

(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2014-519337

(P2014-519337A)

(43) 公表日 平成26年8月14日 (2014. 8. 14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 B O 6 4
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 B O 6 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 1	4 H O 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 35 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2014-515154 (P2014-515154)	(71) 出願人	591003013
(86) (22) 出願日	平成24年6月12日 (2012. 6. 12)		エフ・ホフマンーラ ロシュ アーゲー
(85) 翻訳文提出日	平成26年2月13日 (2014. 2. 13)		F. HOFFMANN-LA ROCH
(86) 国際出願番号	PCT/EP2012/061074		E AKTIENGESSELLSCHAF
(87) 国際公開番号	W02012/171896		T
(87) 国際公開日	平成24年12月20日 (2012. 12. 20)		スイス・シーエイチー４０７０バーゼル・
(31) 優先権主張番号	11169924.5		グレンツアーヘルストラツセ１２４
(32) 優先日	平成23年6月15日 (2011. 6. 15)	(74) 代理人	110001508
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		特許業務法人 津国
(31) 優先権主張番号	11174755.6	(74) 代理人	100078662
(32) 優先日	平成23年7月20日 (2011. 7. 20)		弁理士 津国 肇
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100131808
			弁理士 柳橋 泰雄
		(74) 代理人	100119079
			弁理士 伊藤 佐保子
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 A B C A 1 ポリペプチドに結合する抗体

(57) 【要約】

本発明は、ネイティブな A B C A 1 ポリペプチドに結合する単離された抗体、および組織試料中の A B C A 1 ポリペプチドの検出のためのその使用に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

A B C A 1 ポリペプチドに結合する単離された抗体であって、前記抗体は、ネイティブな A B C A 1 ポリペプチドに結合する、前記抗体。

【請求項 2】

前記 A B C A 1 ポリペプチドがヒト A B C A 1 ポリペプチドである、請求項 1 の単離された抗体。

【請求項 3】

モノクローナル抗体である、請求項 1 または 2 の単離された抗体。

【請求項 4】

前記抗体は、適切な動物を、A B C A 1 ポリペプチド、好ましくはヒト A B C A 1 ポリペプチドを発現している全細胞を用いて免疫化することによって産生される、請求項 1 ～ 3 の単離された抗体。

【請求項 5】

前記抗体が、ハイブリドーマ細胞株 A B C A 1 - 3 / 8 4 (D S M A C C 3 1 0 9)、ハイブリドーマ細胞株 A B C A 1 - 3 / 1 2 5 (D S M A C C 3 1 1 0) およびハイブリドーマ細胞株 A B C A 1 - 4 / 1 8 (D S M A C C 3 1 1 1) からなる群より選択されたハイブリドーマ細胞株から得ることのできる抗体の V H ドメインの C D R 3、並びに、ハイブリドーマ細胞株 A B C A 1 - 3 / 8 4 (D S M A C C 3 1 0 9)、ハイブリドーマ細胞株 A B C A 1 - 3 / 1 2 5 (D S M A C C 3 1 1 0) およびハイブリドーマ細胞株 A B C A 1 - 4 / 1 8 (D S M A C C 3 1 1 1) からなる群より選択されたハイブリドーマ細胞株から得ることのできる抗体の V L ドメインの C D R 3 を含む、請求項 1 ～ 4 の単離された抗体。

【請求項 6】

前記抗体が、ハイブリドーマ細胞株 A B C A 1 - 3 / 8 4 (D S M A C C 3 1 0 9)、ハイブリドーマ細胞株 A B C A 1 - 3 / 1 2 5 (D S M A C C 3 1 1 0) およびハイブリドーマ細胞株 A B C A 1 - 4 / 1 8 (D S M A C C 3 1 1 1) からなる群より選択されたハイブリドーマ細胞株から得ることのできる抗体の V H ドメインから得ることのできる抗体の V H ドメインの C D R 1 から C D R 3、並びに、ハイブリドーマ細胞株 A B C A 1 - 3 / 8 4 (D S M A C C 3 1 0 9)、ハイブリドーマ細胞株 A B C A 1 - 3 / 1 2 5 (D S M A C C 3 1 1 0) およびハイブリドーマ細胞株 A B C A 1 - 4 / 1 8 (D S M A C C 3 1 1 1) からなる群より選択されたハイブリドーマ細胞から得ることのできる抗体の V L ドメインの C D R 1 から C D R 3 を含む、請求項 1 ～ 5 の単離された抗体。

【請求項 7】

前記抗体が、A B C A 1 - 3 / 8 4 (D S M A C C 3 1 0 9)、ハイブリドーマ細胞株 A B C A 1 - 3 / 1 2 5 (D S M A C C 3 1 1 0) およびハイブリドーマ細胞株 A B C A 1 - 4 / 1 8 (D S M A C C 3 1 1 1) からなる群より選択されたハイブリドーマ細胞株から得ることのできる抗体の V H ドメインおよび V L ドメインを含む、請求項 1 ～ 6 の単離された抗体。

【請求項 8】

前記抗体が、ハイブリドーマ細胞株 A B C A 1 - 3 / 8 4 (D S M A C C 3 1 0 9)、ハイブリドーマ細胞株 A B C A 1 - 3 / 1 2 5 (D S M A C C 3 1 1 0) およびハイブリドーマ細胞株 A B C A 1 - 4 / 1 8 (D S M A C C 3 1 1 1) からなる群より選択されたハイブリドーマ細胞株によって産生される、請求項 1 ～ 7 の単離された抗体。

【請求項 9】

ハイブリドーマ細胞株 A B C A 1 - 3 / 8 4 (D S M A C C 3 1 0 9)、ハイブリドーマ細胞株 A B C A 1 - 3 / 1 2 5 (D S M A C C 3 1 1 0) およびハイブリドーマ細胞株 A B C A 1 - 4 / 1 8 (D S M A C C 3 1 1 1) からなる群より選択されたハイブリドーマ細胞株。

10

20

30

40

50

【請求項 10】

ハイブリドーマ細胞株 ABCA1-3/84 (DSM ACC3109)、ハイブリドーマ細胞株 ABCA1-3/125 (DSM ACC3110) およびハイブリドーマ細胞株 ABCA1-4/18 (DSM ACC3111) からなる群より選択されたハイブリドーマ細胞株から得ることのできる抗体の VH ドメインをコードする配列を含む単離された核酸。

【請求項 11】

ハイブリドーマ細胞株 ABCA1-3/84 (DSM ACC3109)、ハイブリドーマ細胞株 ABCA1-3/125 (DSM ACC3110) およびハイブリドーマ細胞株 ABCA1-4/18 (DSM ACC3111) からなる群より選択されたハイブリドーマ細胞株から得ることのできる抗体の VL ドメインをコードする配列を含む単離された核酸。

10

【請求項 12】

ハイブリドーマ細胞株 ABCA1-3/84 (DSM ACC3109)、ハイブリドーマ細胞株 ABCA1-3/125 (DSM ACC3110) およびハイブリドーマ細胞株 ABCA1-4/18 (DSM ACC3111) からなる群より選択されたハイブリドーマ細胞株によって産生された抗体をコードする配列を含む単離された核酸。

【請求項 13】

請求項 10～12 の核酸を含むベクター。

【請求項 14】

請求項 13 のベクターを含む宿主細胞。

20

【請求項 15】

請求項 16 の宿主細胞を培養して、よって抗体を産生することを含む、抗体の産生法。

【請求項 16】

動物の組織試料中の ABCA1 ポリペプチドの検出のための請求項 1～8 の抗体の使用。

【請求項 17】

前記組織試料が全血である、請求項 16 の使用。

【請求項 18】

前記動物がヒト被験者である、請求項 16 または 17 の使用。

30

【請求項 19】

c) 動物の組織試料を準備する工程、
d) 請求項 1～8 の抗体を使用して工程 a) の試料中の ABCA1 ポリペプチドを検出する工程を含む、
動物の組織試料中の ABCA1 ポリペプチドの検出のための方法。

【請求項 20】

前記組織試料が全血である、請求項 19 の方法。

【請求項 21】

前記動物がヒト被験者である、請求項 19 または 20 の方法。

40

【請求項 22】

工程 b) における ABCA1 ポリペプチドの検出がフローサイトメトリーによって行われる、請求項 19～21 の方法。

【請求項 23】

特に前記の実施例を参照して、本明細書で前記されたような本発明。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ABCA1 ポリペプチドに結合する抗体、および ABCA1 ポリペプチドを検出するための方法におけるその使用に関する。

【0002】

50

A T P 結合カセット輸送体 A 1 (A B C A 1) は、細胞外にある脂質の乏しい H D L 粒子にコレステロールおよびリン脂質の搬出を媒介する A T P 依存性輸送体である。ヒト A B C A 1 ポリペプチドのアミノ酸配列が配列番号 1 に示される。A B C A 1 は、リン脂質およびアポリポタンパク質による新生 H D L 粒子の構築に必須である。A B C A 1 は、細胞からアポリポタンパク質への脂質の搬出の非常に重要なレギュレーターとして機能し、従って、アテローム動脈硬化症のリスクを低減することに関与する。A B C A 1 は、血漿中 H D L レベルに影響を及ぼす点で非常に重要である。肝臓および小腸で活性であり、大半の循環中 H D L を生成する。A B C A 1 をコードする遺伝子の異常は、家族性低アルファリポタンパク血症 (F H A) の遺伝的原因の 1 つであることが示された。

【 0 0 0 3 】

10

市販の抗 A B C A 1 抗体は、組織試料中のネイティブな A B C A 1 ポリペプチドの検出には適していない。

【 0 0 0 4 】

それ故、組織試料中のネイティブな A B C A 1 ポリペプチドを検出することのできる抗 A B C A 1 抗体が必要である。

【 0 0 0 5 】

第 1 の局面において、本発明は、ネイティブな A B C A 1 ポリペプチドに結合する単離された抗体に関する。

【 0 0 0 6 】

特定の態様において、A B C A 1 ポリペプチドはヒト A B C A 1 ポリペプチドである。

20

【 0 0 0 7 】

さらなる特定の態様において、抗 A B C A 1 抗体はモノクローナル抗体である。

【 0 0 0 8 】

さらに特定の態様において、前記抗体は、適切な動物を、A B C A 1 ポリペプチド、好ましくはヒト A B C A 1 ポリペプチドを発現している全細胞を用いて免疫化することによって産生される。

【 0 0 0 9 】

さらに特定の態様において、前記抗体は、ハイブリドーマ細胞株 A B C A 1 - 3 / 8 4 (D S M A C C 3 1 0 9)、ハイブリドーマ細胞株 A B C A 1 - 3 / 1 2 5 (D S M A C C 3 1 1 0) およびハイブリドーマ細胞株 A B C A 1 - 4 / 1 8 (D S M A C C 3 1 1 1) からなる群より選択されたハイブリドーマ細胞株から得ることのできる抗体の V H ドメインの C D R 3、並びに、ハイブリドーマ細胞株 A B C A 1 - 3 / 8 4 (D S M A C C 3 1 0 9)、ハイブリドーマ細胞株 A B C A 1 - 3 / 1 2 5 (D S M A C C 3 1 1 0) およびハイブリドーマ細胞株 A B C A 1 - 4 / 1 8 (D S M A C C 3 1 1 1) からなる群より選択されたハイブリドーマ細胞から得ることのできる抗体の V L ドメインの C D R 3 を含む。

