

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4768193号
(P4768193)

(45) 発行日 平成23年9月7日(2011.9.7)

(24) 登録日 平成23年6月24日(2011.6.24)

(51) Int.Cl.	F I
C07K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28 Z N A
G01N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 D
G01N 33/577 (2006.01)	G O 1 N 33/577 B
C12N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 2
A61K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N

請求項の数 10 (全 23 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2001-567800 (P2001-567800)	(73) 特許権者	508066979
(86) (22) 出願日	平成13年3月8日(2001.3.8)		メルク セロノ ソシエテ アノニム
(65) 公表番号	特表2004-506603 (P2004-506603A)		スイス連邦、ヴォ、クワンシン 126
(43) 公表日	平成16年3月4日(2004.3.4)		7、サーントル アンデュストリエル (番
(86) 国際出願番号	PCT/IL2001/000216		地なし)
(87) 国際公開番号	W02001/068710	(74) 代理人	100098464
(87) 国際公開日	平成13年9月20日(2001.9.20)		弁理士 河村 洸
審査請求日	平成19年4月27日(2007.4.27)	(74) 代理人	100149630
(31) 優先権主張番号	135025		弁理士 藤森 洋介
(32) 優先日	平成12年3月13日(2000.3.13)	(74) 代理人	100154449
(33) 優先権主張国	イスラエル(IL)		弁理士 谷 征史
(31) 優先権主張番号	139217	(72) 発明者	ヨナフ、ナクム
(32) 優先日	平成12年10月23日(2000.10.23)		イスラエル国、70700 ゲデラ、レメ
(33) 優先権主張国	イスラエル(IL)		ズ ストリート 6
微生物の受託番号	CNCM I-2390		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトLDL受容体に対するモノクローナル抗体、その産生および用途

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒトLDL受容体およびその断片を特異的に認識して結合するモノクローナル抗体であって、C型肝炎ウイルスの複製を阻害することができ、かつヒトLDLRの配列の位置+4のアミノ酸Aspから位置+291のアミノ酸Gluまでのアミノ酸配列を含むヒト可溶性LDLR+291型を使用して非ヒト動物を免疫化することによって得られ、該モノクローナル抗体が、番号I-2390によってCNCMに寄託されるハイブリドーマクローン12.6により発現されるMab、番号I-2391によってCNCMに寄託されるハイブリドーマクローン28により発現されるMab、番号I-2392によってCNCMに寄託されるハイブリドーマクローン29.8により発現されるMabおよび番号I-2394によってCNCMに寄託されるハイブリドーマクローン50.30により発現されるMabからなる群より選択されるモノクローナル抗体。

【請求項2】

ヒト可溶性LDL受容体の特異的に認識して結合する請求項1記載のモノクローナル抗体。

【請求項3】

免疫グロブリンアイソタイプIgG₁またはIgMに属する請求項1または2記載のモノクローナル抗体。

【請求項4】

請求項1、2または3記載のモノクローナル抗体の使用を含むヒトLDLRの検出およ

び/または定量方法。

【請求項 5】

番号 I - 2 3 9 0 によって CNCM に寄託されるハイブリドーマクローン 1 2 . 6 。

【請求項 6】

番号 I - 2 3 9 1 によって CNCM に寄託されるハイブリドーマクローン 2 8 。

【請求項 7】

番号 I - 2 3 9 2 によって CNCM に寄託されるハイブリドーマクローン 2 9 . 8 。

【請求項 8】

番号 I - 2 3 9 4 によって CNCM に寄託されるハイブリドーマクローン 5 0 . 3 0 。

【請求項 9】

請求項 1、2 または 3 記載のモノクローナル抗体とヒト LDL R 含有材料とを接触させることからなる、ヒト LDL R の精製方法。

10

【請求項 10】

C 型肝炎感染の治療のための医薬の製造における請求項 1、2 または 3 記載のモノクローナル抗体の使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

[本発明の分野]

本発明は、低密度リポタンパク質に対するヒト受容体 (LDLR) を特異的に認識するモノクローナル抗体に関する。それらの抗体は、たとえば、生産工程におけるヒト可溶性 LDLR (hsLDLR) の同定および精製、ならびに C 型肝炎感染 (HCV) などの疾患の同定および治療において有用である。

20

【0002】

[本発明の背景]

すべての真核生物の形質膜の成分であるコレステロールは、高等生物における細胞の増殖および生存に必須である。しかしながら、コレステロールの高い血清レベルは、全身の動脈におけるアテローム硬化性のプラーク形成の一因となることにより、疾患および死を引き起こす。哺乳動物におけるコレステロール合成の主な部位は肝臓である。コレステロールのかなりの量が腸によっても形成されている。それらの臓器によるコレステロール形成の速度は、食事供給源 (dietary sources) から吸収されるコレステロールの量に対して非常に反応しやすい。肝臓および腸以外の細胞は、新たなコレステロールの合成によってではなく、血漿からコレステロールを得る。コレステロールおよびほかの脂質は、増加する密度にしたがって分類されるリポタンパク質により、体液に輸送される。リポタンパク質は、極性脂質とアポタンパク質とからなる外皮に囲まれた疎水性脂質のコアからなる粒子である。そのようなリポタンパク質は、高い疎水性の脂質を可溶化し、特異的な標的細胞や組織の中および外への特定の脂質の移動を制御するシグナルを収容するという、2つの役割を担う。コレステロールは、非肝細胞の形質膜上にある特異的な受容体に結合する低密度リポタンパク質 (LDL) により、体液に輸送される。ついで、受容体-LDL 複合体は、受容体媒介エンドサイトーシスとして知られる輸送機構により、細胞の中へと内在化される (Goldstein et al. 1979)。低密度リポタンパク質 (LDL) 受容体は、哺乳動物細胞において多数のリガンドのエンドサイトーシスを媒介する、構造的に関連付けられた細胞表面受容体のファミリーのプロトタイプである。

30

40

【0003】

LDL 受容体は 8 2 2 アミノ酸残基からなり、1 6 4 0 0 0 の分子量を示す。LDL 受容体はいくつかのドメインからなり、そのドメイン中には他のタンパク質に配列相同性を有するものがある。その NH₂ 末端のリガンド結合ドメインは、7つのシステインリッチの不完全な繰り返しを配された 2 9 2 残基からなる。各繰り返しは、1つから3つのパターンでジスルフィド結合された6つのシステイン残基を含有する (Bieri et al. 1995)。このドメインに、4つのさらなるドメインが続く。第1番目は 4 0 0 アミノ酸残基からなりかつ EGF 受容体に相同性を有しており、第2番目は O - 結合糖に富む 5 8 アミノ酸残

50

基からなるものであり、第3番目は22アミノ酸残基からなる1つの膜貫通ドメインであり、および第4番目は50アミノ酸残基からなる細胞質ドメインである (Sudhof et al. 1985)、(Brown et al. 1986)。

【0004】

LDL受容体の生理学的な重要性は、家族性高コレステロール血症 (FH) に関するBrownおよびGoldsteinの研究により明らかにされた。当該疾患は、LDLに対する機能的な受容体の欠如または欠失を生じる分子遺伝学的障害が原因で発見された (Brown et al. 1976)。FH突然変異の種類いくつかは特徴づけられた (Goldstein et al. 1975)。

【0005】

抗ウイルス活性を示す可溶性のsLDLRは、インターフェロンに誘導された細胞の培養上清から (Fischer et al. 1993) および体液において (Fischer et al. 1994) 同定され単離された。インターフェロンに誘導されるタンパク質のいくつかは、IFNによる抗ウイルス状態の誘導に役立つものとして同定されている。抗ウイルス活性を示すそのようなタンパク質の1つが、ヒト羊膜WISH細胞の培養上清に産生され蓄積された。このタンパク質が均質に精製され、そしてsLDLRとして同定された (EP0553667およびFischer et al. 1993を参照)。sLDLRは、インターフェロンに反応して抗ウイルス状態にはいる哺乳動物細胞により、培地中に分泌されることが見出された。インターフェロンと異なり、sLDLRは細胞において抗ウイルス状態を誘導しないが、それ自体で抗ウイルス性である。sLDLRは、ウイルスの複製、成熟および出芽 (budding) の過程で存在していなければならないようであることが分かり、sLDLRは、ウイルスの集合または出芽の阻害を導く複雑な過程に関連しているかもしれないことが示唆された (未公開データ)。C型肝炎ウイルスのエンドサイトーシスは、培養細胞上のLDL受容体により媒介されていることが最近示された (Agnello et al. 1999)。それらおよびほかの発見は、LDL受容体のファミリーがウイルス受容体として働き得ることを示唆する。したがって、sLDLR受容体に対する抗体は、細胞のLDL受容体に結合することによるウイルス粒子の侵入および出芽を妨害するかもしれない。

【0006】

これまでに知られているLDLRの唯一入手可能なモノクローナル抗体は、ウシLDLRの抗体であるC7であり (Beisiegel et al. 1981, アマシャム社、UKより商業的に入手可能)、均質に精製されたウシ副腎皮質LDLRによるマウスの免疫化により製造された。ウシ副腎皮質由来の膜が可溶化され、受容体はDEAEセルロースカラムからの溶出により部分的に精製された (Beisiegel et al. 1981)。ウシLDLRの抗体は、ヒトLDLRと弱い交差反応を示すのみである。

【0007】

実際、ウシLDLRに対するC7Mabは、組換えヒトLDLRの検出および定量に使用される際に著しい不利益を有することが分かった：

- a) C7Mabは、ヒトLDLRに対して非常に低い親和性を有する。
- b) C7Mabは、細胞培養物由来の不純物と顕著に交差反応する。

【0008】

ヒトLDLRの特異的な抗体は、以前は入手可能ではなかった。精製、同定のために、または検定開発目的のために新規タンパク質に対する抗体をおこすことは非常に一般的であるため、これは驚くべきことである。モノクローナル抗体を生成するための条件は、効果的なマウスの免疫化を可能とする、利用可能な十分に量の多い高度に精製された抗原であるため、そのような抗体はこれまでつくられていないということが考えられる。高度に精製された抗原は、RP-HPLCにおいて単一の大きなピークとしてあらわれるものである。さらには、精製過程で抗原の同定および定量の方法を確立することは容易ではなかった。本発明により、本願明細書において説明される抗ウイルス活性検定は、精製過程でLDLRの同定に使用された。

【0009】

効果的な免疫検定 (ELISA) を開発するための方法、およびウェスタンブロットにお

10

20

30

40

50

いてタンパク質を同定するための方法を提供するために、ヒト可溶性LDLRに対する特異的Mabを生成する必要がある。それらの抗体は、組換えヒト可溶性LDLRの産生および精製過程の進行中における組換えタンパク質の記録および定量的ために、および天然タンパク質の検出のために必要とされる。

