



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102124030 B

(45) 授权公告日 2015.06.17

(21) 申请号 200980132253.1

*G01N 33/53*(2006.01)

(22) 申请日 2009.03.09

*C12N 15/09*(2006.01)

(30) 优先权数据

2008-162565 2008.06.20 JP

(56) 对比文件

WO 95/09363 A1, 1995.04.06, 摘要和权利要求书.

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011.02.18

WO 2004/023141 A1, 2004.03.18, 摘要和权利要求书.

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2009/054473 2009.03.09

KOBAYASHI, K., ET AL. CIRCULATING

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/154025 JA 2009.12.23

OXIDIZED LDL FORM COMPLEXES WITH

B2-GLYCOPROTEIN I: INPLICATION AS AN

ATHEROGENIC AUTOANTIGEN. 《JOURNAL OF LIPID RESEARCH》. 2003, 第44卷 716-726.

(73) 专利权人 国立大学法人冈山大学

地址 日本冈山县

专利权人 株式会社医学生物学研究所

审查员 张彬

(72) 发明人 松浦荣次 小岛和夫

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 王灵菇 白丽

(51) Int. Cl.

*C07K 16/18*(2006.01)

*A61K 49/00*(2006.01)

*C07K 16/46*(2006.01)

*G01N 33/15*(2006.01)

*G01N 33/50*(2006.01)

权利要求书1页 说明书24页

序列表11页 附图11页

(54) 发明名称

抗氧化 LDL/β<sub>2</sub>GPI 复合物的抗体及其用途

(57) 摘要

本发明人等对动脉硬化切片的可免疫染色的抗体中能适用于体内成像的抗体进行了确定,并对其进行特异性进行了分析,结果证明对确定表位具有特异性的抗氧化 LDL/β<sub>2</sub>GPI 复合物抗体的荧光标记物对成像是有效的。

1. 一种抗体,其与氧化 LDL 和  $\beta_2$ -糖蛋白 I 的复合物即氧化 LDL/ $\beta_2$ GPI 复合物结合,且其具有由下述 (a) 或 (b) 中记载的重链和下述 (c) 或 (d) 中记载的轻链构成的对;

(a) 包含具有由序列号 :2 中记载的氨基酸序列构成的 CDR1、由序列号 :3 中记载的氨基酸序列构成的 CDR2 以及由序列号 :4 中记载的氨基酸序列构成的 CDR3 的重链的抗体;

(b) 包含具有由序列号 :1 中记载的氨基酸序列构成的重链可变区的重链的抗体;

(c) 包含具有由序列号 :7 中记载的氨基酸序列构成的 CDR1、由序列号 :8 中记载的氨基酸序列构成的 CDR2 和由序列号 :9 中记载的氨基酸序列构成的 CDR3 的轻链的抗体;

(d) 包含具有由序列号 :6 中记载的氨基酸序列构成的轻链可变区的轻链的抗体。

2. 根据权利要求 1 所述的抗体,其为人源化抗体或嵌合抗体。

3. 权利要求 1 或 2 所述的抗体在制造体内用的动脉硬化的存在部位的成像剂中的用途,其中,所述成像剂通过静脉内注射来给予。

4. 根据权利要求 3 所述的用途,其中,所述成像剂对动脉硬化的粥样斑块的位置和 / 或大小进行成像。

5. 一种动脉硬化的存在部位的成像剂,其含有权利要求 1 或 2 所述的抗体。

6. 根据权利要求 5 所述的成像剂,其对动脉硬化的粥样斑块的位置和 / 或大小进行成像。

7. 权利要求 1 或 2 所述的抗体在制造体内用的动脉硬化的存在部位的成像用试剂盒中的用途,其中,所述成像用试剂盒通过静脉内注射来给予。

8. 一种动脉硬化的存在部位的成像用试剂盒,其包含权利要求 1 或 2 所述的抗体。

9. 一种动脉硬化的存在部位的成像剂,其含有与氧化 LDL 和  $\beta_2$ -糖蛋白 I 的复合物即氧化 LDL/ $\beta_2$ GPI 复合物结合的抗体,所述抗体具有由下述 (a) 或 (b) 中记载的重链和下述 (c) 或 (d) 中记载的轻链构成的对;

(a) 包含具有由序列号 :2 中记载的氨基酸序列构成的 CDR1、由序列号 :3 中记载的氨基酸序列构成的 CDR2 以及由序列号 :4 中记载的氨基酸序列构成的 CDR3 的重链的抗体;

(b) 包含具有由序列号 :1 中记载的氨基酸序列构成的重链可变区的重链的抗体;

(c) 包含具有由序列号 :7 中记载的氨基酸序列构成的 CDR1、由序列号 :8 中记载的氨基酸序列构成的 CDR2 和由序列号 :9 中记载的氨基酸序列构成的 CDR3 的轻链的抗体;

(d) 包含具有由序列号 :6 中记载的氨基酸序列构成的轻链可变区的轻链的抗体。

10. 根据权利要求 9 所述的成像剂,其为体内用成像剂。

11. 根据权利要求 9 所述的成像剂,其用于体内给予。

12. 权利要求 1 或 2 所述的抗体在制造动脉硬化的存在部位的成像剂中的用途。

## 抗氧化 LDL/ $\beta$ 2GPI 复合物的抗体及其用途

[0001] 技术分野

[0002] 本发明涉及抗氧化 LDL/ $\beta$ <sub>2</sub>GPI 复合物的抗体以及利用该抗体确定粥样动脉硬化的存在部位、监测治疗效果等非介入性的动脉硬化的诊断方法。

### 背景技术

[0003] 作为观察动脉硬化的状态的目前已得到实用的诊断方法,可例示出以下 4 种方法。

[0004] “脚关节手臂血压比”:在躺着的状态下测定两臂、两脚的血压,在正常情况下,脚踝一侧的值稍高。但是,在血管存在狭窄的情况下,狭窄部位下游的血压降低,脚关节的血压/手臂的血压之比 (ABI) 变小。从 ABI 降低不仅可以推测下肢动脉存在动脉硬化,而且可以推测全身都存在动脉硬化。

[0005] “脉波速度检查”:通过研究动脉硬化度的方法来推测动脉硬化的进行情况的方法。健康人由于血管具有弹性,振动被血管壁吸收,脉波的速度慢。当动脉硬化时,脉波变快,因此能够以速度为指标来推测动脉硬化的进行情况。

[0006] “颈动脉超声波检查”:利用超声波能够容易地观察到行走于皮肤表面附近的颈动脉的内部状况,因此通过对该颈动脉进行研究来推测全身的动脉硬化的进行情况。

[0007] “MR 血管造影 (MRA)”和“CT 血管造影 (CTA)”:目前血管造影是主要的血管疾病的图像诊断方法,介入性更低且与血管造影基本相当的图像信息已得以应用。关于 CTA 的优点,可列举出 (1) 空间分辨力高、(2) 检查简便、(3) 钙化病变的检测优异。

[0008] 上述“脚关节手臂血压比”、“脉波速度检查”无法确定粥样化位置和对每个单个部位的发展状况进行诊断,只能间接地通过数值进行评价。

[0009] 另外,“颈动脉超声波检查”与脉波速度检查等不同,具有能够通过图像实际地直接对血管内部进行诊断的优点。但是,由于需要根据超声波图像的深浅和形状来判断血管壁的状况,因此要求进行检查的医师或检查技师具有该技能,并且无法确定除颈动脉以外的部位的粥样化位置和对每个单个部位的发展状况进行诊断。

[0010] 另外,作为监测动脉硬化发展状况的方法,有通过测定血中的氧化 LDL/ $\beta$ <sub>2</sub>GPI 复合物的 ELISA 系统 (日本专利 3370334 号、日本专利 3898680 号、W02003/022866、W02004/023141)。但是,目前的氧化 LDL/ $\beta$ <sub>2</sub>GPI 复合物测定 ELISA 虽然能够推测动脉硬化灶的大小,但是无法确定动脉硬化灶的存在部位。

[0011] 此外,使用了 MRI 和放射性标记的成像由于也需要根据图像的深浅和形状来判断血管壁的状况,因此要求进行检查医师和检查技师具有该技能 (美国专利 6716410 号、美国专利 6375925 号)。

[0012] 另外,以下示出与本发明相关的现有技术文献。

[0013] 专利文献 1:日本专利 3370334 号

[0014] 专利文献 2:日本专利 3898680 号

[0015] 专利文献 3:W02003/022866

- [0016] 专利文献 4 :W02004/023141  
[0017] 专利文献 5 :日本特表 2001-506983  
[0018] 专利文献 6 :日本专利第 4044972  
[0019] 专利文献 7 :美国专利 6716410 号  
[0020] 专利文献 8 :美国专利 6375925 号  
[0021] 非专利文献 1 :Journal of Biological Chemistry 269,15274-15279,1994

## 发明内容

- [0022] 发明所要解决的课题
- [0023] 本发明的课题在于提供抗氧化 LDL/ $\beta_2$ GPI 复合物的抗体以及使用该抗体确定粥样动脉硬化的存在部位、监测治疗效果等非介入性的动脉硬化的诊断方法。
- [0024] 用于解决课题的手段
- [0025] 本发明人等确定了动脉硬化切片的可免疫染色的抗体中可适用于对体内即生物体内的动脉硬化灶、特别是动脉硬化粥样斑块的存在位置及其大小进行成像的抗体，并对其特异性进行了分析。其结果证明对确定的表位具有特异性的抗氧化 LDL/ $\beta_2$ GPI 复合物抗体的荧光标记物对成像是有效的。
- [0026] 即，本发明提供以下 (1) ~ (12)。
- [0027] (1) 一种下述 (a) ~ (e) 中任一项所述的抗体，其与氧化 LDL 和  $\beta_2$ -糖蛋白 I 的复合物 (氧化 LDL/ $\beta_2$ GPI 复合物) 结合；
- [0028] (a) 包含具有序列号 :2 中记载的氨基酸序列作为 CDR1、具有序列号 :3 中记载的氨基酸序列作为 CDR2 以及具有序列号 :4 中记载的氨基酸序列作为 CDR3 的重链的抗体；
- [0029] (b) 包含具有序列号 :1 中记载的氨基酸序列作为重链可变区的重链的抗体；
- [0030] (c) 包含具有序列号 :7 中记载的氨基酸序列作为 CDR1、具有序列号 :8 中记载的氨基酸序列作为 CDR2 和具有序列号 :9 中记载的氨基酸序列作为 CDR3 的轻链的抗体；
- [0031] (d) 包含具有序列号 :6 中记载的氨基酸序列作为轻链可变区的轻链的抗体；
- [0032] (e) 具有由上述 (a) 或 (b) 中记载的重链和上述 (c) 或 (d) 中记载的轻链构成的对的抗体。
- [0033] (2) 一种抗体，其与和 (1) 所述的抗体所结合的表位相同的表位结合。
- [0034] (3) 根据 (1) 或 (2) 所述的抗体，其为人源化抗体或嵌合抗体。
- [0035] (4) 一种动脉硬化的存在部位的成像剂，其含有与氧化 LDL 和  $\beta_2$ -糖蛋白 I 的复合物 (氧化 LDL/ $\beta_2$ GPI 复合物) 结合的抗体。
- [0036] (5) 一种动脉硬化的存在部位的成像剂，其含有 (1) ~ (3) 中任一项所述的抗体。
- [0037] (6) 根据 (4) 或 (5) 所述的成像剂，其对动脉硬化的粥样斑块的位置和 / 或大小进行成像。
- [0038] (7) 一种动脉硬化的存在部位的成像用试剂盒，其包含与氧化 LDL 和  $\beta_2$ -糖蛋白 I 的复合物 (氧化 LDL/ $\beta_2$ GPI 复合物) 结合的抗体。
- [0039] (8) 一种动脉硬化的存在部位的成像用试剂盒，其包含 (1) ~ (3) 中任一项所述的抗体。
- [0040] (9) 一种动脉硬化治疗剂的候补化合物的筛选方法，其包含以下工序：

[0041] (a) 向给予了(1)~(3)中任一项所述的抗体的动脉硬化患病非人动物模型给予候补化合物的工序;

[0042] (b) 对给予了所述候补化合物的动脉硬化患病非人动物模型和未给予所述候补化合物的动脉硬化患病非人动物模型的动脉硬化灶进行成像的工序;

[0043] (c) 对给予了所述候补化合物的动脉硬化患病非人动物模型和未给予所述候补化合物的动脉硬化患病非人动物模型的动脉硬化灶的大小或存在部位进行比较的工序,和

[0044] (d) 从给予了所述候补化合物的动脉硬化患病非人动物模型中选择与未给予所述候补化合物的动脉硬化患病非人动物模型相比动脉硬化灶减少或消失的候补化合物的工序。

[0045] (10) 一种动脉硬化的存在部位的成像方法,其包含(1)~(3)所述的抗体。

[0046] (11) (1)~(3)所述的抗体在制造动脉硬化的存在部位的成像剂中的用途。

[0047] (12) (1)~(3)所述的抗体在动脉硬化的存在部位的成像方法中的用途。

### 附图说明

[0048] 图1是表示用氧化LDL/ $\beta_2$ GPI复合物作为抗原对BALB/c小鼠进行免疫得到的单克隆抗体对固定化抗原的反应性的图。横轴表示抗体浓度、纵轴表示吸光度。

[0049] 图2是用于分析与液体中的抗原的竞争性(竞争抑制试验)的示意图。

[0050] 图3是表示利用抗原的竞争抑制试验的曲线图。横轴表示液体中的抗原浓度、纵轴表示当将不存在抑制抗原时的吸光度记为100%时的抑制%。3H3和4C12为识别结合于氧化LDL的 $\beta_2$ GPI的抗体,其不识别游离 $\beta_2$ GPI。另外,2H6、3D4、2A12为与游离的 $\beta_2$ GPI反应的抗体。

[0051] 图4为动脉硬化多发小鼠模型(高脂肪饮食喂养的apoE<sup>-/-</sup>)的主动脉瓣的免疫荧光染色照片。A)DAPI:核的染色、B)Mac3:巨噬细胞的特异性抗体、C)3H3抗体、D)对照。对用普通饲料喂养的C57BL6系统的小鼠使用3H3抗体、Mac3的免疫荧光染色中,泡沫状巨噬细胞聚集而成的粥样斑块被染色。使用3H3时,同样的部位被染色。

[0052] 图5动脉硬化多发小鼠模型(高脂肪饮食喂养的apoE<sup>-/-</sup>)的主动脉瓣的免疫荧光染色照片。表示使用了氧化LDL/ $\beta_2$ GPI复合物抗体的其他抗体的荧光免疫染色的结果。粥样斑块的染色阳性例子仅为3H3和抗体A。

[0053] 图6是利用IVIS 200获得的使用了特异抗体的荧光成像(反射荧光观察)照片。体内:将成像剂从脂肪饮食喂养的ApoE<sup>-/-</sup>小鼠的尾静脉给予高脂肪饮食喂养6个月以上的ApoE<sup>-/-</sup>小鼠,2~24小时后,用IVIS 200在吸入麻醉下对体内荧光进行观察、摄影。此时,由于ApoE<sup>-/-</sup>小鼠的黑色体毛吸收荧光,因此剃掉体毛进行观察。离体:使小鼠安乐死、开胸使心脏和主动脉露出,在右心耳上开一个小口,然后向左心室插入针并用冷PBS 10ml进行心脏灌流,摘出心脏和主动脉,利用IVIS 200得到反射荧光图像。

[0054] 图7是利用IVIS200获得的成像照片(激发:640nm,发射:720nm.)。实验1:从尾静脉给予高脂肪饮食喂养的apoE<sup>-/-</sup>小鼠生理盐水(PBS、对照)、Cy5.5标记抗体A、Cy5.5标记3H3抗体。24小时后剥掉胸部皮肤,在存活状态下进行全身摄影。然后,在与胸部主动脉连接的状态下摘出心脏进行摄影。实验2:从给予了PBS、Cy5.5标记2A12抗体、Cy5.5标记3H3抗体的小鼠摘出的心脏和胸部主动脉。3H3给予中,主动脉根部强烈染色。抗体A

中有一定程度染色,但没有 3H3 的荧光强度强。2A12 中完全不染色。

[0055] 图 8 是使用了特异抗体的动脉硬化的三维图像成像照片。(A) 是利用 IVIS 200 获得的使用了特异抗体的荧光成像(反射)、(B) 是利用 IVIS200 获得的透射光 3D 图像(左图)与整合前的 CT-3D 像(中央)的整合后的 3D 图像(右图)、(C) 是利用 IVIS 获得的荧光信号与三维 CT 的整合图像。

[0056] 图 9 是整合前的利用 IVIS 200 获得的荧光三维图像(上图:A)以及利用 IVIS 200 获得的荧光信号与三维 CT 的整合图像(下图:B)的照片。

[0057] 图 10 是表示用 IVIS200 测定时的主动脉根部周围的依存于 Cy5.5 的荧光量。测定主动脉根部的每单位面积的荧光强度。将给予了 PBS 的对照小鼠的荧光记为 1.0。3H3 给予中,可见为对照的 3 倍左右的荧光;其他抗体给予中,未见荧光强度有大的变化。

[0058] 图 11 是 3H3 抗体氨基酸序列图。各 CDR 用下划线表示。

### 具体实施方式

[0059] 本发明提供一种抗体,其与氧化变性 LDL(氧化 LDL)和  $\beta_2$ -糖蛋白 I 的复合物(氧化 LDL/ $\beta_2$ GPI 复合物)结合。动脉硬化灶中形成了氧化 LDL 与血浆糖蛋白质即  $\beta_2$ GPI 的复合物。本发明所包含的抗体的特征在于与该复合物结合。

[0060] 作为本发明所包含的抗体,具体地可列举出以下抗体,但并不限于这些。

[0061] (a) 包含具有序列号:2 中记载的氨基酸序列作为 CDR1、具有序列号:3 中记载的氨基酸序列作为 CDR2 以及具有序列号:4 中记载的氨基酸序列作为 CDR3 的重链的抗体;