30

【 0 0 1 0 】

別の特定の態様において、前記抗体は、ハイブリドーマ細胞株 A B C A 1 - 3 / 8 4 (D S M A C C 3 1 0 9)、ハイブリドーマ細胞株 A B C A 1 - 3 / 1 2 5 (D S M A C C 3 1 1 0) およびハイブリドーマ細胞株 A B C A 1 - 4 / 1 8 (D S M A C C 3 1 1 1) からなる群より選択されたハイブリドーマ細胞株から得ることのできる抗体の V H ドメインから得ることのできる抗体の V H ドメインの C D R 1 から C D R 3、並びに、ハイブリドーマ細胞株 A B C A 1 - 3 / 8 4 (D S M A C C 3 1 0 9)、ハイブリドーマ細胞株 A B C A 1 - 3 / 1 2 5 (D S M A C C 3 1 1 0) およびハイブリドーマ細胞株 A B C A 1 - 4 / 1 8 (D S M A C C 3 1 1 1) からなる群より選択されたハイブリドーマ細胞から得ることのできる抗体の V L ドメインの C D R 1 から C D R 3 を含む。

40

【 0 0 1 1 】

さらに特定の態様において、前記抗体は、A B C A 1 - 3 / 8 4 (D S M A C C 3 1 0 9)、ハイブリドーマ細胞株 A B C A 1 - 3 / 1 2 5 (D S M A C C 3 1 1 0) およびハイブリドーマ細胞株 A B C A 1 - 4 / 1 8 (D S M A C C 3 1 1 1) からなる群よ

50

り選択されたハイブリドーマ細胞株から得ることのできる抗体のVHドメインおよびVLドメインを含む。

【0012】

さらに特定の態様において、前記抗体は、ハイブリドーマ細胞株ABCA1-3/84 (DSM ACC3109)、ハイブリドーマ細胞株ABCA1-3/125 (DSM ACC3110) およびハイブリドーマ細胞株ABCA1-4/18 (DSM ACC3111) からなる群より選択されたハイブリドーマ細胞株によって産生される。

【0013】

別の局面において、本発明は、ハイブリドーマ細胞株ABCA1-3/84 (DSM ACC3109)、ハイブリドーマ細胞株ABCA1-3/125 (DSM ACC3110) およびハイブリドーマ細胞株ABCA1-4/18 (DSM ACC3111) からなる群より選択されたハイブリドーマ細胞株に関する。

10

【0014】

別の局面において、本発明は、ハイブリドーマ細胞株ABCA1-3/84 (DSM ACC3109)、ハイブリドーマ細胞株ABCA1-3/125 (DSM ACC3110) およびハイブリドーマ細胞株ABCA1-4/18 (DSM ACC3111) からなる群より選択されたハイブリドーマ細胞株から得ることのできる抗体のVHドメインをコードする配列を含む単離された核酸に関する。

【0015】

別の局面において、本発明は、ハイブリドーマ細胞株ABCA1-3/84 (DSM ACC3109)、ハイブリドーマ細胞株ABCA1-3/125 (DSM ACC3110) およびハイブリドーマ細胞株ABCA1-4/18 (DSM ACC3111) からなる群より選択されたハイブリドーマ細胞株から得ることのできる抗体のVLドメインをコードする配列を含む単離された核酸を提供する。

20

【0016】

別の局面において、本発明は、ハイブリドーマ細胞株ABCA1-3/84 (DSM ACC3109)、ハイブリドーマ細胞株ABCA1-3/125 (DSM ACC3110) およびハイブリドーマ細胞株ABCA1-4/18 (DSM ACC3111) からなる群より選択されたハイブリドーマ細胞株によって産生された抗体をコードする配列を含む単離された核酸を提供する。

30

【0017】

別の局面において、本発明は、本発明の核酸を含むベクター、および本発明のベクターを含む宿主細胞を提供する。

【0018】

別の局面において、本発明は、本発明の宿主細胞を培養して、よって抗体を産生することを含む、抗体の産生法を提供する。

【0019】

別の局面において、本発明は、動物の組織試料中のABCA1ポリペプチドの検出のための本発明の抗体の使用を提供する。

【0020】

本発明の使用の特定の態様において、前記組織試料は全血である。

40

【0021】

本発明の使用の特定の態様において、前記動物はヒト被験者である。

【0022】

別の局面において、本発明は、

a) 動物の組織試料を準備する工程、

b) 本発明の抗体を使用して工程a)の試料中のABCA1ポリペプチドを検出する工程を含む、

動物の組織試料中のABCA1ポリペプチドの検出のための方法を提供する。

【0023】

50

特定の態様において、前記組織試料は全血である。

【0024】

特定の態様において、前記動物はヒト被験者である。

【0025】

特定の態様において、工程b)におけるABCA1ポリペプチドの検出はフローサイトメトリーによって行なわれる。

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図1】図1は、「染色指数」という用語の可視化である。青色：ABCA1を発現しているFLP293細胞株；白色：親細胞株293。

10

【図2a】FACSアッセイにおいて市販の抗ABCA1抗体Novus DyLight 488を使用しての、ABCA1を発現しているFLP293細胞株（FLP293／ABCA1細胞株）におけるABCA1の表面発現の検出；染色指数は1.54である（蛍光FLP293ABCA1細胞株／蛍光FLP293親細胞株）；青色：ABCA1を発現しているFLP293細胞株；白色：親細胞株293。抗体希釈率：1：200。

【図2b】FACSアッセイにおいて市販の抗ABCA1抗体ab81950ビオチンを使用しての、ABCA1を発現しているFLP293細胞株（FLP293／ABCA1細胞株）におけるABCA1の表面発現の検出；染色指数は1.24である（蛍光FLP293ABCA1細胞株／蛍光FLP293親細胞株）；青色：ABCA1を発現しているFLP293細胞株；白色：親細胞株293。抗体希釈率：1：200。

20

【図2c】FACSアッセイにおいて市販の抗ABCA1抗体Novusビオチンを使用しての、ABCA1を発現しているFLP293細胞株（FLP293／ABCA1細胞株）におけるABCA1の表面発現の検出；染色指数は1.28である（蛍光FLP293ABCA1細胞株／蛍光FLP293親細胞株）；青色：ABCA1を発現しているFLP293細胞株；白色：親細胞株293。抗体希釈率：1：200。

【図2d】FACSアッセイにおいて市販の抗ABCA1抗体ab18180を使用しての、ABCA1を発現しているFLP293細胞株（FLP293／ABCA1細胞株）におけるABCA1の表面発現の検出；染色指数は1.41である（蛍光FLP293ABCA1細胞株／蛍光FLP293親細胞株）；青色：ABCA1を発現しているFLP293細胞株；白色：親細胞株293。抗体希釈率：1：200。

30

【図2e】FACSアッセイにおいて市販の抗ABCA1抗体ab66217を使用しての、ABCA1を発現しているFLP293細胞株（FLP293／ABCA1細胞株）におけるABCA1の表面発現の検出；染色指数は1.84である（蛍光FLP293ABCA1細胞株／蛍光FLP293親細胞株）；青色：ABCA1を発現しているFLP293細胞株；白色：親細胞株293。抗体希釈率：1：200。

【図3a】FACSアッセイにおいて本発明の抗ABCA1抗体ABCA1-3／84を使用しての、ABCA1を発現しているFLP293細胞株（FLP293／ABCA1細胞株）におけるABCA1の表面発現の検出；染色指数は8.9である（蛍光FLP293ABCA1細胞株／蛍光FLP293親細胞株）；青色：ABCA1を発現しているFLP293細胞株；白色：親細胞株293。抗体濃度：0.1 µg/ml。

40

【図3b】FACSアッセイにおいて本発明の抗ABCA1抗体ABCA1-3／84を使用しての、ABCA1を発現しているFLP293細胞株（FLP293／ABCA1細胞株）におけるABCA1の表面発現の検出；染色指数は10.4である（蛍光FLP293ABCA1細胞株／蛍光FLP293親細胞株）；青色：ABCA1を発現しているFLP293細胞株；白色：親細胞株293。抗体濃度：1 µg/ml。

【図3c】FACSアッセイにおいて本発明の抗ABCA1抗体ABCA1-3／84を使用しての、ABCA1を発現しているFLP293細胞株（FLP293／ABCA1細胞株）におけるABCA1の表面発現の検出；染色指数は10.5である（蛍光FLP293ABCA1細胞株／蛍光FLP293親細胞株）；青色：ABCA1を発現しているFLP293細胞株；白色：親細胞株293。抗体濃度：10 µg/ml。

50

【図4a】FACSアッセイにおいて本発明の抗ABCA1抗体ABCA1-3/125を使用しての、ABCA1を発現しているFLP293細胞株（FLP293/ABCA1細胞株）におけるABCA1の表面発現の検出；染色指数は49.7である（蛍光FLP293ABCA1細胞株／蛍光FLP293親細胞株）；青色：ABCA1を発現しているFLP293細胞株；白色：親細胞株293。抗体濃度：0.1 µg/ml。

【図4b】FACSアッセイにおいて本発明の抗ABCA1抗体ABCA1-3/125を使用しての、ABCA1を発現しているFLP293細胞株（FLP293/ABCA1細胞株）におけるABCA1の表面発現の検出；染色指数は47.0である（蛍光FLP293ABCA1細胞株／蛍光FLP293親細胞株）；青色：ABCA1を発現しているFLP293細胞株；白色：親細胞株293。抗体濃度：1 µg/ml。

【図4c】FACSアッセイにおいて本発明の抗ABCA1抗体ABCA1-3/125を使用しての、ABCA1を発現しているFLP293細胞株（FLP293/ABCA1細胞株）におけるABCA1の表面発現の検出；染色指数は46.9である（蛍光FLP293ABCA1細胞株／蛍光FLP293親細胞株）；青色：ABCA1を発現しているFLP293細胞株；白色：親細胞株293。抗体濃度：10 µg/ml。

【図5】2つの異なるLXRアゴニストおよびLPSを用いての、CD14+単球上でのABCA1のアップレギュレーション。全血をLXRアゴニストまたはLPSと共に24時間かけてインキュベーションした。ABCA1の検出は、抗ABCA1抗体ABCA1-3/125を使用してFACSによって実施された。

【図6】生成された抗ABCA1モノクローナル抗体ABCA1-3/84、ABCA1-3/125およびABCA1-4/18のウェスタンブロット分析。以下の細胞溶解液をウェスタンブロットに使用して、生成された抗ABCA1モノクローナル抗体の特異性を試験した：レーン1：刺激されたTHP1細胞溶解液；レーン2：刺激されていないTHP1細胞溶解液；レーン3：FLP293-hu-ABCA1（ABCA1を発現しているFLP293細胞株）；レーン4：FLP293（ネガティブコントロール）レーン5：MWM（分子量マーカー）；レーン6：HEK-293-hu-ABCA1（DB272-in pANITA2）-6His（Hisタグと共にヒトABCA1タンパク質を発現しているHEK細胞株）。

【図7】ABCA1タンパク質のウェスタンブロット分析。クローン4は、全長タンパク質（約240 kDA）の検出によって示される大量のABCA1およびいくつかのより小さな種を発現する。比較すると、トランスフェクションされていないFLP細胞株にはABCA1タンパク質は全く検出されなかった。

【図8】ABCA1 mRNA発現のqPCRによる分析。ハウスキーピング遺伝子のGAPDHのCp値は、ABCA1を過剰に発現するクローン4と親株とでは一定に維持されていた（18.00 ± 0.24 vs 18.56 ± 0.20）。対照的に、Cp値は、トランスフェクションされていない株では極めて低いABCA1 mRNAの発現を示したが（36.00 ± 0.73）、クローン4-ABCA1株では高いレベルを示した（21.64 ± 0.48）。差異を計算するためにddCp法を使用することは、クローン4が、親FLP細胞株と比較して21,000倍のABCA1転写物を発現することを示す。

【図9】FACSアッセイにおいて本発明の抗ABCA1抗体ABCA1-4/18を使用しての、THP-1細胞におけるABCA1の表面発現の検出。THP-1細胞をLXRアゴニストを用いて一晩かけて処理して、ABCA1の発現を誘導するか、またはDMSOコントロールを用いてコントロール処理した。細胞を、1 µg/mlのABCA1特異的抗体（クローン4/18）またはアイソタイプコントロールを用いて染色し、その後、マウスIgG1に対するPEにコンジュゲートさせた二次抗体を用いて染色した。抗ABCA1抗体ABCA1-4/18は、アイソタイプコントロールと基礎ABCA1シグナルとを良好に分離する。

