

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3919830号

(P3919830)

(45) 発行日 平成19年5月30日(2007.5.30)

(24) 登録日 平成19年2月23日(2007.2.23)

(51) Int. Cl. F I
C 1 2 P 21/08 (2006.01) C 1 2 P 21/08
C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 Z N A A

請求項の数 4 (全 23 頁)

(21) 出願番号	特願平4-341255	(73) 特許権者	000173555
(22) 出願日	平成4年11月28日(1992.11.28)		財団法人化学及血清療法研究所
(65) 公開番号	特開平6-217786		熊本県熊本市大窪一丁目6番1号
(43) 公開日	平成6年8月9日(1994.8.9)	(72) 発明者	来海 和彦
審査請求日	平成11年11月22日(1999.11.22)		熊本県熊本市鶴羽田町1161
審査番号	不服2004-499(P2004-499/J1)	(72) 発明者	前田 浩明
審査請求日	平成16年1月7日(2004.1.7)		熊本県熊本市武蔵ヶ丘2丁目142公園4-609
		(72) 発明者	西山 清人
			熊本県菊池市大字大琳寺225-16
		(72) 発明者	時吉 幸男
			熊本県熊本市若葉3丁目14-19

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗ネコヘルペスウイルス-1組換え抗体および該抗体をコードする遺伝子断片

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ネコヘルペスウイルス-1(FHV-1)に対して特異的に反応する抗体において、VHおよびVLのアミノ酸配列が、それぞれ配列表：配列番号1中のアミノ酸順位20番～143番および配列番号2中のアミノ酸順位21番～127番に記載するアミノ酸配列であり、該VHおよびVLのアミノ酸配列中にそれぞれ下記の相補性決定領域(CDR)を有し、かつ、該抗体の定常領域のアミノ酸配列がネコ抗体由来のアミノ酸配列であることを特徴とする、遺伝子組換え技術により調製された組換え抗体。

VH；

CDR1：LeuSerThrSerGlyMetGlyAlaGly

CDR2：HisIleTrpTrpAspAspValLysArgTyrAsnProAlaLeuLysSer

CDR3：SerGlnIleTyrPheAspTyrAspGlyAlaTrpPheProPhe

VL；

CDR1：ArgAlaSerGlnSerIleSerAsnAsnLeuHis

CDR2：AlaSerGlnSerIleSerGly

CDR3：GlnGlnSerAsnSerTrpProHisThr

【請求項2】

該抗体のH鎖定常領域のアミノ酸配列が、配列表：配列番号3に記載のアミノ酸配列、およびL鎖定常領域のアミノ酸配列が、配列表：配列番号4に記載のアミノ酸配列または配列表：配列番号5に記載のアミノ酸配列である請求項1に記載の抗体。

10

20

【請求項3】

ネコヘルペスウイルス-1 (FHV-1) に対して特異的に反応するネコキメラ抗体H鎖をコードする遺伝子断片であって、配列表：配列番号1中のアミノ酸順位20～143番に記載するアミノ酸配列をコードする遺伝子断片の下流(3'側)に、ネコ抗体H鎖の定常領域をコードする遺伝子断片を結合させたことを特徴とする組換え遺伝子断片。

【請求項4】

該ネコ抗体H鎖の定常領域をコードする遺伝子断片が、配列表：配列番号3に記載のアミノ酸配列をコードする核酸配列である請求項3の組換え遺伝子断片。

【発明の詳細な説明】

【0001】

10

【産業上の利用分野】

本発明は、ネコヘルペスウイルス-1 (FHV-1) 感染症の診断、治療及び予防に期待できる新規なネコモノクローナル抗体に関する。さらに詳細にはマウス型抗FHV-1中和モノクローナル抗体の定常領域をネコ抗体定常領域に変換したネコ型抗FHV-1組換え抗体及び該抗体をコードする遺伝子断片に関する。

【0002】

【発明の背景】

ネコはペットとして昔から人間に愛着のある動物であるが、近年の欧米では、「伴侶、仲間、相棒としての動物」(Companion species)と称され、人間社会の一員としての地位を獲得しつつある。もう一方では、医学、薬学、畜産学、獣医学から心理学にいたる実験動物としての貢献度は従来から大きなものであったが、近年では医薬品の効果検定や安全性試験にSPF猫(SPF Cat)などの呼称のもとで更に貢献度が高まっている。いずれの場合にも当然の事として、これらのネコの疾病、特に伝染病に関するより確実な知識がますます必要となり、その診断、治療、予防のための方法確立が要求されている。

20

【0003】

ネコのウイルス性疾患は多く、なかでもFHV-1に起因した上部気道性疾患は急性で致死率が高い。両疾病に対する特効的な治療薬はなく、抗生物質、サルファ剤等の二次細菌感染予防の対症療法しかなく、現在の治療法には問題を残している。

【0004】

従来よりウイルス感染症の治療薬として高度免疫血清や血清由来の免疫グロブリンが使用され有効な実績を残してきた。しかし、現在では、動物愛護思想の高まりと共に、ネコ血清原料の入手が困難になりこの治療法は使いたくとも使用できない状況になっている。従って、従来高度免疫血清に代わってFHV-1を中和できるモノクローナル抗体があればFHV-1感染症の治療に大きく貢献することが可能である。

30

【0005】

【従来技術】

FHV-1に対する中和モノクローナル抗体がいくつか確立されているが、確立されているモノクローナル抗体は、全てマウスハイブリドーマ由来の抗体である。これらの抗体を治療薬としてネコに投与した場合、異種蛋白であるため血中に存在している補体あるいはFcレセプターを持つ免疫担当細胞との結合力は同種(ネコ)のそれよりも弱く、抗体+補体による細胞障害や抗体依存・細胞媒介性細胞障害を誘起しにくいと考えられる。FHV-1の感染防御及びウイルスの中和には抗体単独による作用に加えて、これら2つの免疫反応も重要であることが知られている(Horimoto T. et al. Jpn.J.Vet.Sci. 51, p1025, 1989)。従って、従来マウス抗体では効果的な治療効果を誘導できない可能性がある。

40

【0006】

さらに、異種タンパクとして認識されたマウス抗体はアナフィラキシーショックや血清病などの副作用を起こしたり、半減期が短縮し治療効果が薄れる可能性がある。従って投与する抗体は、従来マウスモノクローナル抗体では決して満足のいくものではなく、ネコ型のモノクローナル抗体でなければならなかった。

