 6 3 ~ 2 2 4 番目のアミノ酸配列上のエピトープを認識することを特徴とする前記抗体。

## 【請求項 2 2】

配列表の配列番号 4 2 における第 1 7 1 ~ 2 1 6 番目のアミノ酸配列またはその一部の配列が、エピトープの構成部分として含まれることを特徴とする請求項 2 1 記載の抗体。

## 【請求項 2 3】

配列表の配列番号 4 2 における第 1 7 1 ~ 1 7 9 番目のアミノ酸配列またはその一部の配列および第 2 0 8 ~ 2 1 6 番目のアミノ酸配列またはその一部の配列が、エピトープの構成部分として含まれることを特徴とする請求項 2 1 記載の抗体。

40

## 【請求項 2 4】

エピトープが、立体配置的（コンフォメーション）エピトープであることを特徴とする請求項 2 1 ないし 2 3 のいずれかに記載の抗体。

## 【請求項 2 5】

モノクローナル抗体であり、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに受託番号 F E R M P - 1 9 3 4 2 として寄託されるモノクローナル抗体産生ハイブリドーマから調製される請求項 2 1 ないし 2 4 のいずれかに記載の抗体。

## 【請求項 2 6】

50

ヒトプリオン蛋白質と結合する抗体であって、配列表の配列番号 42 における第 163 ~ 197 番目のアミノ酸配列上のエピトープを認識することを特徴とする前記抗体。

【請求項 27】

配列表の配列番号 42 における第 163 ~ 171 番目のアミノ酸配列またはその一部の配列および第 186 ~ 197 番目のアミノ酸配列またはその一部の配列が、エピトープの構成部分として含まれることを特徴とする請求項 26 記載の抗体。

【請求項 28】

エピトープが、立体配置的（コンフォメーション）エピトープであることを特徴とする請求項 26 または 27 記載の抗体。

【請求項 29】

モノクローナル抗体であり、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに受託番号 F E R M P - 19345 として寄託されるモノクローナル抗体産生ハイブリドーマから調製される請求項 26 ないし 28 のいずれかに記載の抗体。

【請求項 30】

ヒトプリオン蛋白質が、異常型であることを特徴とする請求項 1 ないし 29 のいずれかに記載の抗体。

【請求項 31】

標識物質で標識された請求項 1 ないし 30 のいずれかに記載の抗体。

【請求項 32】

標識物質がビオチン、サイダイ（Cydye）、フルオレセインイソチオシアネートまたはローダミンであることを特徴とする請求項 31 記載の抗体。

【請求項 33】

標識物質がペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、ガラクトシダーゼ、グルコシダーゼまたはルーシフェラーゼであることを特徴とする請求項 31 記載の抗体。

【請求項 34】

不溶性の組換え型ヒトプリオン蛋白質を免疫して得られる脾臓細胞とミエローマ細胞との間で細胞融合を行い、得られる融合細胞からモノクローナル抗体産生細胞をスクリーニングすることを特徴とする、抗ヒトプリオン抗体の調製方法。

【請求項 35】

不溶性の組換え型ヒトプリオン蛋白質が、配列表の配列番号 41 記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドであることを特徴とする請求項 34 記載の調製方法。

【請求項 36】

ヒトの異常型プリオン蛋白質と結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項 37】

不溶性の組換え型ヒトプリオン蛋白質を免疫して得られる脾臓細胞とミエローマ細胞との間で細胞融合を行うことによって得られたものである、請求項 36 記載のハイブリドーマ。

【請求項 38】

該モノクローナル抗体が認識・結合するエピトープが、配列表の配列番号 42 における第 43 ~ 62 番目のアミノ酸配列またはその一部の配列を含む、請求項 36 または 37 に記載のハイブリドーマ。

【請求項 39】

独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに受託番号 F E R M P - 19349 として寄託されている、請求項 38 に記載のハイブリドーマ。

【請求項 40】

該モノクローナル抗体が認識・結合するエピトープが、配列表の配列番号 42 における第 158 ~ 172 番目のアミノ酸配列またはその一部の配列を含む、請求項 36 または 37 に記載のハイブリドーマ。

【請求項 41】

10

20

30

40

50

独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに受託番号 F E R M P - 1 9 3 6 6 として寄託されている、請求項 4 0 に記載のハイブリドーマ。

【請求項 4 2】

該モノクローナル抗体が認識・結合するエピトープが、配列表の配列番号 4 2 における第 4 3 ~ 6 2 番目のアミノ酸配列またはその一部の配列、第 1 5 3 ~ 1 6 7 番目のアミノ酸配列またはその一部の配列、第 1 5 8 ~ 1 7 2 番目のアミノ酸配列またはその一部の配列、第 1 6 3 ~ 1 7 7 番目のアミノ酸配列またはその一部の配列および第 2 1 3 ~ 2 2 7 番目のアミノ酸配列またはその一部の配列を含む、請求項 3 6 または 3 7 に記載のハイブリドーマ。

【請求項 4 3】

10

独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに受託番号 F E R M P - 1 9 3 4 6 としてまたは受託番号 F E R M P - 1 9 3 4 8 として寄託されている、請求項 4 2 に記載のハイブリドーマ。

【請求項 4 4】

該モノクローナル抗体が認識・結合するエピトープが、配列表の配列番号 4 2 における第 4 3 ~ 6 2 番目のアミノ酸配列またはその一部の配列および第 1 5 8 ~ 1 7 2 番目のアミノ酸配列またはその一部の配列を含む、請求項 3 6 または 3 7 に記載のハイブリドーマ。

【請求項 4 5】

20

独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに受託番号 F E R M P - 1 9 3 4 7 として寄託されている、請求項 4 4 に記載のハイブリドーマ。

【請求項 4 6】

該モノクローナル抗体が認識・結合するエピトープが、配列表の配列番号 4 2 における第 1 5 3 ~ 1 6 7 番目のアミノ酸配列またはその一部の配列、第 1 5 8 ~ 1 7 2 番目のアミノ酸配列またはその一部の配列、第 1 6 3 ~ 1 7 7 番目のアミノ酸配列またはその一部の配列および第 2 1 3 ~ 2 2 7 番目のアミノ酸配列またはその一部の配列を含む、請求項 3 6 または 3 7 に記載のハイブリドーマ。

【請求項 4 7】

30

独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに受託番号 F E R M P - 1 9 3 6 5 として寄託されている、請求項 4 6 に記載のハイブリドーマ。

【請求項 4 8】

該モノクローナル抗体が認識・結合するエピトープが、配列表の配列番号 4 2 における第 1 3 5 ~ 1 7 4 番目のアミノ酸配列中に含まれる、請求項 3 6 または 3 7 に記載のハイブリドーマ。

【請求項 4 9】

独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに受託番号 F E R M P - 1 9 3 4 3 として寄託されている、請求項 4 8 に記載のハイブリドーマ。

【請求項 5 0】

40

該モノクローナル抗体が認識・結合するエピトープが、配列表の配列番号 4 2 における第 1 3 5 ~ 2 2 4 番目のアミノ酸配列中に含まれる、請求項 3 6 または 3 7 に記載のハイブリドーマ。

【請求項 5 1】

独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに受託番号 F E R M P - 1 9 3 4 4 として寄託されている、請求項 5 0 に記載のハイブリドーマ。

【請求項 5 2】

該モノクローナル抗体が認識・結合するエピトープが、配列表の配列番号 4 2 における第 1 6 3 ~ 2 2 4 番目のアミノ酸配列中に含まれる、請求項 3 6 または 3 7 に記載のハイブリドーマ。

【請求項 5 3】

50

独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに受託番号 F E R M P - 1 9

342として寄託されている、請求項52に記載のハイブリドーマ。

【請求項54】

該モノクローナル抗体が認識・結合するエピトープが、配列表の配列番号42における第163～197番目のアミノ酸配列中に含まれる、請求項36または37に記載のハイブリドーマ。

【請求項55】

独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに受託番号FERMP-19345として寄託されている、請求項54に記載のハイブリドーマ。

【請求項56】

請求項1ないし30のいずれかに記載の抗体若しくは請求項31ないし33のいずれかに記載の標識抗体、またはこれらの組み合わせからなる抗体を使用することを特徴とする異常型プリオン検出システム。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒトプリオン蛋白質に特異的に結合する抗ヒトプリオン抗体に関する。更に詳細には、不溶性の組換え型ヒトプリオン蛋白質を抗原として免疫されたマウスの脾臓細胞をマウスミエロマ細胞と細胞融合して得られるモノクローナル抗体産生細胞、該モノクローナル抗体産生細胞が生産する抗異常型ヒトプリオン抗体およびこれらの調製方法に関する。

20

【背景技術】

【0002】

クロイツフェルト・ヤコブ病（以下、「CJD」と称することもある）は、100万人に1人の割合で孤発性または家族性に生じ、脳組織の海綿（スポンジ）状変性を特徴とする疾患である。CJDは1920年代初頭、ドイツの神経病理学者クロイツフェルトとヤコブによって記述された。現在では成因からプリオン病、また病理から伝達性海綿状脳症（transmissible spongiform encephalopathy；「TSE」）として哺乳類の神経疾患群にひとくくりにされている。近年、プリオン病またはTSEの感染性がクローズアップされ、社会的に認知されている。

【0003】

プリオンとは蛋白質性感染粒子（proteinaceous infectious particle）のことで、TSEの核酸を含まない感染性病原体をさす造語で、米国のプルシナー博士によって1982年に提唱された。プルシナー博士は10年の歳月をかけ、プリオン病の罹患脳から幅4nm、長さ数100nm程度の感染性の微細線維状物質を濃縮していき、プリオン説を唱えるに到った。この微細線維状物質は、現在、宿主プリオン蛋白質が異常構造体へ変換され、凝集することによって形成されていると考えられている。

