

(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2016-193899

(P2016-193899A)

(43) 公開日 平成28年11月17日(2016.11.17)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 16/18 (2006.01)</b>	C07K 16/18 ZNA	2G045
<b>C12N 15/02 (2006.01)</b>	C12N 15/00 C	4B065
<b>C12N 5/20 (2006.01)</b>	C12N 5/20	4C085
<b>A61P 25/28 (2006.01)</b>	A61P 25/28	4H045
<b>A61P 25/00 (2006.01)</b>	A61P 25/00	

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 14 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-74191 (P2016-74191)  
 (22) 出願日 平成28年4月1日 (2016.4.1)  
 (31) 優先権主張番号 特願2015-75401 (P2015-75401)  
 (32) 優先日 平成27年4月1日 (2015.4.1)  
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(出願人による申告) 平成24年度、独立行政法人科学技術振興機構戦略的創造研究推進事業(チーム型研究(CREST))、「精神・神経疾患の分子病態理解に基づく診断・治療へ向けた新技術の創出」、「BDNF機能障害の分子病態の解明と難治性うつ病の診断・治療法の開発」受託研究、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願

(71) 出願人 301021533  
 国立研究開発法人産業技術総合研究所  
 東京都千代田区霞が関1-3-1  
 (74) 代理人 110000796  
 特許業務法人三枝国際特許事務所  
 (72) 発明者 小島 正己  
 大阪府池田市緑丘1丁目8番31号 国立研究開発法人産業技術総合研究所関西センター内  
 (72) 発明者 上垣 浩一  
 大阪府池田市緑丘1丁目8番31号 国立研究開発法人産業技術総合研究所関西センター内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗体又はその抗原結合性フラグメント及びハイブリドーマ

(57) 【要約】

【課題】 BDNFプロドメインもしくはBDNFプロペプチドを特異的に認識する抗体を提供する。

【解決手段】 下記の特徴を有する抗体又はその抗原結合性フラグメント

- (1) 配列番号1で示されるproBDNFの19番目~128番目のBDNFプロドメイン及びproBDNFの19番目~128番目のBDNFプロペプチドを認識するが、成熟BDNFを認識しない
- (2) BDNFプロドメインの領域Aは認識しないが、領域B及び/又は領域Cを特異的に認識する、

【化1】

領域A : APMKEANIRGQGGLAYPGVRTHGTLESVNGPKAGSRGLTSLADTFEHVIEELLDEDQ  
 領域B : ESVNGPKAGSRGLTSLADTFEHVIEELLDEDQKVRPNEENNKDADLYTSRVMLSSQVP  
 領域C : KVRPNEENNKDADLYTSRVMLSSQVPLEPPLFLLEEYKNYLDAAANMSMRV。

(下波線部は領域Aと領域Bの共通部分であり、下線部は領域Bと領域Cの共通部分である。)

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

下記の特徴を有する抗体又はその抗原結合性フラグメント

(1) 配列番号 1 で示される proBDNF の 19 番目 ~ 128 番目の BDNF プロドメイン及び proBDNF の 19 番目 ~ 128 番目の BDNF プロペプチドを認識するが、成熟 BDNF を認識しない

(2) BDNF プロドメインの領域 A は認識しないが、領域 B 及び / 又は領域 C を特異的に認識する、

## 【化 1】

領域 A : APMKEANIRGGGLAYPGVIRTHGTLESVNGPKAGSRGLTSLADTFEHVIEELLDEDQ

領域 B : ESVNGPKAGSRGLTSLADTFEHVIEELLDEDQKVRPNEENNKDADLYTSRVMLSSQVP

領域 C : KVRPNEENNKDADLYTSRVMLSSQVPLEPPLLFLLEEYKNYLDAANMSMRV。

10

(下波線部は領域 A と領域 B の共通部分であり、下線部は領域 B と領域 C の共通部分である。)

## 【請求項 2】

BDNF プロドメインの領域 A を認識せず領域 C を特異的に認識する、請求項 1 に記載の抗体又はその抗原結合性フラグメント。

## 【請求項 3】

KVRPNEENNKDADLY で示されるペプチドで免疫された抗体産生細胞とミエローム細胞とを融合させることにより得られるハイブリドーマから産生され得る、請求項 1 又は 2 に記載の抗体又はその抗原結合性フラグメント。

20

## 【請求項 4】

抗体がモノクローナル抗体である、請求項 1、2 又は 3 に記載の抗体又はその抗原結合性フラグメント。

## 【請求項 5】

受託番号 P-02011, P-02012, P-02013 として独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センターに寄託されたハイブリドーマから産生されるモノクローナル抗体と同じ BDNF プロドメインのエピトープと反応する、請求項 4 に記載の抗体又はその抗原結合性フラグメント。

30

## 【請求項 6】

proBDNF もしくは BDNF プロペプチドに起因する神経病態を組織化学的に解析し得る、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の抗体又はその抗原結合性フラグメント。

## 【請求項 7】

下記の (1) 及び (2)

(1) 配列番号 1 で示される proBDNF の 19 番目 ~ 128 番目の BDNF プロドメイン及び proBDNF の 19 番目 ~ 128 番目の BDNF プロペプチドに結合する

(2) BDNF プロドメインの領域 A を認識せず、領域 B 及び / 又は領域 C を特異的に認識する。

## 【化 2】

領域 A : APMKEANIRGGGLAYPGVIRTHGTLESVNGPKAGSRGLTSLADTFEHVIEELLDEDQ

領域 B : ESVNGPKAGSRGLTSLADTFEHVIEELLDEDQKVRPNEENNKDADLYTSRVMLSSQVP

領域 C : KVRPNEENNKDADLYTSRVMLSSQVPLEPPLLFLLEEYKNYLDAANMSMRV。

40

(下波線部は領域 A と領域 B の共通部分であり、下線部は領域 B と領域 C の共通部分である。)

