

(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2007-274924
(P2007-274924A)

(43) 公開日 平成19年10月25日(2007.10.25)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4B024
C07K 16/12 (2006.01)	C07K 16/12 ZNA	4B064
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/00 B	4B065
C12N 1/15 (2006.01)	C12N 1/15	4C085
C12N 1/19 (2006.01)	C12N 1/19	4H045
審査請求 未請求 請求項の数 26 O L (全 16 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2006-103201 (P2006-103201)	(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
(22) 出願日	平成18年4月4日(2006.4.4)	(71) 出願人	591222245 国立感染症研究所長 東京都新宿区戸山一丁目23番1号
		(74) 代理人	100068526 弁理士 田村 恭生
		(74) 代理人	100100158 弁理士 鮫島 睦
		(74) 代理人	100087114 弁理士 齋藤 みの里
		(74) 代理人	100126778 弁理士 品川 永敏
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 抗E型ボツリヌス神経毒素抗体

(57) 【要約】

【課題】 E型ボツリヌス感染症、E型ボツリヌス神経毒素中毒症に関する疾患の診断あるいは治療に有用であるE型ボツリヌス神経毒素に特異的に結合する抗体を提供する。

【解決手段】 E型ボツリヌス神経毒素を中和するマウスモノクローナル抗体を提供する。当該抗体産生細胞より抗体分子を構成するVH領域及びVL領域遺伝子をクローニングし、このV領域の遺伝情報を元にしてヒト化抗体及び二重特異性抗体などの各種抗体を作製することを特徴とする。本発明により得られる抗体は、E型ボツリヌス感染症、ボツリヌス神経毒素中毒症に関する疾患の診断あるいは治療に有用である。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

E 型ボツリヌス神経毒素に対する中和活性を有するモノクローナル抗体。

【請求項 2】

当該抗体が、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受領番号 F E R M A P - 2 0 8 5 8 を有するハイブリドーマによって産生される請求項 1 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 3】

当該抗体が、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受領番号 F E R M A P - 2 0 8 5 9 を有するハイブリドーマによって産生される請求項 1 に記載のモノクローナル抗体。 10

【請求項 4】

当該抗体が、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受領番号 F E R M A P - 2 0 8 6 0 を有するハイブリドーマによって産生される請求項 1 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 5】

請求項 1 に記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項 6】

当該ハイブリドーマが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受領番号 F E R M A P - 2 0 8 5 8 を有する請求項 5 に記載のハイブリドーマ。 20

【請求項 7】

当該ハイブリドーマが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受領番号 F E R M A P - 2 0 8 5 9 を有する請求項 5 に記載のハイブリドーマ。

【請求項 8】

当該ハイブリドーマが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受領番号 F E R M A P - 2 0 8 6 0 を有する請求項 5 に記載のハイブリドーマ。

【請求項 9】

請求項 1 から 4 のいずれかに記載のモノクローナル抗体を用いることを特徴とする E 型ボツリヌス神経毒素を免疫学的に検出する方法。

【請求項 10】

請求項 1 から 4 のいずれかに記載のモノクローナル抗体を用いることを特徴とする E 型ボツリヌス神経毒素を免疫学的に定量する方法。 30

【請求項 11】

請求項 1 から 4 のいずれかに記載のモノクローナル抗体を有効成分として含有することを特徴とする E 型ボツリヌス感染症または E 型ボツリヌス神経毒素中毒症の診断薬。

【請求項 12】

請求項 1 から 4 のいずれかに記載のモノクローナル抗体を含む E 型ボツリヌス神経毒素に対する中和活性を有するマウスモノクローナル抗体由来のアミノ酸配列とヒト抗体由来のアミノ酸配列からなる遺伝子組換え抗体であって、少なくとも定常領域がヒト抗体由来のアミノ酸配列であることを特徴とし、かつ E 型ボツリヌス神経毒素に対する中和活性を有するヒト化組換え抗 E 型ボツリヌス神経毒素抗体または抗体フラグメント。 40

【請求項 13】

当該組換え抗体の可変領域重鎖 (V H) のアミノ酸配列が配列番号 6 のアミノ酸配列の全部または一部であり、可変領域軽鎖 (V L) のアミノ酸配列が配列番号 8 のアミノ酸配列の全部または一部であることを特徴とする請求項 12 に記載の組換え抗体または抗体フラグメント。

【請求項 14】

当該抗体フラグメントが抗体機能分子であり、Fab、Fab'、F(ab')₂、一本鎖抗体及びジスルフィド安定化抗体であるか、または二重特異性抗体及びその類似物であるか、またはチェーンシャッフリングによって生成した抗体分子であることを特徴とする、請求項 12 ま 50

たは 13 に記載の組換え抗体または抗体フラグメント。

【請求項 15】

当該組換え抗体が、ヒト型キメラ抗体である請求項 12 から 14 のいずれかに記載の組換え抗体または抗体フラグメント。

【請求項 16】

当該組換え抗体が、ヒト型改変抗体である請求項 12 から 14 のいずれかに記載の組換え抗体または抗体フラグメント。

【請求項 17】

当該 V H 及び V L のアミノ酸配列の一部が、Kabatらの文献 (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th. ed. U.S. Department of Health and Human Services (1987))、または Chothiaらの文献 (J. Mol. Biol., 196, 901, 1987) に基づき決定される、配列番号 6 及び配列番号 8 の可変領域内の相補性決定領域 (CDR) を含む請求項 12 から 16 のいずれかに記載の組換え抗体または抗体フラグメント

【請求項 18】

当該Kabatらの文献により決定される当該 V H の C D R 1 が配列番号 9、C D R 2 が配列番号 10、C D R 3 が配列番号 11 であり、当該 V L の C D R 1 が配列番号 12、C D R 2 が配列番号 13、C D R 3 が配列番号 14 である請求項 12 から 17 のいずれかに記載の組換え抗体または抗体フラグメント。

【請求項 19】

当該組換え抗体の V H 及び V L がそれぞれ配列番号 6 及び配列番号 8 のアミノ酸配列であり、定常領域がヒト抗体由来のアミノ酸配列であることを特徴とするヒト型キメラ抗体である請求項 12 から 18 のいずれかに記載の組換え抗体または抗体フラグメント。

【請求項 20】

当該組換え抗体の V H 及び V L 内の C D R 1 ~ 3 が、それぞれ配列番号 9 ~ 10 及び配列番号 12 ~ 14 であり、フレームワーク領域 (FR) の一部がマウス抗体由来であり、その他の FR 及び定常領域がヒト抗体由来のアミノ酸配列であることを特徴とするヒト型改変抗体である請求項 12 から 18 のいずれかに記載の組換え抗体または抗体フラグメント。