[0062] (b) 包含具有序列号:1 中记载的氨基酸序列作为重链可变区的重链的抗体;

[0063] (c) 包含具有序列号:7 中记载的氨基酸序列作为 CDR1、具有序列号:8 中记载的氨基酸序列作为 CDR2 和具有序列号:9 中记载的氨基酸序列作为 CDR3 的轻链的抗体;

[0064] (d) 包含具有序列号:6 中记载的氨基酸序列作为轻链可变区的轻链的抗体;

[0065] (e) 具有由上述(a)或(b)中记载的重链和上述(c)或(d)中记载的轻链构成的对的抗体。

[0066] 另外,本发明还提供一种抗体,其与和氧化 LDL 和  $\beta_2$ -糖蛋白 I 的复合物(氧化 LDL/ $\beta_2$ GPI 复合物)结合的本发明的抗体所结合的表位相同的表位结合。该抗体对与氧化 LDL 形成了复合物的氧化 LDL/ $\beta_2$ GPI 分子上的特定表位进行识别。

[0067] 并不是进行限制,例如某种抗体是否对与其他抗体相同的表位进行识别,可以通过二者对表位的竞争来进行确认。抗体间的竞争可以通过竞争结合实验来进行评价,作为其方法,可列举出 ELISA、荧光能量转移测定法(FRET)和荧光微量测定技术(FMAT(注册商标))等。与抗原结合的所述抗体的量间接地与对相同表位的结合进行竞争的候补竞争抗体(受检抗体)的结合能力相关。即,与相同表位结合的受检抗体的量或亲和性越大,该抗体与抗原的结合量越低,与抗原结合的受检抗体的结合量越增加。具体而言,将进行了适当标记的所述抗体与要评价的抗体同时添加到抗原中,利用标记检测结合的所述抗体。与抗原结合的所述抗体的量通过预先对所述抗体进行标记,能够容易地进行测定。该标记没有特别限制,可选择与技术相应的标记方法。标记方法具体地可列举出荧光标记、放射标记、酶标记等。

[0068] 这里所说的“对相同表位进行识别的抗体”是指下述抗体:相对于使与标记的所述

抗体的结合量比与未标记的所述抗体的结合量低 50% 的浓度 ( $IC_{50}$ ), 受检抗体以非标记的所述抗体的  $IC_{50}$  的通常 100 倍、优选为 80 倍、进一步优选为 50 倍、进一步优选为 30 倍、更优选为 10 倍的高浓度将标记的所述抗体的结合量降低至少 50%。

[0069] 本发明的抗体包括多克隆抗体和单克隆抗体两者。单克隆抗体和多克隆抗体的制备和纯化方法是本领域已知的, 例如 Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988) 中所记载的。

[0070] 本发明的抗体还包括人源化 (humanized) 抗体或嵌合 (chimeric) 抗体等重组抗体。“人源化抗体”是指与人的抗体具有类似结构的抗体。这样的人源化抗体或嵌合抗体包括人型嵌合抗体 (例如抗体的一部分被人源化的抗体、CH2 区被人源化的抗体、Fc 区被人源化的抗体、恒定区被人源化的抗体)、和除恒定区和可变区存在的 CDR (互补决定区) 以外的部分被人源化的人型 CDR 移植 (CDR-grafted) 抗体 (P. T. Johans et al., *Nature* 321, 522 (1986))、完全人源化抗体等。为了提高人型 CDR 移植抗体的抗原结合活性, 已开发出选择与小鼠抗体的同源性高的人抗体 FR 的方法、制作同源性高的人源化抗体的方法、将小鼠 CDR 移植到人抗体后进一步将 FR 的氨基酸替换的方法的改良技术 (参照美国专利第 5585089 号、美国专利第 5693761 号、美国专利第 5693762 号、美国专利第 6180370 号、欧洲专利第 451216 号、欧洲专利第 682040 号、专利第 2828340 号等), 可用于本发明的人型 CDR 移植抗体的制作。

[0071] 人型嵌合抗体例如可以通过将具有上述 H 链可变区的结构和 / 或 L 链可变区的结构的抗体的恒定区替换为人抗体的恒定区来制作。作为人抗体的恒定区, 可以采用公知的恒定区。以下示出人型嵌合抗体的制作方法的一个例子。

[0072] 首先, 从产生抗特定的对象抗原的小鼠抗体的杂交瘤提取 mRNA, 按照常规方法合成 cDNA。将合成的 cDNA 插入到载体中构建 cDNA 库。通过将 H 链基因片段和 L 链基因片段用作探针, 从上述 cDNA 库中选择含有 H 链基因和 L 链基因的载体。对选择的载体的插入序列进行测序, 确定 H 链可变区和 L 链可变区的基因的序列。以如此得到的序列数据为基础, 通过化学合成、生化切断 / 再结合等来制作编码 H 链可变区的 DNA。将得到的编码 H 链可变区的 DNA 与编码人 H 链恒定区的 DNA 连接、插入表达用载体, 从而制作 H 链表达载体。作为表达载体, 可使用例如基于 SV40 病毒的载体、基于 EB 病毒的载体、基于 BPV (乳头状瘤病毒) 的载体等, 但并不限于这些。另一方面, 通过同样的方法制作 L 链表达载体。利用这些 H 链表达载体和 L 链表达载体对宿主细胞进行共转化。作为宿主细胞, 优选使用 CHO 细胞 (中国仓鼠卵巢) (A. Wright & S. L. Morrison, *J. Immunol.* 160, 3393-3402 (1998))、SP2/0 细胞 (小鼠骨髓瘤) (K. Motmans et al., *Eur. J. Cancer Prev.* 5, 512-519 (1996)), R. P. Junghans et al., *Cancer Res.* 50, 1495-1502 (1990)) 等。另外, 转化优选使用脂质体法 (R. W. Malone et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6077 (1989)), P. L. Felgner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 7413 (1987))、电穿孔法、磷酸钙法 (F. L. Graham & A. J. van der Eb, *Virology* 52, 456-467 (1973))、DEAE-Dextran 法等。

[0073] 将转化体培养后, 从转化体的细胞内或培养液中分离人型嵌合抗体。抗体的分离、纯化可以适当组合使用离心分离、硫酸铵分级法、盐析、超滤、亲和层析法、离子交换层析法、凝胶过滤层析法等方法。

[0074] 另一方面, 人型 CDR 移植抗体可以通过例如以下的方法制作。首先, 通过已在上述

嵌合抗体的制造方法中描述的方法来确定抗特定的抗原的抗体的 H 链可变区和 L 链可变区的氨基酸序列和对其进行编码的碱基序列。各 CDR 区的氨基酸序列和碱基序列也一并确定。

[0075] 接着,选择夹有 CDR 区的 FR(框架区)。FR 的选择可采用大约三种方法。第 1 种方法为使用 NEWM、REI 等已清楚三维结构的人抗体框架的方法 (Riechmann L. et al., Nature 332, 323-327 (1988); Tempst, PR. et al., Protein Engineering 7, 1501-1507 (1994); Ellis JH. et al., J. Immunol 155, 925-937 (1995))。第 2 种方法为从数据库中选择与目标小鼠抗体可变区具有最高同源性的人抗体可变区,并使用其 FR 的方法 (Queen C. et al., Proc Natl Acad Sci USA 86, 10029-10033 (1989); Rozak MJ. et al., J Biol Chem 271, 22611-22618 (1996); Shearman CW. et al., J. Immunol 147, 4366-4373 (1991))。第 3 种方法为在人抗体的 FR 中选择最通用的氨基酸的方法 (Sato K. et al., Mol Immunol 31, 371-381 (1994); Kobinger F. et al., Protein Engineering 6, 971-980 (1993); Kettleborough CA. et al., Protein Engineering 4, 773-783 (1991))。本发明可以使用这些方法中的任意方法。

[0076] 其中,即使是对选择的人 FR 的氨基酸序列进行修饰而得到的氨基酸序列,只要最终得到的人型 CDR 移植抗体具有对对象抗原的特异性结合性,即可以用作 FR 的氨基酸序列。特别是,当将选择的人 FR 的氨基酸的一部分变更为作为 CDR 来源的抗体的 FR 的氨基酸时,维持抗的特性的可能性高。修饰的氨基酸的数目优选为 FR 总体的 30% 以下、更优选为 FR 总体的 20% 以下、进一步优选为 FR 总体的 10% 以下。

[0077] 接着,通过将利用这些任一方法选择的 FR 与上述 CDR 组合来设计编码 H 链可变区和 L 链可变区的 DNA。以该设计为基础,利用化学合成、生化切断 / 再结合等来分别制作编码 H 链可变区的 DNA 和编码 L 链可变区的 DNA。进而,将编码 H 链可变区的 DNA 与编码人免疫球蛋白 H 链恒定区的 DNA 一起插入表达载体来构建 H 链表达载体。同样地,将编码 L 链可变区的 DNA 与编码人免疫球蛋白 L 链恒定区的 DNA 一起插入表达载体来构建 L 链表达载体。作为表达载体,可以使用例如基于 SV40 病毒的载体、基于 EB 病毒的载体、基于 BPV (乳头状瘤病毒) 的载体等,但并不限于这些。

[0078] 利用通过上述方法制作的 H 链表达载体和 L 链表达载体对宿主细胞进行共转化。作为宿主细胞,优选使用 CHO 细胞 (中国仓鼠卵巢) (A. Wright & S. L. Morrison, J. Immunol. 160, 3393-3402 (1998))、SP2/0 细胞 (小鼠骨髓瘤) (K. Motmans et al., Eur. J. Cancer Prev. 5, 512-519 (1996), R. P. Junghans et al., Cancer Res. 50, 1495-1502 (1990)) 等。另外,转化可优选使用脂质体法 (R. W. Malone et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 6077 (1989), P. L. Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7413, (1987))、电穿孔法、磷酸钙法 (F. L. Graham & A. J. van der Eb, Virology 52, 456-467 (1973))、DEAE-Dextran 法等。

[0079] 将转化体培养后,从转化体的细胞内或培养液中分离人型 CDR 移植抗体。抗体的分离、纯化可适当组合离心分离、硫酸铵分级法、盐析、超滤、亲和层析法、离子交换层析法、凝胶过滤层析法等方法来进行。

[0080] 另外,人抗体的获得方法也是已知的。例如,将人淋巴细胞在体外用期望的抗原或表达期望抗原的细胞敏化,将敏化淋巴细胞与人骨髓瘤细胞例如 U266 融合,也能够得到

具有与抗原结合的活性的期望的人抗体（参照日本特公平 1-59878）。另外，通过用期望的抗原对具有全部人抗体基因的基因谱的转基因动物进行免疫，能够获得期望的人抗体（参照国际专利申请公开号 W093/12227、W092/03918、W094/02602、W094/25585、W096/34096、W096/33735）。

[0081] 在其他的实施方式中，抗体或抗体片段可以从利用 McCafferty 等 (Nature, 348 : 552-554(1990)) 中记载的技术产生的噬菌体抗体库中分离。Clackson 等 (Nature, 352 : 624-628(1991)) 和 Marks 等 (J. Mol. Biol., 222 : 581-597(1991)) 记述了使用了噬菌体库的小鼠和人抗体的分离。后续的刊物记述了通过链改组获得的高亲和性 (nM 范围) 的人抗体的生成 (Marks 等, Bio/Technology, 10 : 779-783[1992]) 以及作为用于构建非常大的噬菌体库的策略，记述了组合感染和体内重组 (Waterhouse 等, Nuc. Acids. Res., 21 : 2265-2266[1993])。因此，这些技术是与用于单克隆抗体的分离的传统的单克隆抗体杂交瘤法不同的能够实用的其他方法。

[0082] 在这点上，噬菌体展示是一种检索大的寡肽库，并对具有多肽靶特异性结合能力的这些文库中的成员进行鉴定的熟知的技术。噬菌体展示是将各种多肽以融合蛋白的形式呈递到噬菌体粒子表面上的外壳蛋白的技术 (Scott, J. K. 和 Smith G. P. (1990) Science 249 : 386)。噬菌体展示的有用性在于能够快速有效地对以选择性随机化的蛋白变异体（或随机克隆 cDNA）的大的文库为靶分子高亲和性地结合的这些序列进行分类。噬菌体中的多肽 (Cwirala, S. E. 等 (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87 : 6378) 或蛋白 (Lowman, H. B. 等 (1991) Biochemistry, 30 : 10832 ; Clackson, T. 等 (1991) Nature, 352 : 624 ; Marks, J. D. 等 (1991), J. Mol. Biol., 222 : 581 ; Kang, A. S. 等 (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88 : 8363) 库的展示被用于对具有特异性结合特性的大量的多肽或寡肽进行筛选 (Smith, G. P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2 : 668)。随机突变体的噬菌体库的分类需要构建大量的变异体并使之增殖的方法、使用了靶受体的亲和性纯化的方法和评价结合增强的结果的方法（参照美国专利第 5223409 号、美国专利第 5403484 号、美国专利第 5571689 号和美国专利第 5663143 号）。

[0083] 几乎所有的噬菌体展示法均使用了纤维状噬菌体，但还已知  $\lambda$  噬菌体展示体系 (W095/34683 ; 美国专利第 5627024 号)、T4 噬菌体展示体系 (Ren J. 等 Gene 215 : 439(1998) ; Zhu 等 Cancer Research, 58(15) : 3209-3214(1998) ; Jiang 等 Infection & Immunity, 65(11) : 4770-4777(1997) ; Ren 等, Gene, 195(2) : 303-311(1997) ; Ren, Protein Sci. 5 : 1833(1996) ; Efimov 等 Virus Genes 10 : 173(1995) 和 T7 噬菌体展示体系 (Smith 和 Scott Methods in Enzymology, 217, 228-257(1993) ; 美国专利第 5766905 号)。

[0084] 现在，在基础的噬菌体展示法的基础上开发出很多改良和变形。通过这些改良，改善了以与选择的靶分子的结合性等、来自多肽库或蛋白质库的特性、能力等为基础进行筛选的方法。关于用于噬菌体展示法的重组反应方法，在 W098/14277 中有记载。噬菌体展示库被用于对双分子相互作用 (W098/20169 ; W098/20159) 和限制性螺旋肽的特性 (W098/20036) 进行分析和控制。W097/35196 中记载了使噬菌体展示库与配体可与靶分子结合的第一溶液、和亲和性配体不与靶分子结合的第二溶液接触从而选择性地分离结合配体的亲和性配体的分离方法。W097/46251 中记载了利用亲和性纯化抗体对随机噬菌体展示库进行生物淘筛，然后分离结合噬菌体，接着在微板的孔中进行微淘筛 (micropanning)

从而分离高亲和性结合噬菌体的方法。另外,还报告了黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 蛋白质 A 作为亲和性标签 (tag) 的用途 (Li 等, (1998) *Mol Biotech.*, 9:187)。W097/47314 中记载了使用可以是噬菌体展示库的组合文库来识别酶特异性的底物消减文库的用途。W097/09446 中记载了选择适用做噬菌体展示用的洗涤剂中的酶的方法。选择特异性结合的蛋白质的其他方法记载于美国专利第 5498538 号、美国专利第 5432018 号和 W098/15833。多肽库的制作和这些文库的筛选的方法记载于美国专利第 5723286 号、美国专利第 5432018 号、美国专利第 5580717 号、美国专利第 5427908 号、美国专利第 5498530 号、美国专利第 5770434 号、美国专利第 5734018 号、美国专利第 5698426 号、美国专利第 5763192 号和美国专利第 5723323 号。

[0085] 此外,还已知利用人抗体库,通过淘筛来获得人抗体的技术。例如,可以利用噬菌体展示法使人抗体的可变区以单链抗体 (scFv) 的形式表达在噬菌体的表面,从而选择与抗原结合的噬菌体。对选择的噬菌体的基因进行分析,从而能够确定编码与抗原结合的人抗体的可变区的 DNA 序列。通过弄清楚与抗原结合的 scFv 的 DNA 序列,能够制作具有该序列的适当的表达载体,通过将其导入适当的宿主并使之表达,从而获得人抗体。这些方法均是已公知的,可参照 WO 92/01047、WO 92/20791、WO 93/06213、WO 93/11236、WO 93/19172、WO 95/01438、WO 95/15388 来实施。

[0086] 作为其他方法,可以使用噬菌体展示技术 (McCafferty 等, *Nature* 348:552-553 [1990]), 从非免疫化供体的免疫球蛋白可变 (V) 区基因谱在体外生产人抗体和抗体片段。根据该技术,能够将抗体 V 区基因在框架单元中用纤维状噬菌体例如 M13 或 fd 的外壳蛋白基因中的任一种克隆,并使之以功能性抗体片段的形式呈递在噬菌体粒子的表面。由于纤维状粒子包含噬菌体基因组的单链 DNA 拷贝,因此即使基于以抗体的功能特性为基础的选择,其结果也完成了编码显示这些特性的抗体的基因的选择。因此,该噬菌体模仿 B 细胞的几个特性。噬菌体展示可以以多种形式进行,例如参照 Johnson, Kevin S. 和 Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993)。可以将 V- 基因片段的几个供给源用于噬菌体展示。Clackson 等, *Nature*, 352:624-628 (1991) 从经免疫化的小鼠脾脏来源的 V 基因的小的随机组合文库中分离出了多种大量的抗噁唑酮抗体。能够构成非免疫化人供体的 V 基因的基因谱,且抗多种大量的抗原 (包括自身抗原) 的抗体可以直接按照 Marks 等, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991)、或 Griffith 等, *EMBO J.* 12:725-734 (1993) 中记载的技术分离。另外,请参照美国专利第 5565332 号和美国专利 5573905 号。