の特徴を有するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマであって、独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センターにおいて受託番号 N I T E P-02011, P-02012, P-02013 として寄託されている、ハイブリドーマ。

50

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、抗体又はその抗原結合性フラグメント及びハイブリドーマに関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

神経栄養因子は神経細胞の分化，成熟，生存，機能維持を促す液性因子群である。第一の神経栄養因子として発見された神経成長因子（Nerve growth factor：NGF）は，交感神経節や知覚神経質のニューロンの分化や成長に作用するタンパク質である。このNGFに次ぎ，脳由来神経栄養因子（Brain-derived neurotrophic factor：BDNF）は第2の神経栄養因子として1980年代にBardeらにより単離された。1990年代に入り，BDNF遺伝子がクローニングされた頃から，神経栄養因子が生理作用を引き起こすシグナル伝達の研究が進み，BDNFとその受容体TrkB，及び関連分子の遺伝子改変マウスの作製と解析によってBDNFの生体内における生理的役割が解明されつつある。これらの変異マウスに見られる病態とBDNFが脳に強く発現していることから，近年，BDNFと脳疾患との関係が注目されている。長期にわたる持続的ストレス暴露により，BDNF機能が低下し，記憶・学習に重要な海馬や情動制御に重要な前頭前野などが機能的・構造的に障害され，その結果うつ病が発症するといううつ病の「BDNF仮説」も提唱されている。ここでみられるBDNFの機能障害とはプロセッシング障害，分泌障害といった分子病態を意味し，BDNFの分子機能の障害が脳疾患の発症に関連するため，興味深い研究対象となっている。

10

20

## 【0003】

BDNFのレセプターを介したシグナル伝達の研究に対し，このBDNF分子そのものの分泌と輸送のメカニズムはほとんど解明されていない。神経栄養因子が複雑な神経回路の中でどのような時空間制御をもって分泌・輸送されるのかを解明することは，レセプターを介したシグナル伝達の理解と同様に重要である。

## 【0004】

図1はBDNFが産生される過程を示す図である。BDNFは，生理作用を持つ成熟BDNF（以下，mature BDNF）となる前に，成熟BDNFのN末端側にプロドメイン（以下，BDNFプロドメイン）が結合したBDNF前駆体として合成される。そして，プロセッシングの過程で本体から切り離されて生成するプロペプチド（以下，BDNFプロペプチド）は，不要になると通説では考えられてきたが，特許文献3において，このようなプロペプチドも生理活性を発揮することを初めて示した。

30

## 【0005】

proBDNFには多数の一塩基多型（Single-nucleotide polymorphism：SNP）が存在するが，小島らのグループは，多数のSNPの中でも，VM型変異（66番目Val Met変異）が記憶障害を引き起こすこと，成熟BDNFの分泌異常を引き起こす事を明らかにした。

## 【0006】

特許文献1，2は，非切断性proBDNF及び非切断性proBDNFを高発現したノックインマウスを開示する。

40

## 【先行技術文献】

## 【特許文献】

## 【0007】

【特許文献1】特開2006-345787

【特許文献2】特開2007-306899

【特許文献3】特開2011-246420

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0008】

本発明は、BDNFプロドメインもしくはBDNFプロペプチドを特異的に認識する抗体又はその抗原結合性フラグメント及びハイブリドーマを提供することを目的とする。

50

## 【課題を解決するための手段】

## 【0009】

本発明は、以下の抗体又はその抗原結合性フラグメント及びハイブリドーマを提供するものである

項1． 下記の特徴を有する抗体又はその抗原結合性フラグメント

(1) 配列番号1で示されるproBDNFの19番目～128番目のBDNFプロドメイン及びproBDNFの19番目～128番目のBDNFプロペプチドを認識するが、成熟BDNFを認識しない

(2) BDNFプロドメインの領域Aは認識しないが、領域B及びノ又は領域Cを特異的に認識する。

## 【0010】

10

## 【化1】

領域A：APMKEANIRGQGGLAYPGVVRTHGTLESVNGPKAGSRGLTSLADTFEHVIEELLDEDQ

領域B：ESVNGPKAGSRGLTSLADTFEHVIEELLDEDQKVRPNEENNKDADLYTSRVMLSSQVP

領域C：KVRPNEENNKDADLYTSRVMLSSQVPLEPPLLFLLEEYKNYLDAANMSMRV。

## 【0011】

(下波線部は領域Aと領域Bの共通部分であり、下線部は領域Bと領域Cの共通部分である。)

項2． BDNFプロドメインの領域Aは認識しないが、領域Cを特異的に認識する、項1に記載の抗体又はその抗原結合性フラグメント。

20

項3． KVRPNEENNKDADLYで示されるペプチドで免疫された抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合させることにより得られるハイブリドーマから産生され得る、項1又は2に記載の抗体又はその抗原結合性フラグメント。

項4． 抗体がモノクローナル抗体である、項1、2又は3に記載の抗体又はその抗原結合性フラグメント。

項5． 受託番号P-02011,P-02012,P-02013として独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センターに寄託されたハイブリドーマから産生されるモノクローナル抗体と同じBDNFプロドメインのエピトープと反応する、項4に記載の抗体又はその抗原結合性フラグメント。