【請求項 21】

請求項 12 から 20 のいずれかに記載の組換え抗体または抗体フラグメントをコードする DNA。

【請求項 22】

請求項 21 に記載の DNA が組み込まれることを特徴とする組換えベクター。

【請求項 23】

請求項 22 記載の組換えベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換体。

【請求項 24】

請求項 23 記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中に請求項 12 から 20 のいずれかに記載の組換え抗体または抗体フラグメントを生成蓄積させ、該培養物から該抗体を採取することを特徴とする抗体の製造方法。

【請求項 25】

請求項 12 から 20 のいずれかに記載の組換え抗体または抗体フラグメントが、放射性同位元素、蛋白質または低分子の薬剤と化学的または遺伝子工学的に結合させることを特徴とする融合抗体。

【請求項 26】

請求項 12 から 20 及び 25 のいずれかに記載の抗体または抗体フラグメントを有効成分として含有する、E 型ポツリヌス感染症または E 型ポツリヌス神経毒素中毒症の治療薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は E 型ポツリヌス感染症及び E 型ポツリヌス神経毒素中毒症に関する疾患の診断

10

20

30

40

50

あるいは治療に有用であるボツリヌス神経毒素（BoNTと称することもある）に対する中和活性を有するモノクローナル抗体、当該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、当該モノクローナル抗体由来のアミノ酸配列とヒト抗体由来のアミノ酸配列からなる遺伝子組換え抗体、当該組換え抗体を産生する細胞株、該抗体を用いた治療剤に関する。さらには、このような有用な遺伝子組換え抗体の作製に有効なH鎖及びL鎖の可変領域をコードするDNA断片に関する。

【背景技術】

【0002】

ボツリヌス中毒は、グラム陽性有芽胞性のボツリヌス菌が産生する蛋白性毒素を経口的に接種することにより起こる食餌性中毒と、一歳未満の乳児の腸管内で芽胞が発芽、増殖し、その際産生される毒素により起こる乳児ボツリヌス症に大別される。いずれの中毒においても、毒素は末梢の興奮性シナプスに作用し、神経伝達物質の遊離を阻害することにより弛緩性麻痺を引き起こす。ボツリヌス中毒は他の細菌性食中毒と比べ発生例は稀であるが、致死率がきわめて高く、我が国ではヒトの食餌性中毒事例が報告されている。また、最近ではその高い致死性ゆえにバイオテロの手段として使用されることが懸念されている。現在、ボツリヌス中毒症の治療薬としてA、B、E、F型に対して治療用馬抗毒素が常備されている。ウマ血清を原材料としているこの製剤は、ヒトには異種蛋白であるため、アナフィラキシー等のアレルギー反応を引き起こす危険性がある。乳児ボツリヌス症においてはこのアレルギー反応を回避するために異種蛋白由来の抗体による治療はなされていないのが現状である。この危険性は成人の中毒における治療においても同様であり、ウマ抗毒素に代わるより安全で、高い中和力価を持つ抗毒素製剤の開発が望まれている。

【0003】

上記のような抗BoNT中和抗体を、ボツリヌス中毒症の患者またはBoNTを不活化したトキシソイドで免疫した人から抗ボツリヌスヒト免疫グロブリンを直接採取・調製するやり方があり、実際に「BabyBIG」という商品名で乳児ボツリヌス症を対象に市販されている。しかし、この製剤はボツリヌストキシソイドで健常人を免疫して中和抗体価の高い血漿をプールして製造されるために、この方法では倫理的問題や原材料入手、バイオハザードの問題など数多い問題点が予想され、乳児ボツリヌス症のような疾患に限定された疾患にしか使用できない。すなわち、このようなヒト免疫グロブリン製剤を現在のウマ抗毒素の代わりに広く普及させることはできない。そこで、このような高力価血清の代替品としてBoNT中和活性を有するモノクローナル抗体の使用が考えられる。

【0004】

最近、ボツリヌストキシソイドを免疫した人のBリンパ球をソースにしてファージ抗体を作製し、その中から所望の中和抗体を選ぶ方法が試みられているが、BoNT A型毒素に関してそのような人から得られたヒト型中和モノクローナル抗体はそれぞれ単独では中和活性が弱く実用的でなかった。そこで、そのような弱い中和活性を持ったモノクローナル抗体を数種類混合するオリゴクローナルにすることで活性を強化せざるを得なかった。しかしながら、数種類のモノクローナル抗体からなる混合製剤は、抗体の種類が増えるに従って医薬品としての開発・製造コストを上昇させることになり、現実的な価格で医薬品を提供することが難しくなる恐れがある。また、現在のウマ抗毒素についてはA、B、E、F型の毒素に対する抗体が含まれているので、最終的には少なくとも4種類のモノクローナル抗体を混合することになる。それぞれの型に数種類のモノクローナル抗体を混合して、さらにそれらを混合することになれば、開発・製造コストの問題はより厳しさを増すことになる。すなわち、できるだけ一つの毒素の型について一種類のモノクローナル抗体で対応できる方がコスト的に有利である。

【0005】

一方、マウスモノクローナル抗体については、免疫原の選択やマウスへの免疫回数など免疫方法に関してトキシソイドをヒトに免疫するよりは、技術的にも倫理的にも制限が少なく、結果的にヒト由来のモノクローナル抗体よりも高力価の抗体を得ることが出来る可能性がある。マウスモノクローナル抗体作製に関する基本的な技術はすでに確立されている

。しかし、マウスモノクローナル抗体をヒトに投与すると異種タンパクとして認識され、アナフィラキシーショックや血清病などの副作用を引き起こしたり、はやく体外に排除されたりして、抗体の治療効果を低下させてしまうことから臨床応用が困難であった。

【0006】

そこで、遺伝子組換え技術を利用してマウスなどの動物由来のモノクローナル抗体をキメラ抗体あるいは改変抗体（CDR [complementarity determining region] 移植抗体、再形成ヒト抗体と言う場合もある）のようなヒト化抗体にする試みが行われている。抗体は重鎖（H）鎖と軽（L）鎖からなり、各々、抗原結合活性を担う可変（V）領域と、補体やFc受容体への結合性を担う定常（C）領域から構成されている（以下、H鎖V領域はVH、L鎖V領域はVL、H鎖C領域はCH、L鎖C領域はCLと称することがある）。

10

【0007】

キメラ抗体は、マウスモノクローナル抗体を産生するマウスハイブリドーマからクローニングしたV遺伝子と、ヒト抗体産生細胞等のヒト細胞からクローニングしたC遺伝子とを結合させたマウスV-ヒトCキメラ抗体遺伝子を動物細胞あるいは微生物細胞等で発現させ、その培養上清中に得られるものである（非特許文献1）。改変抗体はマウスなど動物由来抗体のCDRをヒト抗体のCDRと置換した抗体であり（非特許文献2）、サルを用いた実験ではマウス抗体に比べ免疫原性が低下し、血中半減期が4～5倍延長している（非特許文献3）。

