

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02012/093706

発行日 平成26年6月9日(2014.6.9)

(43) 国際公開日 平成24年7月12日(2012.7.12)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
CO7K 16/28 (2006.01)	CO7K 16/28 ZNA	4H045
CO7K 14/705 (2006.01)	CO7K 14/705	
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 D	
GO1N 33/531 (2006.01)	GO1N 33/531 B	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 35 頁)

出願番号	特願2012-551879 (P2012-551879)	(71) 出願人	000003034 東亜合成株式会社 東京都港区西新橋1丁目14番1号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2012/050136	(71) 出願人	000002369 セイコーエプソン株式会社 東京都新宿区西新宿2丁目4番1号
(22) 国際出願日	平成24年1月6日(2012.1.6)	(74) 代理人	110000774 特許業務法人 もえぎ特許事務所
(31) 優先権主張番号	特願2011-2394 (P2011-2394)	(72) 発明者	岡本 雅次 茨城県つくば市大久保2番 東亜合成株式会社先端科学研究所内
(32) 優先日	平成23年1月7日(2011.1.7)	(72) 発明者	花村 雅人 長野県諏訪市大和三丁目3番5号 セイコーエプソン株式会社内
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗疎水性ペプチド抗体を得るための抗原調製方法

(57) 【要約】

疎水性ペプチドに対する抗体を取得するための方法であって、簡易でありかつ確実性が高く、汎用的に用いられる方法を見出すこと。

キャリアタンパク質と結合していない状態の疎水性ペプチドを、非イオン性界面活性剤を含む水溶液中において、高分子量凝集体とすることを特徴とする抗原調製方法。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

キャリアタンパク質と結合していない状態の疎水性ペプチドを、非イオン性界面活性剤を含む水溶液中において、高分子量凝集体とすることを特徴とする、抗原調製方法。

【請求項 2】

非イオン性界面活性剤が、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノオレート、ポリオキシエチレン(8)オクチルフェニルエーテル、ポリオキシエチレン(9)オクチルフェニルエーテル、ポリエチレングリコール(12)、ポリエチレングリコール(24)、ポリエチレングリコール(60)ドデシルエーテル、およびポリエチレングリコールコレステロール誘導体からなる群から選ばれる1以上である、請求項1に記載の抗原調製方法。

10

【請求項 3】

非イオン性界面活性剤を含む水溶液中における疎水性ペプチドの高分子量凝集体は、分子量100Kd以上のものがペプチド総量の20質量%以上を占める分子量分布を有する、請求項1または2に記載の抗原調製方法。

【請求項 4】

疎水性ペプチドが、純水に添加した場合に分子量1万以上の凝集体となるペプチドである、請求項1～3のいずれかに記載の抗原調製方法。

【請求項 5】

疎水性ペプチドの配列がMLPGLALLLLAAWTARA(配列番号1)、FGGYQVNPVYVGFEMGYDWLGRMPY(配列番号2)またはFLFCWILMILVVLTFVVGANVEK(配列番号3)のいずれかである、請求項1～4のいずれかに記載の抗原調製方法。

20

【請求項 6】

以下の1)および2)の工程を含む、請求項1～5のいずれかに記載の抗原調製方法。
1) キャリアタンパク質と結合していない状態の疎水性ペプチドを純水に懸濁する工程
2) 1)で得られる懸濁液に非イオン性界面活性剤を添加する工程

【請求項 7】

請求項1～6のいずれかに記載の方法により調製された抗原を免疫原として用いて、ヒト以外の哺乳動物を免疫して得られる抗体。

【請求項 8】

抗体がモノクローナル抗体である、請求項7に記載の抗体。

30

【請求項 9】

サンプル中に存在する抗原の検出方法であって、請求項7に記載の抗体を当該サンプルと接触させる工程を含む、検出方法。

【請求項 10】

抗原がアミロイド前駆体タンパク質シグナルペプチド(SPAPP)であって、抗体が抗アミロイド前駆体タンパク質シグナルペプチドモノクローナル抗体(抗SPAPPモノクローナル抗体)である、請求項9に記載の検出方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は免疫工学分野における抗原調製方法に関する。

特に、キャリアタンパク質を用いずに疎水性ペプチドを免疫原とする、抗疎水性ペプチド抗体を得るための抗原調製方法に関する。

【背景技術】

【0002】

抗体は、極めて特異的な分子認識能と高い結合力を有し、解析すべき目的分子に対し

50

て高確率で容易に製造できるため、数十年前より、多くの研究室において極めて有用な研究試薬として利用され、また実用的には診断薬から医薬まで幅広い用途で利用されている。抗体は、ある種の薬物や環境汚染物質のような低分子化合物を標的としてその高感度検出にも利用されているが、多くの場合、抗体の標的はタンパク質である。

【0003】

近年は、ヒトゲノム解析以降、ヒトを中心とする哺乳類の細胞において、何万もの遺伝子産物の発現状況や機能が活発に研究されつつある。組織や細胞には数万～十数万種類のタンパク質が混在する。これらの中から特定のタンパク質分子の発現状況や局在性を調べるには、抗体が必要不可欠である。分化や組織再生、あるいは癌細胞や幹細胞の研究においても、同一ポピュレーションから機能の異なる細胞を分画するセルソーティングや分化制御理解のための分化マーカー検出手段として、やはり抗体は欠くことのできないツールとなっている。更には、特定タンパク質分子とある疾病との相関関係の基礎研究にも抗体は多用される。これらの研究は、診断薬の開発につながる。特定タンパク質分子の中和と疾病の治療効果に関する研究から抗体医薬の開発もなされている。このように抗体は、基礎研究から直接的な実用化まで幅広く利用されている。

10

【0004】

通常、抗体を得るためには、抗原で動物の免疫を行う。抗原としては、天然のものと人工的なものがある。天然の抗原としては、精製した標的タンパク質か、標的タンパク質を含む粗精製または未精製混合物が用いられる。一方、人工的に調製される主な抗原としては、以下の2通りがある。(i)標的タンパク質をコードする遺伝子もしくはその断片を適当な宿主で発現させて生産した組換えタンパク質、および、(ii)標的タンパク質の一部のアミノ酸配列の合成ペプチドである。

20

以下本明細書で用いる用語「ペプチド」は3～約40アミノ酸の長さのものを意味するものとする。

【0005】

合成ペプチドを抗原として用いる場合は、天然の細胞や組織から標的タンパク質を精製する場合や組換え遺伝子発現を利用する場合に比べて、不純物も少なく抗原調製に要する労力も時間も著しく少なくできる利点がある。DNAシーケンス技術進展に伴い、アミノ酸配列情報が容易に利用可能となった現在では、合成ペプチドを抗原とする免疫が多用されている。合成ペプチドを抗原とするもう一つの利点は、タンパク質の特定の領域を選択できる点である。

30

【0006】

抗原としてよく用いられる合成ペプチドの長さは、通常10～25アミノ酸程度である。免疫反応の惹起には、抗原がB細胞とクラスII型T細胞に同時に結合する必要があるとされている(非特許文献1 P.72)。また、抗原は、通常の免疫スケジュール(1～2週間に1回投与)で免疫を行う場合には、動物に投与された後、一定時間以上体内に残存する必要がある。これらの要件を満たすには、抗原はある一定以上の分子量を有することを必要とするが、一般にペプチドは、分子量が小さく、投与後、速やかに代謝されるため、そのまま抗原として用いられることはない。

【0007】

ところで、ペプチドによる免疫の不利な点は、そのペプチドに特異的に結合する抗体が得られたとしても、その抗体は必ずしもその配列を含む元のタンパク質との反応性が良いとは限らない点である(非特許文献1)。この点に関しては、目的とする抗体が得られる確率は、ペプチドを抗原とする方が、標的タンパク質自体あるいはその断片(分子量約5000以上)を抗原とする場合よりも低いため、2～3通りの異なるペプチド抗原配列が試みられるのが一般的である。

40

【0008】

標的タンパク質のどのアミノ酸配列を選択してペプチド抗原とすべきかについては、絶対確実な方法は未だ知られていない。一般的な選択基準としては、糖鎖修飾を受けそうな位置(Asn-X-Thrのモチーフを含む領域、またはser、thrに富む領域)を避けること、およ

50

び、ある程度親水性が高く、分子表面に出ている可能性が高そうな部分や、プロリンを含む部位もしくは ターンの ような折れ曲がり部分を選ぶこととされている（非特許文献 1、非特許文献 2）。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献 1】"Antibodies; A LABORATORY MANUAL, Ed Harlow & David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988"

【非特許文献 2】大海忍、辻村邦夫、稲垣昌樹、秀潤社「抗ペプチド抗体実験プロトコル」、1994

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

近年のタンパク質のX線構造解析技術やNMRによる溶液中のタンパク質分子の構造解析技術の進展により、数多くのタンパク質分子構造が明らかになってきた。これらの知見によれば、タンパク質の疎水性アミノ酸配列を多く含む部分（疎水性部分）は中性水溶液中で難溶解であり、硬い分子構造を保つ。当該部分は、言わばリジッドなパーツとして、タンパク質分子の立体構造のコアとなり、タンパク質分子の統合性と個性（固有の立体構造）を生み出すのに重要な役割を果たしている。

【0011】

また、タンパク質分子の疎水性部分は、抗原抗体反応、リガンド/リセプター結合、細胞内信号伝達、脂質や疎水的低分子化合物の輸送、細胞間コミュニケーションなどのような重要な分子間相互作用に寄与している。

【0012】

生命の基本単位である細胞は脂質二重層から成る膜構造によって外部と仕切られている。進化の過程で、高等生物の細胞膜構造は、細胞の周縁のみならず、細胞内にも、核、小胞体、ゴルジ体、ミトコンドリアのような数多くの複雑な膜構造を発達させ、それらの膜構造は種々の重要な細胞機能に関わっている。更には、膜構造は細胞の形を構築することや独自の特殊機能を発現することにより、分化や形態形成のような高次の生命活動に関わっている。

【0013】

ところで、細胞の全タンパク質種のうち27%が膜タンパク質であると見積もられており、膜タンパク質は、脂質二重層に埋め込まれた状態で局在することからわかるように、疎水性配列に富んでいる。膜タンパク質の全体的な構造としては、1回～12回膜貫通をする種類が知られている（非特許文献 3）。膜貫通回数が多いほどそのタンパク質中の疎水性アミノ酸の比率が高くなる。これらの膜貫通型タンパク質は、細胞外の信号を細胞に伝えるリガンドのリセプター、神経伝達物質や薬物のリセプター、トランスポーター、更には、細胞間認識、分化、形態形成といった組織形成に関わっている。

【0014】

現在、医薬品の少なくとも60%以上が膜タンパク質を標的としており（非特許文献 4）、複数回膜貫通型の膜タンパク質は、脂質二重層に入って機能するため、非膜タンパク質より疎水性部分を多く含むことが知られている。

【0015】

このように、膜タンパク質に関してより有用な情報を得るための研究に対するニーズは高く、必然的に、実用的な抗膜タンパク質抗体を効率よく作製することに対するニーズも高い。例えば、NEDO (New Energy and Industrial Technology Development Organization)で「新機能抗体創製技術開発」と称される研究が行われている（事業期間：平成18年度～平成22年度、平成21年度予算：9.0億円、PL：児玉 龍彦（東京大学 先端科学技術研究センター 教授）、非特許文献 5）

【0016】

10

20

30

40

50

【非特許文献3】M. S. Almen et. al, BMC biology 7:50,doi:10.1186/1741-7007-7-50, This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1741-7007/7/50>

【非特許文献4】P. F. Slivka et al., ACS Chem. Biol., 2008, 3 (7), pp 402-411

【非特許文献5】<http://www.nedo.go.jp/activities/portal/gaiyou/p06009/p06009.htm>

【0017】

上記以外に知られている他の方法を挙げる。

膜タンパク質以外でも、細胞外や核内、他の細胞内小器官で働くタンパク質は、細胞膜を通過して移動する。これらのタンパク質の細胞内移動および代謝の制御には、少なくともシグナルペプチド、移行ペプチド配列が関与している(O. Bakke and T. W. Nordeng, Immunol Rev. 172:171-87, 1999)。シグナルペプチドは、一般にその内部に疎水性の高い部分を含む。

10

上述のように、疎水性が高いアミノ酸配列は分子内に埋もれているとして、従来、抗ペプチド抗体作製時の候補配列として避けられてきた。また疎水性アミノ酸配列からなるペプチドは、合成しても、その難水溶性のために、中性水溶液の状態でのハンドリングが困難であり、キャリアタンパク質との架橋反応にも供し難いことが多く、これらの問題は疎水性アミノ酸配列が抗原として避けられるさらなる原因となっている。このため、シグナルペプチドや膜タンパク質における疎水性の高いアミノ酸配列を多く含む配列部分は、免疫原の候補として選択することは極めて困難であったため、このような配列に対する抗体は、重要であるにも関わらずほとんど作られていなかった。

20

【0018】

膜タンパク質に対する抗体を得るのが困難な理由のもう一つは、高等生物の膜タンパク質の細胞外親水性部分はしばしば糖鎖付加されており、合成ペプチドで免疫して合成ペプチドを認識する抗ペプチド抗体ができて、天然の抗原タンパク質が認識されない場合が多いことである。

【0019】

合成ペプチドによらずに免疫する場合の手段として、そのタンパク質のcDNAをクローニングもしくは全合成して、組換え遺伝子として適当な宿主でタンパク質を発現させ、得られたタンパク質を精製して免疫に使用することができる。しかしながら、この方法では、膜タンパク質はしばしば発現レベルが低く、膜タンパク質であるがゆえに精製も比較的困難であるという問題がある。

30

【0020】

また、別の免疫方法としては、DNA免疫といわれる方法がある(非特許文献6)。この方法は、マウスで発現できるプロモーター下流にクローニングサイトを配置したプラスミドベクターに、目的とするタンパク質をコードするcDNAをクローニングして、プラスミドDNAで免疫する方法であるが、免疫が成功する確実性は高くなく、細胞内局在性の膜タンパク質については用いることができず、さらに、手間がかかるという問題点がある。