50

【 0 0 0 7 】

【 発明の目的 】

このような状況にあって、本発明者らは、FHV-1ウイルス株を中和するマウスモノクローナル抗体JH2を確立し、この抗体の可変領域(V領域)をコードする遺伝子の核酸配列を同定し、さらに該抗体のFHV-1中和に深く係わるV領域中の特異的アミノ酸配列をも見いだした。次に本マウス型モノクローナル抗体をネコ型化するために、抗FHV-1中和抗体をコードする抗体V領域遺伝子を、先に本発明者らが見いだしたネコ抗体の定常領域をコードする遺伝子断片と連結させることにより、FHV-1中和活性を有する抗FHV-1キメラ抗体発現ベクターを構築し、これを発現させ、抗FHV-1キメラ抗体を得ることに成功するに至った。すなわち、本発明は、遺伝子工学的手法を用いてマウス型抗体の定常領域をネコ抗体の定常領域と置き換えた、これまでに報告のない抗FHV-1ネコ型キメラ抗体、およびこの調製に有用な該抗体をコードする遺伝子断片を提供することを目的とする。かくして、FHV-1感染症に対して有効かつ副作用のない、診断薬・治療薬・予防薬への抗FHV-1抗体の応用が可能となる。

10

【 0 0 0 8 】

【 発明の構成及び効果 】

本発明者らは、まずFHV-1-K1ウイルス粒子で免疫されたマウスのリンパ球とマウスミエローム細胞を常法にしたがい細胞融合し、ハイブリドーマを作製した。ハイブリドーマの培養上清中のウイルス中和能を指標にクローニングを行った結果、FHV-1の中和活性において極めて優れたモノクローナル抗体を産生する抗体産生細胞JH2を確立することに成功した。

20

【 0 0 0 9 】

一般に、抗体の抗原にたいする特異性は抗体可変(V)領域のアミノ酸によって規定されていることが知られている。そこで、JH2のV領域がいかなるアミノ酸で構成されているか調べた。アミノ酸配列は、該抗体のV領域をコードする遺伝子をクローニングし、その核酸塩基配列を調べることにより決定した。

【 0 0 1 0 】

その結果、図2及び図3に示されるアミノ酸配列を有していることが分かった。一般に、抗体のH鎖遺伝子領域には約200個のVH、数10個のD、4つのJH遺伝子が存在する。一方L鎖遺伝子領域には約200のV、4つのJ遺伝子がある。B細胞の分化にともない、これらのV(D)Jの各断片のうちから1つを選んで再構成が起こり可変領域全体のアミノ酸をコードする遺伝子となることが知られている。さらに、N配列の付加、Somatic Mutationにより、抗体可変領域の多様性は莫大な数となる。本発明により明らかにされたJH2の可変領域遺伝子はこの中から選択された唯一のものである。図中のCDRは、抗原と結合する上で重要な領域である。JH2の場合も、これら6つのCDR領域のアミノ酸がFHVと結合し、中和反応を引き起こしているものと考えられる。中でもH鎖CDR3に見られるAsp Gly Ala Trp Phe Pro PheはJH2特有のアミノ酸配列であることが他の抗体可変領域との相同性比較により明かとなった。

30

【 0 0 1 1 】

従って、H鎖CDR3を中心に他のH、L鎖のCDR領域のアミノ酸がFHV-1との結合および中和反応と密接に関連する部位と考えられ、これはJH2抗体の可変領域遺伝子を単離することにより初めて明かとなった。さらに、JH2のV領域の核酸塩基配列、アミノ酸配列が明らかになったことにより、この配列を基にさらに抗原結合活性を向上させたり、V領域そのものをネコ型化を可能にするものである。そして、この様なアミノ酸配列を持つ抗体もしくはペプチドはFHV-1感染症の治療、診断、予防に用いることが出来ると推察される。

40

【 0 0 1 2 】

すなわち、本発明に従い提供される、FHV-1に対して中和活性を有する抗体のV領域をコードする遺伝子断片とは、下記の特徴を有する遺伝子断片を言う。

【 0 0 1 3 】

50

ネコヘルペスウイルス - 1 (F H V - 1) に対して特異的に反応する抗体 V H またはその一部をコードする遺伝子断片とは、該抗体の C D R 3 をコードする核酸配列部分が、下記のアミノ酸配列をコードする核酸配列であることを特徴とする抗体 V H 遺伝子断片である。

Asp Gly Ala Trp Phe Pro Phe

【 0 0 1 4 】

このような配列をコードする核酸配列を有する好ましい V H 遺伝子断片とは、該抗体の C D R 1 ~ 3 をコードする核酸配列部分が、それぞれ下記のアミノ酸配列をコードする核酸配列である遺伝子断片が挙げられる。

CDR1 : LeuSerThrSerGlyMetGlyAlaGly

CDR2 : HisIleTrpTrpAspAspValLysArgTyrAsnProAlaLeuLysSer

CDR3 : SerGlnIleTyrPheAspTyrAspGlyAlaTrpPheProPhe

【 0 0 1 5 】

さらに、上記 V H 遺伝子断片の好ましい配列の一例としては、配列表 : 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列をコードする核酸配列が挙げられる。その具体的核酸配列とは、例えば、配列表 : 配列番号 1 に記載の核酸配列が挙げられる。

【 0 0 1 6 】

一方、ネコヘルペスウイルス - 1 (F H V - 1) に対して特異的に反応する抗体 V L またはその一部をコードする遺伝子断片とは、該抗体の C D R 1 ~ 3 をコードする核酸配列部分が、それぞれ下記のアミノ酸配列をコードする核酸配列である遺伝子断片が挙げられる。

CDR1 : ArgAlaSerGlnSerIleSerAsnAsnLeuHis

CDR2 : AlaSerGlnSerIleSerGly

CDR3 : GlnGlnSerAsnSerTrpProHisThr

【 0 0 1 7 】

さらに、上記 V L 遺伝子断片の好ましい配列の一例としては、配列表 : 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列をコードする核酸配列が挙げられる。その具体的核酸配列とは、例えば、配列表 : 配列番号 2 に記載の核酸配列が挙げられる。