【0008】

さらに、最近の抗体工学の進歩により、一本鎖抗体（single chain Fv; 以下、scFvと称することもある：非特許文献4）あるいはジスルフィド安定化抗体（disulfide stabilized Fv; 以下、dsFvと称することもある：非特許文献5）といった、より小さな抗体分子の作製が行われている。一本鎖抗体やジスルフィド安定化抗体は完全分子型の抗体に比べ、その分子量が小さいことから組織移行性、血中クリアランスに優れ、完全分子型の抗体とは異なった治療効果も期待されている。

20

【0009】

【非特許文献1】Morrison, S. L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 81, 6851-5 (1984)

【非特許文献2】Riechmann, L. et al., Nature, 332, 323-7 (1988)

【非特許文献3】Hakimi, J. et al., J. Immunol., 147, 1352-9 (1991)

30

【非特許文献4】Bird, R. E. et al., Science, 242, 423-6 (1988)

【非特許文献5】Webber, K. O. et al., Molecular Immunology, 32, 249-58 (1995)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

以上述べてきたように、現在のウマ抗毒素は副作用の点で問題がある。その解決策として現在報告されているヒト型モノクローナル抗体では一種類のみで治療効果の優れた抗体はなく、数種類のモノクローナル抗体を混合する製剤となっている。このため、医薬品の開発や製造のコストアップを招き、必然的に高価な医薬品とならざるを得ない。すなわち、治療効果や安全性に優れ、開発や製造コストの面でも実用化が容易なBoNT抗体の開発が

40

【課題を解決するための手段】

【0011】

このような状況において、本発明者らは抗毒素製剤のターゲットである4つの血清型のうちE型のBoNTに対して高力価に中和活性を有するマウスモノクローナル抗体を産生する細胞（ハイブリドーマ）の作製に成功し、キメラ化及びヒト化抗体、あるいは抗体フラグメントの材料となるV領域遺伝子を提供することを可能にし、本発明を完成するに至った。実際、当該細胞から該抗体のV領域をコードする遺伝子を分離することに成功し、このV領域を用いてマウス-ヒト組換え抗体の発現を試みた結果、神経毒素に対して中和活性を有する組換え抗BoNT抗体の作製に成功した。すなわち本発明は、これまでに一切報告さ

50

れていないE型BoNTに対するマウス中和モノクローナル抗体とその産生細胞を提供し、さらにはそのV領域をコードする遺伝子情報を提供し、これを用いた組換え抗BoNT抗体を提供する。遺伝子情報とは、遺伝子をコードする核酸塩基配列やその配列から決定されるアミノ酸配列、さらには当該遺伝子断片そのものなど、組換え抗BoNT抗体の作製に必要な遺伝子情報である。また、当該組換え抗BoNT抗体の形態は、一般的な抗体分子の形態から一つの抗体分子で2つの特異性をもった二重特異性抗体やV領域とC領域の一部からなる様々な形態までの抗体機能分子を提供することが可能である。従って、本願発明は、抗E型BoNTマウス中和モノクローナル抗体とその産生細胞だけでなく、そのV領域をコードする遺伝子情報からもたらされる様々な形態の組換え抗BoNT抗体遺伝子の作製工程、及びその遺伝子を含む発現ベクター、さらにはそのベクターを用いて動物細胞及び微生物を形質転換する工程及びその結果もたらされた組換え抗BoNT抗体及び抗体機能分子高産生形質転換体の作製方法をも包含する。

10

【0012】

本発明は、下記1)～26)の発明を含むものである。

【0013】

1) E型ボツリヌス神経毒素に対する中和活性を有するモノクローナル抗体。

【0014】

2) 当該抗体が、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受領番号FERM AP-20858を有するハイブリドーマによって産生される上記1)に記載のモノクローナル抗体。

20

【0015】

3) 当該抗体が、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受領番号FERM AP-20859を有するハイブリドーマによって産生される上記1)に記載のモノクローナル抗体。

【0016】

4) 当該抗体が、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受領番号FERM AP-20860を有するハイブリドーマによって産生される上記1)に記載のモノクローナル抗体。

【0017】

5) 上記1)に記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

30

【0018】

6) 当該ハイブリドーマが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受領番号FERM AP-20858を有する上記5)に記載のハイブリドーマ。

【0019】

7) 当該ハイブリドーマが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受領番号FERM AP-20859を有する上記5)に記載のハイブリドーマ。

【0020】

8) 当該ハイブリドーマが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受領番号FERM AP-20860を有する上記5)に記載のハイブリドーマ。

【0021】

9) 上記1)から4)のいずれかに記載のモノクローナル抗体を用いることを特徴とするE型ボツリヌス神経毒素を免疫学的に検出する方法。

40

【0022】

10) 上記1)から4)のいずれかに記載のモノクローナル抗体を用いることを特徴とするE型ボツリヌス神経毒素を免疫学的に定量する方法。

【0023】

11) 上記1)から4)のいずれかに記載のモノクローナル抗体を有効成分として含有することを特徴とするE型ボツリヌス感染症またはE型ボツリヌス神経毒素中毒症の診断薬。

【0024】

50

12) 上記1)から4)のいずれかに記載のモノクローナル抗体を含むE型ボツリヌス神経毒素に対する中和活性を有するマウスモノクローナル抗体由来のアミノ酸配列とヒト抗体由来のアミノ酸配列からなる遺伝子組換え抗体であって、少なくとも定常領域がヒト抗体由来のアミノ酸配列であることを特徴とし、かつE型ボツリヌス神経毒素に対する中和活性を有するヒト化組換え抗E型ボツリヌス神経毒素抗体または抗体フラグメント。

【0025】

13) 当該組換え抗体の可変領域重鎖(VH)のアミノ酸配列が配列番号6のアミノ酸配列の全部または一部であり、可変領域軽鎖(VL)のアミノ酸配列が配列番号8のアミノ酸配列の全部または一部であることを特徴とする上記12)に記載の組換え抗体または抗体フラグメント。

【0026】

14) 当該抗体フラグメントが抗体機能分子であり、Fab、Fab'、F(ab')₂、一本鎖抗体及びジスルフィド安定化抗体であるか、または二重特異性抗体及びその類似物であるか、またはチェーンシャッフリングによって生成した抗体分子であることを特徴とする、上記12)または13)に記載の組換え抗体または抗体フラグメント。

【0027】

15) 当該組換え抗体が、ヒト型キメラ抗体である上記12)から14)のいずれかに記載の組換え抗体または抗体フラグメント。

【0028】

16) 当該組換え抗体が、ヒト型改変抗体である上記12)から14)のいずれかに記載の組換え抗体または抗体フラグメント。

【0029】

17) 当該VH及びVLのアミノ酸配列の一部が、Kabatらの文献(Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th. ed. U.S. Department of Health and Human Services (1987))、またはChothiaらの文献(J. Mol. Biol., 196, 901, 1987)に基づき決定される、配列番号6及び配列番号8の可変領域内の相補性決定領域(CDR)を含む上記12)から16)のいずれかに記載の組換え抗体または抗体フラグメント

