

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6531262号
(P6531262)

(45) 発行日 令和1年6月19日(2019.6.19)

(24) 登録日 令和1年5月31日(2019.5.31)

(51) Int.Cl.		F I			
C 0 7 K 16/44	(2006.01)	C 0 7 K	16/44	Z N A	
C 1 2 N 15/13	(2006.01)	C 1 2 N	15/13		
C 1 2 P 21/08	(2006.01)	C 1 2 P	21/08		

請求項の数 3 (全 14 頁)

(21) 出願番号	特願2015-550572 (P2015-550572)	(73) 特許権者	590002389
(86) (22) 出願日	平成26年11月28日 (2014.11.28)		静岡県
(86) 国際出願番号	PCT/JP2014/005969		静岡県静岡市葵区追手町9番6号
(87) 国際公開番号	W02015/079709	(74) 代理人	100107984
(87) 国際公開日	平成27年6月4日 (2015.6.4)		弁理士 廣田 雅紀
審査請求日	平成29年10月27日 (2017.10.27)	(74) 代理人	100102255
(31) 優先権主張番号	特願2013-248159 (P2013-248159)		弁理士 小澤 誠次
(32) 優先日	平成25年11月29日 (2013.11.29)	(74) 代理人	100096482
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		弁理士 東海 裕作
		(74) 代理人	100188352
			弁理士 松田 一弘
		(74) 代理人	100131093
			弁理士 堀内 真
		(74) 代理人	100150902
			弁理士 山内 正子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗蛍光色素モノクローナル抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

アレクサフルオール（登録商標）647を認識する抗体の重鎖可変領域を構成するポリペプチドであって、該重鎖可変領域が、配列番号4に示すアミノ酸配列又は配列番号4と少なくとも97%同一であるアミノ酸配列からなる、前記重鎖可変領域を構成するポリペプチド、及び

アレクサフルオール647を認識する抗体の軽鎖可変領域を構成するポリペプチドであって、該軽鎖可変領域が、配列番号10に示すアミノ酸配列又は配列番号10と少なくとも97%同一であるアミノ酸配列からなる、前記軽鎖可変領域を構成するポリペプチドを含むことを特徴とする抗アレクサフルオール647モノクローナル抗体。

【請求項2】

アレクサフルオール647を認識する抗体の重鎖を構成するポリペプチドであって、該重鎖が、配列番号6に示すアミノ酸配列又は配列番号6と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列からなる、前記重鎖を構成するポリペプチド、及び

アレクサフルオール647を認識する抗体の軽鎖を構成するポリペプチドであって、該軽鎖が、配列番号12に示すアミノ酸配列又は配列番号12と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列からなる、前記軽鎖を構成するポリペプチド

を含むことを特徴とする請求項1記載の抗アレクサフルオール647モノクローナル抗体

【請求項3】

請求項 1 又は 2 記載の抗アレクサフルオール 6 4 7 モノクローナル抗体をコードする DNA。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アレクサフルオール (Alexa Fluor ; 登録商標、インビトロジェン社製) 6 4 7 のエピトープに結合することができる抗蛍光色素モノクローナル抗体や、該モノクローナル抗体を構成するポリペプチドや、該ポリペプチドをコードする DNA に関する。

【背景技術】

【0002】

抗体は研究用試薬、診断用試薬、各種物質モニター用試薬、抗体医薬等として、膨大な種類が開発・販売されている。抗体は、一般的に抗原で免疫した動物の血清から調製されるが、抗原は複数のエピトープ (抗原決定基) をもつことが多いため、単に血清から調製されたままでは、各々のエピトープに対する抗体が混ざっており、これをポリクローナル抗体という。一方、モノクローナル抗体は、免疫グロブリン分子種自体が均一であり、一つのエピトープに対する単一の分子種となるため、抗原特異性が全く同一の抗体となる。

【0003】

従来、モノクローナル抗体の作製には、抗原で免疫した動物の脾臓やリンパ節から取り出した抗体産生リンパ球の B 細胞と、無限に増殖して免疫グロブリンを産生する形質細胞腫瘍の骨髓腫細胞を融合した、ハイブリドーマ細胞を用い、目的の抗体を産生する 1 個のハイブリドーマ細胞から増殖した細胞集団を、限界希釈法により分離し、該細胞集団が分泌する抗体を精製する方法がとられてきた。

【0004】

その他のモノクローナル抗体の作製法としては、目的の抗体が認識する抗原を標識化してなる標識化抗原を、前記抗体を産生するターゲット細胞を含む細胞集団に接触させ、前記標識化抗原を前記ターゲット細胞に結合させ、得られる標識化ターゲット細胞を分離し、分離した標識化ターゲット細胞を用いて、それが保有する抗体遺伝子を調製し、調製した抗体遺伝子を、発現ベクターを用いて発現させる抗体作製方法 [特許文献 1] 等が知られる。

【0005】

また、本発明者らは、既に確立した抗原特異的なヒト抗体を産生する B 細胞を 1 細胞レベルで検出・同定し、PCR クローニング法により、直接抗体遺伝子を取得する技術 [特許文献 2] により、感染症やがん関連抗原に対する特異的なヒト抗体を産生する B 細胞の検出が可能であることを示してきた。

【0006】

アレクサフルオール 6 4 7 は、以下の構造式を有し、その極大吸収波長が 6 5 0 nm の蛍光物質である。また、蛍光物質を認識するモノクローナル抗体の応用としては、免疫組織化学におけるアルカリフォスファターゼ標識抗 FITC (フルオレセインイソチオシアネート) 抗体の二次抗体としての使用 [特許文献 3] や、抗 Cy (登録商標) 5 モノクローナル抗体を結合させたマイクロビーズによる、Cy 5、PE - Cy 5 又はアレクサフルオール 6 4 7 標識の一次抗体で染色した細胞の間接磁気標識分離法 [非特許文献 1] 等が知られている。

