

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-524475

(P2010-524475A)

(43) 公表日 平成22年7月22日(2010.7.22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 7/06 (2006.01)	C O 7 K 7/06	4 B O 6 5
C O 7 K 16/18 (2006.01)	C O 7 K 16/18	4 C O 8 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 H O 4 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 46 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2010-504426 (P2010-504426)
 (86) (22) 出願日 平成20年3月25日 (2008.3.25)
 (85) 翻訳文提出日 平成21年12月22日 (2009.12.22)
 (86) 国際出願番号 PCT/CN2008/070582
 (87) 国際公開番号 W02008/128456
 (87) 国際公開日 平成20年10月30日 (2008.10.30)
 (31) 優先権主張番号 200710039878.6
 (32) 優先日 平成19年4月24日 (2007.4.24)
 (33) 優先権主張国 中国 (CN)

(71) 出願人 509296281
 シャンハイ・ナショナル・エンジニアリン
 グ・リサーチ・センター・オブ・アンチボ
 ディー・メディシン・カンパニー、リミテ
 ッド
 SHANGHAI NATIONAL E
 NGINEERING RESEARCH
 CENTER OF ANTIBODY
 MEDICINE CO., LTD.
 中華人民共和国、シャンハイ 20120
 3、ジャンジアン・ハイテク・パーク、
 リビング・ロード、ナンバー 399、ビ
 ルディング 3
 Building 3, No. 399
 , Libing Road, Zhan
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 オステオポンチンの機能エピトープ、それと特異的に結合するモノクローナル抗体及び用途

(57) 【要約】

本発明は、オステオポンチンの機能エピトープ、それと特異的に結合するモノクローナル抗体、免疫抱合体およびその抗腫瘍薬の製造のための用途を公開した。さらに、前述モノクローナル抗体をコードする配列及びこの配列を含むベクターと宿主細胞を公開した。また、本発明のモノクローナル抗体或いは免疫抱合体はオステオポンチンの検出に有用である。本発明のモノクローナル抗体或いは免疫抱合体によれば、オステオポンチンを抑制することによって自己免疫疾患を治療・緩和し、関連組織を保護することができるため、自己免疫疾患の治療に有用である。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

WLXPDPである（ただし、Xは任意のアミノ酸である。）オステオポンチンの機能エピトープ。

【請求項 2】

請求項1に記載の機能エピトープと特異的に結合する抗オステオポンチンのモノクローナル抗体。

【請求項 3】

前述モノクローナル抗体の重鎖可変領域のCDRアミノ酸配列は、それぞれIYAMD、RIRSQS NNYTTYADSVKD或いはQMGDY QMGDYから、軽鎖可変領域のCDRアミノ酸配列は、それぞれRAS ENIYSFLA、AATNLAD或いはQHFWGTPFTから選ばれる、ことを特徴とする請求項2に記載のモノクローナル抗体。 10

【請求項 4】

前述モノクローナル抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号4或いは配列番号8から、軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号6或いは配列番号10から選ばれる、ことを特徴とする請求項2に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 5】

前述モノクローナル抗体の定常領域は、マウス抗体の定常領域或いはヒト抗体の定常領域から選ばれる、ことを特徴とする請求項2に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 6】

20

請求項2-5のいずれかに記載のモノクローナル抗体をコードするDNA分子。

【請求項 7】

請求項6に記載のDNA分子を含有するベクター。

【請求項 8】

請求項7に記載のベクターを含む、或いはゲノムに請求項6に記載のDNA分子が組み込まれている宿主細胞。

【請求項 9】

(a) 請求項2に記載のモノクローナル抗体と、

(b) 薬物、毒素、サイトカイン、放射性核種、又は酵素からなる群から選ばれる抱合部分と、
を含むことを特徴とする免疫抱合体。 30

【請求項 10】

請求項2に記載の抗オステオポンチンのモノクローナル抗体或いは請求項9に記載の免疫抱合体の自己免疫疾患を治療する薬物の製造のための使用。

【請求項 11】

請求項2に記載の抗オステオポンチンのモノクローナル抗体或いは請求項9に記載の免疫抱合体と、薬学的に允許される担体と、を含む薬物組成物。

【請求項 12】

請求項2に記載の抗オステオポンチンのモノクローナル抗体或いは請求項9に記載の免疫抱合体を含むオステオポンチン検出用キット。 40

【請求項 13】

生物標本におけるオステオポンチンの存在の有無或いはその含有量を検出する方法であって、

(i) 検出される標本を請求項2に記載の抗オステオポンチンのモノクローナル抗体或いは請求項9に記載の免疫抱合体と接触させることと、

(ii) 抗原-抗体複合体が形成すると、標本におけるオステオポンチンの存在が示されるように、抗原-抗体複合体の形成の有無を検出すること、或いは、標本におけるオステオポンチンの含有量を表すように、形成された抗原-抗体複合体の量を検出すること、
を含む検出方法。 50

【発明の詳細な説明】

【発明の説明】

【0001】

[技術分野]

本発明は、免疫学分野に属し、より具体的に、一種のタンパク質の機能エピトープ、それと特異的に結合するモノクローナル抗体およびこれらの抗体の用途を公開する。

【0002】

[背景技術]

自己免疫とは、生体の免疫系が自身の組織に対して抗体と感作リンパ球を生成させ、免疫応答を引起す現象のことを指す。自己免疫で自身の組織・臓器の機能障害が生じ、且つ臨床症状が現れる場合、自己免疫疾患 (autoimmune disease、AID) と呼ばれる。現在、発見された自己免疫疾患が三十数種あり、原発性のものが多数で、続発性のものが少数である。原発性自己免疫疾患は、病因が不明で、遺伝要素と密接に関わり、臓器特異性のものと全身性のものに分かれる。臓器特異性AIDは、通常、標的抗原と病変がある特定の臓器に限るが、全身性AIDは、通常、標的抗原と病変が全身性又は系統性となっている。近年、自己免疫及びそれによる疾患が注目されつつあり、全世界で数億人がこの疾患によって苦しんでいる。この疾患は、病気経過が長く、身体障害を招き、重篤な場合、死亡の可能性があるため、この問題の広範性及び重大性によって全世界の自己免疫疾患の研究が盛んに行われている。

10

【0003】

20

自己免疫疾患は、発病機構が非常に複雑なので、その確実な発病機構が未だ完全に明らかではない。とりあえず、自己免疫疾患は、ある遺伝的特徴 (AID関連遺伝子多型による) を有する個体が、ある体内・外の発病要素による刺激 (自己抗原の放出、構造変化及びスーパー抗原分子擬態など) 或いは自己免疫反応による細胞の遺伝子変異・修飾などの原因で、抗原提示細胞 (APC) 又は樹状細胞の異常な活性化、免疫制御ネットワークのバランスの崩壊 (TH1/TH2バランスの崩壊)、自己免疫細胞のポリクローナル活性化或いはアポトーシスの延期などの変化が発生することによって生じるものだと考えられる。自己免疫疾患は、遺伝、感染、免疫機能の異常などを含む多くの要素に係る。発病機構が明らかではないが、大量な研究によって、例えばTNF- α 、IL-1 β やIL-6などの各種の炎症因子は、自己免疫疾患の患者におけるレベルが正常者よりも遥かに高く、且つ特に関節リウマチ、強直性脊椎炎、クローン病のような自己免疫疾患の場合、抗TNF- α モノクローナル抗体、IL-1受容体拮抗剤は顕著な治療効果があり、患者の病状を大幅に改善することが見出された (The therapeutic effects of an engineered human anti-tumour necrosis factor alpha antibody (CDP571) in rheumatoid arthritis. 「工学的に改良されたヒト抗腫瘍壊死因子 α 抗体 (CDP571) の関節リウマチにおける治療効果」1995. Br. J. Rheumatol. 34:334-342; Infliximab (chimeric antitumour necrosis factor alpha monoclonal antibody) versus placebo in rheumatoid arthritis patients receiving concomitant methotrexate: a randomised phase III trial. 「メソトレキセートを併用して治療される関節リウマチ患者におけるインフリキシマブモノクローナル抗体 (キメラ抗腫瘍壊死因子 α モノクローナル抗体) とプラシーボとの比較: 無作為化第III相試験」ATTRACT Study Group. Lancet. 1999. 354:1932-1939; Infliximab and methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. 「関節リウマチを治療するためのインフリキシマブモノクローナル抗体とメソトレキセート」N. Engl. J. Med. 2000. 343:1594-1602)。これらの生物治療の効果が顕著であるが、まだこれらの疾患を完全に緩和・治療することができない。近年、大量な研究によって、ケモカインも自己免疫疾患において重要な役割を持ち、精確に白血球の炎症組織への移動を調節・制御し、且つアポトーシスの活性を降下させ、B・T細胞の寿命を延ばすることにより、標的組織を攻撃することが見出された。

30

40

【0004】

オステオポンチン (Osteopontin、OPN) は、初期T細胞活性化因子I (Eta-1) 又は分泌型リン酸化タンパク質Iとも呼ばれ、Arg-Gly-Asp (RGD、アルギニン-グリシン-アスパラギ

50

ン酸)であるトリペプチド配列を含有し、分子量が脱リン酸化やグリコシル化の形態にもよるが、44-66KDの間にあり、重要な多機能細胞外マトリックスタンパク質である(Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. 「Eta-1(オステオポンチン): タイプ1(細胞性)免疫の初期成分」 Science. 2000. 287:860-864)。OPNは、骨組織細胞、マクロファージ、活性化T細胞や上皮細胞などの多種の細胞において発現され、細胞の走化、付着、増殖と移動の誘導、腫瘍の転移、骨組織の石灰化と再構築、免疫の調節、シグナルの伝達及び感染性疾患への免疫能力などの面で重要な作用を持つ(Osteoprotegerin Ligand Is a Cytokine that Regulates Osteoclast Differentiation and Activation. 「オステオプロテゲリンリガンドが破骨細胞の分化及び活性化を調節するサイトカインである」 Cell, 1998. 93:65-176. Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression. 「オステオポンチンの細胞のシグナル伝達と癌の進行における作用」 TRENDS in Cell Biology 2006.16:79-87.)。OPNは、主にRGD及び非RGDの二つの経路によって細胞表面の受容体と結合し、その機能を実現させ(Inhibition of Arg-Gly-Asp (RGD)-mediated Cell Adhesion to osteopontin by a Monoclonal Antibody against osteopontin. 「抗オステオポンチンのモノクローナル抗体のArg-Gly-Asp (RGD)による細胞とオステオポンチンとの接着に対する抑制」 J. Bio. Chem. 1994. 269:23280-23285)、RGD経路では、主に細胞表面のインテグリン受容体($\alpha\gamma\beta3$ 、 $\alpha\gamma\beta1$ 、 $\alpha\gamma\beta5$)と結合するが、非RGD経路では、主にあるCD44の変異体(V6、V7)と結合することにより、細胞の多種の生理機能を誘導する(Intracellular Osteopontin Is an Integral Component of the CD44-ERM Complex Involved in Cell Migration. 「細胞内オステオポンチンは細胞の移動に係るCD44-ERM複合体の構成成分である」 JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY. 2000:184:118 - 130)。つまり、細胞により分泌されるOPNがリン酸化、グリコシル化を経て、さらにトロンピンによる切断などの一連の発現後の修飾作用を経て、多種の状態で生体内に存在し、各状態がその独特な機能を有するかもしれないが、現在の研究では十分に説明できず、さらなる研究と検討が必要である。

【0005】

大量な研究から、自己免疫疾患(関節リウマチ、多発性硬化症、自己免疫性肝炎、クローン病など)において、組織及び血漿におけるOPNのレベルが顕著に上昇することが示された(Expression of osteopontin at sites of bone erosion in a murine experimental arthritis model of collagen-induced arthritis: possible involvement of osteopontin in bone destruction in arthritis. Arthritis Rheum. 「ゼラチンで関節炎が誘導されたマウスの関節炎実験モデルにおける骨侵食部位のオステオポンチンの発現: オステオポンチンが関節炎における骨侵食に係る可能性がある」 2002. 46:1094 - 1101; Role of osteopontin in amplification and perpetuation of rheumatoid synovitis. 「オステオポンチンのリウマチ性滑膜炎の増殖と永続化における作用」 J. Clin. Invest. 2005. 115:1060-1067. Osteopontin/Eta-1 upregulated in Crohn's disease regulates the Th1 immune response. 「アップレギュレートしたオステオポンチン/Eta-1のクローン病におけるTh1免疫反応に対する調節」 Gut. 2005.54:1254-1262. Osteopontin as a Mediator of NKT Cell Function in T Cell-Mediated Liver Diseases. 「T細胞に誘導された肝臓病におけるNKT細胞の機能誘発物であるオステオポンチン」 Immunity, 2004. 21:539-550)。OPNは、リンパ球、マクロファージの表面のCD44及び他のインテグリン受容体と結合することにより、炎症細胞を標的臓器に集めると同時に、さらに各種の炎症細胞の活性化を促進し、大量な炎症誘発性サイトカイン(TNF- α 、IL-1 β 及びIL-6)を分泌する(Essential role of the cryptic epitope SLAYGLR within osteopontin in a murine model of rheumatoid arthritis. 「オステオポンチンの中に隠れる抗原エピトープSLAYGLRのマウス関節リウマチモデルにおける重要な作用」 J. Clin. Invest. 2003. 112:181-188)。また、関節リウマチにおいて、OPNは、破骨細胞の表面の $\alpha\gamma\beta3$ 及び $\alpha\gamma\beta5$ 受容体と結合することによって骨の破壊・吸収を誘導し、RAの発病を重篤化する(Osteopontin. 「オステオポンチン」 Crit Rev Oral Biol Med. 2000;11(3):279-303)。研究から、OPN遺伝子欠陥のマウスにおいて、関節炎の発病率及び重篤度が顕著に低下し(Osteopontin deficiency

protects joints against destruction in anti-type II collagen antibody-induced arthritis in mice. 「マウスにおけるオステオポンチン欠陥が関節を抗II型コラーゲン抗体に誘導された関節炎の破壊から保護する」 PNAS. 2002. 99(7): 4556- 4561)、ConAに誘導された自己免疫性肝炎の発病率及び肝臓の破壊具合も顕著に軽減し(「T細胞に誘導された肝臓病におけるNKT細胞の機能誘発物であるオステオポンチン」, 同上Immunity, 2004. 21:539-550)、かつDSSに誘導されたマウスクローン病に対しても保護作用がある(Osteopontin deficiency protects mice from Dextran sodium sulfate-induced colitis. 「オステオポンチン欠陥がマウスをデキストラン硫酸ナトリウムに誘導された大腸炎から保護する」 Inflamm Bowel Dis. 2006. 12(8):790-6)ことが示された。上述のモデルにおいて、抗OPNのポリクローナル抗体も顕著に関節リウマチモデルのマウスの発病を減少し、関節の腫れ、奇形の具合を軽減することができ(「オステオポンチンの中に隠れる抗原エピトープSLAYGLRのマウス関節リウマチモデルにおける重要な作用」, 同上 J. Clin. Invest. 2003. 112:181-188)、肝臓の炎症に対しても顕著に軽減することができる(「T細胞に誘導された肝臓病におけるNKT細胞の機能誘発物であるオステオポンチン」, 同上Immunity, 2004. 21:539-550)。これらのことから、OPNが自己免疫疾患の発病の要因であるため、自己免疫疾患を治療するための有効な薬物標的になることがわかった。

10

【0006】

[発明の内容]

本発明の目的は、オステオポンチンを治療標的とし、自己免疫疾患を治療するモノクローナル抗体を提供することである。

20

【0007】

本発明の第一は、WLXPDPである(ただし、Xは任意のアミノ酸である。)オステオポンチンの機能エピトープを提供する。

【0008】

一つの好ましい例において、前述機能エピトープにおけるXは、N、M或いはLが好適である。

【0009】

本発明の第二は、前述機能エピトープと特異的に結合する抗オステオポンチンのモノクローナル抗体を提供する。

30

【0010】

一つの実施様態において、前述モノクローナル抗体の重鎖可変領域のCDRアミノ酸配列は、それぞれIYAMD、RIRSQSNNYTTYADSVKD及びQMGDY(例えば、図29のH23C3VHbを参照)から、軽鎖可変領域のCDRアミノ酸配列は、それぞれRASENIYSFLA、AATNLAD及びQHFWGTPFT(例えば、図29のH23C3VLbを参照)から選ばれる。

【0011】

もう一つの実施様態において、前述モノクローナル抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号4或いは配列番号8から、軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号6或いは配列番号10から選ばれる。

【0012】

もう一つの実施様態において、前述モノクローナル抗体の定常領域は、マウス抗体の定常領域或いはヒト抗体の定常領域から選ばれる。

40

【0013】

一つの好適な例において、前述定常領域は、ヒト抗体の定常領域である。もう一つの好適な例において、前述定常領域の重鎖定常領域のアミノ酸配列は、配列番号13である。もう一つの好適な例において、前述定常領域の軽鎖定常領域のアミノ酸配列は、配列番号15である。もう一つの好適な例において、前述モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法又は組換えDNA法で製造されたもの、或いはファージ抗体ライブラリーから分離されたものである。もう一つの好適な例において、前述モノクローナル抗体は、キメラ抗体或いはヒト化抗体である。

【0014】

50

本発明の第三は、本発明の前述のようなモノクローナル抗体をコードするDNA分子を提供する。

【0015】

もう一つの好適な例において、前述DNA分子において、重鎖可変領域をコードするヌクレチオド配列は、配列番号3或いは配列番号7で、且つ軽鎖可変領域をコードするヌクレチオド配列は、配列番号5或いは配列番号9である。

【0016】

本発明の第四は、前述のような本発明のDNA分子を含有するベクターを提供する。

【0017】

本発明の第五は、本発明のベクターを含む、或いはゲノムに本発明のDNA分子が組み込まれている宿主細胞を提供する。

10

【0018】

一つの好適な例において、前述宿主細胞は、原核細胞、好ましくは細菌細胞、或いは、低等真核細胞、好ましくは酵母細胞、或いは、高等真核細胞、好ましくは哺乳動物細胞である。

【0019】

本発明の第六は、(a)本発明のモノクローナル抗体と、(b)薬物、毒素、サイトカイン、放射性核種、又は酵素からなる群から選ばれる抱合部分と、を含む免疫抱合体 (immuno conjugate) を提供する。

【0020】

20

本発明の第七は、本発明の抗オステオポンチンのモノクローナル抗体或いは免疫抱合体の自己免疫疾患を治療する薬物の製造のための用途を提供する。

【0021】

もう一つの好適な例において、前述自己免疫疾患は、関節リウマチ、多発性硬化症、自己免疫性肝炎、強直性脊椎炎、クローン病、リウマチ性脊椎炎、骨関節炎、痛風性関節炎、自己免疫性糖尿病、自己免疫性ブドウ膜炎、ネフローゼ症候群、潰瘍性大腸炎、乾癬性関節炎、未分化型脊椎関節症、及び慢性肝機能不全、並びに体重増加、関節変形、関節の腫れ、関節奇形、関節の湾曲・硬直、重篤な運動障害及びその組合せを含む関節リウマチと関わる他の症状から選ばれる。

【0022】

30

本発明の第八は、本発明の抗オステオポンチンのモノクローナル抗体或いは免疫抱合体と、薬学的に允許される担体と、を含む薬物組成物を提供する。

【0023】

一つの好適な例において、前述薬物組成物は、0.00001~99.9wt%、好ましくは0.0001-90wt%、より好ましくは0.001-75wt%、さらに好ましくは0.01-50wt%の前述のモノクローナル抗体或いは免疫抱合体を含む。もう一つの好適な例において、前述薬物組成物は、さらに、IL-4、IL-6、IL-10を含む抗炎症のサイトカイン及び/又はIL-4拮抗剤、ENBREL (登録商標)、IV型ホスホジエステラーゼ阻害剤、抗炎症の阻害剤及びサイトカイン阻害剤、例えばレフルノミド、非ステロイドの抗炎症薬、例えばナプロキセン、コルチゾール、或いはシクロスポリンからなる群から選ばれる他の活性物質を含む。

40

【0024】

本発明の第九は、本発明の抗オステオポンチンのモノクローナル抗体或いは免疫抱合体を含むオステオポンチン検出用キットを提供する。

【0025】

本発明の第十は、(i)検出される標本を本発明の抗オステオポンチンのモノクローナル抗体或いは免疫抱合体と接触させることと、(ii)抗原-抗体複合体が形成すると、標本におけるオステオポンチンの存在が示されるように、抗原-抗体複合体の形成の有無を検出すること、或いは、標本におけるオステオポンチンの含有量を表すように、形成された抗原-抗体複合体の量を定量的に検出することと、を含む生物標本におけるオステオポンチンの存在の有無或いはその含有量を検出する方法を提供する。

50

【 0 0 2 6 】

一つの好適な例において、前述標本は、前処理されたものでも、前処理されていないものでもよく、好ましくは、抽出、精製又は濃縮などを経たものである。

【 0 0 2 7 】

本発明の他の主旨は、本文の公開される内容によって、この分野の技術者にとっては明らかになっている。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 8 】

【図 1】図1は、ヒト・マウスOPNの真核発現・精製後のSDS-PAGE電気泳動図であり、ここで、Mは、タンパク質の標準分子量を示す。

10

【図 2】図2は、23C3を第一抗体としたウェスタンブロットの測定結果である。

【図 3 a】図3は、23C3モノクローナル抗体による治療のCIAマウスの関節炎発病指数、発病時間及び発病率に対する影響の結果であり、図3aは各治療群のCIAマウスの関節炎発病指数で、図3bは各治療群のCIAマウスの発病関節の写真で、図3cは各治療群のCIAマウスの発病率曲線である。