【 0 0 1 8 】

さて、マウス型抗体 J H 2 を F H V - 1 感染症の治療用として直接ネコに投与することは、有効性の減弱、副作用、半減期の短縮などの点から困難と考えられる。これは抗体そのものがネコにとって異種蛋白であるマウス由来のものであるため、ネコの補体や F c レセプターを有する免疫担当細胞と結合できない可能性があり、その結果 A D C C や C D C を誘導しにくいことが予想される。前述のように F H V 感染症においては、これらの作用がウイルス中和に大きく寄与していることを考えると抗体はネコの F c 領域をもつ必要がある。

【 0 0 1 9 】

さらに、生体内において異種蛋白として免疫原性を惹起すれば、生体より速やかにクリアランスされるため半減期が短縮されたり、血清病などの副作用を引き起こすかも知れない。抗体分子としての免疫原生も F c 領域に集約されているといわれており、このことから F c 領域は同種蛋白であるネコの抗体分子のアミノ酸配列であることが好ましい。そこで本発明者らは、J H 2 の抗体定常領域を、ネコのそれと遺伝子工学的手法を用いて置き換えることにより、ネコ型 J H 2 を作製することに成功した。

【 0 0 2 0 】

このようなネコ型抗体は、本発明により提供される上記抗 F H V - 1 抗体の V H をコードする遺伝子および V L 遺伝子の下流 (3 ' 側) に、ネコ抗体定常領域遺伝子 ; C H 遺伝子および C L 遺伝子を接続することにより該ネコ型抗体すなわち、ネコ型キメラ抗体をコードする抗体 H 鎖および L 鎖の構造遺伝子が構築され、これを適当な動物細胞等で発現されることにより目的の抗 F H V - 1 キメラ抗体が調製される。

【 0 0 2 1 】

10

20

30

40

50

このようなネコ抗体定常領域をコードする遺伝子は、本発明者らが先に見いだしている（特開平3-123488、特開平3-201986および特開平3-72873）。このようなネコ抗体定常領域をコードする遺伝子の核酸配列としては、C Hをコードする遺伝子断片として、配列表：配列番号3に記載のアミノ酸配列をコードする遺伝子断片が挙げられる。その具体的な核酸配列としては、配列表：配列番号3に記載の核酸配列が挙げられる。また、このようなC H遺伝子は、*Escherichia coli* CCG-CB25G；微工研菌寄第11166号（FERM P-11166）として本出願人により寄託されている。また、C をコードする遺伝子として、配列表：配列番号4に記載のアミノ酸配列をコードする遺伝子断片が挙げられる。その具体的な核酸配列としては、配列表：配列番号4に記載の核酸配列が挙げられる。また、このようなC 10
 遺伝子は、*Escherichia coli* FCK-CEK8A；微工研菌寄第10985号（FERM P-10985）として本出願人により寄託されている。さらに、C をコードする遺伝子として、配列表：配列番号5に記載のアミノ酸配列をコードする遺伝子断片が挙げられる。その具体的な核酸配列としては、配列表：配列番号5に記載の核酸配列が挙げられる。また、このようなC 20
 遺伝子は、*Escherichia coli* FCL-T162；微工研菌寄第10942号（FERM P-10942）として本出願人により寄託されている。

【0022】

本発明のF H V - 1に対して中和活性を有する抗体のV領域をコードする遺伝子断片は、上記のようなV領域がマウス由来、C領域がネコ由来の配列からなるキメラ抗体の他に、V領域のフレーム（F R）領域についてもマウス以外の抗体（本発明の場合にはネコ抗体）由来の配列に組換えられた改変抗体の調製にも用いることができる。ネコ抗体の一般的 20
 なV領域F R領域のアミノ酸配列に関しては、未だその全配列に関しては報告されていない。しなしながら、その配列の一部については、既に報告されており（KEHO J.M. et al. Proc. N.A.S. 69, p2052, 1972）、これらおよび、本発明者らが先に見いだしたネコ抗体の定常領域のアミノ酸配列等から適当なプライマーを調製することにより、ネコ抗体V領域をコードする遺伝子をクローニングし、該F R領域のアミノ酸配列を見いだすことも可能であろう。改変抗体の基本的調製法に関しては、公知の技術（例えば、特開昭62-296890号）に従い調製される。この場合に用いられる、本発明の遺伝子断片とは、V H鎖およびV L鎖をコードする一部の遺伝子として、少なくとも下記のアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む遺伝子断片を言う。

Asp Gly Ala Trp Phe Pro Phe 30

【0023】

また、好ましくは、該改変抗体V領域のC D Rをコードする核酸部分として、V H鎖、V L鎖それぞれ下記のアミノ酸をコードする核酸配列が用いられる。

V H鎖；

CDR1：LeuSerThrSerGlyMetGlyAlaGly

CDR2：HisIleTrpTrpAspAspValLysArgTyrAsnProAlaLeuLysSer

CDR3：SerGlnIleTyrPheAspTyrAspGlyAlaTrpPheProPhe

V L鎖；

CDR1：ArgAlaSerGlnSerIleSerAsnAsnLeuHis

CDR2：AlaSerGlnSerIleSerGly 40

CDR3：GlnGlnSerAsnSerTrpProHisThr

【0024】

さらに、本発明者らによれば、上記の様な改変抗体の調製の際には、従来技術に従い、V領域のC D R部分をマウス由来の配列にするよりも、C D Rに隣接するV領域のF R領域の一部についてもC D Rと同様のマウス由来の配列にすることで、本来のマウスモノクローナル抗体の持つ特異性に優れた抗体を調製できることがあることをこれまでに見いだしている。すなわち、V H鎖については図2に記載されているアミノ酸配列を、V L鎖については図3に記載されているアミノ酸配列を参考にすることにより、V領域のF R領域についてもその一部をマウス由来の配列にすることで、C D Rのみをマウス由来の配列にした改変抗体より更に優れた改変抗体を調製できる可能性がある。 50