項6． proBDNFもしくはBDNFプロペプチドに起因する神経病態を組織化学的に解析し得る、項1～5のいずれか1項に記載の抗体又はその抗原結合性フラグメント。

30

項7． 下記の(1)及び(2)

(1) 配列番号1で示されるproBDNFの19番目～128番目のBDNFプロドメイン及びproBDNFの19番目～128番目のBDNFプロペプチドに結合する

(2) BDNFプロドメインの領域Aに対し、領域B及びノ又は領域Cを特異的に認識する。

## 【0012】

## 【化2】

領域A：APMKEANIRGQGGLAYPGVVRTHGTLESVNGPKAGSRGLTSLADTFEHVIEELLDEDQ

領域B：ESVNGPKAGSRGLTSLADTFEHVIEELLDEDQKVRPNEENNKDADLYTSRVMLSSQVP

領域C：KVRPNEENNKDADLYTSRVMLSSQVPLEPPLLFLLEEYKNYLDAANMSMRV。

40

## 【0013】

(下波線部は領域Aと領域Bの共通部分であり、下線部は領域Bと領域Cの共通部分である。)

の特徴を有するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマであって、独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センターにおいて受託番号N I T E P-02011,P-02012,P-02013として寄託されている、ハイブリドーマ。

## 【発明の効果】

## 【0014】

本発明の抗体又はその抗原結合性フラグメントは、BDNFプロドメインもしくはBDNFプロ

50

ペプチドを特異的に認識することができ、神経病態に対する抗体医薬、免疫組織化学的検査用の試薬、キットなどとして有用である。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】BDNFの産生過程。「prodomain」は、BDNF前駆体ではBDNFプロドメインであり、プロセッシングにより成熟BDNFと切り離されると、このプロドメインはBDNFプロペプチドと称される生理活性物質になる（[特許文献3]特開2011-246420）。

【図2】proBDNFのアミノ酸配列を示す。

【図3】抗体#111、#113、#101のBDNFプロドメインの領域A,B,Cに対する親和性。(A) proBDNFの領域A,B,Cを示すイメージ図、(B) proBDNFの領域A,B,Cのアミノ酸配列、(C) BIAcoreで解析したproBDNFの領域A,B,Cと抗体#111, 113, 101の相互作用、(D) ドットプロット法によるproBDNFの領域A,B,C、BDNFプロペプチド、成熟型BDNFと抗体#111, 113, 101の相互作用

【図4】成獣マウス海馬CA3領域の免疫染色

【図5】抗体#111、#113、#101を用いたproBDNFの免疫沈降

【発明を実施するための形態】

【0016】

本明細書において、BDNF、proBDNFなどは、哺乳動物(ヒト、サル、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコなど)、魚類、両生類、は虫類及び鳥類を含む他の動物由来のものを包含する。好ましい実施形態においてBDNF、proBDNFなどは哺乳動物由来、さらに好ましくはヒト由来である。

【0017】

ヒトproBDNFのアクセッション番号は、CAA62632である。ヒトproBDNFの配列を配列番号1に示す。

【0018】

proBDNFは、furinやtissue plasminogen activator (tPA)により切断されて成熟型BDNF(配列番号1の129-247)とBDNFプロペプチド(配列番号1の19-128)に分かれる。配列番号1の1-18は、シグナルペプチドである。

【0019】

本発明の「抗体又はその抗原結合性フラグメント」(以下、単に「抗体」と記載するときがある)は、配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるproBDNFのBDNFプロドメイン(19-128)に結合することを特徴とする。本発明の抗体は、BDNFプロペプチドの領域Aに対し、領域B、領域Cを特異的に認識する。領域Aは配列番号1の19番目~65番目のペプチド領域であり、領域Bは配列番号1の44番目~101番目のペプチド領域であり、領域Cは配列番号1の76番目~126番目のペプチド領域である。

【0020】

【化3】

領域A : APMKEANIRGQGGLAYPGVIRTHGTLESVNGPKAGSRGLTSLADTFEHVIEELLDEDQ

領域B : ESVNGPKAGSRGLTSLADTFEHVIEELLDEDQKVRPNEENNKDADLYTSRVMLSSQVP

領域C : KVRPNEENNKDADLYTSRVMLSSQVPLEPPLLFLLEEYKNYLDAANMSMRV。

【0021】

上記において下波線部は領域Aと領域Bの共通部分であり、下線部は領域Bと領域Cの共通部分である。斜字体は抗体の作製に用いることができるペプチドを示す。

【0022】

ここで、本発明の抗体は、例えば、ヒトproBDNF(配列番号1)のN末端から76-90番目のアミノ酸配列であるKVRPNEENNKDADLYからなるペプチドを抗原として免疫された哺乳動物において産生され得る抗体であり、proBDNFの19番目~128番目のBDNFプロドメイン及びproBDNFの19番目~128番目のBDNFプロペプチドを認識する抗体であれば特に限定は無い。

本発明の抗体のエピトープは、KVRPNEENNKDADLYで表されるアミノ酸配列の一部を含むが、連続したアミノ酸配列であっても、立体構造のなかでそれぞれが近接している不連続な配列であってもよい。また、エピトープを構成するアミノ酸の数は、特に限定はされないが、一般的には、抗原となるペプチド又はタンパク質を構成するアミノ酸配列の内、4以上、具体的には、4~10個程度である。従って、本発明において、KVRPNEENNKDADLYのエピトープとしては、例えば、4以上のアミノ酸、具体的には、4~10個のアミノ酸からなる、連続又は不連続な配列が挙げられる。この理由の一つは、領域Bと領域Cが形成する構造に違いがあり、本抗体が構造認識の抗体であることが示唆される。

