

(19) 日本国特許庁(JP)

## 再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2009/154283

発行日 平成23年12月1日(2011.12.1)

(43) 国際公開日 平成21年12月23日(2009.12.23)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 0 7 K 16/18 (2006.01)</b>	C 0 7 K 16/18 Z N A	2 G O 4 5
<b>C 1 2 P 21/08 (2006.01)</b>	C 1 2 P 21/08	4 B O 2 4
<b>A 6 1 K 49/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 49/00 Z	4 B O 6 4
<b>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 D	4 C O 8 5
<b>A 6 1 P 9/10 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 N	4 H O 4 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 68 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2010-517987 (P2010-517987)	(71) 出願人	504147243 国立大学法人 岡山大学
(21) 国際出願番号	PCT/JP2009/061246		岡山県岡山市北区津島中一丁目1番1号
(22) 国際出願日	平成21年6月19日(2009.6.19)	(71) 出願人	390004097 株式会社医学生物学研究所
(31) 優先権主張番号	PCT/JP2009/054475		愛知県名古屋市中区栄四丁目5番3号
(32) 優先日	平成21年3月9日(2009.3.9)	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(74) 代理人	100102118 弁理士 春名 雅夫
(31) 優先権主張番号	特願2008-162566 (P2008-162566)	(74) 代理人	100160923 弁理士 山口 裕孝
(32) 優先日	平成20年6月20日(2008.6.20)	(74) 代理人	100119507 弁理士 刑部 俊
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		
(31) 優先権主張番号	特願2008-308016 (P2008-308016)		
(32) 優先日	平成20年12月2日(2008.12.2)		
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 石灰化小球に対する抗体及びその用途

## (57) 【要約】

本発明者らは、腎・尿路結石由来の石灰化小球、あるいは、頸動脈由来の動脈硬化巣（プラーク）を免疫した後、石灰化小球（NLO）に対してスクリーニングし特異的抗体を得た。当該抗体が動脈硬化（石灰化病変）部位に特異的に反応することを示すと共に、それらの蛍光標識抗体による動脈硬化巣（特に石灰化病変）の可視化を実現し、本発明を完成させた。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

石灰化小球 (NLO) に反応し、硫酸銅による酸化変性LDL (酸化LDL) に結合活性を有する抗体。

## 【請求項 2】

さらに、ホスファチジルセリン、カルジオリピン、7-ケトコレステリル-9-カルボキシノナノエート [9-オキソ-9-(7-ケトコレスト-5-エン-3β-イルオキシ)ノナン酸] (7-ketocholesteryl-9-carboxynonanoate [9-oxo-9-(7-ketochoest-5-en-3β-yloxy) nonanoic acid])、セラミド-1リン酸、及びホスファチジン酸からなる群から選ばれる少なくとも1つに結合活性を有する、請求項 1 記載の抗体。

10

## 【請求項 3】

さらに、カルジオリピン及び7-ケトコレステリル-9-カルボキシノナノエートに結合活性を有する、請求項 1 記載の抗体。

## 【請求項 4】

さらに、ホスファチジルセリン、カルジオリピン及び7-ケトコレステリル-9-カルボキシノナノエートに結合活性を有する、請求項 1 記載の抗体。

## 【請求項 5】

さらに、セラミド-1リン酸に結合し、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、カルジオリピン、および7-ケトコレステリル-9-カルボキシノナノエートに結合活性を有する、請求項 1 記載の抗体。

20

## 【請求項 6】

石灰化小球に反応するが、硫酸銅による酸化変性LDL (酸化LDL)、ホスファチジルセリン、カルジオリピン及び7-ケトコレステリル-9-カルボキシノナノエートからなる群から選ばれる少なくとも1つに対する反応性がELISA法により検出されない、抗体。

## 【請求項 7】

下記 (A) ~ (E) のいずれかに記載の抗体である、請求項 1 又は 6 に記載の抗体；

(A) 下記 (a) または (b) に記載の重鎖、および、下記 (c) または (d) に記載の軽鎖の対を有する抗体、

(a) CDR 1 として配列番号：1 に記載のアミノ酸配列、CDR 2 として配列番号：2 に記載アミノ酸配列、及び CDR 3 として配列番号：3 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体、

30

(b) 重鎖可変領域として配列番号：4 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体、

(c) CDR 1 として配列番号：6 に記載のアミノ酸配列、CDR 2 として配列番号：7 に記載アミノ酸配列、及び CDR 3 として配列番号：8 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖を含む抗体、

(d) 軽鎖可変領域として配列番号：9 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖を含む抗体、

(B) 下記 (e) または (f) に記載の重鎖、および、下記 (g) または (h) に記載の軽鎖の対を有する抗体、

(e) CDR 1 として配列番号：11 に記載のアミノ酸配列、CDR 2 として配列番号：12 に記載アミノ酸配列、及び CDR 3 として配列番号：13 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体、

40

(f) 重鎖可変領域として配列番号：14 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体、

(g) CDR 1 として配列番号：16 に記載のアミノ酸配列、CDR 2 として配列番号：17 に記載アミノ酸配列、及び CDR 3 として配列番号：18 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖を含む抗体、

(h) 軽鎖可変領域として配列番号：19 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖を含む抗体、

(C) 下記 (i) または (j) に記載の重鎖、および、下記 (k) または (l) に記載の軽鎖の対を有する抗体、

50

(i) CDR 1として配列番号：21に記載のアミノ酸配列、CDR 2として配列番号：22に記載アミノ酸配列、及びCDR 3として配列番号：23に記載のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体、

(j) 重鎖可変領域として配列番号：24に記載のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体

(k) CDR 1として配列番号：26に記載のアミノ酸配列、CDR 2として配列番号：27に記載アミノ酸配列、及びCDR 3として配列番号：28に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖を含む抗体、

(l) 軽鎖可変領域として配列番号：29に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖を含む抗体

10

(D) 下記 (m) または (n) に記載の重鎖、および、下記 (o) または (p) に記載の軽鎖の対を有する抗体、

(m) CDR 1として配列番号：31に記載のアミノ酸配列、CDR 2として配列番号：32に記載アミノ酸配列、及びCDR 3として配列番号：33に記載のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体、

(n) 重鎖可変領域として配列番号：34に記載のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体

(o) CDR 1として配列番号：36に記載のアミノ酸配列、CDR 2として配列番号：37に記載アミノ酸配列、及びCDR 3として配列番号：38に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖を含む抗体、

20

(p) 軽鎖可変領域として配列番号：39に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖を含む抗体

(E) 下記 (q) または (r) に記載の重鎖、および、下記 (s) または (t) に記載の軽鎖の対を有する抗体、

(q) CDR 1として配列番号：41に記載のアミノ酸配列、CDR 2として配列番号：42に記載アミノ酸配列、及びCDR 3として配列番号：43に記載のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体、

(r) 重鎖可変領域として配列番号：44に記載のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体

(s) CDR 1として配列番号：46に記載のアミノ酸配列、CDR 2として配列番号：47に記載アミノ酸配列、及びCDR 3として配列番号：48に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖を含む抗体、

30

(t) 軽鎖可変領域として配列番号：49に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖を含む抗体

【請求項 8】

請求項 7 に記載の抗体が結合するエピトープと同じエピトープに結合する抗体。

【請求項 9】

ヒト化抗体またはキメラ抗体である、請求項 1～8 のいずれかに記載の抗体。

【請求項 10】

請求項 1～9 のいずれかに記載の抗体を含む、動脈硬化の石灰化部位のイメージング剤。

40

【請求項 11】

請求項 1～9 のいずれかに記載の抗体を含む、動脈硬化の石灰化部位のイメージング用キット。

【請求項 12】

以下に記載の工程を含む、請求項 1～9 のいずれかに記載の抗体の製造方法：

(a) 石灰化小球または動脈硬化巣を非ヒト動物に免疫する工程、及び

(b) 該非ヒト動物より抗体を単離する工程。

【請求項 13】

請求項 12 の (b) の工程の後さらに、(c) 石灰化小球への反応性を指標としてスクリーニングし、石灰化小球に結合する抗体を選択し、単離する工程を含む、抗体の製造方法

50

。

【請求項 14】

請求項 13 の (c) の工程の後さらに、(d) 石灰化小球培養液に対して該抗体を添加して培養を継続する工程、及び (e) 対照の石灰化小球成長と比較して成長を阻害する抗体を選択し、単離する工程を含む、抗体の製造方法。

【請求項 15】

請求項 13 又は 14 の製造方法で製造された抗体を含む石灰化小球成長阻害剤。

【請求項 16】

CDR1 として配列番号：21 に記載のアミノ酸配列、CDR2 として配列番号：22 に記載アミノ酸配列、及び CDR3 として配列番号：23 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖、または重鎖可変領域として配列番号：24 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖と、  
CDR1 として配列番号：26 に記載のアミノ酸配列、CDR2 として配列番号：27 に記載アミノ酸配列、及び CDR3 として配列番号：28 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖、または軽鎖可変領域として配列番号：29 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖、  
を含む石灰化小球成長阻害剤。

【請求項 17】

請求項 13 又は 14 の製造方法で製造された抗体を含む動脈硬化治療剤。

【請求項 18】

以下に記載の工程を含む、動脈硬化治療剤の候補化合物のスクリーニング方法：

(a) 請求項 1～9 のいずれかに記載の抗体が投与された動脈硬化疾患モデル非ヒト動物に、候補化合物を投与する工程、

(b) 該候補化合物を投与された動脈硬化疾患モデル非ヒト動物と、該候補化合物を投与されていない動脈硬化疾患モデル非ヒト動物において、動脈硬化巣をイメージングする工程、

(c) 該候補化合物を投与された動脈硬化疾患モデル非ヒト動物と、該候補化合物を投与されていない動脈硬化疾患モデル非ヒト動物において、動脈硬化巣の大きさまたは存在部位を比較する工程、及び

(d) 該候補化合物を投与された動脈硬化疾患モデル非ヒト動物において、該候補化合物を投与されていない動脈硬化疾患モデル非ヒト動物と比較して、動脈硬化巣が減少または消失する候補化合物を選択する工程。

【請求項 19】

請求項 1～9 のいずれかに記載の抗体及び酸化 LDL と  $\beta_2$ -グリコプロテイン I の複合体（酸化 LDL/ $\beta_2$ GPI 複合体）に結合する抗体を含有する、動脈硬化巣における石灰化部位及び動脈硬化の存在部位を免疫学的手法により検出するために用いられるキット。

【請求項 20】

以下の工程：

(a) 請求項 1～9 のいずれかに記載の抗体及び酸化 LDL/ $\beta_2$ GPI 複合体に結合する抗体と、分離された動脈硬化巣を接触させる工程；及び

(b) 該動脈硬化巣における石灰化部位及び動脈硬化の存在部位を検出する工程；  
を含む、免疫学的手法。

【請求項 21】

以下に記載の工程を含む、動脈硬化病態の検出方法：

(a) 請求項 1～9 のいずれかに記載の抗体及び酸化 LDL/ $\beta_2$ GPI 複合体に結合する抗体と、分離された動脈硬化巣を接触させる工程；

(b) 該動脈硬化巣における石灰化部位及び動脈硬化の粥腫またはそれぞれの初期病片の存在部位を検出する工程；及び

(c) 動脈硬化巣が、請求項 1～9 のいずれかに記載の抗体で検出されたか、又は酸化 LDL/ $\beta_2$ GPI 複合体に結合する抗体で検出されたかを判定する工程。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

## 【0001】

本発明は、石灰化小球に対する抗体、該抗体を含む石灰化成長阻害剤又は動脈硬化治療剤、及び該抗体を利用した石灰化部位の特定、治療効果モニタリングなどの非侵襲的な動脈硬化の診断法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

動脈硬化の状態を観察する現在実用化されている診断方法としては、以下の4種類の方法が例示される。

「足関節上腕血圧比」：横になった状態で両腕、両足の血圧を測定すると、正常では足首の方がやや高い値になる。ところが血管につまりがある場合、そこから下流の血圧が低下し、足関節の血圧/上腕の血圧の比（ABI）が低くなる。ABIの低下は、下肢動脈だけでなく、全身に動脈硬化があることを推定する。

「脈波速度検査」：動脈の硬さを調べる方法で動脈硬化の進行を推定する方法。健康人は血管に弾力性があるため、振動が血管壁で吸収され、脈波の速度は遅い。動脈硬化が進むと、脈波は速くなるので、速度を指標として動脈硬化の進行を推定することができる。

「頸動脈超音波検査」：皮膚表面近くを走る頸動脈は内部の様子を超音波で観察しやすいので、この頸動脈を調べ、全身の動脈硬化の進行状況を推定する方法。

「MR血管造影(MRA)」：「CT血管造影(CTA)」血管疾患の画像診断法として従来血管造影が主流であったが、より侵襲が少なく血管造影にほぼ匹敵する画像情報が用いられるようになった。CTAの利点は、(1)空間分解能が高い、(2)検査が簡便、(3)石灰化病変の検出に優れる点が挙げられる。

上記「足関節上腕血圧比」、「脈波速度検査」では、粥状化位置特定と個別箇所ごとの進行状況の診断はできず、間接的に数値として評価せざるを得ない。

また、「頸動脈超音波検査」は、脈波速度検査などと違い、実際に血管の内部を画像として直接的に診ることができる点が優れている。しかし、超音波画像の濃淡や形から血管壁の状況を読みとる必要があるため、検査を行う医師や検査技師に技量が求められ、頸動脈以外の部位の、粥状化位置特定と個別箇所ごとの進行状況の診断はできない。

## 【0003】

遡ること1998年、KajanderとCiftciogluがヒトの腎臓結石から「ナノバクテリア (nano bacteria)」という"細菌"を分離したことを報告した (Nanobacteria: an alternative mechanism for pathogenic intra- and extracellular calcification and stone formation. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Jul 7;95(14):8274-9.)。

米国NIHのグループ他からは"細菌"について異論も出ており、尿路（腎）結石はもとより、NLO由来の石灰化小球の形成機序には不明な点が多い。

## 【0004】

なお、以下に本発明に関連する先行技術文献を示す。

## 【先行技術文献】

## 【特許文献】

## 【0005】

【特許文献1】特許2818658号

【特許文献2】特開2004-121152

## 【非特許文献】

## 【0006】

【非特許文献1】Nanobacteria: an alternative mechanism for pathogenic intra- and extracellular calcification and stone formation. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Jul 7;95(14):8274-9.

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0007】

本発明は、石灰化小球に対する抗体、該抗体を含む石灰化成長阻害剤又は動脈硬化治療

剤、及び該抗体を利用した、動脈硬化石灰化部位の特定又は治療効果モニタリングなどの非侵襲的な動脈硬化の診断法を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

腎臓局所の微小血管に動脈硬化が散見される慢性腎炎患者では、酸化LDL/ $\beta_2$ GPI複合体の陽性例が多数存在する。ところで、多くの尿路結石は、「腎臓で生活習慣病と関連して形成される病状」と考えられる。「結石」の形成(特に、アパタイトの形成)は、一般に、リンやカルシウムに関連した内分泌代謝異常で説明される。

しかしながら、本発明者らは、「粥状動脈硬化と関連して発生する動脈血管の石灰化」と「尿路結石の形成」が共に生活習慣病の原因である酸化ストレス(脂質の過酸化)によるものではないかとの発想のもとで、結石および動脈の石灰化病片の成分解析を開始した。また、腎結石由来の石灰化小球あるいは頸動脈由来の動脈硬化巣(プラーク)を免疫した後、石灰化小球に対してスクリーニングし、石灰化小球に特異的に結合する抗体を取得した。さらにそれらの抗体は各脂質(ホスファチジルセリン、カルジオリピン及び7-ケトコレステリル-9-カルボキシノナノエート [9-オキソ-9-(7-ケトコレスト-5-エン-3 $\beta$ -イルオキシ)ノナン酸] (7-ketocholesteryl-9-carboxynonanoate [9-oxo-9-(7-ketochoest-5-en-3 $\beta$ -yloxy) nonanoic acid])、酸化LDLに対する反応性が少し異なることを明らかにした。

具体的には、ヒト腎結石由来の石灰化小球を、10% FCSを含むDMEM培地中で培養し、遠心により石灰化小球を回収した。この石灰化小球(nanobacteria-like organism [NLO])を、フロインドアジュバントを用いて数回BALB/cマウス皮下に免疫し、得られた脾臓細胞をポリエチレングリコール法にてミエローマ細胞株P3U1と細胞融合しモノクローナル抗体を得た。該モノクローナル抗体を、動脈硬化石灰化病変に結合反応するのではないかと確認/検討したところ、結合活性が確認できた。

あるいは、ヒト腹部大動脈の動脈硬化巣のホモジネートを同じようにフロインドアジュバントを用いて数回BALB/cマウス皮下に免疫し、得られた脾臓細胞をポリエチレングリコール法にてミエローマ細胞株P3U1と細胞融合しモノクローナル抗体を得た。生活習慣病の原因である酸化ストレス=脂質の過酸化に反応するクローンをELISAで分析し、ELISAで反応性を示した抗体が動脈硬化病変に結合反応するのではないかと確認/検討したところ、結合活性が確認できた。

また、石灰化小球を免疫したマウスから樹立したモノクローナル抗体によるラメラ(脂質膜様構造)形成を検討したところ、該モノクローナル抗体によりラメラの形成が阻害されることが判明した。そのようにして得た抗体は、石灰化小球に反応性を有し、動脈硬化巣(特に動脈硬化石灰化病変部位)に結合活性を有する。

「粥状動脈硬化と関連して発生する動脈血管の石灰化」と「尿路結石の形成」が共に生活習慣病の原因である酸化ストレス(脂質の過酸化)によるものではないかとの発想から、その抗体についてさらに検討したところ、酸化LDL、ホスファチジルセリン、カルジオリピン及び7-ケトコレステリル-9-カルボキシノナノエートからなる群から選ばれる少なくとも1つにも結合活性を有するものが存在することが判明した。実施例に詳細に記載するが、今回取得のCL15、CL19、CL21クローンは、石灰化小球(NLO)に反応し、さらに酸化LDL、ホスファチジルセリン、カルジオリピン及び7-ケトコレステリル-9-カルボキシノナノエートにも結合活性を有していた。また、CL15、CL19、CL21クローンは動脈硬化病変に結合、特に動脈硬化石灰化病変部位に結合活性を有していた。

一方、CL48、CL56は、石灰化小球(NLO)に反応し、動脈硬化病変に結合するが、酸化LDL、ホスファチジルセリン、カルジオリピン及び7-ケトコレステリル-9-カルボキシノナノエートいずれにも結合活性を示さなかった。

また、当該抗体が動脈硬化(石灰化病変)部位に特異的に反応することを示すと共に、それらの標識抗体による動脈硬化石灰化病変の可視化を実現した。

さらには、本発明の抗体と酸化LDL/ $\beta_2$ GPI複合体に結合する抗体との2重染色実験により、本発明の石灰化小球を認識する抗体と抗体3H3を同一病理組織切片に接触させると、

それぞれの標識により別々の組織部位がイメージングされ、組織切片の異なる病態部位の特定に利用できることが判明した。

【0009】

即ち本発明は、以下〔1〕～〔27〕を提供するものである。

〔1〕石灰化小球 (NLO) に反応し、硫酸銅による酸化変性LDL (酸化LDL) に結合活性を有する抗体。

〔2〕さらに、ホスファチジルセリン、カルジオリピン、7-ケトコレステリル-9-カルボキシノナノエート [9-オキソ-9-(7-ケトコレスト-5-エン-3β-イルオキシ)ノナン酸] (7-ketocholesteryl-9-carboxynonanoate [9-oxo-9-(7-ketochoest-5-en-3β-yloxy) nonanoic acid])、セラミド-1リン酸、及びホスファチジン酸からなる群から選ばれる少なくとも1つに結合活性を有する、〔1〕記載の抗体。 10

〔3〕さらに、カルジオリピン及び7-ケトコレステリル-9-カルボキシノナノエートに結合活性を有する、〔1〕記載の抗体。

〔4〕さらに、ホスファチジルセリン、カルジオリピン及び7-ケトコレステリル-9-カルボキシノナノエートに結合活性を有する、〔1〕記載の抗体。

〔5〕さらに、セラミド-1リン酸に結合し、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、カルジオリピン、および7-ケトコレステリル-9-カルボキシノナノエートに結合活性を有する、〔1〕記載の抗体。

〔6〕石灰化小球に反応するが、硫酸銅による酸化変性LDL (酸化LDL)、ホスファチジルセリン、カルジオリピン及び7-ケトコレステリル-9-カルボキシノナノエートからなる群から選ばれる少なくとも1つに対する反応性がELISA法により検出されない、抗体。 20