【図 3 b】図3は、23C3モノクローナル抗体による治療のCIAマウスの関節炎発病指数、発病時間及び発病率に対する影響の結果であり、図3aは各治療群のCIAマウスの関節炎発病指数で、図3bは各治療群のCIAマウスの発病関節の写真で、図3cは各治療群のCIAマウスの発病率曲線である。

【図 3 c】図3は、23C3モノクローナル抗体による治療のCIAマウスの関節炎発病指数、発病時間及び発病率に対する影響の結果であり、図3aは各治療群のCIAマウスの関節炎発病指数で、図3bは各治療群のCIAマウスの発病関節の写真で、図3cは各治療群のCIAマウスの発病率曲線である。

20

【図 4 a】図4は、23C3モノクローナル抗体による治療のCIAマウスの関節の骨吸収に対する保護作用の結果である。

【図 4 b】図4は、23C3モノクローナル抗体による治療のCIAマウスの関節の骨吸収に対する保護作用の結果である。

【図 5】図5は、23C3モノクローナル抗体の体外におけるリンパ球の移動に対する阻害作用の結果である。

【図 6 a】図6は、異なる治療群のCIAマウスの血漿及び関節組織におけるOPNレベルの変化の結果であり、図6aは、血漿におけるOPNレベルの変化の実験結果で、図6bは、関節組織におけるOPNmRNAレベルの変化の実験結果である。

30

【図 6 b】図6は、異なる治療群のCIAマウスの血漿及び関節組織におけるOPNレベルの変化の結果であり、図6aは、血漿におけるOPNレベルの変化の実験結果で、図6bは、関節組織におけるOPNmRNAレベルの変化の実験結果である。

【図 7】図7は、異なる治療群のCIAマウスの関節組織におけるOPN受容体レベルの変化の結果である。

【図 8】図8は、異なる治療群のCIAマウスの関節組織における各種のサイトカインのレベルの変化の結果である。

【図 9 a】図9は、異なる治療群の体外のリンパ球の既往応答反応の変化の結果であり、図9aは、異なる治療群の体外のリンパ球の既往応答反応の変化の結果で、図9bは、異なる治療群の体外のリンパ球の既往応答反応におけるサイトカインのレベルの変化である。

40

【図 9 b】図9は、異なる治療群の体外のリンパ球の既往応答反応の変化の結果であり、図9aは、異なる治療群の体外のリンパ球の既往応答反応の変化の結果で、図9bは、異なる治療群の体外のリンパ球の既往応答反応におけるサイトカインのレベルの変化である。

【図 1 0】図10は、異なる治療群のCIAマウスの血清における自己抗体のレベルの変化の結果である。

【図 1 1】図11は、異なる治療群のCIAマウスの関節組織におけるRANKL/RANK/OPNのレベルの変化の結果である。

【図 1 2】図12は、異なる治療群のCIAマウスの尿液におけるD-pyrレベルの変化の結果で

50

ある。

【図 1 3】図13は、23C3モノクローナル抗体による肝炎モデルのマウスの死亡率に対する影響の結果である。

【図 1 4 a】図14は、23C3モノクローナル抗体による肝炎モデルのマウスの肝臓に対する保護作用の結果であり、図14aは、異なる治療群の血漿におけるALT及びASTのレベルで、図14bは、異なる治療群の肝臓のHE及びTUNELによる染色の結果である。A、C、E:HE染色、B、D、F:TUNEL染色。

【図 1 4 b】図14は、23C3モノクローナル抗体による肝炎モデルのマウスの肝臓に対する保護作用の結果であり、図14aは、異なる治療群の血漿におけるALT及びASTのレベルで、図14bは、異なる治療群の肝臓のHE及びTUNELによる染色の結果である。A、C、E:HE染色、B、D、F:TUNEL染色。

10

【図 1 5 a】図15は、異なる治療群の肝炎モデルのマウスの血漿及び肝臓組織におけるOPNレベルの変化の結果である。

【図 1 5 b】図15は、異なる治療群の肝炎モデルのマウスの血漿及び肝臓組織におけるOPNレベルの変化の結果である。

【図 1 6 a】図16は、異なる治療群の肝炎モデルのマウスの血漿及び肝臓組織における各サイトカインのレベルの変化の結果であり、図16aは、異なる治療群の血清におけるTNF- α 、IFN-gのレベルの変化の結果で、図16bは、異なる治療群の肝臓組織における各サイトカインのmRNAレベルの変化の結果である。

【図 1 6 b】図16は、異なる治療群の肝炎モデルのマウスの血漿及び肝臓組織における各サイトカインのレベルの変化の結果であり、図16aは、異なる治療群の血清におけるTNF- α 、IFN-gのレベルの変化の結果で、図16bは、異なる治療群の肝臓組織における各サイトカインのmRNAレベルの変化の結果である。

20

【図 1 7 a】図17は、23C3モノクローナル抗体によるクローン病モデルのマウスの体重、疾患活動性指数 (DAI) 及び脾臓指数に対する影響の結果であり、図17aは、異なる治療群のマウスの体重の変化で、図17bは、異なる治療群の疾患活動性指数 (DAI) で、図17cは、異なる治療群の脾臓指数である。

【図 1 7 b】図17は、23C3モノクローナル抗体によるクローン病モデルのマウスの体重、疾患活動性指数 (DAI) 及び脾臓指数に対する影響の結果であり、図17aは、異なる治療群のマウスの体重の変化で、図17bは、異なる治療群の疾患活動性指数 (DAI) で、図17cは、異なる治療群の脾臓指数である。

30

【図 1 7 c】図17は、23C3モノクローナル抗体によるクローン病モデルのマウスの体重、疾患活動性指数 (DAI) 及び脾臓指数に対する影響の結果であり、図17aは、異なる治療群のマウスの体重の変化で、図17bは、異なる治療群の疾患活動性指数 (DAI) で、図17cは、異なる治療群の脾臓指数である。

【図 1 8】図18は、異なる治療群のクローン病モデルのマウス大腸の病理的組織変化の結果である。

【図 1 9】図19は、23C3モノクローナル抗体によるクローン病モデルのマウス腸組織のミエロペルオキシダーゼ (MPO) の活性に対する影響の結果である。

【図 2 0】図20は、異なる治療群のクローン病モデルのマウス腸組織におけるTNF- α 、IL-1 β 及び IL-6のmRNAレベルの変化の結果である。

40

【図 2 1】図21は、異なる治療群のクローン病モデルのマウスの腸組織及び血漿におけるOPNレベルの変化の結果であり、左の図は血漿におけるOPNレベルの変化の結果で、右の図は腸組織におけるOPNレベルの変化の結果である。

【図 2 2】図22は、23C3を使用した3回のスクリーニング後の産出効率の比較図である。

【図 2 3 a】図23は、23C3の陽性ファージELISAとウェスタンブロットの同定図であり、図23Aは、ファージELISAの同定図で、図23Bは、陽性ファージウェスタンブロットの同定で、ここで、図23Bの左の図は、23C3抗体でのハイブリダイゼーションの結果図で、右の図は、無関連抗体SM5-1でのハイブリダイゼーションの結果図である。

【図 2 3 b】図23は、23C3の陽性ファージELISAとウェスタンブロットの同定図であり、

50

図23Aは、ファージELISAの同定図で、図23Bは、陽性ファージウェスタンブロットの同定で、ここで、図23Bの左の図は、23C3抗体でのハイブリダイゼーションの結果図で、右の図は、無関連抗体SM5-1でのハイブリダイゼーションの結果図である。

【図24】図24は、ソフトウェアAlign Xによる23C3の結合エピトープの配列解析の結果である。

【図25】図25は、各種の配列エピトープの抗体23C3との結合力の比較の結果である。

【図26a】図26は、合成オリゴペプチドと相応の抗体の特異的結合及び抗体と抗原の結合の遮断の実験結果であり、図26Aは、ドットプロット法によってオリゴペプチドと抗体の結合を検出した実験結果で、図26Bは、オリゴペプチドの遮断の実験結果である。

【図26b】図26は、合成オリゴペプチドと相応の抗体の特異的結合及び抗体と抗原の結合の遮断の実験結果であり、図26Aは、ドットプロット法によってオリゴペプチドと抗体の結合を検出した実験結果で、図26Bは、オリゴペプチドの遮断の実験結果である。

【図27】図27は、23C3の特異的認識エピトープのOPN分子における相応の部位である。

【図28】図28は、ヒト化抗体h23C3の分子シミュレーションの構造の簡略図であり、FR領域残基は濃灰色のリボンで、CDR領域残基は淡灰色のリボンで、CDR領域から5Å以内で元抗体のCDR配座を影響することができ、且つヒト由来鑄型における相応の位置と異なる7つのFR領域の残基は黒色の球棒状で表される。

【図29】図29は、ヒト化抗体h23C3の重鎖（図29A）及び軽鎖（図29B）のアミノ酸配列と関連配列との比較図である。ここで、23C3VHと23C3VLは、それぞれマウス由来のモノクローナル抗体23C3の重鎖と軽鎖の可変領域を示す。ヒト化抗体h23C3の重鎖と軽鎖のフレームワーク領域として、それぞれヒト抗体AAT51715.1の重鎖の可変領域とヒト抗体BAC01726.1の軽鎖の可変領域を選んだ。H23C3VHaとH23C3VHbは、それぞれのヒト化抗体の重鎖の可変領域を、h23C3VLaとh23C3VLbは、それぞれのヒト化抗体の軽鎖の可変領域を示す。ダッシュは、ヒト抗体AAT51715.1或いはBAC01726.1における相応の残基と同様のアミノ酸を示し、括弧内に表されるのはCDR領域である。アミノ酸は、Kabatの番号付け系に従って番号を付けられている[E.A. Kabat, T.T. Wu, H.M. Perry, K.S. Gottesman, C. Foeller, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 「免疫学に有用なタンパク質の配列（第5版）」, United States Department of Health and Human Services, Bethesda, MD, 1991.]。

【図30】図30は、23C3のヒト化抗体の抗原結合活性の実験結果である。

【図31】図31は、c23C3とh23C3を第一抗体としたウェスタンブロットの結果である。

【図32】図32は、c23C3とh23C3抗体のリンパ球の移動に対する阻害作用の結果である。

【図33】図33は、c23C3とh23C3抗体のリンパ球の免疫応答に対する阻害作用である。

【図34】図34は、c23C3とh23C3抗体の活性化リンパ球の生存に対する影響である。

【0029】

[具体的な実施形態]

本発明者は、長期にわたって深く研究したところ、オステオポンチンの特定の機能エピトープに対抗するモノクローナル抗体を獲得し、さらにキメラのモノクローナル抗体及びヒト化抗体を製造し、且つそのコード配列を解明した。研究によって、本発明者は、さらに、本発明のモノクローナル抗体がオステオポンチンを阻害することによって、関節リウマチ、自己免疫性肝炎、クローン病のような自己免疫疾患に対して、疾患の症状を軽減・緩和し、関連組織を保護するなど積極的な作用を持つため、自己免疫疾患の治療に有用であることを証明した。これに基づき、本発明者が本発明を完成した。

【0030】

具体的に、本発明の出願者は、まず、分子生物学の技術でヒトとマウスのOPN遺伝子をクローンにし、真核細胞でヒトとマウスのOPNタンパクを発現させ、且つ細胞融合-ハイブリドーマの方法により抗ヒトOPNモノクローナル抗体（例えば本発明における23C3）を製造し、さらに得られたモノクローナル抗体の遺伝子に対してクローン及びその配列の測定を行った。

【0031】

10

20

30

40

50

本発明は、さらに、コンピュータ支援設計によってヒト化抗体h23C3のアミノ酸配列を設計し、全遺伝子でh23C3の重鎖と軽鎖の可変領域の遺伝子を合成して遺伝子組換えによってそれぞれヒト抗体の重鎖と軽鎖の定常領域の遺伝子と接続し、真核発現ベクターにクローンし、それぞれヒト化抗体の軽鎖と重鎖の発現ベクターを構築し、さらに軽鎖と重鎖の発現ベクターをリボソーム法で宿主細胞（例えばCHO）にコトランスフェクションした後、スクリーニング、培養精製を行うことにより得ることを含む抗オステオポンチンのヒト化抗体の製造方法を公開する。キメラのモノクローナル抗体c23C3も、この方法を参照して得ることができる。

【0032】

本発明の出願者は、さらに、コラーゲンに誘導されたDBA/1Jマウス関節炎モデル、ConAに誘導された自己免疫性肝炎モデル、DSSに誘導されたマウスクローン病モデルを構築し、上述モノクローナル抗体を使用してこの三つの自己免疫疾患モデルで実験を行い、その保護作用を観察した。

10

【0033】

関節炎モデルで実験を行った実験結果は、本発明に公開された上述モノクローナル抗体が顕著に関節炎の発病指数を降下させ、発病時間を遅らせ、破骨細胞の機能を抑制し、関節炎の骨破壊・吸収を低下させることができ、さらに、好適に骨を吸収から保護し、有効にリンパ球の移動を遮断し、関節炎疾患の症状を軽減・緩和することができることを示した。

【0034】

自己免疫性肝炎モデルで実験を行った結果は、これらのモノクローナル抗体が肝臓組織におけるOPNタンパクを中和し、OPNのmRNAレベルを調節し、炎症誘発性サイトカインのレベルを降下させ、Th1型免疫反応のNF- κ Bレベルをダウンレギュレートすることによって、肝臓を保護し、死亡率を低下させることを示した。

20

【0035】

クローン病(Crohn's disease)モデルで実験を行った実験結果は、このモノクローナル抗体が組織におけるOPNタンパクを中和し、OPNのmRNAレベルを調節し、MPOの活性を低下させ、リンパ球と好中性顆粒球の浸潤を減少し、炎症誘発性サイトカインのレベルを降下させ、炎症及び潰瘍の具合を軽減し、腸又は/及び大腸の組織を保護し、クローン病の症状を緩和することによって、予防及び/又は治療を実現させることができることを示した。

30

【0036】

さらに、本発明の出願者は、ファージディスプレイ技術で23C3モノクローナル抗体が作用するOPNの機能エピトープを同定し、この機能エピトープがWLXPDPで、ここで、Xは任意のアミノ酸でもよいが、前述機能エピトープにおけるXがN、M、Lであることが好ましい。これによって、さらに、OPN分子の作用標的を解明した。より具体的に、本発明の出願人は、モノクローナル抗体の抗原エピトープのスクリーニング、ファージクローンELISA及びウェスタンブロット法による同定、配列決定及び配列解析によってOPNの異なる機能エピトープを推測し、さらにファージクローンと抗体結合能分析によって最強の結合力のクローンを選んで一連のオリゴペプチドを合成し、これらのオリゴペプチドと特異的抗体との結合実験によってこれらの機能性エピトープを同定した。

40

【0037】

本発明のモノクローナル抗体及びその製造
ここで用いられる用語の「モノクローナル抗体」とは、一類のほぼ均一なコロニーから得られた抗体で、すなわち、少数のあり得る自然発生の突然変異以外、このコロニーに含まれる単独の抗体が同様である。モノクローナル抗体は、高度特異的に単一の抗原部位に対するものである。そして、通常のポリクローナル抗体製剤（通常は異なる抗原決定基に対する異なる抗体である）と違い、各モノクローナル抗体は、抗原における単一の抗原決定基に対するものである。それらの特異性以外、モノクローナル抗体の利点は、ハイブリドーマの培養によって合成されるので、他の免疫グロブリンに汚染される恐れがないことに

50

ある。修飾語の「モノクローナル」は、抗体の特性を表し、ほぼ均一な抗体コロニーから得られることで、何らかの特殊な方法で抗体を生産する必要があると理解されるべきではない。

【0038】

ここで用いられるように、用語の「抗体」又は「免疫グロブリン」とは、同様な構造特徴を持つ約150000ダルトンのヘテロテトラマーの糖タンパクで、二つの同じ軽鎖(L)と二つの同じ重鎖(H)からなるものである。各軽鎖は、1つの共有ジスルフィド結合によって重鎖に結合しているが、重鎖間のジスルフィド結合の数は、免疫グロブリンのアイソタイプによるものである。各重鎖および軽鎖も、それぞれ一定の間隔の鎖内ジスルフィド結合を有する。各重鎖は、一つの末端に可変領域(VH)を有し、その先に多数の定常領域を有する。各軽鎖は、一方の末端に可変領域(VL)を有し、他方の末端に定常領域を有する。軽鎖の定常領域は重鎖の一つ目の定常領域と、軽鎖の可変領域は重鎖の可変領域と対向している。特殊なアミノ酸残基が軽鎖と重鎖の可変領域の間に界面を形成している。

10

【0039】

ここで用いられるように、用語の「可変」とは、抗体において可変領域のある部分が配列で異なっており、これによって各特定の抗体のその特定の抗原に対する結合および特異性が構成されることを指す。しかし、可変性は、均一に抗体の可変領域全体に分布しているわけではない。軽鎖と重鎖の可変領域における相補性決定領域(CDR)又は超可変領域と呼ばれる3つの断片に集中している。可変領域において、比較的に保存的な部分は、フレームワーク領域(FR)と呼ばれる。天然の重鎖及び軽鎖の可変領域に、それぞれ、基本的にβシート構造となっており、連結ループを形成する3つのCDRで連結され、場合によって部分βシート構造となる4つのFR領域が含まれる。各鎖におけるCDRは、FR領域で密接し、且つ他方の鎖のCDRと一緒に抗体の抗原結合部位を形成している(Kabat等, NIH Publ. No. 91-3242, 巻I, 647-669ページ(1991)を参照)。定常領域は、抗体と抗原との結合には直接関与しないが、例えば抗体の抗体依存細胞毒性に参与するなどの異なるエフェクター機能を示す。

20

【0040】

脊椎動物の抗体(免疫グロブリン)の「軽鎖」は、その定常領域のアミノ酸配列に基づき、明らかに異なる二種類(κとλと呼ばれる)のいずれかに分類することができる。免疫グロブリンは、その重鎖の定常領域のアミノ酸配列に基づき、異なるクラスに分類することができる。免疫グロブリンには、主として5つのクラス、すなわち、IgA、IgD、IgE、IgGおよびIgMがあり、そのうちのいくつかは、さらに、サブクラス(アイソタイプ)、例えば、IgG-1、IgG-2、IgG-3およびIgG-4やIgA-1およびIgA-2に分類することができる。異なるクラスの免疫グロブリンの重鎖の定常領域に応じて、それぞれα、δ、ε、γ、およびμと呼ばれる。各クラスの免疫グロブリンのサブユニット構造および三次元構造は本分野の技術者にとって熟知である。

30

【0041】

例えば、本発明のモノクローナル抗体は、重鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号4或配列番号8から、軽鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号6或いは配列番号10から選ばれることが好ましく、定常領域は、マウス抗体の定常領域或いはヒト抗体の定常領域から選ばれるもの、たとえば、マウスIgGであってもよい。

40

【0042】

既存の分子生物学の技術で得られるモノクローナル抗体は、さらに、本発明に公開された上述オステオポンチンの機能エピトープと特異的に結合する既存の分子生物学の技術で得られるキメラのモノクローナル抗体c23C3及びヒト化抗体h23C3を含む。ここで、c23C3の重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号4で、軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号6で、定常領域は、ヒト抗体の定常領域である。h23C3の重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号8で、軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号10で、定常領域は、ヒト抗体の定常領域である。

【0043】

50

本発明の一つの実施形態において、重鎖可変領域のCDR1-3のアミノ酸配列は、それぞれIYAMD、RIRSQSNNYTTYADSVKD及び(図29のH23C3VHbを参照)から、軽鎖可変領域のCDR1-3のアミノ酸配列は、それぞれRASENIYSFLA、AATNLAD及びQHFWGTPFT(例えば、図29のH23C3VLbを参照)から選ばれる。

【0044】

モノクローナル抗体は、本分野の技術者に熟知の各種の方法で製造することができる。例えば、モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法(最初はKohler等, Nature, 256:495(1975)で提出)、または、組換えDNA法(米国特許第4,816,567号)で製造することができる。また、モノクローナル抗体は、例えばClackson等, Nature, 352:624-628(1991)及びMarks等, J. Mol. Biol., 222:581-597(1991)に記載された技術でファージ抗体ライブラリーから分離して得たものでもよい。

10

【0045】

本発明のモノクローナル抗体は、キメラ抗体やヒト化抗体、例えば既存の分子生物学の技術で得られるキメラのモノクローナル抗体c23C3及びヒト化抗体h23C3でもよい。ここで、c23C3の重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号4で、軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号6で、定常領域は、ヒト抗体の定常領域である。h23C3の重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号8で、軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号10で、定常領域は、ヒト抗体の定常領域である。

【0046】

また、本発明は、前述の抗hOPNモノクローナル抗体の対応のアミノ酸配列を有するモノクローナル抗体、前述の抗hOPNモノクローナル抗体の可変領域鎖を有するモノクローナル抗体、及びこれらの鎖を有する他のタンパク質又はタンパク質抱合体と融合発現産物を含む。具体的に、本発明は、超可変領域(相補性決定領域、CDR)が本発明の軽鎖及び重鎖の超可変領域と同様で、或いは少なくとも90%、好ましくは95%の相同性を持つものであれば、この超可変領域を含有する軽鎖及び重鎖を有する任意のタンパク質又はタンパク質抱合体と融合発現産物(すなわち免疫抱合体と融合発現産物)を含む。本分野の技術者に知られるように、免疫抱合体と融合発現産物は、薬物、毒素、サイトカイン(cytokine)、放射性核種、酵素又は他の診断・治療分子と前述の抗hOPNモノクローナル抗体又はその断片と結合してなる抱合体を含む。さらに、本発明は、前述の抗hOPNモノクローナル抗体又はその断片と結合した細胞表面マーカー或いは抗原を含む。