【0023】

本発明の抗体は、proBDNFの19番目~128番目のBDNFプロドメイン及びproBDNFの19番目~128番目のBDNFプロペプチドを特異的に認識し、好ましくは、モノクローナル抗体(#111、#113、#101)又はその抗原結合性フラグメントである。モノクローナル抗体(#111、#113、#101)は、受託番号P-02011、P-02012、P-02013として独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センターに寄託されたハイブリドーマから産生される

10

【0024】

【表1】

モノクローナル抗体	受託番号	寄託日
#101(10A-11H)	P-02013	平成27年2月27日
#111(1E-7E)	P-02011	平成27年2月27日
#113(3C-10H)	P-02012	平成27年2月27日

20

【0025】

本発明の抗体は成熟BDNFを認識しない。本発明の抗体又はその抗原結合性フラグメントを用いることで神経などの組織中のproBDNF及びBDNFプロペプチドの検出及び/又はその存在量の測定を行うことができる。

【0026】

抗体の抗原に対する反応性の確認は、公知の免疫学的方法、例えば、ウエスタンブロッティング法、ELISA法(Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)、放射免疫測定法(Radioimmunoassay;RIA)、酵素免疫測定法(Enzyme ImmunoAssay;EIA)、蛍光免疫検定法(Fluorescence Immuno Assay;FIA)、蛍光免疫測定法(Fluorescence-Linked Immuno Sorbent Assay;FLISA)、細胞免疫染色法、組織免疫染色法、フローサイトメトリー法、蛍光標示式細胞分取法(Fluorescence activated cell sorting;FACS)、ELISPOT法(Enzyme-Linked Immuno-Spot)、免疫沈降法等によって行うことができる。その他、分光法、フロンタルアフィニティークロマトグラフィー法(Frontal Affinity Chromatography;FAC)、平行透析法、蛍光消光法、原子間力顕微鏡(Atomic Force Microscope;AFM)、水晶振動子法(Quartz Crystal Microbalance:QCM)、表面プラズモン共鳴法(Surface plasmon resonance:SPR)等によっても前記反応性を確認することができる。本発明の抗体はこれらの方法を実施するためのキットの作製にも有用である。操作の簡便性及び測定精度の観点から、ELISA法、QCM法及びSPR法等が好ましく用いられるが、抗原と抗体の反応性の特異性を確認する方法としては、具体的にはウエスタンブロッティング法を挙げることができる。

30

40

【0027】

本発明の抗体として、KVRPNEENNKDADLYで表されるアミノ酸配列からなるペプチドで免疫された抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合させることにより得られるハイブリドーマから産生され得る抗体が挙げられる。具体的には、受託番号:P-02011、P-02012、P-02013として独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センター(〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8)に平成27年2月27日付で寄託されたハイブリドーマから産生され得るモノクローナル抗体、及び前記ハイブリドーマから産生されるモノクローナル抗体

50

と同じBDNFプロドメイン及びBDNFプロペプチドのエピトープと反応する抗体又はその抗原結合性フラグメントを挙げることができる。

【0028】

本発明のモノクローナル抗体は当業者に公知の方法（ハイブリドーマ法、ファージディスプレイ法等）によって作製することができる。

【0029】

具体的には、BDNFプロドメイン及びBDNFプロペプチドに対するモノクローナル抗体は、BDNFプロドメイン又はBDNFプロペプチドの部分配列であるKVRPNEENNKDADLYで表されるアミノ酸配列からなる、化学的に合成されたペプチド（抗原ペプチド）を、哺乳動物に対して投与することにより、即ち、抗体産生が可能な部位にそれ自体又は担体、希釈剤とともに投与することによって製造することができる。担体としては、抗原性刺激のあるキャリアタンパク質、例えば、キーホール・リンペット・ヘモシアニン（KLH）、ウシ血清アルブミン（BSA）、ウシサイログロブリン、オボアルブミン（OVA）等を使用することができる。担体と抗原ペプチドとの混合比は、担体に架橋させて免疫した抗原ペプチドに対して抗体が効率良くできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させてもよいが、例えば、担体を重量比で抗原ペプチド1に対し、約0.1～20、好ましくは約1～5の割合で結合させる方法が用いられる。抗原ペプチドと担体の結合には種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオピリジル基を含有する活性エステル試薬等を用いることができる。

10

【0030】

投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行なわれる。用いられる哺乳動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ハムスターなどが挙げられるが、細胞融合に使用するミエローマ細胞との適合性等を考慮して選択するのが好ましく、一般的には、マウス、ラット、ハムスター等が好ましく用いられる。

20

【0031】

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された哺乳動物、例えば、マウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓又はリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髄腫細胞（ミエローマ細胞）と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、ELISA法等の当業者に周知の方法に従って行うことができる。例えば、免疫原として用いた抗原ペプチドを直接又は担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）に抗血清を添加し、次に放射性物質や酵素等で標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）又はプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法が挙げられる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法 [Nature, 256, 495 (1975年)] に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール（PEG）やセンダイウィルス等が挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。

30

【0032】

ミエローマとしては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0等が挙げられるが、SP2/0が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数とミエローマ細胞数との好ましい比率は1:1～20:1程度であり、PEG（好ましくは、PEG1000～PEG6000）が10～80%程度の濃度で添加され、約20～40、好ましくは約30～37で約1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