[0087] 本发明的抗体中也包括 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、scFv、dsFv、Diabody 和 sc(Fv)<sub>2</sub> 等抗体的功能性片段。另外,这些功能性片段的多倍体 (例如、二聚体、三聚体、四聚体、聚合物) 也包括在本发明的抗体中。

[0088] Fab 是通过将 IgG 在半胱氨酸存在下用木瓜蛋白酶消化而得到的,是由 L 链和 H 链可变区、以及包含 C<sub>H</sub>1 区和铰链区的一部分的 H 链片段构成的分子量约 5 万的片段。本发明中,可以通过将上述抗体用木瓜蛋白酶消化来得到。另外,也可以通过将编码上述抗体的 H 链的一部分和 L 链的 DNA 导入适当的载体,利用使用该载体进行转化得到的转化体来制备 Fab。

[0089] Fab' 是通过将后述的 F(ab')<sub>2</sub> 的 H 链间的二硫键切断而得到的分子量约 5 万

的片段。本发明中,可以通过将上述抗体用胃蛋白酶消化,并使用还原剂将二硫键切断来得到。另外,与 Fab 同样地,可以使用编码 Fab' 的 DNA 通过基因工程来制备。

[0090] F(ab')<sub>2</sub>是通过将 IgG 用胃蛋白酶消化而得到的,是由片段 (Fab') 通过二硫键结合而得到的分子量约 10 万的片段,所述片段 (Fab') 是由 L 链和 H 链可变区、以及包含 C<sub>H</sub>1 区和铰链区的一部分的 H 链片段构成的。本发明中,可以通过将上述抗体用胃蛋白酶消化来得到。另外,与 Fab 同样地,可以使用编码 F(ab')<sub>2</sub>的 DNA 通过基因工程来制备。

[0091] Fv 可以通过将抗体用酶例如木瓜蛋白酶、胃蛋白酶处理生成抗体片段来制备,或者通过构建编码这些抗体片段的基因并将该基因导入表达载体,然后在适当的宿主细胞中表达来制备(例如参照 Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976、Better, M. & Horwitz, A. H. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496、Plueckthun, A.; Skerra, A. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496、Lamoyi, E., Methods in Enzymology (1989) 121, 652-663, Rousseaux, J. et al., Methods in Enzymology (1989) 121, 663-669, Bird, R. E. et al., TIBTECH (1991) 9, 132-137)。

[0092] scFv 是将包含 H 链可变区和 L 链可变区的 Fv 的一条链的 C 末端用适当的多肽接头连接到另一条链的 N 末端并进行单链化而得到的抗体片段。作为多肽接头,可以使用例如柔软性高的 (GGGGS)<sub>3</sub>等。例如可以使用编码上述抗体的 H 链可变区和 L 链可变区的 DNA 与编码多肽接头的 DNA 来构建编码 scFv 抗体的 DNA,将其导入适当的载体,利用使用该载体进行转化而得到的转化体来制备 scFv。

[0093] dsFv 是通过将 Cys 残基导入 H 链可变区和 L 链可变区的适当位置,并通过二硫键使 H 链可变区和 L 链可变区稳定而得到的 Fv 片段。各链中的 Cys 残基的导入位置可以基于利用分子模拟预测的立体结构来确定。本发明中,例如可以根据上述抗体的 H 链可变区和 L 链可变区的氨基酸序列来预测立体结构,基于上述预测构建分别编码导入了变异的 H 链可变区和 L 链可变区的 DNA,将其导入适当的载体,然后利用使用该载体进行转化而得到的转化体来制备 dsFv。

[0094] 另外,还可以通过使用适当的接头将 scFv 抗体、dsFv 抗体等连接,或使链霉亲和素融合等来使抗体片段多倍体化。本发明的抗体(包括抗体片段)可以通过使低分子化合物、蛋白质、标记物等融合或结合来构成融合抗体或标记化抗体。作为标记物,可以使用 <sup>125</sup>I 等放射性物质等。

[0095] Diabody 是指通过基因融合构建的二价 (bivalent) 的抗体片段 (Holliger P et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 :6444-6448 (1993)、EP404097 号、W093/11161 号等)。Diabody 是由 2 条多肽链构成的二聚体,通常多肽链的各相同链中的 VL 和 VH 通过 VL 和 VH 不会相互结合的短的例如 5 个残基左右的接头结合。同一多肽链上编码的 VL 和 VH 由于它们之间的接头短、无法形成单链可变区片段而形成二聚体,因此 Diabody 具有 2 个抗原结合部位。Diabody 可以通过将抗体用酶例如木瓜蛋白酶、胃蛋白酶等处理生成抗体片段来制备,或者通过构建编码这些抗体片段的 DNA,将该 DNA 导入表达载体,然后在适当的宿主细胞中进行表达来制备(例如参照 Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976; Better, M. and Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496; Plueckthun, A. and Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663; Rousseaux, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669; Bird,

R. E. and Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991)9, 132-137)。

[0096]  $sc(Fv)_2$ 是将 2 个 VH 和 2 个 VL 用接头等结合制成单链而得到的低 分子化抗体 (Hudson et al、J Immunol.Methods 1999 ;231 :177-189)。  $sc(Fv)_2$ 可以通过例如将 scFv 用接头连接来制作。

[0097] 本发明的抗体中还包括本发明的抗体与其他的多肽或蛋白融合而得到的融合蛋白。制作融合蛋白的方法可以使用下述本领域技术人员公知的方法:将编码本发明抗体的多核苷酸与其他肽或编码多肽的多核苷酸按照框架一致的方式连接,然后将其导入表达载体,使其在宿主中表达。作为用于与本发明抗体的融合的其他肽或多肽,例如可以使用 FLAG(Hopp, T. P. et al., BioTechnology (1988)6, 1204-1210)、由 6 个 His(组氨酸)残基构成的  $6\times His$ 、 $10\times His$ 、流感病毒血凝素(HA)、人 c-myc 的片段、VSV-GP 的片段、p18HIV 的片段、T7-tag、HSV-tag、E-tag、SV40T 抗原的片段、lcktag、 $\alpha$ -tubulin 的片段、B-tag、Protein C 的片段等公知的肽。另外,作为用于与本发明的抗体的融合的其他多肽,可列举出例如 GST(谷胱甘肽-S-转移酶)、HA(流感病毒血凝素)、 $\beta$ -半乳糖苷酶、MBP(麦芽糖结合蛋白)等。

[0098] 本发明的抗体也包括标记物所结合的抗体。

[0099] 作为标记物,可列举出利用酶发光(荧光素酶)产生的发光、发光低分子的标记物、和使用荧光蛋白或荧光低分子的标记物、放射性核素等,但并不限于这些。作为放射性核素,可列举出  $^{51}Cr$ 、 $^{59}Fe$ 、 $^{57}Co$ 、 $^{67}Ga$ 、 $^{75}Se$ 、 $^{81m}Kr$ 、 $^{99m}Tc$ 、 $^{111}In$ 、 $^{125}I$ 、 $^{131}I$ 、 $^{133}Xe$ 、 $^{201}Tl$  等  $\gamma$  射线发射核素或  $^{11}C$ 、 $^{13}N$ 、 $^{15}O$ 、 $^{18}F$ 、 $^{35m}Cl$ 、 $^{76}Br$ 、 $^{45}Ti$ 、 $^{48}V$ 、 $^{60}Cu$ 、 $^{61}Cu$ 、 $^{62}Cu$ 、 $^{66}Ga$ 、 $^{89}Zr$ 、 $^{94m}Tc$ 、 $^{124}I$  等正电子发射核素等,但并不限于这些。另外,本领域技术人员清楚,“m”表示核同质异能素(nuclear isomer)。

[0100] 作为荧光标记或发光标记,可以使用利用酶发光(荧光素酶)产生的发光的标记和使用荧光(GFP、DsRed、Kusabira Orange 等荧光蛋白质、FITC 和 Cy5.5、Alexa Fluor 750 等荧光性低分子)的标记。

[0101] 在酶发光(荧光素酶)产生的发光的情况下,底物给予需要其他途径。

[0102] 特别是,优选减轻动物本来的自身荧光所产生的影响的标记,更优选发出皮肤透射性高的信号的标记。

[0103] 另外,本发明还提供编码本发明的抗体的 DNA、插入有该 DNA 的载体和导入有该载体的转化细胞。作为载体的例子,可列举出 M13 系载体、pUC 系载体、pBR322、pBluescript、pCR-Script 等。另外,当以 cDNA 的亚克隆、切除为目的时,除了上述载体外,还可列举出例如 pGEM-T、pDIRECT、pT7 等。编码本发明抗体的 DNA、插入有该 DNA 的载体和导入有该载体的转化细胞可以使用公知的技术来制作。

[0104] 作为编码与本发明的氧化 LDL/ $\beta_2$ GPI 复合物结合的抗体的 DNA,可列举出以下的 DNA。

[0105] (a) 具有序列号:5 中记载的碱基序列的编码重链的 DNA

[0106] (b) 具有序列号:10 中记载的碱基序列的编码轻链的 DNA

[0107] (c) 编码具有序列号:2 中记载的氨基酸序列作为 CDR1、具有序列号:3 中记载的氨基酸序列作为 CDR2 和具有序列号:4 中记载的氨基酸序列作为 CDR3 的重链的 DNA,

[0108] (d) 编码具有序列号:7 中记载的氨基酸序列作为 CDR1、具有序列号:8 中记载的

氨基酸序列作为 CDR2 和具有序列号 :9 中记载的氨基酸序列作为 CDR3 的轻链的 DNA,

[0109] 作为表达载体,例如当为了在大肠杆菌中表达时,载体除了具有能够在大肠杆菌中扩增等的上述特征外,当宿主为 JM109、DH5 $\alpha$ 、HB101、XL1-Blue 等大肠杆菌时,具有在大肠杆菌中能够高效地表达的启动子、例如 lacZ 启动子 (Ward 等, Nature(1989)341, 544-546 ;FASEB J. (1992)6, 2422-2427)、araB 启动子 (Better 等, Science(1988)240, 1041-1043)、或 T7 启动子等也不可缺少的。作为这样的载体,除了上述载体外还可列举出 pGEX-5X-1(Pharmacia 公司制)、“QIAexpress system”(QIAGEN 公司制)、pEGFP 或 pET(此时,宿主优选为表达 T7 RNA 聚合酶的 BL21) 等。

[0110] 另外,载体也可以包含用于多肽分泌的信号序列。作为用于蛋白分泌的信号序列,在产生到大肠杆菌的胞质中的情况下,可以使用 pelB 信号序列 (Lei, S.P. et al J. Bacteriol. (1987)169, 4379)。载体向宿主细胞中的导入可以使用例如氯化钙法、电穿孔法来进行。

[0111] 除了大肠杆菌以外,还可列举出例如哺乳动物来源的表达载体(例如 pcDNA3(Invitrogen 公司制)、pEGF-BOS(Nucleic Acids. Res. 1990,18(17), p5322)、pEF、pCDM8)、或者昆虫细胞来源的表达载体(例如“Bac-to-BAC baculovirus expression system”(GIBCO-BRL 公司制)、pBacPAK8)、植物来源的表达载体(例如 pMH1、pMH2)、动物病毒来源的表达载体(例如 pHSV、pMV、pAdexLcw)、逆转录病毒来源的表达载体(例如 pZIPneo)、酵母来源的表达载体(例如“Pichia Expression Kit”(Invitrogen 公司制)、pNV11、SP-Q01)、枯草杆菌来源的表达载体(例如 pPL608、pKTH50)。

[0112] 当为了在 CHO 细胞、COS 细胞、NIH3T3 细胞等动物细胞中表达时,载体具有细胞内表达所需的启动子例如 SV40 启动子 (Mulligan 等, Nature(1979)277, 108)、MMTV-LTR 启动子、EF1 $\alpha$  启动子 (Mizushima 等, Nucleic Acids Res. (1990)18, 5322)、CMV 启动子等是不可缺少的,更优选载体具有用于挑选转化到细胞的基因(例如能够利用药物(新霉素、G418 等)鉴别的耐药性基因)。作为具有这样的特性的载体,可列举出例如 pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV、pOP13 等。

[0113] 此外,当为了使基因稳定表达并且增加细胞内的基因的拷贝数时,可列举出下述方法:向缺少核酸合成途径的 CHO 细胞中导入具有对其进行补偿的 DHFR 基因的载体(例如 pCHOI 等),并利用氨甲喋呤 (MTX) 使其扩增;另外,当以基因的瞬时表达为目的时,还可列举出下述方法:使用在染色体上具有表达 SV40 T 抗原的基因的 COS 细胞,并利用具有 SV40 的复制起点的载体 (pcD 等) 进行转化。作为复制起点,还可以使用多瘤病毒、腺病毒、牛乳头瘤病毒 (BPV) 等来源的复制起点。此外,为了在宿主细胞系中增加基因拷贝数,表达载体可以包含氨基糖苷转移酶 (APH) 基因、胸苷激酶 (TK) 基因、大肠杆菌黄嘌呤鸟嘌呤磷酸转移酶 (Ecogpt) 基因、二氢叶酸还原酶 (dhfr) 基因等作为选择标记物。

[0114] 作为导入有载体的宿主细胞,没有特殊限制,例如可使用大肠杆菌或各种动物细胞等。宿主细胞例如可以用作本发明抗体的制造或表达用的生产体系。用于多肽制造的生产体系有体外和体内的生产体系。作为体外的生产体系,可列举出使用真核细胞的生产体系和使用原核细胞的生产体系。

[0115] 当使用真核细胞时,例如可以将动物细胞、植物细胞、真菌细胞用作宿主。作为动物细胞,已知哺乳类细胞,例如 CHO(J. Exp. Med. (1995)108, 945)、COS、3T3、骨髓

瘤、BHK(幼仓鼠肾)、HeLa、Vero;两栖动物类细胞,例如爪蟾卵母细胞(Valle, et al., Nature(1981)291,358-340);或者昆虫细胞,例如 Sf9、Sf21、Tn5。本发明中,优选使用 CHO-DG44、CHO-DXB11、COS7 细胞、BHK 细胞。动物细胞中,为了大量表达,特别优选 CHO 细胞。载体向宿主细胞中的导入可以使用例如磷酸钙法、DEAE 葡聚糖法、使用了阳离子脂质体 DOTAP(Boehringer-Mannheim 公司制)的方法、电穿孔法、脂转染等方法来进行。

[0116] 作为植物细胞,例如已知菸草(*Nicotiana tabacum*)来源的细胞作为蛋白生产体系,可以对其进行 callus 培养。作为真菌细胞,已知有酵母,例如酵母(*Saccharomyces*)属,例如酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、粟酒裂殖酵母(*Saccharomyces pombe*);糸状菌,例如曲霉(*Aspergillus*)属,例如黑曲霉(*Aspergillus niger*)。

[0117] 当使用原核细胞时,有使用细菌细胞的生产体系。作为细菌细胞,可列举出大肠杆菌(*E. coli*),例如 JM109、DH5 $\alpha$ 、HB101 等;其他已知枯草杆菌。将利用本发明的 DNA 转化得到的细胞在体外培养,并利用本领域技术人员通用的方法进行纯化,能够得到本发明的抗体。

[0118] 此外,本发明还提供具有包含编码本发明的抗体的核酸的载体的宿主生物。本发明的宿主生物对于重组型抗体的生产是有用的。作为本发明中的宿主生物,可列举出山羊等。例如,本发明的转基因山羊的制作可如下进行。即,通过在编码本质上分泌到乳汁中的蛋白(山羊 $\beta$ 酪蛋白等)的基因的内部通过框架插入抗体基因来构建融合基因。将包含插入有抗体基因的融合基因的 DNA 片段注入到山羊胚中,将该注入胚导入雌山羊。从由接受胚的山羊生的转基因山羊或其子孙产生的乳汁能够获得本发明的抗体。为了增加从转基因山羊产生的含有本发明抗体的乳汁量,也可以给转基因山羊适当使用激素(Ebert, K. M. et al., Bio/Technology(1994)12,699-702)。

[0119] 本发明提供一种动脉硬化的存在部位的成像剂,其含有本发明的与氧化 LDL/ $\beta_2$ GPI 复合物结合的抗体。另外,本发明还提供一种动脉硬化的存在部位的成像方法,其包含将本发明的与氧化 LDL/ $\beta_2$ GPI 复合物结合的抗体给予哺乳动物的工序。将本发明的成像剂给予哺乳动物以对动脉硬化的存在部位进行成像。作为哺乳动物,可列举出人、非人哺乳动物(例如小鼠、大鼠、仓鼠、兔、猪、猴等)。本发明的成像剂在动脉硬化的诊断方面是有用的。本发明的成像剂可用于体内用、体外用中的任何一种。

[0120] 动脉硬化的症状大致分为粥样斑块和钙化病变,利用本发明的成像剂,特别是动脉硬化粥样斑块部位可被染色。

[0121] 粥样斑块是动脉硬化的种病理状态,已知巨噬细胞借助于受体特异性地摄入含有大量胆固醇的氧化 LDL 并将其泡沫化,然后泡沫化的氧化 LDL 蓄积在血管内膜形成斑块(粥样斑块)。

[0122] 本发明的成像剂是通过将能够直接或间接地进行监测的成像用标记、探针结合于与氧化 LDL/ $\beta_2$ GPI 复合物结合的抗体、特别优选为 3H3 抗体而得到的。

[0123] 可以在将所述探针生物体内给予(例如静脉内给予)生物体后,使用 PET 或 SPECT、CCD 相机等图像检测装置对蓄积量和分布进行测定。

[0124] 另外,近年来,通过利用透射性射线源对物体进行扫描,并利用计算机对其数据进行处理,从而实现了构成物体的内部图像的技术计算机断层摄影(Computed Tomography:以下“CT”的表述也表示计算机断层摄影)在病状诊断、临床中的应用。