【0007】

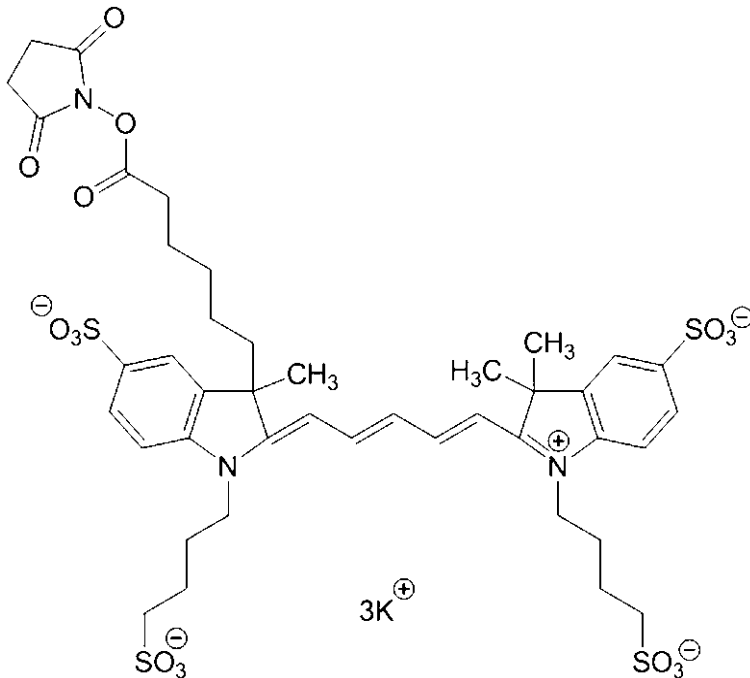
10

20

30

40

【化 1】



10

【先行技術文献】

20

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】特開2006-180708号公報

【特許文献2】特許5205597号公報

【特許文献3】特許4004385号公報

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Anti-Cy5/Anti-Alexa Fluor 647 Micro Beadsデータシート(ミルテニ
ー社: Order no.130-091-395)

【発明の概要】

30

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明の課題は、アレクサフルオール647を認識する新規なモノクローナル抗体を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者らは、悪性グリオーマ患者19症例において数種類のがん関連抗原タンパク(EGFR, VEGFR2, VEGFR3, CDH11等)に対する血液中のがん関連抗原に対する自家抗体価を測定していた。VEGFR2に対する抗体価が最も高かった症例(患者)の末梢血B細胞を用いて、アレクサフルオール647標識VEGFR2タンパク(細胞外ドメイン)とPE標識マウス抗ヒトIgG抗体による染色にて、VEGFR2特異的な抗体をもつB細胞を選別し、更に、Single cell sorter (FACS Aria, BD Bioscience)を用いて1細胞ごとのmRNAを回収し、cDNAクローニングを行った。クローニングされた抗体遺伝子を発現ベクターに組み込んで、バキュロウイルス発現系にて完全長抗体タンパクを発現・分泌させ、抗体を精製した。ELISA法にてVEGFR2-アレクサフルオール647及びVEGFR2タンパクに対する、精製抗体の結合活性を評価したところ、蛍光色素であるアレクサフルオール647特異的に結合活性を示すヒトモノクローナル抗体が、偶発的に同定された。本発明はこれらの知見に基づき完成に至ったものである。

40

【0012】

50

すなわち、本発明は以下のとおりである。

- (1) アレクサフルオール 647 を認識するモノクローナル抗体。
- (2) アレクサフルオール 647 を認識する抗体の重鎖可変領域を構成するポリペプチドであって、該重鎖可変領域が配列番号 2 に示すアミノ酸配列からなる超可変領域を含むことを特徴とするポリペプチド。
- (3) アレクサフルオール 647 を認識する抗体の重鎖可変領域を構成するポリペプチドであって、該重鎖可変領域が配列番号 4 に示すアミノ酸配列、又は配列番号 4 と少なくとも 97% 同一であるアミノ酸配列からなることを特徴とするポリペプチド。
- (4) アレクサフルオール 647 を認識する抗体の重鎖を構成するポリペプチドであって、該重鎖が配列番号 6 に示すアミノ酸配列、又は配列番号 6 と少なくとも 95% 同一であるアミノ酸配列からなることを特徴とするポリペプチド。
- (5) アレクサフルオール 647 を認識する抗体の軽鎖可変領域を構成するポリペプチドであって、該軽鎖可変領域が、配列番号 8 に示すアミノ酸配列からなる超可変領域を含むことを特徴とするポリペプチド。
- (6) アレクサフルオール 647 を認識する抗体の軽鎖可変領域を構成するポリペプチドであって、該軽鎖可変領域が、配列番号 10 に示すアミノ酸配列、又は配列番号 10 と少なくとも 97% 同一であるアミノ酸配列からなることを特徴とするポリペプチド。
- (7) アレクサフルオール 647 を認識する抗体の軽鎖を構成するポリペプチドであって、該軽鎖が、配列番号 12 に示すアミノ酸配列、又は配列番号 12 と少なくとも 95% 同一であるアミノ酸配列からなることを特徴とするポリペプチド。
- (8) 上記 (2) ~ (7) のいずれかに記載のポリペプチドをコードすることを特徴とする DNA。
- (9) 上記 (2) ~ (4) のいずれかに記載のポリペプチド、及び上記 (5) ~ (7) のいずれかに記載のポリペプチドを含むことを特徴とする抗アレクサフルオール 647 モノクローナル抗体。
- (10) 上記 (2) 又は (3) に記載のポリペプチド、及び上記 (5) 又は (6) に記載のポリペプチドを含むことを特徴とする上記 (9) 記載の抗アレクサフルオール 647 モノクローナル抗体。
- (11) 上記 (4) に記載のポリペプチド、及び上記 (7) に記載のポリペプチドを含むことを特徴とする上記 (9) 記載の抗アレクサフルオール 647 モノクローナル抗体。

