(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2009 年8 月6 日 (06.08.2009)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2009/096162 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *C12N 1/19* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *C12N 1/21* (2006.01)
C07K 16/12 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01) *C12P 21/08* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2009/000250

(22) 国際出願日: 2009 年1 月23 日 (23.01.2009)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2008-017152 2008 年1 月29 日 (29.01.2008) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社抗体研究所 (Institute for Antibodies Co., Ltd.) [JP/JP]; 〒4600002 愛知県名古屋市中区丸の内三丁目５番１０号 住友商事丸の内ビル５階 Aichi (JP). 国立感染症研究所長が代表する日本国 (JAPAN as represented by DIRECTOR-GENERAL of National Institute of Infectious Diseases) [JP/JP]; 〒1628640 東京都新宿区戸山１－２３－１ Tokyo (JP). 公立大学法人大阪府立大学 (OSAKA PREFECTURE UNIVERSITY PUBLIC CORPORATION) [JP/JP]; 〒5998531 大阪府堺市中区学園町１－１ Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 東成見 (AZUMA, Masachika) [JP/JP]; 〒4600002 愛知県名古屋市中区丸の内三丁目５番１０号 住友商事丸の内ビル５階 株式会社抗体研究所内 Aichi (JP). 高橋元秀 (TAKAHASHI, Motohide) [JP/JP]; 〒2080011 東京都武蔵村山市学園４－７－１ 国立感染症研究所内 Tokyo (JP). 小崎俊司 (KOZAKI, Shunji) [JP/JP]; 〒5998531 大阪府堺市中区学園町１－１ 公立大学法人大阪府立大学内 Osaka (JP). 向本雅郁 (MUKAMOTO, Masafumi) [JP/JP]; 〒5998531 大阪府堺市中区学園町１－１ 公立大学法人大阪府立大学内 Osaka (JP). 幸田知子 (KOHDA, Tomoko) [JP/JP]; 〒5998531 大阪府堺市中区学園町１－１ 公立大学法人大阪府立大学内 Osaka (JP). 黒澤仁 (KUROSAWA, Gene) [JP/JP]; 〒4650075 愛知県名古屋市名東区藤巻町３－２－１２７１ Aichi (JP). 黒澤良和 (KUROSAWA, Yoshikazu) [JP/JP]; 〒4650075 愛知県名古屋市名東区藤巻町３－２－１２７１ Aichi (JP).

(74) 代理人: 萩野幹治 (HAGINO, Mikiharu); 〒5090109 岐阜県各務原市テクノプラザ１丁目２１番地 アネックス・テクノ２ Gifu (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, 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, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 補正書
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

(54) **Title:** COMPOSITION FOR NEUTRALIZING BOTULINUS TOXIN TYPE-A, AND HUMAN ANTI-BOTULINUS TOXIN TYPE-A ANTIBODY

(54) 発明の名称: Ａ型ボツリヌス毒素中和組成物及びヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体

(57) **Abstract:** Disclosed is a means which is effective for botulism diseases and the prevention of the botulism diseases. Specifically disclosed are multiple human anti-botulinus toxin type-A antibodies having different epitopes from one another. Also specifically disclosed is a composition for neutralizing botulinus toxin type-A, which comprises a combination of two or more of the antibodies and which has a high neutralizing activity.

(57) 要約: ボツリヌス中毒疾患とその中毒発症の予防に対して有効な手段を提供することを課題とする。エピトープが異なる複数のヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体が提供される。また、それらを組み合わせた、中和活性の高いＡ型ボツリヌス毒素中和組成物が提供される。

WO 2009/096162 A1

明　細　書

Ａ型ボツリヌス毒素中和組成物及びヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体

技術分野

[0001] 本発明は、Ａ型ボツリヌス毒素に対する結合活性を有し且つ完全ヒト可変領域を有する遺伝子組換え抗体、該抗体をコードする核酸分子、該抗体を産生する形質転換体、該形質転換体を用いた抗体製造法及び該抗体を用いたＡ型ボツリヌス毒素中和組成物などに関する。

背景技術

[0002] クロストリジウム・ボツリヌス（Clostridium botulinum）が産生する毒素は、血清型の違いによってＡ型～Ｇ型に分類される。Ａ、Ｂ、Ｅ、Ｆ型毒素はヒトの健康に重大な影響を及ぼす。ヒトのボツリヌス中毒疾患には「食餌性ボツリヌス症（ボツリヌス食中毒）」、「乳児ボツリヌス症」、「創傷ボツリヌス症」及び、「感染型ボツリヌス症」の４種類がある。Ａ型毒素はボツリヌス食中毒の２６%に関与している。Ａ型毒素はボツリヌス食中毒の２６%に関与している。Ｂ、及びＥ型がこれに続き、Ｆ型毒素のボツリヌス食中毒への関与の割合は比較的低い。また、創傷ボツリヌス中毒はＡ型又はＢ型毒素によってのみ引き起こされることが報告されている（非特許文献１）。

[0003] 成人のボツリヌス食中毒は通常、食品中で菌や芽胞が増殖した結果、産生した毒素を経口的に摂取して発症する一方で、新生児ボツリヌス症では、ハチミツなどの食品に存在する菌や芽胞を経口的に摂取した結果、菌が腸管で発育・増殖して毒素を生産することによって中毒症状が引き起こされる。
食中毒の原因毒素は国により多少異なるがA型、B型およびE型による症例が報告されている。また乳児ボツリヌス症の大半はA型、B型であるが、C.butiricumによるE型毒素、によるF型毒素の報告もある。

[0004] ボツリヌス毒素は重鎖と軽鎖がS-S結合（ジスルフィド結合）した構造の分子である。ボツリヌス毒素は筋肉への神経伝達をブロックし、これによって

弛緩性麻痺を引き起こす。ボツリヌス毒素が気道や呼吸筋に進入すると致死性の呼吸障害を引き起こす。ボツリヌス中毒による死亡率は１２％であり、特定のリスクグループでは更に死亡率が高い（非特許文献３）。

[0005] 一方、ボツリヌス毒素は生物学的毒素として致死性の最も高い毒素（精製Ａ型毒素における70ｋｇのヒトの致死量は、静注または筋注で0.09-0.15μｇ、吸入で0.70-0.90 µg、経口でも70μｇ（JAMA. 2001 Feb 28;285(8):1059-70）であるため、通常の中毒以外の側面として、バイオテロに利用されるという特殊性を備え、社会的にも注目されている。

[0006] ボツリヌス毒素に対する中和剤として日本で承認を受けているものは、ウマ血清を原材料とした製剤である。この製剤はウマ血清由来のグロブリン、即ちヒトには異種蛋白を主成分とするため、アナフィラキシー反応等の免疫反応を引き起こす危険性がある。また、未知のウイルス感染や血清病の問題もある。さらには、安定供給も困難である。さらに、当該製剤の製造には１年以上を要することから、バイオテロなどの非常時への対応は困難な状況にある。加えて、ウマの飼育管理の問題があるため当該製剤は備蓄目的には向いていない。

[0007] 乳児ボツリヌス症に関しては、アナフィラキシー反応等の重篤な副作用を回避するため、このウマグロブリン製剤による治療が行われていないのが現状である。米国においては、健常人をボツリヌストキソイドで免疫して得られた中和抗体価の高い血漿から調製したヒトグロブリン製剤を利用して、乳児ボツリヌス症に対する特異的治療が行われている。実際、「BabyBIG」という商品名の下、乳児ボツリヌス症を対象とした医薬が米国FDAでオーファンドラッグとして製造認可承認されている。しかし、この方法は、倫理的な問題に加えて原材料入手やバイオハザードの問題、さらには安全性の確保の観点から製造に際して各種のウイルス検査を行う必要があるという問題などを抱える。また、日本では当該製剤は承認されておらず使用できない。

[0008] Ａ型毒素に対する組換え中和キメラ抗体の作製に成功したことが報告された（特許文献１）。しかしながら、当該抗体を使用する場合、HACA（ヒト抗

キメラ抗体）の出現の問題や、アナフィラキシー反応などの問題を解決する必要がある。

一方、米国では特にバイオテロの脅威に備える意味からも毒素中和の研究開発が行われ、ボツリヌス毒素ペンタマーを免疫した人のＢリンパ球からファージ抗体ライブラリーを作製し、その中から所望の完全ヒト中和抗体を選択する方法が試みられた。しかし、Ａ型毒素に対して、単独で十分な中和活性を発揮する抗体クローンの取得には成功していない。そのため、ファージディスプレイスクリーニングの結果得られた１種のヒト抗体に、XENOマウス由来のクローン１種、さらにマウスの免疫により得たマウス抗体をヒト化したものを混合する（オリゴクローナル化）ことによって中和活性を強化せざるを得ず、所期の目的、即ち完全ヒト中和抗体による毒素の中和、を達成するには至っていなかった（特許文献２、３、非特許文献４、５、６）。

特許文献1：特開２００６－３１１８５７号公報

特許文献2：国際公開第２００５／０１６２３２号パンフレット

特許文献3：国際公開第２００７／０９４７５４号パンフレット

非特許文献1：H. Sugiyama, Microbiol. Rev. 44:419, 1980

非特許文献2：S. Arnon, Epidemiol. Rev. 3:45, 1981

非特許文献3：C.O. Tacket et al., Am. J. Med. 76:794, 1984

非特許文献4：P. Amersdorfer et al., Infect. Immun. 65(9):3743, 1997

非特許文献5：P. Amersdorfer et al., Vaccine 20:1640, 2002

非特許文献6：A. Nowakowski et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99(17): 11346, 2002

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0009] 本発明は、以上の背景に鑑み、Ａ型ボツリヌス毒素の中和に有効な組成物を提供し、従来の技術における様々な問題点（アナフィラキシー反応、異種蛋白やウイルスの混入など）を解決しようとするものである。また、先行の組換え抗体の検定法では中和活性を客観的に評価し難いという状況に鑑み、

本発明は別の局面として、Ａ型ボツリヌス毒素中和組成物を提供するに際して、国際基準に適合した数値によって中和活性を示すことも課題とする。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らはまず、先例に倣って、ヒトファージ抗体ライブラリーを構築し、ボツリヌス毒素Ａを特異的に認識する抗体クローンの単離を試みた。スクリーニングを繰り返し実施したところ、各回のスクリーニングによって複数の抗体クローンが選択されたものの、エピトープが共通する抗体が繰り返し選択されていることが明らかとなった。この現象が生ずる原因について検討した結果、抗原性が極端に高いエピトープが存在し、それがエピトープのオーバーラップを引き起こしていると予想された。この仮定に従えば、当該エピトープをブロックすることが、エピトープが異なる抗体を効率的に取得するために有効な手段となる。そこで、複数回のスクリーニングで重複して取得された抗体の断片の添加によって抗原性の強いエピトープをブロック（マスク）した上で、ボツリヌスＡ型毒素にファージ抗体ライブラリーを反応させるという戦略を立てた。当該戦略に従い再度スクリーニングを実施することによって、エピトープが異なる複数の抗体クローンを取得することに成功した。取得に成功した各抗体のエピトープを解析した結果、エピトープの違いによって４種類に分類された。即ち、４つのエピトープに関して特異的な抗体クローンを取得することに成功したことが判明した。

続いて、これらの抗体を３種又は４種組み合わせた場合の中和活性を、国際的な基準（日本薬局法　医薬品各条に掲げる生物学的製剤医薬品に記載の「乾燥ボツリヌスウマ抗毒素（乾燥ボツリヌス抗毒素）」の項　３．２．７「力価試験」に準ずる）に従って比較・評価した。その結果、高い中和活性を与える抗体クローンの組合せとして、３種の抗体クローンの組合せが見出された。また、さらに１種の抗体クローンを組合せれば中和活性が向上することが示された。

以上のように本発明者らは、Ａ型ボツリヌス毒素に対する高い中和活性をもたらす抗体クローンを複数取得することに成功するとともに、当該抗体に

認識される４つのエピトープと中和活性の関係を明らかにした。本発明は主としてこれらの成果に基づくものであり、以下の通りである。

［１］配列番号４のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と配列番号８のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを有する抗体のエピトープを認識する第１のヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体と、

配列番号３６のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と配列番号４０のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを有する抗体のエピトープを認識する第２のヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体と、

配列番号４４のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と配列番号４８のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを有する抗体のエピトープ、又は配列番号５２のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と配列番号５６のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを有する抗体のエピトープを認識する第３のヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体と、

を含むＡ型ボツリヌス毒素中和組成物。

［２］第１のヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体が、以下の（１）～（３）からなる群より選択されるいずれかの抗体であり、

第２のヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体が、以下の（４）又は（５）の抗体であり、

第３のヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体が、以下の（６）～（８）からなる群より選択されるいずれかの抗体である、［１］に記載のＡ型ボツリヌス毒素中和組成物：

（１）配列番号１のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域１、配列番号２のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域２、配列番号３のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域３、配列番号５のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域１、配列番号６のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域２、及び配列番号７のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域３を有する抗体；

（２）配列番号９のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域１、配列番

号１０のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域２、配列番号１１のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域３、配列番号１３のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域１、配列番号１４のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域２、及び配列番号１５のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域３を有する抗体；

（３）配列番号１７のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域１、配列番号１８のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域２、配列番号１９のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域３、配列番号２１のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域１、配列番号２２のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域２、及び配列番号２３のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域３を有する抗体；

（４）配列番号２５のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域１、配列番号２６のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域２、配列番号２７のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域３、配列番号２９のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域１、配列番号３０のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域２、及び配列番号３１のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域３を有する抗体；

（５）配列番号３３のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域１、配列番号３４のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域２、配列番号３５のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域３、配列番号３７のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域１、配列番号３８のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域２、及び配列番号３９のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域３を有する抗体；

（６）配列番号４１のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域１、配列番号４２のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域２、配列番号４３のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域３、配列番号４５のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域１、配列番号４６のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域２、及び配列番号４７のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定

領域３を有する抗体；

（７）配列番号４９のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域１、配列番号５０のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域２、配列番号５１のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域３、配列番号５３のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域１、配列番号５４のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域２、及び配列番号５５のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域３を有する抗体；

（８）配列番号５７のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域１、配列番号５８のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域２、配列番号５９のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域３、配列番号６１のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域１、配列番号６２のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域２、及び配列番号６３のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域３を有する抗体。

［３］第１のヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体が前記（１）～（３）からなる群より選択されるいずれかの抗体であり、

第２のヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体が前記（４）又は（５）の抗体であり、

第３のヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体が前記（６）の抗体であり、

第４のヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体として前記（７）又は（８）の抗体を更に含む、［２］に記載のＡ型ボツリヌス毒素中和組成物。

［４］第１のヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体が前記（１）の抗体であり、

第２のヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体が前記（５）の抗体であり、

第３のヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体が前記（６）の抗体である、［２］に記載のＡ型ボツリヌス毒素中和組成物。

［５］第４のヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体として前記（７）の抗体を更に含む、［４］に記載のＡ型ボツリヌス毒素中和組成物。

［６］第１のヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体が前記（１）の抗体であり、

第２のヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体が前記（５）の抗体であり、

第３のヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体が前記（７）の抗体である、［２］に記載のＡ型ボツリヌス毒素中和組成物。

［７］第４のヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体として前記（４）の抗体を更に含む、［６］に記載のＡ型ボツリヌス毒素中和組成物。

［８］前記（１）の抗体は、重鎖可変領域が配列番号４のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域が配列番号８のアミノ酸配列を有し、

前記（２）の抗体は、重鎖可変領域が配列番号１２のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域が配列番号１６のアミノ酸配列を有し、

前記（３）の抗体は、重鎖可変領域が配列番号２０のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域が配列番号２４のアミノ酸配列を有し、

前記（４）の抗体は、重鎖可変領域が配列番号２８のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域が配列番号３２のアミノ酸配列を有し、

前記（５）の抗体は、重鎖可変領域が配列番号３６のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域が配列番号４０のアミノ酸配列を有し、

前記（６）の抗体は、重鎖可変領域が配列番号４４のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域が配列番号４８のアミノ酸配列を有し、

前記（７）の抗体は、重鎖可変領域が配列番号５２のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域が配列番号５６のアミノ酸配列を有し、

前記（８）の抗体は、重鎖可変領域が配列番号６０のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域が配列番号６４のアミノ酸配列を有する、

［２］～［７］のいずれか一項に記載のＡ型ボツリヌス毒素中和組成物。

［９］［２］に規定された（１）～（８）のいずれかの抗体からなる、単離されたヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体。

［１０］前記（１）の抗体は、重鎖可変領域が配列番号４のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域が配列番号８のアミノ酸配列を有し、

前記（２）の抗体は、重鎖可変領域が配列番号１２のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域が配列番号１６のアミノ酸配列を有し、

前記（３）の抗体は、重鎖可変領域が配列番号２０のアミノ酸配列を有し

、軽鎖可変領域が配列番号２４のアミノ酸配列を有し、

前記（４）の抗体は、重鎖可変領域が配列番号２８のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域が配列番号３２のアミノ酸配列を有し、

前記（５）の抗体は、重鎖可変領域が配列番号３６のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域が配列番号４０のアミノ酸配列を有し、

前記（６）の抗体は、重鎖可変領域が配列番号４４のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域が配列番号４８のアミノ酸配列を有し、

前記（７）の抗体は、重鎖可変領域が配列番号５２のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域が配列番号５６のアミノ酸配列を有し、

前記（８）の抗体は、重鎖可変領域が配列番号６０のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域が配列番号６４のアミノ酸配列を有する、［９］に記載の単離されたヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体。

［１１］［１０］に記載の抗体の重鎖可変領域及び／又は軽鎖可変領域をコードする、単離された核酸分子。

［１２］［１１］に記載の核酸分子を保持するベクター。

［１３］［１２］に記載のベクターで形質転換された形質転換体。

［１４］［１３］に記載の形質転換体を培養し、ヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体を産生させる工程と、

培養上清を回収し、該培養上清からヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体を精製する工程と、

を含む、ヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体の製造方法。

[0011]（用語）

説明の便宜上、本明細書に使用される用語の一部についてその定義をまとめて以下に示す。

本明細書において用語「～を含む」又は「～を含んでなる」は、「～からなる」の意味をも含む表現として使用される。したがって例えば、「複数の要素（部材）を含んで構成される物（又は方法）」と記載した場合には、それが意味するものとして「当該複数の要素（部材）から構成される物（又は

方法）」も当然に考慮される。

[0012] 「単離された」とは、その本来の環境（例えば天然の物質の場合は天然の環境）から取り出された状態、即ち人為的操作によって本来の存在状態と異なる状態で存在していることを意味する。

「単離された抗体」には、天然であって且つ何ら外的操作（人為的操作）が施されていない抗体、即ちある個体の体内で産生され、そこに留まっている状態の抗体は含まれない。尚、単離された抗体は、典型的には、他の種類の抗体が混在していない状態、即ち単独で（同種の抗体の集合として）存在している。

「相補性決定領域（CDR）」については、Kabatら（Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th edition US Department of Health and Human Services(1987)）を参照）の定義に従う。

「Ａ型ボツリヌス毒素中和組成物」とは、複数種の抗体を有効成分として含有し、Ａ型ボツリヌス毒素に対して中和活性を示す薬学的混合物をいう。

本発明における「抗毒素力価」は、特に言及しない限り、国際単位で表現される。「抗毒素力価」は、日本薬局法　医薬品各条に掲げる生物学的製剤医薬品に記載の「乾燥ボツリヌスウマ抗毒素（乾燥ボツリヌス抗毒素）」の項　３．２．７　「力価試験」に準じて決定される。

[0013] 本明細書では必要に応じて、慣習に従い以下の略号（括弧内）を使用する。

重鎖（H鎖）、軽鎖（L鎖）、重鎖可変領域（VH）、軽鎖可変領域（VL）、相補性決定領域（CDR）、相補性決定領域１（CDR1）、相補性決定領域２（CDR2）、相補性決定領域３（CDR3）、重鎖相補性決定領域１（VH CDR1）、重鎖相補性決定領域２（VH CDR2）、重鎖相補性決定領域３（VH CDR3）軽鎖相補性決定領域１（VL CDR1）、軽鎖相補性決定領域２（VL CDR2）、軽鎖相補性決定領域３（VL CDR3）

図面の簡単な説明

[0014] [図1]抗体ライブラリーの構成。

[図2]スクリーニング実験１で取得した抗体の結合活性。無毒成分タンパク質に対するELISAでABS492<0.2を示したクローンをポジティブクローンとした（矢印）。

[図3]スクリーニング実験１で取得した抗体をサンプルとした中和試験（動物試験）の結果。表中の符号（＋、－等）は症状の強さを表す。±、+、＋＋の順に症状が強い。

[図4]スクリーニング実験２で採用した、エピトープのマスク法の概要。

[図5]スクリーニング実験２で取得した抗体の結合活性（図５の下（4th））とスクリーニング実験３で取得した抗体の結合活性（図５の上（3rd-2））。

[図6]スクリーニング実験３で取得した抗体のアミノ酸配列の比較。上から順にBT-058のVHの配列（配列番号２０）、BT-047のVHの配列（配列番号１２）、BT-015のVHの配列配列番号４）、BT-058のVLの配列（配列番号２４）、BT-047のVLの配列（配列番号１６）、BT-015のVLの配列（配列番号８）。

[図7]スクリーニング実験４で取得した抗体の結合活性。ここに示した全ての抗体クローンをポジティブクローンとした。

[図8]スクリーニング実験４で取得した抗体をサンプルとした中和試験（動物試験）の結果。表中の符号（＋、＋＋等）は症状の強さを表す。＋＋、＋＋＋の順に症状が強い。ｄは「マウス死亡」を表す。

[図9]ボツリヌストキソイドを用いたスクリーニングの過程。

[図10]スクリーニング実験５で取得した抗体の結合活性。

[図11]スクリーニング実験５で取得した抗体の結合活性。

[図12]スクリーニング実験６で取得した抗体の結合活性。

[図13]スクリーニング実験６で取得した抗体の結合活性。

[図14]スクリーニング実験５及び６で取得した抗体をサンプルとした中和試験（動物試験）の結果。表中の符号（＋、＋＋等）は症状の強さを表す。±、＋、＋＋、＋＋＋の順に症状が強い。ｄは「マウス死亡」を表す。

[図15]ニューロトキシンを用いたスクリーニングの過程（ニューロトキシン特異的抗体の濃縮）。

[図16]スクリーニング実験１～６で取得した抗体のアミノ酸配列の比較。上から順にBT-175のVHの配列（配列番号３６）、NT-221のVHの配列（配列番号２８）、NT-320のVHの配列（配列番号４４）、NT-539のVHの配列（配列番号６０）、BT-015のVHの配列（配列番号４）、NT-523のVHの配列（配列番号５２）、NT-320のVLの配列（配列番号４８）、NT-539のVLの配列（配列番号６４）、NT-221のVLの配列（配列番号３２）、BT-175のVLの配列（配列番号４０）、BT-015のVLの配列（配列番号８）、NT-523のVLの配列（配列番号５６）。尚、Germlineとの相同性も併せて示した。

[図17]Biacoreによる結合定数解析の結果（サンプルはBT-015のFab-PP型抗体）。

[図18]Biacoreによる結合定数解析の結果（サンプルはBT-015のIgG型抗体）。

[図19]Biacoreによる結合定数解析の結果（サンプルはBT-175のFab-PP型抗体）。

[図20]Biacoreによる結合定数解析の結果（サンプルはBT-175のIgG型抗体）。

[図21]Biacoreによる結合定数解析の結果（サンプルはNT-221のFab-PP型抗体）。

[図22]Biacoreによる結合定数解析の結果（サンプルはNT-320のFab-PP型抗体）。

[図23]Biacoreによる競合実験の結果（BT-015との競合）。BT-015とNT-221が競合することが示唆された。

[図24]Biacoreによる競合実験の結果（BT-175との競合）。BT-175とNT-221が競合することが示唆された。

[図25]Biacoreによる競合実験の結果（NT-221との競合）。NT-539は250sec付近で強いノイズが発生したためその領域を削除した。

[図26]Biacoreによる競合実験の結果（NT-320との競合）。

[図27]Biacoreによる競合実験の結果（NT-523との競合）。NT-523とNT-539が

競合することが示唆された。

[図28]５種類の抗体クローン（BT-015、BT-175、NT-221、NT-320、NT-523）をサンプルとした中和試験の結果。表中の符号（＋、＋＋等）は症状の強さを表す。＋、＋＋、＋＋＋の順に症状が強い。－は「症状を認めない」、ｄは「マウス死亡」をそれぞれ表す。

[図29]ELISAによる抗体のエピトープ解析と毒素亜型A2毒素に対する反応性。６種類の中和抗体（BT-015, BT-175, NT-221、NT-320, NT-523, NT-539）のエピトープをより詳細に解析し、またその亜型であるA2型のニューロトキシン（CHIBA-H）に対する反応性も同時に確認するため、下記抗原を用いてELISAを実施した。クローン毎、OD492nmの値を表形式で示した。

[図30]イムノブロッティングによるエピトープ解析。ニューロトキシン(NT)及び重鎖C末端側の神経細胞結合ドメイン（Hc、大腸菌リコンビナントタンパク質）に対してイムノブロッティングによるエピトープ解析を行った結果を示した。各抗体クローンにつき２種類の濃度（50μg/ml（実線のレーン）、5μg/ml（破線のレーン）に希釈し、反応させた。NT-523はHcドメインの一次構造を認識した。一方、この実験では、その他の抗体についてはバンドが検出されなかった。