20

30

【0047】

本発明は、完全のモノクローナル抗体だけではなく、免疫活性を有する抗体断片、例えばFab又は(Fab')₂断片、抗体の重鎖、抗体の軽鎖も含む。

【0048】

抗hOPNモノクローナル抗体又はその断片のコード分子、この分子を含有する発現ベクター及び宿主細胞
さらに、本発明は、前述の抗hOPNモノクローナル抗体又はその断片をコードするDNA分子を提供する。これらのDNA分子の配列は、通常の技術で、例えば、PCR増幅 或いはゲノムライブラリースクリーニングなどの方法によって得ることができる。また、軽鎖及び重鎖のコード配列を一体に融合し、一本鎖抗体を形成してもよい。

40

【0049】

例えば、本発明のDNA分子は、重鎖可変領域をコードするヌクレチオド配列である配列番号3或いは配列番号7、軽鎖可変領域をコードするヌクレチオド配列である配列番号5或いは配列番号9を含んでもよい。例えば、c23C3の重鎖可変領域をコードするヌクレチオド配列は配列番号3に、軽鎖可変領域のヌクレチオド配列は配列番号5に示された。h23C3の重鎖可変領域をコードするヌクレチオド配列は配列番号7に、軽鎖可変領域のヌクレチオド配列は配列番号9に示された。

【0050】

関連の配列を獲得すれば、組換え法で大量に関連配列を獲得することができる。この場合、通常、その配列をベクターにクローンした後、細胞に導入し、さらに通常の方法で増

50

殖させた宿主細胞から関連配列を分離して得る。

【0051】

また、特に断片の長さが短い場合、人工合成の方法で関連配列を合成してもよい。通常、まず多数の小さい断片を合成し、そして接続させることにより、配列の長い断片を得ることができる。

【0052】

現在、前述の本発明の抗hOPNモノクローナル抗体（又はその断片、或いはその誘導体）をコードするDNA配列を全部化学合成で獲得することがすでに可能である。さらに、このDNA配列を本分野で周知の各種の既知のDNA分子（或いはベクターなど）や細胞に導入してもよい。また、化学合成で本発明のタンパク質配列に突然変異を導入することもできる。

10

【0053】

さらに、本発明は、上述の適当なDNA配列及び適当なプロモーター或いは制御配列を含むベクターに関する。これらのベクターは、タンパク質を発現できるように、適当な宿主細胞の形質転換に用いることができる。宿主細胞は、原核細胞、例えば細菌細胞、或いは、低等真核細胞、例えば酵母細胞、或いは、高等真核細胞、例えば哺乳動物細胞でもよい。

【0054】

さらに、本発明は、本発明の抗hOPNモノクローナル抗体を生産することが可能なハイブリドーマ細胞系、好ましくは高力価の抗hOPNモノクローナル抗体のハイブリドーマ細胞系を提供する。

20

【0055】

本発明の抗hOPNモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマを獲得するには、本分野の技術者は本発明の抗体の構造（例えば抗体の重鎖可変領域と軽鎖可変領域）を非常に便利に知り、そして以下の方法で本発明のモノクローナル抗体を製造することができる。

【0056】

まず、本発明のモノクローナル抗体をコードするヌクレチオド配列及びその配列と作用可能に連結した発現調節配列を含有する発現ベクターを提供する。

【0057】

ここで用いられる用語の「発現調節配列」とは、通常、ヌクレチオド配列の発現制御に関与する配列のことを指す。発現調節配列は、目的ヌクレチオド配列と作用可能に連結したプロモーター及び終結シグナルを含む。通常、さらに、ヌクレチオド配列の適当な翻訳に必要な配列を含む。「作用可能に連結した」とは、直鎖状DNA配列のある部分が同直鎖状DNA配列の他の部分の活性に影響できることを指す。例えば、プロモーター又はエンハンサーはコード配列の転写を増加させた場合、これらとコード配列とは作用可能に連結した。

30

【0058】

本発明のモノクローナル抗体をコードするDNA配列は、本分野の技術者に熟知の通常的手段で得られる。例えば、本発明に公開された配列に基づき、人工合成或いはPCR法による増幅でそのモノクローナル抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域をコードするヌクレチオド配列を得ることができる。その後、本分野で熟知の各種の方法で、好適な制限酵素切断部位の選択によって、それぞれ発現ベクターが有する重鎖定常領域のコード配列と軽鎖定常領域のコード配列の前に位置し、且つ同一のリーディングフレームにあるように、これらのヌクレチオド配列を好適な発現ベクターに挿入する。本発明で用いられる発現ベクターは、本分野の技術者に既知の各種の市販の発現ベクター、例えばpPICZ α 、pPIC9Kである。本発明において、上述ヌクレチオド配列を含有する発現ベクターは例えばpcDNA3.1/ZEO(+)及びpcDNA3.1 (+)である。

40

【0059】

そして、上述で得られた発現ベクターで好適な宿主細胞を形質転換する。「宿主細胞」は、一般的に原核細胞と真核細胞とを含む。常用の原核宿主細胞の例として、大腸菌、枯草菌などを含む。常用の真核宿主細胞として、酵母細胞、昆虫細胞や、哺乳動物細胞を含

50

む。本発明において、哺乳動物細胞が好ましい。通常、哺乳動物細胞系が真核細胞由来のポリペプチドを発現する宿主細胞として用いられる。哺乳動物細胞の培養物における増殖は、本分野で熟知である。「組織培養」, Academic Press, Kruse及びPatterson編(1973)を参照し、ここに参考として取り入れる。好ましい哺乳動物細胞は、多くの入手可能な無限増殖性細胞系である。これらの無限増殖性細胞系は、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、Vero細胞、Hela細胞、ベビーハムスター腎臓(BHK)細胞、サル腎臓細胞(COS)、ヒト肝臓癌細胞(例えばHep G2)及び他の多くの細胞系を含むが、これらに限定されない。これらの細胞は、タンパク質分子に正確な折り畳み、正確なジスルフィド結合の形成及び正確な部位のグリコシル化を含む翻訳後の修飾を提供する。

【0060】

発現ベクターで宿主細胞を形質転換する方法はたくさんあるが、用いられる形質転換のプロトコールが形質転換しようとする宿主にもよる。異質ポリヌクレチドを哺乳動物細胞に導入する方法は、本分野で知られているが、デキストランによるトランスフェクション、リン酸カルシウム沈殿、ポリブレン(1,5-ジメチル-1,5-ジアザウンデカメチレンポリメトプロミド)によるトランスフェクション、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、リポフェクション及びDNAの細胞核への直接マイクロインジェクションを含む。本発明において、好ましい方法は、エレクトロポレーション法やリポフェクション法等である。例えば、Invitrogen社のリポフェクション法キットでCHO細胞などの宿主細胞へのトランスフェクションを行うことができる。本発明において、COS細胞、CHO細胞を宿主細胞として使用することが好ましい。

【0061】

その後、本発明に係るモノクローナル抗体の発現に適切な条件で、形質転換で得られた宿主細胞を培養する。そして、通常のグロブリンの精製工程、例えばプロテインA-Sepharose、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、分子篩クロマトグラフィーやアフィニティークロマトグラフィーなどの本分野の技術者に熟知の通常の分離精製手段で精製し、本発明のヒト由来抗hOPNモノクローナル抗体を得る。

【0062】

モノクローナル抗体の同定、発現及び精製

得られたモノクローナル抗体は、通常的手段で同定することができる。例えば、モノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降、或いは体外結合試験(例えば放射免疫測定(RIA)又は酵素結合免疫吸着測定(ELISA))で測定することができる。モノクローナル抗体の結合親和力は、例えばMunson等, Anal. Biochem., 107:220(1980)のScatchard分析で測定することができる。

【0063】

本発明の抗hOPNモノクローナル抗体は、細胞内又は細胞膜において発現し、或いは細胞外に分泌することができる。必要であれば、その物理・化学的特性及び他の特性を利用して各種の分離方法で組換えタンパク質を分離・精製することができる。これらの方法は、本分野の技術者に熟知である。これらの方法の例として、通用の再生処理、タンパク質沈殿剤による処理(塩析法)、遠心、浸透圧ショック、超音波処理、超遠心、分子篩クロマトグラフィー(ゲルろ過)、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)及び他の各種の液体クロマトグラフィー技術、並びにこれらの方法の組合せを含むが、これらに限定されない。

【0064】

薬物組成物

さらに、本発明は、自己免疫疾患を治療する薬物組成物であって、薬学的に有効量の本発明のモノクローナル抗体或いはその免疫抱合体と、薬学的に允許される担体と、を含む薬物組成物を提供する。

【0065】

ここで用いられる用語の「薬学的に允許される」とは、分子自体と組成物を適当に動物

10

20

30

40

50

或いはヒトに投与する場合、不利な反応、アレルギー反応或いは他の不良反応が生じないことを指す。ここで用いられる「薬学的に允許される担体」は、本発明の活性物質と相容性を持ち、すなわち、本発明の活性物質と混合可能で、通常、大幅に薬物組成物の効果を降下させないはずである。これらの担体は、本分野の技術者に熟知である。「レミントンの医薬科学」(Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Pub. Co., N.J. 1991年)において、薬学的に允許される担体に関する十分な検討が見つけられる。

【0066】

このような担体は、食塩水、緩衝液、ブドウ糖、水、グリセリン、エタノール、佐剤、及びその組合せを含むが、これらに限定されない。さらに、これらの担体には、補助的な物質、例えば湿潤剤或いは乳化剤、pH緩衝物質等が存在してもよい。

10

【0067】

本発明の組成物は、経口投与及び静脈内、筋肉内又は皮下などの状態で投与することができるが、好ましくは、経口又は静脈内注射で投与する。

【0068】

通常、本発明の薬物組成物において、本発明のモノクローナル抗体或いは免疫抱合体の有効成分は、組成物の合計重量の0.00001~99.9wt%、好ましくは0.0001-90wt%、より好ましくは0.001-75wt%、さらに好ましくは0.01-50wt%を占める。残量は、薬学的に允許される担体及び他の添加剤などの物質である。

【0069】

本発明の薬物組成物は、必要により各種の剤形に調製することができ、且つ医者が患者の種類、年齢、体重及び基本病状、投与の様態などの要素によって患者に有益な投与量を決めて使用することができる。投与の様態は、例えば灌注及び他の治療の様態を使用してもよい。

20

【0070】

薬物組成物の使用時、安全有効量の抗hOPNモノクローナル抗体或いは免疫抱合体を哺乳動物に使用するが、その安全有効量は、通常、0.1 μ g-5mg/kg体重で、多くの場合に、約5mg/kg体重未満で、好ましくはこの投与量が約1-10 μ g/kg体重-約1mg/kg体重である。勿論、具体的な投与量は、さらに投与の様態、患者の健康状況などの要素を考えるべきで、すべては熟練の医者の技能範囲に含まれる。

【0071】

本発明のモノクローナル抗体或いは免疫抱合体は、オステオポンチンを治療標的とし、オステオポンチンが発病の要因となる多種の自己免疫疾患を治療することができるが、前述の自己免疫疾患は、関節リウマチ、多発性硬化症、自己免疫性肝炎、強直性脊椎炎、クローン病、リウマチ性脊椎炎、骨関節炎、痛風性関節炎、自己免疫性糖尿病、自己免疫性ブドウ膜炎、ネフローゼ症候群、潰瘍性大腸炎、乾癬性関節炎、未分化型脊椎関節症、慢性肝機能不全、並びに体重増加、関節変形、関節の腫れ、関節奇形、関節の湾曲・硬直、重篤な運動障害及びその組合せを含む関節リウマチと関わる他の症状を含むが、これらに限定されない。

30

【0072】

本発明の薬物組成物は、より優れた治療効果を得るため、さらに、自己免疫疾患に治療或いは改善の活性を持つ物質を含んでも、或いは他の活性物質と併用してもよい。前述他の自己免疫疾患に治療或いは改善の活性を持つ物質は、IL-4、IL-6、IL-10を含む抗炎症のサイトカイン及び/又はIL-4拮抗剤、ENBRELE (登録商標)、IV型ホスホジエステラーゼ阻害剤、抗炎症の阻害剤及びサイトカイン阻害剤、例えばレフルノミド、非ステロイドの抗炎症薬、例えばナプロキセン、コルチゾール、或いはシクロスポリンなどを含むが、これらに限定されない。

40

【0073】

二種或いは二種以上の薬物を併用して投与する場合、一般的に、二種の薬物がそれぞれ単独で投与する場合より優れた効果がある。好ましくは、併用する薬物或いは他の製剤は、本発明のモノクローナル抗体の治療活性を関与しない。

50

【 0 0 7 4 】

hOPN検出用キット

さらに、本発明は、前述の抗hOPNモノクローナル抗体或いはその活性断片、免疫複合体を含むhOPN検出用キットを提供する。本発明のキットで生物標本におけるhOPNの存在の有無或いはその含有量を検出することができるが、この検出方法は、(a)標本を本発明のキットにおける抗hOPNモノクローナル抗体或いはその免疫複合体と接触させることと、(b)抗原-抗体複合体が形成すると、標本におけるオステオポンチンの存在が示されるように、抗原-抗体複合体の形成の有無を検出すること、或いは、標本におけるhOPNの含有量を表すように、形成された抗原-抗体複合体の量を定量的に検出することと、を含む。前述標本は、前処理されたものでも、前処理されていないものでもよく、例えば抽出、精製又は濃縮などを経たものである。

10

【 0 0 7 5 】

前述キットは、容器及び容器内にある本発明のモノクローナル抗体、或いは前述モノクローナル抗体付き検出プレート、並びに取扱説明書を含む。このキットには、さらに、検出に必要な他の試薬、例えば緩衝液、指示薬などが含まれてもよい。本分野の技術者は、具体的な要求に合わせてキットの内容物を調整することができる。

【 0 0 7 6 】

[実施例]

以下、実施例、実験例によって、さらに本発明を説明するが、これらの実施例、実験例は本発明の制限にはならないと理解されるものである。実施例には、伝統的な方法、例えば、ベクターやプラスミドを構築する方法、タンパク質をコードする遺伝子をこのようなベクターやプラスミドに挿入する方法、或いはプラスミドを宿主細胞に導入する方法並びにクラシックな細胞融合とモノクローナル抗体のスクリーニング及び精製の方法などの詳細な記述が含まれていない。このような方法は、本分野における普通の技術者には周知で、且つSambrook, J., Fritsch, E. F. 及びManiatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold spring Harbor Laboratory Press(「モレキュラー・クローニング: 研究室マニュアル」第2版、コールド・スプリング・ハーバー研究所出版社)を含む多くの出版物に記述されている。特に断らない限り、%と部は、重量で計算される。本発明の実施例或いは実施例において、由来が表記されていない原料・補助材はすべて市販品である。

20

30

【 0 0 7 7 】

実施例 マウス抗OPNモノクローナル抗体の製造

実施例1. ヒトOPNのcDNA断片のクローニング

GENEBANKに提供されたヒトOPNの資料及び配列を参照し、プライマーとして、OPNセンスプライマー(プライマー1):GGG AAGCTT ACCATGAGAATTGCAGTGATTTG (Hind III) (配列番号16)及びOPNアンチセンスプライマー(プライマー2):GCC GGTACC ATTGACCTCAGAAGATGCAC(Kpn I) (配列番号17)を合成し、ヒト肝臓癌細胞株LM3(上海中山病院から購入)を増幅し、TRIzolキット(INVITROGEN)でRNAを抽出し、RT-PCR(PROMEGA)によって94 で5分間、そして94 で45秒、58 で30秒、72 で45秒を一つのサイクルとして30サイクル、さらに72 で10分間という反応条件で処理した。963bpのDNA断片を得た。ゲル回収キット(上海生工)で断片を回収した後、制限酵素のHind III及びKpn Iで切断し、ゲル電気泳動で回収した後、Hind III及びKpn Iで二重酵素切断されたプラスミドベクターと連結し、大腸菌DH10Bを形質転換した後、スクリーニングし、断片が挿入された陽性クローンを得た。DNA配列決定によって、OPN遺伝子のヌクレオチド配列は、配列番号1に示されたものであることが確認された。

40

【 0 0 7 8 】

実施例2. マウスOPNのcDNA断片のクローニング

GENEBANKに提供されたマウスOPNの資料及び配列を参照し、プライマーとして、マウスOPNセンスプライマー(プライマー3):ATAAGCTTGGATGACGACGACAAGATGAGAATTGCAGTGATT (Hind I) (配列番号18)及びマウスOPNアンチセンスプライマー(プライマー4):ATCTCGAGTTAATTG

50

ACCTCAGAAGA (Kpn I) (配列番号19)を合成した。マウス脾臓のTリンパ細胞を分離し、Con Aで30時間活性化させた後、TRISOLキット (INVITROGEN) でRNAを抽出し、RT-PCR (PROMEGA) によって、94 で5分間、そして94 で45秒、55 で30秒、72 で45秒を一つのサイクルとして30サイクル、さらに72 で10分間という反応条件でホットスタートPCRを行った。目標DNA断片を得た。ゲル回収キット (上海生工) で断片を回収した後、制限酵素のHind III及びKpn Iで切断し、ゲル電気泳動で回収した後、Hind III及びKpn Iで二重酵素切断されたプラスミドベクターと連結し、大腸菌DH10Bを形質転換した後、スクリーニングし、断片が挿入された陽性クローンを得た。DNA配列決定によって、マウスOPN遺伝子のヌクレオチド配列は、配列番号2に示されたものであることが確認された。

【0079】

10

実施例3．ヒト・マウスOPNの真核細胞発現及び精製

実施例2で得られた正確な配列のヒト・マウスOPN遺伝子断片を相応の制限酵素で酵素切断して回収した後、pPICZα プラスミドに組込んだ。ピキア酵母細胞にトランスフェクションし、単独のクローン酵母を選び、ヒト・マウスOPNタンパクの発現を誘導し、酵母細胞の発現上清を収集し、アニオン交換、分子篩精製を経て、SDS-PAGEによって純ヒト・マウスOPNタンパクを得たことが実証された。精製後、SDS-PAGE電気泳動をし、結果は図1に示された。

【0080】

実施例4．マウス抗ヒトOPNモノクローナル抗体のスクリーニング及び製造

100 µgのヒトOPNと同体積のフロインドアジュバントを乳化した後、腹腔内注射でBALB/Cマウスに免疫接種し、二週間おきに一回目と同じ投与量で免疫強化接種を行った。合計3回の免疫接種後、血清における抗OPN抗体価の高いマウスを選び、その脾臓リンパ細胞を分離し、クラシックなPEG法によって、マウス脾臓リンパ細胞をNS-1細胞と細胞融合させた。10 µg/mlのOPNで96ウェルプレートを被覆し、ELISA法でスクリーニングを繰り返し、安定して抗ヒトOPN抗体を発現できるハイブリドーマ細胞株23C3を得た。モノクローナル細胞株23C3を大量に増殖させ、 5×10^6 個細胞/匹でBALB/Cマウスに腹腔内注射を行い、10日程度でマウスの腹水の収集を始め、プロテインAカラムを用いて、アフィニティークロマトグラフィーによって抗ヒトOPNモノクローナル抗体を精製した。ウェスタンブロット試験の結果から、マウス抗ヒトOPNモノクローナル抗体23C3は、人OPNタンパクと特異的に結合すると同時に、マウスOPNタンパクとも交差反応が生じることが示された。結果が図2に示された。市販抗OPN抗体(R&D社)。

20

30

【0081】

実験例5．23C3の可変領域の遺伝子のクローニング及び配列決定

23C3のハイブリドーマ細胞を $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 個収集し、TRIzol (Invitrogen、カタログ番号: 15596-026) でその全RNAを抽出し、マウス定常領域の配列に基づき、以下のプライマーを設計した。

【0082】

HGSP1: 5' -GATACTGTGATCTGTTTG-3' (配列番号20)

HGSP2: 5' -TCGCAGATGAGTCTGGAC-3' (配列番号21)

HGSP3: 5' -ATGAACACACTCACATTG-3' (配列番号22)

LGSP1: 5' -GAGGTTATGACTTTCATAGTCAGC-3' (配列番号23)

LGSP2: 5' -AACACTGTCCAGGACACCATCTCG-3' (配列番号24)

LGSP3: 5' -TCTGGGATAGAAGTTGTTTCATGAG-3' (配列番号25)

40

Invitrogen 5' RACEキット(カタログ番号: 18374-058)を使用し、それぞれHGSP1、LGSP1をプライマーとし、第一鎖cDNAを合成した。TdTとdCTPの作用で、第一鎖cDNAの3'末端にポリCテールを加えた。それぞれHGSP2、HGSP3、LGSP2、LGSP3を5' プライマーとし、ネステッドPCRによってVH、VLのPCR産物を得た。PCR産物をpGEM-Tベクターに組込んだ。クローンを選んでプラスミドを抽出し、制限酵素によって陽性クローンと同定され、配列決定によってその配列が決定された。23C3の重鎖可変領域のヌクレオチド配列は配列番号3で、アミノ酸配列は配列番号4で、23C3の軽鎖可変領域のヌクレオチド配列は配列番号5で、