【0021】

また、バキュロウイルスのエンベロープ中に目的とするタンパク質を発現させて、ウイルス粒子で免疫する方法があるが、本方法も手間がかかる(非特許文献7)。

40

【0022】

組換えウイルスを用いて適当な細胞に目的とするタンパク質を発現させ、細胞ごと免疫に使用する方法もあるが、特別な技術と多大な労力が必要である(非特許文献8)。

【0023】

ペプチドはそのままでは分子量が小さすぎて、抗原として適していないために、分子量を大きくする必要がある。このため、通常はペプチドとキャリアタンパク質とを架橋したものを抗原として用いている。主に用いられる架橋試薬としては、アミノ基とスルフィドリル基を架橋するMBS (m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester)や、アミノ基とカルボキシル基を架橋するEDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride)が知られている(非特許文献1)。他に、glutaraldehyde bisimide este

50

rが用いられる場合がある。これらの反応は、EDCはpH5付近、他の試薬はpH7~8の水溶液で使用可能である（非特許文献1）。難溶性または不溶性の疎水性ペプチドは、このような条件下では反応に寄与できないため、コンジュゲート作製がうまくできない。

【0024】

抗原にキャリアタンパク質を用いない方法としては、ペプチド合成時にリジンのアミノ基を利用して枝分かれさせて、8量体を合成するMAP (Multiple Antigen Peptide)法が報告されている（非特許文献9）。この方法の欠点として、合成されたMAPペプチドがHPLCでシングルピークとならず精製できない点、10アミノ酸以上になると溶解できない点、しばしば力価上昇がおきにくい点が上げられている（非特許文献10）

【0025】

以上のとおり、疎水性ペプチドに対する抗体を取得する目的において、簡易でありかつ確実性が高く、汎用的に用いられるような方法は未だ開発されていなかった。

【0026】

【非特許文献6】小林岳 生物学 86巻 p384-386 2008

【非特許文献7】<http://www.lsbm.org/staff/hamakubo.html>

【非特許文献8】<https://ruo.mbl.co.jp/custom/custom#sev.html>

【非特許文献9】Tam, J. P.: Synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 5409-5413 (1988)

【非特許文献10】大海忍、辻村邦夫、稲垣昌樹、「抗ペプチド抗体実験プロトコル」秀潤社 1994

【課題を解決するための手段】

【0027】

そこで発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討の末、非イオン性界面活性剤を含む中性水溶液に疎水性ペプチドを懸濁することに着眼した。このような溶液中では、高い疎水性配列を含むペプチドは、単一分子にまでは溶解せず、目視で透明であっても高分子量凝集体として存在することを発明者らは見出した。当該高分子量凝集体は、その大部分が10Kd以上であり、粒径数nm~数十μmのものも含む。このような高分子量凝集体溶液を用いて、キャリアタンパクとのコンジュゲートを作成することなく、ヒト以外の動物を直接免疫したところ、驚くべきことに当該抗原のペプチド配列を特異的に認識する抗体が得られることを発明者らは見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下の構成を有する。

(1) キャリアタンパク質と結合していない状態の疎水性ペプチドを、非イオン性界面活性剤を含む水溶液中において、高分子量凝集体とすることを特徴とする、抗原調製方法。

(2) 非イオン性界面活性剤が、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノオレエート、ポリオキシエチレン(8)オクチルフェニルエーテル、ポリオキシエチレン(9)オクチルフェニルエーテル、ポリエチレングリコール(12)、ポリエチレングリコール(24)、ポリエチレングリコール(60)ドデシルエーテル、およびポリエチレングリコールコレステロール誘導体からなる群から選ばれる1以上である、前記(1)に記載の抗原調製方法。

(3) 非イオン性界面活性剤を含む水溶液中における疎水性ペプチドの高分子量凝集体は、20質量%以上が分子量100Kd以上のものである、前記(1)または(2)に記載の抗原調製方法。

(4) 疎水性ペプチドが、純水に添加した場合に単量体とならずに分子量1万以上の凝集体となるペプチドである、前記(1)~(3)のいずれかに記載の抗原調製方法。

(5) 疎水性ペプチドの配列が MLPGLALLLLAAWTARA (配列番号1)、FGGYQVNPVYVGFEMGYD WLGRMPY (配列番号2) または FLFCWILMILVVLTFVVGANVEK (配列番号3) のいずれかである、前記(1)~(4)のいずれかに記載の抗原調製方法。

(6) 以下の1)および2)の工程を含む、前記(1)~(5)のいずれかに記載の抗原調製方法。

1) キャリアタンパク質と結合していない状態の疎水性ペプチドを純水に懸濁する工程

10

20

30

40

50

- 2) 1) で得られる懸濁液に非イオン性界面活性剤を添加する工程
 (7) 前記(1)～(6)のいずれかに記載の方法により調製された抗原で、ヒト以外の哺乳動物を免疫して得られる抗体。
 (8) 抗体がモノクローナル抗体である、前記(7)に記載の抗体。
 (9) サンプル中に存在する抗原の検出方法であって、前記(7)の抗体を当該サンプルと接触させる工程を含む、検出方法。
 (10) 抗原がアミロイド前駆体タンパク質シグナルペプチド(SPAPP、以下単にSPAPPとすることがある)であって、抗体が抗アミロイド前駆体タンパク質シグナルペプチドモノクローナル抗体(抗SPAPPモノクローナル抗体)である、前記(9)に記載の検出方法。
 (11) 前記(1)～(6)のいずれかに記載の方法により調製された抗原を、ヒト以外の哺乳動物に投与する工程を含む、抗体の製造方法。

10

【発明の効果】

【0028】

本発明の方法によれば、抗原性が悪いと予想され、水溶液中でハンドリングが困難なために、長年避けられてきた疎水性ペプチドを用いて、当該疎水性ペプチドに対する抗体が得られる。本発明方法によれば、キャリアタンパクと疎水性ペプチドとを結合させてコンジュゲートを作成する費用と時間が不要となり、経済性が高まる。さらに、キャリアタンパク質を用いて免疫する場合には、キャリアタンパク質に対する抗体も必然的に生じてしまうが、本発明の方法はキャリアタンパク質を用いないため、目的とする抗体を高効率で得ることができる。

20

【0029】

本発明により、疎水性ペプチドに対する抗体が得られるようになるため、疎水性シグナルペプチドおよび膜タンパク質についての代謝経路、細胞内局在性、相互作用相手などの生理的な役割に関するこれまでに得られなかった新たな有用情報が得られるようになる。このようにして得られる有用情報は、細胞機能の理解、ならびに診断薬および医薬品の開発に貢献できる可能性が高い。膜タンパク質に対する抗体を得るのは従来非常に困難であったが、本発明により、格段に労力と費用を軽減できるという効果が得られる。

【図面の簡単な説明】

【0030】

【図1】精製SPAPPのHPLCクロマトグラム

30

【図2】精製SPAPPのLC-MSクロマトグラム

【図3】本発明の方法で免疫したマウス20匹の血清(500倍希釈)を用いた、SPAPPに対するドットプロット

【図4】免疫に用いたSPAPP/1% Tween20懸濁液中のCountess(登録商標)計測による粒子サイズ分布

【図5】免疫に用いたSPAPP/1% Tween20懸濁液中のペプチド凝集体分子量分布の測定手順

【図6】SPAPPの非イオン性界面活性剤中での分子量分布。A: SPAPPを純水懸濁直後に界面活性剤を混合した場合。B: SPAPPを純水懸濁後、90分室温に放置してから界面活性剤を添加した場合。

40

【図7】本発明の方法で免疫したマウス30匹の血清(10000倍希釈)を用いた、SPAPPに対するEIAによる力価評価結果

【図8】図7の3個体の血清を用いた、ヒト神経芽細胞腫SK-N-SH細胞の蛍光免疫染色。A: No.6、B: No.10、C: No.15

【図9】本発明により得られた抗SPAPPモノクローナル抗体CM61による、SPAPPに対するドットプロットによる力価評価結果

【図10】本発明により得られた抗SPAPPモノクローナル抗体(10種類)を用いた、SPAPPに対するEIAによる力価評価結果

【図11】ペプチドFCG24およびFLF23の1% Tween20懸濁液中の粒子サイズ分布。A: ペプチドFCG24の1% Tween20懸濁液中のCountess(登録商標)計測による結果。B: 1% Tween2

50

0溶液の動的光散乱式粒子径測定装置による計測結果。C：ペプチドFLF23の1% Tween20懸濁液中の動的光散乱式粒子径測定装置による計測結果

【図12】ペプチドFCG24(A)およびFLF23(B)の1% Tween20懸濁液で免疫したマウスの血清を用いた、抗原ペプチドに対するEIAによる力価評価結果

【図13】本発明により得られた抗SPAPPモノクローナル抗体CM6を用いてSPAPP添加ヒト血漿中のSPAPPを検出した結果

【発明を実施するための形態】

【0031】

(疎水性ペプチド)

本発明の抗原調製方法に用いられる抗原としてのペプチドは、疎水性ペプチドであればいずれのものも用いることができ、キャリアタンパク質と結合していない状態の疎水性ペプチドであることを特徴とする。すなわち、本発明の抗原調製方法は、キャリアタンパク質を用いずに疎水性ペプチドのみを抗原として用いる方法である。

本発明において抗原とすべきペプチドの親水性/疎水性プロフィールは、基本的には、標的タンパク質のアミノ酸配列を調べることでわかる。ウェブサイト(Expasy Proteomics toolsのprotscale (HYPERLINK "http://expasy.org/tools/protscale.html" http://expasy.org/tools/protscale.html)等)や市販の遺伝子解析ソフト(株式会社ゼネティックスの遺伝情報処理ソフトウェア「GENETYX」等)で調べることができる。本発明に用いられる疎水性ペプチドとは、前記親水性/疎水性解析結果をベースにして疎水性と判断されるペプチドであり、さらに厳密に言えば、純水と混合した場合に、単量体とならずに分子量1万以上の凝集体となるようなペプチドである。ここで、凝集体の有無およびおよその分子量分布は、ペプチド溶液を、例えば、アミコンウルトラ(Amicon Ultra)-0.5、PLGC ウルトラセル(Ultracel)-10メンブレンのような、カットオフ分子量1万の遠心制限外ろ過ユニットにかけて、元の溶液と透過液のペプチド濃度を比較することによって、確認することができる。また、HPLCで適切な分画レンジのゲルろ過用カラムを用いて分析することにより調べることができる。

本発明の抗原として用いられる疎水性ペプチドはF-MOC法ペプチド合成機で合成し、C18 HPLCカラムでアセトニトリルの濃度勾配により分離精製、分種することができる。なお、これらの手順を合成ペプチド受託メーカーに委託することもできる。本願明細書では、ペプチドに対する抗体を「抗ペプチド抗体」といい、特に疎水性ペプチドに対する抗体に限定する場合は「抗疎水性ペプチド抗体」という。

【0032】

(疎水性ペプチドの凝集体)

疎水性ペプチドは、非イオン性界面活性剤を含む中性水溶液中で高分子量凝集体を形成するようなものであればいずれでも本発明における抗原として用いることができる。凝集の程度と凝集体の粒経は、抗原とするペプチドの疎水性配列によって変わり得るが、ペプチドの凝集体の大部分が分子量1万から2万またはそれ以上であればより好ましい。また、ハンドリング可能な範囲内であれば分子量は大きい程望ましい。なお、本明細書では、ペプチド同士が非共有結合で結合して形成された凝集体全体を指して「分子」と呼ぶことができ、またペプチドを凝集体の状態を含んでいる液を指して「溶液」または「懸濁液」と呼ぶことがある。後述する実施例にあるように、本発明の抗原調製方法によれば、抗原とする疎水性ペプチドとキャリアタンパクとのコンジュゲートを作成しなくても、疎水性ペプチドのみで抗原として認識され、当該ペプチドに対する抗体(抗ペプチド抗体ともいう)を得ることができる。すなわち、ペプチドが水溶液中で、数個以上からなる凝集体を形成し、分子量1万程度以上の分子になっていれば、免疫反応において抗原として認識され、当該抗原に対する抗体が得られる。このように、本発明方法によれば、非イオン性界面活性剤の種類を問わず、その濃度も特定の濃度に限定されず、対象も特定のアミノ酸配列に限定されずに、疎水性ペプチドに対する抗体(抗疎水性ペプチド抗体ともいう)を取得することができる。

【0033】

10

20

30

40

50

(抗原調製方法)

本発明の抗原調製方法は、例えば以下の工程により行われる。

1) 純水に疎水性ペプチドを添加し、ミキサーでよく混合し、不透明な場合は、超音波をかけてある程度透明にする。

2) 1) で得られた疎水性ペプチドの純水懸濁液に非イオン性界面活性剤を添加し、疎水性ペプチドの高分子量凝集体を生成させる。

ここで、高分子量凝集体の分子量分布は、分子量1万(10Kd)以上が大部分を占めることが必要である。また、好ましくは、懸濁液中において分子量10万(100Kd)以上がペプチド総質量の20質量%以上となるように調製することが望ましい。分子量分布はゲルろ過もしくは遠心分子量カット膜とBCAもしくはタンパク質(ペプチド)濃度アッセイ(実施例のように)とを組み合わせること、またはNative PAGEで概ね把握することができる。

また、高分子量凝集体の粒径分布は、1 μ m~100 μ mの粒子が含まれていることが望ましい。粒径分布は、動的光散乱式粒子径測定装置のような動的光散乱を利用した機器や、Coulter Counter (Invitrogen) コールターカウンターのようない細胞計数機で調べることができる。

