

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-507942  
(P2014-507942A)

(43) 公表日 平成26年4月3日(2014.4.3)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 2	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 6 4
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 B O 6 5
C O 7 K 16/18 (2006.01)	C O 7 K 16/18	4 C O 8 5
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 C	4 H O 4 5

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 28 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-552126 (P2013-552126)  
 (86) (22) 出願日 平成24年1月13日 (2012.1.13)  
 (85) 翻訳文提出日 平成25年9月26日 (2013.9.26)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2012/000137  
 (87) 国際公開番号 W02012/104014  
 (87) 国際公開日 平成24年8月9日 (2012.8.9)  
 (31) 優先権主張番号 11000898.4  
 (32) 優先日 平成23年2月4日 (2011.2.4)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 509309581  
 ニューロチューン・アクチエンゲゼルシャ  
 フト  
 スイス国, ツェーハー-8952 シュリ  
 ーレン, ヴァーギシュトラーセ 27アー  
 (74) 代理人 100099623  
 弁理士 奥山 尚一  
 (74) 代理人 100096769  
 弁理士 有原 幸一  
 (74) 代理人 100107319  
 弁理士 松島 鉄男  
 (74) 代理人 100114591  
 弁理士 河村 英文  
 (74) 代理人 100125380  
 弁理士 中村 綾子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アグリンのヒトC44断片に特異的に結合することができるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞系の製造方法

(57) 【要約】

アグリンのヒトC44断片に特異的に結合することができるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞系の製造方法であって、アグリンのC44y4断片の免疫化量を野生型マウスに投与するステップと、免疫化されたマウスから抗体産生細胞を単離するステップと、それらをミエローマ細胞系と融合させるステップと、選択培地中で融合させた細胞を増殖させるステップと、アグリンのC44断片への結合に関してハイブリドーマ細胞の上清中の抗体をスクリーニングするステップと、および前記所望のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞を単離するステップとを含む、方法。

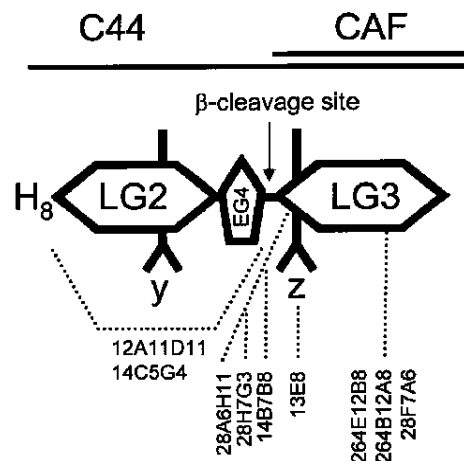


Fig. 1

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

アグリンのヒト C 4 4 断片に特異的に結合することができるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞系の製造方法であって、アグリンの C 4 4 y 4 断片の免疫化量を野生型マウスに投与するステップと、免疫化されたマウスから抗体産生細胞を単離するステップと、それらをミエローマ細胞系と融合させるステップと、選択培地中で融合させた細胞を増殖させるステップと、アグリンの C 4 4 断片への結合に関してハイブリドーマ細胞の上清中の抗体をスクリーニングするステップと、前記所望のモノクローナル抗体を産生する前記ハイブリドーマ細胞を単離するステップとを含む、方法。

## 【請求項 2】

免疫化のために用いられる前記断片が C 4 4 - y 4 である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

免疫化のために用いられる前記断片が C 4 4 K / A - y 4 である、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

免疫化のために用いられる前記断片が C 4 4 K / A - y 4 z 8 である、請求項 3 に記載の方法。

## 【請求項 5】

請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の方法により得られるハイブリドーマ細胞系。

## 【請求項 6】

D S M A C C 3 1 0 1、D S M A C C 3 1 0 2、D S M A C C 3 1 0 3、D S M A C C 3 1 0 4、D S M A C C 3 1 0 5、D S M A C C 3 1 0 6、D S M A C C 3 1 0 7 または D S M A C C 3 1 0 8 の下で寄託された請求項 5 に記載のハイブリドーマ細胞系。

## 【請求項 7】

アグリンの C 4 4 断片に特異的に結合することができる抗体の製造方法であって、請求項 5 に記載のハイブリドーマ細胞系を培養するステップと、上清からモノクローナル抗体を単離するステップとを含む、方法。

## 【請求項 8】

請求項 7 に記載の方法により得られるモノクローナル抗体。

## 【請求項 9】

アグリンの C A F 部分を認識することができる、請求項 8 に記載のモノクローナル抗体。

## 【請求項 10】

C 4 4 断片中に存在する挿入を認識することができる、請求項 8 に記載のモノクローナル抗体。

## 【請求項 11】

C A F 部分中に存在する z 8 挿入を認識することができる、請求項 10 に記載のモノクローナル抗体。

## 【請求項 12】

生物材料から C A F を除く方法であって、インビトロで前記材料を請求項 8 に記載のモノクローナル抗体で処理するステップと、場合により形成される C A F - 抗体複合体を前記生物材料から除去するステップとを含む、方法。

## 【請求項 13】

前記抗体を不溶性担体に結合させるステップと、  
血液などの体液を、結合した前記抗体に曝露するステップと、  
濃い塩溶液および / または低い pH 値に曝露することにより、前記結合した抗体を再生するステップと  
を含む、請求項 12 に記載の方法。

## 【請求項 14】

ヒトの生物材料中の神経性起源の C A F の検出のための免疫学的検出方法であって、請

10

20

30

40

50

求項 11 に記載の抗体で前記材料の試料をインビトロで処理するステップと、CAF-抗体複合体を検出するステップとを含む、方法。

【請求項 15】

アグリンまたはアグリン切断が関与する疾患の治療用薬剤の製造のための、請求項 8 に記載のモノクローナル抗体の使用。

【請求項 16】

臨床試験におけるマーカーもしくはサロゲートマーカーとして、または個別化医療におけるマーカーとしての、アグリンまたはアグリン断片の検出のための、請求項 8 に記載の抗体の使用。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アグリンの C 末端断片に対する抗体を産生するハイブリドーマ細胞系の製造方法、前記細胞系により産生される抗体、前記抗体を含有する医薬組成物、およびその使用に関する。

【背景技術】

【0002】

アグリンは、発達中の神経筋接合部 (NMJ) のシナプス後装置 (postsynaptic apparatus) の形成および維持を補助することから、シナプス形成プロセスにおいて中枢的な役割を果たす重要なタンパク質である (Bezakova および Ruegg, 2003)。例えば、アグリン欠損のマウスは呼吸不全のため誕生時に死ぬことが示され得る。これは、アグリンが筋線維の適切な神経支配にとって厳密に必要とされ、これらのマウスが適切な NMJ を構築することができないという事実により引き起こされる。

20

【0003】

アグリンは、神経組織またはニューロン組織中に存在するだけでなく、肺および腎臓などの末梢組織にも認められており、これはアグリンがこれらの器官においても役割を果たすことを示している。

【0004】

アグリンは、400 ~ 600 kDa の分子量を有する大きいヘパランプロテオグリカンである (データベースアクセッション (受託) 番号 NP\_940978)。このタンパク質のコアは約 2000 のアミノ酸からなり、その質量は約 225 kDa である。それは 9 個の K (Kunitz 型) ドメイン、2 個の LE (ラミニン - EGF 様) ドメイン、1 個の SEA (精子タンパク質、エンテロキナーゼおよびアグリン) ドメイン、4 個の EG (表皮増殖因子様) ドメインおよび 3 個の LG (ラミニン球状) ドメインから構成されるマルチドメインタンパク質である (図 1)。

30

【0005】

アグリンはいくつかのスプライス変異体で存在し、N 末端 NtA (N 末端アグリン) ドメインを含有する分泌タンパク質として発現され得る。N 末端 NtA は、アグリンの最も豊富な形態であり、運動ニューロン中で発現される主要な形態である。それはニューロンの細胞体中で産生され、軸索に沿って輸送され、運動神経の軸索末端から NMJ のシナプス間隙中に放出される。ここで、それは LRP4 (低密度リポタンパク質受容体関連のタンパク質 4) のアゴニストとして作用し、基底膜の成分にもなり得る。CNS (中枢神経系) においては、多くのアグリンは、N 末端 NtA ドメインを欠く、N 末端での選択的スプライシングによって II 型膜貫通タンパク質として発現される (Bezakova および Ruegg, 2003)。

40

【0006】

ヒトアグリンの C 末端部分には、2 つの選択的スプライス部位 y および z がある。y 部位には、0、4、17 または 21 (4 + 17) 個のアミノ酸の挿入があり得、z 部位には

50

、0、8、11または19(8+11)個のアミノ酸の挿入があり得る。y部位中の4個の挿入されたアミノ酸の機能は、ヘパリン結合部位を作ることである。運動ニューロンは、主にy4アグリンを発現する。NMJ成熟に関するアグリンの最も重要なスプライス部位はz部位であり、アセチルコリン受容体のクラスタリング剤として活性となる能力をアグリンに与える。スプライス部位yに4個のアミノ酸の挿入の存在下で、z部位に8個のアミノ酸の挿入を含有している、完全長のアグリン(y4z8)が、培養筋管クラスタリングアッセイ(分析)において35pMの最大半量のAChRクラスタリング活性を有するアグリン変異体を生成することは周知である。11個のアミノ酸の挿入は5nMの最大半量のAChRクラスタリング活性を生じるが、19個のアミノ酸の挿入は110pMの最大半量のAChRクラスタリング活性をもたらす。この部位での挿入を含まないアグリンは、インビトロでの培養筋管上でアセチルコリン受容体をクラスタ化する活性がない(BezakovaおよびRuegg、2003)。このように、クラスタリングアッセイにおけるアグリンの最も活性の高い形態はy4z8変異体であり、運動ニューロンにより発現される。