[図31]免疫沈降によるエピトープ解析。３種類の抗原（ニューロトキシン、H鎖、L鎖）を用いて各クローンの免疫沈降を行い、エピトープ解析を行った結果である。コントロールはH鎖、L鎖をそのまま上層泳動し、アフィニティー精製したウサギ抗Ａ型ボツリヌスニューロトキシン抗体（1000倍希釈）を反応させている。BT-015, NT-523, NT-539はH chainを認識（実線の丸）、BT-175はL chainを認識している可能性が高い（破線の丸）。一方、この実験からは、NT-221, NT-320はH chainとL chainのどちらを認識しているか判定不能であった。

[図32]エピトープ解析の結果を纏め、６種類の抗体のエピトープ分類した表。エピトープ解析の結果を総合的に判断し、抗体エピトープ候補を表の最下段にまとめた。尚、各クローンの結合性（エピトープ候補）について、ニュ

ーロトキシンと結合性がある場合はNT、H chain結合性がある場合はH、H chain C末端側の神経細胞結合ドメインと結合性がある場合はHc、L chainと結合性がある場合はLで示した。（ー）は判定不能を表す。

発明を実施するための最良の形態

[0015] 本発明の第１の局面はＡ型ボツリヌス毒素中和組成物（以下、「本発明の組成物」ともいう）に関する。本発明の組成物では少なくとも３種の抗体を用いる。当該３種の抗体はいずれも、Ａ型ボツリヌス毒素を認識するヒト抗体である。本明細書では当該３種の抗体を、「第１のヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体」、「第２のヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体」、「第３のヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体」と呼ぶ。尚、説明の便宜上、以下では「第１のヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体」を「第１抗体」と略称し、「第２のヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体」を「第２抗体」と略称し、「第３のヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体」を「第３抗体」と略称する。

[0016] 本発明者らはＡ型ボツリヌス毒素の中和に有効なヒト抗体クローン（BT-015、BT-047、BT-058、NT-221、BT-175、NT-320、NT-523、NT-539）を取得することに成功した（実施例の欄を参照）。また、取得に成功したヒト抗体クローンは、エピトープの異同に基づき、４種類に分類されることを示した。第１抗体は、他の抗体クローンと組み合わせて使用するとＡ型ボツリヌス毒素の中和に有効であることが示された抗体クローンBT-015に対応するものであり、抗体クローンBT-015、即ち「配列番号４のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と配列番号８のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを有する抗体」のエピトープを認識することによって特徴づけられる。第１抗体のエピトープは抗体クローンBT-015のエピトープに一致することから、第１抗体と抗体クローンBT-015を同時にＡ型ボツリヌス毒素に反応させれば競合が認められる。従って、第１抗体としての適格性は、抗体クローンBT-015を利用した競合実験によって確認することができる。

[0017] 第２抗体は、他の抗体クローンと組み合わせて使用するとＡ型ボツリヌス毒素の中和に有効であることが示された抗体クローンBT-175に対応するもの

であり、抗体クローンBT-175、即ち「配列番号３６のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と配列番号４０のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを有する抗体」のエピトープを認識することによって特徴づけられる。尚、第２抗体としての適格性については第１抗体の場合と同様に確認することができる。

[0018] 第３抗体は、抗体クローンBT-015と抗体クローンBT-175と組み合わせて使用するとＡ型ボツリヌス毒素の中和に有効であることが示された抗体クローン（NT-320又はNT-523）に対応するものであり、抗体クローンNT-320、即ち「配列番号４４のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と配列番号４８のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを有する抗体」のエピトープ、又は抗体クローンNT-523、即ち「配列番号５２のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と配列番号５６のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを有する抗体」のエピトープを認識することによって特徴づけられる。尚、第３抗体としての適格性については第１抗体の場合と同様に確認することができる。

[0019] 本発明の一態様では、第１抗体が、以下の（１）～（３）からなる群より選択されるいずれかの抗体である。第２抗体は以下の（４）又は（５）の抗体である。第３抗体は以下の（６）～（８）からなる群より選択されるいずれかの抗体である。

（１）配列番号１のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域１、配列番号２のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域２、配列番号３のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域３、配列番号５のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域１、配列番号６のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域２、及び配列番号７のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域３を有する抗体

（２）配列番号９のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域１、配列番号１０のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域２、配列番号１１のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域３、配列番号１３のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域１、配列番号１４のアミノ酸配列からなる軽鎖相補

性決定領域２、及び配列番号１５のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域３を有する抗体

（３）配列番号１７のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域１、配列番号１８のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域２、配列番号１９のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域３、配列番号２１のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域１、配列番号２２のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域２、及び配列番号２３のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域３を有する抗体

（４）配列番号２５のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域１、配列番号２６のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域２、配列番号２７のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域３、配列番号２９のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域１、配列番号３０のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域２、及び配列番号３１のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域３を有する抗体

（５）配列番号３３のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域１、配列番号３４のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域２、配列番号３５のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域３、配列番号３７のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域１、配列番号３８のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域２、及び配列番号３９のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域３を有する抗体

（６）配列番号４１のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域１、配列番号４２のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域２、配列番号４３のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域３、配列番号４５のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域１、配列番号４６のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域２、及び配列番号４７のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域３を有する抗体

（７）配列番号４９のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域１、配列番号５０のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域２、配列番号５１のア

ミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域３、配列番号５３のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域１、配列番号５４のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域２、及び配列番号５５のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域３を有する抗体

（８）配列番号５７のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域１、配列番号５８のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域２、配列番号５９のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域３、配列番号６１のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域１、配列番号６２のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域２、及び配列番号６３のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域３を有する抗体

[0020] （１）はヒト抗体クローンBT-015に対応し、（２）はヒト抗体クローンBT-047に対応し、（３）はヒト抗体クローンBT-058に対応し、（４）はヒト抗体クローンNT-221に対応し、（５）はヒト抗体クローンBT-175に対応し、（６）はヒト抗体クローンNT-320に対応し、（７）はヒト抗体クローンNT-523に対応し、（８）はヒト抗体クローンNT-539に対応する。以下、各クローンの配列情報を示す。

[0021] (BT-015)

VH CDR1：配列番号１

VH CDR2：配列番号２

VH CDR3：配列番号３

VH：配列番号４

VL CDR1：配列番号５

VL CDR2：配列番号６

VL CDR3：配列番号７

VL：配列番号８

[0022] (BT-047)

VH CDR1：配列番号９

VH CDR2：配列番号１０

VH CDR3：配列番号１１

VH：配列番号１２

VL CDR1：配列番号１３

VL CDR2：配列番号１４

VL CDR3：配列番号１５

VL：配列番号１６

[0023] (BT-058)

VH CDR1：配列番号１７

VH CDR2：配列番号１８

VH CDR3：配列番号１９

VH：配列番号２０

VL CDR1：配列番号２１

VL CDR2：配列番号２２

VL CDR3：配列番号２３

VL：配列番号２４

[0024] (NT-221)

VH CDR1：配列番号２５

VH CDR2：配列番号２６

VH CDR3：配列番号２７

VH：配列番号２８

VL CDR1：配列番号２９

VL CDR2：配列番号３０

VL CDR3：配列番号３１

VL：配列番号３２

[0025] (BT-175)

VH CDR1：配列番号３３

VH CDR2：配列番号３４

VH CDR3：配列番号３５

VH：配列番号３６

VL CDR1：配列番号３７

VL CDR2：配列番号３８

VL CDR3：配列番号３９

VL：配列番号４０

[0026] (NT-320)

VH CDR1：配列番号４１

VH CDR2：配列番号４２

VH CDR3：配列番号４３

VH：配列番号４４

VL CDR1：配列番号４５

VL CDR2：配列番号４６

VL CDR3：配列番号４７

VL：配列番号４８

[0027] (NT-523)

VH CDR1：配列番号４９

VH CDR2：配列番号５０

VH CDR3：配列番号５１

VH：配列番号５２

VL CDR1：配列番号５３

VL CDR2：配列番号５４

VL CDR3：配列番号５５

VL：配列番号５６

[0028] (NT-539)

VH CDR1：配列番号５７

VH CDR2：配列番号５８

VH CDR3：配列番号５９

VH：配列番号６０

VL CDR1：配列番号６１

VL CDR2：配列番号６２

VL CDR3：配列番号６３

VL：配列番号６４

[0029] 好ましい一態様では、（１）の抗体は、重鎖可変領域が配列番号４のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域が配列番号８のアミノ酸配列を有する。（２）の抗体については、重鎖可変領域が配列番号１２のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域が配列番号１６のアミノ酸配列を有する。（３）の抗体については、重鎖可変領域が配列番号２０のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域が配列番号２４のアミノ酸配列を有する。（４）の抗体については、重鎖可変領域が配列番号２８のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域が配列番号３２のアミノ酸配列を有する。（５）の抗体については、重鎖可変領域が配列番号３６のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域が配列番号４０のアミノ酸配列を有する。（６）の抗体については、重鎖可変領域が配列番号４４のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域が配列番号４８のアミノ酸配列を有する。（７）の抗体については、重鎖可変領域が配列番号５２のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域が配列番号５６のアミノ酸配列を有する。（８）の抗体については、重鎖可変領域が配列番号６０のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域が配列番号６４のアミノ酸配列を有する。

[0030] 各抗体の由来、種類、クラス、形態などは限定されない。好ましくは、完全ヒトIgG抗体として各抗体を調製する。この場合の定常領域の種類は特に限定されない。即ち、重鎖はγ鎖に限られず、μ鎖、α鎖又はε鎖であってもよい。同様に軽鎖はκ鎖であってもλ鎖であってもよい。

Fab、Fab'、F(ab')2、scFv、又はdsFv抗体などの抗体断片として各抗体を調製することもできる。Fabは、IgG抗体をシステイン存在下パパイン消化することにより得られる、L鎖とH鎖可変領域、並びにCH1ドメイン及びヒンジ部の一部からなるH鎖フラグメントとから構成される分子量約５万の断片である。所望のIgG抗体があれば、これをパパイン消化することによりFabを得るこ

とができる。また、H鎖の一部及びL鎖をコードするDNAを適当なベクターに組み込み、当該ベクターを用いて形質転換した形質転換体よりFabを調製することもできる。

[0031] Fab'は、後述のF(ab')$_2$のH鎖間のジスルフィド結合を切断することにより得られる分子量が約５万の断片である。所望のIgG抗体があれば、これをペプシン消化し、還元剤を用いてジスルフィド結合を切断することによりFab'を得ることができる。また、Fab同様に、Fab'をコードするDNAを用いて遺伝子工学的に調製することもできる。

[0032] F(ab')$_2$は、IgG抗体をペプシン消化することにより得られる、L鎖とH鎖可変領域、並びにCH1ドメイン及びヒンジ部の一部からなるH鎖フラグメントとから構成される断片（Fab'）がジスルフィド結合で結合した分子量約１０万の断片である。所望のIgG抗体があれば、これをペプシン消化することによりF(ab')$_2$を得ることができる。また、Fab同様に、F(ab')$_2$をコードするDNAを用いて遺伝子工学的に調製することもできる。

[0033] scFvは、H鎖可変領域とL鎖可変領域とからなるFvを、片方の鎖のC末端と他方のN末端とを適当なペプチドリンカーで連結し一本鎖化した抗体断片である。ペプチドリンカーとしては、例えば柔軟性の高い（GGGGS）$_3$などを用いることができる。例えば、H鎖可変領域及びL鎖可変領域をコードするDNAとペプチドリンカーをコードするDNAを用いてscFv抗体をコードするDNAを構築し、これを適当なベクターに組み込み、当該ベクターを用いて形質転換した形質転換体よりscFvを調製することができる。

[0034] dsFvは、H鎖可変領域及びL鎖可変領域の適切な位置にCys残基を導入し、H鎖可変領域とL鎖可変領域とをジスルフィド結合により安定化させたFv断片である。各鎖におけるCys残基の導入位置は分子モデリングにより予測される立体構造に基づき決定することができる。例えばH鎖可変領域及びL鎖可変領域のアミノ酸配列から立体構造を予測し、かかる予測に基づき変異を導入したH鎖可変領域及びL鎖可変領域をそれぞれコードするDNAを構築し、これを適当なベクターに組み込み、そして当該ベクターを用いて形質転換した形質転換

体よりdsFvを調製することができる。

[0035] ここで、本発明の組成物における好ましい抗体の組合せとして、以下の組合せを挙げることができる。当該組合せは、後述の実施例に示す中和試験において非常に高い中和活性が認められた組合せに対応する。

第１抗体：（１）の抗体

第２抗体：（５）の抗体

第３抗体：（６）の抗体

[0036] 上記組合せを採用した場合には、第４のヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体（第４抗体）として（７）の抗体を併用することが好ましい。このようにして得られる４種の抗体の組合せは、後述の実施例に示す中和試験において最も高い中和活性が認められた抗体の組合せに対応する。

[0037] 好ましい抗体の組合せの他の例を以下に示す。当該組合せは、後述の実施例に示す中和試験において高い中和活性が認められた組合せに対応する。

第１抗体：（１）の抗体

第２抗体：（５）の抗体

第３抗体：（７）の抗体

[0038] なお、有効成分の抗体を３種に限る場合においては、Ａ型毒素のなかでもその亜種のA2毒素に対しては、上記第３抗体として（７）より強い結合性を保持している（８）の抗体を用いることが好ましい。

[0039] 上記組合せを採用した場合には、第４のヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体（第４抗体）として（４）の抗体を併用することが好ましい。

[0040] ４種の抗体を併用する場合の組合せは以上の二つの例に限られるものではない。以下、４種の抗体を併用する場合の好ましい組合せを示す。

第１抗体：（１）～（３）からなる群より選択されるいずれかの抗体

第２抗体：（４）又は（５）の抗体

第３抗体：（６）の抗体

第４抗体：（７）又は（８）の抗体

[0041] （１）～（８）の抗体は、Ａ型ボツリヌス毒素に対して高い中和活性を示

す組成物の有効成分として利用されるものであり、それ自体が高い力価を有する。そこで、本発明は第２の局面として、（１）～（８）のいずれかの抗体からなるＡ型ボツリヌス毒素中和抗体を提供する。また、本発明は第３の局面として、当該抗体の重鎖可変領域及び／又は軽鎖可変領域をコードする、単離された核酸分子を提供する。以下、（１）～（８）に対応する抗体クローンの塩基配列（重鎖可変領域及び軽鎖可変領域）を示す。

(BT-015)

VH：配列番号６５

VL：配列番号６６

[0042] (BT-047)

VH：配列番号６７

VL：配列番号６８

[0043] (BT-058)

VH：配列番号６９

VL：配列番号７０

[0044] (NT-221)

VH：配列番号７１

VL：配列番号７２

[0045] (BT-175)

VH：配列番号７３

VL：配列番号７４

[0046] (NT-320)

VH：配列番号７５

VL：配列番号７６

[0047] (NT-523)

VH：配列番号７７

VL：配列番号７８

[0048] (NT-539)

VH：配列番号７９

VL：配列番号８０

[0049] なお、Ａ型の亜種であるＡ２毒素に対しても、上記各（１）～（８）の抗体は強い結合性を保持しており、強い中和活性を示す組成物の有効性分となりうる。

[0050] 本発明の抗体（（１）～（８）の抗体）は、各抗体クローンの配列情報を基に遺伝子工学的手法で調製することができる。即ち、典型的には、目的の抗体をコードする遺伝子発現コンストラクトの調製、適当な発現系を利用した発現、及び発現産物の回収、からなる一連の工程によって本発明の抗体を調製することができる。

[0051] 発現系は特に限定されない。即ち、目的の組換え抗体が発現される限り、任意の発現系を利用することができる。但し、IgG型の組換え抗体を発現させる場合には、動物細胞を利用した発現系を用いるとよい。また、可変領域由来のFab、Fab'、$F(ab')_2$、scFv、又はdsFvなどの抗体断片を発現させる場合、動物細胞の他、大腸菌、酵母などの微生物を利用した発現系を利用することができる。使用する宿主に応じ、適当な発現ベクターが用いられる。シグナルペプチドを利用すれば、目的の組換え抗体を細胞外に分泌させたり、ペリプラズマ領域に輸送させたり、あるいは細胞内に留まらせたりすることができる。

[0052] 以下では、最も一般的である、動物細胞を利用した発現方法について詳細に述べる。まず、目的の抗体の重鎖可変領域（VH）をコードするDNAを化学合成、生化学的切断／再結合等により作製する。得られたH鎖可変領域をコードするDNAを、ヒトH鎖定常領域をコードするDNAとライゲーションして発現用ベクターに組込みH鎖発現ベクターを得る。同様の方法でL鎖発現ベクターを作製する。尚、CDR領域を挟んで存在するFR（フレームワーク領域）においては若干の変異を導入した可変領域を用いることもできる。即ち、CDR領域が全て同一な抗体は同じエピトープを認識するためであり、最終的に得られる抗体がＡ型ボツリヌス毒素を認識し、十分な結合活性を示す限り、FRの改変が許

容される。

[0053] ここで、アミノ酸配列が明らかであれば可変領域の立体構造（空間的配置）を予測することが可能であり、FRに特定の改変を加えたことによる立体構造の変化を予測することも可能である。また、コンピュータープログラムENCAD（Energy Calculation and Dynamics）を利用して可変領域の分子モデルを構築することや、CDRと潜在的に相互作用するのに十分に近接した、FR中のアミノ酸を決定することなども可能である（例えば、WO97/002290を参照）。また、各アミノ酸残基が適した環境にあるかを定量的に評価するコンピュータープログラムVerify-3Dや免疫グロブリン専用のモデリング手法（WAM-Web Antibody ModelingやOxford Moleclelar社のAbM）なども利用可能である。可変領域の変異の最適化はランダムPCRやファージディスプレイ法などを利用することによってルーチン的作業で行うことができる。（Manuel B,et al J.Biol Chem Vol.272 no.16 10678 "Antibody humanization using monovalent page display"やWO2007/094754等を参照）。

改変されるアミノ酸の数は、好ましくはFR全体の15%以下であり、更に好ましくはFR全体の10%以下であり、更に更に好ましくはFR全体の5%以下であり、最も好ましくはFR全体の1%以下である。

[0054] 「発現ベクター」とは、それに挿入された核酸を目的の細胞（標的細胞）内に導入し且つ当該細胞内において発現させることが可能な核酸性分子をいい、ウイルスベクター及び非ウイルスベクターを含む。ウイルスベクターを用いた遺伝子導入法は、ウイルスが細胞へと感染する現象を巧みに利用するものであり、高い遺伝子導入効率が得られる。ウイルスベクターとしてSV40 virus basedベクター、EB virus basedベクター、BPV（パピローマウイルス）basedベクター等を例示できるが、これらに限定されるものではない。非ウイルスベクターとしてリポソーム、正電荷型リポソーム（Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 84:7413-7417, 1987）、HVJ(Hemagglutinating virus of Japan)-リポソーム（Dzau, V.J., Mann, M., Morishita, R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 93:11421-11425,

1996、Kaneda, Y., Saeki, Y. & Morishita, R., Molecular Med. Today, 5: 298-303, 1999）等が開発されている。発現ベクターをこのような非ウイルス性ベクターとして構築してもよい。

発現ベクターに含まれるプロモーターとしてはSV40初期プロモーター、SV40後期プロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、ニワトリβアクチンプロモーターなどが利用される。

[0055] H鎖発現ベクターとL鎖発現ベクターを用意した後、これらを用いて宿主細胞を共形質転換する。宿主細胞としては、CHO細胞(チャイニーズハムスター卵巣)(A.Wright& S.L.Morrison, J.Immunol.160, 3393-3402 (1998))、SP2/0細胞(マウスミエローマ)(K.Motmans et al., Eur.J.Cancer Prev.5,512-519 (1996),R.P.Junghans et al.,Cancer Res.50,1495-1502 (1990))などが好適に用いられる。形質転換にはリポフェクチン法(R.W.Malone et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86,6077 (1989), P.L.Felgner et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84,7413 (1987)、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法(F.L.Graham & A.J.van der Eb,Virology 52,456-467(1973))、DEAE-Dextran法等が好適に用いられる。

[0056] H鎖発現ベクターとL鎖発現ベクターの比率、導入のタイミングなどに特段の制約はない。両ベクターの比率（H鎖発現ベクター：L鎖発現ベクター（モル比））は、例えば１：０．５～５、好ましくは１：０．８～１．２である。導入のタイミングに関しては、H鎖発現ベクターとL鎖発現ベクターを同時に宿主細胞に導入することにしても、いずれかを先に導入することにしてもよい。また、上記のようにH鎖発現ベクターとL鎖発現ベクターを別々に構築するのではなく、VHをコードするDNAとVLをコードするDNAの両者を組み込んだ発現ベクターを構築し、当該発現ベクターで宿主細胞を形質転換することにしてもよい。

[0057] 形質転換体の選択に利用するマーカー（選択マーカー）としては、アミノグリコシド3'ホスホトランスフェラーゼ(neo)遺伝子やジヒドロ葉酸還元酵素(dhfr)遺伝子、ピューロマイシン耐性酵素遺伝子、グルタミン合成酵素(GS)

遺伝子など、一般的なマーカー遺伝子（例えば、Michael Kriegler著、加藤郁之進
監訳、ラボマニュアル動物細胞の遺伝子工学、宝酒造(1994)を参照）が利用できる。

[0058] 形質転換体の細胞内又は培養液より抗体が回収（分離・精製）される。抗体の回収は常法に従えば良い。即ち、遠心分離、硫安分画、塩析、限外濾過、アフィニティークロマトグラフィー（Protein A樹脂やProtein G樹脂を使用したものなど）、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーなどを利用して抗体を回収する。

[0059] 以上のようにして得られた抗体は、本発明の組成物の有効成分として利用される。本発明の組成物を構成する際の製剤化は常法に従えばよい。製剤化の際、製剤上許容される他の成分（例えば、担体、賦形剤、崩壊剤、緩衝剤、乳化剤、懸濁剤、無痛化剤、安定剤、保存剤、防腐剤、生理食塩水など）を含有させることができる。賦形剤の例としては、水、生理食塩水溶液、リンゲル液、デキストロース溶液、各種緩衝液（リン酸バッファー、重炭酸バッファー、トリスバッファー等）、乳糖、デンプン、ソルビトール、D-マンニトール、白糖等が挙げられる。崩壊剤としてはデンプン、カルボキシメチルセルロース、炭酸カルシウム等を用いることができる。緩衝剤としてはリン酸塩、クエン酸塩、酢酸塩等を用いることができる。乳化剤としてはアラビアゴム、アルギン酸ナトリウム、トラガント等を用いることができる。懸濁剤としてはモノステアリン酸グリセリン、モノステアリン酸アルミニウム、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ラウリル硫酸ナトリウム等を用いることができる。無痛化剤としてはベンジルアルコール、クロロブタノール、ソルビトール等を用いることができる。安定剤としてはプロピレングリコール、ジエチリン亜硫酸塩、アスコルビン酸等を用いることができる。保存剤としてはフェノール、塩化ベンザルコニウム、ベンジルアルコール、クロロブタノール、メチルパラベン等を用いることができる。防腐剤としては塩化ベンザルコニウム、パラオキシ

安息香酸、クロロブタノール等と用いることができる。

製剤化する場合の剤型も特に限定されないが、注射剤、外用剤又は座剤など、即効性のある製剤処方が好ましい。

[0060] 有効成分である各抗体の混合比は特に限定されないが、典型的には、各抗体の存在量を同一とする（等モルずつ混合）。尚、当業者であれば、後述の実施例に示した中和試験と同様の試験を通して混合比を最適化することができる。

また、各抗体のクラスや形態などは任意である。従って、異なるクラスの抗体が混在した状態や、異なる形態の抗体が混在した状態で本発明の組成物が構成されていてもよい。

本発明の組成物中の抗体濃度は、最終的な投与形態と投与スケジュールを鑑みた上で逆算的に決定することが好ましい。

[0061] 本発明の組成物の状態も特に限定されない。例えば液状や乾燥状態（好ましくは凍結乾燥躁状態）に本発明の組成物を調製する。例えば凍結乾燥させる場合には、溶剤で溶解後の最終1mL中に有効成分として抗毒素力価500単位以上となるように濃度を調整した上で凍結乾燥するとよい。尚、日本薬局法

医薬品各条に掲げる生物学的製剤医薬品に記載の「乾燥ボツリヌスウマ抗毒素（乾燥ボツリヌス抗毒素）」の項５．２ 「小分容器の含有単位数」に従い、小分容器の含有単位数を抗毒素価10000単位以上とするのが好ましい。

[0062] 本発明の組成物は、典型的には、ボツリヌス中毒疾患の治療と予防に用いられる。本発明の組成物はその形態に応じて経口投与又は非経口投与（静脈内、動脈内、皮下、筋肉、腹腔内注射、標的細胞への直接導入など）によって対象（患者）に適用される。

[0063] 本発明の組成物の投与量は症状、患者の年齢、性別、及び体重などによって異なるが、当業者であれば適宜適当な投与量を設定することが可能である。例えば、成人（体重約60kg）を対象として一回当たりの抗毒素の投与量は10000単位～100000単位となるように設定することができる。投与量、スケジュールの設定においては、ウマ抗毒素の場合に使用される量、スケジュール