【0010】

[本発明の要旨]

本発明は、ヒトLDL受容体およびその断片を特異的に認識して結合することができるモノクローナル抗体を産出するハイブリドーマ細胞株の生成を可能とする。

【0011】

さらに詳細には、本発明は、ヒト可溶性LDL受容体を特異的に認識して結合することができるモノクローナル抗体を産出するハイブリドーマ細胞株の生成を可能とする。

10

【0012】

したがって、本発明は、モノクローナル抗体C7を除く、ヒトLDL受容体およびその断片を特異的に認識して結合するモノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体(humanized antibody)、抗-抗Id抗体またはそれらの断片に関する。

【0013】

本発明は、ヒト可溶性LDLRを認識して結合し、下記の要求を満たすモノクローナル抗体を提供する。

1. ヒト可溶性LDLRの検出のためのELISA、たとえばサンドイッチELISA(Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)、における

20

対として使用され得るMab

2. ウェスタンブロット分析におけるLDLRの同定のために使用され得るMab

3. ヒト可溶性LDLRの抗ウイルス性生物学的活性を中和するために使用され得るMab

4. HCVなどのウイルス感染を阻害するために使用され得るMab。

【0014】

本発明はさらに、ヒトLDLRの検出および/または定量的目的で、既知の方法での本発明の特異的モノクローナル抗体の使用を含む、ヒトLDLRの検出および/または定量的方法を提供する。

【0015】

30

本発明はまた、組換えヒトLDLRで免疫化した哺乳動物由来の脾臓細胞および均質もしくは不均質のリンパ系細胞からなるクローン化されたハイブリドーマを提供する。

【0016】

本発明のモノクローナル抗体は、従来の方法で、たとえばhLDLで免疫化した哺乳動物由来の脾臓細胞および均質もしくは不均質のリンパ系細胞からなるクローン化されたハイブリドーマを液体培地または哺乳動物の腹腔において増殖させ、ハイブリドーマがモノクローナル抗体を産出および蓄積することを可能にすることにより、製造される。

【0017】

さらにもうひとつの態様において、本発明は、粗LDLR含有する材料を本発明のモノクローナル抗体に接触させることを含むヒトLDLRの精製方法を提供する。吸着させたLDLR特異的なモノクローナル抗体を含むカラムは、組換えタンパク質の精製方法におけるアフィニティー精製工程として使用し得る。

40

【0018】

組換え体ヒトLDLRの検出および測定方法は、実施例5に記載されているようなELISA検定において、本発明のモノクローナル抗体を抗体として使用することを含む。

【0019】

動物用を免疫化するためのLDLRまたはLDLRの断片としては、温血哺乳動物のLDLRであるかぎり、いかなるLDLRも使用し得る。LDLRのムテインもまた使用し得る。そのような哺乳動物のヒト可溶性LDLRの代表例は、ヒトLDLRの配列の位置+4のアミノ酸Aspで始まり位置+291のアミノ酸Gluで終わるアミノ酸配列を含む

50

可溶性LDLR + 291型であり、+ 292型などのほかの型も同様に使用し得る。

【0020】

[本発明の詳細な説明]

ヒト可溶性LDLR (hsLDLR) に対するモノクローナル抗体を生成する。それらのモノクローナル抗体を使用することにより、hsLDLRの同定のためのELISAおよびウェスタンブロットニングならびにhsLDLRの抗ウイルス活性に対する中和検定を開発した。

【0021】

Mabは、ヒト可溶性LDLRのAsp + 4からGlu + 291までのN末端リガンド結合ドメインからなるhsLDLRの組換え体 + 291型で免疫化したマウスにおいて、生成された。hsLDLRの組換え体 + 291型はCHO細胞で産生され、均質に精製された。

10

【0022】

免疫化したマウスは、著しい力価の特異的抗体を産生した。ハイブリドーマのスクリーニングののち、5つのクローン(番号12、28、29、30および50)が、高抗体プロデューサーとして同定された。サブクローニングのために、それらのクローンはさらに選択された。サブクローニングののち、高抗体産生能を有する29のサブクローンを単離し、親クローン由来のアンブルおよびサブクローン由来のアンブルを凍結した。

【0023】

一組のモノクローナル抗体を、r-hsLDLRに対するELISA用に選択した。Mab 28をコーティング抗体として選択し、そしてビオチンで標識化したMab 29.8を第2抗体として選択した。Mab 12.6および29.8は、ウェスタンブロット解析における天然および組換え体hsLDLRの同定に適していることが見出され、そしてMab 28および30はウェスタンブロット解析における組換え体hsLDLRの同定に適していることが見出された。Mab 12.6および50.30は、hsLDLRの抗ウイルス活性を阻害するために適していることが見出された。

20

【0024】

本発明により、Mab 12.6、28および29.8は、ヒト肝細胞の初代培養におけるC型肝炎ウイルス(HCV)のウイルスゲノム複製を阻害することも見出された。このように、それらの抗体は、C型肝炎感染の治療に使用され得る(図3)。

30

【0025】

それらのクローンにより産生されるMabのサブクラスアイソタイプが決定された。クローン12.6、28、29.8および30はIgG₁として同定され、一方、クローン50.30はIgMであることが見出された。

【0026】

hsLDLRの+ 291型に対して開発されたMabは、hsLDLRのほかの型、すなわち組換え体CHO細胞において産生されるr-hsLDLRの+ 292型および+ 331型をも、ELISAおよびウェスタンブロット解析において認識した。+ 292型はアミノ酸残基Asp + 4からCys + 292までの受容体のN末端部を含み、そして+ 331型はアミノ酸残基Asp + 4からCys + 331までの受容体のN末端部を含む。

40

【0027】

モノクローナル抗体を生成するためのマウスの免疫化に使用される抗原は、CHO細胞において産生されるr-hsLDLR + 291型であった。そのr-hsLDLRの産生は、固定相フィブラセルマトリクスシステム(Fibracel matrix system)を用いるバイオリアクターにおいて実施された。r-hsLDLRは均質に精製され、そしてマウスを免疫化するために使用された。

【0028】

最も優れたマウス免疫応答動物由来の免疫脾臓細胞は、ハイブリドーマの融合および生成のために使用された。

【0029】

50

本明細書において記載される抗体に関し、用語「モノクローナル抗体」は、モノクローナル抗体、キメラ抗体、完全にヒト化した抗体、可溶性または結合型で標識化され得る抗イデオタイプ抗体に対する抗体（抗-抗I d抗体）、ならびに、酵素的切断、ペプチド合成または組換え技術などの、しかしながらそれらに限定されないあらゆる既知の技術により提供されるそれらの断片を含むことを意味する。

【0030】

モノクローナル抗体は、抗原に特異的な抗体の実質的に均質な集団を含み、該集団は実質的に同種のエピトープ結合部位を含有する。M a b は当業者に知られる方法により得ることができる。たとえば、Kohler and Milstein, *Nature*, 256: 495-497 (1975); U. S. Patent No. 4, 376, 110; Ausubel et al., eds., Harlow and Lane *ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL*, Cold Spring Harbor Laboratory (1988); and Colligan et al., eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience N. Y., (1992-1996)を参照のこと。これらの参考文献の内容は、出典を指示することにより完全に本明細書に取りこまれる。このような抗体は、I g G、I g M、I g E、I g A、G I L Dおよびそれらのサブクラスを含むあらゆる免疫グロブリンのクラスであってよい。本発明のm A bを産生するハイブリドーマは、インビトロ、インサイチュまたはインビボで培養してもよい。インビボまたはインサイチュでの高力価のM a bの産生は、現在の好ましい産生方法である。

10

【0031】

キメラ抗体は、マウスM a b由来の可変領域およびヒト免疫グロブリン定常領域を有するものなどの、異なる部位が異なる動物種に由来する分子である。キメラ抗体は、主として、投与の際に免疫原性を低下させるため、および産生の際に収率をあげるために使用されている。たとえば、マウスのM a bはハイブリドーマからの高い収率であるが、ヒトにおいて高い免疫原性を有しているため、ヒト/マウスキメラM a b sが使用される。キメラ抗体およびそれらの産生方法は当業者に知られている（Cabilly et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 3273-3277 (1984); Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6851-6855 (1984); Boulianne et al., *Nature* 312: 643-646 (1984); Cabilly et al., *European Patent Application* 125023 (published November 14, 1984); Neuberger et al., *Nature* 314: 268-270 (1985); Taniguchi et al. *European Patent Application* 171496 (published February 19, 1985); Morrison et al. *European Patent Application* 173494 (published March 5, 1986); Neuberger et al., *PCT Application* WO 860153 3, (published March 13, 1986); Kudo et al., *European Patent Application* 184187 (published June 11, 1986); Sahagan et al., *J. Immunol.* 137: 1066-1074 (1986); Robinson et al., *International Patent Application* No. W08702671 (published May 7, 1987); Liu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 3439-3443 (1987); Sun et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 214-218 (1987); Better et al., *Science* 240: 1041-1043 (1988); Riechmann et al., *Nature* 332: 323-327; Harlow and Lane, *ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL*, supra.)。これらの参考文献は、出典を指示することにより完全に本明細書に取りこまれる。

20

30

【0032】

「完全なヒト化抗体」は、ヒト免疫グロブリンの可変領域および定常領域を共に含有する分子である。完全にヒト化した抗体は、治療の用途に潜在的に使用され得る。自己免疫疾患などの慢性および再発性の疾患に対しては繰り返し治療することが要求される。完全なヒト抗体の製造方法は、内因性のI g遺伝子を不活性にしたマウスにヒト免疫グロブリン(I g)遺伝子座を導入することによるマウス体液性免疫系の「ヒト化」、すなわちヒトI gを産生することができるマウス系統(ゼノマウス)の産生からなる。一般的な免疫応答を最終的に引き起こすために要求されるI g遺伝子座の物質的な構造ならびに遺伝子転位および発現過程に関して、I g遺伝子座は非常に複雑である。抗体多様性は、I g遺伝子座に存在する様々なV、DおよびJ遺伝子間のコンビナトリアル転位によって主に生成される。それらの遺伝子座はまた、抗体発現、対立遺伝子排除、クラススイッチおよび親

40

50

和性成熟を制御する散在性制御因子を含有する。転位していないヒト I g 導入遺伝子のマウスへの導入は、マウスの組換え機構がヒト遺伝子に適合することを証明した。さらに、様々なアイソタイプの抗原特異的 h u - m A b を分泌するハイブリドーマは、抗原によるゼノマウス免疫化によって得ることができる。

【 0 0 3 3 】

完全なヒト化抗体およびそれらの産生方法は、当業者に知られている (Mendez et al., Nature Genetics 15: 146-156 (1997); Buggemann et al., Eux J. Immunol. 21: 1323-1326 (1991); Tomizuka et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 722-727 (2000); Patent WO 98/24893)。