30

【0004】

プリオン病では、異常構造を有する異常プリオン蛋白質が中枢神経系に蓄積し、不可逆的な致死性神経障害を生じる。ヒトプリオン病の大半を占めるのは孤発性CJDである。プリオンには感染性があり、感染性プリオン病としてクールー（Kuru）、（新）変異型CJD（new variant CJD；「vCJD」）、移植後CJDがある。1996年に英国で発表され、ヨーロッパおよび世界中をパニックに陥れたのはvCJDである。これは牛海綿状脳症（bovine spongiform encephalopathy；「BSE」）に起因していると考えられている。一方、プリオン遺伝子に変異を持ち、異常プリオン蓄積の原因となる疾患に遺伝性CJD、クールー斑状沈着を特徴とするゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー症候群（GSS）、致死性家族性不眠症（fatal familial insomnia；「FFI」）などがある。

40

【0005】

動物のプリオン病には、18世紀にすでに知られていたヒツジのスクレイピー（scrapie）、シカ慢性消耗病（chronic wasting disease；「CWD」）、ミンク伝達性脳症（T

50

ME)、日本でも7頭見つかっているBSE、ネコ海綿状脳症(FSE)などがある。

プリオン病の病因は、神経細胞表面にある可溶性の正常プリオン蛋白質が異常構造体へ変換後、不溶性となった異常プリオン蛋白質の蓄積が生じ、神経細胞が変性した結果であるといわれている。プリオン蛋白質(prion protein)は、正常型(細胞型)プリオン蛋白質と異常型(感染型)プリオン蛋白質に分類されている。正常型プリオン蛋白質はC末端部で細胞膜へ連なり、正常型から異常型への変換は細胞膜上、または細胞質への再取り込み後に起こると考えられている。異常型プリオン蛋白質の形成は正常型プリオン蛋白質の構造的な変換によって生じるので、異常型プリオン蛋白質の集積には正常型プリオン蛋白質の存在が不可欠である。正常型プリオン蛋白質に多いらせん状構造(ヘリックス)が板状構造(シート)へ変換した結果、異常型プリオン蛋白質になる。この構造変換によってプリオン蛋白質は伝達性を獲得すると考えられている。

10

#### 【0006】

異常構造の伝達は、種々の宿主因子が関与しながら、異常構造体を核として正常プリオン蛋白質が変換され凝集体が形成されていく数種のモデルによって説明されている。この構造変換に伴い、プリオン蛋白質は伝達性に加え蛋白質分解酵素耐性を獲得する。

#### 【0007】

プリオン蛋白質は253個のアミノ酸より構成されており、その全アミノ酸配列(配列番号42)もすでに知られており(例えば、非特許文献1参照)、ヒトのプリオン蛋白質遺伝子はヒト第20染色体の短腕上に存在し、単一エクソンからなる。

#### 【0008】

20

CJDの診断・治療の新しい展開は以下のとおりである。

#### (1) キナクリンの治験開始

異常プリオンの持続感染細胞を用いた研究でアクリジンの誘導体で抗マラリア薬のキナクリンがプリオンの増殖を抑制するとの報告がなされている(例えば、非特許文献2参照)。変異型CJDの患者1例にキナクリンを投与したところ臨床症状の改善がみられたとの非公式報告もなされている。現在、米国と英国において臨床治験が開始されている。

#### 【0009】

#### (2) 抗プリオン抗体によるプリオン増殖の抑制

プリオン構成蛋白質の中、抗原性のあるフラグメントを合成し、これに対する抗体が作製されている。この抗体を異常プリオン持続感染細胞の培養液に添加したところ、プリオンの増殖が顕著に抑制されたとして、将来、CJD患者への応用が期待されている(例えば、非特許文献3参照)。

30

#### 【0010】

#### (3) protein-misfolding cyclic amplification(PMCA)による微量異常プリオン蛋白質の検出法

異常プリオン蛋白質を微量に含む組織と正常プリオン蛋白質とを混和し、ついで超音波処理して分解する。この混和、超音波処理を繰り返すことによって高感度に異常プリオン蛋白質を検出することができる(例えば、非特許文献4参照)。

#### 【0011】

#### (4) プリオン病における赤芽球分化関連因子(EDRF)のRNAの減少: 早期診断への応用

40

異常プリオン感染動物では接種の早期から脾臓中のEDRF RNAの発現が特異的に減少することが報告されており、早期診断への応用が期待されている(例えば、非特許文献5参照)

#### 【0012】

輸血、血漿分画製剤、あるいは臓器移植において、クロイツフェルト・ヤコブ病の病原体による汚染を防ぐことは医療上重要なことである。それには、抗原抗体反応を利用して、CJDに関与するとされる異常型ヒトプリオンを検出するスクリーニング試験が有用である。

#### 【0013】

50

ところで、正常型ヒトプリオンには様々な遺伝的多型が知られている。また異常型プリオン蛋白質には、異なるコンホメーションを取っているものが複数存在すると考えられている(例えば、非特許文献6参照)。従って、十数残基程度の短いアミノ酸配列を認識する抗体を1種類用いるのみでは、野外に存在する異常型ヒトプリオン蛋白質をもれなく検出することはできない。特異度の高いスクリーニング試験を実施するためには、プリオン蛋白質上の異なる領域を認識する抗体を複数用いることが必要である。それらの抗体が認識する部位は遺伝的多型がない領域であることが望ましい。また、同一のアミノ酸配列を認識する抗体であっても、異常型プリオンの株により反応性が相互に異なるものであれば、それらの抗体は併用する意味がある。

#### 【0014】

ヒトプリオン蛋白質に対するモノクローナル抗体「3B5」、「3F4」、「6H4」、および「12F10」が、それぞれヒトプリオン蛋白質の部分アミノ酸配列(配列番号42におけるアミノ酸番号54~69、109~111、144~152、および150~165)に結合することを示唆する記載がある(例えば、非特許文献7~10参照)。また、それぞれヒトのヒトプリオン蛋白質の部分アミノ酸配列(配列番号42におけるアミノ酸番号86~114、80~98)に特異的に結合する抗体が開示されている(例えば、特許文献1および2参照)。

#### 【0015】

今日では、細胞、動物組織・体液等から遺伝子を抽出、クローニングし、目的の遺伝子を増幅し、得られた目的遺伝子を微生物に生産させる、などの基本的な遺伝子組換え技術(例えば、非特許文献11参照)に基づき、遺伝子クローニング・発現ベクターを始めとする種々の遺伝子研究試薬やキットが開発・市販されている。

#### 【0016】

また、モノクローナル抗体を作製するための細胞融合技術(例えば、非特許文献10参照)は、診断やスクリーニング試薬の研究・開発に広く利用されており、モノクローナル抗体をスクリーニングするためのELISA法、RIA法、ウェスタンブロット法など種々の検出方法およびこれらの技術に適用するための様々な標識試薬も多数開発されている。

#### 【0017】

【特許文献1】特表平7-501798号公報

【特許文献2】特開2000-60551号公報

【非特許文献1】クレツシュマル(Kretzschmar HA, et al.), "DNA", 1986, 5, p. 315-324

【非特許文献2】"Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America", 2001, 98: p.9836-41

【非特許文献3】"Nature", 2001, 412: p.739

【非特許文献4】"Nature" 2001, 411: p.810

【非特許文献5】"Nature Medicine", 2001, 7: p.361

【非特許文献6】ファイファー(Pfeifer, A.)ら、"Science", 1996, 274: p.2079-2082

【非特許文献7】クレースマン(Krasemann, S.)ら、"Journal of Immunological Methods", 1996, 199: p.109-111

【非特許文献8】カザック(Kacsak, R. J.)ら、"Journal of Virology", 1987, 61: p.3688-3693

【非特許文献9】コース(Korth, C.)ら、"Nature", 1997, 390: p.74-77

【非特許文献10】クレースマン(Krasemann, S.)ら、"Molecular Medicine", 1996, 2: p.725-734

【非特許文献11】サムブルック(Sambrook et al.), "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", 第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989

【非特許文献12】ミルシュタイン(Milstein), "Method in Enzymology", 1981, 73,

10

20

30

40

50

p.3-46

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0018】

上述したように、異常型プリオン蛋白質は、可溶性の正常型プリオン蛋白質が構造変化を起こし、凝集することによって形成されると考えられている。したがって、不溶性のプリオン蛋白質を免疫抗原として用いることにより、異常型プリオン蛋白質を認識する抗体を取得できることが期待される。

【0019】

本発明の目的は、ヒトプリオン蛋白質、特にヒトの異常型プリオン蛋白質に結合する抗体およびその調製方法を提供することにある。 10

【0020】

また、本発明の他の目的は、疑陰性の少ない異常型プリオン蛋白質の検出システムを構築するための材料を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0021】

本発明者らは、上記の目的を達成するために鋭意研究を重ねた結果、不溶性の組換え型ヒトプリオン蛋白質（以下、「rhPrP」と称することもある）で免疫されたマウスの脾臓細胞とマウスミエローム細胞とを細胞融合してモノクローナル抗体産生細胞を得、該モノクローナル抗体産生細胞から生産されるモノクローナル抗体を用いて、ウェスタンブロット法および免疫組織染色法により、CJD発症脳組織との反応性を調べたところ、陽性であることを見出し、本発明を完成するに至った。 20

【0022】

したがって、本発明は、CJD発症脳組織、すなわち、ヒトの異常型プリオンと結合するモノクローナル抗体を包含する。

【0023】

また、本発明は、不溶性のrhPrPで免疫されたマウス脾臓細胞を用いたヒトの異常型プリオン蛋白質に結合するモノクローナル抗体の調製方法を包含する。

【0024】

本発明はさらに、ヒトの異常型プリオンと結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、とりわけ不溶性の組換え型ヒトプリオン蛋白質を免疫して得られる脾臓細胞とミエローム細胞との間で細胞融合を行うことによって得られるハイブリドーマをも包含する。 30

【0025】

また、本発明は、上記モノクローナル抗体を用いた免疫学的手法によるヒトの異常型プリオンの検出方法を包含する。

【0026】

また、本発明は、好ましい態様として以下の抗体を包含する。

(1) ヒトプリオン蛋白質と結合する抗体であって、配列表の配列番号42における第43～62番目のアミノ酸配列またはその一部の配列が、エピトープの構成部分として含まれることを特徴とする前記抗体(100A1)； 40

(2) ヒトプリオン蛋白質と結合する抗体であって、配列表の配列番号42における第158～172番目のアミノ酸配列またはその一部の配列が、エピトープの構成部分として含まれることを特徴とする前記抗体(125A)；