[0125] 这样的 CT 技术是通过得到正电子发射断层法 (PET)、单光子放射断层摄影 (SPECT) 或核磁共振成像法 (MRI) 等的截面像来得到物体的 (轮廓等的) 二维截面图像的技术, 这些检查技术常常不仅仅用于得到截面图像, 随着计算机图像处理技术的提高, 也常常将该二维图像整合而显示为三维图形, 从而成为确定三维的病变的位置、诊断、确定手术方案等的有力技术。

[0126] 例如单纯 CT 是不使用造影剂而进行 X 射线照射等摄影的技术, 即使不使用造影剂也能够充分地观察组织的浮肿、骨的形态异常、形态等, 另一方面, 造影 CT 是指将 X 射线吸收率高的造影剂等注射到血管内, 然后进行摄影的方法, 通过造影 CT 能够观察血管和血流丰富的组织的形状。此外, 关于所谓的新一代 CT, 例如开发了射线源螺旋状运动的螺旋 CT、将检测器自身沿对轴方向进行分割的多列检测器 CT (MDCT) (也称为多层螺旋 CT (MSCT)) 等, 这些均没有特别限制, 可以单独也可以并用地用于本发明的成像剂的检测。

[0127] 当成像用标记探针 (本发明的成像剂) 为 X 射线吸收率高的放射线核素时, 也可以单独使用 CT 作为检测器。

[0128] 作为标记物, 可列举出利用酶发光 (荧光素酶) 所产生的发光、发光低分子的标记物和使用荧光蛋白和荧光低分子的标记物、放射性核素等, 但并不限于这些。作为放射性核素, 可列举出  $^{51}\text{Cr}$ 、 $^{59}\text{Fe}$ 、 $^{57}\text{Co}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{75}\text{Se}$ 、 $^{81\text{m}}\text{Kr}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{133}\text{Xe}$ 、 $^{201}\text{Tl}$  等  $\gamma$  射线发射核素和  $^{11}\text{C}$ 、 $^{13}\text{N}$ 、 $^{15}\text{O}$ 、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{35\text{m}}\text{Cl}$ 、 $^{76}\text{Br}$ 、 $^{45}\text{Ti}$ 、 $^{48}\text{V}$ 、 $^{60}\text{Cu}$ 、 $^{61}\text{Cu}$ 、 $^{62}\text{Cu}$ 、 $^{66}\text{Ga}$ 、 $^{89}\text{Zr}$ 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{124}\text{I}$  等正电子发射核素等, 但并不限于这些。其中, 本领域技术人员清楚 “m” 是指核同质异能素。铟 -111、锝 -99m 或碘 -131 特别优选用于平面扫描或单光子发射断层摄影 (SPECT)。正电子放射标记的例子如氟 -19 可特别优选用于正电子放射断层法中。顺磁离子的例子如钆 (III) 或锰 (II) 特别优选用于核磁共振成像法 (MRI) 中。

[0129] 还可以使用利用荧光标记或酶 (荧光素酶) 所产生的发光系的标记物和使用荧光 (GFP、DsRed、Kusabira Orange 等荧光蛋白质、FITC 或 Cy5.5、Alexa Fluor 750 等荧光性低分子) 的标记物。

[0130] 当为酶发光 (荧光素酶) 所产生的发光的情况下, 底物需要另外给予。

[0131] 特别优选减轻动物本来的自身荧光所产生的影响的标记物, 更优选能够发出皮肤透射性高的信号的标记物。

[0132] 作为成像检测器, 可以使用核磁共振成像法 (MRI) PET 或 SPECT, 但在荧光标记探针的观察中, 从低介入性的观点出发特别优选的测定机器为 CCD 相机。

[0133] 由此, 优选发出可被 CCD 相机检测到的波长例如约 350 ~ 900nm 的光的标记。此外, 优选能够根据 CCD 相机所测定的测定动物的体表面的测定值测定生物体内的光源的强度的机械。在荧光标记的情况下, 可以是反射荧光图像、透射荧光图像中的任一个, 但优选捕捉两种图像。另外, 将荧光图像的多角度的面 (不管反射、透射) 重叠, 然后对射线源信息进行整合处理, 从而获得立体图像 (三维), 由此能够正确地构成三维的位置、分布, 因此优选。如此得到的三维图像还可以进一步与 CT 图像整合。

[0134] 当成像用标记探针为与 X 射线吸收率高的放射线核素结合而成时, 如上所述, 即使作为成像检测器的 CT 单独也可使用 (例如 PET、SPECT), 能够对动脉硬化病灶的位置、蓄积量和分布进行测定。

[0135] 另一方面, 在将所述成像用标记探针生物体内给予 (例如静脉内给予) 生物体后,

还可进行经标记的所述探针的 CT 观察、或与 CCD 并用进行观察。作为并用观察的例子,可以将经荧光标记的探针的 CCD 像与单纯 CT(和 / 或造影 CT) 的像重叠来使用。即,通过将利用单纯 CT 对骨、肺等脏器像进行提取(和 / 或造影 CT 对血管、组织像的提取)而得到的 CT 图像与心脏等主要的动脉疾病部分的利用 CCD 相机得到的荧光探针图像整合,从而能够更正确地把握其动脉硬化病灶的位置、蓄积量和分布、三维的组织、血管间的相对位置关系、动脉硬化病灶的三维(局部)图像。

[0136] 本发明的成像剂在抗体之外还可以导入医药上可容许的载体,并通过公知的方法制成制剂。例如以与水或除水以外的药学上可容许的液体形成的无菌性溶液或者悬浮液剂的注射剂形式非经口地使用。例如可以考虑通过与药理学上可容许的载体或介质、具体地、灭菌水或生理盐水、植物油、乳化剂、悬浮剂、表面活性剂、稳定剂、香味剂、赋形剂(excipients)、赋形剂(vehicle)、防腐剂、粘合剂等适当组合,并以通常认可的制药实践所要求的单位用量形态混和来制成制剂。这些制剂的有效分量按照获得所指示的范围的适当的容量来进行设定。

[0137] 用于注射的无菌组合物可以使用注射用蒸馏水等 vehicle 按照通常的制剂实践来配制。

[0138] 作为注射用的水溶液,可列举出例如含有生理盐水、葡萄糖或其他的助剂的等渗液,例如 D-山梨糖醇、D-甘露糖、D-甘露醇、氯化钠,适当的溶解助剂,可以将例如醇具体地乙醇、多元醇例如丙二醇、聚乙二醇、非离子性表面活性剂例如 Polysorbate 80(TM)、HCO-50 并用。

[0139] 作为油性液体,可列举出芝麻油、大豆油,作为溶解助剂,可以将苯甲酸苄酯、苄醇并用。另外,还可以与缓冲剂、例如磷酸盐缓冲液、醋酸钠缓冲液,镇痛剂、例如盐酸普鲁卡因,稳定剂、例如苄醇、苯酚、抗氧化剂配合。所制备的注射液通常填充到适当的安瓿中。

[0140] 给予方式优选为非经口给予,具体地可列举出注射剂型、经鼻给予剂型、经肺给予剂型、经皮给予剂型等。作为注射剂型的例子,例如可以通过静脉内注射、肌肉注射、腹腔内注射、皮下注射等全身或局部地给予。

[0141] 另外,可以根据患者的年龄、症状选择适当的给予方法。作为本发明的成像剂的给予量,例如可以在每次每 1kg 体重 0.0001mg ~ 1000mg 的范围内选择。或者,可以在例如每位对象 0.001 ~ 100000mg/body 的范围内选择给予量,对这些数值没有必要进行限制。

[0142] 给予量、给予方法根据对象的体重和年龄、症状、每 mg 抗体的荧光标记的强度 / 检测机械的检测灵敏度等的不同而发生变动,本领域技术人员可适当地进行选择。

[0143] 另外,本发明还提供一种动脉硬化的存在部位的成像用试剂盒,其包含本发明的与氧化 LDL/ $\beta_2$ GPI 复合物结合的抗体。本发明的试剂盒的特征在于,通过给予对象来对动脉硬化的存在部位进行成像。上述试剂盒除了本发明的抗体外,还包含例如成像剂给予用的注射(点滴)器具、抑制非特异性吸附的助剂(例如白蛋白等)等,但并不限于这些。

[0144] 另外,上述试剂盒还可以包含成像中使用的指示书、适当的容器、对照试剂等通常的试剂盒中所包含的物品。

[0145] 本发明提供一种动脉硬化治疗剂的候补化合物的筛选方法,其包含以下所记载的工序。

[0146] (a) 将本发明的与氧化 LDL/ $\beta_2$ GPI 复合物结合的抗体和候补化合物给予动脉硬化

患病非人动物模型的工序,例如将候补化合物给予已给予了本发明的与氧化 LDL/ $\beta_2$ GPI 复合物结合的抗体的动脉硬化患病非人动物模型的工序;

[0147] (b) 对给予了所述抗体和所述候补化合物的动脉硬化患病非人动物模型和给予了所述抗体而未给予所述候补化合物的动脉硬化患病非人动物模型的动脉硬化灶进行成像的工序;

[0148] (c) 对给予了所述抗体和所述候补化合物的动脉硬化患病非人动物模型和给予了所述抗体而未给予所述候补化合物的动脉硬化患病非人动物模型的动脉硬化灶(例如动脉硬化灶的大小或存在部位)进行比较的工序;和

[0149] (d) 从给予了所述抗体和所述候补化合物的动脉硬化患病非人动物模型中选择与给予了所述抗体而未给予所述候补化合物的动脉硬化患病非人动物模型相比动脉硬化灶减少或消失的候补化合物的工序。

[0150] 各工序使用上述的技术或公知的技术来实施。

[0151] 关于本发明的筛选方法可利用的候补化合物,可列举出纯化蛋白质(包括抗体)、基因库的表达产物、合成多肽的文库、DNA 或 RNA 库(包括适体、siRNA 等功能性核酸)、细胞提取液、细胞培养上清液和合成低分子化合物的文库等,但并不限制于这些。

[0152] 作为本发明的筛选方法可利用的患病非人动物模型,可列举出小鼠、仓鼠、大鼠、兔、猪、猴等,但并不限制于这些。

[0153] 例如,作为动脉硬化患病小鼠模型,有过量表达基因的转基因小鼠、和利用导致某基因缺损的基因打靶获得的基因敲除小鼠。作为动脉硬化模型,例如有构成作为不良胆固醇已知的 LDL 的蛋白(载脂蛋白 E)的 apoE 缺失(apoE<sup>-/-</sup>)模型、LDL 受体缺失(LDLR<sup>-/-</sup>)模型、人型 apoB 导入模型、显性突变 apoE 导入模型。此外,2 型糖尿病小鼠模型(KKAy)、或者小鼠中的更容易患动脉硬化的 C57BL6 系统,该系统有时仅通过高胆固醇饮食即可观察到动脉硬化灶,也可以使用高胆固醇饮食等、其饲料制作的动脉硬化小鼠模型。

[0154] 当给予兔高胆固醇饮食约 2 个半月时有时即可观察到动脉硬化灶,此外,作为 LDL 受体缺损的动脉硬化患病兔模型,已知有 WHHL 兔等。

[0155] 猪也可以通过 apoB 的 LDL 受体结合部分的氨基酸序列异常来获得易患动脉硬化的模型,本领域技术人员可参照血栓症・动脉硬化モデル動物作製法 編著 鈴木 宏治(株式会社 金芳堂)等制作动脉硬化模型动物来用于本发明。

[0156] 通过本发明的筛选方法选择的使动脉硬化灶减少或消失的化合物可成为动脉硬化治疗剂的候补化合物。即,本发明提供一种动脉硬化治疗剂,其含有通过本发明的筛选方法选择的物质作为有效成分。此外,本发明涉及通过本发明的筛选方法选择的化合物在制造动脉硬化治疗剂中的用途。当将通过本发明的筛选方法分离的物质用作治疗剂时,可以利用公知的制剂学制造方法制成制剂后使用。例如,与药理学上可容许的载体或介质(生理盐水、植物油、悬浮剂、表面活性剂、稳定剂等)一起给予患者。给予方法根据物质的性质可经皮、鼻腔内、经支气管、肌内、静脉内或经口地进行。给予量根据患者的年龄、体重、症状、给予方法等的不同而发生变动,本领域技术人员可适当地选择适当的给予量。

[0157] 本说明书中公开的抗体的碱基序列和氨基酸序列按照以下的序列号记载于序列表中。

[0158] <3H3 抗体>

[0159] 序列号 1 :重链可变区的氨基酸序列

[0160] 序列号 2 :重链 CDR1 的氨基酸序列

[0161] 序列号 3 :重链 CDR2 的氨基酸序列

[0162] 序列号 4 :重链 CDR3 的氨基酸序列

[0163] 序列号 5 :重链可变区的碱基序列

[0164] 序列号 6 :轻链可变区的氨基酸序列

[0165] 序列号 7 :轻链 CDR1 的氨基酸序列

[0166] 序列号 8 :轻链 CDR2 的氨基酸序列

[0167] 序列号 9 :轻链 CDR3 的氨基酸序列

[0168] 序列号 10 :轻链可变区的碱基序列

[0169] 另外,本说明书中引用的现有技术文献全部引入本说明书中作为参照。

[0170] 实施例

[0171] 以下,通过实施例详细地对本发明进行说明,但本发明的范围并不限定于这些实施例中记载的方式。

[0172] [ 实施例 1]

[0173] 氧化 LDL/ $\beta_2$ GPI 复合物的制备

[0174] 将 600  $\mu$ g 的人 LDL(Organon Teknika Corp, Durham, NC) 在含有 5  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub> 的 PBS(2mL) 中在 37°C 下氧化处理 12 小时。通过添加 1mM 的 EDTA 使氧化停止。

[0175] 将上述氧化 LDL 0.2mg/mL 与人  $\beta_2$ GPI(从 Affinity Biologicals 购得) 一起以终浓度 0.2mg/mL 在 37°C 条件下孵育 16 小时,得到氧化 LDL/ $\beta_2$ GPI 复合物。

[0176] [ 实施例 2]

[0177] 抗原免疫

[0178] 将人氧化 LDL/ $\beta_2$ GPI 复合物纯化蛋白质与同量的完全佐剂(SIGMA; F5881) 混合制成乳液,向 BALB/c 小鼠(雌性)的足跖(foot-pad) 以 5~50  $\mu$ g/ 只每 3~7 天免疫数次。在最终免疫的 3~5 天后从小鼠摘出腹股沟淋巴结,与小鼠骨髓瘤细胞 P3U1(P3-X63Ag8U1) 进行细胞融合。

[0179] [ 实施例 3]

[0180] 细胞融合和单克隆抗体产生细胞的选择和获得

[0181] 细胞融合以如下所示的常用方法为基础进行。所有的培养基中的胎牛血清(FBS) 使用通过在 56°C 下进行 30min 的保温处理而灭活的胎牛血清。P3U1 通过在 RPMI1640-10% FBS(含有青霉素、链霉素) 中培养来准备。

[0182] 将摘出的小鼠的腹股沟淋巴结细胞与 P3U1 以 10 : 1 ~ 2 : 1 的比例混合,离心。一边将 50% 聚乙二醇 4000(Merck 公司、气体层析法用 PEG4000、Catalog No. 9727) 作为融合促进剂缓缓地加入沉淀的细胞中,一边温和地混合,进行细胞融合。进而,一边缓缓地加入 RPMI1640,一边温和地混合,然后进行离心。将沉淀的融合细胞用含有 15% FCS 的 HAT 培养基(RPMI1640、HAT-supplement(Invitrogen ;11067-030)、青霉素、链霉素) 适当稀释,以 200  $\mu$ L/ 孔播种到 96 孔微板中。

[0183] 将融合细胞在 CO<sub>2</sub> 培养箱(5% CO<sub>2</sub>、37°C) 中培养,在充分形成集落后,取样培养上清液以进行筛选。

[0184] 筛选为挑选在致敏了免疫中使用的人氧化 LDL/ $\beta_2$ GPI 复合物抗原的 96 孔平板的 ELISA( 实施例 4 中记载) 中为阳性的化合物。用含有 15% FCS 的 HT 培养基 (RPMI1640、HT-supplement(Invitrogen ;21060-017)、青霉素、链霉素) 将它们放大培养后, 利用有限稀释 (limiting dilution) 法形成单克隆。由此, 以抗人氧化 LDL/ $\beta_2$ GPI 复合物抗体为免疫原, 获得 7 种包括克隆 3H3 的杂交瘤克隆。

[0185] [ 实施例 4]

[0186] 对人氧化 LDL/ $\beta_2$ GPI 复合物和  $\beta_2$ GPI 的反应性 (ELISA)

[0187] 用于检测抗人氧化 LDL/ $\beta_2$ GPI 复合物抗体的 ELISA 按照以下的方法进行。即, 将  $1 \mu\text{g/mL}$  ( $50 \mu\text{L/孔}$ ) 氧化 LDL/ $\beta_2$ GPI 加到微板 (Nunc 公司 Maxisorp) 中, 在  $4^\circ\text{C}$  下孵育过夜, 从而使其吸附, 将该平板用 1% BSA 封闭。加入用检测缓冲液 (1% BSA、0.15M NaCl/20mM HEPES (pH 7.4)) 稀释至各横轴中记载的抗体浓度的样品  $50 \mu\text{L}$ , 在孔中孵育 30 分钟。弃掉液体, 用 0.1% Tween20/PBS 洗涤后, 接着将 2000 倍稀释的 HRP 标记的抗小鼠 IgG (MBL code 330)  $50 \mu\text{L}$  添加到平板中, 在孔中孵育 30 分钟。弃掉液体, 用 0.1% Tween20/PBS 洗涤, 然后添加底物 TMB (MOSS 公司 ;TMBZ)  $50 \mu\text{L}$ , 在室温下孵育 3 分钟, 添加 0.18M 硫酸  $50 \mu\text{L}$ , 使反应停止, 然后在吸光度 450nm 下进行检测 ( 图 1A)。