【 0 0 3 4 】

抗イデオタイプ (抗 I d) 抗体は、独特の決定基を認識し、一般に抗体の抗原結合部位に結合される抗体である。I d 抗体は、M a b の供給源として同種かつ同遺伝子型の動物 (たとえばマウス系統) を免疫化し、その M a b に対して抗 I d が製造されることによって製造され得る。免疫化された動物は、イデオタイプ決定基に対する抗体 (抗 I d 抗体) を産生することにより、免疫性を与える抗体のイデオタイプ決定基を認識し応答する。たとえば、U. S. Patent No. 4, 699, 880 を参照のこと。それは出典を指示することにより完全に本明細書に取りこまれる。

【 0 0 3 5 】

抗 I d 抗体はまた、いわゆる抗 - 抗 I d 抗体を産生するさらに他の動物において、免疫応答を誘導するための「免疫源」として使用され得る。抗 - 抗 I d は、抗 I d を誘導した本来の M a b と、エピトープが同一であってもよい。すなわち、M a b のイデオタイプ決定基に対する抗体を使用することにより、同一の特異性を有する抗体を発現するほかのクローンを同定することが可能である。

【 0 0 3 6 】

したがって、本発明の L D L R に対して生成された M a b 、そのアイソフォーム、アナログ、断片または誘導体は、B A L B / c マウスなどの適当な動物において抗 I d 抗体を誘導するために使用され得る。そのような免疫化されたマウス由来の脾臓細胞は、抗 I d M a b を分泌する抗 I d ハイブリドーマを産生するために使用される。さらには、抗 I d M a b を、カサガイ (keyhole limpet) ヘモシアニン (K L H) などの担体に結合し、さらなる B A L B / c マウスを免疫化するために使用し得る。それらのマウスからの血清は、前記 L D L R タンパク質またはそのアナログ、断片および誘導体のエピトープに特異的な本来の M a b の結合特性を有する抗 - 抗 I d 抗体を含有するであろう。

【 0 0 3 7 】

したがって、抗 I d M a b は、それら独自のイデオタイプエピトープ、または評価されたそのエピトープに構造的に類似する「イデオトープ」を有する。用語「モノクローナル抗体」はまた、完全な分子および、たとえば抗原に結合することができるその F a b および F (a b)₂ などの断片の双方を含むことを意図されている。F a b および F (a b)₂ 断片は、完全な抗体の F c 断片を欠き、血液循環からより早急に排除され、そして完全な抗体よりも非特異的組織結合が少ない (Wahl et al., J. Nucl. Med. 24: 316-325 (1983))。

【 0 0 3 8 】

本発明において有用な抗体の F a b および F (a b)₂ ならびにほかの断片は、本明細書において開示される完全な抗体分子用の方法にしたがい、L D L R タンパク質の検出および定量のために使用し得ることは評価されるであろう。そのような断片は、パピイン (F a b 断片を産生) またはペプシン (F (a b)₂ 断片を産生) などの酵素を用いるタンパク質分解的切断によって、一般に産生される。

【 0 0 3 9 】

モノクローナル抗体が分子に特異的に反応することができ、それにより分子が抗体に結合する場合は、モノクローナル抗体は分子に「結合することができる」といわれる。用語「エピトープ」は、抗体により結合され得るあらゆる分子の一部であって、またその抗体に

10

20

30

40

50

よっても認識される一部を指すことを意図されている。エピトープまたは「抗原決定基」は通常、アミノ酸または糖側鎖などの分子の化学的に活性な表面配置から構成され、特異的な3次元構造の特徴および固有の電荷特性を有する。

【0040】

「抗原」は、抗体により結合され得る分子または分子の一部であり、抗原はさらに、その抗原のエピトープに結合し得る抗体を動物に産生させることができる。抗原は1つ以上のエピトープを有し得る。前記で言及した特異的反応は、抗原は、高い選択的様式で、他の抗原によってつくられ得るほかの多数の抗体ではなく、その対応する抗体上のエピトープに反応することを示すものとして意図されている。

【0041】

本発明に有用な、抗体の断片を含む抗体は、試料中のLDLRタンパク質を量的または質的に検出するために、または本発明のLDLRタンパク質を発現する細胞の存在を検出するために使用され得る。これは、蛍光顕微鏡法、フローサイトメトリー検出法または蛍光測定検出法と組み合わせる、蛍光標識化抗体（下記を参照のこと）を用いる免疫蛍光技術により達成することができる。

【0042】

本発明において有用な抗体（またはその断片）は、本発明のLDLRタンパク質のインサイチュ検出法のための免疫蛍光法または免疫電子顕微鏡法などにおいて、組織学的に使用され得る。インサイチュ検出法は、患者から組織学的標本を取りだし、そして本発明の標識化抗体をその標本に供給することにより達成され得る。抗体（または断片）は、標識化抗体（または断片）を生物学的試料に適用することにより、または標識化抗体（または断片）を生物学的試料で覆うことにより提供されることが好ましい。そのような手法を使用することによって、LDLRタンパク質の存在だけでなくその検査される組織上の配置もまた、決定することができる。本発明を用いれば、当業者は、そのようなインサイチュ検出法を達成するために、広く様々な組織学的方法（染色手法など）を改変し得ることを、容易に理解するであろう。

【0043】

本発明のLDLRタンパク質用のそのような検定は、通常は、LDLRタンパク質を同定することができる標識化抗体の存在下において、生物学的流体、組織抽出物、リンパ球もしくは白血球などの採取したばかりの細胞、または組織培養においてインキュベーションされている細胞などの生物学的試料をインキュベーションし、ついで本分野において既知のあらゆる技術により該抗体を検出することを含む。

【0044】

生物学的試料は、ニトロセルロースなどの固相支持体または担体、または細胞、細胞片もしくは可溶性タンパク質を固定することができるほかの支持体または担体に結合してもよい。ついで、支持体または担体を適当な緩衝液で洗い、前記のように本発明したがって標識化抗体で処理する。固相支持体または担体はついで、結合していない抗体を除去するために緩衝液で2回洗う。ついで、前記固定支持体または担体上の結合した標識の量は、従来方法により検出される。

【0045】

「固相支持体」、「固相担体」、「固定支持体」、「固定担体」、「支持体」または「担体」は、抗原または抗体を結合することができるあらゆる支持体または担体を意図されている。公知の支持体または担体は、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロンアミラーゼ類、天然および修飾セルロース類、ポリアクリルアミド類、ガブロス (gabbros) ならびに磁鉄鉱を含む。担体の性質は、本発明の目的のために、ある程度可溶性あるいは不溶性のどちらかであり得る。支持体材料は、結合される分子が抗原または抗体に結合することができる限り、事実上あらゆる構造構成を有していてもよい。したがって、支持体または担体の構成は、ビーズのような球状、試験管の内面または棒の外表面のようなシリンダー状であってもよい。あるいは、その表面は、シート、検定細片 (test strip) などの平面であってもよい。好ましい支持体または担体はポ

10

20

30

40

50

リスチレンビーズを含む。当業者は、抗体を結合するほかの適当な担体を理解するであろうし、または日常の試験の用途により同様のことを確認することができるであろう。

【0046】

前記のように、本発明の得られた多くの抗体の結合活性は、既知の方法にしたがって測定され得る。当業者は、日常の試験を使用することによって、各測定法における作用のおよび最善の検定条件を決定することができるであろう。

【0047】

洗い、攪拌、振とう、濾過などのほかの工程は通常のもの、あるいは特定の状況に必要なものである場合、前記検定に追加してもよい。

【0048】

本発明の抗体が標識化され得る方法の1つは、酵素に抗体を結合し、酵素免疫検定(EIA)において使用するものである。その結果、のちに酵素が適当な基質にさらされると、たとえば分光光度計法、蛍光測定法または可視的方法によって検出され得る化学的部分を産生するための方法において、酵素は基質と反応する。抗体を検出できるように標識化するために使用される酵素は、リンゴ酸脱水素酵素、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、デルタ-5-ステロイドイソメラーゼ、酵母アルコール脱水素酵素、アルファ-グリセロリン酸脱水素酵素、トリオースリン酸イソメラーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、ベータ-ガラクトシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース-6-リン酸脱水素酵素、グルコアミラーゼおよびアセチルコリンエステラーゼを含むが、これらに限定されない。検出は、酵素に対する色素原基質を使用する比色分析法により達成され得る。検出はまた、同様に調整された標準物に対する基質の酵素的反応の程度を可視的に比較することにより、達成され得る。

【0049】

検出は、様々なほかの免疫検定を用いることにより達成してもよい。たとえば、抗体または抗体断片を放射活性標識することにより、放射性免疫検定法(RIA)を用いてR-PTPaseを検出することが可能である。RIAの適当な説明は、本明細書に出典を指示することにより取りこまれるChard, T.による“An Introduction to Radioimmuno Assay and Related Techniques”と題された章にとくに関連する、Work, T. S. et al., North Holland Publishing Company, NY (1978)によるLaboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biologyにみられる。放射活性アイソトープは、gカウンターまたはシンチレーションカウンターを使用した方法などにより、またはオートラジオグラフィーにより検出され得る。

【0050】

蛍光化合物により本発明の抗体を標識することも可能である。蛍光標識化抗体が適当な波長の光にさらされると、蛍光によりその存在が検出され得る。最も一般的に使用される蛍光標識化合物は、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、フィコエリトリン、ピコシアニン、アロフィコシアニン、O-フタルデヒド(o-phthaldehyde)およびフルオレサミンである。

【0051】

抗体はまた、 ^{152}E またはほかのランタニド類などの蛍光放射金属を用いて検出可能に標識化することができる。それらの金属は、ジエチレントリアミンペンタ酢酸(ETPA)などの金属キレート群を用いることにより、抗体に結合することができる。

【0052】

抗体はまた、化学発光化合物に結合することにより検出可能に標識化することができる。ついで、化学発光を付加した抗体の存在は、化学反応の過程で生じる発光の存在を検出することにより測定される。特に有用な化学発光標識化合物の例は、ルミノール、イソルミノール、セロマチックアクリジニウムエステル(theromatic acridinium ester)、イミダゾール、アクリジニウム塩およびシュウ酸エステルである。

【0053】

10

20

30

40

50

さらに、本発明の抗体を標識するために、生物発光化合物を使用してもよい。生物発光は、触媒タンパク質により化学発光反応の効率が增大される生物系において見出された、化学発光の1つの型である。生物発光タンパク質の存在は、発光の存在を検出することにより測定することができる。標識の目的で重要な生物発光化合物は、ルシフェリン、ルシフェラーゼおよびエクオリンである。