50

アミノ酸配列は配列番号6である。

【0083】

実施例6．ヒト抗体の軽・重鎖定常領域の遺伝子のクローニング

リンパ細胞分離液（鼎国生物技術発展会社製）で健康なヒトリンパ細胞を分離し、Trizolキット（Invitrogen社製）で全RNAを抽出し、文献(Cell, 1980, 22: 197-207)及び文献(Nucleic Acids Research, 1982, 10: 4071-4079)に報告された配列に従ってそれぞれプライマーを設計し、RT-PCR反応で抗体の重鎖及び軽鎖の定常領域の遺伝子を増幅した。PCR産物をアガロースゲル電気泳動で精製して回収し、pGEM-Tベクターに組み込み、配列決定で検証したところ、正確なクローンを得たことが確認された。配列番号12と配列番号13は、それぞれ重鎖定常領域（CH）のヌクレオチド配列とアミノ酸配列を示す。配列番号14と配列番号15は、それぞれ軽鎖定常領域（CL）のヌクレオチド配列とアミノ酸配列を示す。本実施例における正確なクローンをpGEM-T/CH及びpGEM-T/CLと表記する。

10

【0084】

実施例7．抗hOPNキメラ抗体c23C3の構築

23C3の重鎖可変領域の遺伝子23C3VHとpGEM-T/CHベクターを鋳型とし、94℃で15分間、そして94℃で50秒、58℃で50秒、72℃で50秒を一つのサイクルとして30サイクル、さらに72℃で10分間という反応条件でオーバーラップPCRによってキメラ抗体の重鎖の遺伝子を合成した。そして、このキメラ重鎖の遺伝子の5'末端に制限酵素切断部位HindIIIとシグナルペプチドの遺伝子配列を、3'末端に翻訳終止コドンTAAと制限酵素切断部位EcoRIを含有するようにした。シグナルペプチドの遺伝子配列はATGGATTTTCAGGTGCAGATTTTCAGCTTCCTGCTAATCAGTGCCTCAGTCATAATATCCAGAGGA(配列番号52)である。最後に、アガロースゲル電気泳動でPCR増幅産物を分離し、目的バンドを回収してpGEM-Tベクターに組み込み、陽性クローンをスクリーニングし、配列決定を行った。配列決定で正確なクローンを選んでHindIII及びEcoRIで酵素切断し、アガロースゲル電気泳動でキメラ抗体の重鎖断片c23C3VHCHを精製して回収し、HindIII及びEcoRIで二重酵素切断されたプラスミドpcDNA3.1(+)(米国Invitrogen社製)と連結し、キメラ重鎖の真核発現ベクターpcDNA3.1(+)(c23C3VHCH)を構築した。

20

【0085】

23C3の軽鎖可変領域の遺伝子23C3VLとpGEM-T/CLベクターを鋳型とし、95℃で15分間、そして94℃で50秒、58℃で50秒、72℃で50秒を一つのサイクルとして30サイクル、さらに72℃で10分間という反応条件でオーバーラップPCRによってキメラ抗体の軽鎖の遺伝子を合成し、5'末端に制限酵素切断部位HindIIIとシグナルペプチドの遺伝子配列を、3'末端に翻訳終止コドンTAAと制限酵素切断部位EcoRIを含有するPCR産物Vc1A12LCLを得た。シグナルペプチドの遺伝子配列はATGGATTTTCAGGTGCAGATTTTCAGCTTCCTGCTAATCAGTGCCTCAGTCAATATATCCAGAGGA(配列番号52)である。アガロースゲル電気泳動でPCR産物を精製して回収し、pGEM-Tベクター（Promega社製）に組み込み、陽性クローンをスクリーニングし、配列決定を行った。配列決定で正確なクローンを選んでHindIII及びEcoRIで酵素切断し、アガロースゲル電気泳動でキメラ抗体の軽鎖断片c23C3VLCLを精製して回収し、HindIII及びEcoRIで二重酵素切断されたプラスミドpcDNA3.1/ZEO(+)(米国Invitrogen社製)と連結し、キメラ軽鎖の真核発現ベクターpcDNA3.1/ZEO(+)(c1A12VLCL)を構築した。

30

40

【0086】

構築されたキメラ重鎖及び軽鎖の発現ベクターをリポフェクション法でCOS-1細胞(ATCC CRL 1650)にコトランスフェクションし、72時間後培養上清を採って分析し、以下のよう
にELISAによって培養上清におけるキメラ抗体c23C3の含有量を確認した。ヒツジ抗ヒトIgG(Fc)でELISAプレートを被覆し、2%BSA-PBSで37℃で2時間ブロックし、測定しようとする培養上清及び標準品(ヒト骨髄腫IgG1, κ)を入れ、37℃で2時間インキュベートし、HRP-ヒツジ抗ヒトκを入れて結合反応を行い、37℃で1時間インキュベートし、TMBを入れて37℃で5分間作用させ、最後にH₂SO₄で反応を終止させ、OD450値を測定した。

【0087】

実施例8．マウス由来23C3モノクローナル抗体の可変領域(Fv)の三次元構造のホモロ

50

ジーモデリング

Accelrys社のInsight IIプログラムパッケージで23C3マウス由来モノクローナル抗体の可変領域の三次元構造をシミュレーションした。まず、BLASTプログラムでタンパク質構造データベース(Protein Data Bank、PDB)からそれぞれ23C3の重鎖及び軽鎖の可変領域のタンパク質の鋳型タンパク質を見つけた。一番高い相同性を持つ抗体1cbvと1F6Lを23C3のモデリング鋳型に選択し、Insight IIプログラムで23C3の三次元構造をモデリングした(図28)。

【0088】

実施例9．抗OPNヒト化抗体h23C3の設計及び構築

BLASTプログラムでGenbankのデータベースからそれぞれ23C3の軽鎖及び重鎖の可変領域と最も類似のヒト由来鋳型を見つけた。23C3の重鎖の可変領域と一番高い相同性を持つヒト由来抗体は、ヒト抗体のAAT51715.1抗体(gb|AAT51715.1|)で、類似度が72%で、23C3の軽鎖の可変領域と一番高い相同性を持つヒト由来抗体は、BAC01726.1(dbj|BAC01726.1|)で、類似度が72%である。それで、それぞれAAT51715.1及びBAC01726.1をそれぞれ23C3の重鎖及び軽鎖のヒト化の鋳型として使用した。

【0089】

まず、23C3の重鎖及び軽鎖のCDR領域をそれぞれ直接ヒト由来鋳型のAAT51715.1及びBAC01726.1に移植し、CDR移植抗体を構成し、重鎖はh23C3Haで、軽鎖はh23C3Laであった。h23C3Ha及びh23C3Laの可変領域配列は図29に示される通りである。全遺伝子でヒト化抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域の遺伝子(h23C3VHa及びh23C3VLa)を合成し、さらにh23C3VHa遺伝子とpGEM-T/CHベクターを鋳型とし、95℃で15分間、そして94℃で50秒、58℃で50秒、72℃で50秒を一つのサイクルとして30サイクル、さらに72℃で10分間という反応条件でオーバーラップPCRによってヒト化抗体の重鎖の遺伝子を合成した。そして、このヒト化重鎖の遺伝子の5'末端に制限酵素切断部位HindIIIとシグナルペプチドの遺伝子配列を、3'末端に翻訳終止コドンTAAと制限酵素切断部位EcoRIを含有するようにした。シグナルペプチドの遺伝子配列はATGGATTTTCAGGTGCAGATTTTCAGCTTCCTGCTAATCAGTGCCTCAGTCATAATATCCAGAGGA(配列番号52)である。最後に、アガロースゲル電気泳動でPCR増幅産物を分離し、目的バンドを回収してpGEM-Tベクターに組み込み、陽性クローンをスクリーニングし、配列決定を行った。配列決定で正確なクローンを選んでHindIII及びEcoRIで酵素切断し、アガロースゲル電気泳動でヒト化抗体の重鎖断片h23C3VHaCHを精製して回収し、T4 DNAリガー

【0090】

h23C3VLa遺伝子とpGEM-T/CLベクターを鋳型とし、95℃で15分間、そして94℃で50秒、58℃で50秒、72℃で50秒を一つのサイクルとして30サイクル、さらに72℃で10分間という反応条件でオーバーラップPCRによってヒト化抗体の軽鎖の遺伝子を合成し、5'末端に制限酵素切断部位HindIIIとシグナルペプチドの遺伝子配列を、3'末端に翻訳終止コドンTAAと制限酵素切断部位EcoRIを含有するPCR産物h23C3VLaCLを得た。シグナルペプチドの遺伝子配列はATGGATTTTCAGGTGCAGATTTTCAGCTTCCTGCTAATCAGTGCCTCAGTCATAATATCCAGAGGA(配列番号52)である。配列決定で正確なクローンを選んでHindIII及びEcoRIで酵素切断し、アガロースゲル電気泳動でヒト化抗体の軽鎖断片h23C3VLaCLを精製して回収し、HindIII及びEcoRIで酵素切断されたプラスミドpcDNA3.1/ZE0(+)ベクター(米国Invitrogen社製)と連結し、ヒト化軽鎖の真核発現ベクターpcDNA3.1/ZE0(+) (h23C3VLaCL)を構築した。

【0091】

構築されたヒト化重鎖及び軽鎖の発現ベクターをリポフェクション法でCOS-1細胞(ATCC CRL 1650)にコトランスフェクションし、72時間後培養上清を採って分析し、以下のよう

にELISAによって培養上清におけるヒト化抗体(H23C3Ha/H23C3La)の含有量を確認した。ヒツジ抗ヒトIgG(Fc)でELISAプレートを被覆し、2%BSA-PBSで37℃で2時間ブロックし、測定しようとする培養上清及び標準品(ヒト骨髓腫IgG1, κ)を入れ、37℃で2時間インキ

ュベートし、HRP-ヒツジ抗ヒトκを入れて結合反応を行い、37℃で1時間インキュベートし、TMBを入れて37℃で5分間作用させ、最後にH₂SO₄で反応を終止させ、OD₄₅₀の値を測定した。

【0092】

2μg/mlのOPNでELISAプレートを被覆し、ELISA法によってトランスフェクションで得られたヒト化抗体のOPNと特異的に結合する活性を検出したところ、C23C3キメラ抗体と比べ、H23C3HaとH23C3Laからなるヒト化抗体(H23C3a/H23C3La)は活性が殆ど喪失したことを見出した。従って、高親和力のヒト化抗体を獲得するため、h23C3抗体の結合活性に影響する可能性があるFR領域のマウス由来残基を分析し、且つ復帰突然変異させる必要がある。モデリングで得られた23C3抗体の可変領域の三次元構造(図28)を分析することにより、CDR領域から5A以内の空間範囲には、元抗体CDR配座に影響でき、且つヒト由来鋳型における相応の位置と異なるFR領域の残基が7つあり、それぞれL1Tyr、L45Gln、L48Val、L70Gln、H30Asn、H49Ala及びH93Valであることを発見した。これらのマウス由来アミノ酸残基を構築されたCDR移植抗体に保留することにより、ヒト化抗体(h23C3Hb/h23C3Lb)が得られた。h23C3Hb及びh23C3Lbの可変領域のアミノ酸配列は図29に示される通りである。配列番号7と配列番号8は、それぞれh23C3Hbの可変領域のヌクレオチド配列とアミノ酸配列を示す。配列番号9と配列番号10は、それぞれh23C3Lbの可変領域のヌクレオチド配列とアミノ酸配列を示す。それぞれ全遺伝子でヒト化抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域の遺伝子(h23C3VHb/h23C3VLb)を合成し、且つヒト化抗体(h23C3Ha/h23C3La)と同様な方法で軽鎖発現ベクター-pcDNA3.1/ZEO(+)(VH23C3VLbCL)及び重鎖発現ベクター-pcDNA3.1(+)(VH23C3VHbCH)を構築した。その後、軽・重鎖発現ベクターをCOS-1細胞にコトランスフェクションし、ELISA法によって抗体の抗原結合活性を測定し、OPNタンパク(2μg/ml)でELISAプレートを被覆し、4℃で一晩置き、2%BSA-PBSで37℃で2hブロックし、測定しようとするH23C3の培養上清を入れ、37℃で2hインキュベートし、HRP-ウサギ抗ヒトIgGを入れて結合反応を行い、37℃で1hインキュベートし、TMBを入れて37℃で5分間作用させ、最後にH₂SO₄で反応を終止させ、A450とA630の値を測定した。H23C3のOPNとの特異的結合の結果は図30に示された。

【0093】

そのOPNとの結合活性は、c23C3キメラ抗体と類似で、このヒト化抗体(h23C3Hb/h23C3Lb)をh23C3と名付けた。

【0094】

実施例10．抗OPNヒト化抗体h23C3の安定発現及び精製

上述構築されたc23C3又はh23C3の軽・重鎖のプラスミドをリポフェクション法でCHO-K1細胞(ATCC CRL-9618)にコトランスフェクションし、トランスフェクションから24h後、細胞を600μg/mlのG418及び250μg/mlのZeocinを含有する選択培地に移して耐性クローンをスクリーニングした。細胞の培養上清を取ってELISA検出で高発現クローンをスクリーニングし、スクリーニングで得られた高発現クローンを無血清培地で増殖培養し、プロテインAアフィニティーカラム(GE社製)でキメラ抗体c23C3又はヒト化抗体h23C3を分離・精製し、最後に紫外線吸収法で定量した。

【0095】

実施例11．キメラ抗体c23C3及びヒト化抗体h23C3のOPNとの結合能力の検出

hOPNを5μg/レーンで10% SDS-PAGE電気泳動を行い、360mAの一定電流で1時間電気泳動した後ニトロセルロース膜に移し、10%脱脂粉乳で4℃で一晩或いは室温で2時間ブロックし、1×TBST(Tween-20 0.1%)で毎回10分間で3回洗浄し、それぞれ10μg/mlのc23C3及びh23C3と室温で1時間反応させ、1×TBST(Tween-20 0.1%)で毎回10分間で5回洗浄し、1:1000で希釈したHRP標識のマウス抗マウスIgG(北京中山社)と室温で1時間反応させ、ECLキット(Tiagen社)で1-2分間反応させ、医療用青感光性X線フィルムで押して露光した。結果が図31に示された。結果から、c23C3及びh23C3はいずれもhOPNと特異的に結合することが示された。

【0096】

実験例I. 23C3モノクローナル抗体のCIA関節炎モデルのマウスに対する影響の実験

実験例I-1. 23C3モノクローナル抗体による治療のCIAマウスの関節炎発病指数、発病時間及び発病率に対する影響の実験

100 μ gのニワトリII型コラーゲン (Condrex) と同体積の完全フロインドアジュバントを乳化した後、尾部皮下でDBA/1Jマウス (32匹) (雄、8-10週) に初の免疫を行い、21日後再び免疫し、すなわち、100 μ gのニワトリII型コラーゲンと同体積の不完全フロインドアジュバントを乳化した後、尾部皮下で再び免疫した。2回免疫したマウスを4群に分け、それぞれ対照抗体 (マウスIgG、200 μ g/匹、Sigma)、23C3モノクローナル抗体 (200 μ g/匹、100 μ g/匹、50 μ g/匹) を投与し、すべての治療群は腹腔内投与で、2回目の免疫の当日から1日おきに継続的に6回投与した。2回目の免疫の当日から、関節炎発病指数、発病時間及び発病率を合計30日観察した。マウスの関節炎の重篤度は、文献(A Role for the Lymphotoxin/LIGHT Axis in the Pathogenesis of Murine Collagen-Induced Arthritis. 「コラーゲンに誘導されたマウス関節炎の発病機構におけるリンホトキシン/LIGHT Axisの作用」 Roy A. Fava, Evangelia Notidis, Jane Hunt, Veronika Szanya, Nora Ratcliffe, Apinya Ngam-ek, Antonin R. de Fougereolles, Andrew Sprague and Jeffrey L. Brownrig. The Journal of Immunology, 2003, 171: 115 - 126.)を参照して採点した。具体的に、各足に対して、それぞれ炎症の具合によって、腫れがない場合を0点と、1つの指が腫れ、或いは僅かの水腫の場合を1点と、複数の指が腫れ、或いは中度の水腫の場合を2点と、多数の指が腫れ、或いは重度の水腫の場合を3点と、すべての指が腫れ、或いは奇形の場合を4点と採点した。マウス関節炎の疾患指数は、前肢及び後肢の炎症点数の合計である。

【0097】

実験結果は、図3a、3b、3cに示された。対照治療群と比較すると、23C3モノクローナル抗体は、いずれも顕著に関節炎の発病指数を降下させ、発病時間を遅らせたが、発病率には顕著な影響がなかった。

【0098】

実験例I-2. 23C3モノクローナル抗体による治療のCIAマウスの関節の骨吸収に対する保護作用の実験

23C3モノクローナル抗体200 μ g群と対照治療群のCIAマウス (実験例I-1と同様) について、2回目の免疫から30日の時点で、X線検出を行い、各発病の関節の骨破壊の様子を観察した。結果は、図4に示されるように、治療群と比べ、23C3モノクローナル抗体治療群では、マウスの各指間で関節の骨吸収が顕著ではなかった。23C3モノクローナル抗体の骨吸収に対する良好な保護作用が示唆された。

【0099】

実験例I-3. 23C3モノクローナル抗体の体外におけるリンパ球の移動に対する阻害作用の実験

無菌でCIAマウス (実験例I-1) の脾臓を分離し、100メッシュのスチール網を通し、PBSで2回洗浄し、リンパ球分離液で脾臓リンパ球を分離し、2000rpm $\times$ 20分間で遠心し、リンパ球層を引出し、PBSで2回洗浄し、計数し、且つリンパ球の濃度を 5×10^6 個細胞/mlに調整した。24ウェル組織培養プレートにおいて、上層は、径5 μ mの膜を有し、10 μ gのOPNで下層を被覆しておいた。上層の各ウェルに、異なる抗体、すなわち23C3 (抗OPNモノクローナル抗体)、Her-2抗体 (無関連抗体対照)、抗OPNポリクローナル抗体 (CHEMICONから購入) と同時にリンパ球を 5×10^5 加えた。37 $^{\circ}$ C、5%CO₂で2時間インキュベートし、PBSで2回洗浄し、下層のウェルにおける細胞数を計数し、5つの高倍率の視野で平均値を得て、さらに50をかけた。

【0100】

実験結果は図5に示された。23C3モノクローナル抗体は、有効にリンパ球の移動を遮断することができ、且つ使用量依存性をもつ。

【0101】

実験例I-4. 異なる治療群のCIAマウスの血漿及び関節組織におけるOPNレベルの変化の

10

20

30

40

50

実験

異なる時点(0、7、14或いは28日)で異なる治療群のDBA/1Jマウス(実験例I-1)の血漿を採取し、マウスOPNのELISAキット(R&D社)でOPNのタンパク質濃度を検出した。具体的に、マウスの外眼角静脈から採血し、すぐ4000rpmで10分間遠心し、血漿を分離した。1:200で希釈してELISA検出キットの96ウェルプレートに加え、常温で1時間インキュベートし、PBSTで5回洗浄し、ビオチン標識抗OPN第一抗体を加え、常温で1時間インキュベートし、5回洗浄し、アビジン標識第二抗体を加え、常温で1時間インキュベートし、6回洗浄した後、基質のTMBで着色させ、OD450で吸光度を検出した。標準曲線によって、血漿標本におけるOPNの濃度を算出した。

【0102】

10

結果が図6aに示された。対照群は、OPNレベルが23C3治療群よりも遥かに高く、14日目にOPNレベルが最高で、23C3治療群の10倍となり、OPNタンパクレベルが発病及び重篤度と相関し、且つOPNのレベルを低下させることによって関節炎の重篤度を低下させることができることが示唆された。

【0103】

14日目の実験例I-1における異なる治療群のCIAマウスの関節組織を取り、皮膚及び筋肉組織を除き、RNeasy Miniキット(QIAGEN)で組織の全RNAを抽出し、Sensiscript RT Kit (QIAGEN)でRNAをcDNAに逆転写した。リアルタイムPCRの要求に応じて、表1に示されたようにOPNのプライマーを設計した。SYBR Green Master Mix(Applied Biosystems)でリアルタイムPCRを行い、OPNのmRNAレベルを検出した。反応工程は、50℃で2分間、95℃で10分間、95℃で15秒及び60℃で60秒、40サイクルであった。GAPDH遺伝子を内部参照とした。実験データは、ABI PRISM 7900シーケンシングシステム(Applied Biosystems)で分析した。

20

【0104】

実験結果は、図6bに示されるように、23C3モノクローナル抗体治療群では、関節組織におけるOPNのレベルが対照群のOPNのレベルよりも遥かに低く、且つ23C3群ではOPNレベルがさらに低かった。23C3が組織におけるOPNタンパクを中和することによってOPNのmRNAレベルを調節することが示唆された。

【0105】

実験例I-5. 異なる治療群のCIAマウスの関節組織におけるOPN受容体レベルの変化の実験

30

14日の実験例I-1における異なる治療群のCIAマウスの関節組織を取り、皮膚及び筋肉組織を除き、RNeasy Miniキット(QIAGEN)で組織の全RNAを抽出し、Sensiscript RT Kit (QIAGEN)でRNAをcDNAに逆転写した。リアルタイムPCRの要求に応じて、OPNの各受容体のプライマーを設計した。具体的に表1に示された。SYBR Green Master Mix(Applied Biosystems)でリアルタイムPCRを行い、OPN受容体の組織mRNAレベルを検出した。反応工程は実施例4と同様であった。実験データは、ABI PRISM 7900シーケンシングシステム(Applied Biosystems)で分析した。