10

## 【0007】

LG2、EGF4およびLG3ドメインを含有するアグリン(y4z8)の約45kDaのC末端断片は、AChRクラスタリングにおいて活性であり、AChRクラスタリング活性において130pMのEC50を有するが、より短い断片はより低い活性しか有さないことがわかっている。z8挿入を有するC末端LG3ドメインは、45kDaの断片よりも100倍低い係数である、わずかに13nMの最大半量のAChRクラスタリング活性を示す(BezakovaおよびRuegg、2003)。

20

## 【0008】

国際公開第97/21811号において、筋肉に作用する疾患の治療方法においてアグリンまたはアグリン断片を使用することが提唱されている。しかしながら、そのような試みは、現在まで成功が示されていない。

## 【0009】

本出願人の調査により、アグリン断片のインビボでの活性がLG2およびLG3ドメインの両方が一緒に存在することに主に依存することを確認した。国際公開第97/21811号においては、LG3のみに関するAChRクラスタリングのインビトロでの活性を示したが、LG3のインビボでの活性は示し得なかった。LRP4のみの活性化では、インビボでの活性を完全に達成するには不十分であると考えられる。

30

## 【0010】

アグリンは、アグリンの活性を制御するのに重要な役割を果たすニューロトリプシンと呼ばれる酵素により切断される。現在、アグリンはニューロトリプシンの唯一の既知の標的である。ニューロトリプシン(Stephan Aら、The FASEB Journal、2008;22:1861~1873頁)は、部位および部位と呼ばれる2つの異なる部位でアグリンを切断する(図1)。部位は、SEADドメインからN末端側に位置し、部位はアグリンのLG3ドメインの前に位置する。部位での切断は、4~12%のピストリスSDSゲル中で約130kDaに泳動する約110kDaのC末端アグリン断片を生成する。部位での切断は、前記ゲル中で約22kDaに泳動するC末端LG3ドメインを遊離する(Molinari、Rioら、2002;Reif、Salesら、2007)。部位での切断は、LG3ドメインからのLG2ドメインの分離を誘導する。

40

## 【0011】

ニューロトリプシン(NT)を過剰に発現させるマウス、いわゆるサルコペニアマウス(muslik、M491S)(Stephan、Mateosら、2008)は、サルコペニアの早期発現、加齢に伴う骨格筋の質量および強度の変性喪失を示すことがわかった。

## 【0012】

全てのC末端断片は、マウスの脳抽出物および脊髄抽出物中で検出され得た(Step

50

han、Mateosら、2008)。ニューロトリプシンノックアウトマウスにおいては、いずれの断片も検出され得なかった。結果として、ニューロトリプシンは、2つの切断部位で有意な量のアグリンを切断する唯一のプロテアーゼであると考えられる。ニューロトリプシンによるアグリンの切断は、原則として5つの異なるアグリン断片を生成し、そのうちの3つは血液中で検出することができる。これらの3つのアグリン断片は、CAF、C90およびC110である。これらの断片は、yおよびz位置での特異的挿入の存在にも応じて異なる機能を有し得る。本特許で用いられる様々な天然および人工のアグリン断片を含む一覧を以下の表1に記載する。

【表1】

省略形	説明
CAF	$\beta$ 切断部位でのアグリンのニューロトリプシン切断により生成される天然の22kdのC末端アグリン断片。22kdは、PAGEゲル上の見かけの泳動位置に対応する。Z位置での挿入は固定されていない。それぞれ、挿入なし(CAF-z0)でもよいし、または8個(CAF-z8)、11個(CAF-z11)もしくは19個(CAF-z19)のアミノ酸の挿入があってもよい。種は決まっておらず、例えば、ヒト由来(ヒトCAF)、ラット由来(ラットCAF)、マウス由来(マウスCAF)、ニワトリなどに由来するものであってよい。例えば、ヒトCAF-z8は、Z位置に8個のアミノ酸の挿入を有するアグリンのニューロトリプシン切断により生成される22kdのC末端ヒト由来アグリン断片である。
C44	LG2、EGF4およびLG3ドメインを含む人工の44kdのC末端アグリン断片。Y位置での挿入は、0、4、17または21個のアミノ酸であってよい。Z位置での挿入は、挿入なし、8、11または19個のアミノ酸配列であってよい。種は決まっておらず、例えば、ヒト、ラット、マウス、ニワトリなどに由来するものであってよい。例えば、ヒトC44-y4z8は、Y位置に4個のアミノ酸の挿入およびZ位置に8個のアミノ酸の挿入を有する、LG2、EGF4およびLG3ドメインを含むヒト由来の44kdのC末端アグリン断片である。
C44K/A	LG2、EGF4およびLG3ドメインを含む人工の44kdのC末端アグリン断片。ニューロトリプシンの $\beta$ 切断部位は、切断部位中のリシン(K)をアラニン(A)により置換することによって欠失されている。Y位置での挿入は、0、4、17または21個のアミノ酸であってよい。Z位置での挿入は、挿入なし、8、11または19個のアミノ酸配列であってよい。種は決まっておらず、例えば、ヒト、ラット、マウス、ニワトリなどに由来するものであってよい。例えば、ヒトC44K/A-y4z8は、Y位置に4個のアミノ酸の挿入およびZ位置に8個のアミノ酸の挿入を有する、LG2、EGF4およびLG3ドメインを含むヒト由来の44kdのC末端アグリン断片である。
C90	$\alpha$ および $\beta$ 部位でのアグリンのニューロトリプシン切断により生成される天然の90kdのアグリン断片。C90アグリン断片は、 $\alpha$ 切断部位と $\beta$ 切断部位との間に位置する。90kdのサイズは、PAGEゲル上での見かけの泳動位置に対応する。それはy位置に挿入を有してもよい。種は決まっておらず、例えば、ヒト、ラット、マウス、ニワトリなどに由来するものであってよい。例えば、ヒトC90-y4は、Y位置に4個のアミノ酸の挿入を有するヒト由来の90kdのアグリン断片である。z領域はこの断片上には存在しない。
C110	$\alpha$ 部位でのアグリンのニューロトリプシン切断により生成される天然のC末端の110kdのアグリン断片。110kdのサイズは、PAGEゲル上での見かけの泳動位置に対応する。y位置に挿入を有してもよい。種は決まっておらず、例えば、ヒト、ラット、マウス、ニワトリなどに由来するものであってよい。例えば、ヒトC110-y4z8は、Y位置に4個のアミノ酸の挿入およびZ位置に8個のアミノ酸の挿入を有する、ヒト由来C末端の110kdのアグリン断片である。

表1

様々なアグリン断片の説明

【0013】

合計で24の、天然のニューロトリプシン由来のC末端アグリン断片が存在し得る。こ

10

20

30

40

50

これらの断片は、様々な器官、組織中で異なる機能を有し得る。正確な診断のためには、これらの様々なアグリン断片間を識別することが非常に重要であることは明らかである。

【0014】

本出願と同一の出願人による欧州特許第1990420号において、ニューロトリプシンのインビボでの活性に関するバイオマーカーとしての、ならびにニューロトリプシンに関連したかく乱の診断およびモニタリングでの、アグリンのC末端の22kDaのアグリン断片(CAF)の使用が記載されている。本出願人は、部位でのアグリンの切断後に遊離されて血清などの体液中で測定することができる、この断片の存在および量の上昇が、例えばサルコペニアなどの特定のかく乱と関連することを見出した。

【0015】

上昇したCAFレベルの存在はまた、腎臓および肺の機能障害に罹患しているか、または自閉症もしくは精神遅滞などの脳の疾患に罹患している患者においても示され得る。軽度の認知機能障害、初期の認知症またはアルツハイマー病に罹患している患者は、脳脊髄液(CSF)中のCAFレベルが上昇し得る。

【0016】

あるいは、神経因性疼痛に罹患している患者においては、正常である健康な人と比較して、CAFレベルは低下し得る。末梢神経損傷は、接触性アロディニアを示すラットの同側の脊髄後角中でのアグリン発現を減少させることがわかった。アグリンは、GABAニューロン中でのNR1リン酸化反応を通じて神経因性疼痛を調節する。NR1はNMDA受容体の一部であり、NMDA受容体は2個のNR1および2個のNR2サブユニットの間でヘテロ四量体を形成する。NMDA受容体であるグルタミン酸受容体は、NMDAR機能の調節が存在する疾患、例えば、虚血、発作、パーキンソン病、ハンチントン病、疼痛、糖尿病(末梢NMDARが関与する)、多発性硬化症、統合失調症、自閉症、アルツハイマー病および他の認知症または認知機能障害における主要因子であり、シナプス可塑性および記憶機能を制御するための分子デバイスである。

【0017】

アグリンの減少、およびその後のCAFレベルの減少はまた、神経因性疼痛だけでなく、てんかん、振戦、および痙性の検出のための新しい手法を開くことができる(CuiおよびBazan、2010)。

