

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2003 - 160600

(P2003 - 160600A)

(43)公開日 平成15年6月3日(2003.6.3)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 0 7 K 16/18		C 0 7 K 16/18	4 B 0 2 4
A 6 1 K 39/395		A 6 1 K 39/395	D 4 B 0 6 4
			N 4 B 0 6 5
A 6 1 P 3/14		A 6 1 P 3/14	4 C 0 8 5
17/00		17/00	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 請求項の数 35 O L (全 14数) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2002 - 83678(P2002 - 83678)

(22)出願日 平成14年3月25日(2002.3.25)

(31)優先権主張番号 特願2001 - 88174(P2001 - 88174)

(32)優先日 平成13年3月26日(2001.3.26)

(33)優先権主張国 日本(JP)

(71)出願人 000001856

三共株式会社

東京都中央区日本橋本町3丁目5番1号

(72)発明者 鷺田 尚洋

栃木県下都賀郡石橋町花の木3 - 4 - 12

(72)発明者 佐竹 紀子

埼玉県川越市三光町6 - 2 - 401

(72)発明者 矢野 和樹

東京都大田区上池台1 - 17 - 8 トリアノン

上池台306

(74)代理人 100090941

弁理士 藤野 清也 (外 2 名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗体及びその利用

(57)【要約】

【課題】 骨代謝異常症の治療又は診断方法の提供。

【解決手段】 体液中に存在する破骨細胞形成抑制因子 (OCIF) と可溶性OCIF結合分子 (sOBM) との複合体 (OCIF/sOBM複合体) に結合する抗体、該抗体を産生するハイブリドーマ、このハイブリドーマを用いる該抗体の製造方法、この抗体を有効成分とする骨代謝異常症の予防剤又は治療剤。さらにOCIF/sOBM複合体量を測定することによる骨代謝異常症、特に慢性関節リウマチの診断方法及び骨代謝異常症の診断用キット。該抗体は、骨代謝異常症、特に慢性関節リウマチなどの関節疾患の診断、予防、治療にあるいは研究用分析試薬などとして有用。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 破骨細胞形成抑制因子 (osteoclastogenesis inhibitory factor ; OCIF) 及び可溶性 OCIF 結合分子 (soluble OCIF binding molecule ; sOBM) の複合体に結合する抗体。

【請求項 2】 破骨細胞形成抑制因子 (OCIF) に結合する、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】 可溶性 OCIF 結合分子 (sOBM) に結合する、請求項 1 又は 2 に記載の抗体。

【請求項 4】 ポリクローナル抗体である、請求項 1 乃至 3 のいずれか一つに記載の抗体。

【請求項 5】 モノクローナル抗体である、請求項 1 乃至 3 のいずれか一つに記載の抗体。

【請求項 6】 ヒト化抗体である、請求項 5 に記載の抗体。

【請求項 7】 ハイブリドーマ 01-30 (FERM BP-7872) により生産される、請求項 5 に記載の抗体。

【請求項 8】 ハイブリドーマ H-OBM1 (FERM BP-6264) により生産される、請求項 5 に記載の抗体。

【請求項 9】 ハイブリドーマ #207 (FERM BP-7953) により生産される、請求項 5 に記載の抗体。

【請求項 10】 ハイブリドーマ 01-30 (FERM BP-7872)。

【請求項 11】 ハイブリドーマ H-OBM1 (FERM BP-6264)。

【請求項 12】 ハイブリドーマ #207 (FERM BP-7953)。

【請求項 13】 請求項 1 乃至 9 のいずれか一つに記載の抗体を生産する細胞を培養し、次いで該培養物から請求項 1 乃至 9 のいずれか一つに記載の抗体を採取することを特徴とする、請求項 1 乃至 9 のいずれか一つに記載の抗体の製造方法。

【請求項 14】 請求項 1 乃至 9 のいずれか一つに記載の抗体を含有する医薬組成物。

【請求項 15】 請求項 1 乃至 9 のいずれか一つに記載の抗体を有効成分として含有する、骨代謝異常症の予防剤又は治療剤。

【請求項 16】 骨代謝異常症が、慢性関節リウマチ、変形性関節炎、骨粗鬆症、高カルシウム血症、骨ページェット病及び腎性骨異常栄養症からなる群より選択される一つである、請求項 15 に記載の骨代謝異常症の予防剤又は治療剤。

【請求項 17】 下記工程 [1] 及び [2] を含む骨代謝異常症の診断方法；

[1] 被検者又は健常者の試料中に含有される OCIF 及び sOBM の複合体の量を測定する工程；

[2] 健常者の試料中に含有される該複合体の量と比較して、被検者の試料中に含有される該複合体の量が多い場合、該被検者が骨代謝異常症に罹患していると判定する工程。

【請求項 18】 請求項 1 乃至 9 のいずれか一つに記載の抗体を少なくとも一つ使用することを特徴とする、請求項 17 に記載の診断方法。

【請求項 19】 請求項 1 乃至 9 のいずれか一つに記載の抗体を少なくとも二つ使用することを特徴とする、請求項 17 又は 18 に記載の診断方法。

【請求項 20】 ハイブリドーマ 01-30 (FERM BP-7872) により生産される抗体、及び、ハイブリドーマ H-OBM1 (FERM BP-6264) 又はハイブリドーマ #207 (FERM BP-7953) により生産される抗体を使用することを特徴とする、請求項 17 乃至 19 のいずれか一つに記載の診断方法。

【請求項 21】 ハイブリドーマ 01-30 (FERM BP-7872) により生産される抗体を固相化抗体として使用し、且つ、ハイブリドーマ H-OBM1 (FERM BP-6264) 又はハイブリドーマ #207 (FERM BP-7953) により生産される抗体を標識抗体として使用することを特徴とする、請求項 17 乃至 20 のいずれか一つに記載の診断方法。

【請求項 22】 試料が血漿又は関節液である、請求項 17 乃至 21 のいずれか一つに記載の診断方法。

【請求項 23】 骨代謝異常症が慢性関節リウマチである、請求項 17 乃至 22 のいずれか一つに記載の診断方法。

【請求項 24】 請求項 1 乃至 9 のいずれか一つに記載の抗体を少なくとも一つ含有する、骨代謝異常症の診断用キット。

【請求項 25】 請求項 1 乃至 9 のいずれか一つに記載の抗体を少なくとも二つ含有する、請求項 24 に記載の診断用キット。

【請求項 26】 ハイブリドーマ 01-30 (FERM BP-7872) により生産される抗体、及び、ハイブリドーマ H-OBM1 (FERM BP-6264) 又はハイブリドーマ #207 (FERM BP-7953) により生産される抗体を含有する、請求項 24 又は 25 に記載の診断用キット。

【請求項 27】 ハイブリドーマ 01-30 (FERM BP-7872) により生産される抗体を固相化用抗体として含有し、且つ、ハイブリドーマ H-OBM1 (FERM BP-6264) 又はハイブリドーマ #207 (FERM BP-7953) により生産される抗体を標識用抗体として含有する、請求項 24 乃至 26 のいずれか一つに記載の診断用キット。

【請求項 28】 請求項 1 乃至 9 のいずれか一つに記載の抗体を少なくとも一つ使用することを特徴とする、破骨細胞抑制因子 (OCIF) 及び可溶性 OCIF 結合分子 (sOBM) の複合体の測定方法。

【請求項 29】 請求項 1 乃至 9 のいずれか一つに記載の抗体を少なくとも二つ使用することを特徴とする、請求項 28 に記載の測定方法。

【請求項 30】 ハイブリドーマ 01-30 (FERM BP-7872) により生産される抗体、及び、ハイブリドーマ H-OBM1 (FERM BP-6264) 又はハイブリドーマ #207 (FERM BP-7

953)により生産される抗体を使用することを特徴とする、請求項28又は29に記載の測定方法。

【請求項31】 ハイブリドーマ01-30 (FERM BP-7872)により生産される抗体を固相化抗体として使用し、且つ、ハイブリドーマH-OBM1 (FERM BP-6264)又はハイブリドーマ#207 (FERM BP-7953)により生産される抗体を標識抗体として使用することを特徴とする、請求項28乃至30のいずれか一つに記載の測定方法。

【請求項32】 請求項1乃至9のいずれか一つに記載の抗体を少なくとも一つ含有する、破骨細胞抑制因子 (OCIF) 及び可溶性OCIF結合分子 (sOMB) の複合体の測定キット。

【請求項33】 請求項1乃至9のいずれか一つに記載の抗体を少なくとも二つ含有する、請求項32に記載の測定キット。

【請求項34】 ハイブリドーマ01-30 (FERM BP-7872)により生産される抗体、及び、ハイブリドーマH-OBM1 (FERM BP-6264)又はハイブリドーマ#207 (FERM BP-7953)により生産される抗体を含有する、請求項32又は33に記載の測定用キット。