[0188] 用于检测与  $\beta_2$ GPI 的反应性的 ELISA 按照以下的方法进行。即, 将  $1 \mu\text{g/mL}$  ( $50 \mu\text{L/孔}$ )  $\beta_2$ GPI 加入到微板 (Nunc 公司 Maxisorp) 中, 在  $4^\circ\text{C}$  下孵育过夜, 从而使其吸附, 将该平板用 1% BSA 封闭。加入用检测缓冲液 (1% BSA、0.15M NaCl/20mM HEPES (pH 7.4)) 稀释至各横轴中记载的抗体浓度的样品  $50 \mu\text{L}$ , 在孔中孵育 30 分钟。弃掉液体, 用 0.1% Tween20/PBS 洗涤后, 接着将 2000 倍稀释的 HRP 标记的抗小鼠 IgG (MBLcode 330)  $50 \mu\text{L}$  添加到平板中, 在孔中孵育 30 分钟。弃掉液体, 用 0.1% Tween20/PBS 洗涤, 然后添加底物 TMB (MOSS 公司 ;TMBZ)  $50 \mu\text{L}$ , 在室温下孵育 3 分钟, 添加 0.18M 硫酸  $50 \mu\text{L}$  使反应停止, 然后在吸光度 450nm 下进行检测 ( 图 1B)。

[0189] 进而, 将  $\beta_2$ GPI 改变浓度至  $\sim 50 \mu\text{g/mL}$  ( $50 \mu\text{L/孔}$ ) 加入微板 (nunc 公司 Maxisorp) 中, 在  $4^\circ\text{C}$  下孵育过夜, 从而使其吸附, 同样地对抗体反应性进行试验 ( 未图示)。

[0190] 其结果是对固定化氧化 LDL/ $\beta_2$ GPI 复合物显示  $2H6 > 3H3, 2A12, 3D4 > 4C12, 1H4$  的反应性。另外, 对固定化  $\beta_2$ GPI 显示  $2H6, 3D4 > 2A12, 4F10$  的反应性, 对 3H3、4C12 不显示反应性 ( 图 1A、B)。

[0191] 但是, 当提高对微量滴定板的致敏浓度时, 3H3 等也显示反应性 ( 未图示)。

[0192] 作为确认抗体的反应性的方法, 用游离的抗原施加抑制来进行试验, 进一步可见各抗体的特异性。

[0193] [ 实施例 5]

[0194] 对溶液中的游离  $\beta_2$ GPI、氧化 LDL/ $\beta_2$ GPI 复合物的竞争反应性 (ELISA)

[0195] 在对固定化人氧化 LDL/ $\beta_2$ GPI 复合物和  $\beta_2$ GPI 的反应性 (ELISA) 试验中, 与各抗体反应时, 通过在氧化 LDL/ $\beta_2$ GPI 复合物或  $\beta_2$ GPI 共存下进行反应来进行对固定化抗原的抑制反应 ( 图 2 显示测定系统示意图)。

[0196] 即, 将  $\beta_2$ GPI  $1 \mu\text{g/mL}$  ( $50 \mu\text{L/孔}$ ) 加入到微板 (Nunc 公司 ;Maxisorp) 中, 在  $4^\circ\text{C}$  下孵育过夜, 从而使其吸附, 将该平板用 1% BSA 封闭。加入用检测缓冲液 (1% BSA、0.15M NaCl/20mM HEPES (pH 7.4)) 稀释到适当浓度的抗体样品  $25 \mu\text{L}$ 、和将作为竞争性抗原的

氧化 LDL/ $\beta_2$ GPI 复合物或  $\beta_2$ GPI 用检测缓冲液稀释到各横轴中记载的抗原浓度的样品 25  $\mu$ L, 在孔中孵育 30 分钟。弃掉液体, 用 0.1% Tween20/PBS 洗涤后, 接着将 2000 倍稀释的 HRP 标记的抗小鼠 IgG (MBL ;Code 330) 50  $\mu$ L 添加到平板中, 在孔中孵育 30 分钟。弃掉液体, 用 0.1% Tween20/PBS 洗涤, 然后添加底物 TMB (MOSS 公司 ;TMBZ) 50  $\mu$ L, 在室温下孵育 3 分钟, 添加 0.18M 硫酸 50  $\mu$ L 使反应停止, 然后在吸光度 450nm 下进行检测。

[0197] 其结果, 当 ELISA 中混在的游离抗原为氧化 LDL/ $\beta_2$ GPI 复合物的情况下, 3H3、4C12、2A12 与固定化的氧化 LDL/ $\beta_2$ GPI 的结合抑制显著,  $\beta_2$ GPI 没有抑制结合。另一方面, 游离抗原为氧化 LDL/ $\beta_2$ GPI 复合物, 2H6 的结合也发生抑制, 另外混在有  $\beta_2$ GPI 也可见些许抑制。在 3D4 中, 与游离的抗原为氧化 LDL/ $\beta_2$ GPI 复合物相比,  $\beta_2$ GPI 产生的抑制可见为更高的抑制 (图 3)。

[0198] 根据这些结果, 将各抗体的反应性整理于表 1 中 (实施例 7 所示)。3H3 虽显示与 4C12 近似的反应性, 但不是相同的反应性, 它们具有不同的特异性。

[0199] [ 实施例 6]

[0200] 抗体的动脉硬化灶免疫组织染色

[0201] 用普通饲料喂养 (Oriental 酵母 NMF) apoE<sup>-/-</sup>小鼠和 LDLR<sup>-/-</sup>小鼠 (从 Jackson Lab 获得, 用冈山大学内动物实验设施维持系统) 到 8 周龄, 之后用高脂肪饮食 (普通饲料中配合胆固醇 1%、胆酸 1%、无盐黄油 15%) 喂养 4~6 个月, 胸部或腹部主动脉出现动脉硬化灶 (斑块), 出现肥厚、粥样斑块。然后, 将 8 月龄的这些小鼠宰杀, 这次特别制作胸部主动脉、主动脉的根部和主动脉瓣的冷冻切片, 制成标本进行观察。

[0202] 在制备冷冻切片后, 用多聚甲醛固定以用于荧光免疫染色抗体法的实验中。

[0203] 单克隆抗体的 Cy5.5 标记

[0204] 将在 0.1M 碳酸缓冲液 (pH9.3)、在 4℃ 下透析过夜的各种单克隆抗体 (1mg/ml) 加入到 Fluorolink Cy5.5 monofunctional dye (1 试管) 中, 在室温下使其反应 30 分钟进行标记。反应后, 通过 Sephadex G-25 柱得到 Cy5.5 标记抗体。

[0205] 使用了冷冻切片的免疫荧光染色

[0206] 使各种单克隆抗体与用 1% 多聚甲醛固定 5 分钟得到的切片在 4℃ 下反应过夜。洗涤后, 使 FITC 标记抗小鼠 IgG 或 IgM 抗体 (2 次抗体) 在室温下反应 1 小时。在该 2 次抗体反应时添加 DAPI 和若丹明鬼笔环肽 (Rhodamine Phalloidin) 染色。然后用荧光显微镜观察、摄影。

[0207] 免疫组织染色

[0208] 结果, 在对用普通饲料喂养的 C57BL6 系统的小鼠使用 3H3 抗体、Mac3 的免疫荧光染色中, 泡沫状巨噬细胞聚集而成的粥样斑块被染色。利用 3H3 同样的部位也被染色 (图 4)。

[0209] 将动脉硬化多发小鼠模型 (高脂肪饮食喂养的 apoE<sup>-/-</sup>) 的主动脉瓣的免疫荧光染色与用识别氧化 LDL/ $\beta_2$ GPI 复合物的其他抗体获得的免疫荧光染色进行比较。粥样斑块的染色阳性例子仅为 3H3 和抗体 A (图 5)。

[0210] 用各种特异性的单克隆抗体能够对动脉硬化灶的标记了 Cy5.5、Alexa 等的粥样斑块进行特异性的免疫染色。

[0211] [ 实施例 7]

[0212] 成像

[0213] 体内成像：

[0214] 利用 Xenogen 公司的 IVIS(注册商标) 成像系统、IVIS200 进行成像(激发：640nm, 发射：720nm.)。

[0215] 实验 1：对与实施例 6 同样地制作的高脂肪饮食喂养 apoE<sup>-/-</sup> 小鼠从尾静脉以 0.15ml/只给予 Cy5.5 标记单克隆抗体 (0.25mg/ml)。给予生理盐水 (PBS、对照)、Cy5.5 标记抗体 A、Cy5.5 标记 3H3 抗体这 3 种。给予 24 小时后将胸部皮肤剥离, 在存活状态下对全身进行摄影 (图 7)。

[0216] 实验 2：进而在胸部主动脉连接的状态下摘出心脏进行摄影 (图 7)。在 3H3 给予中主动脉根部强烈染色。在抗体 A 中也有些许染色, 但荧光强度没有 3H3 强。在 2A12 中完全没有染色。

[0217] 测定主动脉根部单位规定面积的荧光强度。将给予了 PBS 的对照小鼠的荧光记为 1.0。在 3H3 给予中, 可见为对照的 3 倍左右的荧光。在其他抗体给予中, 荧光强度未见大的变化 (图 10)。

[0218] 将这次的抗体组的特异性试验整理于表 1。

[0219] [表 1]

[0220] 抗氧化 LDL/ $\beta_2$ GPI 复合物的特异性抗体

[0221]

	与固定化抗原的结合		竞争抑制(固定化氧化 LDL/ $\beta_2$ GPI)		免疫染色
	$\beta_2$ GPI	氧化 LDL/ $\beta_2$ GPI	$\beta_2$ GPI 氧化	LDL/ $\beta_2$ GPI	
1H4	—	+	ND	ND	—
2A12	+	++	—	++	—
2H6	++	+++	++	++	—
3D4	++	++	++	—	—
3H3	—	++	—	++	+++
4C12	—	+	—	++	—
4F10	+	—	ND	ND	—

[0222] 在固定化氧化 LDL/ $\beta_2$ GPI 复合物或固定化  $\beta_2$ GPI ELISA 液体中可见与竞争抑制抗原  $\beta_2$ GPI 的抑制性, 结果是, 在固定化氧化 LDL/ $\beta_2$ GPI 复合物的情况下 :3D4 > 2H6 > 4C12 > 3H3, 在固定化  $\beta_2$ GPI 的情况下 :2H6 > 3D4 (4C12、3H3 只对固定化  $\beta_2$ GPI 微弱地反应)。3H3 对液体中的游离氧化 LDL/ $\beta_2$ GPI 复合物 (非修饰) 的特异性高。

[0223] [实施例 8]

[0224] 识别氧化 LDL/ $\beta_2$ GPI 复合物的小鼠单克隆抗体的可变区基因的分析

[0225] 分析的单克隆抗体为 4 种克隆 (3H3、4C12、2H6、3D4)。

[0226] 关于这 4 种克隆的抗体亚群, 3H3 和 4C12 为 IgG2b、2H6 和 3D4 为 IgG1。

[0227] (L 链可变区基因的分析)

[0228] 将产生 4 种 (3H3、4C12、2H6、3D4) 单克隆抗体的杂交瘤细胞分别在 RPMI1640+10% FCS 培养基中培养。使用 QuickPrep micro mRNA 纯化试剂盒 (Amersham Biosciences, code 27-9255-01) 从该杂交瘤细胞获得 mRNA。使用 First-Strand cDNA 合成试剂盒 (Amersham Biosciences, code 27-9261-01) 将该 mRNA 制成 cDNA。以该 cDNA 为模板, 利用 PCR 法使基因扩增, 利用以下所示的 11 种模式的引物的组合进行 PCR 反应。这

里, MKV1 ~ MKV11 的引物序列通过分析大多单克隆抗体的信号序列来设定, 其中, 该 11 种引物序列包括了基本所有的单克隆抗体的 L 链信号的序列。通过该 11 种 MKV 引物和与小鼠 L 链恒定区序列相当的 MKC 引物间的 11 模式的 PCR 反应中的至少 1 种, 扩增目标 L 链可变区。

[0229] PCR 反应条件如下。

[0230]	来自小鼠杂交瘤的 cDNA	4 $\mu$ L
[0231]	2.5mM dNTPs	4 $\mu$ L
[0232]	MKV1 ~ MKV11 引物 (20 $\mu$ M) 的 11 种中的一种	2.5 $\mu$ L
[0233]	MKC 引物 (20 $\mu$ M)	2.5 $\mu$ L
[0234]	DMSO	2.5 $\mu$ L
[0235]	$\times 10$ pfu 聚合酶缓冲液	5 $\mu$ L
[0236]	pfu 聚合酶	1 $\mu$ L
[0237]	灭菌水	285 $\mu$ L
[0238]	总计	50 $\mu$ L
[0239]	94 $^{\circ}$ C	2min

[0240] 94 $^{\circ}$ C 1min 55 $^{\circ}$ C 2min 72 $^{\circ}$ C 2min(30 个循环)

[0241] 72 $^{\circ}$ C 4min

[0242] 4 $^{\circ}$ C 无限制时间

[0243] 引物的 DNA 序列参照以下序列。

[0244] MKV1 引物 :ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTG (序列号 :11)

[0245] MKV2 引物 :ATGGAGWCAGACACACTCCTGYTATGGGTG (序列号 :12)

[0246] MKV3 引物 :ATGAGTGTGCTCACTCAGGTCCTGGSGTTG (序列号 :13)

[0247] MKV4 引物 :ATGAGGRCCCCTGCTCAGWTTYTTGGMWTCTTG (序列号 :14)

[0248] MKV5 引物 :ATGGATTTWCAGGTGCAGATTWTCAGCTTC (序列号 :15)

[0249] MKV6 引物 :ATGAGGTKCYTYGYSAGYTYCTGRGG (序列号 :16)

[0250] MKV7 引物 :ATGGGCWTCAGATGGAGTCACAKWYYCWGG (序列号 :17)

[0251] MKV8 引物 :ATGTGGGGAYCTKTTYCMMTTTTCAATTG (序列号 :18)

[0252] MKV9 引物 :ATGGTRTCCWCASCTCAGTTCCTTG (序列号 :19)

[0253] MKV10 引物 :ATGTATATATGTTTGTGTCTATTTCT (序列号 :20)

[0254] MKV11 引物 :ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCC (序列号 :21)

[0255] MKC 引物 :ACTGGATGGTGGGAAGATGG (序列号 :22)

[0256] (M = A 或 C, R = A 或 G, W = A 或 T, S = C 或 G, Y = C 或 T, K = G 或 T)

[0257] 通过 PCR 反应 L 链可变区扩增得到的 PCR 引物的组合为下述组合。

[0258] 3H3 :MKV7-MKC

[0259] 4C12 :MKV7-MKC

[0260] 2H6 :MKV5-MKC

[0261] 3D4 :MKV4-MKC

[0262] 将 PCR 扩增得到的 L 链可变区基因插入 pCR2.1 载体 (Invitogen) 中。

[0263] 插入有 L 链可变区基因的 PCR2.1 载体的 DNA 碱基序列用 DNA 测序仪 (Applied

Biosystems 制 :3130 Genetic Analyzer) 进行测序。

[0264] (H 链可变区基因的分析)

[0265] 将产生 4 种 (3H3、4C12、2H6、3D4) 单克隆抗体的杂交瘤细胞在 RPMI1640+10% FCS 培养基中分别培养。使用 QuickPrep micro mRNA 纯化试剂盒 (Amersham Biosciences, code 27-9255-01) 从该杂交瘤细胞获得 mRNA。使用 First-Strand cDNA 合成试剂盒 (Amersham Biosciences, code 27-9261-01) 将该 mRNA 制成 cDNA。以该 cDNA 为模板, 利用 PCR 法使 H 链可变区基因扩增, 利用以下所示的 12 种模式的引物的组合进行 PCR 反应。这里, MHV1 ~ MHV12 的引物序列通过分析多个单克隆抗体的信号序列来设定, 其中, 该 12 种引物序列包括了基本所有的单克隆抗体的 H 链信号的序列。通过该 12 种 MHV 引物和小鼠 H 链恒定区序列相当的 MHC2b 或 MHC1 引物间的 12 模式的 PCR 反应中的至少 1 种, 扩增目标 H 链可变区。这里, MHC2b 引物具有与小鼠 IgG2b 的 H 链恒定区相当的序列, MHC1 引物为与小鼠 IgG1 的 H 链恒定区相当的序列。因此, 作为 IgG2b 亚群的 3H3 克隆和 4C12 克隆的 PCR 扩增使用 MHC2b 引物、作为 IgG1 亚群的 2H6 克隆和 3D4 克隆的 PCR 扩增使用 MHC1 引物。

[0266] PCR 反应条件如下。

[0267]	来自小鼠杂交瘤的 cDNA	4 $\mu$ L
[0268]	2.5mM dNTPs	4 $\mu$ L
[0269]	MHV1 ~ MHV12 引物 (20 $\mu$ M) 的 12 种中的一种	2.5 $\mu$ L
[0270]	MHC2b 或 MHC1 引物 (20 $\mu$ M)	2.5 $\mu$ L
[0271]	DMSO	2.5 $\mu$ L
[0272]	$\times 10$ pfu 聚合酶缓冲液	5 $\mu$ L
[0273]	pfu 聚合酶	1 $\mu$ L
[0274]	灭菌水	285 $\mu$ L
[0275]	总计	50 $\mu$ L

[0276] 94°C 2min

[0277] 94°C 1min 55°C 2min 72°C 2min (30 个循环)

[0278] 72°C 4min

[0279] 4°C 无限制时间

[0280] 引物的 DNA 序列参照以下序列。

[0281] MHV1 引物 :ATGAAATGCAGCTGGGGCATSTTCTTC (序列号 :23)

[0282] MHV2 引物 :ATGGGATGGAGCTRTATCATSYTCTT (序列号 :24)

[0283] MHV3 引物 :ATGAAGWTGTGGTTAACTGGGTTTTT (序列号 :25)

[0284] MHV4 引物 :ATGRACCTTGGGYTCAGCTTGRTT (序列号 :26)