（日医雑誌第１２８巻・第１号/平成１４（２００２）年７月１日）を参考に、本発明組成物とウマ抗毒素の相対力価を鑑み、患者の病状や効果の持続時間などを考慮することができる。

[0064] 国際的な使用に適したものにするため、好ましくは、本発明の組成物の抗毒素力価は国際的な基準で評価される。日本薬局方　医薬品各条に掲げる生物学的製剤医薬品に記載の「乾燥ボツリヌスウマ抗毒素（乾燥ボツリヌス抗毒素）」の項　詳細は生物学的製剤基準の「乾燥ボツリヌスウマ抗毒素」３．２．７　「力価試験」に準じて検定すれば、国際的な基準に基づく抗毒素力価を算出することができる。

実施例

[0065] １．ボツリヌストキソイド免疫抗体ライブラリーの作製

１－１．ボツリヌストキソイドのヒトボランティアへの接種

各A,B,E及びF型菌を培養し、得られた毒素を精製して得た毒素を材料として、トキソイドの調製を行った。特にA型は現在治療用毒素として使用されているクロストリジウム・ボツリヌス97株（C. botulinum 97）または62Ａ株（C. botulinum 62A）より産生された神経毒素を、Ｂ型神経毒素で行われた方法（Infect. Immun. 18 : 761-766, 1977）に準じて精製した。精製した各型毒素はホルマリンで不活化してアルミニウムアジュバントと混合し沈降ABEF型多価混合トキソイドとした。この多価トキソイドを基礎免疫として3-4週間隔で3回、さらに約12ヶ月後に１回を0.5mLを皮下に注射した。さらに、10年後、20年後に追加注射し、さらに以下の成分採血に際して約３週間前にも同量を注射した。

[0066] １－２．抗体ライブラリーの作製

ＡBEF型ボツリヌストキソイドを接種したヒトから、成分採血により3リットルの血液に相当する単核球成分血を分取（約50ml）した。PBSで2倍希釈して血球を回収後、10ml/チューブで分注したFicoll Paque PLUS（GEヘルスケアバイオサイエンス）上に重層し、400g、RT、30分の条件で遠心処理して単核球分画のみを再精製し、1.8x10^{9}細胞を分画した。0.9x10^{9}細胞を用いてtota

l RNAの抽出（RNA Extraction Kit：アマシャム）を行い、1.89mgを回収した。ランダムプライマーを用いてcDNAを調製後（Super Script II：インビトロジェン）、抗体のH鎖（VH）に特異的なプライマー群（下記参照）と抗体のL鎖（VLCL：カッパ鎖、ラムダ鎖）に特異的なプライマー群（下記参照）を用いて目的の抗体遺伝子を増幅した。H鎖はpscFvCA-E8VHdベクターへ（Sfil-Xholを利用）、L鎖はファージミドベクター（pFCAH9-E8d：再表01/062907参照、Sfil-Asclを利用）に組み込み、H鎖ライブラリー、カッパ鎖ライブラリー及びラムダ鎖ライブラリーを得た。ライブラリーサイズはH鎖ライブラリーが$7.05x10^9$、カッパ鎖ライブラリーが$5.87x10^8$、ラムダ鎖ライブラリーが$5.05x10^8$であった。

[0067] （１）VHに特異的なプライマー群

ヒト抗体重鎖遺伝子の取得用5'末端側プライマー（VH1～VH7）と3'末端側プライマー（human JHプライマー4種（697～700）を等量混合したもの）

各VH familyの増幅に使用したプライマー

ヒトVHプライマー（Sfil siteを下線で示す）

628 hVH1a（配列番号８１）：GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGG

629 hVH2a（配列番号８２）：GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC
CAGGTCAACTTAAGGGAGTCTGG

630 hVH3a（配列番号８３）：GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG

631 hVH4a（配列番号８４）：GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGG

632 hVH5a（配列番号８５）：GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC
CAGGTGCAGCTGTTGCAGTCTGC

633 hVH6a（配列番号８６）：GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC
CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGG

629-2 hVH2a-2（配列番号８７）：GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC

CAGRTCACCTTGAAGGAGTCTGGTCC

631-2 hVH4a-2（配列番号８８）:GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGG

632-2 hVH5a-2（配列番号８９）:GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGG

712 hVH7（配列番号９０）:GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC CAGGTGCAGCTGGTGCAATCTGGGTCTGAGT

ヒトJHプライマー（BstPI, Xhol siteを下線で示す）

697 hJH1-2（配列番号９１）:GGTGGAGGCACTCGAGACGGTGACCAGGGTGC

698 hJH3（配列番号９２）:GGTGGAGGCACTCGAGACGGTGACCATTGTCC

699 hJH4-5（配列番号９３）:GGTGGAGGCACTCGAGACGGTGACCAGGGTTC

700 hJH6（配列番号９４）:GGTGGAGGCACTCGAGACGGTGACCGTGGTCC

[0068] （２）L鎖（VLCL：カッパ鎖、ラムダ鎖）に特異的なプライマー群

軽鎖遺伝子の取得用VLの5'側にアリールするプライマー（κ1～κ6、λ1～λ6）とCκ、Cλの3'側にアリールするプライマー（hCKASCプライマーまたはhCLASCプライマー）

L鎖（VLCL：カッパ鎖、ラムダ鎖）

5'-プライマーκ1～κ6

hVK1a（配列番号９５）:GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC GACATCCAGATGA CCCAGTCTCC

hVK2a（配列番号９６）:GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC GATGTTGTGATGA CTCAGTCTCC

hVK3a（配列番号９７）:GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC GAAATTGTGTTGA CGCAGTCTCC

hVK4a（配列番号９８）:GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC GACATCGTGATGA CCCAGTCTCC

hVK5a（配列番号９９）:GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC GAAACGACACTCA CGCAGTCTCC

hVK6a（配列番号１００）：GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC GAAATTGTGCT GACTCAGTCTCC

5’-プライマーλ1～λ6

hVL1（配列番号１０１）：GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC CAGTCTGTGTTG ACGCAGCCGCC

hVL2（配列番号１０２）：GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC CAGTCTGCCCTG ACTCAGCCTGC

hVL3a（配列番号１０３）：GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC TCCTATGTGCT GACTCAGCCACC

hVL3b（配列番号１０４）：GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC TCTTCTGAGCT GACTCAGGACCC

hVL4（配列番号１０５）：GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC CACGTTATACTG ACTCAACCGCC

hVL5（配列番号１０６）：GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC CAGGCTGTGCTC ACTCAGCCGCC

hVL6（配列番号１０７）：GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC AATTTTATGCTG ACTCAGCCCCA

3’-プライマー hCKASC（配列番号１０８）：TCGACTGGCGCGCCGAACACTCTCCC CTGTTGAAGCTCTTTGTG

3’-プライマーHCLASC（配列番号１０９）：TCGACTGGCGCGCCGAACATTCTGTAGG GGCCACTGTCTTCTC

[0069] H鎖ライブラリーからH鎖遺伝子をHindIII、XhoIで切り出し、カッパ鎖ライブラリーとラムダ鎖ライブラリーを等モル混合して作製したL鎖ライブラリーへ組み込み、最終的にライブラリーサイズが1.3×10^{10}の抗ボツリヌス毒素スクリーニング用Fab型抗体ライブラリーを得た（図１）。抗体の種類はVHのCDR3の多様性によって生み出されており、今回作製した巨大な抗体ライブラリーは、単離した抗体遺伝子の多様性を十分にカバーしているものと考えられる。

[0070] ２．Ａ型ボツリヌストキソイドとボツリヌス毒素の無毒成分タンパク質とを使用した抗体ライブラリーのスクリーニング

２－１．スクリーニング実験１

（１）特異的クローンの選択・回収

中和抗体を取得するには、神経毒の活性を有するニューロトキシン部位に結合する抗体をスクリーニングすることが理想となる。しかし献血ボランティアには毒素全長で作製したトキソイドを免疫しており、無毒成分タンパク質に結合する抗体（ここでは不要な抗体）も体内で産生されている。また、神経毒の活性を有するニューロトキシンの入手も制限されている。そこで、最初に無毒成分タンパク質とヒト抗体ライブラリーを反応させて不要な抗体を無毒成分タンパク質に吸収させた後、反応上清を回収し、続いてボツリヌストキソイドと無毒成分タンパク質に吸収されなかったヒト抗体ライブラリー反応させるというスクリーニング戦略を採用した。

[0071] まずマイクロカップ（Nunc社製、Maxisorp）6well分にPBSで10μg/mlの濃度に調製したボツリヌストキソイド及び無毒成分タンパク質を各々100μlずつ分注し、4℃通夜反応させて固相化した。溶液を除去後、1% BSA/PBSを200μlずつ分注して37℃、1時間でブロッキングした。作製したヒト抗体ライブラリー1.0x10^{13}クローン当量を、まず最初に無毒成分タンパク質を固相化したマイクロカップに分注（130μl/well）して、37℃、2時間反応させた。その後、反応上清を回収して改めてボツリヌストキソイドを固相化したマイクロカップに分注して、37℃、2時間反応させた。反応終了後、反応液を除去し、PBSで5回洗浄した。0.1M HCl（グリシンを溶解してpH2.2に調製）を100μl/well分注し、室温で15分反応させ、抗原に結合したファージ抗体を回収した。

これをOD 0.5の大腸菌DH12S 20mlに1時間感染させ、60mlのSBGA培地（SB培地（MOPS 10g、Tryptone 30g及びYeast Extract 20gを溶解し、3N NaOHでpH7へ調整した後、最終溶液量を1リットルとしたもの）に最終濃度として125μg/ml ampicillin sulfateと0.5% glucoseを添加したもの）に添加して37℃、2時間培養後、500mlのSBA培地に添加して更に37℃、2時間培養した。続いて

、ヘルパーファージKO7を1x10^{12}当量添加し、37℃にて2時間培養した後、カナマイシンを終濃度50μg/mlになるよう添加し、30℃、18時間培養した。これを8000rpmにて10分間遠心処理して上清を回収し、それに110mlのPEG液（20% polyetyleneglycol 6000, 2.5M NaCl）を混ぜてよくかきまぜた後、8500rpm、15分間の遠心処理を行い、ファージを沈殿させた。これを2.5mlのPBSに懸濁し、その一部を使用して大腸菌感染数を調べた。このようにして1stスクリーニングのファージ（1stファージ）を得た。

2ndスクリーニングは、1stファージ400μlを使用すること及びPBSの洗浄回数を20回にすること以外、1stスクリーニングと同じ条件で実施した。3rdスクリーニングは、2ndファージ400μlを使用する以外、2ndスクリーニングと同じ条件で実施した。3rdスクリーニングの後、46クローンをピックアップした。

[0072] （２）抗体クローンの塩基配列決定

スクリーニングによって得られた大腸菌を希釈し、ampicillin（100μg/ml）を添加した普通寒天培地に蒔いた。得られたコロニーをピックアップ（上記（１）の46クローンに相当）して2xYTGA培地にて30℃通夜培養後、PI-50（倉敷紡績株式会社）にてDNAを抽出し、ジデオキシ法で塩基配列を決定した。

[0073] （３）各抗体クローンのcp3融合型タンパクの発現・調製

スクリーニングによって得られた大腸菌を希釈し、ampicillin（100μg/ml）を添加した普通寒天培地に蒔いた。得られたコロニーをピックアップ（上記（１）の46クローンに相当）して2xYTGA培地にて30℃通夜培養後、20μlを2mlの0.05% Glucose 2xYTA(2xYT, 100μg/ml ampicillin sulfate,0.05% Glucose)に接種した。30℃、3時間培養後、1M IPTGを20μl添加し、さらに20時間培養した。次に、マイクロ遠心機にて15000rpm、5分間遠心処理し、上清を回収した。上清中には各抗体クローンのcp3融合型タンパク質が含まれる。この上清を用いてトキソイドや無毒成分とのELISAを行った。

[0074] （４）ボツリヌストキソイド及び無毒成分とのELISA反応

ボツリヌストキソイド及び無毒成分タンパク質を用いたELISAで抗体の結合

能を判定した。ボツリヌストキソイドにのみ反応する抗体が単離目的の抗体（即ち中和抗体）となる。

まず、マイクロカップ（Nunc社、Maxisorp）にPBSで10μg/mlの濃度に調製したボツリヌストキソイド及び無毒成分タンパク質を各々100μlずつ分注し、4℃通夜反応させて固相化した。溶液を除去後、1% BSA/PBSを200μlずつ分注して37℃、1時間でブロッキングした。（３）で得た上清（抗体のcp3融合型タンパク質を含む）を100μlずつ分注し、37℃にて１時間反応させた。溶液を除去した後、PBSで洗浄し、PBSで2.5μg/mlに希釈したウサギ抗cp3抗体（MBL）を37℃にて1時間反応させた。溶液を除去した後、PBSで洗浄し、PBSで10000倍希釈したHRP標識ヤギ抗ウサギIgG抗体（MBL）を37℃にて１時間反応させた。溶液を除去した後、PBSで洗浄し、100μlのOPD液を室温にて5分反応させた。2N硫酸にて反応を停止し、SPECTRAmax 340PC（Molecular Devices）にて492nmの吸光度を測定した。

以上のようにして、（１）で回収した46クローンの結合能を調べた結果、40クローン（アミノ酸配列が相違するものとして22種類）がボツリヌストキソイドに対して反応性を示した。また、ボツリヌス毒素の無毒成分タンパク質に対しては19種類が反応した。

[0075] （５）抗体タンパク質の調製

一方、上記ボツリヌストキソイドを抗原としたスクリーニングで得られた抗体のうち、ボツリヌス毒素の無毒成分タンパク質に対しては反応性を示さないが、ボツリヌストキソイドには反応する抗体は3種類であった（図２）。尚、無毒成分タンパク質に対するABS＜0.2を判定基準とした。矢印で示したBT-015、37、39、44のうち、BT-037と無毒成分タンパク質と反応するBT-014はアミノ酸配列が同一であった）。これらのファージミドDNAを制限酵素SalIにて消化後、自己再結合させてProteinA融合型抗体（Fab-pp型抗体）に変換し、それを用いてDH12Sを形質転換した。形質転換後、25mlの2xYTGAにて30℃通夜培養した。この培養液20mlを2リットルの2xYTAに混ぜて3時間培養した後、2mlの1M IPTGを加え30℃で20時間培養した。培養液を4℃、8000rpm、10分間

の遠心処理に供し、上清を回収した。回収した上清に1122gの硫酸アンモニウムをゆっくり加えて室温にて1時間かき混ぜた後、4℃、8500rpm、30分間の遠心処理に供した。沈渣を100mlのComplete（Roche社製）入りPBSに懸濁した。続いてPBSに対して4℃で通夜透析後、4℃、10000rpm、10分間の遠心処理に供した。上清を回収し、それを3mlのIgGセファロース（GEヘルスケアバイオサイエンス）を充填したカラムに添加し、室温にてカラム内を自然滴下で通過させた。300mlのPBSでカラムを洗浄した後、6mlの0.2Mグリシン（pH3）、3mlの0.2Mグリシン（pH2.5）、10mlの0.2Mグリシン（pH3）で溶出した。溶出液を各々2M TrisにてpHを7.0に調整した後、透析濃縮用チューブ（Millipore社製、Amicon Ultra-15、4℃、5530rpm回転）に入れ、PBSに対して透析し、濃縮した。その後SDS-PAGEを行い、タンパク濃度を算出した。

[0076] （６）動物試験による抗体の評価

単離・調製したFab-pp型抗体を毒素と混合して皮下投与した後、マウスの麻痺等の症状を観察するという、半定量的な試験法によって各抗体の中和能を評価した。方法は参考文献（M. Takahashi et al., International Journal of Food Microbiology, 11, 271-278, 1990. Jpn. J. Med. Sci. Biol., 43. 163-170, 1990）に準じた。比較対照として、Ａ型ボツリヌス毒素抗毒素日本標準品（10単位/ml）を10倍希釈してストック溶液とした抗毒素原液（1単位/ml）を、更にPBSで3倍ずつ6段階希釈したものを調製した（以下「標準希釈」という）。一方、（５）で得た抗体溶液をPBSで5倍希釈して抗体原液とし、更に5倍ずつ4段階希釈したものを検体（以下「検体希釈液」という）とした。

また、ボツリヌス神経毒素（3.8×10^5LD50/ml）を400倍希釈してストック溶液（950LD50/ml）とし、更に500倍希釈して試験毒素（1.9LD50/ml）を作製した。試験毒素0.25mlと、各標準希釈及び検体希釈液0.25mlを正確に採り、よく混合して室温で1時間反応させた後、1群2匹のマウスの皮下へ0.2mlずつ接種し、3日間観察した。試験群のマウスの臨床症状（完全緩解、麻痺の程度）により、検体の力価を判定した。その結果、BT-015が中和能を示した（図３

）。

[0077] ２－２．スクリーニング実験２

スクリーニング実験１で取得した抗体のうち、ネガティブと判断された（無毒素部位にも反応する抗体）19クローンの抗体タンパク質を混合したものを以下の方法で調製した。

まず、当該19クローンのDNAを混合し、制限酵素SalIにて消化後、自己再結合させてFab-pp型抗体に変換し、それを用いてDH12Sを形質転換した。形質転換後、100mlの2xYTGAにて30℃通夜培養した。この培養液40mlを4リットルの2xYTAに混ぜて3時間培養した後、4mlの1M IPTGを加えて30℃で20時間培養した。培養液を4℃、8000rpm、10分間の遠心処理に供し、上清を回収した。回収した上清に2244gの硫酸アンモニウムをゆっくり加えて室温にて1時間かき混ぜた後、4℃、8500rpm、30分間の遠心処理に供した。沈渣を200mlのComplete（Roche社製）入りPBSに懸濁した。続いて、PBSに対して4℃で通夜透析後、4℃、10000rpm、10分間の遠心処理に供した。上清を回収し、それを3mlのIgGセファロース（GEヘルスケアバイオサイエンス）を充填したカラムに添加し、室温にてカラム内を自然滴下で通過させた。500mlのPBSでカラムを洗浄した後、6mlの0.2Mグリシン（pH3）、3mlの0.2Mグリシン（pH2.5）、10mlの0.2Mグリシン（pH3）で溶出した。溶出液を各々2M TrisにてpHを7.0に調整した後、透析濃縮用チューブ（Millipore 社製、Amicon Ultra-15、4℃、5530rpm回転）に入れ、PBSに対して透析し、濃縮した。その後SDS-PAGEを行い、タンパク濃度を算出した。

[0078] 以上の方法で調製した抗体ミックスタンパク質を230μg/mlで添加して抗原をマスクした後（図４を参照）、スクリーニング実験１と同様の方法でスクリーニングを実施した。その結果、46クローンが回収された。各抗体クローンをELISAで解析した結果、トキソイド特異的に反応する新規抗体クローンが27種類含まれていることが明らかとなった。このように、抗原をマスクすることで、無毒素部位に反応する抗体は大幅に減少し（2/46）、スクリーニング効率は上昇した（図５の下（4th））。

[0079] ２－３．スクリーニング実験３

スクリーニング実験１の3rdスクリーニングでネガティブと判断したクローンの数が多いことから、この段階で既に偏りが生じ、中和抗体の存在比率が低くなっていると考えた。そこで、スクリーニングの途中段階である2ndスクリーニング後のファージ抗体（2ndファージ）を用いてスクリーニング（3rd-2）を実施した。まずマイクロカップ（Nunc社製、Maxisorp）6well分にPBSで10μg/mlの濃度に調製したボツリヌストキソイドを100μlずつ分注し、4℃通夜反応させて固相化した。溶液を除去後、１% BSA/PBSを200μlずつ分注して37℃、1時間でブロッキングした。ブロッキング溶液除去後、２－２．で調製した抗体ミックスタンパク質を30μg/wellで分注して37℃、1時間反応させて抗原をマスクした。抗体タンパク質溶液を除去後、2ndファージ$3.6x10^{13}$当量と２－２．で調製した抗体ミックスタンパク質180μgを混合した後、マイクロカップに分注して、37℃、2時間反応させた。以後の操作は上記スクリーニング実験1と同様とした。

[0080] 最終的に46クローンをピックアップし、それらの結合能をELISAで確認した。その結果、トキソイド特異的に反応する新規クローンは20種類であった。抗原をマスクすることで、無毒素部位に反応する抗体は大幅に減少し（1/46）、スクリーニング効率は上昇した（図５の上、3rd-2）。

これら各抗体クローンから抗体タンパク質を調製し、毒素の中和試験を実施した。その結果、二つのクローン（BT-058、BT-047）が中和活性を示したが、それらのH鎖のアミノ酸配列は、スクリーニング実験１で取得したクローンBT-015のそれとほぼ同一であった（図６）。従って、これら３クローンのエピトープは同じであると予想される。

[0081] ２－４．スクリーニング実験４（抗体集団共存による集団的排除と、抗体共存による同一クローン排除の同時実施）

ネガティブと判断した抗体をスクリーニング系に共存させることでトキソイド特異的な抗体クローンが効率的に取得されるように改善されたものの、スクリーニング実験１で取得した抗体クローンBT-015と同一又は類似の抗体

クローンしか取得できなかった。そこで、新規抗体クローンを取得するため、ネガティブと判断した抗体クローン19種の抗体タンパク質に加えて抗体クローンBT-015の抗体タンパク質も共存させることで、これらの抗体クローンのエピトープをマスクするという戦略をとることにした（4th-2スクリーニング）。

まず、マイクロカップ6well分にPBSで10μg/mlの濃度に調製したボツリヌストキソイドを100μlずつ分注し、4℃通夜反応させて固相化した。溶液を除去後、1% BSA/PBSを200μlずつ分注して37℃、1時間でブロッキングした。ブロッキング溶液除去後、２－２．で調製した抗体ミックスタンパク質と抗体クローンBT-015から調製した抗体タンパク質を分注し（各々30μg/well）、て37℃、1時間反応させて抗原をマスクした。抗体タンパク質溶液を除去後、スクリーニング実験３で得たファージ（3rd-2ファージ）7.2x10^{12}当量と２－２．で調製した抗体ミックスタンパク質180μg及び抗体クローンBT-015から調製した抗体タンパク質180μgを混合した後、マイクロカップに分注して37℃、2時間反応させた。以後の操作は上記スクリーニング実験1と同様とした。

[0082] 94クローンをピックアップし、それらの結合能をELISAで確認したところ、全てがトキソイド特異的に反応した（図７）。これらのクローンの内、新規アミノ酸配列をもつクローンは26種類であった。また、抗体クローンBT-015と同一若しくは類似の抗体は含まれていなかった。尚、以上のスクリーニング過程を図９に示す。

[0083] 続いて、毒素と混合して皮下投与したときのマウスの生死・麻痺等の症状を観察するという、簡易的な試験法によって各抗体クローンの中和能を評価した。具体的な試験法は参考文献（日本生物学的製剤基準　厚生労働省）に準じた。試験には、各抗体クローンから調製したFab-pp型抗体を使用した。比較対照として、Ａ型ボツリヌス毒素抗毒素日本標準品（10単位/ml）を10倍希釈してストック溶液とした抗毒素原液（1単位/ml）をPBSで希釈して0.1単位/mlとしたものと更に2倍ずつ5段階希釈したものを調製した（以下「標準希

釈」という）。検体には調製した原液をそのまま使用した。

ボツリヌス神経毒素を400倍希釈してストック溶液（950LD50/ml）とし、更に10倍希釈して試験毒素（95LD50/ml）を作製した。試験毒素0.25mlと、各標準希釈及び検体0.25mlを正確に採り、よく混合して室温で1時間反応させた後、1群2匹のマウスの皮下へ0.2mlずつ接種し、4日間観察した。試験群のマウスの臨床症状（完全緩解、麻痺の程度）により、検体の力価を判定した。その結果、抗体クローンBT-175が中和能を示した（図８）。

[0084] ２－５．スクリーニング実験５（Ａ型ボツリヌスニューロトキシンを用いたスクリーニング）

クロストリジウム・ボツリヌス６２Ａ株より、文献INFECTION AND IMMUNITY, Vol. 12, No. 6 Dec. 1975, p. 1262-1270に従い、精製したボツリヌス毒素より無毒成分タンパク質を除去して調製したニューロトキシン（毒素の活性中心150kDa）を精製した。これを抗原としたスクリーニングを実施し、抗体クローンBT-015、BT-175とは異なるエピトープを認識する中和抗体の取得を試みた。

まず、マイクロカップ6well分にPBSで10μg/mlの濃度に調製したボツリヌスニューロトキシンを100μlずつ分注し、4℃通夜反応させて固相化した。溶液を除去後、1% BSA/PBSを200μlずつ分注して37℃、1時間でブロッキングした。ブロッキング溶液除去後、ヒト抗体ライブラリー1.0×10^{13}を分注（130μl/well）して、37℃、2時間反応させた。以後の操作は上記スクリーニング実験１と同一とした（4thスクリーニングまで実施した。4thスクリーニングでは3rdファージ400μlを使用した）。

4thスクリーニングを実施後、188クローンをピックアップし、それらの結合能をELISAで確認した結果、トキソイド特異的に反応するクローンは6種類であった（図１０、１１）。その中には、これまでに取得した2種類の抗体クローン（BT-015、BT-0175）と同一又は類似のクローンが数多く含まれていた（BT-015については6クローン、BT-175については5クローン）。

[0085] ２－６．スクリーニング実験６（BT-015とBT-175抗体共存による同一クロー

ン排除）

ニューロトキシンを抗原としたスクリーニング（２－５．）でも数多く取得された抗体クローン（BT-015又はBT-175と同一又は類似のクローン）を排除することを目的として更にスクリーニング実験を実施した。