【0018】

報告された通り、CAFは、それぞれ観察される機能障害または疾患における共通の誘発因子となり得るNaK-ATPaseの3サブユニットを阻害する。

【0019】

まとめると、アグリンは、発達中の神経筋接合部でのアセチルコリン受容体(AChR)の蓄積を媒介するが、中枢神経系(CNS)シナプスの調節因子としても関与してきた(Matsumoto-Miyai、Sokolowskaら、2009)。天然のニューロトリプシン切断産物であるアグリンのC22構築物が、良好にフォールディングされた安定したドメインを構成することは示されている。さらに、アグリンのC末端領域は、CNSニューロン中でナトリウム-カリウムATPase(NKA)の3サブユニットに結合することが示されており、これは3NKAがニューロンのアグリン受容体であることを示している。

【0020】

上記のことから、特にCAFだけでなく、様々な組織中で検出することが可能な、様々な病的状態および非病的状態と関連させることができる、アグリンの他のC末端断片も、患者の治療において用いることができる重要なマーカーであるだけでなく、重要な標的でもあると考えられる。

【0021】

しかしながら、標的として例えばCAFを用いる有望な医学的適用は、ヒトCAF(特異的ニューロトリプシン切断により誘導される)と他のヒトアグリン断片との間の識別を可能にし、

10

20

30

40

50

高い特異性および親和性でヒトCAFに結合することができ、ニューロトリプシンによるアグリンの切断が起こる組織に対してヒトCAFを識別する抗体を必要とする。

【0022】

様々なアグリン断片に対する抗体は利用可能であるが、それらはヒト由来のCAFを検出せず、または不十分にしか機能しない。ヒトCAFを検出することができるモノクローナル抗体は、現在のところ利用可能ではない。

【0023】

2010年11月17日にVrijbloedらによって提示されたポスター「Aggrin serum level as a marker of sarcopenia」において、また、上記で引用した欧州特許第1990420号においても、出願人によって実験室において、22kDaの断片(CAF)の検出のために、アグリンの90kDaおよび22kDaの断片に対して作製した、特異的なアフィニティー精製されたポリクローナル抗体の使用が記載されている。これらのポリクローナル抗体G92(ヤギ)およびR139(ウサギ)(Stephanら、参照)は、ヤギおよびウサギから誘導されたものであり、特殊な最適化された実験室条件下では非ヒトアグリン断片を認識したが、モノクローナル抗体は、はるかにより良い特異性および再現可能な特性を有し、診断適用にとってはポリクローナル抗体よりも明らかに優れている。例えば、ポリクローナル抗体は大規模で、および一貫した品質で製造することができない。そのため、それらが標準的な適用において機能することが疑われ、それらは上記要件を明確に満たさなかった。

10

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0024】

本発明の課題は、ヒトCAFおよびアグリン断片を含むヒトCAFに対する改良された抗体を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0025】

本出願人は、そのような改良された抗体を、アグリンの特殊なC44断片、すなわち、断片C44y<sub>4</sub>が免疫化のために用いられる、請求項1に記載の方法によって製造された、ハイブリドーマ細胞系から取得することができることを見出した。

30

【0026】

C44断片という用語は、ロイシン1637からプロリン2045にまで及ぶヒトアグリンのC末端部分の全ての異なる変異体を包含し、前記プロリンの正確な位置は、yおよび/またはz位置における挿入の長さおよび存在に依存する。

【0027】

C44y<sub>4</sub>断片という用語は、少なくとも4個のアミノ酸のy挿入を有するC44断片の全ての異なる変異体を包含する。原則として、天然のC44y<sub>4</sub>、17、21挿入を用いることができる。しかしながら、異なる挿入を有する合成断片も想定される。本出願で用いられる場合、接尾語K/Aは、課題のアグリン断片がニューロトリプシン耐性であることを意味する。

40

【0028】

驚くべきことに、少なくとも4個のアミノ酸のy挿入を有するC44断片が、この挿入を欠く他のC44断片と比較してより高い免疫作用を示すことがわかった。本出願人の観察によれば、y挿入を有する断片は凝集体を形成する傾向があり、これはこの挿入を欠く他のC44断片には当てはまらず、おそらく、改善された免疫作用の理由である。

【0029】

免疫化にとって特に好ましいC44y<sub>4</sub>断片は、後に詳述する断片C44K/A-y<sub>4</sub>z<sub>8</sub>である。この断片を用いることによる免疫化は、非常に特異的で有効な抗体を産生するハイブリドーマ細胞系を誘導することがわかった。

【図面の簡単な説明】

50

【0030】

【図1】C44K/A-y4z8断片の模式図である。

【図2】C44K/A-y4z8断片の配列を示す図である。抗体の結合部位を太字の斜体で表し、エピトープ配列が位置する配列の部分を必要に応じて数回記載する(それぞれの抗体につき1回)。

【図3】マウス血清における様々なアグリン変異体の免疫原性を示すELISA試験の結果を示す図である。

【図4】エピトープマッピング後に試験されたそれぞれの抗体について得られたpepspot膜および対応するスキームを示す図である。

【図5】ラット血清中で急増したCAFを検出する異なる抗体の能力を示すウェスタンブロットの図である。

【図6】抗体13E8によるCAF-z8およびCAF-z0の染色を示すウェスタンブロットの図である。

【図7】CAF-z8およびCAF-z0への抗体28H7G3および13E8の異なる結合を示すドットプロットの図である。

【図8】抗体14C5G4および12A11D11のELISA試験の結果を示す図である。

【図9】CAF-z0およびCAF-z8への抗体2D7D9および28H7G3の結合を示すウェスタンブロットの図である。

【図10】z8特異的抗体のELISA試験の結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0031】

本発明による方法において好ましく用いられるアグリンのC44K/A-y4z8断片を、図1に概略的に図示する。これは実施例1に記載のように取得することができる。

【0032】

この配列(配列番号1)を図2に示し、本発明に従って得られる抗体の結合部位を太字の斜体で表す。

【0033】

C44K/A-y4z8断片は、ヒトアグリン(Uniprot O00468-1、但しプロリン1751とパリン1752の間にy4挿入のKSRK(配列番号2)およびセリン1884とグルタミン酸1885の間にz挿入のELANEIPV(配列番号3)を有する)のロイシン1637からプロリン2045にまで及び、LGドメインLG2およびLG3を含む。ニューロトリプシンの切断部位は、アラニン(A:図1で太字で示される)によって切断部位中のリシン(K)を置換することにより欠失されている。しかしながら、本発明は、この特殊なC44断片に限定されることなく、C44y断片の全ての異なる変異体を包含する。また、配列VLSASHPLTVSGASTPR(配列番号4)を有するy17挿入を含む天然のC44y17断片、または配列KSRKVLSSASHPLTVSGASTPR(配列番号5)を有するy21挿入を含むC44y21断片を用いることも想定される。同じことがz挿入にも適用可能である。z-8挿入を含む好ましく用いられるC44断片とは別に、z挿入を有さない、配列PETLDSGALHSPETLDSGALHS(配列番号6)のz11挿入または配列ELANEIPVPETLDSGALHS(配列番号7)のz19挿入を有する、C44断片を用いることもできる。

【0034】

本出願人は、本発明による方法を用いることにより、28H7G3、264E12B8、28A6H11、14C5G4、12A11D11、28F7A6、14B7B8、264B12A8および13E8と命名されたモノクローナル抗体を産生するいくつかの異なるハイブリドーマ細胞系を含有する抗体プラットフォームを調製した。この方法は、実施例2および実施例3で詳細に考察される。

【0035】

10

20

30

40

50

抗体 13E8 (以下に記載される)を産生するハイブリドーマ細胞系とは別に、全てのハイブリドーマ細胞系が2011年1月1日にブダペスト条約の下で本出願人によって DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH、Inhoffenstrasse 7B、38124 Braunschweig GERMANYに寄託されている。この細胞系は、以下の受託番号を与えられている。

28H7G3 = DSMACC3101 ; 264E12B8 = DSMACC3102

28A6H11 = DSMACC3103 ; 14C5G4 = DSMACC3104

12A11D11 = DSMACC3105 ; 28F7A6 = DSMACC3106

14B7B8 = DSMACC3107 ; 264B12A8 = DSMACC3108

10

#### 【0036】

図1において、記載されたアグリンのC44K/A-y4z8断片上の抗体の結合部位を概略的に図示する。抗体のエピトープ配列は、ペプチドマッピング(実施例5)により決定されたものであり、以下の通りである。

抗体 28H7G3 (配列番号8)、配列:TFVEY

抗体 14B7B8 (配列番号9)、配列:FVEYL

抗体 28A6H11 (配列番号10)、配列:TFVE

抗体 264E12B8 (配列番号11)、配列:WLGGLPELP

抗体 264B12A8、配列:LPE

抗体 28F7A6 (配列番号12)、配列:LPELP

20

#### 【0037】

上記のエピトープは、今までのところ記載されていないものである。また、このエピトープに関する知識が、好ましい適用を誘導し得ることも想定される。例えば、療法または予防的適用において用いることができる1または複数のエピトープ配列を含む合成ペプチドを作製することが想定される。さらに、本発明は、上記の特定の抗体に限定されることはなく、課題のエピトープに結合する他の抗体も包含する。

#### 【0038】

また、抗体14C5G4および12A11D11ならびに上記の抗体13E8は、本発明による方法を用いて得られたものである。これらの抗体について、エピトープ配列は決定されなかった。