【0054】

本発明の抗体分子は、同様に「両側」または「サンドイッチ」検定として知られる免疫測定検定法における使用に適用されてもよい。典型的な免疫測定検定法において、定量の非標識化抗体（または抗体の断片）が固定支持体または担体に結合され、そして定量の検出可能に標識化された可溶性抗体を添加することにより、固相抗体、抗原および標識化抗体のあいだで形成される3元の複合体の検出および/または定量を行う。

10

【0055】

典型的で好ましい免疫測定検定は、まず、試験される試料と固相に結合する抗体を接触させ、二元の固相抗体 - 抗原複合体の形成によって試料から抗原を抽出する「フォワード」検定を含む。適当なインキュベーション後、固相支持体または担体を、液体試料の残渣（もしあるとすれば、未反応の抗原を含む）を除去するために洗い、ついで未知量の標識化抗体（「リポーター分子」として機能する）を含有する溶液と接触させる。非標識化抗体の中で、固定支持体または担体に結合した抗原と標識化抗体とを複合体にするための第2のインキュベーションののち、未反応の標識化抗体を除去するために固定支持体または担体を2回洗う。

20

【0056】

本発明の抗原を用いることによってまた有用であり得るもう1つの型の「サンドイッチ」検定において、いわゆる「同時」および「逆」検定が用いられる。同時検定は、固定支持体または担体に結合した抗体、および標識化抗体とともに同時に試験される試料に添加するために、1つのインキュベーション工程を含む。インキュベーションを完了したのち、液体試料の残渣および非複合体の標識化抗体を除去するために固定支持体または担体を洗った。固定支持体または担体に結合した標識化抗体の存在は、ついで、従来の「フォワード」サンドイッチ検定と同様に測定される。

【0057】

「逆」検定において、まず、標識化抗体の溶液を液体試料に徐々に添加し、ついで適当なインキュベーション期間が設けられたのちに、固定支持体または担体に結合した非標識化抗体を添加する。2回目のインキュベーションののち、試験試料の残渣および未反応の標識化抗体の溶液を除くために、固定相を従来の様式で洗う。ついで、固定支持体または担体に結合した標識化抗体の測定は、「同時」および「フォワード」検定と同様にして測定される。

30

【0058】

ここで、以下の非限定的な実施例を用いて本発明を説明する。

【0059】

[実施例]

実施例1 CHO_r-h s LDL Rの調製

40

2つの発現ベクター（アミノ酸残基 Asp (+4) から始まり Glu 291 (+291) までの LDL R の N 末端リガンド結合ドメインを含有する p s LDL R 01、および DHFR に対するマウス遺伝子を含有する p DHFR。双方とも SV40 初期領域のプロモーターおよび転写終結エレメントにより調節される）を用いる、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（DHFR）遺伝子を欠く CHO-DUKX 細胞 (Urlaub, G. et al., 1980) への共トランスフェクションにより、ヒト可溶性 LDL R を発現する安定な組換え体 CHO 細胞を生成した。トランスフェクションは、リポフェクトアミン (LipofectAmine) (ギブコ BRL 社 (Gibco BRL) 製) を用いる陽イオンリポソームにより、製造業者により記載されたプロトコルにしたがって実施した。トランスフェクションの 72 時間後、デオキシヌクレオシドおよびリボヌクレオシドを欠き、かつ 10% の透析 FCS を補充した選択培地に

50

細胞を移した。D H F R 活性を発現する細胞はコロニーを形成することができ、トリプシンを含ませたペーパーディスクで細胞をつりあげることによって単離した。細胞を増殖させ、ついで r - h s L D L R 活性に対するスクリーニングを行った。ついで、トランスフェクションされた細胞を用いて M T X による遺伝子増幅を行い、続いて安定なプロデューサークローンの子クローニングおよび選択を行った。

【 0 0 6 0 】

5 リットルの C e l l i G e n バイオリアクターにおける無血清培地 (ギブコ C H O - A - S F M 、 カタログ番号 9 5 - 0 0 9 1 D J) 中で、 # 3 3 - 1 0 - 2 9 - 2 1 と命名した安定な C H O プロデューサークローン細胞を用いて、 r - h s L D L R (+ 2 9 1 型) を産出した。粗製の収集物は、 0 . 8 - 0 2 μ カートリッジフィルター (ゲルマン (G e l m a n) カタログ番号 C S S 9 2 D S C C K) による濾過によって清澄化し、そして 5 - k D a 膜で覆って 1 0 0 倍に濃縮した。最初の免疫化に用いられた r - h s L D L R の + 2 9 1 型は、スモールスケール精製方法を用いて精製された。その方法において、 D E A E セファロス陽イオン交換カラムが用いられ、ついでブチル - T S K カラムにおける疎水の相互作用工程、続いて H T P カラムおよびセファクリル 1 0 0 カラムにおけるサイズ排除クロマトグラフィー (S E C) を行った。 S E C の分画 # 2 7 は、下記の実施例 9 記載の抗ウイルス検定において検出された 7 8 0 ユニット / μ g の特異的抗ウイルス活性を有していたので、 S E C の分画 # 2 7 を選択した。その分画におけるタンパク質を、 N 末端分析により、 r - h s L D L R として同定した。

【 0 0 6 1 】

C H O + 2 9 1 r - h s L D L R の第 2 の群を精製し、マウスの促進注射用に用いた。以下の工程、 a) 清澄化および粗製収集物の 1 0 0 倍濃縮、 b) H Q P O R O S 陰イオン交換カラム、および c) 2 つの疎水の相互作用 (H I C) 工程 (ブチル - T S K カラムでの捕捉およびフェニル 5 P W カラムによる流下) を含む、収率が改良された精密な工程を用いて精製した。最終の H I C 工程由来の非結合分画を透析し、そして H S - P O R O S 陽イオン交換カラムにより精製した。その最終工程はヒドロキシアパタイト (H T P) カラムであった。そして、 r - h s L D L R は約 9 0 % まで精製され、 R P - H P L C における単一の主要ピークとして溶出された。

【 0 0 6 2 】

実施例 2 マウスの免疫化

前記実施例 1 の S E C カラムの分画 # 2 7 の精製 r - h s L D L R 1 0 μ g を、 1 0 0 μ g / m l の濃度で、完全フロイントアジュバンド (C F A 、 5 0 % v / v) で均質化し、5 匹の 7 週齢の B a l b / C 雌マウスの肢に注射にした。

【 0 0 6 3 】

第 1 回の免疫化から 4 週間後、マウスは、 C F A の 5 0 % (v / v) 溶液における同分画の精製 r - h s L D L R 1 0 μ g により筋肉内注射で促進された。

【 0 0 6 4 】

第 2 回の注射から 2 週間後、以下の実施例 3 記載の直接的 E L I S A を用いて、 r - h s L D L R の抗体に対するマウス血清の試験を行なった。

【 0 0 6 5 】

第 2 回の注射の 1 0 週間後、 r - h s L D L R に最も顕著に特異的な免疫活性を有する 2 匹のマウス M - 1 および M - 2 を、前記実施例 1 記載の精密な精製方法で得られた精製 r - h s L D L R 1 0 μ g により、さらに促進させた。

【 0 0 6 6 】

1 4 週間後にマウスは採血され、 r - h s L D L R の抗体に対する試験を行った。ついで、マウスに P B S 中 r - h s L D L R 5 0 μ g の 2 回のさらなる促進薬を、1 回目は腹腔内に、そして 2 回目は 2 日後、腹腔内および静脈内の双方に与えた。

【 0 0 6 7 】

2 回目の注射から 2 週間後にマウスは採血され、その抗血清は、下記実施例 3 の直接的 E L I S A により、抗 r - h s L D L R 活性に対して試験された。各抗血清は 1 : 1 0 0 ~

10

20

30

40

50

1 : 3 2 0 0 0 に順次に希釈され、そして、前記実施例 1 記載の精密な精製方法により精製された r - h s L D L R を 1 0 U / 穴でコートした 9 6 穴プレート 2 組に用いた。検定用緩衝液および D M E M + P B S 含有 1 0 % H S + 1 % B S A またはゼラチン + 0 . 0 5 % ツイーン 2 0 + 0 . 0 5 % チメローサルを、ブランクとして各列の第 1 番目の穴に使用した。正常なマウス血清 (N M S) を、陰性コントロールとして、最後の 2 列に同じ希釈割合で用いた。酵素反応の吸光度を、4 9 2 および 4 0 5 n m において E L S A リーダーで測定した。

【 0 0 6 8 】

この試験結果は、マウス M - 1 の血清が r - h s L D L R に対し、より高い特異的免疫活性を有していることを示したので、犠牲死させ、ミエローマ細胞を用いて融合するために脾臓細胞を採取した (Eshhar Z, 1985) 。

10

【 0 0 6 9 】

実施例 3 抗血清試験の直接 E L I S A およびハイブリドーマクローンスクリーニング陽性抗血清のスクリーニングのための直接 E L I S A を、以下のように実施した。P B S + 1 % ゼラチン (シグマ社 (Sigma) 製、カタログ番号 G - 7 7 6 5) + 0 . 9 m M C a ⁺² および 0 . 5 m M M g ⁺²、p H 5 . 6 中 r - h s L D L R (実施例 1 の精密な精製方法により精製) 1 0 0 ユニット / m l の 1 0 0 μ l (以下、検定用緩衝液と呼ぶ) を用い、振とうしながら 9 0 分間 3 7 ° で 9 6 穴プレートをコートした。そのプレートを、P B S + 0 . 0 5 % ツイーン 2 0 (ポリオキシエチレン - モノラウリン酸ソルビタン - シグマ P - 1 3 7 9) (以下、洗浄溶液と呼ぶ) で 6 回洗った。

20

【 0 0 7 0 】

免疫化マウス由来の 1 : 1 0 0 ~ 1 : 3 2 0 0 0 に順次希釈された抗血清試料、またはハイブリドーマ細胞培養物由来の上清を穴に添加し、9 0 分間 3 7 ° で振とうしながらインキュベーションし、ついで洗浄溶液で 6 回洗った。

【 0 0 7 1 】

1 : 1 2 0 0 に希釈されたマウス F a b (シグマ社製、カタログ番号 4 6 0 1 - 1) の西洋ワサビペルオキシダーゼ (H R P) - A P A 複合ヤギ抗体 1 0 0 μ l を穴に添加し、9 0 分間 3 7 ° で振とうしながらインキュベーションし、ついで洗浄溶液で 6 回洗った。

【 0 0 7 2 】

基質溶液 1 0 0 μ l (O P D 1 錠および H₂O₂ 1 錠を 2 0 m l の水に溶解することにより調製) を穴に添加し、そして R T で 3 0 分間インキュベーションした。酵素反応は、1 0 0 μ l / 穴の 4 N H C l の添加により停止させた。