まず、マイクロカップ8well分にPBSで10μg/mlの濃度に調製したニューロトキシンを100μlずつ分注し、4℃通夜反応させて固相化した。溶液を除去後、1% BSA/PBSを200μlずつ分注して37℃、1時間でブロッキングした。ブロッキング溶液除去後、抗体クローンBT-015及びBT-175から調製した抗体タンパク質を分注し（各々30μg/well）、37℃、1時間反応させて抗原をマスクした。抗体タンパク質溶液を除去後、スクリーニング実験５の3rdスクリーニングで得られたファージ（3rdファージ）2.0x10^{13}と抗体クローンBT-015及びBT-175から調製した抗体タンパク質（各180μg）を混合した後、マイクロカップに分注して、37℃、2時間反応させた。188クローンをピックアップし、それらの結合能をELISAで確認したところ、ニューロトキシン特異的に反応する新規クローンは24種類であった（図１２、１３）。尚、以上のスクリーニング過程を図１５に示す。

[0086] ２－７．動物試験による抗体の評価

ニューロトキシンを抗原としたスクリーニング（スクリーニング実験５及び６）で取得された30種類の抗体クローンからFab-pp型抗体を調製した。各Fab-pp型抗体について、毒素と混合して皮下投与してマウスの生死・麻痺等の症状を観察するという、試験法によって中和能を判断した。試験法は参考文献（生物学的製剤基準　厚生労働省　日本薬局方）に準じ、検体の力価は日本標準品に対する相対価として求めた。Ａ型ボツリヌス抗毒素日本標準品（10単位/ml）を10倍希釈してストック溶液とした抗毒素原液（1単位/ml）をPBSで希釈して0.1単位/mlとしたものと更に2倍ずつ5段階希釈したものを調製した（以下「標準希釈」という）。検体には調製した原液をそのまま使用した。

また、ボツリヌス神経毒素を400倍希釈してストック溶液（950LD50/ml）と

し、更に10倍希釈して試験毒素（95LD50/ml）を作製した。試験毒素0.25mlと、各標準希釈及び検体0.25mlを正確に採り、よく混合して室温で1時間反応させた後、1群2匹のマウスの皮下へ0.2mlずつ接種し、40日間観察した。試験群のマウスの臨床症状（完全緩解、麻痺の程度）により、検体の力価を判定した。その結果、4種類の抗体クローン（NT-221、NT-320、NT-523、NT-539）が中和能を示した（図１４）。

[0087] ３．抗体の配列の比較

以上のスクリーニング（スクリーニング実験１～６）で取得された抗体の配列情報を以下に示す。尚、図１６では、これらの抗体（但し、BT-015の類似クローンであるBT-047及びBT-058を除く）のアミノ酸配列を比較するとともに、Germlineとの相同性を示した。

[0088] （１）BT-015

（アミノ酸配列）

VH CDR1：配列番号１

VH CDR2：配列番号２

VH CDR3：配列番号３

VH：配列番号４

VL CDR1：配列番号５

VL CDR2：配列番号６

VL CDR3：配列番号７

VL：配列番号８

（塩基配列）

VH：配列番号６５

VL：配列番号６６

[0089] （２）BT-047

（アミノ酸配列）

VH CDR1：配列番号９

VH CDR2：配列番号１０

VH CDR3：配列番号１１

VH：配列番号１２

VL CDR1：配列番号１３

VL CDR2：配列番号１４

VL CDR3：配列番号１５

VL：配列番号１６

（塩基配列）

VH：配列番号６７

VL：配列番号６８

[0090] （３）BT-058

（アミノ酸配列）

VH CDR1：配列番号１７

VH CDR2：配列番号１８

VH CDR3：配列番号１９

VH：配列番号２０

VL CDR1：配列番号２１

VL CDR2：配列番号２２

VL CDR3：配列番号２３

VL：配列番号２４

（塩基配列）

VH：配列番号６９

VL：配列番号７０

[0091] （４）NT-221

（アミノ酸配列）

VH CDR1：配列番号２５

VH CDR2：配列番号２６

VH CDR3：配列番号２７

VH：配列番号２８

VL CDR1：配列番号２９

VL CDR2：配列番号３０

VL CDR3：配列番号３１

VL：配列番号３２

（塩基配列）

VH：配列番号７１

VL：配列番号７２

[0092] （５）BT-175

（アミノ酸配列）

VH CDR1：配列番号３３

VH CDR2：配列番号３４

VH CDR3：配列番号３５

VH：配列番号３６

VL CDR1：配列番号３７

VL CDR2：配列番号３８

VL CDR3：配列番号３９

VL：配列番号４０

（塩基配列）

VH：配列番号７３

VL：配列番号７４

[0093] （６）NT-320

（アミノ酸配列）

VH CDR1：配列番号４１

VH CDR2：配列番号４２

VH CDR3：配列番号４３

VH：配列番号４４

VL CDR1：配列番号４５

VL CDR2：配列番号４６

VL CDR3：配列番号４７

VL：配列番号４８

（塩基配列）

VH：配列番号７５

VL：配列番号７６

[0094] （７）NT-523

（アミノ酸配列）

VH CDR1：配列番号４９

VH CDR2：配列番号５０

VH CDR3：配列番号５１

VH：配列番号５２

VL CDR1：配列番号５３

VL CDR2：配列番号５４

VL CDR3：配列番号５５

VL：配列番号５６

（塩基配列）

VH：配列番号７７

VL：配列番号７８

[0095] （８）NT-539

（アミノ酸配列）

VH CDR1：配列番号５７

VH CDR2：配列番号５８

VH CDR3：配列番号５９

VH：配列番号６０

VL CDR1：配列番号６１

VL CDR2：配列番号６２

VL CDR3：配列番号６３

VL：配列番号６４

（塩基配列）

VH：配列番号７９

VL：配列番号８０

[0096] ４．抗体の解析

４－１．IgG抗体の調製

Fab-pp型抗体に中和活性が観察された抗体クローン（BT-015、BT-175、NT-221、NT-320、NT-523）からIgG抗体を調製した。まず、各抗体クローンについて、VHをコードする遺伝子断片をヒトγ1鎖定常領域DNAとライゲートした後、発現ベクター「BCMGS Neoベクター」（烏山一「ウシパピローマウイルスベクター」，村松正実および岡山博人編，実験医学別冊遺伝子工学ハンドブック，羊土社，pp.297-299(1991)に組み込み、定常領域を伴ったH鎖ベクターを作製した。同様に、各抗体クローンのL鎖全長遺伝子をベクターに組み込み、L鎖発現抗体発現ベクターとした。

抗体発現ベクターをチャイニーズハムスター細胞株CHO-K1にリポフェクチン法を用いてトランスフェクトし、37℃で所定時間培養した後、96穴プレートに移植し高発現の細胞を選択した。選択した各細胞を無血清培地（CHO-S-SFM II：Invitrogen 社製、1% (v/v) Penicillin - Streptomycin Solution：Sigma-Aldrich 社製、700 µg/ml G418：Sigma-Aldrich 社製）を使用し、大量培養フラスコ（Becton

Dickinson 社製

CELLine 1000 Flask）で2週間培養した。培養上清を回収し、Protein G結合アフィニティカラムへ供した。カラムをPBSで洗浄後、グリシン塩酸緩衝液（pH 2.7）で溶出し、トリス塩酸緩衝液（pH8.9）で中和した。続いて、溶出液を透析濃縮用チューブ（Millipore 社製、Amicon Ultra-15）に入れ、PBSに対して透析して濃縮した。このようにして得られたIgG型抗体を以降の実験に用いた。

[0097] ４－２．Biacoreによる結合定数解析

解析には、Biacore3000バイオセンサー装置を利用した。まず、ニューロト

キシン880RUをセンサーチップ（CM5）に固相化後、Fab-PP型或いはIgG型抗体を順次濃度を変えて（1.9nM～1μM）インジェクション（40μｌ、２分間）した。解析結果を図１７（BT-015のFab-PP型抗体）、図１８（BT-015のIgG型抗体）、図１９（BT-175のFab-PP型抗体）、図２０（BT-175のIgG型抗体）、図２１（NT-221のFab-PP型抗体）、図２２（NT-320のFab-PP型抗体）に示す。解析の結果、何れも強い結合力を有する抗体であった。

[0098] ４－３．Biacoreによるエピトープ解析

Ａ型ボツリヌス毒素に対して中和活性を示した6種類の抗体クローン（BT-015、BT-175、NT-221、NT-320、NT-523、NT-539）のFab-PP型抗体を調製し、それを用いてBiacoreにる競合実験を行った。ニューロトキシン800RUをセンサーチップ（CM5）に固相化後、以下の濃度で抗体を順次インジェクションし、競合の有無を測定した。インジェクションは40μｌ（2分間）ずつ流した。すべての解析実験は、HBS-EP流速20μl/min HBS-EP(Biacore）中、25℃にて行った。再生は100mM Glycine-HCl（pH2.0）を20μｌ（流速60μl/min、20秒間）で行った。

[表1]

表１　抗体のインジェクション濃度（単独若しくは混合、最終濃度）

競合試験１ BT-015との競合反応 図２３		競合試験２ BT-175との競合反応 図２４		競合試験３ NT-221との競合反応 図２５		競合試験４ NT-320との競合反応 図２６		競合試験５ NT-523との競合反応 図２７	
サンプル番号	サンプル濃度	サンプル番号	サンプル濃度	サンプル番号	サンプル濃度	サンプル番号	サンプル濃度	サンプル番号	サンプル濃度
①	BT-015 500nM BT-015 1μM	⑦	BT-175 500nM BT-175 1μM	⑫	NT-221 500nM NT-221 1μM	⑯	NT-320 500nM NT-320 1μM	⑲	NT-523 500nM NT-523 1μM
②	BT-015 500nM BT-015 500nM+BT-175 500nM	⑧	BT-175 500nM BT-175 500nM+NT-221 500nM	⑬	NT-221 500nM NT-221 500nM+NT-320 500nM	⑰	NT-320 500nM NT-320 500nM+NT-523 500nM	⑳	NT-523 500nM NT-523 500nM+NT-539 500nM
③	BT-015 500nM BT-015 500nM+NT-221 500nM	⑨	BT-175 500nM BT-175 500nM+NT-320 500nM	⑭	NT-221 500nM NT-221 500nM+NT-523 500nM	⑱	NT-320 500nM NT-320 500nM+NT-539 500nM		
④	BT-015 500nM BT-015 500nM+NT-320 500nM	⑩	BT-175 500nM BT-175 500nM+NT-523 500nM	⑮	NT-221 500nM NT-221 500nM+NT-539 500nM				
⑤	BT-015 500nM BT-015 500nM+NT-523 500nM	⑪	BT-175 500nM BT-175 500nM+NT-539 500nM						
⑥	BT-015 500nM BT-015 500nM+NT-539 500nM								

[0099] Biacoreによる競合実験の結果を図２３～２７に示す。一方、ELISAによって抗体間の競合の有無を確認した。ELISAの結果から、BT-015とNT-221は競合

しないことと、BT-175とNT-221が競合することが確認された。Biacore及びELISAの結果を総合的に判断した結果、6種類の抗体はエピトープの違いによって4カテゴリーに分類された。なお、BT-047とBT-058のH鎖のアミノ酸配列は、クローンBT-015のそれとほぼ同一であり、これら３クローンのエピトープは同じであると予想される。

[表2]

表２　エピトープの分類

BT-015	BT-175、NT-221 （エピトープが同一又は近傍）	NT-320	NT-523、NT-539 （エピトープが同一又は近傍）

[0100] ４－４．中和試験（IgG抗体による中和試験。L+/20レベル）

各抗体クローンから調製したIgG型抗体を用い、生物学的製剤基準に則して中和試験を行った。

まず、ボツリヌスＡ型国内標準品を希釈し、0.25ml中に0.050単位を中心に試験精度を考慮した適当な間隔濃度単位を含む5段階希釈（以下「標準希釈」という）を作製した。また、IgG型抗体を希釈し、同様の希釈（以下「被検希釈」という）を作製した。更に、Ａ型試験毒素を希釈し、0.25ml中に1試験毒素量を含む液（以下「毒素希釈」という）を作製した。各標準希釈及び被検希釈のそれぞれと各毒素希釈との等量ずつを正確に採り、よく混ぜて1時間放置した。23～29日齢のマウス4匹を1群として、各混合液につき1群ずつを用い、1匹当たり混合液0.5mlを腹腔内に注射して3日間観察し、標準品に対する相対値を計算した。

[0101] 6種類の抗体クローンの内、IgG型抗体の発現が良好で調製が容易であった5種類の抗体クローン（BT-015、BT-175、NT-221、NT-320、NT-523）では、IgG型抗体を単独投与したときに完全な中和が認められなかった。そこで、A型ボツリヌス毒素を完全に中和できる、抗体の組合せを見出すべく抗毒素製剤評価試験を実施した。即ち、単独投与よりも混合することで相乗効果を示すことが判明しており、且つエピトープも明らかに異なるBT-015とBT-175を基礎

とした種々の組合せ（検体）を用意し（表３）、中和活性を比較した。

[表3]

サンプル1	サンプル2	サンプル3	サンプル4	サンプル5	サンプル6	サンプル7
5種類混合	4種類混合	4種類混合	4種類混合	3種類混合	3種類混合	3種類混合
BT-015	BT-015	BT-015	BT-015	BT-015	BT-015	BT-015
BT-175	BT-175	BT-175	BT-175	BT-175	BT-175	BT-175
NT-221	NT-221	NT-221	NT-320	NT-221	NT-320	NT-523
NT-320	NT-320	NT-523	NT-523			
NT-523						

[0102] 1mg/mlに調製した抗体を等量混合して調製した抗体溶液を検体原液とした。検体原液を3倍ずつ段階希釈して81倍希釈までの検体希釈液を作製した。検体希釈液0.25mlにPBS 0.38mlを加えて0.63mlとし、試験毒素0.63mlとよく混合して室温で1時間反応させた後、1群2匹のマウスの腹腔内へ0.5mlずつ接種し、40日間観察した。

比較対照はＡ型ボツリヌス抗毒素日本標準品（10単位/ml）とし、PBSで希釈して0.50単位/mlを中心に試験精度を考慮した適当な間隔濃度単位を含む5段階希釈（以下「標準希釈」という。表４）を作製した。またそれぞれの抗毒素に対応するボツリヌス神経毒素を希釈して試験毒素（214ipLD50/ml）を作製した。試験毒素0.63mlと、各標準希釈及び検体希釈液0.63mlを正確に採り、よく混合して室温で1時間反応させた後、1群2匹のマウスの腹腔内へ0.5mlずつ接種し、40日間観察した。検体の力価は日本標準品に対する相対価として求めた。

[表4]

表４　標準希釈

日本標準品アンチトキシン 0.5 単位/ml	PBS
0.30ml	0.33ml
0.28ml	0.35ml
0.25ml	0.38ml
0.23ml	0.40ml
0.21ml	0.42ml

[0103] 中和試験の結果（図２８）、次の3種類の抗体、即ちBT-015、BT-175及びNT-320を混合（サンプル６）することで完全中和に成功し、最も強い活性を示したのは次の4種類の抗体、即ちBT-015、BT-175、NT-320及びNT-523を混合した場合（サンプル４）であった。4種類の抗体を併用した場合の活性は12単位/mg（=12単位/ml）であった。一方、BT-015、BT-175及びNT-523を混合した場合（サンプル７）も高い中和活性を示した。また、これら3種類の抗体にNT-221を混合すると（サンプル３）中和活性が向上することが示唆された。

尚、現行の治療用乾燥ボツリヌスウマ抗毒素（A, B, E, F 4種混合）にはA型毒素抗体が10000単位/vial含まれており、4種類の抗体で代替する場合は各抗体を約210mgずつ混合することで同等の活性が得られることになる。

[0104] ４－５．ELISAによる抗体のエピトープ解析と毒素亜型A2毒素に対する反応性

６種類の中和抗体（BT-015, BT-175, NT-221、NT-320, NT-523, NT-539）のエピトープをより詳細に解析し、またその亜型であるA2型のニューロトキシン（CHIBA-H）に対する反応性も同時に確認するため、以下に示す各抗原を用いてELISAを実施した。

・A型毒素　62A　ニューロトキシン（NT）（BoNT/A1）

・ニューロトキシン重鎖（H chain）

・ニューロトキシン軽鎖（L chain）

・A2亜型毒素　ニューロトキシン　CHIBA-H（BoNT/A2）

[0105] 操作手順は次の通りである。各抗原をPBSで希釈（NT:10μg/ml、H chain：7μg/ml、L chain：3.5μg/ml）し、100μl/wellでマイクロプレートに分注した。37℃で2時間反応後、溶液を除去した。続いて、PBSで0.5%に希釈したBSAで通夜反応させてブロッキングした。溶液を除去した後、以下の濃度に段階希釈した６種類のIgG型中和抗体を各々100μl/wellで分注し、２時間反応させた。尚、以下の通り、予備実験によって抗体毎に最適な希釈濃度を設定した。

・BT-015, BT-175, NT-221：1μg/ml、0.5μg/ml、0.25μg/ml、0.125μg/ml

・NT-320, NT-523, NT-539：10μg/ml、5μg/ml、2.5μg/ml、1.25μg/ml

[0106] 次に、PBSで洗浄した後、PBSで20000倍希釈したHRP標識ヤギ抗ヒトIgG抗体（BIO-RAD）を37℃にて２時間反応させた。溶液を除去した後、PBSで洗浄し、150μlのOPD液（o-phenylendiamine 0.4 mg/ml）を37℃にて30分反応させた。5N硫酸を50μl添加して反応を停止し、492nmの吸光度を測定した。測定結果を図２９の表に示す。尚、２ウエルの平均値からネガティブコントロール（無関係な抗体）のヒトIgG（各濃度）のOD値を引いた値を示した。また、OD値が3.5以上の場合は測定不能であり、表では「＞3.500」と記載した。NDはnot determinedを表す。

[0107] 図２９に示した結果は以下の通り解釈された。

・NT-320はH chainを認識しているためNT-320のエピトープはH chain上に存在している。

・NT-523はH chain、L chain両方に反応した。

・その他４種類はH chain、L chainのいずれとも反応しなかった。

・BT-015, BT-175, NT-539はBoNT/A1、BoNT/A2に対して同程度の反応性を有している。

・NT-221, NT-320, NT-523はBoNT/A2に対する反応性がBoNT/A1に比較して低下している。

[0108] 以上の解釈を総合すると、A2毒素の中和にはNT-523よりもNT-539の方が優

れている可能性が示唆された。

[0109] ４－６．イムノブロッティングによるエピトープ解析

続いて、ニューロトキシン(NT)及び重鎖C末端側の神経細胞結合ドメイン（Hc、大腸菌リコンビナントタンパク質）に対してイムノブロッティングによるエピトープ解析を行った。アクリルアミドの濃度が10%のゲルを用いてSDS-PAGEを行い（ニューロトキシン：1.5μg/lane、Hc：0.5μg/lane）、メンブレンに転写・ブロッキング後、２種類の濃度（50μg/ml（実線のレーン）、5μg/ml（破線のレーン）に希釈し、６種類のIgG型中和抗体を各々200ulずつ反応させた。PBSで洗浄し、PBSで20000倍希釈したHRP標識ヤギ抗ヒトIgG抗体を反応させた。PBSで洗浄し、発色基質にDABを用いて検出した（図３０）。

[0110] 重鎖C末端側の神経細胞結合ドメイン（Hc）に対する反応性の結果は以下の通り解釈された。

・NT-523はHcドメインの一次構造を認識した。

・その他の抗体はバンドが検出されなかったことから、毒素の高次構造を認識する抗体であると考えられる。

[0111] ４－７．免疫沈降によるエピトープ解析

更に３種類の抗原（ニューロトキシン、重鎖、軽鎖）を用いて、免疫沈降によるエピトープ解析を行った。プロテインGセファロース 100μlにIgG型中和抗体を5μgずつ反応させ、６種類の抗体ビーズを作製した。抗体ビーズに抗原（ニューロトキシン：0.6μg/100μl、H chain：0.4μg/100μl、L chain：0.4μg/100μl）を４℃で通夜反応させた。洗浄後、アクリルアミドの濃度が10%のゲルを用いてSDS-PAGEを行い、メンブレンに転写・ブロッキング後、アフィニティー精製したウサギ抗Ａ型ボツリヌスニューロトキシン抗体（1000倍希釈）を反応させた。PBSで洗浄した後、PBSで2000倍希釈したHRP標識ヤギ抗ウサギIgG抗体（BIO-RAD）を37℃にて反応させた。PBSで洗浄した後、発色基質にDABを用いて検出した（図３１）。

[0112] 図３１の結果は以下の通り解釈された。

・BT-015, NT-523, NT-539はH chainを認識（実線の丸）している。

・BT-175はL chainを認識している可能性が高い（破線の丸）。

・NT-221, NT-320はH chainとL chainのどちらを認識しているか判定不能である。

[0113] ４－５．～４－７．に記載したエピトープ解析の結果を総合すると、６種類の抗体のエピトープ分類は図３２の通りとなる。尚、各クローンの結合性（エピトープ候補）について、ニューロトキシンと結合性がある場合はNT、H chain結合性がある場合はH、H chain C末端側の神経細胞結合ドメインと結合性がある場合はHc、L chainと結合性がある場合はLで示した。（－）は判定不能を表す。

産業上の利用可能性

[0114] 本発明のＡ型ボツリヌス毒素中和組成物は、エピトープが異なる複数の抗体を含有し、高い中和活性を発揮する。本発明の有効成分は完全ヒト可変領域を有する抗体である。この特徴によって、製造に時間がかかることや、安定した供給が困難であること、さらには未知ウイルスの混入のおそれがあること等、従来の製剤（ウマ抗毒素製剤や中和キメラ抗体など）が抱える課題を解決することができる。このように本発明は、安全で経済的な抗Ａ型ボツリヌス毒素製剤の実用化を可能とするものであり、ボツリヌス中毒患者の治療と予防に大きく貢献する。

一方、本発明は、毒素中和試験の国際基準に適合したＡ型ボツリヌス毒素中和組成物を提供するものである。従って、備蓄体制が整っていない途上国における中毒症、特に突発的に大発生した中毒症、バイオテロなどに対して国際的に使用可能な治療・予防手段として本発明は極めて有用である。

[0115] この発明は、上記発明の実施の形態及び実施例の説明に何ら限定されるものではない。特許請求の範囲の記載を逸脱せず、当業者が容易に想到できる範囲で種々の変形態様もこの発明に含まれる。

本明細書の中で明示した論文、公開特許公報、及び特許公報などの内容は、その全ての内容を援用によって引用することとする。

請求の範囲

[1] 配列番号４のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と配列番号８のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを有する抗体のエピトープを認識する第１のヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体と、

配列番号３６のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と配列番号４０のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを有する抗体のエピトープを認識する第２のヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体と、

配列番号４４のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と配列番号４８のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを有する抗体のエピトープ、又は配列番号５２のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と配列番号５６のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを有する抗体のエピトープを認識する第３のヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体と、

を含むＡ型ボツリヌス毒素中和組成物。

[2] 第１のヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体が、以下の（１）～（３）からなる群より選択されるいずれかの抗体であり、

第２のヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体が、以下の（４）又は（５）の抗体であり、

第３のヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体が、以下の（６）～（８）からなる群より選択されるいずれかの抗体である、請求項１に記載のＡ型ボツリヌス毒素中和組成物：

（１）配列番号１のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域１、配列番号２のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域２、配列番号３のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域３、配列番号５のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域１、配列番号６のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域２、及び配列番号７のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域３を有する抗体；

（２）配列番号９のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域１、配列番号１０のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域２、配列番号１１のアミ

ノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域３、配列番号１３のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域１、配列番号１４のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域２、及び配列番号１５のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域３を有する抗体；

（３）配列番号１７のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域１、配列番号１８のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域２、配列番号１９のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域３、配列番号２１のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域１、配列番号２２のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域２、及び配列番号２３のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域３を有する抗体；

（４）配列番号２５のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域１、配列番号２６のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域２、配列番号２７のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域３、配列番号２９のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域１、配列番号３０のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域２、及び配列番号３１のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域３を有する抗体；

（５）配列番号３３のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域１、配列番号３４のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域２、配列番号３５のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域３、配列番号３７のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域１、配列番号３８のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域２、及び配列番号３９のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域３を有する抗体；

（６）配列番号４１のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域１、配列番号４２のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域２、配列番号４３のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域３、配列番号４５のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域１、配列番号４６のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域２、及び配列番号４７のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域３を有する抗体；

（７）配列番号４９のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域１、配列番号５０のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域２、配列番号５１のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域３、配列番号５３のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域１、配列番号５４のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域２、及び配列番号５５のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域３を有する抗体；

（８）配列番号５７のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域１、配列番号５８のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域２、配列番号５９のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域３、配列番号６１のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域１、配列番号６２のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域２、及び配列番号６３のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域３を有する抗体。

[3] 第１のヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体が前記（１）～（３）からなる群より選択されるいずれかの抗体であり、

第２のヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体が前記（４）又は（５）の抗体であり、

第３のヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体が前記（６）の抗体であり、

第４のヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体として前記（７）又は（８）の抗体を更に含む、請求項２に記載のＡ型ボツリヌス毒素中和組成物。