【0106】

実験結果は、図7に示されるように、CD44、 $\beta 1$ 、 $\alpha 8$ は対照群及び治療群では正常マウスと顕著な変化がなかったが、 αv 、 $\beta 3$ 、 $\beta 5$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 9$ は対照群では顕著に正常マウスよりも高く、23C3モノクローナル抗体による治療後、そのmRNAレベルが顕著に低下した。 αv 、 $\beta 3$ 、 $\beta 5$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 9$ の5種のOPN受容体が関節炎の発病に参与すること、及び23C3が組織におけるOPNタンパクを中和することによってOPN受容体のmRNAレベルを調節することが示唆された。

40

【表 1】

表1 OPNの各受容体のプライマー

リアルタイムPCR実験で検出された分子の特異性プライマー

名称	配列番号	プライマー	配列(5' → 3')
GAPDH	26	FW	CTTCACCACCATGGAGAAGGC
	27	RV	GGCATGGACTGTGGTCATGAG
OPN	28	FW	GATTTGCTTTTGCCTGTTTGG
	29	RV	TGAGCTGCCAGAATCAGTCACT
αv	30	FW	CTCTGAAACCTGAGGTGCTTCT
	31	RV	GGGCGAAGTAAATGTAACCT
$\alpha 4$	32	FW	GAATCCAAACCAGACCTGCGA
	33	RV	TGACGTAGCAAATGCCAGTGG
$\alpha 8$	34	FW	TTGAAGCTGTCAGCTAGACC
	35	RV	CACACCACCATCCTGGTCAC
$\alpha 9$	36	FW	TTAAGTGTCGTGTCCATACC
	37	RV	GATGTTCTTCCAACGATGGG
$\beta 1$	38	FW	CCTACTGGTCCCGACATCAT
	39	RV	GTCCCACTTGGCATTCACTT
$\beta 3$	40	FW	TGATATCCTGGTGGTACTGCTG
	41	RV	GTTGTTTGCTGTGTCCCACTTA
$\beta 5$	42	FW	CAACAAATCCTACAATGGCTCA
	43	RV	ACACCAGAGTCTCCTTGCTTTC
CD44	44	FW	TGAAGTTGGCCCTGAGCAA
	45	RV	CTCGGAATTACCACATTTCTTCT
IL-1 β	46	FW	CAACCAACAAGTGATATTCTCCA
	47	RV	GATCCACACTCTCCAGCTGCA
IL-6	48	FW	GAGGATACCACTCCCAACAGACC
	49	RV	AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA
TNF- α	50	FW	CATCTTCTCAAAATTGAGTGAC
	51	RV	TGGGAGTAGACAAGGTACAACC

FW= フォワード、RV= リバース

【0107】

実験例I-6．異なる治療群のCIAマウスの関節組織における各種のサイトカインの変化の実験

実験例I-1における14日の異なる治療群のCIAマウスの関節組織を取り、皮膚及び筋肉組織を除き、RNeasy Miniキット(QIAGEN)で組織の全RNAを抽出し、Sensiscript RT Kit (QIAGEN)でRNAをcDNAに逆転写した。リアルタイムPCRの要求に応じて、各種のサイトカインのプライマーを設計した。具体的に上述表1に示された。SYBR Green Master Mix(Applied Biosystems)でリアルタイムPCRを行い、サイトカインの組織mRNAレベルを検出した。反応工程は実施例4と同様であった。実験データは、ABI PRISM 7900シーケンシングシステム(Applied Biosystems)で分析した。

【0108】

実験結果は、図8に示されるように、炎症誘発性サイトカインのTNF- α 、IL-1及びIL-6は対照群ではmRNAレベルが顕著に正常マウスよりも高かったが、23C3モノクローナル抗体による治療後、そのmRNAレベルが顕著に低下した。同時に、Th1型サイトカインIFN- γ 及びTh2型サイトカインIL-10も、23C3モノクローナル抗体による治療後、mRNAレベルが顕著に低下した。23C3が炎症誘発性サイトカインのレベルを降下させることによって関節炎の炎症の重篤度を低下させること、及びTh1型免疫反応だけではなく、Th2型免疫反応をダウンレギュレートすることもできることが示唆された。

【0109】

実験例I-7. 異なる治療群の体外のリンパ球の既往応答反応の変化の実験

無菌で実験例I-1における異なる治療群のCIAマウスの脾臓とリンパ節を分離し、100メッシュのスチール網を通し、PBSで2回洗浄し、リンパ球分離液で脾臓リンパ球を分離し、2000rpm×20分間で遠心し、リンパ球層を引出し、PBSで2回洗浄し、計数し、且つリンパ球の濃度を 5×10^6 個細胞/mlに調整した。各ウェルにリンパ球を 5×10^5 個ずつ加えると同時に、異なる濃度のニワトリII型コラーゲンを加えて刺激した。37℃、5%CO₂で72時間インキュベートし、56時間目にサイトカインのIFN- γ 及びIL-10の検出のため上清を回収し、同時に各ウェルに³H(0.5uCi)を含有する培養液を100 μ lずつ加え、続いて16時間培養した後、細胞収集器で細胞を収集し、 γ 液体シンチレーション検出器で検出した。

【0110】

実験結果は図9に示された。23C3モノクローナル抗体治療群では、リンパ球のニワトリII型コラーゲンに対する応答能力が顕著に対照群のマウスよりも低く、且つ応答の過程に、Th1型サイトカインIFN- γ 及びTh2型サイトカインIL-10のレベルも顕著に対照群よりも低かった。

【0111】

実験例I-8. 異なる治療群のCIAマウスの血清における自己抗体のレベルの変化の実験
異なる時点(0、7、14或いは28日)の実験例I-1における異なる治療群のDBA/1Jマウスの血清を採取し、ELISA法で抗II型コラーゲン自己抗体のIgG1、IgG2a及び全Igの血清抗体価を検出した。具体的に、マウスの外眼角静脈から採血し、室温で2時間静置し、4000rpmで10分間遠心し、血清を分離した。100ng/ウェルのニワトリII型コラーゲンで96ウェルプレートに被覆し、4℃で一晩置き、PBSで洗浄した後、10%脱脂粉乳で2時間ブロックし、PBSTで3回洗浄し、1:2000から血清標本を2倍階段希釈して96ウェルプレートに加え、常温で1時間インキュベートし、PBSTで5回洗浄し、HRP標識のウサギ抗マウスIgG1、IgG2a及び全Igの抗体を加え、37℃で2時間インキュベートし、5回洗浄し、基質のo-フェニレンジアミンで着色させ、OD450で吸光度を検出した。標準曲線によって、標本における自己抗体の抗体価を算出した。

【0112】

結果は、図10に示されるように、対照群では、IgG1、IgG2a及び全Igの血清抗体価がいずれも遥かに23C3治療群よりも高く、14日目にIgG1、IgG2a及び全Igの血清抗体価が最高であった。自己抗体のレベルが発病及び重篤度に関わり、且つ23C3モノクローナル抗体がIgG1、IgG2a及び全Igのレベルを降下させることによって関節炎の重篤度を低下させることが示唆された。

【0113】

実験例I-9. 異なる治療群のCIAマウスの関節組織におけるRANKL/RANK/OPGのレベルの変化の実験

28日目の実施例1における異なる治療群のマウス(実験例I-1)の関節組織を取り、皮膚及び筋肉組織を除き、RNeasy Miniキット(QIAGEN)で組織の全RNAを抽出し、Sensiscript RT Kit (QIAGEN)でRNAをcDNAに逆転写した。リアルタイムPCRの要求に応じて、RANKL、RANK及びOPGのプライマーを設計した。具体的に上述表1と同様である。SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems)でリアルタイムPCRを行い、RANKL、RANK及びOPGの組織mRNAレベルを検出した。反応工程は、実施例におけるヒト・マウスOPNの真核細胞発現及び精製の工程と同様である。実験データは、ABI PRISM 7900シーケンシングシステム(Applied Bio

systems)で分析した。

【0114】

実験結果は、図11に示されるように、破骨細胞の分化及び増殖を促進する調節因子のRA NKL及びRANKは対照群ではmRNAレベルが顕著に正常マウスよりも高かったが、23C3モノクローナル抗体による治療後、そのmRNAレベルが顕著に低下した。OPGレベルは対照群と治療群で顕著な変化がなかった。23C3がRANKL及びRANKのレベルをダウンレギュレートすることによって、破骨細胞の機能を抑制し、関節炎の骨の破壊・吸収を低下させることが示唆された。

【0115】

実験例I-10. 異なる治療群のCIAマウスの尿液におけるD-pyrレベルの変化の実験

異なる治療群のDBA/1Jマウス(実験例I-1)の2回目の免疫から30日目の尿液を収集し、マウスD-pyr ELISAキット(R&D社)でD-pyrのレベルを検出した。結果は、図12に示されるように、23C3モノクローナル抗体治療群では尿液におけるD-pyrが顕著に対照群よりも低かった。

【0116】

実験例II. 23C3モノクローナル抗体の肝炎モデルのマウスに対する影響の実験

実験例II-1. 23C3モノクローナル抗体による肝炎モデルのマウスの死亡率に対する影響の実験

C57BL/6(雄、8-10週)マウス(第二軍医大学実験動物センターから購入)に対して無関連の対照抗体Ig(Sigma)、23C3モノクローナル抗体を各群に10匹ずつ、1匹に200 µgずつ、腹腔内に投与し、2時間後、尾静脈にConA (30mg/ml)を200 µlずつ注射し、急性劇症肝炎を誘導し、24時間継続に23C3モノクローナル抗体の肝炎マウスの死亡率に対する影響を観察した。

【0117】

実験結果は図13に示された。対照治療群と比べ、23C3モノクローナル抗体群では、顕著にマウスの死亡率を低下させることができ、中でも、23C3モノクローナル抗体の保護作用がより強かった。

【0118】

実験例II-2. 23C3モノクローナル抗体による肝炎モデルのマウスの肝臓に対する保護作用の実験

C57BL/6(雄、8-10週)マウスに対して無関連の対照抗体Ig(Sigma)、23C3モノクローナル抗体を各群に10匹ずつ、1匹に200 µgずつ、腹腔内に投与し、2時間後、尾静脈にConA (30 mg/ml)を200 µlずつ注射し、急性劇症肝炎を誘導した。ConAの注射後、0、3、6、12、24及び48時間の時点で各治療群のマウスの血清を採取し、ALT及びASTのレベルの変化を検出し、同時に12時間の時点で各群のマウスの肝臓を採取し、HE及びTUNELの染色を行い、肝臓の壊死、炎症浸潤及びアポトーシスの様子を観察した。

【0119】

実験結果は図14に示された。図14aの結果は、対照治療群と比べ、23C3モノクローナル抗体群のいずれでも顕著に血清におけるALT及びASTのレベルを降下させることができ、中でも、23C3モノクローナル抗体群ではALT及びASTの各時点のレベルがいずれも他の群よりも低かったことを示した。図14bから、23C3モノクローナル抗体群では、肝臓壊死が軽度で、炎症細胞の浸潤の具合が顕著に対照群よりも低かったことがわかった。TUNEL染色から、対照群では肝細胞のアポトーシスが重度で、60%近くの肝細胞はアポトーシスが生じたが、23C3治療群では、約20%であったことがわかった。したがって、上述の肝臓損傷指標及び病理指標は、いずれも23C3が顕著な肝臓保護作用をもつことを示唆した。

【0120】

実験例II-3. 異なる治療群の肝炎モデルのマウスの血漿及び肝臓組織におけるOPNレベルの変化の実験

異なる時点(0、3、6、12、24時間)で異なる治療群のC57BL/6マウス(実験例II-2)の血漿を採取し、マウスOPN ELISAキットでOPNのタンパク質濃度を検出した。具体的に、マウ

10

20

30

40

50

スの外眼角静脈から採血し、すぐ4000rpmで10分間遠心し、血漿を分離した。1:200で希釈してELISA検出キットの96ウェルプレートに加え、常温で1時間インキュベートし、PBSTで5回洗浄し、ビオチン標識抗OPN第一抗体を加え、常温で1時間インキュベートし、5回洗浄し、アビジン標識第二抗体を加え、常温で1時間インキュベートし、6回洗浄した後、基質のTMBで着色させ、OD450で吸光度を検出した。標準曲線によって、血漿標本におけるOPNの濃度を算出した。

【0121】

結果が図15aに示された。対照群では、OPNレベルが遥かに23C3治療群よりも高く、23C3治療群ではOPNレベルがいずれの時点でも最低であった。

【0122】

6時間の時点で異なる治療群のマウス（実験例II-2）の肝臓組織を取り、RNeasy Miniキット(QIAGEN)で組織の全RNAを抽出し、Sensiscript RT Kit (QIAGEN)でRNAをcDNAに逆転写した。リアルタイムPCRの要求に応じて、表1に示されたようにOPNのプライマーを設計した。SYBR Green Master Mix(Applied Biosystems)でリアルタイムPCRを行い、OPNのmRNAレベルを検出した。反応工程は、50℃で2分間、95℃で10分間、95℃で15秒及び60℃で60秒、40サイクルであった。GAPDH遺伝子を内部参照とした。実験データは、ABI PRISM 7900シーケンシングシステム(Applied Biosystems)で分析した。

【0123】

実験結果は、図15bに示されるように、23C3モノクローナル抗体治療群では肝臓組織におけるOPNのレベルが遥かに対照群のOPNレベルよりも低く、OPNモノクローナル抗体が組織におけるOPNタンパクを中和することによってOPNのmRNAレベルを調節することが示唆された。

【0124】

実験例II-4. 異なる治療群の肝炎モデルのマウスの血漿及び肝臓組織におけるサイトカインのレベルの変化の実験

異なる時点(0、3、6、12或いは24時間)で異なる治療群のC57BL/6マウス（実験例II-2）の血漿を採取し、マウスTNF- α ・IFN- γ ELISAキット(R&D)でTNF- α ・IFN- γ のタンパク質濃度を検出した。具体的に、マウスの外眼角静脈から採血し、室温で2時間静置し、血清を分離した。1:100で希釈してELISA検出キットの96ウェルプレートに加え、常温で1時間インキュベートし、PBSTで5回洗浄し、ビオチン標識の抗TNF- α ・IFN- γ 第一抗体を加え、常温で1時間インキュベートし、5回洗浄し、アビジン標識第二抗体を加え、常温で1時間インキュベートし、6回洗浄した後、基質のTMBで着色させ、OD450で吸光度を検出した。標準曲線によって、血漿標本におけるTNF- α ・IFN- γ の濃度を算出した。

【0125】

実験結果は、図16aに示されるように、サイトカインTNF- α ・IFN- γ のレベルが対照群では顕著に23C3モノクローナル抗体治療群よりも高かった。

【0126】

6時間の時点で異なる治療群のマウスの肝臓組織を取り、RNeasy Miniキット(QIAGEN)で組織の全RNAを抽出し、Sensiscript RT Kit (QIAGEN)でRNAをcDNAに逆転写した。リアルタイムPCRの要求に応じて、各種のサイトカインのプライマーを設計した。具体的に表1に示された。SYBR Green Master Mix(Applied Biosystems)でリアルタイムPCRを行い、サイトカインの組織mRNAレベルを検出した。反応工程は実施例3と同様であった。実験データは、ABI PRISM 7900シーケンシングシステム(Applied Biosystems)で分析した。

【0127】

実験結果は、図16bに示されるように、炎症誘発性サイトカインのTNF- α 、IL-1 β 及びIL-6は対照群ではmRNAレベルが顕著に正常マウスよりも高かったが、23C3モノクローナル抗体による治療後、そのmRNAレベルが顕著に低下した。同時に、Th1型サイトカインIFN- γ も、23C3モノクローナル抗体による治療後、mRNAレベルが顕著に低下した。23C3が炎症誘発性サイトカインのレベルを降下させることによって肝臓の炎症の重篤度を低下させること、及びTh1型免疫反応をダウンレギュレートすることもできることが示唆された。

【0128】

実験例III. 23C3モノクローナル抗体のクローン病モデルのマウスに対する影響の実験
 実験例III-1. 23C3モノクローナル抗体のクローン病モデルのマウスの体重、疾患活動性指数(DAI)及び脾臓指数に対する影響の実験

デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)飲水法で実験性大腸炎マウスを30匹再現し、すなわち、水の代わりに30g/L DSSをマウスに継続に7日間飲ませた。上述マウスを平均に对照Ig対照治療群、23C3モノクローナル抗体治療群の3群にわけた。モデル構築の当日から継続に3日間、毎回200 μ g/匹腹腔内投与した。毎日実験マウスの体重を記録し、毎日のマウスの大便の性状、潜血試験及び体重の変化によってマウスの疾患活動性指数(採点基準が表2に示された)を評価した。

【表2】

表2. 疾患活動性指数(DAI)の採点基準

点数	体重低下(%)	大便性状	血便
0	なし	正常	陰性
1	1-5	正常	陰性
2	6-10	半希薄便	潜血(+)
3	10-15	半希薄便	潜血(+)
4	>15	希薄便	肉眼で血便

$$DAI=(\text{体重低下点数}+\text{大便性状点数}+\text{血便点数})/3$$

【0129】

7日目にマウスの脾臓を取り、秤量し、脾臓指数(脾臓重量/体重)を算出した。

【0130】

実験結果は、図17a、17b、17cに示された。对照治療群では、すべての動物に軟便又は下痢、血便及び体重の低下が確認されたが、モノクローナル抗体治療群では、マウスは比較的に大便が形になっており、血便及び体重の低下が顕著ではなかった。各群の疾患活動性指数は、モノクローナル抗体治療群が对照治療群よりも顕著に低下した。对照治療群では、マウスの脾臓指数が正常マウスよりも顕著に上昇したが、モノクローナル抗体治療群では、脾臓指数の上昇が顕著ではなかった。

【0131】

実験例III-2. 異なる治療群のクローン病モデルのマウス大腸の病理的組織変化の実験
 7日目の異なる治療群の病変大腸組織(実験例III-1)を採取し、PBSで洗浄した後、10%ホルムアルデヒドで固定し、通常のパラフィン包埋を行い、連続に2 μ mの組織切片とし、HE染色を行った。光学顕微鏡で異なる治療群の組織学的変化を観察した。具体的な採点基準は表3に示された。

【表3】

表3. 病理的組織損害の採点基準

点数	炎症の具合	炎症の範囲	潰瘍の深さ	潰瘍の範囲
0	なし	なし	なし	1-25%
1	軽度	粘膜層	基底部 1/3	26-50%
2	中度	粘膜層及び粘膜下層	基底部 2/3	51-75%
3	重度	全層	表面上皮だけ完全	76-100%
4			全層潰瘍	

【0132】

結果は図18に示された。光学顕微鏡によって、対照治療群では、大腸組織の構造が不完全で、潰瘍が深く、範囲が広く、炎症性滲出物があり、リンパ球及び好中性顆粒球が大量に浸潤したことが確認され、且つ数が不均一な単球及び好酸性顆粒球が見られた。対照群と比べ、23C3モノクローナル抗体治療群では、組織の構造が比較的完全で、炎症及び潰瘍の具合が軽度で、リンパ球及び好中性顆粒球の浸潤が少なく、組織点数が顕著に対照治療群よりも低かった。

【0133】

実験例III-3. 23C3モノクローナル抗体によるクローン病モデルのマウス腸組織のミエロペルオキシダーゼ (MPO) の活性に対する影響の実験

腸組織ミエロペルオキシダーゼ (MPO) 活性の検出は、商品化された試薬で行った。各治療群の0、3、7日の大腸組織 (実験例III-1) を取り、同様な重量を秤量した後、細かく切り、氷浴で30秒ホモジネートし (0.5% HTAB含有緩衝液中)、ホモジネート液を超音波で10秒処理し、3回凍結・溶解を繰り返し、15000g × 15分間で遠心した。ホモジネート上清0.1mlに0.167mg/mlのo-ジアニシジン塩酸塩 (O-dianisidine hydrochloride) を2.9ml加え、そして0.0005%のH₂O₂を加え、OD460を検出した。公式でMPOの活性を換算し、1単位のMPO活性は、1分間でペルオキシダーゼを1μmol分解することに相当する。

【0134】

結果は図19に示された。各群では、MPOの活性が時間依存性を持ち、炎症の進展につれてMPOの活性も段々増えた。中でも、対照治療群では、MPOレベルが3・7日目に顕著に23C3モノクローナル抗体治療群よりも高く、且つ23C3群ではMPO活性レベルが最低であった。

【0135】

実験例III-4. 異なる治療群のクローン病モデルのマウス腸組織におけるTNF-α、IL-1β及びIL-6のmRNAレベルの変化の実験

3日目と7日目の時点で異なる治療群のマウスの腸組織 (実験例III-1) を取り、RNeasy Miniキット (QIAGEN) で組織の全RNAを抽出し、Sensiscript RT Kit (QIAGEN) でRNAをcDNAに逆転写した。リアルタイムPCRの要求に応じて、各種のサイトカインのプライマーを設計した。具体的に表1に示された。SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) でリアルタイムPCRを行い、サイトカインの組織mRNAレベルを検出した。反応工程は実施例3と同様であった。実験データは、ABI PRISM 7900シーケンシングシステム (Applied Biosystems) で分析した。