[0285] MHV5 引物 :ATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTTCTT (序列号 :27)

[0286] MHV6 引物 :ATGGCTGTCYTRGSGCTRCTTCTGC (序列号 :28)

[0287] MHV7 引物 :ATGGRATGGAGCKGGRTCTTTMTCTT (序列号 :29)

[0288] MHV8 引物 :ATGAGAGTGCTGATTCTTTGTG (序列号 :30)

[0289] MHV9 引物 :ATGGMTTGGGTGTGGAMCTTGCTATTCCTG (序列号 :31)

[0290] MHV10 引物 :ATGGCAGACTTACATTCTCATTCTG (序列号 :32)

[0291] MHV11 引物 :ATGGATTTGGGCTGATTTTTTTTATTG (序列号 :33)

- [0292] MHV12 引物 :ATGATGGTGTAAAGTCTTCTGTACCTG ( 序列号 :34)
- [0293] MHCG2b 引物 :CAGTGGATAGACTGATGGGGG ( 序列号 :35)
- [0294] MHCG1 引物 :CAGTGGATAGACAGATGGGGG ( 序列号 :36)
- [0295] (M = A 或 C, R = A 或 G, W = A 或 T, S = C 或 G, Y = C 或 T, K = G 或 T)
- [0296] 通过 PCR 反应 H 链可变区扩增得到的 PCR 引物的组合为以下的组合。
- [0297] 3H3 :MHV4-MHCG2b
- [0298] 4C12 :MKV4-MHCG2b
- [0299] 2H6 :MHV4-MHCG1
- [0300] 3D4 :MHV1-MHCG1
- [0301] 将 PCR 扩增得到的 H 链可变区基因插入 pCR2.1 载体 (Invitogen) 中。
- [0302] 插入有 H 链可变区基因的 PCR2.1 载体的 DNA 碱基序列用 DNA 测序仪 (Applied Biosystems 制 :3130 Genetic Analyzer) 进行测序。
- [0303] 其结果清楚了可用于本发明的 3H3 的氨基酸序列、CDR ( 图 11)。
- [0304] 本说明书中公开的抗体的碱基序列和氨基酸序列按照下述序列号记载于序列表中。
- [0305] <3H3 抗体 >
- [0306] 序列号 1 :重链可变区的氨基酸序列
- [0307] 序列号 2 :重链 CDR1 的氨基酸序列
- [0308] 序列号 3 :重链 CDR2 的氨基酸序列
- [0309] 序列号 4 :重链 CDR3 的氨基酸序列
- [0310] 序列号 5 :重链可变区的碱基序列
- [0311] 序列号 6 :轻链可变区的氨基酸序列
- [0312] 序列号 7 :轻链 CDR1 的氨基酸序列
- [0313] 序列号 8 :轻链 CDR2 的氨基酸序列
- [0314] 序列号 9 :轻链 CDR3 的氨基酸序列
- [0315] 序列号 10 :轻链可变区的碱基序列
- [0316] [ 实施例 9]
- [0317] 对使用了 IVIS 200 和三维 CT 的图像分析的研究
- [0318] 进行通过将计算机断层摄影 (CT) 图像整合得到动脉硬化病灶的三维 ( 局部 ) 图像的试验。
- [0319] 体内荧光成像 :
- [0320] 使用 IVIS 200 成像系统 (Xenogen 公司) 进行荧光成像 ( 在 Cy5.5 的情况下, 激发 :640nm、发射 :720nm ; 在 Alexa Fluor 750 的情况下, 激发 :745nm、发射 :800nm)。将 Cy5.5 标记 3H3 抗体 (IgG) 以 0.25mg/ml、0.15ml/ 只、或将 Alexa Fluor750 标记 3H3 抗体以 1.0 ~ 1.5mg/ml、0.15ml/ 只从尾静脉给予高脂肪饮食喂养的 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠, 2 ~ 24 小时后, 用 IVIS 200 在吸入麻醉下对体内荧光进行观察、摄影。由于 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠的黑色体毛吸收荧光, 因此剃掉体毛进行观察。开始利用反射光进行荧光观察, 然后利用透射光进行荧光观察, 制作小鼠的三维 (3D) 图像, 将光源信息融合 ( 图 9A : 整合前的 IVIS 所获得的三维图像)。图中的红点部分为标记 3H3 的荧光信号, 浓度越浓表示荧光强度越强, 即成像剂越

局部分布。

[0321] 离体成像：

[0322] 3D-CT 分析结束后对小鼠实施安乐死,用 PBS 10ml 进行心脏灌流,摘出心脏和主动脉,利用 IVIS 200 得到反射荧光图像。

[0323] CT 成像：

[0324] 利用 eXplore Locus CT System(GE Healthcare) 进行 CT 成像。使用与利用 IVIS200 进行成像相同的小鼠个体,在吸入麻醉下进行 X 射线照射,得到 CT 图像。

[0325] 荧光与 CT 的图像整合：

[0326] 将利用 IVIS 200 检测的荧光成像图像与用 CT 摄影得到的图像用通用的 3D 可视化软件 (Amira、Mercury Computer Systems) 进行整合 (图 9B:整合后的三维 CT 图像)。

[0327] 另外,示意地示出了一个流程图 (图 8)。

[0328] (A) 利用 IVIS 200 获得的使用了特异抗体的荧光成像 (反射)。

[0329] (B) 整合前的利用 IVIS 200 获得的使用了特异抗体的荧光成像 (透射光;左) 和 CT 像 (中) 整合图 (右):荧光成像 (透射光;左) 中红点的部分的浓度越浓、荧光强度越强,即显示为成像剂越局部地集中的部分 (3H3 结合反应性高的部位)。

[0330] (C) 利用 IVIS 获得的荧光信号与三维 CT 的整合图像:为在计算机的假想空间上制作三维像的动画 (三维图形的动画) 并从多角度确认其标记的位置的照片。

[0331] 由于可见光在生物体内被吸收,因此为了进行体内成像,使用难以被生物体吸收的波长的近红外的荧光标记。本实验中通过将用 Cy5.5 或 AlexaFluor 750 标记的抗体从尾静脉给予小鼠,然后利用 IVIS200 测定荧光,对反射和透射的荧光测定条件进行研究。在利用 Cy5.5 标记抗体的体内成像的反射荧光图像中,观察到患有动脉硬化的 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠的主动脉瓣和胸部主动脉的强的信号。此外,通过离体成像和离体荧光显微镜观察,可见静脉给予的荧光标记抗体局部化到动脉硬化灶的局部分布。但是,在使用 Cy5.5 标记抗体的情况下,透射荧光的信号弱,难以确定立体图像 (三维) 中的荧光位置。另一方面,在 Alexa Fluor 750 标记抗体中,静脉内给予 2 小时后在反射荧光图像、透射荧光图像二者中均获得强的特异性信号,当尝试构建为立体图像时,可见胸的内部有强的荧光信号 (图 8A、B 中的左图)。接着对同一小鼠进行 CT 摄影,得到利用 CT 图像提取骨和肺的脏器而获得的图像 (将图 8B 中和利用 IVIS200 构建的荧光成像图像利用 Amira 进行整合,得到整合 3D 图像 (图 8B 右),结果观察到在心脏和其附近的位置有荧光信号。图中的红点部分的浓度越浓、荧光强度越强,即显示成像剂局部分布。显示了 CT (中央) 与 3D-CT 整合的图像 (图 8B 右)。在计算机的假想空间上制作三维像的动画 (三维图形的动画),从多角度确认了其标记的位置 (图 8C)。

[0332] 从上述实验的结果可观察到,在利用荧光标记 3H3 抗体的体内成像的反射荧光图像中,患有动脉硬化的 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠的主动脉瓣和胸部主动脉有强的信号。此外,通过离体成像和离体荧光显微镜观察,静脉给予的荧光标记抗体局部分布到动脉硬化灶。

[0333] 从本实验可知,通过使用近红外荧光物质 (Cy5.5、Alexa750) 标记抗体,不仅小鼠的动脉硬化的成像成为可能,而且还能够与利用三维 CT 获得的图像整合。另外还可知,该种抗体能够检测人的动脉硬化灶,本实验结果与临床用的图像诊断技术相关。并且,该小鼠成像技术作为药物开发用的筛选体系已能够实用。

[0334] 产业上的可利用性

[0335] 以往的动脉硬化检查方法无法确定动脉硬化的发病部位（存在部位）。与此不同，本发明提供了能够视觉地获得动脉硬化灶（特别是粥样斑块、粥样动脉硬化）的存在部位和其大小的非介入性诊断方法。

[0336] 通过使用动脉硬化多发小鼠模型（例如 apoE 缺失 (ApoE<sup>-/-</sup>) 小鼠：通过维持高血浆胆固醇浓度，即可患上自然发生的粥样动脉硬化样病变）和该成像用的抗体，能够构建粥样硬化的治疗药的筛选体系。

[0337] 此外，通过将所述抗体替换为人源化抗体，能够构建临床诊断用的成像体系。因此，已知来自动脉粥样斑块的游离斑块等是引起动脉血栓从而引发脑血栓、心肌梗塞的原因，因此对慢性且无症状地不知不觉地进展的人的粥样动脉硬化进行监测的方法可以说能够有助于生活习惯病的预防、治疗。

[0001]

## 序 列 表

&lt;110&gt; 国立大学法人冈山大学；株式会社医学生物学研究所

<120> 抗氧化LDL/ $\beta$ 2GPI复合物的抗体及其用途

&lt;130&gt; M3-X0805P

&lt;150&gt; JP 2008-162565

&lt;151&gt; 2008 06-20

&lt;160&gt; 36

&lt;170&gt; PatentIn version 3.4

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 118

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 1

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1            5            10            15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
           20            25            30

Ala Met Ser Trp Ala Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val  
           35            40            45

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
           50            55            60

Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65            70            75            80

Leu Gln Met Cys Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
           85            90            95

Ala Arg Phe Asp Gly Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
           100            105            110

[0002]

Ser Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 2  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 2

Ser Tyr Ala Met Ser  
1 5

<210> 3  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 3

Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Arg  
1 5 10 15

Gly

<210> 4  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 4

Phe Asp Gly Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr  
1 5

<210> 5  
<211> 354  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

<400> 5

gaagtgcagt tgggtggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaact 60

tctgtgcag cctctggatt cacttcagtc agctatgcca tgtcttgggc tcgccagact 120

[0003]

ccggagaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attagtagtg gtgtagtta cacctactat 180  
 ccagacagtg tgaggggtcg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240  
 ctgcaaatgt gcagtctgag gtctgaggac acggccatgt attactgtgc aaggttgat 300  
 ggttactatg ctatggacta ctgggggtcaa ggaacctcag tcaccgtctc ctca 354

<210> 6  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 6

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Ser Ala  
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser  
 65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Leu  
 85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 7  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

[0004]

<400> 7

Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Ser Ala Val Ala  
1            5                    10

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

Trp Ala Ser Thr Arg His Thr  
1            5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 9

Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Leu Thr  
1            5

<210> 10

<211> 321

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 10

gacattgtga tgaccagtc tcacaaattc atgtccacat cagtcggaga cagggtcagc 60  
atcacctgca aggccagtca ggatgtgggt tctgctgtag cctggtatca acagaaacca 120  
gggcaatctc ctaaactact gatttactgg gcatccacc ggcacactgg agtcctgat 180  
cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccattagcag tttgcagtct 240  
gaagacttgg cagattattt ctgcagcaa tatagcagct atcctctcac gttcggctcg 300  
gggacaaaagt tggaataaa a 321

<210> 11

<211> 30

<212> DNA

[0005]

<213> Artificial	
<220>	
<223> An artificially synthesized primer sequence	
<400> 11	
atgaagttgc ctgtaggct gttggtgctg	30
<210> 12	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> An artificially synthesized primer sequence	
<400> 12	
atggagwcag acacactcct gytatgggtg	30
<210> 13	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> An artificially synthesized primer sequence	
<400> 13	
atgagtgtgc tcactcaggt cctggsgett	30
<210> 14	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> An artificially synthesized primer sequence	
<400> 14	
atgaggrccc ctgctcagwt tyttggmwtc ttg	33
<210> 15	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial	

[0006]

- <220>  
 <223> An artificially synthesized primer sequence
- <400> 15  
 atggatttwc aggtgcagat twtcagcttc 30
- <210> 16  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial
- <220>  
 <223> An artificially synthesized primer sequence
- <400> 16  
 atgaggtkey ytgytsagyt yctgrgg 27
- <210> 17  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> Artificial
- <220>  
 <223> An artificially synthesized primer sequence
- <400> 17  
 atgggcwtca agatggagtc acakwyycwg g 31
- <210> 18  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> Artificial
- <220>  
 <223> An artificially synthesized primer sequence
- <400> 18  
 atgtgggay ctkttycmm ttttcaatt g 31
- <210> 19  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial
- <220>  
 <223> An artificially synthesized primer sequence

[0007]

<400> 19 atggrtccw casctcagtt ccttg	25
<210> 20 <211> 27 <212> DNA <213> Artificial	
<220> <223> An artificially synthesized primer sequence	
<400> 20 atgtatatat gttgttgc tattct	27
<210> 21 <211> 28 <212> DNA <213> Artificial	
<220> <223> An artificially synthesized primer sequence	
<400> 21 atggaagccc cagctcagct tctcttc	28
<210> 22 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial	
<220> <223> An artificially synthesized primer sequence	
<400> 22 actggatggt ggggaagatgg	20
<210> 23 <211> 27 <212> DNA <213> Artificial	
<220> <223> An artificially synthesized primer sequence	
<400> 23	

[0008]

atgaaatgca gctggggcat sttcttc	27
<210> 24	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> An artificially synthesized primer sequence	
<400> 24	
atgggatgga gctratcat sytctt	26
<210> 25	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> An artificially synthesized primer sequence	
<400> 25	
atgaagwtgt ggtaaactg ggTTTT	27
<210> 26	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> An artificially synthesized primer sequence	
<400> 26	
atgracttg ggytcagctt grttt	25
<210> 27	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> An artificially synthesized primer sequence	
<400> 27	
atggactcca ggctcaattt agtttcctt	30

[0009]

<210> 28	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> An artificially synthesized primer sequence	
<400> 28	
atggctgtcy trsgctret cttctgc	27
<210> 29	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> An artificially synthesized primer sequence	
<400> 29	
atggratgga gckggrtctt tmtctt	26
<210> 30	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> An artificially synthesized primer sequence	
<400> 30	
atgagagtgc tgattctttt gtg	23
<210> 31	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> An artificially synthesized primer sequence	
<400> 31	
atggmttggg tgtggamctt gctattcctg	30
<210> 32	

[0010]

- <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> An artificially synthesized primer sequence  
  
 <400> 32  
 atgggcagac ttacattctc attcctg 27
- <210> 33  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> An artificially synthesized primer sequence  
  
 <400> 33  
 atggatttg ggctgatttt tttattg 28
- <210> 34  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> An artificially synthesized primer sequence  
  
 <400> 34  
 atgatggtgt taagtcttct gtacctg 27
- <210> 35  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> An artificially synthesized primer sequence  
  
 <400> 35  
 cagtggatag actgatgggg g 21
- <210> 36  
 <211> 21  
 <212> DNA

[0011]