30

【 0 0 7 3 】

9 6 穴プレートにおける吸光度を 4 9 2 および 4 0 5 n m における E L I S A リーダーを用いて読みとり、得られた結果を、E L I S A リーダーに連結した P C コンピュータの M u l t i C a l c ソフトウェアによって、4 つのパラメトリックロジスティックアルゴリズムを用いて計算した。

【 0 0 7 4 】

実施例 4 融合、ハイブリドーマ製造、クローンの選択および腹水液からの抗体の精製融合方法およびハイブリドーマ細胞選択は、Eshhar Z, 1985 記載のプロトコルにしたがって実施した。つまり、融合する 2 ~ 4 日前に促進されたマウス M - 1 由来の脾臓細胞を、P E G を用いる短時間のインキュベーションによってミエローマ細胞と融合した。はじめに、P E G を D M E M でゆっくり希釈し、ついで遠心により完全に除去した。細胞を D M E M - H A T 培地に再懸濁し、約 3 . 4 × 1 0⁻⁴ 細胞 / 穴の濃度で 9 6 穴プレートに配置させ、8 % C O₂ インキュベータにおいて 3 7 ° で 1 0 ~ 1 4 日間インキュベーションした。1 0 日以内にすべてのハイブリドーマの穴の培地を、1 0 % ウマ血清 (H S) で補充した D M E M に交換した。前記実施例 3 記載の直接 E L I S A により、r - h s L D L R の M a b の存在に対するハイブリドーマ培養上清試料のスクリーニングを行った。検定用緩衝液および D M E M + 1 0 % H S をブランクとして使用した。M a b C 7 (アマシャム社 (Amersham) より商業的に入手可能) および M - 1 マウス抗血清を陽性コントロール

40

50

として使用し、可溶性 p 5 5 T N F 受容体に対するモノクローナル抗体を陰性コントロールとして使用した。培養上清において抗体の存在が検出された穴由来の細胞を 2 4 穴プレートに移し、ついで 2 5 c m² T - フラスコに移した。展開された培養は、r - h s L D L R に対する M a b の分泌についてモニターされた。陽性培養物由来の細胞のアンブルを液体窒素において凍結し保存した。

【 0 0 7 5 】

r - h s L D L R の抗体を検出するために、合計約 1 0 0 0 培養物をスクリーニングした。最も高い免疫活性を有する 5 4 の培養物を数回、再試験した。最も高い活性を有する 5 つの培養物 (1 2、2 8、2 9、3 0 および 5 0) を、9 6 穴プレートにおける限界希釈によりクローン化した。直接 E L I S A により、増殖するクローン由来の上清を数回、r - h s L D L R の抗体に対して試験した。

10

【 0 0 7 6 】

陽性ハイブリドーマクローンの細胞を組織培養フラスコにおいて 1 5 % ウマ血清を含有する D M E M で増殖させ、培養物の一部から得たアンブルを凍結した。並行して、異なるハイブリドーマクローンの細胞を 2 ~ 4 匹の各マウスに注射し、腹水液を得た。硫酸アンモニウム沈殿法により、またはタンパク質 G カラムのどちらかにおいて、抗体を腹水液から精製した。つまり、7 . 5 m l の腹水液を 2 0 m M リン酸緩衝液 p H 7 において 1 : 3 に希釈し、5 m l タンパク質 G カラム (C 1 0 / 1 0) に添加した。2 0 m M リン酸緩衝液 p H 7 を用いてカラムを洗い、1 0 0 m M グリシン緩衝液 p H 2 . 7 を用いて M a b を溶出した。1 M トリス緩衝液 p H 9 . 3 を用いて、溶出分画の p H を 7 ~ 7 . 5 に調整した。

20

【 0 0 7 7 】

実施例 5 E L I S A に使用するための M a b の対のスクリーニングおよび E L I S A パラメータの最適化

下記実施例 6 記載の r - h s L D L R 用サンドイッチ E L I S A における第 1 および第 2 抗体として使用される最適な M a b の対を選択するために、前記実施例 4 記載のように腹水液から精製された M a b は、マトリックス形式での一連の実験を実施するために使用された。つまり、硫酸アンモニウム沈殿法によりまたはタンパク質 G カラムのどちらかにおいて精製された 5 つのハイブリドーマ (# 1 2、2 8 . 2 8、2 9 . 0 8、3 0 および 5 0 . 0 5) 由来の腹水液で、9 6 穴プレートをコートした。C H O 細胞において産生された r - h s L D L R の + 2 9 1 型ならびに + 2 9 2 型 (アミノ酸残基 A s p + 4 から C y s + 2 9 2 まで) および + 3 3 1 (アミノ酸残基 A s p + 4 から C y s + 3 3 1 まで) 型を抗原として用い、抗体をスクリーニングした。サンドイッチ E L I S A における第 2 抗体としての適合性の短時間スクリーニングのために、前述の部分的に精製された各 M a b の 1 m l をビオチンにより標識した。つまり、硫酸アンモニウム沈殿法で精製された M a b の 1 . 5 m g を、0 . 5 M N a H C O₃ 3 0 μ l により、p H 8 . 5 に調整した。0 . 7 5 m g のビオチン - O S u N - ヒドロキシスクシニミド (Hydroxysuccinimido) - ビオチン (ビオチン - O S u、シグマ社製、カタログ番号 H 1 7 5 9、2 0 0 μ l D M S O における 5 m g の溶液) を抗体溶液に添加し、そして緩やかに振とうしながら室温で 2 時間インキュベーションし、ついで 2 ~ 8 において一晩インキュベーションした。ビオチン化 M a b と過剰な未反応ビオチン - O S u とを分けるために、反応溶液をセファデックス G - 2 5 M (ファルマシア社 (Pharmacia) カタログ番号 1 7 - 0 8 5 1 - 0 1) P D 1 0 カラムに適用した。

30

40

【 0 0 7 8 】

最初の予備実験は、M a b 2 9 . 0 8 および 3 0 が E L I S A における第 2 抗体として使用された場合、バックグラウンドを超えて最も高いシグナルを産生することを示した。

【 0 0 7 9 】

それら 2 つのクローンの反応は、プレートのコーティングに使用される抗体 1 2、2 8、2 9 . 0 8 および 5 0 とともに、第 2 抗体として再度試験された。この実験結果は明らかに、M a b 2 8 はコーティングに最適な抗体であることを示した。

50

【0080】

シグナル強度および特異性に関し、最もよい結果は、マイクロタイタープレートのコーティングに使用されたM a b 2 8および第2抗体としてビオチンで標識化したM a b 2 9 . 0 8により得られた。それらのM a bを使用することにより、r - h s L D L Rの3つの型すべて(+ 2 9 1、+ 2 9 2および+ 3 3 1)でよい結果が得られた。すべての型について、4 9 2 / 4 0 5 n mにおける吸光度は約1 . 3 O Dであった。

【0081】

r - h s L D L R抗原の3つの型は、0 . 9 ~ 1 0 0 0 n g / m lの濃度範囲の一連の希釈で分析された。コーティングに使用されたM a b 2 8および第2抗体としてビオチン化されたM a b 2 9 . 0 8により、用量反応曲線を得た。その組み合わせは、r - h s L D L Rの1 ~ 1 0 n g / m lの濃度範囲において、直線反応を示した。

【0082】

以下の条件を試験することによって、試薬濃度、インキュベーション時間、緩衝液およびプレートの選択など、E L I S A試験に影響し得る様々な条件を最適化した。

・ P B S中5 ~ 1 0 μ g / m lのM a b 2 8によるマイクロタイターウェルのコーティング

・ 緩衝液組成：

a) P B S + ツイーン 2 0

b) トリス + C a ⁺² + N a C l + ツイーン 2 0

・ ブロッキング溶液

a) P B S中1 %ゼラチン、0 . 0 5 %ツイーン、0 . 0 0 5 %チメローサル

b) P B S中1 % B S A、0 . 0 5 %ツイーン、0 . 0 0 5 %チメローサル

c) P B S中1 % F B S、0 . 0 5 %ツイーン、0 . 0 0 5 %チメローサル

d) P B S中1 % ミルク、0 . 0 5 %ツイーン、0 . 0 0 5 %チメローサル

e) Iブロック (I Block)、ハイペップ (Hy Pep) およびハイイースト (Hy Yeast)

・ 1 0 . 7 4 ~ 0 . 5 3 7 μ g / m lの濃度範囲に相当する1 : 5 0 0、1 : 1 0 0 0、1 : 2 0 0 0、1 : 4 0 0 0、1 : 8 0 0 0、1 : 1 0 0 0 0の濃度におけるビオチンで標識された第2 M a b 2 9 . 0 8

・ エクストルアビジン (Extravidin) 濃度：4 ~ 0 . 2 μ g / m lの濃度範囲に相当する1 : 5 0 0、1 : 1 0 0 0、1 : 2 0 0 0、1 : 4 0 0 0、1 : 8 0 0 0、1 : 1 0 0 0 0。

【0083】

それらの実験に基づき、下記実施例6記載のサンドイッチE L I S A試験のための最終手順を確立した。

【0084】

実施例6 r - h s L D L Rに対するサンドイッチE L I S Aの確立

M a b 2 8および2 9 . 0 8を用いて、r - h s L D L Rに対するサンドイッチE L I S Aを確立した。つまり、1 0 0 μ lのタンパク質G精製M a b 2 8 (5 μ g / m l)を用い、2 ~ 8 で一晩または3 7 で3時間、9 6穴プレートをコートした。ついで、P B S + 0 . 0 5 %ツイーン 2 0を用い、プレートを5回洗った。プレートを2 0 0 μ lのブロッキング溶液 (P B S + 1 % B S Aまたはゼラチン + 0 . 0 5 %ツイーン 2 0 + チメローサル 0 . 0 5 %) とともに3 7 で1時間または4 で一晩インキュベーションし、P B S + 0 . 0 5 %ツイーン 2 0で5回洗った。1 0 0 μ lの検量曲線抗原 (ブロッキング溶液で希釈された0 . 5 ~ 3 2 n g / m lのC H O + 2 9 1 r - h s L D L R) または試料を穴に添加し、ついで振とうしながら3 7 で9 0分間インキュベーションした。ついで、P B S + 0 . 0 5 %ツイーン 2 0を用いてプレートを5回洗った。

【0085】

ブロッキング溶液に溶解したビオチン化M a b 2 9 . 0 8 (0 . 6 7 μ g / m l) 1 0 0 μ l / 穴を添加し、そして3 7 で1時間、振とうしながらインキュベーションした。P B S + 0 . 0 5 %ツイーン 2 0を用いてプレートを5回洗った。市販のエクストルアビジ