【発明の効果】

【0013】

本発明によると、アレクサフルオール 647 と特異的に結合するモノクローナル抗体を用いることから、アレクサフルオール 647 で標識された物質をモニタリングすることや、アレクサフルオール 647 で標識された物質を定量することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図 1】 サンドイッチ ELISA 法において本発明の抗アレクサフルオール 647 モノクローナル抗体を捕獲抗体として用い、検出抗体として酵素標識抗ヒト IgG 抗体を用いる場合の一例の概略を示す図である。図中、「Alexa 647」はアレクサフルオール 647 を示す (図 2、図 5 においても同様)。

【図 2】 磁気細胞分離法に基づく細胞分離・濃縮方法の概略を示す図である。

【図 3】 悪性グリオーマ 19 症例における数種類のがん関連抗原タンパク (EGFR, VEGFR2, VEGFR3, CDH11 等) に対する血液中の自家抗体価を示す図である。

【図 4】 GB-SCCC008、GB-SCCC011 症例患者血漿中自家抗体と、各がん関連抗原タンパクによるウェスタンブロッティングの結果を示す図である。

【図 5】 GB-SCCC008 症例の末梢血 B 細胞を用いた、アレクサフルオール 647 標識 VEGFR2 タンパク (細胞外ドメイン) と PE 標識マウス抗ヒト IgG 抗体染色による、VEGFR2 特異的な抗体をもつ B 細胞のセルソーティングの経過を示す図である。

【図6】Single cell sorter (FACSAria, BD Bioscience)を用いて1細胞ごとに回収されたmRNAの、RT-PCRを示す図である。

【図7】クローニングされた抗体遺伝子を発現ベクターに組み込んで、バキュロウイルス発現系にて完全長抗体タンパクを発現・分泌させ、精製した15クローンの抗体について、VEGFR2-アレクサフルオール647及びVEGFR2タンパクに対する結合活性をELISA法で評価した図である。

【図8】精製抗体#48, 51, 55を電気泳動した、SDS-PAGEのクマシーブリリアントブルー染色像を示す図である。

【図9】精製抗体#48, 51, 55における、Biacore(登録商標)を用いたSurface plasmon resonance (SPR)法による抗原との結合・解離速度定数解析の結果を示す図である。

10

【図10】サンドイッチELISA法を用いて、アレクサフルオール647標識トラスツズマブを測定した結果を示す図である。X軸が吸光度(450nm)、Y軸がアレクサフルオール647標識トラスツズマブの濃度(ng/ml)である。

【発明を実施するための形態】

【0015】

本発明のポリペプチドとしては、アレクサフルオール647を認識する抗体の重鎖可変領域や重鎖、及び軽鎖可変領域や軽鎖を構成するポリペプチドであって、1)配列番号2に示すアミノ酸配列からなる超可変領域(相補性決定領域:CDR3)を含む重鎖可変領域を構成するポリペプチド[P1]、2)配列番号4に示すアミノ酸配列、若しくは配列番号4と少なくとも97%同一、好ましくは98%以上同一、より好ましくは99%以上同一であるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を構成するポリペプチド[P2]、3)配列番号6に示すアミノ酸配列、又は配列番号6と少なくとも95%同一、好ましくは98%以上同一、より好ましくは99%以上同一であるアミノ酸配列からなる重鎖を構成するポリペプチド[P3]、又は、4)配列番号8に示すアミノ酸配列からなる超可変領域(相補性決定領域:CDR3)を含む軽鎖可変領域を構成するポリペプチド[P4]、5)配列番号10に示すアミノ酸配列、若しくは配列番号10と少なくとも97%同一、好ましくは98%以上同一、より好ましくは99%以上同一であるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を構成するポリペプチド[P5]、6)配列番号12に示すアミノ酸配列、若しくは配列番号12と少なくとも95%同一、好ましくは98%以上同一、より好ましくは99%以上同一であるアミノ酸配列からなる軽鎖を構成するポリペプチド[P6]を挙げることができる。

20

30

【0016】

本発明のDNAとしては、上記本発明のアレクサフルオール647を認識する抗体の重鎖可変領域を構成するポリペプチド[P1]及び[P2]、重鎖を構成するポリペプチド[P3]、軽鎖可変領域を構成するポリペプチド[P4]及び[P5]、並びに、軽鎖を構成するポリペプチド[P6]をそれぞれコードするDNAであれば特に制限されず、より具体的には、1)重鎖超可変領域をコードする配列番号1に示す塩基配列を含む重鎖可変領域をコードするDNA[D1]、2)重鎖可変領域をコードする配列番号3に示す塩基配列、若しくは配列番号3と少なくとも95%同一、好ましくは98%以上同一、より好ましくは99%以上同一である塩基配列を含むDNA[D2]、3)重鎖をコードする配列番号5に示す塩基配列、若しくは配列番号5と少なくとも90%同一、好ましくは95%以上同一、より好ましくは98%以上同一である塩基配列からなるDNA[D3]、4)軽鎖超可変領域をコードする配列番号7に示す塩基配列を含む軽鎖可変領域をコードするDNA[D4]、5)軽鎖可変領域をコードする配列番号9に示す塩基配列、若しくは配列番号9と少なくとも95%同一、好ましくは98%以上同一、より好ましくは99%以上同一である塩基配列を含むDNA[D5]、6)軽鎖をコードする配列番号11に示す塩基配列、若しくは配列番号11と少なくとも90%同一、好ましくは95%以上同一、より好ましくは98%以上同一である塩基配列からなるDNA[D6]を挙げることができる。

40

50

【 0 0 1 7 】

また、上記アミノ酸配列や塩基配列において、例えば、少なくとも95%同一とは、問題の配列が、アミノ酸やヌクレオチドの各挿入、欠失、置換等をただ1つの違いとして数えたとき、比較しようとしている配列と5%未満の異なるアミノ酸やヌクレオチドを含むことを意味する。