〔7〕下記 (A) ~ (E) のいずれかに記載の抗体である、〔1〕又は〔6〕に記載の抗体；

(A) 下記 (a) または (b) に記載の重鎖、および、下記 (c) または (d) に記載の軽鎖の対を有する抗体、

(a) CDR1として配列番号：1に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号：2に記載アミノ酸配列、及びCDR3として配列番号：3に記載のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体、

(b) 重鎖可変領域として配列番号：4に記載のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体、

(c) CDR1として配列番号：6に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号：7に記載アミノ酸配列、及びCDR3として配列番号：8に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖を含む抗体、 30

(d) 軽鎖可変領域として配列番号：9に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖を含む抗体、

(B) 下記 (e) または (f) に記載の重鎖、および、下記 (g) または (h) に記載の軽鎖の対を有する抗体、

(e) CDR1として配列番号：11に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号：12に記載アミノ酸配列、及びCDR3として配列番号：13に記載のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体、

(f) 重鎖可変領域として配列番号：14に記載のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体、 40

(g) CDR1として配列番号：16に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号：17に記載アミノ酸配列、及びCDR3として配列番号：18に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖を含む抗体、

(h) 軽鎖可変領域として配列番号：19に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖を含む抗体、

(C) 下記 (i) または (j) に記載の重鎖、および、下記 (k) または (l) に記載の軽鎖の対を有する抗体、

(i) CDR1として配列番号：21に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号：22に記載アミノ酸配列、及びCDR3として配列番号：23に記載のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体、

- (j) 重鎖可変領域として配列番号：24に記載のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体、
- (k) CDR1として配列番号：26に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号：27に記載アミノ酸配列、及びCDR3として配列番号：28に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖を含む抗体、
- (l) 軽鎖可変領域として配列番号：29に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖を含む抗体、
- (D) 下記 (m) または (n) に記載の重鎖、および、下記 (o) または (p) に記載の軽鎖の対を有する抗体、
- (m) CDR1として配列番号：31に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号：32に記載アミノ酸配列、及びCDR3として配列番号：33に記載のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体、 10
- (n) 重鎖可変領域として配列番号：34に記載のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体、
- (o) CDR1として配列番号：36に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号：37に記載アミノ酸配列、及びCDR3として配列番号：38に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖を含む抗体、
- (p) 軽鎖可変領域として配列番号：39に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖を含む抗体、
- (E) 下記 (q) または (r) に記載の重鎖、および、下記 (s) または (t) に記載の軽鎖の対を有する抗体、 20
- (q) CDR1として配列番号：41に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号：42に記載アミノ酸配列、及びCDR3として配列番号：43に記載のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体、
- (r) 重鎖可変領域として配列番号：44に記載のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体、
- (s) CDR1として配列番号：46に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号：47に記載アミノ酸配列、及びCDR3として配列番号：48に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖を含む抗体、
- (t) 軽鎖可変領域として配列番号：49に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖を含む抗体 30
- 。
- [8] [7] に記載の抗体が結合するエピトープと同じエピトープに結合する抗体。
- [9] ヒト化抗体またはキメラ抗体である、[1]～[8]のいずれかに記載の抗体。
- [10] [1]～[9]のいずれかに記載の抗体を含む、動脈硬化の石灰化部位のイメージング剤。
- [11] [1]～[9]のいずれかに記載の抗体を含む、動脈硬化の石灰化部位のイメージング用キット。
- [12] 以下に記載の工程を含む、[1]～[9]のいずれかに記載の抗体の製造方法：
- (a) 石灰化小球または動脈硬化巣を非ヒト動物に免疫する工程、及び
- (b) 該非ヒト動物より抗体を単離する工程。 40
- [13] [12]の(b)の工程の後さらに、(c)石灰化小球への反応性を指標としてスクリーニングし、石灰化小球に結合する抗体を選択し、単離する工程を含む、抗体の製造方法。
- [14] [13]の(c)の工程の後さらに、(d)石灰化小球培養液に対して該抗体を添加して培養を継続する工程、及び(e)対照の石灰化小球成長と比較して成長を阻害する抗体を選択し、単離する工程を含む、抗体の製造方法。
- [15] [13]又は[14]の製造方法で製造された抗体を含む石灰化小球成長阻害剤
- 。
- [16] CDR1として配列番号：21に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号：22に記載アミノ酸配列、及びCDR3として配列番号：23に記載のアミノ酸配列を 50

有する重鎖、または重鎖可変領域として配列番号：24に記載のアミノ酸配列を有する重鎖と、

CDR1として配列番号：26に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号：27に記載アミノ酸配列、及びCDR3として配列番号：28に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖、または軽鎖可変領域として配列番号：29に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖、を含む石灰化小球成長阻害剤。

〔17〕〔13〕又は〔14〕の製造方法で製造された抗体を含む動脈硬化治療剤。

〔18〕〔13〕又は〔14〕の製造方法で製造された抗体を用いる、石灰化小球成長の阻害方法。

〔19〕石灰化小球成長阻害剤の製造における、〔13〕又は〔14〕の製造方法で製造された抗体の使用。 10

〔20〕石灰化小球成長の阻害方法に使用するための、〔13〕又は〔14〕の製造方法で製造された抗体。

〔21〕以下に記載の工程を含む、動脈硬化治療剤の候補化合物のスクリーニング方法：

(a) 〔1〕～〔9〕のいずれかに記載の抗体が投与された動脈硬化疾患モデル非ヒト動物に、候補化合物を投与する工程、

(b) 該候補化合物を投与された動脈硬化疾患モデル非ヒト動物と、該候補化合物を投与されていない動脈硬化疾患モデル非ヒト動物において、動脈硬化巣をイメージングする工程、

(c) 該候補化合物を投与された動脈硬化疾患モデル非ヒト動物と、該候補化合物を投与されていない動脈硬化疾患モデル非ヒト動物において、動脈硬化巣の大きさまたは存在部位を比較する工程、及び 20

(d) 該候補化合物を投与された動脈硬化疾患モデル非ヒト動物において、該候補化合物を投与されていない動脈硬化疾患モデル非ヒト動物と比較して、動脈硬化巣が減少または消失する候補化合物を選択する工程。

〔22〕〔1〕～〔9〕のいずれかに記載の抗体及び酸化LDLと $\beta_2$ -グリコプロテインIの複合体（酸化LDL/ $\beta_2$ GPI複合体）に結合する抗体を含有する、動脈硬化巣における石灰化部位及び動脈硬化の存在部位を免疫学的手法により検出するために用いられるキット。

〔23〕以下の工程：

(a) 〔1〕～〔9〕のいずれかに記載の抗体及び酸化LDL/ $\beta_2$ GPI複合体に結合する抗体と、分離された動脈硬化巣を接触させる工程；及び 30

(b) 該動脈硬化巣における石灰化部位及び動脈硬化の存在部位を検出する工程；を含む、免疫学的手法。

〔24〕〔1〕～〔9〕のいずれかに記載の抗体を含む、動脈硬化の石灰化部位のイメージング方法。

〔25〕動脈硬化の石灰化部位のイメージング剤の製造における、〔1〕～〔9〕のいずれかに記載の抗体の使用。

〔26〕動脈硬化の石灰化部位のイメージング方法に使用するための、〔1〕～〔9〕のいずれかに記載の抗体。

〔27〕以下に記載の工程を含む、動脈硬化病態の検出方法： 40

(a) 〔1〕～〔9〕のいずれかに記載の抗体及び酸化LDL/ $\beta_2$ GPI複合体に結合する抗体と、分離された動脈硬化巣を接触させる工程；

(b) 該動脈硬化巣における石灰化部位及び動脈硬化の粥腫またはそれぞれの初期病片の存在部位を検出する工程；及び

(c) 動脈硬化巣が、〔1〕～〔9〕のいずれかに記載の抗体で検出されたか、又は酸化LDL/ $\beta_2$ GPI複合体に結合する抗体で検出されたかを判定する工程。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】Hybridoma培養上清中の抗体の石灰化小球への反応性を示すグラフである。ハイブリドーマ樹立直後の培養上清を測定し、スクリーニング過程のIgM抗石灰化小球抗体でE 50

LISAした。縦軸490nm、ヨコ軸、培養上清希釈倍率。

【図2】抗石灰化小球に対するモノクローナル抗体の酸化LDLへの反応性を示すグラフである。樹立した5クローンのハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体の石灰化小球(NLO)および酸化LDLへの反応性を示す。

【図3】ELISA法によるモノクローナル抗体の各種脂質に対する反応性を示すグラフである。縦軸吸光度(490nm)、ヨコ軸クローン名。5種類のモノクローナル抗体の各種脂質への反応性を示している。ELISAでは、CL15および19はPS、CL、およびoxLig-1に反応性を示す。CL21の認識特性としては、CLおよびoxLig-1に反応し、CL15、CL19よりは結合反応性が低いものの、PSにも反応した。CL48、56は石灰化小球(NLO)に反応するが今回用いた全ての脂質に反応性を示さなかった。

10

【図4】ELISA法によるモノクローナル抗体の各種脂質に対する反応性を示すグラフである。縦軸吸光度(490nm)、ヨコ軸クローン名。5種類のモノクローナル抗体の各種脂質への反応性を示している。PSに強く反応する抗体はCL15および19であり、CL21はそれよりは反応性が弱いものの結合するものと考えられる。また、CLには、CL15、19、21が反応性を示した。CL15、19、21がoxLig-1に反応した。

【図5】抗石灰化小球抗体に特異的なモノクローナル抗体による大動脈弁の免疫染色を示す写真である。3H3と異なり、粥腫というよりも、その周辺部位が強く染まる。抗体によって微妙に選択パターンが異なる。

【図6】石灰化小球に対するモノクローナルCL21抗体による免疫電顕(対象サンプルは培養した石灰化小球)を示す写真である。走査電顕(Hitachi S900); 2次電子像に反射電子像を統括し、金コロイドを黄点でマークしたものである。

20

【図7】抗体アミノ酸配列の図である。抗石灰化抗体それぞれのクローンのアミノ酸配列をCDRがわかるように記載した。配列類似箇所はあまりみられない。

【図8】比較として掲載した、AngioSenseによる血管造影の場合のイメージング写真である。

【図9】Cy5.5標識抗体(IgM:抗石灰化小球抗体CL15)によるin vivoイメージング写真である。

【図10】Cy5.5標識抗体(IgM:抗石灰化小球抗体CL21)によるin vivoイメージング写真である。全身写真、心臓と胸部大動脈(ex vivoイメージング)、胸部(in vivoイメージング)の写真である。

30

【図11】Cy5.5標識抗体(IgM:抗石灰化小球抗体CL19)によるin vivoイメージング写真である。全身写真、心臓と胸部大動脈(ex vivoイメージング)、胸部(in vivoイメージング)の写真である。

【図12】各種Cy5.5標識モノクローナル抗体投与後の大動脈起始部近辺の蛍光強度を示すグラフである。対照マウスの心臓起始部の蛍光強度を1とする。3H3抗体及びCL15抗体がin vivoイメージングに使用可能な抗体である。

【図13】BALB/cマウスに抗原として酸化LDL/ $\beta_2$ GPI複合体を免疫して得られたモノクローナル抗体の、固相抗原に対する反応性を示す図である。ヨコ軸は抗体濃度、縦軸には吸光度を示す。

【図14】抗原による競合阻害試験を示すグラフである。ヨコ軸は液中の抗原濃度、縦軸には阻害抗原が存在しない場合の吸光度を100%としたときの阻害された%を示す。3H3、および4C12は、酸化LDLに結合した $\beta_2$ GPIを認識する抗体で、遊離の $\beta_2$ GPIを認識していない。一方、2H6、3D4、2A12は、遊離の $\beta_2$ GPIに反応する抗体である。

40

【図15】動脈硬化好発モデルマウス(高脂肪食を負荷したapoE<sup>-/-</sup>)の大動脈弁の免疫蛍光染色写真である。A)DAPI:核の染色、B)Mac3:マクロファージに特異的抗体、C)3H3抗体、D)control。C57BL6系統のマウスを普通飼料で飼育したのに対し、3H3抗体。Mac3を用いる免疫蛍光染色では、泡沫化マクロファージが集簇してできた粥腫が染まっている。3H3によっても同様な部位が染まっている。

【図16】動脈硬化好発モデルマウス(高脂肪食を負荷したapoE<sup>-/-</sup>)の大動脈弁の免疫蛍光染色写真である。酸化LDL/ $\beta_2$ GPI複合体抗体を用いた他の抗体の蛍光免疫染色の結果

50

を示す。粥腫の染色陽性例は、3H3および抗体Aのみである。

【図17】石灰化小球の成長阻害観察（位相差電顕）写真である。石灰化小球を *in vitro* で増大させる際に、CL21抗体を添加すると、石灰化小球の形成に伴い現れるラメラ構造の出現が著しく阻害され、小球の形成が抑えられた（白く線状に見えているのがラメラ構造）。

【図18】*apoE*<sup>-/-</sup>マウス大動脈弁における動脈硬化巣（不安定プラーク）と初期石灰化病変に関する図及び写真である。（A）マウス大動脈弁部分の凍結切片作製の手順図、（B）マウス大動脈弁のヘマトキシリン・エオシン染色、（C）マウス大動脈弁のオイルレッド染色、（D）～（H）マウス大動脈弁の免疫蛍光染色。（D）一次抗体にラット抗マウス単球/マクロファージ抗体MOMA-2（BMA BIOMEDICALS社製、1 $\mu$ g/ml）およびウサギ抗アルファ平滑筋アクチン抗体（Abcam社製、6 $\mu$ g/ml）で染色し、FITC蛍光用のU-MNIBA2フィルターで撮影した画像と、ローダミン蛍光用のU-MWIG2フィルターで撮影した画像を重ね合わせた。（E）Cy5.5標識したCL15抗体（100 $\mu$ g/ml）及びDAPIで染色し、DAPI用のU-MNU2フィルターを用いて撮影した画像とローダミン用のU-MWIG2フィルターを用いて撮影した画像を重ね合わせた。（F）Alexa Fluor488標識した3H3抗体（25 $\mu$ g/ml）を及びDAPIで染色しU-MNU2フィルターを用いて撮影した画像とFITC用のU-MNIBA2フィルターを用いて撮影した画像を重ね合わせた。（G）Cy5.5標識したCL15抗体（100 $\mu$ g/ml）およびAlexa Fluor488標識した3H3抗体（25 $\mu$ g/ml）で染色し、FITC用のU-MNIBA2フィルターを用いて撮影した画像とローダミン用のU-MWIG2フィルターを用いて撮影した画像を重ね合わせた。重なった部分は黄色く見える。（H）一次抗体にウサギ抗オステオカルシン抗体（Santa Cruz社製、4 $\mu$ g/ml）、二次抗体にローダミン標識したロバ抗ウサギIgG抗体（Santa Cruz社製、4 $\mu$ g/ml）を用い、DAPIとともに処理した。DAPI用のU-MNU2フィルターを用いて撮影した画像とローダミン用のU-MWIG2フィルターを用いて撮影した画像を重ね合わせた。

【図19】Cy5.5標識抗体を尾静脈投与した*apoE*<sup>-/-</sup>マウスの大動脈弁の写真である。Cy5.5標識した抗体のCy5.5蛍光を観察、撮影した（B, Cy5.5標識CL-15抗体の蛍光、D: Cy5.5標識3H3抗体の蛍光）その同一切片をそれぞれヘマトキシリン・エオシン染色した（A, C）。

【図20】ELISAにおける各種脂質へのCL15抗体の反応性を示す図である。

【図21】TLC-Ligand blotにおける各種脂質へのCL15抗体の反応性を示す写真である。

【図22】IVIS 200による特異抗体を用いた蛍光イメージング（反射蛍光観察）写真である。*in vivo*: 高脂肪食6ヵ月以上負荷した*ApoE*<sup>-/-</sup>マウスに、イメージング剤を、脂肪食負荷*ApoE*<sup>-/-</sup>マウスの尾静脈より投与し、2～24時間後に、IVIS 200にて麻酔吸入下で *in vivo* 蛍光を観察・撮影した。その際*ApoE*<sup>-/-</sup>マウスでは黒い体毛が蛍光を吸収するため体毛を剃って観察した。*ex vivo*: マウスを安楽死させ、開胸して心臓と大動脈を露出させ、右心耳に小さく切り込みを入れた後、左心室に針を挿入して冷PBS 10 mlで心灌流し、心臓および大動脈を摘出して、IVIS 200により反射蛍光画像を得た。

【図23】IVIS200によるイメージング写真である（Excitation: 640 nm, Emission: 720 nm.）。実験1: 高脂肪食負荷*apoE*<sup>-/-</sup>マウスに生理食塩水（PBS、対照）、Cy5.5標識抗体A、Cy5.5標識3H3抗体を尾静脈より投与。24時間後に胸部皮膚を剥がし、生きた状態で全身を撮影。更に胸部大動脈が繋がった状態で心臓を摘出して撮影。実験2: PBS、Cy5.5標識2A12抗体、Cy5.5標識3H3抗体投与マウスから摘出した心臓と胸部大動脈。3H3投与で大動脈起始部が強く染まる。抗体Aでも幾分染まるが3H3の場合ほど蛍光強度は強くない。2A12では全く染まらない。

【図24】特異抗体を用いた動脈硬化の3次元画像イメージング写真である。（A）IVIS 200による特異抗体を用いた蛍光イメージング（反射）、（B）IVIS200による透過光3D画像（左図）と統合前のCT-3D像（中央）と統合後の3D画像（右図）、（C）IVISによる蛍光シグナルと3次元CTの統合画像である。

【図25】統合前のIVIS 200による蛍光3次元画像（上段: A）及びIVIS 200による蛍光シグナルと3次元CTの統合画像（下段: B）の写真である。

【図26】統合前のIVIS 200による蛍光3次元画像（Alexa750 標識 CL-19抗体: IVIS200

)の写真である。3次元による多方面からの観察である。

【図27】Alexa750 標識 CL-19:IVIS200、CT (A 骨抽出、B 臓器抽出)と3D蛍光 (IVIS200) -CT統合の写真(C~E)である。

【図28】3D蛍光 (IVIS200) -CT統合の画像全身写真である。

【図29】IVIS200で測定した際の大動脈起始部周辺のCy5.5に依存する蛍光量を示す図である。大動脈起始部の一定面積あたりの蛍光強度を測定した。PBSを投与した対照マウスの蛍光を1.0とした。3H3投与で、対照の3倍程度の蛍光が確認されたその他の抗体投与では蛍光強度に大きな変化は見られなかった。

【図30】3H3抗体アミノ酸配列図である。各CDRを下線で示した。

【図31】マウスH鎖からヒト化H鎖への変換に関する図である。(A)マウスH鎖と移植先ヒトH鎖のFR部分の相同性を比較したものである。すなわちマウス3H3抗体の重鎖(H鎖)とヒト抗体AY882577のアミノ酸を比較した図である。H鎖のFR部分については、87アミノ酸中80アミノ酸が一致しており、91.9%の相同性があった。(B)マウスH鎖からヒト化H鎖への変換過程を示す。マウス3H3抗体の重鎖をKabat則によりナンバリングし、CDR1~CDR3、FR1~FR4を同定した。Kabat則の詳細については、<http://www.bioinf.org.uk/abs/numbering.html>を参照のこと。マウス3H3抗体FR1~FR4と相同性のあるヒトFR1~FR4を有するAY882577を同定し、マウス3H3 CDR1~CDR3を移植した3H3RHAを設計した。図中の3H3VHはマウス3H3抗体の重鎖であり、3H3 CDRは3H3重鎖のCDR1~CDR3であり、AY882577FRはAY882577のCDRを除いた重鎖フレームワークである。

【図32】マウスL鎖からヒト化L鎖への変換に関する図である。(A)マウスL鎖と移植先ヒトL鎖FR部分の相同性を比較したものである。すなわちマウス3H3抗体の軽鎖(L鎖)とヒト抗体AY942004のアミノ酸を比較した図である。L鎖のFR部分については、80アミノ酸中65アミノ酸が一致しており、81.3%の相同性があった。(B)マウスL鎖からヒト化L鎖への変換過程を示す。マウス3H3抗体の軽鎖をKabat則によりナンバリングし、CDR1~CDR3、FR1~FR4を同定した。Kabat則の詳細については、<http://www.bioinf.org.uk/abs/numbering.html>を参照のこと。マウス3H3抗体FR1~FR4と相同性のあるヒトFR1~FR4を有するAY942004を同定し、マウス3H3 CDR1~CDR3を移植した3H3RKAを設計した。図中の3H3VKはマウス3H3抗体の軽鎖であり、3H3 CDRは3H3L鎖のCDR1~CDR3であり、AY942004FRはAY942004のCDRを除いた軽鎖フレームワークである。