(3) ヒトプリオン蛋白質と結合する抗体であって、配列表の配列番号42における第43～62番目のアミノ酸配列またはその一部の配列、第153～167番目のアミノ酸配列またはその一部の配列、第158～172番目のアミノ酸配列またはその一部の配列、第163～177番目のアミノ酸配列またはその一部の配列および第213～227番目のアミノ酸配列またはその一部の配列が、エピトープの構成部分として含まれることを特徴とする前記抗体(63A1；66A1)；

(4) ヒトプリオン蛋白質と結合する抗体であって、配列表の配列番号42における第43～62番目のアミノ酸配列またはその一部の配列および第158～172番目のアミノ酸配列またはその一部の配列が、エピトープの構成部分として含まれることを特徴とする前記抗体(64A)；

(5) ヒトプリオン蛋白質と結合する抗体であって、配列表の配列番号42における第153～167番目のアミノ酸配列またはその一部の配列、第158～172番目のアミノ酸配列またはその一部の配列、第163～177番目のアミノ酸配列またはその一部の配列および第213～227番目のアミノ酸配列またはその一部の配列が、エピトープの構成部分として含まれることを特徴とする前記抗体(82A1)；

(6) ヒトプリオン蛋白質と結合する抗体であって、配列表の配列番号42における第135～174番目のアミノ酸配列上のエピトープを認識することを特徴とする前記抗体(5A1)；

(7) ヒトプリオン蛋白質と結合する抗体であって、配列表の配列番号42における第135～224番目のアミノ酸配列上のエピトープを認識することを特徴とする前記抗体(9A1)；

(8) ヒトプリオン蛋白質と結合する抗体であって、配列表の配列番号42における第163～224番目のアミノ酸配列上のエピトープを認識することを特徴とする前記抗体(4A1)；および

(9) ヒトプリオン蛋白質と結合する抗体であって、配列表の配列番号42における第163～197番目のアミノ酸配列上のエピトープを認識することを特徴とする前記抗体(12A1)。

#### 【発明の効果】

##### 【0027】

本発明による抗ヒトプリオン抗体は、ヒトプリオン蛋白質のアミノ酸配列上の新規なエピトープを認識し、ヒトの異常型プリオン蛋白質に対して安定した反応性を有する。このように新規なエピトープを認識する本発明抗体は、不溶性のプリオン蛋白質を免疫抗原として用いることによって得ることができた。

##### 【0028】

本発明の抗ヒトプリオン抗体はまた、ウエスタンブロット法および免疫組織染色法によりCJD発症脳組織との反応性を調べた結果、陽性を示し、異常型プリオン蛋白質の検出に利用できることが示された。

##### 【0029】

さらに、本発明の抗ヒトプリオン抗体を用いてサンドイッチELISAアッセイを行ったところ、組換えヒトプリオン蛋白質を高感度で検出することができた。

##### 【0030】

ヒトプリオン蛋白質には様々な遺伝的多型が知られており、また異常型プリオン蛋白質には異なるコンホメーションをとっているものが複数存在すると考えられている。このため、1種類の抗体を用いた検出系では異常型プリオン蛋白質を漏れなく検出することはできず、様々なエピトープを認識する新規な抗体が望まれていた。本発明は、このような様々なエピトープを認識する抗ヒトプリオン抗体を提供するものであり、これまでの既知の抗体とは異なるエピトープを認識し、その認識部位は既知抗体には少ないプリオンの構造変化に影響を与えるC末端側の領域である抗体も多い。

##### 【0031】

また、本発明による抗ヒトプリオン抗体には立体構造を認識するものも含まれており、立体構造の変化により正常型から異常型に変わるプリオンを検出するのに有効である。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

##### 【0032】

以下、本発明について詳述する。

本発明の方法は、不溶性の組換え型ヒトプリオン蛋白質で免疫されたマウスの脾臓細胞とマウスミエローマ細胞とを細胞融合し、ヒトプリオンと結合するモノクローナル抗体産

生細胞をスクリーニングすることを特徴とするものである。この方法を実施することにより、異常型プリオン蛋白質に結合する抗体を取得することができる。

【0033】

ヒトプリオン蛋白質をコードするcDNAは、常法に従って、以下のように調製される。まず、ヒト脳遺伝子ライブラリーから全RNAを抽出し、この中からmRNAを精製する。得られたmRNAをcDNAに変換した後、大腸菌に導入する。大腸菌コロニーの中からヒトプリオン蛋白質をコードするcDNAを含有するクローンを選択する。該クローンの選択は、標識したヒトプリオン蛋白質をコードする遺伝子断片または合成ヌクレオチドをプローブとしてハイブリダイゼーションにより行うことができる。上記の全RNAの抽出には、市販のTRIzol試薬(インビトロジェン社)、ISOGEN(ニッポンジーン社)、St 10  
rataPrep Total RNA Purification Kit(東洋紡)等の試薬、mRNAの精製には、mRNA Purification Kit(アマシャムバイオサイエンス社)、Poly(A) Quick mRNA Isolation Kit(東洋紡)、mRNA Separator Kit(クロンテック社)などのキット、cDNAへの変換には、SuperScript plasmid system for cDNA synthesis and plasmid cloning(インビトロジェン社)、cDNA Synthesis Kit(宝酒造)、SMART PCR cDNA Synthesis & Library Construction Kits(クロンテック社)、Directionary cDNA Library Construction Systems(ノバジェン社)などのcDNAライブラリー作製キットがそれぞれ使用される。

【0034】

また、ヒトプリオン蛋白質をコードするcDNAの塩基配列は、DNAシーケンサー(例えば、アプライド・バイオシステムズ(Applied Biosystems)377型)により決定す 20  
ることができる。配列表の配列番号41は、本発明で使用したcDNAの塩基配列から推測されるアミノ酸配列を示す。

【0035】

このようにして得られたヒトプリオン蛋白質をコードするcDNAを、宿主に導入し、可溶性蛋白質との融合蛋白質として発現させる。

【0036】

上記の宿主として、大腸菌、酵母、動物細胞、植物細胞、枯草菌および昆虫細胞などを挙げることができるが、好ましくは、大腸菌である。発現ベクターのプロモータ、マーカ 30  
ー遺伝子などは、使用する宿主によって適宜選択される。

【0037】

可溶性の融合蛋白質としては、マルトース結合蛋白質、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)、プロテインAおよびアルブミン等の蛋白質が挙げられるが、好ましくは、マルトース結合蛋白質である。大腸菌を宿主とする場合は、発現ベクターとして、例えば、マルトース結合蛋白質(以下、「MBP」と称すること 30  
もある)発現ベクター(pMALc2x、New England Biolab社製)が挙げられる。配列番号41に記載のアミノ酸配列をコードするcDNAを挿入したMBP発現ベクターで大腸菌(JM109株、BL21株等)を形質転換し、ヒトプリオン蛋白質を生産する形質転換大腸菌を培養することにより、MBP-ヒトプリオン蛋白質(以下、「MBP-PrP」と称することもある)の融合蛋白質を生産する組換え型大腸菌を得ることができる。上記の一連の操作は、pMALc2xキットに添付の方法に従って行われる。得られたMBP-PrP産生大腸 40  
菌は、通常使用される組換え型大腸菌の培養条件下で培養した後、遠心分離することによって回収される。

【0038】

MBP-PrPの精製は、蛋白質化学において通常使用される方法、例えば、塩析法、限外ろ過法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等を適宜選択して行えば良い。より 40  
具体的には、MBP-PrP産生大腸菌を破碎し、遠心分離により上清を採取し、これをアミロースレジンに接触させてMBP-PrPを吸着させる。洗浄後、マルトース含有緩衝液でMBP-PrPを溶出させる。

【0039】

10

20

30

40

50

得られた可溶性のMBP-PrPは、不溶性のヒトプリオン蛋白質とするために、活性化第X因子で処理される。この処理によって、切断されたPrPは不溶化して沈殿し、MBPは上清中に残る。不溶性のPrPは、適当な緩衝液を用いて懸濁と遠心分離を繰り返すことによって精製される。

【0040】

ヒトプリオン蛋白質をコードするcDNAの5'側または3'側を適当な制限酵素またはエキソヌクレアーゼで除去したcDNAを用いれば、N末側またはC末側が欠失した切断型ヒトプリオン蛋白質を生産することができる。こうして得られる種々の長さの切断型ヒトプリオン蛋白質は、後述のエピトープマッピングに使用される。

【0041】

マウスの免疫は、一般的な方法により、例えば、上記の不溶性のPrPを、通常のアジュバントと併用して、マウスに腹腔内投与、皮下投与、皮内投与あるいは静脈内投与することにより行われる。免疫に用いるマウスは、マウスプリオン蛋白質を発現している通常のマウスまたはマウスプリオン遺伝子が除去されたノックアウトマウスのいずれでもよい。

【0042】

ノックアウトマウスは、マウスプリオン蛋白質遺伝子のエクソン3を含むEcoRIフラグメント(約2kbpで蛋白翻訳領域を含む)をpgk-neo遺伝子に置換したベクターを用いて、相同組換えを行うことにより作製することができる。

【0043】

アジュバントとしては、フロイントの完全・不完全アジュバント、水酸化アルミゲルなどを使用できるが、好ましくは、フロイントの不完全アジュバントである。より具体的には、不溶性のPrPとフロイントの不完全アジュバントとを等量混合してエマルジョンにした後、これを免疫抗原として、7週令のBalb/c雌マウスに皮下に投与し、1週間後に同様に調製した抗原を皮下に2回追加投与する。免疫の程度は、最終投与後の各マウスの尾血管から採血し、この血液中の抗体価の上昇を確認することによって行われる。抗体価の測定は、通常使用されるELISA法、RIA法、ウェスタンブロット法などの方法に従って行えば良い。

【0044】

マウスミエロマ細胞としては、NS1-Ag4/1、P3X63-Ag8.U1、X63-Ag8.653などが使用される。不溶性のPrPで免疫されたマウスの脾臓細胞とマウスミエロマとの融合反応は、ミルシュタインらの方法(ミルシュタイン、"Method in Enzymology", 73, 1981, p.3-46)に準じて行うことができる。すなわち、融合反応は、リンパ細胞の培養に通常用いられる培地、例えば、RPMI1640培地中に、約 $10^7$ 個のマウスミエロマ細胞、マウスミエロマ細胞に対して1~10倍程度の脾臓細胞および融合促進剤として30~50%(W/V)濃度のポリエチレングリコール(分子量1,000~6,000)を含む懸濁液を37℃で加温することにより行われる。