[4] 第１のヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体が前記（１）の抗体であり、

第２のヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体が前記（５）の抗体であり、

第３のヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体が前記（６）の抗体である、請求項２に記載のＡ型ボツリヌス毒素中和組成物。

[5] 第４のヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体として前記（７）の抗体を更に含む、請求項４に記載のＡ型ボツリヌス毒素中和組成物。

[6] 第１のヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体が前記（１）の抗体であり、

第２のヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体が前記（５）の抗体であり、

第３のヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体が前記（７）の抗体である、請求項

２に記載のＡ型ボツリヌス毒素中和組成物。

[7] 第４のヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体として前記（４）の抗体を更に含む、請求項６に記載のＡ型ボツリヌス毒素中和組成物。

[8] 前記（１）の抗体は、重鎖可変領域が配列番号４のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域が配列番号８のアミノ酸配列を有し、

前記（２）の抗体は、重鎖可変領域が配列番号１２のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域が配列番号１６のアミノ酸配列を有し、

前記（３）の抗体は、重鎖可変領域が配列番号２０のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域が配列番号２４のアミノ酸配列を有し、

前記（４）の抗体は、重鎖可変領域が配列番号２８のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域が配列番号３２のアミノ酸配列を有し、

前記（５）の抗体は、重鎖可変領域が配列番号３６のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域が配列番号４０のアミノ酸配列を有し、

前記（６）の抗体は、重鎖可変領域が配列番号４４のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域が配列番号４８のアミノ酸配列を有し、

前記（７）の抗体は、重鎖可変領域が配列番号５２のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域が配列番号５６のアミノ酸配列を有し、

前記（８）の抗体は、重鎖可変領域が配列番号６０のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域が配列番号６４のアミノ酸配列を有する、

請求項２～７のいずれか一項に記載のＡ型ボツリヌス毒素中和組成物。

[9] 請求項２に規定された（１）～（８）のいずれかの抗体からなる、単離されたヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体。

[10] 前記（１）の抗体は、重鎖可変領域が配列番号４のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域が配列番号８のアミノ酸配列を有し、

前記（２）の抗体は、重鎖可変領域が配列番号１２のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域が配列番号１６のアミノ酸配列を有し、

前記（３）の抗体は、重鎖可変領域が配列番号２０のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域が配列番号２４のアミノ酸配列を有し、

前記（４）の抗体は、重鎖可変領域が配列番号２８のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域が配列番号３２のアミノ酸配列を有し、

前記（５）の抗体は、重鎖可変領域が配列番号３６のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域が配列番号４０のアミノ酸配列を有し、

前記（６）の抗体は、重鎖可変領域が配列番号４４のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域が配列番号４８のアミノ酸配列を有し、

前記（７）の抗体は、重鎖可変領域が配列番号５２のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域が配列番号５６のアミノ酸配列を有し、

前記（８）の抗体は、重鎖可変領域が配列番号６０のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域が配列番号６４のアミノ酸配列を有する、請求項９に記載の単離されたヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体。

[11] 請求項１０に記載の抗体の重鎖可変領域及び／又は軽鎖可変領域をコードする、単離された核酸分子。

[12] 請求項１１に記載の核酸分子を保持するベクター。

[13] 請求項１２に記載のベクターで形質転換された形質転換体。

[14] 請求項１３に記載の形質転換体を培養し、ヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体を産生させる工程と、

培養上清を回収し、該培養上清からヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体を精製する工程と、

を含む、ヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体の製造方法。

補正された請求の範囲

[2009年3月26日(26.03.2009)国際事務局受理]

[1] 配列番号４のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と配列番号８のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを有する抗体のエピトープを認識する第１のヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体と、

配列番号３６のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と配列番号４０のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを有する抗体のエピトープを認識する第２のヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体と、

配列番号４４のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と配列番号４８のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを有する抗体のエピトープ、又は配列番号５２のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と配列番号５６のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを有する抗体のエピトープを認識する第３のヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体と、

を含むＡ型ボツリヌス毒素中和組成物。

[2] 第１のヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体が、以下の（１）～（３）からなる群より選択されるいずれかの抗体であり、

第２のヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体が、以下の（４）又は（５）の抗体であり、

第３のヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体が、以下の（６）～（８）からなる群より選択されるいずれかの抗体である、請求項１に記載のＡ型ボツリヌス毒素中和組成物：

（１）配列番号１のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域１、配列番号２のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域２、配列番号３のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域３、配列番号５のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域１、配列番号６のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域２、及び配列番号７のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域３を有する抗体；

（２）配列番号９のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域１、配列番号１０のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域２、配列番号１１のアミ

ノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域３、配列番号１３のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域１、配列番号１４のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域２、及び配列番号１５のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域３を有する抗体；

（３）配列番号１７のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域１、配列番号１８のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域２、配列番号１９のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域３、配列番号２１のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域１、配列番号２２のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域２、及び配列番号２３のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域３を有する抗体；

（４）配列番号２５のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域１、配列番号２６のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域２、配列番号２７のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域３、配列番号２９のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域１、配列番号３０のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域２、及び配列番号３１のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域３を有する抗体；

（５）配列番号３３のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域１、配列番号３４のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域２、配列番号３５のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域３、配列番号３７のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域１、配列番号３８のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域２、及び配列番号３９のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域３を有する抗体；

（６）配列番号４１のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域１、配列番号４２のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域２、配列番号４３のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域３、配列番号４５のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域１、配列番号４６のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域２、及び配列番号４７のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域３を有する抗体；

（７）配列番号４９のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域１、配列番号５０のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域２、配列番号５１のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域３、配列番号５３のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域１、配列番号５４のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域２、及び配列番号５５のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域３を有する抗体；

（８）配列番号５７のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域１、配列番号５８のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域２、配列番号５９のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域３、配列番号６１のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域１、配列番号６２のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域２、及び配列番号６３のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域３を有する抗体。

[3] 第１のヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体が前記（１）～（３）からなる群より選択されるいずれかの抗体であり、

第２のヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体が前記（４）又は（５）の抗体であり、

第３のヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体が前記（６）の抗体であり、

第４のヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体として前記（７）又は（８）の抗体を更に含む、請求項２に記載のＡ型ボツリヌス毒素中和組成物。

[4] 第１のヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体が前記（１）の抗体であり、

第２のヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体が前記（５）の抗体であり、

第３のヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体が前記（６）の抗体である、請求項２に記載のＡ型ボツリヌス毒素中和組成物。

[5] 第４のヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体として前記（７）の抗体を更に含む、請求項４に記載のＡ型ボツリヌス毒素中和組成物。

[6] 第１のヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体が前記（１）の抗体であり、

第２のヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体が前記（５）の抗体であり、

第３のヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体が前記（７）の抗体である、請求項

２に記載のＡ型ボツリヌス毒素中和組成物。

[7] 第４のヒト抗Ａ型ボツリヌス毒素抗体として前記（４）の抗体を更に含む、請求項６に記載のＡ型ボツリヌス毒素中和組成物。

[8] 前記（１）の抗体は、重鎖可変領域が配列番号４のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域が配列番号８のアミノ酸配列を有し、

前記（２）の抗体は、重鎖可変領域が配列番号１２のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域が配列番号１６のアミノ酸配列を有し、

前記（３）の抗体は、重鎖可変領域が配列番号２０のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域が配列番号２４のアミノ酸配列を有し、

前記（４）の抗体は、重鎖可変領域が配列番号２８のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域が配列番号３２のアミノ酸配列を有し、

前記（５）の抗体は、重鎖可変領域が配列番号３６のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域が配列番号４０のアミノ酸配列を有し、

前記（６）の抗体は、重鎖可変領域が配列番号４４のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域が配列番号４８のアミノ酸配列を有し、

前記（７）の抗体は、重鎖可変領域が配列番号５２のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域が配列番号５６のアミノ酸配列を有し、

前記（８）の抗体は、重鎖可変領域が配列番号６０のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域が配列番号６４のアミノ酸配列を有する、

請求項２～７のいずれか一項に記載のＡ型ボツリヌス毒素中和組成物。

[9] （削除）

[10] （削除）

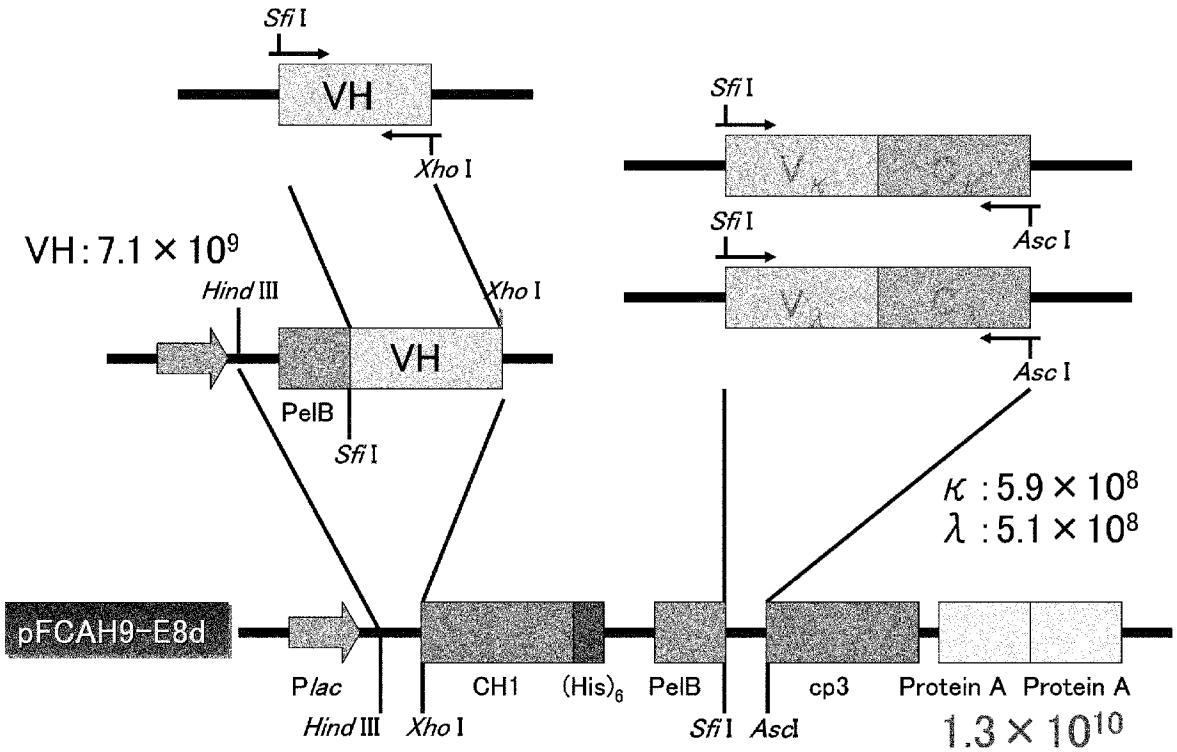
[11] （削除）

[12] （削除）

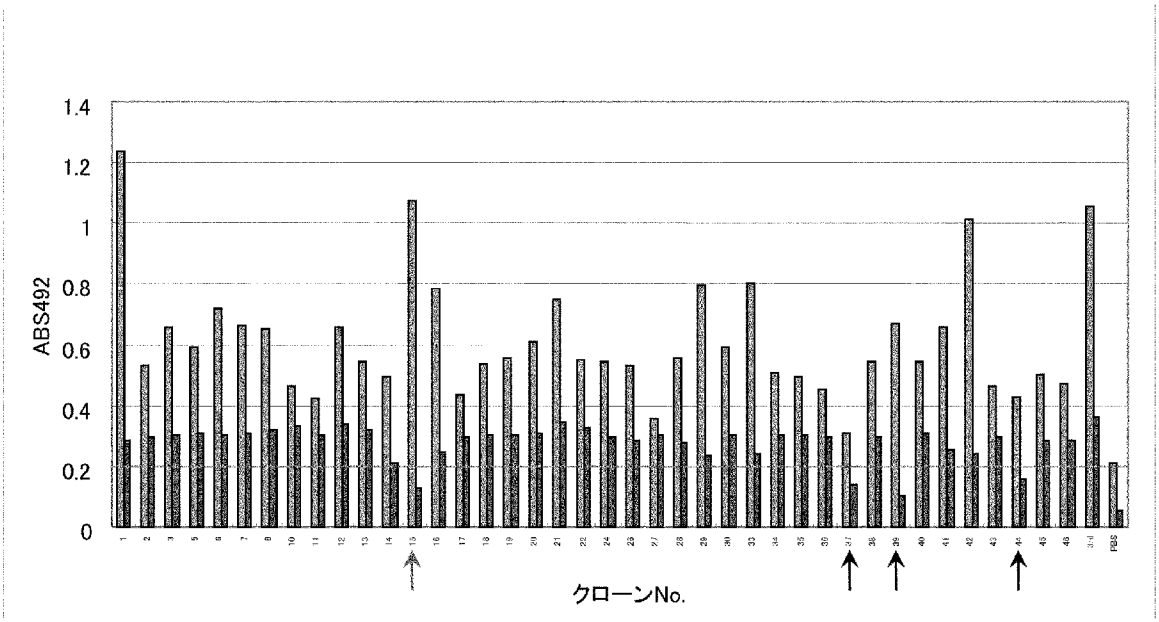
[13] （削除）

[14] （削除）

[図1]



[図2]



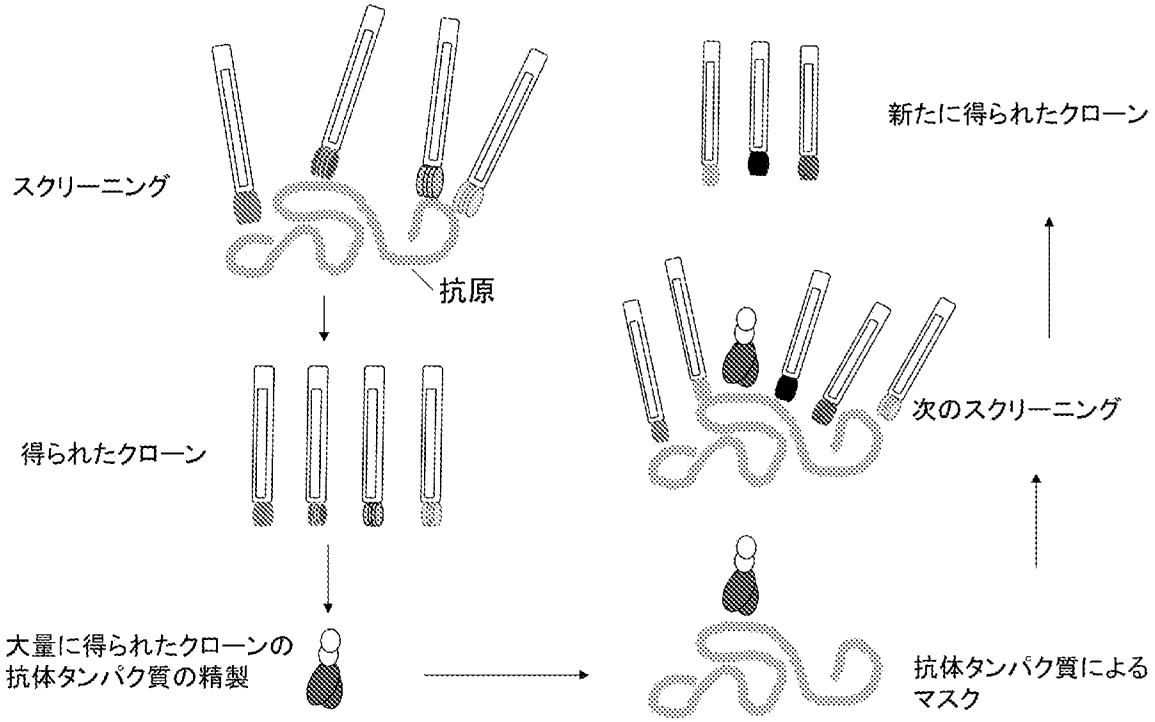
※無毒成分タンパク質に対するELISAで
ABS492<0.2をポジティブとした（矢印）

ボツリヌストキソイド
無毒成分タンパク質

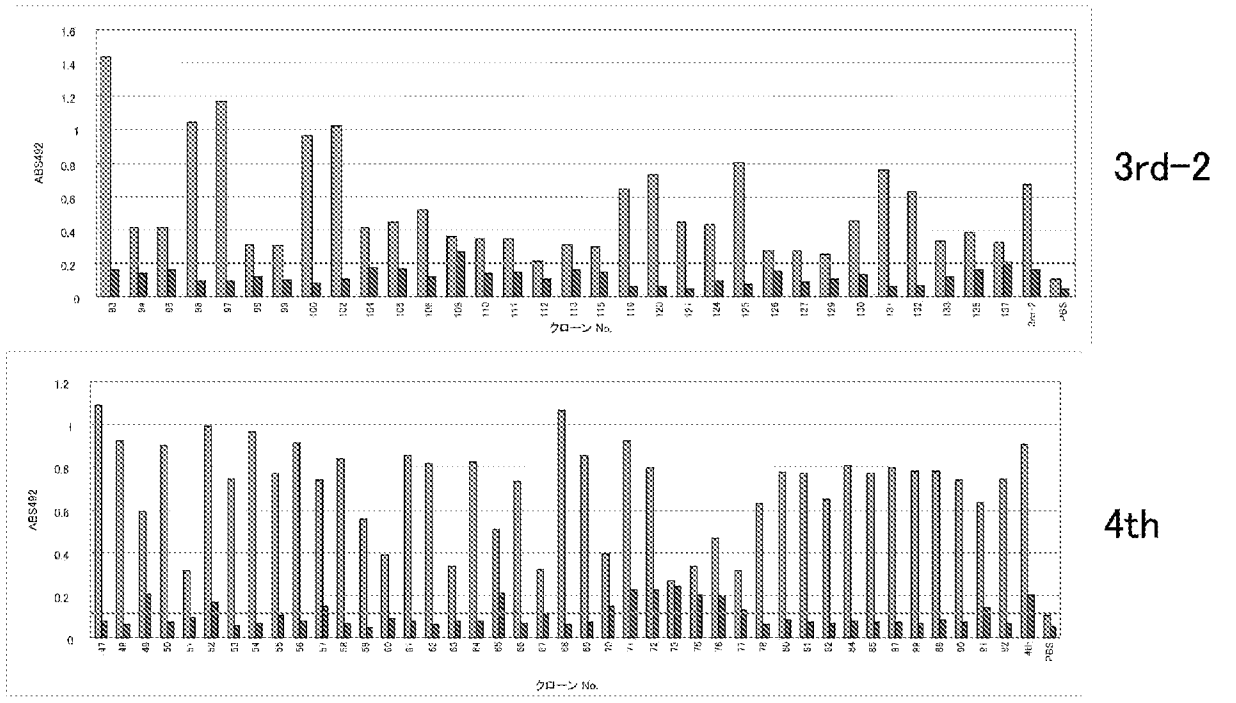
[図3]

	IU/ml		抗毒素	毒素	0.2ml皮下接種					
標準A型抗毒素				500倍希釈試験毒素	1日後(11.15)		2日(11.16)		3日(11.17)	
抗毒素日本標品	1倍		0.25	0.25	−	−	−	−	−	−
	3倍希釈	0.25	0.125	0.25	−	−	−	−	−	−
	9倍希釈	0.25	0.125	0.25	−	−	−	−	−	−
	27倍希釈	0.25	0.125	0.25	−	−	−	−	−	−
	81倍希釈	0.25	0.125	0.25	−	±	−	±	−	−
		0.25	0.125	0.25	+	±	+	+	+	+
		0.125 discard		0.25	+	+	+	+	+	+
サンプル	3.0x inter	PBS	抗体							
BT-015	5倍希釈		0.25	0.25	−	−	−	−	−	−
	15倍希釈	0.25	0.125	0.25	−	−	−	−	−	−
	45倍希釈	0.25	0.125	0.25	−	−	−	−	−	−
	135倍希釈	0.25	0.125	0.25	−	−	−	−	−	−
	405倍希釈	0.25	0.125	0.25	−	±	−	−	−	−
		0.125 discard		0.25						
BT-037	5倍希釈		0.25	0.25	+	+	+	+	+	+
	15倍希釈	0.25	0.125	0.25	+	+	+	+	+	+
	45倍希釈	0.25	0.125	0.25	+	+	+	+	+	+
	135倍希釈	0.25	0.125	0.25	+	+	+	+	+	+
	405倍希釈	0.25	0.125	0.25	+	+	++	++	++	++
		0.125 discard		0.25						
BT-039	5倍希釈		0.25	0.25	±	+	−	+	−	+
	15倍希釈	0.25	0.125	0.25	+	+	+	++	+	++
	45倍希釈	0.25	0.125	0.25	+	+	+	++	+	++
	135倍希釈	0.25	0.125	0.25	+	+	+	+	+	+
	405倍希釈	0.25	0.125	0.25	+	+	+	+	+	+
		0.125 discard		0.25						
BT-044	5倍希釈		0.25	0.25	+	+	+	+	+	+
	15倍希釈	0.25	0.125	0.25	+	+	+	+	+	+
	45倍希釈	0.25	0.125	0.25	+	+	++	+	+	+
	135倍希釈	0.25	0.125	0.25	+	+	++	+	++	+
	405倍希釈	0.25	0.125	0.25	+	+	+	+	+	+

[図4]


スクリーニング
抗原
新たに得られたクローン
得られたクローン
次のスクリーニング
大量に得られたクローンの
抗体タンパク質の精製
抗体タンパク質による
マスク

[図5]

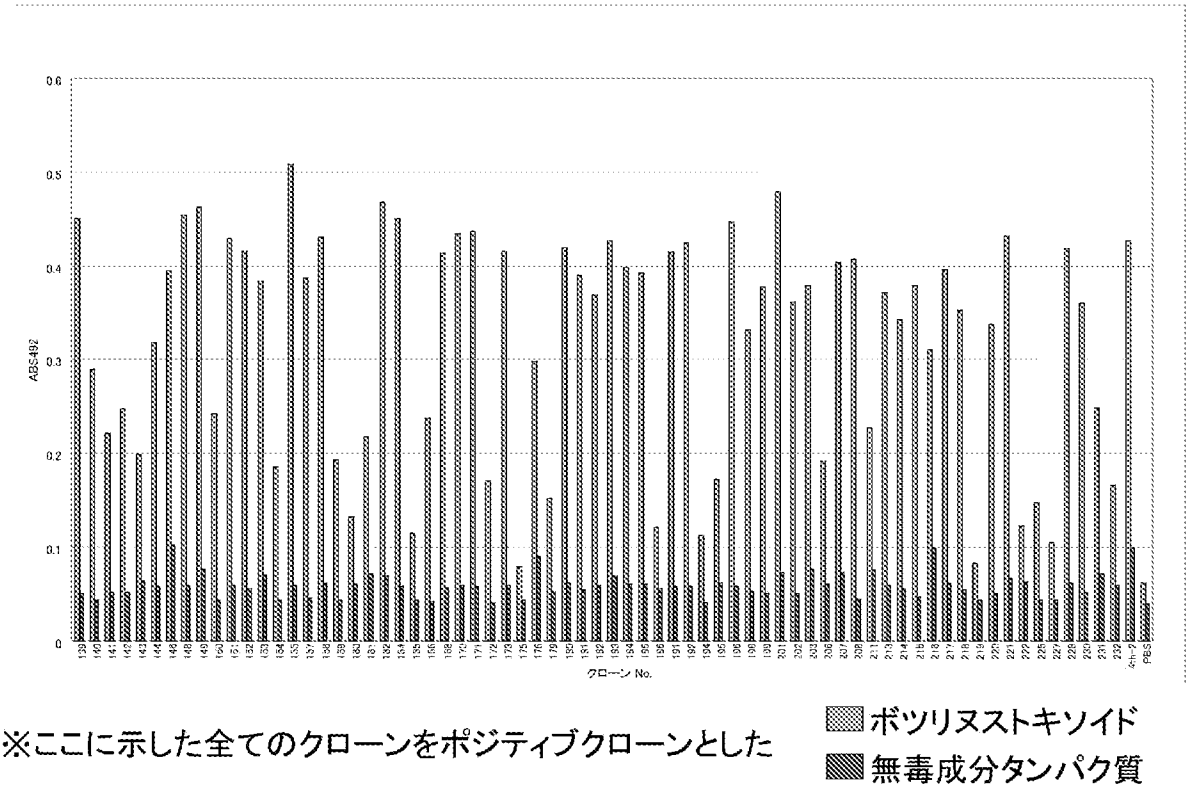

ABS492
クローン No.
3rd-2
4th
※無毒成分タンパク質に対するELISAで
ABS492<0.2をポジティブとした
ボツリヌストキソイド
無毒成分タンパク質