10

20

30

40

50

ン - ペルオキシダーゼ複合体 (エクストルアビジン TM - ペルオキシダーゼ バイオメーカー (BioMakor)、カタログ番号 0645-1) を 1 : 10000 に希釈した 100 μ l を穴に添加し、1 時間 37 で振とうしながらインキュベーションした。ついで、PBS + 0.05% ツイーン 20 を用いてプレートを 5 回洗った。125 μ l の前記基質溶液を各穴に添加し、その色が所望の強度に達するまで約 10 分間インキュベーションした。反応は、125 μ l の 4N HCl を添加することにより停止した。96 穴プレートにおける吸光度を 492 および 405 nm 波長において ELISA リーダーを用いることにより読みとり、その結果を ELISA リーダーに連結した PC コンピュータの Multica 1c ソフトウェアにより計算した。

【0086】

10

実施例 7 モノクローナル抗体アイソタイプ

モノクローナル抗体 Ig アイソタイプは、市販のアイソタイプングキット (ファルミンゲン インターナショナル社製 (PharMingen International)) を用い、製造会社の検定手順にしたがって測定された。クローン 12.6、28、29.8 および 30 を Ig G₁ として同定し、一方、クローン 50.30 は Ig M クラスであることが分かった。

【0087】

実施例 8 SDS - PAGE ウェスタンブロット解析

精製した r - h s L D L R の + 291 型およびヒトの尿から精製された天然 L D L R を、r - h s L D L R に対して開発されたモノクローナル抗体を用いるウェスタンブロット解析により解析した。つまり、12% SDS ポリアクリルアミドゲルを、100 ng / レーンの r - h s L D L R の CHO + 291 型または天然の尿 h s L D L R もしくは T B P - 1 粗製採取物 (陰性コントロールとして) とともに還元条件下 (40 mM DTT) において添加した。1つのレーンには低分子量マーカー (LMW) を添加した。このサンプルの組み合わせを 5 回実施した。ゲル上で分離されたタンパク質を、電気溶出によりニトロセルロース膜に移した。10% 低脂肪ミルク、0.1% ツイーン 20 を含有する PBS において、膜を 16 時間インキュベーションした。膜を細片に切断し、選択した 5 つの Mab (12.6、30、50.30、28 または 29.08 (1 : 4000 希釈の腹水液)) のうち 1 つとともに、各細片を室温で 2 時間インキュベーションした。

20

【0088】

膜の細片は、0.1% ツイーン 20 含有 PBS で洗い (3 x 15 分間)、第 2 抗体 (西洋ワサビペルオキシダーゼ - アルカリホスファターゼ) (1 : 10000 希釈、バイオメーカー社製) とのヤギ抗マウス複合体) で 2 時間インキュベーションした。

30

【0089】

細片を、0.1% ツイーン 20 含有 PBS で洗った (3 x 15 分間)。陽性のバンドを、増強された化学発光 (ECL、アマシャム社製) により検出した。

【0090】

モノクローナル抗体 # 12.6 および # 29.8 は、ウェスタンブロット解析において、尿の精製 r - h s L D L R ならびに + 291 型の精製 r - h s L D L R の双方を認識した (図 2)。Mab 28 および 30 は、+ 291 型の精製 r - h s L D L R を認識した。

【0091】

40

実施例 9 モノクローナル抗体による r - h s L D L R 抗ウイルス活性の阻害

V S V / W I S H 系における細胞変性効果 (CPE) 阻害検定を用いることにより、r - h s L D L R に特異的に反応した Mab を、インビトロにおける r - h s L D L R (+ 291 型) の抗ウイルス活性を阻害する能力に対して試験した。

【0092】

W I S H 細胞 (ヒト羊膜が起源) を、37、5% CO₂ インキュベータにおいて、10% FBS および 4 mM グルタミンで補充した MEM で培養した。検定開始 24 時間前に、指数関数的に増殖する細胞を 96 穴組織培養プレートに 40000 細胞 / 穴の密度で播種した。試験すべき試料および標準を希釈し、細胞を有する穴に分配した。即時に、0.5 p f u / 細胞の感染多重度 (MOI) で V S V を穴に添加した。プレートを 16 ~ 18 時

50

間37 でインキュベーションし、ついでエタノールで洗った。グラムクリスタルバイオレット染色により、生存細胞の単層を観察した。標準に対する細胞変性効果の定量は、標準濃度に対する色密度 (colour density) をプロットすることにより、実施した。

【0093】

抗体の中和効果を解析するために、試験される Mab の腹水液の濃度を上げながら、r - h s L D L R を 37 で 30 分間プレインキュベーションした。ついで、それらの溶液を 96 マイクロタイタープレートにおける W I S H 細胞の培養物に添加し、水疱性口内炎ウイルス (V S V) を添加した。18 時間のインキュベーションののち、クリスタルバイオレットで残った細胞を染色することにより、V S V 媒介細胞溶解を測定した。標準濃度に対する色強度 (E L I S A リーダーにより測定) をプロットすることにより、標準に対する細胞変性効果の半定量を実施した。

10

【0094】

r - h s L D L R の濃度をあげながら、M a b の効果を試験した。表 1 に示すように、2 つの M a b (12 . 6 および 50 . 30) は中和活性を示すことが分かった。

【0095】

表 1 に示す実験において、2 つの M a b の阻害効果は、腹水液の 1 : 40 希釈で試験された。この希釈で、M a b 12 . 6 は、M a b 50 . 30 よりもいくらか高い活性を示した。これは、M a b の特性ならびに腹水液におけるそれらの濃度の違いに由来する結果かもしれない。

20

【0096】

M a b の阻害効果は、M a b 濃度に対して r - h s L D L R 濃度を上げることにより解消されることができた。実際に 62 . 5 U / m l の r - h s L D L R 濃度では、どちらの M a b も、解析された抗体濃度において、r - h s L D L R 活性に対する効果を有していなかった。

【0097】

【表 1】

表1:クローン12.6および50.30によるr-hsLDLR抗ウイルス活性の阻害①

VSV/Mab	LDLR 濃度 (U/ml)			
	0	2.5	12.5	62.5
- VSV	1.5	1.2	1.6	1.5
+ VSV	(0.25)	1	7 (1.7)	1.7
+VSV +クローン50.30	6 (0.4)	0.88	(1.25)	1.62
+VSV +クローン12.6	5 (0.5)	0.77	7 (0.7)	1.67

30

40

① VSVに対するr-hsLDLR抗ウイルス活性の阻害はWISH細胞の細胞溶解を媒介した。Mabの阻害効果は、腹水液の1:40希釈で測定した。生存細胞の数をOD値で表に示す。括弧内の番号は、0および12.5U/mlのLDLR濃度で実施した反復を示す。

【0098】

r - h s L D L R の抗ウイルス活性阻害は、M a b 12 . 6 および 50 . 30 の濃度を上げながら使用することによって測定された。M a b 12 . 6 は、1 : 40 希釈 (腹水液)

50

においては～60%で、および1:20500希釈においては～35%で、r-hsLDLRの抗ウイルス活性を阻害した。クローン50.30は、1:40希釈においては～45%で、および1:20500希釈においては～15%で、r-hsLDLR活性を阻害した。

【0099】

両Mabを用いて得られた用量反応曲線、および、阻害効果が過剰のr-hsLDLRによって減じられるという見解により、Mabはr-hsLDLRへの結合によってその効果を発揮することが示唆された。

【0100】

実施例10 モノクローナル抗体によるHCV複製の阻害

r-hsLDLR特異的なMabは、初代培養のヒト肝細胞におけるHCV複製阻害能力に関して試験された。FT167細胞培養物は、医療目的で葉切除を要する57歳の男性患者（結腸腫瘍の転移、右葉）由来であった。

【0101】

ヒト肝細胞の初代培養を、2工程コラゲナーゼ灌流法（the two steps collagenase perfusion method）（Maurel P. Adv. Drug Del. Rev. 22: 105-132 (1996), Pichard L. et al. Mol. Pharmacol. 41: 1047-1055 (1992), Ferrini JB. Et al. Chem-Biol Interactions 107: 31-45 (1997)）によって調製した。平板培養前の細胞の生存能力は、トリパンブルー排除試験（trypan blue exclusion test）を用いて測定された。3ml培地中4百万個の細胞を、コラゲンでプレコートした60mmプラスチック皿において平板培養した。長期無血清培養培地は、公表されたように補充したウィリアムズE（Williams' E）からなる（Lanford R. et al. In Vitro Cell Dev. Biol. 25: 174-182 (1989)）。ついで、その培地を48時間ごとに取り替えた。培養物は、空気および5%二酸化炭素からなる湿潤雰囲気下において37℃で維持した。それらの培養条件において、ヒト肝細胞は、少なくとも35日間、その分化した表現型を保ち（Ferrini JB. Et al. Chem-Biol Interactions 107: 31-45 (1997)）、HCV感染に感受性であり、ウイルスゲノム複製に対して許容的である（Fournier C. et al. J. Gen Virol. 79: 2367-2374 (1998)）。

【0102】

HCV陽性血清試料：EIA HCV3.0およびケイロン（Chiron）RIBA HCV3.0SIAにより抗HCV抗体陽性を検査された患者由来のヒト血清バンクが設立された。それらの患者の誰もが、HBVまたはHIVに共感染していなかった。各血清試料において、HCV RNAは、ロッシュ モニター（the Roche monitor）により定量され、ラインプローブ検定（line probe assay）により遺伝子型を決定された（イノ-リパ HCV II（Inno-Lipa HCV II）、イノジェネティクス社（Innogenetics）製）。凍結-解凍サイクルを避けるために、少量のアリコートで血清試料を-80℃で保存した。それらの実験において、試料S42（遺伝子型Ib；ウイルス負荷：410000コピー/ml）を使用した。

【0103】

感染およびつぎの処理のために、肝細胞培養物は、滅菌条件でP3研究室（ヒト感染性微生物に対する高度な締め出し）に移された。平板培養の3日後、単離の傷害から細胞が回復したとき、3ml培地中に存在するHCV陽性血清試料（S42）の25μlとともに一晩インキュベーションすることにより、肝細胞のインピトコ感染を実施した。感染後、3mlの新鮮な培地で細胞を3回洗い、そして長期培養培地における正常な条件下で培養を続けた。

【0104】

細胞を、r-hsLDLRに対する3つの異なるMab（Mab12.6、Mab28、Mab29.8）で処理した。感染の30分前に、細胞を2または8μg/mlの異なるMabに曝した。ついで、細胞を前記のように感染させた。

【0105】

コントロール培養物は、同様の条件下であるが抗ウイルス処理をせずに、感染させた。並

10

20

30

40

50

行実験において、比較のために同じ条件下で、同じ培養物を 5000 U/mL IFN で処理した (IFN は細胞における HCV 複製を強く阻害する)。すべての処理は 2 組で実施した。