40

【0033】

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、免疫原として用いた抗原ペプチドを直接又は担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素等で標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免

50

疫グロブリン抗体が用いられる)又はプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体又はプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素等で標識した抗原ペプチドを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法等が挙げられる。

#### 【0034】

モノクローナル抗体の選別は、自体公知又はそれに準じる方法に従って行なうことができるが、通常はHAT(ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン)を添加した動物細胞用培地等で行なうことができる。選別及び育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1~20%、好ましくは10~20%のウシ胎児血清を含むRPMI 1640培地、1~10%のウシ胎児血清を含むGIT培地(和光純薬工業(株))又はハイブリドーマ培養用無血清培地(SFM-101、日水製薬(株))、10~20%のウシ胎児血清を含むハイブリドーマ培養用無血清培地(Hybridoma-SFM、インビトロジェン)等を用いることができる。培養温度は、通常20~40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日~3週間、好ましくは1週間~2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

10

#### 【0035】

さらに、抗原ペプチドに対するELISAで陽性のハイブリドーマクローンについて、2次培養を行った後、個々のクローンの培養上清を用いてproBDNF又はBDNFプロペプチドを認識する抗体を産生する能力を、血小板抽出物に対するウエスタンブロッティング法で評価し、proBDNF又はBDNFプロペプチドが検出されるか否かを調べることにより、proBDNF又はBDNFプロペプチドを特異的に認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選別することができる。

20

#### 【0036】

具体的には、BDNFプロドメイン又はBDNFプロペプチドを特異的に認識するモノクローナル抗体を産生する好適なハイブリドーマとして、受託番号:P-02011,P-02012,P-02013として独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センターに寄託されたハイブリドーマ、#111、#113、#101が挙げられる。

#### 【0037】

モノクローナル抗体の分離精製は、通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法、例えば、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体(例、DEAE)による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相又はプロテインAもしくはプロテインG等の活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法等に従って行なうことができる。

30

#### 【0038】

BDNFプロドメイン又はBDNFプロペプチドに対するポリクローナル抗体は、それ自体公知又はそれに準じる方法にしたがって製造することができる。具体的には、上記のモノクローナル抗体の作製方法と同様に、KVRPNEENKADADLYで表されるアミノ酸配列からなる、化学的に合成されたペプチド(抗原ペプチド)を、哺乳動物又はニワトリに対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体又は担体、希釈剤とともに投与することによって製造することができる。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約2~6週毎に1回ずつ、計約3~10回程度行なうことができる。

40

#### 【0039】

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された哺乳動物の血液、腹水、母乳等、好ましくは血液から採取することができ、ニワトリの場合は血液及び卵黄から採取できる。

#### 【0040】

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定、BDNFプロドメイン又はBDNFプロペプチドに対する反応性の評価、ポリクローナル抗体の分離精製等は、上記のモノクローナル抗体の作製方法に従って行なうことができる。

50

## 【0041】

本発明の抗体の「抗原結合性フラグメント」は、本発明のモノクローナル抗体の部分、好ましくはその抗原結合領域又は可変領域を含み、BDNFプロドメイン又はBDNFプロペプチドへの結合性を有している。該フラグメントの具体例としては、例えば、Fv、scFv、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、Fd、dAb、CDR、scFv-Fc断片、ナノボディ、アフィボディ、ダイアボディ、アビマー、ミニボディ、パーサボディなどが挙げられる。

## 【0042】

これらのフラグメントは、当業者に周知の方法を用いて得ることができ、具体的には、抗体を酵素、例えば、パパイン、ペプシンなどで処理し抗体断片を生成させるか、又は、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させればよい。得られたフラグメントは、本発明の抗体と同様にして抗原との反応性、特異性等を評価することができる。

10

## 【0043】

本発明においては、抗体産生細胞からクローニングされた抗体遺伝子によってコードされる抗体を利用することもできる。クローニングした抗体遺伝子は、適当なベクターに組み込んで宿主に導入することによって、抗体として発現させることができる。抗体遺伝子の単離と、ベクターへの導入、そして宿主細胞の形質転換のための方法は既に確立されている（例えば、Vandamme, A. M. et al., Eur. J. Biochem. (1990) 192, 767-775参照）。

## 【0044】

たとえば、本発明抗体を産生するハイブリドーマ細胞から、本発明抗体の可変領域（V領域）をコードするcDNAを得ることができる。そのためには、通常、まずハイブリドーマから全RNAが抽出される。細胞からmRNAを抽出するための方法として、たとえば、グアニジン超遠心法（Chirgwin, J. M. et al., Biochemistry (1979) 18, 5294-5299）、AGPC法（Chomczynski, P. et al., Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159）などを用いることができる。抽出されたmRNAは、mRNA Purification Kit（GEヘルスケアバイオサイエンス製）等を使用して精製することができる。あるいは、QuickPrep mRNA Purification Kit（GEヘルスケアバイオサイエンス製）などのように、細胞から直接全mRNAを抽出するためのキットも市販されている。このようなキットを用いて、ハイブリドーマから全mRNAを得ることもできる。得られたmRNAから逆転写酵素を用いて抗体V領域をコードするcDNAを合成することができる。cDNAは、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit（生化学工業社製）等によって合成することができる。また、cDNAの合成および増幅のために、5'-Ampli FINDER RACE Kit（Clontech製）およびPCRを用いた5'-RACE法（Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85, 8998-9002、Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932）を利用することができる。更にこうしたcDNAの合成の過程においてcDNAの両末端に後述する適切な制限酵素サイトが導入できる。