【0030】

18) 当該Kabatらの文献により決定される当該VHのCDR1が配列番号9、CDR2が配列番号10、CDR3が配列番号11であり、当該VLのCDR1が配列番号12、CDR2が配列番号13、CDR3が配列番号14である上記12)から17)のいずれかに記載の組換え抗体または抗体フラグメント。

【0031】

19) 当該組換え抗体のVH及びVLがそれぞれ配列番号6及び配列番号8のアミノ酸配列であり、定常領域がヒト抗体由来のアミノ酸配列であることを特徴とするヒト型キメラ抗体である上記12)から18)のいずれかに記載の組換え抗体または抗体フラグメント。

【0032】

20) 当該組換え抗体のVH及びVL内のCDR1~3が、それぞれ配列番号9~10及び配列番号12~14であり、フレームワーク領域(FR)の一部がマウス抗体由来であり、その他のFR及び定常領域がヒト抗体由来のアミノ酸配列であることを特徴とするヒト型改変抗体である上記12)から18)のいずれかに記載の組換え抗体または抗体フラグメント。

【0033】

21) 上記12)から20)のいずれかに記載の組換え抗体または抗体フラグメントをコードするDNA。

【0034】

22) 上記21)に記載のDNAが組み込まれることを特徴とする組換えベクター。

【0035】

23) 上記22)に記載の組換えベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換体。

10

20

30

40

50

【0036】

24) 上記23)記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中に上記12)から20)のいずれかに記載の組換え抗体または抗体フラグメントを生成蓄積させ、該培養物から該抗体を採取することを特徴とする抗体の製造方法。

【0037】

25) 上記12)から20)のいずれかに記載の組換え抗体または抗体フラグメントが、放射性同位元素、蛋白質または低分子の薬剤と化学的または遺伝子工学的に結合させることを特徴とする融合抗体。

【0038】

26) 上記12)から20)及び25)のいずれかに記載の抗体または抗体フラグメントを有効成分として含有する、E型ボツリヌス感染症またはE型ボツリヌス神経毒素中毒症の治療薬。

【発明の効果】

【0039】

このような本願発明の新規抗BoNTマウスモノクローナル抗体及びその産生細胞、そのV領域遺伝子情報からもたらされる各種組換え抗体及び抗体フラグメントによって、開発や製造コストの面で優れ、効果が高く副作用の少ないボツリヌス中毒症の診断薬・治療薬・予防薬の開発が可能になる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0040】

本発明である抗BoNTマウスモノクローナル抗体及びその産生細胞は、これまでに確立されているマウスモノクローナル抗体の作製技術を用いて作製される。免疫原としては、例えば、ボツリヌス菌の産生する神経毒、もしくはその毒素活性をホルマリン処理等により失活させたトキソイド、もしくは遺伝子組換え技術を用いて調製される組換え毒素H鎖、L鎖、あるいは毒素のペプチド、もしくは該毒素蛋白のアミノ酸配列に基づいて調製される好適な合成ペプチド等があげられる。使用可能なボツリヌス菌株の一例として、*C. botulinum* type Eであればいかなる株でも構わないが、望ましくは35396株、Iwanai株、Biwako株、5545株、164-1株などがあげられる。

【0041】

マウスを上記のような適当な株の神経毒素を免疫原で免疫し、得られた脾臓細胞をマウスのミエローマ細胞と融合させ、得られたハイブリドーマから、前記の免疫原に反応する細胞を選択し、該細胞を培養することによって抗BoNTマウスモノクローナル抗体を調製することができる。

【0042】

更に、このようにして得られた抗BoNTマウスモノクローナル抗体産生細胞の中からE型BoNTに対して中和活性を有するモノクローナル抗体を産生している細胞を選択することができる。そのような細胞株として本発明者等はBoNTに対して中和活性を有する抗体を産生する16種のハイブリドーマの確立に成功した。中でも10種、更に好ましくはm3-4、m9-4、m9-7、m9-8の4種が、これらが本発明に用いる最も好ましい細胞株としてあげられる。

これらのうち、m3-4、m9-7及びm9-8については、平成18年3月29日付、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それぞれ受領番号FERM AP-20858、FERM AP-20859及びFERM AP-20860として寄託されている。

【0043】

本発明のマウスモノクローナル抗体及び当該抗体産生細胞より、ボツリヌス中毒症の診断薬・治療薬・予防薬になる各種組換え抗体及び抗体フラグメントを作製することができる。当該モノクローナル抗体のV領域をコードする遺伝子断片は、前述のような抗BoNT中和モノクローナル抗体産生細胞より分離され、解析された遺伝子配列である。V領域遺伝子は通常の遺伝子操作技術により単離することができる。例えば、その細胞の染色体DN

10

20

30

40

50

A から常法 [例えば、T. Maniatis "Molecular Cloning" Cold Spring Harbor Lab.(1982) 参照] に従って V 領域遺伝子をクローニングする方法、あるいは、その細胞の mRNA を材料として常法 [例えば、D.M.Glover 編集 " DNA cloning Vol.1" IRL press (1985)] により cDNA を合成し V 領域遺伝子をクローニングする方法である。いずれの方法も、V 領域遺伝子クローニングの為にプローブとして、すでに報告されているマウス免疫グロブリン遺伝子の核酸塩基配列 [例えば、坂野ら、Nature, 286,p676,(1980); E.E.Max ら、J. Biol. Chem., 256,p5116,(1981)] を参照して合成した DNA プローブ等を利用することが出来る。

【 0 0 4 4 】

また、PCR (ポリメラーゼ連鎖反応) を利用したクローニングも可能である [R. Orlandi, et al., Proc. Natl. Acad.Sci. USA, 86, 3833 (1989); W. D. Huse, et al., Science, 246, 1275 (1989)]。例えば、前述のようにハイブリドーマから調製された cDNA を鋳型に、Kabatら [Sequences of Proteins of Immunological Interest 4th ed., Public Health Service, NIH, Washington DC, 1987] の分類した V 領域と J 領域の核酸塩基配列をもとにして合成した DNA プライマーを用いて PCR を行なうことが可能である。V 領域と J 領域の PCR 用プライマーは、DNA 合成受託機関 (例えば QIAGEN 社) などに依頼すれば容易に入手可能である。この時、5' 側に KOZAK 配列 (Kozak M, J.Mol.Biol., 196, 947 (1987)) 及び適切な制限酵素切断部位 (例えば HindIII や BamHI) の配列を付加することが望ましい。これらのプライマーは抗体の種類によって使用可能なプライマーの種類が異なるが、本願発明の 4 種のハイブリドーマのうち m9-4 抗体の場合には、好ましくは、配列番号 1 から 4 に記載の合成 DNA がプライマーとして用いられる。PCR 反応は、例えば Advantage HF-2 PCR Kit (BC Bioscience) を用い、添付のプロトコールに従って行えばよい。PCR により得られた DNA 断片の塩基配列は、TA クローニングキット (インビトロジェン社) 等を用いてクローニングした後、DNA シークエンサー、例えば、ABI PRISM310 Genetic Analyzer (PEバイオシステムズ社) により決定することが出来る。