【図10】FACSアッセイにおいて本発明の抗ABCA1抗体ABCA1-3/125を使用しての、THP-1細胞におけるABCA1の表面発現の検出。THP-1細胞をLXRアゴニストを用いて一晩かけて処理して、ABCA1の発現を誘導するか、または

10

20

30

40

50

DMSOコントロールを用いてコントロール処理した。細胞を、1 μ g/mlのABC A 1 特異的抗体（クローン3 / 125）またはアイソタイプコントロールを用いて染色し、その後、マウスIgG1に対するPEにコンジュゲートさせた二次抗体を用いて染色した。

【図11】マウス抗ABC A 1 mAbクローン3 / 84を使用したウェスタンブロットによって示されるABC A 1 タンパク質のヒト組織における分布。

【図12】マウス抗ABC A 1 mAbクローン3 / 84を用いてのヒト肝臓におけるABC A 1 の免疫組織化学的染色。緑色：肝細胞の細胞膜に局在したABC A 1 タンパク質、および青色：DAPIにより染色された核。

【0027】

本発明の態様の詳細な説明

10

本明細書において使用する「染色指数」という用語は以下のように定義される：

染色指数：
$$\frac{\text{ABC A 1 を発現している細胞株の蛍光強度の中央値}}{\text{ABC A 1 陰性の親細胞株の蛍光強度の中央値}}$$

【0028】

「抗体」という用語は、完全抗体および抗体フラグメントを含むがそれらに限定されない、種々の形態の抗体構造を包含する。本発明による抗体は、本発明による特徴的な特性が保持されている限りにおいて、ヒト化抗体、キメラ抗体またはさらに遺伝子工学された抗体であり得る。

【0029】

「抗体フラグメント」は、全長抗体の一部、好ましくはその可変ドメイン、または少なくともその抗原結合部位を含む。抗体フラグメントの例としては、ダイアボディ、一本鎖抗体分子、および抗体フラグメントから形成された多重特異的抗体が挙げられる。s c F v 抗体は、例えば、Houston, J.S., Methods in Enzymol. 203 (1991) 46-96に記載されている。さらに、抗体フラグメントは、ABC A 1 に結合する（すなわちV_Lドメインと一緒に機能的抗原結合部位に会合することができる）V_HドメインまたはABC A 1 に結合する（すなわちV_Hドメインと一緒に機能的抗原結合部位に結合することができる）V_Lドメインの特徴を有し、これにより特性が付与された、一本鎖ポリペプチドを含む。

20

【0030】

本明細書において使用する「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」という用語は、単一のアミノ酸組成の抗体分子の調製物を指す。

30

【0031】

「キメラ抗体」という用語は、通常組換えDNA技術によって調製される、1つの起源または種からの可変領域（すなわち結合領域）と、異なる起源または種に由来する定常領域の少なくとも一部とを含む抗体を指す。マウス可変領域とヒト定常領域とを含むキメラ抗体が好ましい。本発明によって包含される他の好ましい形態の「キメラ抗体」は、定常領域が、元来の抗体のそれとは、特にC1qへの結合および／またはFcレセプター（FcR）への結合に関して改変または変化されて、本発明による特性を生じているものである。このようなキメラ抗体はまた、「クラススイッチ抗体」とも呼ばれる。キメラ抗体は、免疫グロブリン可変領域をコードするDNAセグメントおよび免疫グロブリン定常領域をコードするDNAセグメントを含む、免疫グロブリン遺伝子の発現産物である。キメラ抗体を産生するための方法は当技術分野において周知である組換えDNA技術および遺伝子トランスフェクション技術を含む。例えば、Morrison, S.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855；米国特許第5,202,238号および第5,204,244号を参照されたい。

40

【0032】

「ヒト化抗体」という用語は、フレームワークまたは「相補性決定領域」（CDR）が、親免疫グロブリンと比較して特異性の異なる免疫グロブリンのCDRを含むように改変されている抗体を指す。好ましい態様において、マウスCDRがヒト抗体のフレームワーク領域に移植されて、「ヒト化抗体」が調製される。例えば、Riechmann, L., et al., Nature 332 (1988) 323-327；およびNeuberger, M.S., et al., Nature 314 (1985) 268-2

50

70を参照されたい。特に好ましいC D Rは、キメラ抗体について上記した抗原を認識する配列を示すものに相当する。本発明によって包含される他の形態の「ヒト化抗体」は、定常領域が、元来の抗体のそれとは、特にC 1 qへの結合および／またはF cレセプター（F c R）への結合に関して改変または変化されて、本発明による特性を生じているものである。

【0033】

本明細書において使用する「ヒト抗体」という用語は、ヒト生殖系列の免疫グロブリン配列に由来する可変領域および定常領域を有する抗体を含むことを意図する。ヒト抗体は当技術分野の最新技術において周知である（van Dijk, M.A.およびvan de Winkel, J.G., Curr. Opin. Chem. Biol. 5 (2001) 368-374）。ヒト抗体はまた、免疫化により、内因性免疫グロブリンの非産生下で、完全なレパートリーのまたは選抜されたヒト抗体を産生することのできる、トランスジェニック動物（例えばマウス）において産生され得る。このような生殖系列の突然変異マウスへのヒト生殖系列の免疫グロブリン遺伝子アレイの導入により、抗原によるチャレンジ時にヒト抗体が産生される（例えば、Jakobovits, A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 2551-2555; Jakobovits, A., et al., Nature 362 (1993) 255-258; Bruggemann, M., et al., Year Immunol. 7 (1993) 33-40を参照されたい）。ヒト抗体はまた、ファージディスプレイライブラリーにおいても産生され得る（Hoogenboom, H.R.およびWinter, G., J. Mol. Biol. 227 (1992) 381-388; Marks, J.D., et al., J. Mol. Biol. 222 (1991) 581-597）。Cole et al.およびBoerner et al.の技術も、ヒトモノクローナル抗体の調製に利用できる（Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); およびBoerner, P., et al., J. Immunol. 147 (1991) 86-95）。本発明によるキメラ抗体およびヒト化抗体についてすでに記載したように、本明細書において使用する「ヒト抗体」という用語はまた、定常領域において、特にC 1 qへの結合および／またはF c Rへの結合に関して、例えば「クラススイッチ」、すなわちF c部分の変化または突然変異（例えばI g G 1からI g G 4へおよび／またはI g G 1 / I g G 4突然変異）によって改変されて、本発明による特性を生じる、このような抗体を含む。

【0034】

「エピトープ」という用語は、抗体に特異的に結合することのできる任意のポリペプチド決定基を含む。特定の態様において、エピトープ決定基は、アミノ酸、糖側鎖、ホスホリルまたはスルホニルなどの分子の化学的に活性な表面基を含み、そして特定の態様において、特異的な3次元構造特徴およびまたは特異的な荷電特徴を有し得る。エピトープは、抗体の結合する抗原の領域である。

【0035】

本明細書において使用する「可変ドメイン」（軽鎖の可変ドメイン（V_L）、重鎖の可変ドメイン（V_H））は、抗原と抗体の結合に直接関与する軽鎖ドメインおよび重鎖ドメインの各対を示す。軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインは、同じ一般的な構造を有し、そして各ドメインは、その配列が広く保存されている4つのフレームワーク（FR）領域を含み、これらは3つの「超可変領域」（または相補性決定領域、C D R）によって接続されている。フレームワーク領域はβシートコンフォメーションをとり、そしてC D Rは、βシート構造を接続しているループを形成し得る。各鎖のC D Rは、フレームワーク領域によってその3次元構造が保たれ、そして他の鎖のC D Rと一緒に抗原結合部位を形成する。抗体の重鎖および軽鎖C D R 3領域は、本発明による抗体の結合特異性／親和性に特に重要な役割を果たし、それ故、本発明のさらなる目的を提供する。

【0036】

本明細書において使用する場合の「抗体の抗原結合部位」という用語は、抗原との結合に関与する抗体のアミノ酸残基を指す。抗体の抗原結合部位は、「相補性決定領域」すなわち「C D R」に由来するアミノ酸残基を含む。「フレームワーク」すなわち「FR」領域は、本明細書において定義したような超可変領域残基以外の可変ドメイン領域である。それ故、抗体の軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインは、N末端からC末端へと、ド

メインFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3およびFR4を含む。特に、重鎖のCDR3は、抗原との結合に最も寄与する領域であり、そして抗体の特性を規定する。CDR領域およびFR領域、並びに／または「超可変ループ」に由来する残基は、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)の標準的な定義に従って決定される。

【0037】

「ABCA1ポリペプチド」という用語は、本明細書において、任意の動物、例えば哺乳動物種（ヒトを含む）に由来するネイティブなABCA1ポリペプチド、およびABCA1変異体を指す。ABCA1ポリペプチドは、ヒト組織型を含む種々の起源から単離され得るか、あるいは組換え法および／または合成法によって調製され得る。ヒトABCA1ポリペプチドのアミノ酸配列は配列番号1に示される。

【0038】

「単離された」抗体は、その天然の環境の成分から分離されたものである。いくつかの態様において、抗体は、95%または99%超の純度まで精製され、これは例えば電気泳動（例えばSDS-PAGE、等電点電気泳動（IEF）、キャピラリー電気泳動）またはクロマトグラフィー（例えばイオン交換または逆相HPLC）によって決定される。抗体純度の評価のための方法の論評については、例えば、Flatman et al., J. Chromatogr. B 848:79-87 (2007)を参照されたい。

【0039】

「単離された」核酸は、その天然の環境の成分から単離された核酸分子を指す。単離された核酸としては、核酸分子を通常含む細胞に含まれる核酸分子が挙げられるが、核酸分子は、染色体外に、またはその天然の染色体上の位置とは異なる染色体上の位置にも存在する。

【0040】

「抗ABCA1抗体をコードする単離された核酸」は、抗体重鎖および軽鎖をコードする1つ以上の核酸分子（またはそのフラグメント）（単一のベクターまたは別々のベクター中のこのような核酸分子（群）および宿主細胞中の1つ以上の位置に存在するこのような核酸分子（群）を含む）を指す。

【0041】

本明細書において使用する「ベクター」という用語は、それが連結された別の核酸を増幅させることのできる核酸分子を指す。この用語は、自己複製する核酸構造としてのベクター、並びに、それが導入された宿主細胞のゲノムに組み込まれたベクターを含む。特定のベクターは、それらが作動可能に連結された核酸の発現を指令することができる。このようなベクターを、本明細書において「発現ベクター」と称する。

【0042】

抗体は、例えば米国特許第4,816,567号に記載のように、組換え法および組成物を使用して産生され得る。1つの態様において、本明細書に記載された抗ABCA1抗体をコードする単離された核酸が提供される。このような核酸は、抗体のV_Lを含むアミノ酸配列および／または抗体のV_Hを含むアミノ酸配列（例えば抗体の軽鎖および／または重鎖）をコードし得る。さらなる態様において、このような核酸を含む1つ以上のベクター（例えば発現ベクター）が提供される。さらなる態様において、このような核酸を含む宿主細胞が提供される。1つのこのような態様において、宿主細胞は、（1）抗体のV_Lを含むアミノ酸配列および／または抗体のV_Hを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含むベクター、あるいは（2）抗体のV_Lを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第1のベクターおよび抗体のV_Hを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第2のベクターを含む（例えばそれを用いて形質転換されている）。1つの態様において、宿主細胞は真核細胞、例えばチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞またはリンパ球系細胞（例えばY0、NS0、Sp20細胞）である。1つの態様において、抗ABCA1抗体を製作する方法が提供され、前記方法は、上で提供されたような抗体をコードする核酸を含む