[図6]

```
                    FR1              CDR1      FR2              CDR2                    FR3                        CDR3          FR4
BT-058H  QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASRYTFT AYYMH WVRQAPGQGLEWMG WINPHSGGTNYAQKFQG RVTMTRDTSTSTAYMELSSLRSDDTAVYYCAR GFGSSCDTSCSFSCDFSGLDV WGQGTTVTVSS
BT-047H  QVQLVQSGAEVKKPGASVKVACKASRYNFS AYYMH WVRQAPGQGPEWMG WINPHSGVTTYARKFQG RVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTALYYCAR GFGSSCSDTSCSFSGLDV WGQGTTVTVSS
BT-015H  QVQLQQSGAEVKKPGASVKVACKASRYNFS AYYMH WVRQAPGQGPEWMG WINPHSGVTTYAQKFQG RVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTALYYCAR GFGSSCSDTSCSFSGLDV WGQGTTVTVSS

                    FR1              CDR1      FR2      CDR2              FR3                        CDR3      FR4
BT-047L  EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC RASQSV.....SSSYLA WYQQKPGQAPRLLIY GASSRATG IPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC ...QQYGSSPLYT FGQGTKLEIK-
BT-058L  QSALTQ.PASASGSPGQSVTISC TGTSS...DVGGYNYVS WYQQHPGKAPKLMIY EVTKRPSG VPDRFSGSKSGNTASLTVSGLQAEDEADYYC SSYAGTNNLG. V FGTGTKVTVLG
BT-015L  QSALTQ.PASVSGSPGQSITISC TGTSS...DVGCYDYVS WYQQHPGEAPKLLIY DVTNRPSG VSSRFSGSKSGNTASLTISGLQPEDEADYYC TSYTSSVTY...V FGSGTTLTVLS
```

[図7]



※ここに示した全てのクローンをポジティブクローンとした

ボツリヌストキソイド

無毒成分タンパク質

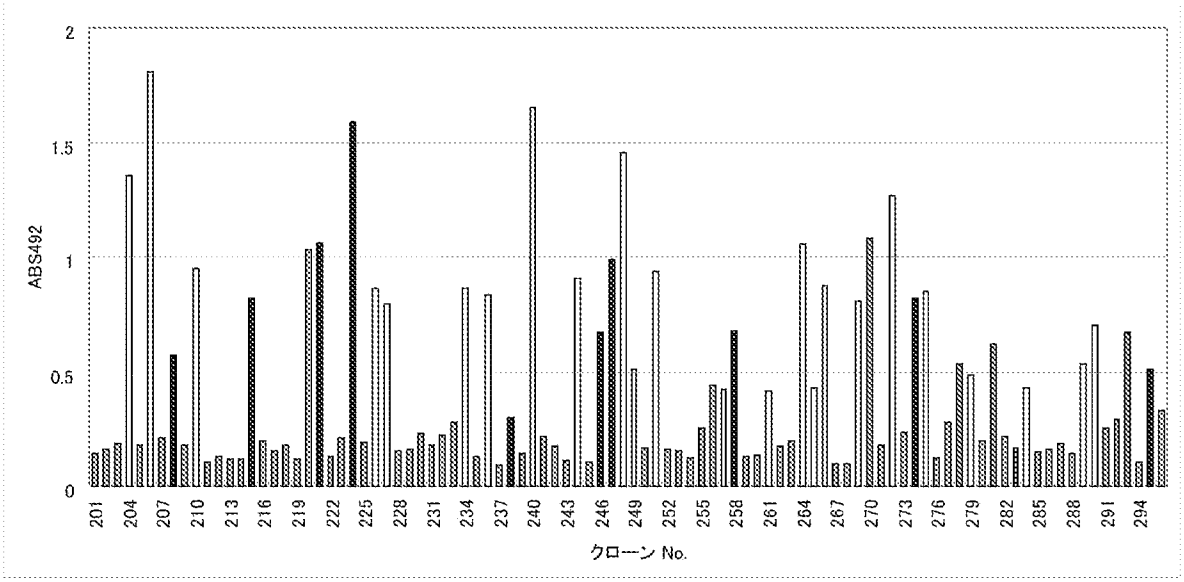
[図8]

サンプル										
	IU/ml	PBS	AT	Tn		Bimiso				打切り
標準A型抗毒素				10xストック Tn	体重	1日		2日	3日	4日
						AM	PM	PM	AM	AM
サンプル	番号	PBS	サンプル量	Tn						
1	139	1x	0.25	0.25		++, ++	d, d			
2	140	1x	0.25	0.25		++, ++	++, ++	d, +++	d	
3	141	1x	0.25	0.25		d, d				
4	142	1x	0.25	0.25		++, ++	++, d	d		
5	144	1x	0.25	0.25		+++, +++	d, d			
6	149	1x	0.25	0.25		d, +++	d			
7	153	1x	0.25	0.25		+++, +++	d, d			
8	155	1x	0.25	0.25		d, +++	d			
9	160	1x	0.25	0.25		+++, +++	d, d			
10	165	1x	0.25	0.25		+++, +++	d, d			
11	175	1x	0.25	0.25		++ ++	++ ++	+++, +++	+++, +++	+++, +++
12	176	1x	0.25	0.25		+++, +++	d, d			
13	180	1x	0.25	0.25		d, d				
14	182	1x	0.25	0.25		+++, +++	d, d			
15	184	1x	0.25	0.25		+++, +++	+++, +++	d, d		
16	198	1x	0.25	0.25		d, d				
17	202	1x	0.25	0.25		d, +++	d			
18	203	1x	0.25	0.25		d, d				
19	208	1x	0.25	0.25		++, ++	+++, +++	d, d		
20	216	1x	0.25	0.25		+++, d	d			
21	219	1x	0.25	0.25		++, ++	d, d			
22	222	1x	0.25	0.25		++, d	d			
23	225	1x	0.25	0.25		+++, +++	+++, +++	d, d		
24	230	1x	0.25	0.25		+++, +++	d, d			
25	231	1x	0.25	0.25		+++, +++	d, d			
26	232	1x	0.25	0.25		+++, ++	d, d			
27	MIX	1x	0.25	0.25		d, +++	d			

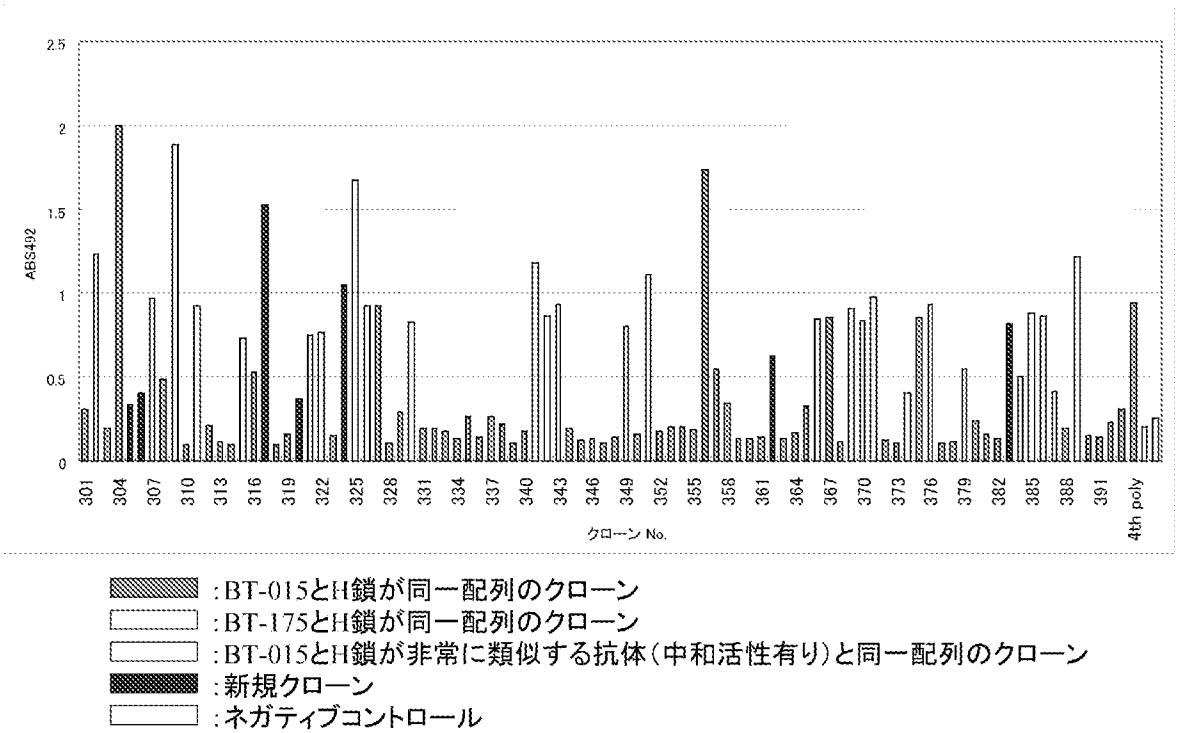
[図9]

	導入したファージ数	回収したファージ数	ELISA検査したクローン数	中和抗体	
1st	1.0×10^{13}	9.36×10^{7}			
2nd	3.64×10^{13}	4.98×10^{7}			
3rd	3.60×10^{13}	6.22×10^{8}	1-46	BT-015	スクリーニング実験1
4th	1.56×10^{13}	9.6×10^{8}	47-92		スクリーニング実験2
3rd -2	3.60×10^{13}	4.72×10^{7}	93-138		スクリーニング実験3
4th -2	7.24×10^{12}	7.52×10^{8}	139-232	BT-175	スクリーニング実験4

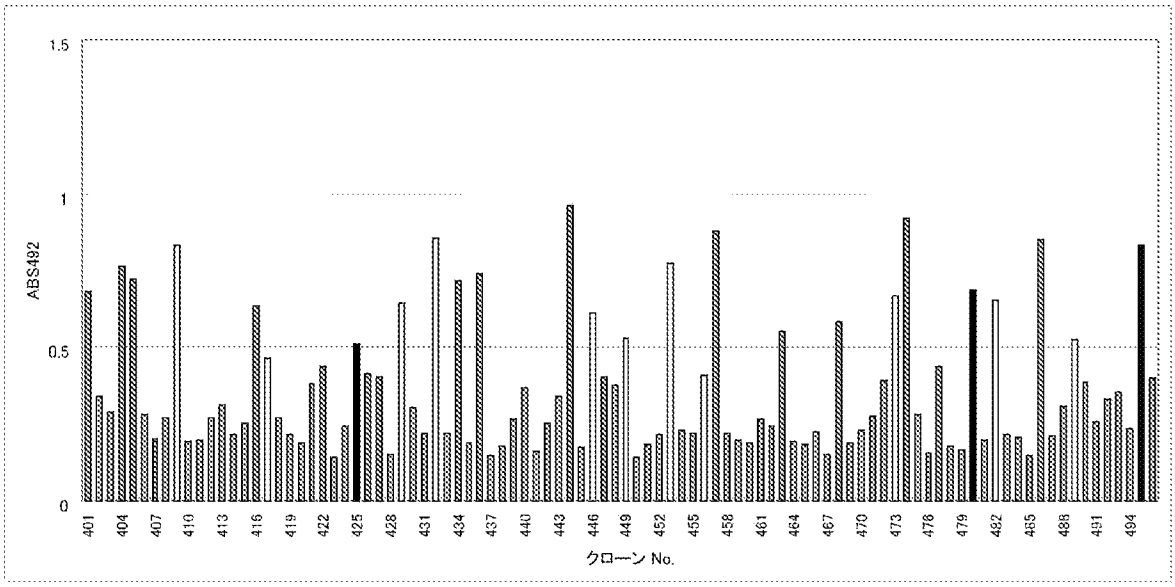
[図10]


ABS492
クローン No.
:BT-015とH鎖が同一配列のクローン
:BT-175とH鎖が同一配列のクローン
:BT-015とH鎖が非常に類似する抗体(中和活性有り)と同一配列のクローン
:新規クローン

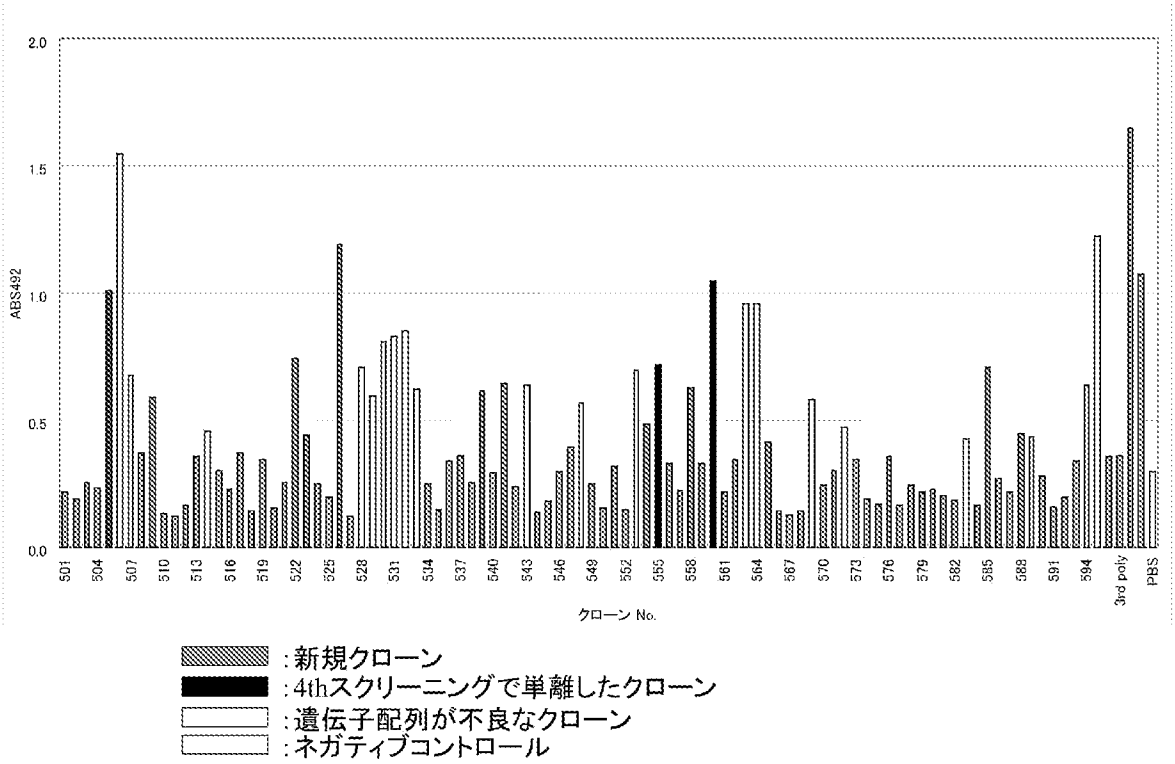
[図11]


ABS492
クローン No.
4th poly
:BT-015とH鎖が同一配列のクローン
:BT-175とH鎖が同一配列のクローン
:BT-015とH鎖が非常に類似する抗体(中和活性有り)と同一配列のクローン
:新規クローン
:ネガティブコントロール

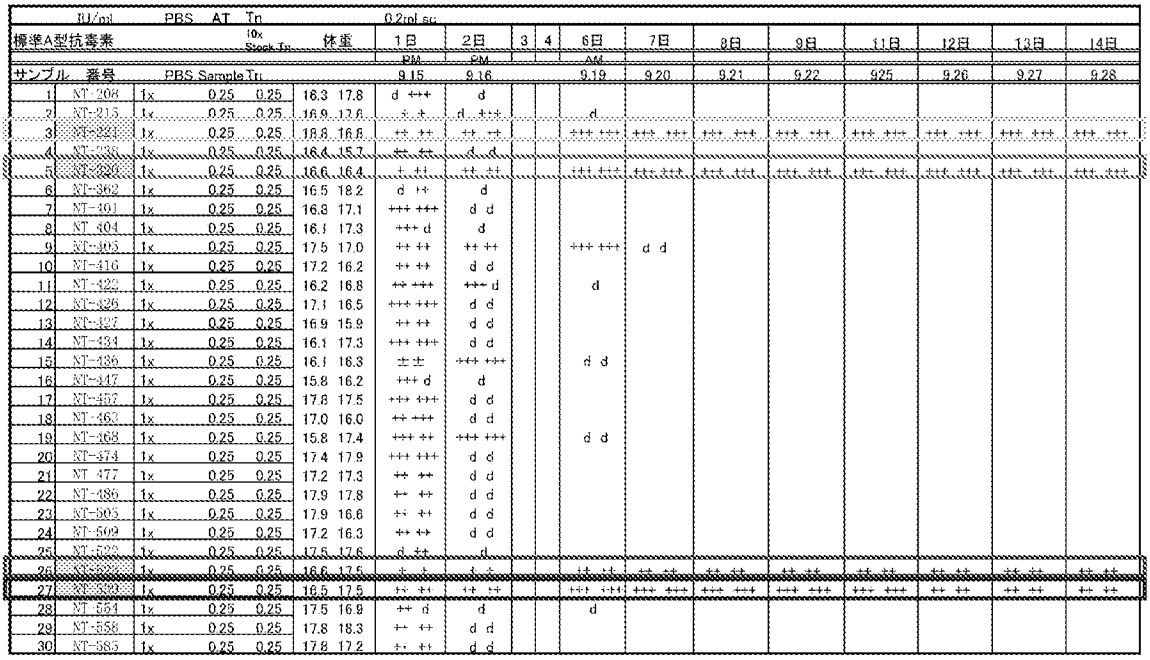
[図12]


ABS492
クローン No.
:新規クローン
:4thスクリーニングで単離したクローン
:遺伝子配列が不良なクローン

[図13]


ABS492
クローン No.
3rd poly
PBS
:新規クローン
:4thスクリーニングで単離したクローン
:遺伝子配列が不良なクローン
:ネガティブコントロール

[図14]



	BJ/pl	PBS	AT	Tn			0.2ml sc											
標準A型抗毒素				10x Stock Tn		体重	1日	2日	3	4	6日	7日	8日	9日	11日	12日	13日	14日
							PM	PM			AM							
サンプル	番号	PBS	Sample	Tn			9.15	9.16			9.19	9.20	9.21	9.22	925	9.26	9.27	9.28
1	NT-308	1x	0.25	0.25	16.3	17.8	d +++	d										
2	NT-313	1x	0.25	0.25	16.9	17.6	± ±	d +++			d							
3	NT-324	1x	0.25	0.25	18.8	16.6	++ ++	++ ++			+++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +++
4	NT-338	1x	0.25	0.25	16.4	15.7	++ ++	d d										
5	NT-339	1x	0.25	0.25	16.6	16.4	± ++	++ ++			+++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +++
6	NT-362	1x	0.25	0.25	16.5	18.2	d ++	d										
7	NT-401	1x	0.25	0.25	16.8	17.1	+++ +++	d d										
8	NT-404	1x	0.25	0.25	16.1	17.3	+++ d	d										
9	NT-405	1x	0.25	0.25	17.5	17.0	++ ++	++ ++			+++ +++	d d						
10	NT-416	1x	0.25	0.25	17.2	16.2	++ ++	d d										
11	NT-422	1x	0.25	0.25	16.2	16.8	++ +++	+++ d			d							
12	NT-426	1x	0.25	0.25	17.1	16.5	+++ +++	d d										
13	NT-427	1x	0.25	0.25	16.9	15.9	++ ++	d d										
14	NT-434	1x	0.25	0.25	16.1	17.3	+++ +++	d d										
15	NT-436	1x	0.25	0.25	16.1	16.3	± ±	+++ +++			d d							
16	NT-447	1x	0.25	0.25	15.8	16.2	+++ d	d										
17	NT-457	1x	0.25	0.25	17.8	17.5	+++ +++	d d										
18	NT-463	1x	0.25	0.25	17.0	16.0	++ +++	d d										
19	NT-468	1x	0.25	0.25	15.8	17.4	+++ ++	+++ +++			d d							
20	NT-474	1x	0.25	0.25	17.4	17.9	+++ +++	d d										
21	NT-477	1x	0.25	0.25	17.2	17.3	++ ++	d d										
22	NT-486	1x	0.25	0.25	17.9	17.8	++ ++	d d										
23	NT-505	1x	0.25	0.25	17.9	16.6	++ ++	d d										
24	NT-509	1x	0.25	0.25	17.2	16.3	++ ++	d d										
25	NT-526	1x	0.25	0.25	17.5	17.6	d ++	d										
26	NT-532	1x	0.25	0.25	16.6	17.5	± ±	d ±			++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++
27	NT-539	1x	0.25	0.25	16.5	17.5	++ ++	++ ++			++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +++	++ ++	++ ++	++ ++
28	NT-551	1x	0.25	0.25	17.5	16.9	++ d	d			d							
29	NT-558	1x	0.25	0.25	17.8	18.3	++ ++	d d										
30	NT-585	1x	0.25	0.25	17.8	17.2	++ ++	d d										

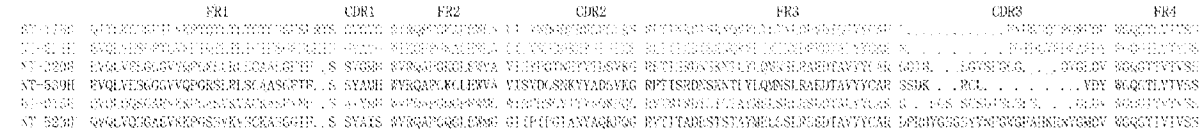
[図15]

	導入した ファージ数	回収した ファージ数	ELISA検査した クローン数	中和抗体	
1st	1.0×10^{13}	2.34×10^{8}			
2nd	2.60×10^{13}	9.68×10^{7}			
3rd	4.56×10^{13}	1.6×10^{8}	NT001-096		
			NT101-195		
4th	2.64×10^{13}	1.58×10^{8}	NT201-296	NT-221	スクリーニング 実験5
			NT301-392	NT-320	
4th-2	1.98×10^{13}	3.59×10^{7}	NT401-496		スクリーニング 実験6
			NT501-596	NT-523,NT-539	

抗原：ニューロトキシン

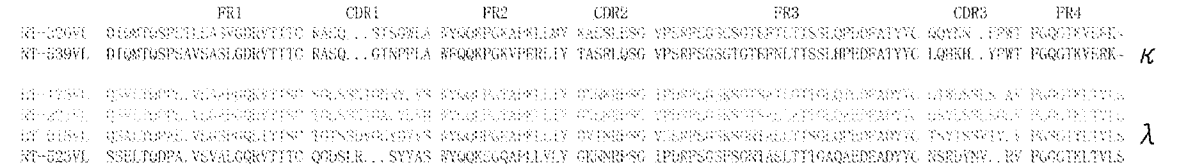
[図16]

重鎖



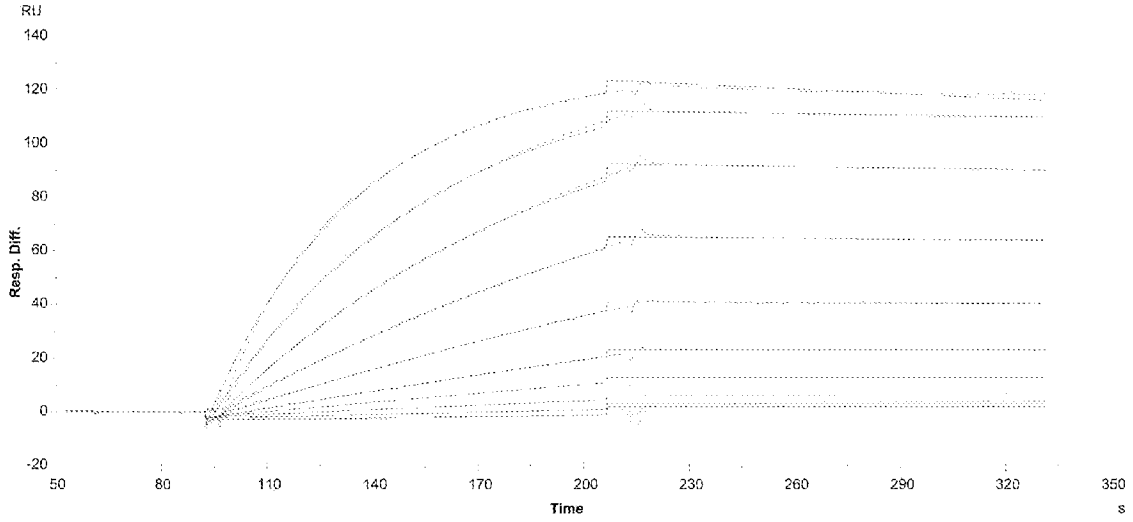
	Germline	相同性
BT-015IgG	VH1-2	87.5%
BT-175IgG	VH2-5	88.8%
BT-221IgG	VH2-5	96.6%
NT-320IgG	VH3-30	94.3%
NT-523IgG	VH1-69	98.9%
NT-539IgG	VH3-30	98.9%