【請求項35】 ハイブリドーマ01-30 (FERM BP-7872)により生産される抗体を固相化用抗体として含有し、且つ、ハイブリドーマH-OBM1 (FERM BP-6264)又はハイブリドーマ#207 (FERM BP-7953)により生産される抗体を標識用抗体として含有する、請求項32乃至34のいずれか一つに記載の測定用キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、破骨細胞形成抑制因子 (osteoclastogenesis inhibitory factor; OCIF) と可溶性OCIF結合分子 (soluble OCIF binding molecule; sOBM) との複合体に結合する抗体に関する。さらに、本発明は、この抗体を産生するハイブリドーマ、この抗体の製造方法、この抗体を有効成分とする骨代謝異常症の予防治療薬、あるいはこの抗体を用いる骨代謝異常症の診断薬、診断方法及び診断用キット等に関する。

【0002】

【従来の技術】骨代謝は、骨形成を担当する骨芽細胞と、骨吸収を担当する破骨細胞の活性の均衡に依存している (Chambers, T.J., et al., Vitam. Horm., 46, 41-86 (1991))。骨代謝異常症は、骨形成と骨吸収の均衡が崩れることにより発生すると考えられている。骨代謝の異常を伴う疾患として、慢性関節リウマチ、変形性関節炎、骨粗鬆症、高カルシウム血症、骨ペーজেット病、及び腎性骨異常症が知られている。慢性関節リウマチは関節滑膜を病変の主座とする難治性の炎症性疾患である。病変が進行すれば、軟骨・骨破壊を引き起こし、関節の機能低下へと至る。さらに、様々な関節外症状を呈することにより全身臓器に炎症性疾患が波及することもあり、結果として患者のQOL (quality of life)

を著しく低下させる。

【0003】慢性関節リウマチは、その早期の診断により治療を開始して骨破壊の進行を抑える必要があることから、早期慢性関節リウマチの診断基準の作成が行われている。その診断基準は(1)朝のこわばり15分以上が一週間以上続く、(2)3つ以上の関節域の腫脹が一週間以上続く、(3)手関節、中手指関節 (MCP)、近位指関節 (PIP)、足関節または中足指関節 (MTP) の膨脹が一週間以上続く、(4)対称性膨脹が一週間以上続く、(5)リウマチ因子の検出、(6)手または足のX線変化、軟部組織紡錘状膨脹と骨萎縮、又は骨びらん (山前、日本医事新報, 3360, p43 (1988)) となっており、6項目中4項目が当てはまれば慢性関節リウマチと診断される。しかし、このような早期診断のために感度の高い基準を設定すると、どうしても特異性を犠牲にせざるをえなくなる。このため、慢性関節リウマチの早期診断用特異的疾患マーカーが現在求められている。

【0004】前述したように、骨代謝を担当する細胞は骨芽細胞と破骨細胞である。これらの細胞は密接に相互作用していることが知られており、この現象はカップリンク#と呼ばれている。即ち、破骨細胞の分化、成熟には骨芽細胞様ストローマ細胞が分泌する種々のサイトカイン、たとえばインターロイキン (IL) -1、IL-6、IL-11、マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF)、腫瘍壊死因子 (TNF α)、トランスフォーミング増殖因子 β (TGF- β) などが促進的または抑制的に作用することが報告されている (Raisz : Disorder of Bone and Mineral Metabolism, 287-311, 1992; Suda et al. : Principle of Bone biology, 87-102, 1996; Suda et al. : Endocrine Reviews, 4, 226-270, 1995; Lacey et al. : Endocrinology, 136, 2367-2376, 1995)。骨芽細胞様ストローマ細胞は、未熟な破骨細胞前駆細胞や破骨細胞との接着により、それぞれ破骨細胞の分化、成熟や成熟破骨細胞による骨吸収等の機能に重要な役割を演じていることが知られている。この細胞間接着による破骨細胞形成に関与する因子として、骨芽細胞様ストローマ細胞の膜上に発現される破骨細胞分化誘導因子 (osteoclast differentiation factor, ODF) という分子が想定されていた (Suda et al., : Endocrine Rev. 13, 66-80, 1992; Suda et al., : Bone, 17, 87S-91S, 1995)。

【0005】津田らは、ヒト胎児肺線維芽細胞IMR-90 (ATCC CCL-186) の培養液中に破骨細胞形成抑制因子 (osteoclastogenesis inhibitory factor, OCIF) を見出し、遺伝子組換え型OCIFによるin vivoでの骨代謝改善効果の確認に成功した (W096/26217号公報)。そして、OCIFは破骨細胞の分化、成熟を特異的に抑制することにより、骨形成を促進することを明らかにした。OCIFはオステオプロテグリン (osteoprotegerin) と呼ばれることもある (W097/23614号公報)。さらに、骨芽細胞

様ストローマ細胞株、ST-2のcDNAライブラリーからOCIF結合分子(OCIF binding molecule ; OBM)のクローニングに成功した。この OBMは、仮想されていたODFであることが明らかとなった。又、OBM の発見に相前後し、OBM と同一の蛋白質がTRANCE (W099/29865号公報)あるいは RANKL (W098/28426号公報)として発表されている。このOBMはタイプIIの膜結合タンパク質であり、その膜貫通領域を欠失させた可溶性OBM(soluble OBM ; sOBM)とともに in vitro での破骨細胞形成系における破骨細胞の分化、成熟を支持し、促進する因子であること 10を明らかにした(W098/46644号公報)。OBMは骨芽細胞、活性化T細胞等に存在し、OCIFはOBMに結合してその生物活性をブロックすることにより破骨細胞形成を抑制する。

【0006】矢野らはヒト血清中にOCIFが存在することを確認し、それが加齢及び骨代謝疾患と強く関連することを見いだした(Yano et al.; Journal of Bone and Mineral Research, 14(4), 518-527(1999))。骨代謝異常症の進行に伴ってsOBMが生成し、これが血清中に存在するOCIFと結合して複合体を形成するものと予想されるが、OCIF及びsOBMの複合体の測定系は未だ開発されていない。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは、このような状況に鑑み鋭意探索した結果、OCIF及びsOBMの複合体(OCIF/sOBM複合体)に極めて高い親和性を有しているモノクローナル抗体を見出すに至った。さらに、これらの抗体を用いてOCIF/sOBM複合体を測定できる酵素免疫測定(enzyme immunoassay ; EIA)方法を構築するに至った。又、この酵素免疫測定方法を用いて健常者及び 30リウマチ因子陽性患者の血漿中のOCIF/sOBM複合体量を測定した結果、リウマチ因子陽性患者でOCIF/sOBM複合体がより多く検出された。

【0008】従って本発明は、OCIF/sOBM複合体に結合する抗体、OCIF/sOBM複合体に結合するポリクローナル抗体、OCIF/sOBM複合体に結合するモノクローナル抗体、OCIF/sOBM複合体に結合するヒト化モノクローナル抗体、これらの抗体を生産する細胞の培養物よりこれらの抗体を採取することを特徴とするこれらの抗体の製造方法、これらの抗体を含有する医薬組成物、これらの抗 40体を有効成分とする、骨代謝異常症(慢性関節リウマチ、変形性関節炎、骨粗鬆症、高カルシウム血症、骨ページェット病、腎性骨異常栄養症等)の予防剤及び治療剤、これらの抗体を含有する骨代謝異常症診断用キット、その診断方法、OCIF/sOBM複合体測定キット、その測定方法等を提供することを課題とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明は、上記課題を解決するためになされたものである。すなわち、本発明は、(1) 破骨細胞形成抑制因子(osteoclastogenesis 50

inhibitory factor ; OCIF) 及び可溶性OCIF結合分子(soluble OCIF binding molecule ; sOBM)の複合体に結合する抗体、(2) 破骨細胞形成抑制因子(OCIF)に結合する、前記(1)に記載の抗体、(3) 可溶性OCIF結合分子(sOBM)に結合する、前記(1)又は(2)に記載の抗体、(4) ポリクローナル抗体である、前記(1)乃至(3)のいずれか一つに記載の抗体、(5) モノクローナル抗体である、前記(1)乃至(3)のいずれか一つに記載の抗体、(6) ヒト化抗体である、前記(5)に記載の抗体、(7) ハイブリドーマ01-30(FERM BP-7872)により生産される、前記(5)に記載の抗体、(8) ハイブリドーマH-OBM1(FERM BP-6264)により生産される、前記(5)に記載の抗体、(9) ハイブリドーマ#207(FERM BP-7953)により生産される、前記(5)に記載の抗体、(10) ハイブリドーマ01-30(FERM BP-7872)、(11) ハイブリドーマH-OBM1(FERM BP-6264)、(12) ハイブリドーマ#207(FERM BP-7953)、(13) 前記(1)乃至(9)のいずれか一つに記載の抗体を生産する細胞を培養し、次いで該培養物から前記(1)乃至(9)のいずれか一つに記載の抗体を採取することを特徴とする、前記(1)乃至(9)のいずれか一つに記載の抗体の製造方法、(14) 前記(1)乃至(9)のいずれか一つに記載の抗体を含有する医薬組成物、(15) 前記(1)乃至(9)のいずれか一つに記載の抗体を有効成分として含有する、骨代謝異常症の予防剤又は治療剤、(16) 骨代謝異常症が、慢性関節リウマチ、変形性関節炎、骨粗鬆症、高カルシウム血症、骨ページェット病及び腎性骨異常栄養症からなる群より選択される一つである、前記(15)に記載の骨代謝異常症の予防剤又は治療剤、(17) 下記工程[1]及び[2]を含む骨代謝異常症の診断方法；