10

20

30

40

50

宿主細胞を、抗体の発現に適した条件下で培養し、そして場合により宿主細胞（または宿主細胞培養培地）から抗体を回収することを含む。

【0043】

本発明の抗体の組換え産生のために、例えば前記したような抗体をコードする核酸が単離され、そしてさらなるクローニングおよび／または宿主細胞における発現のために1つ以上のベクターに挿入される。このような核酸は、慣用的な手順を使用して（例えば抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することのできるオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって）容易に単離およびシークエンスされ得る。

【0044】

抗体をコードするベクターのクローニングまたは発現に適した宿主細胞としては、本明細書に記載された原核細胞または真核細胞が挙げられる。例えば、抗体は、特にグリコシル化およびFcエフェクター機能が必要とされない場合には、細菌において産生されてもよい。細菌における抗体フラグメントおよびポリペプチドの発現については、例えば米国特許第5,648,237号、第5,789,199号および第5,840,523号を参照されたい。（また、E.coliにおける抗体フラグメントの発現を記載している、Charlton, Methods in Molecular Biology, Vol. 248(B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254も参照されたい）。発現後、抗体は、可溶性画分中の細菌細胞ペーストから単離され得、そしてさらに精製され得る。

【0045】

モノクローナル抗体を産生しているハイブリドーマから抗体遺伝子をクローニングするための方法は、当業者には公知である。例えば、重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメイン（ V_H および V_L ）の遺伝子情報は、免疫グロブリン特異的プライマーと共にポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を使用してハイブリドーマ細胞から増幅させることができる（Methods Mol Med. 2004;94:447-58）。その後、重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメイン（ V_H および V_L ）をコードする核酸を、宿主細胞における発現のために適切なベクターにクローニングすることができる。

【0046】

生物学的試料中のポリペプチドの検出および／または測定のための方法は、当技術分野において周知であり、そしてこれにはウェスタンブロット、フローサイトメトリー、ELISAもしくはRIA、または種々のプロテオミクス技術が挙げられるがそれらに限定されない。例えば、変性タンパク質に結合することのできる抗体、例えばポリクローナル抗体を使用して、ウェスタンブロットにおいてABCA1ポリペプチドを検出することができる。ポリペプチドを測定するための方法の一例はELISAである。この種類のタンパク質定量は、特異的抗原を捕捉することのできる抗体、および捕捉された抗原を検出することのできる二次抗体に基づく。

【0047】

ネイティブなABCA1ポリペプチドの好ましい検出法は、フローサイトメトリーである。フローサイトメトリー法は、Handbook of Flow Cytometry Method, J. Paul Robinson (Editor); Flow Cytometry - A Basic Introduction, Michael G Ormerod (2008) and Current Protocols in Cytometry (2010), Wileyに記載されている。

【0048】

実施例および方法

本発明のモノクローナル抗ヒトABCA1抗体

ヒトABCA1に対するモノクローナル抗体を産生する以下の3つのマウスハイブリドーマ細胞株は、DSMZ（Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH）に2011年1月20日にF. Hoffmann-La Roche Ltd.の名称で寄託され、そして以下に列挙された寄託番号を受け取った：

ABCA1-3/84=DSM ACC3109

ABCA1-3/125=DSM ACC3110

ABCA1-4/18=DSM ACC3111

10

20

30

40

50

【0049】

モノクローナル抗ヒトA B C A 1抗体の生成

哺乳動物細胞の細胞表面上におけるA B C A 1タンパク質の発現

ヒトA B C A 1細胞外ドメインを、発現プラスミドp A N I T A 2を使用してH E K細胞の細胞表面上に発現させた。ヒトA B C A 1の細胞外ドメインを発現しているH E K由来細胞株を安定なトランスフェクションによって確立した。

【0050】

高発現している細胞株を得るために、トランスフェクション体を、抗F L A G抗体を用いて表面染色した後、蛍光活性化細胞選別によって高発現している細胞プールへと分類した。高発現している細胞プールへと選別するためにゲート化された細胞の蛍光強度平均は、全てのトランスフェクション体の2. 1～4. 3倍高かった。

10

【0051】

ヒトA B C A 1を発現している細胞株を、ウェスタンブロット分析によって発現について試験し、これにより予期された分子量を有する高レベルのタンパク質の発現が示された。

【0052】

トランスフェクションされたH E K細胞を用いて免疫化されたマウスにおけるA B C A 1特異的抗体の発達

本発明者らのアプローチは、その細胞表面上に組換え抗原を発現している安定にトランスフェクションされた哺乳動物細胞（H E K 2 9 3）を利用する。トランスフェクションされた細胞はまた、血清転換の測定、ハイブリドーマの選択および抗体の特徴付けのために使用される。免疫化およびハイブリドーマ選択のためにそのネイティブなコンフォメーションで抗原を提示することによって、この手順は、内因性タンパク質と結合することのできる抗体の生成を促進する。

20

【0053】

免疫原は、組換えタンパク質を免疫精製することによって得られ、これにより免疫複合体が得られ、そしてこれらの免疫複合体を免疫化抗原として使用する。免疫精製は、抗H i s タグモノクローナル抗体を使用してウェスタンブロット分析によって確認された。

【0054】

免疫複合体を用いて免疫化されたマウスの脾臓細胞を、P A I 骨髄腫細胞と融合して、B細胞ハイブリドーマを生成した。融合細胞をマイクロタイター培養プレートのウェルに分配した。A B C A 1特異的抗体を産生するハイブリドーマ細胞を同定するために、精製組換えタンパク質の必要性が全くない、2工程のスクリーニング手順を使用した。まず全ての培養ウェルをE L I S AによってI g Gの産生について試験した。第2工程でI g G産生について陽性である全てのウェルを、I F Aによって、トランスフェクションされた細胞への抗体の結合についてスクリーニングした。マルチウェルスライドガラス上にスポットされたトランスフェクションされたおよびトランスフェクションされていないH E K細胞を、個々のハイブリドーマ上清を用いて染色し、そして蛍光顕微鏡によって分析した。トランスフェクションされていないH E K細胞は、各試料のためのネガティブコントロールとして使用した。

30

40

【0055】

生成されたモノクローナル抗体A B C A 1-3/84、A B C A 1-3/125およびA B C A 1-4/18の特異性をウェスタンブロットによって確認した（図6）。T H P 1 = ヒト単球細胞株。

【0056】

細胞培養

ヒト胚腎細胞（F l i p - I n 2 9 3細胞、Invitrogen）を、10%ウシ胎児血清、2 mMのL-グルタミンおよび抗生物質の補充されたダルベッコ改変イーグル培地（D M E M）中で維持した。細胞を、製造業者によって記載されたようなF u g e n e - 6（Roche Biochemicals）を使用してトランスフェクションした。

50

【0057】

ヒト末梢血単球（THP-1、ATCC_{TM}-F-6430）を、0.05mMの2-メルカプトエタノール（Invitrogen）および10%の熱失活FBS（Invitrogen）の補充されたRPMI-1640 Glutamax（Invitrogen）中で培養した。細胞濃度は 1×10^6 個の細胞/mlを超えなかった。最大継代数は30であった。

【0058】

プラスミド：完全長ヒトABCA1をコードする6.5kbのDNAフラグメントを、XhoIで消化しクレノウで埋めたプラスミドPN721へとサブクローニングした。配列を確認した後、6.5kbのフラグメントを回収し、そしてプラスミドpCDNA5-FRT（Invitrogen）へとさらにサブクローニングした。

10

【0059】

ABCA1安定細胞株の生成

ヒトABCA1を発現しているモノクローナル安定細胞株は、製造業者の推奨に従って、ゼオシンの非存在下で、増殖培地中でFugene-6（Roche Biochemicals）を使用して、pCDNA5-FRT-ABCA1およびpOG44プラスミドと一緒に（Invitrogen）共トランスフェクションすることによって得られた。トランスフェクションの次の日、ハイグロマイシンBを50 µg/mlの最終濃度となるまで加え、そしてハイグロマイシンB耐性コロニーが出現するまで、培地を3～4日間毎に交換した。個々のコロニーを選択し、そしてハイグロマイシンBの存在下でさらに増殖させた。個々のクローンを定量PCRおよびウェスタンブロット分析によってABCA1の発現について評価した。これらの結果に基づき、クローン4を、高度にABCA1を発現する細胞株ベースとして選択した。

20

【0060】

ABCA1タンパク質発現のウェスタンブロットによる分析：FLP細胞またはクローン4細胞を、12ウェルプレートにおいて 10^6 個の細胞/ウェルで48時間かけて培養した。細胞をレムリ緩衝液/ベンゾナーゼ中で溶解し、そして変性した試料を3～8%酢酸トリスゲルにアプライし、そして1次元ゲル電気泳動によって分離した。分離したタンパク質を、膜へのエレクトロブロットによって転写した。ABCA1が、マウスモノクローナル抗体ABCA1（Neuromics）と、続いて、ヤギ抗マウスIgG-HRP（Abcam2043番）とのインキュベーションによって検出された（図7）。

30

【0061】

ヒト組織のウェスタンブロットによる分析：Biochain Institute, Inc., Hayward, CA 94545, USAのヒト組織溶解液を使用した。ブロットを、前の段落で記載したのと同じように行なった。ABCA1が、マウス抗ABCA1 mAb（クローン3/84）、続いてヤギ抗マウスIgG-HRPとのインキュベーションによって検出された（図11）。

【0062】

ABCA1 mRNA発現の定量PCRによる分析：FLP細胞またはクローン4細胞を、96ウェルプレートにおいて 5×10^5 個の細胞/ウェルで37℃で48時間かけて培養した。全RNAが、製造業者の指示に従って（Qiagen）自動システムを使用して単離された。リアルタイム定量RT-PCRを、one-step reagent mix（Qiagen）およびプローブ/プライマーセット（Applied Biosystems）を使用してLightcycler 480機器（Roche）で実施し、ABCA1およびGAPDH mRNAの相対的発現を検出した。データは、Ctの平均値（N=8ウェル/条件）+/-SDとして表現される（図8）。

40

【0063】

抗体および第2工程の試薬

ABCA1に対する特異性を試験した市販の一次モノクローナル抗体は、Abcam（登録商標）およびNovus（登録商標）（クローンHJ1およびクローンAB.H10）製であった。試験したウサギポリクローナル抗体はAbcam（登録商標）（ab81950）製であった。第2ステップの試薬であるストレプトアビジンPEおよびヤギ-α-マウスIgG PEはSouthern Biotechnology（登録商標）製であった。

50

【0064】

市販の抗体に加えて、社内で生成した3つのマウス抗A B C A 1ハイブリドーマ上清を、フローサイトメトリーでA B C A 1を検出するその能力について評価した。検出は、第2試薬(Southern Biotechnology(登録商標)製のストレプトアビジンP E、ヤギ抗マウスI g G p EおよびI g G 1 P E)をアプライすることによって行なわれた。2つのクローン(クローンA B C A 1-3/84およびA B C A 1-3/125)のハイブリドーマ上清を精製し、再試験し、そして滴定した。後の時点において、クローンA B C A 1-3/18に由来する抗体を試験し、そしてT H P-1細胞を使用してA B C A 1-3/125と比較した。以下の抗体を、特異的ヒト血液サブセットの同定のために使用した: C D 3 パシフィックブルー、クローンU C H T 1、C D 1 4 P e r C P-C y 5. 5、クロー 10
ンM 5 E 2、C D 1 5 A P C、クローンH I 9 8、C D 1 6 A P C-C y 7、クローン3 G 8、C D 1 9 P E-C y 7、クローンS J 2 5 C IおよびC D 6 6 b F I T C、クローンG 1 0 F 5。全てのC Dマーカー特異的抗体は、Becton Dickinson(登録商標)から入手した。