軽鎖



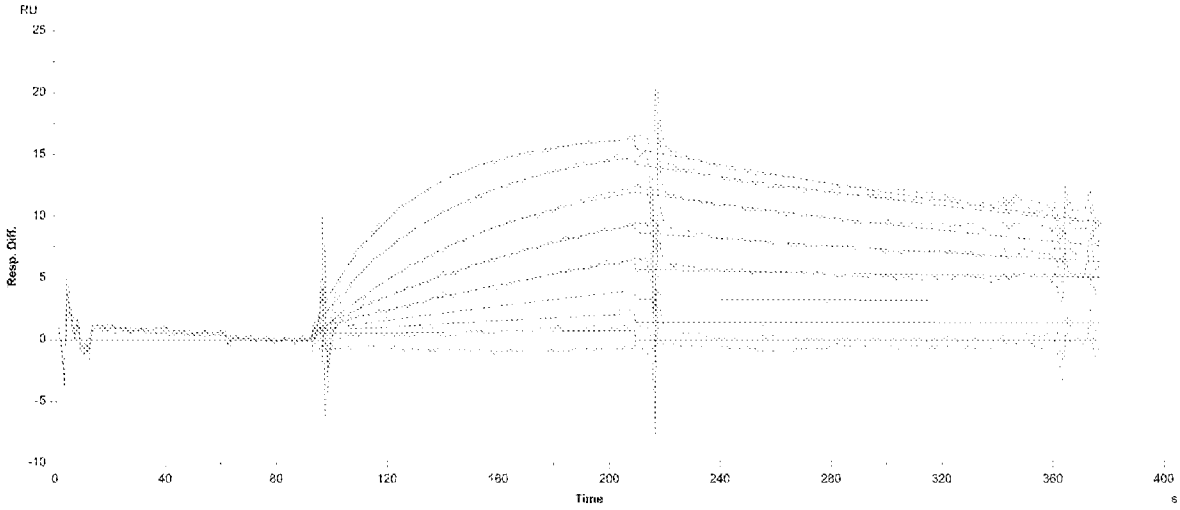
	Germline	相同性
BT-015IgG	IGLV2-14（λ）	89.8%
BT-175IgG	IGLV1-51（λ）	100.0%
BT-221IgG	IGLV1-40（λ）	100.0%
NT-320IgG	IGKV1-5（κ）	95.2%
NT-523IgG	IGLV3-19（λ）	92.6%
NT-539IgG	IGKV1D-17（κ）	82.4%

[図17]



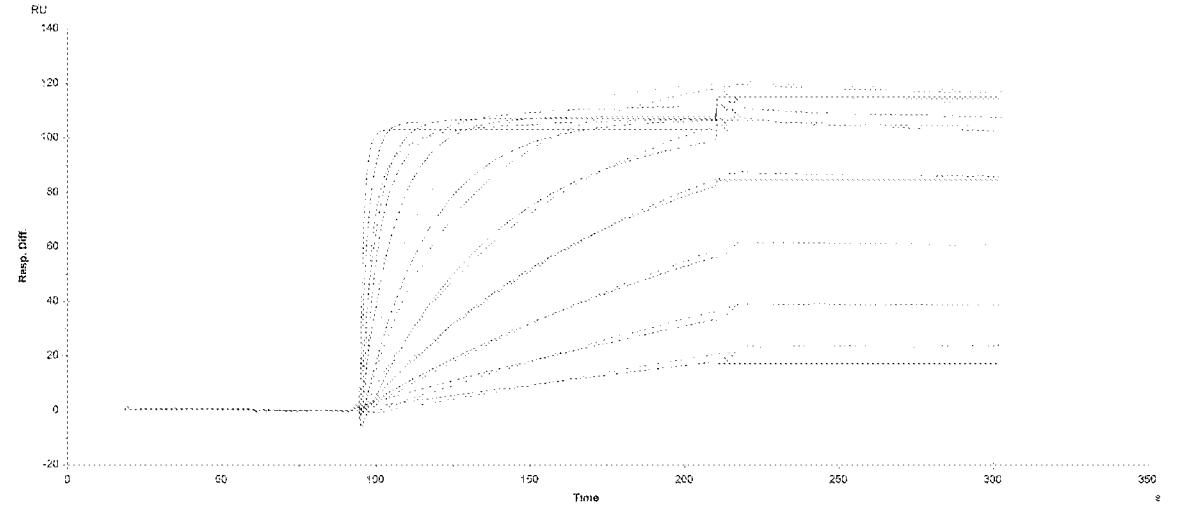
Conc of analyte	ka (1/Ms)	kd (1/s)	Rmax (RU)	KA (1/M)	KD (M)	kobs (1/s)	Chi2
Global	1.15E+05	2.00E-07	135	5.74E+11	1.74E-12		0.102
1.9nM	6.88E+04	6.09E-07		1.13E+11	8.85E-12	1.31E-04	
3.9nM	5.49E+04	5.88E-07		9.33E+10	1.07E-11	2.15E-04	
7.8nM	5.47E+04	5.12E-06		1.07E+10	9.37E-11	4.31E-04	
15.5nM	5.69E+04	1.52E-06		3.73E+10	2.68E-11	8.83E-04	
31.25nM	5.29E+04	1.28E-06		4.13E+10	2.42E-11	1.65E-03	
62.5nM	5.04E+04	2.10E-05		2.40E+09	4.17E-10	3.17E-03	
125nM	4.68E+04	1.64E-04		2.85E+08	3.50E-09	6.01E-03	
250nM	4.10E+04	1.89E-04		2.17E+08	4.61E-09	0.0104	
500nM	3.15E+04	1.54E-04		2.04E+08	4.89E-09	0.0159	
1uM	2.33E+04	4.99E-04		4.66E+07	2.15E-08	0.0237	

[図18]



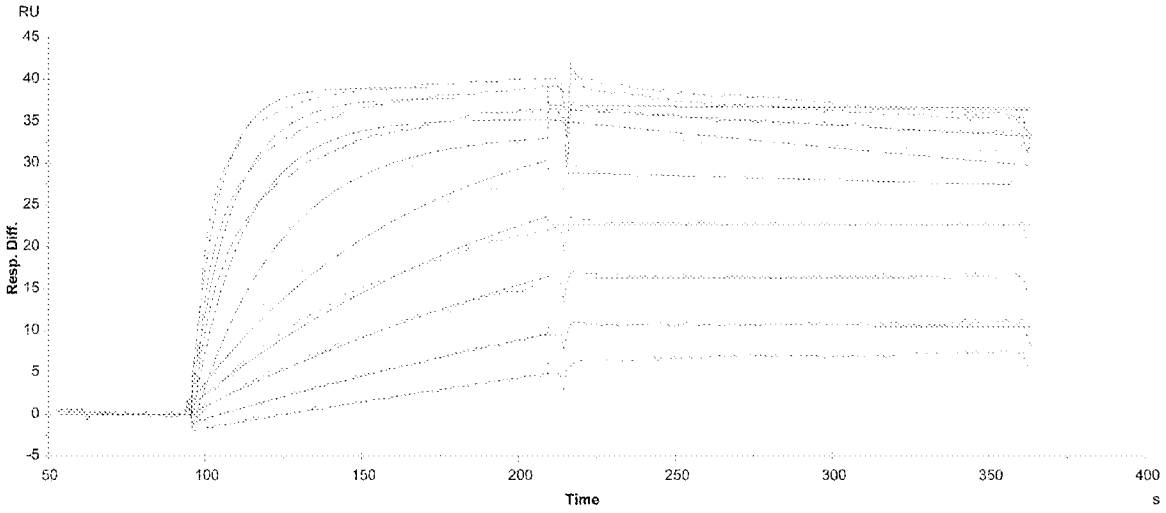
Conc of analyte	ka (1/Ms)	kd (1/s)	Rmax (RU)	KA (1/M)	KD (M)	kobs (1/s)	Chi2
Global	6.32E+04	2.81E-03	17.7	2.42E+07	4.13E-08		0.0545
3.8n	92.2	8.86E-05		1.04E+06	9.61E-07	8.90E-05	
7.8n	1.55E+04	4.23E-05		3.67E+08	2.73E-09	1.65E-04	
15.5n	4.68E+04	9.64E-05		4.86E+08	2.06E-09	8.22E-04	
31.25n	5.78E+04	3.69E-04		1.57E+08	6.39E-09	2.18E-03	
62.5n	5.56E+04	7.01E-04		7.93E+07	1.26E-08	4.18E-03	
125n	5.31E+04	1.87E-03		2.84E+07	3.52E-08	8.51E-03	
250n	4.88E+04	2.68E-03		1.82E+07	5.50E-08	1.49E-02	
500n	3.64E+04	2.42E-03		1.50E+07	6.65E-08	2.06E-02	
1u	2.69E+04	2.87E-03		9.37E+06	1.07E-07	2.98E-02	

[図19]



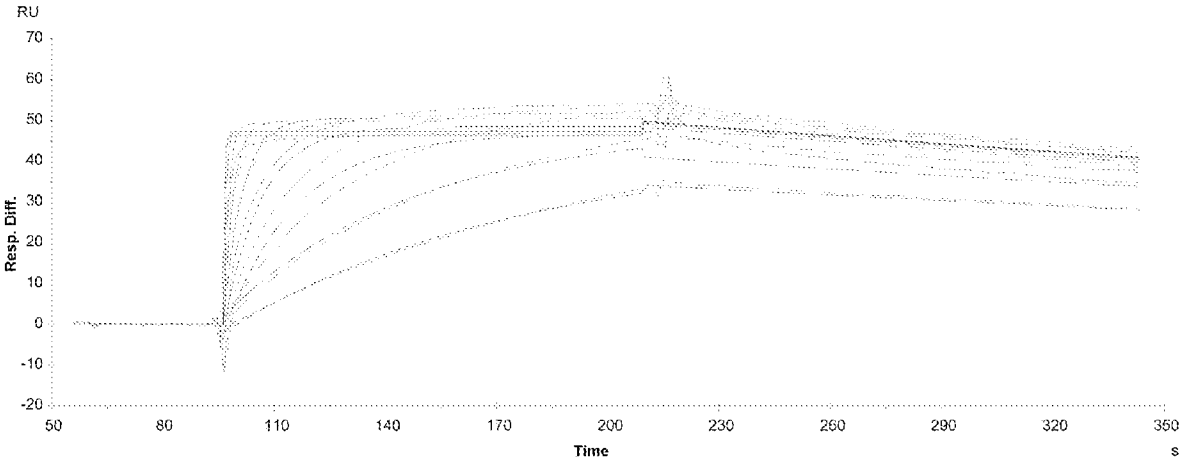
Conc of analyte	ka (1/Ms)	kd (1/s)	Rmax (RU)	KA (1/M)	KD (M)	kobs (1/s)	Chi2
Global	1.15E+06	2.72E-06	2.20E+03	4.22E+11	2.37E-12		2.17
1.9n	1.80E+05	5.87E-07	640	3.06E+11	3.27E-12	9.45E-05	
3.8n	7.26E+05	6.75E-07	149	1.08E+12	9.30E-13	1.59E-04	
7.8n	8.36E+05	1.37E-07	120	6.08E+12	1.64E-13	2.48E-04	
15.5n	7.21E+05	3.75E-07	122	1.92E+12	5.20E-13	3.59E-04	
31.25n	1.30E+04	3.67E-05		3.54E+08	2.83E-09	4.42E-04	
62.5n	7.21E+03	3.65E-05		1.97E+08	5.07E-09	4.87E-04	
125n	3.55E+03	2.76E-06		1.29E+09	7.77E-10	4.47E-04	
250n	1.67E+03	7.71E-07		2.17E+09	4.61E-10	4.19E-04	
500n	7.81E+02	9.01E-06		8.66E+07	1.15E-08	4.00E-04	
1u	369	3.30E-06		1.12E+08	8.94E-09	3.73E-04	

[図20]



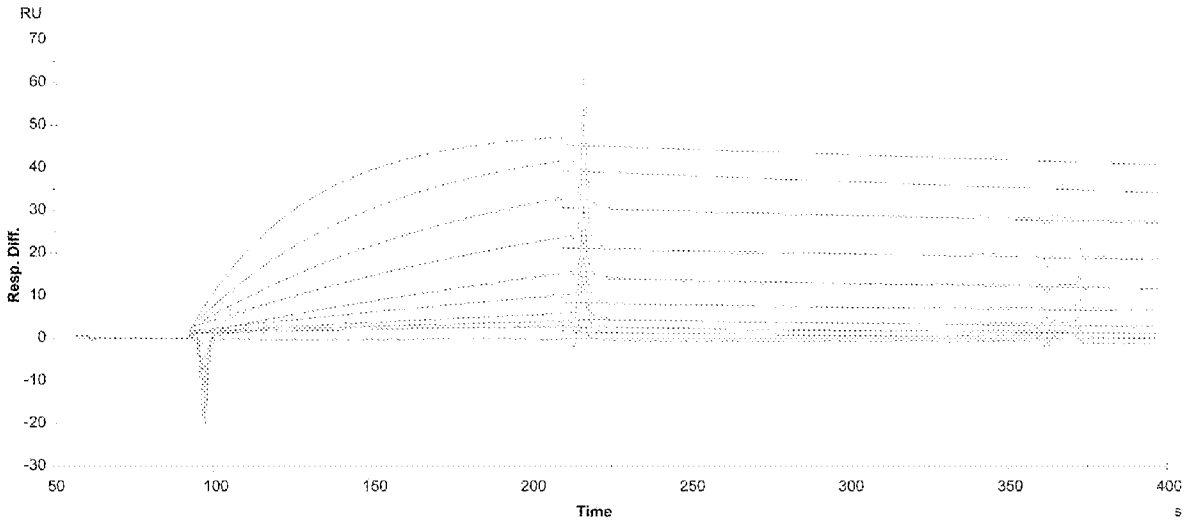
Conc of analyte	ka (1/Ms)	kd (1/s)	Rmax (RU)	KA (1/M)	KD (M)	kobs (1/s)	Chi2
Global	6.10E+05	5.79E-06	37	1.05E+11	9.49E-12		0.179
3.9nM	4.65E+05	1.49E-05	3.9n	3.12E+10	1.83E-03		
7.8nM	3.82E+05	8.78E-05	7.8n	4.35E+09	3.07E-03		
15.5nM	3.32E+05	3.18E-05	15.5n	1.04E+10	5.18E-03		
31.25nM	2.67E+05	9.60E-06	31.25n	2.78E+10	8.35E-03		
62.5nM	2.22E+05	3.60E-04	62.5n	6.18E+08	0.0142		
125nM	2.77E+05	1.10E-03	125n	2.52E+08	0.0358		
250nM	2.36E+05	6.18E-04	250n	3.83E+08	0.0597		
500nM	1.56E+05	9.49E-05	500n	1.64E+09	0.0779		
1uM	1.15E+05	6.37E-05	1u	1.80E+09	0.115		

[図21]



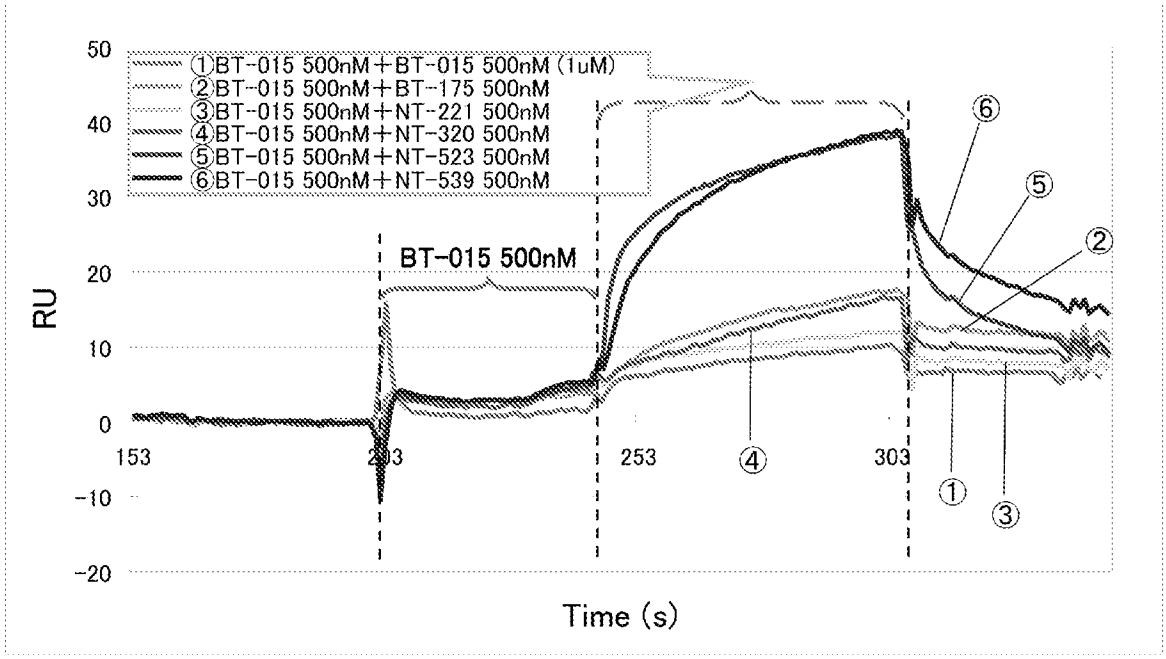
Conc of analyte	ka (1/Ms)	kd (1/s)	Rmax (RU)	KA (1/M)	KD (M)	kobs (1/s)	Chi2
Global	1.32E+06	1.01E-03	394	1.31E+09	7.63E-10		0.0621
1.9n	4.22E+06	1.60E-03	64.6	2.64E+09	3.79E-10	9.19E-03	
3.8n	5.44E+06	1.63E-03	59.5	3.33E+09	3.00E-10	0.0169	
7.8n	3.35E+06	1.72E-03	58	1.95E+09	5.13E-10	0.0278	
15.5n	2.99E+06	1.80E-03	56.4	1.66E+09	6.02E-10	0.0482	
31.25n	3.50E+04	2.39E-04		2.83E-09	1.46E+08	1.33E-03	
62.5n	1.61E+04	2.11E-05		5.07E-09	7.63E+08	1.03E-03	
125n	7.64E+03	8.47E-06		7.77E-10	9.02E+08	9.64E-04	
250n	3.67E+03	2.86E-06		4.61E-10	1.28E+09	9.20E-04	
500n	1.77E+03	4.80E-05		1.15E-08	3.68E+07	9.32E-04	
1u	854	4.22E-05		8.94E-09	2.02E+07	8.96E-04	

[図22]

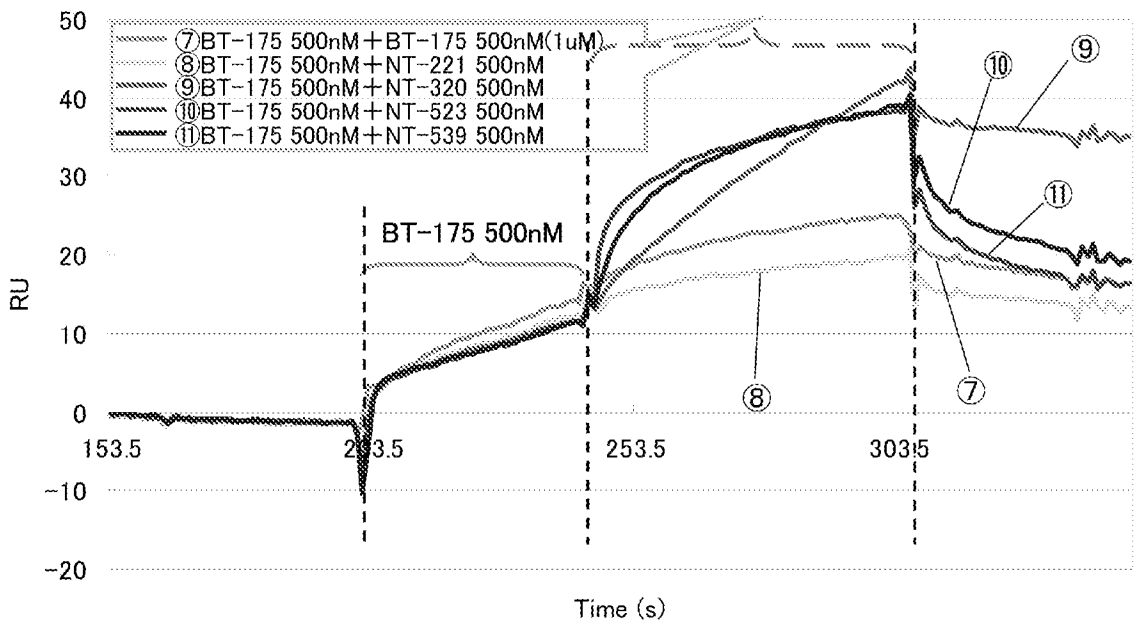


Conc of analyte	ka (1/Ms)	kd (1/s)	Rmax (RU)	KA (1/M)	KD (M)	Keqa (1/s)	Chi2
0 (blank)	3.03E+03	1.33E-02	48.2	2.28E+07	4.38E-08		0.074
1.9n	1.46E+02	1.33E-03		1.10E+05	9.09E-06	1.33E-03	
3.8n	1.34E+05	1.00E-02		1.34E+07	7.47E-08	0.0105	
7.8n	8.36E+04	4.44E-03		1.88E+07	5.31E-08	5.10E-03	
15.5n	6.47E+04	2.67E-03		2.43E+07	4.12E-08	3.67E-03	
31.25n	5.74E+04	1.49E-03		3.86E+07	2.59E-08	3.28E-03	
62.5n	5.10E+04	1.25E-03	49	4.08E+07	2.46E-08	4.44E-03	
125n	4.51E+04	9.29E-04	46.2	4.85E+07	2.06E-08	6.57E-03	
250n	4.12E+04	8.36E-04	45.8	4.93E+07	2.03E-08	0.0111	
500n	3.09E+04	8.44E-04	48.6	3.66E+07	2.73E-08	0.0163	
1u	2.74E+04	5.76E-04		4.76E+07	2.10E-08	0.028	

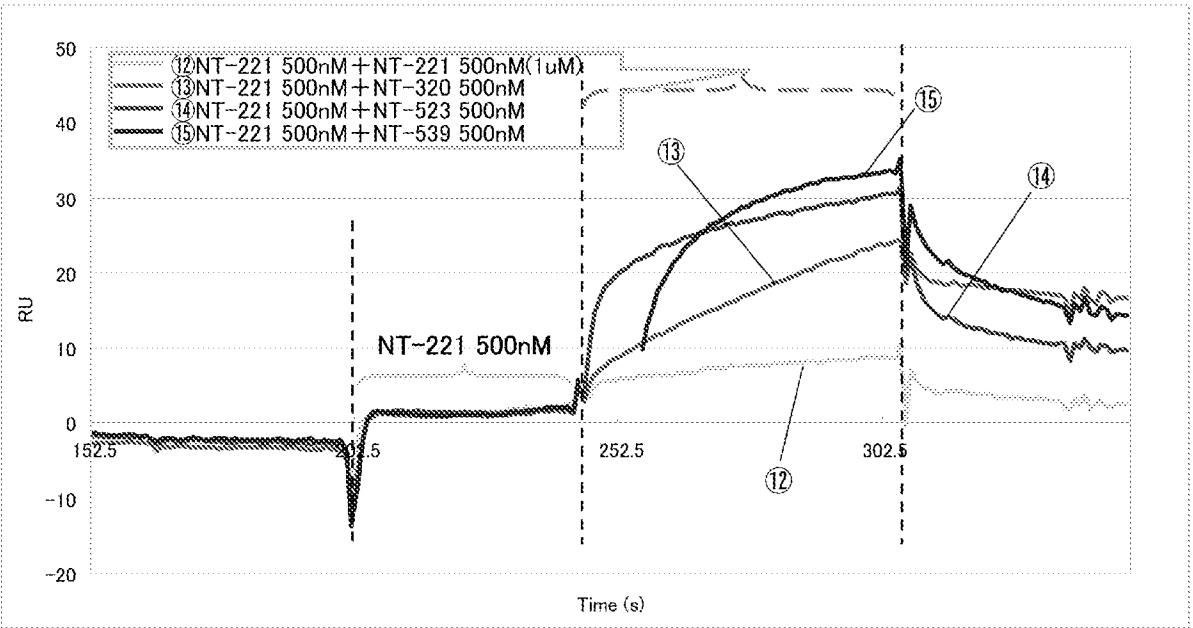
[図23]



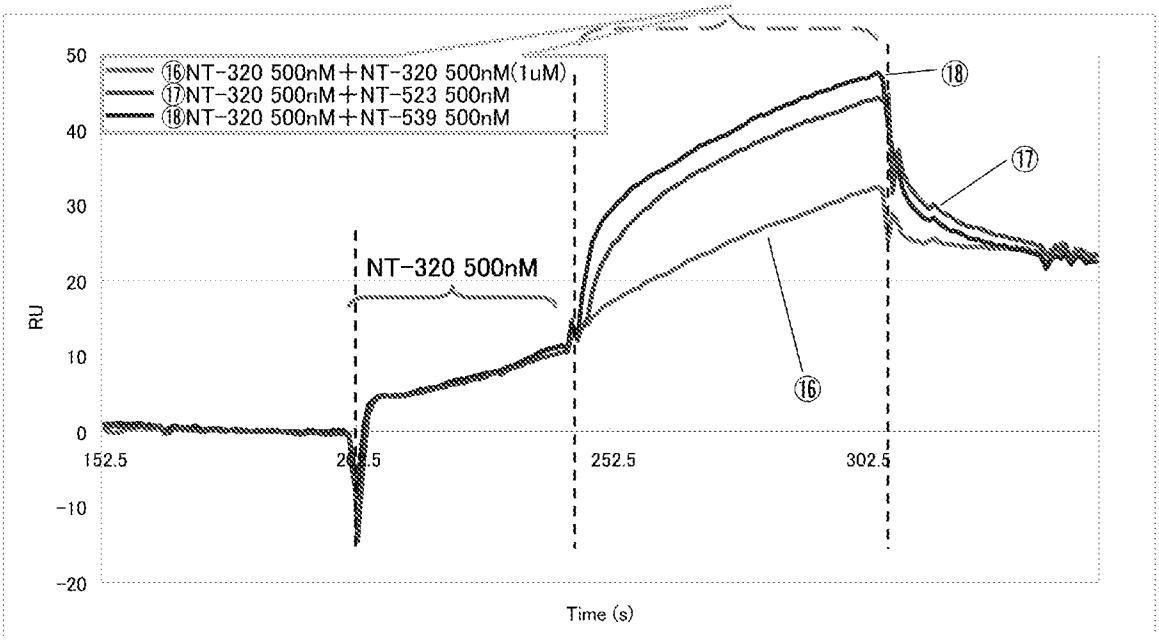
[図24]