[1]被検者又は健常者の試料中に含有されるOCIF及びsOBMの複合体の量を測定する工程；

[2]健常者の試料中に含有される該複合体の量と比較して、被検者の試料中に含有される該複合体の量が多い場合、該被検者が骨代謝異常症に罹患していると判定する工程、(18) 前記(1)乃至(9)のいずれか一つに記載の抗体を少なくとも一つ使用することを特徴とする、前記(17)に記載の診断方法、(19) 前記(1)乃至(9)のいずれか一つに記載の抗体を少なくとも二つ使用することを特徴とする、前記(17)又は(18)に記載の診断方法、(20) ハイブリドーマ01-30(FERM BP-7872)により生産される抗体、及び、ハイブリドーマH-OBM1(FERM BP-6264)又はハイブリドーマ#207(FERM BP-7953)により生産される抗体を使用することを特徴とする、前記(17)乃至(19)のいずれか一つに記載の診断方法、(21) ハイブリドーマ01-30(FERM BP-7872)により生産される抗体を固相化抗体として使用し、且つ、ハイブリドーマH-OBM1(FERM BP-6264)又はハイブリドーマ#207(FERM BP-7953)により生産される抗体を標識抗体と

して使用することを特徴とする、前記(17)乃至(20)のいずれか一つに記載の診断方法、(22)試料が血漿又は関節液である、前記(17)乃至(21)のいずれか一つに記載の診断方法、(23)骨代謝異常症が慢性関節リウマチである、前記(17)乃至(22)のいずれか一つに記載の診断方法、(24)前記(1)乃至(9)のいずれか一つに記載の抗体を少なくとも一つ含有する、骨代謝異常症の診断用キット、(25)前記(1)乃至(9)のいずれか一つに記載の抗体を少なくとも二つ含有する、前記(24)に記載の診断用キット、(26)ハイブリドーマ01-30 (FERM BP-7872)により生産される抗体、及び、ハイブリドーマH-OBM1 (FERM BP-6264)又はハイブリドーマ#207 (FERM BP-7953)により生産される抗体を含有する、前記(24)又は(25)に記載の診断用キット、(27)ハイブリドーマ01-30 (FERM BP-7872)により生産される抗体を固相化用抗体として含有し、且つ、ハイブリドーマH-OBM1 (FERM BP-6264)又はハイブリドーマ#207 (FERM BP-7953)により生産される抗体を標識用抗体として含有する、前記(24)乃至(26)のいずれか一つに記載の診断用キット、(28)前記(1)乃至(9)のいずれか一つに記載の抗体を少なくとも一つ使用することを特徴とする、破骨細胞抑制因子(OCIF)及び可溶性OCIF結合分子(sOMB)の複合体の測定方法、(29)前記(1)乃至(9)のいずれか一つに記載の抗体を少なくとも二つ使用することを特徴とする、前記(28)に記載の測定方法、(30)ハイブリドーマ01-30 (FERM BP-7872)により生産される抗体、及び、ハイブリドーマH-OBM1 (FERM BP-6264)又はハイブリドーマ#207 (FERM BP-7953)により生産される抗体を使用することを特徴とする、前記(28)又は(29)に記載の測定方法、(31)ハイブリドーマ01-30 (FERM BP-7872)により生産される抗体を固相化抗体として使用し、且つ、ハイブリドーマH-OBM1 (FERM BP-6264)又はハイブリドーマ#207 (FERM BP-7953)により生産される抗体を標識抗体として使用することを特徴とする、前記(28)乃至(30)のいずれか一つに記載の測定方法、(32)前記(1)乃至(9)のいずれか一つに記載の抗体を少なくとも一つ含有する、破骨細胞抑制因子(OCIF)及び可溶性OCIF結合分子(sOMB)の複合体の測定キット、(33)前記(1)乃至(9)のいずれか一つに記載の抗体を少なくとも二つ含有する、前記(32)に記載の測定キット、(34)ハイブリドーマ01-30 (FERM BP-7872)により生産される抗体、及び、ハイブリドーマH-OBM1 (FERM BP-6264)又はハイブリドーマ#207 (FERM BP-7953)により生産される抗体を含有する、前記(32)又は(33)に記載の測定用キット、(35)ハイブリドーマ01-30 (FERM BP-7872)により生産される抗体を固相化用抗体として含有し、且つ、ハイブリドーマH-OBM1 (FERM BP-6264)又はハイブリドーマ#207 (FERM BP-7953)により生産される抗体を標識用抗体として含有する、前記(32)乃至(34)のいずれか一つに

記載の測定用キット、等に関する。本発明の提供する、OCIF/sOMB複合体に結合する抗体は、骨代謝異常症の予防、治療及び/又は診断等に有用である。

【0010】

【発明の実施の形態】本発明において、骨代謝異常症とは、一次性骨粗鬆症(老人性骨粗鬆症、閉経後骨粗鬆症及び特発性若年性骨粗鬆症)、内分泌骨粗鬆症(甲状腺機能亢進症、副甲状腺機能亢進症、クッシング症候群及び末端肥大症)、性機能低下に伴う骨粗鬆症(下垂体機能低下症、Klinefelter症候群及びTurner症候群)、遺伝性及び先天性形態の骨粗鬆症(骨形成不全、ホモシスチン尿症、メンケス症及びライリーデイ症候群)、重力負荷軽減又は四肢の固定や不動化による骨減少症、ページェット病、骨髄炎、骨喪失による感染症病巣、固形腫瘍(乳癌、肺癌、腎臓癌、前立腺癌等)に起因する高カルシウム血症、血液学的悪性疾患(多発性骨髄腫、リンパ腫及び白血病)、特発性高カルシウム血症、甲状腺機能亢進症又は腎機能不全に伴う高カルシウム血症、ステロイド投与に起因する骨減少症、他の薬物(メトトレキサート及びシクロスポリンA等の免疫抑制剤、ヘパリン及び抗てんかん薬)投与に起因する骨減少症、腎臓機能不全に伴う骨減少症、外科手術、消化器疾患(小腸障害、大腸障害、慢性肝炎、胃切除、原発性胆汁性肝硬変及び肝硬変)に伴う骨減少症、慢性関節リウマチ等の各種リウマチによる骨減少症、慢性関節リウマチ等の各種リウマチによる骨破壊及び関節破壊、ムチランス型リウマチ、変形性関節症、歯周骨喪失、癌の骨転移(骨溶解性転移)、外傷性負傷、ゴシェ病、鎌状赤血球貧血、全身性紅性狼創若しくは非外傷性負傷に伴う骨壊死又は骨細胞死、腎性骨異栄養症等の骨異栄養症、低アルカリフォスファターゼ血症、糖尿病に伴う骨減少症、栄養障害又は摂食障害に伴う骨減少症、その他の骨減少症等である。

【0011】本発明の提供する抗体は、OCIF/sOMB複合体と結合する抗体であれば特に限定されるものではなく、ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体のいずれでもよい。そのような抗体として、本発明の提供するハイブリドーマ01-30 (FERM BP-7872)により生産されるモノクローナル抗体が特異的に結合する部位(epitope)と特異的に結合するモノクローナル抗体、ハイブリドーマH-OBM1 (FERM BP-6264)又はハイブリドーマ#207 (FERM BP-7953)により生産されるモノクローナル抗体(#207)が特異的に結合する部位(epitope)と特異的に結合するモノクローナル抗体等を例示することができ、好適な例としてハイブリドーマ01-30 (FERM BP-7872)により生産されるモノクローナル抗体、ハイブリドーマH-OBM1 (FERM BP-6264)又はハイブリドーマ#207 (FERM BP-7953)により生産されるモノクローナル抗体(#207)等を挙げることができる。

【0012】本発明の抗体を取得する際に免疫される動

物としては、ヒト、ヒト以外の哺乳動物又は鳥類を例示することができ、好適な動物は抗原の由来する種とは異なる種である。なお、本発明において、抗原 (antigen) とは免疫原 (immunogen) の意味をも包含する。本発明の抗体を取得する際に使用される抗原としては、ヒト又はヒト以外の哺乳動物由来のOCIF、その類縁体、その変異体、その誘導体等 (以上、W096/26217号公報、W097/23614号公報; 以下、それら全てを単に「OCIF」という。)、ヒト又はヒト以外の哺乳動物由来のOBM、その類縁体、その変異体、その誘導体等 (W098/46644号公報、W099/29865号公報、W098/28426号公報、W098/46751号公報; 以下、それら全てを単に「OBM」という。)、sOBM (W098/46644号公報、W099/29865号公報、W098/28426号公報、W098/46751号公報)、ヒト又はヒト以外の哺乳動物に由来するOCIF/sOBM複合体等を例示することができる。OCIFを免疫原とする場合、好適にはOCIF 単量体及びOCIF2量体を混合して用いる。