【 0 0 2 5 】

上記のごとく、本発明の抗 F H V - 1 抗体の可変領域をコードする遺伝子を用いて、キメラ抗体用または改変抗体用の V 領域構造遺伝子を構築し、本発明者らが先に見いだしたネコ抗体定常領域をコードする遺伝子と連結させることにより、ネコ型抗 F H V - 1 組換え抗体、いわゆるキメラ抗体をコードする構造遺伝子が調製される。この遺伝子を適当なプロモーター遺伝子の下流に連結させ公知の技術に従い動物細胞等で発現させることにより得られる本発明の組換え抗体は、マウス型抗体の J H 2 と同じ優れた中和活性を保持していた。さらに F H V 感染ネコへ投与した場合においては、顕著な副作用を呈することなく病状を緩和させた。E.A.Emini等¹はチンパンジーの H I V 感染におけるモノクローナル抗体の感染防御効果を検討した。その結果、ヒト型のキメラ抗体は H I V 感染を防御出来た

10

(E.A.Emini et al. Nature, 355, p728, 1992) が、オリジナルのマウス型抗体は防御出来なかった (E.A.Emini et al. J.Virol., 64, p3674, 1990)。これは、F c 領域依存性の ADC C あるいは CDC 活性を誘導できなかった点、及び消失半減期が短かったことによるものと考えられる。

今回見いだされた F H V 感染ネコにおける F H 2 抗体の有効性も前例同様マウス型の抗体では効果が弱いと考えられ、ネコ型化することによってはじめて認められるものと推察される。

以上のことから本抗 F H V - 1 キメラ抗体 F H 2 は F H V - 1 感染症の治療・予防において、実質的な治療薬となり得るものである。

以下、本発明を実施例に沿って更に詳細に説明する。

20

【 0 0 2 6 】

【実施例】

(1) 抗 F H V - 1 中和モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの作製

F H V - 1 感染 F L 細胞 (ネコ肺細胞) の培養上清を硫酸アンモニウムで沈降させ、透析後、リン酸緩衝液に再懸濁させ BALB/c マウスの腹腔内にフロイントの完全アジュバントとともに免疫した。2週間後、マウスのリンパ球とマウスミエローマ細胞 (P3U1) をポリエチレングリコール法で細胞融合し、ハイブリドーマを作製した。ハイブリドーマの培養上清中のウイルス中和能を指標にクローニングを行い 4 種類の F H V - 1 中和モノクローナル抗体産生細胞を確立した。下記の表 1 は各モノクローナル抗体が 10TCID₅₀ の F H V - 1 を中和するのに必要な抗体の最小有効濃度を示している。これらのモノクローナル抗体のうち

30

J H 2 抗体は最も強力に F H V - 1 - K 1 株を中和した。

【 0 0 2 7 】

【表 1】

抗体名	クラス	最小有効中和濃度 (ug/ml)
J H 2	γ 1 , κ	0. 3 9
J H 3	γ 1 , κ	6. 3
J H 4	γ 1 , κ	1 0 0
J H 7	γ 2 a , κ	6. 3

40

【 0 0 2 8 】

(2) 抗 F H V - 1 抗体 (J H 2) 可変領域遺伝子の単離

1 ~ 0.5 × 10⁷ の細胞 (ハイブリドーマ) から全 R N A を抽出し、Oligo dT カラム (Stratagene 社製、Poly(A) Quik mRNA Purification Kit) によって m R N A を精製した。逆転写酵素 (タカラ社 ; 以下特別にことわりのないかぎり遺伝子操作の試薬はタカラ社製のもの

50

を用いた)により一本鎖cDNAを合成した。

5'側のプライマーとしては抗体のリーダー領域(MHL34,MKL104)の、3'側にはJ領域(MHJ3,MKJ124)の塩基配列を有するオリゴヌクレオチド合成した。下記にその塩基配列を示す。

VH鎖増幅用プライマー

MHL341 : TCTAGAAGCTTGCCGCCACCATGGGCAGACTTACATTCTCATT

MHJ3 : GAAGATCTGGATCCACTCACCTGCAGAGACAGTGA

V鎖増幅用プライマー

MKL104 : GGAATTCAAGCTTGCCGCCACCATGGT(T/A)T(C/T)CTCACCTCAG

MKJ124 : CTAGATCTGGATCCACTTACGTTT(T/G)ATTTC(A/G)CTT

【0029】

cDNA 20ngに50pmoleのプライマーをそれぞれ添加した。94 1分、55 1分、72 1分で30サイクルPCR(Polymerase Chain Reaction)を行い、プライマーによって挟まれた可変領域遺伝子(VH、V)を増殖した。図1は増幅された遺伝子断片のアガロース電気泳動パターンである。遺伝子の大きさはVH(H鎖)約400bp、V(L鎖)約400bpであり期待されたバンドの大きさとほぼ一致した。

【0030】

(3) 塩基配列の決定

1で増幅された各遺伝子断片の塩基配列をジデオキシ法により決定した。VHおよびV遺伝子断片をpUC18にそれぞれクローン化し、ジデオキシ法(USB社製、Sequenase ver.2)により塩基配列を決定した。

【0031】

図2は、JH2抗体のVH遺伝子の塩基およびそれによってコードされるアミノ酸配列を示したものである。オープンリーディングフレーム(ORF)をとりドメイン構造を形成するCysは保存されていたことからこの遺伝子が発現型の遺伝子であることが示された。また、JH3で再配列していることが解った。次に、この遺伝子のコードするアミノ酸配列のホモロジー検索を行なった。検索用ソフトウェアはGENETYX-CD(ソフトウェア社)を用い、Gene Bankのデータベースを検索した。その結果、VHIII/J606ファミリーに属する抗体1から5が相同性の高いVHとして検索された(図4)。図4中の*は、他のVHと相同性のあるアミノ酸を示し、それ以外の領域は、JH2のみに認められたアミノ酸配列である。特に下線で示された部分はこれまでに報告のない新規なアミノ酸配列で、JH2抗体に特徴的な領域である。

【0032】

図3は、JH2抗体のV遺伝子の塩基およびそれによってコードされるアミノ酸配列を示したものである。L鎖と同様にORFをとりドメイン構造を形成するCysは保存されていたことからこの遺伝子が発現型の遺伝子であることが示された。また、J1で再配列していることが解った。図5は、ホモロジー検索の結果を示している。JH2のVの場合も他のVと相同性が認められた。