30

#### 【0039】

しかしながら、抗体13E8はCAF-z-8断片に特異的に結合することが示され得た(実施例7)。これはそのエピトープ配列がELANEIPV(配列番号3)またはその一部にちがいないことを示している。当業者にとって、本発明の方法を用いることにより、y4、y17もしくはy21またはz11もしくはz19挿入などのC44断片中におそらく存在する他の挿入に特異的に結合する、本出願には記載されていないさらなる抗体を得ることもできることが明らかである。

#### 【0040】

抗体14C5G4および12A11D11は、C44の非CAF-N末端部分に結合することが示された(実施例8)。

40

#### 【0041】

図1は、上記抗体の異なる結合部位をまとめたものである。図1に見られる通り、抗体28H7G3、14B7B8、28A6H11、264E12B8、264B12A8、28F7A6および13E8は、CAF部分に位置する部位に結合し、抗体13E8はCAF断片中におそらく存在するz8挿入に特異的に結合する。抗体14C5G4および12A11D11は、C44の他のN末端部分に位置する部位に結合する。

#### 【0042】

結果として、本発明により得られる抗体を用いることにより、CAF断片を他の断片から識別することができ、さらに後に考察するように、検出されたCAF断片の起源を決定することもできる。

50

## 【0043】

例えば、試験システムにおいて抗体 28H7G3 および抗体 14C5G4 を用いることにより、試料中で検出されたアグリン断片がCAF断片であるか、またはCAF部分を含むより大きい断片、例えば、その切断部位でのアグリンの切断により生成される110kDaの断片であるかどうかを決定することができる。両方の抗体が前記断片に結合する場合、これはCAF断片を含むより大きいアグリン断片を示唆する。一方の抗体だけが結合する場合、これはCAF(28H7G3)またはCAFを欠くアグリン断片(14C5G4)のいずれかを示唆する。

## 【0044】

興味深いことに、14B7B8はCAFのみを認識し、より長いC末端アグリン断片、例えばヒトC44またはヒトC110を認識しないが、28H7G3はヒトCAF、C44およびC110に対する全てのCAF含有変異体を検出する。両抗体は同じエピトープに結合すると考えられるが、それらの抗体は明確に異なる結合特性を有する。つまり、14B7B8の使用により、他のアグリン断片と干渉せずにヒトCAFを特異的に検出することができるが、28H7G3は全てのCAF含有断片を同時に検出することができる。

10

## 【0045】

本発明に従って得られた記載の抗体の特定の組合せの使用により、濃度および同一性に関して様々なC末端アグリン断片を識別するELISAシステムの確立が可能になる。

## 【0046】

上述の抗体13E8に関して、この抗体はCAF断片中におそらく存在するz8挿入に特異的に結合する。このz8挿入は神経組織を起源とするCAF断片中にのみ存在するので、この抗体の使用により検出された断片が神経組織または他の組織中で遊離されたかどうかの決定が可能になる。

20

## 【0047】

本発明の方法により得られる抗体は、診断だけでなく、CAFに関連するかく乱の治療においてもいくつかの異なる適用を可能にすることが明らかである。

## 【0048】

上述の通り、CAF断片はNa、K、-ATPaseの3ユニットを阻害するため、毒性タンパク質断片となり得る。これは、細胞内または細胞外に毒性ナトリウム、カリウムまたはカルシウム濃度をもたらす得る。従って、本発明の方法に従って生成された抗体の1つの重要な適用としては、人工腎臓において腎臓病に罹患している患者の血液を浄化するためのそれらの使用があり得る。この浄化は、抗体をセファロース(架橋デキストラン)などの不溶性担体材料または他の生体適合性材料に結合させ、低密度リポタンパク質(LDL)などの他のタンパク質の除去について記載されたもの(Borberg、Gaczowskiら、1990)と同様のアフレーション処置(procedure、方法)において、患者の血液を前記抗体に曝露することによって達成することができる。好ましくは、血液は抗凝固化され、抗体との接触の前に細胞が除去される。結合した抗体を、濃い塩溶液および/または低いpH値への曝露により再生することができる。

30

## 【0049】

また、患者における、静脈内または皮内注射または点滴によるCAFの直接的中和のために、本発明の方法に従って得ることができる1または複数の抗体を用いて薬剤を製造することも想定される。

40

## 【0050】

本発明の1つの主な態様は、医薬製剤における抗体の使用またはそのような製剤の製造におけるこれらの抗体の使用に関して想定されるいくつかのさらなる適用である。これは、抗体の形成によるアレルギー反応またはその中和を防止するための抗体のヒト化処置を含んでもよい。

## 【0051】

そのような製剤は、血液中の上昇したCAFレベルに対するものであったり、例えば、サルコペニア、腎臓病、肺疾患、およびアルツハイマー病、パーキンソン病などの精神遅

50

滞を特徴とする疾患において用いることができるものであったりする。

【0052】

また、臨床試験におけるマーカーもしくはサロゲートマーカーとして、または個別化医療におけるマーカーとして、アグリンまたはアグリン断片の検出のための抗体を使用することも想定される。CAF含有薬剤を用いる臨床試験においては、mABを用いて、体内、例えば、血液または尿中の薬剤の量を検出することができる。

【0053】

1つのそのような薬剤は、例えば、アグリンのニューロトリプシン耐性C44断片（特許出願EP09011367.1に記載されている）である。臨床試験中の患者またはこのニューロトリプシン耐性アグリン断片を摂取する任意の他の患者における、この断片の濃度の決定のためにmABを用いることができる。

10

【0054】

以下の実施例は、本発明を例示するものであるが、それを限定するものではない。これらの実施例を読む当業者であれば、他の関連する状態を適用することができ、これらのものも本発明の範囲内にある。

【0055】

（実施例1）

[C44K/A-y4z8のクローニング、発現および精製]

[a) アグリンのニューロトリプシン耐性ヒト 44kd C末端断片のクローニング]

20

最初に、N末端NtAドメインを欠く完全長のヒトアグリンy0z0（ヒトアグリンy0z0 deltaNTAは、受託番号NP\_\_940978のタンパク質配列中で位置K156から始まる）を、好適な限定部位およびプライマーを介して、ヒトカルシトニン（calsyntenin）-1の分泌シグナルのコード配列を含有するpEAK8ベクター（Reif、Salesら、2007）中に、PCRによりクローニングした。ヒトアグリンのための鑄型として、ベクターpCMV-XL5-アグリン（Origene USAから購入）を用いた。

【0056】

その後の2つのステップにおいて、y4z8挿入にとって必要な対応するコドン、標準的な技術の部位特異的突然変異誘発により導入し、完全長のヒトアグリンy4z8 deltaNTAを含有するpEAK8ベクターを得た。

30

【0057】

このベクターを鑄型として用いて、ヒトアグリンの44kd C末端断片をコードする遺伝子を増幅し、変換（転移）されるタンパク質のN末端にHis8タグおよびPrescissionプロテアーゼ切断部位のコード領域を導入した。

【0058】

ニューロトリプシン耐性型のヒトアグリンC44K/Aを、アグリンの切断部位-中のリシンのコドンの位置にアラニンのコドンを導入するプライマーを用いたクイックチェンジ突然変異誘発ステップにおいて作製した。

【0059】

このプラスミドは、トランスフェクト細胞の培養上清中で配列番号1の配列と共に、His8タグおよびPrescission切断部位を含有するさらなるN末端アミノ酸配列「ARVNH H H H H H H H L E V L F Q G P」（配列番号13）を含む、タンパク質（シグナル配列を含まない）を生成する。

40

【0060】

[b) ヒトアグリンC44およびニューロトリプシン耐性C44K/Aの発現および精製]

1×10<sup>6</sup>細胞/mlの密度までExcell293培地中で増殖させた500mlのHEK293細胞を、100×gで、30分間、Sorvall RC5C遠心分離機中で遠心分離してペレット化した。細胞を、37℃に予め温めた500mlのRPMI16

50

40培地中に再懸濁した。ニューロトリプシン耐性ヒトアグリンC44 y4z8の発現に起因する挿入を含有する1.25mgのpEAK8を、25mlの150mMのNaCl中に希釈した。3.75mgのポリエチレンイミン(PEI)、25kDaを、25mlの150mMのNaCl中に希釈した。両溶液をプールし、室温で10分間インキュベートした。その後、この溶液を細胞懸濁液に添加し、これを1000mlのスピナーフラスコに移した。細胞懸濁液を、加湿雰囲気中の5%のCO<sub>2</sub>および37のインキュベータ中に置かれた攪拌プラットフォーム上で、75rpmで7日間インキュベートした。

#### 【0061】

7日後、Sorvall RC5C遠心分離機による5000rpmでの遠心分離により、培養上清を分取した。0.22μmのMillipore滅菌濾過装置を通す濾過により、残留する粒子を除去した。濾過した培養上清を、Pellicon PLCGC 10kDa カットオフ接線流カートリッジを用いて10倍に濃縮し、20mMのMOPS、pH8.5、400mMのNaClに対して少なくとも1:1000で透析した。透析液を、Ni<sup>2+</sup>で標識化した10mlのベンチトップHis Selectカラムを用いたHis8タグを活用する固定化金属アフィニティクロマトグラフィー(IMAC)にかけた。濃縮および透析された細胞培養上清をロードした後、カラムを100mlの透析バッファー(緩衝材)で洗浄し、結合したタンパク質を、500mMのイミダゾールを含有する10mlの透析バッファーで5回溶出させた。精製を達成した後、SDS-PAGEを行った。陽性画分をプールし、Sigma 4K15遠心分離機中、3000×gでAMICON 30kDa カットオフ濾過装置を用いて10倍に濃縮し、20mMのMOPS、pH8.5、200mMのNaClに対して1:10000で透析した。0.725cm<sup>2</sup>/mgの吸光係数を用いるUV分光法により、精製したC44K/Aの濃度を決定した。