【図33】3H3RHAの塩基配列及びアミノ酸配列を示す図である。シグナル配列を含めた、3H3RHAの塩基配列及びアミノ酸配列を示す。シグナル配列は下線で示した。

【図34】3H3RKAの塩基配列及びアミノ酸配列を示す図である。シグナル配列を含めた、3H3RKAの塩基配列及びアミノ酸配列を示す。シグナル配列は下線で示した。

【図35】抗原に対するELISA活性(ヒト化IgG1とキメラIgG1の比較)を示すグラフである。横軸に抗体濃度、縦軸にELISAで測定された吸光度(650nm)を示す。ヒト化IgG1とキメラIgG1とマウス3H3は結合性に差はなかった。コントロールとしては、293細胞の培養上清を用いた。

【図36】変異型IgG4抗体の作製を示す図である。定常領域のアミノ酸配列中、IgG1,2と異なるKabat則241番目のセリンがIgG4の不安定化につながるという報告があるため、この位置をプロリンに変換した定常領域を作製した。

【図37】変異型IgG4抗体の結合活性比較図である。横軸に抗体濃度、縦軸にELISAで測定された吸光度(650nm)を示す。ヒト化IgG4とキメラIgG1とヒト化IgG1の結合性に差はなかった。コントロールとしては、293細胞の培養上清を用いた。

【発明を実施するための形態】

【0011】

本発明は、石灰化小球に反応性を有し、動脈硬化巣(特に動脈硬化石灰化病変部位)に結合活性を有する抗体を提供する。動脈硬化巣には、動脈硬化石灰化病変部位や動脈硬化粥腫またはそれぞれの初期病変が含まれる。よって本発明は、石灰化小球に結合し、かつ、動脈硬化石灰化病変部位に結合する抗体を含む。なお、抗体が「石灰化小球に反応」とは、抗体が「石灰化小球に結合」することと言い換えることもできる。

石灰化小球 (NLO) は、外科的に摘出された腎・尿路結石を破碎した後、酸で溶解し、中和した後、無菌化するためにフィルターで濾過したものを、10% FCS (またはFBS、いずれも、ガンマ線照射したものが好ましい) 含有培地(Dulbecco's modified MEM)中で、5% CO<sub>2</sub>, 37°Cの条件下にて、あたかも細胞培養する条件にて培養 (インキュベート) する。この「培養」に当たり、超音波処理して沈澱を液中に分散後させることが好ましい。この培養操作で、石灰化小球を増やすことが出来る。例えば、Nanobacterium (NNb)株 (Dr.Neva Ciftcioglu (NASA,USA)より分与) を文献 (Nanobacteria: an alternative mechanism for pathogenic intra- and extracellular calcification and stone formation.Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Jul 7;95(14):8274-9.) に準じて、 $\gamma$ 線照射した10% FBSを含むDMEMで5% CO<sub>2</sub>, 37°Cの条件下で培養開始し、位相差顕微鏡下でモニターしながらサブカルチャーを続けることができる。但し、石灰化小球は、様々な患者由来の尿路結石、腎結石他より調製が可能で、上記方法に限定されず、調製可能である。

石灰化小球の成長は、650 nmの濁度の増加または、位相差顕微鏡で、膜状(ラメラ)構造の粒子の大きさの増加及び/またはラメラの数の増加として把握することが出来る。培養液からの石灰化小球の単離・回収は20°C、低速遠心 (例えば3000rpm~10,000rpm, 30~60分の遠心) で、沈降物として回収可能である。

動脈硬化巣および動脈硬化石灰化病変部位は、胸部・腹部大動脈あるいは頸動脈に動脈硬化が認められる患者より外科的切除で得られる。実験的には、高脂血症モデルマウスであるapoE欠失マウス (apoE<sup>-/-</sup>) やLDL受容体欠失マウス (LDLR<sup>-/-</sup>) に高脂肪食を負荷したのち、大動脈弁 (大動脈起始部) や胸部・腹部大動脈を摘出することで得られる。

石灰化病変とは、血液中のカルシウムが、リン酸カルシウムの形となってキレートし血管壁に沈着したものである。動脈硬化において、粥腫が発展して、石灰化病変となる場合もあり、血管壁が老化、弾力性を失い硬くなる。

#### 【0012】

本発明の抗体は、石灰化小球 (NLO) または動脈硬化巣を非ヒト動物に免疫することにより、得ることができる。免疫原としては、石灰化小球の場合は、前述の調整法、また、好ましくは実施例1で記載した調整法で得られるものであれば、特に動物種に制限はない。好ましい動物種としてはヒトが挙げられる。免疫原として動脈硬化巣のホモジネートを用いる場合、部位、動物種に特に制限はないが、ヒト腹部大動脈などが使用でき、いずれの免疫原を用いた場合でも、石灰化小球に対する反応性を指標に抗体クローンを選択することが望ましい。

#### 【0013】

本発明は、石灰化小球 (NLO) に反応し、硫酸銅による酸化変性LDL (酸化LDL) に結合活性を有する抗体を提供する。本発明の抗体は、動脈硬化石灰化病変に対して結合性を有する。また、本発明の抗体には、酸化LDLへの結合活性に加えて、ホスファチジルセリン、カルジオリピン、7-ケトコレステリル-9-カルボキシノナノエート [9-オキソ-9-(7-ケトコレスト-5-エン-3 $\beta$ -イルオキシ)ノナン酸] (7-ketocholestery[1-9-carboxynonanoate [9-oxo-9-(7-ketochoest-5-en-3 $\beta$ -yloxy) nonanoic acid])、セラミド-1リン酸、及びホスファチジン酸からなる群から選ばれる少なくとも1つに結合活性を有する抗体、カルジオリピン及び7-ケトコレステリル-9-カルボキシノナノエートに結合活性を有する抗体、ホスファチジルセリン、カルジオリピン及び7-ケトコレステリル-9-カルボキシノナノエートに結合活性を有する抗体、又はセラミド-1リン酸に結合し、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、カルジオリピン、および7-ケトコレステリル-9-カルボキシノナノエートに結合活性を有する抗体が包含される。

#### 【0014】

また、本発明に包含される抗体としては、石灰化小球に反応するが、硫酸銅による酸化変性LDL (酸化LDL)、ホスファチジルセリン、カルジオリピン及び7-ケトコレステリル-9-カルボキシノナノエートからなる群から選ばれる少なくとも1つに対する反応性がELISA法により検出されない抗体が挙げられる。なお、「・・・に対する反応性がELISA法により検出されない」とは、ELISA法を用いた実験により、その抗体が酸化LDL等に対して結合

しないと判定された場合をいう。

【0015】

ELISA法では、ヒト腎・尿路結石から前述の通り分離、増殖された石灰化小球（NLO）、硫酸銅で酸化変性させた血漿LDL、例えばウシ脳由来のホスファチジルセリン、ウシ心臓由来のカルジオリピン及び酸化LDLより精製される、あるいは、7-ケトコレステロールとアゼライン酸より合成される7-ケトコレステリル-9-カルボキシノナノエートを、96ウェルマイクロテストプレートに固相化する。これら抗原固相に反応する抗体を、HRPなど酵素を標識した抗免疫グロブリン抗体で検出することが可能である。

【0016】

本発明の抗体は、標的医療（DDS）によるか、もしくは、その抗体そのもの中和活性を利用して標的医療に利用することが可能である。そのような抗体は、例えば、本発明の抗体に薬剤封入りポソームを結合させた抗体である。本発明の抗体に薬剤封入りポソームを結合させた抗体を生体内に投与することにより動脈硬化の原因となる動脈局所による炎症・免疫反応を抑えることが可能である。薬剤の例としては、スタチン（HMG-CoA還元酵素阻害剤）、免疫抑制剤（ラパマイシン、パクリタキセル、など）などである。

【0017】

本願発明に包含される抗体としては、具体的には以下の抗体が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

(A) 下記 (a) または (b) に記載の重鎖、および、下記 (c) または (d) に記載の軽鎖の対を有する抗体、

(a) CDR1として配列番号：1に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号：2に記載アミノ酸配列、及びCDR3として配列番号：3に記載のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体、

(b) 重鎖可変領域として配列番号：4に記載のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体、

(c) CDR1として配列番号：6に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号：7に記載アミノ酸配列、及びCDR3として配列番号：8に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖を含む抗体、

(d) 軽鎖可変領域として配列番号：9に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖を含む抗体、

(B) 下記 (e) または (f) に記載の重鎖、および、下記 (g) または (h) に記載の軽鎖の対を有する抗体、

(e) CDR1として配列番号：11に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号：12に記載アミノ酸配列、及びCDR3として配列番号：13に記載のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体、

(f) 重鎖可変領域として配列番号：14に記載のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体、

(g) CDR1として配列番号：16に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号：17に記載アミノ酸配列、及びCDR3として配列番号：18に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖を含む抗体、

(h) 軽鎖可変領域として配列番号：19に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖を含む抗体、

(C) 下記 (i) または (j) に記載の重鎖、および、下記 (k) または (l) に記載の軽鎖の対を有する抗体、

(i) CDR1として配列番号：21に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号：22に記載アミノ酸配列、及びCDR3として配列番号：23に記載のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体、

(j) 重鎖可変領域として配列番号：24に記載のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体、

(k) CDR1として配列番号：26に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号：27に記載アミノ酸配列、及びCDR3として配列番号：28に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖を含む抗体、

10

20

30

40

50

(1) 軽鎖可変領域として配列番号：29に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖を含む抗体

、  
(D) 下記 (m) または (n) に記載の重鎖、および、下記 (o) または (p) に記載の軽鎖の対を有する抗体、

(m) CDR1として配列番号：31に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号：32に記載アミノ酸配列、及びCDR3として配列番号：33に記載のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体、

(n) 重鎖可変領域として配列番号：34に記載のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体

、  
(o) CDR1として配列番号：36に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号：37に記載アミノ酸配列、及びCDR3として配列番号：38に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖を含む抗体、 10

(p) 軽鎖可変領域として配列番号：39に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖を含む抗体

、  
(E) 下記 (q) または (r) に記載の重鎖、および、下記 (s) または (t) に記載の軽鎖の対を有する抗体。

(q) CDR1として配列番号：41に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号：42に記載アミノ酸配列、及びCDR3として配列番号：43に記載のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体、

(r) 重鎖可変領域として配列番号：44に記載のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体 20

、  
(s) CDR1として配列番号：46に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号：47に記載アミノ酸配列、及びCDR3として配列番号：48に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖を含む抗体、

(t) 軽鎖可変領域として配列番号：49に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖を含む抗体

。【0018】

また、本発明には、以下の抗体も包含されるが、これらに限定されない。

(F) (A) に記載の抗体において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および/または挿入された抗体であって、(A) に記載の抗体と同等の活性を有し、CDR1として 30  
配列番号：1に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号：2に記載アミノ酸配列、及びCDR3として配列番号：3に記載のアミノ酸配列を有する重鎖、並びに、CDR1として配列番号：6に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号：7に記載アミノ酸配列、及びCDR3として配列番号：8に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖の対を有する抗体

(G) (B) に記載の抗体において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および/または挿入された抗体であって、(B) に記載の抗体と同等の活性を有し、CDR1として 40  
配列番号：11に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号：12に記載アミノ酸配列、及びCDR3として配列番号：13に記載のアミノ酸配列を有する重鎖、並びに、CDR1として配列番号：16に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号：17に記載アミノ酸配列、及びCDR3として配列番号：18に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖の対を有する抗体

(H) (C) に記載の抗体において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および/または挿入された抗体であって、(C) に記載の抗体と同等の活性を有し、CDR1として 50  
配列番号：21に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号：22に記載アミノ酸配列、及びCDR3として配列番号：23に記載のアミノ酸配列を有する重鎖、並びに、CDR1として配列番号：26に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号：27に記載アミノ酸配列、及びCDR3として配列番号：28に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖の対を有する抗体

(I) (D) に記載の抗体において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および/ま

たは挿入された抗体であって、(D)に記載の抗体と同等の活性を有し、CDR1として配列番号：31に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号：32に記載アミノ酸配列、及びCDR3として配列番号：33に記載のアミノ酸配列を有する重鎖、並びに、CDR1として配列番号：36に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号：37に記載アミノ酸配列、及びCDR3として配列番号：38に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖の対を有する抗体

(J) (E)に記載の抗体において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および/または挿入された抗体であって、(E)に記載の抗体と同等の活性を有し、CDR1として配列番号：41に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号：42に記載アミノ酸配列、及びCDR3として配列番号：43に記載のアミノ酸配列を有する重鎖、並びに、CDR1として配列番号：46に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号：47に記載アミノ酸配列、及びCDR3として配列番号：48に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖の対を有する抗体

#### 【0019】

ポリペプチドに変異を導入する方法は、あるポリペプチドと機能的に同等なポリペプチドを調製するための、当業者によく知られた方法の一つである。例えば、当業者であれば、部位特異的変異誘発法 (Hashimoto-Gotoh, T. et al. (1995) *Gene* 152, 271-275、Zoller, MJ, and Smith, M. (1983) *Methods Enzymol.* 100, 468-500、Kramer, W. et al. (1984) *Nucleic Acids Res.* 12, 9441-9456、Kramer W, and Fritz HJ (1987) *Methods. Enzymol.* 154, 350-367、Kunke1, TA (1985) *Proc Natl Acad Sci USA.* 82, 488-492、Kunke1 (1988) *Methods Enzymol.* 85, 2763-2766) などを用いて、本発明の抗体に適宜変異を導入することにより、該抗体と機能的に同等な抗体を調製することができる。また、アミノ酸の変異は自然界においても生じうる。このように、本発明の抗体のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が変異したアミノ酸配列を有し、該抗体と機能的に同等な抗体もまた本発明の抗体に含まれる。

このような変異体における、変異するアミノ酸数は、通常、20アミノ酸以内であり、好ましくは15アミノ酸以内であり、さらに好ましくは10アミノ酸以内 (例えば、5アミノ酸以内) である。尚、変異はFR (フレームワーク) 内であることが好ましい。

#### 【0020】

変異するアミノ酸残基においては、アミノ酸側鎖の性質が保存されている別のアミノ酸に変異されることが望ましい。例えばアミノ酸側鎖の性質に基づいて、次のような分類が確立している。

疎水性アミノ酸 (A, I, L, M, F, P, W, Y, V)、

親水性アミノ酸 (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T)、

脂肪族側鎖を有するアミノ酸 (G, A, V, L, I, P)、

水酸基含有側鎖を有するアミノ酸 (S, T, Y)、

硫黄原子含有側鎖を有するアミノ酸 (C, M)、

カルボン酸及びアミド含有側鎖を有するアミノ酸 (D, N, E, Q)、

塩基含有側鎖を有するアミノ酸 (R, K, H)、

芳香族含有側鎖を有するアミノ酸 (H, F, Y, W)

(括弧内はいずれもアミノ酸の一文字標記を表す)

#### 【0021】

あるアミノ酸配列に対する1又は複数個のアミノ酸残基の欠失、付加及び/又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列を有するポリペプチドがその生物学的活性を維持することはすでに知られている (Mark, D. F. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1984) 81, 5662-5666、Zoller, M. J. and Smith, M., *Nucleic Acids Research* (1982) 10, 6487-6500、Wang, A. et al., *Science* 224, 1431-1433、Dalbadie-McFarland, G. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1982) 79, 6409-6413)。すなわち、一般に、あるポリペプチドを構成するアミノ酸配列中、各群に分類されたアミノ酸は、相互に置換したときに、当該ポリペプチドの活性が維持される可能性が高いとされている。本

USA (1984) 81, 5662-5666、Zoller, M. J. and Smith, M., *Nucleic Acids Research* (1982) 10, 6487-6500、Wang, A. et al., *Science* 224, 1431-1433、Dalbadie-McFarland, G. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1982) 79, 6409-6413)。すなわち、一般に、あるポリペプチドを構成するアミノ酸配列中、各群に分類されたアミノ酸は、相互に置換したときに、当該ポリペプチドの活性が維持される可能性が高いとされている。本

発明において、上記アミノ酸群の群内のアミノ酸間の置換を保存的置換という。

【0022】

また本発明は、石灰化小球に結合し、かつ、動脈硬化石灰化病変に結合する、本願発明の抗体が結合するエピトープと同じエピトープに結合する抗体も提供する。

この限りではないが、例えばある抗体が他の抗体と同じエピトープを認識するか否かは、両者のエピトープに対する競合によって確認することができる。抗体間の競合は、競合結合アッセイによって評価することができ、その手段としてELISA、蛍光エネルギー転移測定法 (FRET) や蛍光微量測定技術 (FMAT(登録商標)) などが挙げられる。抗原に結合した該抗体の量は、同じエピトープへの結合に対して競合する候補競合抗体 (被検抗体) の結合能に間接的に相関している。すなわち、同じエピトープに対する被検抗体の量や親和性が大きくなるほど、該抗体の抗原への結合量は低下し、抗原への被検抗体の結合量は増加する。具体的には、抗原に対し、適当な標識をした該抗体と評価すべき抗体を同時に添加し、標識を利用して結合している該抗体を検出する。抗原に結合した該抗体量は、該抗体を予め標識しておくことで、容易に測定できる。この標識は特には制限されないが、手法に応じた標識方法を選択する。標識方法は、具体的には蛍光標識、放射標識、酵素標識などが挙げられる。

10

【0023】

ここでいう「同じエピトープを認識する抗体」とは、標識該抗体に対して、非標識の該抗体の結合により結合量を50%低下させる濃度 ( $IC_{50}$ ) に対して、被検抗体が非標識該抗体の  $IC_{50}$  の通常、100倍、好ましくは80倍、さらに好ましくは50倍、さらに好ましくは30倍、より好ましくは10倍高い濃度で少なくとも50%、標識該抗体の結合量を低下させることができる抗体である。

20

【0024】

本発明の抗体には、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の両方が含まれる。モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体の調製および精製方法は、当分野で知られており、例えば Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988) に記載されている。また、本発明の抗体は、アイソタイプ (IgG, IgM, IgA, IgE, IgDなど) を問わない。

【0025】

本発明の抗体には、ヒト化 (humanized) 抗体またはキメラ (chimeric) 抗体などの組換え抗体も含まれる。「ヒト化抗体」とは、ヒトの抗体に構造を類似させた抗体のことをいう。このようなヒト化抗体またはキメラ抗体には、ヒト型キメラ抗体 (例えば抗体の一部がヒト化された抗体、CH2領域がヒト化された抗体、Fc領域がヒト化された抗体、定常領域がヒト化された抗体)、及び定常領域及び可変領域に存在するCDR (相補性決定領域) 以外の部分がヒト化されたヒト型CDR移植 (CDR-grafted) 抗体 (P.T.Johons et al., *Nature* 321,522(1986))、完全ヒト化抗体などが含まれる。ヒト型CDR移植抗体の抗原結合活性を高めるため、マウス抗体と相同性の高いヒト抗体FRを選択する方法、相同性の高いヒト化抗体を作製する方法、ヒト抗体にマウスCDRを移植した後さらにFRのアミノ酸を置換する方法の改良技術もすでに開発され (米国特許第5585089号、米国特許第5693761号、米国特許第5693762号、米国特許第6180370号、欧州特許第451216号、欧州特許第682040号、特許第2828340号などを参照)、本発明のヒト型CDR移植抗体の作製に利用することもできる。ヒト化の際に用いられるヒト抗体は、IgG, IgM, IgA, IgE, IgDなど如何なるアイソタイプのヒト抗体でもよい。

30

40

【0026】

ヒト型キメラ抗体は例えば、上記のH鎖可変領域の構造及び/又はL鎖可変領域の構造を有する抗体の定常領域をヒト抗体の定常領域に置換することにより作製することができる。ヒト抗体の定常領域としては公知のものを採用することができる。以下に、ヒト型キメラ抗体の作製方法の一例を示す。