なお、疎水性ペプチドを純水に懸濁した後界面活性剤添加までの時間は、その後の凝集体分子量分布に影響する。したがって、時間を置かずに界面活性剤を添加した場合には、凝集体の分子量分布は低い側になる傾向があり、純水懸濁状態でじゅうぶん時間を置いた場合には、より高分子量側に分布する傾向がある。このような方法で、疎水性ペプチド凝集体のサイズ分布を制御することが可能である。

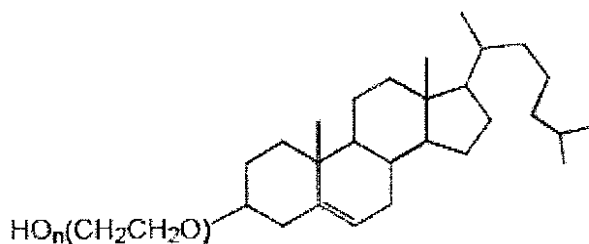
【0034】

(非イオン性界面活性剤)

本発明の疎水性ペプチドの高分子量凝集体を作成するための界面活性剤は、非イオン性界面活性剤であればいずれのものでもよく、例えば、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート(Tween 20)、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノオレエート(Tween80)、ポリエチレングリコール(12)(PEG12)、ポリエチレングリコール(24)(PEG24)、ポリエチレングリコール(60)(PEG60)ドデシルエーテル、下記一般式で示されるポリエチレングリコールコレステロール誘導体、ポリオキシエチレン(8)オクチルフェニルエーテル(Triton X-100)、ポリオキシエチレン(9)オクチルフェニルエーテル(Nonidet P-40)、 α -オクチルグリコシド、ドデシル-D-マルトシドや下記市販の非イオン性界面活性剤が挙げられる。このうちでも特に、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノオレエート、ポリオキシエチレン(8)オクチルフェニルエーテル、ポリオキシエチレン(9)オクチルフェニルエーテル、ポリエチレングリコール(12)、ポリエチレングリコール(24)、ポリエチレングリコール(60)ドデシルエーテル、またはポリエチレングリコールコレステロールが好ましく用いられる。本発明で用いる非イオン性界面活性剤は、疎水性ペプチドを純水に懸濁した状態の溶液に添加してもよいし、または、先に非イオン性界面活性剤水溶液を調製し、これに疎水性ペプチドを添加して疎水性ペプチド高分子量凝集体を調製しても良い。疎水性ペプチド高分子量凝集体の分子量分布は、疎水性ペプチドの配列、非イオン性界面活性剤の種類、あるいは非イオン性界面活性剤の濃度によっても変化する。非イオン性界面活性剤の濃度は、疎水性ペプチド高分子量凝集体の粒子サイズが幅広く分布するような範囲であればよく、例えば0質量%から2質量%程度の範囲が好ましい。

【0035】

【化 1】



【 0 0 3 6 】

(市販非イオン性界面活性剤の例)

- N,N-Bis(3-D-gluconamidopropyl)cholamide [BIGCHAP] 同仁化学
- 342-05611 N,N-Bis(3-D-gluconamidopropyl)deoxycholamide [Deoxy-BIGCHAP] 同仁化学
- 149-05701 NIKKOL BL-9EX [Polyoxyethylene(9)Lauryl Ether] 和光特級
- 348-05071 Octanoyl-N-methylglucamide [MEGA-8] 同仁化学
- 345-05081 Nonanoyl-N-methylglucamide [MEGA-9] 同仁化学
- 342-05091 Decanoyl-N-methylglucamide [MEGA-10] 同仁化学
- 348-05093 同仁化学
- 164-19881 Polyoxyethylene(8)Octylphenyl Ether [Triton X-114] 生化学用
- 161-19911 Polyoxyethylene(9)Octylphenyl Ether [NP-40] 生化学用
- 168-11805 Polyoxyethylene(10)Octylphenyl Ether [Triton X-100]
- 163-11512 Polyoxyethylene(20)Sorbitan Monolaurate [Tween 20]
- 160-11522 Polyoxyethylene(20)Sorbitan Monopalmitate [Tween 40]
- 167-11532 Polyoxyethylene(20)Sorbitan Monostearate [Tween 60]
- 164-11542 Polyoxyethylene(20)Sorbitan Monooleate [Tween 80]
- 161-11552 Polyoxyethylene(20)Sorbitan Trioleate Pr.G.
- 160-11561 Polyoxyethylene(23)Lauryl Ether [Brij35]
- 533-80981 CALBIOCHEM
- 167-11571 Polyoxyethylene(20)Cethyl Ether [Brij58]
- 341-06161 n-Dodecyl-β-D-maltopyranoside 同仁化学
- 346-05371 n-Heptyl-β-D-thioglucopyranoside 同仁化学
- 340-05031 n-Octyl-β-D-glucopyranoside 同仁化学
- 349-05361 n-Octyl-β-D-thioglucopyranoside 同仁化学
- 343-06861 n-Nonyl-β-D-thiomaltoside 同仁化学
- 043-21376 Digitonin 生化学用
- 192-08851 Saponin, from Soybeans 和光一級

10

20

30

【 0 0 3 7 】

(免疫)

免疫は通常当業者が行う手法に従って行えばよい。試験採血により血清力価を測定し、免疫期間を延長しても良い。血清力価は抗原ペプチドのドットプロットや抗原ペプチドコンジュゲートコートプレートもしくは抗原ペプチドコートプレートを用いたEIAによって調べることができる。更には、目的に応じてウェスタンプロットや免疫染色により評価することが出来る。なお、本発明の免疫原の調製は、キャリアタンパクを用いずに、疎水性ペプチドを非イオン系界面活性剤に添加して凝集体を得る方法により行われているが、このことは、抗体の力価測定のための抗原ペプチドコンジュゲートコートプレートもしくは抗原ペプチドコートプレート作成において、キャリアタンパク質とペプチドとのコンジュゲートを使用することをなんら排除するものではないことはいうまでもない。

40

【 0 0 3 8 】

(モノクローナル抗体)

次に、上記抗原調製方法により得られる疎水性ペプチドの高分子量凝集体を抗原として

50

用いて免疫した哺乳動物から、上記疎水性ペプチドに対するモノクローナル抗体を取得する方法について説明する。

免疫する哺乳動物としては、モルモット、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ等の実験動物が用いられるが、モノクローナル抗体あるいはポリクローナル抗体を得るためには、ラット、マウス、ウサギが好適である。免疫方法は、例えば、皮下、腹腔内、静脈内、筋肉内、皮内等のいずれの投与経路を用いてもよいが、主として、皮下、腹腔内、静脈内に抗原を注入するのが好ましい。また、免疫間隔、免疫量等も特に制限なく種々の方法を用いることが可能であるが、例えば、2週間隔で合計約2~10回免疫し、最終免疫後、好ましくは約2~7日後に、約1~5回、生体内から検体を擦取する方法がよく用いられる。また、免疫量については、1回に投与するペプチド量を限定するものではないが、例えば、マウス1匹当たり10~200 µg程度のペプチドを用いることが好ましい。初回免疫は上記疎水性ペプチドの高分子量凝集体をアジュバント(例えば、フロイントの完全アジュバント)とよく混合してマウスの腹腔内に投与し、細胞を増殖させ、2週間隔で再び該高分子量凝集体をアジュバント(例えば、フロイントの不完全アジュバント)とともによく混合して腹腔内に投与し、その後血液や腹水や抗体産生細胞を採取することにより、高力価の抗疎水性ペプチドモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を効率良く取得することができる。なお、目的のモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体の精製は、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過法、硫酸塩析法等の公知の方法により行うことができる。

【0039】

次に、上記疎水性ペプチドに対する抗体の製造方法により得られた抗体を用いた抗原抗体反応に基づいて、検体中から所定の疎水性ペプチドを検出する、検出方法について説明する。上記検体としては、いかなる態様のものでもよく、例えば、血澄、血清、血漿、リンパ液、尿、髄液、唾液、汗、腹水、羊水、または細胞もしくは臓器の抽出液等から調製した生体試料を使用することができる。なお、上記生体試料は、必要に応じて適切に処理することができる。例えば、細胞の分離、抽出操作などで得られた試料については、免疫組織染色法、酵素免疫測定法、凝集法、競合法、サンドイッチ法など既知の方法を適用することができる。免疫組織染色法は、例えば標識化抗体を用いる直接法、該抗体に対する抗体の標識化されたものを用いる間接法などにより行い得る。標識化剤としては蛍光物質、放射性物質、酵素、金属、色素など公知の標識物質はいずれも使用できる。

【0040】

(コンジュゲート)

本明細書で用いる用語「コンジュゲート」とは、キャリアタンパク質と抗原ペプチドの化学的架橋による複合体を意味する。通常、ペプチドを抗原として用いる場合には、代謝時間を長くするために、クラスII型T細胞に結合させる効果のあるキャリアタンパク質に抗原を化学的に架橋してコンジュゲートとして用いる(非特許文献1)。キャリアタンパク質としてはKLH(Keyhole limpet hemocyanin)、BSA(Bovine serum albumin)、Ovalbuminなどが用いられる(非特許文献1)。

架橋には、MBS(m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester)、NHS(N-hydroxysuccinimide ester)、EDC(1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide)、グルタルアルデヒドなどが用いられる。MBSはシステイン残基の(-SH)とアミノ基を、NHSはアミノ基とアミノ基を、EDCはアミノ基とカルボキシル基とを、グルタルアルデヒドはアミノ基同士を共有結合化させて(イミン結合を形成させて)架橋する。これらの架橋に寄与するには遊離の官能基である必要がある。

【実施例】

【0041】

[試験例1]

疎水性ペプチドSPAPP(アミロイド前駆体タンパク質シグナルペプチド)の合成、精製、精密質量の確認

ヒト amyloid precursor protein A4 のシグナルペプチドと想定される1位~17位の配

10

20

30

40

50

列（配列表配列番号1）からなるペプチドMLPGLALLLLAAWTARA-COOH を、GL Biochem (Shanghai) Ltd.への委託により合成、精製した。精製ポリペプチドの純度は、HPLCのピーク面積比より、92%~94%であった（図1）。また、分子量は、LC-MS（ESIモード）より、891.5の2価イオンシグナルもしくは1781の1価イオンシグナルが観測された（図2）ことから、質量1781であることを示している。これはアミノ酸配列から計算される分子量と一致しており、目的とするペプチドであることが確認された。

【0042】

〔試験例2〕

ペプチドSPAPPの各種溶媒への溶解性試験

(1) 粉末精製SPAPPを各種濃度で各種溶媒と混和し、溶解性について調べた。試験条件および結果を表1に示す。

なお、以下で用いる用語「可溶」とは目視で溶媒が透明な状態を意味し、「不溶」とは目視で溶媒が白濁した状態を意味する。

【0043】

【表1】

溶媒分類	溶媒名	SPAPP濃度	溶解性
中性水溶液	純水	0.1 mg/ml	不溶
	リン酸バッファー (PBS) (pH7)		不溶
強酸性水溶液	0.1%トリフルオロ酢酸 (pH2.0)	7.5mg/ml	可溶
	1%ギ酸 (pH3.0)	0.5mg/ml	可溶
有機溶媒	100%メタノール	0.5mg/ml	可溶
	100%DMSO	50mg/ml	可溶
	100%DMF	20mg/ml	可溶
界面活性剤 (陰イオン性)	1%SDS	1~5mg/ml	可溶
(非イオン性)	1%Tween20	1~5mg/ml	可溶
(非イオン性)	1%Tween80	1~5mg/ml	可溶
(非イオン性)	1%TritonX-100	1~5mg/ml	可溶
(非イオン性)	1% Nonidet P40	1~5mg/ml	可溶
(非イオン性)	1% PEG12	1~5mg/ml	可溶
(非イオン性)	1% PEG24	1~5mg/ml	可溶
(非イオン性)	1%PEG60 docesyether	1~5mg/ml	可溶
(非イオン性)	1% cholesterol-PEG (日油 No. CS050)	1~5mg/ml	可溶

【0044】

(2) 結果および考察

(i) 中性水溶液

SPAPPは中性水溶液には白濁して全く不溶であった。

(ii) 強酸性水溶液

SPAPPの等電点は10.9であり、強酸性溶液には可溶であった。

(iii) 有機溶媒

SPAPPは極性有機溶媒に可溶であった。

(iv) 界面活性剤を含む中性水溶液

SPAPPは極性および非イオン性界面活性剤を含む中性水溶液に可溶であった。

(v) 以上のことから、SPAPPは高度の疎水性のために、中性水溶液中では溶解せず、大きな凝集体となって白濁を引き起こすが、SPAPPを水和させる分子の介在（すなわち、界面活性剤）によって、中性水溶液中であっても可溶化されると考えられる。このような状態のSPAPPは後述するように、目視で透明であっても、高分子量凝集体となって水溶液中に存在している。

なお、極性の界面活性剤を含む水溶液に疎水性ペプチドは溶解するものの、これを用い

て免疫しても抗体は得られなかったことから（データを示さず）、界面活性剤としては非イオン性界面活性剤が好ましいと考えられた。また、強酸性水溶液および有機溶媒は参考例である。

【0045】

〔試験例3〕

ドットプロットによる抗体力価測定試験方法

(1) ドットプロットは以下の手順で行った。

(i) ニトロセルロース膜に、SPAPPの1% Tween20 溶液を1 μ l/dotでスポットして、当該ニトロセルロース膜を1%スキムミルク/TBSTまたはStarting Block (TBS) Blocking Bufferで室温で1時間以上ブロッキングした。

(ii) 力価を調べる血清を、0.2%スキムミルク/TBSTで400~500倍に希釈して、前記SPAPPをスポットしたニトロセルロース膜に添加し、室温(20~24 $^{\circ}$ C)で1時間振とうすることによって、1次抗体反応を行った。

(iii) 結合しなかった未反応分の抗体の除去は、0.2%スキムミルク/PBSTで5分 \times 3回、ニトロセルロース膜を洗浄することによって行った。

(iv) 2次抗体反応は、0.2%スキムミルク/TBSTで4000倍希釈した2次抗体と共にニトロセルロース膜を室温で1時間振とうすることによって行った。

(v) 0.2%スキムミルク/TBSTで5分 \times 3回、ニトロセルロース膜を洗浄した。

(vi) アルカリフォスファターゼ基質溶液を添加して、室温で30分呈色反応を行い、純水で洗浄して反応を停止させた。

【0046】

(2) 材料および試薬

2次抗体

血清がマウスの場合：Anti-mouse IgG (Fc specific) Alkaline phosphatase conjugate (Sigma No. A-2429)

血清がウサギの場合：Goat polyclonal anti-rabbit immunoglobulins AP (DAKO No. D0487)

アルカリフォスファターゼ基質溶液：サーモサイエンティフィック、No.34042 1-Step NBT/BCIP

TBS：10mM Tris-HCl pH7.5, 0.1M NaCl

TBST：TBS+1% Tween20

ニトロセルロース膜：GE ヘルスケア製 Hybond-ECL

Starting Block (TBS) Blocking Buffer：サーモサイエンティフィック製 No.37542

【0047】

〔比較例〕

各種のコンジュゲートを免疫原として得られた血清（ポリクローナル抗体）の力価の測定（従来法）

SPAPPと各種のキャリアタンパクとのコンジュゲートを作成しこれを免疫に使用して得られた血清を用いて力価の測定を行った。

(1) SPAPP / KLHコンジュゲート

(1-1) コンジュゲートの作成

2.5mg KLH（和光純薬 免疫化学用 No. 08607663）を66 μ lの1.5 M NaClに溶解し、70 μ lの1M MESバッファー(pH4.5)と565.5 μ lの純水を混合して終濃度3.77mg/mlのKLH溶液を調製した。SPAPP溶液は、濃度が7.5mg/mlとなるようにSPAPPを100% DMSOに溶解して調製した。EDC溶液は純水で33mg/mlとなるよう調製した。これらの溶液を以下の容量と順で混合し、23 $^{\circ}$ Cで15時間置いた。反応溶液は混合直後に白濁した。

KLH溶液 270 μ l (1017 μ g)

SPAPP溶液 180 μ l (1315 μ g)

EDC溶液 30 μ l

未反応アミノ基をクエンチングするために、1M Tris-HCl (pH7.0)を30 μ l添加した。

次にPBSで2倍に希釈して10本のチューブに分注し、免疫まで-30℃に保存した。

(1-2) 免疫

免疫は、抗原を等容量の完全フロイントアジュバント（初回免疫時のみ）または不完全フロイントアジュバントと混合し、2羽のウサギの皮下に、1回におよそ120 µgの抗原ペプチドに相当する量を注射することにより行った。初回免疫日を第0日として、2週ごとに免疫を行った（合計4回）。第49日に採血を行い、血清の抗体価をドットプロット試験により調べた。

(1-3) 結果

SPAPPに対する抗体価は検出されなかった。原因としては、反応液組成がSPAPPの溶解状態を保つには適していないため、コンジュゲートの作成が不十分である可能性が考えられた。

10

【0048】

(2) SPAPP/EWA コンジュゲート

(2-1) コンジュゲートの作成

KLHはキャリアタンパク質として溶解性が低いので、溶解性の高いEgg white avidin（EWA, 和光純薬 No.017-21011）を選択した。EWAを純水に25mg/mlとなるように溶解してEWA水溶液とし、次に以下の組成でSPAPP/EWA DMSO溶液を調製した。

(i) EWA DMSO溶液

100% DMSO	280 µl	
1 M MES バッファー (pH4.5)	35 µl	20
EWA水溶液	50 µl	

(ii) SPAPP DMSO 溶液

7.5mg/ml SPAPP / 100% DMSO	135 µl	
1M MESバッファー (pH4.5)	50 µl	
純水	50 µl	

これらの溶液を以下の容量と順で混合し、23℃で15時間置いた。反応溶液はやや白濁した。未反応アミノ基をクエンチングするために、1 M Tris-HCL (pH7.0)を30 µl添加した。PBSで2倍に希釈して10本のチューブに分注し、免疫まで-30℃に保存した。

(iii) SPAPP/EWAコンジュゲート溶液

EWA DMSO溶液	365 µl	30
SPAPP DMSO 溶液	250 µl	
33mg/ml EDC	30 µl	

(2-2) 免疫

免疫は、抗原を等容量の完全フロイントアジュバント（初回免疫時のみ）または不完全フロイントアジュバントと混合し、2羽のウサギの皮下に、1回におよそ120 µgの抗原ペプチドに相当する量を注射することにより行った。初回免疫日を第0日として、2週ごとに免疫を行った（合計4回）。第49日に採血を行い、血清の抗体価をドットプロットで調べた。

(2-3) 結果

SPAPPに対する抗体価は検出されなかった。原因としては、反応液組成がSPAPPの溶解状態を保つには適していないため、コンジュゲート作成が不十分であった可能性が考えられた。

40

【0049】

(3) SPAPP / HRPコンジュゲート

(3-1) コンジュゲートの作成

Horseradish peroxidase (HRP, 和光純薬 No.169-10791) を純水に50mg/ml となるように溶解した。不溶性不純物を除去するために15000rpmで10分間遠心して上清を回収した。分解タンパク質を除去するために分子量カットオフ 5000の遠心フィルターユニット(Amic on YM-5)を用いて純水で3回洗浄した。

(i) HRP DMSO溶液

50

100% DMSO	280 μ l
1 M MES バッファー (pH4.5)	35 μ l
HRP	44 μ l
純水	6 μ l
(ii) SPAPP DMSO 溶液	
7.5mg/ml SPAPP / 100% DMSO	135 μ l
1M MESバッファー (pH4.5)	50 μ l
純水	50 μ l

これらの溶液を以下の容量と順で混合し、23℃で15時間置いた。反応溶液はやや白濁した。未反応アミノ基をクエンチングするために、1M Tris-HCL (pH7.0)を30 μ l添加した。PBSで2倍に希釈して10本のチューブに分注し、免疫まで-30℃に保存した。

10

(iii) SPAPP / HRPコンジュゲート溶液

HRP DMSO溶液	365 μ l
SPAPP DMSO 溶液	250 μ l
33mg/ml EDC	30 μ l

(3-2) 免疫

免疫は、抗原を等容量の完全フロイントアジュバント（初回免疫時のみ）または不完全フロイントアジュバントと混合し、2羽のウサギの皮下に、1回におよそ120 μ gの抗原ペプチドに相当する量を注射することにより行った。初回免疫日を第0日として、2週ごとに免疫を行った（合計4回）。第49日に採血を行い、血清の抗体価をドットプロットで調べた。

20

(3-3) 結果

SPAPPに対する抗体価は検出されなかった。原因としては、反応液組成がSPAPPの溶解状態を保つには適していないため、コンジュゲート作成が不十分であった可能性が考えられた。

【0050】

(4) SPAPP/OVAコンジュゲート

(ii)に示す手順に従いSPAPPとOvalbumin（オボアルブミン、OVAと略）との間でコンジュゲート反応を行い、(i)に示すSPAPP/OVA溶液からSPAPP/OVAコンジュゲート溶液を作成した。

30

(i) SPAPP/OVA溶液

10 M urea, 20 mM Phosphate buffer	1320 μ l
20 mg/ml SPAPP（純度：94.38%）, DMSO溶液	300 μ l
20 mg/ml Ovalbumin(Calbiochem, #32467), 10 M urea, 20 mM Phosphate buffer	300 μ l
20% Tween20	120 μ l
DW	60 μ l
total	2100 μ l

(ii) 手順

- 95℃に加熱した乾燥機中で上記(i)の溶液を20分間ブレインキュベートした後、架橋剤として62.5 mM BS3(サーモフィッシャーサイエンティフィック) / 20 mM Phosphate bufferをポルテックスしつつ300 μ lずつ加えた。
- 引き続き95℃で2時間インキュベートした。
- その後、1M Tris-HCL(pH7)を120 μ lずつ加え、室温で~30分間、未反応BS3をクエンチさせた。
- さらに7080 μ lのPBS中に上記3.の溶液を滴下した。

40

【0051】

〔実施例1〕

本発明の抗原を用いた抗体の取得(1)ポリクローナル抗体

SPAPPを非イオン性界面活性剤を含む溶媒に懸濁した液を免疫原とした直接免疫法によ

50

り得られた血清を用いてドットプロットによる力価の測定を行った。

(1) 抗原の調製 ~ SPAPP / 1% Tween20 ~

純度92%のSPAPPを秤量して6mgを5.4mlの純水に懸濁した。この時点ではSPAPPは水溶液に全く溶けず白濁していた。この状態で約3時間置き、10% Tween 20を0.6ml添加混合した。SPAPP終濃度は2mg/mlであった。更にトミー精工Handy sonic model UR-20Pでpower level 7で断続的に延べおよそ3分超音波をかけた。ある程度透明度が増し、600nmの吸光度が0.2程度になるまで超音波振動を行った。このようにして得られたSPAPP溶液を試験管10本以上に分注して、免疫に用いられる直前まで-30℃で保存した。

(2) 免疫

免疫は、上記(1)で調製したSPAPP溶液を等量のフロイントcomplete またはincomplete アジュバントと混合して、Balb/cマウス20匹の皮下に1回1匹当たり20µgとなるように注射することにより行った。免疫は、2週間隔で合計6回というスケジュールで行い、適宜、抗原投与の1週後に中間採血または全採血を行った。

10

(3) ドットプロット

試験例3に示すドットプロットにおいて、SPAPP濃度を1スポットあたり10、100ngとなるように調製し、(2)で得られた20匹のマウスの血清を500倍希釈したものについて力価を測定した。

(4) 結果

結果を図3に示す。20匹中約半数の血清で10ngのSPAPPが検出可能であった。このように、SPAPPの懸濁液をコンジュゲートなしで免疫に使用することにより、SPAPPと十分な反応性を示す血清(ポリクローナル抗体)が得られた。

20

【 0 0 5 2 】

〔 実施例 2 〕

SPAPPの粒子サイズ分布および分子量分布

(1) 粒子サイズ分布の測定

上記の免疫に供したSPAPP / 1% Tween20懸濁液の粒子サイズ分布について以下のように調べた。2mg/mlのSPAPP懸濁液を等量の0.4%トリパンブルー液と混合して、細胞計数装置Countess (登録商標) (INVITROGEN製)に適用した。この装置では、2µm~80µmの粒子が計測できる。

(2) その結果、懸濁液中のSPAPP粒子サイズ分布は2~60µmで濃度は 3.2×10^6 /mlであった。大多数は数µmであった。図4に分子量分布の測定結果を示す。

30

次にこの懸濁液のSPAPP凝集体の分子量分布を、以下に示す手順にしたがって測定した。なお、本手順の概略を図5に示す。

(i) 15000rpmで5分間遠心して上清と沈殿に分けた。この遠心によっておよそ1µm以上の粒子が沈殿する。

(ii) 上清を分子量100,000カットスピンフィルター(Amicon Microcon YM--100)に適用し、遠心により当該フィルターに通す。

(iii) (ii)のフロースルー液を、分子量10,000カットスピンフィルターに適用し、遠心により当該フィルターに通す。

以上の工程のそれぞれの段階で、溶液のタンパク質濃度を、BSAを標準としてBCAプロテインアッセイ(サーモフィッシャーサイエンティフィック)で測定した。

40

その結果、最初の遠心によって、上清のタンパク質濃度が原液の約半分になることから、1µm以上の粒子(不溶性画分)が質量にして全タンパク質の約半分(48質量%)を占めることがわかった。残りは、分子量10,000-100,000(10-100kd)が20質量%、分子量100,000(100kd)以上が33質量%を占めることがわかった(表2)。

【 0 0 5 3 】

【表 2】

SPAPP/1% Tween20 懸濁液中のペプチド凝集体の分子量分布

MW	10Kd未満	10-100Kd	100Kd以上	不溶性(沈殿)
ペプチド質量比	0%	20%	33%	48%

【0054】

(3) まとめ

SPAPPは17アミノ酸からなり、単量体の分子量は1781であるが、このように界面活性剤を含む水溶液に懸濁状態にした場合には、大きな分子量分布および粒子サイズ分布になっていることがわかる。

10

【0055】

〔実施例3〕

凝集体の分子サイズ(分子量/粒径)分布コントロール試験

(1) 純水中での放置時間と凝集体の分子サイズ分布の関係

SPAPPを純水に懸濁してから各種界面活性剤を添加するまでの時間を変更し、時間によって凝集体の分子サイズ分布が異なることを確認した。例えば、1% Tween20の場合、不溶性画分(沈殿)は、SPAPPの純水への懸濁直後に添加すると5%、1.5時間後では17%、3時間後では48%であった。

(2) 他の非イオン性界面活性剤溶液中での分子サイズ分布

SPAPPが他の非イオン性界面活性剤溶液中でも同様に高分子量凝集体を形成するかを調べた。界面活性剤として、PEG60 dodecylether (Polypure社), Triton X-100, Nonidet P-40をいずれも1%で使用した。実施例2と同様の方法で、各々の界面活性剤を用いてSPAPP懸濁液を調製し、遠心とスピン型分子量カットフィルターを用いて、サイズ分画した後、各画分に終濃度1%となるように10%SDSを添加混合して凝集体を溶解した。各画分のペプチド濃度をBCAアッセイで測定し、SPAPP凝集体分子量分布を図6A, Bにまとめた。グラフAは、SPAPPを純水懸濁直後に界面活性剤を混合した場合、グラフBは、SPAPPを純水懸濁後、90分室温に放置してから界面活性剤を添加した場合である。グラフ中、「Ppt」は遠心により除去されるペプチド、即ち沈殿を意味しており、サイズとしては1 μ m以上で分子量としては数百キロダルトン以上と考えられる。「>100Kd」は100Kd以上、「<100Kd」は100Kd以下を意味している。界面活性剤の種類によってサイズ分布に多少の変動はあるが、いずれの界面活性剤においても、上記のような条件で高分子量凝集体が形成されることがわかった。

20

30

(3) 考察

上記(1)および(2)より、界面活性剤の種類や純水への懸濁時間によって分子サイズ(分子量/粒径)を制御できることがわかった。

【0056】

〔実施例4〕

本発明の抗原を用いた抗体の取得(2)モノクローナル抗体

実施例1より、キャリアタンパクとコンジュゲートしない方法でSPAPPに対する抗体を得ることが可能であることがわかったので、次に、モノクローナル抗体の作製を試みた。

40

(1) 免疫

実施例1(1)の方法で抗原を調製し、30匹のBalb/cマウスに免疫を行った。免疫は、2週間隔で合計7回行った。アジュバントには、等量のTiter Max Gold (Titer Max Inc.)を用い、フットパッドに1回に20 μ g相当の抗原を注射して免疫を行った。免疫開始後77日目と90日目の血清について、以下の試験を行った。

【0057】

(2) Enzyme immunoassay (EIA) による抗体の力価測定

(2-1) EIA試験方法

(2-1-1) 手順

(i) 比較例(4)の方法で作成したSPAPP/OVAコンジュゲートを2.5 μ g/mlとなるようにP

50

BSで希釈して、Nunc No.467120 Medisorpのウェルに100 μ l添加、4 で一夜置いた。

(ii) ウェル内の溶液を吸引廃液して、次に230 μ lの1% BSA/PBSTを添加し、室温で1時間置いて、ブロッキングを行った。ブロッキング液をアスピレートで除去し、1%BSA/PBS溶液を230 μ l添加し、室温で1時間以上置いた後、ウェル内の溶液を吸引廃液した。

(iii) 1%BSA/PBSで希釈した血清を各ウェルに100 μ l添加して、室温で1時間置いた。

(iv) ウェル内の溶液を吸引廃液し、300 μ lのPBST(0.1% Tween20)でウェルを6回洗浄した。

(v) 2次抗体として、1% BSA/PBST で4000倍希釈したPOD標識抗マウスIgG (MBL No.330)を100 μ lウェルに添加して、室温で1時間置いた。

(vi) ウェル内の溶液を吸引廃液し、300 μ lのPBST(0.1% Tween20)でウェルを6回洗浄した。

(vii) 発色のための基質としてTMB (DAKO No.S1599) を100 μ lウェルに添加し、室温で30分反応を行い、2N硫酸を等量添加して反応を停止させた。反応液の吸光度を450nmで測定した。

(2 - 2 - 2) 結果

図7に77日目と90日目の10000倍希釈血清の力価を示す。強度の差はあるが、30匹中約1/3にあたる9~10匹の血清に、ある程度の反応性(400mOD以上)があることがわかった。

【0058】

(3) 免疫蛍光染色

上記(2)において力価の高い個体NO.6、NO.9、NO.15の血清について、ヒト神経芽細胞腫SK-N-SH細胞を用いて免疫蛍光染色を行った。

(3 - 1) 手順

ヒト神経芽細胞腫SK-N-SHを、MEM 培地中、Poly-D-lysine coated slide chamber (ベクトンデッキンソン No.354632) に蒔いて37 5% CO₂ インキュベータで細胞培養した。

以下の操作は氷上で行った。

(i) PBSで5分2回洗浄した

(ii) -20 メタノールで5分固定透過処理

(iii) PBSで1回洗浄

(iv) 5%ヤギ血清/PBSで1時間ブロッキング

(v) 5%ヤギ血清/PBSで250倍希釈した上記マウス血清を添加して1時間置いた

(vi) PBSで5分3回洗浄

(vii) 5%ヤギ血清/PBSで1000倍希釈した蛍光標識2次抗体(Alexa FluorR 488 Goat Anti-mouse IgG, 2 mg/ml, Invitrogen No.A11001)を添加して1時間置いた

(viii) PBSで5分3回洗浄

(ix) 退色防止剤(ProLong Gold Antifade Reagent with DAPI, Invitrogen, No.P36935)を添加してカバーガラスをかけた

(x) LSM(ZWEISS META5000)で画像撮影した

(3 - 2) 染色の結果

結果を図8に示す。図中、オレンジは抗体反応に基づく染色、青は核のDAPI染色である。

【0059】

(4) モノクローナル抗体の作製

NO6、10、15のマウスの脾臓リンパ球を細胞融合に供した。細胞融合のための細胞株としてマウスミエロマ細胞P3U1を用い、"Antibodies; A LABORATORY MANUAL, Ed Harlow & David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988"に記載されている標準的なPEG(PEG1500)法によりハイブリドーマを作製し、抗SPAPP抗体産生ハイブリドーマクローンを15株選択した。候補株選択には、上記(2)に示すSPAPP/OVAコートプレートを用いたEIAを行った。EIAにおいて反応性の高いウェル13穴を選択した。各々のウェル内のハイブリドーマを回収し、限界希釈法によって各96穴プレートからシングルクローンを選抜し、HAT培地(Invitrogen #11875 RPMI medium 1640, 1% Pyruvate, 1% penicillin streptomycin)

10

20

30

40

50

n stock, 1xHAT) で増殖培養を行った。培養した細胞をPBSで洗浄し、プリスタン投与 Ba lb/c マウスに 1×10^7 個程度、腹腔内投与して、定法にて腹水を得た。HiTrap proteinG カラム (GEヘルスケア) 用い、各々の腹水から定法にてIgGを精製した。精製IgGは全部で10種類あり、それぞれ抗SPAPPモノクローナル抗体CM61、CM101、CM102、CM103、CM152、CM154、CM156、CM157、CM158、CM159と命名して以下の試験に用いた。

【0060】

〔実施例5〕

本発明のモノクローナル抗体の分析

(1) ドットプロット検出感度と認識配列特異性

(1-1) 試験方法

実施例4(4)で得られた抗SPAPPモノクローナル抗体CM61を用いて、試験例3の方法でSPAPPのドットプロットを行った。スポットに染み込ませるSPAPP(1% Tween20で希釈した)の量は、図9に示す量であり、1次抗体として $10 \mu\text{g/ml}$ のCM61を用いた。参考として、2箇所ではアミノ酸が異なるマウスSPAPP、およびSPAPPと同じアミノ酸組成で配列をスクランブルした scSPAPPについても、SPAPPの量と同量についてドットプロットを行った。

(1-2) 結果

約40pgのSPAPPが検出できた。マウスSPAPP (mSPAPP)も同様に認識された。このことは、当該抗体はマウスの細胞や個体を用いた実験にも使用できることを意味している。一方、scSPAPPは、160ngでもほとんど反応性を示さなかった。このことは、得られた抗体が単純に疎水性アミノ酸クラスターを認識しているということではなく、配列特異的認識結合性を有していることを意味している。

【0061】

(2) EIA

実施例4(4)で得られたいくつかの抗SPAPPモノクローナル抗体について、SPAPP/OVAでコートしたプレートを用いてEIAを行った。

(2-1) 試験方法

実施例4に従い、1mlあたり0 ng、4 ng、12 ng、37 ng、111 ng、333ng、 $1 \mu\text{g}$ 、 $3 \mu\text{g}$ 、 $9 \mu\text{g}$ というSPAPP濃度について、10種類のモノクローナル抗体について試験を行った。

(2-2) 結果

結果を図10に示した。本EIAにおいては反応性の強い抗体では10ng/ml前後から反応性が検出されることがわかった。実施例1および5の結果から、本発明の、コンジュゲートを伴わない疎水性ペプチドを用いた免疫方法により、実用的な親和性と配列特異的認識結合性を有するポリクローナルおよびモノクローナル抗体が得られることが示された。

【0062】

〔実施例6〕

本発明の抗体を用いて、臨床サンプル中の抗原(SPAPP)の検出を行った。臨床サンプルとしてヒト血漿を用いた。

(1) 材料と方法

(i) EIAプレートの調製

1% Tween20に 1mg/ml となるように溶解したSPAPPを純水で200倍に希釈して、Nunc No.46 7120 Medisorpのウェルに $100 \mu\text{l}$ 添加、4 で一夜置いた。ウェル内の溶液を吸引廃液して、次に $230 \mu\text{l}$ の1% BSA/PBSTを添加し、室温で1時間置いて、ブロッキングを行った。

(ii) SPAPP添加ヒト血漿(臨床サンプル)の調製

ヒト血漿(コージン)は、大きな不要沈殿物をピンセットで除去した後、 $20000 \times g$ で30分遠心し、上清を用いた。1% Tween20 に溶解した 1mg/ml SPAPPを、10% BSA/1% Tween 20/PBSで、図13のグラフに示された終濃度の12倍の濃度となるように希釈した。この希釈したSPAPP溶液 $10 \mu\text{l}$ をヒト血漿 $100 \mu\text{l}$ に添加し、SPAPP添加ヒト血漿を得た。

(iii) 抗体溶液の調製および抗原抗体反応

実施例5で用いた抗体のうち EIA活性の高い抗SPAPPモノクローナル抗体CM61を、1% BS

10

20

30

40

50

A/PBSTに120ng/mlとなるように希釈し、抗SPAPPモノクローナル抗体溶液とした。当該抗体溶液を(ii)で得られたSPAPP添加ヒト血漿に添加した。(終濃度10ng/ml)。室温で1時間、抗原抗体反応を行った。

(iv) EIA

反応液を(i)のEIAプレートの各ウェルに100 μ l添加し、室温で1時間置いた。

(v) ウェル内の溶液を吸引廃液し、300 μ lのPBST(0.1% Tween20)でウェルを6回洗浄した。

(vi) 2次抗体として、1% BSA/PBSTで4000倍希釈したPOD標識抗マウスIgG(MBL No.330)を100 μ lウェルに添加して、室温で1時間置いた。

(vii) ウェル内の溶液を吸引廃液し、300 μ lのPBST(0.1% Tween20)でウェルを6回洗浄した。

(viii) 発色のための基質としてTMB(DAKO No.S1599)を100 μ lウェルに添加し、室温で30分反応を行い、2N硫酸を等量添加して反応を停止させた。反応液の吸光度を450nmで測定した。

【0063】

(2) 結果と考察

結果を図13に示す。本アッセイにおけるヒト血漿の終濃度は83%である。抗SPAPPモノクローナル抗体CM61の終濃度は10ng/mlである。SPAPP無添加の血漿の場合、CM61抗体のEIAプレート(SPAPPコートプレート)への結合はヒト血漿によってほとんど阻害されず、本アッセイにおいては、呈色が450nmにおける吸光度で1100 mODとなった。血漿に添加されたSPAPP濃度が増加するにしたがって、CM61抗体は溶液中のSPAPPと先に結合するため、プレート上のSPAPPと溶液中のSPAPPとの間において競合が起こり、プレートへのCM61抗体の結合は阻害される。グラフの縦軸は、その阻害程度を吸光度として示している。この結果によれば、ヒト血漿中に、本抗原が少なくとも200pg/ml存在すれば、存在しない場合と比較して、本EIA系における吸光度の差として検出できることが示された。ヒト血漿中のタンパク質濃度は50~70mg/mlであるから、CM61抗体を用いた本アッセイ系は、血漿中に本抗原(SPAPP)が、総タンパク質濃度の3億分の1の濃度で存在しても検出できることを意味する。また、ヒト血漿中に含まれるタンパク質の種類は、微量しか存在しないものも含めるとおよそ1万種類あると言われている。本アッセイ系は、1万種類の別のタンパク質と共存した状態においても、SPAPPをこれらと識別して検出できることを意味している。

【0064】

〔実施例7〕

SPAPP以外の疎水性ペプチドによる免疫

他の配列からなる疎水性ペプチドでもSPAPPと同様にコンジュゲート無しの免疫によって抗原となる疎水性ペプチドと反応性のある抗体が得られるかを調べた。試験方法は実施例1に準じた。

(1) 疎水性ペプチドの合成

疎水性ペプチドとして以下(i)、(ii)を選び、純度70~80%の合成ペプチドを作成した。

(i) 大腸菌外膜タンパク質 ompA由来配列、FGGYQVNPYVGFEMGYDWLGRMPY (FCG24 / 配列番号2)

(ii) ヒトCD133由来配列、FLFCWILMILVVLTFVVGANVEK (FLF23 / 配列番号3)

【0065】

(2) 抗原の調製

1% Tween20に(1)の疎水性ペプチドを添加して懸濁液を調製した。各々の懸濁液中における疎水性ペプチドの大きな粒子の存在は、動的光散乱式粒子径測定装置(NIKKISO Nanotracer UPA-UT151)またはCountessによって確認した。

FCG24懸濁液では、動的光散乱式粒子径測定装置において、1% Tween20の溶液のみのシグナル(図11B)とシグナルが重なって粒子が確認できなかったが、Countess(登録商

10

20

30

40

50

標)において、細胞サイズの粒子(5~35 μ m)が確認された(図11A)。

FLF23懸濁液では、1% Tween20の溶液のみのシグナルより大きなサイズの粒子が確認された(図11C)。

【0066】

(3) 免疫

前記(2)で得られた各々の2mg/ml 懸濁液を用いてマウス10匹を免疫して、60日後の血清を得た(#1~#10)。

【0067】

(4) EIA

上記ペプチド(i)または(ii)(各5 μ g/ml)でコートしたプレートを用いて、EIAを行った。

10

【0068】

(5) 結果

結果を図12に示す。

FCG24は100倍希釈血清で、FLF23は500倍希釈血清で、非免疫マウス血清(図中、non-imm)と比較して、高い反応性を示した。

この結果から、本発明方法の抗原調製方法を用いれば、他の疎水性ペプチドについてもコンジュゲートを用いずに抗疎水性ペプチド抗体が得られることが判った。

【産業上の利用可能性】

【0069】

20

本発明により、疎水性ペプチドに対する抗体が得られるようになるため、疎水性シグナルペプチドや膜タンパク質について、代謝経路、細胞内局在性、相互作用相手などの生理的な役割に関するこれまでに得られなかった新たな有用情報が得られるようになる。このようにして得られる有用情報は、細胞機能の理解、および診断薬や医薬品の開発に貢献できる可能性が高い。膜タンパク質に対する抗体は得るのが従来容易ではなかったが、本発明により、格段にその労力と費用を軽減できる効果がある。