#### 【0062】

[c) Prescissionプロテアーゼ切断によるHis8タグの除去]

His8タグを除去すべき場合、0.5mlのタンパク質溶液のバッファーを、そのバッファーで予め平衡化させたNAP-5カラムを用いて、50mMのTris-HCl、pH7.2、150mMのNaCl、1mMのDTT、1mMのNa<sub>2</sub>EDTAに交換した。タンパク質溶液を1mlの同じバッファー中に溶出させた。1μlの1MのDTTをタンパク質溶液に添加し、チューブを数回軽くはじくことにより混合した。20μlのPrescissionプロテアーゼ(1U/μl)を添加し、チューブを数回軽くはじくことによりそれを混合した。反応を4で一晩行った。0.5mlの重力流グルタチオンセファロースカラムを、1mMのDTTを添加した5mlのPBSで平衡化させた。消化されたタンパク質溶液をロードし、流出液を回収した。カラムを、1mMのDTTを添加した1mlのPBSで3回洗浄し、流出液を前の流出液画分と同じチューブ中に回収した。回収した流出液画分を、5lの20mMのMOPS、pH8.5、400mMのNaClに対して2時間、2回透析して、DTTおよびEDTAを除去した。

#### 【0063】

切断されたHis8タグを除去するために、2回目のIMACを実施した。Ni<sup>2+</sup>イオンで予め標識化された1mlのキレート化セファロースFFカラムを、5mlの20mMのMOPS、pH8.5、400mMのNaClで平衡化させた。透析したタンパク質溶液をカラム上に適用し、流出液を回収した。カラムを1mlの20mMのMOPS、pH8.5、400mMのNaClで3回洗浄し、流出液を同じチューブ中に回収した。プールした画分を、AMICON 30kDa カットオフ濃縮装置を用いて0.5mlに濃縮し、20mMのMOPS、pH8.5、200mMのNaClで予め平衡化させたNAP-5カラムを用いてバッファーを交換した。0.761cm<sup>2</sup>/mgの吸光係数を用いるUV分光法により、濃度を決定した。タンパク質を、さらなる実験のために新たに用いるか、または使用まで-80で保存した。対応するタンパク質のタンパク質配列は、Prescission切断の結果として、さらなるN末端アミノ酸配列「GP」を含む、配列番号1の一部に対応する。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 6 4 】

(実施例 2)

[ C 4 4 K / A - y 4 z 8 を用いたマウスの免疫化 ]

3匹の6~8週齢のメスのB a l b / cマウスを、完全フロイントアジュバント中の90~150マイクログラムのC 4 4 K / Aで免疫化した。28日後、C 4 4 K / Aを不完全フロイントアジュバント中で投与した。このステップを56日後に繰り返した。87日後、C 4 4 K / AをP B S中で投与し、これを90日目に繰り返した。1日後、膝のリンパ節に由来する細胞を調製し、得られたB細胞を、P E G 4 0 0 0の存在下でP 3 - X 6 3 - A g 8のマウスのミエローマ細胞と融合させた。

## 【 0 0 6 5 】

細胞融合の完了後、細胞を24ウェルプレート上に塗布したところ、5~10個のクローンからなる360個のオリゴクローンが得られた。融合細胞(ハイブリドーマ)のみを選択する選択用O p t i m e m培地(G I B C O)中で10日間、細胞を培養した。

## 【 0 0 6 6 】

陽性検査として、E L I S Aにより上清をスクリーニングした。2倍の限界希釈により、単一のクローンが生成された。クローンの陽性を、C 4 4 K / Aを用いるE L I S Aにより検査した。

## 【 0 0 6 7 】

(実施例 3)

[ モノクローナル抗体の発現および精製 ]

ハイブリドーマ細胞を無血清I S F - 1培地(B I O C H R O M E A G)に適應させ、5~7日間増殖させた。約100mlの馴化(条件)培地を、プロテインGセファロースクロマトグラフィーにかけた。

## 【 0 0 6 8 】

簡単に述べると、馴化された上清を、1.5ml/minの流速で1mlのプロテインGまたはプロテインAセファロースカラム(G E - H E A L T H C A R E)上にロードした。30倍のカラム容量(C V)のP B S / 0.5Mのグリシン、p H 7.4で洗浄した後、結合した抗体を100mMのクエン酸バッファー、p H 2.6で溶出させた。陽性画分をプールし、好適な量の2MのT r i sにより中和した。

## 【 0 0 6 9 】

精製した抗体を、P B Sに対して透析し、それをさらに使用するまで4 で保存した。

## 【 0 0 7 0 】

(実施例 4)

[ C A F - z 8 および C 4 4 K / A - y 4 z 8 を用いる免疫化ならびにこれらの免疫原を用いて得られた抗体の比較 ]

それぞれの抗原、C 4 4 K / A - y 4 z 8 または C A F - z 8 について、3匹のマウスを用いた。5mg/kgの対応するアグリン変異体を、1日1回、24日間にわたって皮下注射した。この後、マウスを犠牲にし、標準的な血清チューブを用いて血清を調製した。

## 【 0 0 7 1 】

[ E L I S A プレートの被覆 ]

N u n c M a x i S o r p I m m u n o プレート96ウェル(平底、ポリスチレン)を、100ng/ウェルのC A F - z 8で被覆した。被覆は、1x C a n d o r 社製の被覆バッファー(C o a t i n g B u f f e r)、p H 9.6の存在下、4 で一晩(すなわち、15h)行った。

## 【 0 0 7 2 】

被覆バッファーの吸引後、プレートを400μlのN a - P B S - C A S、p H 7.2(追加の0.2molのN a C l(「N a」)および0.05%のカゼイン(「C A S」)を添加したP B S)で7回洗浄した。洗浄は、B i o T e k E L x 4 0 5 プレート洗浄装置(W i t e c A G)を用いて行った。ウェルあたり180μlのC a n d o r 社

10

20

30

40

50

製のブロッキング溶液 (Blocking Solution) を添加することにより、洗淨されたプレートのウェルをブロッキングした。次いで、プレートを室温で3hインキュベートした。ブロッキング溶液を除去した後、プレートを400 $\mu$ lのNa-PBS-CAS、pH7.2で7回洗淨した。続いて、プレートをELISA実験に用いた。

#### 【0073】

##### [アグリン変異体の免疫原性の検査]

PBSに、カゼインおよびTween20を、0.05%の最終濃度まで添加した(PBST-CASバッファー)。血清をPBSで1000倍に希釈した。バックグラウンド対照を、未処理のマウスから調製した。各試料のうち、ウェルあたり100 $\mu$ lを、対応するアグリン種で被覆したELISAプレートに移した。室温(RT:20~21; 密閉フィルムで密閉)で2h、プレートをインキュベートした後、これらをBioTek ELx405プレート洗淨装置(Wittec AG)を用いて400 $\mu$ lのPBST-CASで7回洗淨した。続いて、100 $\mu$ l/ウェルのヤギ抗マウス、ペルオキシダーゼ標識(KPL、074-1806)を添加し、PBST-CASで10000倍に希釈した。その後、プレートをRTで30分間インキュベートした後、400 $\mu$ lのPBST-CASで7回洗淨した。基質を添加し(ウェルあたり100 $\mu$ l;「TMB Super Sensitive One Component HRP Microwell」基質; BioFX; TMB S-1000-01)、プレートをRTで30分間インキュベートした。各ウェルに100 $\mu$ lの450nm 停止試薬(Stop Reagent; BioFX; #STPR-1000-01)を添加することにより、発色を停止させた。続いて、450nmでの吸光度を、Tecan infinite F200プレートリーダーを用いて測定した。測定の結果を図3にまとめる。CAF-z8マウスに由来する血清中では良好な免疫応答は検出されなかった。応答はバックグラウンド(bckg)を超えてちょうど検出可能であり、その平均は0.07OD単位であった。驚くべきことに、抗原としてC44K/A-y4z8で処理したマウスにおいては、非常に高い免疫応答が認められた。バックグラウンド(bckg)を超える平均の増加は1.6OD単位であった。CAF-z8の良好な免疫応答が存在しないこと理由は、完全には理解されないが、天然のニューロトリプシン切断産物であるアグリンC22構築物は良好にフォールディングされた安定なドメイン(tydor)を構成することが示された。対照的に、C44K/A-y4z8は、凝集する傾向があるタンパク質である(データは示さない)。この凝集は、マウスにおける強力な免疫応答の理由となり得る。マウスにおけるCAFの良好な免疫応答の欠如は、ヒトCAFに対する良好なモノクローナル抗体が未だ市販されていない理由の1つであり得る。しかしながら、抗原としてC44K/A-y4z8を用いた場合、強力な免疫応答が観察され、多種多様のモノクローナル抗体が得られた。