【0027】

まず、特定の対象抗原に対するマウス抗体を産生するハイブリドーマよりmRNAを抽出し

50

、常法に従ってcDNAを合成する。合成したcDNAをベクターに組み込みcDNAライブラリーを構築する。このcDNAライブラリーから、H鎖遺伝子フラグメント及びL鎖遺伝子フラグメントをプローブとして用いることにより、H鎖遺伝子及びL鎖遺伝子を含むベクターを選択する。選択されたベクターの挿入配列のシーケンシングを行うことにより、H鎖可変領域及びL鎖可変領域の遺伝子の配列が決定される。このようにして得られた配列データを基にH鎖可変領域をコードするDNAを化学合成、生化学的切断／再結合等により作製する。得られたH鎖可変領域をコードするDNAを、ヒトH鎖定常領域をコードするDNAとライゲーションして発現用ベクターに組込むことによりH鎖発現ベクターを作製する。発現ベクターとしては例えばSV40 virus basedベクター、EB virus basedベクター、BPV (パピローマウイルス) basedベクターなどを用いることができるが、これらに限定されるものではない。一方、同様の方法によりL鎖発現ベクターを作製する。これらH鎖発現ベクター及びL鎖発現ベクターにより宿主細胞を共形質転換する。宿主細胞としてはCHO細胞(チャイニーズハムスター卵巣)(A.Wright & S.L.Morrison, *J.Immunol.*160, 3393-3402 (1998))、S P2/O細胞(マウスミエローム)(K.Motmans et al., *Eur.J.Cancer Prev.*5,512-519 (1996), R.P.Junghans et al., *Cancer Res.*50,1495-1502 (1990))などが好適に用いられる。また、形質転換にはリポフェクション法(R.W.Malone et al.,*Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 86,6077 (1989), P.L.Felgner et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 84,7413 (1987))、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法(F.L.Graham & A.J.van der Eb,*Virology* 52,456-467 (1973))、DEAE-Dextran法等が好適に用いられる。

#### 【0028】

形質転換体を培養した後、形質転換体の細胞内又は培養液よりヒト型キメラ抗体を分離する。抗体の分離、精製には、遠心分離、硫酸分画、塩析、限外濾過、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーなどの方法を適宜組み合わせることができる。

#### 【0029】

一方、ヒト型CDR移植抗体は例えば以下の方法により作製することができる。まず、上記キメラ抗体の製造方法の欄で述べた方法により、特定の抗原に対する抗体のH鎖可変領域及びL鎖可変領域のアミノ酸配列及びそれをコードする塩基配列を決定する。併せて各CDR領域のアミノ酸配列及び塩基配列を決定する。

#### 【0030】

次に、CDR領域を挟んで存在するFR(フレームワーク領域)を選択する。FRの選択には、およそ三つの方法が採用できる。1つめの方法は、NEWM、REIなど既に三次元構造の明らかとなったヒト抗体フレームを用いる方法である(Riechmann L. et al., *Nature* 332, 323-327 (1988); Tempst, PR. et al., *Protein Engineering* 7, 1501-1507 (1994); Ellis JH. et al., *J. Immunol* 155, 925-937 (1995))。2つめの方法は、目的のマウス抗体可変領域と最も高いホモロジーを持つヒト抗体可変領域をデータベースより選択し、そのFRを用いる方法である(Queen C. et al., *Proc Natl Acad SciUSA* 86, 10029-10033 (1989); Rozak MJ. et al., *J Biol Chem* 271, 22611-22618 (1996); Shearman CW. et al., *J.Immunol* 147, 4366-4373 (1991))。3つめの方法は、ヒト抗体のFRで最も共通に用いられるアミノ酸を選択する方法である(Sato K. et al., *Mol Immunol* 31, 371-381 (1994); Kobinger F. et al., *Protein Engineering* 6, 971-980 (1993); Kettleborough C A. et al., *Protein Engineering* 4, 773-783 (1991))。本発明ではこれらいずれの方法を用いることもできる。

#### 【0031】

尚、選択されたヒトFRのアミノ酸配列を改変したアミノ酸配列であっても、最終的に得られるヒト型CDR移植抗体が対象抗原に対する特異的結合性を有する限り、FRのアミノ酸配列として利用することができる。特に、選択されたヒトFRのアミノ酸の一部をCDRの由来となった抗体のFRのアミノ酸に変更した場合、抗体の特性が維持される可能性が高い。改変されるアミノ酸の数は好ましくはFR全体の30%以下であり、更に好ましくはFR全体の20%以下であり、更に好ましくはFR全体の10%以下である。

## 【0032】

次に、これらいずれかの方法により選択したFRと上記CDRとを組み合わせることによりH鎖可変領域及びL鎖可変領域をコードするDNAを設計する。この設計を基にH鎖可変領域をコードするDNAとL鎖可変領域をコードするDNAを化学合成、生化学的切断/再結合等によりそれぞれ作製する。そしてH鎖可変領域をコードするDNAを、ヒト免疫グロブリンH鎖定常領域をコードするDNAとともに発現ベクターに組み込みH鎖発現ベクターを構築する。同様に、L鎖可変領域をコードするDNAを、ヒト免疫グロブリンL鎖定常領域をコードするDNAとともに発現ベクターに組み込みL鎖発現ベクターを構築する。発現ベクターとしては例えばSV40 virus basedベクター、EB virus basedベクター、BPV (パピローマウイルス) basedベクターなどを用いることができるが、これらに限定されるものではない。

10

## 【0033】

以上の方法で作製されたH鎖発現ベクター及びL鎖発現ベクターにより宿主細胞を共形質転換する。宿主細胞としてはCHO細胞(チャイニーズハムスター卵巣)(A.Wright & S.L.Morrison, J.Immunol.160, 3393-3402 (1998)), SP2/O細胞(マウスミエローマ)(K.Motmans et al., Eur.J.Cancer Prev.5,512-519 (1996), R.P.Junghans et al., Cancer Res.50,1495-1502 (1990))などが好適に用いられる。また、形質転換にはリポフェクチン法(R.W.Malone et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86,6077 (1989), P.L.Felgner et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84,7413 (1987)), エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法(F.L.Graham & A.J.van der Eb, Virology 52,456-467(1973)), DEAE-Dextran法等が好適に用いられる。

20

## 【0034】

形質転換体を培養した後、形質転換体の細胞内又は培養液よりヒト型CDR移植抗体を分離する。抗体の分離、精製は、遠心分離、硫酸分画、塩析、限外濾過、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーなどの方法を適宜組み合わせて行うことができる。

## 【0035】

また、ヒト抗体の取得方法も知られている。例えば、ヒトリンパ球をin vitroで所望の抗原または所望の抗原を発現する細胞で感作し、感作リンパ球をヒトミエローマ細胞、例えばU266と融合させ、抗原への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる(特公平1-59878参照)。また、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物を所望の抗原で免疫することで所望のヒト抗体を取得することができる(国際特許出願公開番号WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096, WO 96/33735参照)。

30

## 【0036】

更なる実施態様では、抗体又は抗体断片は、McCafferty等(Nature, 348:552-554 (1990))に記載された技術を使用して産生される抗体ファージライブラリーから分離することができる。Clackson等(Nature, 352:624-628 (1991))及びMarks等(J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991))は、ファージライブラリーを使用したマウス及びヒト抗体の分離を記述している。続く刊行物は、鎖シャフリングによる高親和性(nM範囲)のヒト抗体の生成(Marks等, Bio/Technology, 10:779-783[1992])、並びに非常に大きなファージライブラリーを構築するための方策としてコンビナトリアル感染とインビボ組換え(Waterhouse等, Nuc. Acids. Res., 21:2265-2266[1993])を記述している。従って、これらの技術はモノクローナル抗体の分離に対する伝統的なモノクローナル抗体ハイブリドーマ法に対する実行可能な別法である。

40

## 【0037】

この点において、バクテリオファージ(ファージ)ディスプレイは、大きなオリゴペプチドライブラリーを検索して、ポリペプチド標的に特異的に結合する能力のあるこれらライブラリーのメンバーを同定することを可能にするよく知られた技術の一つである。ファージディスプレイは、様々なポリペプチドがバクテリオファージ粒子の表面上のコートタンパク質に融合タンパク質として提示されることによる技術である(Scott, J.K.及びSmit

50

h G. P. (1990) *Science* 249:386)。ファージディスプレイの有用性は、選択的にランダム化されたタンパク質変異体（又はランダムクローン cDNA）の大きなライブラリーを標的分子に高い親和性で結合するこれらの配列について素早く効果的に分類することができる点にある。ファージでのペプチド (Cwirlla, S.E.等 (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6378) 又はタンパク質 (Lowman, H.B.ら (1991) *Biochemistry*, 30:10832; Clackson, T.ら (1991) *Nature*, 352: 624; Marks, J.D.等 (1991), *J. Mol. Biol.*, 222:581; Kang, A.S.等 (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:8363) ライブラリーのディスプレイは、特異的に結合する特性を有するものについて無数のポリペプチド又はオリゴペプチドをスクリーニングするために使用されている (Smith, G.P. (1991) *Current Opin. Biotechnol.*, 2:668)。ランダム突然変異体のファージライブラリーの分類は、多数の変異体 10  
 を構築して増殖させる方法、標的レセプターを用いた親和性精製の方法、及び結合増強の結果を評価する手段を必要とする (米国特許第5 2 2 3 4 0 9号、同第5 4 0 3 4 8 4号、同第5 5 7 1 6 8 9号、及び同第5 6 6 3 1 4 3号を参照)。

#### 【0038】

ほとんどのファージディスプレイ法は繊維状ファージを使用していたが、λファージディスプレイシステム (WO 9 5 / 3 4 6 8 3 ; 米国特許第5 6 2 7 0 2 4号)、T4ファージディスプレイシステム (Ren J.ら *Gene* 215:439 (1998); Zhuら *Cancer Research*, 58(15):3209-3214 (1998); Jiang等 *Infection & Immunity*, 65(11): 4770-4777 (1997); Ren等, *Gene*, 195(2):303-311 (1997); Ren, *Protein Sci.* 5:1833 (1996); Efimov等 *Virus Genes* 10:173(1995))及びT7ファージディスプレイシステム (Smith及びScott *Methods in Enzymology*, 217, 228-257(1993); 米国特許第5 7 6 6 9 0 5号) も知られている。 20

#### 【0039】

現在、基礎的なファージディスプレイ法は多くの改良及び変形が開発されている。これらの改良により、選択された標的分子との結合性など、ペプチドライブラリーやタンパク質ライブラリーから特性、能力などに基づいてスクリーニングする方法が改善された。ファージディスプレイ法のための組み換え反応手段については、WO 9 8 / 1 4 2 7 7 に記載がある。ファージディスプレイライブラリーは、二分子相互作用 (WO 9 8 / 2 0 1 6 9 ; WO 9 8 / 2 0 1 5 9) 及び拘束性ヘリックスペプチドの特性 (WO 9 8 / 2 0 0 3 6) を分析及び制御するために使用されている。WO 9 7 / 3 5 1 9 6 には、リガンドが標的分子に結合しうる第一の溶液、及び親和性リガンドが標的分子に結合しない第二の溶液とファージディスプレイライブラリーを接触させて結合リガンドを選択的に単離する、親和性リガンドの単離方法が記載されている。WO 9 7 / 4 6 2 5 1 は、親和性精製抗体でランダムファージディスプレイライブラリーをバイオパニングし、次いで結合ファージを単離し、続いてマイクロプレートのウェルでマイクロパニングして高親和性結合ファージを単離する方法を記載する。黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) タンパク質Aの親和性タグとしての使用も報告されている (Li等, (1998) *Mol Biotech.*, 9:187)。WO 9 7 / 4 7 3 1 4 は、ファージディスプレイライブラリーでもよいコンビナトリアルライブラリーを用いて酵素特異性を識別するための基質サブトラクションライブラリーの使用を記載している。ファージディスプレイに用いる洗浄剤における使用に適した酵素を選択する方法はWO 9 7 / 0 9 4 4 6 に記載される。特異的に結合するタンパク質を選択する更なる方法は、米国特許第5 4 9 8 5 3 8号、同第5 4 3 2 0 1 8号、及びWO 9 8 / 1 5 8 3 3 に記載されている。ペプチドライブラリーの作製及びこれらのライブラリーのスクリーニングの方法は、米国特許第5 7 2 3 2 8 6号、同第5 4 3 2 0 1 8号、同第5 5 8 0 7 1 7号、同第5 4 2 7 9 0 8号、同第5 4 9 8 5 3 0号、同第5 7 7 0 4 3 4号、同第5 7 3 4 0 1 8号、同第5 6 9 8 4 2 6号、同第5 7 6 3 1 9 2号、及び同第5 7 2 3 3 2 3号に記載される。 30

#### 【0040】

さらに、ヒト抗体ライブラリーを用いて、パニングによりヒト抗体を取得する技術も知られている。例えば、ヒト抗体の可変領域を一本鎖抗体 (scFv) としてファージディスプレイ法によりファージの表面に発現させ、抗原に結合するファージを選択することが 40

できる。選択されたファージの遺伝子を解析すれば、抗原に結合するヒト抗体の可変領域をコードするDNA配列を決定することができる。抗原に結合するscFvのDNA配列が明らかになれば、当該配列を有する適当な発現ベクターを作製し、適当な宿主に導入して発現させることによりヒト抗体を取得することができる。これらの方法は既に周知であり、WO 92/01047、WO 92/20791、WO 93/06213、WO 93/11236、WO 93/19172、WO 95/01438、WO 95/15388を参考に実施することができる。

#### 【0041】

別法として、ファージディスプレイ技術(McCafferty等, Nature 348: 552-553[1990])を使用して、非免疫化ドナーの免疫グロブリン可変(V)ドメイン遺伝子レパートリーから、インビトロでヒト抗体及び抗体断片を産出させることができる。この技術によれば、抗体Vドメイン遺伝子を、フレーム単位で、繊維状バクテリオファージ、例えばM13又はfdのコートタンパク質遺伝子のどちらかでクローニングし、ファージ粒子の表面で機能的抗体断片として提示させる。繊維状粒子がファージゲノムの一本鎖DNAコピーを含むので、抗体の機能特性に基づいた選択に基づいても、結果としてこれらの特性を示す抗体をコードする遺伝子の選択が成される。よって、このファージはB細胞のいくつかの特性を模倣している。ファージディスプレイは多様な形式で行うことができる；例えばJohnson, Kevin S. 及びChiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3: 564-571(1993)を参照。V-遺伝子セグメントのいくつかの供給源を、ファージディスプレイのために使用できる。Clackson等, Nature, 352: 624-628(1991)は、免疫化したマウス脾臓由来のV遺伝子の小さいランダムなコンビナトリアルライブラリーから、多様で多くの抗-オキサゾロン抗体を単離した。非免疫化ヒトドナーのV遺伝子のレパートリーが構成可能であり、多様で多くの抗原(自己抗原を含む)に対する抗体は、Marks等, J. Mol. Biol. 222: 581-597(1991)又はGriffith等, EMBO J. 12: 725-734(1993)に記載の技術にそのまま従うことで単離することができる。また、米国特許第5565332号及び同5573905号を参照のこと。

#### 【0042】

本発明の抗体には、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、scFv、dsFv、Diabody及びsc(Fv)<sub>2</sub>等の、抗体の機能的断片も含まれる。また、これら機能的断片の多量体(例えば、ダイマー、トリマー、テトラマー、ポリマー)も、本発明の抗体に含まれる。

Fabは、IgGをシステイン存在下パパイン消化することにより得られる、L鎖とH鎖可変領域、並びにC<sub>H</sub>1ドメイン及びヒンジ部の一部からなるH鎖フラグメントとから構成される分子量約5万の断片である。本発明では、上記抗体をパパイン消化することにより得ることができる。また、上記抗体のH鎖の一部及びL鎖をコードするDNAを適当なベクターに組み込み、当該ベクターを用いて形質転換した形質転換体よりFabを調製することもできる。

Fab'は、後述のF(ab')<sub>2</sub>のH鎖間のジスルフィド結合を切断することにより得られる分子量が約5万の断片である。本発明では、上記抗体をペプシン消化し、還元剤を用いてジスルフィド結合を切断することにより得られる。また、Fab同様に、Fab'をコードするDNAを用いて遺伝子工学的に調製することもできる。

F(ab')<sub>2</sub>は、IgGをペプシン消化することにより得られる、L鎖とH鎖可変領域、並びにC<sub>H</sub>1ドメイン及びヒンジ部の一部からなるH鎖フラグメントとから構成される断片(Fab')がジスルフィド結合で結合した分子量約10万の断片である。本発明では、上記抗体をペプシン消化することにより得られる。また、Fab同様に、F(ab')<sub>2</sub>をコードするDNAを用いて遺伝子工学的に調製することもできる。

Fvは、抗体を酵素、例えばパパイン、ペプシンで処理し抗体断片を生成させるか、または、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現できる(例えば、Co, M.S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976、Better, M. & Horwitz, A. H. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496、Plueckthun, A. & Skerra, A. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496、Lamoyi, E., Methods in Enzymology (1989) 121, 652-663、Rousseaux, J. et al., Method

s in Enzymology (1989) 121, 663-669、Bird, R. E. et al., TIBTECH (1991) 9, 132-137参照)。

scFvは、H鎖可変領域とL鎖可変領域とからなるFvを、片方の鎖のC末端と他方のN末端とを適当なペプチドリンカーで連結し一本鎖化した抗体断片である。ペプチドリンカーとしては例えば柔軟性の高い(GGGGS)<sub>3</sub>などを用いることができる。例えば、上記抗体のH鎖可変領域及びL鎖可変領域をコードするDNAとペプチドリンカーをコードするDNAを用いてscFv抗体をコードするDNAを構築し、これを適当なベクターに組み込み、当該ベクターを用いて形質転換した形質転換体よりscFvを調製することができる。

dsFvは、H鎖可変領域及びL鎖可変領域の適切な位置にCys残基を導入し、H鎖可変領域とL鎖可変領域とをジスルフィド結合により安定化させたFv断片である。各鎖におけるCys残基の導入位置は分子モデリングにより予測される立体構造に基づき決定することができる。本発明では例えば上記抗体のH鎖可変領域及びL鎖可変領域のアミノ酸配列から立体構造を予測し、かかる予測に基づき変異を導入したH鎖可変領域及びL鎖可変領域をそれぞれコードするDNAを構築し、これを適当なベクターに組み込み、そして当該ベクターを用いて形質転換した形質転換体よりdsFvを調製することができる。

尚、適当なリンカーを用いてscFv抗体、dsFv抗体などを連結させたり、ストレプトアビジンを融合させたりして抗体断片を多量体化することもできる。本発明の抗体(抗体断片を含む)に低分子化合物、タンパク質、標識物質などを融合又は結合させることにより、融合抗体又は標識化抗体を構成することができる。標識物質としては<sup>125</sup>I等の放射性物質、などを用いることができる。

#### 【0043】

Diabodyは、遺伝子融合により構築された二価(bivalent)の抗体断片を指す(Holliger P et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90: 6444-6448 (1993)、EP404,097号、WO93/11161号等)。Diabodyは、2本のポリペプチド鎖から構成されるダイマーであり、通常、ポリペプチド鎖は各々、同じ鎖中でVL及びVHが、互いに結合できない位に短い、例えば、5残基程度のリンカーにより結合されている。同一ポリペプチド鎖上にコードされるVLとVHとは、その間のリンカーが短いため単鎖可変領域フラグメントを形成することが出来ず二量体を形成するため、Diabodyは2つの抗原結合部位を有することとなる。Diabodyは、抗体を酵素、例えば、パパイン、ペプシンなどで処理し、抗体断片を生成させるか、又はこれら抗体断片をコードするDNAを構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させればよい(例えば、Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976; Better, M. and Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496; Pluckhuth, A. and Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663; Rousseaux, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669; Bird, R. E. and Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137参照)。

sc(Fv)<sub>2</sub>は、2つのVH及び2つのVLをリンカー等で結合して一本鎖にした低分子化抗体である(Hudson et al., J Immunol. Methods 1999; 231: 177-189)。sc(Fv)<sub>2</sub>は、例えば、scFvをリンカーで結ぶことによって作製できる。

#### 【0044】

本発明の抗体には、本発明の抗体と他のペプチド又はタンパク質とが融合した融合タンパク質も含まれる。融合タンパク質を作製する方法は、本発明の抗体をコードするポリヌクレオチドと他のペプチド又はポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをフレームが一致するように連結してこれを発現ベクターに導入し、宿主で発現させればよく、当業者に公知の手法を用いることができる。本発明の抗体との融合に付される他のペプチド又はポリペプチドとしては、例えば、FLAG (Hopp, T. P. et al., BioTechnology (1988) 6, 1204-1210)、6個のHis(ヒスチジン)残基からなる6×His、10×His、インフルエンザ凝集素(HA)、ヒトc-mycの断片、VSV-GPの断片、p18HIVの断片、T7-tag、HSV-tag、E-tag、SV40T抗原の断片、lck tag、α-tubulinの断片、B-tag、Protein Cの断片等の公知のペプチドを使用することができる。また、本発明の抗体との融合に付される他のポリペプ