【 0 0 1 8 】

本発明のモノクローナル抗体としては、アレクサフルオール647に特異的に結合する抗アレクサフルオール647モノクローナル抗体であれば特に制限されず、抗アレクサフルオール647モノクローナル抗体の重鎖可変領域を構成するポリペプチド[P1]及び[P2]、重鎖を構成するポリペプチド[P3]のいずれかと、軽鎖可変領域を構成するポリペプチド[P4]及び[P5]、軽鎖を構成するポリペプチド[P6]のいずれかを含むモノクローナル抗体、例えば、[P1]と[P4]、[P2]と[P5]、[P3]と[P6]、[P1]と[P5]、[P2]と[P4]等をそれぞれ含むモノクローナル抗体を具体的に挙げるができる。

10

【 0 0 1 9 】

本発明の抗アレクサフルオール647モノクローナル抗体には、IgG、IgA、IgM、IgD、IgE等のいずれのアイソタイプを有するモノクローナル抗体が含まれ、また、本発明の抗アレクサフルオール647モノクローナル抗体には、完全長(Full body)モノクローナル抗体の他、モノクローナル抗体の活性フラグメント、例えば、F(ab)₂、Fab、Fab、Fv(variable fragment of antibody)、sFv、dsFv(disulphide stabilised Fv)、dAb(single domain antibody)等も含まれる。

20

【 0 0 2 0 】

本発明の抗アレクサフルオール647モノクローナル抗体の完全長抗体の作製方法としては、抗アレクサフルオール647モノクローナル抗体の重鎖をコードするDNA[D3]と軽鎖をコードするDNA[D6]を組み込んだ発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、形質転換細胞を適切な培地で培養して発現させることにより得ることができる。Fab抗体の作製には、精製された上記完全長抗体をパイン消化して、Fab断片のみを再度精製する従来法が挙げられる。また、一本鎖Fvフラグメント(scFv)抗体の作製には、抗アレクサフルオール647モノクローナル抗体の重鎖可変領域をコードするDNA[D1]又は[D2]と軽鎖可変領域をコードするDNA[D4]又は[D5]とをリンカーで連結して宿主細胞内で発現させる方法等を挙げるができる。

30

【 0 0 2 1 】

本発明の抗アレクサフルオール647モノクローナル抗体には、抗体可変領域(Fv)と、様々な動物種由来の抗体定常領域(Fc)を組み合わせたキメラ抗体やヒト化抗体も含まれる。かかるキメラ抗体やヒト化抗体は、Fv領域をコードする遺伝子とFc領域をコードする遺伝子と結合させて発現させることにより、調製することができる。かかる動物種としては、一般的な抗体の動物種であるマウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ロバ、ブタ、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ、ニワトリ、サル、ヒト等を例示することができる。定常領域は、可変領域の由来するモノクローナル抗体と同一のものであっても、あるいは、異なるモノクローナル抗体に由来するものであってもよい。例えば、Fc領域として、公知のヒトのIgG1、マウスのIgG1のFc領域が使用可能である。

40

【 0 0 2 2 】

なお、サンドイッチELISA法において本発明のヒト抗アレクサフルオール647モノクローナル抗体を捕獲抗体として用いる場合には、かかる捕獲抗体の定常領域が検出抗体の定常領域と異なる動物種由来とすることで、捕獲抗体と検出抗体との交差反応をより防ぐことが可能となる。例えば、図1に示すように、検出抗体として酵素標識抗ヒトIgG抗体等の抗ヒト抗体を用いる場合には、捕獲抗体としてヒト-マウスキメラ抗体(マウス化抗体)を用いればよい。前記ヒト-マウスキメラ抗体は、例えば、ヒト由来の配列番号6に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドコードする遺伝子のうちFc領域配列を人

50

工合成されたマウス由来のFc領域配列と入れ替えた、配列番号13に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする遺伝子を発現する発現ベクターを作製し、ヒト由来の配列番号12に示すアミノ酸配列をコードする遺伝子と共にexp1293細胞のような哺乳類細胞に導入して培養上清中に産生させることにより得ることができる。

【0023】

本発明のモノクローナル抗体の製造に用いることができる発現ベクターとしては、本発明のポリペプチドをコードするDNAを、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、植物細胞、動物細胞等の宿主細胞において発現しうるものが好ましく、バキュロウイルスのAutographa californica nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) ベクター及びバキュロウイルス用のシャトルベクター (pFastBac Dual vector) を好適に挙げることもできる。また、宿主細胞がカイコ (Bombix mori) 細胞のBmN4では、バキュロウイルスの核多角体病ウイルスBombix mori nuclear polyhedrosis virus (BmNPV) ベクターを好適に挙げることもできる。また、上記発現ベクターには、プロモーター、ターミネーター、マーカー遺伝子としての薬剤耐性遺伝子を含んでいてもよい。

【0024】

また、宿主細胞へのベクターの導入法としては、In-Fusionクローニングシステム (Clontech社)、リポソーム法、リポフェクション法、マイクロインジェクション法、DEAEデキストラン法、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法等を挙げることができる。Lipofectin Reagent (登録商標)、Lipofectamine (登録商標)、Lipofectamine (登録商標) 2000 Reagent (インビトロジェン社製) や、SuperFect (登録商標) Transfection Reagent (キアゲン社製)、FuGENE (登録商標) HD Transfection Reagent (ロシュ・ダイアグノスティックス社製)、FuGENE (登録商標) 6 Transfection Reagent (ロシュ・ダイアグノスティックス社製) 等の市販のトランスフェクション試薬を用いる当技術分野で広く用いられている手法を挙げることができる。