【0013】OCIF/sOBM複合体は、(1) ヒト又はヒト以外の哺乳動物より採取された生体試料 (組織、血液等) 又は細胞 (培養細胞、細胞株等) から通常タンパク質の単離精製に使用される手段を適宜組み合わせることにより取得するか、あるいは、(2) 予め取得され、必要に応じて単離精製されたヒト又はヒト以外の哺乳動物由来のOCIF、及び、ヒト又はヒト以外の哺乳動物由来のsOBMを溶媒に溶解させた後混合し次いで保温することにより、取得することができる。OCIF又はsOBMは組換え型であってもよく、組換え型OCIF又はsOBMは、OCIF又はsOBMをコードしたヌクレオチドが導入された大腸菌等の原核細胞あるいは動物細胞の培養物により採取することができる。(2) におけるOCIF及びsOBMの由来する種は特に限定されないが、好適にはOCIFの由来する種とsOBMの由来する種は同一である。OCIFまたはsOBMを溶解させる溶媒は、通常タンパク質を溶解させるのに使用されるものであればよく、リン酸緩衝液等を例示することができる。該溶媒は塩化ナトリウム、界面活性剤等を含有していてもよい。また、該溶媒のpHの範囲は5乃至10、好適には6乃至8である。OCIFとsOBMの混合比の範囲はOCIF : sOBM = 1 : 0.1 : 乃至 1 : 100であり、好適にはOCIF : sOBM = 1 : 0.2乃至1 : 5である。保温温度の範囲は0乃至40、好適には0乃至37、より好適には4乃至25である。本時間の範囲は反応温度、OCIF及びsOBMの濃度、それらの混合比等に依存するが、通常1時間乃至1週間、好適には6時間乃至2日である。保温後、反応物を直接、又は適宜分画した後、電気泳動法 (非変性条件下のPAGE等)、抗OCIF抗体及び抗sOBM抗体又は抗OBM抗体を組み合わせたEIA法等により、所望のOCIF/sOBM複合体が得られたことを確認することができる。このようにして取得され確認されたOCIF/sOBM複合体は、必要に応じて精製した後、本発明の抗体を取得する際に動物を免疫するための抗原、本発明の抗体を精製または選抜する際の手段、被検試料

中のOCIF/sOBM複合体の量を測定する際の標準品等に供することができる。

【0014】本発明のポリクローナルは、予め抗原で免疫した動物より血液を回収して血清画分を得、次いでOCIF/sOBM複合体を用いたアフィニティークロマトグラフィー等により取得することができる。本発明のモノクローナル抗体は、以下の方法により得ることができる。即ち、上述の抗原を溶媒 (例えば生理食塩水など) で希釈し、これを必要に応じて免疫補助剤 (例えばフロイント完全アジュバント) とともに哺乳動物の腹腔内または静脈内に投与する。免疫は1~2週間間隔で3~4回行なうのが一般的である。あるいはin vitro法による感作法も使用することができる。この動物に生理食塩水などで希釈した抗原を静脈内投与後、3日目に摘出した脾臓より調製した脾細胞を骨髓腫瘍細胞株 (ミエローマ) と融合させ、常法によりハイブリドーマを作製する。マウス由来のミエローマとしては、例えばP3X63, Ag8.653やSp2/0-Ag14などが挙げられる。脾細胞とミエローマとの細胞融合は公知の方法、例えばKoehlerとMilsteinの方法 (Koehler, G. and Milstein, C. Nature, 256, 495-497, 1975) が一般的である。感作脾細胞とミエローマは通常行われている細胞数の比率に混合し、牛胎児血清 (FCS) 不含培地にポリエチレングリコールを添加して融合処理を行い、FCS添加HAT選択培地で培養を行い融合細胞 (ハイブリドーマ) を選択する。このハイブリドーマ培養上清を用いて、EIA法などの通常用いられる抗体の検出方法により、該抗原を特異的に認識する目的抗体を生産しているハイブリドーマを選別する。得られた細胞を限界希釈法にてクローニングすることにより、安定なハイブリドーマを樹立することができる (Harlow, E. & Lane, D., Antibodies, Cold Spring Harbor Lab. (1988))。

【0015】ハイブリドーマを常法に従って培養した培養上清、または動物の腹腔内に接種して得られる腹水から、抗体を精製することができる。培養上清あるいは腹水に含まれる抗体は、塩析法、イオン交換及びゲルクロマトグラフィー、プロテインAまたはGを用いたアフィニティークロマトグラフィーなど通常用いられる方法により精製することができる (Harlow, E. & Lane, D., Antibodies, Cold Spring Harbor Lab. (1988))。このようにして得られた多くのモノクローナル抗体より、(1) OCIF、OBM又はsOBMと結合するモノクローナル抗体を選抜した後、更にその中からOCIF/sOBM複合体と結合する抗体を選抜するか、あるいは、(2) 直接OCIF/sOBM複合体と結合する抗体を選抜することにより、所望の抗体を生産するハイブリドーマを取得することができる。得られたハイブリドーマの培養物から、前述の精製手段に加え、OCIF/sOBM複合体を用いたアフィニティークロマトグラフィー等を使用することにより、OCIF/sOBM複合体と結合する抗体を取得することができる。

【0016】このようにして得られた本発明の抗体は、

OCIF/sOBM免疫学的測定又は検定に使用することができる。そのような測定又は検定として、ウェスタンブロッティング法、免疫沈降法、EIA、ラジオイムノアッセイ法（radio immunoassay：RIA）等を例示することができる。また、そのような測定又は検定には、ヒト又はヒト以外の哺乳動物由来の試料（血液、血漿、血清、組織、関節液、尿、リンパ液等）、細胞（培養細胞、細胞株等）、その培養上清、それらの抽出物、それらの部分精製画分等を試料として使用することができ、好適な試料は血漿又は関節液である。

【0017】本発明はヒト又はヒト以外の哺乳動物における骨代謝異常症の診断方法を提供する。該診断方法は、OCIF/sOBM複合体の量又は濃度を測定する工程を含む方法であれば特に限定されるものではないが、例えば、下記[1]及び[2]の工程を含有する；

[1] 被検者または健常者の試料中に含有されるOCIF/sOBM複合体の量を測定する工程；

[2] 健常者の試料中に含有される該複合体の量と比較して、被検者の試料中に含有される該複合体の量が多い場合、該被検者が骨代謝異常症に罹患していると判定する工程。

【0018】好適な診断方法では、上記工程[2]において、健常者の試料中に含有される該複合体の量と比較して、被検者の試料中に含有される該複合体の量が2倍以上多い場合、該被検者が骨代謝異常症に罹患していると判定するか、又は、被検者の又は健常者の試料に含有されるOCIF/sOBM複合体の量をそれぞれ3回以上測定したとき、被検者試料に含有されるOCIF/sOBM複合体の量の平均値が、健常者の試料に含有されるOCIF/sOBM複合体の量の平均値にその標準偏差を2倍した値を加算した値以上である場合、該被検者が骨代謝異常症に罹患していると判定する。また、より好適な診断方法では、上記工程[1]において、OCIF/sOBM複合体の量を測定する際、本発明の提供する抗体を使用する。そのような抗体を使用する測定方法としては、ELISA、サンドイッチ（sandwich）EIA等の各種EIAを例示することができ、好適にはサンドイッチEIA（Harlow, E. & Lane, D., Antibodies, Cold Spring Harbor Lab. (1988)）を挙げることができる。サンドイッチEIAの場合、一次抗体及び二次抗体として、本発明の抗体を少なくとも2つ選択し、一次抗体を不溶性担体等に固相化し、二次抗体を標識抗体としてOCIF/sOBM検出に使用する。なお、本発明の好適な抗体である、ハイブリドーマ01-30（FERM BP-7872）により生産されるモノクローナル抗体及びハイブリドーマH-OB M1（FERM BP-6264）又はハイブリドーマ#207（FERM BP-7953）により生産されるモノクローナル抗体（#207）を組合せる場合、前者を一次抗体として、後者を二次抗体としてそれぞれ使用することが望ましい。また、本発明の診断方法における「被検者が骨代謝異常症に罹患している」なる句には、被検者が骨代謝異常症に既に罹患し

ていることに加え、被検者が骨代謝異常症に罹患する危険性を有することもその意味に包含される。さらに、本発明において被検者又は健常者は、ヒト又はヒト以外の哺乳動物である。また、本発明の診断方法における上記工程[1]はOCIF/sOBM複合体の測定方法として本発明に包含される。

【0019】本発明はヒト又はヒト以外の哺乳動物における骨代謝異常症の診断用キットを提供する。該キットは本発明の抗体を少なくとも1つ含有すれば特に限定されるものではないが、サンドイッチEIAによる測定に使用される場合には本発明の抗体を少なくとも2つ含有し、好適にはそれらのうち的一方が不溶性担体に固相化された抗体であり他方は標識された抗体である。また、本発明のキットは、溶解剤、検体の希釈液、標識抗体の希釈液、OCIF/sOBM複合体標準品、洗浄剤、標識酵素の基質、標識酵素の反応停止液等を適宜含有してもよい。不溶性担体としては、例えばポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリエステル、ポリアクリルニトリル、ラテックス、ラテックスに金属等をメッキした磁性微粒子などの高分子及びこれらの組み合わせなどを明示することができる。また不溶性担体の形状としては、トレイ状、球状、容器状、試験管、多孔性フィルター、マイクロタイタープレートなど、種々の形状をとることができる。