【0136】

実験結果は、図20のように、炎症誘発性サイトカインのTNF-α、IL-1β及びIL-6は対照群ではmRNAレベルが顕著に正常マウスよりも高かったが、23C3モノクローナル抗体による治療後、そのmRNAレベルが顕著に低下した。23C3が炎症誘発性サイトカインのレベルを低下させることによって大腸の炎症の重篤度を低下させることが示唆された。

【0137】

実施例III-5. 異なる治療群のクローン病モデルのマウスの腸組織及び血漿におけるOPNレベルの変化の実験

異なる時点 (0、3、7日) で異なる治療群のC57BL/6マウス (実験例III-1) の血漿を採取し、マウスOPN ELISAキットでOPNのタンパク質濃度を検出した。具体的に、マウスの外眼角静脈から採血し、すぐ4000rpmで10分間遠心し、血漿を分離した。1:200で希釈してELISA検出キットの96ウェルプレートに加え、常温で1時間インキュベートし、PBSTで5回洗浄し、ビオチン標識抗OPN第一抗体を加え、常温で1時間インキュベートし、5回洗浄し、アビジン標識第二抗体を加え、常温で1時間インキュベートし、6回洗浄した後、基質のTMBで着色させ、OD450で吸光度を検出した。標準曲線によって、血漿標本におけるOPNの濃度を算出した。

【0138】

結果が図21の左の図に示された。対照群では、OPNレベルが遥かに23C3治療群よりも高く、23C3治療群ではOPNレベルがいずれの時点でも対照群よりも低かった。

【 0 1 3 9 】

7日目の時点で異なる治療群のマウス（実験例III-1）の大腸病変組織を取り、RNeasy Miniキット(QIAGEN)で組織の全RNAを抽出し、Sensiscript RT Kit (QIAGEN)でRNAをcDNAに逆転写した。リアルタイムPCRの要求に応じて、表1に示されたようにOPNのプライマーを設計した。SYBR Green Master Mix(Applied Biosystems)でリアルタイムPCRを行い、OPNのmRNAレベルを検出した。反応工程は、50℃で2分間、95℃で10分間、95℃で15秒及び60℃で60秒、40サイクルであった。GAPDH遺伝子を内部参照とした。実験データは、ABI PRISM 7900シーケンシングシステム(Applied Biosystems)で分析した。

【 0 1 4 0 】

実験結果は、図21の右の図に示されるのように、23C3モノクローナル抗体治療群では大腸組織におけるOPNのレベルが遥かに対照群のOPNレベルよりも低く、OPNモノクローナル抗体が組織におけるOPNタンパクを中和することによってOPNのmRNAレベルを調節することが示唆された。

【 0 1 4 1 】

実験例IV．c23C3とh23C3抗体の体外におけるリンパ球の移動、免疫応答及び生存に対する影響

実験例IV-1．c23C3とh23C3抗体の体外におけるリンパ球の移動に対する阻害作用の実験
無菌でCIAマウスの脾臓を分離し、100メッシュのスチール網を通し、PBSで2回洗浄し、リンパ球分離液で脾臓リンパ球を分離し、2000rpm×20分間で遠心し、リンパ球層を引出し、PBSで2回洗浄し、計数し、且つリンパ球の濃度を 5×10^6 個細胞/mlに調整した。24ウェル組織培養プレートで、上層は、径5µmの膜を有し、10µgのOPNで下層を被覆しておいた。上層の各ウェルに、異なる濃度の抗体、すなわち23C3、Her-2抗体(無関連抗体対照)、c23C3及びh23C3と同時にリンパ球を 5×10^5 加えた。37℃、5%CO₂で2時間インキュベートし、PBSで2回洗浄し、下層のウェルにおける細胞数を計数し、5つの高倍率の視野で平均値を得て、さらに50をかけた。

【 0 1 4 2 】

実験結果は図32に示された。c23C3とh23C3は、いずれも有効にリンパ球の移動を遮断することができ、且つ使用量依存性をもつが、その阻害効果がマウス由来の23C3モノクローナル抗体よりやや低い。

【 0 1 4 3 】

実験例IV-2．c23C3とh23C3抗体のリンパ球の免疫応答に対する阻害の実験

無菌でCIAマウスの脾臓を分離し、100メッシュのスチール網を通し、PBSで2回洗浄し、リンパ球分離液で脾臓リンパ球を分離し、2000rpm×20分間で遠心し、リンパ球層を引出し、PBSで2回洗浄し、計数し、且つリンパ球の濃度を 5×10^6 個細胞/mlに調整した。各ウェルに、30µg/mlのニワトリII型コラーゲン及び異なる濃度の23C3、対照Ig、c23C3及びh23C3と同時にリンパ球を 5×10^5 個加えた。37℃、5%CO₂で72時間インキュベートし、各ウェルに³H(0.5uCi)を含有する培養液を100µlずつ加え、続いて16時間培養した後、細胞収集器で細胞を収集し、γ液体シンチレーション検出器で検出した。

【 0 1 4 4 】

実験結果は図33に示された。c23C3とh23C3抗体は、いずれも有効にリンパ球のニワトリII型コラーゲンに対する免疫応答反応を阻害することができ、且つ使用量依存性をもつが、その阻害効果がマウス由来の23C3モノクローナル抗体よりやや低い。

【 0 1 4 5 】

実験例IV-3．c23C3とh23C3抗体の活性化リンパ球の生存に対する影響の実験

無菌でCIAマウスの脾臓を分離し、100メッシュのスチール網を通し、PBSで2回洗浄し、リンパ球分離液で脾臓リンパ球を分離し、2000rpm×20分間で遠心し、リンパ球層を引出し、PBSで2回洗浄し、計数し、且つリンパ球の濃度を 5×10^6 個細胞/mlに調整した。各ウェルに、100µg/mlのニワトリII型コラーゲン及び異なる濃度の23C3、対照Ig、c23C3及びh23C3と同時にリンパ球を 5×10^5 個加えた。37℃、5%CO₂で72時間インキュベートし、細胞を収集し、Annexin V-FITCを加え、フローサイトメトリーでアポトーシスの様子を検出した

。

【0146】

結果は、図34のように、c23C3とh23C3抗体は、いずれも有効に活性化リンパ球のアポトーシスを促進することができ、アポトーシス細胞の割合はそれぞれ42%と34%であったが、マウス由来の23C3モノクローナル抗体によって誘導された活性化リンパ球のアポトーシスの割合は55%で、キメラ及びヒト化の抗OPN抗体よりも強かった。

【0147】

実験例V．抗hOPN (23C3) モノクローナル抗体の抗原エピトープの同定実験

実験例V-1．抗hOPN (23C3) モノクローナル抗体の抗原エピトープのスクリーニング実験
ランダムペプチドライブラリー免疫スクリーニング法を使用し、全過程は96ウェルプレートで行った。23C3モノクローナル抗体を100 µg/ml、100 µl/ウェルで4 で一晩被覆し、10%脱脂粉乳 (TBST希釈) で一晩ブロックし、1×TBST (Tween-20 0.1%) で6回洗浄し、ファージランダムペプチドライブラリー (NEB, Ph.D. -12™ ファージディスプレイペプチド実験室キット Phage Display Peptide Library Kit) 4×10^{10} pfu + 正常マウス血清100 µl を室温で1時間緩く振蕩した。1×TBST (Tween-20 0.1%)、1×PBS (pH5.0)、1×PBS (pH3.5)でそれぞれ5回洗浄し、1mg/ml BSA含有グリシン-Cl (pH 2.2)で溶出させ、室温で15分間緩く振蕩し、Tris-Cl (pH 9.1) 15 µlで中和した。10 µlを抗体価の測定に、残りは増幅に供した。増幅産物はPEG/NaClで沈殿させ、抗体価を測定し、同時に2回目のスクリーニングを行い、同様に3回目のスクリーニングを行った。毎回インプットされたファージ数は同一で (4×10^{10} pfu)、3回のスクリーニングでアウトプット (output) されたファージ数はそれぞれ 2.76×10^3 pfu、 3.45×10^5 pfu、 3.08×10^6 pfuで、スクリーニング効率は、それぞれ1回目の125倍と1116倍で、結果から、図22に示されたように、スクリーニングによる蓄積効果が顕著であることが明らかになった。

【0148】

実験例V-2．ファージクローンのELISA及びウェスタンブロット法による同定実験

ELISAは96ウェルプレートで行い、100 µg/ml、50 µl/ウェルの23C3モノクローナル抗体で4 で一晩被覆し、10%脱脂粉乳 (TBSTで希釈) で37 で2時間ブロックし、1×TBST (Tween-20 0.1%) で5回洗浄し、各モノクローナルファージの増殖上清をいずれも 5×10^8 pfu/50 µl になるように1×TBSで希釈し、マウスモノクローナル抗体SM5-1 (中国人民解放军第二軍医大学腫瘍研究所によって調製され、調製過程は文献: SM5-1: a new monoclonal antibody which is highly sensitive and specific for melanocytic lesions. 「SM5-1: メラニン細胞の損傷に対して高度敏感で且つ特異的である新規なモノクローナル抗体」 Arch Dermatol Res. 2000年12月;292(12):583-9.を参照し、以下も同様)を対照抗体とし、4E4 (このクローンはSM5-1の陽性クローンで、同上。以下も同様)を陰性対照ファージとした。室温で1時間結合させ、1×TBST (Tween-20 0.1%) で5回洗浄した後、各ウェルに1:5000で希釈したHRP標識の抗-M13抗体 (Pharmacia #27-9411-01)を200 µlずつ加え、室温で1時間振蕩して作用させ、1×TBST (Tween-20 0.1%) で5回洗浄し、晶美社のELISA検出キットのA:B=1:1の新製の反応基質を50 µl/ウェル加え、室温で1-5分間作用させた。2N H₂SO₄で反応を終止させた。各クローンは、いずれも23C3及び対照抗体SM5-1に対して平行重複ウェルを3つ設けて検出した。OD450の記録結果から、図23Aに示されたように、陽性クローンと抗体の反応が特異的であることが明らかになった。

【0149】

ウェスタンブロットの手順: 増殖後のファージのモノクローナル上清を20%PEG/NaClで沈殿精製した後、 1×10^{10} pfu/レーンで10% SDS-PAGE電気泳動を行い、360mAの一定電流で1時間電気泳動した後ニトロセルロース膜に移し、10%脱脂粉乳で4 で一晩或いは室温で2時間ブロックし、1×TBST (Tween-20 0.1%) で毎回10分間で3回洗浄し、10 µg/mlの第一抗体と室温で1時間反応させ、1×TBST (Tween-20 0.1%) で毎回10分間で5回洗浄し、1:1000で希釈したHRP標識のウサギ抗マウスIgG (北京中山社)と室温で1時間反応させ、ECLキット (Tiangen社)で1-2分間反応させ、医療用青感光性X線フィルムで押して露光した。結果が図23Bに示された。図23Bの左の図は23C3モノクローナル抗体でのハイブリダイゼ

ーションの結果で、23Bの右の図は無関連抗体SM5-1でのハイブリダイゼーションの結果で、これらの結果は、陽性クローンと抗体の反応が特異的である（対照抗体はマウスモノクローナル抗体SM5-1で、陰性対照ファージは4E4（このクローンはSM5-1の陽性クローン）である）ことを示した。

【0150】

実験例V-3．配列決定及び配列分析

一本鎖DNA抽出キット（上海捷瑞社）で鋳型を調製し、-96プライマーで配列決定を行い、クロム酸塩（Chromas）で配列を読み出し、25個の陽性クローンのうち独立の配列が15個あった。AlignXで分析したところ、結果は図24に示されたように、23C3の可能な抗原エピトープはWLXPDPであることがわかった。

10

【0151】

実験例V-4．ファージクローンと抗体の結合能力の分析

実験例V-3で得られた各クローンをそれぞれ 5×10^7 pfuで抗体で被覆された96ウェルプレートに投入し、同様な条件のスクリーニング（対照抗体：SM5-1、無関連の対照抗体：4E4）後、溶出されたファージに対して抗体価を測定した（blood 2006-04-014639を参照）。

【0152】

結果は、hOPN配列において、エピトープW43LNP46DP48におけるW43、P46、P48が23C3-hOPNの結合の誘導に重役を担うことを示した。中でも、結合力が最強のクローンは5F12:DVYWLMPDPPTS合成オリゴペプチド、5D2:GTSTEWLAPDP合成オリゴペプチドである。結果が図25に示された。

20

【0153】

実験例V-5．合成オリゴペプチドと抗体の特異的結合の実験

ドットプロット実験： 3×10 ngのKLH-4B5（無関連対照）、KLH-5F12でそれぞれ3つのドットをつけ、実験例V-4で得られた各種のオリゴペプチドをそれぞれ3つの異なる抗体とハイブリドさせ、ブロック、メンブレンの洗浄、第一抗体の室温での1時間の反応、メンブレンの洗浄、HRP標識抗マウス第二抗体の室温での1時間の反応を経て、メンブレンを洗浄し、フィルムで押して露光した。無関連のオリゴペプチドは23C3と反応しなかったが、KLH-5F12は相応の抗体と特異的に反応することができ、結果は図26Aに示された。

【0154】

オリゴペプチドのファージ-抗体結合に対する遮断の実験：抗体を $100 \mu\text{g/ml}$ 、 $50 \mu\text{l}$ /ウェルで96ウェルプレートを被覆し、4時間一晩置き、10%脱脂粉乳でブロックし、 $1 \times \text{PBST}$ で3回洗浄し、使用に備えた。 $100 \mu\text{g/ml}$ のオリゴペプチドとファージを均一に混合し、抗体で被覆されたプレートに加え、室温で1時間緩く振蕩し、 $1 \times \text{TBST}$ （Tween-20 0.1%）、 $1 \times \text{PBS}$ （pH5.0）、 $1 \times \text{PBS}$ （pH3.5）でそれぞれ5回洗浄し、 1mg/ml BSA含有グリシン-Cl（pH 2.2）で15分間溶出させ、Tris-Cl（pH 9.1）で中和し、抗体価を測定した。各オリゴペプチドは、それぞれ（1）ファージ、（2）ファージ+ペプチド、（3）ファージ+無関連ペプチドの三群に分けた。この濃度のオリゴペプチド5F12の遮断効率は71%であった。結果が図26Bに示された。

30

【0155】

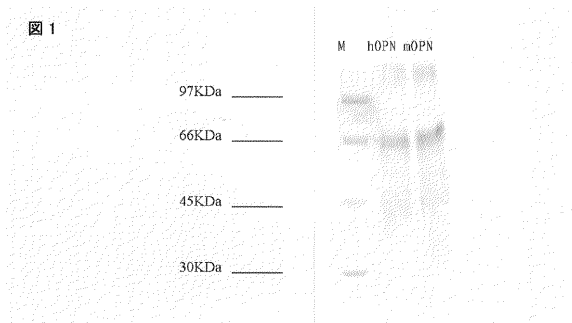
結果は、23C3抗体の認識エピトープ配列はWLNPDPで、OPNの第4エクソンに位置することを示した。エピトープのOPNタンパクにおける位置及び配列は図27に、配列が配列番号11に示された。

40

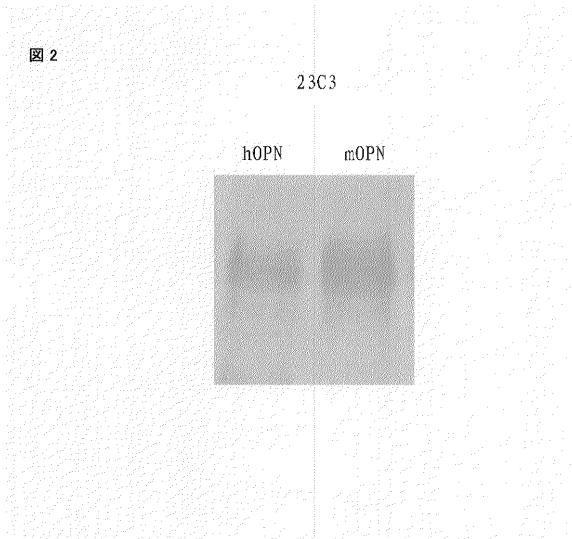
【0156】

各文献がそれぞれ単独に引用されるように、本発明に係るすべての文献は本出願で参考として引用する。また、本発明の上記の内容を読み終わった後、この分野の技術者が本発明を各種の変動や修正をすることができるが、それらの等価の形態のものは本発明の請求の範囲に含まれることが理解されるべきである。