【0025】

本発明の抗アレクサフルオール647モノクローナル抗体は、被検非ヒト動物対象に投与された、アレクサフルオール647で標識された物質のモニタリングに有利に使用することができる。より詳細には、特定疾患の生物学的製剤 (医薬品) の開発に向け実験動物に使用する場合を例として、医薬品への感受性の確認や投与間隔及び投与量の調整等を目的とした、生物学的製剤濃度による有効性、及びin vivo/in situにおける生物学的製剤の局在に対するモニタリングに有利に使用することができる。具体的には、アレクサフルオール647で標識された開発候補医薬品を実験動物に投与したのち、適宜観察対象の臓器を取り出し、本発明の抗体を用いた免疫組織化学法、免疫沈降法、ELISA法、ウェスタンブロッティング法等により、対象の臓器に局在する該医薬品を同定、可視化、定量する手法を例示することができる。

【0026】

本発明の抗アレクサフルオール647モノクローナル抗体は、磁気細胞分離法に基づく細胞分離・濃縮を目的とした利用を例示することができ、MACS (登録商標) 細胞分離システム (Miltenyi Biotec社) や、Dynabeads (登録商標) 細胞分離システム (インビトロジェン社)、BD Imag (商標) 細胞分離システム等好適に挙げることができる。(a) アレクサフルオール647で標識された任意の抗体と特異的に結合している濃縮対象細胞を含む、細胞懸濁液試料を調製し; (b) 前記試料に、本発明の抗アレクサフルオール647モノクローナル抗体が結合した磁気ビーズを添加し、濃縮対象細胞をビーズに結合させ; (c) 前記試料を磁場の存在下で強磁性マトリックスに通過させ、強磁性マトリックスに結合しない濃縮非対象細胞を回収し; (d) 濃縮対象細胞を提供するために、実質的に磁場の非存在下で該マトリックスから結合細胞を溶出し、濃縮対象細胞を回収する方法を挙げることができる。磁気細胞分離法に基づく細胞分離・濃縮方法の概略を図2に示す。

【0027】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの

10

20

30

40

50

例示に限定されるものではない。また、実施例において使用した患者検体（細胞および血漿）は、静岡県立静岡がんセンターにて治療中の患者の同意のもと、施設内の臨床研究倫理審査委員会の承認を受けた研究の範囲内で使用された。

【実施例 1】

【0028】

1. 悪性グリオーマ患者血液中の自家抗体測定

悪性グリオーマ 19 症例においてがん関連抗原タンパクの上皮成長因子受容体（EGFR）、血管内皮細胞増殖因子受容体（VEGFR2 及び VEGFR3）、カドヘリン（CDH11）、血小板凝集因子（Podoplanin）及び陰性コントロールのグルタチオン S-トランスフェラーゼ（GST）に対する、患者血液中の自家抗体の測定を、特開 2010-237126 号公報に開示される、本発明者が開発した「ELISA法を用いたヒト血清中の抗原特異的な IgG 抗体力価測定の標準化法」にて実施した（図 3）。

各組換えタンパク 20 ng を 96 ウェルプレートに固相化し、4 で一晩インキュベートした後、3% BSA 溶液にてブロッキングを行った。次に希釈した患者由来の血漿 100 μ l を添加し、2 時間室温にてインキュベートした。洗浄後、1000 倍希釈の HRP 標識ヒツジ抗ヒト IgG 抗体（GEヘルスケア社製）、その後発色基質を添加し、イムノリーダー（Immuno Mini NJ-2300、ナルジェヌンク社製）にて吸光度の測定を行った。

その結果、GB-SCCC008 症例の血液中には、EGFR、VEGFR2 及び VEGFR3 について自家抗体が顕著に存在することが示された。また、GB-SCCC008 症例の血液中の各種がん関連抗原タンパクに対する自家抗体は、ウェスタンブロッティングによっても確認できた（図 4）。

【実施例 2】

【0029】

2. シングルセルソーターによる VEGFR2 - アレクサフルオール 647 特異的抗体産生 B 細胞の分取

GB-SCCC008 症例の全血から FicolI-PaqueTM plus（GEヘルスケア社製）処理による密度勾配遠心分離を行い、末梢血単核球を分離した後、CD19 マイクロビーズ（Miltenyi 社製）を用いて AutoMACS（Miltenyi 社製）装置にて CD19 陽性細胞を選別した。その後、アレクサフルオール 647 標識 VEGFR2（細胞外ドメイン）タンパク（当研究室にて作製）、PE 標識マウス抗ヒト IgG 抗体（BD Bioscience 社製）、PerCP 標識マウス抗ヒト CD14 モノクローナル抗体（クローン：MfP9）（BD Bioscience 社製）及び PI（propidium iodide）を用いて VEGFR2 抗体を産生する細胞分取用の染色を行った。また抗 CEACAM5 マウスハイブリドーマ細胞（クローン：T84.66A3.1A.1F2, ATCC, cat. HB-8747）を使用した実験では、アレクサフルオール 647 標識ヒト CEA-related cell adhesion molecules（CEACAM5）タンパク（当研究室にて作製）、PE 標識ラット抗マウス CD138 モノクローナル抗体（クローン：281-2）（BD Bioscience 社製）を使用して細胞の染色を行った。

シングルセルソーター（FACS Aria, BD Bioscience 社製）を用いて、PI 陰性生細胞の CD14 陰性かつ CD19 陽性 B 細胞のうち、VEGFR2（細胞外ドメイン）タンパクに結合する免疫グロブリン G（IgG）が細胞膜に結合している B 細胞にゲートを設定したところ、CD19 陽性細胞の 0.06% が VEGFR2 特異的抗体産生 B 細胞であった（図 5B）。セルソーターの検出感度は、抗 CEACAM5 マウスハイブリドーマ細胞を含む患者末梢血単核球を用いて検討した。含まれる抗 CEACAM5 マウスハイブリドーマ細胞は、アレクサフルオール 647 標識 CEACAM5 抗原と抗マウス CD138 抗体を用いて検出した。セルソーターの検出限界は、10 細胞 / 10^6 末梢血単核球であり、0.001% であった（図 5A）。