#### 【0074】

##### (実施例5)

##### [抗CAF抗体のエピトープマッピング]

CAFに対する抗体のエピトープマッピングのために、JPT Peptide Technologies (Berlin, Germany)社製のPepsot膜を用いた: ヒトアグリンのニューロトリプシン切断部位のP1'残基で始まるLG3ドメインの配列(CAF-z0)を、14個のアミノ酸の重複を含む15個のアミノ酸長のペプチドに分割した。これにより、全配列を包含する15個のアミノ酸長の172個のペプチドが得られた。ペプチドをN-アセチル化し、そのC末端を介してセルロース-アラニン膜に共有結合させた。

#### 【0075】

0.1%のTween20を添加したPBS(PBST)中で2時間、0.1~2マイクログラム/mlの濃度で抗体と共に、膜をインキュベートした。PBSTで10分間の洗淨ステップを3回行った後、HRPで標識化されたヤギ抗マウスの二次抗体を添加し、30分間インキュベートした。PBSTで10分間、3回洗淨した後、Immobilon ウェスタン(Western)化学発光HRP基質(MILLIPORE)を添加し

、Ste l l a画像化システム ( R A Y T E S T ) 上で1分間、膜に転写 ( r e c o r d e d ) した。陽性スポットを対応するペプチドスポットに割り当て、エピトープを一致させた。

【 0 0 7 6 】

陽性スポットを、膜上にスポットされたペプチド配列に割り当てた。抗体の結合に寄与する必須アミノ酸を、タンパク質配列のN末端側でシグナルを与える最初のアミノ酸と、C末端側でシグナルを与える最後のアミノ酸との決定により位置づけた。

【 0 0 7 7 】

ペプチドマッピングの結果を図4に示し、得られるエピトープを以下の表2に示す。

【表2】

抗体	エピトープ配列
28H7G3	TFVEY (配列番号8)
14B7B8	FVEYL (配列番号9)
28A6H11	TFVE (配列番号10)
264E12B8	WLGGLPELP (配列番号11)
264B12A8	LPE
28F7A6	LPELP (配列番号12)

表2

実施例1に従って得られた抗体のエピトープ配列

【 0 0 7 8 】

(実施例6)

[ラット血清中で急増したCAFのウェスタンブロッティング]

生物試料中のCAFを検出する抗体の能力を証明するために、ヒトCAF-z0をラット血清中で急増させ、PBSで1:250に希釈し、0.2ng/μlの濃度を得た。2ngのCAF-z0に対応する10μlを、4~12%のビストリスSDS-PAGEゲル(BIORAD)上にロードし、セミドライブロッティング装置(BIORAD)を用いてPVDF膜(MILLIPORE)上にプロットした。

【 0 0 7 9 】

PBST o/N中の10%rocheブロッティング試薬中の1μg/mlのモノクローナル抗体と共に、プロットをインキュベートした。比較のために、CAFに対する市販の抗体、ABCAM社製のab247を用いた。

【 0 0 8 0 】

洗浄し、HRPコンジュゲートヤギ抗マウス抗体と共にインキュベートした後、化学発光基質(MILLIPORE)とのHRP反応から誘導された化学発光シグナルを、Ste l l a画像化システム ( R A Y T E S T ) 中で1分間転写した。

【 0 0 8 1 】

その結果を図5に示す。レーン1=抗体28H7G3;レーン2=抗体14B7B8;レーン3=抗体28A6H11;レーン4=264E12B8;レーン5=抗体264B12A8;レーン6=28F7A6;7=Abcam抗体、[Agr 247]ab12364-100;ロット:577087およびレーン8=HRPコンジュゲートヤギ抗マウスIgG抗体、Socochim SA、074-1806。

【 0 0 8 2 】

番号および説明は、用いた一次抗体に対応する。ラット血清中に天然に存在する抗体の重鎖および軽鎖のバンド(それぞれ、55kDaおよび25kDaの一本線の矢印で示される)が二次抗マウス抗体により検出されることに留意されたい。これらのバンドは、口

10

20

30

40

50

ーディング対照およびウェスタンプロットの機能性対照として役立つ。

【0083】

22kDaの二本線の矢印で示されるCAFシグナルは、レーン1~6においてのみ、すなわち、本発明に従って得られた抗体についてのみ検出することができた。

【0084】

(実施例7)

[zスプライス部位に対して特異的なモノクローナル抗体13E8]

アグリンCAF-z8特異的抗体13E8を、限界希釈を行わずに、実施例1の記載と同じ免疫化から誘導した。このクローンの選択のために、以下の方法を選択した。

【0085】

ELISAプレートの被覆：Nunc MaxiSorp Immunoプレート96ウェル(平底、ポリスチレン)を、100ng/ウェル(125 $\mu$ l/ウェル)のヒトCAF-z8またはヒトCAF-z0で被覆した。被覆は、1xCandor被覆バッファ、pH9.6の存在下、4で一晚(すなわち、15h)行った。

【0086】

被覆バッファの吸引後、400 $\mu$ lのNa-PBS-CAS、pH7.2(追加の0.2molのNaClおよび0.05%のカゼインを添加したPBS)で、プレートを7回洗浄した。洗浄は、BioTek ELx405プレート洗浄装置(Wittec AG)を用いて行った。洗浄されたプレートのウェルを、室温で3h、ウェルあたり180 $\mu$ lのCandorブロッキング溶液を添加することによりブロッキングした。ブロッキング溶液を除去した後、プレートを400 $\mu$ lのNa-PBS-CAS、pH7.2で7回洗浄した。続いて、プレートをELISA実験のために用いた。

【0087】

推定される抗アグリン抗体を含有するハイブリドーマ上清を検査するために、洗浄バッファ(0.05%のカゼインおよびTween20を添加したPBS)を新たに調製した。細胞培養上清をPBSで30倍に希釈した。細胞培養培地のみで、陰性対照を調製した。各試料のうち、100 $\mu$ lを、様々なアグリン種で被覆したELISAプレートのウェルに移した。

【0088】

室温(RT:20~21;密閉フィルムで密閉)で2h、プレートをインキュベートした後、それらを、BioTek ELx405プレート洗浄装置(Wittec AG)を用いて400 $\mu$ lのPBST-CASで7回洗浄した。続いて、100 $\mu$ l/ウェルの10000倍に希釈したヤギ抗マウス、ペルオキシダーゼ標識(KPL、074-1806)を添加した後、プレートをRTで30分間インキュベートした。

【0089】

プレートを400 $\mu$ lのPBST-CASで7回洗浄し、基質を添加した(ウェルあたり100 $\mu$ l;「TMB Super Sensitive One Component HRP Microwell」基質;BioFX;TMBS-1000-01)。TMB基質を添加した後、プレートをRTで30分間インキュベートした。各ウェルに100 $\mu$ lの450nm停止試薬(BioFX;STPR-1000-01)を添加することにより、発色を停止させた。続いて、450nmでの吸光度を、Tecan infinite F200プレートリーダーを用いて測定した。クローン13E8に関する測定の結果を図6にまとめる。13E8はCAF-z0ではなく、CAF-z8にのみ高い特異性で結合することが明らかであり、これはこの抗体がCAF中のz挿入に特異的であることを意味する。

【0090】

さらなる実験において、抗体13E8および28H7G3を、CAF-z0およびCAF-z8のそれらの結合に関して比較した。2ngのCAF-z0およびCAF-z8を、4~12%のピストリスSDS-PAGEゲル(BIORAD)上にロードした。分離後、24Vで60分間、TransプロットSDセル(BIORAD)を用いて標準的な

10

20

30

40

50

トランスファーバッファーでのセミドライプロットングによってP V D F膜 ( M I L L I P O R E ) 上にタンパク質をプロットした。

【 0 0 9 1 】

プロットされたタンパク質の検出のために、 $1 \mu\text{g} / \text{ml}$ の濃度の精製した抗体 ( 1 3 E 8 および 2 8 H 7 G 3 ) または細胞培養上清 ( 1 : 2 で希釈されたもの ) を P B S T 中で用いた。

【 0 0 9 2 】

P B S T 中の R o c h e ブロッキング溶液 ( 1 0 % ) を用いて 1 h、プロットをブロッキングした。その後、必要な量の抗体を添加し、2 h インキュベートした。P B S T で 3 回洗浄した後、二次抗体溶液 ( 標準的なヤギ抗マウス H R P コンジュゲート ) を、P B S T + 1 0 % R o c h e ブロッキング溶液中で好適な濃度で添加した。3 0 分間インキュベートした後、プロットを P B S T で 3 回洗浄し、S t e l l a 化学発光画像化装置を用いて化学発光基質にプロットを曝露した。その結果を図 7 に示し、レーン 1 および 2 は抗体 2 8 H 7 G 3 に関する結果を示し ( レーン 1 : C A F - z 0 ; レーン 2 : C A F - z 8 ) 、レーン 2 およびレーン 3 は 1 3 E 8 に関する結果を示す ( レーン 3 : C A F - z 0 ; レーン 4 : C A F - z 8 ) 。

10

【 0 0 9 3 】

これらの結果はまた、抗体 1 3 E 8 は C A F - z 8 を特異的に認識するが、2 8 H 7 G 3 は両方の変異体を認識することを示している。

【 0 0 9 4 】

20

( 実施例 8 )

[ C 4 4 の N 末端 ( 非 C A F ) 部分に対する抗体 ]

C 4 4 y 4 z 8 の N 末端部分に対する抗体に関して試験するために、E L I S A プレートを被覆するためのタンパク質として C 4 4 y 4 z 8 および C A F - z 8 を用いて、実施例 6 に記載のように E L I S A 試験を行った。上記の 2 つの抗体、1 4 C 5 G 4 および 1 2 A 1 1 D 1 1 を試験した。その結果を図 8 に示す。試験した抗体は両方とも、C A F - z 8 ではなく、C 4 4 K / A - y 4 z 8 に結合し、これは、これらの抗体が C 4 4 の N 末端非 C A F 部分に結合することを意味する。