20

30

## 【0045】

得られたPCR産物から目的とするcDNA断片が精製され、次いでベクターDNAと連結される。このように組換えベクターが作製され、大腸菌等に導入されコロニーが選択された後に、該コロニーを形成した大腸菌から所望の組換えベクターが調製できる。そして、該組換えベクターが目的とするcDNAの塩基配列を有しているか否かについて、公知の方法、例えば、ジデオキシヌクレオチドチェーンターミネーション法等により確認できる。

40

## 【実施例】

## 【0046】

以下、本発明を実施例に従いより詳細に説明するが、本発明がこれら実施例に限定されないことはいうまでもない。

## 【0047】

実施例1：モノクローナル抗体作製から単離まで  
proBDNFのプロドメインに対するモノクローナル抗体の作製

50

抗体作製の抗原

proBDNFのプロドメイン内のペプチドと大腸菌組み換えBDNFプロペプチド(図2、アミノ酸19-128: 作製方法は特許4457216号に記載)を用いた。

【0048】

KVRPN EENNKDADLYが抗原に用いたペプチド配列である。

【0049】

ペプチド合成とキャリア架橋

1. Fluorenyl-MethOxy-Carbonyl(Fmoc)固相合成法により各ペプチドを80%以上の純度で各々5 mg合成した。ペプチドはHPLC法にて純度80%以上とし、MASS分析で目的ペプチドの分子量理論値と一致していることを確認した。

2. ペプチド1 mg相当を免疫用にKeyhole limpet hemocyanin (KLH)に架橋し、もう1 mg相当をアッセイ用にBSAに架橋した。架橋方法はきわめてペプチド損失のない手段をとり、かつ立体構造についても十分な配慮を行った。組み換えタンパクに対しても構造を伴わない架橋方法で免疫直前にキャリア架橋することで免疫原性を効果的に上げる試みを行い、更に架橋していないオリジナル組み換え抗原と共に投与抗原とした。

【0050】

動物免疫及び細胞融合

1. 抗原は76-90C:KVR16-KLH 0.6 mg/300 µlとヒトBDNFプロペプチド(組み換えタンパク) 500 µl (0.75 mg/ml)を混合したものを、同量のフロイントコンプリートアジュバンド(Pierce)と共にエマルジョン化させ、等分してC57BL6マウス4匹免疫した。リンパ節融合を成功させる効果的な位置に免疫感作を行った。

2. 初回免疫13日後に、体内の複数箇所に腫大化しているリンパ節を可能な限り全て摘出し、抗体産生細胞の由来となるリンパ球を得た。

3. マウスミエローマ細胞P3-X63-Ag8-Uと免疫動物体内から得られたリンパ球を50%ポリエチレングリコール存在下にて細胞融合させた。融合細胞は96ウェル培養プレート10枚以上に培養した(960ウェルの候補群)。更に、無血清に近い組成で調製したHAT選択培地での培地交換を3-4回にわたって実施した。

【0051】

スクリーニング及び特異性試験

1. 抗原種類別にスクリーニングを実施した。低分子のペプチド抗原は、全てBSA架橋物としておき、アッセイ抗原(i)MSM20ペプチド、(ii)HSD13ペプチド、(iii)ヒトproBDNF組み換えタンパクを各々2 µg/ml濃度にPBSで希釈してELISA用96ウェルプレートを調製した。ELISAに使用する検出用酵素標識二次抗体は、サブクラスにおいてIgGクラスの検出を期待でき、検出感度と特異性に優れたものを使用した。ELISA法にて抗血清及び培養上清中の抗体の有無を検出した。各抗原に対して959ウェルについて測定した。

2. 得られた陽性株に対して、それぞれ各種免疫原との競合反応を実施して、エピトープを認識しているかどうかの特異性を確認した。

【0052】

クローニング

1. 細胞融合で得られた抗原陽性株(組み換え抗原に反応する抗体を産生している細胞)をコロニー捕捉(Colony Capture Method)を行った。

2. 捕捉細胞はただちに限界希釈法により完全クローニングを実施した。

3. シングル細胞から成長したハイブリドーマクローン細胞を、同一系統から不測の事態に備え2系統(本株、亜株)取得し、拡大培養した。

【0053】

細胞凍結保管及び復元テスト

1. 容積2 ml用クライオバイアルに本株7本、亜株3本を凍結し、本株の1本を復元テスト用に後日融解する。納品は本株4本、亜株2本の送付とし、残りは輸送中等の不測の事態を回避するためのスペア細胞として委託会社が保管する。

2. 得られた全てのハイブリドーマ培養上清を良質な抗体含有液として保存・納品する

10

20

30

40

50

。

## 【 0 0 5 4 】

実施例 2 : BDNFプロドメインの領域A,B,Cに対する抗体の親和性

図3A, 図3Bに示されるBDNFプロドメイン配列内の3つの領域A, B, Cを大腸菌で発現・精製した。

図3A 3つの領域A, B, CのBDNFプロドメイン内の位置を示す。

図3B 各々のアミノ酸数、予想分子量、アミノ酸配列を示す。重複するアミノ酸配列は下線又は2重下線で示している。

図3C 領域A,B,Cと各抗体の結合をピアコアで調べた。ピアコアセンサーチップに領域A,B又はCのリコンビナントタンパクを結合させ、各抗体を流して結合の強さを比較した。

図3D ドットプロットによる各抗体と領域A,B,C, BDNFプロドメイン、成熟型BDNFとの反応。Rb pAbはBDNFプロドメインに対するウサギポリクロナル抗体、N20は成熟型BDNFに対するウサギポリクロナル抗体(既製品)である。