【0020】標識抗体の標識物質としては、酵素、蛍光物質、発光物質、及び放射性物質などを使用するのが有利である。酵素としてはペルオキシダーゼ（peroxidase：以下、「POD」という。）、アルカリフォスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼなどを、蛍光物質としてはフルオレセインイソチオシアネート、フィコビリプロテインなどを、発光物質としては、イソルシノール、ルシゲニンなどを、そして放射性物質としては ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{14}C 、 ^3H などを用いることができる。又、これらの例示したものに限らず、ビオチン等の免疫学的測定法に使用し得るものであれば特に限定されない。標識物質が酵素である場合には、その活性を測定するために基質、また必要により発色剤が用いられる。酵素としてPODを用いる場合には、基質として H_2O_2 を用い、発色剤として2, 2'-アジノジ-（3-エチルベンズチアゾリンスルホン酸）アンモニウム塩（ABTS）、5-アミノサリチル酸、*o*-フェニレンジアミン、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジンなどを、酵素にアルカリフォスファターゼを用いる場合は基質として*o*-ニトロフェニルフォスフェート、4-メチルウンベリフェリルリン酸などを、酵素に β -D-ガラクトシダーゼを用いる場合は基質としてフルオレセイン-ジ-（ β -D-ガラクトピラノシド）、4-メチルウンベリフェリル- β -D-ガラクトピラノシドなどを用いることができる。

【0021】溶解剤としては免疫学的測定に通常使用されるものであればよく、例えばリン酸塩緩衝液、トリス

塩酸緩衝液、酢酸塩緩衝液などを含んだpHが6.0~8.0の範囲のものが好適な例として示される。さらに洗浄剤としては、同様に免疫学的測定に通常使用されているものがそのまま使用される。その例としては、生理食塩水、食塩を含むリン酸緩衝液、食塩を含むトリス緩衝液及びこれらの混合液があげられる。これらの洗浄剤にはさらにTritonX-100、Tween20またはBrij35のような非イオン系界面活性剤、ドデシル硫酸ナトリウム、CHAPSのようなイオン系界面活性剤を加えてもよい。また、本発明の提供する骨代謝異常症の診断用キットは、OCIF/sOBM複合体の測定用キットとしても本発明に包含される。本発明は、本発明の抗体を含有する医薬組成物及び骨代謝異常症予防剤又は治療剤を提供する。

【0022】モノクローナル抗体を本発明の医薬組成物に含有せしめてヒトへ投与する場合であり、且つ、該モノクローナル抗体がヒト以外の哺乳動物に由来する場合、好適には、該モノクローナル抗体をヒト化する。例えば、マウス由来のモノクローナル抗体をヒトに投与した場合、ヒト抗マウス抗体応答(human antimouse antibody: 以下「HAMA」という。)が起こる(シュロップら、Cancer Res., 45, 879-85 (1985) 参照)。マウスに由来するモノクローナル抗体を長期間又は継続してヒトへ投与する場合、該モノクローナル抗体をヒト化する。一般に、抗体は、分子量約50000の免疫グロブリン重鎖(以下、「重鎖」と呼ぶ。)と分子量約23000の免疫グロブリン軽鎖(以下、「軽鎖」と呼ぶ。)の各2本から構成されている。重鎖及び軽鎖は、それぞれアミノ末端より約110残基において可変領域と称されるアミノ酸配列の異なる領域を有している。更にこの可変領域の中でも特にアミノ酸配列の変異の頻度が高い領域を超可変領域といい、アミノ末端から30番目、50番目及び95番目付近にそれぞれ位置する。抗体分子においては、この超可変領域が集合して、抗原が結合できる表面構造を形成できるよう折りたたまれている。このように超可変領域(variable region)が抗原結合部位の形成に関与していることから、超可変領域を相補性決定領域(complementary determining region: 以下「CDR」という。)と、2つのCDRに挟まれた部分をフレームワーク(frame work region: 以下「FR」という。)とそれぞれ呼ぶ。カバトラは、重鎖、軽鎖の可変領域の一次配列を多数収集し、配列の保存性に基づき、それぞれの一次配列をCDRおよびフレームワークに分類した表を作成した(カバトラ、SEQUENCES OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5th edition, NIH publication, No.91-3242, E.A.Kabatt et al.参照)。また、各フレームワークは、アミノ酸配列が共通の特徴を有する複数のサブグループに分類された。さらに、ヒトとマウスの間で対応するフレームワークが存在することも見いだされた。本発明のヒト化抗体は、ヒト以外の動物由来のモノクローナル抗体中の可変領域をヒト由来の定常領域に接合したキメラ抗体(Proc. Natl. Acad. Sc

i. U.S.A, 81, 6851-6855, (1984) 参照)、及び、CDR以外の部位をヒト抗体のアミノ酸配列で置換した抗体(CDR-grafted抗体:P.T.Jones et al., Nature 321,522 (1986))のいずれであってもよく、好適にはより免疫原性の低いCDR-grafted抗体である(Riechmann, L., et al., Nature 332, 323-327 (1988); Isaacs, J.D. et al., Lancet 340, 748-752 (1992))。CDR-grafted抗体を作製するには、CDR配列全体及びFR配列の一部のアミノ酸残基をヒト抗体へ移植するように、可変領域のアミノ酸配列を設定する必要がある。この設計は、以下の方法に従う。一般に、移植すべきCDRを有する非ヒト哺乳動物由来抗体は「ドナー(donor)」、CDRが移植される側のヒト抗体は「アクセプター(acceptor)」と定義されるが、本発明もこの定義に従う。ヒト化のデザインを行う場合、アクセプターのサブグループの選択指針としては、

天然のアミノ酸配列を有する公知のヒト抗体の免疫グロブリン重鎖、軽鎖の天然の組み合わせをそっくりそのまま用いる、

重鎖、軽鎖が属するサブグループとして組み合わせは保存するが、重鎖、軽鎖としては、それぞれ異なるヒト抗体に由来し、ドナーの重鎖、軽鎖のアミノ酸配列と同一性が高いアミノ酸配列、またはコンセンサス配列を用いる、のいずれかが選択されている。本発明においても、上記の指針に従うことができるが、これらと異なる方法として、

サブグループの組み合わせを考慮することなく、ドナーのFRと最も同一性の高い重鎖、軽鎖のFRをヒト抗体の一次配列ライブラリーの中から選択するという方法を採用することも可能である。これらの選択法により、ドナーおよびアクセプター間での、FR部分のアミノ酸の同一性を少なくとも70%以上とすることが可能となる。この方法を採用することにより、ドナーより移植するアミノ酸残基の数をより少なくすることが可能となり、HAMA応答の誘導を減少させることができる。

【0023】また、抗体分子の一次配列より三次構造を予測する操作はその予測精度に限界があり、そのドナーが属するサブグループにおいて稀にしか出現しないアミノ酸残基の役割を十分に特定することができない。クイーンらの方法(特表平4-502408号公報参照)に従い、かかる位置においてドナー、アクセプターのいずれのアミノ酸残基を選択すべきかを判断することは困難である。

の選択法によれば、このような判断をする機会を著しく減少することができる。

【0024】OCIF/sOBM複合体に結合する抗体を各種骨代謝異常症の予防又は治療に用いる場合、種々の形態で投与され得るが、疾患の種類、疾患の程度、患者の年齢、患者の性別等に応じて適宜選択することができる。例えば、錠剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、シロップ剤は経口投与され、注射剤は単独で若しくはブドウ

糖、アミノ酸等の通常の補液と混合して静脈内投与されるか、又は単独で筋肉内投与、皮下投与、皮内投与、腹腔内投与され、坐剤は直腸内投与される。これらの製剤は、常法に従い、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、矯味矯臭剤、溶解補助剤、懸濁剤、コーティング剤等、医薬の製剤分野において通常使用しうる公知の補助剤を用いて製剤化することができる。

【0025】錠剤の形態に成形するには、担体として当該分野で公知のものを広く使用できる。そのような担体としては、例えば、乳糖、白糖、塩化ナトリウム、ブドウ糖、尿素、澱粉、炭酸カルシウム、カオリン、結晶セルロース、ケイ酸等の賦形剤；水、エタノール、プロパノール、単シロップ、ブドウ糖液、澱粉液、ゼラチン溶液、カルボキシメチルセルロース、セラック、メチルセルロース、リン酸カリウム、ポリビニルピロリドン等の結合剤；乾燥澱粉、アルギン酸ナトリウム、寒天末、ラミナラン末、炭酸水素ナトリウム、炭酸カルシウム、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類、ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸モノグリセリド、澱粉、乳糖等の崩壊剤、白糖、ステアリン、カカオバター、水素添加油等の崩壊抑制剤；第4級アンモニウム塩基、ラウリル硫酸ナトリウム等の吸収促進剤；グリセリン、澱粉等の保湿剤；澱粉、乳糖、カオリン、ベントナイト、コロイド状ケイ酸等の吸着剤；精製タルク、ステアリン酸塩、硼酸末、ポリエチレングリコール等の潤滑剤等を挙げることができる。また、錠剤は必要に応じ通常の剤皮を施した錠剤、例えば糖衣錠、ゼラチン被包錠、腸溶被錠、フィルムコーティング錠、二重錠、多層錠等とすることができる。