【0033】

すなわち、VH鎖における下線部で示された部分がJH2抗体特異的な部分であり、抗原結合活性を規定する重要なアミノ酸配列であると推察された。

【0034】

(4) 抗FHV-1キメラ抗体遺伝子の作製

PCRにより増幅された可変領域遺伝子をそれぞれ、ネコ抗体鎖定常領域遺伝子CB25(特開平3-201986)あるいは鎖定領域CEK(特開平3-123488)と連結した。発現用のプロモーターにはニワトリの β -アクチンのプロモーター(特願平1-309785)を、セレクションマーカーにはneo(Southern P.J. J.Mol.Appl.Genet.,1,327,1982)あるいはdhfr遺伝子(Stark,G.R. and Wahl,G.M.,Annu.Rev.Biochem.,53,p447,1984)を用いた。図6および図7は、作製されたキメラ抗体H鎖およびL鎖発現ベクターの制限酵素地図である。

【0035】

(5) 安定形質転換体の作製

10

20

30

40

50

図6及び図7に示したキメラ抗体遺伝子H鎖、L鎖それぞれ10 μ gをPvuIで切断し2x10⁶のマウスミエローマ細胞P3-X63-Ag8-6.5.3.(ATCC・CRL1580)にlipofectin(BRL社製)を用いてco-transfectionし0.25x10⁻⁷Mメトトレキセート(MTX)を含む5%FCS/RPMI1640選択培地で培養し薬剤耐性株(形質転換体)を選別した。培養上清中に発現されるネコIgGを指標にキメラ抗体産性細胞を限界希釈法によってクローン化し発現細胞FH2を確立し、以下の性状解析を行った。

【0036】

(6)抗ネコ抗体との反応

FH2(キメラ抗体発現細胞)およびJH2(マウスモノクローナル抗体発現細胞)の培養上清を抗ネコ抗体(E.Y.LABS.INC)固相化マイクロタイタープレートに加え、室温で1時間反応させた。プレートを洗浄後、HRP-抗ネコ抗体(E.Y.LABS.INC)を室温で1時間反応させた。再びプレートを洗浄後、TMBZで発色させ吸光度450nmを測定し抗ネコ抗体との反応性を調べた(図8)。FH2の培養上清は濃度依存的に抗ネコ抗体と反応したが、マウス抗体を発現しているJH2の培養上清は抗ネコ抗体と反応しなかった。このことからFH2細胞の発現しているキメラ抗体はネコ抗体であることがわかった。

【0037】

(7)キメラ抗体のSDS-PAGEによる同定

培養上清よりキメラ抗体をProteinA(Bio Rad社製、MAPS-II)で精製した。精製キメラ抗体を12.5%SDS-PAGEにかけ、ネコIgG標品(ポリクローナル抗体)と比較した。分子量はBio Rad社製のプレステインドマーカースにより求めた。図9に示されるように、キメラ抗体は還元状態下ではH鎖5万、L鎖2.5万で非還元状態では約15万のところにバンドを検出したことから、H2L2の2量体を形成し、ネコの生体内に存在しているIgGと同じ形をとっていることがわかった。

【0038】

(8)FHV-1ウイルス粒子との反応

次にキメラ抗体の抗原結合活性を調べた。培養上清(FH2及びJH2)をFHV-1-K1(硫安沈澱粗精製品)固相化マイクロタイタープレートに加えた。プレートを洗浄後、HRP-抗ネコ抗体あるいはHRP-抗マウス抗体を反応させた。TMBZで発色させ、FHV-1ウイルス粒子との反応性を調べた。FH2抗体はマウス抗体JH2と同様にFHV-1-K1と特異的に反応した。しかしながら、他のウイルスに特異的な組換えキメラ抗体(同じネコ定常領域と異なるマウス可変領域を持っている抗体)は反応しなかった(図10)。

【0039】

(9)FHV-1ウイルス中和試験

さらにキメラ抗体のFHV-1中和活性を調べた。培養上清(FH2及びJH2)をFHV-1ウイルス100TCID₅₀と4で6時間反応させた。CRFK細胞を0.25x10⁵個加えて37で2日培養した。CPE(Cell Rounding)を観察し、最低有効中和濃度を求めた。下記の表2にその結果をまとめた。その結果、FH2抗体はFHV-1を1.95 μ g/mlで中和することが確認された。

【0040】

【表2】

抗体	最低有効中和濃度 (ug/ml)
キメラ抗体 (FH2)	1.95
マウス抗体 (JH2)	1.25

10

20

30

40

50

【 0 0 4 1 】

(1 0) F H V 強制感染ネコにおける F H 2 の有効性

10⁴TCID₅₀のFHV-1-K1株を1.5-3.0Kgのネコに経鼻より強制感染させた。2日目にFH2を30-10mg/Kgで頸静脈より静脈内投与した。体重、体温、食餌量、飲水量及び元気などの一般臨床症状、さらに、流涙、結膜炎、鼻漏、くしゃみおよび咳などの呼吸器病変を経時的に観察し、無症状0点、軽度の症状を1点、中度2点、重度3点としてスコア化した(図11)。その結果、10及び30mg/kg投与群で病状が緩和され、FH2のFHV感染症に対するin vivoでの有用性が示された。また、FH2投与後に発熱、下痢、嘔吐その他のショック様症状などの副作用は観察されなかった。以上のこのことより、FH2抗体はFHV-1感染症に対して有効かつ副作用のない診断薬、治療薬・予防薬への応用を可能にするものである。

10

【 0 0 4 2 】

【 配 列 表 】

配列番号：1

配列の長さ：429

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列の特徴

10

起源

生物名：マウス

配列

ATG GGC AGA CTT ACA TTC TCA TTC CTG CTA CTG ATT GTC CCT GCA TAT 48

Met Gly Arg Leu Thr Phe Ser Phe Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr

1 5 10 15

GTC CTG TCC CAG GTT ACT CTG AAA GAG TCT GGC CCT GGG ATA TTG CAG 96

Val Leu Ser Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln

20 25 30

CCC TCC CAG ACC CTC AGT CTG ACT TGT TCT TTC TCT GGG TTT TCA CTG 144

Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu

35 40 45

AGC ACT TCT GGT ATG GGT GCA GGC TGG ATT CGT CAG CCA TCA GGG AAG 192

Ser Thr Ser Gly Met Gly Ala Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys

50 55 60

GGT CTG GAG TGG CTG GCA CAC ATT TGG TGG GAT GAT GTC AAG CGC TAT 240

Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Val Lys Arg Tyr

65 70 75 80

AAC CCA GCC CTG AAG AGC CGA CTG ACT ATC TCC AAG GAT ACC TCC AGC 288

Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser

85 90 95

AGC CAG GTA TTC CTC AAG ATC GCC AGC GTG GAC ACT GCA GAT ACT GCC 336

40

Ser	Gln	Val	Phe	Leu	Lys	Ile	Ala	Ser	Val	Asp	Thr	Ala	Asp	Thr	Ala		
		100						105					110				
ACA	TAT	TTT	TGT	GTT	CGA	TCC	CAG	ATC	TAC	TTT	GAT	TAC	GAC	GGG	GCC	384	
Thr	Tyr	Phe	Cys	Val	Arg	Ser	Gln	Ile	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Asp	Gly	Ala		
		115					120					125					
TGG	TTT	CCT	TTC	TGG	GGC	CAA	GGG	ACT	CTG	GTC	ACT	GTC	TCT	GCA	429		
Trp	Phe	Pro	Phe	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala			10
		130					135					140					

[0 0 4 3]

配列番号：2

配列の長さ：381

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列の特徴

10

起源

生物名：マウス

配列

ATG GTA TCC TCA CCT CAG TTC CTT GGA CTT ATG CTT TTT TGG ATT TCA 48

Met Val Ser Thr Ala Gln Phe Leu Gly Leu Met Leu Phe Trp Ile Ser

1 5 10 15

GCC TCC AGA GGT GAT ATT GTG CTA ACT CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT 96

Ala Ser Arg Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser

20 25 30

GTG ACT CCA GGA GAT AGC GTC AGT CTT TCC TGC AGG GCC AGC CAA AGT 144

Val Thr Pro Gly Asp Ser Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser

35 40 45

ATT AGC AAC AAC CTA CAC TGG TAT CAA CAA AAA TCA CAT GAG TCT CCA 192

Ile Ser Asn Asn Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro

50 55 60

AGG CTT CTC ATC AAG TAT GCT TCC CAG TCC ATC TCT GGG ATC CCC TCC 240

Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser

65 70 75 80

AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCA GGG ACA GAT TTC ACT CTC AGT ATC AAC 288

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn

85 90 95

AGT GTG GAG ACT GAA GAT TTT GGA ATG TAT TTC TGT CAA CAG AGT AAC 336

40

Ser	Val	Glu	Thr	Glu	Asp	Phe	Gly	Met	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Ser	Asn	
		100						105					110			
AGC	TGG	CCT	CAC	ACG	TTC	GGT	GCT	GGG	ACC	AAG	CTG	GAG	CTG	AAA		381
Ser	Trp	Pro	His	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys		
		115					120						125			

【 0 0 4 4 】

配列番号：3

配列の長さ：1005

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列の特徴

10

起源

生物名：ネコ

配列

ACC ACG GCC CCA TCG GTG TTC CCA CTG GCC CCC AGC TGC GGG ACC ACA 48

Thr Thr Ala Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly Thr Thr

1 5 10 15

TCT GGC GCC ACC GTG GCC CTG GCC TGC CTG GTG TTA GGC TAC TTC CCT 96

Ser Gly Ala Thr Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Leu Gly Tyr Phe Pro

20 25 30

GAG CCG GTG ACC GTG TCC TGG AAC TCC GGC GCC CTG ACC AGC GGT GTG 144

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val

35 40 45

CAC ACC TTC CCG GCC GTC CTG CAG GCC TCG GGG CTG TAC TCT CTC AGC 192

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ala Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser

50 55 60

AGC ATG GTG ACA GTG CCC TCC AGC AGG TGG CTC AGT GAC ACC TTC ACC 240

Ser Met Val Thr Val Pro Ser Ser Arg Trp Leu Ser Asp Thr Phe Thr

65 70 75 80

TGC AAC GTG GCC CAC CCG CCC AGC AAC ACC AAG GTG GAC AAG ACC GTG 288

Cys Asn Val Ala His Pro Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val

85 90 95

CGC AAA ACA GAC CAC CCA CCG GGA CCC AAA CCC TGC GAC TGT CCC AAA 336

40

Arg Lys Thr Asp His Pro Pro Gly Pro Lys Pro Cys Asp Cys Pro Lys		
100	105	110
TGC CCA CCC CCT GAG ATG CTT GGA GGA CCG TCC ATC TTC ATC TTC CCC	384	
Cys Pro Pro Pro Glu Met Leu Gly Gly Pro Ser Ile Phe Ile Phe Pro		
115	120	125
CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC TCG ATT TCC CGG ACG CCC GAG GTC ACA	432	
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Ser Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr		10
130	135	140
TGC TTG GTG GTG GAC TTG GGC CCA GAT GAC TCC GAT GTC CAG ATC ACA	480	
Cys Leu Val Val Asp Leu Gly Pro Asp Asp Ser Asp Val Gln Ile Thr		
145	150	155
TGG TTT GTG GAT AAC ACC CAG GTG TAC ACA GCC AAG ACG AGT CCG CGT	528	
Trp Phe Val Asp Asn Thr Gln Val Tyr Thr Ala Lys Thr Ser Pro Arg		
165	170	175
GAG GAG CAG TTC AAC AGC ACC TAC CGT GTG GTC AGT GTC CTC CCC ATC	576	
Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile		
180	185	190
CTA CAC CAG GAC TGG CTC AAG GGG AAG GAG TTC AAG TGC AAG GTC AAC	624	
Leu His Gln Asp Trp Leu Lys Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn		
195	200	205
AGC AAA TCC CTC CCC TCC CCC ATC GAG AGG ACC ATC TCC AAG GCC AAA	672	
Ser Lys Ser Leu Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Ala Lys		30
210	215	220
GGA CAG CCC CAC GAG CCC CAG GTG TAC GTC CTG CCT CCA GCC CAG GAG	720	
Gly Gln Pro His Glu Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Ala Gln Glu		
225	230	235
GAG CTC AGC AGG AAC AAA GTC AGT GTG ACC TGC CTG ATC AAA AGC TTC	768	
Glu Leu Ser Arg Asn Lys Val Ser Val Thr Cys Leu Ile Lys Ser Phe		40
245	250	255