【 0 0 9 5 】

30

( 実施例 9 )

[ z 8 スプライス部位の特異的抗体を達成するためのマウスの免疫化 ]

神経性のアグリンは、非神経性のアグリンとは異なる生物学的機能を有し得る ( B e z a k o v a および R u e g g , 2 0 0 3 ) 。例えば、神経性のアグリンは、発達中の神経筋接合部でのアセチルコリン受容体 ( A C h R ) の蓄積を媒介するが、非神経性のアグリンはこの活性を有さない。血液、血清、尿または脳脊髄液中の C A F - z 8 の存在は、神経性のアグリンの分解を示す。それゆえ、C A F - z 8 を特異的に検出することができ、このようにして神経性のアグリンと非神経性のアグリンとを区別することができる、モノクローナル抗体は非常に重要である。そのような抗体を得るために、ヒトアグリンの z 8 挿入中に存在するアミノ酸を含有するペプチド N H 2 - E L A N E I P V ( 配列番号 3 ) - C O O H を、マウスオボアルブミンにコンジュゲートさせて、免疫原として用いた。アミノ酸合成、コンジュゲーション、免疫化および細胞融合ならびにモノクローナル抗体の精製は、当業者には公知の標準的な技術に従って行った。簡単に述べると、オボアルブミンにコンジュゲートさせたペプチドを抗原として用いて、4 匹の B A L B / c マウスを免疫化した。2 0 ~ 3 0 g + C F A ( 完全フロイントアジュバント ) の注射を T 0 ( 開始日 ) に行い、1 0 ~ 1 5 g + I F A ( 不完全 F A ) の注射を T 2 1、T 2 8 ( 日 ) に皮下に行った。さらなる注射を T 4 2、4 7、5 9、6 1、7 2 で行った。T 7 5 日目に、脾臓摘出を行った後、脾臓細胞とミエロマ細胞とを融合させ、K L H ( キーホールリンペットヘモシアニン ) に結合させたペプチドに対する E L I S A 試験によって母ハイブリドーマ ( m o t h e r h y b r i d o m a ) クローンをスクリーニングした。陽性クローンを、限界希釈によりサブクローニングし、I S F - 1 培地中で無血清条件に適応させ

40

50

た。培養上清中に分泌された抗体を、プロテインGセファロースクロマトグラフィーにより精製した。最良のモノクローナル抗体(mAB)は、IgM(2D7D9)サブクローンであり、IgGクローンは得られなかった。

#### 【0096】

##### [ウェスタンブロットおよびELISAの結果]

対照抗体として28H7G3を用いる2D7D9でのウェスタンブロットを、セミドライブロットング技術を用いてPVD膜上にブロットされた100ngのCAF-z0(レーンz0)およびCAF-z8(レーンz8)を用いて実施した。この膜を、10%Rocheブロッキング溶液を添加したPBST中で1時間ブロッキングした。その後、13ng/mlのビオチン化28H7G3または1μg/mlのビオチン化2D7D9を添加し、さらに2時間インキュベートした。PBSTで10分間、3回洗浄した後、ストレプトアビジン-ポリ-HRPコンジュゲート(PIERCE、0.5mg/ml)を添加し、10%Rocheブロッキング溶液を添加したPBST中で1:30000に希釈した。PBST中で10分間、3回洗浄した後、膜を化学発光基質に曝露し、Stella画像化システム中で画像化した。28H7G3を含むパネルは1秒曝露したが、2D7D9を含むパネルは300秒曝露した。第1抗体として用いた28H7G3と比較して2D7D9のアクセスはおおよそ100倍であり、2D7D9のシグナルを受け取るまでの曝露時間が300倍長いことを考慮すると、28H7G3が2D7D9よりも少なくとも30000倍感受性が高いと結論付けることができる。CAF-z0およびCAF-z8は、グリコシル化タンパク質の画分に起因して二重のバンドとして出現する(図9)。

10

20

#### 【0097】

受容された抗体は、ウェスタンブロットにおいて非常に弱いシグナルしか示さず、CAF-z0とCAF-z8とを良好に識別しない。ELISAにおいては、前記抗体は、弱いシグナルしか与えず、CAF-z0とCAF-z8との識別はわずかである(図10)。

#### 【0098】

##### [2D7D9を用いるELISA]

ELISAプレート(Nunc maxisorp immunoプレート)を、30ng/ウェルのCAF-z0またはCAF-z8で被覆した。プレートを、室温で4h、ウェルあたり180μlのCandorブロッキングバッファーでブロッキングした。300ng/mlの2D7D9または13E8-2C5を添加し、RTで2hインキュベートした。プレートを、0.05%のTween20および0.05%のカゼインを添加した400μlのPBSTで7回洗浄した。検出抗体として、それぞれヤギ抗マウスIgM-HRPまたはヤギ抗マウスIgG-HRPを、1:10000の希釈率で用いた。洗浄後、Tecan Infinite F200 96ウェルリーダー中、ウェルあたり100μlのBioFX社製の「450nm Stop Reagent for TMB Microwell Substrates」でブロッキングされたTMB Super Sensitive One Component HPR Microwell基質を用いて、結合した抗体を検出した。得られたシグナルは非常に弱く、CAF変異体の識別は弱い。この免疫化方法では、高親和性の特異的mABの生成に成功しなかった。C44K/A-y4z8の免疫化により得られたmAB 13E8-1C5(以下を参照)は、CAF-z8に対して高く、特異的なシグナルを示した。

30

40

#### 【0099】

##### [文献リスト]

## 【表 3】

## Reference List:

Bezakova G, Ruegg MA. New insights into the roles of agrin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2003; 4: 295-308.

Borberg H, Gaczowski A, Oette K, Stoffel W. Immunosorptive apheresis of LDL. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 1990; 337: 163-7. 10

Cui JG, Bazan NG. Agrin downregulation induced by nerve injury contributes to neuropathic pain. *J Neurosci.*, 2010; 30: 15286-97.

Matsumoto-Miyai K, Sokolowska E, Zurlinden A, Gee CE, Luscher D, Hettwer S, Wolfel J, Ladner AP, Ster J, Gerber U, Rulicke T, Kunz B, Sonderegger P. Coincident pre- and postsynaptic activation induces dendritic filopodia via neurotrypsin-dependent agrin cleavage. *Cell*, 2009; 136: 1161-71. 20

Molinari F, Rio M, Meskenaite V, Encha-Razavi F, Auge J, Bacq D, Briault S, Vekemans M, Munnich A, tte-Bitach T, Sonderegger P, Colleaux L. Truncating neurotrypsin mutation in autosomal recessive nonsyndromic mental retardation. *Science*, 2002; 298: 1779-81.

Reif R, Sales S, Hettwer S, Dreier B, Gisler C, Wolfel J, Luscher D, Zurlinden A, Stephan A, Ahmed S, Baici A, Ledermann B, Kunz B, Sonderegger P. Specific cleavage of agrin by neurotrypsin, a synaptic protease linked to mental retardation. *FASEB J*, 2007; 21: 3468-78. 30

Stephan A, Mateos JM, Kozlov SV, Cinelli P, Kistler AD, Hettwer S, Rulicke T, Streit P, Kunz B, Sonderegger P. Neurotrypsin cleaves agrin locally at the synapse. *FASEB J*, 2008; 22: 1861-73. 40



【 図 6 】

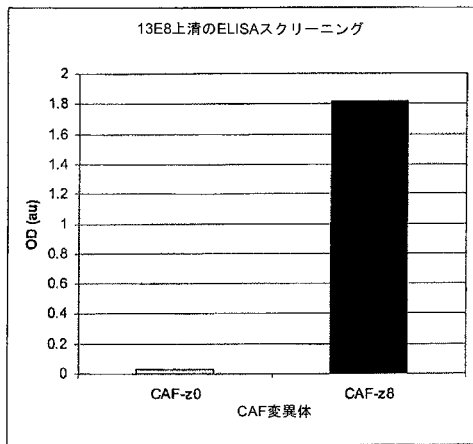


図6

【 図 7 】

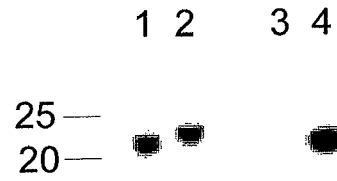


図7

【 図 8 】

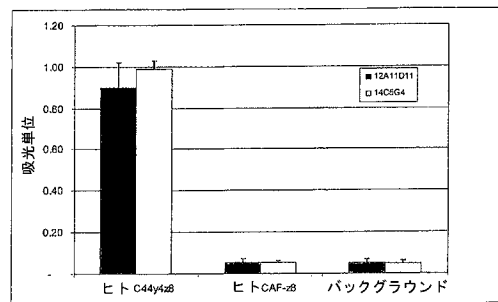


図8

【 図 9 】



図9

【 図 10 】

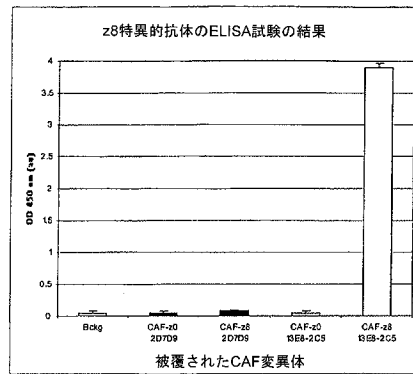


図10

【配列表】

2014507942000001.xml

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2012/000137
---------------------------------------------------