【 図 1 】

カラム : 4.6mm * 250mm, Hypersil 300A C18

溶媒A : 100%アセトニトリル中、0.1%のトリフルオロ酢酸

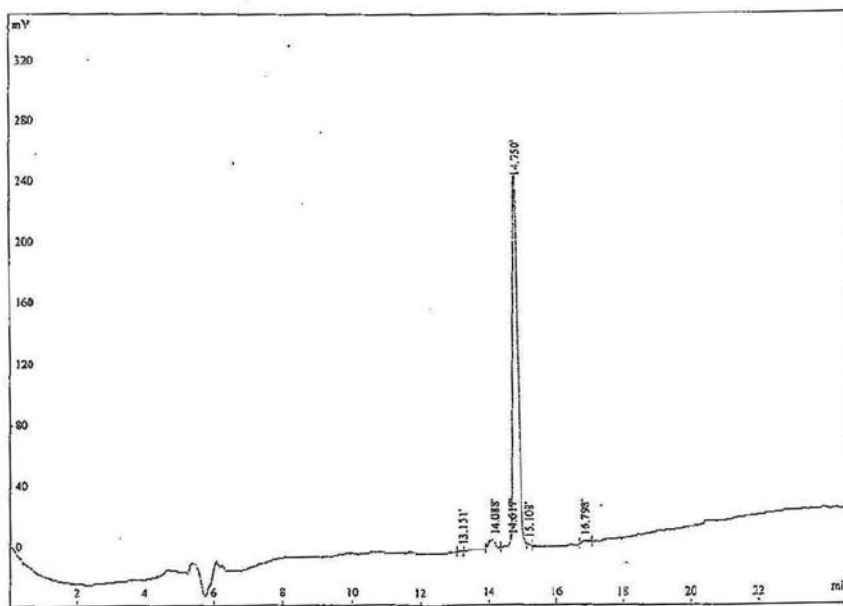
溶媒B : 100%水中、0.1%のトリフルオロ酢酸

勾配 : A B
 0.01分 32% 68%
 25.0分 62% 38%
 25.1分 100% 0%
 30.0分 STOP

流速 : 1.0ml/分

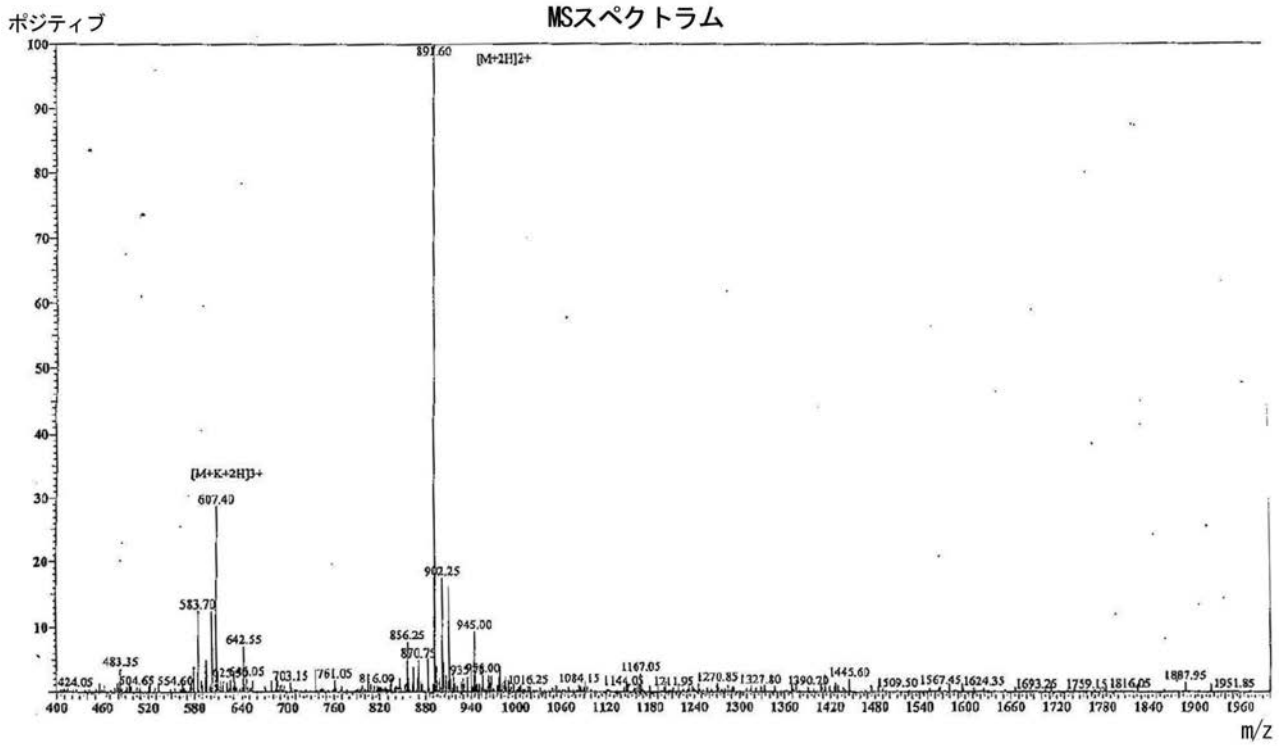
波長 : 220nm

体積 : 5ul



ランク	時間	濃度	面積	Terトレイ番号
1	13.151	0.1358	3494	98937
2	14.088	3.351	86246	24027
3	14.617	1.115	28686	192785
4	14.750	94.38	2428723	53772
5	15.108	0.3534	9094	229084
6	16.798	0.667	17166	44110

【 図 2 】

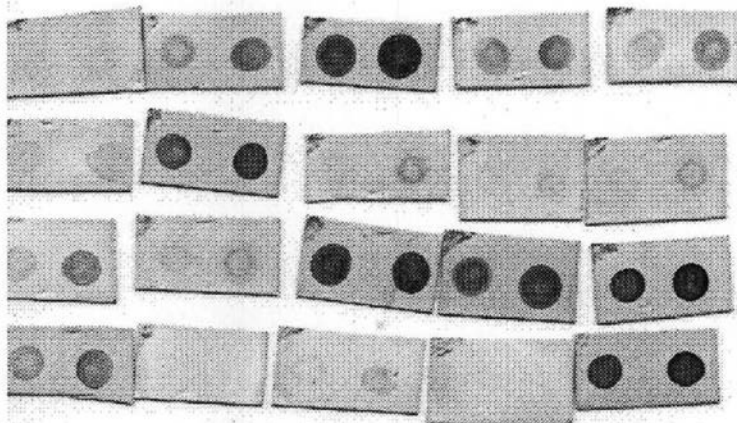


【 図 3 】

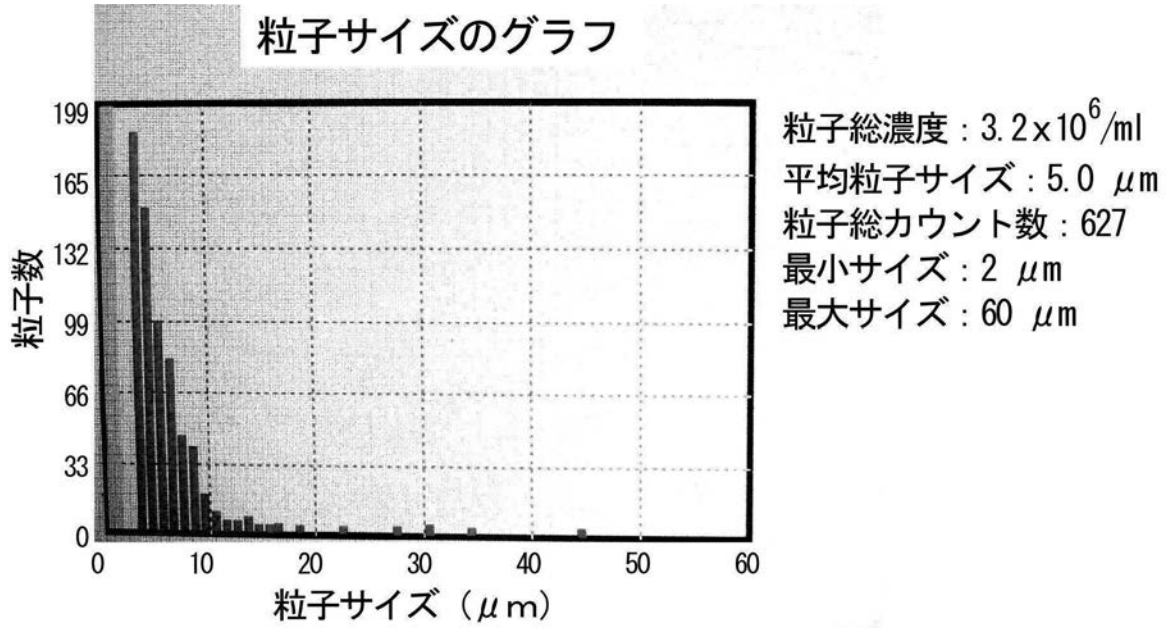
マウス個体番号

41	42	43	44	45
46	47	48	49	50
51	52	53	54	55
56	57	58	59	60

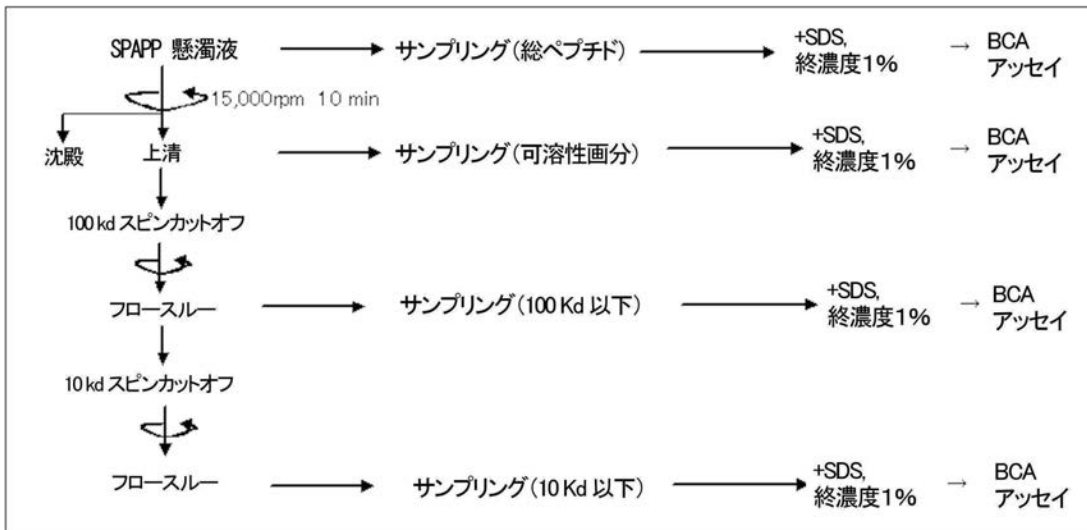
上記個体番号と対応した血清(500倍希釈)によるドットブロット
(左側; 10ng、右側; 100ng)



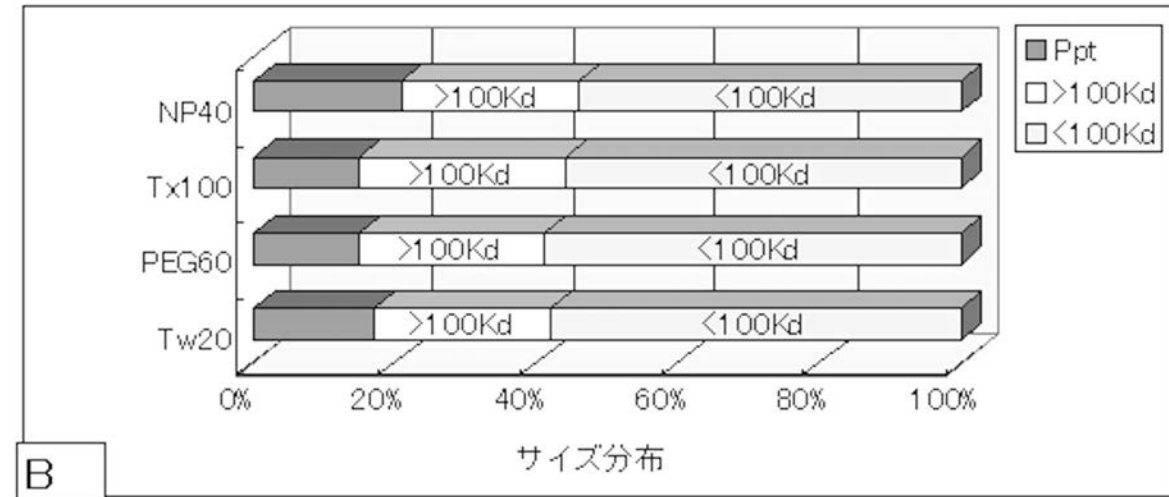
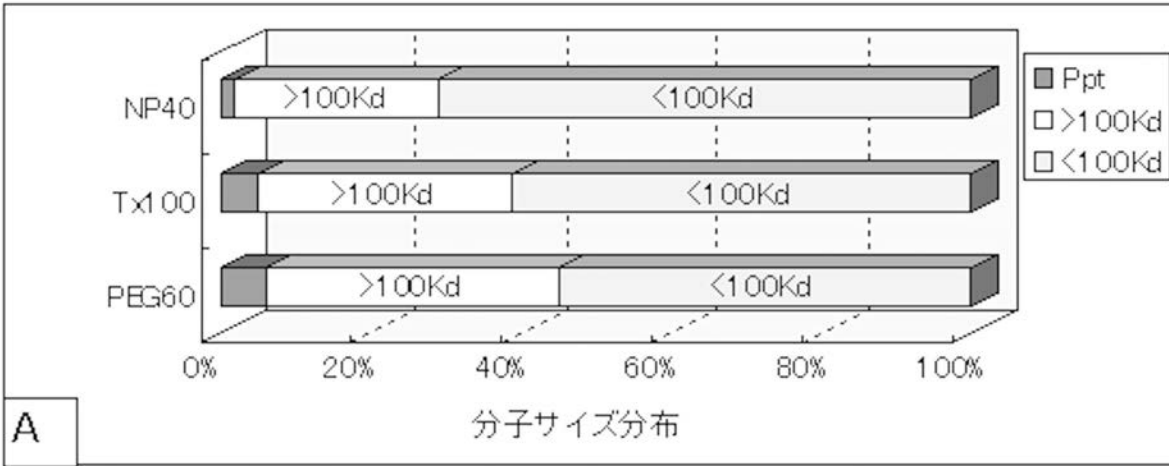
【 図 4 】