【0045】

ハイブリドーマは、未融合細胞が死滅するのに十分な時間、通常数日~数週間、HAT(ヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン)培地中で培養することにより得られる。このようにして得られるハイブリドーマに対し、その培養上清を用いて、上述の抗体価測定方法に従い、目的とする抗体産生株の選択およびクローン化が行われる。より具体的には、MBP-PrPまたはPrP固相化プレートとMBP固相化プレートを用いたELISA法を行うことにより、rhPrPに特異的なモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマを取得できる。

【0046】

異常型プリオン蛋白質に対する結合性は、CJD発症脳組織に対するウェスタンブロット分析またはCJD発症脳組織切片を用いた免疫学的染色を行うことにより確認される。CJD発症脳組織として、CJD患者または人工的にCJDを発症させたトランスジェニック動物の脳組織が使用される。トランスジェニック動物のCJD発症脳組織は、例えば

10

20

30

40

50

、ヒトプリオン蛋白質を発現しているトランスジェニックマウスにCJD病原体を脳内接種し、発症後の脳組織を採取することにより得られる。

【0047】

ウェスタンブロット分析には、採取した脳組織をホモジナイズし、遠心分離により核画分を除去し、プロテナーゼK処理したものが使用される。また、免疫学的染色には、採取したCJD発症脳組織をホルマリン固定し、パラフィン包埋したものが使用される。ウェスタンブロット分析および免疫学的染色は、常法に従って行われる。

【0048】

かくして得られたヒトの異常型プリオン蛋白質に結合する抗体は、該抗体産生ハイブリドーマを大量培養した培養上清からまたは該抗体産生ハイブリドーマをマウス腹腔内に投与し、数日後に貯留した腹水から採取される。モノクローナル抗体の精製は、前述の蛋白質化学において通常使用される方法を適宜選択して行えば良い。

【0049】

抗体のアイソタイピングは、市販のマウスイムノグロブリンアイソタイピングキット（アマシャムバイオサイエンス社）を用い、添付の方法に従って決定することができる。

【0050】

得られた抗体の抗原認識部位は、N末端側若しくはC末端側を欠失させた種々の長さの切断型ヒトプリオン蛋白質または適当な長さの合成ペプチドを用いたELISA、RIA、ドットブロット、ウェスタンブロット等の方法でエピトープマッピングを実施することにより決定することができる。より具体的には、ビオチン標識したヒトプリオンアミノ酸配列を有する合成ペプチドを、ストレプトアビジン固相化プレートに加え、ビオチン化ペプチドでコーティングされたプレートを作製する。これに、適当濃度のモノクローナル抗体を添加し、抗原抗体反応をさせた後、パーオキシダーゼ標識ヤギ抗マウスIgGを反応させ、発色基質を添加して発色させることにより行われる。前記の合成ペプチドの標識物質としては、ビオチン以外に、蛍光物質、例えばサイダイ（Cydye）、フルオレセインイソチオシアネートまたはローダミンなどを使用できる。

【0051】

以上の操作を実施することにより、ヒトプリオン蛋白質のアミノ酸配列の特定領域を認識し、且つ、ヒトの異常型プリオン蛋白質に結合するモノクローナル抗体を取得することができる。得られたモノクローナル抗体の種類とヒトプリオン蛋白質のアミノ酸配列上の認識部位を表5および実施例8に示した。なお、表5に記載されたモノクローナル抗体4A1、9A1、100A1、64A、5A1、12A1、63A1および66A1を産生するハイブリドーマは2003年5月13日に、82A1および125Aを産生するハイブリドーマは2003年5月21日に、それぞれ以下の受託番号にて独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6）に依頼人により寄託されている。

【0052】

4A1 : FERM P - 19342  
 9A1 : FERM P - 19344  
 100A1 : FERM P - 19349  
 64A : FERM P - 19347  
 5A1 : FERM P - 19343  
 12A1 : FERM P - 19345  
 63A1 : FERM P - 19346  
 66A1 : FERM P - 19348  
 82A1 : FERM P - 19365  
 125A : FERM P - 19366

【0053】

このようにして得られたモノクローナル抗体は、上記の標識物質に加え、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、ガラクトシダーゼ、グルコシダーゼ、またはルー

10

20

30

40

50

シフェラーゼなどの酵素で標識され、免疫組織染色、酵素免疫測定法またはウェスタンブロット法等の方法に基づく、ヒトの異常型プリオン検出システムを構築するための構成成分として使用される。

#### 【0054】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、これら実施例は本発明の一例を示すものであり、これに限定されるものではない。

#### 実施例 1：不溶性の組換え型ヒトプリオン蛋白質抗原の調製

東北大学大学院医学研究科病態神経学教授 北本哲之博士より分与された、配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるヒトプリオン蛋白質をコードするポリヌクレオチド（以下、「cDNA」と称することもある）を、組換え型ヒトプリオン蛋白質の調製に使用した。

10

#### 【0055】

上記の cDNA を、マルトース結合蛋白質 (MBP) 発現ベクター (pMALc2x、New England Biolab社製) の Eco RI サイトに挿入した。この発現ベクターで大腸菌 (JM109株、BL21株等) を形質転換し、アンピシリン含有寒天培地に播種した。得られたコロニーをスクリーニングし、cDNA が順方向に挿入されているクローンを選択した。

#### 【0056】

選択されたクローンを一夜前培養し、300ml の培地に一夜培養液を 1/100 容添加して本培養を開始した。菌体が大数増殖期に入った時点でイソプロピル - D - チオガラクトピラノシドを添加し、さらに 2 - 4 時間培養した。集菌後、菌体を破砕し、遠心分離後上清を採取した。この上清をアミロースレジンカラムにアプライして MBP - PrP を吸着させた。カラムを洗浄後、10mM マルトース含有緩衝液で MBP-PrP を溶出した。

20

#### 【0057】

MBP-PrP 溶液に活性化第 X 因子を添加し、4℃ で 1 - 3 日間反応させた。この間に、切り出されたヒトプリオン蛋白質部分は不溶化して沈殿し、MBP 部分は可溶化状態を保持していた。反応溶液を遠心し、上清を除去後、リン酸緩衝液 (以下、「PBS」という) で沈殿を懸濁し、再度遠心した。上清を除去後、PBS に懸濁したものを抗原とし、使用直前まで - 80℃ で保存した。

#### 【0058】

本抗原調製時に、Eco RI サイトを使用したため、配列番号 1 で示されたアミノ酸配列の N 末に I S E F の 4 残基が付加された。

30

#### 【0059】

#### 実施例 2：モノクローナル抗体の作製

##### (1) 免疫

抗原とする蛋白質溶液を、PBS で 5 倍に希釈し、500 μl づつ分注後凍結保存して随時免疫に供した。免疫は、抗原溶液 500 μl とフロイント不完全アジュバント 500 μl とを混合し、7 週令の Balb/c 雌マウス 10 匹に 100 μl づつ皮下投与した。1 週間後前回同様に抗原を投与し、3 回目の免疫後各マウスの尾血管より採血して抗体測定に用いた。ノックアウトマウスに対しても同様に免疫した。

#### 【0060】

40

##### (2) 抗体価測定

抗体価測定は、酵素免疫法 (以下、「EIA」という) で行った。96 穴のイムノプレート (Nunc社) に、MBP-PrP を 150ng/well づつ固相化し、対照用に MBP のみを 100ng/well づつ固相化した。各プレートは洗浄してウシ血清アルブミン (以下、「BSA」という) でブロッキング後、乾燥して 4℃ で保存した。10 匹のマウス血清を 400 倍から 51,200 倍まで 2 倍希釈系列を作成し、各希釈血清を各プレートに 50 μl づつ添加し、37℃ で 30 分間インキュベートした。PBS で 3 回洗浄後、ホースラディッシュパーオキシダーゼ標識抗マウスイムノグロブリン G 抗体を全ての well に 50 μl づつ添加し、37℃ で 30 分間清置した。次いで PBS で 3 回洗浄後、o-フェニレンジアミンを添加し、室温で 15 分間インキュベートした。塩酸を添加して呈色反応を停止させ、490nm で吸光度を測定した。

50

## 【0061】

## (3) 融合

抗体価の上昇が認められたマウス3匹に抗原を50 $\mu$ lづつ静脈注射した。静脈注射の4日後に各マウスを屠殺して脾臓を摘出した。脾臓細胞を採取し、マウスミエローマ細胞(X63-Ag8.653)とポリエチレングリコール法によって細胞融合させ、96穴プレートに播種した。

## 【0062】

## (4) 1次スクリーニング

HAT培地を用いて融合細胞を選択した。ヒポキサンチン・チミジン培地に替え、融合2週間目に全wellの上清をMBP-PrP固相化プレート(以下、「ポジプレート」という)、およびMBP固相化プレート(以下、「対照プレート」という)に各々50 $\mu$ lづつ分注し、4で一夜インキュベートした。洗浄後、抗体価測定と同様の手順で、測定した。

## 【0063】

## (5) 1次クローニング

ポジプレートで測定値が1.8以上で、かつ、対照プレートで測定値が0.09以下の細胞から、生育状況の良好なもの23クローンを選択した。各細胞を限界希釈法によりサブクローニングを行った。

## 【0064】

## (6) 2次スクリーニング

培養上清を用いて、1次スクリーニングと同様の手順で測定した。

その結果、2A1、4A1、5A1、9A1、12A1、16A3、63A1、64A、66A1、76A、78A、80A、82A1、90A、99A、100A1、103A、119A、120A、125A、135A、142Aおよび174Aとして示されるモノクローナル抗体が得られた。

## 【0065】

## 実施例3：モノクローナル抗体のアイソタイピング

マウスイムノグロブリンアイソタイピングキット(アマシャムバイオサイエンス社製)を用いて、抗体のサブタイプを決定した。その結果、各抗体のサブタイプは以下のとおりであった。