【実施例 3】

【0030】

3. 1 細胞レベルでの抗体遺伝子の解析及び同定

上記により、セルソーターで 1 細胞ごとに分取した VEGFR2 - アレクサフルオール

10

20

30

40

50

647特異的抗体産生B細胞の、1細胞レベルでの抗体遺伝子の解析を、特許番号第5205597号公報に開示される、本発明者が開発した「1細胞レベルでの抗体遺伝子の解析・同定方法」に準拠して実施した。まずセルソーターにて1細胞ごとに96ウェルプレートに分取した後、細胞を破碎させ、直接1細胞ごとにmRNAを回収した。その後RT-PCRを行ったところ、採取した60個のB細胞のうち40個でIgH遺伝子の増幅に成功した(図6 最上段)。また、分取したウェルごとの細胞の有無を確認するために実施した、アクチンのRT-PCRでは、38個で成功した(図6 最下段)。最終的に同一細胞でIgH及びIgL遺伝子がともに増幅された細胞は、22個であった。これらのすべての細胞からH鎖及びL(kappa)鎖の抗体遺伝子のcDNAがクローニングされた。

10

【実施例4】

【0031】

4. バキュロウイルス発現系による完全長抗体タンパクの作製

22クローンの抗体遺伝子を発現ベクターに組み込んで、バキュロウイルス発現系にて完全長抗体タンパクを発現・分泌させ、精製を行った。

抗体遺伝子(H鎖及びL鎖)をバキュロウイルス用のシャトルベクター(pFastBac Dual vector)に組み込んで、大腸菌DH10Bacに導入し、相同組換えにより組換えバクミドの作製を行った。バクミドDNAは、昆虫由来のSf9細胞に導入され、組換えバキュロウイルスの作製を行った。増幅されたウイルスは、タンパクの高産生株である昆虫由来のHigh Five細胞に感染させ、27で64時間無血清培地にて培養した。培養上清中に産生された抗体タンパクは、プロテインAプレパックカラム(GEヘルスケア社製)を用いて精製を行った。取得できた15クローンについて、アレクサフルオール647標識VEGFR2及びVEGFR2タンパクに対する結合活性をELISA法にて評価した(図7)。アレクサフルオール647標識VEGFR2タンパクに対して強く結合したクローンが5種類認められた(#48, 51, 54, 55, 56)。このうちVEGFR2にも結合したものが、クローン#48, #51であった。従ってこの結果から、#54, #55, #56のクローンは、VEGFR2タンパクではなく、アレクサフルオール647標識特異的に結合活性のある抗体である可能性が示された。VEGFR2タンパクに対する抗体クローンの#48, #51, #55精製抗体を、SDS-PAGE法にて電気泳動し、泳動後のゲルをクマシーブリリアントブルー染色したところ、H鎖、L鎖に分かれた明瞭なバンドを確認できた(図8)。

20

30

【実施例5】

【0032】

5. 抗体クローンのSPR法を用いた親和性測定

抗体クローンの#48, #51, #55精製抗体と、VEGFR2タンパク及びアレクサフルオール647標識VEGFR2タンパクとの親和性を、BIAcore X100(GEヘルスケア社製)の機器を用いた表面プラズモン共鳴法(SPR解析)にて測定した。チップへのリガンド(各抗体クローン)固定化量は1000~10000レスポンスユニット(RU)の間で行われた。抗体はHBS緩衝液(0.15M NaCl, 3mM EDTA, 0.05% Tween 20)に溶解し、流速10 μ l/min又は30 μ l/min、25、最大150 μ Mの濃度で測定した。チップの再生を行う際には3molar塩化マグネシウムを用いた。BIAcore X100エバリュエーションソフトウェアを用いて測定データから動態定数を算出した。

40

【0033】

抗体クローン#48及び#51については、1:1結合モデルにて結合速度定数(K_a)、解離速度定数(K_d)及び解離定数(KD)を求め、抗体クローン#55については、1:1結合反応の解離速度の差を利用したTwo-state reactionモデルにて解離定数を求めた。結果を表1に示す。SPR解析の結果から、クローン#48及び#51抗体は、VEGFR2に比較的強く結合活性を示すが、一方クローン#55抗体は、VEGFR2タンパクには親和性を示さず、アレクサフルオール647標識VEGFR2タンパクのみに

50

結合することが明らかとなった。これよりクローン#55抗体は、蛍光色素であるアレクサフルオール647を特異的に認識するヒトモノクローナル抗体であることがわかった(図9)。

【0034】

【表1】

1:1 binding model

Ligand	Analyte	ka(/Ms)	kd(/s)	KD(M)
Ab #48	VEGFR2ex.	1.3×10^4	7.0×10^{-6}	5.5×10^{-10}
Ab #51	VEGFR2ex.	3.9×10^4	7.5×10^{-6}	1.9×10^{-10}

10

Two state reaction

Ligand	Analyte	ka(/Ms)	kd(/s)	KD(M)
Ab #55	VEGFR2ex-Alexa647	-	-	3.12×10^{-9}

【実施例6】

【0035】

6. サンドイッチELISA法を用いたアレクサフルオール647標識抗体濃度の測定
 アレクサフルオール647標識抗体として、アレクサフルオール647標識トラスツズマブを次の方法で作製した。まずトラスツズマブ(抗Her2抗体)の重鎖を構成するポリペプチド(配列番号14)と軽鎖を構成するポリペプチド(配列番号15)をコードする遺伝子をそれぞれpcDNA3.3ベクター(サーモフィッシャーサイエンティフィック社製)に組み込み、Expi293細胞に遺伝子導入し、5~7日間培養した後に培養上清からプロテインAを用いて回収精製することでトラスツズマブを得た。次に、得られたトラスツズマブに対して、Alexa Fluor 647 Protein Labeling Kit(サーモフィッシャーサイエンティフィック社製)を用い、製品付属のマニュアルに従ってアレクサフルオール647標識操作を行い、アレクサフルオール647標識トラスツズマブを得た。