【0026】丸剤の形態に成形するには、担体として当該分野で公知のものを広く使用できる。そのような担体としては、例えば、ブドウ糖、乳糖、カカオバター、澱粉、硬化植物油、カオリン、タルク等の賦形剤；アラビアゴム末、トラガント末、ゼラチン、エタノール等の結合剤；ラミナラン、寒天等の崩壊剤等を挙げることができる。坐剤の形態に成形するには、担体として当該分野で公知のものを広く使用できる。そのような担体としては、例えば、ポリエチレングリコール、カカオバター、高級アルコール、高級アルコールのエステル類、ゼラチン、半合成グリセリド等を挙げることができる。注射剤として調製される場合には、液剤及び懸濁剤は殺菌され、且つ血液と等張であることが好ましい。これらの液剤、乳剤および懸濁剤の形態に成形するには、希釈剤として当該分野で公知のものを広く使用でき、例えば、水、エタノール、プロピレングリコール、エトキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類等を挙げることができる。なお、この場合、血液との等張性を保つのに十分な量の食塩、ブドウ糖、グリセリン等を医薬製剤中に含有せしめてもよく、また通常

の溶解補助剤、緩衝剤、無痛化剤等を添加してもよい。また、必要に応じて着色剤、保存剤、香料、風味剤、甘味剤、他の医薬等を含有せしめてもよい。

【0027】これらの医薬製剤中に含まれる、OCIF/sOBM複合体に結合する抗体の量は、特に限定されるものではないが、通常0.1乃至70重量%であり、好適には1乃至30重量%である。OCIF/sOBM複合体に結合する抗体の投与量は、症状、年齢、体重、投与形態、剤形等に依存するが、通常成人に対して1日あたり、上限500乃至1,000mg、下限10乃至50mgであり、好適な範囲は50乃至500mgである。OCIF/sOBM複合体に結合する抗体を有効成分として含有する医薬の投与回数は、投与形態、剤形等に依存するが、数日に1回、1日1回、又は1日数回である。本発明は、本発明のモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマをも提供する。そのようなハイブリドーマは、OCIF/sOBMと結合する抗体を生産する細胞であれば限定されるものではなく、ハイブリドーマ01-30 (FERM BP-7872) により生産されるモノクローナル抗体が結合する部位 (epitope) と特異的に結合するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ、ハイブリドーマH-OBM1 (FERM BP-6264) 又はハイブリドーマ#207 (FERM BP-7953) により生産されるモノクローナル抗体 (#207) が結合する部位 (epitope) と特異的に結合するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ等を例示することができ、好適な例としてハイブリドーマ01-30 (FERM BP-7872)、ハイブリドーマH-OBM1 (FERM BP-6264)、ハイブリドーマ#207 (FERM BP-7953) 等を挙げることができる。

【0028】

【実施例】次に実施例をもって本発明をより詳細に説明するが、これらは単に例示するのみであり、本発明はこれらによって何ら限定されるものではない。

実施例1 抗OCIFモノクローナル抗体の作製

抗OCIFモノクローナル抗体は、Yanoらの方法 (J. Bone & Mineral Res., 14, 518-527 (1999)) に従って作製した。即ち、Tomoyasuらの方法 (Biochem. Biophys. Res. Commun., 245, 382-387 (1998)) に従って精製されたヒトOCIF単量体及び2量体の混合物でBALB/cマウスを免疫し、次いで該マウスより脾臓を回収した。得られた脾臓細胞及びマウスミエローマ細胞 (P3×63.Ag8.653) を細胞融合することによりハイブリドーマを作製し、OCIFを固相化したEIAを用いて、これら細胞の中からOCIFに特異的に結合する抗体を産生している細胞を選択した。OCIFに特異的に結合する抗体の産生が認められたハイブリドーマを限界希釈法によりクローニングする操作を3乃至5回行い、抗体生産量の高いクローンを選別した。得られたクローンを、あらかじめプリスタン (アルドリッチケミカル社) を投与しておいたBALB/cマウスの腹腔内に $1 \sim 10 \times 10^6$ 細胞/匹となるよう投与し、約2週間後にその腹水を採取した。この腹水より、アフィゲルプロテ

インAセファロース（バイオラッド社）を用いて、キット添付のプロトコールに従いアフィニティークロマトグラフィーを行ない、40種類の抗体を精製した。得られた精製抗体をSDS-PAGEに供したところ、それぞれ分子量約150,000の位置に均一なバンドが検出された。

【0029】実施例2 抗sOBMモノクローナル抗体の作製

抗sOBMモノクローナル抗体は、Yanoらの方法（J. Bone & Mineral Res., 14, 518-527（1999））に基本的に準じて作製した。即ち、W098/46644号公報記載の方法に準じて精製されたヒトsOBMでBALB/cマウスを免疫し、次いで該マウスより脾臓を回収した。得られた脾臓細胞及びマウスミエローマ細胞（P3×63.Ag8.653）を細胞融合することによりハイブリドーマを作製し、これら細胞の中からsOBMを固相化したEIAによって、sOBMに特異的に結合する抗体を産生している細胞を選択した。sOBMに特異的に結合する抗体の産生が認められたハイブリドーマを限界希釈法によりクローニングする操作を3乃至5回行い、抗体生産量の高いクローンを選別した。得られた生産株を、あらかじめプリスタン（アルドリッチケミカル社）を投与しておいたBALB/cマウスの腹腔内に $1 \sim 10 \times 10^6$ 細胞/匹となるよう投与し、約2週間後にその腹水を採取した。この腹水より、プロテインAカラム（ファルマシア社）を用いて、キット添付のプロトコールに従いアフィニティークロマトグラフィーを行ない、40種類の抗体を精製した。得られた精製抗体をSDS-PAGEに供したところ、それぞれ分子量約150,000の位置に均一なバンドが検出された。

【0030】実施例3 標準OCIF/sOBM複合体の作製

0.1% Tween20を含む10mMリン酸緩衝液（pH7.4）-0.15 M NaCl（PBST）へTomoyasuらの方法（Biochem. Biophys. Pres. Commun., 245, 382-387（1998））に従って得られたヒトOCIF単量体を60 µg/mlとなるように、W098/46644号公報に記載の方法に従って得られたヒトsOBMを40 µg/mlとなるようにそれぞれ溶解させ、4で18時間インキュベートし、ヒトOCIF/ヒトsOBM複合体を作製した（複合体として100 µg/ml）。複合体が形成されていることをDavisらの方法（Ann. N. Y. Acad. Sci. 121, 404（1964））を一部改変し、非変性条件下の電気泳動（NativePAGE）により調べた。即ち、上記ヒトOCIF/ヒトsOBM複合体およびヒトOCIF単量体、ヒトsOBMを等量のサンブルバッファー（0.0625M Tris-HCl（pH6.8）, 15% Glycerol, 0.001 %BPB）と混合し、そのサンプル混合液10 µlをNative PAGEにより解析した。泳動ゲルはマルチゲル4/20（第一化学社）、泳動バッファーは0.025M Tris-0.192M Glycine（pH8.4）、ゲルの染色はシルバーステインKANTO（関東化学）を用いた。結果を図1に示す。この結果、ヒトOCIF単量体（レーン2）およびヒトsOBM（レーン3）は、Native PAGEにてそれぞれ異なる位置に単一バンドを示した。それぞれを混合して作製した複合

体（レーン1）は、ヒトOCIF単量体又はヒトsOBMとは異なる位置にバンドが検出された。さらにレーン1において、ヒトOCIF単量体およびヒトsOBMに相当する位置に蛋白質が検出されなかった。以上の結果から、ヒトOCIF単量体およびヒトsOBMがこの条件下で反応し、複合体を形成していることが示された。

【0031】実施例4 OCIF/sOBM複合体のEIAによる測定

（1）抗sOBMモノクローナル抗体の選択

実施例2で得られた抗sOBMモノクローナル抗体40種類を固相化抗体として、W096/26217号公報に記載のウサギ抗OCIFポリクローナル抗体を標識抗体としてサンドイッチEIAを構築した。ウサギ抗OCIFポリクローナル抗体の標識は、マレイミド活性化パーオキシダーゼキット（ピアス社）を用いて行った。40種類の抗sOBMモノクローナル抗体をそれぞれ10 µg/mlとなるよう0.1M炭酸水素ナトリウム溶液（pH9.6）に溶解し、100 µlずつ96ウェルイムノプレート（メンク社）の各ウェルに加え、4で晩静置して固相化した。各ウェルの溶液を捨て、25%（V/V）のブロックエース（大日本製薬株式会社製）300 µlを加え、室温で2時間静置しブロッキングした。その後、プレートをPBSTで洗浄した。