チドとしては、例えば、GST (グルタチオン-S-トランスフェラーゼ)、HA (インフルエンザ凝集素)、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、MBP (マルトース結合タンパク質) 等が挙げられる。

#### 【0045】

本発明の抗体には、標識物質が結合した抗体も含まれる。

標識物質としては、酵素発光 (ルシフェラーゼ) による発光、発光低分子を利用するものと、蛍光タンパクや蛍光低分子を用いるもの、放射性核種等が挙げられるがこれらには限定されない。放射性核種としては $^{51}\text{Cr}$ 、 $^{59}\text{Fe}$ 、 $^{57}\text{Co}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{75}\text{Se}$ 、 $^{81\text{m}}\text{Kr}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{133}\text{Xe}$ 、 $^{201}\text{Tl}$  などの $\gamma$ 線放出核種や、 $^{11}\text{C}$ 、 $^{13}\text{N}$ 、 $^{15}\text{O}$ 、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{35\text{m}}\text{Cl}$ 、 $^{76}\text{Br}$ 、 $^{45}\text{Ti}$ 、 $^{48}\text{V}$ 、 $^{60}\text{Cu}$ 、 $^{61}\text{Cu}$ 、 $^{62}\text{Cu}$ 、 $^{66}\text{Ga}$ 、 $^{89}\text{Zr}$ 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{124}\text{I}$ 、 $^{123}\text{I}$  などの陽電子放出核種などが挙げられるがこれらには限定されない。なお当業者には自明であるが"m"とは核異性体を示す。

蛍光標識や発光標識としては酵素発光 (ルシフェラーゼ) による発光を利用するものと、蛍光 (GFP、DsRed、クサビラオレンジ等の蛍光タンパク質やFITCやCy5.5、Alexa Fluor 750などの蛍光性低分子) を用いるものとのが使用できる。

酵素発光 (ルシフェラーゼ) による発光の場合は基質投与が別途必要である。

特に、動物本来の自家蛍光による影響を軽減したものが好ましく、さらには皮膚透過性の高いシグナルを発する標識が好ましい。

#### 【0046】

また本発明は、本発明の抗体をコードするDNA、該DNAが挿入されたベクター、及び該ベクターが導入された形質転換細胞を提供する。ベクターの例としては、M13系ベクター、pUC系ベクター、pBR322、pBluescript、pCR-Scriptなどが挙げられる。また、cDNAのサブクローニング、切り出しを目的とした場合、上記ベクターの他に、例えば、pGEM-T、pDIRECT、pT7などが挙げられる。本発明の抗体をコードするDNA、該DNAが挿入されたベクター、及び該ベクターが導入された形質転換細胞は公知の技術を用いて作成される。

#### 【0047】

本発明の石灰化小球に反応性を有し、動脈硬化巣 (特に動脈硬化石灰化病変部位) に結合活性を有する抗体をコードするDNAとしては、以下のDNAが挙げられる。

- (a) 配列番号：5 に記載の塩基配列を有する、重鎖をコードするDNA
- (b) 配列番号：10 に記載の塩基配列を有する、軽鎖をコードするDNA
- (c) 配列番号：15 に記載の塩基配列を有する、重鎖をコードするDNA
- (d) 配列番号：20 に記載の塩基配列を有する、軽鎖をコードするDNA
- (e) 配列番号：25 に記載の塩基配列を有する、重鎖をコードするDNA
- (f) 配列番号：30 に記載の塩基配列を有する、軽鎖をコードするDNA
- (g) 配列番号：35 に記載の塩基配列を有する、重鎖をコードするDNA
- (h) 配列番号：40 に記載の塩基配列を有する、軽鎖をコードするDNA
- (i) 配列番号：45 に記載の塩基配列を有する、重鎖をコードするDNA
- (j) 配列番号：50 に記載の塩基配列を有する、軽鎖をコードするDNA

#### 【0048】

発現ベクターとしては、例えば、大腸菌での発現を目的とした場合は、ベクターが大腸菌で増幅されるような上記特徴を持つほかに、宿主をJM109、DH5 $\alpha$ 、HB101、XL1-Blueなどの大腸菌とした場合においては、大腸菌で効率よく発現できるようなプロモーター、例えば、lacZプロモーター (Wardら, Nature (1989) 341, 544-546; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427)、araBプロモーター (Betterら, Science (1988) 240, 1041-1043)、またはT7プロモーターなどを持っていることが不可欠である。このようなベクターとしては、上記ベクターの他にpGEX-5X-1 (ファルマシア社製)、「QIAexpress system」(キアゲン社製)、pEGFP、またはpET (この場合、宿主はT7 RNAポリメラーゼを発現しているBL21が好ましい) などが挙げられる。

#### 【0049】

また、ベクターには、ポリペプチド分泌のためのシグナル配列が含まれていてもよい。蛋白質分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、peTBシグナル配列 (Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (1987) 169, 4379) を使用すればよい。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば塩化カルシウム法、エレクトロポレーション法を用いて行うことができる。

#### 【0050】

大腸菌以外にも、例えば、哺乳動物由来の発現ベクター (例えば、pcDNA3 (インビトロゲン社製) や、pEGF-BOS (Nucleic Acids. Res.1990, 18(17),p5322)、pEF、pCDM8)、昆虫細胞由来の発現ベクター (例えば「Bac-to-BAC baculovirus expression system」 (ギブコBRL社製)、pBacPAK8)、植物由来の発現ベクター (例えばpMH1、pMH2)、動物ウイルス由来の発現ベクター (例えば、pHSV、pMV、pAdexLcw)、レトロウイルス由来の発現ベクター (例えば、pZIPneo)、酵母由来の発現ベクター (例えば、「Pichia Expression Kit」 (インビトロゲン社製)、pMV11、SP-Q01)、枯草菌由来の発現ベクター (例えば、pPL608、pKTH50) が挙げられる。

#### 【0051】

CHO細胞、COS細胞、NIH3T3細胞等の動物細胞での発現を目的とした場合には、細胞内で発現させるために必要なプロモーター、例えばSV40プロモーター (Mulliganら, Nature (1979) 277, 108)、MMTV-LTRプロモーター、EF1 $\alpha$ プロモーター (Mizushimaら, Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322)、CMVプロモーターなどを持っていることが不可欠であり、細胞への形質転換を選抜するための遺伝子 (例えば、薬剤 (ネオマイシン、G418など) により判別できるような薬剤耐性遺伝子) を有すればさらに好ましい。このような特性を有するベクターとしては、例えば、pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV、pOP13などが挙げられる。

#### 【0052】

さらに、遺伝子を安定的に発現させ、かつ、細胞内での遺伝子のコピー数の増幅を目的とする場合には、核酸合成経路を欠損したCHO細胞にそれを相補するDHFR遺伝子を有するベクター (例えば、pCHOIなど) を導入し、メトトレキサート (MTX) により増幅させる方法が挙げられ、また、遺伝子の一過性の発現を目的とする場合には、SV40 T抗原を発現する遺伝子を染色体上に持つCOS細胞を用いてSV40の複製起点を持つベクター (pcDなど) で形質転換する方法が挙げられる。複製開始点としては、また、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、ウシパピローマウイルス (BPV) 等の由来のものを用いることもできる。さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドトランスフェラーゼ (APH) 遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、大腸菌キサンチンゲアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Ecogpt) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (dhfr) 遺伝子等を含むことができる。

#### 【0053】

ベクターが導入される宿主細胞としては特に制限はなく、例えば、大腸菌や種々の動物細胞などを用いることが可能である。宿主細胞は、例えば、本発明の抗体の製造や発現のための産生系として使用することができる。ポリペプチド製造のための産生系は、in vitroおよびin vivoの産生系がある。in vitroの産生系としては、真核細胞を使用する産生系や原核細胞を使用する産生系が挙げられる。

#### 【0054】

真核細胞を使用する場合、例えば、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を宿主に用いることができる。動物細胞としては、哺乳類細胞、例えば、CHO (J. Exp. Med. (1995) 108, 945)、COS、3T3、ミエローマ、BHK (baby hamster kidney)、HeLa、Vero、両生類細胞、例えばアフリカツメガエル卵母細胞 (Valle, et al., Nature (1981) 291, 358-340)、あるいは昆虫細胞、例えば、Sf9、Sf21、Tn5が知られている。本発明においては、CHO-DG44、CHO-DXB11、COS7細胞、BHK細胞が好適に用いられる。動物細胞において、大量発現を目的とする場合には特にCHO細胞が好ましい。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、カチオニックリボソームDOTAP (ペーリングガ

ーマンハイム社製)を用いた方法、エレクトロポレーション法、リポフェクションなどの方法で行うことが可能である。

【0055】

植物細胞としては、例えば、ニコチアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*) 由来の細胞が蛋白質生産系として知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えば、サッカロミセス (*Saccharomyces*) 属、例えば、サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、サッカロミセス・ポンベ (*Saccharomyces pombe*)、糸状菌、例えば、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属、例えば、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) が知られている。

【0056】

原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる産生系がある。細菌細胞としては、大腸菌 (*E. coli*)、例えば、JM109、DH5 $\alpha$ 、HB101等が挙げられ、その他、枯草菌が知られている。本発明のDNAにより形質転換された細胞を *in vitro* で培養し、当業者が通常行う方法によって精製することによって、本発明の抗体を得ることが可能である。

【0057】

また本発明は、本発明の抗体をコードする核酸を含むベクターを有する宿主生物を提供する。本発明の宿主生物は、組換え型抗体の産生に有用である。本発明における宿主生物としては、ヤギなどが挙げられる。例えば、本発明のトランスジェニックヤギの作成は次のようにして行うことが可能である。即ち、抗体遺伝子が乳汁中に固有に産生されるタンパク質 (ヤギ $\beta$ カゼインなど) をコードする遺伝子の内部にインフレームで挿入された融合遺伝子を構築する。抗体遺伝子が挿入された融合遺伝子を含むDNA断片をヤギの胚へ注入すれば、該注入胚が雌のヤギへ導入される。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギ又はその子孫が産生する乳汁から、本発明の抗体を取得することができる。トランスジェニックヤギから産生される本発明の抗体を含む乳汁量を増加させるために、ホルモンをトランスジェニックヤギに適宜使用することも可能である (Ebert, K.M. et al., *Bio/Technology* (1994) 12, 699-702)。

【0058】

本発明は、石灰化小球に反応性を有し、動脈硬化巣 (特に動脈硬化石灰化病変部位) に結合活性を有する抗体を含む、動脈硬化の石灰化部位のイメージング剤を提供する。また、本発明は、本発明の石灰化小球に反応性を有し、動脈硬化巣 (特に動脈硬化石灰化病変部位) に結合活性を有する抗体を含む、動脈硬化の石灰化部位のイメージング方法を提供する。本発明のイメージング剤は、動脈硬化の石灰化部位をイメージングするために哺乳動物に投与される。哺乳動物としては、ヒト、非ヒト哺乳動物 (例えばマウス、ラット、サルなど) が挙げられる。本発明のイメージング剤は、動脈硬化の診断において有用である。本発明のイメージング剤は *in vivo* 用、*in vitro* 用のどちらとしても利用できる。

【0059】

本発明のイメージング剤は、石灰化小球に反応性を有し、動脈硬化巣 (特に動脈硬化石灰化病変部位) に結合活性を有する抗体に、直接、あるいは間接的に追尾できる、イメージング用標識、プローブを結合させたものである。

前記プローブを生体に生体内投与 (例えば静脈内投与) した後、PETやSPECT、CCDカメラなどの画像計測装置を用いて蓄積量や分布を測定することができる。

【0060】

また、近年、透過性線源により、物体を走査し、そのデータをコンピューターを用いて処理することで、物体の内部画像を構成する技術コンピューター断層撮影 (Computed Tomography: 以下、「CT」との記載もComputed Tomographyを意味する) の病状診断、臨床への応用がされている。

そのようなCT技術は、ポジトロン断層法 (PET)や単一光子放射断層撮影 (SPECT)、や核磁気共鳴画像法 (MRI) などの、断面像を得て、物体の (輪切りなどの) 2次元断面画像を得る技術であるが、これらの検査技術は単に断面画像として用いられるだけでなく、コンピューター画像処理技術向上によってその2次元画像を統合し3次元グラフィックスと

10

20

30

40

50

して表示されることも多く、3次元的な病変の位置の特定、診断、手術方針決定等に有力な技術となっている。

例えば、単純CTは、造影剤を使用せずにX線照射等の撮影を行うものであり、組織の浮腫、骨の形態異常、形態など造影剤を用いなくても十分に観察でき、一方、造影CTとは、X線吸収率の高い造影剤等を血管内に注射してから撮影を行うものをいい、血管や血流が豊富な組織の形状を観察することができる。さらに、いわゆる次世代CT、例えば、線源がらせん状に動くヘリカルCT、検出器自体を対軸方向に、分割した、多列検出器CT (MDCT) (マルチスライスCT(MSCT)とも呼ぶ) なども、開発され、それらはいずれも特に制限なく、単独又は併用で発明のイメージング剤の検出に適用可能である。

イメージング用標識プローブ (本発明のイメージング剤) がX線吸収率の高い放射線核種である場合は、検出器としてのCTの単独使用も可能である。 10

【0061】

標識物質としては酵素発光 (ルシフェラーゼ) による発光、発光低分子を利用するものと、蛍光タンパクや蛍光低分子を用いるもの、放射性核種等が挙げられるがこれらには限定されない。放射性核種としては $^{51}\text{Cr}$ 、 $^{59}\text{Fe}$ 、 $^{57}\text{Co}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{75}\text{Se}$ 、 $^{81\text{m}}\text{Kr}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{133}\text{Xe}$ 、 $^{201}\text{Tl}$  などの $\gamma$ 線放出核種や、 $^{11}\text{C}$ 、 $^{13}\text{N}$ 、 $^{15}\text{O}$ 、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{35\text{m}}\text{Cl}$ 、 $^{76}\text{Br}$ 、 $^{45}\text{Ti}$ 、 $^{48}\text{V}$ 、 $^{60}\text{Cu}$ 、 $^{61}\text{Cu}$ 、 $^{62}\text{Cu}$ 、 $^{66}\text{Ga}$ 、 $^{89}\text{Zr}$ 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{124}\text{I}$ 、 $^{123}\text{I}$  などの陽電子放出核種などが挙げられるがこれらには限定されない。なお 20  
 当業者には自明であるが"m"とは核異性体を示す。特に、インジウム-111、テクネチウム-99mまたはヨウ素-131は、平面走査またはシングルフォトン断層撮影 (SPECT) のために特に好ましく使用できる。陽電子放射標識の例えばフッ素-19は、陽電子放射断層法において特に好ましく使用できる。常磁性イオンの例えばガドリニウム (III) またはマンガン (II) は特に好ましく磁気共鳴映像法 (MRI) において使用できる。

【0062】

蛍光標識や酵素 (ルシフェラーゼ) による発光系を利用するものと、蛍光 (GFP、DsRed、クサビラオレンジ等の蛍光タンパク質やFITCやCy5.5、Alexa Fluor 750などの蛍光性低分子) を用いるものとのが使用できる。

酵素発光 (ルシフェラーゼ) による発光の場合は基質投与が別途必要である。 30

特に、動物本来の自家蛍光による影響を軽減したものが好ましく、さらには皮膚透過性の高いシグナルを発する標識が好ましい。

【0063】

イメージング検出器としては磁気共鳴映像法 (MRI) PETやSPECTが用いられるが、特に、蛍光標識プローブの観察において、低侵しゅう性の観点で好ましく測定機器は、CCDカメラである。

それゆえ、CCDカメラで補足可能な波長、例えばおよそ350~900nmの光を、発する標識が好ましい。さらにCCDカメラによる測定動物の体表面における測定値から生体内の光源の強さを測定できる機械が好ましい。蛍光標識の場合、反射蛍光画像、透過蛍光画像のいずれでも良いが、両方の画像を捉えることが好ましい。また、蛍光画像の多方面 (反射、透過を問わず) 重ね合わせ、それに線源情報を統合して処理し、立体画像 (3次元) として捉えることが、3次元的な位置、分布を正確に構成でき、好ましい。こうして得た3次元画像は、さらにCT画像とさらに統合することもできる。統合した3次元CTデータは、3次元仮想空間上でアニメーションとして多方面からその標識された位置を確認することもできる。 40

【0064】

イメージング用標識プローブがX線吸収率の高い放射線核種を結合したものである場合、前述したように イメージング検出器としての、CTの単独でも十分使用可能 (例えばPETやSPECT) で動脈硬化病巣の位置、蓄積量や分布を測定することもできる。

【0065】

一方、前記イメージング用標識プローブを生体に生体内投与（例えば静脈内投与）した後、標識された前記プローブのCT観察、又はCCDとの併用観察も可能である。併用観察の例として、蛍光標識したプローブのCCD像を、単純CT（及び/又は造影CTの像と重ね合わせる）を用いることができる。即ち、単純CTにより骨、肺などの臓器像の抽出（及び/又は造影CTの血管、組織像抽出）を行って得られたCT画像と、心臓など主要な動脈疾患部分のCCDカメラによる蛍光プローブ画像を統合し、その動脈硬化病巣の位置、蓄積量や分布を3次元的な組織、血管との相対的な位置関係、動脈硬化病巣の3次元（局在）イメージをより正確に把握することができる。

#### 【0066】

本発明のイメージング剤は、抗体に加えて医薬的に許容し得る担体を導入し、公知の方法で製剤化することが可能である。例えば、水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、又は懸濁液剤の注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、結合剤などと適宜組み合わせ、一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製剤化することが考えられる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

#### 【0067】

注射のための無菌組成物は注射用蒸留水のようなベヒクルを用いて通常製剤実施に従って処方することができる。

注射用の水溶液としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液、例えばD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール、具体的にはエタノール、ポリアルコール、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、非イオン性界面活性剤、例えばポリソルベート80 (TM)、HCO-50と併用してもよい。

#### 【0068】

油性液としてはゴマ油、大豆油があげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールと併用してもよい。また、緩衝剤、例えばリン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液、無痛化剤、例えば、塩酸プロカイン、安定剤、例えばベンジルアルコール、フェノール、酸化防止剤と配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填させる。

#### 【0069】

投与は好ましくは非経口投与であり、具体的には、注射剤型、経鼻投与剤型、経肺投与剤型、経皮投与型などが挙げられる。注射剤型の例としては、例えば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射などにより全身または局所的に投与することができる。

#### 【0070】

また、患者の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。本発明のイメージング剤の投与量としては、例えば、一回につき体重1kgあたり0.0001mgから1000mgの範囲で選ぶことが可能である。あるいは、例えば、対象あたり0.001から100000mg/bodyの範囲で投与量を選ぶことができるが、これらの数値に必ずしも制限されるものではない。投与量、投与方法は、対象の体重や年齢、症状などにより変動するが、当業者であれば適宜選択することが可能である。

#### 【0071】

また本発明は、本発明の石灰化小球に反応性を有し、動脈硬化巣（特に動脈硬化石灰化病変部位）に結合活性を有する抗体を含む、動脈硬化の石灰化部位のイメージング用キットを提供する。本発明のキットは、対象に投与されることにより、動脈硬化の石灰化部位をイメージングすることを特徴とする。上記キットには、本発明の抗体に加えて、例えば、イメージング剤投与用の注射（点滴）器具、非吸着吸着を抑える補助剤（例えばアルブミン等）等が含まれるが、これらに制限されるものではない。

また、上記キットには、イメージングに用いるための指示書、適当な容器、コントロー

ル試薬等、通常のキットに含まれるものを含んでいてもよい。

【0072】

本発明はまた、石灰化小球に反応性を有し、動脈硬化巣（特に動脈硬化石灰化病変部位）に結合活性を有する抗体の製造方法を提供する。より具体的には、以下の（a）及び（b）の工程を含む、石灰化小球に反応性を有し、動脈硬化巣（特に動脈硬化石灰化病変部位）に結合活性を有する抗体の製造方法を提供する。

（a）石灰化小球または動脈硬化巣を非ヒト動物に免疫する工程

（b）該非ヒト動物より抗体を単離する工程

上記製造方法は、（b）の工程の後さらに、（c）石灰化小球への反応性を指標としてスクリーニングし、特異的に結合する抗体を選択し、単離する工程を含んでもよい。

10

また、（c）の工程の後さらに、（d）石灰化小球培養液に対して該抗体を添加して培養を継続する工程、及び（e）対照の石灰化小球成長と比較して成長を阻害する抗体を選択し、単離する工程を含んでもよい。