## 【 0 0 5 5 】

実験内容 :

ピアコア 大腸菌で発現させ精製したBDNFプロペプチドの領域A, B, CをBIAcoreセンサーチップCM5に10 mM Acetate, pH4.7の溶媒を用いて固定化を行った。測定パラメーターは温度 : 20、流速 : 20  $\mu$ L/min、Injection Volume : 120  $\mu$ L、Dissociation Time : 300sec、洗浄液 : 50mM NaOH、Injection Volume : 60  $\mu$ L。この条件で各抗体と領域A,B,Cの相互作用を解析した。

## 【 0 0 5 6 】

ドットプロット 領域A,B,C, BDNFプロペプチドまたは成熟型BDNFを100 ng/dotをニトロセルロース膜に図3Dの配置で静置し乾燥させた。ブロッキング液で30分間、室温でインキュベートした。各抗体を1000倍希釈し、1次抗体として抗体反応を行った。洗浄後、2次抗体反応を室温で30分間反応させた。洗浄後、HRP用検出試薬で検出した。

## 【 0 0 5 7 】

[実施例 3] 成獣マウス海馬CA3領域の免疫染色

図4 抗体#111,113,101を用いて、成獣マウス海馬組織切片の免疫染色と核染色(DAPI)の2重染色を行った。どの抗体もCA3領域の錐体細胞の細胞体に強い染色が見られた。

## 【 0 0 5 8 】

実験内容 :

15.7週齢の野生型マウスをPBSと4% PFAを含むPBSで灌流固定を行い、固定後の脳組織を取り出した。1晩、4% PFAを含むPBSで後固定を行った後、30% ショ糖を含むPBSに徐々に置き換えた。溶液を置き換えた後の脳組織を凍結し、クリオスタットで30  $\mu$ m厚のcoronal切片を作成し使用前までエチレングリコール : グリセロール : PBS=1:1:2の溶液につけて-30 で保存した。

以下の染色操作は切片を浮遊させて行った。切片をPBSで10分、3回洗浄し、その後0.2% Triton X-100を含むPBS(PBST)で10分、3回洗浄した。続いて3% ウシ血清アルブミンを含むPBSでブロッキングを室温、2時間行った。その後、1次抗体(ブロッキング液で500倍希釈)液で4、2晩インキュベーションした。PBSTで5分、3回洗浄した後、2次抗体液(Alexa555-conjugated anti mouse IgGをブロッキング液で1000倍希釈かつ1  $\mu$ g/ml DAPIを含む溶液)で室温、2時間インキュベーションした。PBSTで5分、3回洗浄した後、切片をスライドガラスに封入剤PermaFluorを用いて封入した。画像は共焦点レーザー顕微鏡で取得した。

## 【 0 0 5 9 】

[実施例 4] 抗体#111,113,101を用いたproBDNFの免疫沈降

抗体#111,113,101を用いて、BDNF<sup>Pro/+</sup>成獣マウス海馬組織ライセートより免疫沈降を行った。その結果、#101,103,111共にproBDNFを免疫沈降できることが明らかになった(図5)。

IP, 免疫沈降に使用した抗体。Control IgGは市販のマウスIgG。IB, ウエスタンプロット

10

20

30

40

50

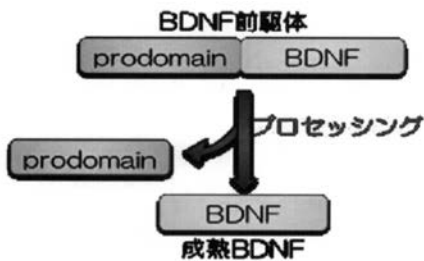
による検出に使用した抗体(既製品)。

【 0 0 6 0 】

実験内容：

BDNF<sup>Pro/+</sup>成獣マウス海馬組織を1% TritonX-100を含む可溶化溶液で溶かし、遠心後の上清を海馬組織ライセートとした。ライセートのタンパク量1 mgに対して、1 μgの各抗体とコントロール抗体を各々混合し、4、1晩インキュベーションした。前もって可溶化溶液で洗浄したProtein G セファロース 10 μlを添加し、さらに1時間インキュベーションした。セファロースを可溶化溶液1 mlで4回洗浄した後、SDSサンプルバッファーを加えて100、5分処理した。これらをIPサンプルとした。IPサンプルをSDS-PAGE、市販のBDNFプロドメイン抗体でウエスタンブロットを行った。

【 図 1 】



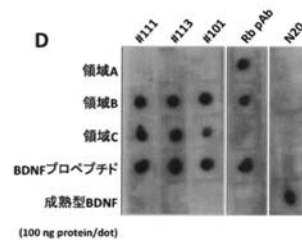
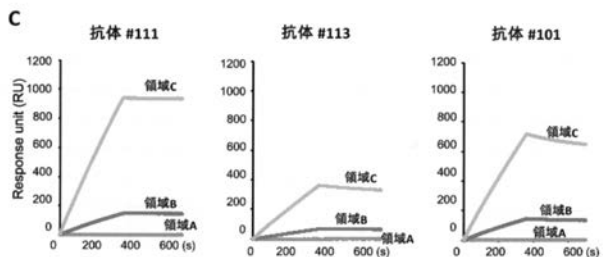
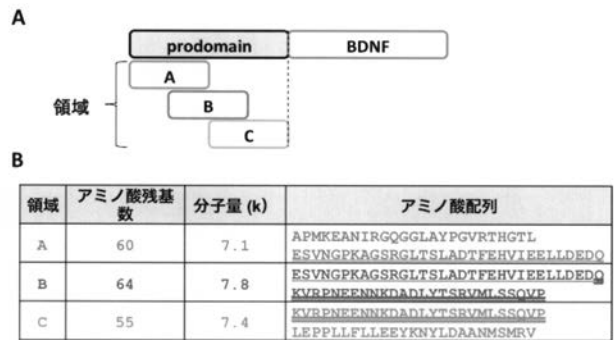
【 図 2 】