## 【0066】

表1：各抗体のアイソタイプ

モノクローナル抗体	H鎖	L鎖
63A1, 66A1, 76A, 78A, 80A, 82A1, 90A, 99A, 103A, 119A, 120A, 125A, 135A, 142A, 2A1, 5A1, 9A1, 12A1, 16A3	IgG1	$\kappa$
64A, 100A1, 174A	IgG1	$\lambda$
4A1	IgG2a	$\kappa$

## 【0067】

## 実施例4：エピトープ重複確認試験

マルトース結合蛋白質-ヒトプリオン蛋白質融合蛋白質をマイクロプレートに固相化した。5 $\mu$ g/mlの各精製抗体を50 $\mu$ lづつ分注し、37 $^{\circ}$ Cで30分間、ブロッキングした。プレートを洗浄後、20 $\mu$ g/mlのビオチン標識した抗体を50 $\mu$ lづつ分注し、37 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートした。プレートを洗浄後、アビジン-ホースラディッシュペーパーオキシダーゼを添加し、室温で30分間反応させた。プレートを洗浄後、o-フェニレンジアミンで発色させ、490nmにおける吸光度を測定した。

## 【0068】

ビオチン標識抗体単独使用時の吸光度をA、非標識抗体でブロッキング後、ビオチン標識抗体を反応させたときの吸光度をBとして、以下の式で結合抑制率を計算した：抑制率

10

20

30

40

50

$$(\%) = (A - B) / A \times 100$$

各抗体の抑制率を表2に示した。

【0069】

表2：各抗体の結合抑制率

結合抑制率 (%)		ビオチン標識抗体								
		63A1	64A	66A1	76A	78A	80A	82A1	90A	99A
ブ ロ ッ キ ン グ 抗 体	なし	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	63A1	66	0	74	49	44	62	53	59	40
	64A	0	93	3	0	0	0	9	0	0
	66A1	79	100	85	60	56	72	62	87	51
	76A	94	100	100	86	84	98	86	100	79
	78A	96	100	100	90	89	100	88	100	85
	80A	60	100	77	53	49	70	52	84	43
	82A1	91	100	96	89	85	96	87	100	82
	90A	51	73	64	38	35	57	37	63	32
	99A	91	13	32	89	87	90	88	93	81
	100A1	21	67	0	21	14	31	21	37	10
	103A	77	100	0	65	62	84	64	88	60
	119A	89	100	38	90	88	98	90	99	86
	120A	63	100	0	50	46	60	48	82	44
	125A	51	73	0	39	37	54	39	72	34
	135A	73	80	0	61	56	71	60	84	53
	142A	79	73	0	62	54	69	68	81	52
174A	0	0	3	0	2	0	5	0	4	

10

20

【0070】

表2：各抗体の結合抑制率（続き）

30

結合抑制率 (%)		ビオチン標識抗体							
		100A1	103A	119A	120A	125A	135A	142A	174A
ブ ロ ッ キ ン グ 抗 体	なし	0	0	0	0	0	0	0	0
	63A1	38	48	49	49	60	71	64	0
	64A	28	0	0	0	0	0	0	0
	66A1	64	64	48	100	67	90	69	0
	76A	79	88	79	91	91	97	96	17
	78A	89	93	84	97	88	100	93	29
	80A	57	55	34	69	82	81	57	0
	82A1	80	89	79	83	89	93	87	0
	90A	25	37	24	38	46	47	42	0
	99A	62	88	79	65	72	67	82	13
	100A1	67	12	0	0	33	36	7	17
	103A	69	79	50	100	86	86	80	25
	119A	89	94	80	91	98	95	90	42
	120A	70	66	35	66	81	69	61	0
	125A	62	48	21	55	67	69	49	17
	135A	75	69	38	62	74	76	67	0
142A	67	68	45	63	65	62	68	0	
174A	38	0	8	0	0	12	7	0	

10

20

## 【 0 0 7 1 】

表 2 : 各抗体の結合抑制率 ( 続き )

結合抑制率 (%)		ビオチン標識抗体					
		2A1	4A1	5A1	9A1	12A1	16A3
ブ ロ ッ キ ン グ 抗 体	63A1	36	-	16	-	-	-
	64A	45	16	21	62	-	-
	66A1	42	13	-	29	-	-
	76A	37	18	13	23	-	-
	78A	40	13	-	21	-	-
	80A	37	23	14	41	11	-
	82A1	38	16	15	20	-	-
	90A	43	35	20	42	17	18
	99A	39	20	18	24	10	-
	100A1	38	13	39	30	-	17
	103A	30	13	26	21	-	13
	119A	30	-	29	19	-	14
	120A	33	18	34	31	12	22
	125A	31	22	30	41	25	26
	135A	35	29	31	35	21	25
	142A	34	19	27	31	22	16
174A	49	39	39	61	11	32	

30

40

50

## 【0072】

## 実施例5：ウエスタンブロッティング

## (1) rhPrPに対するウエスタンブロッティング

抗原として用いた不溶性のrhPrPをポリアクリルアミドゲルで電気泳動後、PVDF膜にブロッティングし、1%スキムミルク含有TBS緩衝液(25mM Tris-HCl (pH 7.5), 150mM NaCl)でブロッキングした。抗体産生ハイブリドーマ細胞をマウスに接種して得られた腹水を200倍希釈したものを一次抗体とし、抗マウスIgG抗体を二次抗体として用いて、インキュベートした。膜を洗浄後、ECLシステムで化学発光させた。各抗体は、rhPrPを認識した。その結果を図1に示す。

## 【0073】

10

## (2) CJD患者脳に対するウエスタンブロッティング

脳ホモジネートをブロッティング後、1000倍希釈した腹水を一次抗体、パーオキシダーゼ標識抗マウスIgGを二次抗体として用い、ECLシステムで化学発光させた。その結果を図2に示す。図2から明らかなように、各抗体は、異常型プリオン蛋白質に特徴的な3本のバンドを認識していた。

## 【0074】

## (3) CJD病原体接種後、発症したマウスの脳ホモジネートに対するウエスタンブロッティング

ヒトプリオン蛋白質を発現するトランスジェニックマウスに、CJD病原体を脳内接種した。発症後、脳を採取してホモジナイズし、核画分を除去後、プロテナーゼK処理した。電気泳動、メンブランへ転写後、各抗体でウエスタンブロッティングした。その結果を図3に示す。

20

## 【0075】

図3から明らかなように、2A1、5A1、9A1、および16A3の各抗体は、異常型プリオン蛋白質に特徴的な3本のバンドを、また、4A1、および12A1は、異常型プリオン蛋白質に特徴的な3本のバンドのうち最も分子量の大きい糖鎖が2本付加したバンドを除く2本を認識していた。さらに、12A1はフラグメンテッドプリオン蛋白質といわれる分子量の小さいバンドも認識していた。

## 【0076】

## 実施例6：CJD患者脳組織切片に対する免疫組織染色

30

ホルマリン固定したパラフィン包埋組織から2.7µm厚の切片を切り出した後、パラフィンを除去した。組織中にもともと存在するパーオキシダーゼをブロックするため、0.3%過酸化水素含有メタノール中で30分間インキュベートした。ステンレス鋼の容器中で組織切片を、蒸留水で希釈した3mmol/L塩酸に浸漬した状態で121℃、10分間オートクレープし、常圧、および60℃以下になってから組織切片を取り出し、水道水と50mmol/L Tris-HCl (pH 7.6)で洗浄した。5%スキムミルク含有のTTBS (25mmol/L Tris-HCl (pH 7.6)、0.05% Tween 20、0.5mol/L NaCl)で希釈した抗プリオン抗体(0.5µg/ml)溶液中、4℃でインキュベートし、非標識抗体-ビオチン-ストレプトアビジン法(ICN Immunobiologicals, Costa Mesa, CA)を実施後、ジアミノベンジジンで発色させた。その結果を表3に示す。各抗体は、異常型プリオン蛋白質を特異的に染色していた。

40

## 【0077】

## 表3

モノクローナル抗体	免疫組織染色の強度
2 A 1	+++
4 A 1	++
5 A 1	+++
9 A 1	±
1 2 A 1	+++
1 6 A 3	++

## 【 0 0 7 8 】

10

## 実施例 7：合成ペプチドによるエピトープマッピング

## ( 1 ) ビオチン化ペプチドの合成 ( PepSet )

東洋紡に委託して、ペプセットによりクリーバブルタイプのビオチン化ペプチドを 1  $\mu$  moleづつ合成した。各ペプチドは、ビオチン - S G S G ( スペーサ ) - 1 5 アミノ酸 - アミド ( 1 5 アミノ酸部分は表 4 参照 )、但し、第 1 番目のペプチドのみ Amino - 1 5 アミノ酸 - G S G - Biocytamide との構造とした。ペプチド本数は合計 4 0 本で、streptavidin 固定化プレート 5 枚を作製した。

## 【 0 0 7 9 】

表 4：合成ペプチド ( 1 5 アミノ酸部分 ) の配列

No.	配列	配列番号 4 2 中での 位置	No.	配列	配列番号 4 2中 での位置
1	KKRPKPGWNTGGSR (配列 番号 1)	23-37	21	GGLGGYMLGSAMSRP (配列 番号 2 1)	123-137
2	PGWNTGGSRYPGQG (配列 番号 2)	28-42	22	YMLGSAMSRPIIHFG (配列 番号 2 2)	128-142
3	TGGSRYPGQSPGGN (配列 番号 3)	33-47	23	AMSRPIIHFGSDYED (配列 番号 2 3)	133-147
4	YPGQSPGGNRYPPQ (配列 番号 4)	38-52	24	IIHFGSDYEDRYRE (配列 番号 2 4)	138-152
5	SPGGNRYPPQGGGW (配列 番号 5)	43-57	25	SDYEDRYRENMHRY (配列 番号 2 5)	143-157
6	RYPPQGGGWGQPHG (配列 番号 6)	48-62	26	RYRENMHRYPNQVY (配列 番号 2 6)	148-162
7	GGGWGQPHGGGWGQ (配列 番号 7)	53-67	27	NMHRYPNQVYRPM (配列 番号 2 7)	153-167
8	GQPHGGGWGQPHGG (配列 番号 8)	58-72	28	PNQVYRPMDEYSNQ (配列 番号 2 8)	158-172
9	GGWQPHGGGWGQPH (配列 番号 9)	63-77	29	YRPMDEYSNQNNFVH (配列 番号 2 9)	163-177
10	PHGGGWGQPHGGGWG (配列 番号 1 0)	68-82	30	EYSNQNNFVHDCVNI (配列 番号 3 0)	168-182
11	WGQPHGGGWGQPHGG (配列 番号 1 1)	73-87	31	NNFVHDCVNITIKQH (配列 番号 3 1)	173-187
12	GGGWGQPHGGGWGQG (配列 番号 1 2)	78-92	32	DCVNITIKQHTVTTT (配列 番号 3 2)	178-192
13	QPHGGGWGQGGGTHS (配列 番号 1 3)	83-97	33	TIKQHTVTTTTKGEN (配列 番号 3 3)	183-197
14	GWGQGGGTHSQWNKP (配列 番号 1 4)	88-102	34	TVTTTTKGENFTETD (配列 番号 3 4)	188-202
15	GGTHSQWNKPSKPKT (配列 番号 1 5)	93-107	35	TKGENFTETDVKMME (配列 番号 3 5)	193-207
16	QWNKPSKPKTNMKHM (配列 番号 1 6)	98-112	36	FTETDVKMMERVVEQ (配列 番号 3 6)	198-212
17	SKPKTNMKHMAGAAA (配列 番号 1 7)	103-117	37	VKMMERVVEQMCITQ (配列 番号 3 7)	203-217
18	NMKHMAGAAAAGAVV (配列 番号 1 8)	108-122	38	RVVEQMCITQYERES (配列 番号 3 8)	208-222
19	AGAAAAGAVVGLGG (配列 番号 1 9)	113-127	39	MCITQYERESQAYYQ (配列 番号 3 9)	213-227
20	AGAVVGLGGYMLGS (配列)	118-132	40	TQYERESQAYYQRGS (配列)	216-230

10

20

30

40

## 【 0 0 8 0 】

## ( 2 ) 合成ペプチドのコーティング

別個のBIO-RAD racked Titertube Micro Tube内にある、40種類の各乾燥ペプチドに、0 50

.4mLの50/50% acetonitrile/waterを添加した。各チューブを5分間繰り返し逆さにした後、Microrackに移して超音波槽内で超音波処理した。ペプチド溶液を約70倍に希釈するため、1.4mLづつ50/50% acetonitrile/waterをBeckman square well plate (Cat. No. 1405 04)に分注した。そこへ20 $\mu$ Lのペプチド溶液を添加し、混合した。20 $\mu$ Lの希釈したペプチド溶液を、duplicateで、あらかじめ各穴に80 $\mu$ LのPBS/0.1%v/v Tween 20/0.1%w/v sodium azideが入ったstreptavidin coated plateの相応する位置の穴に添加した。最終的なペプチド溶液の希釈倍数は、約350倍となった。(注:このペプチド量は、固定化されたstreptavidinのすべての結合サイトを飽和させるのに十分な量である。)プレートは、冷室で一夜インキュベート後、20 で30分間振とうした。プレートを洗浄後、25 で30分間乾燥した。プレートは使用するまで-20 で保存した。

10

## 【0081】

(3) 全ての穴がビオチン化ペプチドでコーティングされていることの確認試験

多数のプレートをduplicateでペプチドコーティングした。各穴がビオチン化ペプチドでコーティングされていることを確認するため、各穴に100 $\mu$ Lの50ng/mLビオチン化パーオキシダーゼ溶液を添加した。このとき、対照として、ビオチン化ペプチドでコートされていない穴(fully unblocked)と過剰のビオチンで処理した穴(fully blocked)を追加した。その結果を図4に示す。図4中、BLはfully blocked、UNはfully unblockedをそれぞれ意味する。

## 【0082】

図4から明らかなように、ペプチドコートした穴は、fully blockedの穴より低いabsorbanceを示した。このことは、各穴がビオチン化ペプチドでコートされていることを示唆している。さらには、ビオチンよりもビオチン化ペプチドの方が、より効果的にビオチン化パーオキシダーゼの結合を阻害することを示唆している。

20

## 【0083】

(4) エピトープマッピング

モノクローナル抗体を終濃度2 $\mu$ g/mLとなるようにPBS/0.1%v/v Tween 20/0.1%w/v sodium azideで希釈した。抗体溶液をペプチドコーティングしたプレートの各穴に100 $\mu$ Lづつ分注した。プレートは、4 で一夜インキュベート後、20 で30分間振とうした。プレートを洗浄後、各穴に100 $\mu$ Lづつ、2.5%カゼイン溶液で2000倍に希釈したパーオキシダーゼ標識ヤギ抗マウスIgG(H+L)(Kirkegaard & Perry, Cat. No. 074-1806)を添加した。プレートを20 で1時間振とうした。各穴を水で洗浄後、残存する液体を除去するため紙タオル上に向け下方向にたたいた。100 $\mu$ LのABTS基質溶液(0.5mg/mL 2,2Azino-di-[3-ethyl-benzthiazolin-sulfonat], 0/01%w/v 過酸化水素水)を添加し、22 の恒温室で10分まで浸透した。プレートをLabsystems Multiskan Multisoft plate readerを用い、495nmをreference波長とし405nmで測定した。その結果を図5~図7に示す。

30

## 【0084】

4A1および9A1は、いずれのペプチドにも結合しなかった(図5)。従って、この方法では、これらの抗体のエピトープを推定することはできなかった。64A、100A1および174Aは、ペプチド5および6と強く結合し、ペプチド7~13とも弱く結合した。さらに、64Aはペプチド28とも結合した(図5)。ペプチド7~13は、オクタペプチドのリピートが存在する領域である。これらの抗体は、オクタペプチドの一部をエピトープとしていることが示唆された。

40

## 【0085】

2A1、5A1および16A3は、ペプチド24および25に強く結合した(図6)。12A1、125Aは、ペプチド28のみに強く結合した(図6)。63A1および66A1は、ペプチド28に強く結合し、ペプチド27および29に弱く結合した。また、これらは、ペプチド5、6および39にも弱く結合した(図6)。その他の抗体は、ペプチド28に強く結合し、ペプチド27、29および39にも弱く結合した(図7)。

以上の結果を表5にまとめて示す。

## 【0086】

50

表 5 : エピトープマッピングの結果

モノクローナル抗体	結合したペプチド番号*
4A1, 9A1	未反応
100A1, 174A	(5, 6) <sup>S</sup> , (7~13) <sup>W</sup>
64A	(5, 6) <sup>S</sup> , (7~13) <sup>W</sup> , 28 <sup>M</sup>
2A1, 5A1, 16A3	(24, 25) <sup>S</sup>
125A, 12A1	28 <sup>S</sup>
63A1	(5, 6) <sup>M</sup> , 28 <sup>S</sup> , (27, 29, 39) <sup>W</sup> ,
66A1	(5, 6) <sup>W</sup> , 28 <sup>S</sup> , (27, 29, 39) <sup>W</sup>
76A, 78A, 80A, 82A1, 90A, 99A, 103A, 119A, 120A, 135A, 142A	28 <sup>S</sup> , (27, 29, 39) <sup>W</sup>

10

\* : S, M, Wは、それぞれ強、中、弱の結合の程度を表す。

20

【0087】

**実施例 8 : 欠失変異体によるエピトープマッピング**

プロテナーS K処理後のヒトプリオン蛋白質(アミノ酸番号95-230)のN末側、またはC末側からの一連の欠失変異体とグルタチオン-S-トランスフェラーゼとの融合蛋白質を大腸菌で発現させた。各変異体の構造を図8および図9に示す。これらの蛋白質に対して、各抗体でウエスタンブロッティングを実施した。

【0088】

2A1によるウエスタンブロッティングでは、C末側が174番目まである変異体(Hu95-174)は認識したが、それ以上欠失させる(Hu95-146)と認識しなかった。また、N末側が135番目まである変異体(Hu135-230)は認識したが、それ以上欠失させる(Hu149-230等)と認識しなかった(図10)。これらのことから、2A1の認識するエピトープは135-174残基の間にあると推察された。

30

【0089】

以下同様にして、4A1のエピトープは171-216(または163-224)残基の間に(図11)、5A1のエピトープは135-174残基の間に(図12)、9A1のエピトープは135-216残基の間に(図13)、12A1のエピトープは163-197残基の間に(図14)、16A3のエピトープは135-174残基の間に、それぞれあると推察された。

【0090】

**実施例 9 : ヒトプリオン蛋白質(hPrP)を検出するためのサンドイッチELISA**

40

ヒトプリオン蛋白質(hPrP)を検出するため、数種類のモノクローナル抗hPrP抗体を用いたサンドイッチELISA法の確立を行った。

モノクローナル抗体80Aと119A(PBSで0.5mg/mLに希釈抗体各60μL)を混合し、炭酸緩衝液(pH9.4; 1380μL)でそれぞれの最終濃度を20μg/mLとし、ELISAプレートの各ウェルに50μLを添加した。37℃で2時間吸着させた後、ELISAプレートを0.05%Tween-PBS(pH7.4; 250μL/ウェルで2回)で洗浄後、4倍希釈したブロックエース(1.5mL)を各ウェルに50μLずつ添加して37℃で2時間培養した。実施例1で調製した組換えhPrP(200μL)を5%SDS(200μL)と等量混合した後、メタノール(1.6mL)で沈殿させ、10倍希釈したブロックエースで2段階希釈し、各ウェルに50μLずつ添加して4℃で終夜反応させた。各ウェルを0.05%Tween-PBSで洗浄後、Biotin化モノクローナル抗体100A

50

1 (最終濃度5 $\mu$ g)の50 $\mu$ Lを添加し、37 $^{\circ}$ Cで3時間反応させた。Avidin標識酵素(1.5 $\mu$ L)を10倍希釈したブロックエースで1000倍に希釈し、各ウエルに50 $\mu$ Lずつ添加して、37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。各ウエルを0.05%Tween-PBSで洗浄後、o-フェニレンジアミンを添加し、室温で反応させた後、1mol/L塩酸で反応を停止した。各サンプルの測定をデュプリケートで実施した。その結果を図15に示す。

【0091】

図15の結果から明らかなように、モノクローナル抗hPrP抗体を利用したサンドイッチELISA法の組換えhPrPに対する検出感度は、31pg/50 $\mu$ Lであり、モノクローナル抗hPrP抗体を利用したサンドイッチELISA法が樹立された。

【産業上の利用可能性】

10

【0092】

本発明によれば、ヒトプリオン蛋白質のアミノ酸配列上の新規なエピトープを認識し、ヒトの異常型プリオン蛋白質に対して安定した反応性を有する抗体が提供される。このように新規なエピトープを認識する本発明抗体は、不溶性のプリオン蛋白質を免疫抗原として用いることによって得ることができた。ウエスタンブロット法および免疫組織染色法により、CJD発症脳組織との反応性を調べた結果、本発明抗体は陽性を示し、異常型プリオン蛋白質の検出に利用できることが示された。

【0093】

従来技術の項においても詳述したように、ヒトプリオンには様々な遺伝的多型が知られており、また異常型プリオン蛋白質には、異なるコンホメーションをとっているものが複数存在すると考えられている。従って、1種類の抗体を用いた検出系では異常型プリオン蛋白質を漏れなく検出することはできないため、様々なエピトープを認識する新規な抗体が望まれていた。本発明抗ヒトプリオン抗体は、既知の抗体とは異なるエピトープを認識し、その認識部位は既知抗体には少ないプリオンの構造変化に影響を与えるC末端側の領域である抗体も多い。

20

【0094】

また、本発明抗体には立体構造を認識する抗体も含まれており、立体構造の変化により正常型から異常型に変わるプリオンの検出において、立体的なエピトープを認識する本発明抗体は異常型プリオン検出系の開発、プリオン異常化に関する研究など様々な面で有用な抗体である。従って、本発明抗ヒトプリオン抗体は、輸血、血液製剤、および臓器移植における異常型プリオン蛋白質のスクリーニングやヒトプリオン蛋白質関連の研究用試薬や診断薬等への利用が期待できる。

30

【図面の簡単な説明】

【0095】

【図1】組換えヒトプリオン蛋白質に対するウエスタンブロッティングを示す。抗原量の単位はng(バンド当たり)。矢印は、抗原(組換えヒトプリオン)の位置を示す。70kDa付近に見えるバンドはウシ血清アルブミンである。

【0096】

【図2】CJD患者の脳に対するウエスタンブロッティングの結果を示す。

【0097】

40

【図3】CJD病原体を接種後、発症したマウスの脳ホモジネートに対するウエスタンブロッティングの結果を示す。

【0098】

【図4】ペプチドコーティングの確認試験の結果を示す。

【0099】

【図5】ペプチドによるエピトープマッピングの結果を示す。ペプチド1~40に対するモノクローナル抗体4A1、9A1、174A、100A1および64Aの結合を示す。

【0100】

【図6】ペプチドによるエピトープマッピングの結果を示す。ペプチド1~40に対するモノクローナル抗体2A1、5A1、16A3、12A1、125A、63A1、66A

50

1 および 76A の結合を示す。

【0101】

【図7】ペプチドによるエピトープマッピングの結果を示す。ペプチド1～40に対するモノクローナル抗体76A、78A、80A、82A1、90A、99A、103A、119A、120A、135Aおよび142Aの結合を示す。

【0102】

【図8】大腸菌で発現させた、ヒトプリオン蛋白質またはそのC末端側欠失変異体とグルタチオン-S-トランスフェラーゼとの各融合蛋白質の構造を示す模式図。図中、GSTはグルタチオン-S-トランスフェラーゼを示し、数値はアミノ酸番号を示す。糖鎖の付加部位をも示してあるが、実際の融合蛋白質は大腸菌発現のため糖鎖はない。

10

【0103】

【図9】大腸菌で発現させた、ヒトプリオン蛋白質またはそのN末端側欠失変異体とグルタチオン-S-トランスフェラーゼとの各融合蛋白質の構造を示す模式図。図中、GSTはグルタチオン-S-トランスフェラーゼを示し、数値はアミノ酸番号を示す。糖鎖の付加部位をも示してあるが、実際の融合蛋白質は大腸菌発現のため糖鎖はない。

【0104】

【図10】GTS-プリオン欠失変異体融合蛋白質に対するモノクローナル抗体2A1によるウエスタンブロッティングの結果を示す。レーン1：Mo94-230；レーン2：Hu95-230；レーン3：Hu95-224；レーン4：Hu95-216；レーン5：Hu95-208；レーン6：Hu95-197；レーン7：Hu95-186；レーン8：Hu95-174；レーン9：Hu95-146；レーン10：GST；レーン11：Hu135-230；レーン12：Hu149-230；レーン13：Hu163-230；レーン14：Hu171-230；レーン15：Hu179-230；レーン16：Hu187-230；レーン17：Hu197-230

20

【0105】

【図11】GTS-プリオン欠失変異体融合蛋白質に対するモノクローナル抗体4A1によるウエスタンブロッティングの結果を示す。レーン1：Mo94-230；レーン2：Hu95-230；レーン3：Hu95-224；レーン4：Hu95-216；レーン5：Hu95-208；レーン6：Hu95-197；レーン7：Hu95-186；レーン8：Hu95-174；レーン9：Hu95-146；レーン10：GST；レーン11：Hu135-230；レーン12：Hu149-230；レーン13：Hu163-230；レーン14：Hu171-230；レーン15：Hu179-230；レーン16：Hu187-230；レーン17：Hu197-230

30

【0106】

【図12】GTS-プリオン欠失変異体融合蛋白質に対するモノクローナル抗体5A1によるウエスタンブロッティングの結果を示す。レーン1：Mo94-230；レーン2：Hu95-230；レーン3：Hu95-224；レーン4：Hu95-216；レーン5：Hu95-208；レーン6：Hu95-197；レーン7：Hu95-186；レーン8：Hu95-174；レーン9：Hu95-146；レーン10：GST；レーン11：Hu135-230；レーン12：Hu149-230；レーン13：Hu163-230；レーン14：Hu171-230；レーン15：Hu179-230；レーン16：Hu187-230；レーン17：Hu197-230

40

【0107】

【図13】GTS-プリオン欠失変異体融合蛋白質に対するモノクローナル抗体9A1によるウエスタンブロッティングの結果を示す。レーン1：Mo94-230；レーン2：Hu95-230；レーン3：Hu95-224；レーン4：Hu95-216；レーン5：Hu95-208；レーン6：Hu95-197；レーン7：Hu95-186；レーン8：Hu95-174；レーン9：Hu95-146；レーン10：GST；レーン11：Hu135-230；レーン12：Hu149-230；レーン13：Hu163-230；レーン14：Hu171-230；レーン15：Hu179-230；レーン

50

16 : Hu187 - 230 ; レーン17 : Hu197 - 230  
【0108】

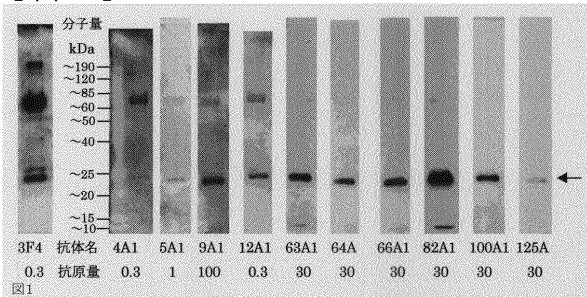
【図14】GTS - プリオン欠失変異体融合蛋白質に対するモノクローナル抗体12A1によるウエスタンブロッティングの結果を示す。レーン1 : Mo94 - 230 ; レーン2 : Hu95 - 230 ; レーン3 : Hu95 - 224 ; レーン4 : Hu95 - 216 ; レーン5 : Hu95 - 208 ; レーン6 : Hu95 - 197 ; レーン7 : Hu95 - 186 ; レーン8 : Hu95 - 174 ; レーン9 : Hu95 - 146 ; レーン10 : GST ; レーン11 : Hu135 - 230 ; レーン12 : Hu149 - 230 ; レーン13 : Hu163 - 230 ; レーン14 : Hu171 - 230 ; レーン15 : Hu179 - 230 ; レーン16 : Hu187 - 230 ; レーン17 : Hu197 - 230