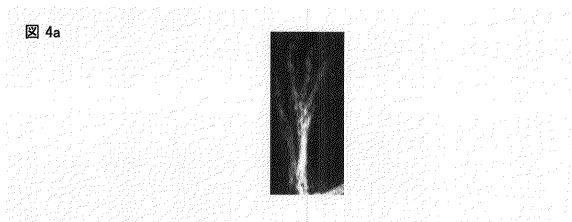
【図 1】



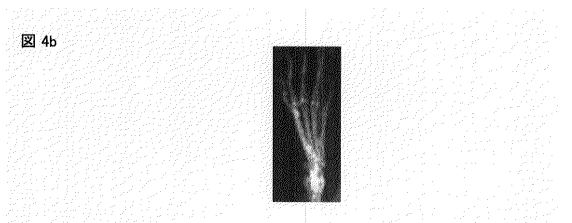
【図 2】



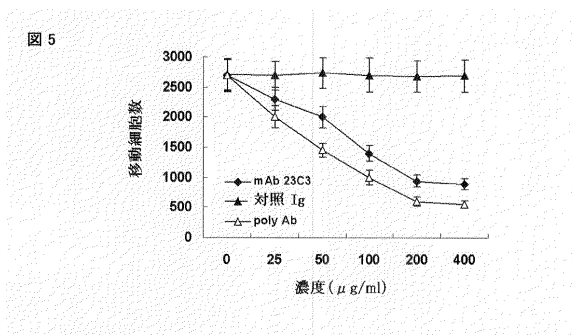
【図 4 a】



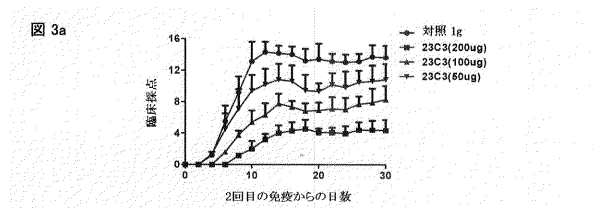
【図 4 b】



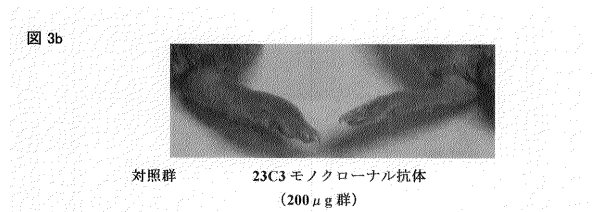
【図 5】



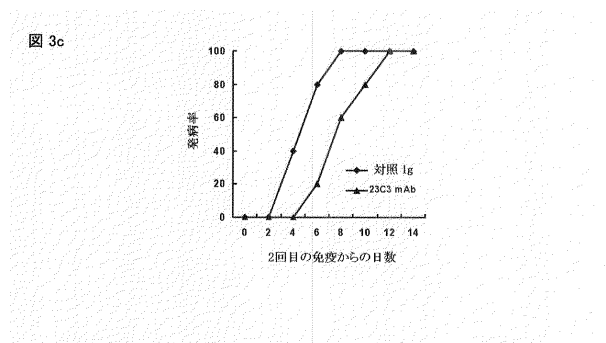
【図 3 a】



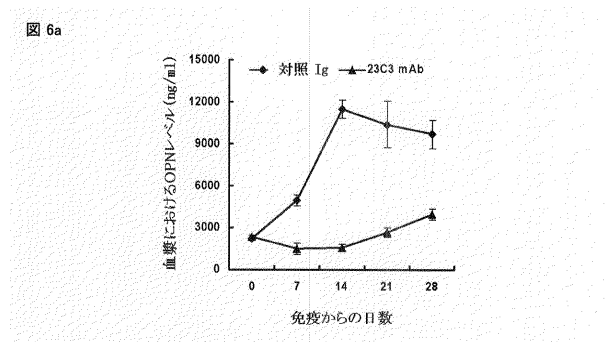
【図 3 b】



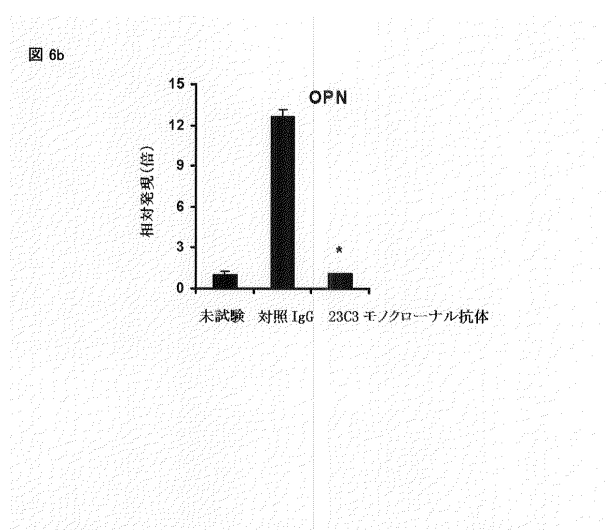
【図 3 c】



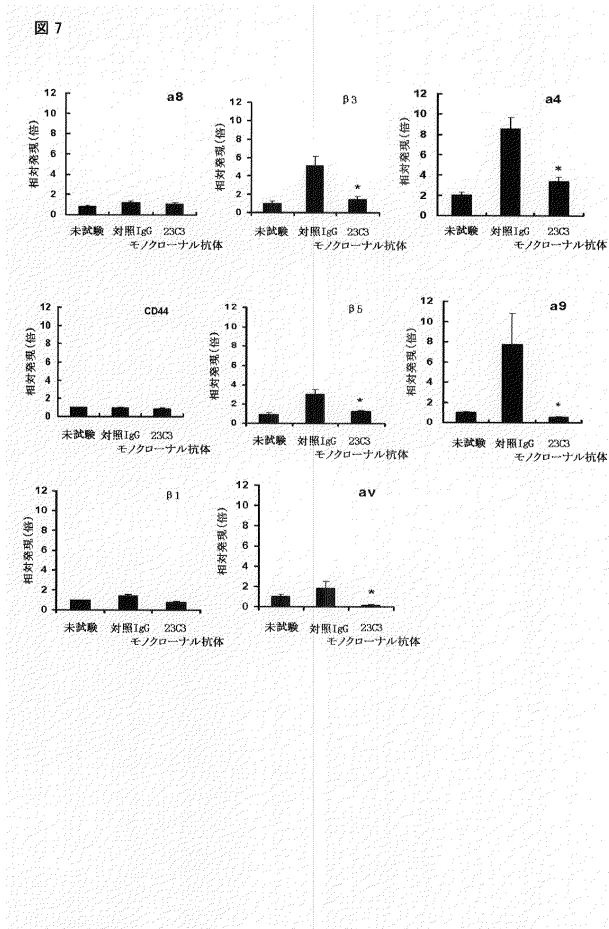
【図 6 a】



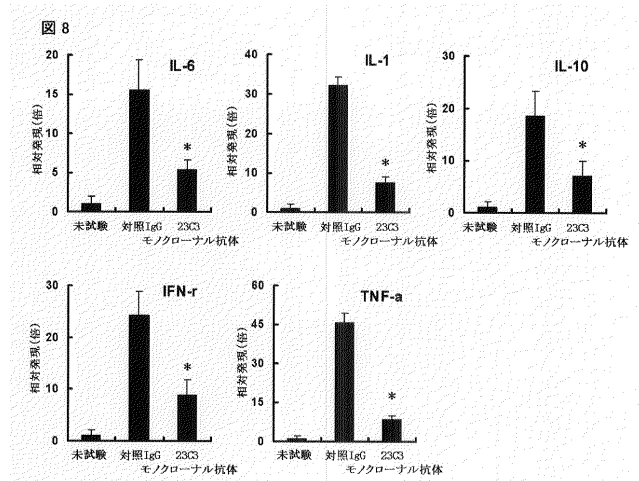
【図 6 b】



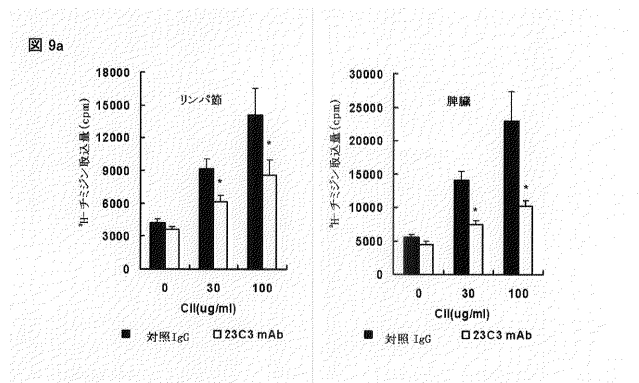
【図 7】



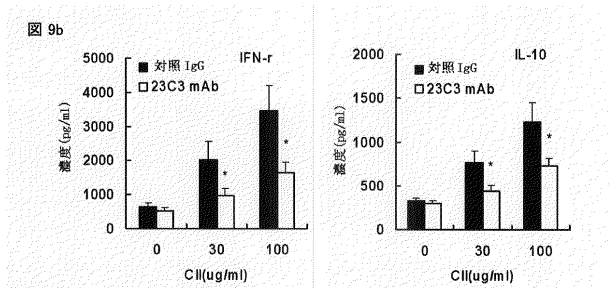
【図 8】



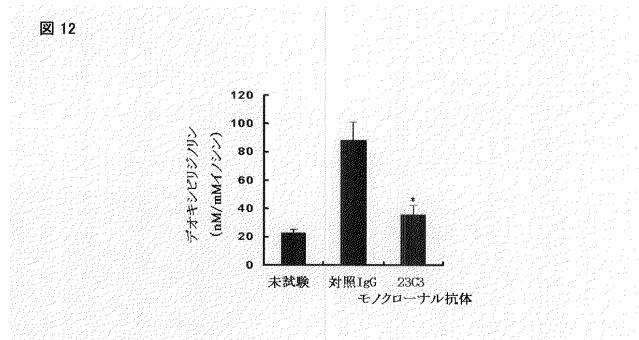
【図 9 a】



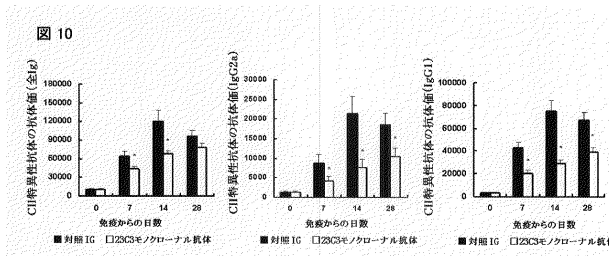
【図 9 b】



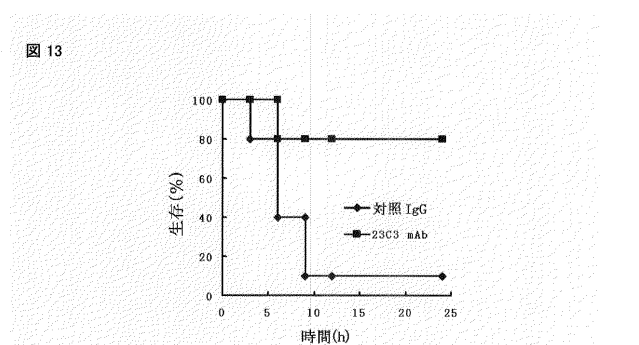
【図 1 2】



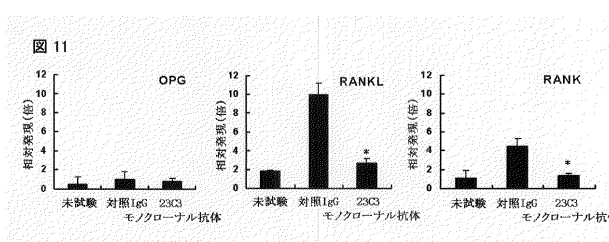
【図 1 0】



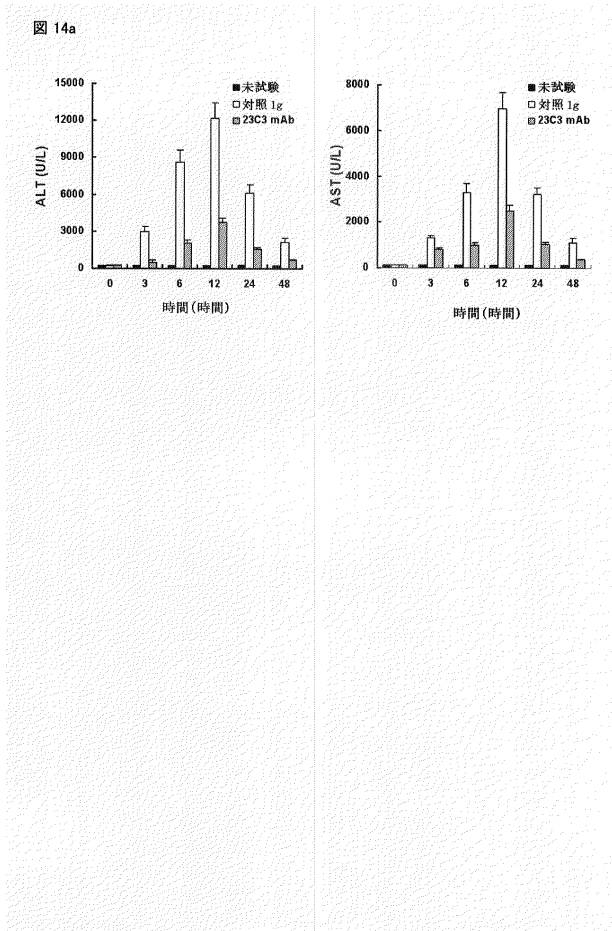
【図 1 3】



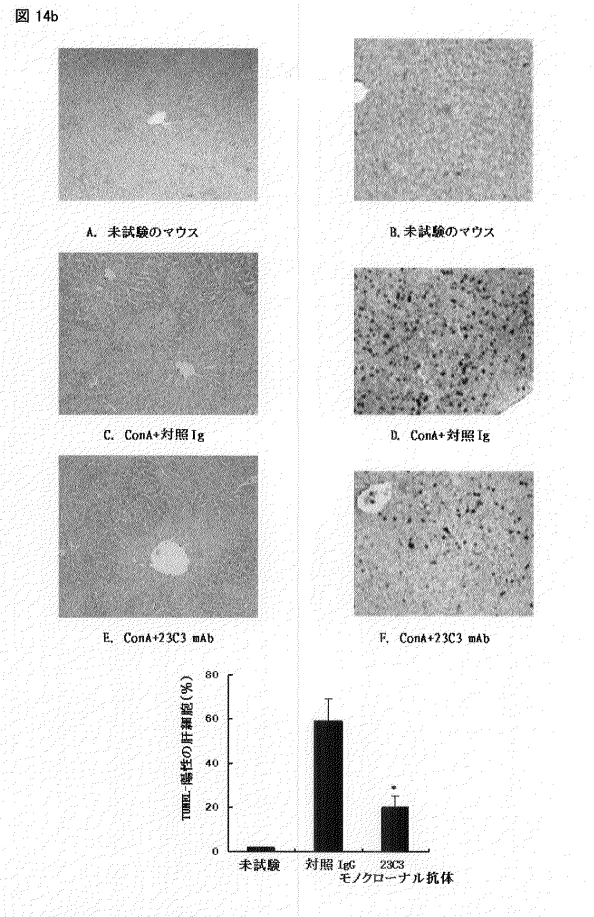
【図 1 1】



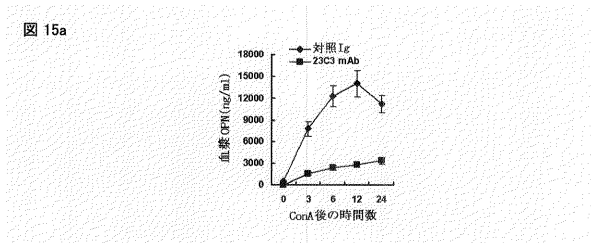
【図 14 a】



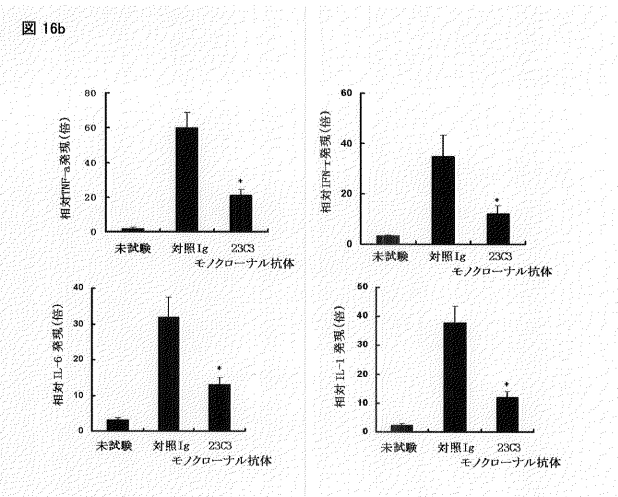
【図 14 b】



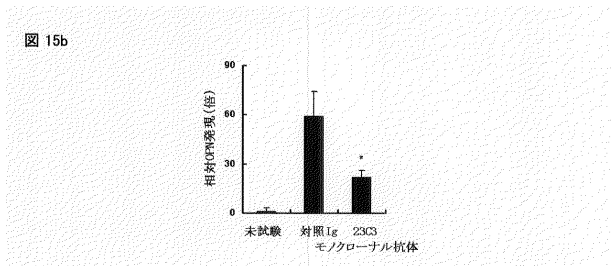
【図 15 a】



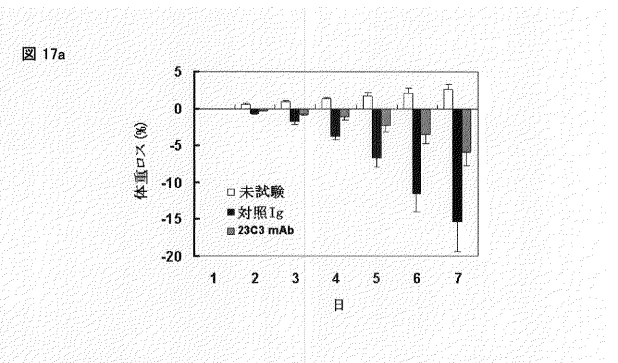
【図 16 b】



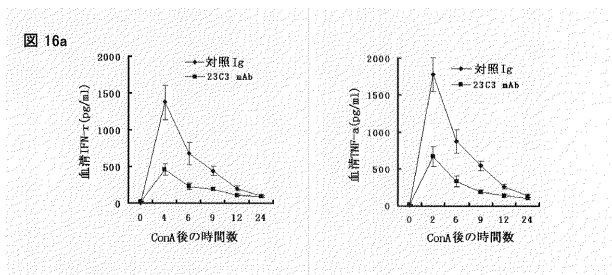
【図 15 b】



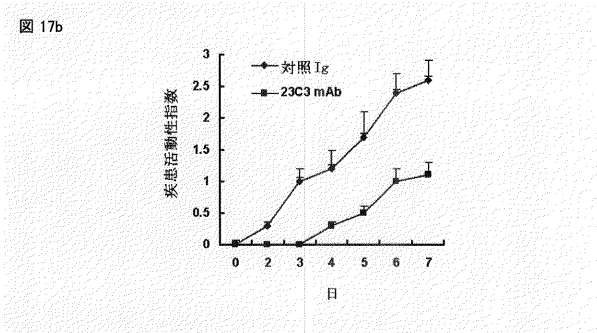
【図 17 a】



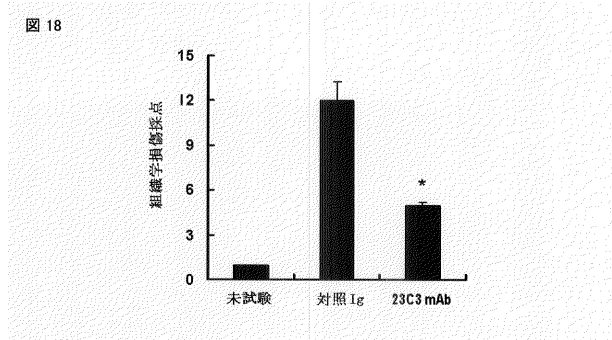
【図 16 a】



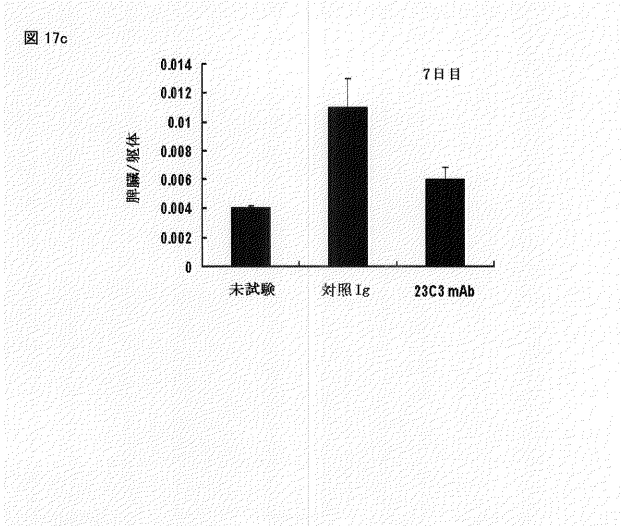
【図 17 b】



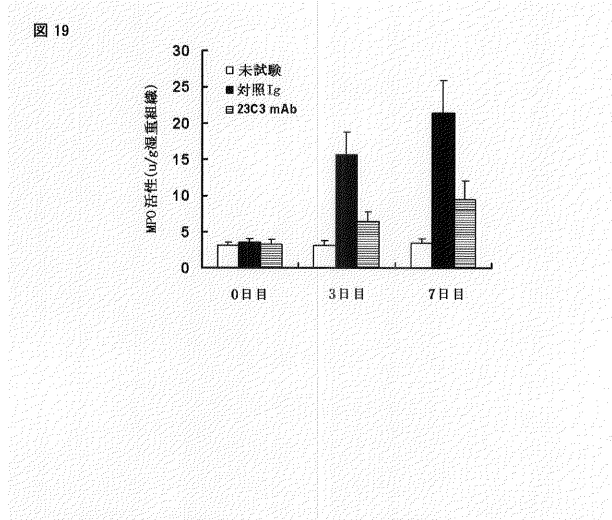
【図 18】



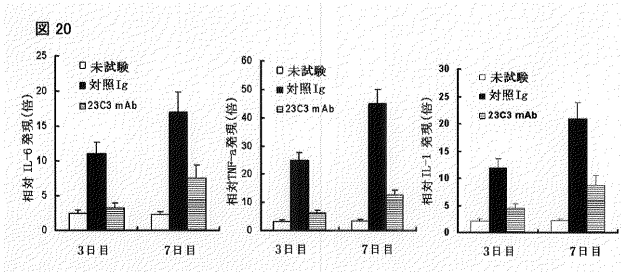
【図 17 c】



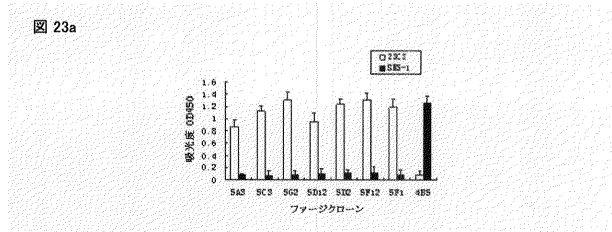
【図 19】



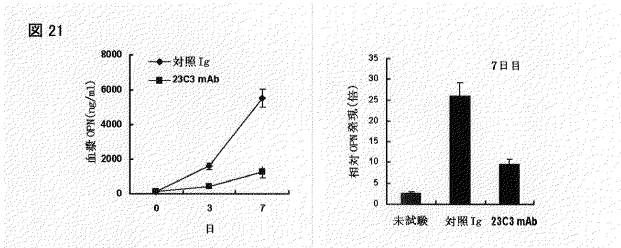
【図 20】



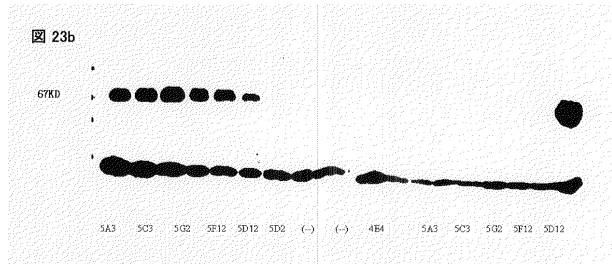
【図 23 a】



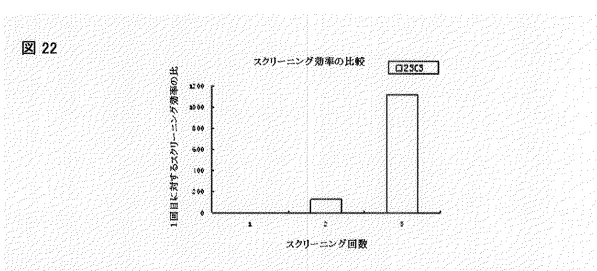
【図 21】



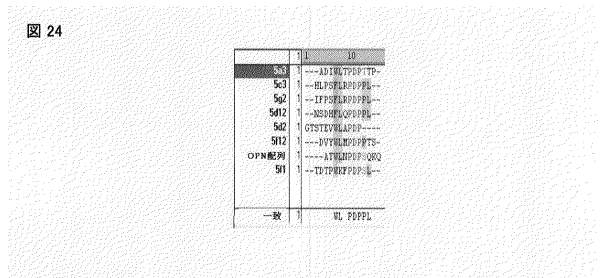
【図 23 b】



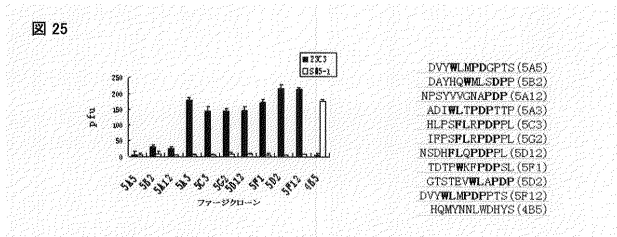
【図 22】



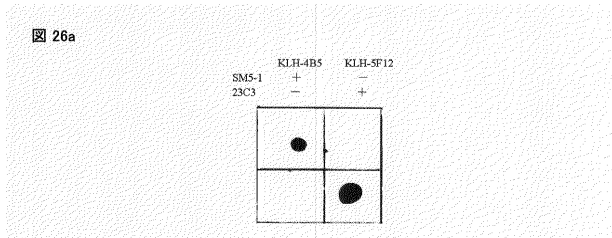
【図 24】



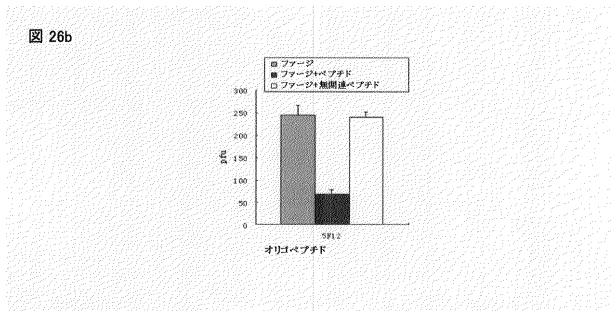
【図 25】



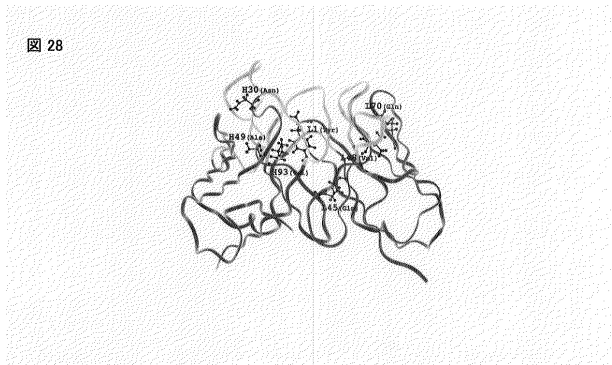
【図 26 a】



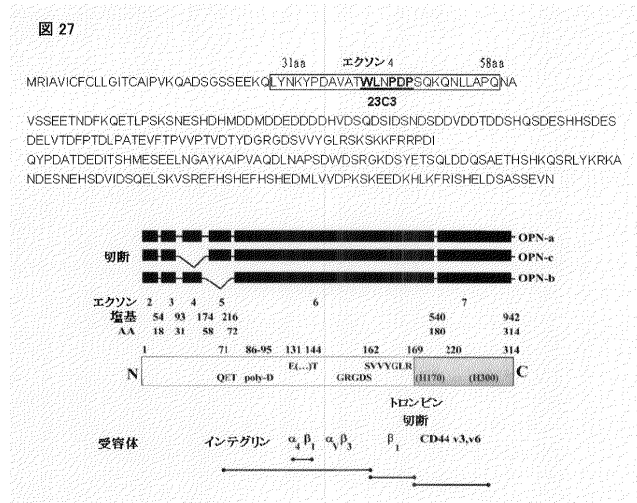
【図 26 b】



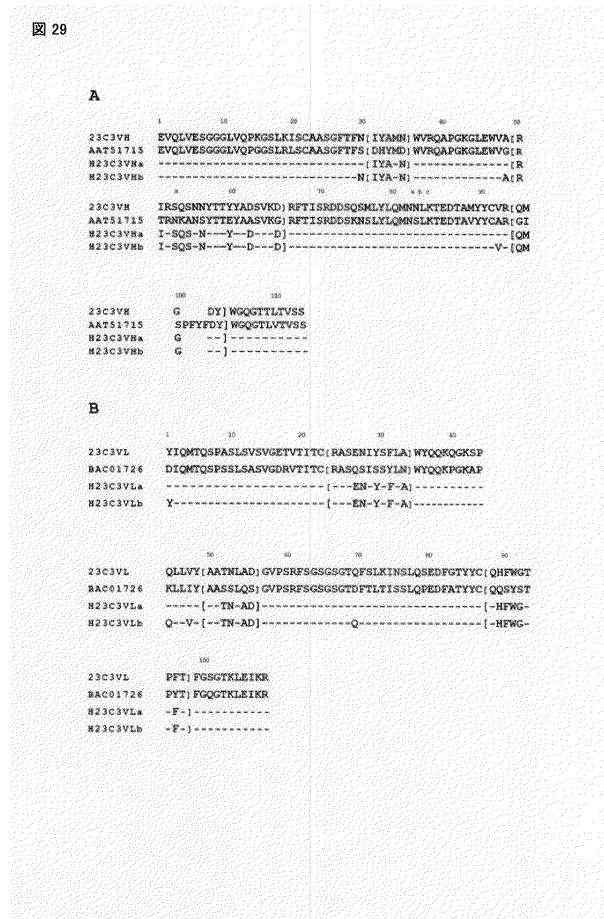
【図 28】



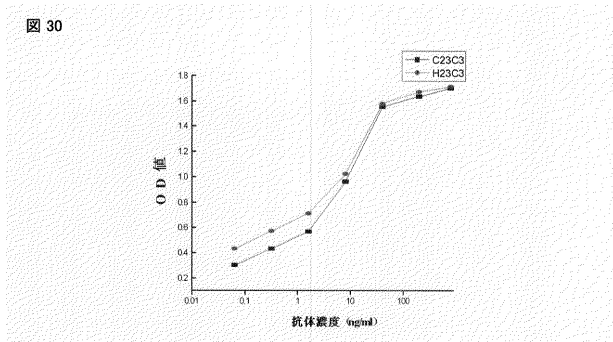
【図 27】



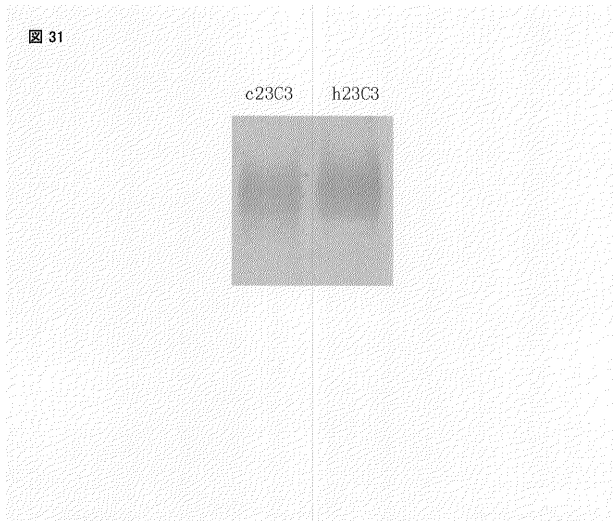
【図 29】



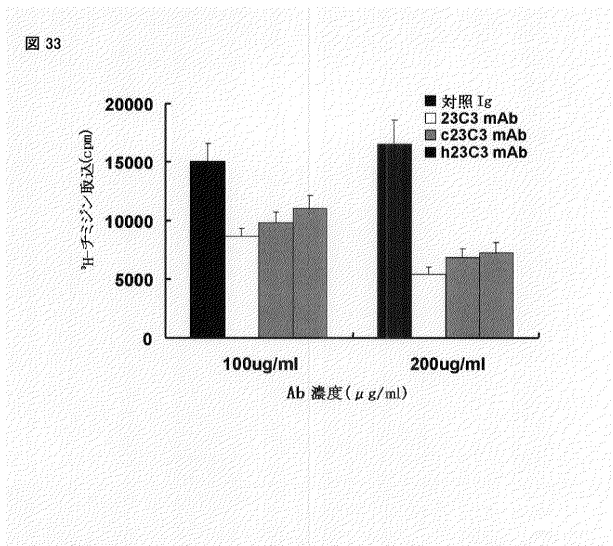
【図 30】



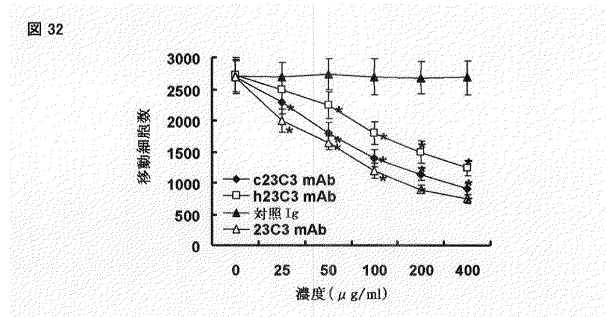
【図 31】



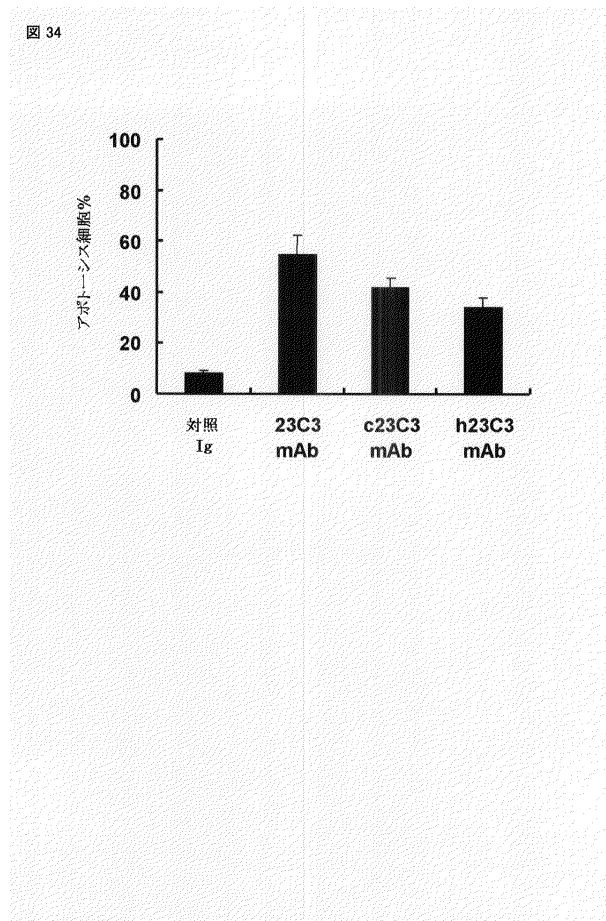
【図 33】



【図 32】



【図 34】



【配列表】

2010524475000001.app

【 国际调查报告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2008/070582
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
See extra sheet According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC: C07K16/-;C07K7/-;C12N15/-;C12P21/-;A61K39/-;A61P37/-;A61P29/00;A61P19/-		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WPI;EPODOC;PAJ;CNPAT;CNKI;MEDLINE;GENBANK;EBI antigen; antibody; epitope; monoclonal antibody; OPN; medicant; immunity; autoimmunity; therapy		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Kon S, et al. Antibodies to Different Peptides in Osteopontin Reveal Complexities in the Various Secreted Forms. Journal of Cellular Biochemistry. Apr. 2000, Vol.77, NO.3, pages 487-498, ISSN 0730-2312	1, 2, 5-13
A	CN 1513000A (IMMUNO-BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD., et al.) 14.Jul. 2004 (14.07.2004), pages 14-36 in the specification	1-13
A	CN 1351888A (HEBEI MEDICAL UNIVERSITY) 05.Jun. 2002 (05.06.2002), pages 5-7 in the specification	1-13
A	WO 0063241A2 (CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION) 26.Oct. 2000 (26.10.2000), pages 58-84 in the specification	1-13
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 10. Jun. 2008 (10.06.2008)		Date of mailing of the international search report 26 Jun. 2008 (26.06.2008)
Name and mailing address of the ISA/CN The State Intellectual Property Office, the P.R.China 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China 100088 Facsimile No. 86-10-62019451		Authorized officer JIANG, Tao Telephone No. (86-10)62413827

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2008/070582

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 1513000A	14.07.2004	WO 02081522A	17.10.2002
		CA 2443330A	17.10.2002
		AR 033121A	03.12.2003
		NO 20034405A	05.12.2003
		EP 1375518A	02.01.2004
		CZ 20032697A	14.01.2004
		BR 0208809A	09.03.2004
		MXPA 03009052A	15.10.2004
		US 2004234524A	25.11.2004
		HU 0401561A	29.11.2004
		PL 366469A	07.02.2005
		RU 2003132446A	27.04.2005
		NONE	
CN 1351888A	05.06.2002		
WO 0063241A2	26.10.2000	CA 2370129A	26.10.2000
		AU 4357500A	02.11.2000
		BR 0009791A	08.01.2002
		EP 1175223A	30.01.2002
		MXPA 01010332A	18.09.2002
		AU 773350B	20.05.2004

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2008/070582

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K16/18 (2006.01) i
C07K7/06 (2006.01) i
C07K7/08 (2006.01) i
C12N15/09 (2006.01) i
C12P21/08 (2006.01) i
A61K39/395 (2006.01) i
A61P37/02 (2006.01) i
A61P29/00 (2006.01) n
A61P19/02 (2006.01) n

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2008/070582
A. 主题的分类		
参见附加页		
按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类		
B. 检索领域		
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)		
IPC: C07K16/-;C07K7/-;C12N15/-;C12P21/-; A61K39/-;A61P37/-;A61P29/00;A61P19/-		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))		
WPI;EPODOC;PAJ;CNPAT;CNKI;MEDLINE;GENBANK;EBI		
抗原; 抗体; 表位; 单克隆抗体; 骨桥蛋白; 药物; 免疫; 自身免疫; 治疗		
antigen; antibody; epitope; monoclonal antibody; OPN; medicant; immunity; autoimmunity; therapy		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	Kon S, et al. Antibodies to Different Peptides in Osteopontin Reveal Complexities in the Various Secreted Forms. Journal of Cellular Biochemistry. Apr. 2000, Vol.77, NO.3, pages 487-498, ISSN 0730-2312	1、2、5-13