20

【0036】

サンドイッチELISA法を用いて、アレクサフルオール647標識トラスツズマブを次の方法で測定した。96穴イモビライザーアミノプレート(サーモフィッシャーサイエンティフィック社製)に、PBS中に希釈した10µg/mlの抗アレクサフルオール647抗体(抗体クローン#55)を捕獲抗体として50µl/ウェルずつ分注し室温で2時間反応固定化した後、洗浄液(0.05% Tween-20含有PBS)を用いて3回洗浄し、3%BSAを含むPBSを用いて4で一晚反応させブロッキングを行った。上記プレートを洗浄液で3回洗浄した後、0、15.625、31.25、62.5、125、250、500及び1000ng/mlのアレクサフルオール647標識トラスツズマブを各ウェルに加え、室温で2時間反応させた。次に上記プレートを、洗浄液で3回洗浄後、検出抗体として5µg/mlのビオチン標識した抗アレクサフルオール647抗体(抗体クローン#55)を50µl/ウェルずつ加えて30分間反応させ、洗浄液で3回洗浄した。さらに、0.2µg/mlのホースラディッシュペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(PN21130、サーモフィッシャーサイエンティフィック社製)を50µl/ウェルずつ加えて30分間反応させ、洗浄液で7回洗浄した後、基質液(TMB substrate reagent set, BDバイオサイエンス社製)を100µl/ウェルずつ加え、室温で30分間インキュベートし、1Mの硫酸水溶液を50µl/ウェルずつ添加し発色反応を停止させた。各ウェルの吸光度(450nm)をプレートリーダー(ImmunoMini NJ-2300、バイオテック社製)を用いて測定した。

30

40

【0037】

吸光度(450nm)をX軸に、アレクサフルオール647標識トラスツズマブの濃度(ng/ml)をY軸にしてプロットしたグラフを作成した(図10)。その結果、吸光度とアレクサフルオール647標識トラスツズマブの濃度から相関係数が高い検量線を作成できることが確認できた。したがって、抗体クローン#55を用いたサンドイッチEL

50

I S A法により、アレクサフルオール647標識抗体の検量線を作成し、被検物質を上記と同様に処理して吸光度(450nm)を測定することで、被検物質中のアレクサフルオール647標識抗体の濃度を定量することが可能であることが明らかとなった。

【0038】

サンドイッチELISA法によりアレクサフルオール647標識抗体の濃度を定量することは、抗体医薬の開発に応用できる。例えば、正常な動物と腫瘍細胞を移植した動物に対して、アレクサフルオール647で標識した、前記腫瘍細胞を特異的に認識する抗体(以下、「アレクサ標識-腫瘍細胞認識抗体」ともいう)を投与した後、所定期間後にそれぞれの動物から血液を採取する。次に、本発明の抗体を用いたサンドイッチELISA法により、それぞれの血液中に含まれるアレクサ標識-腫瘍細胞認識抗体の濃度を定量して比較することで、動物体内の腫瘍細胞に結合するアレクサ標識-腫瘍細胞認識抗体量を測定することができる。かかる腫瘍細胞に結合するアレクサ標識-腫瘍細胞認識抗体量の測定により、抗体医薬として用いた場合の抗体の投与量、投与時期等を判断することが可能となる。

10

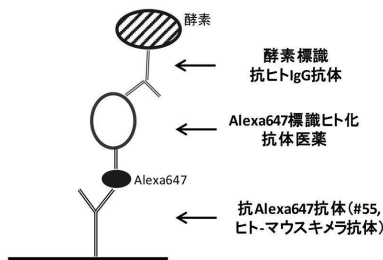
【産業上の利用可能性】

【0039】

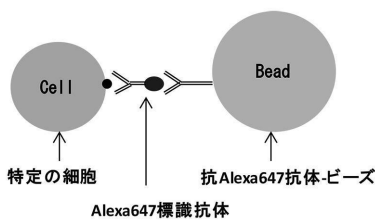
本発明は、アレクサフルオール647標識抗体に対する2次抗体として標的細胞の選別や、アレクサフルオール647標識タンパクを定量しうるELISA系の構築が可能である。特にアレクサフルオール647標識抗体のin vivoでの血中濃度のモニタリング等に対し好適に利用することができ、抗体医薬の代謝や薬物動態の解析に有用性を発揮しうると期待される。