10

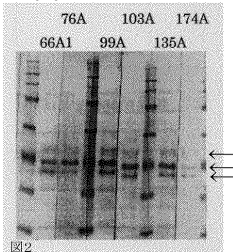
【0109】

【図15】本発明の抗ヒトプリオン抗体を用いたサンドイッチELISA法による組換えヒトプリオン蛋白質の検出を示す。

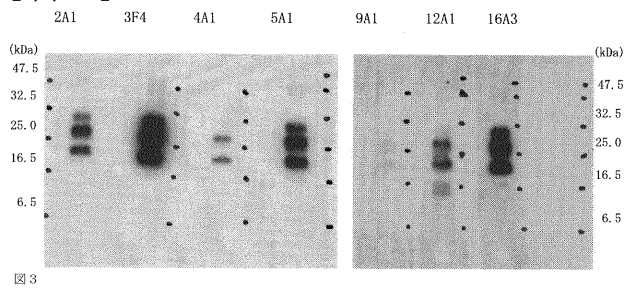
【図1】



【図2】



【図3】



【図4】

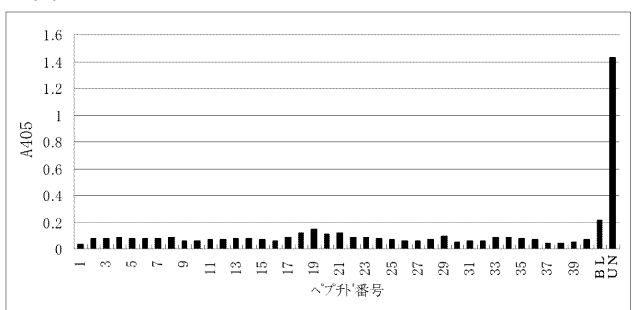


図4

【 図 5 】

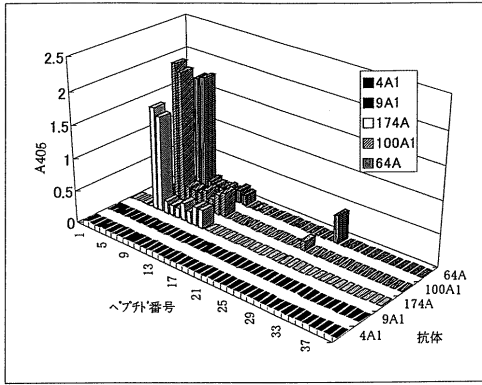


図 5

【 図 7 】

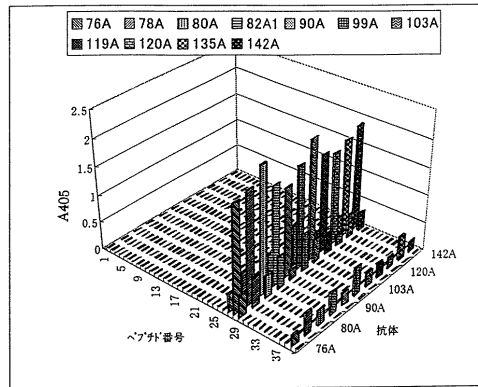


図 7

【 図 6 】

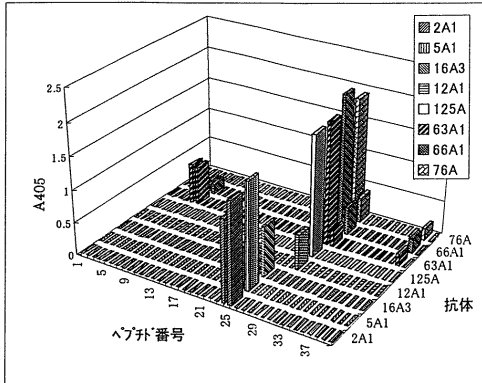


図 6

【 図 8 】

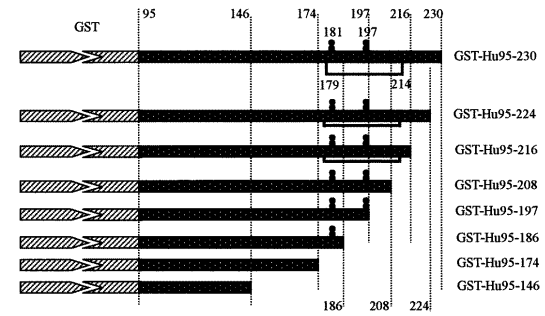


図 8 C 末側欠失変異体との融合蛋白質の構造  
● は糖鎖付加部位を示す。ただし、大腸菌発現のため糖鎖はない。  
GST: グルチオン-S-トランスフェラーゼ、数値はアミノ酸の番号を示す。

【 図 9 】

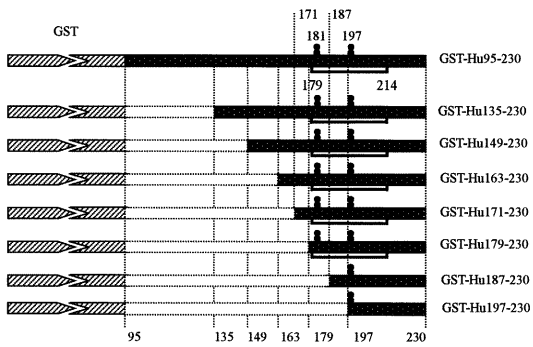


図 9 C 末側欠失変異体との融合蛋白質の構造  
● は糖鎖付加部位を示す。ただし、大腸菌発現のため糖鎖はない。  
GST: グルチオン-S-トランスフェラーゼ、数値はアミノ酸の番号を示す。

【 図 11 】

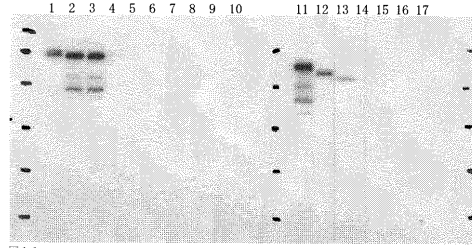


図 11

【 図 12 】



図 12

【 図 10 】

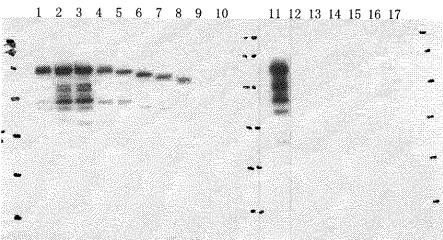


図 10

【 図 1 3 】

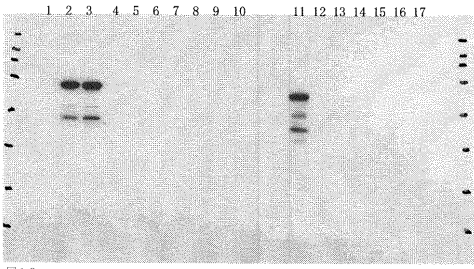


図 1 3

【 図 1 4 】

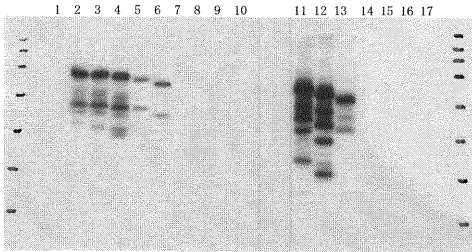
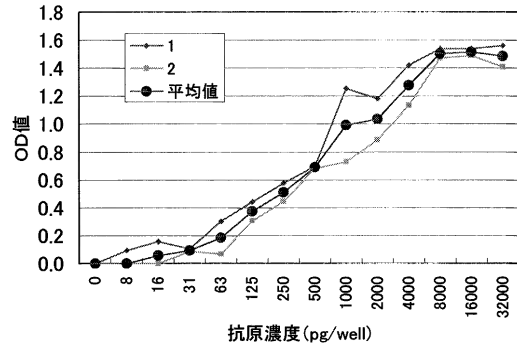


図 1 4

【 図 1 5 】



【 配列表 】

[2005023074000001.app](#)

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>7</sup> F I テーマコード(参考)  
 G 0 1 N 33/577 C 1 2 N 5/00 B

(74)代理人 100068526

弁理士 田村 恭生

(74)代理人 100076521

弁理士 坪井 有四郎

(74)代理人 100126778

弁理士 品川 永敏

(72)発明者 前野 英毅

北海道千歳市泉沢1007番31

(72)発明者 緒方 洋一

熊本県熊本市帯山7丁目9番142号

(72)発明者 松尾 宇人

千葉県成田市新泉3-1

(72)発明者 内木 充

兵庫県神戸市西区竹の台6丁目6番地6-1205

(72)発明者 中田 勲

兵庫県小野市高山町1834-158

(72)発明者 鈴木 正司

兵庫県小野市古川町南山1093番地

(72)発明者 森田 将典

兵庫県川西市花屋敷一丁目15番8号

(72)発明者 大水 章正

奈良県大和郡山市西町8-8

Fターム(参考) 4B024 AA11 BA44 CA04 CA05 CA06 DA02 DA06 EA04 FA02 FA10  
 GA05 GA11 GA18 GA19 HA03 HA08 HA14  
 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA13  
 4B065 AA92X AA93Y AB05 AC14 BA08 BA24 CA25 CA46  
 4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA40 DA76 EA50 FA72 FA74

专利名称(译)	抗人朊病毒抗体		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005023074A</a>	公开(公告)日	2005-01-27
申请号	JP2004174045	申请日	2004-06-11
[标]申请(专利权)人(译)	Benesis 日本红十字会 日本脏器制药株式会社		
申请(专利权)人(译)	株式会社ベネシス 日本红十字会 日本製薬株式会社 日本脏器制药有限公司 财团法人化学及血清疗法研究所		
[标]发明人	前野英毅 緒方洋一 松尾宇人 内木充 中田勲 鈴木正司 森田将典 大水章正		
发明人	前野 英毅 緒方 洋一 松尾 宇人 内木 充 中田 勲 鈴木 正司 森田 将典 大水 章正		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/18 C12N5/10 C12N15/02 C12P21/08 G01N33/577		
FI分类号	C07K16/18.ZNA C12P21/08 G01N33/53.D G01N33/577.B C12N15/00.C C12N5/00.B C12N5/00.102 C12N5/20		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/CA06 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/FA10 4B024/GA05 4B024/GA11 4B024/GA18 4B024/GA19 4B024/HA03 4B024/HA08 4B024/HA14 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA92X 4B065/AA93Y 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/BA24 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	品川EiSatoshi		
优先权	2003166824 2003-06-11 JP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

解决的问题：提供与异常的人类病毒蛋白结合的抗体及其制备方法。一种与人病毒蛋白结合的抗体，其特征在于，包括特定序列或该序列的一部分中的预定氨基酸序列作为表位的组成部分，其制备方法，使用抗体的病毒蛋白检测系统异常。[选择图]无

表 2 : 各抗体の結合抑制率

結合抑制率 (%)	ビオチン標識抗体									
		63A1	64A	66A1	76A	78A	80A	82A1	90A	99A
ブロッッキング抗体	なし	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	63A1	66	0	74	49	44	62	53	59	40
	64A	0	93	3	0	0	0	9	0	0
	66A1	79	100	85	60	56	72	62	87	51
	76A	94	100	100	86	84	98	86	100	79
	78A	96	100	100	90	89	100	88	100	85
	80A	60	100	77	53	49	70	52	84	43
	82A1	91	100	96	89	85	96	87	100	82
	90A	51	73	64	38	35	57	37	63	32
	99A	91	13	32	89	87	90	88	93	81
	100A1	21	67	0	21	14	31	21	37	10
	103A	77	100	0	65	62	84	64	88	60
	119A	89	100	38	90	88	98	90	99	86
	120A	63	100	0	50	46	60	48	82	44
	125A	51	73	0	39	37	54	39	72	34
	135A	73	80	0	61	56	71	60	84	53
	142A	79	73	0	62	54	69	68	81	52
174A	0	0	3	0	2	0	5	0	4	