【0106】

感染後 5 日で、培地を除去し、そして冷たいリン酸緩衝化食塩水を用いて培養物を 3 回洗った。グアニジニウムイソチオシアネート - 酸性フェノール抽出手順を用い、 4×10^6 肝細胞から RNA を精製した (Chomczynski PN, And Sacchi N, *Analyt. Biochem.* 162: 156-159 (1987))。沈殿した RNA をジエチルピロカルボネート (DEPC) 処理された水 50 μ l に溶かし、定量した。1 μ g の細胞 RNA を、鎖特異的 rTth RT-PCR 検定において解析した。

10

【0107】

感染の可能性を避けるために、鎖特異的 RT-PCR 検定は、つづいて 3 つの異なる部屋 (前 PCR 室、PCR 室および後 PCR 室) を用いて実施した。10 μ l の DEPC 処理された水に溶かした RNA をミネラルオイルで覆い、95 °C で 1 分間加熱した。温度を 70 °C に下げ、予め加熱された cDNA 反応混合液 10 μ l を添加した。ついでアニーリングのために温度を 2 分間 60 °C に下げ、そして rTth DNA ポリメラーゼ (パーキン - エルマー社 (Perkin-Elmer) 製) を用い、cDNA 反応を 20 分間 70 °C で実施した。温度を 70 °C に維持し、同時に、rTth RT 活性を抑制するために、Mn²⁺ のキレート剤として EGTA を含有する予め温められた緩衝液 40 μ l を添加した。反応チューブを 70 °C に維持し、同時に、予め温められた PCR 混合液 40 μ l を添加した。Gene Amp (登録商標) PCR システム 9600 (パーキン - エルマー社製) において実施された PCR 条件は、94 °C 1 分間の開始サイクル、94 °C 15 秒間、58 °C 30 秒間および 72 °C 30 秒間からなる 50 サイクル、および 72 °C 7 分間の最終伸長工程からなる。プラス鎖 HCV RNA 検定のために、リバースプライマー P3 のヌクレオチド配列は、5' - TGG / ATGCACGGTCTACGAGACCTC - 3' (nt 342 ~ 320) であり、そしてフォワードプライマー P4 のヌクレオチド配列は、5' - CACTCCCCCTGTGAGGA ACT - 3' (nt: 38 ~ 56) である (Laskus T. et al. *J. Gen. Virol.* 78: 2747-2750 (1997))。マイナス鎖を検出するために、同じプライマーを逆の順序で使用した。アガロース (2%) 上でのゲル電気泳動法によって増幅産物の 10 分の 1 を解析し、ついで BET で着色し、UV 光のもとで写真撮影を行った。すべての一連の実験において、合成 HCV RNA (+) および (-) 鎖の希釈を行い、培養された肝細胞の解析のための条件に似せるために、1 μ g の全肝臓 RNA を添加した。それらの混合液は、RT-PCR 検定および解析のための陽性コントロールとして使用した。

20

30

【0108】

図 3 は、LDLR に対する Mab の存在下では、HCV マイナス鎖の産生が培養 FT167 において完全に阻害されることを示す。したがって、ウイルスゲノムの複製は強く阻害された。その結果は、LDLR が HCV に対する受容体であり得るという見解に一致した。

【0109】

実施例 11 LDLR に対するキメラ抗体の産生

40

mRNA は、LDLR 特異的 mAb を産生するハイブリドーマ株から精製した。

【0110】

重鎖可変ドメイン由来のエクソン CH1 の 5' 末端に対する相補オリゴヌクレオチド (oligo 1) および軽鎖可変ドメインの C_H エクソンの 5' に対する相補オリゴヌクレオチド (oligo 2) を用い、精製した mRNA を鋳型として用いて、特異的な cDNA を合成した。

【0111】

2 つの cDNA が得られ、そのうちの 1 つは重鎖の可変領域 (LDLR 特異的) をコードし、他方は軽鎖の可変領域 (LDLR 特異的) をコードする。cDNA をクローン化して配列決定する。

50

【 0 1 1 2 】

キメラ重鎖の構築のために、クローン化したヒト I g 重鎖遺伝子の可変領域を、マウスの重鎖可変ドメイン (L D L R 特異的) をコードするクローン化 D N A に交換する (遺伝子操作を用いる) 。 遺伝子操作は、特異的な制限酵素を用いるヒト I g からの可変領域の除去、およびマウス可変領域のライゲーションを含む。キメラ軽鎖を得るために、同じ手順を実施した。

【 0 1 1 3 】

2 つの哺乳動物発現プラスミドを構築する。1 つはキメラ重鎖遺伝子を含み、他方はキメラ軽鎖遺伝子を含む。両ベクターは、ハイブリドーマ細胞株 (S P 6) を共トランスフェクションするために使用した。

10

【 0 1 1 4 】

L D L R 特異的 I g の産生は、トランスフェクションした細胞の培養上清を第 2 抗体として用いる E L I S A またはウェスタンブロットにより試験される。リガンドに対するキメラ抗体の親和性は、ピアコア (Biacore) によって記録された。

【 0 1 1 5 】

実施例 1 2 ヒト免疫グロブリン遺伝子座 (ゼノマウス) を有するように処理されたトランスジェニックマウスの作製および h L D L R に対するヒト m A b の製造

ゼノマウス作製は、W O 98/24893 および Mendez M, J. et al Nature genetics 15: 146-56 (1997) に記載されている。

【 0 1 1 6 】

ヒト重鎖可変領域 (約 1 0 0 0 k b) を含有する Y A C について、ヒト - 酵母人工染色体 (Y A C) ライブラリーをスクリーニングする (Y A C クローニング方法は、1 0 0 k b より大きい挿入サイズが必要とされる場合の選択方法である) 。

20

【 0 1 1 7 】

それらの Y A C は、サザンブロット解析およびパルスフィールド電気泳動法 (P F G E) により特徴づけられる。Y A C は生殖系列立体配置 (germ line configuration) において C μ 、C、D h および V h 領域を含むべきである。

【 0 1 1 8 】

Y A C に含有されるオーバーラップ配列を利用し、段階的な組換え計画によって、酵母で Y A C の組換えを行った。組換えを行う前に、Y A C (V 領域を有する) の 3' 末端を H P R T 選択マーカに結合した。組換えられた Y A C の構造は、P F G E およびサザンブロット解析により確認した (生殖系列立体配置における C 領域から V h 領域までのヒト重鎖遺伝子座の存在) 。

30

【 0 1 1 9 】

完全な 2 定常領域、マウスのエンハンサー、ネオマイシン耐性遺伝子を有するベクターを用いることにより Y A C 無動原体アームをターゲティングし、完全な可変領域を含有する最終的な重鎖 (すなわち、8 2 の V h 遺伝子、6 の J h 遺伝子および 3 つの異なる定常領域 C μ 、C、C' ならびにそれらに対応する調節配列) をもたらした。この Y A C を y H 2 と命名した。この構築をゼノマウスの産出用に使用した。

【 0 1 2 0 】

全カッパ遺伝子座を含有する再構築 Y A C にネオマイシン選択マーカを結合したことを除き、前記で使用したものと同様の計画をカッパ遺伝子座の再構築に利用した。この Y A C を y K 2 と命名した。

40

【 0 1 2 1 】

Y A C 含有酵母スフェロプラストと H P R T 欠損 E 1 4 . T G 3 B マウス E S 細胞との融合により、y H 2 を含有する Y A C を E S 細胞に導入する。H P R T 陽性細胞を選択する。陽性クローンを増殖させ、そしてサザンブロットおよび C H E F ブロット解析によって解析する。完全な y H 2 Y A C を含有するクローンを選択する。

【 0 1 2 2 】

E S 細胞における y K 2 Y A C の導入および選択は、y H 2 Y A C についての記載と同様

50

に実施した。

【 0 1 2 3 】

Y H 2 含有 E S 細胞をマウス C 5 7 B L / 6 J プラストサイトに微量注入する。作製されたキメラの雄は、子孫への生殖系遺伝に対して評価される。

【 0 1 2 4 】

y H 2 およびまたは y K 2 トランスジェニックマウスは D I マウスと交配される（遺伝子ターゲティングされ不活性化されたマウスの重鎖遺伝子座およびカッパ鎖遺伝子座に対してホモ接合型）。 y H 2 ; D I トランスジェニック株を y K 2 ; D I トランスジェニック株と交配させ、ゼノマウス株を作製した。

【 0 1 2 5 】

ゼノマウスにおける B 細胞発生の再構成および抗体産生は、フローサイトメトリーおよび E L I S A によって評価される。

【 0 1 2 6 】

ゼノマウスの免疫化は実施例 2 記載のように実施される。

【 0 1 2 7 】

ハイブリドーマ調製および陽性クローンのスクリーニング方法は、実施例 3 および 4 記載の方法と同様である。

【 0 1 2 8 】

ハイブリドーマクローン 1 2 . 6 、 2 8 、 2 9 . 8 、 3 0 および 5 0 . 3 0 は、ブダペスト条約にしたがって、ザ コレクション ナショナル デ カルチャー デ マイクロオーガニズムズ (the Collection Nationale de Culture de Microorganismes) (C N C M) 、 パスツール研究所、パリ、に寄託し、それぞれ寄託番号 I - 2 3 9 0 、 I - 2 3 9 1 、 I - 2 3 9 2 、 I - 2 3 9 3 および I - 2 3 9 4 を与えられた。

【 0 1 2 9 】

[参考文献]

Agnello, V., Abel, G., Elfahal, M., Knight, G. B., and Zhang, Q. X. (1999). " Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor [In Process Citation]. " Proc Natl Acad Sci U S A, 96(22), 12766-71.

Beisiegel, U., Schneider, W. J., Goldstein, J. L., Anderson, R. G., and Brown, M. S. (1981). " Monoclonal antibodies to the low density lipoprotein receptor as probes for study of receptor-mediated endocytosis and the genetics of familial hypercholesterolemia. " J Biol Chem, 256(22), 11923-31.

Bieri, S., Djordjevic, J. T., Daly, N. L., Smith, R., and Kroon, P. A. (1995). " Disulfide bridges of a cysteine-rich repeat of the LDL receptor ligand-binding domain. " Biochemistry, 34(40), 13059-65.

Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1976). " Familial hypercholesterolemia: A genetic defect in the low-density lipoprotein receptor. " N Engl J Med, 294(25), 1386-90.

Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1986). " A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. " Science, 232(4746), 34-47.

Chomczynski, P.N., And Sacchi, N. (1987). " Single -step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction " . Analyt. Biochem. 162:156-9.

Eshhar Z, 1985 " Monoclonal Antibody Strategy and Techniques " in " Hybridoma technology in the bioscience and medicine " , Edited by Timothy A. Springer (Plenum Publishing Corporation, 1985;Chapter 1)

Fischer. D. G., Tal. N., Novick, D., Barak, S., and Rubinstein, M. (1993). " An antiviral soluble form of the LDL receptor induced by interferon " . Science, 262(5131), 250-3.