CAC CCG CCT GAC ATT GCC GTC GAG TGG GAG ATC ACC GGA CAG CCG GAG	816	
His Pro Pro Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ile Thr Gly Gln Pro Glu		
260	265	270
CCA GAG AAC AAC TAC CGG ACG ACC CCG CCC CAG CTG GAC AGC GAC GGG	864	
Pro Glu Asn Asn Tyr Arg Thr Thr Pro Pro Gln Leu Asp Ser Asp Gly		
275	280	285
ACC TAC TTC GTG TAC AGC AAG CTC TCG GTG GAC AGG TCC CAC TGG CAG	912	10
Thr Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Ser Val Asp Arg Ser His Trp Gln		
290	295	300
AGG GGA AAC ACC TAC ACC TGC TCG GTG TCA CAC GAA GCT CTG CAC AGC	960	
Arg Gly Asn Thr Tyr Thr Cys Ser Val Ser His Glu Ala Leu His Ser		
305	310	315
CAC CAC ACA CAG AAA TCC CTC ACC CAG TCT CCG GGT AAA TGAGCA	1005	
His His Thr Gln Lys Ser Leu Thr Gln Ser Pro Gly Lys		20
325	330	

[0 0 4 5]

配列番号：4

配列の長さ：337

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

配列の特徴

10

起源

生物名：ネコ

配列

AGT GAT GCT CAG CCA TCT GTC TTT CTC TTC CAA CCA TCT CTG GAC GAG 48

Ser Asp Ala Gln Pro Ser Val Phe Leu Phe Gln Pro Ser Leu Asp Glu

1 5 10 15

TTA CAT ACA GGA AGT GCC TCT ATC GTG TGC ATA TTG AAT GAC TTC TAC 96

Leu His Thr Gly Ser Ala Ser Ile Val Cys Ile Leu Asn Asp Phe Tyr

20 25 30

CCC AAA GAG GTC AAT GTC AAG TGG AAA GTG GAT GGC GTA GTC CAA ACA 144

Pro Lys Glu Val Asn Val Lys Trp Lys Val Asp Gly Val Val Gln Thr

35 40 45

AAG GCA TCC AAG GAG AGC ACC ACA GAG CAG AAC AGC AAG GAC AGC ACC 192

Lys Ala Ser Lys Glu Ser Thr Thr Glu Gln Asn Ser Lys Asp Ser Thr

50 55 60

TAC AGC CTC AGC AGC ACC CTG ACG ATG TCC AGG ACG GAG TAC CAA AGT 240

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Met Ser Arg Thr Glu Tyr Gln Ser

65 70 75 80

CAT GAA AAG TTC TCC TGC GAG GTC ACT CAC AAG AGC CTG GCC TCC ACC 288

His Glu Lys Phe Ser Cys Glu Val Thr His Lys Ser Leu Ala Ser Thr

85 90 95

CTC GTC AAG AGC TTC AAC AGG AGC GAG TGT CAG AGA GAG TAGCCTAGCA 337

Leu Val Lys Ser Phe Asn Arg Ser Glu Cys Gln Arg Glu

100 105

[0 0 4 6]

20

30

40

配列番号：5

配列の長さ：318

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列の特徴

10

起源

生物名：ネコ

配列

CAG CCC AAG TCG GCC CCC TCG GTC ACA CTC TTC CCA CCC TCC AGT GAG 48

Gln Pro Lys Ser Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu

1 5 10 15

GAG CTC AGC GCA AAC AAG GCC ACC CTG GTG TGT CTC GTC AGT GAC TTC 96 20

Glu Leu Ser Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Val Ser Asp Phe

20 25 30

TAC CCC AGC GGC TTG ACG GTG GCC TGG AAG GAA GAT GGC ACC CCC ATC 144

Tyr Pro Ser Gly Leu Thr Val Ala Trp Lys Glu Asp Gly Thr Pro Ile

35 40 45

ACC AAG GGC GTG GAG ACC ACC AAG CCC TCC AGA CAG AGC AAC AAC AAG 192

Thr Lys Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Arg Gln Ser Asn Asn Lys 30

50 55 60

TAC GCG GCC AGC AGC TAC CTG AGC CTG TCA CCG AAC GAG TGG AAA TCT 240

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Ser Pro Asn Glu Trp Lys Ser

65 70 75 80

CAC AGC AGA TAC ACC TGC CAG GTC ACG CAC GAG GGG AGC ACT GTG GAG 288

His Ser Arg Tyr Thr Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu

85 90 95 40

AAG AGT GTG GTC CCT GCA GAG TGC CCT TAG 318

Lys Ser Val Val Pro Ala Glu Cys Pro

100 105

【図面の簡単な説明】

【図1】PCRによって増幅された抗FHV-1抗体JH2のVH、V_H遺伝子のアガロースゲル電気泳動結果を示す模式図である。

50

【図2】実施例(3)で得たVH遺伝子の塩基配列及びそれによってコードされるアミノ酸配列を示す。

【図3】実施例(4)で得たV_H遺伝子の塩基配列及びそれによってコードされるアミノ酸配列を示す。

【図4】JH2と他の抗体のVH領域のアミノ酸レベルでの相同性比較を行った結果を示す。

【図5】JH2と他の抗体のV_H領域のアミノ酸レベルでの相同性比較を行った結果を示す。

【図6】抗FHV-1キメラ抗体H鎖発現ベクターの制限酵素地図を示す。

【図7】抗FHV-1キメラ抗体L鎖発現ベクターの制限酵素地図を示す。

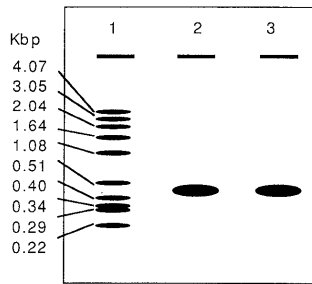
【図8】抗ネコ抗体に対する本発明のキメラ抗体の反応性を示したものである。

【図9】本発明のキメラ抗体のSDS-PAGEの泳動結果を示す模式図である。

【図10】FHV-1に対する本発明のキメラ抗体の結合性を示したものである。

【図11】FHV-1 K1株を強制感染させたネコに対する本発明のキメラ抗体の有効性を示したものである。

【図1】



- 1. 分子量マーカー
- 2. 抗FHV H鎖遺伝子
- 3. 抗FHV L鎖遺伝子

【図2】

TCTAGAAGCTTGGCCGACC
HindIII

60
| リーダー | FR1
MetGlyArgLeuThrPheSerPheLeuLeuLeuIleValProAlaTyrValLeuSerGln
ATGGGCAGACTTACATTCTCATTCTGCTACTGATTGTCCCTGCATATGCTCTGCCAG
(MHL341)