⑦BT-175 500nM＋BT-175 500nM(1uM)
⑧BT-175 500nM＋NT-221 500nM
⑨BT-175 500nM＋NT-320 500nM
⑩BT-175 500nM＋NT-523 500nM
⑪BT-175 500nM＋NT-539 500nM
BT-175 500nM
RU
Time (s)
153.5
253.5
303.5

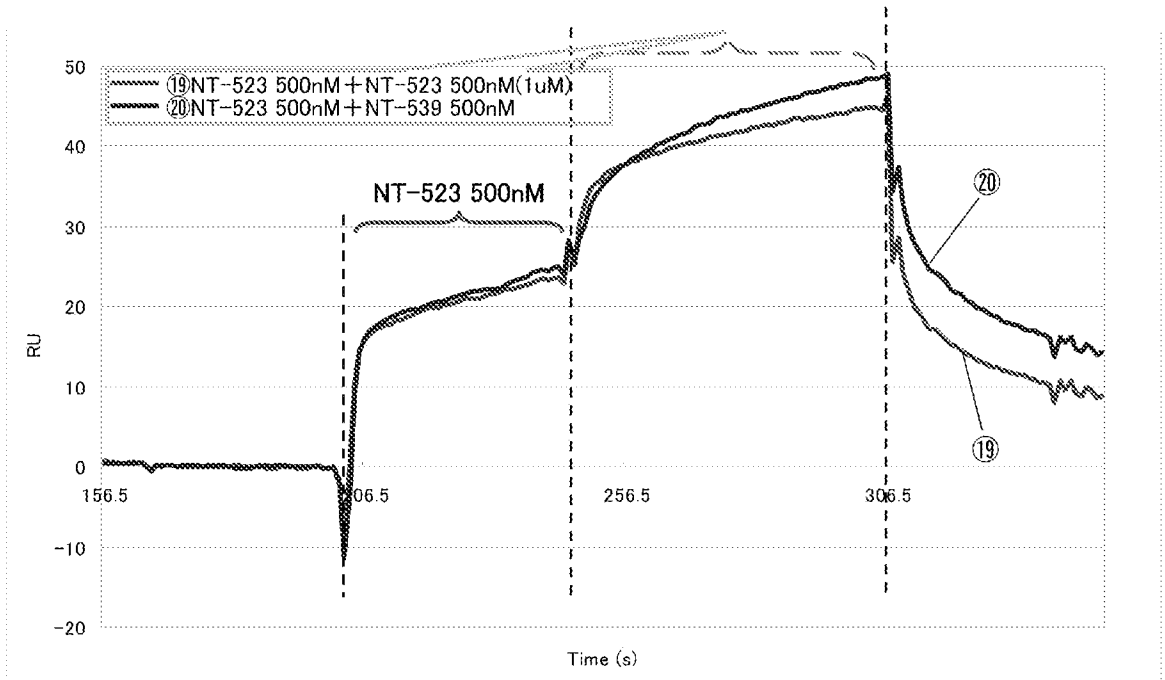
[図25]


⑫NT-221 500nM＋NT-221 500nM(1uM)
⑬NT-221 500nM＋NT-320 500nM
⑭NT-221 500nM＋NT-523 500nM
⑮NT-221 500nM＋NT-539 500nM
NT-221 500nM
RU
Time (s)
152.5
252.5
302.5

[図26]


⑯NT-320 500nM＋NT-320 500nM(1uM)
⑰NT-320 500nM＋NT-523 500nM
⑱NT-320 500nM＋NT-539 500nM
NT-320 500nM
RU
Time (s)
50
40
30
20
10
0
-10
-20
152.5
252.5
302.5

[図27]


⑲NT-523 500nM＋NT-523 500nM(1uM)
⑳NT-523 500nM＋NT-539 500nM
NT-523 500nM
RU
Time (s)
50
40
30
20
10
0
-10
-20
156.5
256.5
306.5

[図28]

標準A型抗毒素				(体重(g)	8.29	8.30.	8.31.	9.03.	9.04.	9.05.	9.06	9.07.	9.10.	9.12	9.14	9.18	9.19
AT:0.5 IU/ml		PBS(ml)	Toxin(ml)		1日目	2日目	3日目	6日目	7日目	8日目	9日目	10日目	13日目	15日目	17日目	21日目	22日目
10IU/ml	ml			14.9	++	++	+++	+++	++−	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++
0.4:7.6	0.30	0.33	0.63	15.5													
				16.2	+	++	+++	+++	++−	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++
	0.28	0.36	0.63	16.0	+	+++	+++	+++	++−	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++
				15.5	++	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	0.25	0.38	0.63	16.0	++	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
				16.3	+	d											
	0.23	0.40	0.63	15.8	++	++	+++	+++	++−	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++
				16.3	+++	+++	d										
	0.21	0.42	0.63	15.8	d												

No.				(体重(g)	8.29	8.30.	8.31	9.03.	9.04.	9.05.	9.06	9.07.	9.10.	9.12	9.14	9.18	9.19
検体(ml)		PBS(ml)	Toxin(ml)	0.0	1日目	2日目	3日目	6日目	7日目	8日目	9日目	10日目	13日目	15日目	17日目	21日目	22日目
5種pool Sample 1				15.7	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
1mg/ml	0.25	0.38	0.63	16.2	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
				16.2	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
3倍希釈	0.25	0.38	0.63	16.0	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
				15.8	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
9倍希釈	0.25	0.38	0.63	15.0	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
				16.5	d												
27倍希釈	0.25	0.38	0.63	17.0	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
				16.9	d												
81倍希釈	0.25	0.38	0.63	16.4	d												

No.				(体重(g)	8.29	8.30.	8.31	9.03.	9.04.	9.05.	9.06	9.07.	9.10.	9.12	9.14	9.18	9.19
検体(ml)		PBS(ml)	Toxin(ml)	0.0	1日目	2日目	3日目	6日目	7日目	8日目	9日目	10日目	13日目	15日目	17日目	21日目	22日目
4種混合サンプル 2				17.2	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
1mg/ml	0.25	0.38	0.63	15.4	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
				16.6	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
3倍希釈	0.25	0.38	0.63	16.4	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
				17.2	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
9倍希釈	0.25	0.38	0.63	15.5	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
				16.1	++	d											
27倍希釈	0.25	0.38	0.63	15.7	+++	d											
				16.1	++	++	d										
81倍希釈	0.25	0.38	0.63	14.9	+++	+++	d										

No.				(体重(g)	8.29	8.30.	8.31	9.03.	9.04.	9.05.	9.06	9.07.	9.10.	9.12	9.14	9.18	9.19
検体(ml)		PBS(ml)	Toxin(ml)	0.0	1日目	2日目	3日目	6日目	7日目	8日目	9日目	10日目	13日目	15日目	17日目	21日目	22日目
4種混合サンプル 3				15.4	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
1mg/ml	0.25	0.38	0.63	16.0													
				16.1	+	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
3倍希釈	0.25	0.38	0.63	16.1	+++	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
				16.1	+++	d											
9倍希釈	0.25	0.38	0.63	15.8	d												
				15.0	d												
27倍希釈	0.25	0.38	0.63	16.2	++	++	d										
				17.3	d												
81倍希釈	0.25	0.38	0.63	14.7	d												

No.				(体重(g)	8.29	8.30.	8.31	9.03.	9.04.	9.05.	9.06	9.07.	9.10.	9.12	9.14	9.18	9.19
検体(ml)		PBS	Toxin	0.0	1日目	2日目	3日目	6日目	7日目	8日目	9日目	10日目	13日目	15日目	17日目	21日目	22日目
4種混合サンプル 4				15.9	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
1mg/ml	0.25	0.38	0.63	15.2	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
				15.6	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
3倍希釈	0.25	0.38	0.63	16.9	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
				16.8	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
9倍希釈	0.25	0.38	0.63	15.2	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
				16.7	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
27倍希釈	0.25	0.38	0.63	15.8	++	d											
				13.4	d												
81倍希釈	0.25	0.38	0.63	16.9	d												

No.				(体重(g)	8.29	8.30.	8.31	9.03.	9.04.	9.05.	9.06	9.07.	9.10.	9.12	9.14	9.18	9.19
検体(ml)		PBS	Toxin	0.0	1日目	2日目	3日目	6日目	7日目	8日目	9日目	10日目	13日目	15日目	17日目	21日目	22日目
3種混合サンプル 5				15.3	+++	d											
1mg/ml	0.25	0.38	0.63	15.7	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
				14.8	d												
3倍希釈	0.25	0.38	0.63	16.6	d												
				15.6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9倍希釈	0.25	0.38	0.63	16.8	d												
				16.1	d												
27倍希釈	0.25	0.38	0.63	16.1	d												
				15.9	d												
81倍希釈	0.25	0.38	0.63	15.5	d												

No.				(体重(g)	8.29	8.30.	8.31	9.03.	9.04.	9.05.	9.06	9.07.	9.10.	9.12	9.14	9.18	9.19
検体(ml)		PBS	Toxin	0.0	1日目	2日目	3日目	6日目	7日目	8日目	9日目	10日目	13日目	15日目	17日目	21日目	22日目
3種混合サンプル 6				15.4	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
1mg/ml	0.25	0.38	0.63	14.9	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
				16.2	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
3倍希釈	0.25	0.38	0.63	15.9	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
				16.7	++	++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	+	+	+
9倍希釈	0.25	0.38	0.63	16.1	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
				16.2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++
27倍希釈	0.25	0.38	0.63	15.0	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++
				16.5	d												
81倍希釈	0.25	0.38	0.63	15.5	+++	+++	d										

No.				(体重(g)	8.29	8.30.	8.31	9.03.	9.04.	9.05.	9.06	9.07.	9.10.	9.12	9.14	9.18	9.19
検体(ml)		PBS	Toxin	0.0	1日目	2日目	3日目	6日目	7日目	8日目	9日目	10日目	13日目	15日目	17日目	21日目	22日目
3種混合サンプル 7				16.7	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
1mg/ml	0.25	0.38	0.63	16.1	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
				16.4	+++	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
3倍希釈	0.25	0.38	0.63	16.1	d												
				15.4	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9倍希釈	0.25	0.38	0.63	16.2	+++	d											
				16.0	d												
27倍希釈	0.25	0.38	0.63	14.9	d												
				15.6	d												
81倍希釈	0.25	0.38	0.63	17.3	d												

[図29]

抗体:BT-015

抗原	抗体濃度(μg/ml) 1	0.5	0.25	0.125
BoNT/A1	>3.500	>3.500	3.149	2.491
H chain	0.071	0.064	0.050	0.045
L chain	0.100	0.087	0.082	0.079
BoNT/A2	>3.500	>3.500	>3.500	ND

抗体:BT-175

抗原	抗体濃度(μg/ml) 1	0.5	0.25	0.125
BoNT/A1	>3.500	>3.500	>3.500	3.004
H chain	0.078	0.052	0.037	0.029
L chain	0.194	0.153	0.115	0.076
BoNT/A2	>3.500	>3.500	>3.500	ND

抗体:NT-221

抗原	抗体濃度(μg/ml) 1	0.5	0.25	0.125
BoNT/A1	>3.500	>3.500	2.918	2.102
H chain	0.104	0.079	0.054	0.042
L chain	0.131	0.096	0.088	0.071
BoNT/A2	1.133	1.105	0.893	ND

抗体:NT-320

抗原	抗体濃度(μg/ml) 10	5	2.5	1.25
BoNT/A1	2.620	2.475	2.464	2.250
H chain	1.059	1.062	1.065	1.000
L chain	0.197	0.097	0.082	0.034
BoNT/A2	1.121	0.867	0.389	ND

抗体:NT-523

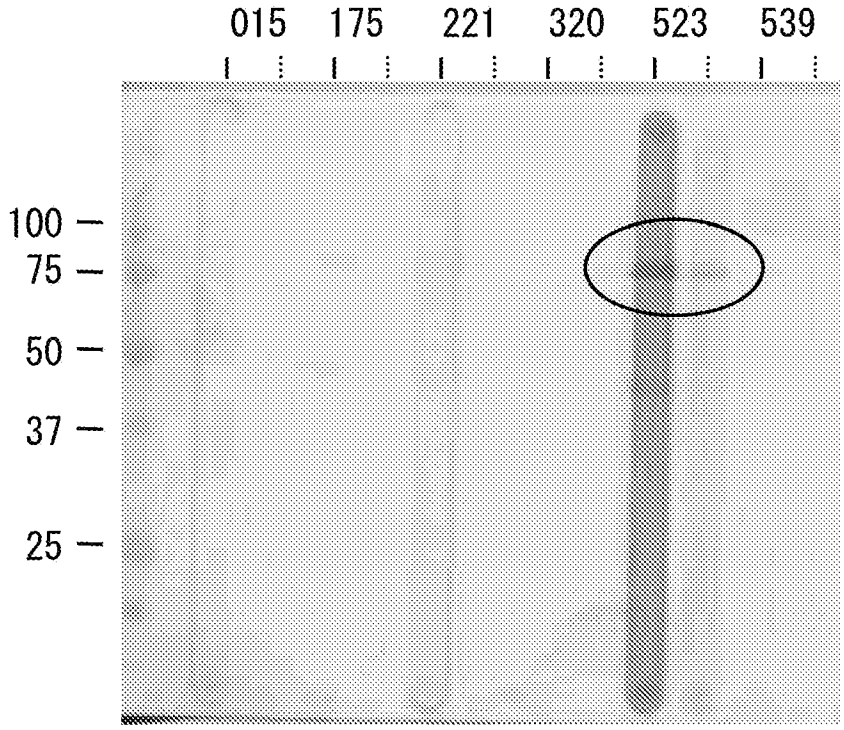
抗原	抗体濃度(μg/ml) 10	5	2.5	1.25
BoNT/A1	>3.500	>3.500	>3.500	>3.500
H chain	1.828	1.752	1.598	1.498
L chain	2.656	2.212	1.947	1.398
BoNT/A2	0.949	0.945	0.871	ND

抗体:NT-539

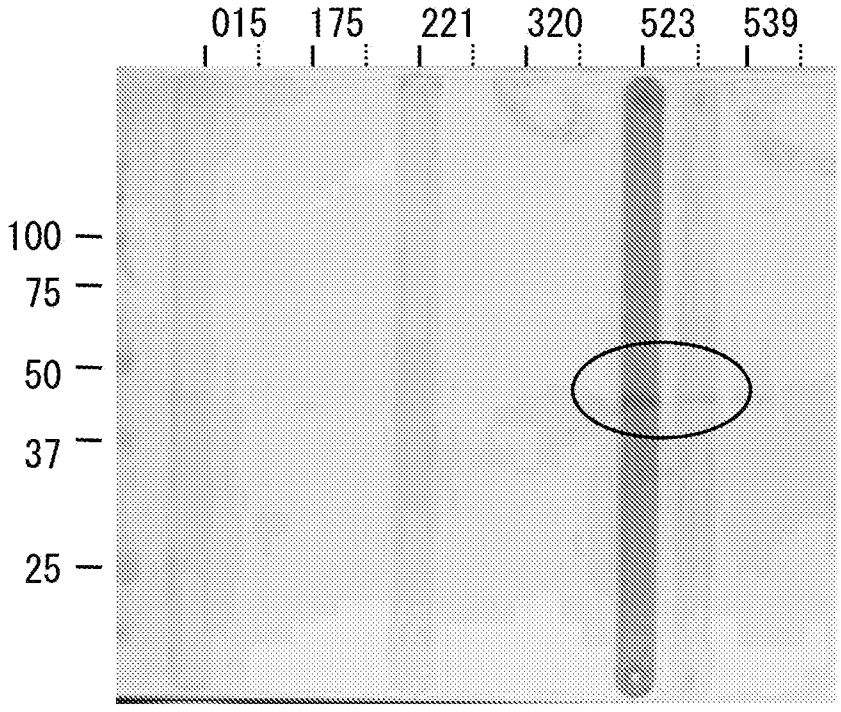
抗原	抗体濃度(μg/ml) 10	5	2.5	1.25
BoNT/A1	2.360	1.909	1.505	1.202
H chain	0.261	0.206	0.114	0.083
L chain	0.314	0.209	0.102	0.094
BoNT/A2	2.065	1.272	0.646	ND

[図30]

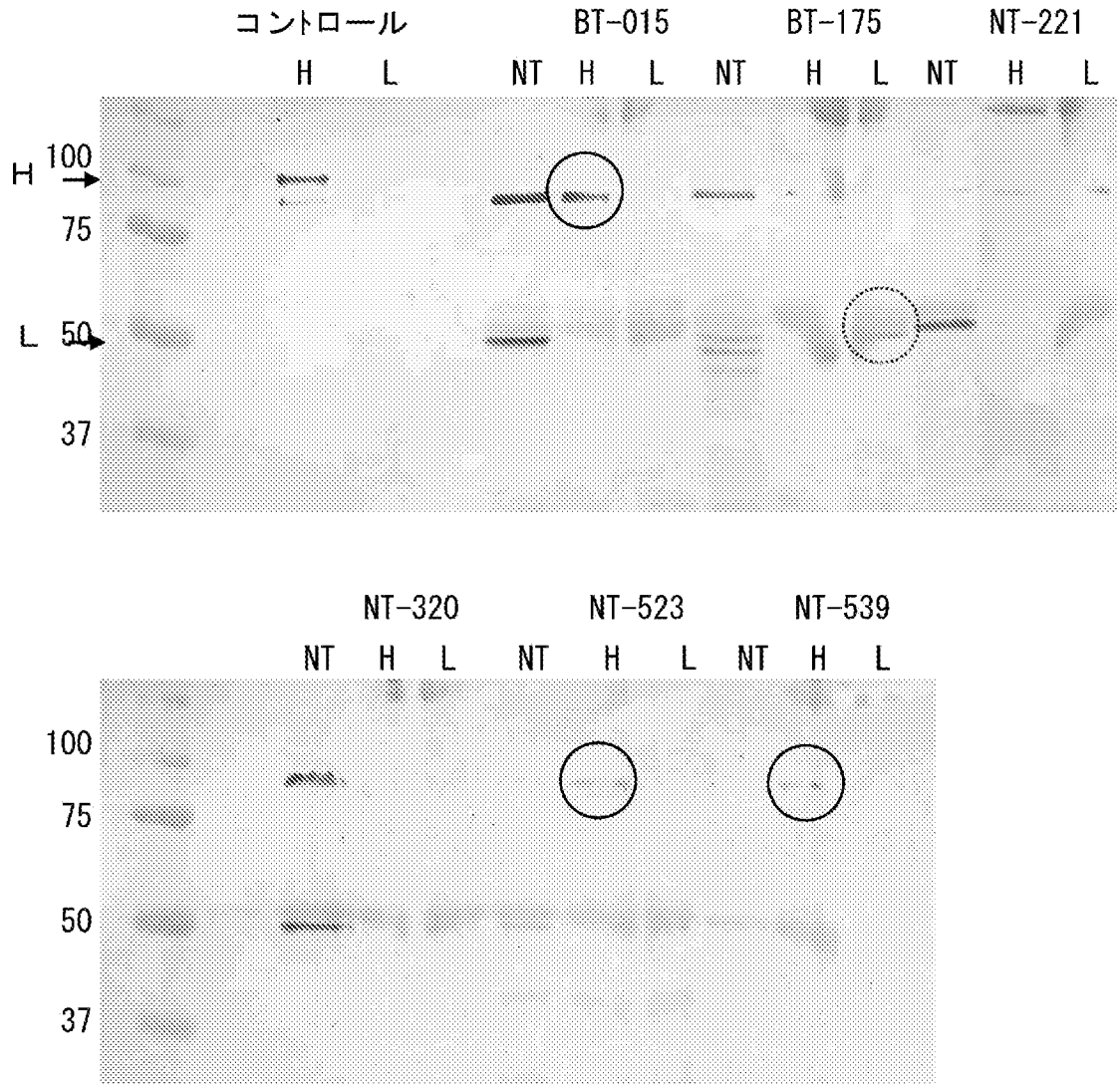
1) A1 ニューロトキシン(NT)



2) リコンビナントHc



[図31]



[図32]

	BT-015	BT-175	NT-221	NT-320	NT-523	NT-539
ELISA	NT	NT	NT	H	NT	NT
ブロッティング	-	-	-	-	Hc	-
免疫沈降	H	L(?)	NT	NT	H	H
エピトープ候補	H	L(?)	—	H	Hc	H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2009/000250

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N15/09(2006.01)i, *A61K39/395*(2006.01)i, *C07K16/12*(2006.01)i, *C12N1/15*(2006.01)i, *C12N1/19*(2006.01)i, *C12N1/21*(2006.01)i, *C12N5/10*(2006.01)i, *C12P21/08*(2006.01)i
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)
C12N15/09, A61K39/395, C07K16/12, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12P21/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2009
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2009 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2009

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), CAplus(STN), JSTPlus(JDreamII), JMEDPlus(JDreamII), JST7580(JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Nowakowski A. et al., Potent neutralization of botulinum neurotoxin by recombinant oligoclonal antibody., Proc Natl Acad Sci U S A., 2002, 99(17), 11346-50	1-14
A	Mullaney BP et al., Epitope mapping of neutralizing botulinum neurotoxin A antibodies by phage display., Infect Immun., 2001, 69(10), 6511-4	1-14
X	Motohide TAKAHASHI, Ko Dokuso Seizai no Koritsuteki Seizo Hoho no Kaihatsu ni Kansuru Kenkyu, 2006, pages 21 to 23	9-14
X	Motohide TAKAHASHI, Ko Dokuso Seizai no Koritsuteki Seizo Hoho no Kaihatsu ni Kansuru Kenkyu, 2005, pages 1 to 7	9-14

☒ 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
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
09 February, 2009 (09.02.09)	24 February, 2009 (24.02.09)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2009/000250

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Motohide TAKAHASHI, Ko Dokuso Seizai no Koritsuteki Seizo Hoho no Kaihatsu ni Kansuru Kenkyu", 2005, pages 23 to 26	9-14
P,X	Motohide TAKAHASHI, Ko Dokuso Seizai no Koritsuteki Seizo Hoho no Kaihatsu ni Kansuru Kenkyu, 2008.03, pages 15 to 20	1-14
A	WO 2007/094754 A2 (THE REGENTS OF THE UNICERSITY OF CALIFORDNIA), 23 August, 2007 (23.08.07), & US 2008/0124328 A1 & EP 1850866 A & CA 2594297 A & CN 101146554 A & CA 2594297 A1	1-14
A	Bavari S et al., Identifying the principal protective antigenic determinants of type A botulinum neurotoxin., Vaccine, 1998, 16(19), 1850-6	1-14
A	Chen F et al., Antibody mapping to domains of botulinum neurotoxin serotype A in the complexed and uncomplexed forms., Infect Immun., 1997, 65(5), 1626-30	1-14
A	Smith TJ et al., Sequence variation within botulinum neurotoxin serotypes impacts antibody binding and neutralization., Infect Immun., 2005, 73(9), 5450-7.	1-14

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２００９／０００２５０

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N15/09(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, C07K16/12(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N15/09, A61K39/395, C07K16/12, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12P21/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２００９年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２００９年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２００９年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), CAplus(STN), JSTPlus(JDreamII), JMEDPlus(JDreamII), JST7580(JDreamII)

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
A	Nowakowski A. et al., Potent neutralization of botulinum neurotoxin by recombinant oligoclonal antibody., Proc Natl Acad Sci U S A., 2002, 99(17), 11346-50	１－１４
A	Mullaney BP et al., Epitope mapping of neutralizing botulinum neurotoxin A antibodies by phage display., Infect Immun., 2001, 69(10), 6511-4	１－１４
X	高橋元秀, 抗毒素製剤の効率的製造方法の開発に関する研究, 2006, p.21-23	９－１４
X	高橋元秀, 抗毒素製剤の効率的製造方法の開発に関する研究, 2005,	９－１４

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　　☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 ０９．０２．２００９	国際調査報告の発送日 ２４．０２．２００９
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｎ　９７３９ 田中　晴絵 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４８８

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
	p. 1-7	
X	高橋元秀，抗毒素製剤の効率的製造方法の開発に関する研究，2005，p. 23-26	９－１４
ＰＸ	高橋元秀，抗毒素製剤の効率的製造方法の開発に関する研究，2008.03，p. 15-20	１－１４
A	WO 2007/094754 A2 (THE REGENTS OF THE UNICERSITY OF CALIFORDNIA) 2007.08.23, & US 2008/0124328 A1 & EP 1850866 A & CA 2594297 A & CN 101146554 A & CA 2594297 A1	１－１４
A	Bavari S et al., Identifying the principal protective antigenic determinants of type A botulinum neurotoxin., Vaccine, 1998, 16(19), 1850-6	１－１４
A	Chen F et al., Antibody mapping to domains of botulinum neurotoxin serotype A in the complexed and uncomplexed forms., Infect Immun., 1997, 65(5), 1626-30	１－１４
A	Smith TJ et al., Sequence variation within botulinum neurotoxin serotypes impacts antibody binding and neutralization., Infect Immun., 2005, 73(9), 5450-7.	１－１４