KVRPNEENKDADLY (76-90C: KVR16, prodomain内のペプチド)

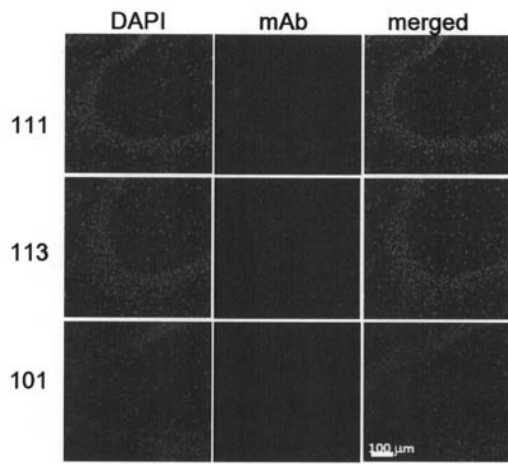
MTILFLTMVI SYFGCMKAAP MKEANIRGQG GLAYPGVRTH GTLESVNGPK AGSRGLTSLA 60  
 DTFEHVIEEL LDEQKVRPN EENKDADLY TSRVMLSSQV PLEPPLFLLL EYKKNYLDAA 120  
 MMSMRVRRHS DPARRGELSV CDSISEWVTA ADKKTAVDMS GGTIVTVLEKV PVSKGQLKQY 180  
 FYETKCNPMG YTKEGGRGID KRHWNSQCRT TQSYVRALTM DSKKRIGWRF IRIDTSCVCT 240  
 TIKRGR 247

シグナルペプチド (1-18)、\_\_ prodomain (19-128)、\_\_ mature BDNF (129-247)、  
 # 糖鎖結合予測 (121)。

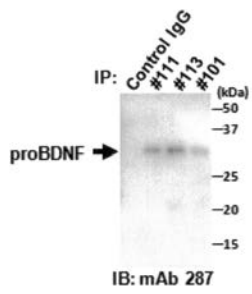
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【 配列表 】

2016193899000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード(参考)
<b>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</b>			A 6 1 K	39/395		N
<b>G 0 1 N 33/48 (2006.01)</b>			G 0 1 N	33/48		P
<b>G 0 1 N 33/53 (2006.01)</b>			G 0 1 N	33/53		Y

(72)発明者 原 とも子

大阪府池田市緑丘1丁目8番31号 国立研究開発法人産業技術総合研究所関西センター内

(72)発明者 水井 利幸

大阪府池田市緑丘1丁目8番31号 国立研究開発法人産業技術総合研究所関西センター内

(72)発明者 熊ノ郷 晴子

大阪府池田市緑丘1丁目8番31号 国立研究開発法人産業技術総合研究所関西センター内

Fターム(参考) 2G045 AA24 BB24 CB01 DA36 FB03

4B065 AA91X AA92X AA92Y AB01 AB05 AC16 BA08 BB32 BD09 BD12

CA25 CA44 CA46

4C085 AA14 BB11 CC02 CC21 EE01

4H045 AA11 AA30 DA75 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	抗体或其抗原结合片段和杂交瘤		
公开(公告)号	<a href="#">JP2016193899A</a>	公开(公告)日	2016-11-17
申请号	JP2016074191	申请日	2016-04-01
申请(专利权)人(译)	国立研究开发法人产业技术総合研究所		
[标]发明人	小島正己 上垣浩一 原とも子 水井利幸 熊ノ郷晴子		
发明人	小島 正己 上垣 浩一 原 とも子 水井 利幸 熊ノ郷 晴子		
IPC分类号	C07K16/18 C12N15/02 C12N5/20 A61P25/28 A61P25/00 A61K39/395 G01N33/48 G01N33/53		
FI分类号	C07K16/18.ZNA C12N15/00.C C12N5/20 A61P25/28 A61P25/00 A61K39/395.N G01N33/48.P G01N33/53.Y C12N15/06.100 C12N15/13		
F-TERM分类号	2G045/AA24 2G045/BB24 2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/FB03 4B065/AA91X 4B065/AA92X 4B065/AA92Y 4B065/AB01 4B065/AB05 4B065/AC16 4B065/BA08 4B065/BB32 4B065/BD09 4B065/BD12 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC02 4C085/CC21 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	2015075401 2015-04-01 JP		
其他公开文献	JP2016193899A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

提供了特异性识别BDNF前结构域或BDNF前肽的抗体。具有以下特征的抗体或其抗原结合片段：(1) 识别proBDNF的第19至128个BDNF前结构域和proBDNF的第19至第128 BDNF前肽，但不识别成熟的BDNF (2) 不识别BDNF前域的区域A，但具体识别区域B和/或区域C，[化学1] (带下划线的部分是区域A和B之间的公共部分，带下划线的部分是区域B和C之间的公共部分。) [选择图]无

モノクローナル抗体	受託番号	寄託日
#101(10A-11H)	P-02013	平成27年2月27日
#111(1E-7E)	P-02011	平成27年2月27日
#113(3C-10H)	P-02012	平成27年2月27日