各工程は、上述した技術または公知の技術を用いて実施される。

【0073】

免疫原としては、石灰化小球（NLO）の場合は、腎・尿路結石由来の石灰化小球（NLO）であれば、特に動物種に制限はないが、好ましい動物種としてはヒトが挙げられる。免疫原として動脈硬化巣のホモジネートを用いる場合、部位、動物種に特に制限はないが、ヒト腹部大動脈などが使用でき、いずれの免疫原を用いた場合でも、石灰化小球（NLO）に対する反応性を指標に抗体クローンを選択することが望ましい。

20

【0074】

さらに本発明の抗体を用いることにより、石灰化成長を阻害することが可能である。したがって本発明は、本発明の抗体及び上記抗体の製造方法により製造された抗体を含んでなる石灰化成長阻害剤を提供する。本発明において、特に好ましい石灰化成長阻害剤は、CDR1として配列番号：21に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号：22に記載アミノ酸配列、及びCDR3として配列番号：23に記載のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体、または重鎖可変領域として配列番号：24に記載のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体のいずれかの重鎖と、CDR1として配列番号：26に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号：27に記載アミノ酸配列、及びCDR3として配列番号：28に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖を含む抗体、または軽鎖可変領域として配列番号：29に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖を含む抗体のいずれかの軽鎖とを有する抗体、を含む石灰化小球成長阻害剤である。

30

石灰化小球の成長を阻害する抗体は、以下のとおり調製することができる。

前述のとおり、石灰化小球を免疫した動物から石灰化小球に反応性のある抗体を選択する。その後、石灰化小球培養液に対して該抗体を添加して培養を継続し、培養後の石灰化小球成長度合いを観察し、対照（抗体無添加の同じ実験系、石灰化小球に結合しない抗体を添加した同じ実験系、または石灰化小球に結合するが、成長阻害効果がないことがすでに確認されたコントロール抗体を添加した実験系）の石灰化小球成長より成長阻害されていた抗体を選択し、単離する。

石灰化小球の成長は、培養液の濁度の増加または、位相差電顕によるラメラ構造の粒子の大きさ増加、及び/またはラメラ構造の数増加として捕らえることができ、成長阻害されていた抗体とは、即ち、対照（抗体無添加の同じ実験系、石灰化小球に結合しない抗体を添加した同じ実験系、または石灰化小球に結合するが、成長阻害効果がないことがすでに確認されたコントロール抗体を添加した実験系）に対して濁度増加が遅いか、ラメラ構造の大きさ増加が遅い、及び/またはラメラ構造の数が少ないことを指標に判断、選択できる。本発明の抗体により、数々の病態における石灰化成長を伴うことが知られており、その成長を阻害することが有効である。

40

また、本発明は本発明の抗体及び上記抗体の製造方法により製造された抗体を含む動脈硬化治療剤を提供する。例えば、腎臓疾患（尿路結石）、動脈硬化（石灰化病変）等の石灰化成長基点に本抗体が作用することによって、病態の進行を遅らせ、又は停止させるこ

50

とが可能である。

投与方法、薬剤の形態等については、上述のとおりである。

#### 【0075】

さらに本発明は、以下に記載の工程を含む、動脈硬化治療剤の候補化合物のスクリーニング方法を提供する。(a) 本発明の石灰化小球 (NLO) に反応し、動脈硬化巣 (特に硬化石灰化病変部位) に結合活性を有する抗体、及び、候補化合物を動脈硬化疾患モデル非ヒト動物に投与する工程、例えば、本発明の石灰化小球 (NLO) に反応し、動脈硬化巣 (特に硬化石灰化病変部位) に結合活性を有する抗体が投与された動脈硬化疾患モデル非ヒト動物に候補化合物を投与する工程、(b) 該抗体、及び、該候補化合物を投与された動脈硬化疾患モデル非ヒト動物と、該抗体を投与されているが該候補化合物は投与されていない動脈硬化疾患モデル非ヒト動物において、動脈硬化巣をイメージングする工程、(c) 該抗体、及び、該候補化合物を投与された動脈硬化疾患モデル非ヒト動物と、該抗体を投与されているが該候補化合物は投与されていない動脈硬化疾患モデル非ヒト動物において、動脈硬化巣 (例えば、動脈硬化巣の大きさまたは存在部位) を比較する工程、及び (d) 該抗体、及び、該候補化合物を投与された動脈硬化疾患モデル非ヒト動物において、該抗体を投与されているが該候補化合物は投与されていない動脈硬化疾患モデル非ヒト動物と比較して、動脈硬化巣が減少または消失する候補化合物を選択する工程。

各工程は、上述した技術または公知の技術を用いて実施される。

#### 【0076】

本発明のスクリーニング方法において利用することができる候補化合物には、精製蛋白質 (抗体を含む)、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成ペプチドのライブラリー、DNA または RNA ライブラリー (アプタマー、siRNA など機能性核酸を含む)、細胞抽出液、細胞培養上清、及び合成低分子化合物のライブラリー等が挙げられるが、これらに制限されない。

#### 【0077】

本発明のスクリーニング方法において利用することができる疾患モデル非ヒト動物としては、マウス、ハムスター、ラット、ウサギ、ブタ、サル等が挙げられるが、これらに制限されない。

例えば、動脈硬化疾患モデルマウスとしては遺伝子を過剰発現させるトランスジェニックマウスと、ある遺伝子を欠損させるジーンターゲットングによるノックアウトマウス、例えば、動脈硬化モデルとしては悪玉コレステロールとして知られている LDL を形作っているタンパク質 (アポリポタンパク質 E) のアポ E 欠失 (apoE<sup>-/-</sup>)、LDL 受容体欠失 (LDLR<sup>-/-</sup>)、ヒト型アポ B 導入、ドミナント変異アポ E 導入モデルがある。さらには、2 型糖尿病モデルマウス (KKAy)、あるいは、マウスのなかでもっとも動脈硬化になりやすい C57BL6 系統で、この系統では高コレステロール食のみで動脈硬化巣がみられる場合もあり、高コレステロール食等、その餌により作製された、動脈硬化モデルマウスも用いることができる。

ウサギは高コレステロール食により約 2 ヶ月半で動脈硬化巣がみられる場合もあり、さらに LDL 受容体欠損の動脈硬化疾患モデルウサギとしては、WHHLウサギなどが知られている。

ブタでもアポ B の LDL 受容体結合部分のアミノ酸配列異常により、動脈硬化をおこしやすいモデルが知られており、当業者であれば、血栓症・動脈硬化モデル動物作製法 編著 鈴木 宏治 (株式会社 金芳堂) など参照して、動脈硬化モデル動物を作製、本発明に利用できる。

#### 【0078】

本発明のスクリーニング方法によって選択される動脈硬化巣を減少または消失させる化合物は、動脈硬化治療剤の候補化合物となる。即ち、本発明は、本発明のスクリーニング方法によって選択された物質を有効成分として含有する動脈硬化治療剤を提供する。また本発明は、本発明のスクリーニング方法によって選択された化合物の動脈硬化治療剤製造における使用に関する。本発明のスクリーニング法により単離される物質を、治療剤として用

いる場合には、公知の製剤学的製造法により製剤化して用いることができる。例えば、薬理学上許容される担体または媒体（生理食塩水、植物油、懸濁剤、界面活性剤、安定剤など）とともに患者に投与する。投与は、物質の性質に応じて、経皮的、鼻腔内の、経気管支的、筋内の、静脈内、または経口的に行われる。投与量は、患者の年齢、体重、症状、投与方法等により変動するが、当業者であれば適宜適当な投与量を選択することができる。

#### 【0079】

本発明は、以下の工程（a）及び（b）を含む、免疫学的手法に関する。（a）石灰化小球（NLO）に反応し、動脈硬化巣（特に硬化石灰化病変部位）に結合活性を有する抗体と、分離された動脈硬化巣を接触させる工程；及び（b）該動脈硬化巣における石灰化部位及び動脈硬化の存在部位を検出する工程；を含む、免疫学的手法 10

免疫学的手法としては、例えば、免疫組織化学的染色法、ELISA法、ラジオイムノアッセイ、FACS、免疫沈降法、イムノプロットティング等が挙げられる。例えば、上記免疫学的手法のうち免疫組織化学的染色法によって、動脈硬化巣における石灰化部位及び動脈硬化の存在部位を検出する手順は、一般に後述の手順(1)～(9)で実施される。

#### 【0080】

本発明は、本発明の抗体及び酸化変性LDL(酸化LDL)と $\beta_2$ -グリコプロテインIの複合体（酸化LDL/ $\beta_2$ GPI複合体）に結合する抗体を含有する、動脈硬化巣における石灰化部位及び動脈硬化の存在部位を免疫学的手法により検出するために用いられるキットに関する。すなわち、本発明の抗体をはじめとして、標識の検出に必要な基質、陽性対照や陰性対照、あるいは試料の希釈や洗浄に用いる緩衝液等を組み合わせてキットとすることができる。本発明のキットはin vivo用、in vitro用のどちらとしても利用できる。 20

#### 【0081】

酸化LDL/ $\beta_2$ GPI複合体に結合する抗体とは、動脈硬化巣で形成される、酸化LDLと血漿糖タンパク質である $\beta_2$ GPIとの複合体に結合する抗体を意味する。このような抗体としては、具体的には以下の抗体が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

(a) CDR1として配列番号：54に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号：55に記載アミノ酸配列、及びCDR3として配列番号：56に記載のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体、

(b) 重鎖可変領域として配列番号：53に記載のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体 30

(c) CDR1として配列番号：59に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号：60に記載アミノ酸配列、及びCDR3として配列番号：61に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖を含む抗体、

(d) 軽鎖可変領域として配列番号：58に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖を含む抗体

(e) 上記(a)または(b)に記載の重鎖、および、上記(c)または(d)に記載の軽鎖の対を有する抗体、

(f) 重鎖可変領域として配列番号：96に記載のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体 40

(g) 配列番号：98に記載のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体、

(h) 軽鎖可変領域として配列番号：104に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖を含む抗体、

(i) 配列番号：106に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖を含む抗体、

(j) 上記(f)または(g)に記載の重鎖、および、上記(h)または(i)に記載の軽鎖の対を有する抗体。

また、酸化LDL/ $\beta_2$ GPI複合体に結合する抗体をコードするDNAとしては、以下のDNAが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

(a) 配列番号：57に記載の塩基配列を有する、重鎖をコードするDNA

(b) 配列番号：62に記載の塩基配列を有する、軽鎖をコードするDNA 50

(c) CDR1として配列番号：54に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号：55に記載アミノ酸配列、及びCDR3として配列番号：56に記載のアミノ酸配列を有する重鎖をコードするDNA

(d) CDR1として配列番号：59に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号：60に記載アミノ酸配列、及びCDR3として配列番号：61に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖をコードするDNA

(e) 配列番号：97に記載の塩基配列を有する、重鎖をコードするDNA

(f) 配列番号：105に記載の塩基配列を有する、軽鎖をコードするDNA

#### 【0082】

免疫学的手法では、本発明の抗体及び酸化LDL/ $\beta_2$ GPI複合体に結合する抗体の結合性（結合量）を指標として動脈硬化巣における石灰化部位及び動脈硬化の存在部位が検出される。免疫学的検出法によれば迅速で感度のよい検出が可能となる。また、操作も簡便である。

免疫組織化学的染色法では通常、まず被検病理組織に本発明の抗体を接触させるステップを実施し、その後、本発明の抗体及び酸化LDL/ $\beta_2$ GPI複合体に結合する抗体の結合量を調べる。具体的には、以下に示す免疫組織化学的染色法に従って本発明の方法を実施することができる。

#### 【0083】

生体組織の免疫組織化学的染色は一般に以下の手順(1)～(9)で実施される。尚、生体組織の免疫組織化学的染色法については様々な文献及び成書を参照することができる（例えば、「酵素抗体法、改訂第3版」、渡辺慶一、中根一穂編集、学際企画）。

##### (1)固定・パラフィン包埋

外科的に生体より採取した組織をホルマリンやパラホルムアルデヒド、無水エチルアルコール等によって固定する。その後パラフィン包埋する。一般にアルコールで脱水した後キシレンで処理し、最後にパラフィンで包埋する。パラフィンで包埋された標本を所望の厚さ（例えば3～5 $\mu$ m厚）に薄切し、スライドガラス上に伸展させる。尚、パラフィン包埋標本に代えてアルコール固定標本、乾燥封入した標本、凍結標本などを用いる場合もある。

##### (2)脱パラフィン

一般にキシレン、アルコール、及び精製水で順に処理する。

##### (3)前処理（抗原賦活）

必要に応じて抗原賦活のために酵素処理、加熱処理及び／又は加圧処理等を行う。

##### (4)内因性ペルオキシダーゼ除去

染色の際の標識物質としてペルオキシダーゼを使用する場合、過酸化水素水で処理して内因性ペルオキシダーゼ活性を除去しておく。

##### (5)非特異的反応阻害

切片をウシ血清アルブミン溶液（例えば1%溶液）で数分から数十分程度処理して非特異的反応を阻害する。尚、ウシ血清アルブミンを含有させた抗体溶液を使用して次の一次抗体反応を行うこととし、この工程を省略してもよい。

##### (6)一次抗体反応

適当な濃度に希釈した抗体をスライドガラス上の切片に滴下し、その後数十分～数時間反応させる。反応終了後、リン酸緩衝液など適当な緩衝液で洗浄する。

##### (7)標識試薬の添加

標識物質としてペルオキシダーゼが頻用される。ペルオキシダーゼを結合させた2次抗体をスライドガラス上の切片に滴下し、その後数十分～数時間反応させる。反応終了後、リン酸緩衝液など適当な緩衝液で洗浄する。

##### (8)発色反応

トリス緩衝液にDAB（3,3'-diaminobenzidine）を溶解する。続いて過酸化水素水を添加する。このようにして調製した発色用溶液を数分間（例えば5分間）切片に浸透させ、発色させる。発色後、切片を水道水で十分に洗浄し、DABを除去する。

## (9)核染色

マイヤーのヘマトキシリンを数秒～数十秒反応させて核染色を行う。流水で洗浄し色出しする（通常、数分間）。

## (10)脱水、透徹、封入

アルコールで脱水した後、キシレンで透徹処理し、最後に合成樹脂やグリセリン、ゴムシロップなどで封入する。

## 【0084】

本発明の抗体及び酸化LDL/ $\beta_2$ GPI複合体に結合する抗体として標識化抗体を使用すれば、標識量を指標に結合抗体量を直接検出することが可能である。従って、より簡易な方法となる。その反面、標識物質を結合させた本発明の抗体及び酸化LDL/ $\beta_2$ GPI複合体に結合する抗体を用意する必要があることに加えて、検出感度が一般に低くなるという問題点がある。そこで、標識物質を結合させた二次抗体を利用する方法、二次抗体と標識物質を結合させたポリマーを利用する方法など、間接的検出方法を利用することが好ましい。ここでの二次抗体とは、本発明の抗体及び酸化LDL/ $\beta_2$ GPI複合体に結合する抗体に特異的結合性を有する抗体であって例えばウサギ抗体として本発明の抗体及び酸化LDL/ $\beta_2$ GPI複合体に結合する抗体を調製した場合には抗ウサギIgG抗体を使用できる。ウサギやヤギ、マウスなど様々な種の抗体に対して使用可能な標識二次抗体が市販されており（例えばフナコシ株式会社やコスモ・バイオ株式会社など）、本発明の抗体及び酸化LDL/ $\beta_2$ GPI複合体に結合する抗体に応じて適切なものを適宜選択して使用することができる。

10

## 【0085】

標識物質には、ペルオキシダーゼ、 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ、マイクロペルオキシダーゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、ローダミンイソチオシアネート（RITC）、アルカリホスファターゼ、ビオチン、及び放射性物質の中から任意に選択されるものが好適に用いられる。特に、ビオチンを標識物質として用いてアビジンペルオキシダーゼを反応させる方法によれば高感度の検出が可能である。

20

## 【0086】

本発明は、以下の工程（a）～（c）を含む、動脈硬化病態の検出方法に関する。（a）石灰化小球（NLO）に反応し、動脈硬化巣（特に硬化石灰化病変部位）に結合活性を有する抗体と、分離された動脈硬化巣を接触させる工程；（b）該動脈硬化巣における石灰化部位及び動脈硬化の粥腫またはそれぞれの初期病片の存在部位を検出する工程；及び；（c）動脈硬化巣が、動脈硬化巣（特に硬化石灰化病変部位）に結合活性を有する抗体で検出されたか、又は酸化LDL/ $\beta_2$ GPI複合体に結合する抗体で検出されたかを判定する工程を含む、検出方法。

30

本発明の抗体及び酸化LDL/ $\beta_2$ GPI複合体に結合する抗体にそれぞれ判別可能な標識（2種の判別可能な蛍光波長を呈する標識及びそれぞれ対応する蛍光フィルター等）を用いて、同一組織切片に関して2重染色が可能である。後述の実施例に示すとおり、2重染色によって、それぞれ認識される微細な部位、構造が異なり、病変として、本発明の抗体で認識される部位には石灰化病変が存在し、酸化LDL/ $\beta_2$ GPI複合体に結合する抗体で認識される部位には異常脂質の構造が存在すること判定でき、病変の判定、診断に有効である。

40

## 【0087】

なお、本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

## 【実施例】

## 【0088】

以下、本発明を実施例によって詳細に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例に記載された態様に限定されるものではない。

## 【0089】

## [実施例1]

石灰化小球の調製

50

文献（非特許文献1：Nanobacteria: an alternative mechanism for pathogenic intracellular and extracellular calcification and stone formation. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Jul 7;95(14):8274-9.）に準じ、外科的に摘出したヒト尿路結石由来の結石を、1 N HClでまず可溶化した。その後、中和、滅菌濾過の後、10% FCSを含むDMEM培地中で3週間培養（インキュベート）し、培養液を、10,000 RPM x 30min遠心し石灰化小球(NLO)を回収した。

または、Dr.Neva Ciftcioglu (NASA,USA)より分与されたNanobacterium (NNb)株のインキュベーションをDr.Ciftciogluの指示および非特許文献1に準じて、 $\gamma$ 線照射した10% FBSを含むDMEMで5% CO<sub>2</sub>, 37℃の条件下で培養を開始し、位相差顕微鏡下でモニターしながらサブカルチャーを続け、継体培養することができた。NNb由来のNLOの回収は20℃、9,000rpm, 30分の遠心で可能である。

さらには、Pst19株は、パラグアイで50才男性から外科的に摘出した巨大尿路結石からその一部を破碎し、乳鉢中で少量の1 N HClを加えて乳剤とし、低速遠心（3,000rpm, 5分）後、得られた上清を1 N NaOHで中和し、孔径0.45 $\mu$ mのフィルターでろ過、その1mlを、非特許文献1に準じ、 $\gamma$ 線照射した10% FBSを含むDMEM 5mlに加え、インキュベーションした。位相差顕微鏡下にNNb同様の微少粒子がインキュベーション開始3週後に認められたので、サブカルチャーを実施し継体培養することができた。Pst 19由来のNLOの回収はNNb同様、20℃、9,000rpm, 30分の遠心で可能である。

更に、石灰化小球 (Gibco Hap) は、以下の方法で得ることも可能である。株化培養細胞の培養に用いていた熱非働化Gibco FBS 200mlを4℃、10,000rpm, 60分遠心して得られた少量の沈澱を10%  $\gamma$ 線照射FBSを含むDMEM 5mlに回収、30秒間超音波処理して沈澱を分散後、5% CO<sub>2</sub>, 37℃にてインキュベーションを開始した。6ヶ月14日後に位相差顕微鏡下で微少粒子の出現を認めたのでサブカルチャーを実施し、継体培養することができた。NLO回収はNNb, Pst 19同様の遠心操作である。

【0090】

[実施例2] 抗体取得

モノクローナル抗体の作製

石灰化小球 (NLO) あるいはヒト腹部大動脈の動脈硬化巣のホモジネートを、フロインドアジュバントを用いて数回BALB/cマウス皮下に免疫し、得られた脾臓細胞をポリエチレングリコール法にてミエローマ細胞株P3U1と細胞融合した。IgM抗石灰化抗体ELISA法およびIgM抗酸化LDL抗体ELISA法による培養上清中の抗体価を指標にスクリーニングし、特異的な抗体産生ハイブリドーマを限界希釈法でクローニングした。