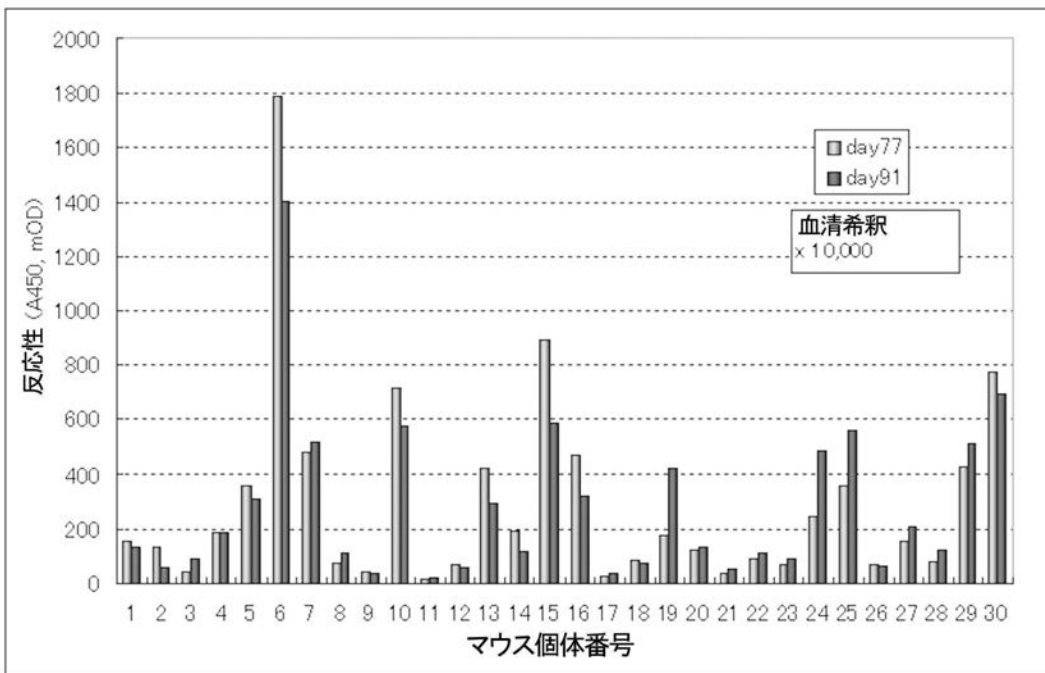
【 図 5 】



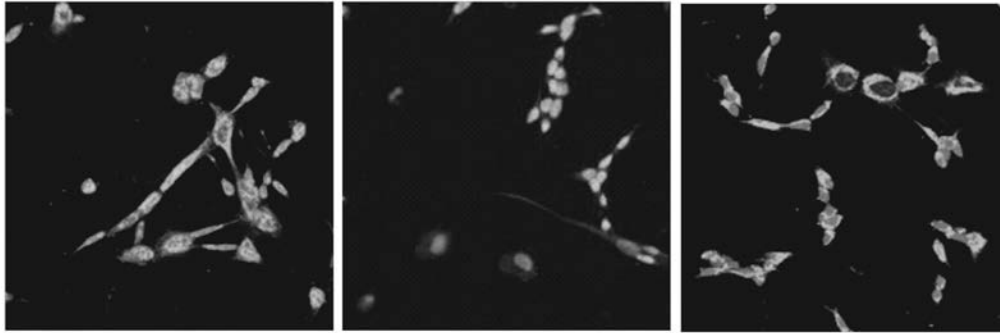
【 図 6 】



【 図 7 】



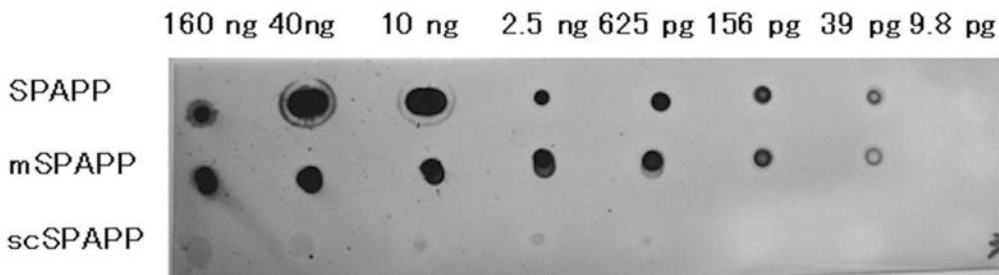
【 図 8 】



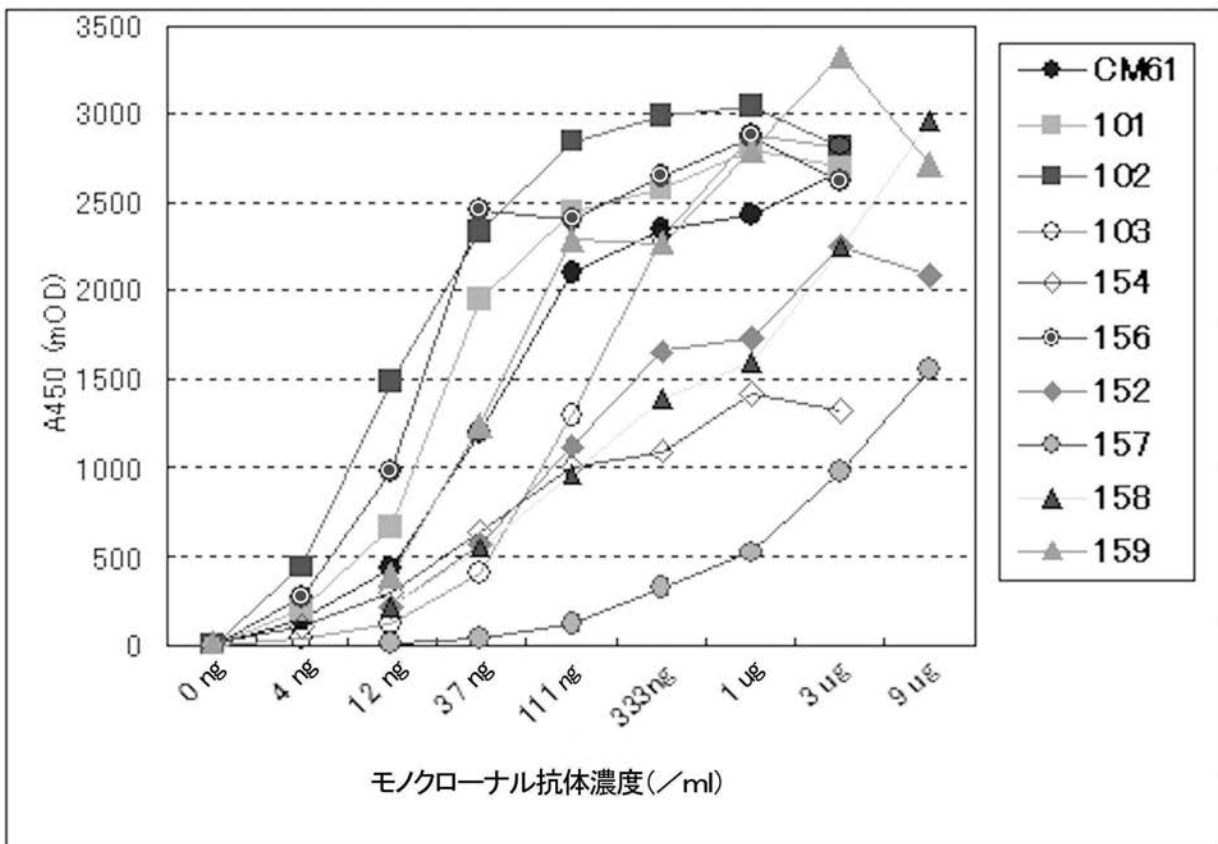
A) 個体No.6血清 B) 個体No.10血清 C) 個体No.15血清

SK-N-SH細胞の蛍光免疫染色

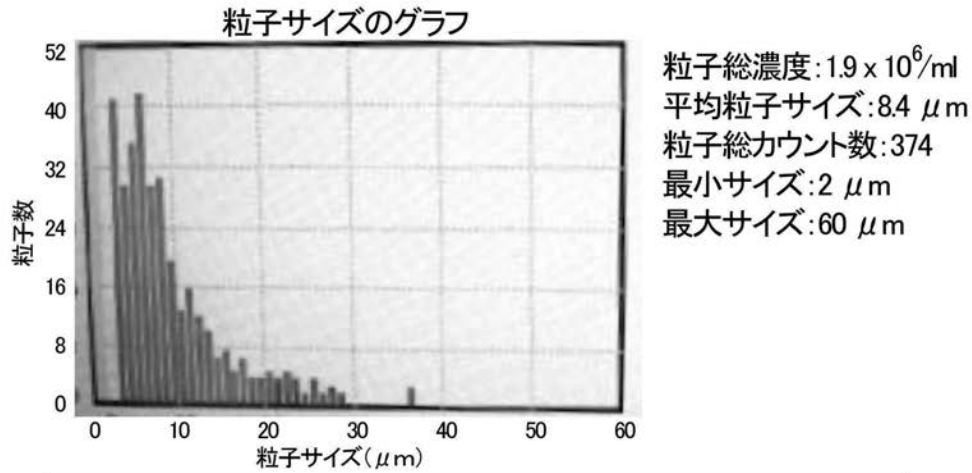
【 図 9 】



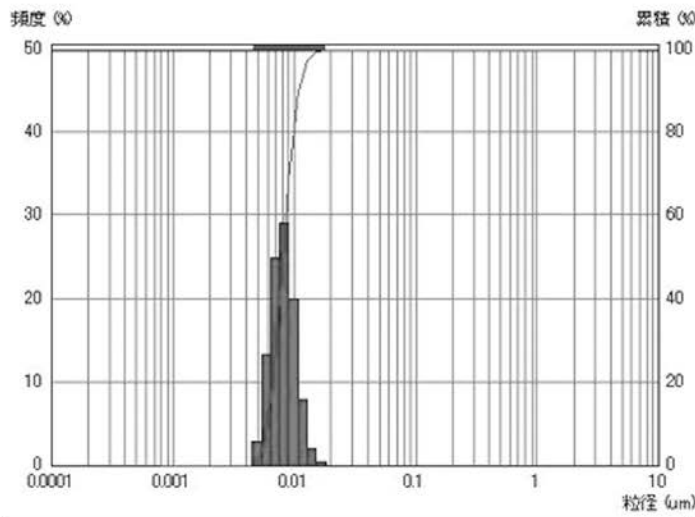
【 図 10 】



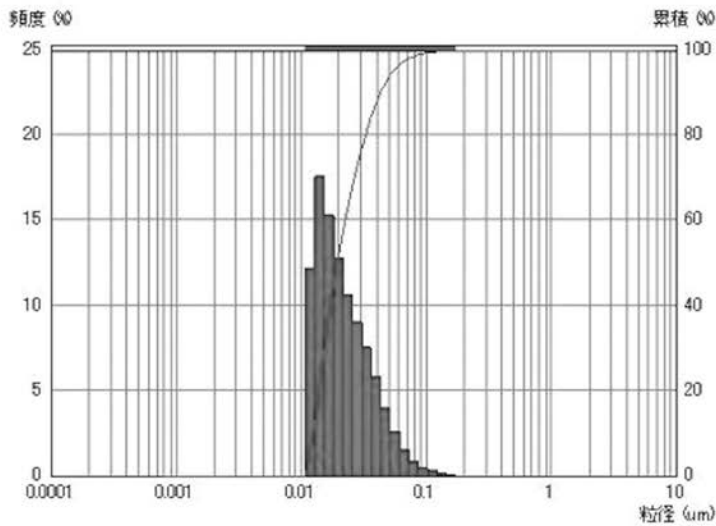
【 図 1 1 】



A FCG24/1% Tween 20 懸濁液のカウンテスによる計測

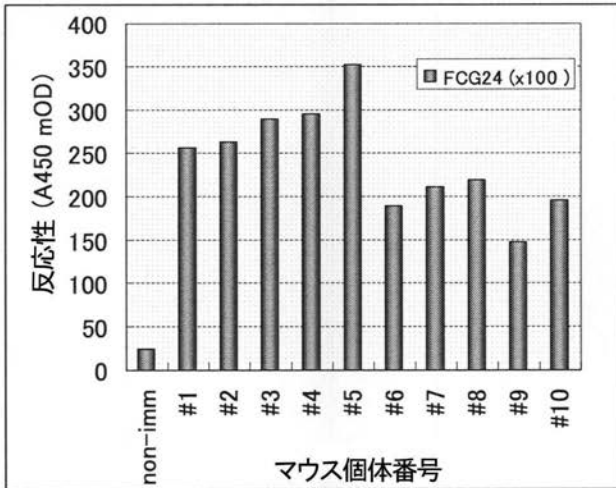


B 1% Tween20 溶液のDLSによる計測

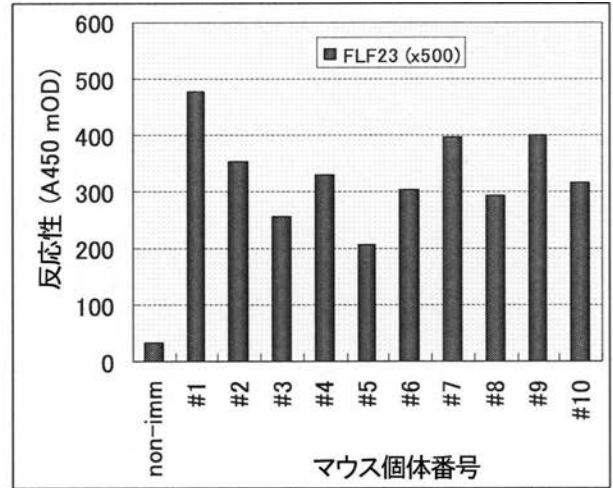


C FLF23/1% Tween20 懸濁液のDLSによる計測

【 図 1 2 】

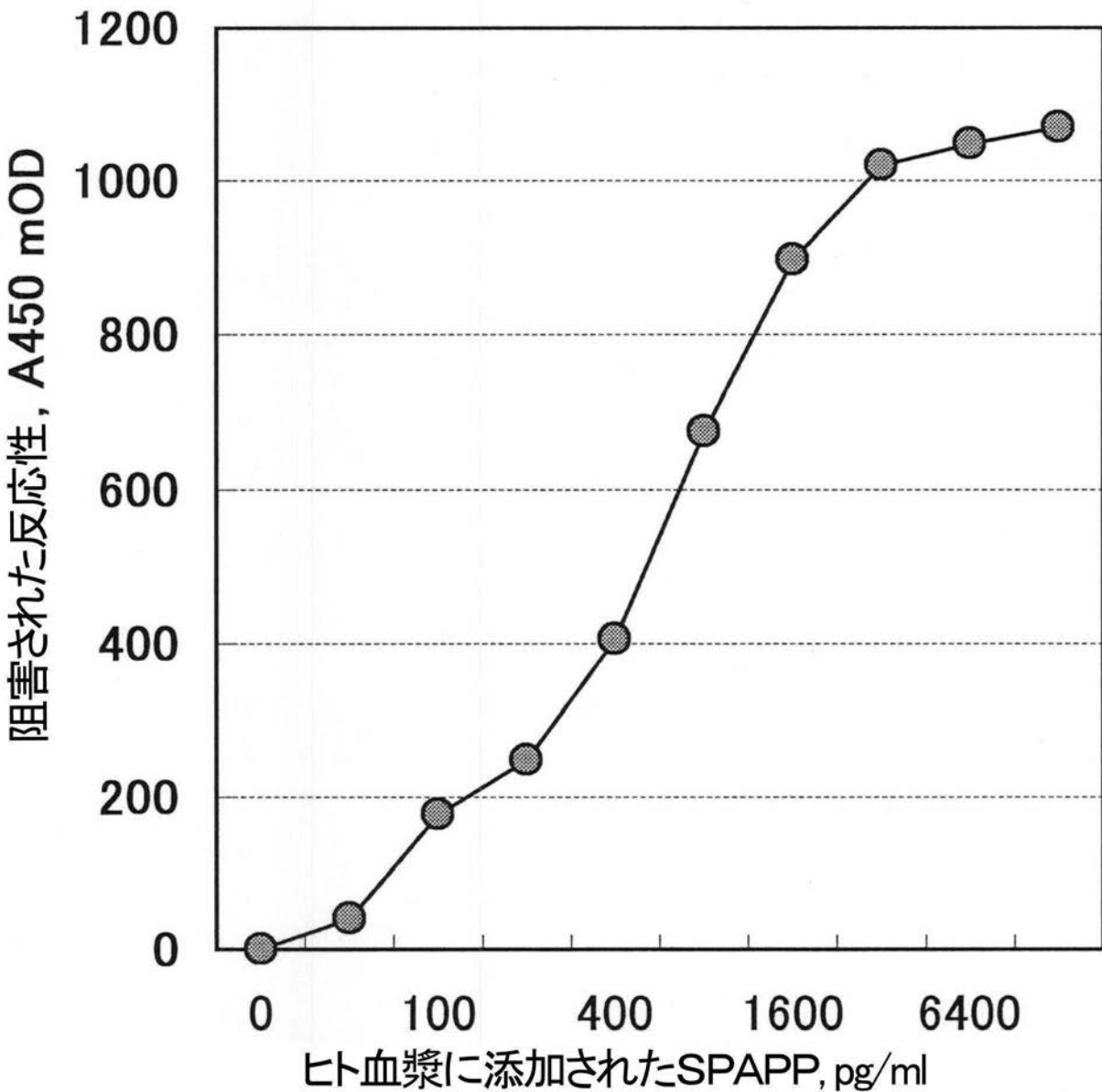


A



B

【 図 1 3 】



【配列表】

2012093706000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2012/050136
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K16/28(2006.01)i, C07K17/02(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K16/28, C07K17/02, G01N33/53 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2012 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2012 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2012 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA/REGISTRY (STN), CAPLUS/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2005-511047 A (Dana-Farber Cancer Institute, Inc.), 28 April 2005 (28.04.2005), abstract; paragraphs [0033] to [0039], [0049] to [0055] & US 2005/0129701 A1 & EP 1470159 A & WO 2003/048337 A2 & CA 2468259 A & AU 2002351239 A	7-8 1-6, 9-10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 21 February, 2012 (21.02.12)		Date of mailing of the international search report 28 February, 2012 (28.02.12)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/050136

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 07-505389 A (Proteus Molecular Design Ltd.), 15 June 1995 (15.06.1995), abstract; page 3, lower right column & JP 2690620 B & US 5679355 A & GB 9207731 D & GB 9207731 D0 & EP 634937 A & WO 1993/019781 A1 & DE 69314020 C & DE 69314020 D & AP 9300517 A & NO 943739 A & AT 158185 E & NZ 251402 A & FI 944676 A & HU 69935 A & ZA 9302491 A & AT 158185 T & AU 3899793 A & CA 2132547 A & CN 1085449 A	1-6,9-10
Y	JP 07-132033 A (Hoechst Japan Ltd.), 23 May 1995 (23.05.1995), paragraph [0019]; sequence no.1 & US 6037521 A & EP 653154 A3 & CA 2135595 A & CA 2135595 A1	5-6,9-10
Y	BECK E. et al., Nucleotide sequence of the gene ompA coding the outer membrane protein II of Escherichia coli K-12, Nucleic Acids Research, 1980, Vol.8, No.13, pp.3011-3027	5-6,9-10
Y	MIRAGLIA Sheri et al., A Novel Five- Transmembrane Hematopoietic Stem Cell Antigen: Isolation, Characterization, and Molecular Cloning, Blood, 1997, Vol.90, No.12, pp.5013- 5021	5-6,9-10
E,A	JP 2011-016763 A (Toagosei Co., Ltd.), 27 January 2011 (27.01.2011), (Family: none)	1-10
A	WO 2008/125360 A1 (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FORDERRUNG DER WISSENSCHAFTEN), 23 October 2008 (23.10.2008), & US 2010/0093059 A1 & EP 1982727 A1 & EP 2144937 A & WO 2008/125361 A1	1-10
A	US 4981684 A (Coopers Animal Health Ltd.), 01 January 1991 (01.01.1991), & US 5178860 A	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/050136

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 59-186921 A (Bror Morein), 23 October 1984 (23.10.1984), & US 4578269 A & US 4744983 A & EP 109942 A2 & DE 3382190 C & DE 3382190 D & DE 109942 T & SE 8205892 A & MX 7563 U & NO 833769 A & AT 61228 E & AU 2010383 A & NZ 205925 A & PT 77515 A & ES 526524 A & FI 833748 A & CA 1243954 A & DK 478383 A & ZA 8307603 A & AT 61228 T & IE 57025 B & MX 7563 E & SE 8205892 D & AR 243080 A & AU 558258 B & SE 8205892 A	1-10

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 2 / 0 5 0 1 3 6									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K16/28(2006.01)i, C07K17/02(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K16/28, C07K17/02, G01N33/53											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2012年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2012年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2012年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2012年	日本国実用新案登録公報	1996-2012年	日本国登録実用新案公報	1994-2012年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2012年										