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C07K16/18 ADD. According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, Sequence Search, EMBASE, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HOCH W ET AL: "STRUCTURAL DOMAINS OF AGRIN REQUIRED FOR CLUSTERING OF NICOTINIC ACETYLCHOLINE RECEPTORS", EMBO JOURNAL, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 13, no. 12, 1 January 1994 (1994-01-01), pages 2814-2821, XP002031858, ISSN: 0261-4189	1,2,5-11
Y	fig. 1, 2, 6; pg. 2820 ----- -/--	3,4, 12-16
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" 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 document 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		Date of mailing of the international search report
23 February 2012		06/03/2012
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Bernhardt, Wiebke

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2012/000137
---------------------------------------------------

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HOCH W ET AL: "Developmental regulation of highly active alternatively spliced forms of agrin", NEURON, CELL PRESS, US, vol. 11, no. 3, 1 September 1993 (1993-09-01), pages 479-490, XP024246622, ISSN: 0896-6273, DOI: DOI:10.1016/0896-6273(93)90152-H [retrieved on 1993-09-01] abstract; pg. 476, right-hand column -----	4,12-14
Y	EP 1 990 420 A1 (NEUROTUNE AG [CH]; UNIV ZUERICH [CH]) 12 November 2008 (2008-11-12) og, 2-6 -----	16
Y	WO 2008/074813 A2 (NEUROTUNE AG [CH]; UNIV ZUERICH [CH]; SONDEREGGER PETER [CH]; MIYAI KA) 26 June 2008 (2008-06-26) example 5; page 40, 2nd paragraph -----	3,4,15
X,P	EP 2 295 068 A1 (NEUROTUNE AG [CH]) 16 March 2011 (2011-03-16) the whole document in particular paragraphs [0050] - [0052], [0062] -----	1-16
A	BEZAKOVA GABRIELA ET AL: "New insights into the roles of agrin", NATURE REVIEWS MOLECULAR CELL BIOLOGY, MACMILLAN MAGAZINES, LONDON, GB, vol. 4, no. 4, 1 April 2003 (2003-04-01), pages 295-308, XP008080787, the whole document in particular Box 1; table 1 -----	1-16
A	WO 97/21811 A2 (REGENERON PHARMA [US]; VALENZUELA DAVID M [US]; GLASS DAVID J [US]; BO) 19 June 1997 (1997-06-19) examples, claims -----	1-16
A	MATSUMOTO-MIYAI KAZUMASA ET AL: "Coincident Pre- and Postsynaptic Activation Induces Dendritic Filopodia via Neurotrypsin-Dependent Agrin Cleavage", CELL, CELL PRESS, US, vol. 136, no. 6, 20 March 2009 (2009-03-20), pages 1161-1171, XP002558394, ISSN: 0092-8674, DOI: DOI:10.1016/J.CELL.2009.02.034 the whole document -----	1-16
1	----- -/--	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2012/000137
---------------------------------------------------

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>STEPHAN ALEXANDER ET AL: "Neurotrypsin cleaves agrin locally at the synapse", FASEB JOURNAL, FED. OF AMERICAN SOC. FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY, US, vol. 22, no. 6, 1 June 2008 (2008-06-01), pages 1861-1873, XP009149897, ISSN: 0892-6638, DOI: DOI:10.1096/FJ.07-100008 [retrieved on 2008-01-29] abstract; figures -----</p>	1-16

1

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/000137

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1990420	A1	12-11-2008	AT 477329 T 15-08-2010
			AU 2008250733 A1 20-11-2008
			CA 2692132 A1 20-11-2008
			CN 101680022 A 24-03-2010
			DK 1990420 T3 15-11-2010
			EP 1990420 A1 12-11-2008
			ES 2350254 T3 20-01-2011
			JP 2010526994 A 05-08-2010
			PT 1990420 E 04-11-2010
			SI 1990420 T1 31-12-2010
			US 2010240083 A1 23-09-2010
			WO 2008138474 A1 20-11-2008
-----			
WO 2008074813	A2	26-06-2008	NONE
-----			
EP 2295068	A1	16-03-2011	EP 2295068 A1 16-03-2011
			WO 2011026615 A1 10-03-2011
-----			
WO 9721811	A2	19-06-1997	AU 728559 B2 11-01-2001
			AU 1352497 A 03-07-1997
			CA 2240516 A1 19-06-1997
			EP 0866860 A2 30-09-1998
			IL 124859 A 08-03-2007
			JP 2000504929 A 25-04-2000
			US 5814478 A 29-09-1998
			US 6413740 B1 02-07-2002
			WO 9721811 A2 19-06-1997
-----			

## 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>A 6 1 P 25/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 25/00	
<b>A 6 1 P 13/12 (2006.01)</b>	A 6 1 P 13/12	
<b>A 6 1 P 11/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 11/00	
<b>G 0 1 N 33/53 (2006.01)</b>	G 0 1 N 33/53	D

(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

(74) 代理人 100142996

弁理士 森本 聡二

(74) 代理人 100154298

弁理士 角田 恭子

(74) 代理人 100166268

弁理士 田中 祐

(74) 代理人 100170379

弁理士 徳本 浩一

(74) 代理人 100161001

弁理士 渡辺 篤司

(74) 代理人 100179154

弁理士 児玉 真衣

(74) 代理人 100180231

弁理士 水島 亜希子

(74) 代理人 100184424

弁理士 増屋 徹

(72) 発明者 ダヒンデン, ピウス

スイス国, ツェーハー 5 4 1 2 ゲーベンシュトルフ, ゲーリッヒ 8

(72) 発明者 ヘットヴァー, シュテファン

スイス国, ツェーハー 8 0 5 1 チューリッヒ, ハイトヴィーゼン 3 1

(72) 発明者 フライブルード, ヤン・ウィレム

スイス国, ツェーハー 4 3 1 3 メーリン, ウンテレ・フックスラインシュトラッセ 1 6

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA41 CA01 CA09 CA11 CA20 DA02 DA03 EA04 GA05

GA11 HA01 HA15

4B064 AG27 BJ12 CA20 CC24 CE12 DA01 DA13

4B065 AA91X AA93X AA93Y AB01 AB05 AB06 BA02 BA08 CA25 CA44

CA46

4C085 AA14 CC23 EE01

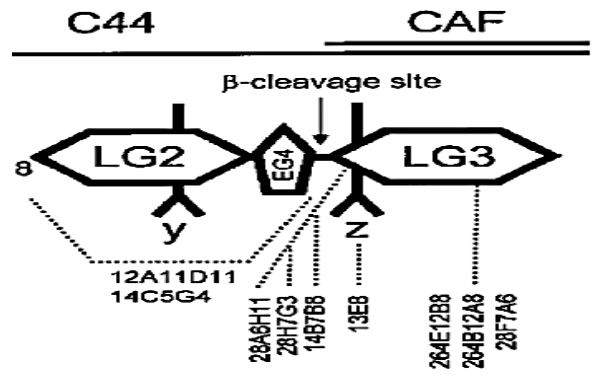
4H045 AA11 AA20 BA10 BA12 BA13 BA15 BA17 CA40 DA76 EA20

EA50 FA74

专利名称(译)	产生能够特异性结合集聚蛋白人C44片段的单克隆抗体的杂交瘤细胞系的制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2014507942A</a>	公开(公告)日	2014-04-03
申请号	JP2013552126	申请日	2012-01-13
[标]申请(专利权)人(译)	纽罗图恩股份公司		
申请(专利权)人(译)	神经调股份公司		
[标]发明人	ダヒンデンピウス ヘットヴァーシュテファン フライブルードヤンウイレム		
发明人	ダヒンデン,ピウス ヘットヴァー,シュテファン フライブルード,ヤン・ウイレム		
IPC分类号	C12N5/10 C12N15/09 C12P21/08 C07K16/18 C12N15/02 A61K39/395 A61P25/00 A61P13/12 A61P11/00 G01N33/53		
CPC分类号	A61P11/00 A61P13/12 A61P25/00 C07K16/18 C07K2317/34		
FI分类号	C12N5/00.102 C12N15/00.ZNA.A C12P21/08 C07K16/18 C12N15/00.C A61K39/395.N A61P25/00 A61P13/12 A61P11/00 G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA41 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/DA03 4B024/EA04 4B024/GA05 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/BJ12 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA91X 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB05 4B065/AB06 4B065/BA02 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA14 4C085/CC23 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/BA10 4H045/BA12 4H045/BA13 4H045/BA15 4H045/BA17 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	河村 英文 中村綾子 角田恭子 田中宇 德本光一 渡边淳		
优先权	2011000898 2011-02-04 EP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

一种产生杂交瘤细胞系的方法，该细胞系产生能够特异性结合集聚蛋白的人C44片段的单克隆抗体，包括给野生型小鼠施用免疫量的C44y≥4集聚蛋白片段的步骤，将它们与骨髓瘤细胞系融合，使细胞在选择性培养基中融合，孵育杂交瘤细胞以结合集聚蛋白的C44片段筛选单克隆抗体上清液中的抗体，并分离产生所需单克隆抗体的杂交瘤细胞。



**Fig. 1**