【0032】次に、実施例3で得られたOCIF/sOBM複合体をそれぞれ40%ブロックエースを含むPBSTに溶解、希釈して100 µlずつ各ウェルに加え、室温で2時間反応させた。2時間後、プレートをPBSTで洗浄し、25%ブロックエースを含むPBSTで1000倍希釈した、PODで標識したウサギ抗OCIFポリクローナル抗体を各ウェルに100 µl加え、室温で2時間反応させた。プレートをPBSTで洗浄した後、各ウェルに100 µlの酵素基質溶液（TMB、ScyTec社）を加えて発色させた後、反応停止液（ScyTec社）を100 µlずつ各ウェルに加えて酵素反応を停止した。各ウェルの450nmにおける吸光度を、マイクロプレートリーダー（イムノリーダーNJ2000：日本インターメッド社）を用いて測定した。この結果、40種類の抗sOBMモノクローナル抗体のうち、8種類がOCIF/sOBM複合体に結合することが確認された。又、図2に示す通り、207がOCIF/sOBM複合体に対する反応性が最も高かった。なお、#207を生産するハイブリドーマは、平成9年11月5日、日本国茨城県つくば市東1-1-3の通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（現 日本国茨城県つくば市東1-1-1中央第6の独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター）に、H-OBM1として国際寄託され、受託番号FERM BP-6264を付与された。また、#207を生産するハイブリドーマは、平成13年2月19日、日本国茨城県つくば市東1-1-3の通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（現 日本国茨城県つくば市東1-1-1中央第6の独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター）に、#207として寄託され、受託番号FERM P-18210を付与された後、平成14年3月11日に国際寄託へ移管され、受

託番号FERM BP-7953を付与された。

【0033】(2)抗OCIFモノクローナル抗体の選択
上記(1)で得られた抗sOBMモノクローナル抗体#207を固相化抗体として、実施例1で得られた抗OCIFモノクローナル抗体40種類を標識抗体としてサンドイッチEIAを構築した。抗OCIFモノクローナル抗体の標識は、マレイミド活性化パーオキシダーゼキット(ピアス社)を用いて行った。抗sOBMモノクローナル抗体(#207)を10μg/mlとなるよう0.1M炭酸水素ナトリウム溶液(pH9.6)に溶解し、100μlずつ96ウェルイムノプレート(ヌンク社)の各ウェルに加え、4℃で一晩静置し固相化した。各ウェルの溶液を捨て、25%ブロックエース(大日本製薬株式会社製)300μlを加え、室温で2時間静置してブロッキングした。その後、プレートをPBSTで洗浄した。

【0034】次に、実施例3で得られたOC1F/sOBM複合体をそれぞれ40%ブロックエースを含むPBSTに溶解、希釈して100μlずつ各ウェルに加え、室温で2時間反応させた。反応後、プレートをPBSTで洗浄し、25%ブロックエースを含むPBSTで1000倍希釈した、PODで標識した抗OC1Fモノクローナル抗体40種のいずれかを各ウェルに100μlに加え、室温で2時間反応させた。プレートをPBSTで洗浄した後、各ウェルに100μlの酵素基質溶液（TMB、ScyTec社）を加えて発色させた後、反応停止液（ScyTec社）を100μlずつ各ウェルに加えて酵素反応を停止した。各ウェルの450nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダーにて測定した。この結果、40種類の抗OC1Fモノクローナル抗体のうち、6種類がOC1F/sOBM複合体に結合することが確認された。又、図3に示す通り、OI-30がOC1F/sOBM複合体に対する反応性が最も高いことが明らかとなった。このハイブリドーマは、平成11年4月14日、日本国茨城県つくば市東1-1-3の通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（現 独立行政法人産業技術研究所特許生物寄託センター）に、OI-30として寄託され、受託番号FERM P-17366を付与され、平成14年2月1日に国際寄託に移管され、受託番号FERM BP-7872を付与された。

【0035】(3) 固相化及び標識化の選択

上記(1)で得られた抗ヒトsOBMモノクローナル抗体#207又は上記(2)で得られた抗OCIFモノクローナル抗体O1-30を、それぞれ10 µg/mlとなるよう0.1M炭酸水素ナトリウム溶液(pH9.6)に溶解し、100 µlずつ96ウェルレイムノプレート(ヌンク社)の各ウェルに加え、4 晩静置して固相化した。各ウェルの溶液を捨て、25%ブロックエース(大日本製薬株式会社製)300 µlを加え、室温で2時間静置しブロッキングした。その後、プレートをPBSTで洗浄した。次に、実施例3で得られたOCIF/sOBM複合体5ng/mlをそれぞれ40%ブロックエースを含むPBSTに溶解、希釈して100 µlずつ各ウェルに加え、室温で2時間反応させた。2時間後、プレートをPBSTで洗浄し、#207を固相化した場合はPODで標識したO1-30を、O1-30を固相化した場合にはPODで標識した#207を、それぞれ25%

ブロックエース含有PBSTで希釈して各ウェルに100 μ l 加え、室温で2時間反応させた。プレート をPBSTで洗浄した後、各ウェルに100 μ l の酵素基質溶液 (TMB、ScyTec社) を加えて発色させた後、反応停止液 (ScyTec社) を100 μ l ずつ各ウェルに加えて酵素反応を停止した。各ウェルの450nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダーにて測定した。結果を図4に示す。その結果、01-30を固相化抗体 (一次抗体)、#207を標識抗体 (二次抗体) とした方が、他方の組み合わせに比べて、OCIF/sOBM複合体を高感度に検出できることが確認された。

【0036】実施例5 検量線の作製

実施例3で調製したOCIF/sOBM複合体標準品を0~100ng/mlの濃度範囲で用いて、実施例4(3)の方法、即ち0I-30を固相化抗体とし、且つ#207を標識抗体としたサンドイッチEIAによる測定を行い、検量線を作成した。その典型的な結果を図5に示す。このEIA法によって、複合体濃度の上昇に伴う吸光度の増加が確認され、この検量線から1乃至25ng/mlの濃度範囲でOCIF/sOBM複合体が定量できることが明らかとなった。

【0037】実施例6 検体中に含まれるOCIF/sOBM複合
体量の測定

健常者血清中又はリウマチ因子陽性患者血漿中のOCIF/sOBM複合体の量を0I-30を固相化抗体に、#207を標識抗体にそれぞれ使用したサンドイッチEIAにより測定した。0I-30を10 μ g/mlとなるように0.1M炭酸水素ナトリウム溶液 (pH9.6) に溶解し、100 μ lずつ96ウェルイムノプレート (ヌンク社) の各ウェルに加え、4 で一晩静置することにより0I-30抗体を固相化した。各ウェル中の溶液を捨て、25%ブロックエース (大日本製薬株式会社製) 300 μ lを加え、室温で2時間静置しブロッキングした。その後、プレートをPBSTで洗浄した。健常者の血清 (BioWhittaker 社) 及びリウマチ因子陽性患者の血漿 (International Enzymes, Inc社製) 3種をそれぞれ40%ブロックエースを含むPBSTに溶解させ、2倍希釈して100 μ lずつ3連で各ウェルに加え、室温で2時間反応させた。反応後、プレートをPBSTで洗浄し、POD標識した#207を25%ブロックエース含有PBSTで希釈して各ウェルに100 μ lに加え、室温で2時間反応させた。反応後、プレートをPBSTで洗浄し、各ウェルに100 μ lの酵素基質溶液 (TM B, ScyTec社) を加えて発色させた後、反応停止液 (Scy Tec社) を100 μ lずつ各ウェルに加えて酵素反応を停止した。各ウェルの450nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダーにて測定し、測定値につき平均値及び標準偏差を算出した。また、算出された数値につき、スチューデントt-検定を行った。結果を図6に示す。リウマチ因子陽性患者の血漿中のOCIF/sOBM複合体量の平均値は、健常者の血清中のOCIF/sOBM複合体量の平均値を2倍した値より大きく、且つ、健常者の血清中のOCIF/sOBM複合体量の平均値に、その標準偏差を2倍した値を加算した値よりも大きかった。また、リウマチ因子陽性患者

の血漿中に含まれるOCIF/sOBM複合体量は、健常者の血清中のそれと比較して統計学的に有意に多かった。

【0038】実施例7 (1) OCIF/sOBM複合体測定用キットの製造(80検体用)

(1) ハイブリドーマ01-30により生産される抗体を実施例4の方法で固相化し、予めブロックエースでブロッキングした96ウェルプレート：1枚

(2) 実施例4の方法でPOD標識した#207抗体：10μl

(3) OCIF/sOBM複合体標準品：1、2.5、5、10、25ng/mlの5濃度各400μl

(4) 検体の希釈液(0.01% Tween20と40%ブロックエースを含むPBS溶液)：10ml

(5) 標識抗体の希釈液(0.01% Tween20と25%ブロックエースを含むPBS溶液)：10ml

(6) 96ウェルプレート洗浄液(0.1% Tween20を含むPBS溶液)：1リットル

(7) 標識酵素の活性測定をするための基質溶液(ここではTMB溶液)：10ml

(8) 反応停止液(TMB stopping reagent)：10ml

【0039】(2) キットを用いた測定

プレート(1)の各ウェルに希釈液(4)で希釈した検体、正常プール血清及びOCIF/sOBM複合体標準品(3)を3連で100μlずつ加える。室温にて約2時間放置した後、洗浄液(300μl)でプレートの各ウェルを5～6回洗浄する。この洗浄操作には自動プレートウォッシャーを用いてもよい。洗浄したプレートの各ウェルにPOD標識した#207抗体(2)を希釈液(5)で500倍希釈した溶液100μlずつを加え、さらに室温にて約2時間放置する。洗浄液(6)でプレートの各ウェルを5～6回洗浄する。この洗浄操作には自動プレートウォッシャーを用いてもよい。酵素基質溶液(7)を各ウェルに100μlずつ加え、室温にて20～30分放置する。各ウェルに反応停止液(8)を100μl加えることにより酵素反応を停止する。各ウェルの450nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダーにて測定する。OCIF/sOBM複合体標準品(3)を加えた各ウェルの450nmの吸光度よりOCIF/sOBM複合体の検量線を作製し、この検量線から各検体のOCIF/sOBM複合体濃度を算出する。