日本国実用新案登録公報	1996-2012年										
日本国登録実用新案公報	1994-2012年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CA/REGISTRY (STN)、CAPLUS/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)、JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
X Y	JP 2005-511047 A (ダイナーフェアーバー キャンサー インスティ チュート、インコーポレイテッド) 2005.04.28 要約、段落【0033】～【0039】、【0049】～【0055】 & US 2005/0129701 A1 & EP 1470159 A & WO 2003/048337 A2 & CA 2468259 A & AU 2002351239 A	7-8 1-6, 9-10									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。											
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献									
国際調査を完了した日 21.02.2012		国際調査報告の発送日 28.02.2012									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 引地 進	4 B 9 5 4 9								
		電話番号 03-3581-1101 内線 3448									

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 2 / 0 5 0 1 3 6
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 07-505389 A (プロデュース モレキュラー デザイン リミテッド) 1995.06.15 要約、3頁右下欄 & JP 2690620 B & US 5679355 A & GB 9207731 D & GB 9207731 D0 & EP 634937 A & WO 1993/019781 A1 & DE 69314020 C & DE 69314020 D & AP 9300517 A & NO 943739 A & AT 158185 E & NZ 251402 A & FI 944676 A & HU 69935 A & ZA 9302491 A & AT 158185 T & AU 3899793 A & CA 2132547 A & CN 1085449 A	1-6, 9-10
Y	JP 07-132033 A (ヘキストジャパン株式会社) 1995.05.23 段落【0019】、配列番号1 & US 6037521 A & EP 653154 A3 & CA 2135595 A & CA 2135595 A1	5-6, 9-10
Y	BECK E. et al., Nucleotide sequence of the gene ompA coding the outer membrane protein II of Escherichia coli K-12, Nucleic Acids Research, 1980, Vol.8, No.13, pp.3011-3027	5-6, 9-10
Y	MIRAGLIA Sheri et al., A Novel Five-Transmembrane Hematopoietic Stem Cell Antigen: Isolation, Characterization, and Molecular Cloning, Blood, 1997, Vol.90, No.12, pp.5013-5021	5-6, 9-10
EA	JP 2011-016763 A (東亜合成株式会社) 2011.01.27 (ファミリーなし)	1-10
A	WO 2008/125360 A1 (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FORDERRUNG DER WISSENSCHAFTEN) 2008.10.23 & US 2010/0093059 A1 & EP 1982727 A1 & EP 2144937 A & WO 2008/125361 A1	1-10
A	US 4981684 A (Coopers Animal Health Limited) 1991.01.01 & US 5178860 A	1-10
A	JP 59-186921 A (プロル・モレイン) 1984.10.23 & US 4578269 A & US 4744983 A & EP 109942 A2 & DE 3382190 C & DE 3382190 D & DE 109942 T & SE 8205892 A & MX 7563 U & NO 833769 A & AT 61228 E & AU 2010383 A & NZ 205925 A & PT 77515 A & ES 526524 A & FI 833748 A & CA 1243954 A & DK 478383 A & ZA 8307603 A & AT 61228 T & IE 57025 B & MX 7563 E & SE 8205892 D & AR 243080 A & AU 558258 B & SE 8205892 A	1-10

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, T J, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, R O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, H U, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI , NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN

(72)発明者 福島 均

長野県諏訪市大和三丁目3番5号 セイコーエプソン株式会社内

(72)発明者 吉田 徹彦

茨城県つくば市大久保2番 東亜合成株式会社先端科学研究所内

Fターム(参考) 4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA76 DA86 EA20 EA50 FA72
GA05 GA20 GA45

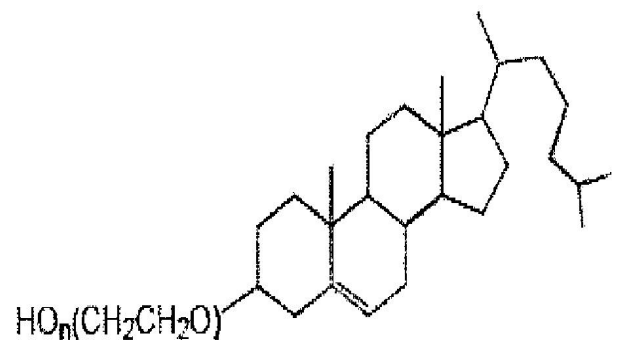
(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	用于获得抗疏水性肽抗体的抗原制备方法		
公开(公告)号	JPWO2012093706A1	公开(公告)日	2014-06-09
申请号	JP2012551879	申请日	2012-01-06
[标]申请(专利权)人(译)	东亚合成株式会社 精工爱普生株式会社		
申请(专利权)人(译)	东亚合成株式会社 精工爱普生公司		
[标]发明人	岡本雅次 花村雅人 福島均 吉田徹彦		
发明人	岡本 雅次 花村 雅人 福島 均 吉田 徹彦		
IPC分类号	C07K16/28 C07K14/705 G01N33/53 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/6896 C07K14/245 C07K14/4711 C07K14/70596 C07K16/1232 C07K16/18 C07K16/2896		
FI分类号	C07K16/28.ZNA C07K14/705 G01N33/53.D G01N33/531.B		
F-TERM分类号	4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/GA05 4H045/GA20 4H045/GA45		
优先权	2011002394 2011-01-07 JP		
其他公开文献	JP6077858B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明的目的是提供一种获得用于疏水性肽的抗体的方法，该方法可以容易地用于通用目的并且具有很高的可靠性。还提供了一种制备抗原的方法，其特征在于未与载体蛋白结合的疏水性肽在含有非离子表面活性剂的水溶液中用作高分子量聚集体。

【化1】



【0036】