【0065】

F L P 2 9 3細胞、F L P 2 9 3由来細胞およびT H P-1細胞のF A C Sによる分析
F A C S分析のために、F L P 2 9 3細胞を、カルシウムおよびマグネシウムを含まないD-P B S(Gibco(登録商標))で濯ぎ、そして0.02% E D T A(Sigma(登録商標))と共にインキュベーションした。収集後、それらを2回、冷D-P B Sを用いて洗浄し、その後、抗体染色へと進んだ。簡潔に言えば、 $0.8 \sim 1 \times 10^6$ 個の細胞/試料 20
を、1:200に希釈された一次抗体を含む100 μ lのB D社の染色用緩衝液/2% F C S(Becton Dickinson(登録商標))中に再懸濁した。インキュベーション時間は、暗闇中で+4℃で45分間であった。細胞を1回、B D社の冷染色用緩衝液/2% F C Sを用いて洗浄し、そしてB D社の染色用緩衝液/2% F C S中で希釈された100 μ lの第2工程の試薬を加えた。+4℃で暗闇中で45分間インキュベーションし、B D社の冷染色用緩衝液/2% F C Sを用いて2回洗浄した後、細胞を分析した。付着していないT H P-1細胞を、F L P 2 9 3細胞について前記したように同じように処理したが、E D T Aを含む緩衝液中でのインキュベーションは省いた。

【0066】

細胞を、F A C S C a n t o I I(Becton Dickinson(登録商標))で分析した。評価をF l o w J o ソフトウェア(Tree Star(登録商標))で実施した。 30

【0067】

A B C A 1の全血におけるアッセイおよびF A C Sにおける染色

全血のF A C S分析のために、社内で生成した抗A B C A 1クローン3/125を全ての場合において使用した。N a-ヘパリン全血を、指定されたアゴニストと共に37℃で24時間かけてインキュベーションした。インキュベーション後、一次抗A B C A 1特異的抗体を、暗闇中で氷上で30分間かけて1:800の最終希釈率で100 μ lの全血に加えた。

【0068】

赤血球を、1×赤血球溶解緩衝液(Becton Dickinson(登録商標))を用いて溶解し、そして洗浄した。続いて、1:250に希釈した100 μ lの二次ヤギー α -マウスI g G₁ P E(Southern Biotechnology(登録商標))を加え、そして+4℃で20分間かけてインキュベーションし、続いて2回の洗浄工程を実施した。 40

【0069】

細胞サブセット特異的抗体を、+4℃で暗闇中で20分間かけて加え、続いて洗浄工程を実施して、その後、分析した。

【0070】

細胞を、FACS Canto II(Becton Dickinson(登録商標))で分析した。評価は、F l o w J ソフトウェア(Tree Star(登録商標))で実施した。

【0071】

免疫組織化学的染色

ヒト肝臓 F F P E 切片 (5 mm、Biochain) を脱水し、クエン酸緩衝液 (Thermo Scientific) と共にマイクロウェーブ処理し、そしてマウス抗 A B C A 1 m A b (クローン 3 / 8 4、1 mg/ml) と共に 1 時間かけてインキュベーションし、続いて二次抗体による検出 (1 mg/ml で 1 時間かけて、Alexa Fluor (登録商標) 4 8 8 ロバ抗マウス I g G (H + L)、Invitrogen, Basel, Switzerland) および D A P I による染色を実施した。

【 0 0 7 2 】

前記の本発明は、理解し易くするために説明および実施例により幾分詳細に記載されているが、本文および実施例は本発明の範囲を制限するものと捉えるべきではない。本明細書において引用されている全ての特許文献および科学文献の開示は、その全体が参照により明確に組み入れられる。