IgM抗石灰化小球抗体ELISA

irradiated FCS (10%)含有Dulbecco's modified MEM (DMEM)中、37℃、5% CO<sub>2</sub>下で増やしたNLOをDMEMで洗浄した。0.20 $\mu$ m(650nm)のNLOを80 $\mu$ l/wellずつ96-well culture plate (グライナー社)に捲き、37℃で1日インキュベートした後、0.4% パラホルムアルデヒド (PFA; in PBS)にて更に一晚インキュベートした。PBSで3回洗浄の後、0.5% BSA含有PBSにてブロッキング (室温、1時間)し、被検検体(適宜希釈した培養上清 in 0.1% BSA-PBS)を室温にて1時間反応させた。0.05%-Tween 20含有PBS (PBS-Tween)にて3回洗浄の後、HRP標識抗マウスIgM抗体を室温で1時間反応させた。PBS-Tweenにて3回洗浄の後、orthophenylenediamine (OPD) 0.4 mg/ml in 0.1 M citrate buffer (pH3.0), 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を10分間反応させた後、2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を同容量加え反応を停止し、吸光度(490 nm)を測定した(図1)。図1のデータはハイブリドーマ樹立直後の培養上清を測定したものであり、実際の抗体のアフィニティーを反映するものではない。

【0091】

[実施例3] 抗体特性解析

硫酸銅による酸化変性LDL (酸化LDL)

600 $\mu$ gのヒトLDL (Organon Teknika Corp, Durham, NC) を、5 $\mu$ MCuSO<sub>4</sub>を含むPBS (2ml)中で37℃、12時間酸化処理した。1mMのEDTAを添加することによって酸化を停止させた。

。

### 抗酸化LDL抗体ELISA

上記、硫酸銅で酸化変性させたヒトLDL(4 $\mu$ g/ml)、50 $\mu$ lを96-wellmicrotiter plate (Immulon-2) に入れ、4 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートした。PBS-Tweenで洗浄後、0.5% BSA-PBSでブロッキングした。被検検体(適宜希釈した培養上清 in 0.1% BSA-PBS)を室温にて1時間反応させた。PBS-Tweenにて3回洗浄の後、HRP標識抗マウスIgM抗体を室温で1時間反応させた。PBS-Tweenにて3回洗浄の後、orthophenylenediamine (OPD) 0.4 mg/ml in 0.1 M citrate buffer (pH.0), 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を10分間反応させた後、2NH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を同容量加え反応を停止し、吸光度(490nm)を測定した(図2)。図2は、樹立した5クローンのハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体のNLOおよび酸化LDLへの反応性を示したグラフである。CL15、CL19、CL21が硫酸銅による酸化変性LDL(酸化LDL)に結合活性を有していた。すなわち、これらの抗体は石灰化小球(NLO)に反応し、かつ硫酸銅による酸化変性LDL(酸化LDL)に結合活性を有する抗体であった。一方、CL48、56は石灰化小球(NLO)に反応するが、硫酸銅による酸化変性LDL(酸化LDL)には結合しなかった。

### 抗脂質抗体ELISA

50 $\mu$ g/mlにエタノールで希釈したホスファチジルセリン(PS;ウシ脳由来)、カルジオリピン(CL;ウシ心臓由来)、ジオレオイルホスファチジルコリン(PC)、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(PE)、ジオレオイルホスファチジルセリン(PS)、7- $\alpha$ -ケトコレステリル-9-カルボキシノナノエート(oxLig-1) 50 $\mu$ lを96-wellmicrotiter plate (Immulon-1) に入れ、風乾した後、0.5% BSA-PBSでブロッキングした。被検検体(適宜希釈した培養上清 in 0.1% BSA-PBS)を室温にて1時間反応させた。0.05%-Tween 20含有PBS (PBS-Tween)にて3回洗浄の後、HRP標識抗マウスIgM抗体を室温で1時間反応させた。PBS-Tweenにて3回洗浄の後、orthophenylenediamine (OPD) 0.4 mg/ml in 0.1 M citrate buffer (pH.0), 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を10分間反応させた後、2 NH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を同容量加え反応を停止し、吸光度(490nm)を測定した(図3、4)。ELISAでは、CL15および19はPS、CL、およびoxLig-1に反応性を示す。CL21の認識特性としては、CLおよびoxLig-1に反応し、CL15、CL19よりは結合反応性が低いものの、PSにも反応した。CL48、56は石灰化小球に反応するが今回用いた全ての脂質に反応性を示さなかった(図3)。

PSに強く反応する抗体はCL15および19であり、CL21はそれよりは反応性が弱いものの結合するものと考えられる。また、CLには、CL15、19、21が反応性を示した。CL15、19、21がoxLig-1に反応した(図4)。

なお、後述の実施例で示すように、これらの抗体は石灰化小球に結合し、かつ、動脈硬化病変に結合する抗体であった。

【0092】

[実施例4] 抗体組織染色

### 免疫染色

抗体の動脈硬化巣免疫組織染色を検討した。

apoE<sup>-/-</sup>マウスおよびLDLR<sup>-/-</sup>マウス(Jackson Labより入手し、岡山大学内動物実験施設にて系統維持)を8週齢までは、普通飼料で飼育し(オリエンタル酵母MMF)し、それ以降に高脂肪食(コレステロール1%、コール酸1%、無塩バター15%を普通飼料に配合)を4-6ヶ月負荷すると、胸部あるいは腹部大動脈に動脈硬化巣(プラーク)が現れ、肥厚、粥腫が出現する。そこで、8ヶ月齢のこれらマウスを屠殺し、特に今回は、胸部大動脈、大動脈の起始部、および大動脈弁の凍結切片を作製し、標本として観察した。

蛍光免疫染色抗体法のためには、凍結切片を調製後、パラホルムアルデヒド固定し実験に供した。

### モノクローナル抗体のCy5.5標識

0.1M炭酸緩衝液(pH9.3)に対し、4 $^{\circ}$ Cで一晩透析した各種モノクローナル抗体(1mg/ml)をFluorolink Cy5.5 monofunctional dye(1 tube)に入れ、室温で30分間反応させ標識した。反応後、SephadexG-25カラムにてCy5.5標識抗体を得た。

### 凍結切片を用いた免疫蛍光染色

1%パラホルムアルデヒドで5分間固定した切片に各種モノクローナル抗体を4 $^{\circ}$ Cで一晩反

応させた。洗浄後、FITC標識抗マウスIgGあるいはIgM抗体(2次抗体)を室温で1時間反応させた。DAPIおよびRhodaminePhalloidin染色は、この2次抗体の反応時に添加した。その後、蛍光顕微鏡にて観察、撮影した。

図5に示すとおり、CL15~CL56抗体を用いる場合大動脈弁周囲(筋層に近い部位)が特異的に染まり、3H3抗体で染色可能なマクロファージの集簇する粥腫の部位と異なる。但し、抗石灰化小球抗体の種類により微妙な染色パターンの違いが見られる。

【0093】

[実施例5]抗体免疫電顕

石灰化小球に対するモノクローナル抗体による免疫電顕(対象サンプルは培養した石灰化小球)を示す写真である。走査電顕(Hitachi S900); 2次電子像に反射電子像を統括し、金コロイドを黄点でマークしたものである(図6)。 10

図6は、CL15抗体およびCL21抗体が石灰化小球(NLO)に反応することを示している。特にCL21は石灰化小球に共在する脂質膜様構造(ラメラ)に結合している。

【0094】

[実施例6] CL21抗体による石灰化成長の阻害活性

これまでの予備実験で $\gamma$ 線照射した10% DMEMを加えたPBS(-Mg)[マグネシウムを除き、カルシウムを加えたphosphate buffer saline]でインキュベートしたNNbやPst 19はいずれも効率よくラメラ(脂質膜様構造)を形成することが判明している。この結果に基づいて、 $\gamma$ 線照射した10% DMEM(FBS無添加)に最終濃度250 $\mu$ g/ml(最初の1週間は50 $\mu$ g/ml,次いで200 $\mu$ g/ml)を添加しインキュベートし、1週間5%CO<sub>2</sub>,37℃の条件下で培養)のCL21抗体を加えた培地中でラメラ形成におよぼす影響を高分解能走査電子顕微鏡(SEM)で検討したところ顕著にラメラの形成が阻止(、または遅延)されることが判明した(図17)。 20

FBSの $\gamma$ 線照射の石灰化小球に対する影響を検討するため、同一ロットの $\gamma$ 線照射FBSと非照射FBSを各々10%含むDMEMで脱脂Pst19(長期incubateしたPst19をFolch法で脱脂)をインキュベートして両者のOD650値を比較すると同時に、OD650値測定時にSEM試料を作製した。その結果、 $\gamma$ 線照射したFBSを添加した場合のOD値は非照射FBSを添加したその比倍著しく増大した。

【0095】

[実施例7]

Ligand blot: シリカゲルプレートを用いる薄層クロマトグラフィー

薄層シリカゲルプレートに各種脂質(PS、CLなど)をスポットしクロロホルム/メタノール/アンモニア/水系の展開溶媒で展開する。乾燥後、BSAおよびpolyvinylpyrrolidone含有のPBSでブロッキングする。洗浄後、モノクローナル抗体、およびHRP標識抗マウスIgM抗体を順次反応させ、過酸化水素水および4-methoxy-1-naphtolを加えて発色させる。その結果、CL15およびCL19のホスファチジルセリン(ウシ脳由来)に対する強い反応性が認められた(図は示さず)。

本発明者らは、尿路結石等に由来する石灰化小球(NLO)あるいは頸動脈由来の動脈硬化巣(プラーク)をBALB/cマウスに免疫した後、細胞融合により石灰化小球に特異的に反応するモノクローナル抗体産生株を樹立した。表1に、石灰化小球に特異的なモノクローナル抗体を示す(表1)。 40

【0096】

【表1】

## 石灰化小球に特異的なモノクローナル抗体

クローン名免疫原サブクラス			特異性					
ELISA	Ligand		石灰化小球	酸化LDL	PS	CL	oxLig-1	blot
CL15	石灰化小球	$\mu, \kappa$	+++	+++	++	++	+++	PS
CL19	石灰化小球	$\mu, \kappa$	+++	++	++	+	+++	PS
CL21	石灰化小球	$\mu, \kappa$	+++	+	+	+	+++	PS
CL48	ブラーク	$\mu, \kappa$	+	-	-	-	-	
CL56	ブラーク	$\mu, \kappa$	+	-	-	-	-	

10

CL15, 19, 21は石灰化小球NLOを免疫したマウスから樹立したモノクローナル抗体、CL48および56は、ヒト腹部大動脈の動脈硬化巣のホモジネートを免疫したマウスから樹立したモノクローナル抗体で、何れも石灰化小球 (NLO) に特異的な抗体である。これら5種類の抗体の全てがIgMで、各種脂質に対する反応性は本表に示すとおりである。PS:ホスファチジルセリン、CL:カルジオリピン、oxLig-1: 7-ketocholesterol-9-carboxynonanoate。また、Ligand blot (すなわち、シリカゲルプレートを用いる薄層クロマトグラフィーで各種脂質を展開した後、そのプレート上でELISAを行い抗体の反応性を試験する方法) で、CL15、CL19およびCL21がPSに反応することを示している。

20

## 【0097】

## [実施例8]抗石灰化抗体の塩基配列解析

抗石灰化抗体について、H鎖L鎖V領域の塩基配列解析を行った。

解析を行ったクローンはCL15-203 (略称 CL15)、CL19-107 (略称 CL19)、CL21-35 (略称 CL21)、CL48-139 (略称 CL48)、CL56-369 (略称 CL56) の5種類のハイブリドーマである。ハイブリドーマから分泌された抗体を免疫学的に検証した結果、いずれも抗体のクラスはIgM、 $\kappa$ という結果になった。そのため、Kabatのデータベース (Sequence s of proteins of immunological interest, 5th edition, 1991) でmouse IgMのH鎖CH4領域 (分泌型) と $\kappa$ 鎖C領域の配列を調べ、それぞれの末端部分と相同な以下のプライマーを作製した。

30

(1) Mouse IgM HC priR: 5'-TCAATAGCAGGTGCCGCTGTGTGACAGAC-3' (配列番号: 51)

(2) Mouse Ig KC priR: 5'-TCAACACTCATTCTGTGGAAGCTCTTGACAATGGGTG-3' (配列番号: 52)

GeneRacer Kit (Invitrogen) を使用し、各ハイブリドーマtotal RNAからRT-PCRによって目的とする抗体遺伝子のcDNAを増幅した。H鎖の増幅はkit付属のGeneRacer 5'primerと(1)のプライマーを使用し、L鎖の増幅にはGeneRacer 5'primerと(2)のプライマーを使用した。

手順としては、上記kitを用い、total RNAに含まれる全長のmRNA選択的に、GeneRacer 5'primerの鋳型となる配列を持ったRNA oligoをligationする。続いてGeneRacer 5'primerと(1)もしくは(2)のプライマーを用いてRT-PCRを行うことで、各プライマーに挟まれた領域の遺伝子を増幅することである。

40

得られたPCR産物には目的とする抗体遺伝子をコードするDNAと以外のものも含まれているため、アガロースゲル電気泳動によってDNAを分離し、抗体遺伝子のサイズに相当するバンドを切り出し、DNAを抽出、Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (Invitrogen) を用いてクローニングし、シーケンスした。すなわち、各ハイブリドーマ由来から得られた多数のクローンからH鎖L鎖それぞれ24クローンをピックアップし、CEQ8800 (BECKMAN COULTER) でシーケエンシングを行った。得られたシーケエンシングはNCBIのサイトの、IgBLASTの機能を使用し、マウス抗体の配列であることを確認した。

シーケエンシングによってV領域の配列を解析し、NCBIのIgBLASTで相同な配列を持つmo 50

use V領域を検索した。その結果クローニングによって得られた24クローンのうち、同一の Maus 抗体配列を示すものがそれぞれ4クローン以上確認できた。

抗体毎に全く同じ塩基配列を示すクローンが複数個確認できれば、それが目的の抗体配列であると考えられるが、ハイブリドーマのフュージョンパートナーである P3U1細胞由来の抗体配列が検出される可能性もある。P3U1の親株はMOPC-21であり、P3U1はMOPC-21と同じ $\kappa$ 鎖を産生することが知られている（H鎖は作られない）。そこで得られた Maus 抗体配列のL鎖V領域とMOPC-21の $\kappa$ 鎖V領域の相同性を検証し、それとは一致しないことも確認した。そして最後にC領域のシーケンシングを行い、H鎖はIgM、L鎖は $\kappa$ に相違ないことを確認した。

そこからシーケンスの波形の乱れによってV領域全てを解析できなかったクローンや変異導入されていたクローンを除き、V領域の配列が100%一致するものを選び出すと3~8クローンに絞り込んだ。さらにL鎖に関してはMOPC-21のV領域との相同性を確認したが、相同性は60~70%程度でありMOPC-21由来のL鎖ではないことが確認できた。

これらのクローンについてV領域のほか、定常領域の解析を行った。その結果、H鎖はIgMであること、L鎖は $\kappa$ であることが確認、検証できた。それぞれのクローンのアミノ酸配列（図8）と塩基配列は下記のとおりである。

さらに抗体配列からCDRを同定した。各クローンのCDR配列は、下記のとおりである。

【0098】

各クローンの塩基配列およびアミノ酸配列は、以下の配列番号に従って配列表に記載されている。

<CL15>

配列番号1：重鎖CDR1のアミノ酸配列  
 配列番号2：重鎖CDR2のアミノ酸配列  
 配列番号3：重鎖CDR3のアミノ酸配列  
 配列番号4：重鎖可変領域のアミノ酸配列  
 配列番号5：重鎖可変領域の塩基配列  
 配列番号6：軽鎖CDR1のアミノ酸配列  
 配列番号7：軽鎖CDR2のアミノ酸配列  
 配列番号8：軽鎖CDR3のアミノ酸配列  
 配列番号9：軽鎖可変領域のアミノ酸配列  
 配列番号10：軽鎖可変領域の塩基配列

<CL19>

配列番号11：重鎖CDR1のアミノ酸配列  
 配列番号12：重鎖CDR2のアミノ酸配列  
 配列番号13：重鎖CDR3のアミノ酸配列  
 配列番号14：重鎖可変領域のアミノ酸配列  
 配列番号15：重鎖可変領域の塩基配列  
 配列番号16：軽鎖CDR1のアミノ酸配列  
 配列番号17：軽鎖CDR2のアミノ酸配列  
 配列番号18：軽鎖CDR3のアミノ酸配列  
 配列番号19：軽鎖可変領域のアミノ酸配列  
 配列番号20：軽鎖可変領域の塩基配列

<CL21>

配列番号21：重鎖CDR1のアミノ酸配列  
 配列番号22：重鎖CDR2のアミノ酸配列  
 配列番号23：重鎖CDR3のアミノ酸配列  
 配列番号24：重鎖可変領域のアミノ酸配列  
 配列番号25：重鎖可変領域の塩基配列  
 配列番号26：軽鎖CDR1のアミノ酸配列  
 配列番号27：軽鎖CDR2のアミノ酸配列

10

20

30

40

50

配列番号 28 : 軽鎖 CDR3 のアミノ酸配列  
 配列番号 29 : 軽鎖可変領域のアミノ酸配列  
 配列番号 30 : 軽鎖可変領域の塩基配列

<CL48>

配列番号 31 : 重鎖 CDR1 のアミノ酸配列  
 配列番号 32 : 重鎖 CDR2 のアミノ酸配列  
 配列番号 33 : 重鎖 CDR3 のアミノ酸配列  
 配列番号 34 : 重鎖可変領域のアミノ酸配列  
 配列番号 35 : 重鎖可変領域の塩基配列  
 配列番号 36 : 軽鎖 CDR1 のアミノ酸配列  
 配列番号 37 : 軽鎖 CDR2 のアミノ酸配列  
 配列番号 38 : 軽鎖 CDR3 のアミノ酸配列  
 配列番号 39 : 軽鎖可変領域のアミノ酸配列  
 配列番号 40 : 軽鎖可変領域の塩基配列

10

<CL56>

配列番号 41 : 重鎖 CDR1 のアミノ酸配列  
 配列番号 42 : 重鎖 CDR2 のアミノ酸配列  
 配列番号 43 : 重鎖 CDR3 のアミノ酸配列  
 配列番号 44 : 重鎖可変領域のアミノ酸配列  
 配列番号 45 : 重鎖可変領域の塩基配列  
 配列番号 46 : 軽鎖 CDR1 のアミノ酸配列  
 配列番号 47 : 軽鎖 CDR2 のアミノ酸配列  
 配列番号 48 : 軽鎖 CDR3 のアミノ酸配列  
 配列番号 49 : 軽鎖可変領域のアミノ酸配列  
 配列番号 50 : 軽鎖可変領域の塩基配列

20

【0099】

[実施例 9]

血管造影剤である AngioSense を高脂肪食負荷 apoE<sup>-/-</sup>マウスの尾静脈より投与後、速やかに Xenogen 社の IVIS (登録商標) Imaging System、IVIS200 により観察、撮影した血管造影写真である (図 8)。

30

【0100】

[実施例 10]

in vivo イメージング :

Xenogen 社の IVIS (登録商標) Imaging System、IVIS200 により、イメージングを行った (Excitation: 640 nm, Emission: 720 nm)。

Cy5.5 標識 CL15 抗体 (IgM) 0.25 mg/ml; 0.15 ml/head を高脂肪食負荷 apoE<sup>-/-</sup>マウスの尾静脈より投与、20 時間後に IVIS200 にて観察、撮影した (図 9)。CL15 抗体の静脈投与で、大動脈起始部近辺と胸部大動脈に蛍光が検出された。

同様の手順で、CL21 抗体 (図 10)、CL19 抗体 (図 11) を静脈投与で胸部 in vivo イメージング、さらには、開腹・開胸して心臓および大動脈を露出させ、ex vivo イメージングした。in vivo、ex vivo イメージング両方法において、CL21 抗体、CL19 抗体とも大動脈起始部近辺と胸部大動脈に蛍光が検出された。黄色の部分が高蛍光強度が高く、集約した部分である。

40

尚、この蛍光部位を解剖後確認したところ、臨床所見上の石灰化病変部位と一致していた。同様の方法による免疫顕微鏡での観察結果を実施例 12 に示した。

図 12 は、IVIS200 によって得られたイメージングデータを基に、大動脈起始部近辺の一定面積あたりの蛍光量を数値化 (定量化) したものである。このグラフから、3H3 抗体同様、抗石灰化小球抗体 (NLO) に反応し、硫酸銅による酸化変性 LDL (酸化 LDL) に結合活性を有する 3 抗体 (CL15、CL19、CL21 抗体) で石灰化病変部位の in vivo 及び / 又は ex vivo イメージングが可能になることを示している。