10

20

30

40

50

- Fischer. D. G., Novick, D., Cohen, B, Rubinstein, M. (1994). " Isolation and characterization of a soluble form of the LDL receptor, an interferon-induced antiviral protein " . Proc Soc Exp Biol Med 206(3),228-32.
- Ferrini. J.B., Pichard,L.,Domergue, J., and Maurel, P. (1997). " Long-term primary cultures of adult human hepatocytes " . Chem-Biol Interactions 107:31-45.
- Fournier. C., Sureau. C., Coste. J., Ducos, J., Pageaux G., Larrey, D., Domergue, J., and Maurel, P. (1998). " In vitro infection of adult normal human hepatocytes in primary culture by hepatitis C virus " . J. Gen Virol. 79:2367-74.
- Goldstein, J. L., Anderson. R. G., and Brown, M. S. (1979). " Coated pits, coated vesicles. and receptor-mediated endocytosis. " Nature, 279(5715), 679-85. 10
- Goldstein, J. L., Dana, S. E., Brunschede, G. Y., and Brown, M. S. (1975). " Genetic heterogeneity in familial hypercholesterolemia: evidence for two different mutations affecting functions of low-density lipoprotein receptor. " Proc Natl Acad Sci U S A, 72(3), 1092-6.
- Lanford R. E., Carey, K. D., Estlack, L.E., Smith, G. C., and Hay, R. V. (1989) " Analysis of plasma protein and lipoprotein synthesis in long-term primary cultures of baboon hepatocytes maintained in serum-free medium " In Vitro Cell Dev. Biol. 25:174-82.
- Laskus T., Radkowski, M., Wang, L. F., Cianciara, J., Vargas, H., and Rakela, J. (1997). " Hepatitis C virus negative strand RNA is not detected in peripheral blood mononuclear cells and viral sequences are identical to those in serum : a case against extrahepatic replication " . J. Gen. Virol. 78 : 2747-50. 20
- Maurel P. (1996) " The use of adult human hepatocytes in primary culture and other in vitro systems to investigate drug metabolism in man " . Adv. Drug Del.Rev. 22 : 105-132
- Mendez. M. M., Green, L. L., Corvalan, J. R. F., Jia X-C., Maynard-Currie, E. E., Yang, X-D., Gallo. M. L., Louie, D. M., Lee, D. V., Erickson, K. L., Luna, J., Roy, C.M-N., Abderrahim, H., Kirshenbaum, F., Noguchi, M., Smith, D. M., Fukushima, A., Hales, J. F., Finer, M. H., Davis, C. G., Zsebo, K. M. and Jakobovits, A. (1997). " Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice " . Nature Genetics, 15, 146-56. 30
- Pichard. L., Fabre. I., Daujat, M., Domergue, J., Joyeux, H., and Maurel, P. (1992). " Effect of corticosteroids on the expression of cytochromes P450 and on cyclosporin A oxidase activity in primary cultures of human hepatocytes " . Mol. Pharmacol. 41:1047-55.
- Riachmann, L., Clark, M., Waldmann, H., and Winter, G. (1988) . " Reshaping human antibodies for therapy. " Nature, 332, 323-27.
- Sudhof, T. C., Goldstein, J. L., Brown, M. S., and Russell, D. W. (1985). " The LDL receptor gene : a mosaic of exons shared with different proteins. " Science, 228(4701), 815-22. 40
- Urlaub, G. and Chasin, L. A. (1980) Isolation of Chinese Hamster Cell Mutants Deficient in Dihydrofolate Reductase Activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-4220.

【図面の簡単な説明】

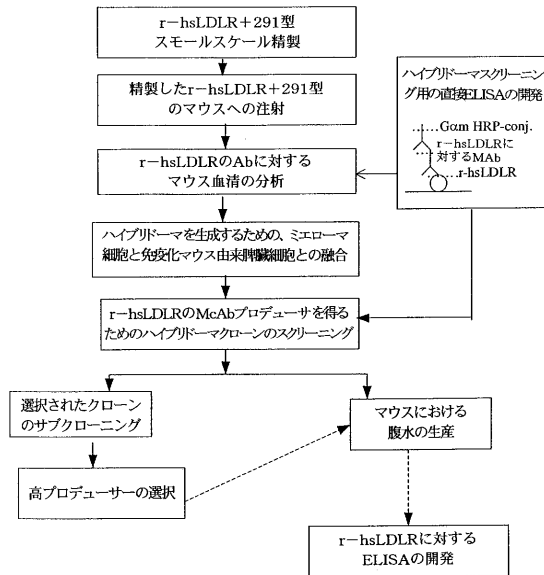
【図1】 図1は、r - h s L D L Rに対するモノクローナル抗体の開発を表すフローチャートを示す図である。

【図2】 図2は、レーン1にr - h s L D L Rの+ 2 9 1型、レーン2に尿h s L D L Rおよび陰性コントロールとしてのレーン3に組換え体ヒトp 5 5 T N F受容体 (r - h T B P - 1) の、各細片の下方に示すモノクローナル抗体を用いるウェスタンブロット解 50

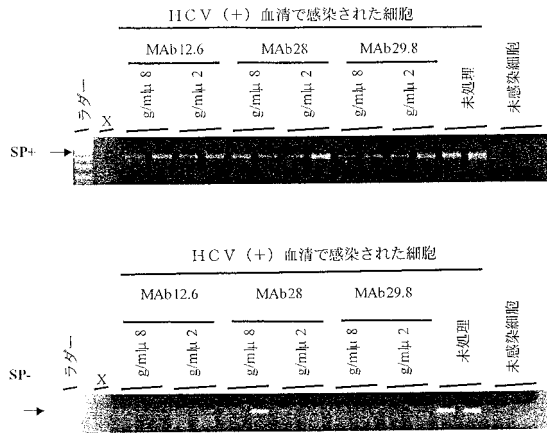
析を示す図である。図面左の矢印は分子量マーカの位置を示し、図面右の矢印は、各矢印の上に示される h s L D L R 型の位置を示す。

【図3】 図3は、培養FT167におけるHCV(+)鎖および(-)鎖の産生に対するMab12.6、28および29.8の効果を示す図である。細胞は、感染30分前にMab抗LDLR(8または2μg/ml)により処理された。ついで、細胞は25μlのHCV(+)血清(N°42;1b)で一晩感染させた。感染の翌日、3回の洗いを実施し、そして48時間ごとに新しい培地を添加して交換した。感染5日後に肝細胞を採取し、RNAを精製し、そして1μgの細胞のRNAをrTth RT-PCR(パーキンエルマー社製)により解析した。検定は2回実施した。+SP:プラス鎖RNA検定;-SP:マイナス鎖RNA検定;X:ブランク

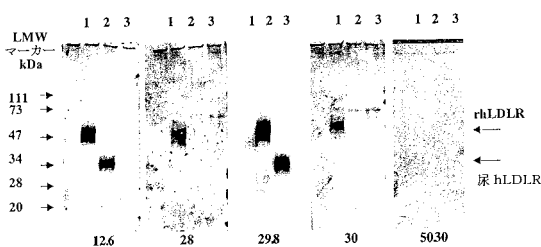
【図1】



【図3】



【図2】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 31/14	(2006.01)	A 6 1 P 31/14	
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	A

微生物の受託番号 CNCM I-2391

微生物の受託番号 CNCM I-2392

微生物の受託番号 CNCM I-2394

前置審査

- (72)発明者 スイッサ、ダニー
イスラエル国、7 6 4 6 8 レホボト、モスコビツ ストリート 2 8
- (72)発明者 ベルザー、イラナ
イスラエル国、7 5 4 8 3 リシヨン レ-ジオン、ハラシュバ ストリート 1 0
- (72)発明者 アントネッティ、フランチェスコ
イタリア共和国、イ - 0 0 1 7 9 ローマ、ピア アマデオ チルベルッチ、3 5
- (72)発明者 スモラルスキー、モーシェ
イスラエル国、7 6 2 7 3 レホボト、グルスキン ストリート 9
- (72)発明者 ドレアノ、ミシェル
フランス共和国、エフ - 7 4 1 6 0 コロンジェ - ス - サレブ、シュメン デ ボットクルウ、1 6 9

審査官 高山 敏充

- (56)参考文献 J. Biol. Chem. , 1 9 8 9 年 , Vol. 264, No. 16 , pp.9533-9538
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. , 1 9 9 9 年 , Vol. 96, No. 22 , pp.12766-12771
J. Biol. Chem. , 1 9 8 7 年 , Vol. 262, No. 36 , pp.17443-17449
ACTA BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA SINICA , 1 9 9 1 年 , Vol. 23, No. 3 , pp.189-195

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C12N 15/00-15/90

C07K 1/00-19/00

PubMed

CAplus/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

专利名称(译)	抗人LDL受体的单克隆抗体，其制备和用途		
公开(公告)号	JP4768193B2	公开(公告)日	2011-09-07
申请号	JP2001567800	申请日	2001-03-08
[标]申请(专利权)人(译)	应用研究系统ARS股份公司		
申请(专利权)人(译)	应用研究系统Eiaruesu控股Namuroze芬恩笔记本闭嘴		
当前申请(专利权)人(译)	默克雪兰诺兴业ANONYME		
[标]发明人	ヨナフナクム スイッサダニー ベルザーイラナ アントネッティフランチェスコ スモラルスキーモーシェ ドレアノミシエル		
发明人	ヨナフ、ナクム スイッサ、ダニー ベルザー、イラナ アントネッティ、フランチェスコ スモラルスキー、モーシェ ドレアノ、ミシエル		
IPC分类号	C07K16/28 G01N33/53 G01N33/577 C12N5/10 A61K39/395 A61P31/14 C12N15/09 C07K C12N C12N15/02 C12P21/08 G01N		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P31/00 A61P31/14 A61P31/20 C07K16/28 Y10S436/82		
FI分类号	C07K16/28.ZNA G01N33/53.D G01N33/577.B C12N5/00.102 A61K39/395.N A61P31/14 C12N15/00.A		
审查员(译)	高山俊光		
优先权	135025 2000-03-13 IL 139217 2000-10-23 IL		
其他公开文献	JP2004506603A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了针对LDL受体的单克隆抗体，其可用于LDL的鉴定和纯化以及例如LDL的治疗。丙型肝炎感染。

VSV/Mab	LDLR 濃度 (U/ml)			
	0	2.5	12.5	62.5
- VSV	1.5	1.2	1.6	1.5
+ VSV	(0.25)	1	7 (1.7)	1.7
+VSV +クロン50.30	6 (0.4)	0.88	(1.25)	1.62
+VSV +クロン12.6	5 (0.5)	0.77	7 (0.7)	1.67