<213> Artificial

<220>

<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 36

cagtggatag acagatgggg g

21

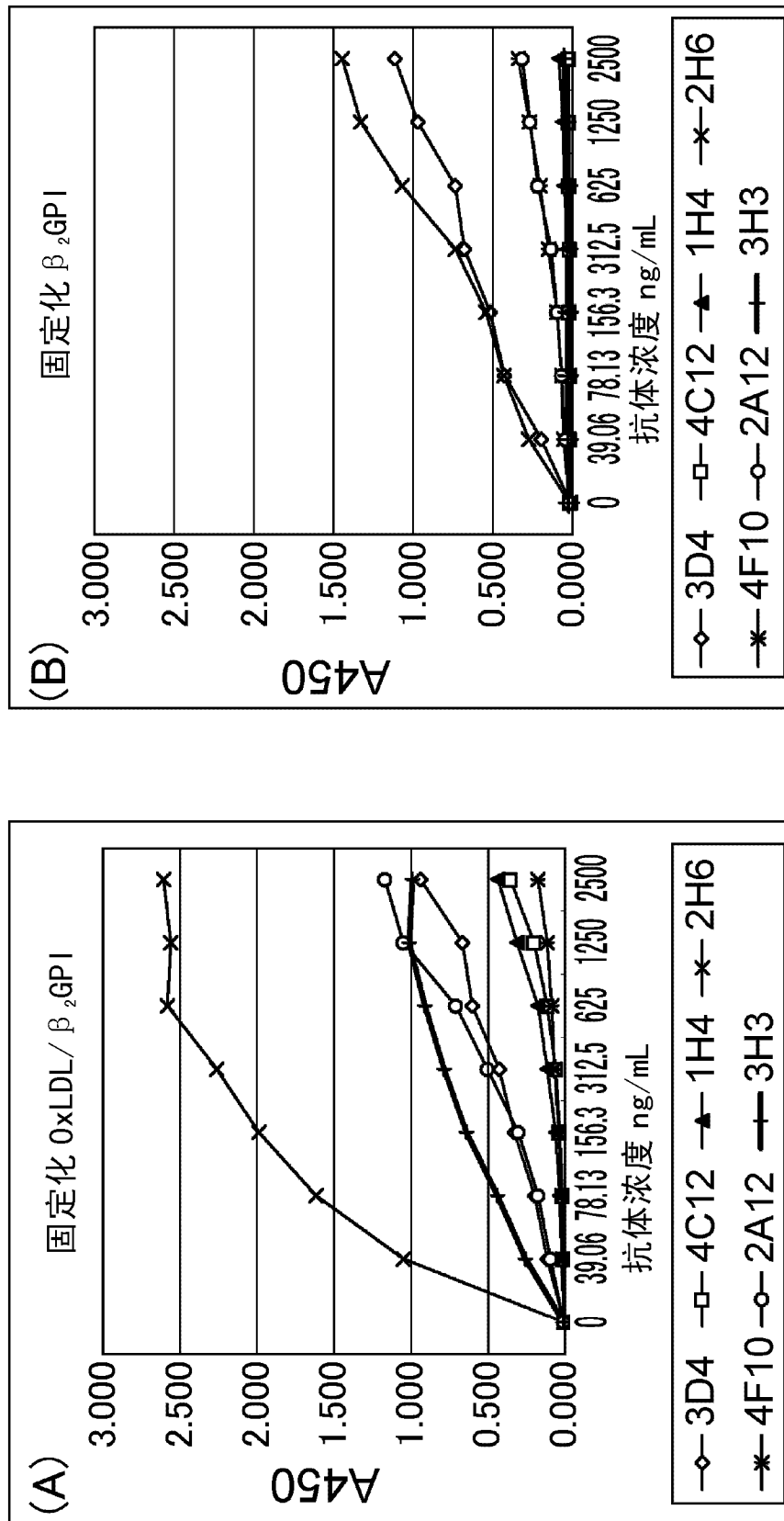


图 1

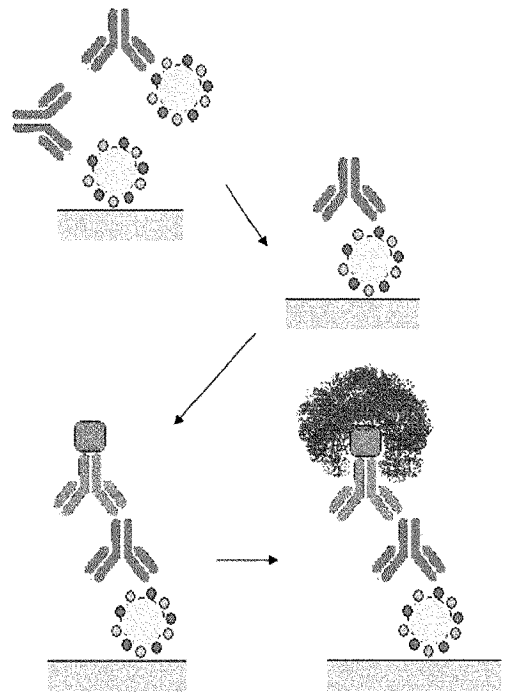
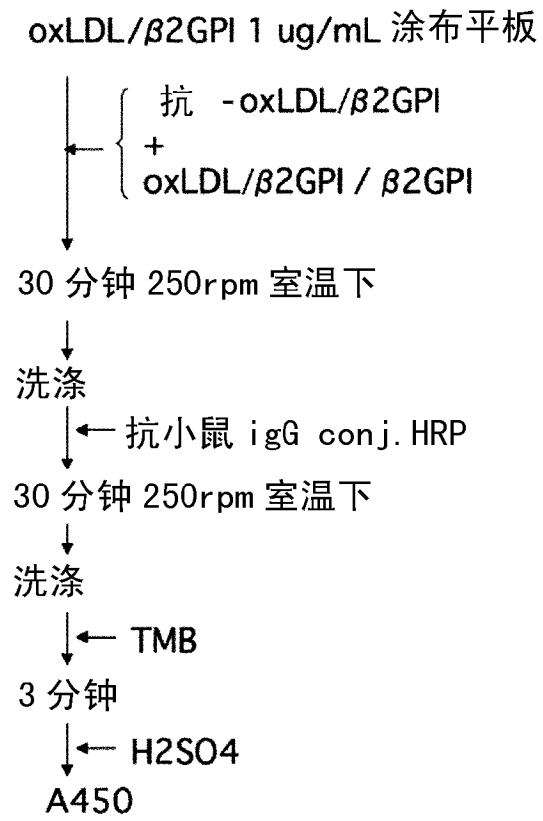


图 2

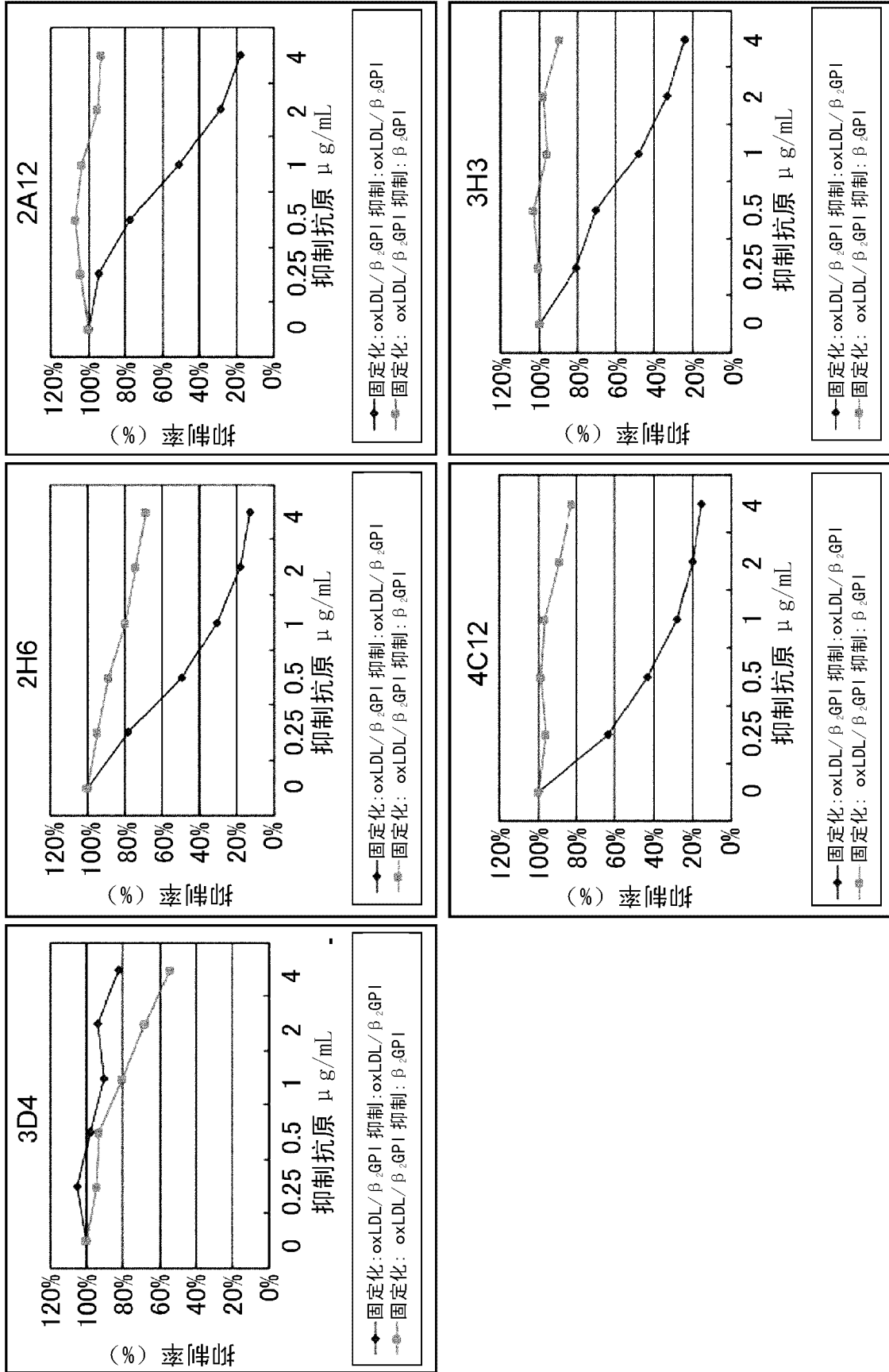


图 3

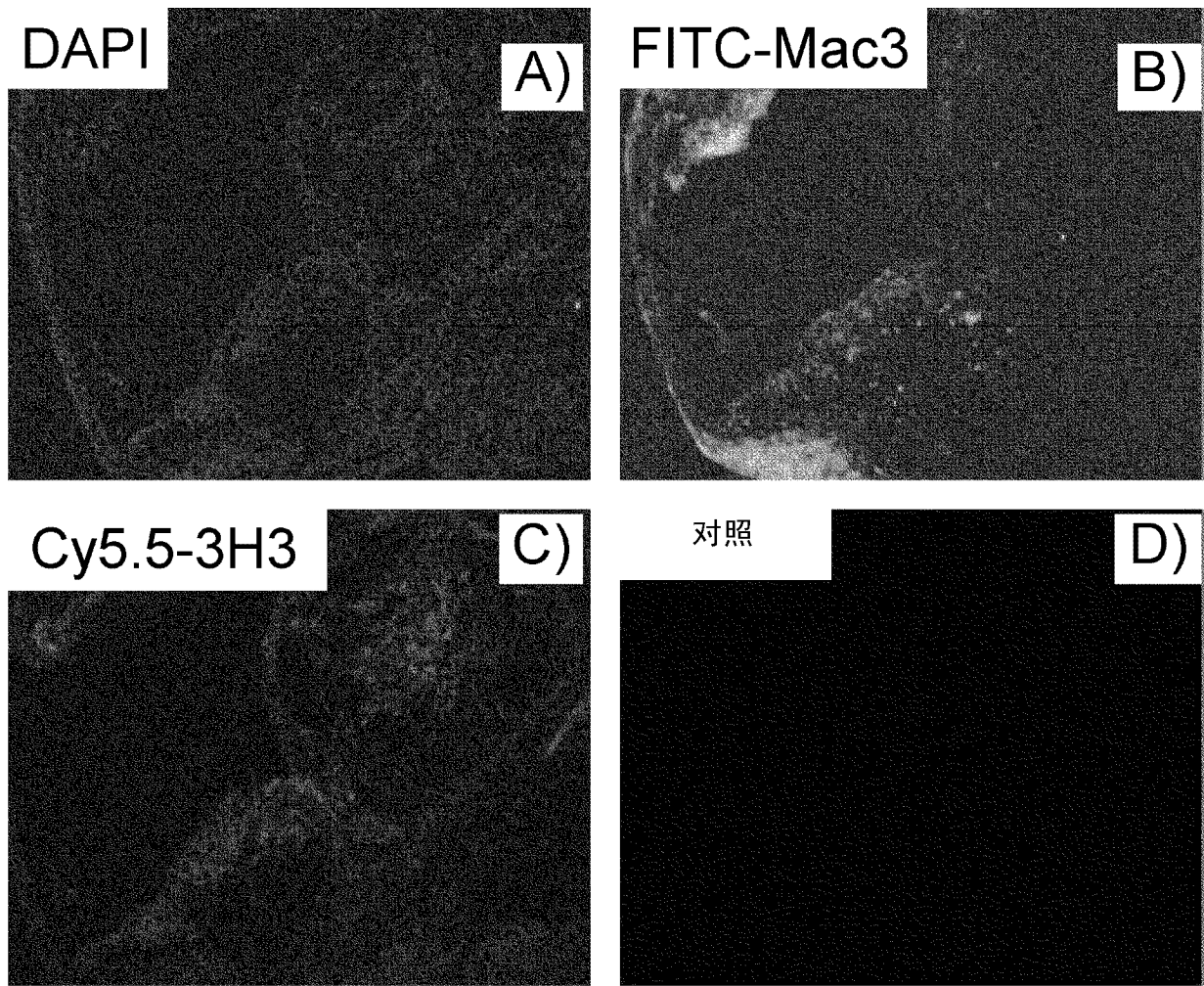


图 4

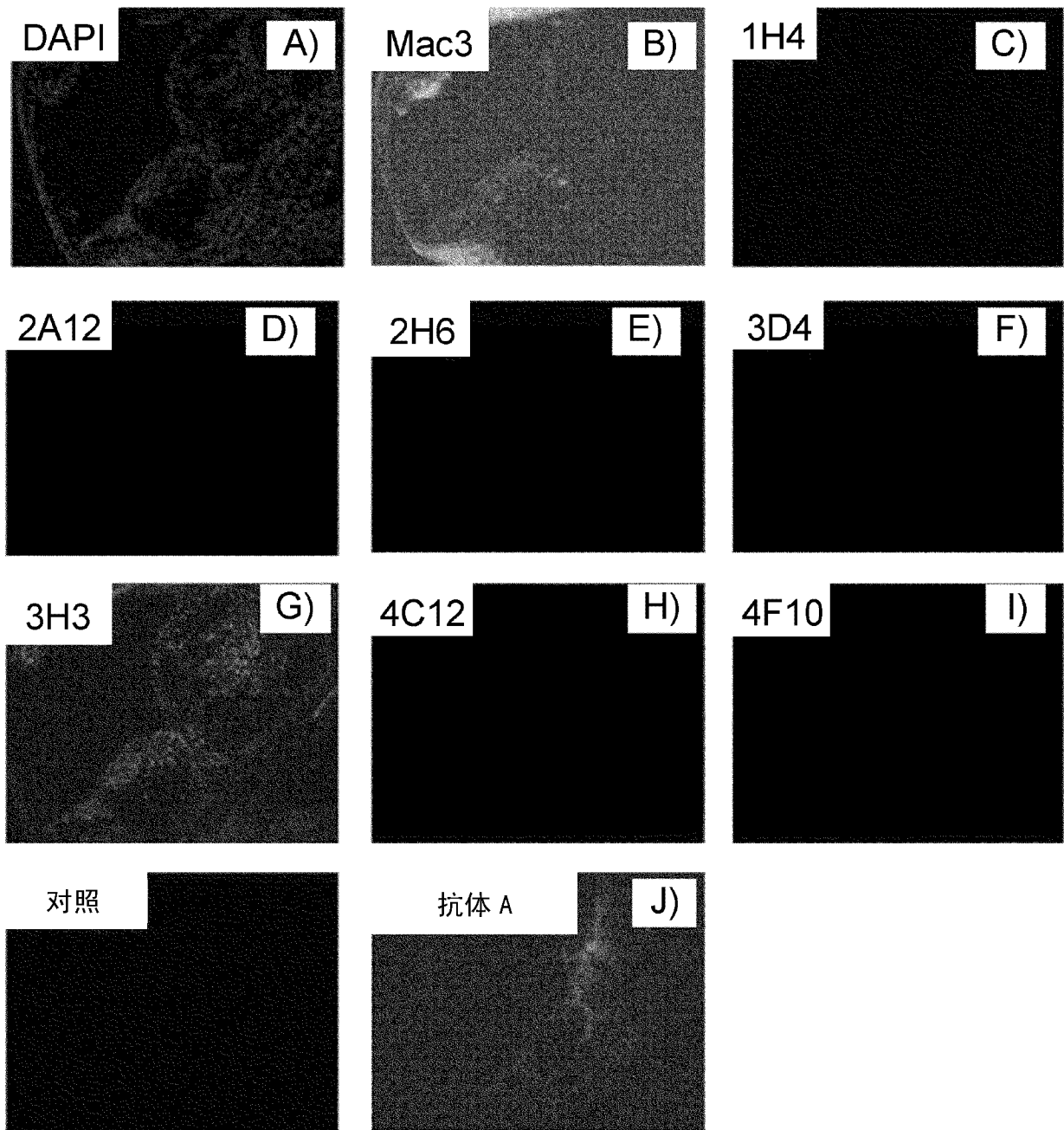
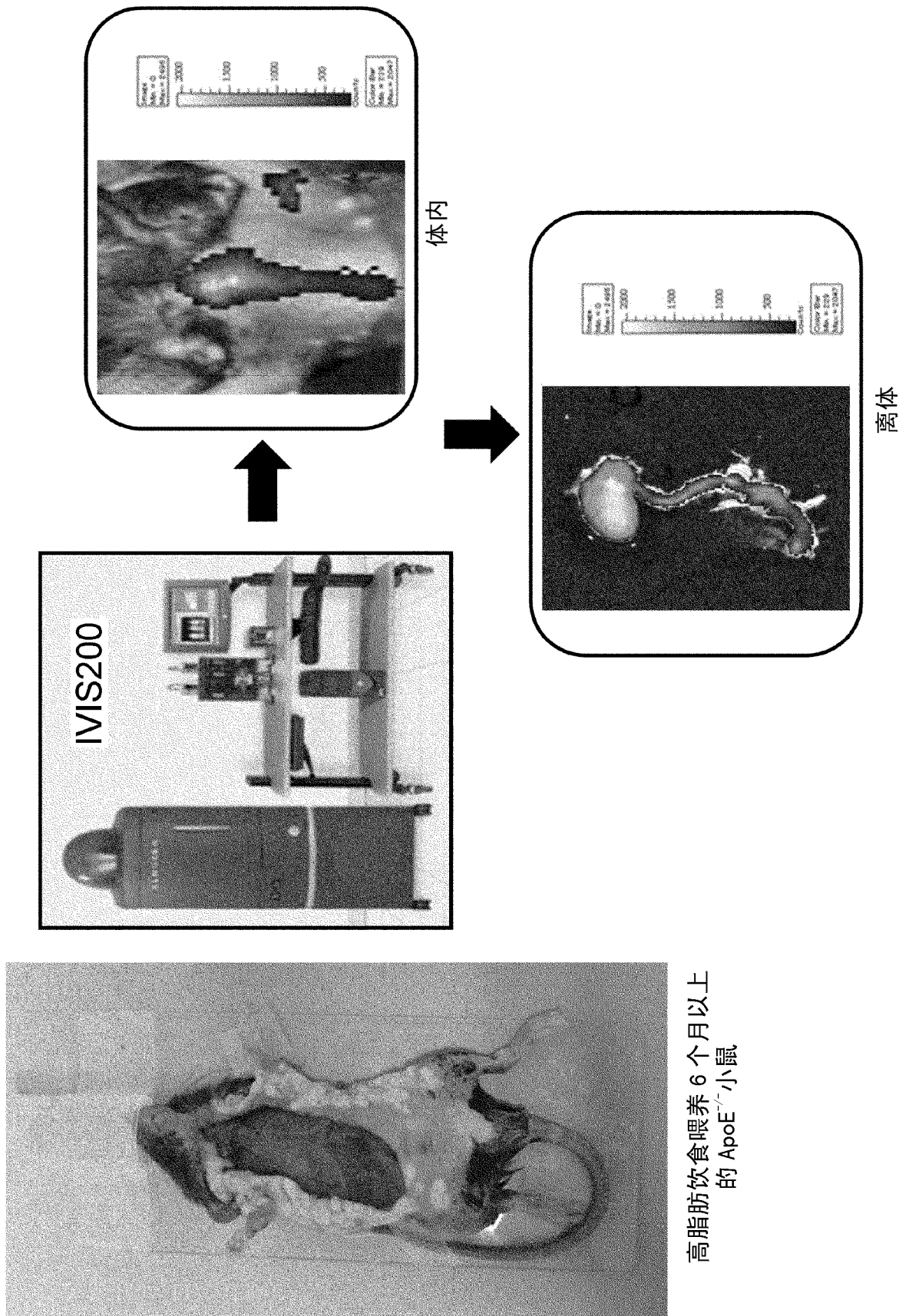