10

20

【 0 0 4 5 】

このようにして得られた BoNT 中和活性を有する抗体分子の可変領域をコードする遺伝子として、H 鎖、L 鎖それぞれ配列番号 6 及び 8 のアミノ酸配列をコードする遺伝子断片がその好ましい一例として挙げられる。また、そのような遺伝子の具体的核酸塩基配列の一例としては、H 鎖、L 鎖それぞれ配列番号 5 及び 7 に示された核酸塩基配列が挙げられる。また、Kabatら (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th. ed. U.S. Department of Health and Human Services (1987)) あるいは / 及び、Chothia and Lesk (J.Mol.Biol., 196, 901, 1987) を参照することにより、本発明の抗 BoNT 抗体の抗体活性を決定する可変領域の相補性決定領域 (CDR 1 ~ CDR 3) の配列を同定することが出来る。

30

【 0 0 4 6 】

例えば、Kabatらの定義に従えば、本発明により得られた m9 - 4 抗体の CDR は下記の通り同定される。

【 0 0 4 7 】

VH : (配列番号 6)

VH - CDR 1 : Asp Tyr Ala Met Ser (配列番号 9)

VH - CDR 2 : Thr Ser Ile Ser Thr Asp Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Asp Asn Val (配列番号 10)

VH - CDR 3 : Gly Gly Ser His Phe Tyr (配列番号 11)

VL : (配列番号 8)

VL - CDR 1 : Lys Ala Ser Gln Ala Ile Asn Ser Tyr Leu Ser (配列番号 12)

VL - CDR 2 : Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp (配列番号 13)

VL - CDR 3 : Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu Thr (配列番号 14)

【 0 0 4 8 】

40

50

これらの配列がCDRペプチド、さらには抗体活性の改良を行う際の重要な領域となる。後述の抗体機能分子を作製する際にも、このようなアミノ酸配列が最も重要な情報となりうる。具体的にはそのようなアミノ酸配列をコードした核酸塩基配列を含む遺伝子を用いてそのような抗体機能分子は作製される。そのようなアミノ酸配列をコードした核酸塩基配列であればいかなるコドンからなっても構わないが、その望ましい核酸塩基配列として、配列番号15～20に示される配列があげられる。

【0049】

このようにしてクローニングされた本願発明のV領域遺伝子断片あるいはアミノ酸配列を元にして、ヒト化抗体(マウスヒトキメラ抗体及び改変抗体)が作成可能である。例えば、キメラ抗体についてはM. Bruggemann (Waldmann H (ed) Monoclonal Antibody Therapy. Prog Allergy. Basel, Karger, 1988, vol 45, pp91)やS. L. Morrison (Advances in Immunology, 44, 65, (1989))などの文献が、改変抗体については、G. Winter and C. Milstein (Nature 349, 293 (1991))やM.M. Bendig (Methods, 8, 83 (1995))などの文献で紹介されている方法に準じて行うことが出来る。

【0050】

また、これらのV領域の情報を用いてBoNTに特異的に反応する低分子の抗体機能分子を作製することが可能である。低分子の抗体機能分子として、例えば、Fragment of antigen binding (Fabと略記する)、Fab'、F(ab')₂、一本鎖抗体及びジスルフィド安定化抗体を作製することも可能である。この場合、本願発明のマウス抗体そのものの遺伝情報を利用することもできるが、望ましくは本願発明のマウス抗体の遺伝情報をベースにして作製されたキメラ抗体あるいは改変抗体をベースにすることによって、よりヒトに対して安全性の高い低分子抗体を作製することが出来る。

【0051】

一方、組換え抗BoNT抗体作製に用いられるヒト免疫グロブリンH鎖遺伝子並びにL鎖遺伝子のC領域遺伝子は、例えばヒト抗体産生細胞から同様の方法により単離することが出来る。また、C領域遺伝子はその遺伝子内で再配列を行わないので特にヒトC領域遺伝子を単離するために抗体産生細胞を使う必要はなく、その他の組織の細胞でも構わない。単離する方法としては、前述のマウスV領域遺伝子の単離の場合と同様にして行なうことができる。また、C領域遺伝子の種類としては、特に1鎖、鎖に限ったものではなく、 μ 鎖、鎖、2鎖、3鎖、4鎖、鎖、鎖の各鎖の遺伝子でも可能である。しかし、補体活性化能、抗体依存性細胞傷害活性を期待するならば、1鎖が望ましい。

【0052】

さらに、抗体機能分子として二重特異性抗体(bispecific抗体あるいはbifunctional抗体と呼ぶことがある)が挙げられる。抗体1分子は2個の抗原結合部位を有するが、それぞれの抗原結合部位が異なる抗原に結合する抗体、すなわち2つの特異性を持った抗体のことを二重特異性抗体という。通常、二重特異性抗体は細胞融合法と化学合成法の2つの方法で作製される。細胞融合法では、2つの異なるモノクローナル抗体産生細胞をさらに融合することによって作製する事が出来る。化学合成法は、2つの抗体分子を一旦還元してH鎖間のSS結合を解離させ、これらを混合して再び酸化することによって作製するものである。本願発明では、得られたH鎖、L鎖を適宜組み合わせることによって二重特異性抗体を作製することができる。さらに、本願発明で得られたH鎖及びL鎖のみならず、E型以外のボツリヌス神経毒素を中和可能な抗体由来のH鎖及びL鎖とを適宜組み合わせることにより、タイプの異なる二種以上のボツリヌス神経毒素に対して中和可能な二重特異性抗体を作製することも可能となる。

【0053】

また本願発明は、抗体機能分子として前述の二重特異性抗体だけを示すものではなく、二重特異性抗体の類似物として、例えば、ヒンジ領域のCys残基による自発的な2量体化、両親媒性ペプチドの導入によるFabの2量体化や、2つの一本鎖抗体(scFv)をペプチドリンカーで結合させるscFvの2量体化(BiscFv)、特異性の異なる2つの抗体におけるお互いのドメインを入れ替えて、非共有結合的に2量体化(diabody)なども、本願発明

のV領域を用いることにより作製することが可能である。

【0054】

また本願発明は、抗体機能分子として前述の二重特異性抗体だけを示すものではなく、二重特異性抗体の類似物として、例えば、ヒンジ領域のCys残基による自発的な2量体化、両親媒性ペプチドの導入によるFabの2量体化や、2つの1本鎖抗体(scFv)をペプチドリンカーで結合させるscFvの2量体化(BiscFv)、特異性の異なる2つの抗体におけるお互いのドメインを入れ替えて、非共有結合的に2量体化(diabody)なども、本願発明のV領域を用いることにより作製することが可能である。