FR1 120

ValThrLeuLysGluSerGlyProGlyIleLeuGlnProSerGlnThrLeuSerLeuThr
GTTACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGGATATTGCAGCCCTCCAGACCTCAGTCTGACT

FR1 | CDR1 | FR2 180

CysSerPheSerGlyPheSerLeuSerThrSerGlyMetGlyAlaGlyTrpIleArgGln
TGTTCTTCTCTGGGTTTTCACTGAGCACTTCTGGTATGGGTGACGGCTGGATTCTGTCAG

FR2 | CDR2 240

ProSerGlyLysGlyLeuGluTrpLeuAlaHisIleTrpTrpAspAspValLysArgTyr
CCATCAGGGAAGGGTCTGGAGTGGCTGGCACACATTGTTGGGATGATGTCAAGCGCTAT

CDR2 | FR3 300

AsnProAlaLeuLysSerArgLeuThrIleSerLysAspThrSerSerSerGlnValPhe
AACCAGCCCTGAAGAGCCGACTGACTATCTCCAAGGATACCTCCAGCAGCCAGGTATTCT

FR3 | CDR3 360

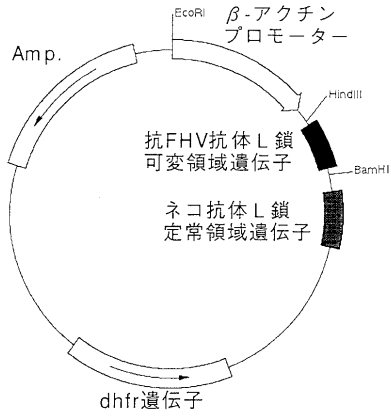
LeuLysIleAlaSerValAspThrAlaAspThrAlaThrTyrPheCysValArgSerGln
CTCAAGATCGCCAGCGTGGACACTGCAGATACTGCCACATATTTTGTGTTGATCCCGAC

CDR3 | FR4 420

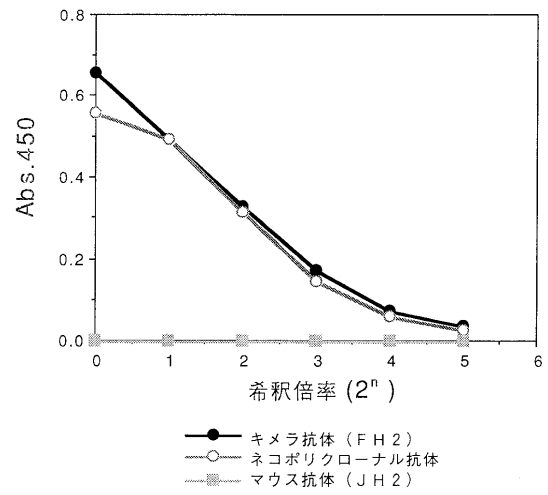
IleTyrPheAspTyrAspGlyAlaTrpPheProPheTrpGlyGlnGlyThrLeuValThr
ATCTACTTTGATTACGACGGGGCTGGTTTCCTTTCTGGGGCCAAGGACTCTGGTCACT

ValSerAla
GTCTCTGCAGGTGAGTGGATCC
(MJH3) BamHI

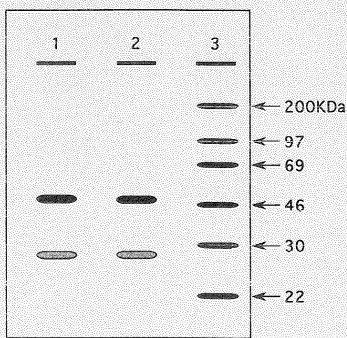
【 図 7 】



【 図 8 】

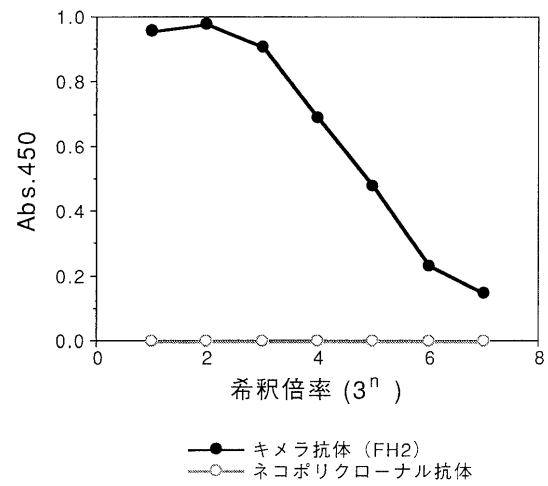


【 図 9 】

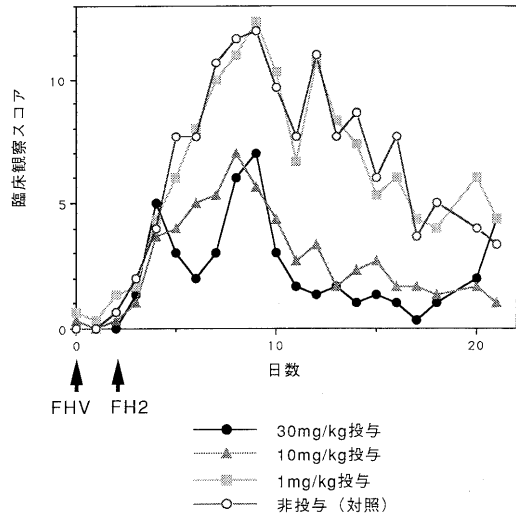


- 1. 抗FHVキメラ抗体 (FH2)
- 2. ネコポリクローナル IgG
- 3. 分子量マーカー

【 図 10 】



【 図 1 1 】



フロントページの続き

合議体

審判長 種村 慈樹

審判官 八原 由美子

審判官 高堀 栄二

(56)参考文献 特開平3 - 201986 (JP, A)

特開平3 - 123488 (JP, A)

Arch. Virol., Vol. 111, p. 127 - 132 (1990)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12P 21/08

C12N 15/13

SwissProt/PIR/GeneSeq

MEDLINE (STN)