(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2006-347922
(P2006-347922A)
(43)公開日　平成18年12月28日(2006.12.28)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
C07K 16/10	(2006.01)	C07K 16/10	ZNA	4B050
C12N 9/50	(2006.01)	C12N 9/50		4B064
C12P 21/08	(2006.01)	C12P 21/08		4H045

審査請求 未請求　請求項の数 6　ＯＬ　（全 30 頁）

(21)出願番号　特願2005-174161 (P2005-174161)
(22)出願日　平成17年6月14日 (2005.6.14)

(71)出願人　591079487
広島県
広島県広島市中区基町１０番５２号
(74)代理人　110000338
特許業務法人原謙三国際特許事務所
(72)発明者　宇田　泰三
広島県三次市十日市東３丁目１３－１６－９０２
(72)発明者　一二三　恵美
広島県庄原市三日市町２０－１７　県大教員公舎１－１０２
(72)発明者　高尾　信一
広島県広島市南区翠２丁目１２－１７

Ｆターム(参考) 4B050 CC03 DD01 FF04E FF14E LL01

最終頁に続く

(54)【発明の名称】インフルエンザウイルスのヘマグルチニンに対する抗体酵素

(57)【要約】
【課題】　インフルエンザウイルスの連続変異や不連続変異に関わらず、表面糖蛋白ヘマグルチニンを認識するとともに、該ヘマグルチニンを切断および／または分解することができる抗体酵素を提供する。
【解決手段】　ヘマグルチニンＨＡ１の高度保存領域に存在するアミノ酸配列、および／またはヘマグルチニンＨＡ２の高度保存領域に存在するアミノ酸配列を含む抗原ペプチドを抗原として作製された抗体またはその断片は、表面糖蛋白ヘマグルチニンを認識するとともに、該ヘマグルチニンを切断および／または分解することができる抗体酵素である。
【選択図】　なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ヘマグルチニンを有するインフルエンザウイルスに対する抗体であって、ヘマグルチニンを認識し、且つ、当該ヘマグルチニンを分解する活性を有することを特徴とする抗体酵素、またはその可変領域を含む抗体酵素の断片。
【請求項２】
ヘマグルチニンＨＡ１の高度保存領域に存在する配列番号１に示すアミノ酸配列、および／またはヘマグルチニンＨＡ２の高度保存領域に存在する配列番号２に示すアミノ酸配列を認識することを特徴とする請求項１に記載の抗体酵素、またはその可変領域を含む抗体酵素の断片。
【請求項３】
ヘマグルチニンＨＡ１の高度保存領域に存在する配列番号１に示すアミノ酸配列、および／またはヘマグルチニンＨＡ２の高度保存領域に存在する配列番号２に示すアミノ酸配列を含む抗原ペプチドを抗原として作製されたことを特徴とする請求項１または２に記載の抗体酵素、またはその可変領域を含む抗体酵素の断片。
【請求項４】
抗原として用いられる上記抗原ペプチドは、配列番号３に示すアミノ酸配列からなるペプチドをタンパク質と共有結合させてなることを特徴とする請求項３に記載の抗体酵素、またはその可変領域を含む抗体酵素の断片。
【請求項５】
重鎖可変領域が、配列番号４に示すアミノ酸配列、又は、配列番号４に示されるアミノ酸配列において、１または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加されたアミノ酸配列からなり、
軽鎖可変領域が、配列番号５に示すアミノ酸配列、又は、配列番号５に示されるアミノ酸配列において、１または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加されたアミノ酸配列からなることを特徴とする請求項１ないし４のいずれか１項に記載の抗体酵素、またはその可変領域を含む抗体酵素の断片。
【請求項６】
重鎖可変領域が、配列番号６に示すアミノ酸配列、又は、配列番号６に示されるアミノ酸配列において、１または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加されたアミノ酸配列からなり、
軽鎖可変領域が、配列番号７に示すアミノ酸配列、又は、配列番号７に示されるアミノ酸配列において、１または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加されたアミノ酸配列からなることを特徴とする請求項１ないし４のいずれか１項に記載の抗体酵素、またはその可変領域を含む抗体酵素の断片。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、インフルエンザウイルスのヘマグルチニンに対する抗体酵素に関するものである。
【背景技術】
【０００２】
インフルエンザウイルスはコア蛋白質（核蛋白（ＮＰ蛋白）および膜蛋白（Ｍ１蛋白））の抗原性に基づき分類される。１９４０年にインフルエンザウイルスではあるが、それまでのウイルスとは抗原的に全く異なったウイルスが分離され、それまでのウイルスをＡ型とし、新しいウイルスをＢ型とした。以後さらに新しいウイルスが分類された場合には、Ｃ、Ｄ、Ｅ・・・型とすることになった。１９４９年にTaylorによってＣ型インフルエンザウイルスが発見され、現在では、インフルエンザＡ、ＢおよびＣの３つの型があることが明らかになっている。
【０００３】

Ａ型インフルエンザウイルスは、さらに、ウイルス粒子の２種類の表面糖蛋白であるヘマグルチニン（Hemagglutinin（ＨＡ）、以下、適宜ＨＡと略記する。）とノイラミニダーゼ（Neuraminidase（ＮＡ）、以下、適宜ＮＡと略記する。）との抗原性に基づいて、ＨＡでＨ１～Ｈ１５、ＮＡでＮ１～Ｎ９の亜型に分類される。ＨＡは、ヒト等の細胞に吸着・侵入する際に細胞表面にあるシアル酸と結合して、インフルエンザウイルス粒子が細胞内に取り込まれるときの重要な役割を果たしている。一方、ＮＡは、ウイルス粒子が感染後期に細胞表面から離れる際にシアル酸を切断する働きを有し、感染性を獲得するのに役だっている。ＨＡについては、１９９３年以降ヒトで３種類、ブタで２種類、ウマで２種類、水禽で１５種類の亜型が同定されてきた。Ｂ型インフルエンザウイルスはＡ型インフルエンザウイルスと同様の表面糖蛋白を持つが１つの亜型しかない。また、Ｃ型インフルエンザウイルスはヘマグルチニンエステラーゼ（ＨＥ）のみを持っている。Ｂ型インフルエンザウイルスはヒトのみに、Ｃ型インフルエンザウイルスはヒトとブタのみに流行してきた。

【０００４】

Ａ型インフルエンザおよびＢ型インフルエンザのウイルスは、規模に大小はあるが、ほとんど毎年流行をくり返している。その抗原構造は多少とも異なっており、この抗原構造のずれが流行の原因になっている。抗原変異は、ウイルス粒子の表面蛋白質であるヘマグルチニン（ＨＡ）とノイラミニダーゼ（ＮＡ）でみられ、不連続変異(antigenic shift)と連続変異(antigenic drift)の２種類がある。不連続変異とは、２種類の異なった系統によって感染した細胞が、ＲＮＡゲノム成分の各種組換えによって新しい血清型を突如出現する機構のことをいい、Ａ型インフルエンザウイルスのみでみられる。不連続変異はしばしば大流行の原因となっている。これまでにヒトでは１９１８年にスペイン風邪（Ｈ１Ｎ１）、１９５７年にアジア風邪（Ｈ２Ｎ２）、１９６８年にホンコン風邪（Ｈ３Ｎ２）、１９７７年にロシア風邪（Ｈ１Ｎ１）と世界的に大流行を繰り返している。連続変異とは、Ａ、Ｂ、Ｃ型インフルエンザウイルスに観測されているもので、ゲノムＲＮＡ分節の交換ではなく、同じゲノムを維持しているが、ＨＡ、ＮＡ遺伝子の突然変異の結果起こる機構である。Ａ型ウイルスの起源は単一であり、そこから不連続変異、連続変異により新型ウイルスが発生・流行し、他の株にとって代わるという単一系統様式を示す。ところがＣ型ウイルスはいろいろなウイルス株が同時に流行すると言う多系統様式を示す。Ｂ型はＡ型とＣ型の中間の様式を示す。

【０００５】

このような、ヘマグルチニン（ＨＡ）やノイラミニダーゼ（ＮＡ）の変異のため、現在使われているＨＡワクチンでは、抗原型に適合したワクチンの生産が難しく、予防効果が問題となっている。

【０００６】

かかる問題を解決する技術として、ＨＡ分子のサブタイプに共通で、抗原変異の生じ難い抗原部位を認識する抗体についての報告がなされている（例えば、特許文献１等参照。）。特許文献１では、インフルエンザウイルスＨ１Ｎ１やＨ２Ｎ２を抗原として作製された抗体であって、ヘマグルチニン分子中のポリペプチド配列TGLRNとGITNKVNSVIEKとを認識する抗体が開示されている。

【特許文献１】特開平６－１００５９４号公報（平成６年４月１２日公開）

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【０００７】

しかし、抗原変異がみられるヘマグルチニン（ＨＡ）に変異することなく高度に保存されている領域（高度保存領域）を認識しウイルスの中和活性を有する抗体としての機能だけでなく、ＨＡを切断および／または分解することができる酵素としての機能もあわせ持つ抗体酵素を得ることができれば、毎年起こる抗原変異にもかかわらず、該抗体酵素によってＨＡを認識するとともに、認識したＨＡを切断および／または分解することができる。すなわち、１分子で１つ（あるいは２つ）のＨＡ分子に結合する抗体に比べ、抗体酵素

は１分子で次から次にＨＡ分子を破壊することができる。それゆえ、かかる抗体酵素を得ることができればインフルエンザウイルスの感染能力を破壊することができ、インフルエンザの予防・治療に寄与することが期待できる。

【０００８】

本発明は、上記の問題点に鑑みてなされたものであり、その目的は、インフルエンザウイルスの連続変異や不連続変異にもかかわらず、表面糖蛋白ヘマグルチニンを認識するとともに、該ヘマグルチニンを切断および／または分解することができる抗体酵素を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【０００９】

本願発明者等は、上記課題を解決するために、インフルエンザウイルスのＨ１型とＨ２型間で保存されているヘマグルチニンのＨＡ１セグメント（以下、適宜ＨＡ１と略記する。）の高度保存領域TGLRN（３１８～３２２）、および、同様に保存されているヘマグルチニンのＨＡ２セグメント（以下、適宜ＨＡ２と略記する。）の高度保存領域GITNKVNSVIEK（４７～５８）に着目し抗体酵素を得るために鋭意検討した。その結果、これらの高度保存領域TGLRNとGITNKVNSVIEKとを含む抗原ペプチドを免疫抗原に用いて得られた抗体の中に、表面糖蛋白ヘマグルチニンを認識し、且つ、当該ヘマグルチニンを切断および／または分解することができる抗体酵素としての機能を発揮するものが存在することを見出し、本発明を完成させるに至った。

【００１０】

本発明にかかる抗体酵素は、上記課題を解決するために、ヘマグルチニンを有するインフルエンザウイルスに対する抗体であって、ヘマグルチニンを認識し、且つ、当該ヘマグルチニンを分解する活性を有することを特徴としている。

【００１１】

上記抗体酵素は、ヘマグルチニンＨＡ１の高度保存領域に存在する配列番号１に示すアミノ酸配列、および／またはヘマグルチニンＨＡ２の高度保存領域に存在する配列番号２に示すアミノ酸配列を認識する抗体酵素であることが好ましい。

【００１２】

また、上記抗体酵素は、ヘマグルチニンＨＡ１の高度保存領域に存在する配列番号１に示すアミノ酸配列、および／またはヘマグルチニンＨＡ２の高度保存領域に存在する配列番号２に示すアミノ酸配列を含む抗原ペプチドを抗原として作製された抗体酵素であることが好ましい。ここで、上記抗原として用いられる上記抗原ペプチドは、配列番号３に示すアミノ酸配列からなるペプチドをタンパク質と共有結合させてなるものであってもよい。

【００１３】

また、上記抗体酵素は、例えば、重鎖可変領域が、配列番号４に示すアミノ酸配列、又は、配列番号４に示されるアミノ酸配列において、１または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加されたアミノ酸配列からなり、軽鎖可変領域が、配列番号５に示すアミノ酸配列、又は、配列番号５に示されるアミノ酸配列において、１または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加されたアミノ酸配列からなっている。

【００１４】

また、上記抗体酵素は、重鎖可変領域が、配列番号６に示すアミノ酸配列、又は、配列番号６に示されるアミノ酸配列において、１または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加されたアミノ酸配列からなり、軽鎖可変領域が、配列番号７に示すアミノ酸配列、又は、配列番号７に示されるアミノ酸配列において、１または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加されたアミノ酸配列からなっていてもよい。

【００１５】

また、本発明には上記抗体酵素の可変領域を含む抗体酵素の断片も含まれる。

【発明の効果】

【００１６】
本発明にかかる抗体酵素は、以上のように、ヘマグルチニンを有するインフルエンザウイルスに対する抗体であって、ヘマグルチニンを認識し、且つ、当該ヘマグルチニンを分解する活性を有するという構成を備えているので、インフルエンザウイルスの連続変異や不連続変異にもかかわらず、表面糖蛋白ヘマグルチニンを認識するとともに、該ヘマグルチニンを切断および／または分解することができる。それゆえ、本発明にかかる抗体酵素は、ヘマグルチニンを有するインフルエンザウイルスの感染の予防・治療に寄与することが期待できる。
【発明を実施するための最良の形態】
【００１７】
本発明について以下により具体的に説明するが、本発明はこの記載に限定されるものではない。
【００１８】
（Ｉ）本発明にかかる抗体酵素
本発明にかかる抗体酵素は、ヘマグルチニンを有するインフルエンザウイルスに対する抗体であって、ヘマグルチニンを認識し、且つ、当該ヘマグルチニンを分解する活性を有する抗体酵素であればよい。
【００１９】
ここで、ヘマグルチニンを有するインフルエンザウイルスに対する抗体は、これらのインフルエンザウイルスに対するポリクロナール抗体であってもよいが、これらのインフルエンザウイルスに対するモノクロナール抗体であることがより好ましい。これにより、特異性に優れた抗体を選択することが可能となる。また、上記抗体は、ヘマグルチニンを認識する。したがって、上記抗体は、インフルエンザウイルスのヘマグルチニンに対する抗体であるということもできる。
【００２０】
また、ここで、本発明の抗体酵素が認識するインフルエンザウイルスは、表面糖蛋白として、ヘマグルチニンを有するものであれば特に限定されるものではないが、例えば、インフルエンザウイルスＨ１型、Ｈ２型、Ｈ３型等を挙げることができる。この中でも、インフルエンザウイルスＨ１型、Ｈ２型であることがより好ましい。かかるインフルエンザウイルスＨ１型としては、例えば（Ｈ１Ｎ１）等を挙げることができ、インフルエンザウイルスＨ２型としては、例えば（Ｈ２Ｎ２）等を挙げることができる。また、本発明の抗体酵素は、抗原変異がみられるヘマグルチニン（ＨＡ）に変異することなく高度に保存されている領域（高度保存領域）を認識することができるため、現在存在する（Ｈ１Ｎ１）、（Ｈ２Ｎ２）等のＡ型インフルエンザウイルスに限らず、今後連続変異や不連続変異により、変異したＨ１型やＨ２型インフルエンザウイルスも認識することができる。
【００２１】
本発明にかかる抗体酵素は、ヘマグルチニンを認識し、且つ、当該ヘマグルチニンを分解する活性を有する。すなわち、本発明にかかる抗体酵素はヘマグルチニンを特異的に認識する抗体としての性質と、認識したヘマグルチニンを切断および／または分解する酵素としての性質を併せ持つ。ここで、上記「抗体酵素」とは、抗体でありながら酵素作用を有するものであり、その抗原タンパク質を標的として分解活性を示すものをいう。それゆえ、本発明の抗体酵素は、毎年起こる抗原変異にもかかわらず、該抗体酵素によってＨＡを認識するとともに、認識したＨＡを切断および／または分解することができる。すなわち、１分子で１つ（あるいは２つ）のＨＡ分子に結合する抗体に比べ、抗体酵素は１分子で次から次にＨＡ分子を破壊することができる。したがって、その効果は通常の抗体の数百倍あるいは数千倍に達する。それゆえ、かかる抗体酵素を得ることができればインフルエンザウイルスの感染能力を破壊することができ、インフルエンザの予防・治療に寄与することが期待できる。また、酵素であるため、酵素センサの構築が可能であり、抗体よりも応用範囲が広い。なお、本発明にかかる抗体酵素の酵素活性は、認識するヘマグルチニン以外に加えて、他のタイプのＨＡタンパク質をも切断および／または分解するものであ

ってもよい。

【００２２】

本発明の抗体酵素は、ヘマグルチニンを認識するものであればよいが、ヘマグルチニンＨＡ１の高度保存領域に存在するアミノ酸配列および／またはヘマグルチニンＨＡ２の高度保存領域に存在するアミノ酸配列を認識するものであることが好ましい。ここで、ヘマグルチニンＨＡ１の高度保存領域に存在するアミノ酸配列とは、ＨＡ１中で連続変異や不連続変異により変異することなく高度に保存されている領域であれば特に限定されるものではないが、例えば配列番号１に示すアミノ酸配列を挙げることができる。配列番号１に示すアミノ酸配列は、ヘマグルチニンＨＡ１の高度保存領域TGLRN（３１８～３２２）のアミノ酸配列である。また、ヘマグルチニンＨＡ２の高度保存領域に存在するアミノ酸配列も、ＨＡ２中で連続変異や不連続変異により変異することなく高度に保存されている領域であれば特に限定されるものではないが、例えば配列番号２に示すアミノ酸配列を挙げることができる。配列番号２に示すアミノ酸配列は、ヘマグルチニンＨＡ２の高度保存領域GITNKVNSVIEK（４７～５８）のアミノ酸配列である。

【００２３】

また、本発明の抗体酵素は、ヘマグルチニンＨＡ１の高度保存領域に存在するアミノ酸配列および／またはヘマグルチニンＨＡ２の高度保存領域に存在するアミノ酸配列を含む抗原ペプチドを抗原として作製されたものであることが好ましい。

【００２４】

すなわち、ヘマグルチニンＨＡ１またはその高度保存領域を認識し、且つ、当該ヘマグルチニンＨＡ１を含むヘマグルチニンを分解する活性を有する抗体酵素は、ＨＡ１の高度保存領域に存在するアミノ酸配列を含む抗原ペプチドを抗原として作製されたものであることが好ましい。かかる抗原ペプチドは、ＨＡ１の高度保存領域に存在するアミノ酸配列からなるペプチドであってもよいし、ＨＡ１の高度保存領域に存在するアミノ酸配列に他のアミノ酸配列を結合したペプチドであってもよいし、ＨＡ１の高度保存領域に存在するアミノ酸配列に他のタンパク質を結合したものであってもよい。

【００２５】

また、ヘマグルチニンＨＡ２またはその高度保存領域を認識し、且つ、当該ヘマグルチニンＨＡ２を含むヘマグルチニンを分解する活性を有する抗体酵素は、ＨＡ２の高度保存領域に存在するアミノ酸配列を含む抗原ペプチドを抗原として作製されたものであることが好ましい。かかる抗原ペプチドは、ＨＡ２の高度保存領域に存在するアミノ酸配列からなるペプチドであってもよいし、ＨＡ２の高度保存領域に存在するアミノ酸配列に他のアミノ酸配列を結合したペプチドであってもよいし、ＨＡ２の高度保存領域に存在するアミノ酸配列に他のタンパク質を結合したものであってもよい。

【００２６】

また、ヘマグルチニンＨＡ１およびＨＡ２またはそれらの高度保存領域を認識し、且つ、当該ヘマグルチニンＨＡ１およびＨＡ２を含むヘマグルチニンを分解する活性を有する抗体酵素は、ＨＡ１の高度保存領域に存在するアミノ酸配列およびＨＡ２の高度保存領域に存在するアミノ酸配列を含む抗原ペプチドを抗原として作製されたものであることが好ましい。かかる抗原ペプチドは、ヘマグルチニンＨＡ１の高度保存領域に存在するアミノ酸配列とＨＡ２の高度保存領域に存在するアミノ酸配列とを結合した融合ペプチドであってもよいし、かかる融合ペプチドに他のアミノ酸配列を結合したペプチドであってもよいし、かかる融合ペプチドに他のタンパク質を結合したものであってもよい。また、ここで、ヘマグルチニンＨＡ１の高度保存領域に存在するアミノ酸配列とＨＡ２の高度保存領域に存在するアミノ酸配列とを結合する順は特に限定されるものではなく、どちらがＣ末端側であってもよい。

【００２７】

ここで、ヘマグルチニンＨＡ１の高度保存領域に存在するアミノ酸配列とは、連続変異や不連続変異により変異することなく高度に保存されている領域であれば特に限定されるものではないが、例えば配列番号１に示すアミノ酸配列を挙げることができる。また、ヘ

マグルチニンＨＡ２の高度保存領域に存在するアミノ酸配列も、連続変異や不連続変異により変異することなく高度に保存されている領域であれば特に限定されるものではないが、例えば配列番号２に示すアミノ酸配列を挙げることができる。また、上記「他のアミノ酸配列」としても特に限定されるものではないが、例えば、アラニン２分子（AA）等を挙げることができる。AAを、Ｃ末端に付加することにより、自然のヘマグルチニンのヘリックス構造に近い構造をとらせることが可能となる。また、上記「他のアミノ酸配列」は免疫応答を向上させるための例えば２ないし３のアミノ酸からなるアミノ酸配列であってもよい。これらの「他のアミノ酸配列」を付加する位置は、特に限定されるものではなく、ヘマグルチニンＨＡ１の高度保存領域に存在するアミノ酸配列および／またはヘマグルチニンＨＡ２の高度保存領域に存在するアミノ酸配列のＮ末端に付加してもよいし、Ｃ末端に付加してもよい。

【００２８】

また、上記「他のタンパク質」としても、通常低分子に結合させて抗原とするために用いることができるタンパク質であれば特に限定されるものではないが、例えば、Human IgG、ＢＳＡ（ウシ血清アルブミン）、ＨＳＡ（ヒト血清アルブミン）、ＫＬＨ（キーホールリンペットヘモシニアン）等を挙げることができる。上記抗原ペプチドとしては、上述した種々の抗原ペプチドを用いることができるが、例えば、好ましい一例としては、配列番号３に示すアミノ酸配列からなるペプチドを上記他のタンパク質と共有結合させた抗原ペプチドを挙げることができる。配列番号３に示すアミノ酸配列からなるペプチドは、インフルエンザウイルスのヘマグルチニンＨＡ１の高度保存領域TGLRN（３１８～３２２）に、インフルエンザウイルスのヘマグルチニンＨＡ２の高度保存領域GITNKVNSVIEK（４７～５８）をつなぎ、さらにAAをつないだ１９ｍｅｒのペプチド（TGLRNGITNKVNSVIEKAA）である。

【００２９】

本発明の抗体酵素は、ヘマグルチニンを有するインフルエンザウイルスに対する抗体である。

【００３０】

ここで、上記抗体としては、その構造や由来は特に限定されるものではない。したがって、上記抗体は、細胞融合によって得られたマウス等のモノクロナール抗体であってもよいし、遺伝子組換え技術を用いて大腸菌、動物細胞等で生産される抗体であってもよいし、ヘマグルチニンを有するインフルエンザウイルスに対する抗体の可変領域を、ヒトその他の動物の抗体に移植したヒト化抗体等のキメラ抗体であってもよい。

【００３１】

本発明の抗体酵素は、上述した抗体酵素であれば特に限定されるものではないが、具体的な一例としては、例えば、重鎖可変領域が、配列番号４に示すアミノ酸配列からなり、軽鎖可変領域が、配列番号５に示すアミノ酸配列からなる抗体酵素を挙げることができる。なお、配列番号４に示すアミノ酸配列は、後述する実施例において製造した抗体酵素ＨＡ１－１の重鎖可変領域のアミノ酸配列であり、配列番号５に示すアミノ酸配列は、同抗体酵素ＨＡ１－１の軽鎖可変領域のアミノ酸配列である。図２６（ａ）にＨＡ１－１の重鎖可変領域のアミノ酸配列（配列番号４）を、図２６（ｂ）にＨＡ１－１の軽鎖可変領域のアミノ酸配列（配列番号５）を示す。図２６（ａ）に示すように、ＨＡ１－１の重鎖可変領域は、下線を付して示す、相補性決定領域ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３を有している。すなわちＨＡ１－１の重鎖可変領域は、配列番号４に示すアミノ酸配列の３１番目から３５番目のアミノ酸配列からなるＣＤＲ１、配列番号４に示すアミノ酸配列の５０番目から６６番目のアミノ酸配列からなるＣＤＲ２、配列番号４に示すアミノ酸配列の９９番目から１０２番目のアミノ酸配列からなるＣＤＲ３を有する。また、図２６（ｂ）に示すように、ＨＡ１－１の軽鎖可変領域は、下線を付して示すＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３を有している。すなわちＨＡ１－１の重鎖可変領域は、配列番号５に示すアミノ酸配列の２４番目から４０番目のアミノ酸配列からなるＣＤＲ１、配列番号５に示すアミノ酸配列の５６番目から６２番目のアミノ酸配列からなるＣＤＲ２、配列番号５に示すアミノ酸配

列の９５番目から１０３番目のアミノ酸配列からなるＣＤＲ３を有する。

【００３２】

また、本発明にかかる抗体酵素は、重鎖可変領域が、配列番号４に示されるアミノ酸配列において、１または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加されたアミノ酸配列からなるもの、および／または、軽鎖可変領域が、配列番号５に示されるアミノ酸配列において、１または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加されたアミノ酸配列からなるもので、ヘマグルチニンを認識し、且つ、当該ヘマグルチニンを分解する活性を有するものであってもよい。かかる抗体酵素は、ＨＡ１－１の変異体であって、ヘマグルチニンを認識し、且つ、当該ヘマグルチニンを分解する活性を有するものである。なお、上記の「配列番号４（５）に示されるアミノ酸配列において、１または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加されたアミノ酸配列」における「１または数個」の範囲は特に限定されないが、例えば、１から２０個、好ましくは１から１０個、より好ましくは１から７個、さらに好ましくは１個から５個、特に好ましくは１個から３個を意味する。

【００３３】

また、他の一例として、例えば重鎖可変領域が、配列番号６に示すアミノ酸配列からなり、軽鎖可変領域が、配列番号７に示すアミノ酸配列からなる抗体酵素を挙げることができる。なお、配列番号６に示すアミノ酸配列は、後述する実施例において製造した抗体酵素ＨＡ１－２の重鎖可変領域のアミノ酸配列であり、配列番号７に示すアミノ酸配列は、後述する実施例において製造した抗体酵素ＨＡ１－２の軽鎖可変領域のアミノ酸配列である。図２７（ａ）にＨＡ１－２の重鎖可変領域のアミノ酸配列（配列番号６）を、図２７（ｂ）にＨＡ１－２の軽鎖可変領域のアミノ酸配列（配列番号７）を示す。図２７（ａ）に示すように、ＨＡ１－２の重鎖可変領域は、下線を付して示すＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３を有している。すなわちＨＡ１－２の重鎖可変領域は、配列番号６に示すアミノ酸配列の３１番目から３５番目のアミノ酸配列からなるＣＤＲ１、配列番号６に示すアミノ酸配列の５０番目から６６番目のアミノ酸配列からなるＣＤＲ２、配列番号６に示すアミノ酸配列の９９番目から１０２番目のアミノ酸配列からなるＣＤＲ３を有する。また、図２７（ｂ）に示すように、ＨＡ１－２の軽鎖可変領域は、下線を付して示すＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３を有している。すなわちＨＡ１－１の重鎖可変領域は、配列番号７に示すアミノ酸配列の２４番目から４０番目のアミノ酸配列からなるＣＤＲ１、配列番号７に示すアミノ酸配列の５６番目から６２番目のアミノ酸配列からなるＣＤＲ２、配列番号７に示すアミノ酸配列の９５番目から１０３番目のアミノ酸配列からなるＣＤＲ３を有する。

【００３４】

また、本発明にかかる抗体酵素は、重鎖可変領域が、配列番号６に示されるアミノ酸配列において、１または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加されたアミノ酸配列からなるもの、および／または、軽鎖可変領域が、配列番号７に示されるアミノ酸配列において、１または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加されたアミノ酸配列からなるもので、ヘマグルチニンを認識し、且つ、当該ヘマグルチニンを分解する活性を有するものであってもよい。かかる抗体酵素は、ＨＡ１－２の変異体であって、ヘマグルチニンを認識し、且つ、当該ヘマグルチニンを分解する活性を有するものである。

【００３５】

また、本発明には、本発明の抗体酵素の断片であって、上記抗体酵素の可変領域を含む抗体断片も含まれる。かかる抗体断片としては、上記抗体酵素の可変領域含む抗体断片であって、ヘマグルチニンを認識し、且つ、当該ヘマグルチニンを分解する活性を有する抗体断片であれば特に限定されるものではない。かかる抗体断片としては、上記抗体酵素の可変領域を含んでいればよい。したがって、上記抗体酵素の重鎖（Ｈ鎖）であってもよく、上記抗体酵素の軽鎖（Ｌ鎖）であってもよく、上記抗体酵素の重鎖の可変領域であってもよく、上記抗体酵素の軽鎖の可変領域であってもよく、これらを含むいかなる抗体断片

であってもよい。中でも、上記抗体酵素の重鎖または軽鎖の可変領域は、かかる可変領域をヒトその他の動物の抗体に移植してキメラ抗体を作製するために好適に用いることができる。

【００３６】

かかる抗体断片としては、例えば、配列番号４、５、６または７に示すアミノ酸配列からなる抗体断片やこれらのアミノ酸配列を含む抗体断片を挙げることができる。なお、配列番号４に示すアミノ酸配列は、後述する実施例において製造した抗体酵素ＨＡ１－１の重鎖可変領域のアミノ酸配列であり、配列番号５に示すアミノ酸配列は、後述する実施例において製造した抗体酵素ＨＡ１－１の軽鎖可変領域のアミノ酸配列であり、配列番号６に示すアミノ酸配列は、後述する実施例において製造した抗体酵素ＨＡ１－２の重鎖可変領域のアミノ酸配列であり、配列番号７に示すアミノ酸配列は、後述する実施例において製造した抗体酵素ＨＡ１－２の軽鎖可変領域のアミノ酸配列である。

【００３７】

また、上記抗体断片は、配列番号４、５、６または７に示されるアミノ酸配列において、１または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加されたアミノ酸配列からなる抗体断片やかかるアミノ酸配列を含む抗体断片であって、ヘマグルチニンを認識し、且つ、当該ヘマグルチニンを分解する活性を有するものであってもよい。かかる抗体断片は、それぞれ、抗体酵素ＨＡ１－１の重鎖（ＨＡ１－１－Ｈ）、抗体酵素ＨＡ１－１の軽鎖（ＨＡ１－１－Ｌ）、抗体酵素ＨＡ１－２の重鎖（ＨＡ１－２－Ｈ）、または抗体酵素ＨＡ１－２の軽鎖（ＨＡ１－２－Ｌ）の可変領域の変異体またはかかる変異体を含む抗体断片であって、ヘマグルチニンを認識し、且つ、当該ヘマグルチニンを分解する活性を有するものである。

【００３８】

また、本発明には、上記抗体酵素をコードする遺伝子、または、上記抗体酵素の断片であって上記抗体酵素の可変領域を含む抗体酵素の断片をコードする遺伝子も含まれる。かかる遺伝子を適当な宿主に発現可能に導入することにより、本発明の抗体酵素またはその断片を宿主内で発現させることができる。また、本発明の抗体酵素の可変領域、またはそのＣＤＲを組み込んだ可変領域は、そのまま発現させてもよいが、定常領域をコードする遺伝子と連結してキメラ抗体酵素として発現させることもできる。

【００３９】

なお、上記「遺伝子」とは、２本鎖ＤＮＡのみならず、それを構成するセンス鎖およびアンチセンス鎖といった一本鎖ＤＮＡやＲＮＡを包含する。さらに、上記「遺伝子」は、本発明の抗体酵素、またはその断片をコードする配列以外に、非翻訳領域（ＵＴＲ）の配列やベクター配列（発現ベクター配列を含む。）等の配列を含むものであってもよい。

【００４０】

本発明の遺伝子としては、具体的には、例えば、配列番号１２、１３、１４または１５に示す塩基配列からなる遺伝子、またはこれらを含む遺伝子を挙げることができる。配列番号１２に示す塩基配列からなる遺伝子は、後述する実施例において製造した抗体酵素ＨＡ１－１の重鎖可変領域をコードする遺伝子の一例であり、配列番号１３に示すアミノ酸配列は、後述する実施例において製造した抗体酵素ＨＡ１－１の軽鎖可変領域をコードする遺伝子の一例であり、配列番号１４に示すアミノ酸配列は、後述する実施例において製造した抗体酵素ＨＡ１－２の重鎖可変領域をコードする遺伝子の一例であり、配列番号１５に示すアミノ酸配列は、後述する実施例において製造した抗体酵素ＨＡ１－２の軽鎖可変領域をコードする遺伝子の一例である。

【００４１】

また、上記遺伝子は、配列番号１２、１３、１４または１５に示される塩基配列と必ずしも同一である必要はなく、ヘマグルチニンを認識し、且つ、当該ヘマグルチニンを分解する活性を有する抗体酵素またはその断片をコードする遺伝子であれば、その変異体も含まれる。このような変異体としては、上記抗体酵素またはその断片をコードする遺伝子の塩基配列において１又は複数個の塩基が欠失、置換、又は付加した変異体が挙げられる。

【００４２】
（２）本発明にかかる抗体酵素の製造方法
本発明にかかる抗体酵素は、例えば、ヘマグルチニンＨＡ１の高度保存領域に存在するアミノ酸配列および／またはヘマグルチニンＨＡ２の高度保存領域に存在するアミノ酸配列を含む抗原ペプチドで免疫したマウス等の免疫動物の脾臓細胞と、マウスのミエローマ細胞等の融合パートナーとを融合させてなるハイブリドーマにより、モノクロナール抗体を産生することにより製造することができる。重鎖、軽鎖を得る場合には、得られたモノクロナール抗体を重鎖と軽鎖に分離すればよい。また、本発明の抗体断片を得る場合には、まず該当するモノクロナール抗体を取得し、その後、上記モノクロナール抗体を適当なプロテアーゼを用いて目的とする抗体断片が得られるように切断すればよい。
【００４３】
モノクロナール抗体の取得は通常のハイブリドーマ法（Kohler, G. and Milstein, C., Nature 256, 495-497(1975)）、トリオーマ法、ヒトＢ－細胞ハイブリドーマ法（Kozbor, Immunology Today 4, 72(1983)）、ＥＢＶ－ハイブリドーマ法（Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R Liss, Inc.,77-96(1985)）等により行なわれる。
【００４４】
上記抗原ペプチドとしては、ＨＡ１の高度保存領域に存在するアミノ酸配列からなるペプチド、ＨＡ１の高度保存領域に存在するアミノ酸配列に他のアミノ酸配列を結合したペプチド、ＨＡ１の高度保存領域に存在するアミノ酸配列に他のタンパク質を結合したもの、ＨＡ２の高度保存領域に存在するアミノ酸配列からなるペプチド、ＨＡ２の高度保存領域に存在するアミノ酸配列に他のアミノ酸配列を結合したペプチド、ＨＡ２の高度保存領域に存在するアミノ酸配列に他のタンパク質を結合したもの、ヘマグルチニンＨＡ１の高度保存領域に存在するアミノ酸配列とＨＡ２の高度保存領域に存在するアミノ酸配列とを結合した融合ペプチド、かかる融合ペプチドに他のアミノ酸配列を結合したペプチド、かかる融合ペプチドに他のタンパク質を結合したもの等を挙げることができる。また、ここで、ヘマグルチニンＨＡ１の高度保存領域に存在するアミノ酸配列とＨＡ２の高度保存領域に存在するアミノ酸配列とを結合する順は特に限定されるものではなく、どちらがＣ末端側であってもよい。
【００４５】
ここで、ヘマグルチニンＨＡ１の高度保存領域に存在するアミノ酸配列とは、連続変異や不連続変異により変異することなく高度に保存されている領域であれば特に限定されるものではないが、例えば配列番号１に示すアミノ酸配列を挙げることができる。また、ヘマグルチニンＨＡ２の高度保存領域に存在するアミノ酸配列も、連続変異や不連続変異により変異することなく高度に保存されている領域であれば特に限定されるものではないが、例えば配列番号２に示すアミノ酸配列を挙げることができる。また、上記「他のアミノ酸配列」としても特に限定されるものではないが、例えば、アラニン２分子（AA）等を挙げることができる。AAを、Ｃ末端に付加することにより、自然のヘマグルチニンのヘリックス構造に近い構造をとらせることが可能となる。また、免疫応答を向上させるために２～３のアミノ酸を付加してもよい。また、上記「他のタンパク質」としても、通常低分子に結合させて抗原とするために用いることができるタンパク質であれば特に限定されるものではないが、例えば、Human IgG、ＢＳＡ、ＨＳＡ、ＫＬＨ等を挙げることができる。上記抗原ペプチドとしては、上述した種々の抗原ペプチドを用いることができるが、例えば、好ましい一例としては、配列番号３に示すアミノ酸配列からなるペプチドを上記他のタンパク質と共有結合させた抗原ペプチドを挙げることができる。配列番号３に示すアミノ酸配列からなるペプチドは、インフルエンザウイルスのヘマグルチニンＨＡ１の高度保存領域TGLRN（３１８～３２２）に、インフルエンザウイルスのヘマグルチニンＨＡ２の高度保存領域GITNKVNSVIEK（４７～５８）をつなぎ、さらにAAをつないだ１９ｍｅｒのペプチド（TGLRNGITNKVNSVIEKAA）である。
【００４６】
また、アミノ酸配列が明らかになっている抗体酵素については、従来公知の遺伝子組み

換え技術等を用いて本発明の抗体酵素を製造することができる。この場合、上記抗体酵素のアミノ酸配列をコードする遺伝子をベクター等に組み込んだ後、発現可能に適当な宿主細胞に導入し、細胞内で翻訳されたペプチドを精製する等の方法を用いることができる。なお、大量発現させることができる適当なプロモーターとともに上記抗体酵素をコードする遺伝子を組み込めば、目的とする抗体酵素を効率よく製造することができる。

【実施例】

【００４７】

〔実施例１：インフルエンザウイルスヘマグルチニンに対するモノクローナル抗体の作製〕

インフルエンザウイルスの表面蛋白質ヘマグルチニンＨＡ１の高度保存領域であるTGLRNに、ＨＡ２の高度保存領域であるGITNKVNSVIEKを結合したペプチドのＣ末端にさらに２個のアラニン分子を結合して、１９ｍｅｒ（TGLRNGITNKVNSVIEKAA）のペプチド（以下、適宜ＩＡＨ（Influenza Ａ型 Hemagglutinin）ペプチドと略記する。）を合成した。なお、アラニン分子を２個付加したのは、ヘリックス構造をとらせ、天然のヘマグルチニンの構造に近付けるためである。得られたＩＡＨペプチドにHuman IgGを結合し抗原ペプチドとした。この抗原ペプチドをBlb/Cマウス(メス)に免疫し、ポリエチレングリコールによる通常の細胞融合法により、インフルエンザウイルスヘマグルチニンに対するモノクローナル抗体を作製した。

【００４８】

＜マウスへの免疫＞

クリーンベンチ内にガラス製シリンジを２本用意し、１本のガラス製シリンジに１９Ｇの注射針を取り付け、滅菌ＰＢＳ（phosphate buffered saline、リン酸緩衝食塩水）で１ｍｇ／ｍＬに希釈した抗原ペプチドを採取した。そして注射針をはずし、三方活栓を取り付けた。もう１本のガラス製シリンジを用意し、１９Ｇの注射針で抗原ペプチドの１ｍｇ／ｍＬ ＰＢＳ溶液と同量の完全フロイントアジュバンドを採取し、両方のガラス製シリンジを三方活栓に取り付けた。三方活栓でつないだガラス製シリンジを交互に押して抗原ペプチドとアジュバンドを白い乳液となるまでよく混合しＷ／Ｏ（ウオーターインオイル）の状態にした。

【００４９】

マウスの腹部をアルコール綿で拭き消毒し、マウスの皮下２ケ所にそれぞれ１００μＬ（一匹当たり）ずつ投与した。マウス１匹当たり１００μｇ投与したことになる。

【００５０】

２、３回目免疫も完全フロイントアジュバンドを用いて免疫を行った。そして、４回目の免疫で不完全フロイントアジュバンドを用いた。

【００５１】

最終免疫はアジュバンドなしでマウスの尾静脈に抗原ペプチドの１ｍｇ／ｍＬ ＰＢＳ溶液を各マウス一匹当たり１００μＬ投与した。細胞融合は最終免疫の３日後に行った。

【００５２】

各免疫注射から７ないし１０日後のマウスの抗血清を採取し、力価測定を通常のＥＬＩＺＡ法で行った。なお、初回免疫を０日目とすると、２回目免疫は２０日目に、３回目免疫は３６日目に、４回目免疫は５０日目に、最終免疫は、６５日目に行った。

【００５３】

ＩＡＨペプチドおよびhuman-IgGをＰＢＳを用いて４μｇ／ｍＬになるように調製した。これらＩＡＨペプチドとhuman-IgGとを９６穴イムノプレートにそれぞれ別系列で５０μＬずつ注入した。４℃、オーバーナイトでコーティングした後、イムノウォッシャーを用いて０．０５％のTween 20を含むＰＢＳ（ＰＢＳ－Ｔ）でプレートを３回洗浄し、すべてのウェルに２％ゼラチンＰＢＳを１５０μＬずつ加えた。室温で１時間インキュベーションし、ブロッキングを完了した。

【００５４】

採取した抗血清をまず１／１００希釈し、１／１００から４倍連続希釈を７回繰り返し

、１サンプルにつき抗血清希釈液を８種類用意した。また未処理マウスの血清も抗血清と同様に希釈を行いコントロールとして用いた。ブロッキングが終了した各ウエルに、連続希釈した抗血清を５０μＬずつ加え、室温で１時間インキュベーションした(一次反応)。洗浄後、ＰＢＳ－Ｔで1/1000希釈したアルカリフォスファターゼ（ＡＬＰ）ウサギ製標識抗マウス抗体を各ウェルに５０μＬずつ加えた。室温で１時間インキュベーションした(二次反応)。プレートを洗浄後、ＡＬＰ基質(p-nitrophenyl phosphate)を各ウェルに１００μＬずつ加え(基質反応)、３０分後にイムノリーダー（波長４０５ｎｍ）で吸光度を測定した。

【００５５】

図１に初回免疫後（初回免疫より１４日後）の力価測定の結果を示す。図１に示すように、human-IgGに対しては十分に力価が上がっているが、ＩＡＨペプチドに対しては力価が全く上がっていなかった。

【００５６】

図２に２回目免疫後の力価測定の結果を示す。図２に示すように、２回目免疫後は、ＩＡＨペプチドに対する力価が上昇してきたことが判る。

【００５７】

３回目免疫（図３）、４回目免疫（図４）と進むにつれ、ＩＡＨペプチドに対する力価はさらに上昇した。最終免疫後の力価は数百倍まで上昇していた（図５）。

【００５８】

＜細胞融合＞

最終免疫の３日後に細胞融合を行った。ジエチルエーテルでマウスに麻酔を行い、半鋭バサミの先端をマウスの首の８割付近まであて、頚動脈を切断した。血液を採血管にとり、実験終了まで室温で静置させ、その後４℃で一晩静置し、翌日遠心（３０００ｒｐｍ、１０分）後、抗血清を回収して力価測定を行った。図５に最終免疫後の力価測定の結果を示す。また、表１に最終免疫後の各マウスにおけるＩＡＨペプチドに対する力価を示す。なお、力価はＯ．Ｄ．$_{1/2}$をとり、そのときの希釈倍率を力価とした。

【００５９】

【表１】

	Influenza peptide に対する力価
Mouse Ⅰ	3×10^{2}
Mouse Ⅱ	1.5×10^{3}
Mouse Ⅲ	not measured

【００６０】

マウスに消毒用エタノールを十分に吹き付けて消毒した。消毒したマウスをクリーンベンチ内に置き、他の臓器を傷つけないように脾臓を取り出した。取り出した脾臓は洗浄用ＭＥＭ培地が５ｍＬ入ったシャーレに移し、脂肪等を除去しよく洗い、洗浄用ＭＥＭ培地１０ｍＬ入ったシャーレに移した。摺りガラス板２枚で、脾臓を３等分した。３等分した脾臓をひとつずつ順に摺りガラス板をのせ、もうひとつの摺りガラス板で擦りながらつぶし中の脾細胞を取り出した。５０ｍＬ遠心管の上にスクリーンメッシュをのせ、そこにシャーレに取り出した脾細胞を注ぎ、遠心した（１４００ｒｐｍ、６分）。遠心操作の間にあらかじめＴ－フラスコで培養していたミエローマ細胞（ＮＳ－１）を回収し５０ｍＬ遠心管に入れ遠心した。１回目の洗浄を終えた遠心管の上清をパスツールピペットでアスピレートし、再度１０ｍＬＭＥＭ培地をピペッティングしながら加えた。遠心の終了したミエローマ細胞の上清をアスピレートした。再度ＭＥＭ培地で懸濁し、ミエローマ細胞と一緒に再度遠心した。遠心後それぞれの上清をアスピレートし、再度ＭＥＭ培地１０ｍＬで懸濁して遠心した後、上清をアスピレートし、ＭＥＭ培地を１０ｍＬ加え均一に懸濁した。ミエローマ細胞：脾細胞＝１：５になるように脾細胞とミエローマ細胞とをそろえた。これら両細胞を混合し、ＰＥＧ１ｍＬを１分かけて１滴ずつゆっくり加えることにより細

胞融合を行った。ＭＥＭで洗浄後、ＨＡＴ選択培地を加え、３７℃のインキュベーターで培養を開始した。３日後ＨＡＴ培地をさらに添加し、７日後に培地交換を行った。表２に用いたそれぞれのマウスの細胞融合における、ミエローマ細胞および脾臓細胞の各細胞数、ミエローマ細胞と脾臓細胞と細胞数の比、蒔いたウェル数を示す。

【００６１】

【表２】

	Myeloma (NS-1) (細胞数)	Spleen	M：S	蒔いた Well 数
Mouse Ⅰ	2.4×10^{7}	1.2×10^{8}	1：5	336
Mouse Ⅱ	1.7×10^{7}	8.4×10^{7}	1：5	240
Mouse Ⅲ	2.0×10^{8}	1.0×10^{8}	1：5	288

【００６２】

＜クローニングとスクリーニング＞

細胞融合後７日目の培地交換コロニーが確認できたウェルのスクリーニングを行った。スクリーニングは上述した力価測定のＥＬＩＳＡ法と同様に行い、コロニーが確認できたウェルの上清を９６穴Ｕ底プレートに入れ、ＰＢＳ－Ｔで１／２希釈をし、これを一次反応に用いた。一次反応の陽性コントロールとして細胞融合時の抗血清を、陰性コントロールとして未処理マウスの血清を１／１００希釈したものを用いた。一次スクリーニングで陽性だった株はクローニングを行った。二次スクリーニング以降は各プレートでＩＡＨペプチドに対して一番強く反応したものを限界希釈法によりクローニングした。スクリーニングは、コロニーが確認できたウェルがすべて陽性になるまで繰り返した。１００％が２回連続して現われ、かつ、ＨＡに特異的に反応する株をインフルエンザウイルスＡ型ヘマグルチニンに対するモノクローナル抗体として確立した。表３に各マウスにおける細胞融合効率と陽性出現率を示す。

【００６３】

【表３】

	細胞融合効率 (融合細胞出現率)	陽性クローン
Mouse Ⅰ	32%	1株
Mouse Ⅱ	96%	4株
Mouse Ⅲ	94%	1株

【００６４】

表３に示すように、細胞融合による融合効率はmouseⅠで３２％と低かったが、mouseⅠⅠ、mouseⅠⅠⅠではそれぞれ９６％、９４％と高い値が出ている。その反面、出現した陽性クローンの数はmouseⅠⅠで４株、mouseⅠ、mouseⅠⅠⅠでは１株と非常に少なかった。表４に最終的に確立されたモノクロナール抗体（ＨＡ１－１およびＨＡ１－２）を示す。

【００６５】

【表４】

Mouse	株名	クラス・サブクラス
Mouse Ⅱ	HA1-1	IgG(κ)
	HA1-2	IgG(κ)

【００６６】
＜クラス・サブクラスの決定＞
確立したモノクロナール抗体（ＨＡ１－１およびＨＡ１－２）のクラス・サブクラスの決定をIso StripTMマウスモノクローナル抗体アイソタイピングキットを用いて行った。
【００６７】
ＰＢＳで１０倍希釈した培養上清１５０μＬをdevelopment tubeに入れ、室温に３０秒置いた。ボルテックスにかけ、着色ラテックスビーズを溶かした。stripの黒い部分を下にしてdevelopment tubeに入れ、陽性コントロールのバンドが検出されるまで１～５分静置した。結果、表４に示すように、ＨＡ１－１とＨＡ１－２とはともにＩｇＧ（κ）であった。
【００６８】
〔実施例２：インフルエンザウイルスＡ型ヘマグルチニンに対するモノクローナル抗体ＨＡ１－１およびＨＡ１－２の交差反応性試験〕
＜ペプチドとの交差反応性試験＞
得られた２クローンの培養上清を用いて、いくつかのペプチドとの交差反応性をＥＬＩＳＡ法により調べた。ペプチドとしては、ＴＰ４１－１、ＥＣＬ２Ａ、ＨＩＶ Ｖ３ loop、およびＲＴ－１を用いた。ＴＰ－４１はＨＩＶの表面タンパク質ｇｐ４１の高度保存領域ペプチドであり、ＥＣＬ２ＡはＨＩＶのコレセプターであるケモカインレセプターＣＣＲ５Δ３２の第２細胞外領域の欠損部位のペプチドであり、ＨＩＶ Ｖ３ loopはＨＩＶがＣＣＲ５のコレセプターと結合する部位の保存領域を元に合成したペプチドであり、ＲＴ－１はＨＩＶ逆転写酵素の部分ペプチドである。ＴＰ４１－１は配列番号８に示すアミノ酸配列からなり、ＥＣＬ２Ａは配列番号９に示すアミノ酸配列からなり、ＨＩＶ Ｖ３ loopは配列番号１０に示すアミノ酸配列からなり、ＲＴ－１は配列番号１１に示すアミノ酸配列からなる。また、それぞれのアミノ酸配列を以下の表５に示す。
【００６９】
【表５】

ペプチドの種類	アミノ酸配列
IAH	TGRNGITNKVNSVIEKAA
TP41-1	TPRGPDRPEGIEEEGGERDRD
ECL2A	RSSHFPYSQYQFWKNFQTLKGC
HIV V3 loop	CTRPNYNKRKRIHIGPGRAFYTTKNIIGTIRQAHC
RT-1	KLLRGTKALTFVIPLTEEAE

【００７０】
ＴＰ４１－１、ＥＣＬ２Ａ、ＨＩＶ Ｖ３ loop、およびＲＴ－１はそれぞれＰＢＳで５μｇ／ｍＬに調製し、９６穴のイムノのプレートに２００μＬずつ入れコーティングに用いた。また、今回ターゲットにしているＩＡＨペプチドとの比較も行うため、ＩＡＨペプチドも他のペプチドと同様にＰＢＳで５μｇ／ｍＬに調製し、コーティングを行った。培養上清はＰＢＳ－Ｔで１／２希釈し、一次反応に用いた。その他の操作は上述した力価測定と同様に行った。
【００７１】

図６に交差反応性試験の結果を示す。図６に示すように、ＨＡ１－１、ＨＡ１－２共にＩＡＨペプチド以外のペプチドとは反応が見られなかった。

【００７２】

＜インフルエンザＡ型ウイルスおよび他のタンパク質との交差反応性試験＞

得られた２クローンの培養上清を用いて、インフルエンザＡ型ウイルス（Ｈ１Ｎ１、Ｈ２Ｎ２、Ｈ３Ｎ２）および他のタンパク質との交差反応性をＥＬＩＳＡ法により調べた。他のタンパク質としては、Human IgG、ＢＳＡ、ＨＳＡ、ＫＬＨ、Human-hemoglobinを用いた。

【００７３】

Ａ型インフルエンザウイルスＨ１Ｎ１、Ａ型インフルエンザウイルスＨ２Ｎ２、Ａ型インフルエンザウイルスＨ３Ｎ２、Human IgG、ＢＳＡ、ＨＳＡ、ＫＬＨ、およびHuman-hemoglobinはそれぞれＰＢＳで５μｇ／ｍＬに調製し、９６穴のイムノのプレートに２００μＬずつ入れコーティングを行った。ＩＡＨペプチドとの比較も行うため、ＩＡＨペプチドも他のタンパク質と同様にＰＢＳで５μｇ／ｍＬに調製し、コーティングを行った。培養上清はＰＢＳ－Ｔで１／２希釈し、一次反応に用いた。その他の操作は上述した力価測定と同様に行った。

【００７４】

交差反応性試験の結果、ＨＡ１－１、ＨＡ１－２抗体は共にHuman IgG、ＢＳＡ、ＨＳＡ、ＫＬＨ、およびHuman-hemoglobinとは反応しなかった。図７に、Ａ型インフルエンザウイルスＨ１Ｎ１、Ａ型インフルエンザウイルスＨ２Ｎ２、Ａ型インフルエンザウイルスＨ３Ｎ２との交差反応試験の結果を示す。図７に示すように、ＨＡ１－１、ＨＡ１－２共にＩＡＨペプチドとは当然強く反応しているが、Ｈ１Ｎ１に対して高い反応を示した。Ｈ２Ｎ２に対しても反応していることが判る。一方、Ｈ３Ｎ２に対しては、ネガティブコントロール（Negative control）でも弱く出ていることから、これには反応していないと考えられる。このことより、ＨＡ１－１、ＨＡ－２は今回ターゲットとしているヘマグルチニンの保存領域を認識する抗体であることが判る。

【００７５】

〔実施例３：インフルエンザウイルスのヘマグルチニンに対するモノクローナル抗体ＨＡ１－１およびＨＡ１－２の精製と分離＞

＜ＨＡ１－１およびＨＡ１－２の大量取得と精製＞

純度の高いＨＡ１－１およびＨＡ１－２を得るため、精製前に５０％硫安による塩析を２回行ってアルブミンを除去し、引き続いて、アフィゲルプロテインA MAPS-IIキット（BIO-RAD）を使用し精製した。

【００７６】

ＩＡＨペプチドにHuman IgGを結合した抗原ペプチドを免疫原とし、細胞融合法によって得られたハイブリドーマ（マウス1匹当たり１×１０^{6} 個)をマウスに腹腔投与して、ＨＡ１－１（またはＨＡ１－２）の腹水を得た。この腹水約８ｍＬを濾紙で濾過し、腹水中の浮遊物を除去した。その後、濾過した液量と等量のＰＢＳで希釈した。次に腹水を２本の遠心チューブ(ガラス製)に均等に分け、各々等量の飽和硫安溶液をボルテックスで攪拌しながらドロップワイズで加えた。これを氷中で３０分静置し、４℃、５０００ｒｐｍで１０分遠心した。上清をデカンテーションして、ペレットをそれぞれ１ｍＬずつのＰＢＳで溶解した。もう一度、等量の飽和硫安溶液をボルテックスで攪拌しながらドロップワイズで加え、同様に塩析を行った。塩析が終わったら、２本のチューブを１本に合わせて、２ＬのＰＢＳに対して２回透析した。

【００７７】

透析終了後、ＨＡ１－１（またはＨＡ１－２）の精製を行った。操作はアフィゲルプロテインA MAPS-IIキットの説明書に従い低温室中、４℃で行った。カラムにゲルをパスツールピペットで泡立てないように充填し、ＵＶモニター、記録計などを低温室にセッティングした。ＵＶ２８０ｎｍでモニターし、ベースラインがおちつくまでBinding bufferを自然滴下、ゲルを平衡化させた。流速を０．２～０．４ｍＬ／ｍｉｎに調整し、Binding

bufferがゲル表面に来たところでサンプルをアプライした。サンプルがゲル表面まで到達したらBinding bufferをアプライし、ピークが落ち着くまで自然滴下で洗浄を行った。次にElution bufferをアプライし、サンプルを分取した。この時Elution buffer（酸性）には抗体が含まれているため、直ちに２Ｍ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ ｐＨ８．０で中和した。回収したサンプルの各画分は３ＬのＰＢＳに対し２回透析した。そして、ＤＣプロテインスタンダードアッセイ（BIO-RAD）でタンパクの濃度を決定した。

【００７８】

＜重鎖・軽鎖の分離・精製＞

アフィゲルプロテインA MAPS-IIキットで精製した抗体ＨＡ１－１（またはＨＡ１－２）（５ｍｇ分)溶液をセントリプレップ-10(MILLIPORE)で抗体液が約１ｍＬになるまで限外濾過濃縮を行った。さらに５ｍＬの５０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、０．１５Ｍ ＮａＣｌ buffer （ｐＨ８．０）を加え、約１ｍＬになるまで再び遠心濃縮した。この操作を再度行い、限外濾過後、５０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、０．１５Ｍ ＮａＣｌ buffer （ｐＨ８．０）で溶液を２．７ｍＬに調整し、褐色瓶に保存した。

【００７９】

抗体液２．７ｍＬに０．３ｍＬの２Ｍ ２-メルカプトエタノールを加えて軽く撹拌した。１Ｍ Tris solutionでｐＨ８．０に調整後、N_2を封入し、１５℃で３時間撹拌しながら還元反応を行った。この間に０．６Ｍヨードアセトアミドを作製し、５０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、０．１５Ｍ ＮａＣｌ buffer （ｐＨ８．０）で調整後、アスピレーターで脱気しておいた。還元反応終了後、０．６Ｍ ヨードアセトアミド３ｍＬを反応液に加え、軽く撹拌した。１Ｍ Tris solutionでｐＨ８．０に調整後、N_2を封入し、１５℃で１５分撹拌しながらアルキル化反応を行った。ディスクフィルター（MILLIPOREサンプレップLCR13-LH、φ０．５μｍ）を使用し、反応液の除粒子を行った。セントリプレップ-10（MILLIPORE)を使用し、反応液を、高速冷却遠心機を使用し、４℃、２８００ｒｐｍで１０分遠心し、約０．５ｍＬまで限外濾過濃縮を行った。次に濃縮したサンプルをウルトラフリーC3（０．２μｍ）で濾過した。

【００８０】

重鎖、軽鎖の精製は移動相に６Ｍグアニジン塩酸塩を用いたサイズ排除クロマトグラフィー（カラム：Protein-Pak 300、７．８×３００ｍｍ、Nippon Waters製)で行った。６Ｍグアニジン塩酸塩はＨＣｌでｐＨ６．５に調製した。分離した抗体液を３回にわけて（1回のインジェクト量０．２ｍＬ以下）ＨＰＬＣにインジェクトし、重鎖、軽鎖を分取した。つづいて透析をＰＢＳに対して計８回行い、さらに１５ｎＭ PB ｐＨ６．５に対し２回行った。ＳＤＳ－ＰＡＧＥ（１２％分離ゲル、３％濃縮ゲル、銀染色)で純度を確認した。最後にＤＣプロテインアッセイ(BIO-RAD)で重鎖、軽鎖の濃度を決定し、４℃で保存した。以降無菌的に取り扱った。

【００８１】

〔実施例４：ＨＡ１－１、ＨＡ１－２の重鎖および軽鎖の配列決定〕

ＨＡ１－１、ＨＡ－１－２をコードするｍＲＮＡを、QuickPrep mRNA Purification Kit (Amersham Bioscience製)を用いてハイブリドーマから抽出した。その後、AMV RT cDNA Synthesis Kit (Life Science Inc. 製)を用いて、得られたｍＲＮＡからｃＤＮＡを合成した。目的のＨＡ１－１、ＨＡ－１－２をコードする遺伝子は、Ig-Prime Kits (Novagen製)を用いて、合成されたｃＤＮＡを鋳型に増幅し、TOPO TA Cloning Kits for Sequencing (Invitrogen製) にサブクローニング後、M13 forward (-20)およびreverse プライミング部位より配列決定を行った。配列決定には、全自動ＤＮＡシークエンサーを使用した。ＨＡ１－１、ＨＡ－１－２の重鎖および軽鎖のアミノ酸配列を、決定された各ＤＮＡ配列をもとに推定した。

【００８２】

ＨＡ１－１の重鎖可変領域のアミノ酸配列を配列番号４に、ＨＡ１－１の重鎖可変領域をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号１２に、ＨＡ１－１の軽鎖可変領域のアミノ酸配列を配列番号５に、ＨＡ１－１の軽鎖可変領域をコードする遺伝子の塩基配列を配列番

号１３に、ＨＡ１－２の重鎖可変領域のアミノ酸配列を配列番号６に、ＨＡ１－２の重鎖可変領域をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号１４に、ＨＡ１－２の軽鎖可変領域のアミノ酸配列を配列番号７に、ＨＡ１－２の軽鎖可変領域をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号１５に示す。

【００８３】

〔実施例５：ＨＡ１－１、ＨＡ１－２の重鎖および軽鎖によるペプチダーゼ活性試験〕

＜ＴＰ４１－１ペプチドを用いたペプチダーゼ活性試験＞

本実験では全てのガラス器、プラスチック用品、緩衝液は乾熱滅菌あるいはオートクレーブ滅菌して用いた。また、オートクレーブできないものは０．２μｍのフィルターで濾過滅菌した。実験操作はすべてクリーンベンチ内で行った。

【００８４】

ＴＰ４１－１（TPRGPDRPEGIEEEGGERDRD）溶液（終濃度：１２０μＭ in １５ｍＭ ＰＢ）と終濃度０．２μＭあるいは０．４μＭに調製したＨＡ１－１－Ｈ（またはＨＡ１－１－ＬまたはＨＡ１－２－ＨまたはＨＡ１－２－Ｌ）とを混合した。反応は２５℃で行い、ＨＰＬＣでＴＰ４１－１ペプチドの消失を追跡した。表６に反応液の組成を示す。

【００８５】

【表６】

	H鎖	L鎖	TP41-1
HA1-1	0.4uM(20ug/ml)	0.8uM(20ug/ml)	-
HA1-2	0.4uM(20ug/ml)	0.8uM(20ug/ml)	-
TP41-1	-	-	120uM(284ug/ml)

(全て終濃度)

【００８６】

図８にＨＡ１－１－Ｈ、ＨＡ１－１－Ｌを用いたときのＴＰ４１－１ペプチド濃度の経時変化を、図９にＨＡ１－２－Ｈ、ＨＡ１－２－Ｌを用いたときのＴＰ４１－１ペプチド濃度の経時変化を示す。また、図１０にＨＡ１－１－Ｈを用いてＴＰ４１－１ペプチドを分解したときのクロマトグラムを、図１１にＨＡ１－２－Ｈを用いてＴＰ４１－１ペプチドを分解したときのクロマトグラムを、図１２にＨＡ１－２－Ｌを用いてＴＰ４１－１ペプチドを分解したときのクロマトグラムを示す。図８および図１０に示すように、ＨＡ１－１では、重鎖は約２５時間の誘導期をへて、約９５時間で分解が完了した。しかし、ＨＡ１－１－Ｌでは２５０時間以上追跡したが、分解は見られなかった。また、図９および図１１に示すように、ＨＡ１－２では、約５０時間でペプチドの分解が終了した。また、図９および図１２に示すように、ＨＡ１－２軽鎖では、約３０時間の誘導期をへて、約１２０時間で完全に分解が終了した。

【００８７】

＜ＩＡＨペプチドを用いたペプチダーゼ活性試験＞

ＩＡＨペプチド溶液（終濃度：１４０μＭ）と終濃度０．２μＭあるいは０．４μＭに調製したＨＡ１－１－Ｈ（またはＨＡ１－１－ＬまたはＨＡ１－２－ＨまたはＨＡ１－２－Ｌ）とを混合した。

【００８８】

ＴＰ４１－１ペプチドを用いたときと同様に２５℃で反応を行い、ＨＰＬＣでＩＡＨペプチドの消失を追跡した。表７に反応液の組成を示す。

【００８９】

【表７】

	H鎖	L鎖	IAH
HA1-1	0.4uM(20ug/ml)	0.8uM(20ug/ml)	-
HA1-2	0.4uM(20ug/ml)	0.8uM(20ug/ml)	-
IAH	-	-	140uM(291.2ug/ml)

(全て終濃度)

【００９０】

図１３にＨＡ１－１－Ｈ、ＨＡ１－１－Ｌを用いたときのＩＡＨペプチド濃度の経時変化を、図１４にＨＡ１－２－Ｈ、ＨＡ１－２－Ｌを用いたときのＩＡＨペプチド濃度の経時変化を示す。また、図１５にＨＡ１－１－Ｈを用いてＩＡＨペプチドを分解したときのクロマトグラムを、図１６にＨＡ１－１－Ｌを用いてＩＡＨペプチドを分解したときのクロマトグラムを、図１７にＨＡ１－２－Ｈを用いてＩＡＨペプチドを分解したときのクロマトグラムを、図１８にＨＡ１－２－Ｌを用いてＩＡＨペプチドを分解したときのクロマトグラムを示す。図１３および図１５に示すように、ＨＡ１－１では、重鎖は、約５５時間で完全にＩＡＨペプチドを分解した。また、図１３および図１６に示すように、ＴＰ４１－１ペプチドの時には分解反応が見られなかった軽鎖でも約６０時間の誘導期をへて、約１１０時間でＩＡＨペプチドの分解が終了した。また、図１４および図１７に示すように、ＨＡ１－２では、重鎖は、約６５時間でＩＡＨペプチドの分解を終了している。また、図１４および図１８に示すように、軽鎖では約３０時間の誘導期をへて、約７５時間でＩＡＨペプチドの分解が終了している。ＨＡ１－１、ＨＡ１－２両抗体の重鎖、軽鎖共に、ＴＰ４１－１ペプチドよりもＩＡＨペプチドの方が、分解反応が早い。これは、ＩＡＨペプチドが抗原そのものであるからだと考えられる。また、ＨＡ１－２－ＨによるＩＡＨペプチドの分解断片を質量分析計で調べた。図１９にその結果を示す。図１９に示すように、ＩＡＨペプチドは、Ｋ－Ｖ間（配列番号３に示すアミノ酸配列の１０番目と１１番目のアミノ酸の間）、Ｎ－Ｓ間（配列番号３に示すアミノ酸配列の１２番目と１３番目のアミノ酸の間）、Ｅ－Ｋ間（配列番号３に示すアミノ酸配列の１６番目と１７番目のアミノ酸の間）、Ｋ－Ａ間（配列番号３に示すアミノ酸配列の１７番目と１８番目のアミノ酸の間）、Ａ－Ａ間（配列番号３に示すアミノ酸配列の１８番目と１９番目のアミノ酸の間）で切断されていた。

【００９１】

＜動力学的解析＞

抗原分解活性を示す抗体サブユニットは２相性（誘導期および活性期）の曲線を描きながらペプチドを分解するため、この曲線から分解の初速度を求めるのは困難である。そこで一度、完全にペプチドを分解した反応液に再びペプチドを添加することで誘導期をなくしこの問題を解決した。酵素による基質の変化量が１割未満を初速度として定義した。ＨＡ１－２－Ｌを０．６４ｍＭと一定濃度にし、基質（ＴＰ４１－１ペプチド）濃度を変化させた。得られたHanes-WoolfプロットからMichaelis-Menten式に従い動力学的パラメータを算出した。

【００９２】

図２０（ａ）に基質（ＴＰ４１－１ペプチド）濃度と分解速度との関係を、図２０（ｂ）にHanes-Woolfプロットの結果を示す。

【００９３】

〔実施例６：ＨＡ１－１、ＨＡ１－２の重鎖および軽鎖によるインフルエンザＡ型ヘマグルチニン分解試験〕

＜ＨＡ１－１の重鎖によるインフルエンザＡ型ヘマグルチニン分解試験＞

まず、ＨＡ１－１抗体重鎖（ＨＡ１－１－Ｈ）でＴＰ４１－１ペプチドを完全に分解させた（ＨＡ１－１－Ｈの活性化）。その後、インフルエンザＡ型ウイルスと１：１の割合で混合し、反応させた（インフルエンザＡ型ウイルス ５００μＬ ＋ 活性化ＨＡ１－１

－Ｈ５００μＬ）。コントロールとしてインフルエンザＡ型ウイルスと１５ｍＭ ＰＢを１：１の割合で混合し、反応させた(インフルエンザＡ型ウイルス ３００μＬ ＋ １５ｍＭ ＰＢ ３００μＬ）。これをＳＤＳ－ＰＡＧＥで経時変化を追跡した。

【００９４】

また、図２１にインフルエンザＡ型ウイルスのＳＤＳ－ＰＡＧＥ結果を、図２２にＨＡ１－１抗体を用いたインフルエンザＡ型ウイルスに対するウエスタンブロット分析の結果を、図２３にＨＡ１－１抗体重鎖によるインフルエンザＡ型ウイルスのヘマグルチニンの分解試験結果を示す。

【００９５】

図２１、２２および２３から、ＨＡ１－１抗体重鎖により特異的にＨＡ２のバンドの消失が見られたことが判る。特に図２３からは、インフルエンザＡ型ウイルスのＨＡ２分子がＨＡ１－１抗体重鎖により、反応時間８時間で約４０％、１２時間で７０％、２４時間で９０％、４８時間ではほとんど完全に分解されていることが判る。ＨＡ１－１抗体重鎖を加えない系ではＨＡ２分子は全く分解されなかった。また、ＨＡ１－１抗体重鎖はＨＡ２分子以外のＡ型インフルエンザウイルス構成タンパク質を分解せず、高い特異性でもってＨＡ２分子を分解していることが判る。このことから、ＨＡ１－１抗体重鎖はインフルエンザＡ型ヘマグルチニンを特異的に認識し、分解する抗体酵素であるといえる。

【００９６】

＜ＨＡ１－１の軽鎖によるインフルエンザＡ型ヘマグルチニン分解試験＞

ＨＡ１－１抗体軽鎖（ＨＡ１－１－Ｌ）を用いた以外は前記と同様にして、ＨＡ１－１抗体軽鎖（ＨＡ１－１－Ｌ）によるインフルエンザウイルス構成タンパク質の分解を試みた。図２４にＨＡ１－１抗体軽鎖によるインフルエンザＡ型ウイルスのヘマグルチニンの分解試験結果を示す。図２４に示すように、ＨＡ２分子のみが４時間で２０％、８時間で４０％分解していた。

【００９７】

＜ＨＡ１－２の重鎖によるインフルエンザＡ型ヘマグルチニン分解試験＞

ＨＡ１－２抗体重鎖（ＨＡ１－２－Ｈ）を用いた以外は前記と同様にして、ＨＡ１－１抗体重鎖（ＨＡ１－２－Ｈ）によるインフルエンザウイルス構成タンパク質の分解を試みた。図２５にＨＡ１－２抗体重鎖によるインフルエンザＡ型ウイルスのヘマグルチニンの分解試験結果を示す。図２５に示すように、ＨＡ１－２－Ｈは反応開始から約４時間で、ＨＡ２分子をほとんど分解した。一方、コントロールとして用いたヒト血清アルブミン（ＨＳＡ）はほとんど分解されなかった。

【産業上の利用可能性】

【００９８】

ヘマグルチニンＨＡ１および／またはＨＡ２の高度保存領域を構成するペプチドを認識し、且つ、ＨＡを切断および／または分解することができる抗体酵素を得ることができれば、毎年起こる抗原変異によって妨害されることなく、該抗体酵素によってＨＡを認識するとともに、認識したＨＡを切断および／または分解することが可能となり、インフルエンザの予防・治療に寄与することが期待できる。また、かかる抗体酵素は、大気中のウイルスのセンシングや除去に利用することが期待される。このため、本発明の抗体酵素は、医療業、製薬産業、試薬産業、医療機器産業、食品産業等に利用することができ、非常に有用である。

【図面の簡単な説明】

【００９９】

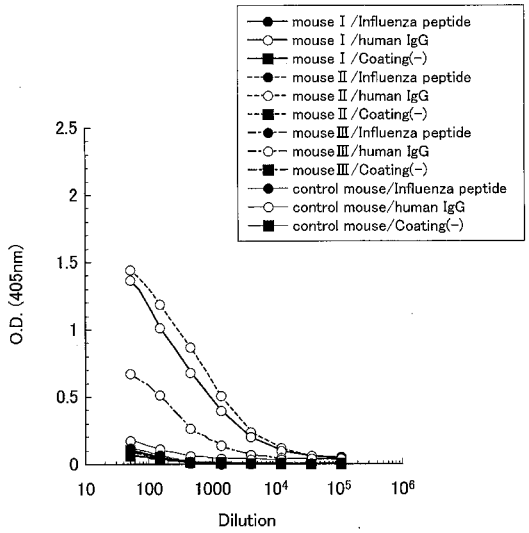
【図１】モノクロナール抗体を製造する実施例１において、初回免疫後の力価測定の結果を示す図である。

【図２】モノクロナール抗体を製造する実施例１において、２回目免疫後の力価測定の結果を示す図である。

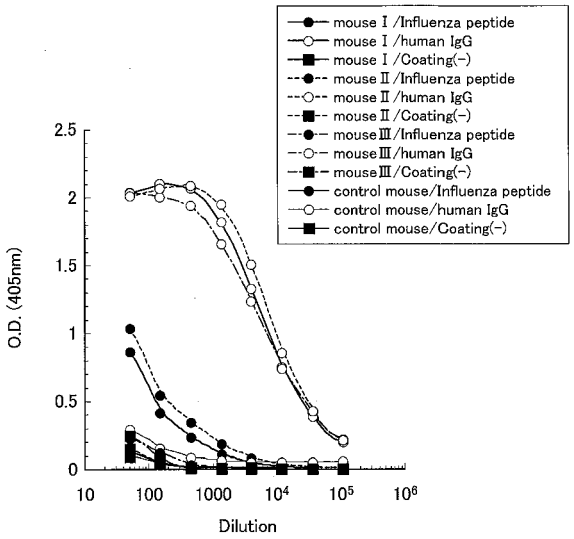
【図３】モノクロナール抗体を製造する実施例１において、３回目免疫後の力価測定の結果を示す図である。

【図４】モノクロナール抗体を製造する実施例１において、４回目免疫後の力価測定の結果を示す図である。
【図５】モノクロナール抗体を製造する実施例１において、最終免疫後の力価測定の結果を示す図である。
【図６】実施例２において、ＴＰ４１－１、ＥＣＬ２Ａ、ＨＩＶ Ｖ３ loop、およびＲＴ－１との交差反応性試験の結果を示す図である。
【図７】実施例２において、Ｈ１Ｎ１、Ｈ２Ｎ２、Ｈ３Ｎ２との交差反応性試験の結果を示す図である。
【図８】ＴＰ４１－１ペプチドを用いたＨＡ１－１－Ｈ、ＨＡ１－１－Ｌのペプチダーゼ活性試験の結果を示す図である。
【図９】ＴＰ４１－１ペプチドを用いたＨＡ１－２－Ｈ、ＨＡ１－２－Ｌのペプチダーゼ活性試験の結果を示す図である。
【図１０】ＨＡ１－１－Ｈを用いてＴＰ４１－１ペプチドを分解したときのクロマトグラムを示す図である。
【図１１】ＨＡ１－２－Ｈを用いてＴＰ４１－１ペプチドを分解したときのクロマトグラムを示す図である。
【図１２】ＨＡ１－２－Ｌを用いてＴＰ４１－１ペプチドを分解したときのクロマトグラムを示す図である。
【図１３】ＩＡＨペプチドを用いたＨＡ１－１－Ｈ、ＨＡ１－１－Ｌのペプチダーゼ活性試験の結果を示す図である。
【図１４】ＩＡＨペプチドを用いたＨＡ１－２－Ｈ、ＨＡ１－２－Ｌのペプチダーゼ活性試験の結果を示す図である。
【図１５】ＨＡ１－１－Ｈを用いてＩＡＨペプチドを分解したときのクロマトグラムを示す図である。
【図１６】ＨＡ１－１－Ｌを用いてＩＡＨペプチドを分解したときのクロマトグラムを示す図である。
【図１７】ＨＡ１－２－Ｈを用いてＩＡＨペプチドを分解したときのクロマトグラムを示す図である。
【図１８】ＨＡ１－２－Ｌを用いてＩＡＨペプチドを分解したときのクロマトグラムを示す図である。
【図１９】ＨＡ１－２－ＨによるＩＡＨペプチドの分解断片を質量分析計で調べた結果を示す図である。
【図２０】ペプチダーゼ活性試験における動力学的解析の結果を示す図であり、（ａ）は、基質（ＴＰ４１－１ペプチド）濃度と分解速度との関係を示す図であり、（ｂ）は、Hanes-Woolfプロットの結果を示す図である。
【図２１】インフルエンザＡ型ウイルスのＳＤＳ－ＰＡＧＥ結果を示す図である。
【図２２】ＨＡ１－１抗体を用いたインフルエンザＡ型ウイルスに対するウエスタンブロット解析の結果を示す図である。
【図２３】ＨＡ１－１抗体重鎖によるインフルエンザＡ型ウイルスのヘマグルチニンの分解試験結果を示す図である。
【図２４】ＨＡ１－１抗体軽鎖によるインフルエンザＡ型ウイルスのヘマグルチニンの分解試験結果を示す図である。
【図２５】ＨＡ１－２抗体重鎖によるインフルエンザＡ型ウイルスのヘマグルチニンの分解試験結果を示す図である。
【図２６】ＨＡ１－１の可変領域のアミノ酸配列を示す図であり、（ａ）はＨＡ１－１の重鎖可変領域のアミノ酸配列（配列番号４）を示す図であり、（ｂ）はＨＡ１－１の軽鎖可変領域のアミノ酸配列（配列番号５）を示す図である。
【図２７】ＨＡ１－２の可変領域のアミノ酸配列を示す図であり、（ａ）はＨＡ１－２の重鎖可変領域のアミノ酸配列（配列番号６）を示す図であり、（ｂ）はＨＡ１－２の軽鎖可変領域のアミノ酸配列（配列番号７）を示す図である。

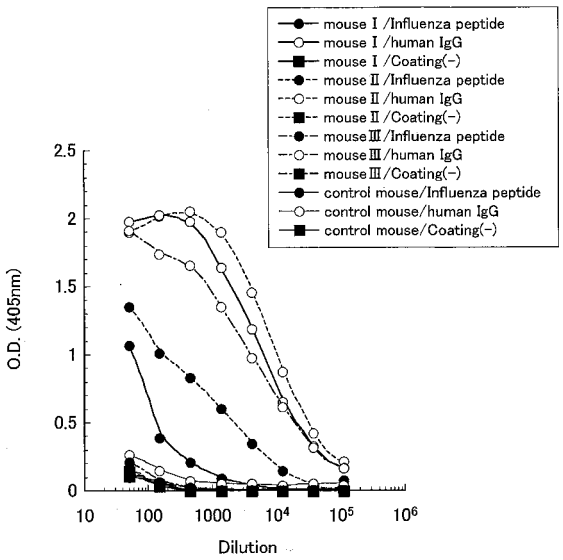
【図１】


mouse Ⅰ /Influenza peptide
mouse Ⅰ /human IgG
mouse Ⅰ /Coating(−)
mouse Ⅱ /Influenza peptide
mouse Ⅱ /human IgG
mouse Ⅱ /Coating(−)
mouse Ⅲ /Influenza peptide
mouse Ⅲ /human IgG
mouse Ⅲ /Coating(−)
control mouse/Influenza peptide
control mouse/human IgG
control mouse/Coating(−)
O.D. (405nm)
2.5
2
1.5
1
0.5
0
10
100
1000
10⁴
10⁵
10⁶
Dilution

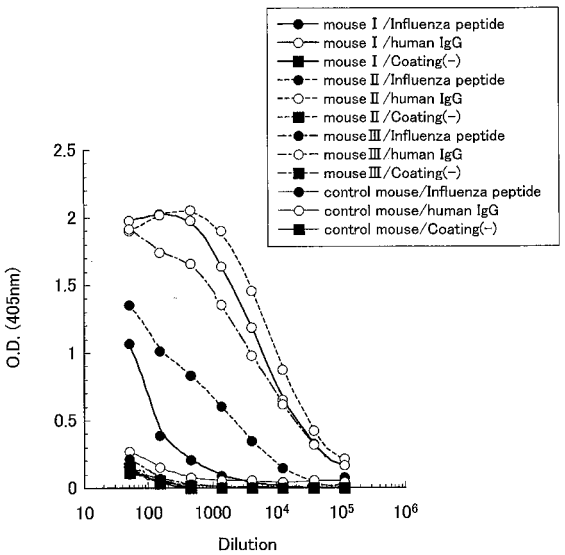
【図２】


mouse Ⅰ /Influenza peptide
mouse Ⅰ /human IgG
mouse Ⅰ /Coating(−)
mouse Ⅱ /Influenza peptide
mouse Ⅱ /human IgG
mouse Ⅱ /Coating(−)
mouse Ⅲ /Influenza peptide
mouse Ⅲ /human IgG
mouse Ⅲ /Coating(−)
control mouse/Influenza peptide
control mouse/human IgG
control mouse/Coating(−)
O.D. (405nm)
2.5
2
1.5
1
0.5
0
10
100
1000
10⁴
10⁵
10⁶
Dilution

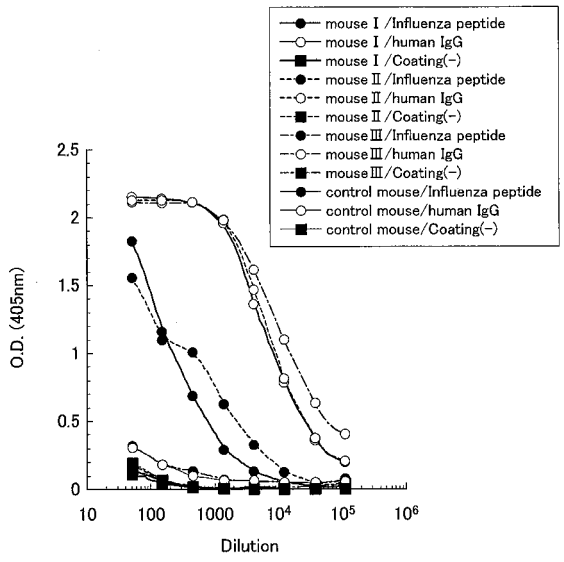
【図３】


mouse Ⅰ /Influenza peptide
mouse Ⅰ /human IgG
mouse Ⅰ /Coating(−)
mouse Ⅱ /Influenza peptide
mouse Ⅱ /human IgG
mouse Ⅱ /Coating(−)
mouse Ⅲ /Influenza peptide
mouse Ⅲ /human IgG
mouse Ⅲ /Coating(−)
control mouse/Influenza peptide
control mouse/human IgG
control mouse/Coating(−)
O.D. (405nm)
2.5
2
1.5
1
0.5
0
10
100
1000
10⁴
10⁵
10⁶
Dilution

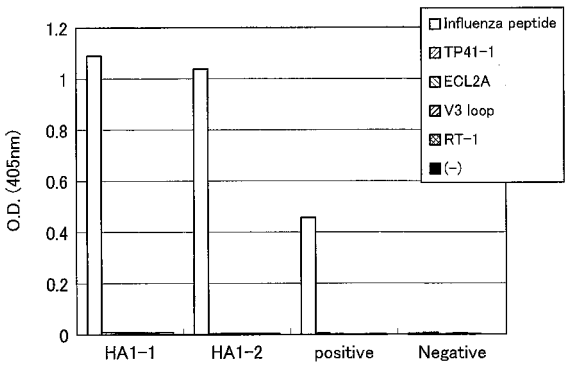
【図４】


mouse Ⅰ /Influenza peptide
mouse Ⅰ /human IgG
mouse Ⅰ /Coating(−)
mouse Ⅱ /Influenza peptide
mouse Ⅱ /human IgG
mouse Ⅱ /Coating(−)
mouse Ⅲ /Influenza peptide
mouse Ⅲ /human IgG
mouse Ⅲ /Coating(−)
control mouse/Influenza peptide
control mouse/human IgG
control mouse/Coating(−)
O.D. (405nm)
2.5
2
1.5
1
0.5
0
10
100
1000
10⁴
10⁵
10⁶
Dilution

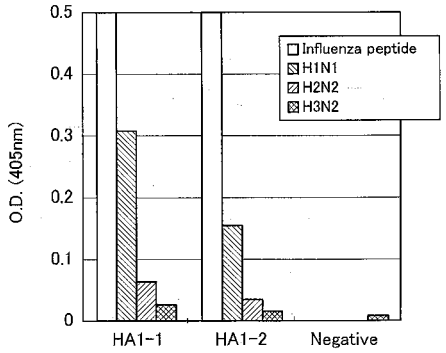
【図５】



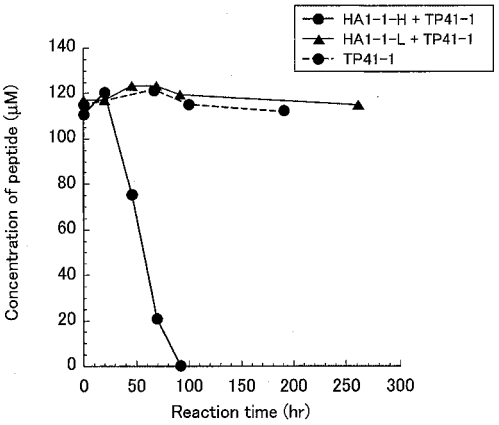
【図６】



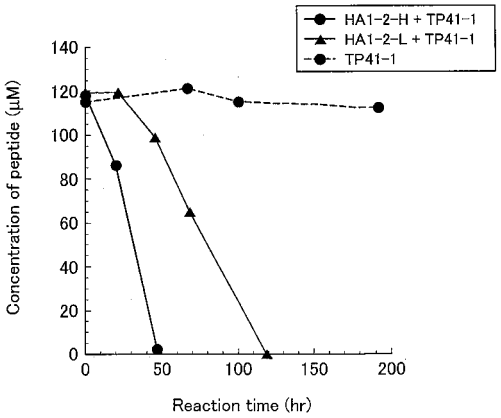
【図７】



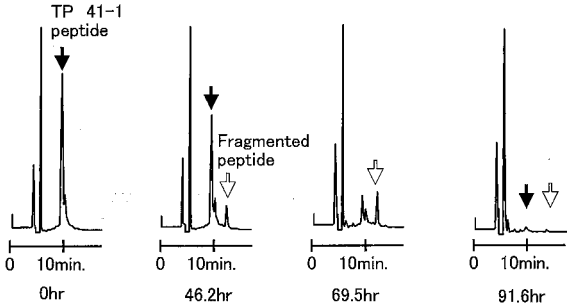
【図８】



【図９】

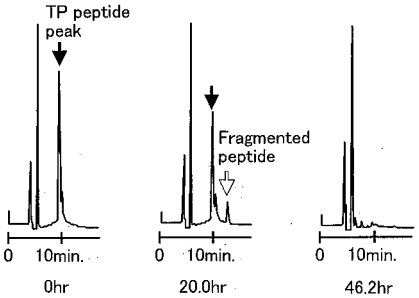


【図１０】



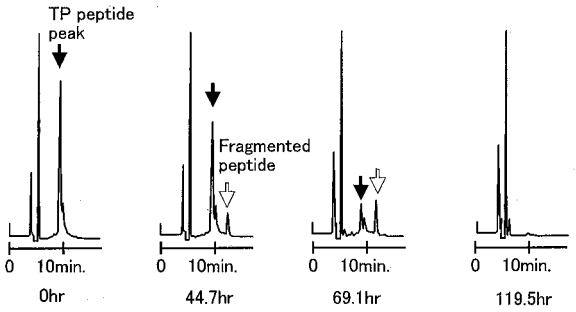
0.8μM HA1-1 H鎖 + 120μM TP41-1 peptide

【図１１】



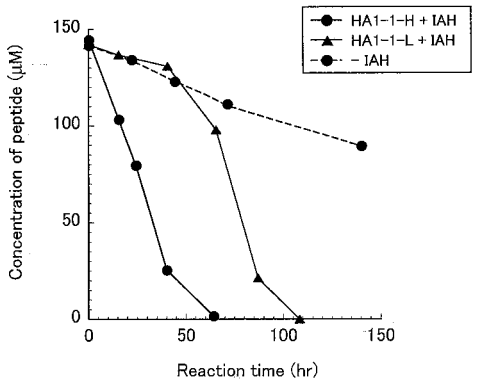
0.4μM HA1-2 H + 120μM TP41-1 peptide

【図１２】

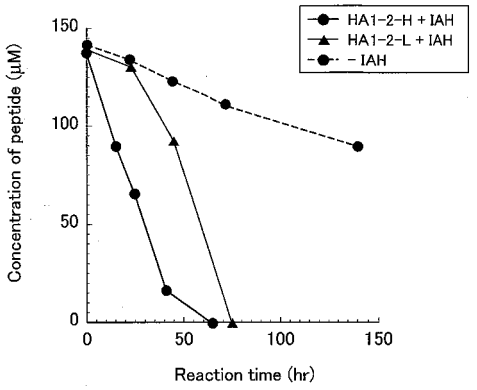


0.8μM HA1-2 L + 120μM TP41-1 peptide

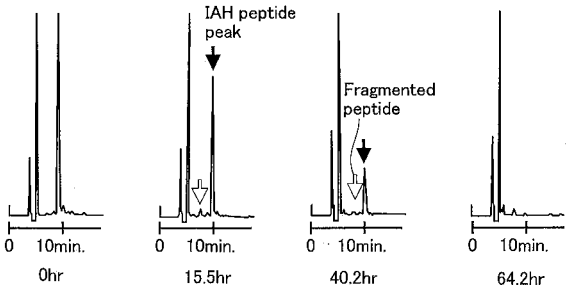
【図１３】



【図１４】

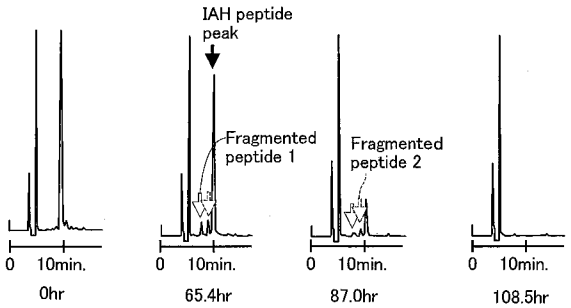


【図１５】



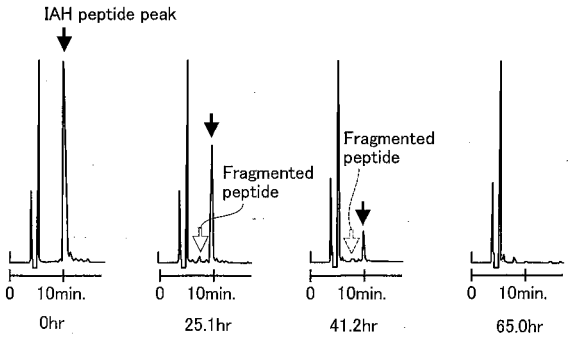
0.4μM HA1-1 H + 140μM IAH peptide

【図１６】



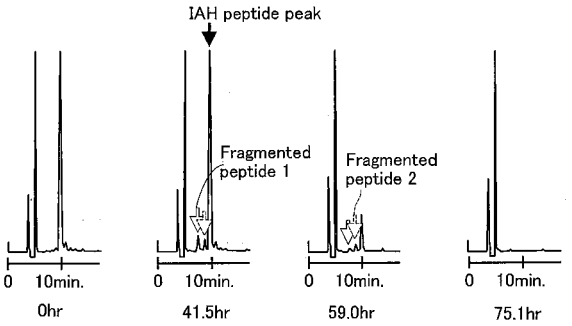
0.8μM HA1-1 L + 140μM IAH peptide

【図１７】



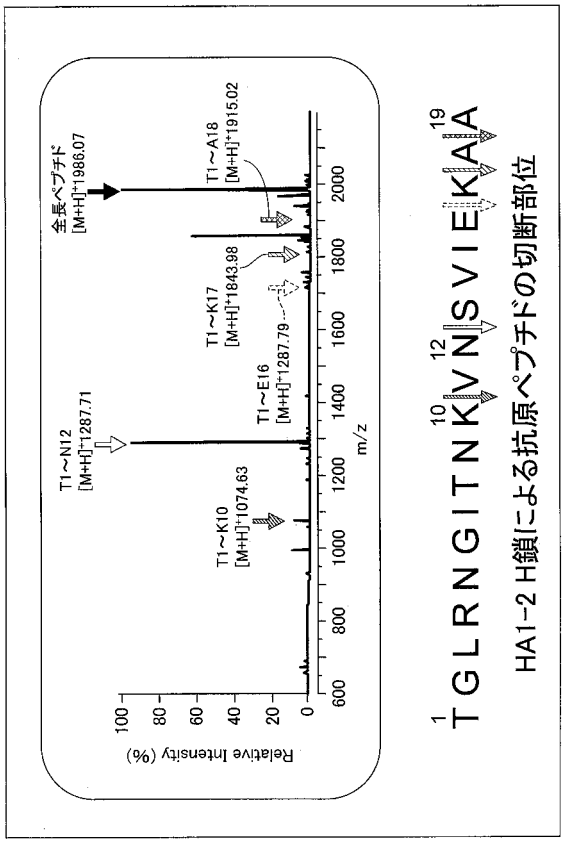
0.4μM HA1-2 H + 140μM IAH peptide

【図１８】

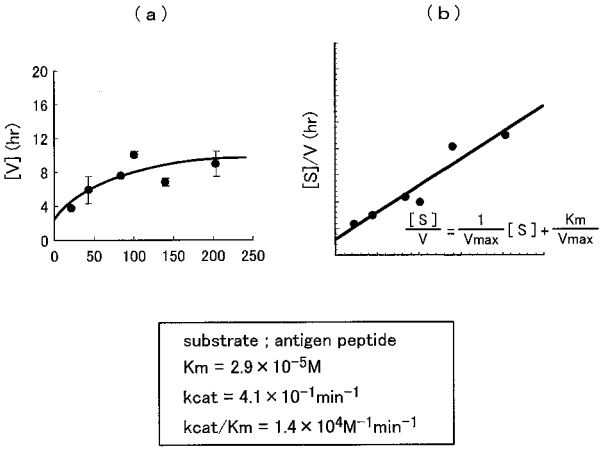


0.8μM HA1-2 L + 140μM IAH peptide

【図１９】



【図２０】



【図２６】

(a)

HA1-1-H

QVQLQQSGPQLVRPGASVKISCKTSGYSFTTYWMHWVKQRPGQGLDWIGMIDPSESETRLNQKFKDKATL
CDR1 CDR2

TVDKSSSTADMQLSSPTSEDSAVYYCASYEGYWGQGTLVTVS
CDR3

(b)

HA1-1-L

DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLLNSRTRKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASARESGVPDRFTG
CDR1 CDR2

SGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCKQSYTLTWTFGGGTKVEIKRA
CDR3

【図２７】

(a)

HA1-2-H

QVQLQQSGPHLVRPGTSVRISCKASGYSFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGMIAPSDSETGLNQKFKDKATL
CDR1 CDR2

TVDKSSSTAYIQLSSPTSEDSAVYYCASYEAYWGQGTLVTVS
CDR3

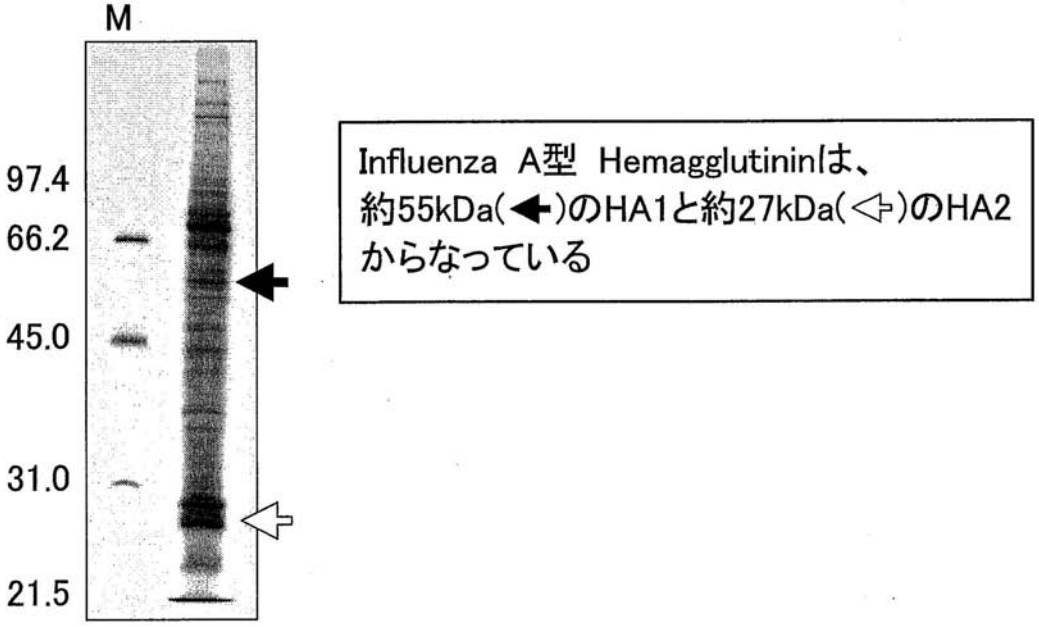
(b)

HA1-2-L

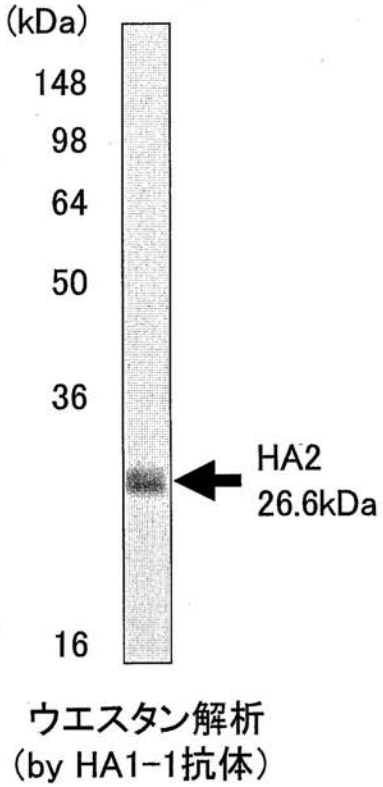
DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLNSRARKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTG
CDR1 CDR2

SGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCKQSYNVTWTFGGGTKLEIKRA
CDR3

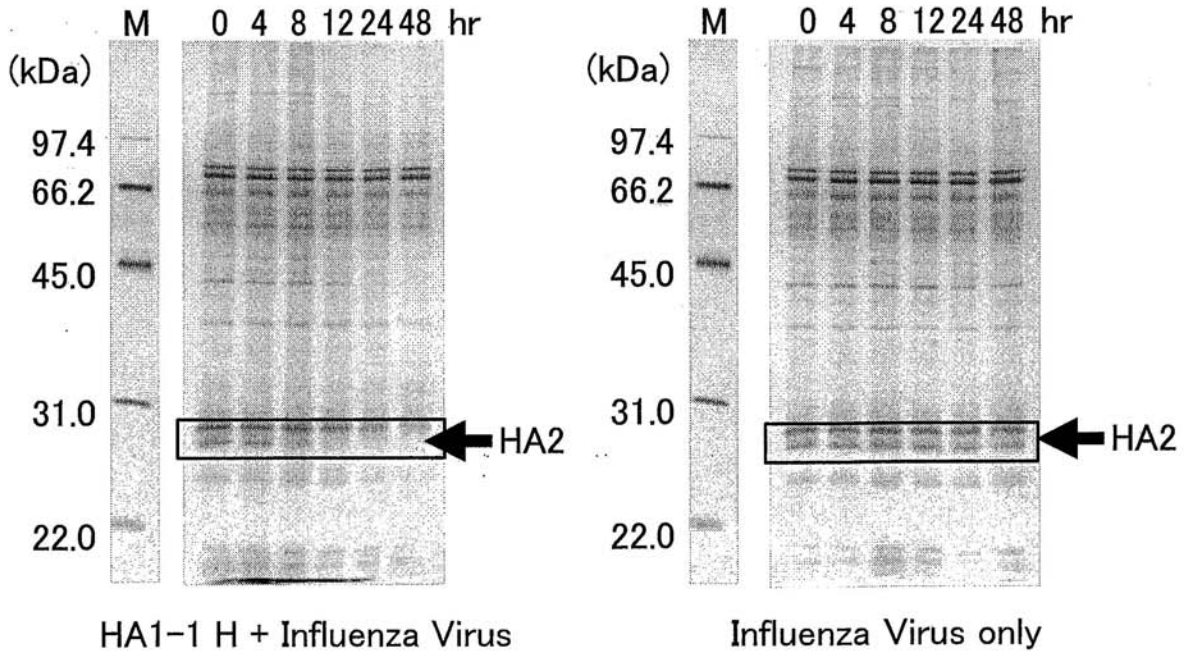
【図２１】


M
97.4
66.2
45.0
31.0
21.5
Influenza A型 Hemagglutininは、
約55kDa(◀)のHA1と約27kDa(⇦)のHA2
からなっている

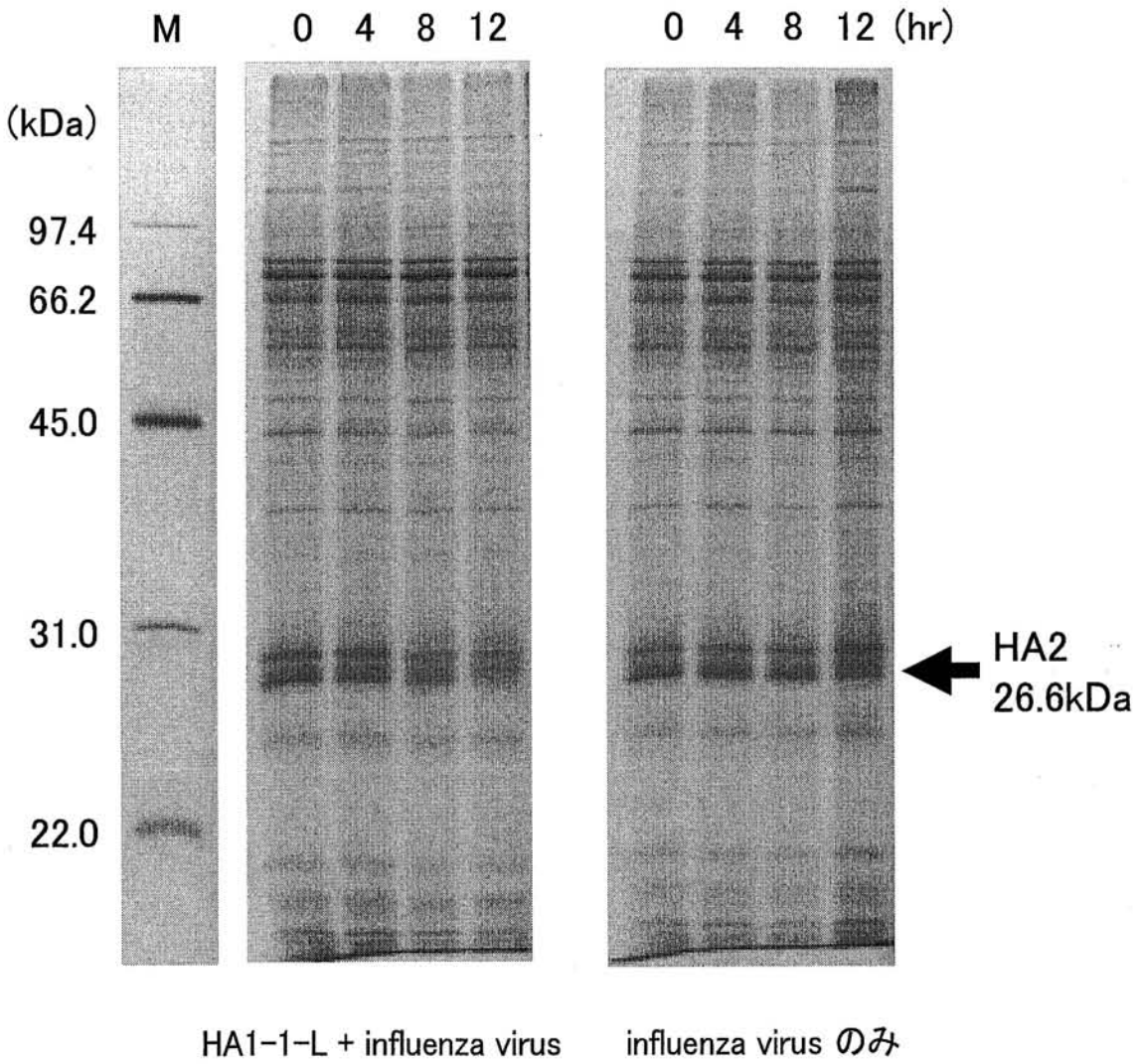
【図２２】


(kDa)
148
98
64
50
36
16
HA2
26.6kDa
ウエスタン解析
(by HA1-1抗体)

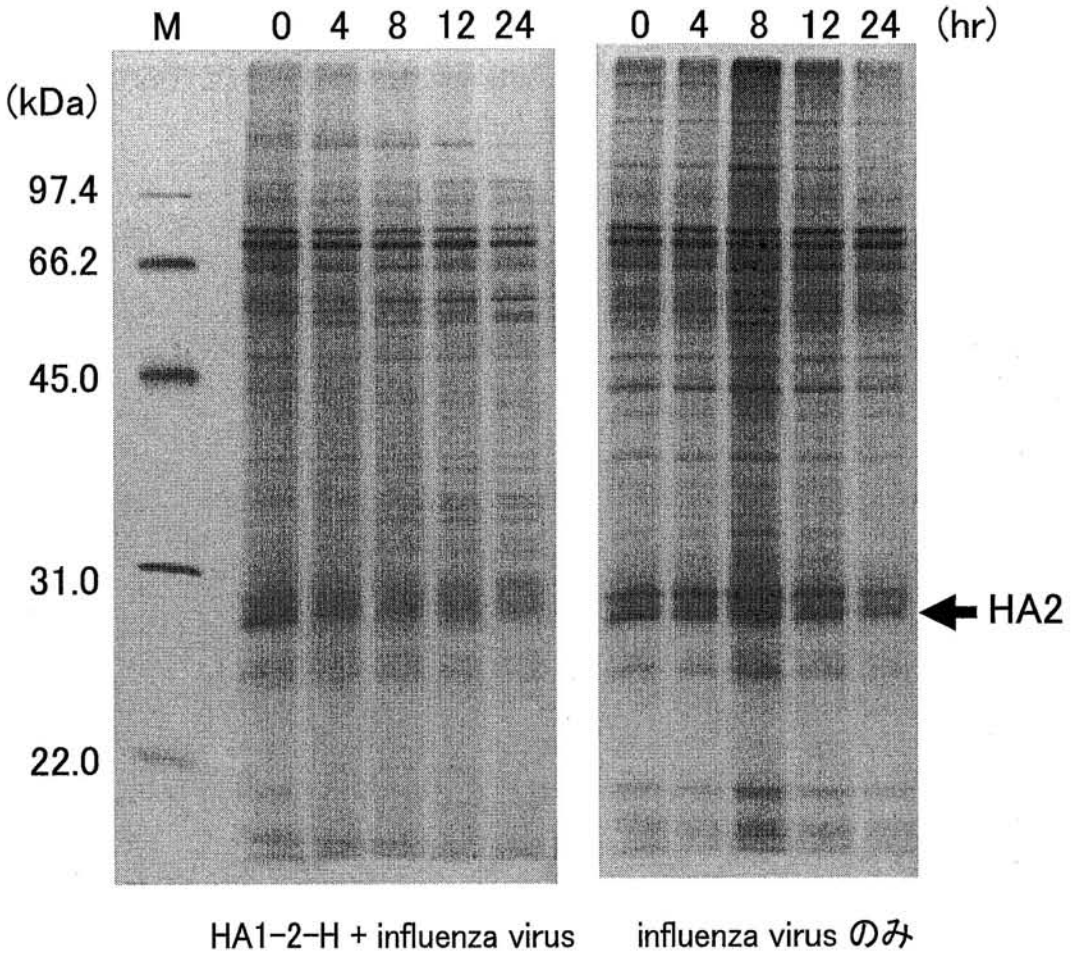
【図２３】


M
0 4 8 12 24 48 hr
(kDa)
97.4
66.2
45.0
31.0
22.0
HA2
HA1-1 H + Influenza Virus
M
0 4 8 12 24 48 hr
(kDa)
97.4
66.2
45.0
31.0
22.0
HA2
Influenza Virus only

【図２４】


M
0 4 8 12
0 4 8 12 (hr)
(kDa)
97.4
66.2
45.0
31.0
22.0
HA2
26.6kDa
HA1-1-L + influenza virus
influenza virus のみ

【図２５】


M
0 4 8 12 24
0 4 8 12 24 (hr)
(kDa)
97.4
66.2
45.0
31.0
22.0
HA2
HA1-2-H + influenza virus
influenza virus のみ

【配列表】

2006347922000001.app

フロントページの続き

Ｆターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 CE04 CE12 DA01
4H045 AA11 BA10 CA01 DA76 DA89 EA29 FA72 FA74 GA06 GA26