【0055】

さらに、抗体機能分子として、本願発明の抗BoNT抗体可変領域をコードする遺伝子断片を用いて、結合活性を強化した新しい抗体が作製可能である。すなわち、本発明により提供される抗BoNT抗体可変領域をコードする遺伝子断片は、BoNTに対して中和活性を有する抗体分子の可変領域の特異的アミノ酸配列もしくは核酸塩基配列を開示するものであり、この領域、ドメインを用いて新しい抗体作製の可能性をも提供する物である。例えば、エクソンシャuffling(exon shuffling)やチェーンシャuffling(chain shuffling)とされているファージディスプレイライブラリーを応用する方法があげられる。すなわち、ファージ上に発現させる際に、抗体可変領域のVHあるいはVL遺伝子の一方を固定化し、他方をV遺伝子ライブラリーと結合させたファージライブラリーを構築し、もとの抗体より抗原に対する特異性が高い抗体可変領域の組み合わせをスクリーニングする方法が考えられる。あるいは、CDRのみを人工的に入れ替えるCDRシャufflingや単純にCDRにランダム変異を導入して、親和性や特異性を向上させる方法が考えられる。

【0056】

以上のようにして得られるV領域を利用して作製された抗BoNT抗体分子をコードする遺伝子を発現させる場合は通常組換えタンパク質が発現される産生系ならどの様なものでも利用可能であるが、抗体の通常形態である完全分子なら動物細胞での発現が望ましい。また、前述の一本鎖抗体のような低分子抗体の形態なら、動物細胞以外に大腸菌、酵母などの微生物の中から適切なものを選択することができるが、その場合の発現用ベクターとしては、それぞれの宿主に適切なものを選択する必要がある。また、適切なシグナルペプチドをコードするcDNAを発現用ベクターに挿入することで一本鎖抗体を細胞外に分泌させ、ペリプラズマ領域に輸送させ、あるいは細胞内に留まらせることができる。

【0057】

ここでは最も一般的な、動物細胞での発現について述べる。動物細胞を宿主とする発現ベクターには特段の制約はないが、プラスミド、ウイルスベクター等を用いることができる。当該発現ベクターに含まれるプロモーターは、宿主として用いる動物細胞との組み合わせにより、SV40初期、SV40後期、サイトメガロウイルスプロモーター、ニワトリアクチンなど、最終的にアッセンブルした抗体及び抗体機能分子が得られるのであれば如何なるものでも良い。好ましくは、ニワトリ-アクチンプロモーター系発現プラスミドpCAGG(特許第2824434号)が使用される。選択や遺伝子増幅のマーカー遺伝子として、アミノグリコシド3'ホスホトランスフェラーゼ(neo)遺伝子やジヒドロ葉酸還元酵素(dhfr)遺伝子、ピューロマイシン耐性酵素遺伝子、グルタミン合成酵素(GS)遺伝子など一般に知られる選択や遺伝子増幅用のマーカー遺伝子(Kriegler M著、加藤郁之進 監訳、ラボマニュアル動物細胞の遺伝子工学、宝酒造(1994))が利用できる。

【0058】

H鎖L鎖の遺伝子を動物細胞に導入する際の組み合わせや形態、比率に特段の制約はない。H鎖L鎖の遺伝子を同じベクター内に組み込み同時に動物細胞内に導入する方法でも良いし、H鎖L鎖の遺伝子を別々のベクターに組み込み、同時期に、あるいは別々の時期に選択マーカーを変えて動物細胞に順次導入してもよい。また、その構成比もH鎖L鎖が1:1になるようにする必要はなく、どの様な比率でも構わない。

【0059】

発現ベクターを導入する宿主細胞として、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞

やSP2/0等マウスミエローマ細胞、BHK細胞、293細胞、COS細胞など様々な動物細胞が利用可能であるが、発現ベクターに使用されるプロモーター、選択及び遺伝子増幅用マーカ-遺伝子に合わせて適当な細胞を選択すれば良い。例えば、ニワトリ - アクチンプロモーター系発現プラスミドを用いて構築した発現ベクターには、CHO細胞などが使用される。

【0060】

宿主細胞の形質転換するときには公知の方法を利用すればよい。例えば、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、リポフェクチン系のリポソームを用いる方法、プロトプラストポリエチレングリコール融合法、エレクトロポレーション法などが利用でき、使用する宿主細胞により適当な方法を選択すればよい (Molecular Cloning (3rd Ed.), Vol 3, Cold Spring Harbor Laboratory Press(2001))。 10

【0061】

形質転換細胞の選択・増殖には、一般に動物細胞を形質転換する時に行われる方法を使用すればよい。例えば、形質転換後の細胞は、CHO-S-SFMII培地 (GIBCO-BRL)、IS CHO-V培地 (アイエスジャパン)、YMM培地等無血清培地やMEMアルファ培地、RPMI培地、ダルベッコMEM培地 (いずれもGIBCO-BRL) に5~10%程度のウシ胎児血清を添加した血清培地などの一般的に動物細胞培養に用いられる培地に、使用する選択マーカ-に合わせてメトトレキサート、G418等を添加した選択培地を用いて、適宜培地交換をしながら、37 前後で10~14日間程度培養される。この培養により、形質転換されていない細胞は死滅し、形質転換した細胞のみが増殖してくる。更に、形質転換細胞に対して、限界希釈法などの方法により、目的とする抗体産生細胞株の選択及びクローン化が行われる。 20

【0062】

このようにして得られる本発明の組換え抗体は、E型BoNTに対して中和活性を有していることが確認され、本発明によりこれまでになかった組換え抗BoNT抗体を調製することが可能となった。このような組換え抗BoNT抗体は、E型ボツリヌス中毒症の臨床において、これまでになかった有効な治療剤となりうるものである。さらに、本発明により提供される抗BoNT抗体可変領域をコードする遺伝子断片は、E型BoNTに対して中和活性を有する抗体分子の可変領域の特異的アミノ酸配列もしくは核酸塩基配列を開示するものであり、今後、さらに進んだ遺伝子組換え技術を応用して目的の抗体分子を修飾、または一部置換等することにより、より優れた組換え抗BoNT抗体分子の開発を可能にするものである。 30

【0063】

以下に、実施例を挙げて本願発明をさらに具体的に説明するが、この例示に限定されるものではない。

【実施例】

【0064】

以下に示す実施例では、特に断りのない限り、和光純薬、宝酒造、東洋紡及びNew England BioLabs社、アマシャムバイオサイエンス社、バイオラド社、シグマ社、ギブコ社製の試薬を使用した。

【0065】

《実施例1：マウスハイブリドーマの調製》 40

現在治療用毒素として使用されているC. botulinum type E 35396株より精製したE型神経毒素をB型神経毒素で行われた方法に準拠して (Infect. Immun. 18: 761-766, 1977) ホルマリンで不活化したトキシイドを免疫抗原に用いた。上記のトキシイドと Freund's Complete Adjuvant (Difco) を等量混合しBALB/cマウス1匹当たり毒素蛋白量で0.25mgを腹腔内に接種した。初回免疫後、4及び8週目に Freund's Incomplete Adjuvant (Difco) を用いて同量を追加免疫した。10日後、部分採血を行い、ELISAにより抗原結合抗体価を測定した。ELISAには、E型神経毒素 (0.5 µg/well) をコートしたプレート (FALCON, Flexible Plate) を用い、ブロッキングには0.2% BSA、2次抗体にはペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG(H+L) (1:5000, BioRad)、基質はオルソフェニレンジアミン (Nacalai Tesque) を使用した。反応は基質反応以外全て37 2時間で行った。基質の発色反応は3 50

7 30分で行った。

【0066】

5匹のBalb/cマウスにおいて3回のトキシド免疫後の血中の抗ボツリヌスE型神経毒素のELISA抗体価はいずれのマウスにおいても500,000倍以上に上昇していた。ELISA抗体価が500,000倍以上のマウスにおいて順次、神経毒素(10 μ g/マウス; 106LD50/マウス)を腹腔内に投与した。3~4日後に脾細胞を調製し、ポリエチレングリコール法によりミエローマ細胞(P3U1)と細胞融合を行った。脾細胞とP3U1を10:3の割合で混合し、50%PEG4000(MERCK)/10% DMSO(SIGMA)を用いて細胞融合を行った。DMEM(DIFCO)/15% FCS(GIBCO)/HAT(SIGMA)を用いて細胞を選択した。得られたハイブリドーマの培養上清中のELISA抗体価を測定し、限界希釈法により中和活性のある抗体を産生しているハイブリドーマのクローニングを2~3回行った結果、E型神経毒素に対する抗体陽性ハイブリドーマが46クローン得られた。

10

【0067】

《実施例2. マウス抗体の中和活性》

これら46クローンの内、比較的抗体価の高いクローンを20クローン選別し、産生する抗体の毒素中和活性を調べた。中和活性は、BoNT(200ipLD50/ml)とハイブリドーマ培養上清を等量混合し、室温で30分反応させた後、マウスの腹腔内へ0.5ml接種し、毒素を培地のみと混合したサンプルをコントロールとし、コントロールが死亡した時点における、試験群の臨床症状(麻痺の程度)により判定した。その結果、E型神経毒素を完全中和する抗体を産生するハイブリドーマが10クローン、神経毒素のみを接種した対照マウスと比較して延命あるいは症状の緩和が見られたクローンは6クローン得られた(表1)。

20

【0068】

【表1】

表1. ハイブリドーマ培養上清の毒素中和活

clone No.	12h	15h	20h	24h	36h
m1-7	—	—	d		
m1-9	—	—	—	—	—
m2-5	—	—	—	—	—
m2-7	d				
m2-8	—	—	—	—	—
m3-2	—	—	d		
m3-3	d				
m3-4	—	—	—	—	—
m5-7	d				
m6-1	+++	d			
m7-8	—	—	d		
m8-2	—	—	—	—	—
m9-4	—	—	—	—	—
m9-6	d				
m9-7	—	—	—	—	—
m9-8	—	—	—	—	—
m10-1	++	d			
m10-3	+	d			
m10-6	—	—	—	—	—
m10-9	—	—	—	—	—
培地	d				

30

40

—: 無症状、+ < ++ < +++: 症状の程度、d: 死亡

50

【0069】

《実施例2：V領域遺伝子クローニング》

マウスモノクローナル抗体のV領域遺伝子は、RT-PCR法によって単離した。m9-4ハイブリドーマよりQuickPrep micro mRNA Purification Kit (Amersham Bioscience)を用いてmRNAを抽出し、Superscript II 逆転写酵素(Invitrogen)によるcDNA合成を行った。これをテンプレートとし、プライマーとしてKozak配列及び必要なスプライシングシグナル、酵素サイト(HindIII、BamHI)を持ったオリゴマーをVH、VL領域遺伝子用にそれぞれのV領域及びJ領域のサブグループ毎に作製し(配列番号1~4)、Advantage HF-2 PCR Kit (BD Bioscience)を用いて当該キットのプロトコールに従ってPCR反応を行った。その結果、VH、VL領域それぞれにPCR増幅バンドが複数検出された。その中からサイ

10

【0070】

《実施例3：キメラ抗体産生細胞の作製》

このようにして得たVH、VL領域遺伝子をHindIIIとBamHI(TAKARA)で消化し、それぞれを、発現ベクターであるCAG-1、CAG-1(J. Immunol., 167, 3266, 2001)の同

20

サイトに組み込み、キメラ抗体発現ベクターを構築した。CAG-1は、ヒト抗体C領域鎖の遺伝子及び選択マーカーとしてのネオマイシン耐性遺伝子(neor)を持ち、CAG-1はヒト抗体C領域鎖の遺伝子及び選択マーカーとしてのジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子(dhfr)を持っている。構築したキメラ抗体発現プラスミドを用い以下に述べる方法にてCHO DG44(Urlaub Gら, Somatic cell. Mol. Genet., 12, 555 (1986)、以下CHO)細胞を形質転換した。形質転換の前日にCHO細胞を6wellプレートに $1-0.5 \times 10^5$ cells/2 ml/wellの細胞密度で10%ウシ胎児血清(FCS、GIBCO-BRL社製)を含むYMM培地(インシュリン・トランスフェリン・エタノールアミン・亜セレン酸ナトリウムを含むアミノ酸・ビタミンを強化した核酸不含MEMアルファ培地)を用い播種した。37℃、5%CO₂培養装置で一夜培養の後、リボソーム系形質転換試薬、TransIT-LT1(宝)あるいはリポフェクトアミン2000

30

(インビトロジェン)を用いて、あらかじめキメラ抗体H鎖及びL鎖遺伝子発現プラスミドを等量混合し、PvuIで消化・線状化しておいたものを導入DNAとして、それぞれのプロトコールに従いトランスフェクションを行った。37℃、5%CO₂培養装置で一夜培養した後、選択培地、10%透析FCS(d-FCS: GIBCO-BRL社製)、0.5 mg/ml Geneticin(G418: GIBCO-BRL社製)、300nM メトトレキサート(MTX: 和光純薬工業製)を含むYMM培地に培地交換した。3~4日毎に培地を交換しながら37℃、5%CO₂培養装置で培養を続けることで選択を行い、形質転換体を得た。得られた形質転換細胞の培養上清中に含まれるキメラ抗体の濃度は、ヤギ由来抗ヒトIgG Fc抗体(CAPPEL)とプロテインA-HRP(ZYMED社)を用いたサンドイッチELISA法により測定した。この際、市販のヒトIgG1抗体(Biogenesis)の希釈系列を作製し、それを標準試料とした。このELISA法により得られた形質転換細胞の中

40

から抗体産生量の高い細胞をスクリーニングし、次いで限界希釈法によるクローニングを行って。最終的に得られた9-4由来のキメラ抗体産生細胞はAE94と名付けた。

【0071】

《実施例4：キメラ抗体の活性》

得られたキメラ抗体の神経毒素に対する結合活性をE型神経毒素(0.5 µg/well)をコートしたプレート(FALCON, Flexible Plate)を用いて測定した。ブロッキングには0.2% BSA、2次抗体にはペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgG(H+L)(1:5000, BioRad)、基質はオルソフェニレンジアミン(Nacalai Tesque)を使用した。反応は基質反応以外全て37℃、2時間で行った。基質の発色反応は37℃、30分で行った。細胞の培養上清中の抗BoNTキメラモノクローナル抗体はELISAによって期待通りに毒素と結合することが示された。

50

【0072】

また、キメラ抗体の培養上清中の毒素中和活性を調べた。前述の中和活性測定と同様に、BoNTと培養上清を等量混合し、室温で30分反応させた後、マウスの腹腔内へ0.5ml接種した。毒素を培地のみと混合したコントロールが死亡した時点における、試験群の臨床症状を調べた結果、表1で示したものと同様の結果になった。

【産業上の利用可能性】

【0073】

本願発明によって得られる抗BoNTマウスモノクローナル抗体及びそのV領域遺伝子情報からもたらされる組換え抗体はBoNTに対して高力価の中和活性を有している。このような組換え抗BoNT抗体は、ボツリヌス中毒症の臨床において、これまでになかった有効な治療剤となりうるものである。さらに、本発明により提供される抗BoNTマウスモノクローナル抗体及びその可変領域をコードする遺伝子断片は、BoNTに対して中和活性を有する抗体分子の可変領域の特異的アミノ酸配列もしくは核酸塩基配列を開示するものであり、今後、さらに進んだ遺伝子組換え技術を応用して目的の抗体分子を修飾、または一部置換等することにより、より優れた抗BoNT組換え抗体分子の開発を可能にするものである。

10

【0074】

このように、本願発明の方法により得られる抗BoNTマウスモノクローナル抗体産生細胞及び当該細胞により得られる抗BoNTマウスモノクローナル抗体、そのV領域遺伝子情報を元にて得られる組換え抗BoNT抗体産生細胞及び当該細胞により得られる組換え抗BoNT抗体は、医療及び研究分野において多大なる貢献をするものである。

20

【配列表】

[2007274924000001.app](#)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	A
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	
G 0 1 N 33/577 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	G 0 1 N 33/577	B
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	R
	A 6 1 P 31/04	

(72)発明者 前田 浩明
熊本県菊池市旭志川辺 1 3 1 4 番地 1 財団法人化学及血清療法研究所 菊池研究所内

(72)発明者 向本 雅郁
大阪府堺市学園町 1 番 1 号 大阪府立大学内

(72)発明者 幸田 知子
大阪府堺市学園町 1 番 1 号 大阪府立大学内

(72)発明者 小崎 俊司
大阪府堺市学園町 1 番 1 号 大阪府立大学内

(72)発明者 高橋 元秀
東京都武蔵村山市学園 4 - 7 - 1 国立感染症研究所内

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA13 BA50 CA01 CA07 DA02 GA05 GA11 HA15 HA20
4B064 AG27 CA10 CA19 CA20 CC24 DA01 DA15
4B065 AA01Y AB01 AB04 AC14 BA02 BA08 BB40 CA25 CA44 CA46
4C085 AA14 AA16 BB43 CC02 CC03 CC05 CC23 DD62
4H045 AA11 BA10 BA41 CA11 DA76 EA29 EA52 FA72 FA74

专利名称(译)	抗E型肉毒杆菌神经毒素抗体		
公开(公告)号	JP2007274924A	公开(公告)日	2007-10-25
申请号	JP2006103201	申请日	2006-04-04
[标]申请(专利权)人(译)	日本国立感染症研究所		
申请(专利权)人(译)	财団法人化学及血清疗法研究所 国立感染症研究所長		
[标]发明人	前田浩明 向本雅郁 幸田知子 小崎俊司 高橋元秀		
发明人	前田 浩明 向本 雅郁 幸田 知子 小崎 俊司 高橋 元秀		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/12 C12N5/10 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/08 C07K19/00 G01N33/53 G01N33/577 A61K39/395 A61P31/04		
FI分类号	C12N15/00.A C07K16/12.ZNA C12N5/00.B C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A C12P21/08 C07K19/00 G01N33/53.D G01N33/577.B A61K39/395.R A61P31/04 C12N5/00.101 C12N5/00.102 C12N5/16		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA13 4B024/BA50 4B024/CA01 4B024/CA07 4B024/DA02 4B024/GA05 4B024 /GA11 4B024/HA15 4B024/HA20 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA15 4B065/AA01Y 4B065/AB01 4B065/AB04 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065 /BA08 4B065/BB40 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/BB43 4C085/CC02 4C085/CC03 4C085/CC05 4C085/CC23 4C085/DD62 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045 /BA41 4H045/CA11 4H045/DA76 4H045/EA29 4H045/EA52 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	品川EiSatoshi		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种特异性结合E型肉毒杆菌神经毒素的抗体，该抗体可用于诊断或治疗与E型肉毒杆菌感染和E型肉毒杆菌神经毒素中毒相关的疾病。 解决方案：提供中和E型肉毒杆菌神经毒素的小鼠单克隆抗体。其特征在于，从抗体产生细胞克隆构成抗体分子的VH区和VL区基因，并基于V区的遗传信息制备各种抗体，例如人源化抗体和双特异性抗体。到。通过本发明获得的抗体可用于诊断或治疗与肉毒杆菌E型感染和肉毒杆菌神经毒素中毒有关的疾病。 【选择图】无

【表 1】

表 1. ハイブリドマ培養上清の毒素中和活

clone No.	12h	15h	20h	24h	36h
m1-7	—	—	d	—	—
m1-9	—	—	—	—	—
m2-5	—	—	—	—	—
m2-7	d	—	—	—	—
m2-8	—	—	—	—	—
m3-2	—	—	d	—	—
m3-3	d	—	—	—	—
m3-4	—	—	—	—	—
m5-7	d	—	—	—	—
m6-1	+++	d	—	—	—
m7-8	—	—	d	—	—
m8-2	—	—	—	—	—
m9-4	—	—	—	—	—
m9-6	d	—	—	—	—
m9-7	—	—	—	—	—
m9-8	—	—	—	—	—
m10-1	++	d	—	—	—
m10-3	+	d	—	—	—
m10-6	—	—	—	—	—
m10-9	—	—	—	—	—
培地	d	—	—	—	—

—：無症状、+ < ++ < +++：症状の程度、d：死亡