20

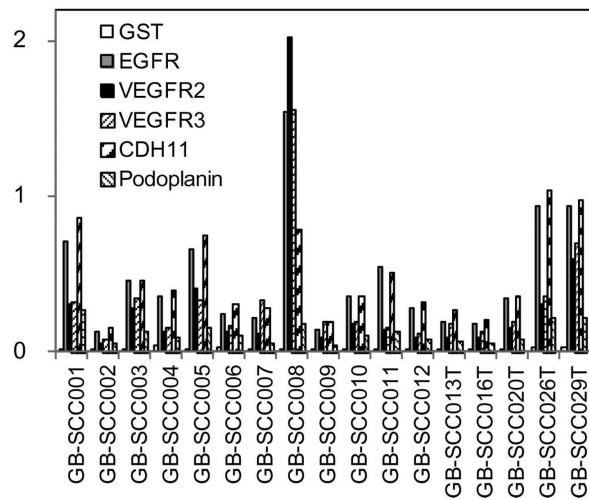
【図1】



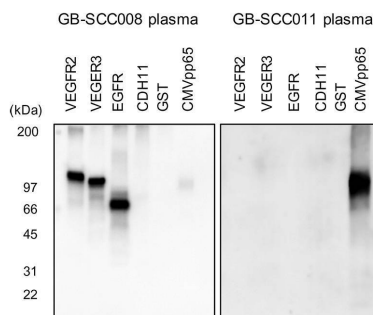
【図2】



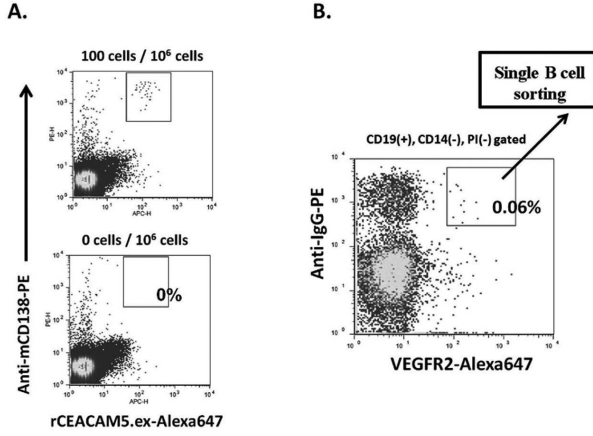
【図3】



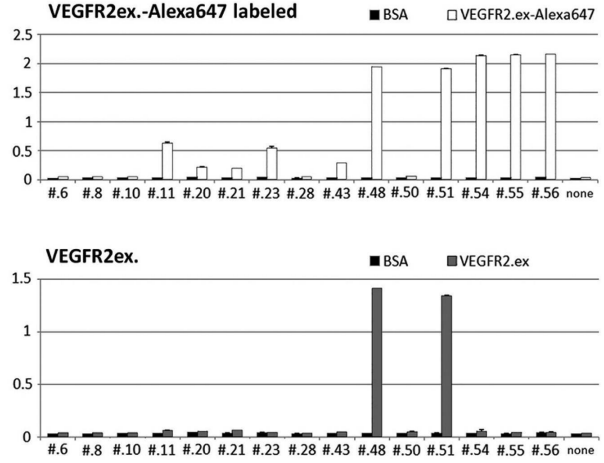
【図4】



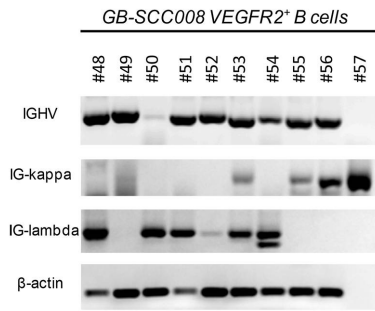
【 5 】



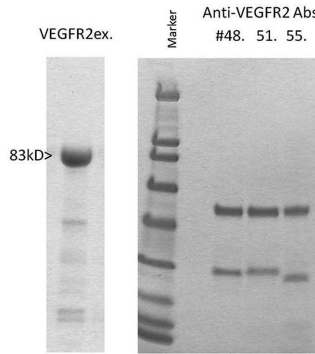
【 7 】



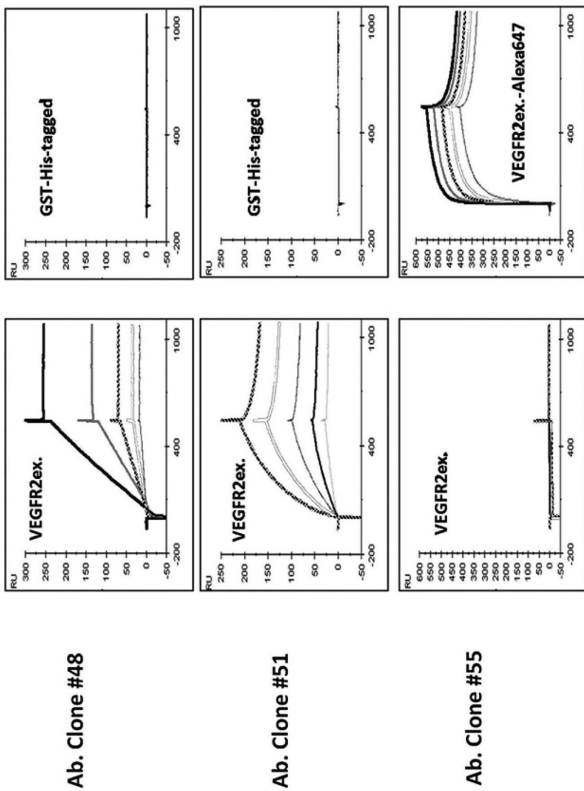
【 6 】



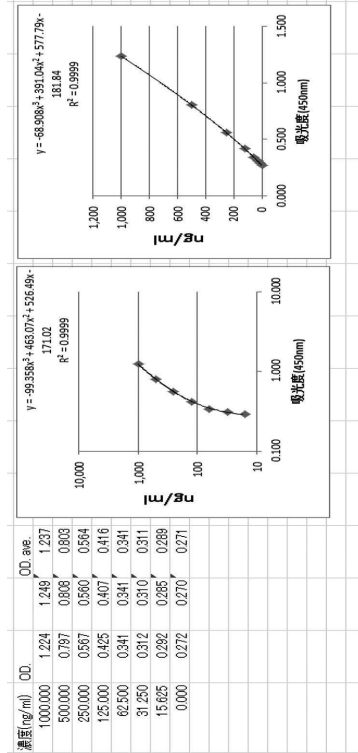
【 8 】



【 9 】



【 10 】



測定感度 15.6 ng/ml <

【配列表】

0006531262000001.app

フロントページの続き

(74)代理人 100141391

弁理士 園元 修一

(72)発明者 秋山 靖人

静岡県駿東郡長泉町東野343-16

(72)発明者 飯塚 明

静岡県駿東郡長泉町本宿566-7

審査官 田中 晴絵

(56)参考文献 特開平09-005324(JP,A)

特表2008-500820(JP,A)

特表2008-531035(JP,A)

国際公開第2009/123216(WO,A1)

George P ANDERSON et al., Improved fluoroimmunoassays using the dye Alexa Fluor 647 with the RAPTOR, a fiber optic biosensor, Journal of Immunological Methods, 2002年, Volume 271, Issues 1-2, Pages 17-24

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K

C12N 15/00-15/90

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS
(STN)

JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDreamIII)