



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102712923 A

(43) 申请公布日 2012. 10. 03

(21) 申请号 201080059844. 3

代理人 杨青 穆德骏

(22) 申请日 2010. 12. 28

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

2009-296706 2009. 12. 28 JP

C12N 15/09 (2006. 01)

A61K 39/395 (2006. 01)

A61P 13/12 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 06. 28

A61P 37/02 (2006. 01)

C07K 16/42 (2006. 01)

(86) PCT申请的申请数据

PCT/JP2010/073737 2010. 12. 28

C07K 16/46 (2006. 01)

C12N 1/15 (2006. 01)

(87) PCT申请的公布数据

W02011/081189 JA 2011. 07. 07

C12N 1/19 (2006. 01)

C12N 1/21 (2006. 01)

C12N 5/10 (2006. 01)

(83) 生物保藏信息

FERM BP-11214 2009. 12. 18

FERM BP-11215 2009. 12. 18

FERM BP-11216 2009. 12. 18

C12N 15/02 (2006. 01)

C12P 21/08 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

(71) 申请人 协和发酵麒麟株式会社

地址 日本东京都

(72) 发明人 金子悦士 佐佐木由香 森胜弘

神田丰 佐藤光男

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限

责任公司 11219

权利要求书 2 页 说明书 42 页

序列表 11 页 附图 12 页

(54) 发明名称

抗 IgA1 抗体

(57) 摘要

本发明的目的在于提供一种对 IgA 肾病的诊断有效的单克隆抗体,其特异性识别并结合由免疫球蛋白 A1 的重链基因编码的多肽的铰链区,所述铰链区包含未结合半乳糖的丝氨酸苏氨酸连接型糖链。根据本发明,能够提供一种单克隆抗体或该抗体片段,其特异性识别并结合由免疫球蛋白 A1 的重链基因编码的多肽的铰链区,所述铰链区包含未结合半乳糖的丝氨酸苏氨酸连接型糖链;并且能够提供使用该抗体或抗体片段的诊断剂以及含有该抗体或抗体片段作为有效成分的治疗剂。

CN 102712923 A

1. 一种单克隆抗体或该抗体片段,其特异性识别并结合由免疫球蛋白 A1 的重链基因编码的多肽(以下称为 IgA1 重链)的铰链区,所述铰链区包含未结合半乳糖的丝氨酸/苏氨酸连接型糖链(以下称为 O 连接型糖链)。

2. 一种单克隆抗体或该抗体片段,其不识别结合有 O 连接型糖链的由 IgA1 重链基因编码的多肽的铰链区中包含结合有半乳糖的 O 连接型糖链的 IgA1 重链的铰链区,而识别并结合包含未结合半乳糖的 O 连接型糖链的 IgA1 重链的铰链区。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的单克隆抗体或该抗体片段,其中,未结合半乳糖的 O 连接型糖链为选自 α -N-乙酰半乳糖胺-丝氨酸/苏氨酸(以下称为 Tn 抗原)或涎酸化 Tn 抗原中的至少一种 O 连接型糖链。

4. 如权利要求 3 所述的单克隆抗体或该抗体片段,其中,未结合半乳糖的 O 连接型糖链为 Tn 抗原。

5. 如权利要求 1~4 中任一项所述的单克隆抗体或该抗体片段,其中,单克隆抗体为特异性识别并结合包含序列号 1 表示的氨基酸序列的 IgA1 重链的铰链区的抗体。

6. 如权利要求 1~4 中任一项所述的单克隆抗体或该抗体片段,其中,单克隆抗体为特异性识别并结合包含序列号 1 表示的氨基酸序列的 IgA1 重链的铰链区多肽的抗体,并且,所述铰链区多肽是在选自从该多肽的氨基末端起第 3 位的苏氨酸、第 6 位的苏氨酸、第 8 位的丝氨酸、第 10 位的丝氨酸、第 14 位的苏氨酸中的至少一个氨基酸残基上结合有不具有半乳糖的 N-乙酰半乳糖胺的糖肽。

7. 如权利要求 1~4 中任一项所述的单克隆抗体或该抗体片段,其中,单克隆抗体是对包含未结合半乳糖的 O 连接型糖链的补体 C1 抑制物不显示交叉反应性的单克隆抗体。

8. 如权利要求 1~4 中任一项所述的单克隆抗体或该抗体片段,其中,单克隆抗体是在向包含未结合半乳糖的 O 连接型糖链的 IgA1 重链的铰链区上结合时与选自单克隆抗体 KM4137、KM4140、KM4144 中的至少一种单克隆抗体发生竞争反应的单克隆抗体。

9. 如权利要求 1~4 中任一项所述的单克隆抗体或该抗体片段,其中,单克隆抗体是与选自单克隆抗体 KM4137、KM4140、KM4144 中的至少一种单克隆抗体所结合的、存在于包含未结合半乳糖的 O 连接型糖链的 IgA1 重链的铰链区的表位进行结合的单克隆抗体。

10. 如权利要求 1~9 中任一项所述的抗体或抗体片段,其中,单克隆抗体是由选自杂交瘤 KM4137(FERM BP-11214)、KM4140(FERM BP-11215)、KM4144(FERM BP-11216)中的至少一种杂交瘤生产的单克隆抗体。

11. 如权利要求 1~9 中任一项所述的抗体或该抗体片段,其中,单克隆抗体为基因重组抗体。

12. 如权利要求 11 所述的基因重组抗体或该抗体片段,其中,基因重组抗体为选自人嵌合抗体、人源化抗体和人抗体中的抗体。

13. 如权利要求 1~12 中任一项所述的抗体片段,其中,抗体片段为选自 Fab、Fab'、F(ab')₂、单链抗体(scFv)、二聚体化 V 区(双价抗体)、二硫键稳定的 V 区(dsFv)和包含 CDR 的肽中的抗体片段。

14. 一种杂交瘤,其生产权利要求 1~9 中任一项所述的单克隆抗体。

15. 一种 DNA,其编码权利要求 1~13 中任一项所述的抗体或该抗体片段。

16. 一种重组载体,其含有权利要求 15 所述的 DNA。

17. 一种转化株,其通过将权利要求 16 所述的重组载体导入宿主细胞中而得到。
18. 一种抗体或该抗体片段的制造方法,用于制造权利要求 1~13 中任一项所述的抗体或该抗体片段,其特征在于,将权利要求 14 所述的杂交瘤或权利要求 17 所述的转化株在培养基中进行培养,在培养物中生成并蓄积权利要求 1~13 中任一项所述的抗体或该抗体片段,并从该培养物中收集抗体或该抗体片段。
19. 一种 IgA1 的免疫学检测或测定方法,所述 IgA1 具有包含未结合半乳糖的 O 连接型糖链的铰链区,所述方法中,使用权利要求 1~13 中任一项所述的抗体或该抗体片段。
20. 一种 IgA1 的检测试剂,所述 IgA1 具有包含未结合半乳糖的 O 连接型糖链的铰链区,所述检测试剂中,使用权利要求 1~13 中任一项所述的抗体或该抗体片段。
21. 一种 IgA1 相关疾病的诊断剂,所述 IgA1 具有包含未结合半乳糖的 O 连接型糖链的铰链区,所述诊断剂中,使用权利要求 1~13 中任一项所述的抗体或该抗体片段。
22. 如权利要求 21 所述的诊断剂,其中,与具有包含未结合半乳糖的 O 连接型糖链的铰链区的 IgA1 相关的疾病为自身免疫疾病。
23. 如权利要求 21 所述的诊断剂,其中,与具有包含未结合半乳糖的 O 连接型糖链的铰链区的 IgA1 相关的疾病为 IgA 肾病。
24. 一种 IgA1 相关疾病的治疗剂,所述 IgA1 具有包含未结合半乳糖的 O 连接型糖链的铰链区,所述治疗剂中,含有权利要求 1~13 中任一项所述的抗体或抗体片段作为有效成分。
25. 如权利要求 24 所述的治疗剂,其中,与具有包含未结合半乳糖的 O 连接型糖链的铰链区的 IgA1 相关的疾病为自身免疫疾病。
26. 如权利要求 24 所述的治疗剂,其中,与具有包含未结合半乳糖的 O 连接型糖链的铰链区的 IgA1 相关的疾病为 IgA 肾病。
27. 一种 IgA1 相关疾病的诊断方法,所述 IgA1 具有包含未结合半乳糖的 O 连接型糖链的铰链区,所述诊断方法包括:使用权利要求 1~13 中任一项所述的抗体或该抗体片段,对具有包含未结合半乳糖的 O 连接型糖链的铰链区的 IgA1 进行检测或测定。
28. 如权利要求 27 所述的诊断方法,其中,与具有包含未结合半乳糖的 O 连接型糖链的铰链区的 IgA1 相关的疾病为自身免疫疾病。
29. 如权利要求 27 所述的诊断方法,其中,与具有包含未结合半乳糖的 O 连接型糖链的铰链区的 IgA1 相关的疾病为 IgA 肾病。
30. 权利要求 1~13 中任一项所述的抗体或该抗体片段在制造 IgA1 相关疾病的治疗剂中的应用,所述 IgA1 具有包含未结合半乳糖的 O 连接型糖链的铰链区。
31. 如权利要求 30 所述的抗体或该抗体片段的应用,其中,与具有包含未结合半乳糖的 O 连接型糖链的铰链区的 IgA1 相关的疾病为自身免疫疾病。
32. 如权利要求 30 所述的抗体或该抗体片段的应用,其中,与具有包含未结合半乳糖的 O 连接型糖链的铰链区的 IgA1 相关的疾病为 IgA 肾病。

抗 IgA1 抗体

技术领域

[0001] 本发明涉及一种单克隆抗体或该抗体片段,其特异性识别并结合由免疫球蛋白 A1 的重链基因编码的多肽的铰链区,所述铰链区包含未结合半乳糖的丝氨酸苏氨酸连接型糖链;并且涉及产生该抗体的杂交瘤、编码该抗体的 DNA、含有该 DNA 的载体、对该载体进行转化而得到的转化体、使用该杂交瘤或转化体的抗体或该抗体片段的制造方法、使用该抗体或抗体片段的诊断剂以及含有该抗体或抗体片段作为有效成分的治疗剂。

背景技术

[0002] 近年来,报道了如下实例:伴随着各种疾病的发病和病情的发展,附加在与该疾病和病情相关的细胞所表达的蛋白质上的糖链结构发生变化。该实例中,具有代表性的是在超过 80% 的人类癌症种类中观察到表达的、作为 O 连接型(丝氨酸苏氨酸型)糖链抗原之一的 Tn 抗原(汤姆森(Thomsen)抗原、CD175 抗原)和在该 Tn 抗原上附加有涎酸的涎酸化 Tn 抗原(CD175s 抗原)的表达(非专利文献 2)。已知这些糖链抗原在正常细胞中几乎观察不到表达,并且正在进行将其作为癌特异性疫苗疗法的靶分子应用于医疗的研究(非专利文献 1)。这些癌特异性糖链抗原的表达通过生物体内存在的构成复杂的糖链生物合成途径和糖链代谢途径的酶活性来进行调控。作为其中一例,已知如下例子:在癌细胞中,编码参与糖链生物合成途径的蛋白质的基因的表达方式发生变化,结果,糖链生物合成途径在中途被阻断;等。Tn 抗原作为正常细胞中的 O 连接型糖链的生物合成途径的中间产物而已知,其具有:在蛋白质氨基酸序列中的特定的丝氨酸(Ser)残基或苏氨酸(Thr)残基的侧链中存在的羟基上具有 α 连接的 N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)的结构(GalNAc α -Ser/Thr)。利用核心 1 β 3 半乳糖转移酶(core1 β 3Gal-T, T-合成酶)的活性在该 Tn 抗原的非还原末端侧附加一分子半乳糖,由此进行 TF 抗原(汤姆森-弗里登雷克(Thomsen-Friedenreich)抗原、CD176 抗原)等正常型 O 连接型糖链的生物合成。认为在多种癌细胞系中,细胞内的核心 1 β 3 半乳糖转移酶的活性降低,结果,糖链的生物合成途径被阻断,从而表达 Tn 抗原或涎酸化 Tn 抗原。癌细胞内核心 1 β 3 半乳糖转移酶的活性降低的机制较复杂,直到目前也没有完全弄清楚。但是,作为其机制之一,推测为如下机制:编码核心 1 β 3 半乳糖转移酶的活性表达所需的特定的伴侣蛋白(Cosmc)的基因发生了突变,结果,细胞内的核心 1 β 3 半乳糖转移酶活性大幅度降低(非专利文献 6)。由于在多个癌症种类中共同地观察到 Tn 抗原的表达,因此认为细胞内的糖链生物合成途径和糖链代谢途径中的异常是使附加在该细胞内表达的大量不同糖蛋白质上的糖链结构产生共同变化的主要原因。

[0003] 已知糖链结构的变化与病情的发展密切相关的代表性的疾病为癌症。此外,除了癌症以外,作为已知糖链结构的变化与病情的发展密切相关的疾病,已知有 IgA 肾病。IgA 肾病是以作为免疫球蛋白之一的免疫球蛋白 A(IgA) 颗粒状沉积在肾小球的系膜区的病理所见为特征的慢性肾小球肾炎,于 1968 年由 Berger 首次报道(非专利文献 2)。该疾病是在日本国内的慢性肾小球肾炎患者中约占半数的代表性的肾炎。据称约四成被诊断为 IgA 肾病的患者在随后 20 年以内发展成晚期肾衰竭,因而不得不进行人工透析或肾移植。由此

可见,虽然 IgA 肾病普遍被认为是预后不良的疾病,但在临床上尚未建立有效性得到证明的治疗方法。在 IgA 肾病的患者体内,已知两种 IgA 同种型 (IgA1 和 IgA2) 中主要是 IgA1 沉积于肾脏。此外,作为该沉积的原因之一,有如下报道:人 IgA1 分子中特异性存在的、附加于铰链区的 O 连接型糖链的结构从正常型变成 Tn 抗原或涎酸化 Tn 抗原(非专利文献 3、非专利文献 4)。已证明,当附加于 IgA1 铰链区的 O 连接型糖链缺失半乳糖而变成 Tn 抗原或涎酸化 Tn 抗原时,IgA1 分子的自身凝集能力亢进,与特异性识别该糖链缺陷型 IgA1 的自身抗体结合而形成免疫复合物,并且,形成凝集体或免疫复合物后的 IgA1 分子避开通常的循环血液中的清除机制而沉积在肾系膜区(非专利文献 5)。进而报道了:在从 IgA 肾病患者分离出的产生 IgA 的细胞中,因 Cosmc 的表达量降低而导致核心 1 β 3 半乳糖转移酶活性降低(非专利文献 6)。即,在 IgA 肾病患者体内的产生 IgA 的细胞中,糖链生物合成途径在中途被阻断,结果,不能产生具有正常型糖链的 IgA1,取而代之,产生糖链缺陷型 IgA1。作为 IgA 肾病的发病机制之一,提出了如下机制:包含该糖链缺陷型 IgA1 的复合物沉积在肾小球上,结果引发肾组织的炎症。

[0004] 一般而言,IgA 由血液或组织内的 B 细胞或由 B 细胞分化成的浆细胞产生。已知浆细胞是 B 细胞分化的最终阶段,分布于次级淋巴组织、全身的粘膜组织、骨髓等中并产生大量的抗体,而产生 IgA 的浆细胞主要分布于粘膜组织。另一方面还已知,在次级淋巴组织的生发中心,由获得高亲和性 IgA 抗体产生能力的 B 细胞克隆分化出记忆 B 细胞或浆细胞,并分布于全身的靶器官而长期持续地产生抗体。但尚未明确产生与 IgA 肾病的发病相关的糖链缺陷型 IgA 的细胞在 B 细胞分化过程的哪个阶段中产生以及产生糖链缺陷 IgA 的 B 细胞或浆细胞分布于体内的何种组织。

[0005] 已知约半数的 IgA 肾病患者血中 IgA 值升高(非专利文献 7)。而且已知,作为在 IgA 肾病患者中共同观察到的现象,在末梢血或尿液等体液以及肾小球中检测到一般在健康人中观察不到的糖链缺陷型 IgA1(非专利文献 8)。如上所述,该糖链缺陷型 IgA1 即半乳糖缺失型 IgA1 是促进 IgA 肾病的病情发展的因素,但近年来查明,在除 IgA 肾病以外的几种人类疾病例如作为过敏性疾病的过敏性紫癜(Henoch-Schonlein purpura)、作为自身免疫疾病的系统性红斑狼疮或作为癌症的 IgA1 型骨髓瘤的一部分疾病中,该糖链缺陷型 IgA1 的出现和在肾脏的蓄积也导致肾功能的降低(非专利文献 8)。基于上述背景,糖链缺陷型 IgA1 作为以 IgA 肾病为代表的特定的人类疾病的生物标志物例如诊断生物标志物、预测生物标志物或药效动力学生物标志物正逐渐被人们所认识。

[0006] 人 IgA1 的铰链区很难以 IgA1 重链多肽的氨基酸序列号的形式来严格地定义。一般是指构成 IgA1 分子的重链多肽中位于 CH1 结构域与 CH2 结构域之间的区域。在构成普通的分泌型人 IgA1 分子的重链多肽(序列号 2)中,多指从 N 末端起第 223 位的脯氨酸开始至第 240 位的丝氨酸或第 241 位的半胱氨酸为止的区域。该区域也称为 IgA1 铰链区核心肽。在迄今为止的研究中,已鉴定出该区域中附加有 O 连接型糖链的氨基酸残基,已知有第 225 位的苏氨酸、第 228 位的苏氨酸、第 230 位的丝氨酸、第 232 位的丝氨酸、第 236 位的苏氨酸共五处。另外,已知 N 连接型糖链不与铰链区结合,而与构成 IgA1 分子的重链多肽中第 263 位的天冬酰胺和第 459 位的天冬酰胺结合。

[0007] 作为现行的 IgA 肾病确诊法的肾活检(活组织检查)是给患者带来精神上的痛苦、肾周围出血的风险以及住院数天所产生的经济负担的方法。到目前为止,已研究了儿

以直接检测糖链缺陷型 IgA1 并进行分析为目的的实验方法。使用识别并结合 Tn 型糖链或涎酸化 Tn 型糖链的凝集素例如长柔毛野豌豆 (*Vicia villosa*) 来源的凝集素、大果瓦泰豆 (*Vatairea macrocarpa*) 来源的凝集素、大豆来源的凝集素、散大蜗牛 (*Helix aspersa*) 来源的凝集素或树锦鸡儿 (*Caragana arborescens*) 来源的凝集素等的 ELISA 法或蛋白免疫印迹法等免疫学方法是简易的方法之一 (非专利文献 9), 但由于这些凝集素具有仅识别糖链结构并与其并结合的性质, 因此, 存在与人来源试样等样品中含有的、IgA1 以外的具有 O 连接型糖链的糖蛋白 (粘蛋白类、补体 C1 抑制物等) 也非选择性地结合的问题。另外, 使用抗 Tn 单克隆抗体例如 MLS128、22-1-1、HB Tn1 或 Bric111 等的 ELISA 或免疫蛋白印迹等免疫学方法也是简易的方法之一, 但与上述凝集素法同样地存在特异性低的问题 (非专利文献 10)。另一方面, 将利用聚糖酶或肽酶等各种酶对从人来源试样等样品中纯化提取出的 IgA1 进行处理而得到的糖链和糖肽的混合物通过基质辅助激光解吸电离串联飞行时间质谱仪 (MALDI-TOF MS) 等进行分析的方法具有特异性和检测灵敏度较高的优点 (非专利文献 11)。但是, 该方法需要蛋白质的纯化、酶处理、装置分析的工序, 因而难以称其为简易, 而且存在定量性差的问题。由此可见, 尚未获知能够特异性地、简易且定量性地检测或测定人来源试样等样品中含有的糖链缺陷 IgA1 的方法。另外, 虽然认为上述产生糖链缺陷型 IgA1 的细胞在其细胞内或细胞表面表达或蓄积糖链缺陷型 IgA1, 但尚未获知能够特异性地且简易地检测这种细胞的方法。

[0008] 比企等人的方法 (专利文献 1) 中, 首先, 在固定有识别作为正常型 O 连接型糖链的 TF 抗原 (汤姆森-弗里登雷克 (Thomsen-Friedenreich) 抗原、CD176 抗原) 的植物凝集素木菠萝凝集素的 ELISA 板上捕获正常型 IgA1, 制作 ELISA 板。接着, 从患者来源的试样中纯化出 IgA1, 将其用生物素等标记后添加到该 ELISA 板上, 利用与预先捕获在板上的正常型 IgA1 的自身凝集反应而使糖链缺陷型 IgA1 结合到板上。该方法的问题在于定量性差。这是因为, 尚未明确 IgA1 铰链区的糖链缺陷的程度与自身凝集性的强度之间的相关性, 而且不能排除由标记引起的患者来源的 IgA1 的变性给凝集性带来的影响。另外, 由于需要从试样中纯化出 IgA1, 因此, 不得不在简易性方面也存在问题的方法。

[0009] 成田等人的方法 (专利文献 2) 无需对患者来源的 IgA1 进行纯化分离, 因此是比上述方法更简易的方法。该方法为如下方法: 制作固定有链球菌来源的 IgA 结合肽 SAP 的 ELISA 板, 向该板上添加患者来源的试样, 从而将 IgA 捕获到板上; 然后, 添加识别 N-乙酰半乳糖胺的植物凝集素 (长柔毛野豌豆 B4 凝集素; VVL) 的标记物, 由此检测糖链缺陷型 IgA1。但是, VVL 除了与丝氨酸/苏氨酸上 α 连接的 N-乙酰半乳糖胺结合以外, 还与 N 连接型糖链中含有的半乳糖的非还原末端上 β 连接的 N-乙酰半乳糖胺结合, 因此, 该成田等人的方法不是特异性检测 IgA1 铰链区的 O 连接型糖链的结构变化的方法。比企等人的另一方法 (专利文献 3) 为如下方法: 使患者来源的血清在填充有木菠萝凝集素琼脂糖的层析柱上通过而分离出 IgA1, 然后将该 IgA1 固定在 ELISA 板上, 接着, 向该 ELISA 板上添加针对具有 IgA1 铰链区的氨基酸序列的合成肽 (PVPSTPPTSPSTPPTSPSPS) 的兔来源多克隆抗体, 最后, 使用标记的抗兔 IgG 抗体进行检测。该方法是对患者来源的血清中含有的、完全缺失铰链区的 O 型糖链的 IgA1 进行检测的方法, 而不是对铰链区具有 Tn 型糖链的糖链缺陷型 IgA1 进行特异性检测的方法。另外, 由于 IgA1 的纯化中使用作为 TF 抗原特异性凝集素的木菠萝凝集素, 因此, 使患者血清中含有的糖链缺陷型 IgA1 的回收不完全。

[0010] 虽然不是直接检测糖链缺陷型 IgA1 的方法,但也进行了尝试利用 ELISA 法分析患者来源的试样来诊断 IgA 肾病的研究。日本专利第 4197393 号中记载的方法为如下方法:制作固定有将具有 IgA1 铰链区的氨基酸序列的合成肽 (PVPSTPPTPSPSTPPTPSPSC) 与牛血清白蛋白连接而制成的蛋白质的 ELISA 板,并向该 ELISA 板上添加患者来源的试样。该方法中,通过将 IgA1 铰链区特异性结合的自身抗体 (IgG 型) 捕获到板上并最后添加抗人 IgG 抗体的标记物,能够检测该自身抗体。但是,该方法中,仅能检测不与铰链区具有 Tn 型糖链的 IgA1 结合而与完全缺失铰链区的 O 型糖链的 IgA1 结合的 IgG 型自身抗体。

[0011] 作为特异性识别 IgA1 的单克隆抗体,报道了:通过对小鼠进行人 IgA1 重链蛋白质免疫而得到的 B3506B4 抗体或者通过对小鼠进行人母乳来源的 IgA1 免疫而得到的 3C10 抗体等 (非专利文献 12)。

[0012] B3506B4 抗体或 3C10 抗体对正常糖链型 IgA1 也具有亲和性。到目前为止,尚未获知特异性识别包含未结合半乳糖的 O 连接型糖链的 IgA1 分子的抗体。

[0013] 普遍已知在对人施用非人抗体例如小鼠抗体等时,其作为异物而被识别,由此在人体内诱导出抗小鼠抗体的人抗体 (人抗小鼠抗体, Human Anti Mouse Antibody ;HAMA)。已知 HAMA 与所施用的小鼠抗体反应而引起副作用 (非专利文献 13~16),或者,加快小鼠抗体在体内的消失 (非专利文献 17~19),降低小鼠抗体的治疗效果 (非专利文献 20、21)。

[0014] 为了解决上述问题,正在尝试利用基因重组技术由非人抗体制作人嵌合抗体和人源化抗体。

[0015] 人源化抗体与小鼠抗体等非人抗体相比,在对人进行施用的方面具有多个优点。例如,据报道,在使用猴进行的实验中,与小鼠抗体相比,其免疫原性降低,血中半衰期延长 (非专利文献 22、非专利文献 23)。即,人源化抗体与非人抗体相比,对人产生的副作用少,并可以期待其治疗效果长期持续。

[0016] 另外,由于人源化抗体利用基因重组技术来制作,因此,能够制作成多种形式的分子。例如,使用 $\gamma 1$ 亚类作为人抗体的重链 (以下记为 H 链) 恒定区 (以下记为 C 区) (将 H 链 C 区记为 CH) 时,能够制作抗体依赖性细胞毒活性 (以下记为 ADCC 活性) 等效功能高的人源化抗体 (非专利文献 24),并且,可以期待其血中半衰期比小鼠抗体延长 (非专利文献 25)。特别是在将细胞表面上表达 Tn 抗原型 IgA1 的产生 Tn 抗原型 IgA1 的细胞从人体内除去的治疗中,为了通过抗体使效应细胞蓄积在靶细胞的附近而对靶细胞进行特异性杀伤,抗体的 Fc 段 (抗体重链的铰链区以后的区域) 介导的补体依赖性细胞毒活性 (以下记为 CDC 活性) 或 ADCC 活性等细胞毒活性是很重要的。在人的治疗中,为了发挥细胞毒活性,优选使用人嵌合抗体、人源化抗体或人源化抗体 (非专利文献 26、27)。

[0017] 而且,随着近来蛋白质工程、基因工程的进步,人源化抗体也可以制作成 Fab、Fab'、F(ab')₂、单链抗体 (以下记为 scFv) (非专利文献 28)、二聚体化 V 区片段 (以下记为双价抗体 (Diabody)) (非专利文献 29)、二硫键稳定的 V 区片段 (以下记为 dsFv) (非专利文献 30)、包含 CDR 的肽 (非专利文献 31) 等小分子量的抗体片段,这些抗体片段与完整的抗体分子相比,向靶组织的移行性更优良 (非专利文献 32)。

[0018] 现有技术文献

[0019] 专利文献

[0020] 专利文献 1:日本特开平 9-311132 号公报

- [0021] 专利文献 2 :日本特开 2007-24661 号公报
- [0022] 专利文献 3 :日本特开平 10-111290 号公报
- [0023] 非专利文献
- [0024] 非专利文献 1 :Crit Rev Oncog. , 6, 57(1995)
- [0025] 非专利文献 2 :J Urol Nephrol. , 74, 694(1968)
- [0026] 非专利文献 3 :Clin Exp Immunol. , 100, 470(1995)
- [0027] 非专利文献 4 :J Am Soc Neph. , 7, 955(1996)
- [0028] 非专利文献 5 :Nephrol Dial Transplant. , 17, 50(2002)
- [0029] 非专利文献 6 :J Intern Med. , 258, 467(2005)
- [0030] 非专利文献 7 :日本腎臟学会誌 , 44(7) , 514-523(2002)
- [0031] 非专利文献 8 :Seminars in Nephrolog, 28(1), 78(2008)
- [0032] 非专利文献 9 :JBC 282, 28256, 2007;Kidney Int. , 1997, 52:509
- [0033] 非专利文献 10 :Chem Bio Chem, 6, 2229(2005)
- [0034] 非专利文献 11 :Carbohydrate Research, 339(13), 2329-2355(2004)
- [0035] 非专利文献 12 :Clinical&Experimental Immunology, 79(1), 35-40(1990)
- [0036] 非专利文献 13 :Hum. Pathol. , 38, 564(2007)
- [0037] 非专利文献 14 :Hum. Pathol. , 36, 886(2005)
- [0038] 非专利文献 15 :FEBS Lett. , 579, 6179(2005)
- [0039] 非专利文献 16 :Cancer Res. , 65, 7378(2005)
- [0040] 非专利文献 17 :Hum. Pathol. , 36, 886(2005)
- [0041] 非专利文献 18 :Oncogene, 13, 2328(2006)
- [0042] 非专利文献 19 :Virchows Arch. , 448, 52(2006)
- [0043] 非专利文献 20 :J. Immunol. , 135, 1530(1985)
- [0044] 非专利文献 21 :Cancer Res. , 46, 6489(1986)
- [0045] 非专利文献 22 :Cancer Res. , 56, 1118(1996)
- [0046] 非专利文献 23 :Immunol. , 85, 668(1995)
- [0047] 非专利文献 24 :CancerRes. , 56, 1118(1996)
- [0048] 非专利文献 25 :Immunol. , 85, 668(1995)
- [0049] 非专利文献 26 :J. Immunol. , 144, 1382(1990)
- [0050] 非专利文献 27 :Nature, 322, 323(1988)
- [0051] 非专利文献 28 :Science, 242, 423(1988)
- [0052] 非专利文献 29 :Nature Biotechnol. , 15, 629(1997)
- [0053] 非专利文献 30 :Molecular Immunol. , 32, 249(1995)
- [0054] 非专利文献 31 :J. Biol. Chem. , 271, 2966(1996)
- [0055] 非专利文献 32 :Cancer Res. , 52, 3402(1992)

发明内容

- [0056] 发明所要解决的问题
- [0057] 本发明的目的在于提供特异性识别并结合包含未结合半乳糖的 O 连接型糖链的

IgA1 的单克隆抗体或该单克隆抗体的使用方法。

[0058] 需要特异性识别并结合包含未结合半乳糖的 O 连接型糖链的 IgA1 的单克隆抗体或该单克隆抗体的使用方法。

[0059] 用于解决问题的手段

[0060] 本发明涉及下述 (1)~(32) 项。

[0061] (1) 一种单克隆抗体或该抗体片段,其特异性识别并结合由免疫球蛋白 A1 的重链基因编码的多肽(以下称为 IgA1 重链)的铰链区,所述铰链区包含未结合半乳糖的丝氨酸/苏氨酸连接型糖链(以下称为 O 连接型糖链)。

[0062] (2) 一种单克隆抗体或该抗体片段,其不识别结合有 O 连接型糖链的由 IgA1 重链基因编码的多肽的铰链区中包含结合有半乳糖的 O 连接型糖链的 IgA1 重链的铰链区,而识别并结合包含未结合半乳糖的 O 连接型糖链的 IgA1 重链的铰链区。

[0063] (3) 如 (1) 或 (2) 所述的单克隆抗体或该抗体片段,其中,未结合半乳糖的 O 连接型糖链为选自 α -N-乙酰半乳糖胺-丝氨酸/苏氨酸(以下称为 Tn 抗原)或涎酸化 Tn 抗原中的至少一种 O 连接型糖链。

[0064] (4) 如 (3) 所述的单克隆抗体或该抗体片段,其中,未结合半乳糖的 O 连接型糖链为 Tn 抗原。

[0065] (5) 如 (1)~(4) 中任一项所述的单克隆抗体或该抗体片段,其中,单克隆抗体为特异性识别并结合包含序列号 1 表示的氨基酸序列的 IgA1 重链的铰链区的抗体。

[0066] (6) 如 (1)~(4) 中任一项所述的单克隆抗体或该抗体片段,其中,单克隆抗体为特异性识别并结合包含序列号 1 表示的氨基酸序列的 IgA1 重链的铰链区多肽的抗体,并且,所述铰链区多肽是在选自从该多肽的氨基末端起第 3 位的苏氨酸、第 6 位的苏氨酸、第 8 位的丝氨酸、第 10 位的丝氨酸、第 14 位的苏氨酸中的至少一个氨基酸残基上结合有不具有半乳糖的 N-乙酰半乳糖胺的糖肽。

[0067] (7) 如 (1)~(4) 中任一项所述的单克隆抗体或该抗体片段,其中,单克隆抗体是对包含未结合半乳糖的 O 连接型糖链的补体 C1 抑制物不显示交叉反应性的单克隆抗体。

[0068] (8) 如 (1)~(4) 中任一项所述的单克隆抗体或该抗体片段,其中,单克隆抗体是在向包含未结合半乳糖的 O 连接型糖链的 IgA1 重链的铰链区上结合时与选自单克隆抗体 KM4137、KM4140、KM4144 中的至少一种单克隆抗体发生竞争反应的单克隆抗体。

[0069] (9) 如 (1)~(4) 中任一项所述的单克隆抗体或该抗体片段,其中,单克隆抗体是与选自单克隆抗体中的至少一种单克隆抗体所结合的、存在于包含未结合半乳糖的 O 连接型糖链的 IgA1 重链的铰链区的表位进行结合的单克隆抗体。

[0070] (10) 如 (1)~(9) 中任一项所述的单克隆抗体或抗体片段,其中,单克隆抗体是由选自杂交瘤 KM4137 (FERM BP-11214)、KM4140 (FERM BP-11215)、KM4144 (FERM BP-11216) 中的至少一种杂交瘤生产的单克隆抗体。

[0071] (11) 如 (1)~(9) 中任一项所述的单克隆抗体或该抗体片段,其中,单克隆抗体为基因重组抗体。

[0072] (12) 如 (11) 所述的基因重组抗体或该抗体片段,其中,基因重组抗体为选自人嵌合抗体、人源化抗体和人抗体中的抗体。

[0073] (13) 如 (1)~(12) 中任一项所述的抗体片段,其中,抗体片段为选自 Fab、Fab'、

F(ab')₂、单链抗体 (scFv)、二聚体化 V 区 (双价抗体)、二硫键稳定的 V 区 (dsFv) 和包含 CDR 的肽中的抗体片段。

[0074] (14) 一种杂交瘤,其生产 (1)~(9) 中任一项所述的单克隆抗体。

[0075] (15) 一种 DNA,其编码 (1)~(13) 中任一项所述的抗体或该抗体片段。

[0076] (16) 一种重组载体,其含有 (15) 所述的 DNA。

[0077] (17) 一种转化株,其通过将 (16) 所述的重组载体导入宿主细胞中而得到。

[0078] (18) 一种抗体或该抗体片段的制造方法,用于制造 (1)~(13) 中任一项所述的抗体或该抗体片段,其特征在于,将 (14) 所述的杂交瘤或 (17) 所述的转化株在培养基中进行培养,在培养物中生成并蓄积 (1)~(13) 中任一项所述的抗体或该抗体片段,并从该培养物中收集抗体或该抗体片段。

[0079] (19) 一种 IgA1 的免疫学检测或测定方法,所述 IgA1 具有包含未结合半乳糖的 O 连接型糖链的铰链区,所述方法中,使用 (1)~(13) 中任一项所述的抗体或该抗体片段。

[0080] (20) 一种 IgA1 的检测试剂,所述 IgA1 具有包含未结合半乳糖的 O 连接型糖链的铰链区,所述检测试剂中,使用 (1)~(13) 中任一项所述的抗体或该抗体片段。

[0081] (21) 一种 IgA1 相关疾病的诊断剂,所述 IgA1 具有包含未结合半乳糖的 O 连接型糖链的铰链区,所述诊断剂中,使用 (1)~(13) 中任一项所述的抗体或该抗体片段。

[0082] (22) 如 (21) 所述的诊断剂,其中,与具有包含未结合半乳糖的 O 连接型糖链的铰链区的 IgA1 相关的疾病为自身免疫疾病。

[0083] (23) 如 (21) 所述的诊断剂,其中,与具有包含未结合半乳糖的 O 连接型糖链的铰链区的 IgA1 相关的疾病为 IgA 肾病。

[0084] (24) 一种 IgA1 相关疾病的治疗剂,所述 IgA1 具有包含未结合半乳糖的 O 连接型糖链的铰链区,所述治疗剂中,含有 (1)~(13) 中任一项所述的抗体或抗体片段作为有效成分。

[0085] (25) 如 (24) 所述的治疗剂,其中,与具有包含未结合半乳糖的 O 连接型糖链的铰链区的 IgA1 相关的疾病为自身免疫疾病。

[0086] (26) 如 (24) 所述的治疗剂,其中,与具有包含未结合半乳糖的 O 连接型糖链的铰链区的 IgA1 相关的疾病为 IgA 肾病。

[0087] (27) 一种 IgA1 相关疾病的诊断方法,所述 IgA1 具有包含未结合半乳糖的 O 连接型糖链的铰链区,所述诊断方法包括:使用 (1)~(13) 中任一项所述的抗体或该抗体片段,对具有包含未结合半乳糖的 O 连接型糖链的铰链区的 IgA1 进行检测或测定。

[0088] (28) 如 (27) 所述的诊断方法,其中,与具有包含未结合半乳糖的 O 连接型糖链的铰链区的 IgA1 相关的疾病为自身免疫疾病。

[0089] (29) 如 (27) 所述的诊断方法,其中,与具有包含未结合半乳糖的 O 连接型糖链的铰链区的 IgA1 相关的疾病为 IgA 肾病。

[0090] (30) (1)~(13) 中任一项所述的抗体或该抗体片段在制造 IgA1 相关疾病的治疗剂中的应用,所述 IgA1 具有包含未结合半乳糖的 O 连接型糖链的铰链区。

[0091] (31) 如 (30) 所述的抗体或该抗体片段的应用,其中,与具有包含未结合半乳糖的 O 连接型糖链的铰链区的 IgA1 相关的疾病为自身免疫疾病。

[0092] (32) 如 (30) 所述的抗体或该抗体片段的应用,其中,与具有包含未结合半乳糖的

O 连接型糖链的铰链区的 IgA1 相关的疾病为 IgA 肾病。

[0093] 发明效果

[0094] 根据本发明,能够提供一种单克隆抗体,其特异性识别并结合由免疫球蛋白 A1 的重链基因编码的多肽的铰链区,所述铰链区包含未结合半乳糖的 O 连接型糖链。另外,根据本发明,能够提供与包含未结合半乳糖的 O 连接型糖链的、由免疫球蛋白 A1 的重链基因编码的多肽的铰链区相关的各种疾病的治疗剂或诊断剂。

附图说明

[0095] 图 1 是表示质粒 pCR2B8PVH 的构建流程的图。

[0096] 图 2 是表示质粒 pCRIgA 的构建流程的图。

[0097] 图 3 是表示质粒 pCRmIgA 的构建流程的图。

[0098] 图 4 是表示质粒 pCR2B8PmIgA 的构建流程的图。

[0099] 图 5 是表示质粒 pKAN932B8PVHmIgA 的构建流程的图。

[0100] 图 6 是表示 mIgA1-Fc 的 SDS 聚丙烯酰胺电泳的图。

[0101] 图 7 是通过 ELISA 法对 mIgA1-Fc 的 O 连接型糖链结构进行分析而得到的图。纵轴表示样品波长 415nm、参比波长 490nm 下的平均荧光强度 (OD415-OD490),凡例中的值表示竞争物质浓度 ($\mu\text{g/ml}$)。

[0102] 图 8 是通过 ELISA 法对建立的单克隆抗体的结合特异性进行分析而得到的图。纵轴为 ELISA 的吸光度,表示对栏外示出的各固定化抗原的结合性。

[0103] 图 9 是通过竞争 ELISA 法对建立的单克隆抗体的结合特异性进行分析而得到的图。上段中,Tn 抗原型人 IgA1 为竞争物质,下段中,人血浆来源的 IgA1 为竞争物质。纵轴表示吸光度,横轴表示竞争物质的浓度 ($\mu\text{g/ml}$)。

[0104] 图 10 是通过流式细胞术对建立的单克隆抗体的结合特异性进行分析而得到的图,上段为确认与表达 mIgA1 的 DG44 细胞株结合的图,下段为确认与表达 mIgA1 的 Lec8 细胞株结合的图。纵轴表示细胞数,横轴表示荧光强度。

[0105] 图 11 表示通过使用建立的单克隆抗体而构建的夹心 ELISA 法对糖链缺陷型 IgA1 进行定量而得到的结果。纵轴表示吸光度,横轴表示抗原的浓度 ($\mu\text{g/ml}$)。

[0106] 图 12 表示通过流式细胞术 (FCM) 测定 KM4137 (▲)、KM4140 (◆) 和 KM4144 (●) 对生物素标记的抗附加有 Tn 抗原的 mIgA 铰链肽单克隆抗体 KM4137(a)、KM4140(b) 或 KM4144(c) 与 Tn 抗原型人 IgA1 的结合的竞争抑制活性而得到的结果。纵轴表示样品波长 415nm、参比波长 490nm 下的平均荧光强度 (OD415-OD490),横轴表示竞争物质浓度 ($\mu\text{g/ml}$)。

具体实施方式

[0107] 本发明涉及一种单克隆抗体,其特异性识别并结合由免疫球蛋白 A1 的重链基因编码的多肽的铰链区,所述铰链区包含未结合半乳糖的 O 连接型糖链。作为免疫球蛋白 A1 的重链基因,只要是编码免疫球蛋白 A1 的重链的基因则均可,作为一例,可以列举包含编码分泌型免疫球蛋白 A1 重链恒定区的氨基酸序列 (序列号 2) 的碱基序列 (序列号 3) 的基因。另外,在严格条件下与包含序列号 3 表示的碱基序列的 DNA 杂交并且编码具有 IgA1

重链功能的多肽的基因等也包括在本发明的 IgA1 重链基因中。

[0108] 在严格条件下杂交的 DNA 是指以具有序列号 3 表示的碱基序列的 DNA 为探针, 通过集落杂交法、噬菌斑杂交法、DNA 印迹杂交法、DNA 微阵列法等而得到的能够杂交的 DNA, 具体而言, 可以列举通过如下方法进行鉴定的 DNA: 使用固定有来源于杂交的集落或噬菌斑的 DNA、或者具有该序列的 PCR 产物或寡聚 DNA 的过滤器或载玻片, 在 0.7~1.0 摩尔 / 升的氯化钠存在下在 65°C 下进行杂交, 然后, 使用 0.1~2 倍浓度的 SSC 溶液 (1 倍浓度的 SSC 溶液的组成包括 150 毫摩尔 / 升的氯化钠、15 毫摩尔 / 升的柠檬酸钠), 在 65°C 的条件下清洗过滤器或载玻片, 由此进行鉴定。杂交可以依据 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual (分子克隆实验指南), 第二版 (冷泉港实验室出版社, 1989)、Current Protocols in Molecular Biology (最新分子生物学实验方法) (约翰威立父子出版公司, 1987-1997)、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach (DNA 克隆 1: 核心技术与实用方法), 第二版 (牛津大学, 1995)] 等中记载的方法来进行。作为能够杂交的 DNA, 可以列举与序列号 3 表示的碱基序列具有至少 60% 以上的同源性的 DNA, 优选与序列号 3 表示的碱基序列具有 80% 以上的同源性的 DNA, 更优选与序列号 3 表示的碱基序列具有 95% 以上的同源性的 DNA。

[0109] 编码真核生物的蛋白质的基因的碱基序列常常可以观察到基因的多态性。本发明中使用的 IgA1 重链基因也包括碱基序列因基因的多态性而稍有突变的基因。

[0110] 作为 IgA1 重链, 可以列举: 具有序列号 2 表示的氨基酸序列的多肽; 包含在序列号 2 表示的氨基酸序列中缺失、取代或添加一个以上的氨基酸而成的氨基酸序列且具有 IgA1 重链的功能的多肽; 以及包含与序列号 2 表示的氨基酸序列具有 60% 以上、优选 80% 以上、更优选 90% 以上、最优选 95% 以上的同源性的氨基酸序列且具有 IgA1 重链的功能的多肽等。

[0111] 具有在序列号 2 表示的氨基酸序列中缺失、取代或添加一个以上的氨基酸而成的氨基酸序列的多肽可以通过如下方法得到: 使用 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第二版 (冷泉港实验室出版社, 1989)、Current Protocols in Molecular Biology (约翰威立父子出版公司, 1987-1997)、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985)] 等中记载的定点诱变法, 在例如编码具有序列号 2 表示的氨基酸序列的多肽的 DNA 中导入定点突变。缺失、取代或添加的氨基酸数没有特别限定, 优选为一个至数十个、例如 1~20 个的氨基酸, 更优选为一个至数个、例如 1~5 个的氨基酸。

[0112] 在没有特别说明的情况下, 本发明中记载的同源性的数值可以是使用本领域技术人员公知的同源性检索程序而计算出的数值, 对于碱基序列而言, 可以列举: 使用 BLAST [J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)] 中默认的参数而计算出的数值等, 对于氨基酸序列而言, 可以列举: 使用 BLAST2 [Nucleic Acids Res., 25, 3389 (1997); Genome Res., 7, 649 (1997); <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Education/BLASTinfo/information3.html>] 中默认的参数而计算出的数值等。

[0113] 作为默认的参数, G (起始空位罚分, Cost to open gap) 在碱基序列的情况下为 5, 在氨基酸序列的情况下为 11; -E (空位延伸罚分, Cost to extend gap) 在碱基序列的

情况下为 2,在氨基酸序列的情况下为 1;-q(核苷酸错配罚分, Penalty for nucleotide mismatch) 为 -3;-r(核苷酸匹配得分, reward for nucleotide match) 为 1;-e(期望值, expect value) 为 10;-W(字长大小, word size) 在碱基序列的情况下为 11 个残基,在氨基酸序列的情况下为 3 个残基;-y(非空位延伸下降的阈值, Dropoff(X) for blast extensions in bits) 在 blastn 中为 20,在 blastn 以外的程序中为 7;-X(空位比对的下降阈值, X dropoff value for gapped alignment in bits) 为 15;-Z(最终空位比对的下降值, final X dropoff value for gapped alignment in bits) 在 blastn 中为 50,在 blastn 以外的程序中为 25(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/html/blastcgihelp.html>)。

[0114] 包含序列号 2 表示的氨基酸序列的部分序列的多肽可以通过本领域技术人员公知的方法来制作,例如,可以通过使编码序列号 2 表示的氨基酸序列的 DNA 的一部分缺失并对导入有包含上述 DNA 的表达载体的转化体进行培养来制作。另外,基于这样制作的多肽或 DNA,通过与上述同样的方法,可以得到具有在序列号 2 表示的氨基酸序列的部分序列中缺失、取代或添加一个以上的氨基酸而成的氨基酸序列的多肽。

[0115] 本发明中,包含未结合半乳糖的 O 连接型糖链的、由 IgA1 重链基因编码的多肽,只要是包含未结合半乳糖的 O 连接型糖链的 IgA1 重链则均可,具体而言,可以列举:包含未结合半乳糖的 O 连接型糖链的、由序列号 3 表示的碱基序列编码的 IgA1 重链多肽。

[0116] 作为 IgA1 的铰链区,具体而言,可以列举:与文献[Biochemical and Biophysical Research Communication] 中公开的 IgA1 重链多肽的第 223~240 位相当的区域等。本发明中,包含未结合半乳糖的 O 连接型糖链的、由 IgA1 重链基因编码的多肽的铰链区,只要是包含未结合半乳糖的 O 连接型糖链的 IgA1 重链多肽的铰链区则均可,具体而言,可以列举:在包含未结合半乳糖的 O 连接型糖链的由序列号 3 表示的碱基序列编码的 IgA1 重链多肽中共同含有的、由序列号 1 表示的氨基酸序列。

[0117] O 连接型糖链是指在蛋白质的丝氨酸(Ser)或苏氨酸(Thr)的氨基酸残基中借助各氨基酸侧链所含的-OH 基而结合有糖链的结构。在 O 连接型糖链中,将多肽上的 Ser 或 Thr 氨基酸侧链的-OH 基上结合有 N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)的 O 连接型糖链称为粘蛋白型糖链。作为 O 连接型糖链的具体例,可以列举:T 抗原(TF 抗原)、涎酸化 T 抗原、Tn 抗原或涎酸化 Tn 抗原等(表 1)。

[0118] [表 1]

[0119]

糖链抗原名称	糖链结构
Tn 抗原	GalNAc1 α → Ser/Thr
涎酸化 Tn 抗原	NeuNAc α 2 → 6GalNAc1 α → Ser/Thr
T 抗原	Gal β 1 → 3GalNAc1 α → Ser/Thr
涎酸化 T 抗原	NeuNAc α 2 → 3Gal β 1 → 3GalNAc1 α → Ser/Thr

[0120] (NeuNAc :N-乙酰神经氨酸)

[0121] 本发明中,未结合半乳糖的 O 连接型糖链是指在借助蛋白质的 Ser 或 Thr 的氨基酸残基的 -OH 基结合的 N-乙酰半乳糖胺 (GalNAc) 上未结合半乳糖 (Gal) 的 O 连接型糖链,具体而言,可以列举上述的 Tn 抗原和涎酸化 Tn 抗原。未结合半乳糖的 O 连接型糖链是正常 O 连接型糖链的合成途径中的中间体,通常在正常细胞的糖蛋白质中几乎不存在,而在癌症和肾病等某些特定的疾病中观察到表达。

[0122] 以下,本发明中,有时将未结合半乳糖的 O 连接型糖链记为异常糖链,将结合有异常糖链的蛋白质记为糖链缺陷型蛋白质,将结合有异常糖链的 IgA1 记为糖链缺陷型 IgA1。

[0123] 作为 O 连接型糖链所结合的多肽中的氨基酸残基,可以列举: IgA1 重链多肽的铰链区的氨基酸序列中的丝氨酸 (Ser) 或苏氨酸 (Thr) 的氨基酸残基。

[0124] 另外,对于 O 连接型糖链所结合的多肽中的氨基酸残基,可以通过使用 NetOGlyc3.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) 等序列检索软件来确认结合 O 连接型糖链的共有序列。或者,可以通过对具有 O 连接型糖链的糖蛋白进行质谱 (MS) 分析来确定具体的糖链结合位点。

[0125] 本发明中,作为 IgA1 重链多肽上的 O 连接型糖链所结合的铰链区多肽中的氨基酸残基,在 IgA1 重链多肽的铰链区氨基酸序列中任意一个 Ser 或 Thr 残基上均可以结合 O 连接型糖链,优选列举包含选自人 IgA1 重链多肽的氨基酸序列中第 225 位的苏氨酸、第 228 位的苏氨酸、第 230 位的丝氨酸、第 232 位的丝氨酸、第 236 位的苏氨酸中的至少一个氨基酸残基的糖链结合位点。

[0126] 作为每一分子 IgA1 重链多肽的重链铰链区上结合的 O 连接型糖链数,只要在至少一个 Ser 残基或 Thr 残基上结合有 O 连接型糖链即可, O 连接型糖链数没有限定。

[0127] 作为获取表达本发明的包含未结合半乳糖的 O 连接型糖链的 IgA1 (以下记为糖链缺陷型 IgA1) 的细胞的方法,可以通过如下方法制作表达糖链缺陷型 IgA1 的细胞:在 O 连接型糖链合成过程中,向在多肽上的 Ser/Thr 上结合的 N-乙酰半乳糖胺 (GalNAc) 上附加 Gal 的酶、与该酶的活性相关的蛋白质或与尿苷 5' - 二磷酸半乳糖 (UDP-半乳糖) 的转运相关的蛋白质等的活性降低或缺失的细胞株中导入编码 IgA1 重链的 DNA 和编码 IgA1 轻链的 DNA,由此制作表达糖链缺陷型 IgA1 的细胞。另外,也可以通过使涎酶和半乳糖苷酶等糖链切割酶对表达包含正常 O 型糖链的 IgA1 的细胞起作用来制作表达具有未结合半乳糖的 O 连接型糖链的 IgA1 的细胞。

[0128] 作为向多肽上的 Ser 或 Thr 上结合的 GalNAc 上附加 Gal 的酶的具体例,可以列举 β 1,3-半乳糖基转移酶 [The Journal of Biological Chemistry, 277, 178-186 (2002)] 等。另外,作为与向多肽上的 Ser 或 Thr 上结合的 GalNAc 上附加 Gal 的酶的活性相关的蛋白质,可以列举与该酶的蛋白质折叠相关的伴侣 Cosmc [Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99, 16613-16618 (2002)] 等。

[0129] IgA 肾病患者来源的 IgA1 表达细胞,由于编码向多肽上的 Ser/Thr 上结合的 GalNAc 上附加 Gal 的酶、与该酶的活性相关的蛋白质或与 UDP-半乳糖的转运相关的蛋白质等的 DNA 上发生了添加、缺失或取代等而使酶的活性降低或缺失,因此,可以作为表达糖链缺陷型 IgA1 的细胞来利用。

[0130] 作为与 UDP-半乳糖的转运相关的蛋白质,可以列举 UDP-半乳糖转运蛋白等。作为 UDP-半乳糖转运蛋白的活性降低或缺失的细胞系,可以列举 Lec8 细胞

[Glycobiology., 1, 307-14(1991)] 等。

[0131] 本发明中,作为表达糖链缺陷型 IgA1 的细胞,可以列举:在人体中内源性存在的细胞、由人体中内源性存在的细胞建立的细胞系或通过基因重组技术得到的细胞等。优选列举:使在如上所述的 O 连接型糖链合成过程中向多肽上的 Ser/Thr 上结合的 GalNAc 上附加 Gal 的酶、与该酶的活性相关的蛋白质或与 UDP-半乳糖的转运相关的蛋白质等的活性降低或缺失的细胞系、具有相同的性质并且在人体中内源性存在的细胞等。

[0132] 作为在人体中内源性存在的细胞,优选在 O 连接型糖链合成过程中向多肽上的 Ser/Thr 上结合的 GalNAc 上附加 Gal 的酶、与该酶的活性相关的蛋白质或与 UDP-半乳糖的转运相关的蛋白质等的活性降低或缺失的细胞系,具体而言,可以列举在 IgA 肾病患者体内或癌症患者体内表达 IgA1 重链多肽的细胞,例如,可以列举通过活组织检查等得到的免疫相关细胞或肿瘤细胞中表达 IgA1 重链多肽的细胞。

[0133] 作为通过基因重组技术得到的细胞,可以列举如下细胞:制作使 O 连接型糖链合成过程中向多肽上的 Ser/Thr 上结合的 GalNAc 上附加 Gal 的酶、与该酶的活性相关的蛋白质或与 UDP-半乳糖的转运相关的蛋白质等的活性降低或缺失的宿主细胞,将包含编码目标多肽的 cDNA 的表达载体导入宿主细胞中,由此表达糖链缺陷型 IgA1。

[0134] 作为宿主细胞,具体而言,可以列举:UDP-半乳糖转运蛋白的活性降低的 Lec8 细胞,或者,因 β 1, 3-半乳糖基转移酶或与该酶活性相关的 Comsc 伴侣蛋白的异常而使酶的活性降低或缺失的 IgA 肾病患者来源的 IgA1 表达细胞等。

[0135] 此外,作为制作糖链缺陷型 IgA1 蛋白的方法,可以列举:使用上述的 IgA1 表达细胞来表达糖链缺陷型 IgA1 蛋白并进行纯化的方法等。

[0136] 作为获取糖链缺陷型 IgA1 蛋白的方法,可以通过以 IgA1 蛋白与其他物质的融合蛋白的形式进行表达和纯化来获取。作为与 IgA1 蛋白融合的物质,可以列举:抗体恒定区、抗体 Fc 段、GST 标签、组氨酸标签(也称为 His 标签)或 Myc 标签等多肽等。该融合蛋白可以通过使用蛋白 A、镍柱、特异性抗体柱等亲和层析柱来分离纯化。

[0137] 本发明的单克隆抗体或该抗体片段对如上得到的糖链缺陷型 IgA1 细胞或糖链缺陷型 IgA1 具有结合活性。

[0138] 本发明的抗体或该抗体片段与糖链缺陷型 IgA1 蛋白的结合例如可以通过以下方法确认:使用公知的免疫学检测方法、优选荧光细胞染色法等来确认表达特定抗原的细胞与抗特定抗原的抗体的结合性的方法。另外,也可以将公知的免疫学检测方法 [Monoclonal Antibodies-Principles and practice(单克隆抗体的原则与实践),第三版,美国学术出版社(1996);Antibodies-A Laboratory Manual(抗体实验指南),冷泉港实验室(1988);单クローン抗体実験マニュアル(单克隆抗体实验指南)、講談社サイエンティフィック(1987)] 等组合来进行确认。

[0139] 作为本发明的单克隆抗体,可以列举:由杂交瘤生产的抗体、以及由利用包含抗体基因的表达载体进行转化而得到的转化体生产的基因重组抗体。

[0140] 杂交瘤例如可以通过如下方法制备:制备表达上述糖链缺陷型 IgA1 的细胞等作为抗原,利用经该抗原免疫后的动物诱导出具有抗原特异性的抗体生产细胞,进而,使该抗体生产细胞与骨髓瘤细胞融合。通过对该杂交瘤进行培养或者对动物施用该杂交瘤细胞而使该动物产生癌性腹水并对该培养液或腹水进行分离、纯化,可以获得抗糖链缺陷型 IgA1

抗体。

[0141] 作为进行抗原免疫的动物,只要能够制作杂交瘤则均可以使用,优选使用小鼠、大鼠、仓鼠、兔等。另外,由如下制作的杂交瘤生产的抗体等也包括在本发明的抗体中:从上述动物中获取具有抗体产生能力的细胞,在体外对该细胞实施免疫,然后与骨髓瘤细胞融合而制作杂交瘤。

[0142] 单克隆抗体是指单一克隆的抗体产生细胞所分泌的抗体,该抗体仅识别一个表位(也称为抗原决定簇),并且构成单克隆抗体的氨基酸序列(一级结构)一致。

[0143] 表位可以列举:单克隆抗体所识别并结合的单一氨基酸序列、由氨基酸序列构成的立体结构、结合有糖链的氨基酸序列以及由结合有糖链的氨基酸序列构成的立体结构等。作为本发明的单克隆抗体的表位,可以列举糖链缺陷型 IgA1 蛋白的立体结构。

[0144] 作为本发明的单克隆抗体,只要是识别并结合糖链缺陷型 IgA1 的重链铰链区的单克隆抗体,则可以是任意一种抗体,具体而言,可以列举:单克隆抗体 KM4137、KM4138、KM4139、KM4140 和 KM4144 等。

[0145] 更具体而言,可以列举:由杂交瘤 KM4137 生产的单克隆抗体 KM4137、与单克隆抗体 KM4137 竞争地与糖链缺陷型 IgA1 的重链铰链区结合的单克隆抗体以及与单克隆抗体 KM4137 所结合的存在于糖链缺陷型 IgA1 重链铰链区的表位进行结合的单克隆抗体。

[0146] 作为本发明的单克隆抗体,还可以列举:由杂交瘤 KM4138 生产的单克隆抗体 KM4138、与单克隆抗体 KM4138 竞争地与糖链缺陷型 IgA1 的重链铰链区结合的单克隆抗体以及与单克隆抗体 KM4138 所结合的存在于糖链缺陷型 IgA1 重链铰链区的表位进行结合的单克隆抗体。

[0147] 作为本发明的单克隆抗体,还可以列举:由杂交瘤 KM4139 生产的单克隆抗体 KM4139、与单克隆抗体 KM4139 竞争地与糖链缺陷型 IgA1 的重链铰链区结合的单克隆抗体以及与单克隆抗体 KM4139 所结合的存在于糖链缺陷型 IgA1 重链铰链区的表位进行结合的单克隆抗体。

[0148] 另外,作为本发明的单克隆抗体,还可以列举:由杂交瘤 KM4140 生产的单克隆抗体 KM4140、与单克隆抗体 KM4140 竞争地与糖链缺陷型 IgA1 的重链铰链区结合的单克隆抗体以及与单克隆抗体 KM4140 所结合的存在于糖链缺陷型 IgA1 重链铰链区的表位进行结合的单克隆抗体。

[0149] 此外,作为本发明的单克隆抗体,还可以列举:由杂交瘤 KM4144 生产的单克隆抗体 KM4144、与单克隆抗体 KM4144 竞争地与糖链缺陷型 IgA1 的重链铰链区结合的单克隆抗体以及与单克隆抗体 KM4144 所结合的存在于糖链缺陷型 IgA1 重链铰链区的表位进行结合的单克隆抗体等。

[0150] 作为与本发明的单克隆抗体发生竞争反应的单克隆抗体,具体而言,可以列举:如上所述对各种单克隆抗体和存在于糖链缺陷型 IgA1 的重链铰链区的表位具有竞争反应的单克隆抗体。

[0151] 与单克隆抗体发生竞争反应是指,以与本发明的单克隆抗体相同或部分相同的表位作为抗原并与该表位结合的抗体。

[0152] 另外,作为与本发明的单克隆抗体所结合的表位进行结合的单克隆抗体,具体可以列举:如上所述与各种单克隆抗体所识别的存在于糖链缺陷型 IgA1 重链铰链区的表位

结合的单克隆抗体。

[0153] 杂交瘤 KM4137、KM4140、KM4144 于 2009 年 12 月 18 日依照布达佩斯条约保藏于日本独立行政法人产业技术综合研究所专利生物保藏中心 (305-856, 日本茨城县筑波市东 1 丁目 1 番地 1 中央第 6), 保藏编号分别为 FERM BP-11214、FERM BP-11215、FERM BP-11216。

[0154] 作为基因重组抗体, 包括人嵌合抗体、人源化抗体、人抗体或该抗体片段等通过基因重组技术制造的抗体。基因重组抗体中, 具有抗原结合活性、抗原性低且血中半衰期延长的基因重组抗体优选作为治疗剂。

[0155] 人嵌合抗体是指包含非人抗体的重链可变区 (以下记为 VH) 和轻链可变区 (以下记为 VL) 与人抗体的重链恒定区 (以下记为 CH) 和轻链恒定区 (以下记为 CL) 的抗体。

[0156] 本发明的人嵌合抗体可以如下进行制造。即, 由本发明的特异性识别糖链缺陷型 IgA1 并与该重链铰链区结合的单克隆抗体或者产生特异性识别糖链缺陷型 IgA1 并与该重链铰链区结合的单克隆抗体的杂交瘤获取编码 VH 和 VL 的 cDNA, 将它们插入到具有编码人抗体的 CH 和 CL 的基因的动物细胞用表达载体中, 构建人嵌合抗体表达载体, 将其导入动物细胞中而对抗体进行表达, 从而制作人嵌合抗体。

[0157] 作为人嵌合抗体的 CH, 只要属于人免疫球蛋白 (以下记为 hIg) 则均可以使用, 优选 hIgG 类的 CH, 而且可以使用属于 hIgG 类的 hIgG1、hIgG2、hIgG3、hIgG4 等亚类中的任意一种。另外, 作为人嵌合抗体的 CL, 可以是属于 hIg 的任意一种 CL, 可以使用 κ 类或 λ 类的 CL。

[0158] 人源化抗体是指将非人抗体的 VH 和 VL 的 CDR 的氨基酸序列移植到人抗体的 VH 和 VL 的适当位置而得到的抗体, 也称为人 CDR 移植抗体、重构抗体 (reshaped antibody)。

[0159] 本发明的人源化抗体可以如下制造: 构建编码抗体可变区的 cDNA, 所述抗体可变区是将由产生本发明的特异性识别糖链缺陷型 IgA1 蛋白并与该重链铰链区结合的单克隆抗体的杂交瘤产生的非人抗体的 VH 和 VL 的 CDR 的氨基酸序列移植到任意的人抗体的 VH 和 VL 的框架 (以下记为 FR) 中而形成的抗体可变区 (以下记为 V 区), 将上述 cDNA 插入到具有编码人抗体的 CH 和 CL 的基因的动物细胞用表达载体中, 构建人源化抗体表达载体, 并将其导入动物细胞中, 由此进行表达, 从而制造人源化抗体。

[0160] 人抗体的 VH 和 VL 的 FR 的氨基酸序列只要是人抗体来源的 VH 和 VL 的 FR 的氨基酸序列, 则均可以使用。可以使用例如: 蛋白数据库 (Protein Data Bank) 等数据库中登记的人抗体的 VH 和 VL 的 FR 的氨基酸序列或者 Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991) 等中记载的人抗体的 VH 和 VL 的 FR 的各亚类的共有氨基酸序列等。

[0161] 作为人源化抗体的 CH, 只要属于 hIg 则均可以使用, 优选 hIgG 类的 CH, 而且可以使用属于 hIgG 类的 hIgG1、hIgG2、hIgG3、hIgG4 等亚类中的任意一种。另外, 作为人源化抗体的 CL, 只要属于 hIg 则可以为任意一种, 可以使用 κ 类或 λ 类的 CL。

[0162] 人抗体原本是指人体中内源性存在的抗体, 也包括从利用最近的基因工程、细胞工程、发育工程的技术进步制作的人抗体噬菌体文库和产生人抗体的转基因动物而得到的抗体等。

[0163] 人体中内源性存在的抗体例如可以如下获得: 分离出人末梢血淋巴细胞, 使其感染 EB 病毒等而永生化, 并进行克隆, 由此可以培养产生该抗体的淋巴细胞, 并可以从培养

上清中纯化出该抗体。

[0164] 人抗体噬菌体文库是通过将由人 B 细胞制备的抗体基因插入到噬菌体基因中而使 Fab、scFv 等抗体片段在噬菌体表面进行表达而得到的文库。可以以抗体片段对固定有抗原的底物的结合活性为指标,从该文库中回收在表面表达具有期望的抗原结合活性的抗体片段的噬菌体。该抗体片段还可以进一步通过基因工程方法转化为包含两条完整的 H 链和 L 链的人抗体分子。

[0165] 产生人抗体的转基因动物是指细胞内重组有人抗体基因的动物。具体而言,例如,向小鼠 ES 细胞中导入人抗体基因,将该 ES 细胞移植入小鼠的早期胚胎中,然后使其发育,由此可以制作产生人抗体的转基因小鼠。由产生人抗体的转基因动物制作人抗体的方法中,通过通常在人以外的动物中实施的杂交瘤制作方法获取产生人抗体的杂交瘤,并进行培养,由此,可以在培养上清中产生并蓄积人抗体。

[0166] 在构成上述抗体或抗体片段的氨基酸序列中缺失、添加、取代或插入一个以上的氨基酸并且具有与上述抗体或其抗体片段相同的活性的抗体或其抗体片段也包括在本发明的抗体或其抗体片段中。

[0167] 缺失、取代、插入和 / 或添加的氨基酸数为一个以上,其数量没有特别限定,可以是利用分子克隆第二版、最新分子生物学实验方法、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci USA, 82, 488 (1985) 等中记载的定点诱变法等公知的技术能够缺失、取代或添加的程度的数量。例如为一个至数十个,优选为 1~20 个,更优选为 1~10 个,进一步优选为 1~5 个。

[0168] 在上述抗体的氨基酸序列中缺失、取代、插入或添加一个以上的氨基酸残基表示如下含义。即,意味着在同一序列中的任意且一个或多个氨基酸序列中,存在一个或多个氨基酸残基的缺失、取代、插入和 / 或添加。另外,既存在同时发生缺失、取代、插入和 / 或添加的情况,也存在被取代、插入或添加的氨基酸残基为天然型和非天然型中的任意一种的情况。作为天然型氨基酸残基,可以列举:L-丙氨酸、L-天冬酰胺、L-天冬氨酸、L-谷氨酰胺、L-谷氨酸、甘氨酸、L-组氨酸、L-异亮氨酸、L-亮氨酸、L-赖氨酸、L-蛋氨酸、L-苯丙氨酸、L-脯氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸、L-色氨酸、L-酪氨酸、L-缬氨酸和 L-半胱氨酸等。

[0169] 以下示出可相互取代的氨基酸残基的优选例。同一组中所含的氨基酸残基可以相互取代。

[0170] A 组:亮氨酸、异亮氨酸、正亮氨酸、缬氨酸、正缬氨酸、丙氨酸、2-氨基丁酸、蛋氨酸、O-甲基丝氨酸、叔丁基甘氨酸、叔丁基丙氨酸、环己基丙氨酸

[0171] B 组:天冬氨酸、谷氨酸、异天冬氨酸、异谷氨酸、2-氨基己二酸、2-氨基辛二酸

[0172] C 组:天冬酰胺、谷氨酰胺

[0173] D 组:赖氨酸、精氨酸、鸟氨酸、2,4-二氨基丁酸、2,3-二氨基丙酸

[0174] E 组:脯氨酸、3-羟基脯氨酸、4-羟基脯氨酸

[0175] F 组:丝氨酸、苏氨酸、高丝氨酸

[0176] G 组:苯丙氨酸、酪氨酸

[0177] 作为本抗体的效应活性,可以列举:ADCC 活性、CDC 活性、抗体依赖性吞噬活性 (antibody dependent cellular phagocytosis, ADCP)、调理作用等,可以通过各种方法进

行调控。

[0178] 作为调控效应活性的方法,可以列举:对结合于抗体的 Fc 段的糖链进行调控的方法、对抗体的 Fc 段的氨基酸残基进行氨基酸改变的方法等。

[0179] 作为对结合于抗体的 Fc 段的糖链进行调控的方法,可以列举:通过将 IgG 抗体的第 297 位的糖链除去而降低 ADCC、CDC 活性的方法 [Molecular Immunology, 32, 1311, (1995), W02008/030564];使半乳糖与抗体的 Fc 段的结合减少而降低 CDC 活性的方法等。

[0180] 另外,作为对结合于抗体的 Fc 段的糖链进行调控的方法,可以列举如下方法:生产在 IgG 抗体的 Fc 段的第 297 位的天冬酰胺上结合的 N 连接型糖链中包含在糖链所结合的基部的 N-乙酰葡萄糖胺 (GlcNAc) 上未结合岩藻糖的糖链的抗体的方法 (US7, 214, 775、US6, 946, 292);生产包含结合有平分型 (bisecting) GlcNAc 的糖链的抗体的方法 [Nature Biotechnology, 17, 176, (1999)];生产具有结合有与非还原末端结合的半乳糖 (Gal) 的糖链的抗体的方法 [Hum. Antibod. Hybridomas, 5, 143-151, (1994)];等。

[0181] 作为对抗体的 Fc 段的氨基酸残基进行氨基酸改变的方法,可以列举如下方法:通过进行抗体的 Fc 段的氨基酸改变来调控效应活性的方法 (J. B. C., 277, 26733-26740, 2002、US6, 737, 056、US7, 297, 775、US2007/0020260、W02005/070963);以及通过进行抗体的 Fc 段的各亚类之间的结构域交换来调控效应活性的方法 (W02007/011041) 等。

[0182] 作为本发明的抗体片段,可以列举:Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、双价抗体、dsFv 等。

[0183] 作为本发明的抗体片段,可以列举:Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv、双价抗体、dsFv 和包含 CDR 的肽等。

[0184] Fab 是将 IgG 用蛋白分解酶木瓜蛋白酶进行处理而得到的片段中(在 H 链的第 224 位的氨基酸残基处切断)、N 末端侧约一半的 H 链与整个 L 链通过二硫键结合而成的分子量约为 5 万的具有抗原结合活性的抗体片段。

[0185] 本发明的 Fab 可以通过将本发明的特异性识别糖链缺陷型 IgA1 蛋白且与该重链铰链区结合的单克隆抗体用蛋白分解酶木瓜蛋白酶进行处理而得到。或者,可以通过将编码该抗体的 Fab 的 DNA 插入原核生物用表达载体或真核生物用表达载体中并将该载体导入原核生物或真核生物中使其进行表达来制造。

[0186] F(ab')₂ 是将 IgG 的铰链区的两个二硫键的下部用胃蛋白酶分解而得到的、两个 Fab 区在铰链部分结合而构成的、分子量约为 10 万的具有抗原结合活性的片段。

[0187] 本发明的 F(ab')₂ 可以通过将本发明的特异性识别糖链缺陷型 IgA1 蛋白且与该重链铰链区结合的单克隆抗体用蛋白分解酶胃蛋白酶进行处理而得到。或者,可以通过使下述 Fab' 以硫醚键结合或以二硫键结合来制作。

[0188] Fab' 是将上述 F(ab')₂ 的铰链区的二硫键切断而得到的分子量约为 5 万的具有抗原结合活性的抗体片段。

[0189] 本发明的 Fab' 可以通过将本发明的特异性识别糖链缺陷型 IgA1 蛋白且与该重链铰链区结合的 F(ab')₂ 用还原剂二硫苏糖醇进行处理而得到。或者,可以通过将编码该抗体的 Fab' 片段的 DNA 插入原核生物用表达载体或真核生物用表达载体中并将该载体导入原核生物或真核生物中使其进行表达来制造。

[0190] scFv 是使用适当的肽接头（以下记为 P）将一条 VH 与一条 VL 连接而形成的 VH-P-VL 或 VL-P-VH 多肽，并且是具有抗原结合活性的抗体片段。

[0191] 本发明的 scFv 可以通过如下方法制造：获取编码本发明的特异性识别糖链缺陷型 IgA1 蛋白且与该重链铰链区结合的单克隆抗体的 VH 和 VL 的 cDNA，构建编码 scFv 的 DNA，将该 DNA 插入原核生物用表达载体或真核生物用表达载体中，并将该表达载体导入原核生物或真核生物中，由此进行表达。

[0192] 双价抗体为 scFv 二聚体化而得到的抗体片段，并且是具有二价抗原结合活性的抗体片段。二价抗原结合活性可以相同，也可以使其中一者具有不同的抗原结合活性。

[0193] 本发明的双价抗体可以通过如下方法制造：获取本发明的特异性识别糖链缺陷型 IgA1 蛋白且与该重链铰链区结合的单克隆抗体，以 P 的氨基酸序列长度为 8 个残基以下的方式构建编码 scFv 的 DNA，将该 DNA 插入原核生物用表达载体或真核生物用表达载体中，并将该表达载体导入原核生物或真核生物中，由此进行表达。

[0194] dsFv 是指使 VH 和 VL 中各一个氨基酸残基取代为半胱氨酸残基的多肽借助该半胱氨酸残基之间的二硫键结合而得到的抗体片段。取代为半胱氨酸残基的氨基酸残基可以根据 Reiter 等人公开的方法 [Protein Engineering, 7, 697 (1994)] 基于抗体的立体结构预测来进行选择。

[0195] 本发明的 dsFv 可以通过如下方法制造：获取编码本发明的特异性识别糖链缺陷型 IgA1 蛋白且与该重链铰链区结合的单克隆抗体的 VH 和 VL 的 cDNA，构建编码 dsFv 的 DNA，将该 DNA 插入原核生物用表达载体或真核生物用表达载体中，并将该表达载体导入原核生物或真核生物中，由此进行表达。

[0196] 包含 CDR 的肽可以包含 VH 或 VL 的 CDR 中的至少一个区域以上而构成。包含多个 CDR 的肽可以直接进行结合或者借助肽接头而进行结合。

[0197] 本发明的包含 CDR 的肽可以通过如下方法制造：构建编码本发明的特异性识别糖链缺陷型 IgA1 蛋白且与该重链铰链区结合的单克隆抗体的 VH 和 VL 的 CDR 的 DNA，将该 DNA 插入原核生物用表达载体或真核生物用表达载体中，并将该表达载体导入原核生物或真核生物中，由此进行表达。

[0198] 另外，包含 CDR 的肽也可以通过 Fmoc 法（苄氧羰基法）、tBoc 法（叔丁氧羰基法）等化学合成法来制造。

[0199] 本发明中包括：利用化学或基因工程方法在本发明的特异性识别糖链缺陷型 IgA1 蛋白且与该重链铰链区结合的单克隆抗体或抗体片段上结合药剂、蛋白质、放射性同位素等而得到的与抗体的结合物。

[0200] 本发明的结合物通过利用化学方法 [抗体工学入门（抗体工程入门），金光修著，地人书馆（1994）] 在本发明的特异性识别糖链缺陷型 IgA1 蛋白且与该重链铰链区结合的单克隆抗体或其抗体片段的 H 链或 L 链的 N 末端侧或 C 末端侧、抗体或其抗体片段中的适当的取代基或侧链以及抗体或其抗体片段中的糖链等上结合药剂、蛋白质、放射性同位素等来制造。

[0201] 另外，也可以通过基因工程方法来制造，即，使编码本发明的特异性识别糖链缺陷型 IgA1 蛋白且与该重链铰链区结合的单克隆抗体或其抗体片段的 DNA 与编码要结合的蛋白质的 DNA 连接后插入表达载体中，并将该表达载体导入原核生物或真核生物的宿主细胞

中。

[0202] 作为药剂,可以列举:化疗剂、抗体药品、免疫刺激剂、高分子药剂等。

[0203] 作为蛋白质,可以列举:细胞因子、增殖因子、毒蛋白等。

[0204] 此外,与抗体或该抗体片段结合的药剂可以为前药的形式。本发明中的前药是指利用存在于肿瘤环境中的酶等进行化学修饰而转变为具有杀伤癌细胞的作用的物质的药剂。

[0205] 作为化疗剂,包括烷化剂、亚硝基脲剂、代谢拮抗剂、抗癌性抗生素、植物来源的生物碱、拓扑异构酶抑制剂、激素疗法制剂、激素拮抗剂、芳香化酶抑制剂、P糖蛋白抑制剂、铂络合物衍生物、M期抑制剂、激酶抑制剂等任何的化疗剂。作为化疗剂,可以列举:阿米福汀(氨磷汀)、顺铂、达卡巴嗪(DTIC)、更生霉素、二氯甲基二乙胺(氮芥)、链脲霉素、环磷酰胺、异环磷酰胺、卡莫司汀(BCNU)、洛莫司汀(CCNU)、多柔比星(阿霉素)、阿霉素脂质体(多喜)、表柔比星、吉西他滨(健择)、柔红霉素、柔红霉素脂质体(DaunoXome)、丙卡巴肼、丝裂霉素、阿糖胞苷、依托泊苷、甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶、氟尿嘧啶、长春碱、长春新碱、博来霉素、道诺霉素、培洛霉素、雌莫司汀、紫杉醇(泰素)、多西紫杉醇(多西他奇)、阿地白介素、天冬酰胺酶、白消安、卡铂、奥沙利铂、奈达铂、克拉屈滨、喜树碱、CPT-11、10-羟基-7-乙基-喜树碱(SN38)、5-氟脱氧尿苷、氟达拉滨、羟基脲、异环磷酰胺、伊达比星、美司那、依立替康、拓扑替康(ノギテカン)、米托蒽醌、托泊替康、亮丙瑞林、甲地孕酮、美法仑、巯基嘌呤、羟基脲、普卡霉素、密妥坦、培门冬酶、喷司他丁、哌泊溴烷、链脲霉素、他莫昔芬、戈舍瑞林、亮丙瑞林、氟他胺、替尼泊苷、睾内酯、硫鸟嘌呤、塞替派、乌拉莫司汀、长春瑞滨、苯丁酸氮芥、氢化可的松、泼尼松龙、甲基泼尼松龙、长春地辛、尼莫司汀、司莫司汀、卡培他滨、雷替曲塞、氮胞苷、UFT、奥沙利铂、吉非替尼(易瑞沙)、伊马替尼(STI571)、厄洛替尼、Flt3抑制剂、血管内皮生长因子受体(VEGFR)抑制剂、成纤维细胞生长因子受体(FGFR)抑制剂、表皮生长因子受体(EGFR)抑制剂(易瑞沙、特罗凯等)、根赤壳菌素、17-烯丙基氨基-17-去甲氧基格尔德霉素、雷帕霉素、安吡啶、全反式维甲酸、沙利度胺、阿那曲唑、法曲唑、来曲唑、依西美坦、硫代苹果酸金、D-青霉胺、布西拉明、硫唑嘌呤、咪唑立宾、环孢素、雷帕霉素、氢化可的松、蓓萨罗丁(塔革雷汀)、他莫昔芬、地塞米松、孕激素类、雌激素类、阿那曲唑(瑞宁德)、利普安、阿司匹林、吡哆美辛、塞来昔布、硫唑嘌呤、青霉胺、硫代苹果酸金、马来酸氯苯那敏、氯苯那敏、氯马斯汀、维甲酸、蓓萨罗丁、砷、硼替佐米、别嘌呤醇、吉妥单抗、替伊莫单抗、131托西莫单抗、塔革雷汀、奥唑米星、克拉霉素、瘤可维、异环磷酰胺、酮康唑、氨鲁米特、苏拉明、甲氨蝶呤、类美登醇(Maytansinoid)及其衍生物等。

[0206] 作为使化疗剂与抗体结合的方法,可以列举:通过戊二醛使化疗剂与抗体的氨基之间结合的方法、通过水溶性碳二亚胺使化疗剂的氨基与抗体的羧基结合的方法等。

[0207] 作为抗体药品,可以列举:对通过抗体的结合诱导凋亡的抗原、与肿瘤的病态形成相关的抗原或调节免疫功能的抗原、与病变部位的血管新生相关的抗原具有抗性的抗体。

[0208] 作为通过抗体的结合诱导凋亡的抗原,可以列举:分化抗原(Cluster of differentiation,以下记为CD)19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD37、CD53、CD72、CD73、CD74、CDw75、CDw76、CD77、CDw78、CD79a、CD79b、CD80(B7.1)、CD81、CD82、CD83、CDw84、CD85、CD86(B7.2)、人类白细胞抗原(HLA)II类、EGFR等。

[0209] 作为与肿瘤的病态形成相关的抗原或调节免疫功能的抗原,可以列举:CD4、CD40、

CD40 配体、B7 家族分子 (CD80、CD86、CD274、B7-DC、B7-H2、B7-H3、B7-H4)、B7 家族分子的配体 (CD28、CTLA-4、ICOS、PD-1、BTLA)、OX-40、OX-40 配体、CD137、肿瘤坏死因子 (TNF) 受体家族分子 (DR4、DR5、TNFR1、TNFR2)、TNF 相关的凋亡诱导配体受体 (TRAIL) 家族分子、TRAIL 家族分子的受体家族 (TRAIL-R1、TRAIL-R2、TRAIL-R3、TRAIL-R4)、核因子 κ B 受体活化因子配体 (RANK)、RANK 配体、CD25、叶酸受体 4、细胞因子 [白细胞介素 -1 α (以下将白细胞介素记为 IL)、IL-1 β 、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13、转化生长因子 (TGF) β 、TNF α 等]、上述细胞因子的受体、趋化因子 (SLC、ELC、I-309、TARC、MDC、CTACK 等)、上述趋化因子的受体。

[0210] 作为抑制病变部位的血管新生的抗体的抗原,可以列举:血管内皮生长因子 (VEGF)、血管生成素、成纤维细胞生长因子 (FGF)、EGF、血小板源性生长因子 (PDGF)、胰岛素样生长因子 (IGF)、促红细胞生成素 (EPO)、TGF β 、IL-8、Ephillin、SDF-1 等以及它们的受体。

[0211] 作为免疫刺激剂,可以是作为免疫佐剂已知的天然物,作为具体例,使免疫亢进的药剂可以列举: β -1,3-葡聚糖(香菇多糖、西佐糖)、 α -半乳糖神经酰胺(KRN7000)、菌体粉末(溶链菌、BCG)、菌体提取物(云芝多糖)。

[0212] 作为高分子药剂,可以列举:聚乙二醇(以下记为 PEG)、白蛋白、右旋糖酐、聚环氧乙烷、苯乙烯马来酸共聚物、聚乙烯吡咯烷酮、吡喃共聚物、羟丙基甲基丙烯酰胺等。通过使这些高分子药剂与抗体或抗体片段结合,可以期待发挥如下效果:(1) 提高对化学性、物理性或生物性的各种因素的稳定性;(2) 显著延长血中半衰期;(3) 抑制免疫原性消失并抑制抗体产生;等[バイオコンジュゲート医薬品,广川书店(1993)]。例如,作为使 PEG 与抗体结合的方法,可以列举与 PEG 化修饰试剂进行反应的方法等[バイオコンジュゲート医薬品,广川书店(1993)]。作为 PEG 化修饰试剂,可以列举:赖氨酸的 ϵ -氨基的修饰剂(日本特开昭 61-178926)、天冬氨酸和谷氨酸的羧基的修饰剂(日本特开昭 56-23587)、精氨酸的胍基的修饰剂(日本特开平 2-117920) 等。

[0213] 作为细胞因子或增殖因子,只要是使 NK 细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞等细胞亢进的细胞因子或增殖因子则均可,可以列举例如:干扰素(以下记为 IFN)- α 、INF- β 、INF- γ 、IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、IL-23、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF) 等。

[0214] 作为毒蛋白,可以列举:蓖麻毒素、白喉毒素、ONTAK 等,还包括为调节毒性而向蛋白质中引入突变而得到的蛋白毒素。

[0215] 作为放射性同位素,可以列举: ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{90}Y 、 ^{64}Cu 、 ^{199}Tc 、 ^{77}Lu 、 ^{211}At 、Re186、Re188、In111 等。放射性同位素可以通过氯胺 T 法等直接与抗体进行结合。另外,也可以在抗体结合用于螯合放射性同位素的物质。作为螯合剂,可以列举甲基苯基二亚乙基三胺五乙酸(MX-DTPA) 等。

[0216] 本发明中,可以将本发明中使用的抗体与一种以上的其他药剂组合来施用,或者也可以与放射线照射组合。作为其他药剂,可以列举:上述的化疗剂、抗体药品、免疫刺激剂、细胞因子或增殖因子等。

[0217] 作为放射线照射,包括: X 射线、 γ 射线等光子(电磁波)照射;电子束、质子束、重离子束等粒子束照射等。

[0218] 作为组合施用的方法,可以与本发明中使用的抗体同时施用,或者也可以在施用本发明中使用的抗体前后施用。

[0219] 本发明的检测方法、定量方法、检测试剂、定量试剂或诊断剂中,可以列举将特定的标记物标记到本发明的抗体上来使用的方法。作为标记物,可以列举通常的免疫学检测或测定方法中使用的标记物,可以列举:碱性磷酸酶、过氧化物酶、荧光素酶等酶;吖啶酯、洛酚碱等发光物质;异硫氰酸荧光素 (FITC)、三甲基罗丹明 (RITC) 等荧光物质;等。

[0220] 以下,对本发明的抗体的制造方法进行具体说明。

[0221] 1. 单克隆抗体的制造方法

[0222] (1) 抗原的制备

[0223] 通过下述中记载的方法,将包含编码全长或部分长度 IgA1 重链的 cDNA 的表达载体导入在 O 连接型糖链合成过程中向多肽上的 Ser/Thr 上结合的 GalNAc 上附加 Gal 的酶、与该酶的活性相关的蛋白质或与 UDP- 半乳糖的转运相关的蛋白质等的活性降低或缺失的酵母、昆虫细胞、动物细胞等中,由此,能够得到作为抗原的糖链缺陷型 IgA1 蛋白或表达糖链缺陷型 IgA1 的细胞。另外,也可以使用通过从在细胞膜上或培养液中大量表达糖链缺陷型 IgA1 的各种人来源的培养细胞、人组织等中纯化出糖链缺陷型 IgA1 来制备抗原的方法,或者,制备具有糖链缺陷型 IgA1 的部分序列的合成肽并作为抗原使用。此外,可以通过在试管内向使用不具有糖链附加能力的大肠杆菌等原核生物进行表达、纯化而得到的 IgA1 蛋白上附加糖链来得到糖链缺陷型 IgA1。

[0224] 另外,同样地操作,向具有正常的 O 连接型糖链合成过程的酵母、昆虫细胞、动物细胞等宿主细胞中导入包含编码全长或部分长度 IgA1 重链的 cDNA 的表达载体,由此可以获得表达具有正常 O 连接型糖链的 IgA1 重链的细胞,并可以从该细胞中纯化出具有正常 O 连接型糖链的 IgA1 重链蛋白。

[0225] 如上得到的糖链缺陷型 IgA1 蛋白、具有正常 O 连接型糖链的 IgA1 蛋白或它们的表达细胞可以用于目标抗体的筛选、确认所获得的抗体对抗原的反应性。

[0226] 作为本发明中使用的多肽,可以通过使用 Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第二版,冷泉港实验室出版社(1989)或 Current Protocols INMolecular Biology, 约翰威立父子出版公司(1987-1997)等中记载的方法等,例如利用以下的方法,使编码该多肽的 DNA 在宿主细胞中进行表达来制造。

[0227] 首先,将编码全长多肽的 cDNA 插入适当的表达载体的启动子的下游,由此制作重组载体。此时若有需要,也可以基于全长 cDNA 来制备包含编码多肽的部分的适当长度的 DNA 片段,并使用该 DNA 片段来代替上述全长 cDNA。接着,将该重组载体导入适合于该表达载体的宿主细胞中,由此可以得到生产多肽的转化体。

[0228] 作为宿主细胞,只要是大肠杆菌、酵母、昆虫细胞、动物细胞等具有附加 O 连接型糖链的能力并且能够表达目的基因的宿主细胞,则均可以使用。

[0229] 作为表达载体,使用能够在所使用的宿主细胞中进行自主复制或者能够整合到染色体中并且在能够转录编码多肽的 DNA 的位置含有适当的启动子的表达载体。

[0230] 在使用大肠杆菌等原核生物作为宿主细胞的情况下,含有编码本发明中使用的多肽的 DNA 而构成的重组载体优选为在原核生物中能够进行自主复制并且包含启动子、核糖体结合序列、本发明中使用的 DNA 和转录终止序列的载体。该重组载体可以进一步含有调

控启动子的基因。

[0231] 作为表达载体,可以列举例如:pBTrp2、pBTac1、pBTac2(均为罗氏诊断公司制造)、pKK233-2(Pharmacia公司制造)、pSE280(Invitrogen公司制造)、pGEMEX-1(Promega公司制造)、pQE-8(QIAGEN公司制造)、pKYP10(日本特开昭58-110600)、pKYP200[Agricultural Biological Chemistry, 48, 669(1984)]、pLSA1[Agric. Biol. Chem., 53, 277(1989)]、pGEL1[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306(1985)]、pBlue scriptII SK(-)(Stratagene公司制造)、pTrs30[由大肠杆菌JM109/pTrS30(FERMBP-5407)制备]、pTrs32[由大肠杆菌JM109/pTrS32(FERM BP-5408)制备]、pGHA2[由大肠杆菌IGHA2(FERMBP-400)制备,日本特开昭60-221091]、pGKA2[由大肠杆菌IGKA2(FERM BP-6798)制备,日本特开昭60-221091]、pTerm2(US4686191, US4939094, US5160735)、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pEG400[J. Bacteriol., 172, 2392(1990)]、pGEX(Pharmacia公司制造)、pET系统(Novagen公司制造)、pME18SFL3等。

[0232] 作为启动子,只要是能够在所使用的宿主细胞中发挥功能的启动子则均可使用。可以列举例如:trp启动子(Ptrp)、lac启动子、PL启动子、PR启动子、T7启动子等来源于大肠杆菌或噬菌体等的启动子。另外,也可以使用两个Ptrp串联而成的串联启动子、tac启动子、lac T7启动子、let I启动子等经过人为设计改变而得到的启动子等。

[0233] 另外,作为上述重组载体,优选使用将作为核糖体结合序列的夏因-达尔加诺(Shine-Dalgarno)序列与起始密码子的间隔调节至适当距离(例如6~18个碱基)而得到的质粒。编码本发明中使用的多肽的DNA的碱基序列中,可以对碱基进行取代,以形成最适于在宿主内表达的密码子,由此,能够提高目标多肽的生产率。此外,上述重组载体中的基因的表达不一定需要转录终止序列,但优选在紧邻结构基因的下游配置转录终止序列。

[0234] 作为宿主细胞,可以列举属于埃希氏菌属等的微生物,可以列举例如:大肠杆菌XL1-Blue、大肠杆菌XL2-Blue、大肠杆菌DH1、大肠杆菌MC1000、大肠杆菌KY3276、大肠杆菌W1485、大肠杆菌JM109、大肠杆菌HB101、大肠杆菌No. 49、大肠杆菌W3110、大肠杆菌NY49、大肠杆菌DH5 α 等。

[0235] 作为重组载体的导入方法,只要是向上述宿主细胞中导入DNA的方法则均可以使用,可以列举例如:使用钙离子的方法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110(1972)]、Gene, 17, 107(1982)或Molecular&General Genetics, 168, 111(1979)中记载的方法等。

[0236] 在使用动物细胞作为宿主的情况下,作为表达载体,可以列举例如:pcDNA1、pcDM8(由フナコシ公司销售)、pAGE107[日本特开平3-22979; Cytotechnology, 3, 133, (1990)]、pAS3-3(日本特开平2-227075)、pCDM8[Nature, 329, 840, (1987)]、pcDNA1/Amp(Invitrogen公司制造)、pcDNA3.1(Invitrogen公司制造)、pREP4(Invitrogen公司制造)、pAGE103[J. Biochemistry, 101, 1307(1987)]、pAGE210、pME18SFL3、pKANTEX93[W097/10354]等。

[0237] 作为启动子,只要是能够在动物细胞中发挥功能的启动子则均可以使用,可以列举例如:巨细胞病毒(CMV)的IE(即刻早期)基因的启动子、SV40的早期启动子、逆转录病毒的启动子、金属硫蛋白启动子、热休克启动子、SR α 启动子、莫洛尼小鼠白血病病毒(moloney murine leukemia virus)的启动子和增强子等。另外,也可以将人CMV的IE基因的增强子与启动子一同使用。

[0238] 作为宿主细胞,只要是在糖链合成途径中向多肽上的 Ser/Thr 上结合的 N-乙酰半乳糖胺 (GalNAc) 上附加 Gal 的酶、与该酶的活性相关的蛋白质或与尿苷 5'-二磷酸半乳糖 (UDP-半乳糖) 的转运相关的蛋白质等的活性降低或缺失的细胞系,则均可以使用。具体而言,可以列举:作为 UDP-半乳糖转运蛋白缺失的中国仓鼠卵巢细胞 (CHO 细胞) 的 Lec8 突变体 [ACSSymp. Ser. 128, 214(1980)]。

[0239] 此外,可以使用在与糖链合成途径相关的酶、转运蛋白的活性未缺失的细胞中使 UDP-半乳糖转运蛋白 (别名:UDP-半乳糖转位蛋白,UGALT) 或者核心 1 合酶即糖蛋白-N-乙酰半乳糖胺 3- β -半乳糖基转移酶 (C1GALT1,别名:核心 1- β -3-gal-t, t 合酶) 或 C1GALT1-特异伴侣蛋白 1(c1galt1c1,别名:核心 1 β -3-半乳糖基转移酶-特异分子伴侣 (COSMC), C1GALT2) 等酶、转运蛋白的功能降低或缺失的细胞系。

[0240] 作为与糖链合成途径相关的酶、转运蛋白的活性未缺失的细胞,可以列举例如:那马瓦 (Namalwa) 细胞、作为猴细胞的 COS 细胞、作为中国仓鼠来源的细胞的 CHO 细胞、HBT5637 (日本特开昭 63-299) 等。

[0241] 作为降低基因功能的方法,可以列举:反义法、核酶法 [Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 96, 1886(1999)]、同源重组法 [Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual (小鼠胚胎操作实验指南),第二版,冷泉港实验室出版社 (1994)、Gene Targeting, A Practical Approach (基因寻靶:实践探讨),牛津大学出版社旗下的 IRL 出版社 (1993)]、RNA-DNA 寡核苷酸 (RDO) 法、RNA 干扰 (RNAi) 法 [Nature, 391, 806, (1998)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 15502, (1998)、Nature, 395, 854, (1998)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 96, 5049, (1999)、Cell, 95, 1017, (1998)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 1451, (1999) roc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 13959, (1998)、Nature Cell Biol., 2, 70, (2000)]、使用逆转录病毒的方法、使用转座子的方法 [Nature Genetics, 25, 35, (2000)] 等。

[0242] 作为载体的导入方法,只要是向动物细胞中导入 DNA 的方法则均可以使用,可以列举例如:电穿孔法 [Cytotechnology, 3, 133(1990)]、磷酸钙法 (日本特开平 2-227075)、脂质体转染法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413(1987)] 等。

[0243] 作为基因的表达方法,除了直接表达以外,还可以根据 Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第二版,冷泉港实验室出版社 (1989) 中记载的方法等进行分泌生产、融合蛋白表达等。在真核生物来源的细胞中进行表达的情况下,可以得到附加有糖或糖链的多肽。

[0244] 将如上得到的转化体在培养基中进行培养,在培养物中生成并蓄积该多肽,并从该培养物中进行收集,由此可以制造多肽。将该转化体在培养基中进行培养的方法可以根据宿主的培养中使用的通常的方法来进行。

[0245] 对利用使用诱导性启动子作为启动子的重组载体进行转化后的微生物进行培养时,可以根据需要向培养基中添加诱导物。例如,对利用使用 lac 启动子的重组载体进行转化后的微生物进行培养时,可以向培养基中添加异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷等,对利用使用 trp 启动子的重组载体进行转化后的微生物进行培养时,可以向培养基中添加吲哚丙烯酸等。

[0246] 作为用于培养以动物细胞为宿主而得到的转化体的培养基,可以使用普遍使用的 RPMI 1640 培养基 [The Journal of the American Medical

Association, 199, 519(1967)]、伊戈尔 (Eagle) 的 MEM 培养基 [Science, 122, 501(1952)]、杜尔贝科改良 MEM 培养基 [Virology, 8, 396(1959)]、199 培养基 [Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 73, 1(1950)] 或者向这些培养基中添加 FCS 等而得到的培养基等。培养通常在 pH6~8、30~40℃、5%CO₂ 存在下等条件下进行 1~7 天。另外,在培养中,可以根据需要向培养基中添加卡那霉素、青霉素等抗生素。

[0247] 如上所述,将包含重组有编码本发明中使用的多肽的 DNA 的重组载体的来源于微生物、动物细胞等的转化体根据通常的培养方法进行培养,生成并蓄积该多肽,并从该培养物进行收集,由此可以制造本发明中使用的多肽。

[0248] 作为基因的表达方法,除了直接表达以外,还可以根据 Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第二版,冷泉港实验室出版社 (1989) 中记载的方法等进行分泌生产、融合蛋白表达等。

[0249] 作为多肽的生产方法,有如下方法:在宿主细胞内生产的方法、分泌到宿主细胞外的方法以及在宿主细胞外膜上生产的方法,通过改变使用的宿主细胞或者所生产的多肽的结构,可以选择适当的方法。

[0250] 在宿主细胞内或宿主细胞外膜上生产多肽的情况下,通过使用鲍尔森等人的方法 [J. Biol. Chem., 264, 17619(1989)]、罗等人的方法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, 8227(1989)、Genes Develop., 4, 1288(1990)] 或者日本特开平 05-336963、W094/23021 等中记载的方法,可以使该基因产物分泌到宿主细胞外。

[0251] 另外,还可以根据日本特开平 2-227075 中记载的方法,利用使用二氢叶酸还原酶基因等的基因扩增系统来提高生产量。

[0252] 多肽可以以例如如下所述的方式进行分离和纯化。

[0253] 多肽在细胞内以溶解状态进行表达的情况下,培养结束后通过离心分离来回收细胞,悬浊于水性缓冲液中后,利用超声波破碎机、法式压滤壶、MANTON-GULIN 匀浆器、卧式砂磨机等将细胞破碎,从而得到无细胞提取液。将该无细胞提取液进行离心分离,从所得到的上清中利用通常的酶的分纯化法得到纯化制备品,即,单独或组合使用溶剂提取法、利用硫酸铵等的盐析法、脱盐法、利用有机溶剂的沉淀法、使用二乙氨基乙基 (DEAE)-琼脂糖、DIAION HPA-75(三菱化学公司制造)等树脂的阴离子交换层析法、使用 S-Sepharose FF(Pharmacia 公司制造)等树脂的阳离子交换层析法、使用丁基琼脂糖、苯基琼脂糖等树脂的疏水层析法、使用分子筛的凝胶过滤法、亲和层析法、聚焦层析法、等电点电泳等电泳法等方法。

[0254] 另外,多肽在细胞内形成包涵体而进行表达的情况下,同样地将细胞回收后进行破碎,并进行离心分离,由此,以沉淀级分的形式回收该多肽的包涵体。利用蛋白变性剂使回收的该多肽的包涵体可溶化。通过对该可溶化液进行稀释或透析,使该多肽恢复至正常的立体结构,然后,通过与上述同样的分离纯化方法得到多肽的纯化制备品。

[0255] 另外,本发明中使用的多肽也可以通过 Fmoc 法(苄氧羰基法)、tBoc 法(叔丁氧羰基法)等化学合成法来制造。另外,还可以利用 Advanced ChemTech 公司、パークイン・エールマ-公司、Pharmacia 公司、Protein Technology Instrument 公司、Synthecell-Vega 公司、PerSeptive 公司、岛津制作所等的肽合成仪进行化学合成。

[0256] (2) 动物的免疫和抗体产生细胞的制备

[0257] 对 3~20 周龄的小鼠、大鼠或仓鼠进行如上制备的抗原的免疫,收集该动物的脾脏、淋巴结、末梢血中的抗体产生细胞。另外,在免疫原性低因而在上述动物中未观察到充分的抗体效价升高的情况下,还有使用 CD27 敲除动物作为被免疫动物的方法。

[0258] 免疫通过将抗原连同适当的佐剂 [例如,完全弗氏佐剂 (Complete Freund's Adjuvant) 或氢氧化铝凝胶和百日咳菌疫苗等] 一同施用到动物的皮下、静脉内或腹腔内来进行。在抗原为部分肽的情况下,与 BSA(牛血清白蛋白)或 KLH(钥孔蠔血蓝蛋白, Keyhole Limpet Hemocyanin) 等载体蛋白制成结合物,将其作为免疫原使用。

[0259] 关于抗原的施用,在第一次施用之后,每隔 1~2 周施用 5~10 次。每次施用后第 3~7 天从眼底静脉丛采血,利用酶免疫测定法 [Antibodies-A Laboratory Manual,冷泉港实验室,1988] 等考察其血清与抗原的反应。将其血清对免疫所用的抗原显示出充分的抗体效价的小鼠、大鼠或仓鼠供作脾脏细胞的供给源。

[0260] 在供于脾脏细胞与骨髓瘤细胞的融合时,在抗原物质的末次施用后第 3~7 天从免疫后的小鼠、大鼠或仓鼠中摘除脾脏,收集脾脏细胞。将脾脏在 MEM 培养基(日水制药公司制造)中细细切碎,用镊子搅散,并离心分离(1200rpm、5 分钟),然后,弃去上清,用 Tris-氯化铵缓冲液(pH7.65)处理 1~2 分钟以除去红细胞,并用 MEM 培养基洗涤 3 次,从而提供融合用脾脏细胞。

[0261] (3) 骨髓瘤细胞的制备

[0262] 作为骨髓瘤细胞,使用由小鼠得到的确立细胞系。可以使用例如:8-氮杂鸟嘌呤抗性小鼠(BALB/c 来源)骨髓瘤细胞系 P3-X63Ag8-U1(P3-U1) [Current Topics in Microbiology and Immunology, 18, 1(1978)]、P3-NS1/1-Ag41(NS-1) [European J. Immunology, 6, 511(1976)]、SP2/0-Ag 14(SP-2) [Nature, 276, 269(1978)]、P3-X63-Ag8653(653) [J. Immunology, 123, 1548(1979)]、P3-X63-Ag8(X63) [Nature, 256, 495(1975)] 等。这些细胞系在 8-氮杂鸟嘌呤培养基 [向在 RPMI-1640 培养基中添加有谷氨酰胺(1.5mM)、2-巯基乙醇(5×10^{-5} M)、庆大霉素($10 \mu\text{g/mL}$)和胎牛血清(FCS)的培养基(以下称为正常培养基)中进一步添加 8-氮杂鸟嘌呤($15 \mu\text{g/mL}$)而得到的培养基]中传代培养,在细胞融合的 3~4 天之前传代到正常培养基中,以确保融合当天达到 2×10^7 个以上的细胞数。

[0263] (4) 细胞融合

[0264] 将上述抗体产生细胞和骨髓瘤细胞用 MEM 培养基或 PBS(磷酸氢二钠 1.83g、磷酸二氢钾 0.21g、食盐 7.65g、蒸馏水 1 升、pH7.2)充分洗涤,以使细胞数达到抗体产生细胞:骨髓瘤细胞 = 5~10:1 的方式进行混合,离心分离(1200rpm、5 分钟)后,弃去上清,将沉淀的细胞群充分搅散后,在搅拌的同时在 37°C 下以 $0.2 \sim 1\text{mL}/10^8$ 个抗体产生细胞的量加入 2g 聚乙二醇-1000(PEG-1000)、2mL MEM 和 0.7mL 二甲亚砷的混合溶液,并每隔 1~2 分钟加入 1~2mL 的 MEM 培养基,重复数次后,加入 MEM 培养基至总量达到 50mL。离心分离(900rpm、5 分钟)后,弃去上清,轻轻地将细胞搅散后,通过用刻度吸管吸入并吹出,轻轻地将细胞悬浮于 100mL HAT 培养基 [在正常培养基中添加有次黄嘌呤(10^{-4} 摩尔/升)、胸腺嘧啶核苷(1.5×10^{-5} 摩尔/升)和氨基蝶呤(4×10^{-7} 摩尔/升)的培养基]中。将该悬浮液以 $100 \mu\text{L}$ /孔分注到 96 孔培养板中,在 5%CO₂ 的培养箱中在 37°C 下培养 7~14 天。

[0265] 培养后,取一部分培养上清,通过后述的结合分析等选出与包含本发明中使用的

多肽的抗原发生反应而不与不含多肽的抗原发生反应的细胞。

[0266] 然后,利用有限稀释法重复进行两次克隆[第一次使用 HT 培养基(从 HAT 培养基中除去氨基蝶呤而得到的培养基),第二次使用正常培养基],选出稳定地观察到强抗体效价的细胞作为产生单克隆抗体的杂交瘤株。

[0267] (5) 单克隆抗体的制备

[0268] 对姥鲛烷处理[腹腔内施用 0.5mL 的 2, 6, 10, 14- 四甲基十五碳烷(姥鲛烷),饲养 2 周]后的 8~10 周龄的小鼠或裸鼠以 $2 \times 10^6 \sim 5 \times 10^7$ 细胞/只的量腹腔内注射(4)中得到的产生抗 CD27 单克隆抗体的杂交瘤细胞。在 10~21 天内杂交瘤产生癌性腹水。从该小鼠中收集腹水,离心分离(3000rpm、5 分钟)除去固体成分后,用 40~50% 的硫酸铵进行盐析,然后,利用辛酸沉淀法、DEAE- 琼脂糖柱、蛋白 A 柱或凝胶过滤柱进行纯化,收集 IgG 或 IgM 级分,作为纯化的单克隆抗体。

[0269] 抗体亚类的确定使用亚类分型试剂盒通过酶免疫测定法来进行。蛋白量的定量通过劳里法和 280nm 下的吸光度来计算。

[0270] (6) 结合分析

[0271] 作为抗原,使用:通过本项(1)中记载的方法将包含编码本发明中使用的 CD27 多肽的 cDNA 的表达载体导入大肠杆菌、酵母、昆虫细胞、动物细胞等中而得到的基因导入细胞或重组蛋白、或者由人组织得到的纯化多肽或部分肽。在抗原为部分肽的情况下,与 BSA(牛血清白蛋白)或 KLH(钥孔贻血蓝蛋白, Keyhole Limpet Hemocyanin) 等载体蛋白制成结合物,并使用该结合物。

[0272] 将上述抗原分注到 96 孔板中并使其固相化,然后,分注被免疫动物血清、产生单克隆抗体的杂交瘤的培养上清或纯化抗体作为第一抗体,并使其发生反应。用 PBS 或 PBS-0.05% 吐温充分洗涤后,分注由生物素、酶、化学发光物质或放射线化合物等标记的免疫球蛋白抗体作为第二抗体,并使其发生反应。用 PBS- 吐温充分洗涤后,进行与第二抗体的标记物质对应的反应。

[0273] 与识别包含未结合半乳糖的 O 连接型糖链的 CD27 且与该重链铰链区结合的单克隆抗体产生竞争的抗体,可以通过向上述结合分析系统中添加受试抗体并使其反应来获得。即,筛选出在加入受试抗体时单克隆抗体的结合受到抑制的抗体,由此可以获得在向糖链缺陷型 IgA1 的重链铰链区上结合时与获得的单克隆抗体产生竞争的单克隆抗体。

[0274] 另外,与识别糖链缺陷型 IgA1 且与该重链铰链区结合的单克隆抗体所识别的表位结合的抗体,可以通过如下方法获得:对在上述结合分析系统中获得的抗体的表位进行鉴定,制作所鉴定出的表位的部分糖链结合肽或者模拟表位的立体结构的糖链结合肽等,并进行免疫。

[0275] 2. 基因重组抗体的制作

[0276] 作为基因重组抗体的制作例,以下示出人嵌合抗体和人源化抗体的制作方法。

[0277] (1) 基因重组抗体表达用载体的构建

[0278] 基因重组抗体表达用载体是指重组有编码人抗体的 CH 和 CL 的 DNA 的动物细胞用表达载体,可以通过将编码人抗体的 CH 和 CL 的 DNA 分别克隆到动物细胞用表达载体中来进行构建。

[0279] 人抗体的 C 区可以使用任意的人抗体的 CH 和 CL。可以列举例如:人抗体的

γ 1 亚类的 CH 和 κ 类的 CL 等。作为编码人抗体的 CH 和 CL 的 DNA, 可以使用包含外显子和内含子的染色体 DNA, 也可以使用 cDNA, 优选使用 cDNA。作为动物细胞用表达载体, 只要是能够重组并表达编码人抗体的 C 区的基因的载体则均可以使用。可以列举例如 :pAGE107[Cytotechnol., 3, 133(1990)]、pAGE103[J. Biochem., 101, 1307(1987)]、pHSG274[Gene, 27, 223(1984)]、pKCR[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 1527(1981)]、pS G1bd2-4[Cytotechnol., 4, 173(1990)]、pSE1UK1Sed1-3[Cytotechnol., 13, 79(1993)] 等。作为动物细胞用表达载体中使用的启动子和增强子, 可以列举 :SV40 的早期启动子 [J. Biochem., 101, 1307(1987)]、莫洛尼小鼠白血病病毒的 LTR[Biochem. Biophys. Res. Commun., 149, 960(1987)]、免疫球蛋白 H 链的启动子 [Cell, 41, 479(1985)] 和增强子 [Cell, 33, 717(1983)] 等。

[0280] 基因重组抗体表达用载体可以使用抗体 H 链和 L 链存在于不同载体上的类型或者存在于同一载体上的类型 (串联型) 中的任意一种, 从基因重组抗体表达载体的构建的容易度、向动物细胞中导入的容易度、抗体 H 链与 L 链在动物细胞内的表达量的平衡均衡等观点出发, 优选串联型基因重组抗体表达用载体 [J. Immunol. Methods, 167, 271(1994)]。作为串联型基因重组抗体表达用载体, 可以列举 pKANTEX93[W097/10354]、pEE18[Hybridoma, 17, 559(1998)] 等。

[0281] (2) 编码人以外的动物来源的抗体的 V 区的 cDNA 的获得和氨基酸序列的分析

[0282] 编码非人抗体的 VH 和 VL 的 cDNA 可以如下获得。

[0283] 从产生非人抗体的杂交瘤细胞中提取 mRNA, 并合成 cDNA。将合成的 cDNA 克隆到噬菌体或质粒等载体中, 制作 cDNA 文库。使用编码小鼠抗体的 C 区部分或 V 区部分的 DNA 作为探针, 从该文库中分别分离出具有编码 VH 或 VL 的 cDNA 的重组噬菌体或重组质粒。分别确定重组噬菌体或重组质粒上的目标小鼠抗体的 VH 或 VL 的全长碱基序列, 由碱基序列分别推测出 VH 或 VL 的全长氨基酸序列。

[0284] 作为人以外的动物, 只要能够制作小鼠、大鼠、仓鼠、兔等的杂交瘤细胞则均可以使用。

[0285] 作为由杂交瘤细胞制备总 RNA 的方法, 可以列举异硫氰酸胍三氟乙酸铯法 [Methods in Enzymol., 154, 3(1987)] 等, 另外, 作为试剂盒, 可以列举 RNAeasy 试剂盒 (QIAGEN 公司制造) 等。作为由总 RNA 制备 mRNA 的方法, 可以列举固定有寡聚 (dT) 的纤维素柱法 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第二版 (冷泉港实验室出版社, 1989)] 等, 另外, 作为试剂盒, 可以列举 OligoTM-dT30<Super>mRNA 纯化试剂盒 (Takara 公司制造) 等。作为由杂交瘤细胞制备 mRNA 的试剂盒, 可以列举 :FastTrack mRNA 分离试剂盒 (Invitrogen 公司制造)、QuickPrepm RNA 纯化试剂盒 (Pharmacia 公司制造) 等。

[0286] 作为 cDNA 的合成和 cDNA 文库的制作方法, 可以列举 :常规方法 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第二版 (冷泉港实验室出版社, 1989)]; Current Protocols in Molecular Biology, 副刊 1-34] 或者使用市售试剂盒例如用于 cDNA 合成和质粒克隆的 SuperScript™ 质粒系统 (Invitrogen 公司制造) 或 ZAP-cDNA 合成试剂盒 (Stratagene 公司制造) 的方法等。

[0287] 在制作 cDNA 文库时, 用于重组以由杂交瘤细胞提取出的 mRNA 为模板而合成的 cDNA 的载体只要是能够重组该 cDNA 的载体则均可以使用。可以使用例如 :ZAPExpress[Str

ategies, 5, 58(1992)], pBluescript IISK(+) [Nucleic Acids Research, 17, 9494(1989)], λ ZAPII (Stratagene 公司制造)、 λ gt10、 λ gt11 [DNA Cloning: A Practical Approach, I, 49(1985)], λ BlueMid (Clontech 公司制造)、 λ ExCell、pT7T318U (Pharmacia 公司制造)、pcD2 [Mol. Cell. Biol., 3, 280(1983)] 和 pUC18 [Gene, 33, 103(1985)] 等。

[0288] 作为用于导入由噬菌体或质粒载体构建的 cDNA 文库的大肠杆菌, 只要是能够导入、表达和保持该 cDNA 文库的大肠杆菌则均可以使用。可以使用例如: XL1-Blue MRF' [Strategies, 5, 81(1992)]、C600 [Genetics, 39, 440(1954)]、Y1088、Y1090 [Science, 222, 778(1983)]、NM522 [J. Mol. Biol., 166, 1(1983)]、K802 [J. Mol. Biol., 16, 118(1966)] 和 JM105 [Gene, 38, 275(1985)] 等。

[0289] 作为从 cDNA 文库中筛选编码非人抗体的 VH 或 VL 的 cDNA 克隆的方法, 可以通过使用同位素或荧光标记的探针的克隆杂交法或噬菌斑杂交法 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第二版 (冷泉港实验室出版社, 1989)] 来进行筛选。另外, 也可以制备引物, 将由 mRNA 合成的 cDNA 或 cDNA 文库作为模板, 通过聚合酶链反应 [以下记为 PCR 法; Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第二版、冷泉港实验室出版社 (1989); Current Protocols in Molecular Biology, 副刊 1-34] 来制备编码 VH 或 VL 的 cDNA。

[0290] 将通过上述方法筛选出的 cDNA 利用适当的限制性酶等进行切割后, 克隆到 pBluescript SK(-) (Stratagene 公司制造) 等质粒中, 进行通常使用的碱基序列分析方法例如桑格 (Sanger, F.) 等人的双脱氧法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463(1977)] 等的反应, 并使用碱基序列自动分析装置例如 A. L. F. DNA 测序仪 (Pharmacia 公司制造) 等进行分析, 由此, 可以确定该 cDNA 的碱基序列。

[0291] 由确定出的碱基序列分别推测 VH 和 VL 的全长氨基酸序列, 与已知的抗体的 VH 和 VL 的全长氨基酸序列 [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services(1991)] 进行比较, 由此, 可以分别确认所获得的 cDNA 是否编码包含分泌信号序列的抗体的 VH 和 VL 的完整氨基酸序列。关于包含分泌信号序列的抗体的 VH 和 VL 的完整氨基酸序列, 通过与已知的抗体的 VH 和 VL 的全长氨基酸序列 [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services(1991)] 进行比较, 可以推测出分泌信号序列的长度和 N 末端氨基酸序列, 进而可以获知它们所属的亚类。另外, VH 和 VL 的各 CDR 的氨基酸序列也通过与已知的抗体的 VH 和 VL 的氨基酸序列 [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services(1991)] 进行比较来找出。

[0292] 进而, 使用 VH 和 VL 的完整氨基酸序列, 利用任意的数据库例如对于 SWISS-PROT 或 PIR- 蛋白等利用 BLAST 法 [J. Mol. Biol., 215, 403(1990)] 等进行序列同源性检索, 从而可以确认使用的氨基酸序列是否是新的氨基酸序列。

[0293] (3) 人嵌合抗体表达载体的构建

[0294] 将编码非人抗体的 VH 或 VL 的 cDNA 分别克隆到本项 2 的 (1) 中记载的基因重组抗体表达用载体的编码人抗体的 CH 或 CL 的各基因的上游, 从而可以构建人嵌合抗体表达载体。例如, 为了使编码非人抗体的 VH 或 VL 的 cDNA 的 3' 末端侧与人抗体的 CH 或 CL 的 5' 末端侧连接, 制作以如下方式设计的 VH 和 VL 的 cDNA: 连接部分的碱基序列编码适当的氨基酸并且为适当的限制性酶识别序列。将所制作的 VH 和 VL 的 cDNA 分别克隆到本项 2

的(1)中记载的人源化抗体表达用载体的编码人抗体的 CH 或 CL 的各基因的上游,以使它们以适当的形式进行表达,从而可以构建人嵌合抗体表达载体。另外,也可以使用在两端具有适当的限制性酶的识别序列的合成 DNA,通过 PCR 法对编码非人抗体 VH 或 VL 的 cDNA 分别进行扩增,并将它们分别克隆到本项 2 的(1)中记载的基因重组抗体表达用载体中。

[0295] (4) 编码人源化抗体的 V 区的 cDNA 的构建

[0296] 编码人源化抗体的 VH 或 VL 的 cDNA 可以如下构建。首先,分别选择用于移植非人抗体的 VH 或 VL 的 CDR 的氨基酸序列的人抗体的 VH 或 VL 的框架区(以下记为 FR)的氨基酸序列。作为选择的 FR 的氨基酸序列,只要是人抗体来源的氨基酸序列则均可以使用。可以列举例如:蛋白数据库(Protein Data Bank)等数据库中登记的人抗体的 FR 的氨基酸序列、人抗体的 FR 的各亚类的共有氨基酸序列[Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services(1991)]等。为了抑制抗体的结合活性的降低,选择与原来的抗体的 VH 或 VL 的 FR 的氨基酸序列具有尽量高的同源性(至少 60% 以上)的 FR 的氨基酸序列。接着,向选择好的人抗体的 VH 或 VL 的 FR 的氨基酸序列中分别移植原抗体的 CDR 的氨基酸序列,从而分别设计出人源化抗体的 VH 或 VL 的氨基酸序列。考虑在抗体基因的碱基序列中出现的密码子的使用频率[Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services(1991)],将设计好的氨基酸序列转变为 DNA 序列,从而分别设计出编码人源化抗体的 VH 或 VL 的氨基酸序列的 DNA 序列。基于设计好的 DNA 序列,合成多条包含约 100 个碱基的长度的合成 DNA,使用这些合成 DNA 进行 PCR 法。这种情况下,从 PCR 中的反应效率和能够合成的 DNA 的长度考虑,优选对于 H 链、L 链均设计 6 条合成 DNA。

[0297] 另外,通过在位于两端的合成 DNA 的 5' 末端导入适当的限制性酶的识别序列,可以容易地将编码人源化抗体的 VH 或 VL 的 cDNA 克隆到本项 2 的(1)中构建的人源化抗体表达用载体中。PCR 反应后,将扩增产物分别克隆到 pBluescript SK(-)(Stratagene 公司制造)等质粒中,通过本项 2 的(2)中记载的方法来确定碱基序列,从而获得具有编码期望的人源化抗体的 VH 或 VL 的氨基酸序列的 DNA 序列的质粒。

[0298] (5) 人源化抗体的 V 区的氨基酸序列的改变

[0299] 已知:仅将非人抗体的 VH 和 VL 的 CDR 移植到人抗体的 VH 和 VL 的 FR 中时,人源化抗体的抗原结合活性与原来的非人抗体相比降低[BIO/TECHNOLOGY, 9, 266(1991)]。认为其原因在于,原来的非人抗体的 VH 和 VL 中,不仅 CDR 与抗原结合活性相关,而且 FR 内的氨基酸残基也直接或间接地与抗原结合活性相关,因此,通过人源化使非人抗体的 FR 的氨基酸残基取代之人抗体的 FR 的氨基酸残基时,抗原结合活性降低。为了解决该问题,在人源化抗体中,鉴定出人抗体的 VH 和 VL 的 FR 的氨基酸序列中直接与抗原的结合相关的氨基酸残基、与 CDR 的氨基酸残基相互作用的氨基酸残基以及维持抗体的立体结构并间接与抗原的结合相关的氨基酸残基,将这些氨基酸残基取代之原来的非人抗体的氨基酸残基,由此使降低的抗原结合活性升高[BIO/TECHNOLOGY, 9, 266(1991)]。人源化抗体的制作中,为了解决如何能够有效地鉴定出这些与抗原结合活性相关的 FR 的氨基酸残基的问题,利用 X 射线晶体分析[J. Mol. Biol., 112, 535(1977)]或计算机模拟分析[Protein Engineering, 7, 1501(1994)]等进行抗体的立体结构的构建和分析。上述抗体的立体结构的信息给人源化抗体的制作带来很多有益的信息,而另一方面,尚未建立能够适用于所有

抗体的人源化抗体的制作方法,就现状而言,需要进行针对各个抗体制作多种改变体并研究它们与抗原结合活性的相关性等各种尝试。

[0300] 人抗体的 VH 和 VL 的 FR 的氨基酸残基可以通过使用改变用合成 DNA 进行本项 2 的 (4) 中记载的 PCR 法来进行改变。对于 PCR 后的扩增产物,通过本项 2 的 (2) 中记载的方法来确定碱基序列,从而确认已实施了目标改变。

[0301] (6) 人源化抗体表达载体的构建

[0302] 将构建好的编码基因重组抗体的 VH 或 VL 的 cDNA 分别克隆到本项 2 的 (1) 中记载的基因重组抗体表达用载体的编码人抗体的 CH 或 CL 的各基因的上游,从而可以构建人源化抗体表达载体。

[0303] 例如,通过向本项 2 的 (4) 和 (5) 中构建人源化抗体的 VH 或 VL 时使用的合成 DNA 中、位于两端的合成 DNA 的 5' 末端导入适当的限制性酶的识别序列,可以将构建好的 VH 或 VL 的 cDNA 分别克隆到本项 2 的 (1) 中记载的人源化抗体表达用载体的编码人抗体的 CH 或 CL 的各基因的上游,以使它们以适当的形式进行表达。

[0304] (7) 基因重组抗体的瞬时表达

[0305] 为了有效地评价制作的多种人源化抗体的抗原结合活性,可以使用本项 2 的 (3) 和 (6) 中记载的基因重组抗体表达载体或者对上述载体进行改变后的表达载体,进行基因重组抗体的瞬时表达。作为用于导入表达载体的宿主细胞,只要是能够表达基因重组抗体的宿主细胞则可以使用任何细胞,从表达量高的观点出发,一般使用 COS-7 细胞 (ATCC CRL1651) [Methods in Nucleic Acids Res., CRC press, 283(1991)]。作为将表达载体导入 COS-7 细胞的方法,可以列举:DEAE-右旋糖酐法 [Methods in Nucleic Acids Res., CRC press, 283(1991)]、脂质体转染法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413(1987)] 等。

[0306] 导入表达载体后,培养上清中的基因重组抗体的表达量和抗原结合活性可以通过酶联免疫吸附法 [以下记为 ELISA 法; Monoclonal Antibodies-Principles and practice, 第三版, 美国学术出版社 (1996)、Antibodies-A Laboratory Manual, 冷泉港实验室 (1988)、単クローン抗体実験マニュアル、講談社サイエンティフィック (1987)] 等来测定。

[0307] (8) 基因重组抗体的稳定表达

[0308] 通过将本项 2 的 (3) 和 (6) 中记载的基因重组抗体表达载体导入适当的宿主细胞中,可以得到稳定表达基因重组抗体的转化株。

[0309] 作为将表达载体导入宿主细胞的方法,可以列举电穿孔法 [日本特开平 2-257891、Cytotechnology, 3, 133(1990)] 等。

[0310] 作为用于导入基因重组抗体表达载体的宿主细胞,只要是能够表达基因重组抗体的宿主细胞则可以使用任何细胞。可以列举例如:小鼠 SP2/0-Ag14 细胞 (ATCC CRL1581)、小鼠 P3X63-Ag8.653 细胞 (ATCC CRL1580)、两种中国仓鼠卵巢细胞 CHO/dhfr- 细胞 (ATCC CRL9096) 和 CHO/DG44 细胞 [Somatic Cell and Molecular Genetics, 12, 555(1986)]、获得了凝集素抗性的 Lec13 细胞 [Somatic Cell and Molecular genetics, 12, 55(1986)]、 $\alpha 1, 6$ -岩藻糖转移酶基因缺失的 CHO 细胞 (W005/35586、W002/31140)、大鼠 YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 细胞 (ATCC CRL1662) 等。

[0311] 除了上述宿主细胞以外,还可以使用与细胞内糖核苷酸 GDP-岩藻糖的合成相关

的酶等蛋白质、与在 N-糖苷键复合型糖链的还原末端的 N-乙酰葡萄糖胺的 6 位上使岩藻糖的 1 位进行 α 连接的糖链修饰相关的酶等蛋白质或与细胞内糖核苷酸 GDP-岩藻糖向高尔基体的转运相关的蛋白质等的活性降低或缺失的宿主细胞,优选使用 W005/35586、W002/31140 等中记载的 α 1,6-岩藻糖转移酶基因缺失的 CHO 细胞等。

[0312] 导入表达载体后,根据日本特开平 2-257891 中公开的方法,在含有 G418 硫酸盐(以下记为 G418, SIGMA 公司制造)等药剂的动物细胞培养用培养基中进行培养,由此可以筛选稳定表达基因重组抗体的转化株。作为动物细胞培养用培养基,可以使用: RPMI1640 培养基(Invitrogen 公司制造)、GIT 培养基(日本制药公司制造)、EX-CELL301 培养基(JRH 公司制造)、IMDM 培养基(Invitrogen 公司制造)、杂交瘤-SFM 培养基(Invitrogen 公司制造)或者在这些培养基中添加有胎牛血清(以下记为 FCS)等各种添加物的培养基等。通过将所得到的转化株在培养基中进行培养,可以在培养上清中表达并蓄积基因重组抗体。培养上清中的基因重组抗体的表达量和抗原结合活性可以通过 ELISA 法等来测定。另外,可以根据日本特开平 2-257891 中公开的方法,利用 DHFR 扩增系统等,使转化株的基因重组抗体的表达量升高。

[0313] 基因重组抗体可以使用蛋白 A 层析柱从转化株的培养上清中进行纯化[Monoclonal Antibodies-Principles and practice, 第三版,美国学术出版社(1996); Antibodies-A Laboratory Manual, 冷泉港实验室(1988)]。另外,除此以外,可以使用蛋白纯化中通常使用的纯化方法。例如,可以将凝胶过滤、离子交换层析和超滤等组合来进行纯化。纯化后的基因重组抗体的 H 链、L 链或整个抗体分子的分子量可以通过聚丙烯酰胺凝胶电泳[以下记为 SDS-PAGE; Nature, 227, 680(1970)]或蛋白免疫印迹法[Monoclonal Antibodies-Principles and practice, 第三版,美国学术出版社(1996); Antibodies-A Laboratory Manual, 冷泉港实验室(1988)]等来测定。

[0314] 3. 本发明的抗体或抗体片段的活性评价

[0315] 纯化后的本发明的抗体或抗体片段的反应特异性可以如下进行评价。

[0316] 将表达正常型糖链的细胞和在 O 连接型糖链合成过程中向多肽上的 Ser/Thr 上结合的 GalNAc 上附加 Gal 的酶、与该酶的活性相关的蛋白质或与尿苷 5'-二磷酸半乳糖(UDP-半乳糖)的转运相关的蛋白质等的活性降低或缺失的细胞系作为宿主,可以分别制作表达编码 IgA1 重链的碱基序列(3)的 IgA1 表达细胞。这样,可以制作出表达具有正常 O 连接型糖链的 IgA1 的细胞、表达糖链缺陷型 IgA1 的细胞,并通过 ELISA 法和荧光抗体法[Cancer Immunol. Immunother., 36, 373(1993)]等测定表达各 IgA1 的细胞系与纯化抗体的反应性。

[0317] 另外,通过将膜型 IgA1 的细胞外结构域以融合蛋白等可溶物的形式分别在上述宿主细胞中进行表达并在适当的条件下进行纯化,可以分别制作保持了立体结构的可溶型 IgA1 蛋白。作为融合蛋白,可以列举:使 IgA1 蛋白与抗体恒定区(也称为 Fc)、GST 标签、组氨酸标签(也称为 His 标签)或 Myc 标签等其他多肽融合而得到的蛋白。该融合蛋白可以通过使用蛋白 A、镍柱、特异性抗体柱等亲和层析柱来进行分离纯化。也可以通过利用表面等离子体共振(SPR)的 BIAcore™、ELISA 法或免疫沉淀法等来测定这些纯化的可溶型 CD27 蛋白与纯化抗体的反应性[Monoclonal Antibodies-Principles and practice, 第三版,美国学术出版社(1996); Antibodies-A Laboratory Manual, 冷泉港实验室(1988)]。

[0318] 4. 使用特异性识别本发明的糖链缺陷型 IgA1 且与该重链铰链区结合的单克隆抗体或其抗体片段的疾病诊断方法

[0319] 通过使用本发明的抗体或该抗体片段对糖链缺陷型 IgA1 或表达、蓄积该多肽的细胞进行检测或定量,可以诊断糖链缺陷型 IgA1 相关疾病。

[0320] 作为与糖链缺陷型 IgA1 蛋白或表达糖链缺陷型 IgA1 的细胞相关的疾病,只要是在生物体内发现包含糖链缺陷型 IgA1 多肽的蛋白或者表达糖链缺陷型 IgA1 多肽的细胞的疾病则均包括在内。优选为与健康人相比时与糖链缺陷型 IgA1 蛋白或表达糖链缺陷型 IgA1 的细胞相关的疾病的患者的该多肽的表达量增加的疾病。具体而言,可以列举自身免疫疾病或癌症。作为自身免疫疾病,可以列举:以 IgA 肾病为主的慢性肾小球肾炎、系统性红斑狼疮、过敏性紫癜等。另外,作为癌症,可以列举来源于浆细胞的癌症,具体而言,可以列举:浆细胞瘤、IgA 型骨髓瘤套细胞淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病、小淋巴细胞性白血病、伯基特(バーキット)淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、粘膜相关淋巴组织淋巴瘤、弥漫性大细胞淋巴瘤、浆细胞瘤等。

[0321] 本发明中,作为糖链缺陷型 IgA1 多肽的检测或测定对象的生物试样,只要是组织细胞、血液、血浆、血清、胰液、尿液、粪便、组织液、培养液等可能包含该多肽的试样则没有特别限定。

[0322] 与糖链缺陷型 IgA1 相关的疾病中,例如,IgA 肾病的诊断可以如下进行。

[0323] 对于从多名健康人的体内收集的生物试样,使用本发明的抗体或该抗体片段或者它们的衍生物,利用下述的免疫学方法,进行糖链缺陷型 IgA1 多肽的检测或测定,从而确认健康人的生物试样中的该多肽的表达量。对受试者的生物试样也同样考察该多肽的表达量,将其表达量与健康人的表达量进行比较。在受试者的该多肽的表达量与健康人相比增加的情况下,可以判断为 IgA 肾病或者将来患 IgA 肾病的可能性高。

[0324] 与糖链缺陷型 IgA1 相关的疾病中,例如癌症的诊断可以如下进行。

[0325] 对于从多名健康人的生物体内收集的生物试样,使用本发明的抗体或该抗体片段或者它们的衍生物,利用下述的免疫学方法,进行糖链缺陷型 IgA1 多肽的检测或测定,从而确认健康人的生物试样中的该多肽的表达量。对受试者的生物试样也同样考察该多肽的表达量,将其表达量与健康人的表达量进行比较。在受试者的该多肽的表达量与健康人相比增加的情况下,可以判断癌症为阳性。

[0326] 含有本发明的抗体或该抗体片段或者它们的衍生物的诊断剂中,根据目标的诊断方法,可以含有用于进行抗原抗体反应的试剂、该反应的检测用试剂。作为用于进行抗原抗体反应的试剂,可以列举缓冲剂、盐等。作为检测用试剂,可以列举:抗体或该抗体片段、或者它们的衍生物、或者识别它们的衍生物的标记的二次抗体、标记物的底物等通常的免疫学检测或测定方法中使用的试剂。

[0327] 作为本发明中检测或测定糖链缺陷型 IgA1 的量的方法,可以列举任意的公知方法。例如,可以列举免疫学检测或测定方法等。

[0328] 免疫学检测或测定方法是指使用实施过标记的抗原或抗体来检测或测定抗体量或抗原量的方法。作为免疫学检测或测定方法,可以列举:放射免疫测定法(RIA)、酶免疫测定法(EIA或ELISA)、荧光免疫测定法(FIA)、发光免疫测定法(luminescent immunoassay)、蛋白免疫印迹法和物理化学方法(TIA、LAPIA、PCIA)等。

[0329] 作为放射免疫测定法 (RIA), 例如可以列举下述方法: 使本发明的抗体或该抗体片段与抗原或表达抗原的细胞等反应, 进而使实施过放射线标记的抗免疫球蛋白抗体或结合片段进行反应, 然后, 利用闪烁计数仪等进行测定。

[0330] 作为酶免疫测定法 (EIA 或 ELISA), 例如可以列举下述方法: 使本发明的抗体或该抗体片段与抗原或表达抗原的细胞等反应, 进而使实施过标记的抗免疫球蛋白抗体或结合片段进行反应, 然后, 利用吸光光度计来测定发光色素; 可以使用例如夹心 ELISA 法等。作为酶免疫测定法中使用的标记物, 可以使用如上所述的任意的公知 (石川荣次等编, 酶免疫测定法, 医学书院) 的酶标记。可以使用例如: 碱性磷酸酶标记、过氧化物酶标记、荧光素酶标记、生物素标记等。

[0331] 夹心 ELISA 法为如下方法: 将抗体结合在固相上后, 使其捕获要检测或测定的抗原, 并使第二抗体与被捕获的抗原反应。该 ELISA 法中, 准备两种识别要检测或测定的抗原的抗体或抗体片段, 其抗原识别部位不同, 预先使其中一种抗体或抗体片段吸附到板 (例如, 96 孔板) 上, 将第二抗体或抗体片段用 FITC 等荧光物质、过氧化物酶等酶、生物素等预先进行标记。在吸附有上述抗体的板上, 使从生物体内分离出的细胞或其破碎液、组织或其破碎液、细胞培养上清、血清、胸水、腹水、眼液等进行反应, 然后, 使标记后的单克隆抗体或抗体片段反应, 并进行与标记物质相对应的检测反应。在利用该方法测定受试样品中的抗原浓度的情况下, 可以由将浓度已知的抗原进行梯度稀释而制作的标准曲线计算出受试样品中的抗原浓度。作为夹心 ELISA 法中使用的抗体, 可以使用多克隆抗体、单克隆抗体中的任意一种, 也可以使用 Fab、Fab'、F(ab')₂ 等抗体片段。作为夹心 ELISA 法中使用的两种抗体的组合, 可以是识别不同表位的单克隆抗体或抗体片段的组合, 也可以是为多克隆抗体与单克隆抗体或抗体片段的组合。

[0332] 作为荧光免疫测定法 (FIA), 可以列举文献 [Monoclonal Antibodies-Principles and practice, 第三版, 美国学术出版社 (1996); 単クローン抗体実験マニュアル、講談社サイエンティフィック (1987)] 等中记载的方法。作为荧光免疫测定法中使用的标记物, 可以使用如上所述的任意的公知 (川生明著, 荧光抗体法, ソフトサイエンス公司) 的荧光标记。例如, 可以使用 FITC 标记、RITC 标记等。

[0333] 作为发光免疫测定法 (luminescent immunoassay), 可以使用 [Monoclonal Antibodies-Principles and practice, 第三版, 美国学术出版社 (1996); 単クローン抗体実験マニュアル、講談社サイエンティフィック (1987)] 等中记载的方法来进行。作为发光免疫测定法中使用的标记物, 可以列举如上所述的任意的公知 [今井一洋编, 生物发光和化学发光, 广川书店; 临床检查 42 (1998)] 的发光体标记。例如, 可以使用吖啶酯标记、洛酚碱标记等。

[0334] 蛋白免疫印迹法为如下方法: 将抗原或表达抗原的细胞等用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 [Antibodies-A Laboratory Manual (冷泉港实验室, 1988)] 使级分分离后, 将该凝胶印迹到 PVDF 膜或硝酸纤维素膜上, 使识别抗原的抗体或抗体片段与该膜进行反应, 进而使实施过 FITC 等荧光物质、过氧化物酶等酶标记、生物素标记等的抗小鼠 IgG 抗体或结合片段进行反应, 然后, 使该标记可见化, 由此来进行确认。以下示出蛋白免疫印迹法的一例。

[0335] 使表达具有序列号 2 表示的氨基酸序列的多肽的细胞或组织溶解, 在还原条件下使每个泳道的蛋白量为 0.1~30 μ g, 通过 SDS-PAGE 法进行电泳。将电泳后的蛋白转印到

PVDF 膜上,在含有 1%BSA 的 PBS(以下记为 BSA-PBS) 中在室温下反应 30 分钟,进行封闭操作。在此,使本发明的单克隆抗体进行反应,用含有 0.05% 的吐温-20 的 PBS(以下记为吐温-PBS) 进行洗涤,并使过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 在室温下反应 2 小时。用吐温-PBS 洗涤,使用 ECLTM 蛋白免疫印迹检测试剂(Amersham 公司制造) 等对结合有单克隆抗体的条带进行检测,由此,可以检测出具有序列号 2 表示的氨基酸序列的多肽。作为蛋白免疫印迹法的检测中使用的抗体,可以使用能够与未保持天然型的立体结构的多肽结合的抗体。

[0336] 物理化学方法具体而言可以如下进行:使用本发明的抗体或该抗体片段,使作为抗原的结合半乳糖缺失的 O 型糖链的 CD27 与本发明的抗体或该抗体片段结合,由此形成凝集体,并对该凝集体进行检测。除此以外,作为物理化学方法,可以列举:毛细管法、一维免疫扩散法、免疫比浊法或乳胶免疫比浊法等[临床检查法提要,金原出版,499(1998)]。

[0337] 例如,乳胶免疫比浊法中,使用敏化抗体或抗原的粒径约 $0.1\mu\text{m} \sim 1\mu\text{m}$ 的聚苯乙烯乳胶等载体,利用对应的抗原或抗体引起抗原抗体反应时,反应液中的散射光增加,透射光减少。将该变化以吸光度或积分球浊度的形式进行检测,由此可以测定受试样中的抗原浓度等。

[0338] 由于本发明的抗体或该抗体片段能够与糖链缺陷型 IgA1 多肽的重链铰链区结合,因此,可以适合用于检测表达该多肽的细胞。

[0339] 在表达该多肽的细胞的检测中,可以使用公知的免疫学检测方法,优选使用免疫沉淀法、免疫细胞染色法和免疫组织染色法等。另外,也可以应用使用 FMAT8100HTS 系统(アプライドバイオシステム公司制造)的荧光抗体染色法等。

[0340] 免疫沉淀法为如下方法:使表达该多肽的细胞等与本发明的单克隆抗体或抗体片段反应后,加入对蛋白 G-琼脂糖等免疫球蛋白具有特异性结合能力的载体而使抗原抗体复合物沉淀。或者,也可以通过如下方法来进行。

[0341] 使上述本发明的抗体或该抗体片段固相化于 ELISA 用 96 孔板上,然后,利用 BSA-PBS 进行封闭。在抗体为未纯化的状态例如杂交瘤培养上清等未纯化的状态下,使抗小鼠免疫球蛋白或大鼠免疫球蛋白或蛋白 A 或 G 等预先固相化于 ELISA 用 96 孔板上,用 BSA-PBS 封闭后,分注杂交瘤培养上清而使其进行结合。弃去 BSA-PBS,用 PBS 充分洗涤后,使表达具有序列号 2 表示的氨基酸序列的多肽的细胞或组织的溶解液进行反应。用 SDS-PAGE 用样品缓冲液从充分洗涤后的板上提取出免疫沉淀物,通过上述蛋白免疫印迹法进行检测。

[0342] 免疫细胞染色法和免疫组织染色法是指如下的荧光抗体染色法(流式细胞术):将表达抗原的细胞或组织等根据需要用表面活性剂或甲醇等进行处理,以增加抗体的通过性,然后使本发明的抗体进行反应,进而,使实施过 FITC 等荧光标记、过氧化物酶等酶标记、生物素标记等的抗免疫球蛋白抗体或结合片段进行反应,然后,使该标记可见化并利用显微镜进行显微观察,或者使细胞与荧光标记的抗体反应并利用流式细胞仪进行分析。例如,可以使用文献[Monoclonal Antibodies-Principles and practice,第三版,美国学术出版社(1996);単クローン抗体実験マニュアル、講談社サイエンティフィック(1987)]等中记载的方法来进行。特别是,由于本发明的抗体或该抗体片段能够与糖链缺陷型 IgA1 的重链铰链区结合,因此,可以优选用于对细胞膜上保持天然型立体结构而表达的 CD27 进

行检测的流式细胞术的分析。

[0343] 另外,通过使用利用荧光抗体染色法原理的 FMAT8100HTS 系统(アプライドバイオシステム公司制造),可以在不对所形成的抗体-抗原复合物与未参与抗体-抗原复合物形成的游离抗体或抗原进行分离的情况下测定抗原量或抗体量。

[0344] 5. 使用特异性识别并结合本发明的糖链缺陷型 IgA1 多肽的单克隆抗体或该抗体片段的疾病治疗方法

[0345] 本发明的特异性识别糖链缺陷型 IgA1 多肽且与该重链铰链区结合的单克隆抗体或其抗体片段可以用于治疗与糖链缺陷型 IgA1 多肽相关的疾病。

[0346] 作为与糖链缺陷型 IgA1 多肽相关的疾病,只要是在生物体内发现表达该多肽的细胞的疾病则可以为任何疾病,可以列举例如 IgA 肾病或癌症等。

[0347] 此外,作为疾病,还可以列举患有 IgA 肾病并表现肾病综合征的疾病或表现肾衰竭的疾病。

[0348] 作为癌症,可以列举造血器官起源的肿瘤(也称为血液癌)或上皮起源的实体癌。

[0349] 作为血液癌,具体而言,可以列举:白血病、淋巴瘤(霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤)、多发性骨髓瘤等。作为具体的非霍奇金淋巴瘤,可以列举:套细胞淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病、小淋巴细胞性白血病、伯基特淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、粘膜相关淋巴组织淋巴瘤、弥漫性大细胞淋巴瘤、浆细胞瘤等。

[0350] 作为实体癌,具体而言,可以列举:乳腺癌、子宫癌、大肠癌、胃癌、卵巢癌、肺癌、肾癌、直肠癌、甲状腺癌、子宫颈癌、小肠癌、前列腺癌或胰腺癌等。

[0351] 作为本发明的治疗剂,可以列举以本发明的抗体或该抗体片段作为有效成分的癌治疗剂。具有 ADCC 活性或 CDC 活性等效应活性的癌治疗剂或者利用凋亡诱导作用的癌治疗剂等也包括在本发明的治疗剂内。

[0352] 本发明的抗体或该抗体片段能够识别在细胞膜上表达的糖链缺陷型 IgA1 多肽,因此,能够识别生物体内存在的表达糖链缺陷型 IgA1 多肽的细胞。因此,属于本发明的抗体或该抗体片段且具有效应活性的抗体或该抗体片段能够在体内和体外杀伤表达糖链缺陷型 IgA1 多肽的细胞。另外,上述本发明的抗体或该抗体片段能够杀伤生物体内的表达糖链缺陷型 IgA1 多肽的细胞而使其减少,因此,可以作为治疗剂特别有效地使用。

[0353] 含有本发明的抗体或该抗体片段或者它们的衍生物的治疗剂可以仅含有作为有效成分的该抗体或该抗体片段或者它们的衍生物,通常优选以与药理学上可容许的一种以上的载体一同混合并通过制剂学的技术领域中公知的任意方法制造而成的医药制剂的形式来提供。

[0354] 施用途径优选使用治疗时最有效的途径,可以列举:经口施用或者口腔内、气管内、直肠内、皮下、肌肉内和静脉内等非经口施用,在抗体或肽制剂的情况下,可以优选列举静脉内施用。作为施用形式,可以列举:喷雾剂、胶囊剂、片剂、颗粒剂、糖浆剂、乳剂、栓剂、注射剂、软膏、胶带剂等。

[0355] 作为适于经口施用的制剂,可以列举:乳剂、糖浆剂、胶囊剂、片剂、散剂、颗粒剂等。乳剂和糖浆剂这样的液体制备物可以使用如下成分作为添加剂来制造:水、蔗糖、山梨醇、果糖等糖类,聚乙二醇、聚丙二醇等二醇类,芝麻油、橄榄油、大豆油等油类,对羟基苯甲酸酯等防腐剂,草莓香料、薄荷等香料类。胶囊剂、片剂、散剂、颗粒剂等可以使用如下成分

作为添加剂来制造：乳糖、葡萄糖、蔗糖、甘露醇等赋形剂，淀粉、海藻酸钠等崩解剂，硬脂酸镁、滑石等润滑剂，聚乙烯醇、羟丙基纤维素、明胶等粘结剂、脂肪酸酯等表面活性剂、甘油等增塑剂等。

[0356] 作为适于非经口施用的制剂，可以列举注射剂、栓剂、喷雾剂等。注射剂使用包含盐溶液、葡萄糖溶液或者两者的混合物的载体等来制备。栓剂使用可可脂、氢化脂肪或羧酸等载体来制备。另外，喷雾剂使用该抗体或抗体片段本身以及不刺激接受者的口腔和气管粘膜并且使该抗体或抗体片段分散为微细粒子而容易吸收的载体等来制备。作为载体，具体可以例示例如乳糖、甘油等。根据该抗体或抗体片段和使用的载体的性质，可以为气溶胶、干粉等制剂。另外，也可以向这些非经口剂中添加在经口剂中作为添加剂而例示的成分。

[0357] 施用量或施用次数根据目标治疗效果、施用方法、治疗时间、年龄、体重等而不同，通常成人每天为 $10 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 8\text{mg}/\text{kg}$ 。

[0358] 以下，通过实施例更具体地对本发明进行说明，但本发明不受下述实施例的限定。

[0359] 实施例 1

[0360] 在细胞膜上高表达糖链缺陷型 IgA1 的 CHO 细胞株的制作

[0361] (1) 膜型 IgA 表达质粒 pKAN932B8PVHmIgA 的构建

[0362] 按照以下顺序制作用于在细胞膜上表达膜型免疫球蛋白 A 的载体 pKAN932B8PVHmIgA。本质粒是记载在专利 W003/085107 中的表达使抗 CD20 抗体 2B8P 的重链 Fab 部分与膜型免疫球蛋白的恒定区连接而成的蛋白质的质粒载体。

[0363] 1. pCR2B8PVH 的制作

[0364] 以专利 W003/085107 中记载的质粒载体 pKANTEX932B8P 为模板，通过以下所示的 PCR 反应对包含抗 CD20 抗体 2B8P 的重链可变区的基因片段进行扩增。在含有 0.2 毫摩尔 / 升 dNTPs、1 毫摩尔 / 升氯化镁的反应液中使用 1ng 的 pKANTEX932B8P、1 微摩尔 / 升 RitNotNheIfw (序列号 4)、1 微摩尔 / 升 RitNotNheIrv (序列号 5) 和 2.5 单位的 KOD 聚合酶 (东洋纺公司制造)，调节至总计 $50 \mu\text{L}$ ，进行 PCR 反应。反应条件为：以 98°C 下 15 秒、 65°C 下 2 秒、 74°C 下 30 秒为 1 次循环，进行 25 次循环。将该反应液利用 2% 的琼脂糖凝胶电泳进行分离，然后，使用 Zero Blunt PCR 克隆试剂盒 (インビトロジエン公司制造)，依照附带的使用说明书将约 450bp 的 PCR 产物导入 pCR-Blunt 载体中，从而获得具有序列号 6 所示的 DNA 序列的 pCR2B8PVH (图 1)。

[0365] 2. pCRIgA 的制作

[0366] 接着，以作为人源 cDNA 克隆 FLJ46724 登记在基因库 (Genebank) 中的质粒 (由 NEDO 人类 cDNA 测序项目分售) 为模板，使用以下所示的 PCR 对包含免疫球蛋白 A 的恒定区的 DNA 片段进行扩增。在含有 0.2 毫摩尔 / 升 dNTPs、1 毫摩尔 / 升氯化镁的反应液中使用 1ng 包含 FLJ46724 的质粒、1 微摩尔 / 升 Ig-a-NheI (序列号 7)、1 微摩尔 / 升 Ig-b-BamHI (序列号 8) 和 2.5 单位的 KOD 聚合酶 (东洋纺公司制造)，调节至总计 $50 \mu\text{L}$ ，进行 PCR 反应。反应条件为：以 98°C 下 15 秒、 68°C 下 30 秒为 1 次循环，进行 25 次循环。将该反应液利用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行分离，然后，使用 Zero Blunt PCR 克隆试剂盒 (インビトロジエン公司制造)，依照附带的使用说明书将约 1000bp 的 PCR 产物导入 pCR-Blunt 载体中，从而获得具有序列号 9 所示的 DNA 序列的 pCRIgA (图 2)。

[0367] 3. pCRmIgA 的制作

[0368] 接着,在含有 0.2 毫摩尔 / 升 dNTPs、1 毫摩尔 / 升氯化镁的反应液中使用 0.02 微摩尔 / 升的 AMD-A(序列号 10)、0.02 微摩尔 / 升的 AMD-B(序列号 11)、1 微摩尔 / 升的 AMDBamHIfw(序列号 12)、1 微摩尔 / 升的 AMDSpeIrv(序列号 13) 和 2.5 单位的 KOD 聚合酶(东洋纺公司制造),调节至总计 50 μ L,进行 PCR 反应。反应条件为:以 98 $^{\circ}$ C 下 15 秒、65 $^{\circ}$ C 下 2 秒、74 $^{\circ}$ C 下 30 秒为 1 次循环,进行 25 次循环。将该反应液利用 2% 的琼脂糖凝胶电泳进行分离,然后,使用 Zero Blunt PCR 克隆试剂盒(インビトロジエン公司制造),依照附带的使用说明书将约 450bp 的 PCR 产物导入 pCR-Blunt 载体中,从而获得具有序列号 14 所示的 DNA 序列的 pCRmIgA(图 3)。

[0369] 4. pCR 2B8P mIgA 的制作

[0370] 使将上述 1 项中制作的 pCR2B8PVH 用限制性酶 NotI 和限制性酶 NheI 消化而得到的约 450bp 的 DNA 片段和将上述 2 项中制作的 pCRIgA 用限制性酶 NheI 和限制性酶 BamHI 消化而得到的约 1000bp 的 DNA 片段与将上述 3 项中制作的 pCRmIgA 用限制性酶 NotI 和限制性酶 BamHI 消化而得到的约 3.5Kbp 的质粒 DNA 连接,由此,构建编码抗 CD20 抗体 2B8P 的重链可变区与膜型免疫球蛋白的重链恒定区连接而成的 DNA 的质粒 pCR 2B8P mIgA(图 4)。将本质粒所编码的膜型 IgA1 序列(重链)示于序列号 15。

[0371] 5. pKAN932B8PmIgA 的构建

[0372] 使将上述 4 项中制作的 pCR 2B8P mIgA 用限制性酶 NotI 和限制性酶 SpeI 消化而得到的 1580bp 的 DNA 片段和将 KANTEX932B8P 用限制性酶 EcoRI 和限制性酶 NotI 消化而得到的 2845bp 的 DNA 片段与同样将 pKANTEX932B8P 用限制性酶 EcoRI 和限制性酶 SpeI 消化而得到的约 13.5Kbp 的 DNA 片段连接,由此,制作表达抗 CD20 抗体 2B8P 的恒定区为膜型免疫球蛋白 A 的蛋白的质粒 pKAN932B8PmIgA(图 5)。将使用该表达载体转化的大肠杆菌接种到 100mL 的 LB 培养基中,培养过夜后,回收菌体,使用 Qiafilter 质粒中量纯化试剂盒(Qiafilter Plasmid midi kit)(キアゲン公司制造),依照附带的规程对质粒进行纯化。纯化后,将 30 μ g 的质粒载体用限制性酶 AatII 进行消化,由此进行线性化。线性化之后,进行苯酚 / 氯仿抽提和乙醇沉淀,溶解于 1/10 浓度的 TE 缓冲液(1mM TrisHCl, 0.1mM EDTA)后,测定浓度,并供于基因导入。

[0373] (2) 膜型免疫球蛋白 A 表达质粒 pKAN932B8PmIgA 的导入

[0374] 将 pKAN932B8PmIgA 基因导入作为主要表达 Tn 型糖链的突变 CHO 细胞的 Lec8 细胞和主要表达正常型糖链的 CHO/DG44 细胞中,由此,建立表达膜型免疫球蛋白 A 的 Lec8 细胞和 DG44 细胞。膜型免疫球蛋白 A 表达质粒 pKAN932B8PmIgA 向 CHO/DG44 细胞(以下记为 DG44)或 Lec8 细胞中的导入可以依据电穿孔法[サイトテクノロジー, 3, 133(1990)]按照以下顺序进行。首先,将在基本培养基[添加有 10% 胎牛透析血清(インビトロジエン公司)、50 μ g/mL 庆大霉素(ナカライテスク公司)和 1 \times HT 添加剂(インビトロジエン公司制造)的伊思考夫改良的杜尔贝科培养基(Iscove's Modified Dulbecco's Medium)(インビトロジエン公司)]中传代的 DG44 细胞悬浮于 K-PBS 缓冲液[137 毫摩尔 / 升 KCl、2.7 毫摩尔 / 升 NaCl、8.1 毫摩尔 / 升 Na₂HPO₄、1.5 毫摩尔 / 升 KH₂PO₄、4.0 毫摩尔 / 升 MgCl₂]中,使其达到 8 \times 10⁶ 个 / mL,制备细胞悬浮液。将 200 μ L(1.8 \times 10⁶ 个)制备好的细胞悬浮液与 10 μ g 上述 (1) 中制备的线性化质粒 pKAN932B8PmIgA 混合。但是, Lec8 细

胞的传代在未添加 1×HT 添加剂的基本培养基（以下记为 HT- 培养基）中进行。将该细胞 DNA 混合液转移到 Gene Pulser 的电击杯（电极之间的距离为 2mm）(BIO-RAD 公司) 中, 然后, 使用基因导入装置 Gene Pulser (BIO-RAD 公司), 在脉冲电压为 0.35KV、电容为 250 μF 的条件下进行基因导入。将该细胞悬浮液混合到 30mL 的 HT- 培养基 [添加有 10% 胎牛透析血清 (インビトロ-ジエン公司制造) 和 50 μg/mL 庆大霉素 (ナカライテスク公司) 的伊思考夫改良的杜尔贝科培养基 (インビトロ-ジエン公司制造)] 中, 以 100 μL/ 孔接种到 3 块 96 孔板上。接种 2 天后, 更换为含有 500 μg/mL G418 的传代用培养基, 培养 10 天。10 天后, 更换为含有 50nM MTX (Sigma aldrich 公司制造) 的 HT- 培养基, 获得 MTX 抗性株。将 Lec8 株来源的膜型免疫球蛋白表达株命名为 mIgA/Lec8, 另一方面, 将 DG44 细胞来源的膜型免疫球蛋白 A 表达细胞命名为 mIgA/DG44。

[0375] 实施例 2

[0376] 糖链缺陷型 IgA1-Fc 融合蛋白的制备

[0377] 为了获得可溶性 mIgA1 蛋白, 设计了使 mIgA1 细胞外区部分与人 IgG4Fc 连接而成的 Fc 融合蛋白 mIgA1-Fc。具体而言, 利用 PCR 法制作使 mIgA1 细胞外区的一部分与人 IgG4Fc 连接而成的基因片段, 将其插入实施例 1 中得到的 pKAN932B8PVHmIgA 中, 由此, 制备 Fc 融合 mIgA1 表达载体 pKANTEK-mIgA1-Fc。将该表达载体导入 CHO/DG44 细胞株和 Lec8 细胞株中, 向培养基中添加 500 μg/mL 的 G418, 由此筛选基因导入细胞。将筛选出的基因导入细胞在无血清培养基 Excell-302 (SAFC 公司) 中培养一周, 得到含有 mIgA1-Fc 的培养上清。使用 Mabselect (GE Healthcare 公司) 柱, 依照附带的说明书从约 1 升的培养上清中进行纯化, 获得各自约为 5mg 的 DG44 来源 mIgA1-Fc 和 Lec8 来源 mIgA1-Fc。将所得到的各 mIgA1-Fc 供于 SDS-PAGE 分析, 考察分子量和纯化度 (图 6)。另外, 为了确认纯化蛋白的修饰糖链, 实施以下的酶免疫测定法。向 96 孔的 EIA 用板 (Greiner 公司) 中以 50 μL/ 孔分注 1 μg/mL 的 DG44 来源的 mIgA1-Fc 或 Lec8 来源的 mIgA1-Fc 或者人 IgG4 (SIGMA 公司), 在 4℃ 下放置过夜使其进行吸附。洗涤后, 以 100 μL/ 孔加入 1%BSA-PBS, 在室温下反应 1 小时, 对残余的活性基团进行封闭。弃去 1%BSA-PBS, 以 50 μL/ 孔分注用 PBS 稀释的小鼠抗人 IgA1 单克隆抗体 B3506B4 (Beckman Coulter 公司) 或小鼠抗 Tn 抗原抗体 22-1-1 (MBL 公司) 作为一次抗体, 使其反应 2 小时。用 0.05% 吐温 -PBS 洗涤后, 以 50 μL/ 孔加入稀释后的过氧化物酶标记抗小鼠免疫球蛋白 (DAKO 公司) 作为二次抗体, 在室温下反应 1 小时, 用 0.05% 吐温 -PBS 洗涤后, 使用 ABTS [2, 2- 连氨基双 (3- 乙基苯并噻唑 -6- 磺酸) 铵] 底物液 [1 毫摩尔 / 升 ABTS、0.1 摩尔 / 升柠檬酸缓冲液 (pH4.2)、0.1% H₂O₂] 进行显色, 使用酶标仪 (MULTISKAN SPECTRUM, Thermo 公司) 测定样品波长 415nm、参比波长 490nm 下的吸光度 (OD415-OD490)。结果, 确认到抗 IgA1 抗体与 DG44 来源的 mIgA1-Fc 和 Lec8 来源的 mIgA1-Fc 结合, 而另一方面, 确认到抗 Tn 抗原抗体仅与 Lec8 来源 mIgA1-Fc 结合 (图 7)。由以上确认, Lec8 来源的 mIgA1-Fc 具有 Tn 抗原型 O 连接型糖链。

[0378] 实施例 3

[0379] 抗 Tn 抗原附加型 IgA1 的铰链区的单克隆抗体的制作

[0380] (1) 作为免疫原的糖肽的制备

[0381] 使用自动合成计 (岛津制作所), 合成如下的肽 (Tn 附加型 IgA1 铰链肽, 序列号 16): 在人 IgA1 (IgA1) 铰链区氨基酸序列 (从氨基末端数第 223 位至第 240 位的氨基酸)

的第 230 位和第 232 位的丝氨酸 (Ser) 以及第 225 位、第 228 位和第 236 位的苏氨酸 (Thr) 上通过 α 连接附加有 N-乙酰半乳糖胺 (GalNAc), 进而为了与载体蛋白结合而在氨基末端附加有半胱氨酸 (Cys)。为了提高免疫原性, 通过以下的方法制作与 KLH (和光纯药公司) 的结合物, 作为免疫原。即, 将 KLH 溶解于 PBS 中并调节至 10mg/mL, 滴加 1/10 体积的 25mg/mL 的 MBS [N-马来酰亚胺基苯甲酸琥珀酰亚胺酯] (ナカライテスク公司), 搅拌 30 分钟使其反应。利用预先用 PBS 平衡化的セファデックス G-25 柱等凝胶过滤柱除去游离的 MBS, 将 2.5mg 所得到的 KLH-MBS 与溶解在 0.1M 磷酸钠缓冲液 (pH7.0) 中的 1mg 肽混合, 在室温下搅拌 3 小时使其反应。反应后, 将用 PBS 透析而得到的物质作为免疫原。

[0382] (2) 动物的免疫和抗体产生细胞的制备

[0383] 将 100 μ g 通过 (1) 所示的方法制备的 Tn 抗原附加型 IgA1 铰链肽-KLH 结合物连同 2mg 铝凝胶和 1×10^9 个细胞的百日咳疫苗 (千叶县血清研究所制造) 一起施用给 4 周龄的雌性 SD 大鼠 (日本エスエルシー公司), 从 2 周后开始每周施用一次 100 μ g 的结合物, 共计 4 次。从尾静脉采血, 通过以下所示的酶免疫测定法考察对来源于人血浆的 Tn 抗原附加 IgA1 的反应性, 在末次免疫 3 天后从显示充分抗体效价的大鼠中摘除脾脏。将脾脏在 MEM 培养基 (日水制药公司) 中细细切碎, 用镊子搅散, 离心分离 (1200rpm, 5 分钟) 后, 弃去上清, 用 Tris-氯化铵缓冲液 (pH7.65) 处理 1~2 分钟以除去红细胞, 用 MEM 培养基洗涤 3 次, 用于细胞融合。

[0384] (3) 酶免疫测定法

[0385] 使用人血浆来源 IgA1 (BIOPUR 公司) 作为分析用的阴性对照抗原, 使用 Tn 抗原型人 IgA1 作为阳性对照抗原。Tn 抗原型人 IgA1 通过如下方法得到: 使 5U/mL 的 β -半乳糖苷酶 (ProZyme 公司, GKX-5013)、1U/mL 的神经氨酸酶 (ナカライ公司, 24229-61) 在 37°C 下与人血浆来源 IgA1 作用过夜, 将正常糖链转换为 Tn 抗原。另外, 为了排除仅识别 Tn 抗原的抗体, 与 IgA1 同样地对人血浆来源的 C1 抑制物蛋白 (ZLB ベーリング, 商品名ベリナート) 进行酶处理, 将所得到的 Tn 抗原型 C1 抑制物也作为阴性对照抗原使用。向 96 孔的 EIA 用板 (グライナー公司) 中以 50 μ L/孔分别分注 2.5 μ g/mL 的各抗原, 在 4°C 下放置过夜使其进行吸附。洗涤后, 以 100 μ L/孔加入 1%BSA-PBS, 在室温下使其反应 1 小时, 对残余的活性基团进行封闭。弃去 1%BSA-PBS, 以 50 μ L/孔分注杂交瘤的培养上清或被免疫大鼠抗血清作为一次抗体, 使其反应 2 小时。用 0.05% 吐温-PBS 洗涤后, 以 50 μ L/孔加入稀释后的过氧化物酶标记抗大鼠免疫球蛋白 (ダコ公司) 作为二次抗体, 在室温下使其反应 1 小时, 用 0.05% 吐温-PBS 洗涤后, 使用 ABTS [2,2-连氨基双 (3-乙基苯并噻唑-6-磺酸) 铵] 底物液 [1 毫摩尔/升 ABTS、0.1 摩尔/升柠檬酸缓冲液 (pH4.2)、0.1% H_2O_2] 进行显色, 使用酶标仪 (Emax ;Molecular Devices 公司) 测定样品波长 415nm、参比波长 490nm 下的吸光度 (OD415-OD490)。

[0386] (4) 小鼠骨髓瘤细胞的制备

[0387] 将 8-氮杂鸟嘌呤抗性小鼠骨髓瘤细胞系 P3-U1 在正常培养基中进行培养, 确保细胞融合时达到 2×10^7 以上的细胞, 作为亲本株供于细胞融合。

[0388] (5) 杂交瘤的制作

[0389] 将 (2) 中得到的大鼠脾细胞与 (4) 中得到的骨髓瘤细胞以 10:1 的比例进行混合, 离心分离 (1200rpm、5 分钟) 后, 弃去上清, 将沉淀的细胞群充分搅散, 然后, 在搅拌的同时

在 37℃ 下以每 10^8 个小鼠脾细胞为 0.5mL 的量加入 1g 聚乙二醇-1000 (PEG-1000)、1mL MEM 培养基和 0.35mL 二甲亚砜的混合溶液,并每隔 1~2 分钟向该悬浮液中加入 1mL MEM 培养基,重复数次后,加入 MEM 培养基至总量达到 50mL。离心分离 (900rpm、5 分钟) 后,弃去上清,轻轻地将细胞搅散后,通过用刻度吸管吸入并吹出,轻轻地将细胞悬浮于 100mL HAT 培养基 [在添加有 10% 胎牛血清的 RPMI 培养基中加入 HAT 培养基添加剂 (Invitrogen 公司) 而得到的培养基] 中。将该悬浮液以 200 μ L/孔分注到 96 孔培养用板中,在 5%CO₂ 的培养箱中在 37℃ 下培养 10~14 天。通过 (3) 中记载的酶免疫测定法对该培养上清进行考察,选出与 Tn 抗原型人 IgA1 特异性反应的孔,重复克隆两次,从而建立生产抗 Tn 抗原附加 mIgA 铰链肽单克隆抗体的杂交瘤株 KM4137、4138、4139、4140、4144。通过使用亚类特异性的二次抗体的酶免疫测定法对抗体类别进行考察,确定 KM4137、KM4138、KM4139、KM4144 为小鼠 IgG2a, KM4140 为小鼠 IgG2b。它们的抗体类别示于表 2 中。

[0390] [表 2]

[0391]

KM No.	动物种类	抗体类别
KM4137	小鼠	IgG2a
KM4138	小鼠	IgG2a
KM4139	小鼠	IgG2a
KM4140	小鼠	IgG2b
KM4144	小鼠	IgG2a

[0392] 需要说明的是,还实施了数次对 Balb/c 小鼠和 BxSB 狼疮小鼠免疫 (1) 项中制备的糖肽-KLH 融合蛋白的实验,但无法得到 Tn 抗原型铰链区特异性的单克隆抗体。另外,还实施了数次对 SD 小鼠和 Balb/c 小鼠免疫实施例 1 中建立的在细胞膜上高表达 Tn 抗原型 IgA1 的 CHO 细胞株 (mIgA/Lec8) 的实验,但无法得到 Tn 抗原型铰链区特异性的单克隆抗体。进而,还实施了数次对 SD 小鼠和 Balb/c 小鼠免疫实施例 2 中建立的 Tn 抗原型 IgA1-Fc 融合蛋白的实验,但无法得到 Tn 抗原型铰链区特异性的单克隆抗体。

[0393] (6) 单克隆抗体的纯化

[0394] 将 (5) 中得到的杂交瘤株分别以 $5\sim 20\times 10^6$ 细胞/只的量对雌小鼠处理后的 8 周龄雌性裸鼠 (Balb/c) 进行腹腔内注射。10~21 天后,杂交瘤产生癌性腹水。从积存有腹水的小鼠中收集腹水 (1~8mL/只),离心分离 (3000rpm、5 分钟) 除去固体成分,然后,利用辛酸沉淀法 (Antibodies-A Laboratory manual,冷泉港实验室,1988) 进行纯化,制成纯化的单克隆抗体。

[0395] 实施例 4

[0396] 抗 Tn 抗原附加 mIgA 铰链肽单克隆抗体的反应性

[0397] (1) 结合 ELISA

[0398] 通过实施例 3 的 (3) 中记载的酶免疫测定法,对所得到的单克隆抗体的反应特异

性进行研究。KM4137~4140 和 KM4144 均对 Tn 抗原型人 IgA1 显示出特异性的反应性,对人 IgA1 和 Tn 抗原型 C1 抑制物不反应(图 8)。

[0399] (2) 竞争性酶免疫测定法

[0400] 为了对建立的单克隆抗体的结合特异性进行评价,实施以下的竞争性酶免疫测定法。向 96 孔的 EIA 用板(Greiner 公司)中以 50 μ L/孔分注 2.5 μ g/mL 的实施例 3 的(3)中制备的 Tn 抗原型人 IgA1,在 4 $^{\circ}$ C 下放置过夜使其吸附。洗涤后,以 100 μ L/孔加入 1%BSA-PBS,在室温下反应 1 小时,对残余的活性基团进行封闭。弃去 1%BSA-PBS,以 25 μ L/孔分注 Tn 抗原型人 IgA1 或人血浆来源的 IgA1 作为竞争物质,进而,作为一次抗体,将实施例 3 中建立的各杂交瘤的培养上清制备成约 1 μ g/mL 的抗体浓度,以 25 μ L/孔分注到板中,使其反应 2 小时。用 0.05%吐温-PBS 洗涤后,以 50 μ L/孔加入稀释后的过氧化物酶标记抗大鼠免疫球蛋白(DAKO 公司)作为二次抗体,在室温下使其反应 1 小时,用 0.05%吐温-PBS 洗涤后,使用 ABTS[2,2-连苯基双(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸)铵]底物液[1 毫摩尔/升 ABTS、0.1 摩尔/升柠檬酸缓冲液(pH4.2)、0.1%H₂O₂]进行显色,使用酶标仪(MULTISKAN SPECTRUM, Thermo 公司)测定样品波长 415nm、参比波长 490nm 下的吸光度(OD415-OD490)。使用大鼠抗阿维菌素抗体 KM1762 作为阴性对照抗体,使用大鼠抗人 IgA 单克隆抗体 LO-HA-9(P. A. R. I. S 公司)作为阳性对照。结果可知,在使用 Tn 抗原型人 IgA1 作为竞争物质的情况下,建立的单克隆抗体显示出依赖于竞争物质浓度的吸收,而且在比使用人血浆来源 IgA1 作为竞争物质时低约 100 倍~约 1000 倍的竞争物质浓度下有吸收(图 9)。由以上表明,建立的单克隆抗体均对 Tn 抗原型人 IgA1 具有高结合特异性。

[0401] (3) 与 Tn 抗原型人 IgA1 或人血浆来源 IgA1 的结合活性的测定

[0402] 利用表面等离子体共振法进行结合活性测定。以下的操作全部使用 Biacore T-100(Biacore 公司)来进行。通过胺偶联法将抗小鼠免疫球蛋白抗体(ピアコア公司)固相化于 CM5 传感芯片(Biacore 公司)上,使抗体浓度已知的各杂交瘤的培养上清在芯片上流过,以捕获各抗体。然后,使利用 HBS-EP+ 缓冲液(Biacore 公司)从 2 μ g/mL 开始以六个梯度进行稀释后的 Tn 抗原型人 IgA1 或人血浆来源 IgA1 以 30 μ L/分钟的速度在芯片上流过,对各浓度下的传感图进行分析,使用动力学分析(1:1 结合模式)计算出各抗体对 Tn 抗原型人 IgA1 的结合速度常数和解离速度常数。Biacore-T100 的内部温度设定为 25 $^{\circ}$ C,在每次抗体的结合中使用 pH1.5 的甘氨酸缓冲液(Biacore 公司)对芯片进行再生。结果,所有的单克隆抗体均对 Tn 抗原型人 IgA1 显示出解离常数约为 10⁻⁸[M]的亲中性,与此相对,未观察到与人血浆来源 IgA1 进行结合(表 3)。由以上表明,建立的单克隆抗体均对 Tn 抗原型人 IgA1 具有高结合特异性和高亲中性。

[0403] [表 3]

[0404]

	K_a [1/Ms]	K_d [1/s]	K_b [M]
KM4137	4.07×10^4	7.13×10^{-4}	1.75×10^{-8}
KM4138	3.83×10^3	7.65×10^{-4}	2.00×10^{-7}

KM4139	4.21×10^4	6.21×10^{-4}	1.47×10^{-8}
KM4140	1.68×10^4	1.24×10^{-3}	7.40×10^{-8}
KM4144	4.36×10^4	8.87×10^{-4}	2.03×10^{-8}

[0405] (4) 与 mIgA1 表达转染体的反应性评价

[0406] 将实施例 (1) 中建立的表达 mIgA 的 DG44 细胞株和表达 mIgA1 的 Lec8 细胞株的 5×10^5 个细胞在建立的各杂交瘤的培养上清 $50 \mu\text{L}$ 中悬浮, 在 4°C 下使其反应 1 小时。反应后, 使用含有 $0.05\% \text{NaN}_3$ 的 PBS 离心分离 3 次而进行洗涤, 然后, 添加 $50 \mu\text{L}$ 将 Alexa488 标记山羊抗大鼠 IgG (H+L) 抗体 (Invitrogen 公司) 或 Alexa488 标记山羊抗小鼠 IgG (H+L) 抗体 (Invitrogen 公司) 用 $1\% \text{BSA-PBS}$ 稀释 300 倍而得到的溶液, 悬浮后在 4°C 下反应 1 小时。反应后, 使用含有 $0.05\% \text{NaN}_3$ 的 PBS 离心分离 3 次而进行洗涤, 然后, 悬浮于 $500 \mu\text{L}$ 含有 $0.05\% \text{NaN}_3$ 的 PBS 中, 使用流式细胞仪 FACS Calibur (BD Biosciences 公司) 进行分析。使用小鼠抗 ND28 单克隆抗体 KM511 (日本特开平 08-165300 号) 或大鼠抗阿维菌素单克隆抗体 KM1762 (Clin Cancer Res., 2005May1; 11 (9):3494-502) 作为阴性对照抗体, 使用小鼠抗 Tn 抗原单克隆抗体 22-1-1 (MBL 公司) 或大鼠抗人 IgA 单克隆抗体 LO-HA-9 (P. A. R. I. S 公司) 作为阳性对照。结果确认, 建立的单克隆抗体均不与表达 mIgA1 的 DG44 细胞结合而与表达 mIgA1 的 Lec8 细胞特异性结合 (图 10)。由于表达 mIgA1 的 Lec8 细胞表达 Tn 抗原原型 mIgA1, 因此暗示, 建立的单克隆抗体能够识别存在于细胞表面上的 Tn 抗原原型 mIgA1。

[0407] (5) 人血清中的 Tn 抗原原型 IgA1 的定量

[0408] 为了构建人血清中的糖链缺陷 IgA1 的检测系统, 实施以下的酶免疫测定法。作为受试物质, 使用将 Tn 抗原原型人 IgA1 或人血浆来源的 IgA1 用人血清 (SIGMA 公司) 稀释后得到的溶液。以 $50 \mu\text{L}/\text{孔}$ 分注 $x \mu\text{g}/\text{mL}$ 的实施例 3 中纯化的 KM4137、KM4140、KM4144 或大鼠抗人 IgA 单克隆抗体 LO-HA-9 (P. A. R. I. S 公司), 在 4°C 下放置过夜使其进行吸附。洗涤后, 以 $100 \mu\text{L}/\text{孔}$ 加入 $1\% \text{BSA-PBS}$, 在室温下反应 1 小时, 对残余的活性基团进行封闭。弃去 $1\% \text{BSA-PBS}$, 以 $50 \mu\text{L}/\text{孔}$ 分注用 PBS 稀释的受试物质, 使其反应 1 小时。用 $0.05\% \text{吐温-PBS}$ 洗涤后, 以 $50 \mu\text{L}/\text{孔}$ 加入稀释后的过氧化物酶标记小鼠抗人 IgA1 单克隆抗体 B3506B4 (Beckman Coulter 公司) 作为二次抗体, 在室温下使其反应 1 小时, 用 $0.05\% \text{吐温-PBS}$ 洗涤后, 使用 ABTS [2, 2'-连氨基双 (3-乙基苯并噻唑-6-磺酸) 铵] 底物液 [1 毫摩尔 / 升 ABTS、0.1 摩尔 / 升柠檬酸缓冲液 (pH4.2)、 $0.1\% \text{H}_2\text{O}_2$] 进行显色, 使用酶标仪 (MULTISKAN SPECTRUM, Thermo 公司) 测定样品波长 415nm 、参比波长 490nm 下的吸光度 ($\text{OD}_{415}-\text{OD}_{490}$)。结果, 在吸附有抗人 IgA 单克隆抗体的板上, Tn 抗原原型人 IgA1 或人血浆来源 IgA1 均被同样地检出, 而另一方面, 在吸附有建立的 KM4137、KM4140、KM4144 的板上, 仅以依赖于添加浓度的方式检测到 Tn 抗原原型人 IgA1 (图 11)。由以上表明, 通过使用 KM4137、KM4140、KM4144 的酶免疫测定法, 能够仅对糖链缺陷型人 IgA1 进行特异性检测并定量。

[0409] 实施例 5

[0410] 为了对建立的抗 Tn 抗原附加 mIgA 铰链肽单克隆抗体 KM4137、KM4140 和 KM4144 的竞争抑制活性进行评价, 实施以下的竞争性酶免疫测定法。向 96 孔的 nunc maxisorp 板 (NUNC 公司) 中以 $50 \mu\text{L}/\text{孔}$ 分注 $25 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的实施例 3 的 (3) 中制备的 Tn 抗原原型人 IgA1,

在 4℃ 下放置过夜使其进行吸附。洗涤后,以 200 μ L/孔加入 1%BSA-PBS,在室温下反应 1 小时,对残余的活性基团进行封闭。弃去 1%BSA-PBS,以 25 μ L/孔分注实施例 3 中纯化的抗 Tn 抗原附加 mIgA 铰链肽单克隆抗体 KM4137、KM4140 或 KM4144 作为竞争物质,进而,作为一次抗体,将实施例 3 中纯化的抗 Tn 抗原附加 mIgA 铰链肽单克隆抗体进行生物素标记,分别制备成 2 μ g/mL、0.16 μ g/mL 和 10 μ g/mL 的生物素标记 KM4137、生物素标记 KM4140 和生物素标记 KM4144,分别以 25 μ L/孔进行分注,并使其反应 1 小时。用 0.05%吐温 -PBS 洗涤后,以 50 μ L/孔加入稀释后的过氧化物酶标记链亲和素 (Sigma-Aldrich 公司) 作为二次抗体,在室温下使其反应 1 小时,用 0.05%吐温 -PBS 洗涤后,使用 ABTS[2,2-连氨基双(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸)铵]底物液 [1 毫摩尔/升 ABTS、0.1 摩尔/升柠檬酸缓冲液 (pH4.2)、0.1% H_2O_2] 进行显色,使用酶标仪 (MULTISKAN SPECTRUM, Thermo 公司) 测定样品波长 415nm、参比波长 490nm 下的吸光度 (OD415-OD490)。使用大鼠抗阿维菌素抗体 KM1762 作为阴性对照抗体。结果表明,建立的抗 Tn 抗原附加 mIgA 铰链肽单克隆抗体 KM4137、KM4140 和 KM4144 对 Tn 抗原附加 mIgA 铰链区存在相互竞争 (图 12)。

[0411] 产业上的可利用性

[0412] 根据本发明,能够提供一种单克隆抗体或该抗体片段,其特异性识别并结合由免疫球蛋白 A1 的重链基因编码的多肽的铰链区,所述铰链区包含未结合半乳糖的丝氨酸苏氨酸连接型糖链;并且能够提供使用该抗体或抗体片段的诊断剂或者含有该抗体或抗体片段作为有效成分的治疗剂。

[0413] 保藏编号

[0414] IPOD FERM BP-11214

[0415] IPOD FERM BP-11215

[0416] IPOD FERM BP-11216

[0417] 序列自由文本

[0418] 序列号 1- 人 IgA1 铰链区氨基酸序列

[0419] 序列号 2- 人 IgA1 重链氨基酸序列

[0420] 序列号 3- 人 IgA1 铰链区 DNA 序列

[0421] 序列号 4- 人工序列的记载:RitNotNheI fw

[0422] 序列号 5- 人工序列的记载:RitNotNheI rv

[0423] 序列号 6- 人工序列的记载:pCR2B8PVH

[0424] 序列号 7- 人工序列的记载:Ig-a-NheI

[0425] 序列号 8- 人工序列的记载:Ig-b-BamHI

[0426] 序列号 9- 人工序列的记载:pCRIgA

[0427] 序列号 10- 人工序列的记载:AMD-A

[0428] 序列号 11- 人工序列的记载:AMD-A

[0429] 序列号 12- 人工序列的记载:AMDBamHI fw

[0430] 序列号 13- 人工序列的记载:AMDSpeI rv

[0431] 序列号 14- 人工序列的记载:pCRmIgA

[0432] 序列号 15- 人工序列的记载:膜型 IgA1 序列

[0433] 序列号 16-Tn 附加型 IgA1 铰链肽氨基酸序列

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Ala Asn Thr
 35 40 45

Tyr Tyr Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val
 50 55 60

Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Leu Ser Leu Lys Val Arg
 65 70 75 80

Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg His Gly
 85 90 95

Tyr Ser Arg Ser Gly Arg Thr Gly Ala Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Pro Thr Ser Pro Lys Val Phe
 115 120 125

Pro Leu Ser Leu Cys Ser Thr Gln Pro Asp Gly Asn Val Val Ile Ala
 130 135 140

Cys Leu Val Gln Gly Phe Phe Pro Gln Glu Pro Leu Ser Val Thr Trp
 145 150 155 160

Ser Glu Ser Gly Gln Gly Val Thr Ala Arg Asn Phe Pro Pro Ser Gln
 165 170 175

Asp Ala Ser Gly Asp Leu Tyr Thr Thr Ser Ser Gln Leu Thr Leu Pro
 180 185 190

Ala Thr Gln Cys Leu Ala Gly Lys Ser Val Thr Cys His Val Lys His
 195 200 205

[0003]

Tyr Thr Asn Pro Ser Gln Asp Val Thr Val Pro Cys Pro Val Pro Ser
210 215 220

Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser
225 230 235 240

Cys Cys His Pro Arg Leu Ser Leu His Arg Pro Ala Leu Glu Asp Leu
245 250 255

Leu Leu Gly Ser Glu Ala Asn Leu Thr Cys Thr Leu Thr Gly Leu Arg
260 265 270

Asp Ala Ser Gly Val Thr Phe Thr Trp Thr Pro Ser Ser Gly Lys Ser
275 280 285

Ala Val Gln Gly Pro Pro Glu Arg Asp Leu Cys Gly Cys Tyr Ser Val
290 295 300

Ser Ser Val Leu Pro Gly Cys Ala Glu Pro Trp Asn His Gly Lys Thr
305 310 315 320

Phe Thr Cys Thr Ala Ala Tyr Pro Glu Ser Lys Thr Pro Leu Thr Ala
325 330 335

Thr Leu Ser Lys Ser Gly Asn Thr Phe Arg Pro Glu Val His Leu Leu
340 345 350

Pro Pro Pro Ser Glu Glu Leu Ala Leu Asn Glu Leu Val Thr Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Ala Arg Gly Phe Ser Pro Lys Asp Val Leu Val Arg Trp Leu
370 375 380

[0004]

Gln Gly Ser Gln Glu Leu Pro Arg Glu Lys Tyr Leu Thr Trp Ala Ser
385 390 395 400

Arg Gln Glu Pro Ser Gln Gly Thr Thr Thr Phe Ala Val Thr Ser Ile
405 410 415

Leu Arg Val Ala Ala Glu Asp Trp Lys Lys Gly Asp Thr Phe Ser Cys
420 425 430

Met Val Gly His Glu Ala Leu Pro Leu Ala Phe Thr Gln Lys Thr Ile
435 440 445

Asp Arg Leu Ala Gly Lys Pro Thr His Val Asn Val Ser Val Val Met
450 455 460

Ala Glu Val Asp Gly Thr Cys Tyr
465 470

<210> 3

<211> 1503

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

atgtgcaaga aatgaagca cctgtggttc ttectectgc tggtagcggc tcccagatgg 60

gtcctgtecc agctgcagct gcaggagtcg ggcccaggac tggtagagtc ttccgagacc 120

ctgtccctca cctgcactgt ctctgggtgc tccatcagca gtagtagtta ctactgggga 180

tggatcggcc ageccccagg gaagggactg gactggattg caaacaccta ttatagtgga 240

atcacctact acaacceatc cctcaagagt cgcgtcacca tatecgtaga cacgtccaag 300

aaccagtgt ccctgaaggt gaggctctgt acgccgcag acacggctgt gtatttctgt 360

gogagggcatg gctatagcag gtccggggcga actggggcga ttactactg gggccaggga 420

[0005]

accctggtea cegtctctc agcatcccc accagcccca aggtcttccc gctgagctc	480
tgcagcacc agccagatgg gaaegtggc atcgectgc tggccaggg ettcttccc	540
caggagccac tcagtgtgac ctggagcga agoggacagg gctgaccgc cagaaactc	600
ccaccagcc aggatgecte cggggacctg tacaccacga gcagccagct gacctgccc	660
gccacacagt gcctagccgg caagtccgt acatgccacg tgaagcacta caogaatccc	720
agccaggatg tgactgtgcc ctgccagtt cctcaactc cactacccc atctcctca	780
actccacta ccccatctc ctcatgtgc caccctcagc tctacttga ccgaccgccc	840
ctcagggacc tgccttagg ttcagaagc aacctcact gcacctgac cggcctgaga	900
gatgctcag gtgtcacctt cactggacg ccctcaagt ggaagagcgc tgttcaagga	960
ccactgagc gtgacctctg tggctgtac agcgtgtcca gtgtcctgcc ggctgtgcc	1020
gagccatgga accatggga gaccttact tgcactctg ctacccccga gtccaagac	1080
ccgctaaccg ccacctctc aaaatccga aacacatcc ggcccaggt ccactgctg	1140
ccgccccgt cggaggagct ggcctgaac gagctggtga cgtgacgtg cctggcacgc	1200
ggettccacc ccaaggact gctggttgc tggctgcagg ggtcacagga gctgccccg	1260
gagaagtacc tgacttgggc atcccggcag gageccagc agggcaccac cacttctgt	1320
gtgaccagca tactgcgct ggcagccgag gactggaaga agggggacac ctctctctg	1380
atggtgggcc acgaggcct gcgctggcc ttacacaga agaccatcga ccgcttggcg	1440
ggtaaacca cccatgtcaa tgtgtctgt gtcatggcg aggtggacgg caoctgtac	1500
tga	1503

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

[0006]

<220>		
<223>	Synthetic DNA	
<400>	4	
	gggcggcgcg caccctcacc catg	24
<210>	5	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Synthetic DNA	
<400>	5	
	ggctagctgc agagacggcg accgtggt	28
<210>	6	
<211>	444	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Synthetic DNA	
<400>	6	
	cgcccgccac cctcaccat gggttgagc ctcatcttgc tcttcttgt cgtcttget	60
	accgtgtcc tgtccaggt acaactgcag cagcctggcg ctgagctggt gaagcctggg	120
	gcctcagtga agatgtctg caaggcttct ggctacacat ttaccagtta caatatgcac	180
	tgggtaaac agacacctgg tcggggcctg gaatggattg gagctattta tcccgaaat	240
	ggtgatactt cctacaatec gaagttcaaa ggcaaggcca cattgactgc agacaaatcc	300
	tccagcacag cctacatgca gctcagcagc ctgacatctg aggactctgc ggtctattac	360
	tgtgcaagat cgaactacta cggcggcgac tggtacttca atgtctggcg cgcagggacc	420
	acggtcaccg tctctgcagc tagc	444

[0007]

<210> 7	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> Synthetic DNA	
<400> 7	
gggctagccc gaccagcccc aaggtcttc	29
<210> 8	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> Synthetic DNA	
<400> 8	
ggggatcccc ccaagcggtc gatggtctt	29
<210> 9	
<211> 1005	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> Synthetic DNA	
<400> 9	
gctagccoga ccagcccaaa ggtcttcccg ctgagcctct gcagcacca gccagatggg	60
aaegtggtea tegcctgect ggtccagggc ttcttccccc aggagccact cagtgtgacc	120
tggagcgaaa gggacaggg cgtgaccgcc agaaacttcc caccagcca gtagcctcc	180
ggggacctgt acaccacgag cagccagctg acctgcgg ccacacagtg cctagccggc	240
aagtcogtga catgccact gaagcactac acgaatccca gccaggatgt gaetgtgccc	300

[0008]

tgcccagttc cctcaactcc acctacccca tctccctcaa ctcacctac cccatctccc	360
tcattgtgcc acccccgact gtcactgcac cgaccggccc tcgaggacct gctcttaggt	420
tcagaagcga acctcaagtg cacactgacc ggccctgagag atgcctcagg tgtcaccttc	480
acctggacgc cctcaagtgg gaagagcgtt gttaaggac cacctgaccg tgacctctgt	540
ggctgtfaca gcgtgtccag tgcctgccc ggctgtgccc agccatggaa ccatgggaag	600
accttcactt gcactgtctc ctaccctgag tccaagacct cgctaaccgc caccctctca	660
aaatccggaa acacattccg gcccgaggtc cactgtctgc cgcgccttc ggaggagctg	720
gccctgaacg agctgggtgac gctgacgtgc ctggaacgtg gcttcagccc caaggatgtg	780
ctggttcgct ggctgcaggg gtcacaggag ctgcccctgc agaagtacct gacttgggca	840
tcccggcagg agcccagcca gggcaccacc accttcctgt tgaccagcat actgcgcgtg	900
gcagccgagg actggaagaa gggggacaac ttctctgca tggtaggcca cgaggccctg	960
cgcctggcct tcacacagaa gaccatcgc cgcttggcgg gatcc	1005

<210> 10

<211> 110

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 10

ctgttgacga ttggcagatg ccgcctcctt atgtgtgct ggacttgccg caggagacc 60

tggaggagga gaccctccgc gccaacctgt ggcccaccac caccaccttc 110

<210> 11

<211> 112

<212> DNA

<213> Artificial

[0009]

- <220>
 <223> Synthetic DNA
- <400> 11
 tactgggggc cctccctggt gccagatggg ccceggagcg tggcaccgt cagtgcctgtg 60
 ctatagaaca ggctcagcag gaagagggtg aggaaggtga tggtggtggg cc 112
- <210> 12
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial
- <220>
 <223> Synthetic DNA
- <400> 12
 ggggatcctg ctctgttgca gattggcaga tg 32
- <210> 13
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial
- <220>
 <223> Synthetic DNA
- <400> 13
 ccactagttc agtactgggg gccctccctg ttg 33
- <210> 14
 <211> 159
 <212> DNA
 <213> Artificial
- <220>
 <223> Synthetic DNA
- <400> 14
 ggatcctccc ccaaaccttg gatttatgcc acatccaacc tggcttctgg agtcctgtt 60

[0010]

cgcttcagtg gcagtgggtc tgggacttct tactctctca ccatcagcag agtggagget	120
gaagatgctg ccaettatta ctgccagcag tggactagt	159
<210> 15	
<211> 1632	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> Synthetic DNA	
<400> 15	
atgggttggg gctcatctt gctcttctt gtcgtgttg ctacgctgt cctgtcccag	60
gtacaactgc agcagcctgg gctgagctg gtgaagcctg ggccctcagt gaagatgtcc	120
tgcaaggctt ctggtacac atttaccagt tacaatatgc actgggtaaa acagacacct	180
ggtcggggcc tggaatggat tggagctatt tateccggaa atggtgatac ttctacaat	240
cagaagttea aaggcaaggc cacattgaet gcagacaaat cctccagcac agcctacatg	300
cagctcagca gctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag atcgacttac	360
taeggcggtg actggtactt caatgtctgg ggcgcaggga ccaeggtcac cgtctctgca	420
gctagcccga ccagcccaa ggtcttcccg ctgagcctct gcagcaccga gccagatggg	480
aacgtggtea tcgctgcct ggtccagggc ttcttccccc aggagccact cagtgtgacc	540
tggagcgaaa ggggacaggg cgtgaccgcc agaaacttcc caaccagcea ggatgectcc	600
ggggacctgt acaccacgag cagccagctg accctgcgg ccacacagtg cctagccggc	660
aagtccgtga catgccactg gaagcactac acgaatccca gccaggatgt gactgtgcc	720
tgcccagttc cctcaactcc acctacccca tctcctcaa ctcacctac cccatctccc	780
tcatgtgcc accccgact gtcactgca cgcaccgccc tcaggacct gctcttaggt	840
tcagaagcga acctcagtg cacactgacc ggctgagag atgcctcagg tgtcaccttc	900

[0011]

acctggacgc cctcaagtgg gaagageget gtteaaggac cacctgaccg tgacctctgt 960
 ggctgctaca gcgtgtccag tgtcctgccg ggctgtgccg agccatggaa ccatgggaag 1020
 acctteactt gcactgetgc ctaccccag tccaagacc cgetaaccgc caccctctca 1080
 aaatccggaa acacattccg gcccagagtc cacctgetgc cgcgcctgc ggaggagctg 1140
 gccctgaacg agctgggtgac getgacgtgc ctggcaactg gettcagccc caaggatgtg 1200
 ctggttcgct ggetgcaggg gtcacaggag ctgcccgcg agaagtacct gaattgggca 1260
 tcccggcagg agcccagcca gggcaccacc accttcctg tgaccagcat actgcgcgtg 1320
 gcagccgagg actggaagaa gggggacacc ttctctgca tggtaggcca cgaggccctg 1380
 ccgtggcct tcacacagaa gaccatcgc cgtttggcgg gatcctgctc tgttgcagat 1440
 tggcagatgc cgcctccta tgtggtgtg gacttgcgc aggagaccct ggaggaggag 1500
 accccggcg ccaacctgtg gccaccacc ataacttcc taacctctt ctgctgagc 1560
 ctgttctata gcacagcact gaccgtgacc agcgtccggg gcccatctgg caacagggag 1620
 gccccccagt ac 1632

<210> 16

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 16

Cys Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro
 1 5 10 15

Ser Pro Ser

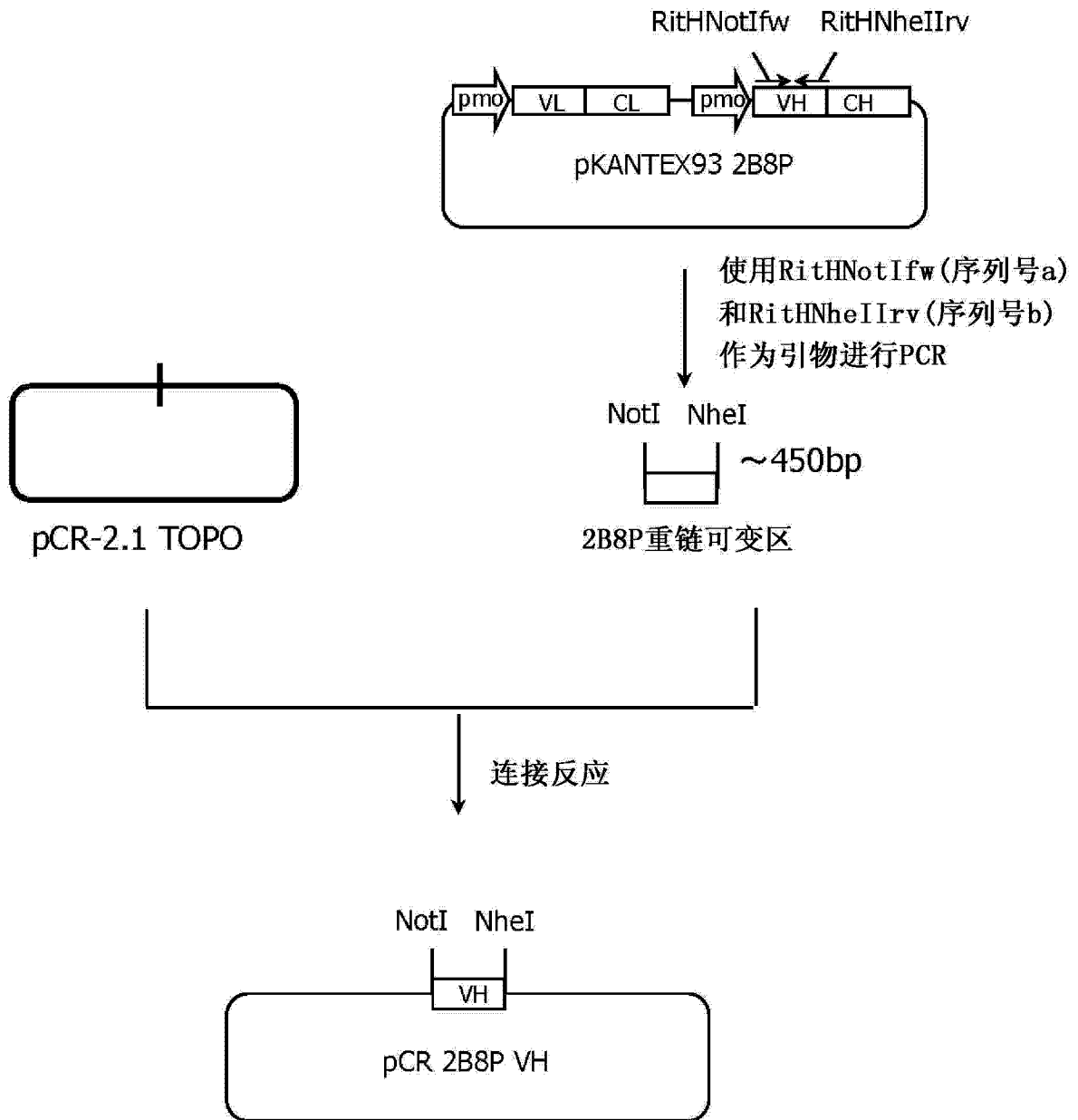


图 1

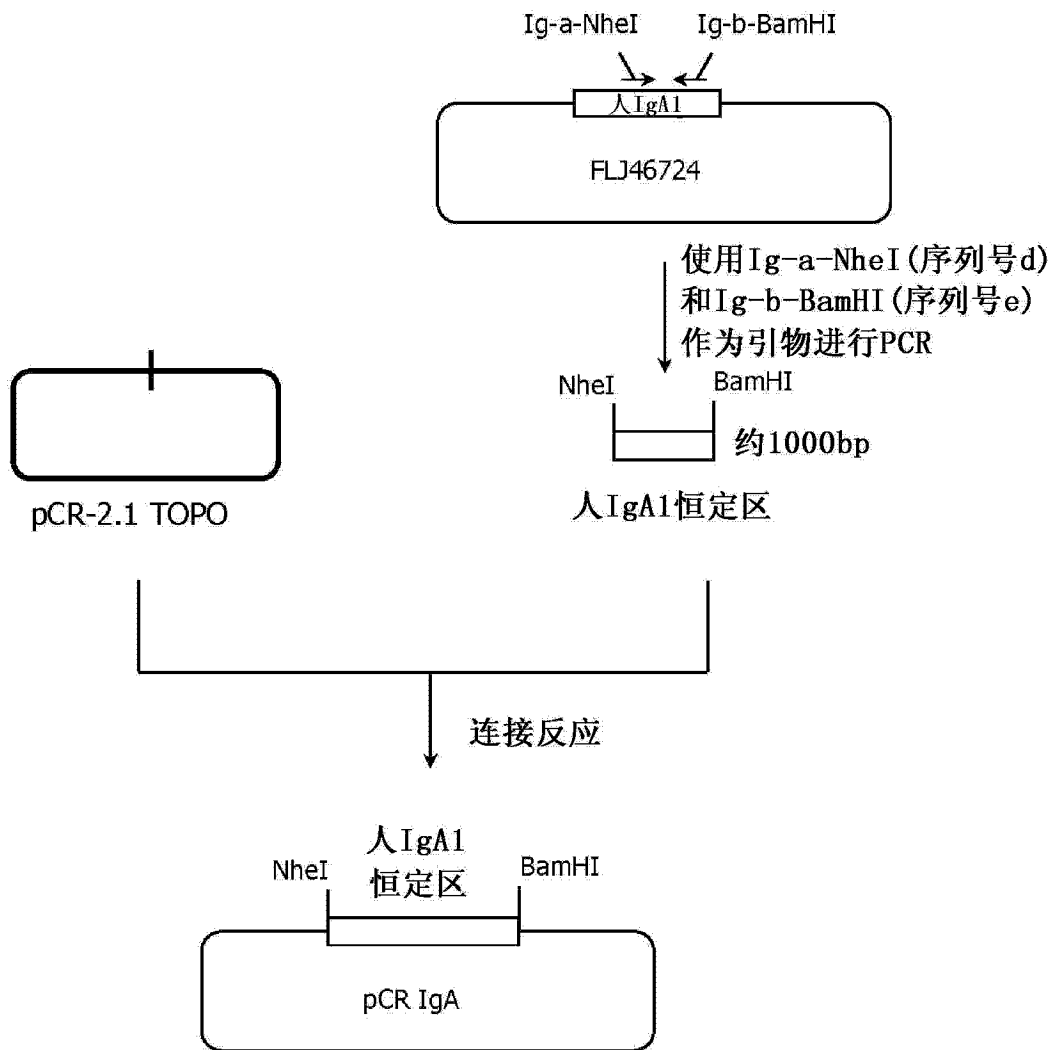


图 2

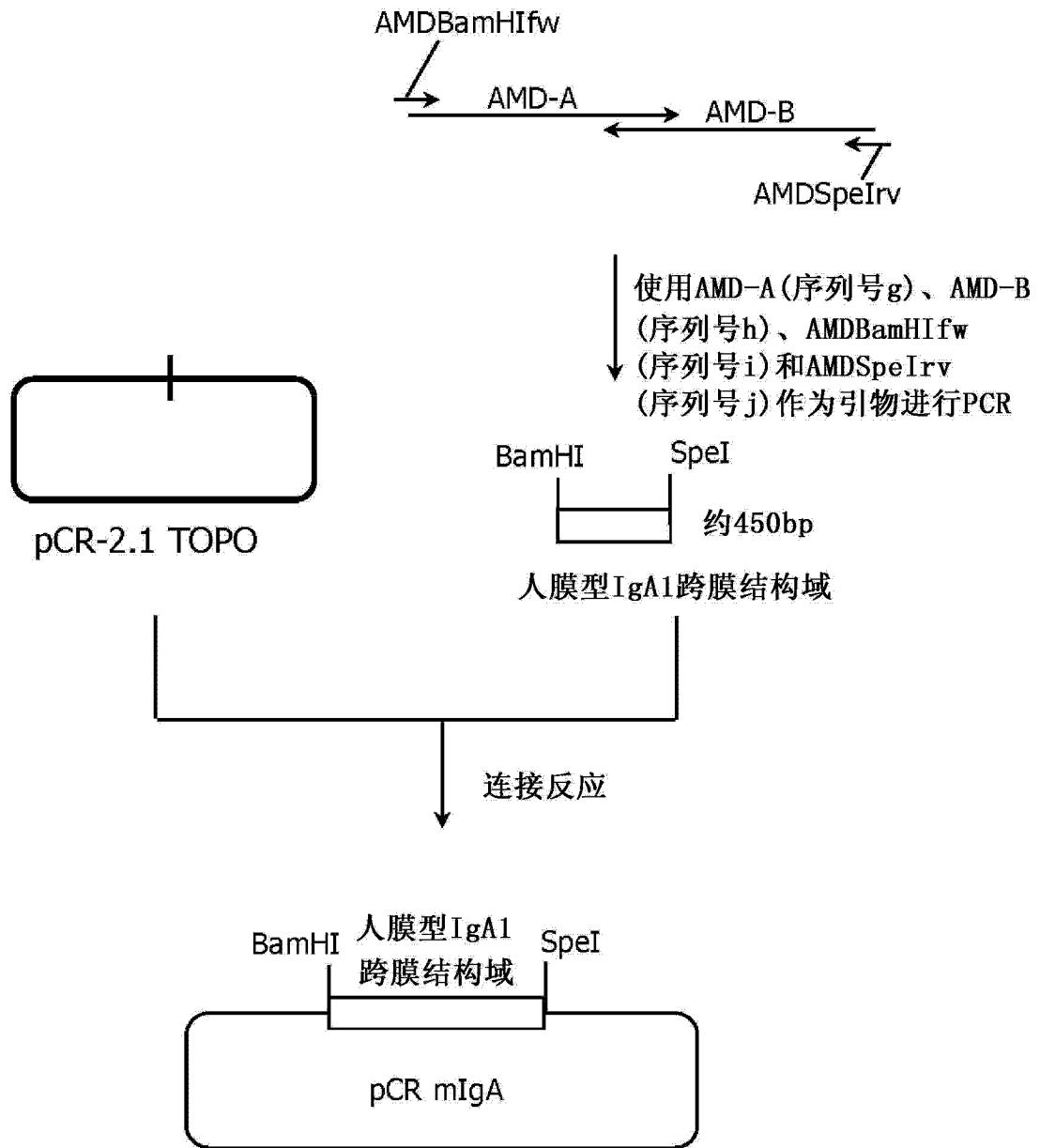


图 3

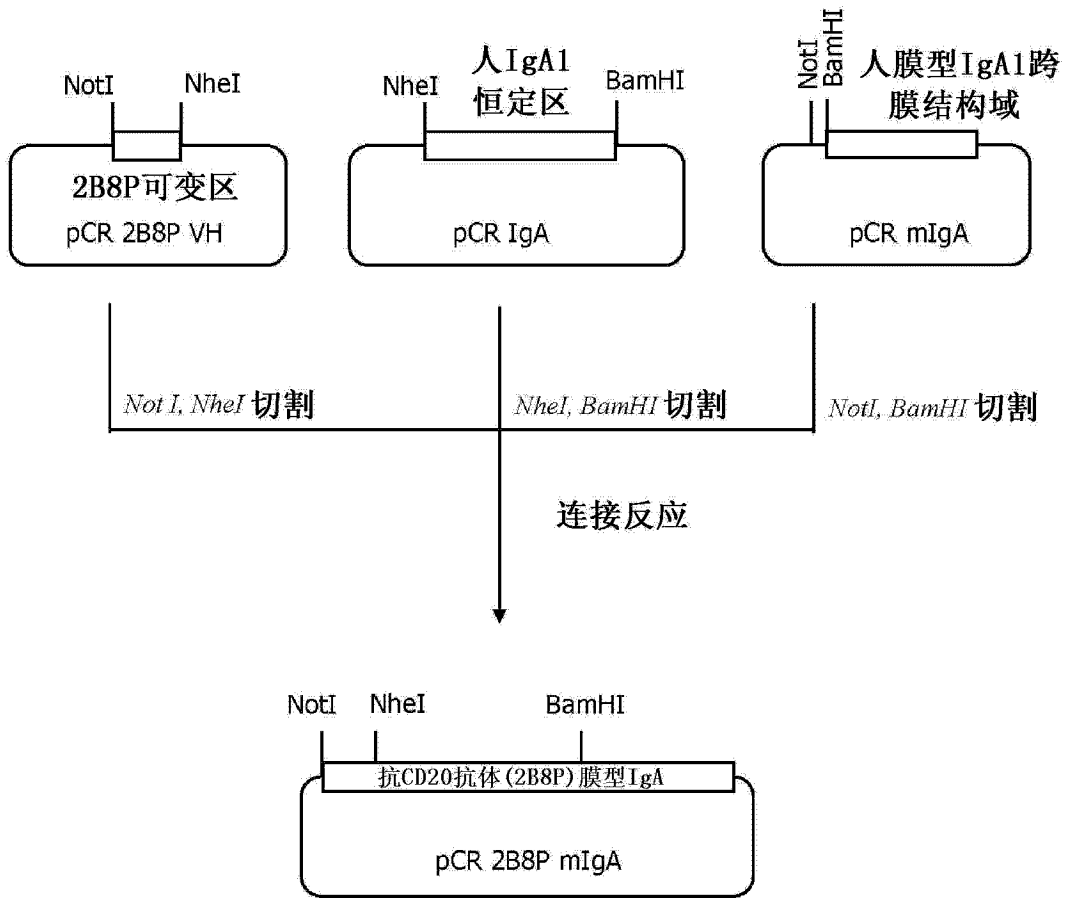


图 4

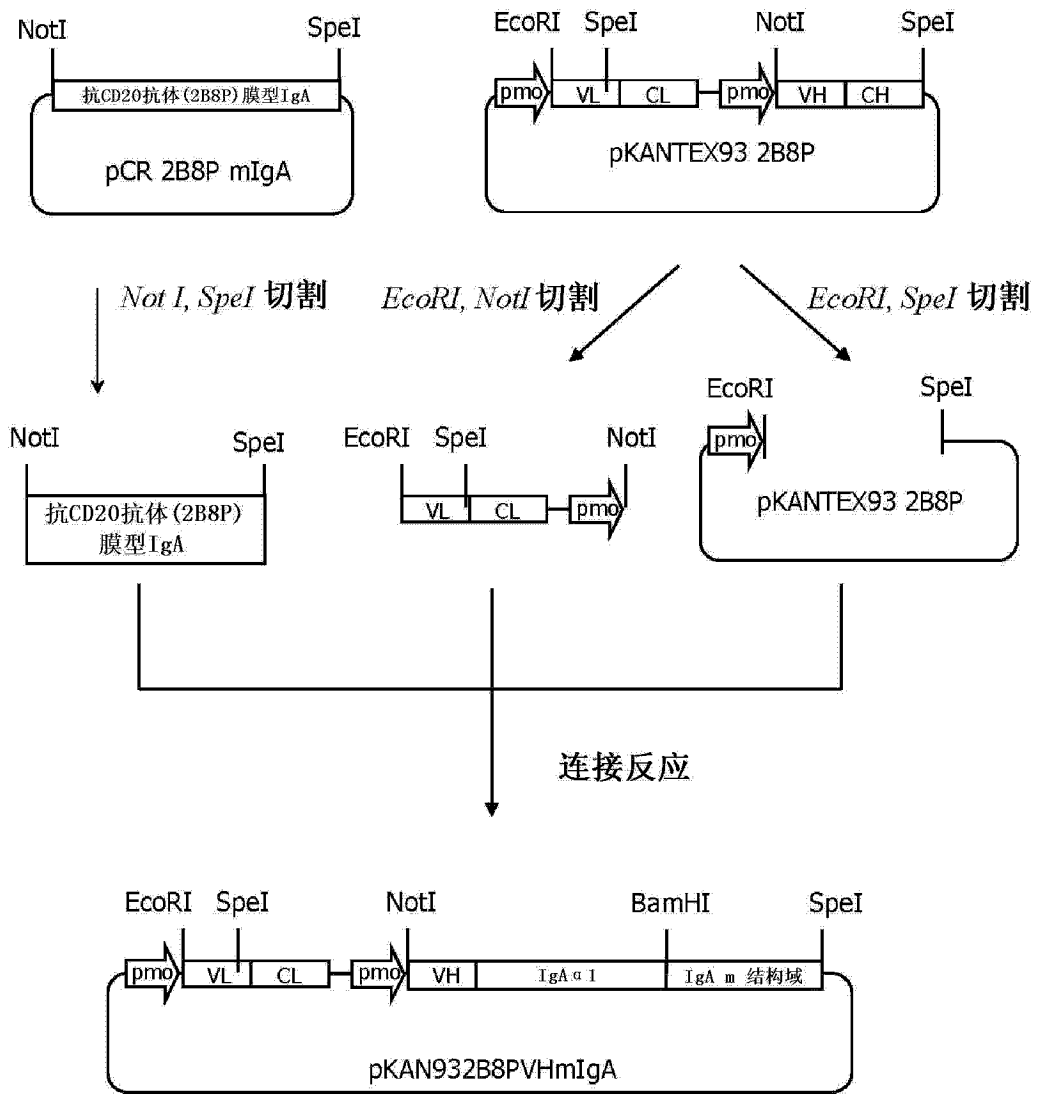


图 5

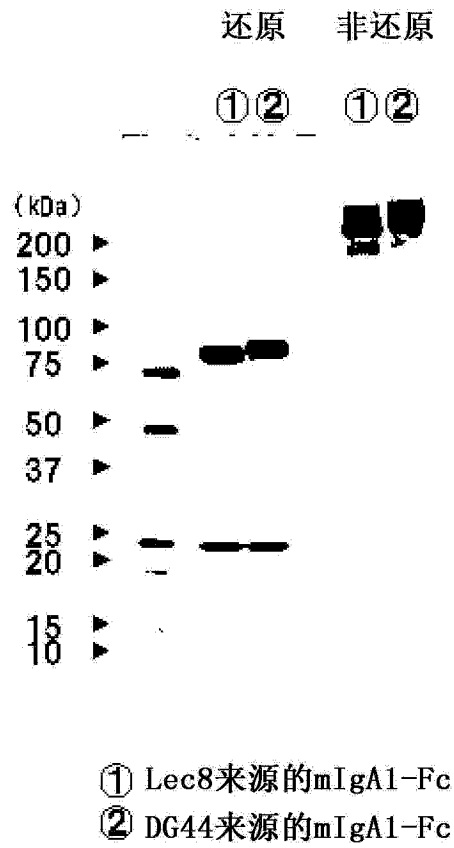


图 6

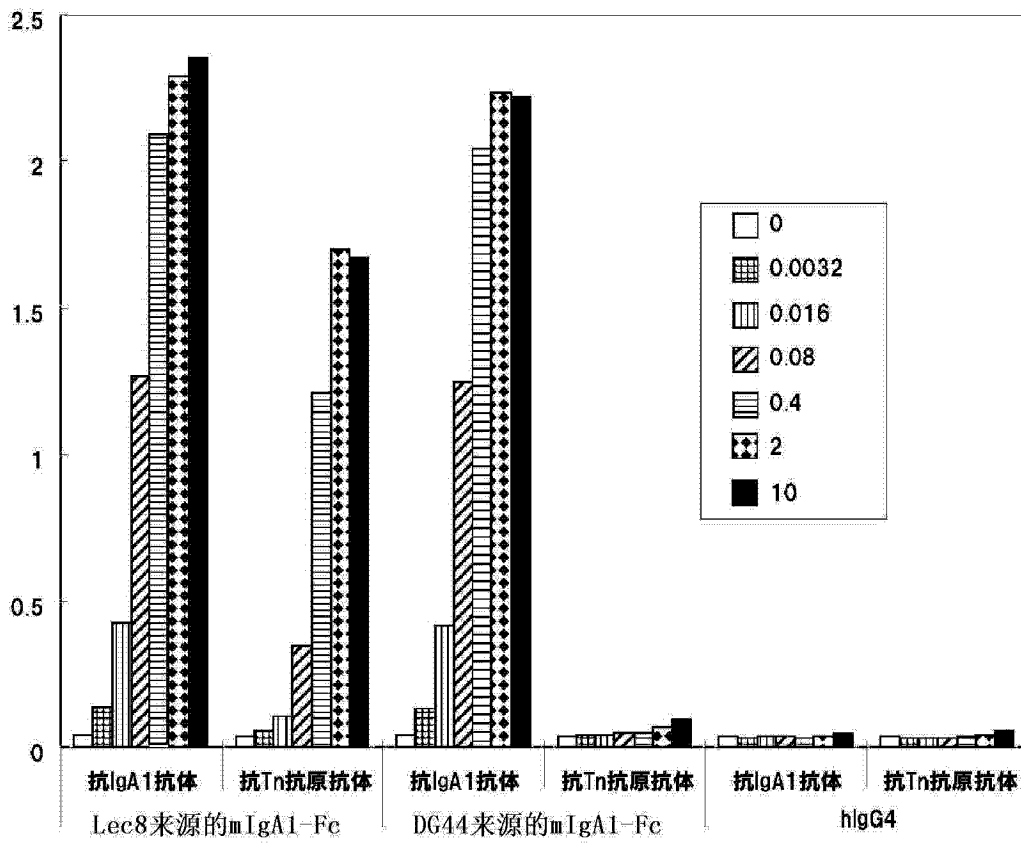


图 7

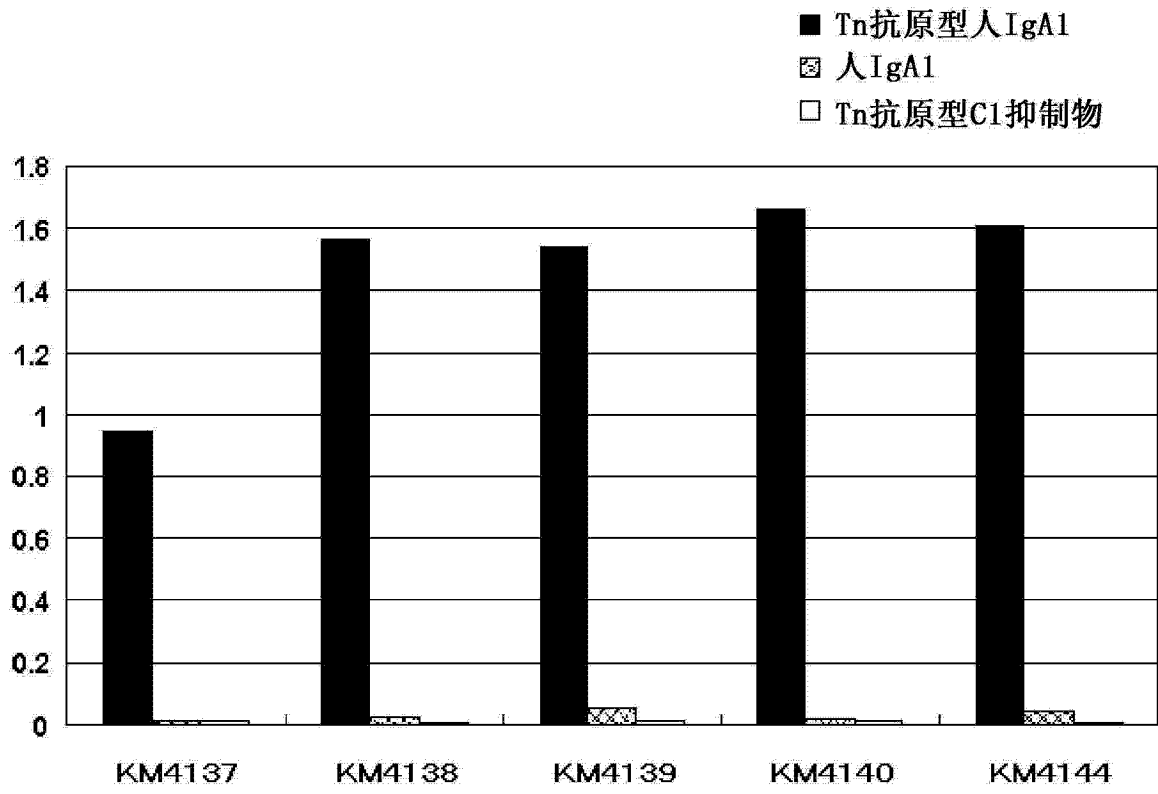


图 8

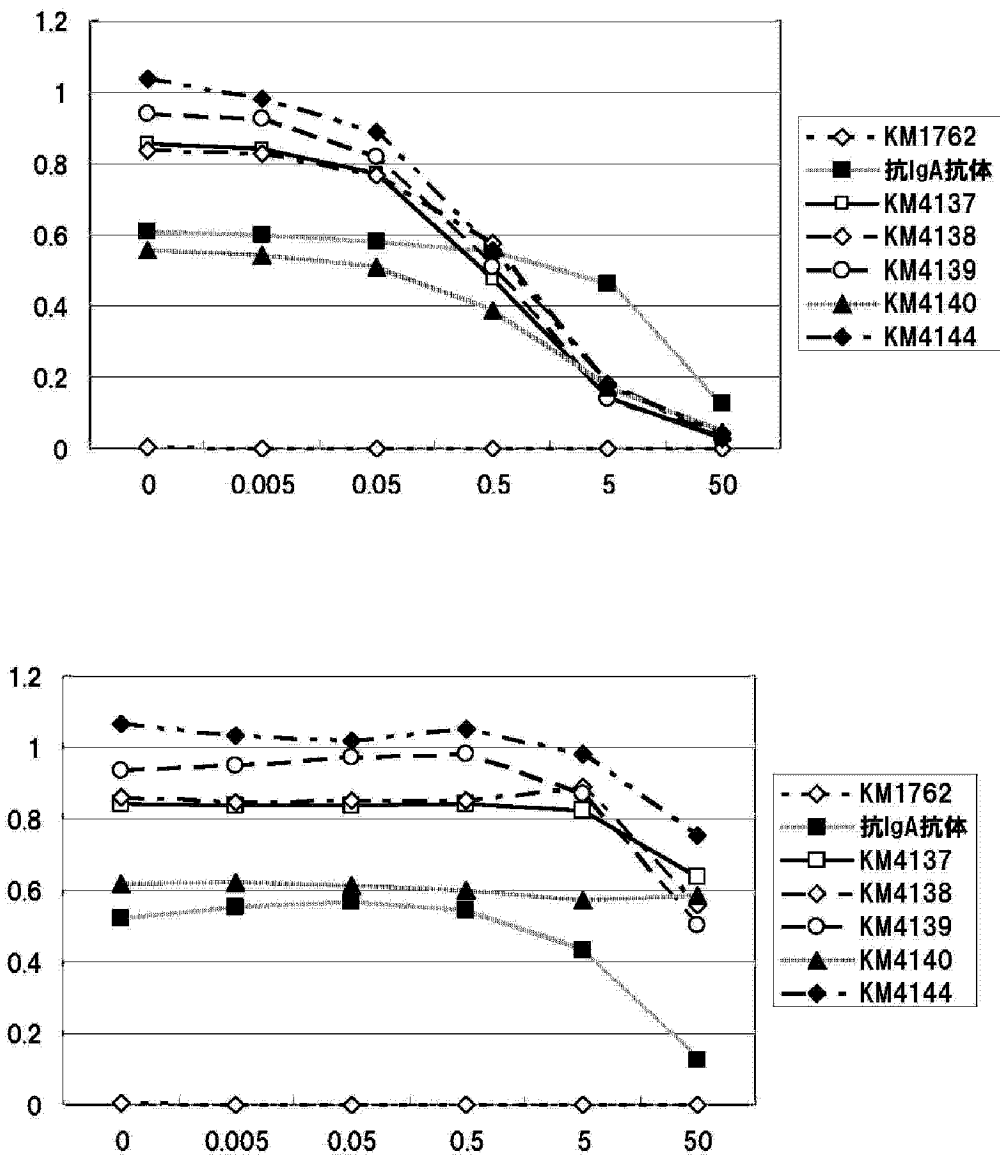


图 9

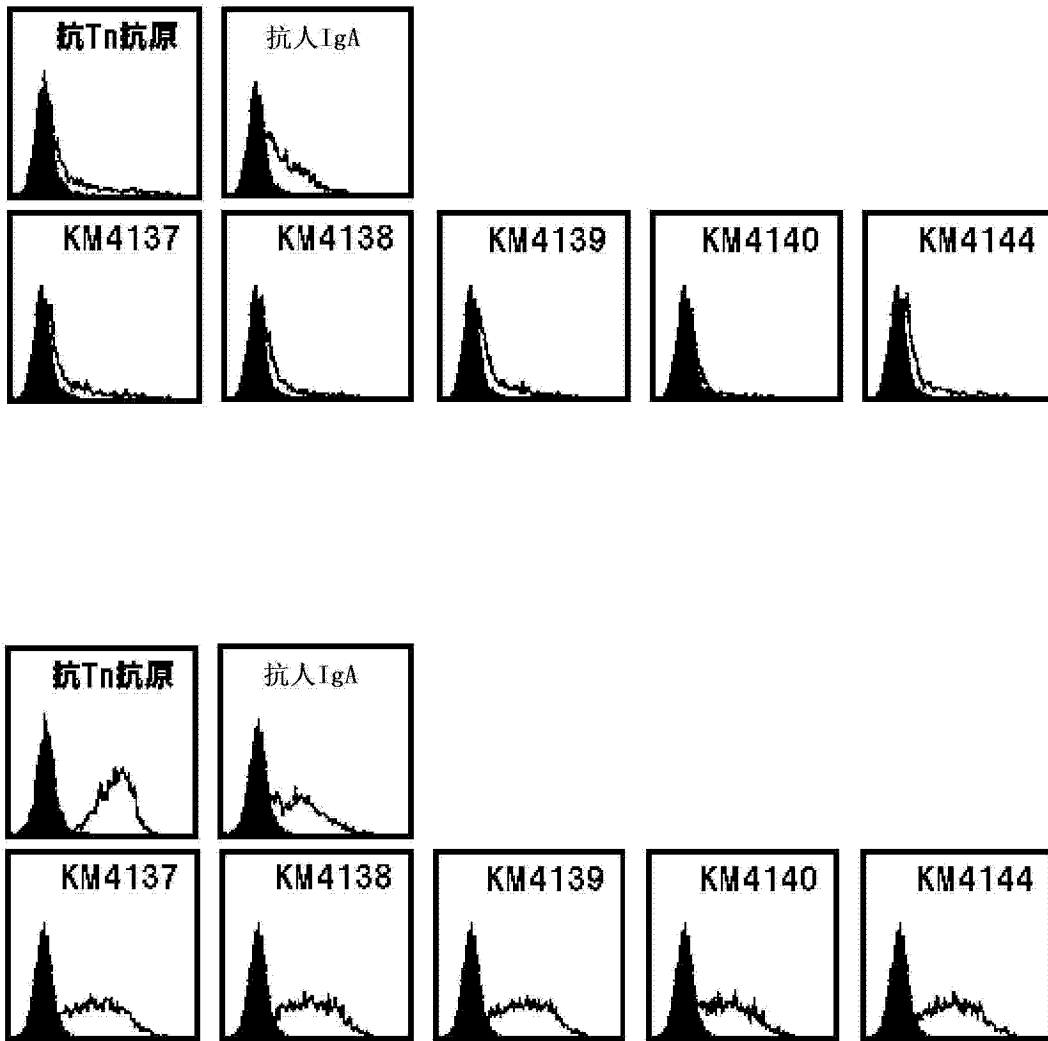


图 10

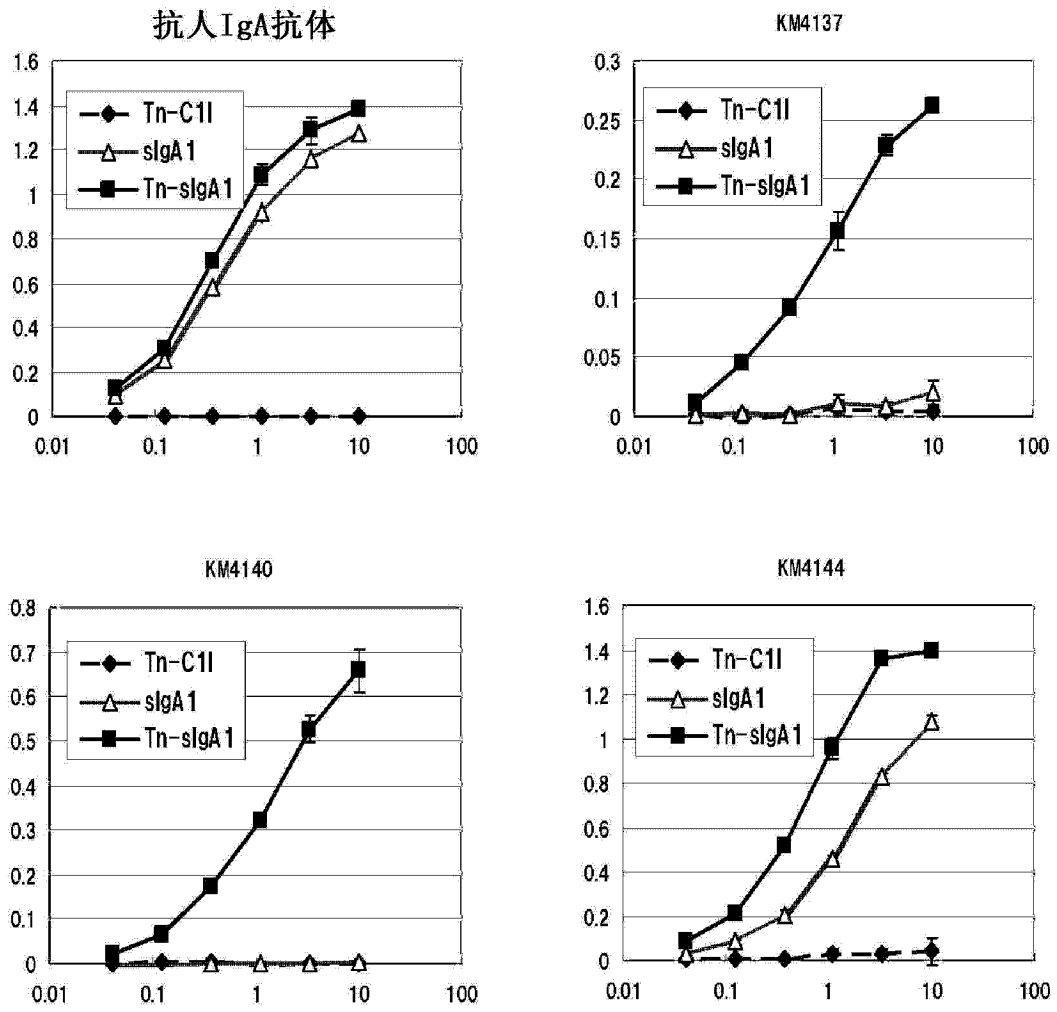
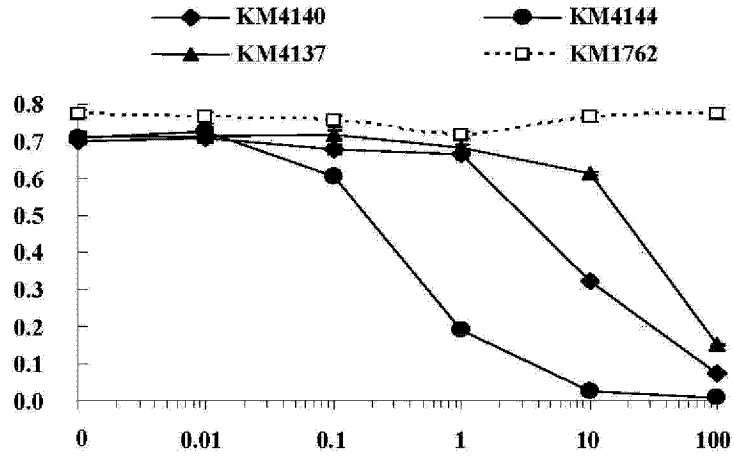
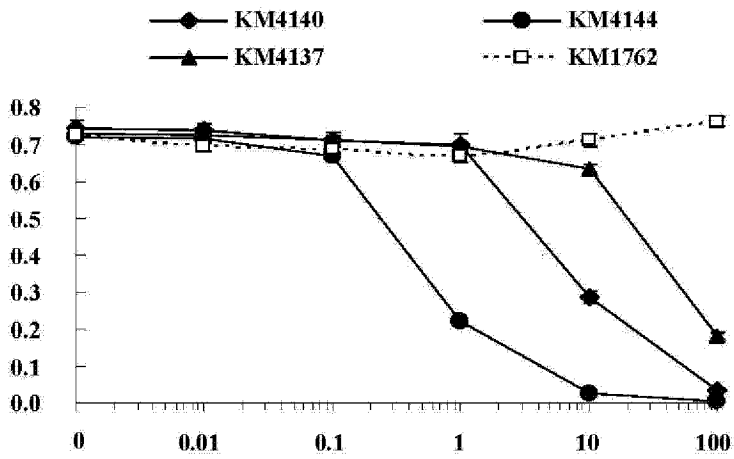


图 11

(a)



(b)



(c)

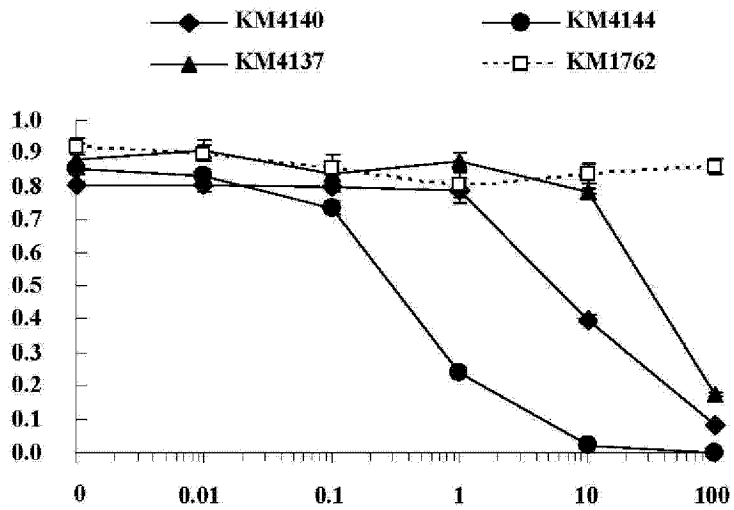


图 12

专利名称(译)	抗IgA1抗体		
公开(公告)号	CN102712923A	公开(公告)日	2012-10-03
申请号	CN201080059844.3	申请日	2010-12-28
申请(专利权)人(译)	协和发酵麒麟株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	协和发酵麒麟株式会社		
[标]发明人	金子悦士 佐佐木由香 森胜弘 神田丰 佐藤光男		
发明人	金子悦士 佐佐木由香 森胜弘 神田丰 佐藤光男		
IPC分类号	C12N15/09 A61K39/395 A61P13/12 A61P37/02 C07K16/42 C07K16/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/02 C12P21/08 G01N33/53		
CPC分类号	C07K16/4283 G01N2800/34 A61P13/12 A61P37/02 C07K2317/34 C07K2317/92 A61K38/17 A61K38/20 A61K39/395 A61K48/00 C07K14/435 C07K14/54 C07K16/18 C07K16/22 C07K16/24 C07K16/28 C07K16/42		
代理人(译)	杨青		
优先权	2009296706 2009-12-28 JP		
其他公开文献	CN102712923B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明的目的在于提供一种对IgA肾病的诊断有效的单克隆抗体，其特异性识别并结合由免疫球蛋白A1的重链基因编码的多肽的铰链区，所述铰链区包含未结合半乳糖的丝氨酸苏氨酸连接型糖链。根据本发明，能够提供一种单克隆抗体或该抗体片段，其特异性识别并结合由免疫球蛋白A1的重链基因编码的多肽的铰链区，所述铰链区包含未结合半乳糖的丝氨酸苏氨酸连接型糖链；并且能够提供使用该抗体或抗体片段的诊断剂以及含有该抗体或抗体片段作为有效成分的治疗剂。