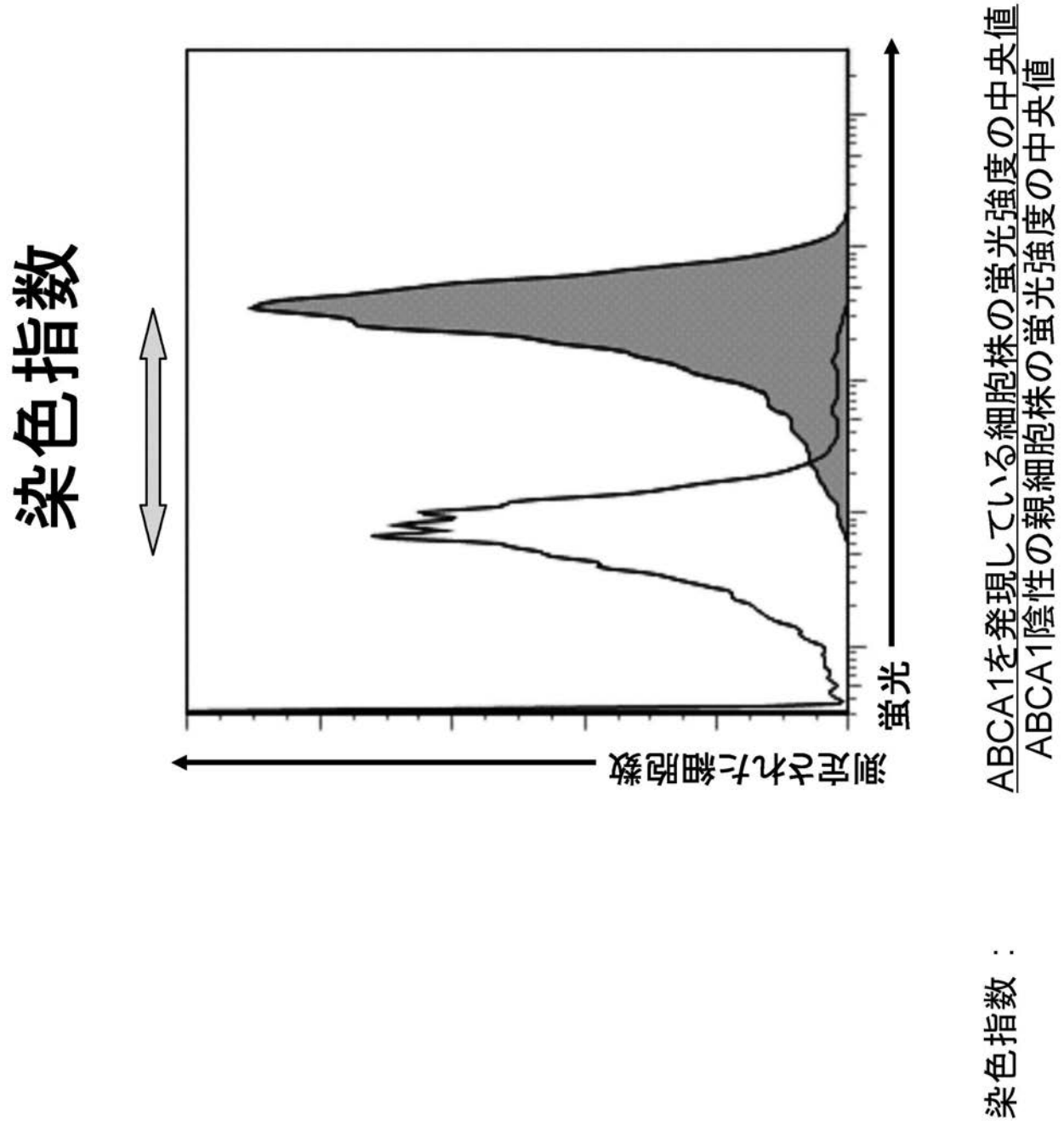
10

【 図 1 2 】

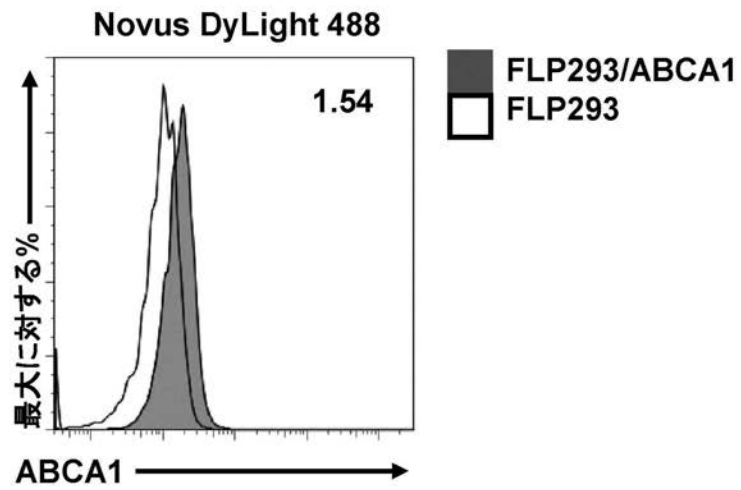


Fig. 12

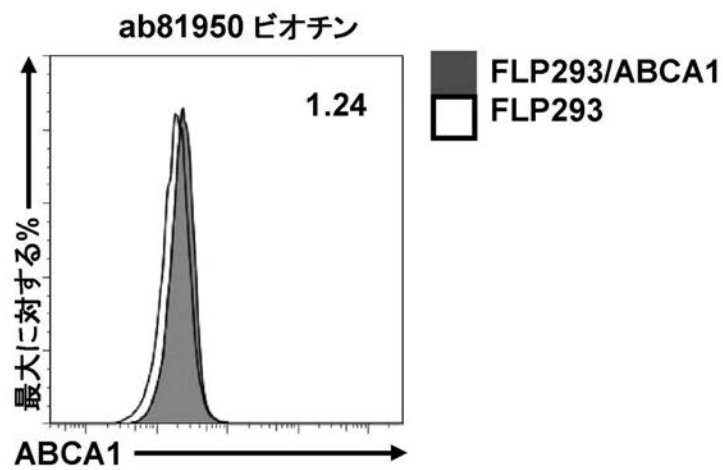
【図 1】



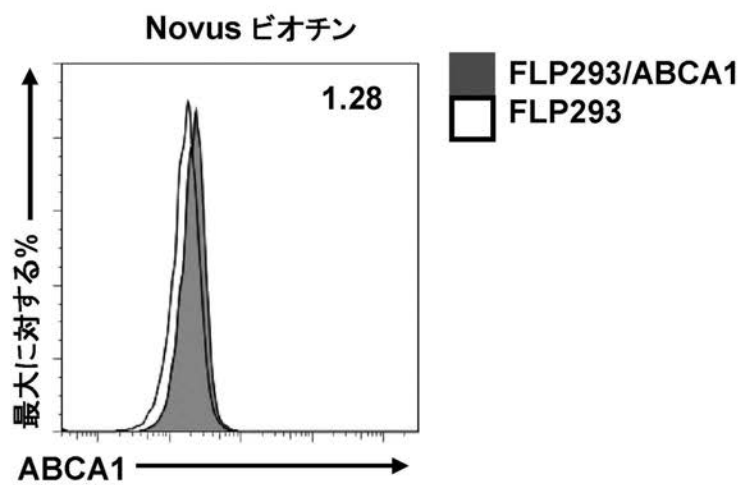
【図 2 a】



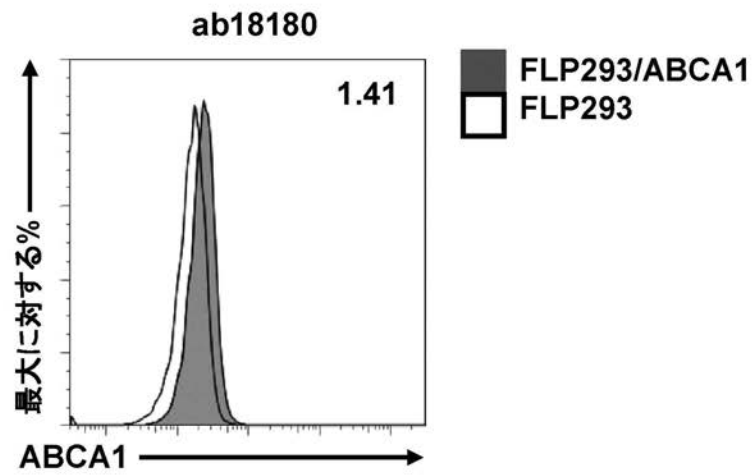
【図 2 b】



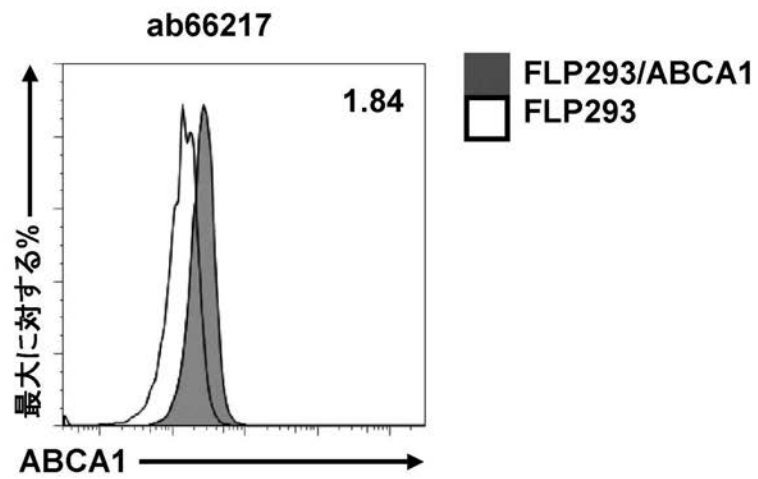
【図 2 c】



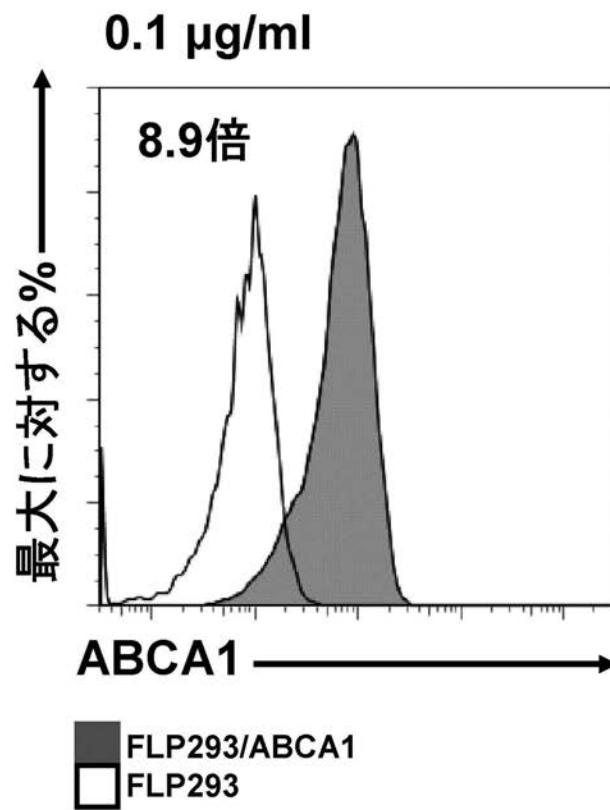
【図 2 d】



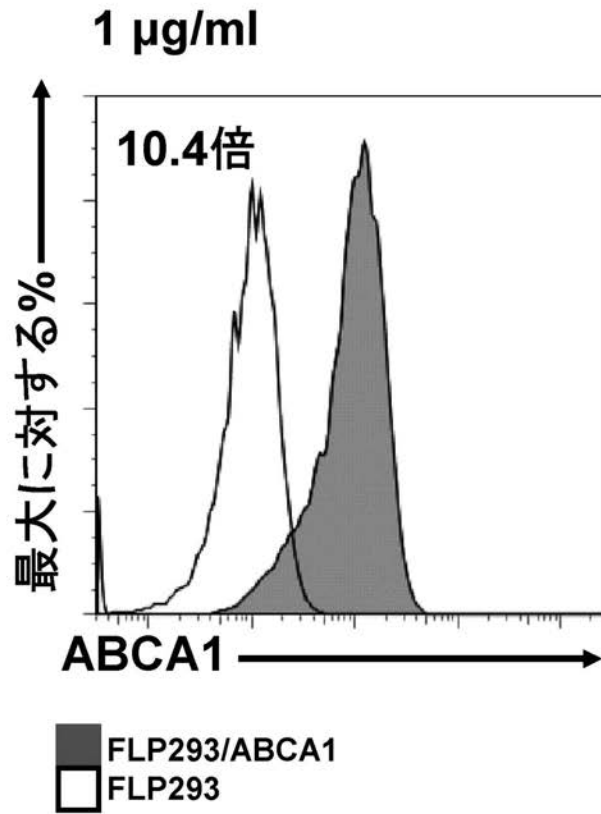
【図 2 e】



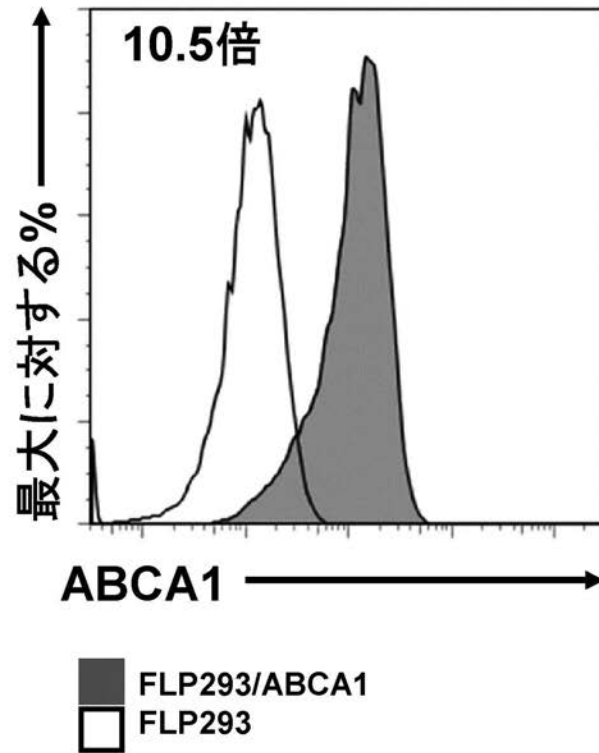
【図 3 a】

ABCA1-3/84

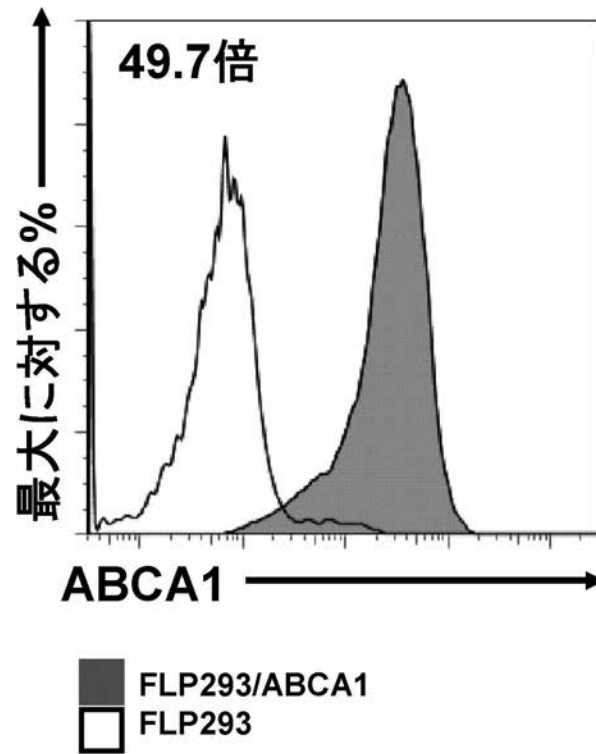
【図 3 b】

ABCA1-3/84

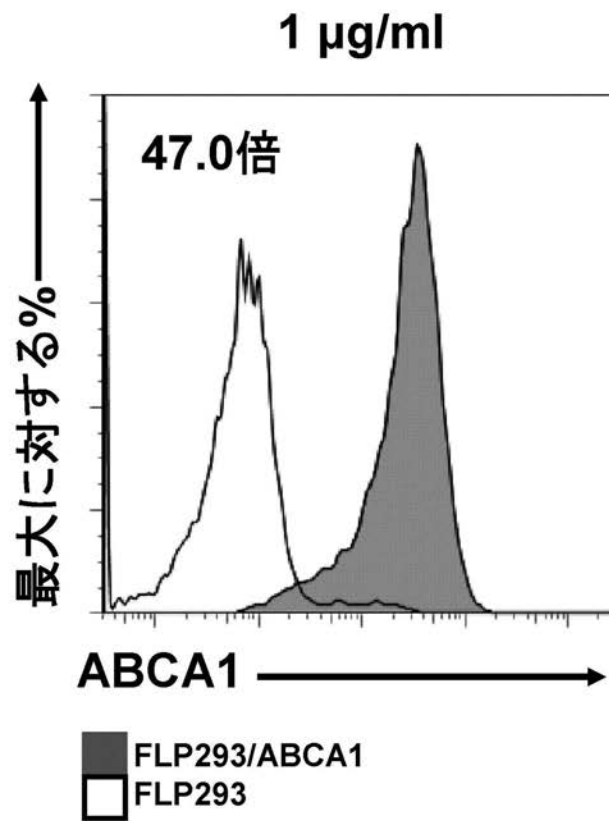
【図 3 c】

ABCA1-3/84**10 μ g/ml**

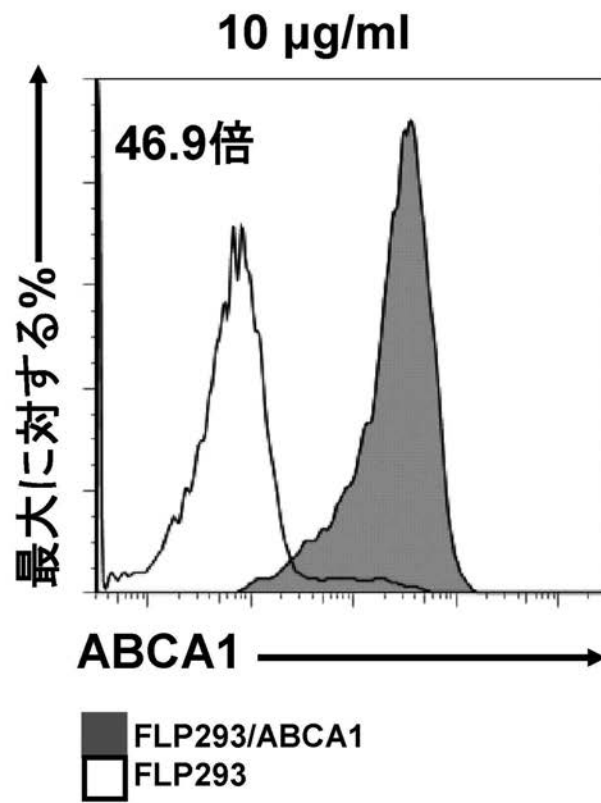
【図 4 a】

ABCA1-3/125**0.1 $\mu\text{g/ml}$** 

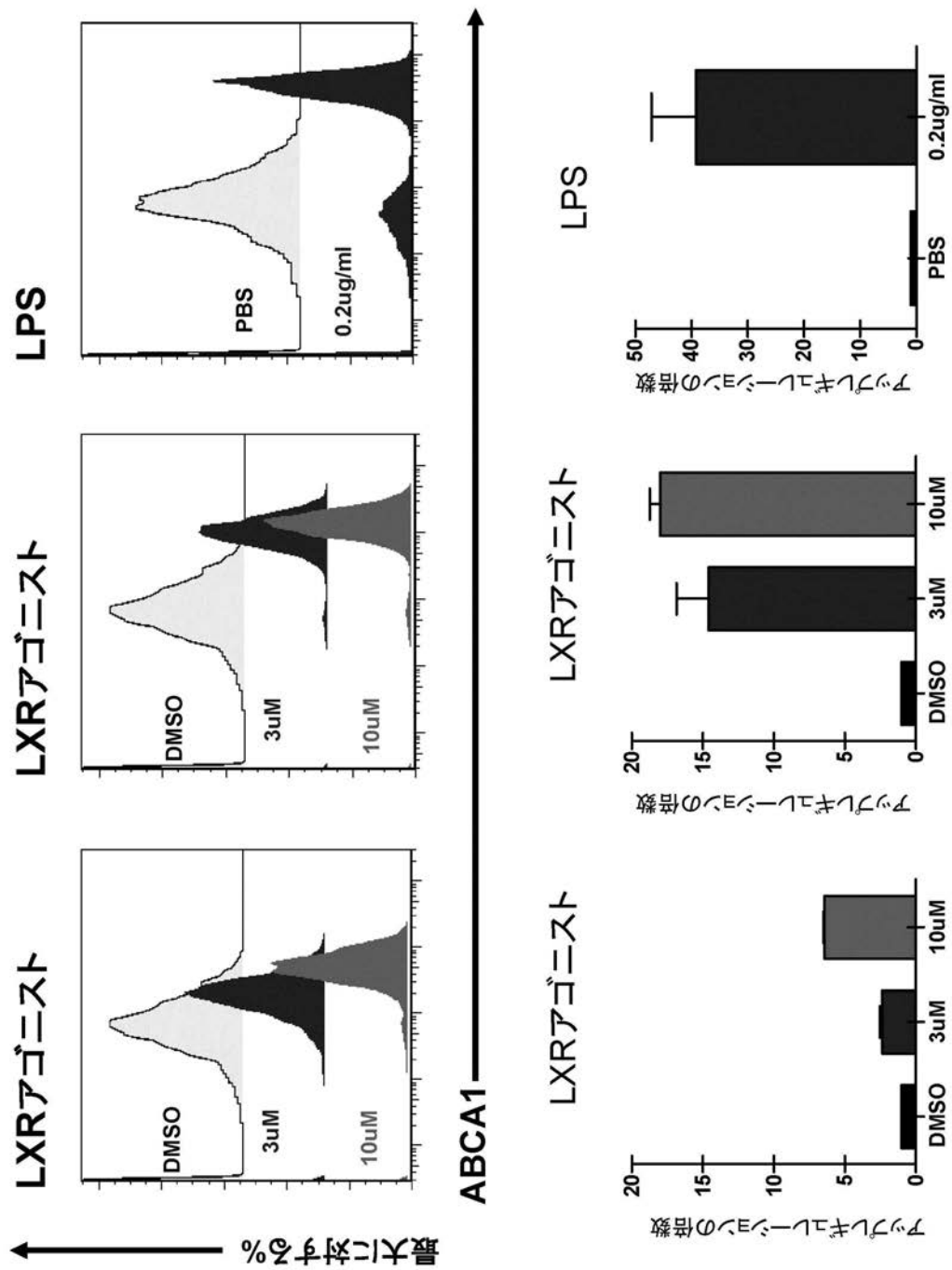
【図 4 b】

ABCA1-3/125

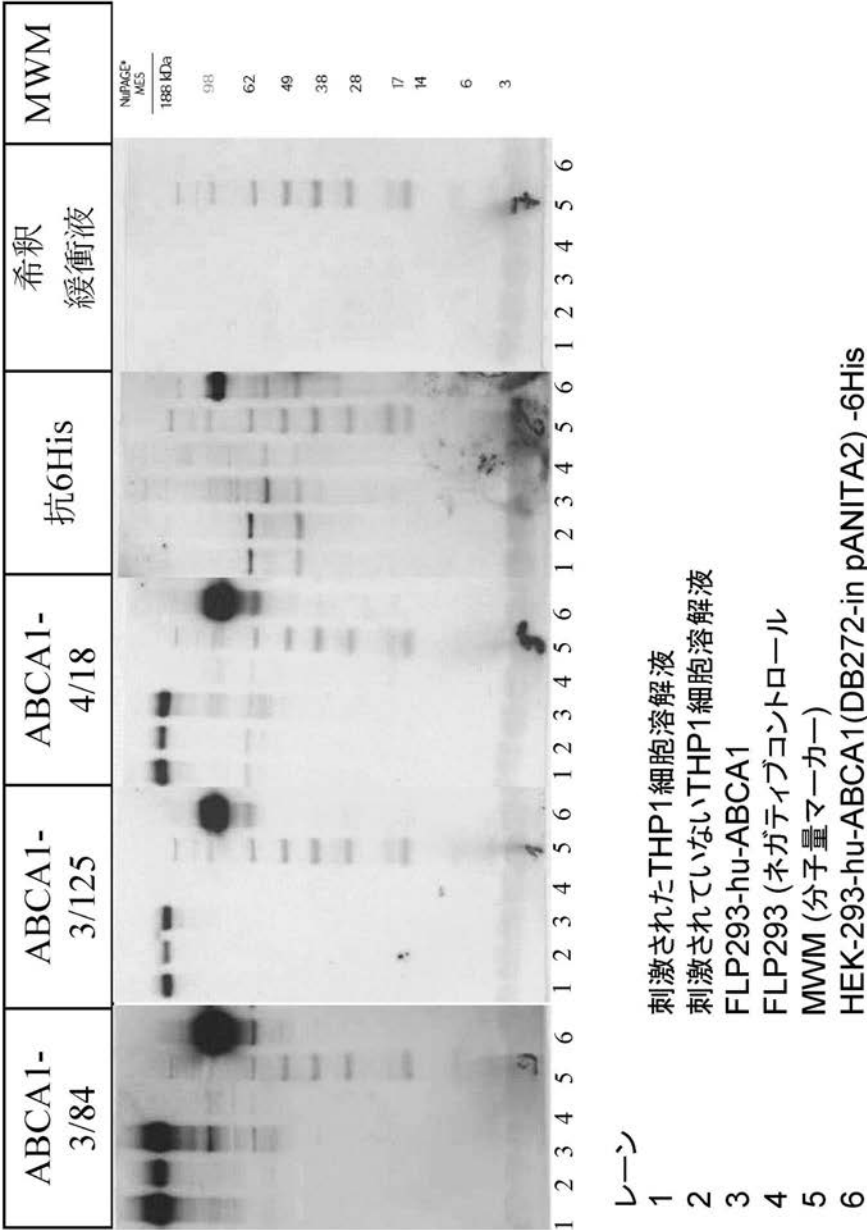
【図 4 c】

ABCA1-3/125

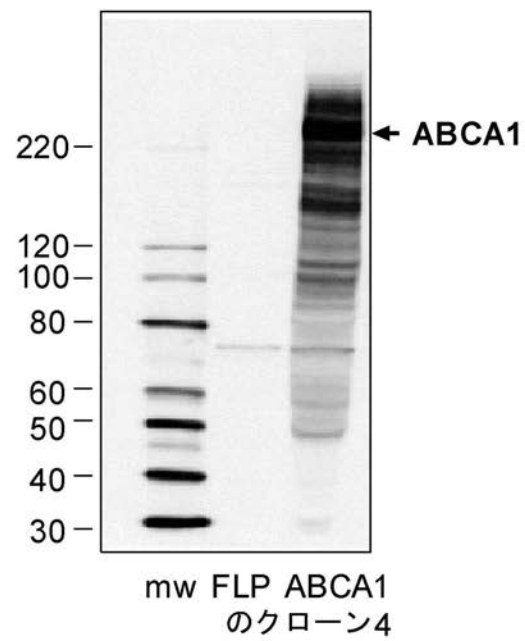
【図 5】



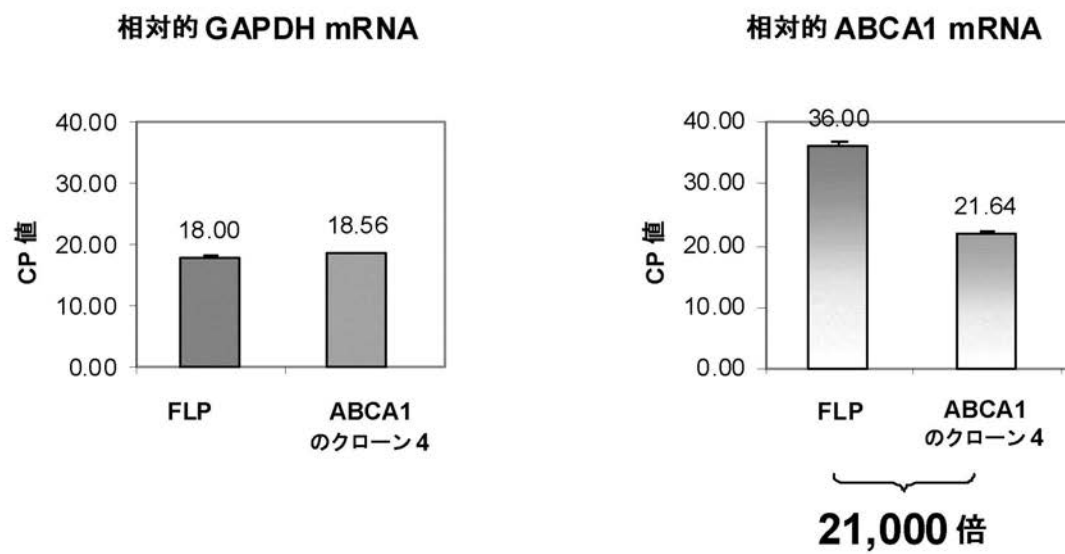
ABCA1-mAbsのウェスタンブロットによる確認



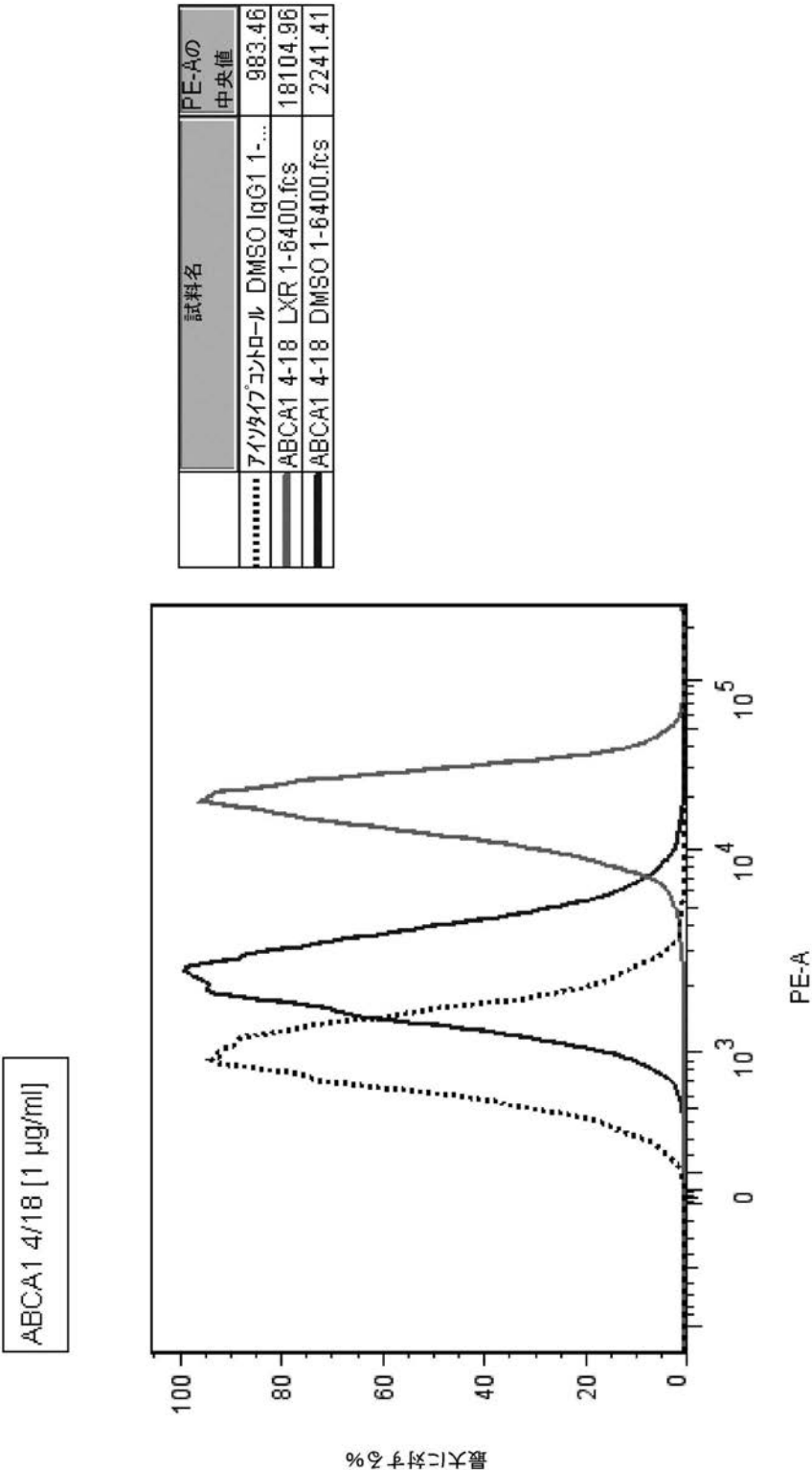
【図 7】



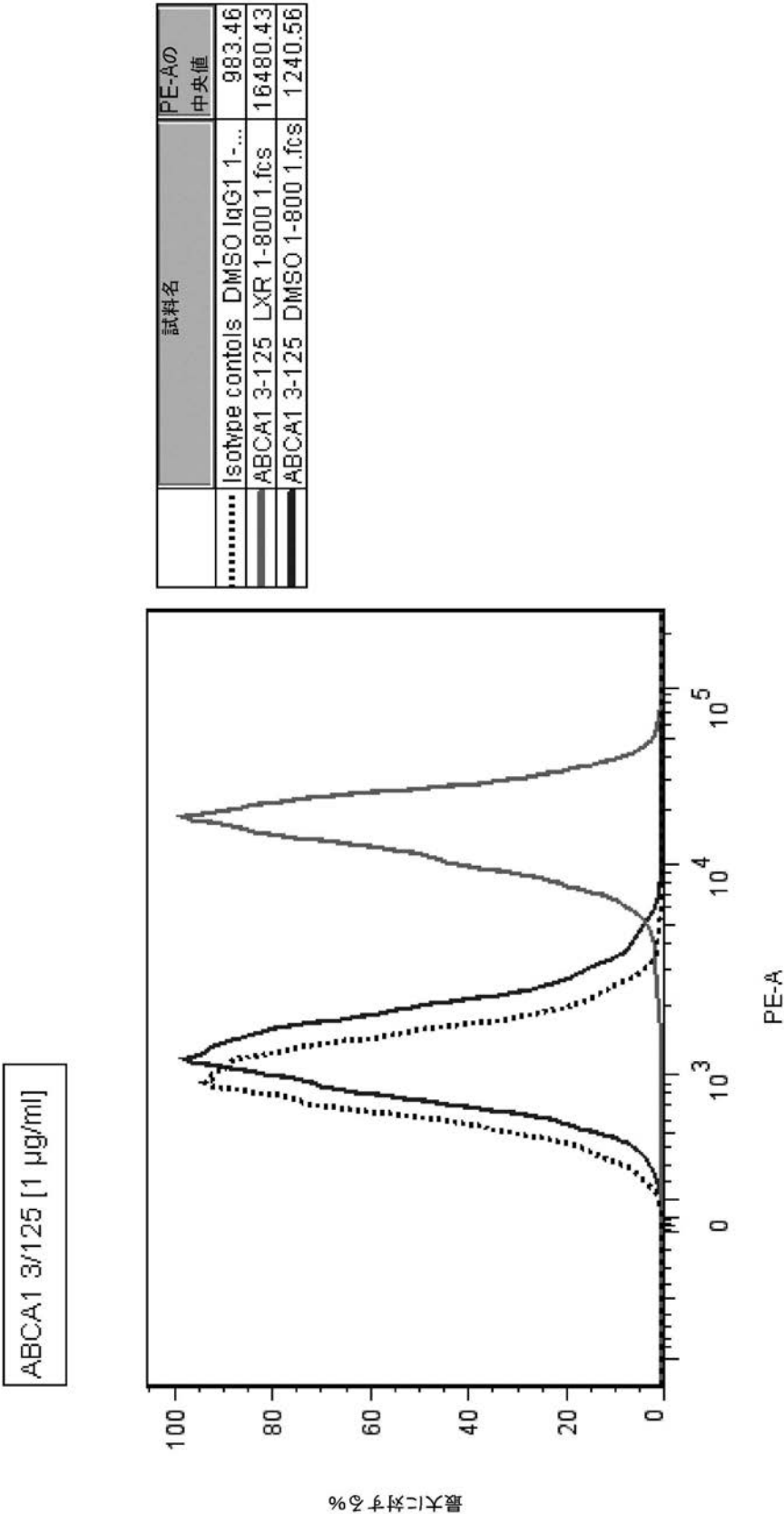
【図 8】



【 図 9 】



【図 1 0】



【図 1 1】



【配列表】

2014519337000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2012/061074

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. (means)

☐
☒

on paper

in electronic form

b. (time)

☒
☐
☐

in the international application as filed

together with the international application in electronic form

subsequently to this Authority for the purpose of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/061074

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/18
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

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 practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FUHRMAN B ET AL: "Paraoxonase 1 (PON1) deficiency in mice is associated with reduced expression of macrophage SR-BI and consequently the loss of HDL cytoprotection against apoptosis", ATHEROSCLEROSIS, ELSEVIER IRELAND LTD, IE, vol. 211, no. 1, 1 July 2010 (2010-07-01), pages 61-68, XP027353034, ISSN: 0021-9150 [retrieved on 2010-01-28]	1-8, 16-23