图 5



高脂肪饮食喂养6个月以上的 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠

图 6

实验 1

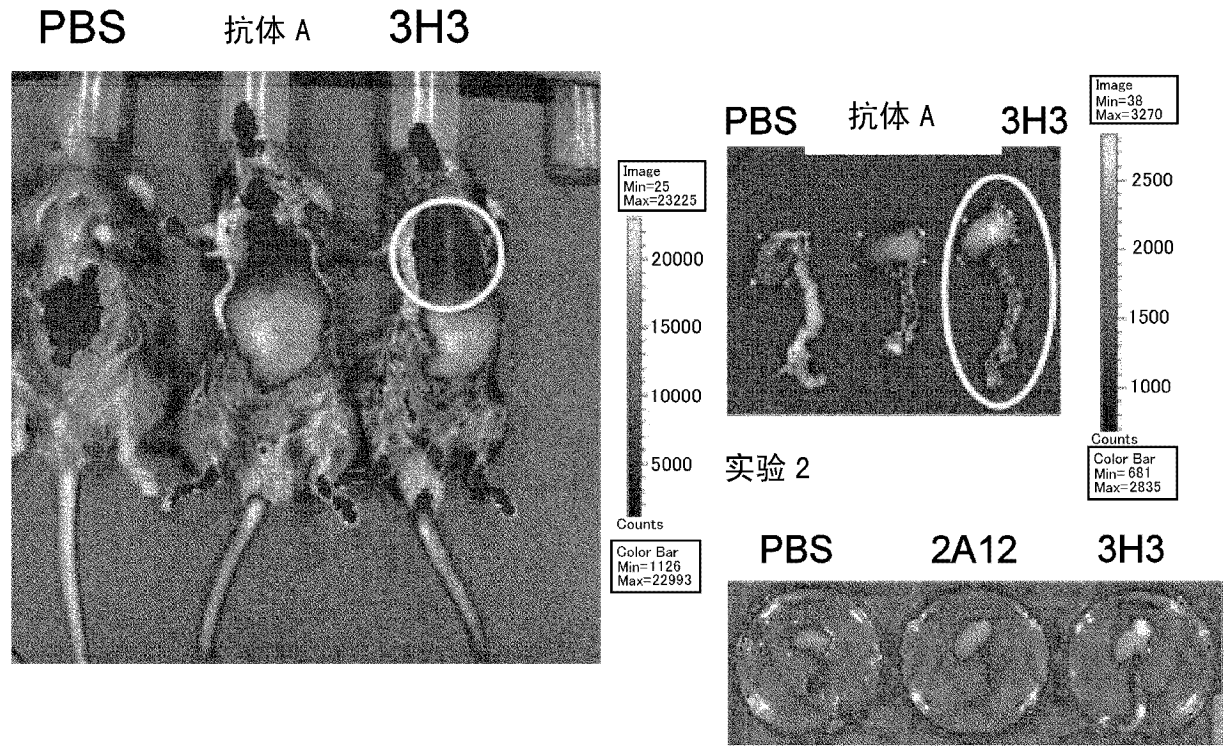


图 7

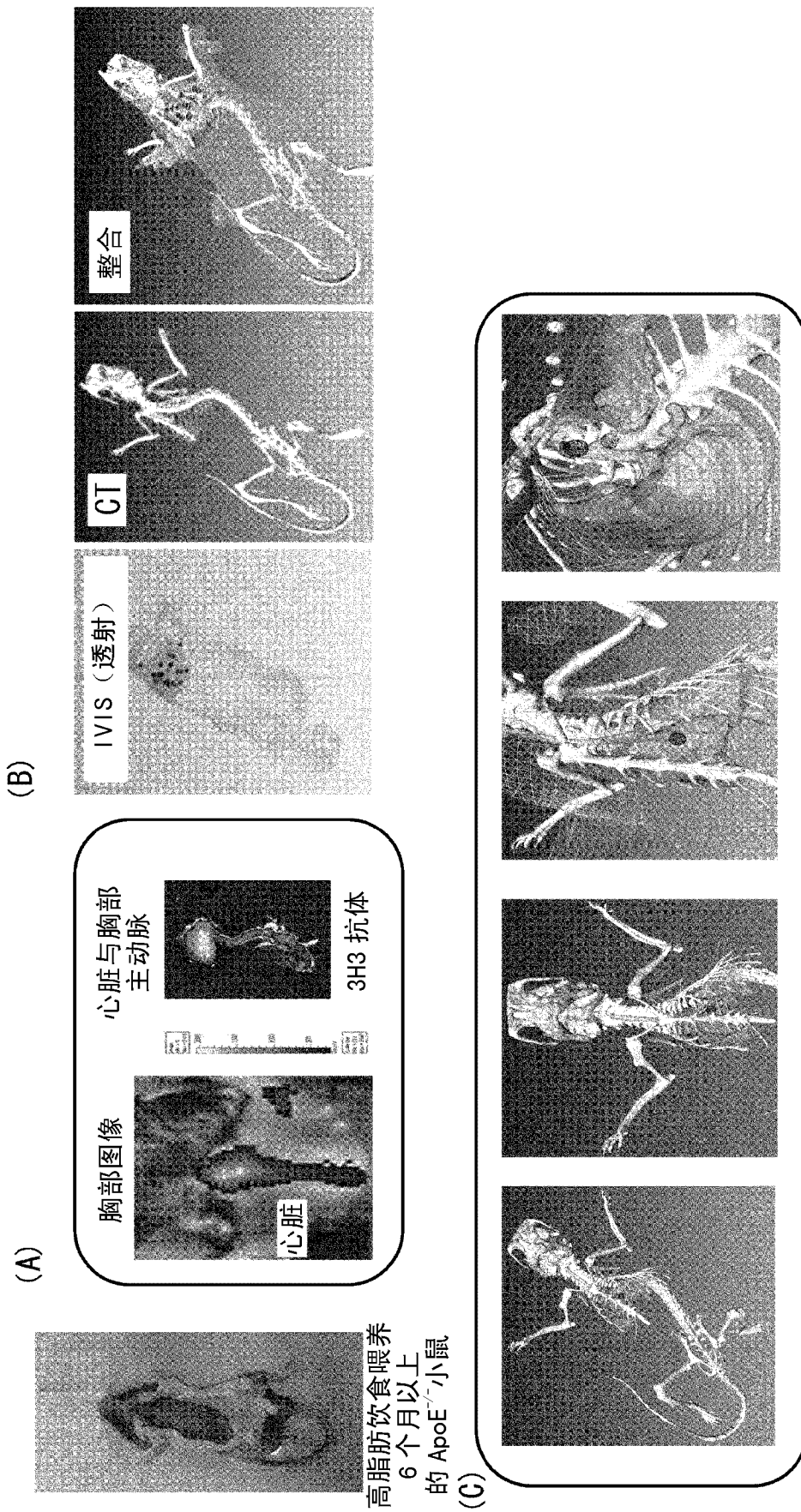
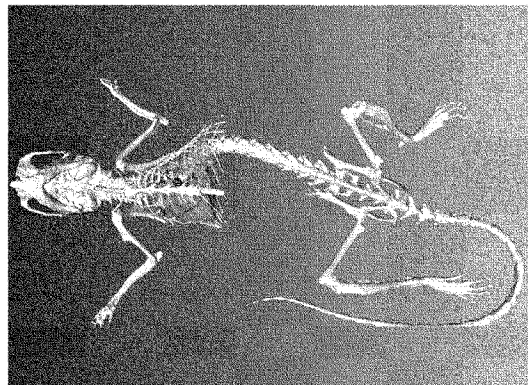
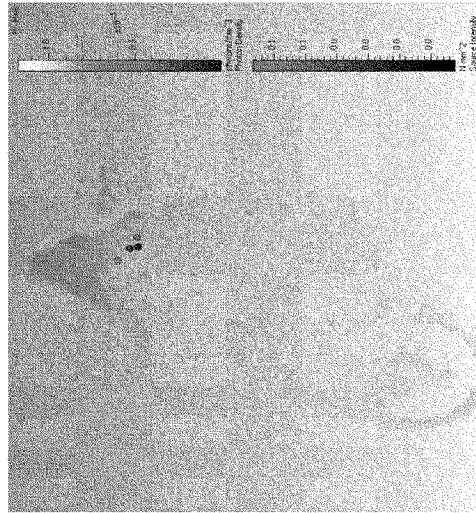
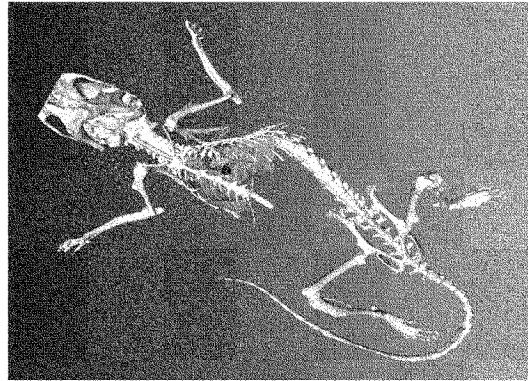
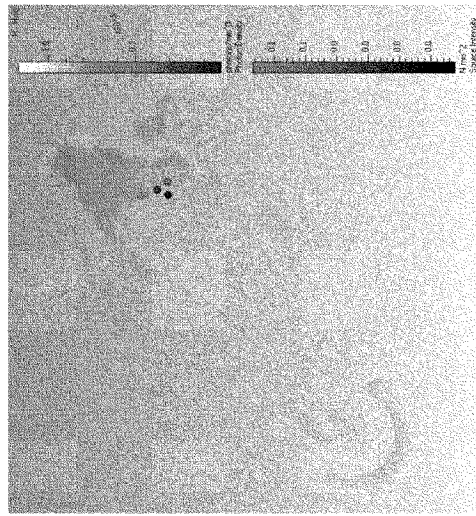
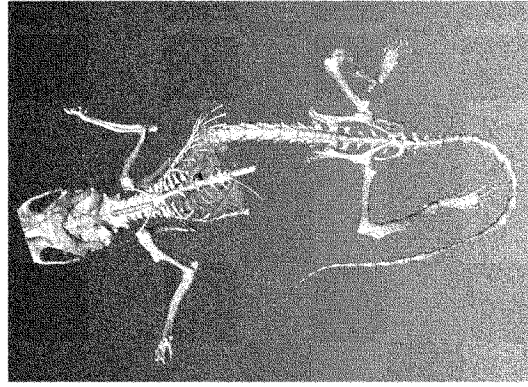
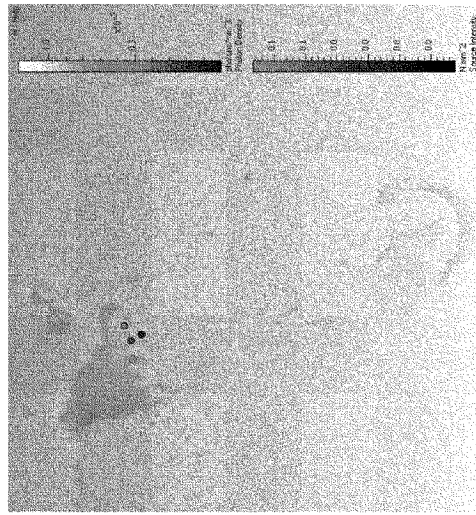


图 8



(A)

(B)

图 9

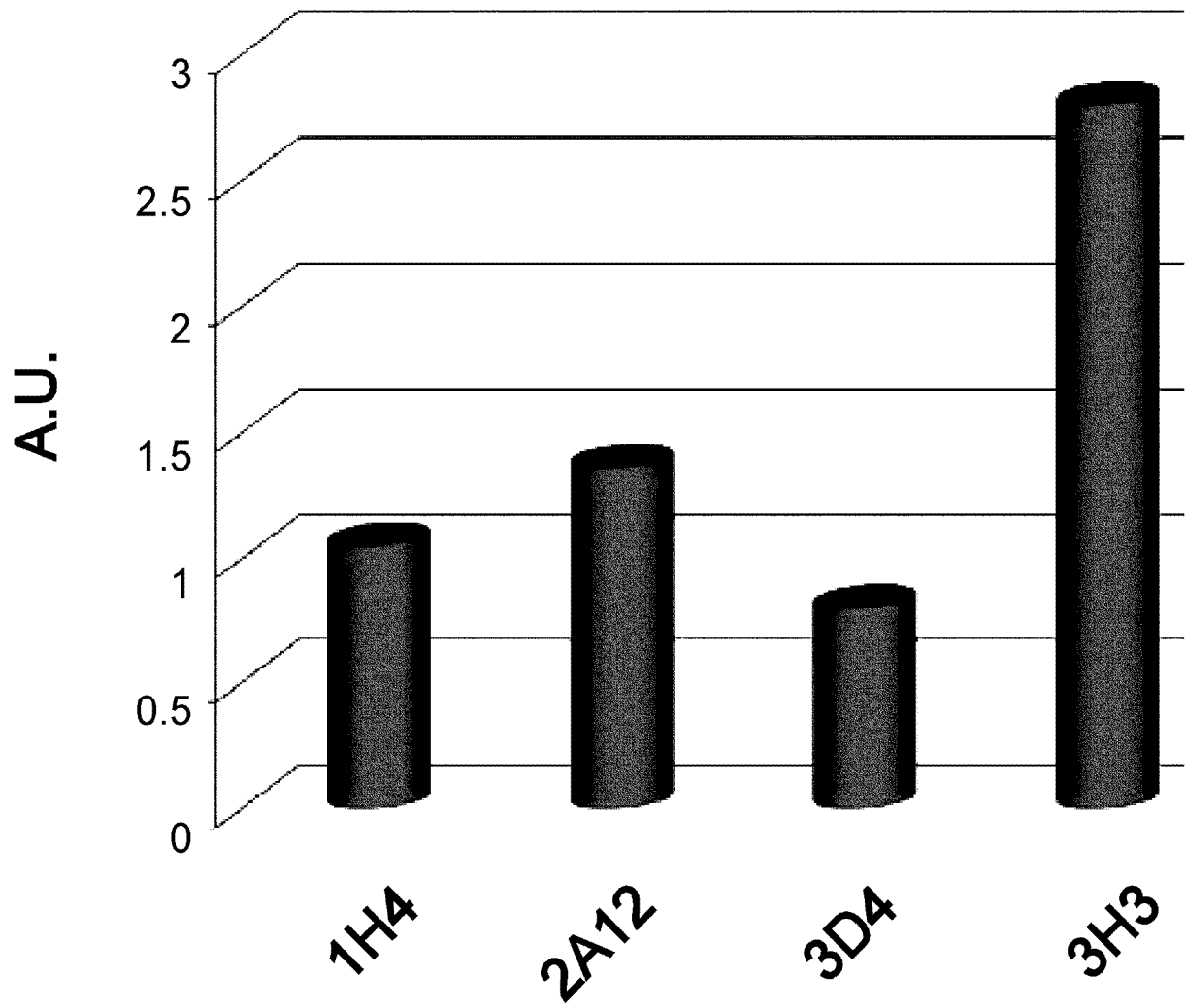


图 10



专利名称(译)	抗氧化LDL/ $\beta$ 2GPI复合物的抗体及其用途		
公开(公告)号	<a href="#">CN102124030B</a>	公开(公告)日	2015-06-17
申请号	CN200980132253.1	申请日	2009-03-09
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社医学生物学研究所		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人冈山大学 株式会社医学生物学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	国立大学法人冈山大学 株式会社医学生物学研究所		
[标]发明人	松浦荣次 小岛和夫		
发明人	松浦荣次 小岛和夫		
IPC分类号	C07K16/18 A61K49/00 C07K16/46 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 C12N15/09		
CPC分类号	G01N33/6893 A61K49/0034 A61K49/0058 C07K16/18 C07K2317/56 C07K2317/565 G01N33/5088 G01N2800/323		
代理人(译)	白丽		
审查员(译)	张彬		
优先权	2008162565 2008-06-20 JP		
其他公开文献	CN102124030A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明人等对动脉硬化切片的可免疫染色的抗体中能适用于体内成像的抗体进行了确定，并对其特异性进行了分析，结果证明对确定表位具有特异性的抗氧化LDL/ $\beta$ 2GPI复合物抗体的荧光标记物对成像是有效的。

	与固定化抗原的结合		竞争抑制(固定化氧化LDL/ $\beta$ 2GPI)		免疫染色
	$\beta$ 2GPI	氧化LDL/ $\beta$ 2GPI	$\beta$ 2GPI氧化	LDL/ $\beta$ 2GPI	
1H4	-	+	ND	ND	-
2A12	+	++	-	++	-
2H6	++	+++	++	++	-
3D4	++	++	++	-	-
3H3	-	++	-	++	+++
4C12	-	+	-	++	-
4F10	+	-	ND	ND	-