10

20

30

*【0040】

【発明の効果】本発明により、OCIF/sOBM複合体に結合する抗体及びこの抗体を産生するハイブリドーマを得ることができる。本発明の抗体は、骨代謝異常症の予防、治療あるいは診断に有用である。また、本発明により、OCIF/sOBM複合体量を定量することによる骨代謝異常症の診断方法が提供される。さらに本発明によりこの抗体を含む骨代謝異常症の診断用キットが提供される。また、本発明の抗体は、研究用分析試薬としても用いられ得る。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明(実施例3)のOCIF/sOBM複合体を、非変性条件下の電気泳動(Native PAGE)に供した際の結果を示す。

【符号の説明】

レーン1：OCIF/sOBM複合体

レーン2：ヒトOCIF単量体

レーン3：ヒトsOBM

【図2】 本発明(実施例4)の抗sOBMモノクローナル抗体を固相化抗体とし、ウサギ抗OCIFポリクローナル抗体を標識抗体として構築したサンドイッチEIAによるOCIF/sOBM複合体の測定結果を示す。

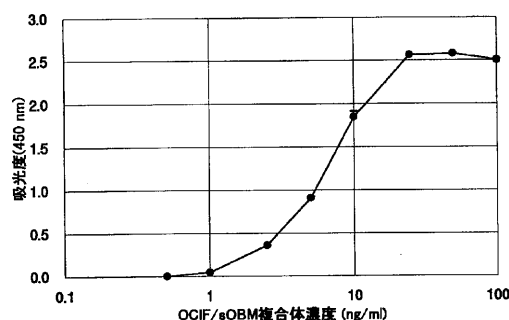
【図3】 本発明(実施例4)の抗sOBMモノクローナル抗体#207を固相化抗体とし、抗OCIFモノクローナル抗体を標識抗体として構築したサンドイッチEIAによるOCIF/sOBM複合体の測定結果を示す。

【図4】 本発明(実施例4)の抗sOBMモノクローナル抗体#207及び抗OCIFモノクローナル抗体01-30をそれぞれ固相化抗体あるいは標識抗体として構築したサンドイッチEIAによるOCIF/sOBM複合体の測定結果を示す。

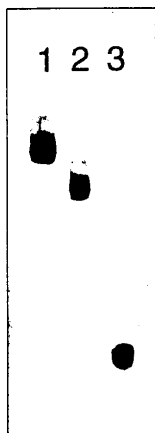
【図5】 本発明(実施例5)の、実施例3で調製したOCIF/sOBM複合体標準品を用いて作成した検量線を示す。

【図6】 本発明(実施例6)の抗sOBMモノクローナル抗体#207を標識抗体とし、抗OCIFモノクローナル抗体01-30を固相化抗体として構築したサンドイッチEIAによる健常者の血清中又はリウマチ因子陽性患者の血漿中のOCIF/sOBM複合体量の測定結果を示す。

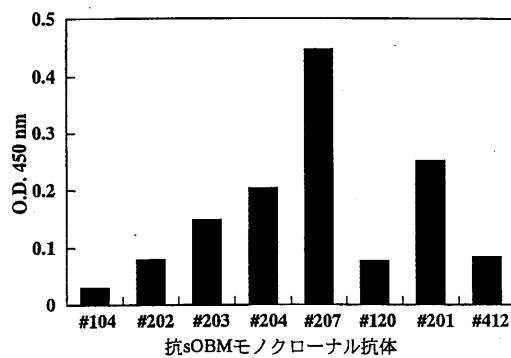
【図5】



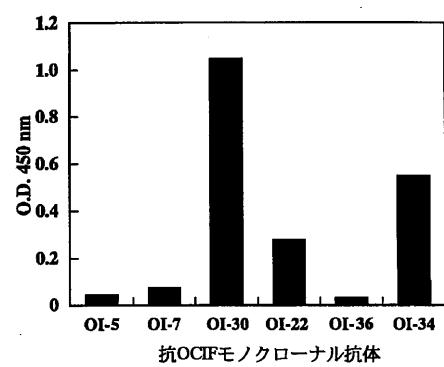
【図1】



【図2】

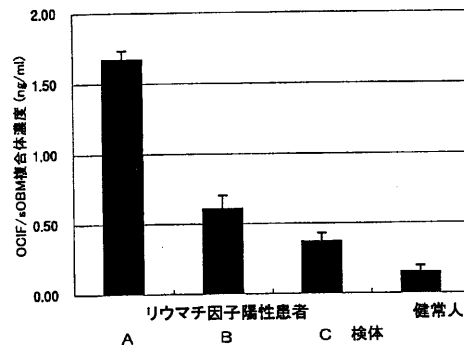
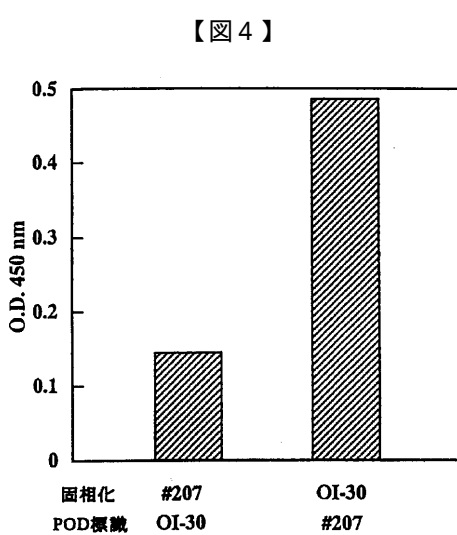


【図3】



【図6】

【図4】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

識別記号

F I

テ-マコード (参考)

A 6 1 P 19/02
19/08
19/10
29/00
C 0 7 K 16/46
C 1 2 N 5/10
15/02
C 1 2 P 21/02
G 0 1 N 33/53
33/577
// C 1 2 P 21/08

1 0 1

A 6 1 P 19/02
19/08
19/10
29/00
C 0 7 K 16/46
C 1 2 P 21/02
G 0 1 N 33/53
33/577
C 1 2 P 21/08
C 1 2 N 15/00
5/00

1 0 1

C
S
B
C
B

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA41 BA61 GA03
GA23 HA15
4B064 AG26 AG27 CA10 CA20 CC24
CE12 DA01 DA13
4B065 AA91X AA91Y AB05 BA08
CA25 CA44 CA46
4C085 AA13 AA14 AA16 BB11 CC02
CC13 CC17 DD33 DD34 DD63
DD86 DD88 EE01 GG02 GG03
GG04 GG05 GG06 GG08
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA41
DA75 DA76 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	抗体及其用途		
公开(公告)号	JP2003160600A	公开(公告)日	2003-06-03
申请号	JP2002083678	申请日	2002-03-25
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社三共		
申请(专利权)人(译)	三共株式会社		
[标]发明人	鷲田尚洋 佐竹紀子 矢野和樹		
发明人	鷲田 尚洋 佐竹 紀子 矢野 和樹		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/395 A61P3/14 A61P17/00 A61P19/02 A61P19/08 A61P19/10 A61P29/00 C07K16/18 C07K16/46 C12N5/10 C12N15/02 C12P21/02 C12P21/08 G01N33/577		
FI分类号	C07K16/18 A61K39/395.D A61K39/395.N A61P3/14 A61P17/00 A61P19/02 A61P19/08 A61P19/10 A61P29/00.101 C07K16/46 C12P21/02.C G01N33/53.S G01N33/577.B C12P21/08 C12N15/00.C C12N5/00.B C12N5/00.102 C12N5/20		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA41 4B024/BA61 4B024/GA03 4B024/GA23 4B024/HA15 4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA91X 4B065/AA91Y 4B065/AB05 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/BB11 4C085/CC02 4C085/CC13 4C085/CC17 4C085/DD33 4C085/DD34 4C085/DD63 4C085/DD86 4C085/DD88 4C085/EE01 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG05 4C085/GG06 4C085/GG08 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	2001088174 2001-03-26 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种治疗或诊断异常骨骼代谢的方法。与破骨细胞生成抑制剂（OCIF）的复合物（OCIF / sOBM复合物）和体液中存在的可溶性OCIF结合分子（sOBM）的复合物（OCIF / sOBM复合物）结合的抗体，一种使用杂交瘤生产抗体的方法，以及含有该抗体作为活性成分的骨代谢疾病的预防或治疗剂。此外，通过测量OCIF / sOBM复合物的量来诊断骨代谢紊乱，特别是类风湿性关节炎的方法，以及用于诊断骨代谢紊乱的试剂盒。该抗体可用于诊断，预防和治疗骨代谢异常，特别是诸如类风湿性关节炎之类的关节疾病，或用作研究的分析试剂。

【図5】