Y	e.g. page 62, right-hand column, last paragraph; fig. 1(B); the whole document -/--	9-15

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier application or patent but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 August 2012

Date of mailing of the international search report

22/08/2012

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

Gruber, Andreas

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/061074

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	-& anonymous: "SUPPLEMENTAL MATERIAL", ATHEROSCLEROSIS, ELSEVIER IRELAND LTD, IE, vol. 211, no. 1 28 January 2010 (2010-01-28), XP002681638, Retrieved from the Internet: URL:http://www.sciencedirect.com/science/a rticle/pii/S0021915010000730 [retrieved on 2012-08-10] -----	
X	X. ZHOU ET AL: "Inhibition of ERK1/2 and Activation of Liver X Receptor Synergistically Induce Macrophage ABCA1 Expression and Cholesterol Efflux", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 285, no. 9, 26 February 2010 (2010-02-26), pages 6316-6326, XP55035239, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M109.073601	1-8, 16-23
Y	e.g. page 6317, right-hand column, paragraph 1; page 6318, right-hand column, penultimate paragraph; the whole document -----	9-15
X	WO 2005/116057 A1 (BAKER MEDICAL RES INST [AU]; SVIRIDOV DMITRI [AU]) 8 December 2005 (2005-12-08)	1-8, 16-23
Y	e.g. example 2,4,5,7; the whole document -----	9-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/061074

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005116057 A1	08-12-2005	US 2007178086 A1 WO 2005116057 A1	02-08-2007 08-12-2005

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 2	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
G 0 1 N 33/483 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 D	
	G 0 1 N 33/483 C	

(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, RU, TJ, 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, RO, 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, HU, 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, ZA

(74)代理人 100135873
弁理士 小澤 圭子

(74)代理人 100116528
弁理士 三宅 俊男

(74)代理人 100122736
弁理士 小國 泰弘

(74)代理人 100122747