A	CN 1513000A (株式会社免疫生物研究所等) 14.7 月.2004 (14.07.2004) 说明书第 14-36 页	1-13
A	CN 1351888A (河北医科大学) 05.6 月 2002 (05.06.2002), 说明书第 5-7 页	1-13
A	WO 0063241A2 (CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION) 26.10 月 2000 (26.10.2000), 说明书第 58-84 页	1-13
☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "B" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 10.6 月 2008 (10.06.2008)		国际检索报告邮寄日期 26.6 月 2008 (26.06.2008)
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 传真号: (86-10)62019451		受权官员 姜涛 电话号码: (86-10) 62413827

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2008/070582

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN 1513000A	14.07.2004	WO 02081522A	17.10.2002
		CA 2443330A	17.10.2002
		AR 033121A	03.12.2003
		NO 20034405A	05.12.2003
		EP 1375518A	02.01.2004
		CZ 20032697A	14.01.2004
		BR 0208809A	09.03.2004
		MXPA 03009052A	15.10.2004
		US 2004234524A	25.11.2004
		HU 0401561A	29.11.2004
		PL 366469A	07.02.2005
		RU 2003132446A	27.04.2005
CN 1351888A	05.06.2002	无	
WO 0063241A2	26.10.2000	CA 2370129A	26.10.2000
		AU 4357500A	02.11.2000
		BR 0009791A	08.01.2002
		EP 1175223A	30.01.2002
		MXPA 01010332A	18.09.2002
		AU 773350B	20.05.2004

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2008/070582

续主题的分类

C07K16/18 (2006.01) i

C07K7/06 (2006.01) i

C07K7/08 (2006.01) i

C12N15/09 (2006.01) i

C12P21/08 (2006.01) i

A61K39/395 (2006.01) i

A61P37/02 (2006.01) i

A61P29/00 (2006.01) n

A61P19/02 (2006.01) n

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 1	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 P	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
	G 0 1 N 33/53 D	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, T R), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, K G, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT , RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(71)出願人 509296281

シャンハイ・ナショナル・エンジニアリング・リサーチ・センター・オブ・アンチボディー・メデ
ィシン・カンパニー, リミテッド

SHANGHAI NATIONAL ENGINEERING RESEARCH CENTE
R OF ANTIBODY MEDICINE CO., LTD.

中華人民共和国、シャンハイ 201203、ジャンジアン・ハイ・テク・パーク、リビング・ロ
ード、ナンバー 399、ビルディング 3

Building 3, No. 399, Libing Road, Zhangjiang
Hi-Tech Park, Shanghai 201203, P.R. China

(74)代理人 100058479

弁理士 鈴江 武彦

(74)代理人 100108855

弁理士 蔵田 昌俊

(74)代理人 100091351

弁理士 河野 哲

(74)代理人 100088683

弁理士 中村 誠

(74)代理人 100109830

弁理士 福原 淑弘

(74)代理人 100075672

弁理士 峰 隆司

(74)代理人 100095441

弁理士 白根 俊郎

(74)代理人 100084618

弁理士 村松 貞男

(74)代理人 100103034

弁理士 野河 信久

(74)代理人 100140176

弁理士 砂川 克

(72)発明者 グオ、ヤジュン

中華人民共和国、シャンハイ 201203、ジャンジアン・ハイ・テク・パーク、リビング・ロ
ード、ナンバー 399

(72)発明者 ダイ、ジャンシン

中華人民共和国、シャanghai 201203、ジャンジアン・ハイ - テク・パーク、リビング・ロード、ナンバー 399

(72)発明者 ワン、ハオ

中華人民共和国、シャanghai 201203、ジャンジアン・ハイ - テク・パーク、リビング・ロード、ナンバー 399

(72)発明者 コウ、ジェン

中華人民共和国、シャanghai 201203、ジャンジアン・ハイ - テク・パーク、リビング・ロード、ナンバー 399

(72)発明者 ホウ、シェン

中華人民共和国、シャanghai 201203、ジャンジアン・ハイ - テク・パーク、リビング・ロード、ナンバー 399

(72)発明者 チアン、ウェイジュ

中華人民共和国、シャanghai 201203、ジャンジアン・ハイ - テク・パーク、リビング・ロード、ナンバー 399

(72)発明者 ファン、ケシン

中華人民共和国、シャanghai 201203、ジャンジアン・ハイ - テク・パーク、リビング・ロード、ナンバー 399

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA44 CA04 CA20 DA02 EA04 GA13

4B065 AA90X AA93Y AB01 AC14 BA05 CA25 CA44

4C085 AA14 CC23 EE01

4H045 AA11 BA10 BA14 DA76 DA86 EA20 FA74 GA26

专利名称(译)	骨桥蛋白的功能性表位，与其特异性结合的单克隆抗体并使用		
公开(公告)号	JP2010524475A	公开(公告)日	2010-07-22
申请号	JP2010504426	申请日	2008-03-25
[标]申请(专利权)人(译)	反身媒体新港兔子有限公司上海国家工程研究中心 上海抗体藥物国家工程研究中心有限公司		
申请(专利权)人(译)	反身医药Kanbani有限公司上海的国家工程研究中心		
[标]发明人	グオヤジュン ダイジャンシン ワンハオ コウジェン ホウシェン チアンウェイジュ ファンケシン		
发明人	グオ、ヤジュン ダイ、ジャンシン ワン、ハオ コウ、ジェン ホウ、シェン チアン、ウェイジュ ファン、ケシン		
IPC分类号	C12N15/09 C07K7/06 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61K39/395 A61P37/02 G01N33/53		
CPC分类号	A61P1/16 A61P19/00 A61P19/02 A61P29/00 C07K14/52 C07K16/24 C07K2317/34 C07K2317/565		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K7/06 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 A61K39/395.N A61K39/395.P A61P37/02 G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA44 4B024/CA04 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA13 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA05 4B065/CA25 4B065/CA44 4C085/AA14 4C085/CC23 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/BA14 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	河野 哲 中村 誠		
优先权	200710039878.6 2007-04-24 CN		
其他公开文献	JP2010524475A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明公开了骨桥蛋白的功能性表位，特异性结合骨桥蛋白的单克隆抗体，免疫缀合物及其用于制备抗肿瘤剂的用途。此外，公开了编码所述单克隆抗体的序列和含有该序列的载体和宿主细胞。此外，本发明的单克隆抗体或免疫缀合物可用于检测骨桥蛋白。根据本发明的单克隆抗体或免疫缀合物，可以抑制骨桥蛋白治疗/减轻自身免疫疾病并保护相关组织，因此它可用于治疗自身免疫疾病。

リアルタイムPCR実験で検出された分子の特異性プライマー

名称	配列番号	プライマー	配列(5' → 3')
GAPDH	26	FW	CTTCACCACCATGGAGAAGGC
	27	RV	GGCATGGACTGTGGTCATGAG
OPN	28	FW	GATTTGCTTTTGCCTGTTTGG
	29	RV	TGAGCTGCCAGAATCAGTCACT
α v	30	FW	CTCTGAAACCTGAGGTGCTTCT
	31	RV	GGCGAAGTAAATGTAACCT
α 4	32	FW	GAATCCAAACCGACCTGCGA
	33	RV	TGACGTAGCAAATGCCAGTGG
α 8	34	FW	TTGAAGCTGTCAAGCTAGACC
	35	RV	CACACCACCATCCTGGTCAC
α 9	36	FW	TTAAGTGTCGTGTCCATACC
	37	RV	GATGTTCTTCCAACGATGGG
β 1	38	FW	CCTACTGGTCCCGACATCAT
	39	RV	GTCCCACTTGGCATTCAATT
β 3	40	FW	TGATATCCTGGTGGTACTGCTG
	41	RV	GTTGTTTGCTGTGTCCCACTTA
β 5	42	FW	CAACAAATCCTACAATGGCTCA
	43	RV	ACACCAGAGTCTCCTTGCTTTC
OD44	44	FW	TGAAGTTGGCCCTGAGCAA
	45	RV	CTCGGAATTACCACATTTCTTTCT
IL-1 β	46	FW	CAACCAACAAGTGATATTCTCCA
	47	RV	GATCCACACTCTCCAGCTGCA
IL-6	48	FW	GAGGATACCACTCCCAACAGACC
	49	RV	AAGTGATCATCGTTGTTTCATACA
TNF- α	50	FW	CATCTTCTCAAAATTGAGTGAC
	51	RV	TGGGAGTAGACAAGGTACAACC

FW= フォワード、RV= リバース