弁理士 田中 洋子

(74)代理人 100132540
弁理士 生川 芳徳

(74)代理人 100146031
弁理士 柴田 明夫

(74)代理人 100181102
弁理士 後藤 孝明

(72)発明者 エカベルト, バルバラ
スイス国、ツェーハー 4 1 0 6 テルヴィル、イム・ホーフアッカー 1 7

(72)発明者 マティレ, フギュス
スイス国、ツェーハー 4 0 0 1 バーゼル、ファルクナーシュトラッセ 1

(72)発明者 ノゴケイク, エバーソン
スイス国、ツェーハー 4 0 5 2 バーゼル、レンヴェーク 1 0 0

(72)発明者 ライス, ベルンハルト
スイス国、ツェーハー 4 0 5 3 バーゼル、グンデルディンガーシュトラッセ 1 8 3

(72)発明者 ワン, ハイヤン
スイス国、ツェーハー 4 1 2 3 アルシュヴィル、ブレンナーシュトラッセ 5 4

Fターム(参考) 2G045 AA13 AA24 AA25 BA13 BB01 CA25 CB01 DA36 DA60 FA37
FB03 FB12 GC15
4B024 AA11 BA41 BA61 CA01 CA09 CA11 CA20 DA01 DA02 DA05
DA11 EA04 GA01 GA11 HA01 HA11
4B064 AG26 AG27 CA01 CA19 CA20 CC24 DA13
4B065 AA01X AA57X AA87X AA90X AA90Y AA91X AB01 AC14 BA01 BA08
CA24 CA25 CA46
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA75 DA76 EA50 FA74

专利名称(译)	与ABCA1多肽结合的抗体		
公开(公告)号	JP2014519337A	公开(公告)日	2014-08-14
申请号	JP2014515154	申请日	2012-06-12
申请(专利权)人(译)	F.霍夫曼 - 罗氏公司		
[标]发明人	エカベルトバルバラ マティレフギュス ノゴケイクエバーソン ライスベルンハルト ワンハイヤン		
发明人	エカベルト,バルバラ マティレ,フギュス ノゴケイク,エバーソン ライス,ベルンハルト ワン,ハイヤン		
IPC分类号	C12N15/09 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C07K16/18 C12P21/08 G01N33/53 G01N33/483		
CPC分类号	C07K16/18		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C12N5/00.102 C07K16/18 C12P21/08 G01N33/53.D G01N33/483.C		
F-TERM分类号	2G045/AA13 2G045/AA24 2G045/AA25 2G045/BA13 2G045/BB01 2G045/CA25 2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/DA60 2G045/FA37 2G045/FB03 2G045/FB12 2G045/GC15 4B024/AA11 4B024/BA41 4B024/BA61 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/EA04 4B024/GA01 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA11 4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/CA01 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA87X 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AA91X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA01 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	津国 肇 柳桥康夫 三宅 俊男 田中洋子 阿基奥·希巴达 后藤孝明		
优先权	2011169924 2011-06-15 EP 2011174755 2011-07-20 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及与天然ABCA1多肽结合的分离的抗体及其在组织样品中检测ABCA1多肽的用途。

【 图 1 2 】

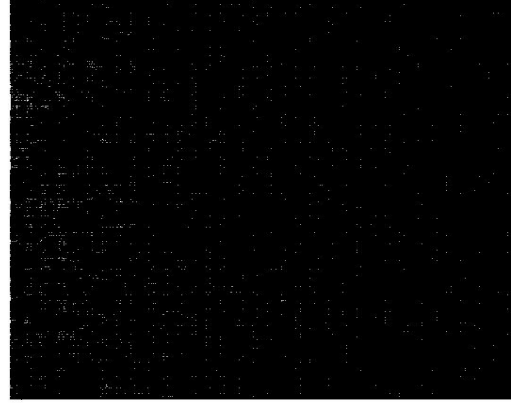


Fig. 12