50

【0101】

[実施例 11] 本発明の抗体と酸化LDL/ $\beta_2$ GPI複合体に結合する抗体との2重染色

本発明の抗体と酸化LDL/ $\beta_2$ GPI複合体に結合する抗体との2重染色を実施した。以下に各写真について解説する(図18)。

図18 (A) マウス大動脈弁部分の凍結切片作製の手順図

高脂肪飼料を3ヶ月以上与えたApoE<sup>-/-</sup>マウスを安楽死させ、直後に開腹・開胸して心臓および大動脈を露出させ、右心耳を切開したのち注射針を左心室に入れ、冷PBS 10mLをゆっくり注入して放血した。その後心臓を摘出し、上下半分に分断した大動脈側を包埋剤(サクラ、OCTコンパウンド)に包埋、急速凍結した。これをクリオスタットにて厚さ7  $\mu$ mに薄切しスライドガラスに貼り付け、室温で風乾した。以下に挙げる染色では特に記述しない限り1%パラホルムアルデヒド、50%PBSで固定し、PBSで5分間、2回洗浄したものを用いた。免疫組織染色用として、蛍光色素Cy5.5、Alexa Fluor 488および555、あるいは、FITCを用いて3H3抗体および抗石灰化小球抗体を標識した。pH8.8(Alexa)またはpH9.3(Cy5.5)の0.1 M 炭酸バッファーに対して透析した抗体(1 mg/ml)を1 ml、蛍光色素と室温で30分~60分混和し、その後Sephadex G-25カラムで標識抗体を未反応蛍光色素から分離した。Cy5.5の場合、3H3抗体1分子に対し色素3.0~3.8分子の標識効率を得た。

10

図18 (B) マウス大動脈弁のヘマトキシリン・エオシン染色

固定、洗浄後の組織切片を精製水に30秒浸した後、カラッチヘマトキシリン液(武藤化学)で6分間処理し、水洗後、エオシンY 1%液(武藤化学)で1分間処理し、水洗後、グリセリンで封入し、顕微鏡撮影した。

20

図18 (C) マウス大動脈弁のオイルレッド染色

乾燥した凍結切片を10%ホルマリンで30分間蒸気固定し、精製水30秒処理後、60%イソプロピルアルコールに1分間浸し、オイルレッド染色液(Sigma、イソプロピルアルコールに対する飽和溶液)で37℃、15分間処理した。水洗後、カラッチヘマトキシリン液で5分間処理し、水洗してグリセリンで封入し、顕微鏡撮影した。

図18 (D) ~ (H) マウス大動脈弁の免疫蛍光染色

パップペンで組織周囲を囲み、ブロッッキング液(Dako Cytomation社、Protein Block Serum Free液)をのせて室温で10分間インキュベートした。次に、抗体希釈液(Dako)で希釈した一次抗体(30  $\mu$ L/sample)をのせて、4℃で24時間インキュベートした後、PBSで5分間、2回洗浄し、蛍光標識二次抗体(30  $\mu$ L)および核染色用DAPI(同仁、4000倍希釈)の混液をのせ、室温で1時間インキュベートした。その後、PBSで5分間、3回洗浄し、水性の封入剤(Vector社、Vectashield mounting medium)を20  $\mu$ Lのせてカバーガラスで封入し、周囲をマニキュアで固定し、オリンパスIX71蛍光顕微鏡で観察、撮影した。FITC蛍光はU-MNIBA2フィルター、ローダミン蛍光はU-MWIG2フィルター、Cy5.5蛍光はUU-DM-CY5-2フィルター、DAPI蛍光はU-MNU2フィルターを用いて観察した。

30

図18それぞれにおいて用いた具体的な抗体名を以下に記述する。

図18(D)では、一次抗体にラット抗マウス単球/マクロファージ抗体MOMA-2(BMA BIOMEDICALS社製、1  $\mu$ g/ml)およびウサギ抗アルファ平滑筋アクチン抗体(Abcam社製、6  $\mu$ g/ml)を用い、二次抗体にローダミン標識したヤギ抗ラットIgG抗体(Santa Cruz社製、20  $\mu$ g/ml)、およびFITC標識したブタ抗ウサギIgG抗体(Dako社製、1:20希釈)を用いた。FITC 40 蛍光用のU-MNIBA2フィルターで撮影した画像と、ローダミン蛍光用のU-MWIG2フィルターで撮影した画像を重ね合わせた。

図18(E)、(F)、(G)では、Cy5.5標識したCL15抗体(100  $\mu$ g/ml)およびAlexa Fluor488標識した3H3抗体(25  $\mu$ g/ml)をのせ、4℃で24時間インキュベート後、DAPIで1時間インキュベートした。

図18(E)では、DAPI用のU-MNU2フィルターを用いて撮影した画像とローダミン用のU-MWIG2フィルターを用いて撮影した画像を重ね合わせた。

図18(F)では、DAPI用のU-MNU2フィルターを用いて撮影した画像とFITC用のU-MNIBA2フィルターを用いて撮影した画像を重ね合わせた。

図18(G)では、FITC用のU-MNIBA2フィルターを用いて撮影した画像とローダミン用のU 50

-MWIG2フィルターを用いて撮影した画像を重ね合わせた。重なった部分は黄色く見える。

図18(H)では、一次抗体にウサギ抗オステオカルシン抗体(Santa Cruz社製、 $4\mu\text{g/ml}$ )、二次抗体にローダミン標識したロバ抗ウサギIgG抗体(Santa Cruz社製、 $4\mu\text{g/ml}$ )を用い、DAPIとともに処理した。DAPI用のU-MNU2フィルターを用いて撮影した画像とローダミン用のU-MWIG2フィルターを用いて撮影した画像を重ね合わせた。

この実験の結果、図18(G)に示すように本発明の石灰化小球を認識する抗体CL15と抗体3H3を同一病理組織切片に接触させると、それぞれの標識蛍光が別々の組織部位を認識し、組織切片の異なる病態部位の特定に利用できる一方で、Cy5.5標識CL15抗体は大動脈弁の脂質蓄積部分(粥腫部分)を染め、またAlexa Fluor 488標識3H3抗体も同様の領域を染めて、両方の抗体染色が重なり合う共在部分も認められた。

また、骨形成関連タンパク質であるオステオカルシンの局在を指標に検証した石灰化初期病変は、これらの抗体の認識した領域と概ね重なっていた(図18H)

#### 【0102】

[実施例12] 還流後の心臓の免疫顕微鏡での観察結果

高脂肪飼料を4ヶ月間与えた、6ヶ月齢の $apoeE^{-/-}$ マウスに、Cy5.5標識3H3抗体、およびCy5.5標識CL-15抗体、各 $250\mu\text{g/ml}$ を $0.15\text{ml}$ 、尾静脈内投与し、24時間後にIVIS200にてin vitro近赤外蛍光観察後、安楽死させ、直後に開腹・開胸して右心耳を切開したのち注射針を左心室に入れ、冷PBS  $10\text{mL}$ をゆっくり注入して放血した。その後心臓と大動脈(総腸骨動脈分岐の手前まで)を摘出し、IVIS200にてex vivo近赤外蛍光観察後、心臓を包埋剤(OCTコンパウンド)に包埋して凍結し、クリオスタットにて大動脈弁の、厚さ $7\mu\text{m}$ の切片を作製した。オリンパスIX71蛍光顕微鏡にてUU-DM-CY5-2フィルターを用い、Cy5.5蛍光を観察、撮影した(図19のB、D)。その同一切片をそれぞれヘマトキシリン・エオシン染色した(図19のA、C)。

この結果、肥厚した大動脈弁の、マクロファージ由来の脂質を蓄積した泡沫化細胞の集積部分にCy5.5標識CL-15抗体の蛍光が観察された。また、Cy5.5標識3H3抗体の蛍光も、肥厚した大動脈弁の脂質蓄積部分に観察された。この観察結果は、in vivoイメージングのためにマウスの静脈内投与した標識抗体が、確かに大動脈弁の脂質蓄積部分に移行していることを示しており、in vivoイメージングの結果を支持するものである。

#### 【0103】

[実施例13] 抗石灰化小球抗体モノクローナル抗体の特異性の解析

動脈硬化のin vivoイメージングに有効と考えられる抗石灰化小球抗体について固相酵素免疫測定法(ELISA)、および、薄層クロマトグラフィー(TLC)とELISAを組み合わせた"Ligand blot"を試行し特異性の解析を行った。

#### 【0104】

抗体の精製:

石灰化小球に対するIgM抗体(CL15、CL19およびCL21)を産生するハイブリドーマをそれぞれマウス腹腔内に投与して腹水化し、集めた腹水を、Mannan Binding Proteinアフィニティーカラム(Pierce)にかけ、IgM抗体を精製した。

ELISA:

マイクロプレートに各種脂質のエタノール溶液を分注・風乾し、BSAでブロッキングした後、抗石灰化小球抗体で処理し、続いてHRP標識抗マウスIgM抗体で処理した。発色には、o-フェニレンジアミンと過酸化水素を用いた。

Ligand Blot:

各種脂質をシリカゲル薄層プレート(Marchery-Nage1)にスポットし、クロロホルム/メタノール/28%アンモニア/水(24/16/2/1)混液にて展開した。乾燥したプレートを1%BSA、1%ポリビニルピロリドンを含むPBSでブロッキング後、抗石灰化小球抗体 $10\mu\text{g/ml}$ で60分間処理し、HRP標識抗マウスIgM抗体で60分間処理し、4-メトキシナフトールと過酸化水素を用いて発色させた。各操作の間はTBSで洗浄した。

樹立された石灰化小球に特異的なモノクローナル抗体の特異性をさらに詳細に知るために、ELISAおよびTLC-Ligand blotを用いて各種脂質への反応性を調べた。結果の一部を図

20および図21に示す。また、表2はそれらの結果を要約したものである。抗石灰化小球抗体 CL15、CL21抗体ともに、セラミド1リン酸 (Ceramide-1P) に結合し、ホスファチジルセリン (PS)、ホスファチジン酸 (PA)、カルジオリピン (CL) 等の陰性荷電リン脂質、およびカルボキシル基をもつ酸化脂質7-ケトコレステリル-9-カルボキシノナノエート (oxLig-1) に結合する認識特性を持つことが明らかになった。

【0105】

【表2】

	CL15	CL21	
DOPS	+ (+)	+ (+)	10
DOPA	+ (+)	+ (+)	
DOPC	- (-)	- (-)	
DOPE	- (-)	- (-)	
CL	+ (+)	+ (+)	
SM	- (-)	- (-)	20
Ceramide	- (-)	- (-)	
Ceramide-1P	+ (+)	+ (+)	
Lionleic acid	- (-)	- (-)	
Cholesterol (Chol)	- (-)	- (-)	
Chol-linoleate	- (-)	- (-)	
oxLig-1	+ (+)	+ (+)	30

(括弧内：ELISA 結果)

表2中の略称に対する正式名称は以下のとおり。

DOPS (BBPS): 3,4-スレオジヒドロキシフェニルセリン (ホスファチジルセリン)

DOPA: 3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン (ホスファチジン酸)

DOPC: 1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルコリン

CL: カルジオリピン

SM: スフィンゴミリエン

Ceramide: セラミド

Ceramide-1P: セラミド-1リン酸

Lionleic acid: リノール酸

Chol-linoleate: リノール酸 コレステロール.

oxLig-1: 7-ケトコレステリル-9-カルボキシノナノエート [9-オキソ-9-(7-ケトコレスト-5-エン-3β-イルオキシ)ノナン酸]

【0106】

[実施例14]

後述の [参考例9] と同様の手順にて、石灰化小球抗体CL-19をAlexa Fluor 750により標識した抗体を、マウスの尾静脈より投与して、IVIS200により蛍光を測定した。静脈内投与後2時間後に強い特異的なシグナルが反射蛍光画像、透過蛍光画像の両方で得られ、

それをもとに立体画像を構築すると、胸の内部に強い蛍光シグナルが認められた(図26)。図の赤い点の部分について濃度が濃いほど蛍光強度が強い、即ち、イメージング剤が局在化していることを示す。

CT画像より、骨抽出(図27A)、臓器抽出(ピンク色)で得られた画像(図27B)と、IVIS200により構築した蛍光イメージング画像との3D-CT統合の画像(図27C~E)を、コンピュータの仮想空間上に3次元像を動画として構成し(3次元グラフィックスのアニメーション)、多方面からその標識された位置を確認した。図28に3D-CT統合の画像全身図を示した。

【0107】

[参考例1]

#### 酸化LDL/ $\beta_2$ GPI複合体の調製

600 $\mu$ gのヒトLDL(Organon Teknika Corp, Durham, NC)を、5 $\mu$ MCuSO<sub>4</sub>を含むPBS(2mL)中で37 $^{\circ}$ C、12時間酸化処理した。1mMのEDTAを添加することによって酸化を停止させた。

。上記、酸化LDL 0.2mg/mLをヒト $\beta_2$ GPI(Affinity Biologicalsより購入)とともに終濃度 0.2mg/mL、37 $^{\circ}$ C条件下で、16時間インキュベートし、酸化LDL/ $\beta_2$ GPI複合体を得た。

【0108】

[参考例2]

#### 抗原免疫

ヒト酸化LDL/ $\beta_2$ GPI複合体精製タンパク質を同量のコンプリートアジュバント(SIGMA; F5881)と混合してエマルジョンにし、BALB/cマウス(メス)のfoot-padに5~50 $\mu$ g/headで3から7日おきに数回免疫した。最終免疫の3~5日後にマウスから鼠径リンパ節を摘出し、マウス骨髄腫細胞P3U1(P3-X63Ag8U1)との細胞融合を行った。

【0109】

[参考例3]

#### 細胞融合、及びモノクローナル抗体産生細胞の選択と取得

細胞融合は次に示す一般的な方法を基本として行った。全ての培地中のFetal Bovine Serum(FBS)は、56 $^{\circ}$ Cで30min保温する処理により、非働化したものを使用した。P3U1は、RPMI1640-10%FBS(Penicillin, Streptomycin 含)で培養して準備した。

摘出したマウスの鼠径リンパ節細胞とP3U1を10:1~2:1の割合で混合し、遠心した。沈殿した細胞に50%ポリエチレングリコール4000(Merck社、ガスクロマトグラフィー用 PEG 4000、カタログNo. 9727)を融合促進剤として徐々に加えながら穏やかに混合し、細胞融合を行った。さらにRPMI1640を徐々に加えながら穏やかに混合後、遠心した。沈殿した融合細胞を、15%FCSを含むHAT培地(RPMI1640, HAT-supplement(Invitrogen; 11067-030), Penicillin, Streptomycin)で適宜希釈し、200 $\mu$ L/wellで96穴のマイクロプレートに播種した。

融合細胞をCO<sub>2</sub>インキュベータ(5% CO<sub>2</sub>、37 $^{\circ}$ C)中で培養し、コロニーが十分に形成されたところで、培養上清をサンプリングしてスクリーニングを行った。

スクリーニングは、免疫に使用したヒト酸化LDL/ $\beta_2$ GPI複合体抗原を感作した96穴プレートに対するELISA(実施例4に記載)で陽性となったものを選別した。15%FCSを含むHT培地(RPMI1640, HT-supplement(Invitrogen; 21060-017), Penicillin, Streptomycin)でこれらを拡大培養後、限界希釈(limiting dilution)法により単クローン化した。このようにして、抗ヒト酸化LDL/ $\beta_2$ GPI複合体抗体を免疫原としてクローン3H3を含むハイブリドーマクローン他、7種類を得た。

【0110】

[参考例4]

#### ヒト酸化LDL/ $\beta_2$ GPI複合体及び $\beta_2$ GPIに対する反応性(ELISA)

抗ヒト酸化LDL/ $\beta_2$ GPI複合体抗体を検出するためのELISAは、以下の方法によって行っ

た。すなわち、酸化LDL/ $\beta_2$ GPIをマイクロプレート(Nunc社 Maxisorp)に1 $\mu$ g/mL(50

10

20

30

40

50

$\mu\text{L}$ /ウエル) 入れて、 $4^\circ\text{C}$ で一晩インキュベートすることによって吸着させ、このプレートを1% BSAを用いてブロッキングした。Assay buffer (1% BSA, 0.15 M NaCl/20mM HEPES (pH 7.4)) を用いて、各横軸に記載の抗体濃度に希釈したサンプル $50\mu\text{L}$ を入れて、ウエル中で30分間インキュベートした。液を捨て、0.1% Tween20/PBSで洗浄した後、次いでHRP標識した抗マウスIgG (MBL code 330) 2000倍希釈  $50\mu\text{L}$ をプレートに添加しウエル中で30分間インキュベートした。液を捨て、0.1% Tween20/ PBS で洗浄した後、基質TMB (MOSS社; TMBZ)を $50\mu\text{L}$ 添加し、室温にて 3分間インキュベートし、0.18M 硫酸  $50\mu\text{L}$ を添加して反応停止後、吸光度450nmで検出した (図13)。

$\beta_2\text{GPI}$ との反応性を検出するためのELISAは、以下の方法によって行った。すなわち、 $\beta_2\text{GPI}$ をマイクロプレート (Nunc社Maxisorp) に $1\mu\text{g/mL}$  ( $50\mu\text{L}$ /ウエル) 入れて、 $4^\circ\text{C}$ で一晩インキュベートすることによって吸着させ、このプレートを1% BSAを用いてブロッキングした。Assay buffer (1% BSA, 0.15 M NaCl/20 mM HEPES (pH 7.4)) を用いて、各横軸に記載の抗体濃度に希釈したサンプル $50\mu\text{L}$ を入れて、ウエル中で30分間インキュベートした。液を捨て、0.1% Tween20/PBSで洗浄した後、次いでHRP標識した抗マウスIgG (MBL code 330) 2000倍希釈 $50\mu\text{L}$ をプレートに添加しウエル中で30分間インキュベートした。液を捨て、0.1% Tween20/PBS で洗浄した後、基質TMB (MOSS社; TMBZ)を $50\mu\text{L}$ 添加し、室温にて3分間インキュベートし、0.18 M 硫酸  $50\mu\text{L}$ を添加して反応停止後、吸光度450nmで検出した (図13)。

さらに、 $\beta_2\text{GPI}$ をマイクロプレート (nunc社 Maxisorp) に $\sim 50\mu\text{g/mL}$ まで濃度を変え ( $50\mu\text{L}$ /ウエル) 入れて、 $4^\circ\text{C}$ で一晩インキュベートすることによって吸着させ、同様に抗体反応性を試験した (図示さず)。

その結果、固相酸化LDL/ $\beta_2\text{GPI}$ 複合体に対しては、2H6 > 3H3, 2A12, 3D4 > 4C12, 1H4の反応性を示した。また、固相 $\beta_2\text{GPI}$ に対しては、2H6, 3D4 > 2A12, 4F10を示し、3H3, 4C12については反応性を示さなかった (図13)。

しかし、マイクロタイタープレートへの感作濃度をあげると3H3なども反応性を示した (図示さず)。

抗体の反応性を確認する方法として次に、遊離の抗原で阻害をかける試験を行い、さらに、各抗体の特異性を見た。

【0111】

[参考例5]

溶液中の遊離の $\beta_2\text{GPI}$ 、酸化LDL/ $\beta_2\text{GPI}$ 複合体に対する競合反応性 (ELISA)

固相ヒト酸化LDL/ $\beta_2\text{GPI}$ 複合体及び $\beta_2\text{GPI}$ に対する反応性 (ELISA) 試験において、各抗体と反応させる際に、酸化LDL/ $\beta_2\text{GPI}$ 複合体または $\beta_2\text{GPI}$ を共存させて反応することにより、固相抗原に対する阻害反応を行った。

すなわち、 $\beta_2\text{GPI}$ をマイクロプレート (Nunc社; Maxisorp) に $1\mu\text{g/mL}$  ( $50\mu\text{L}$ /ウエル) 入れて、 $4^\circ\text{C}$ で一晩インキュベートすることによって吸着させ、このプレートを1% BSAを用いてブロッキングした。Assay buffer (1% BSA, 0.15 M NaCl/20 mM HEPES (pH 7.4)) を用いて、適当な濃度に希釈した抗体サンプル $25\mu\text{L}$ 及び、競合させる抗原である酸化LDL/ $\beta_2\text{GPI}$ 複合体または $\beta_2\text{GPI}$ を各横軸に記載の抗原濃度にAssay bufferを用いて希釈したサンプル $25\mu\text{L}$ を入れて、ウエル中で30分間インキュベートした。液を捨て、0.1% Tween20/PBSで洗浄した後、次いでHRP標識した抗マウスIgG (MBL; Code 330) 2000倍希釈  $50\mu\text{L}$ をプレートに添加しウエル中で30分間インキュベートした。液を捨て、0.1% Tween20/PBS で洗浄した後、基質TMB (MOSS社; TMBZ)を $50\mu\text{L}$ 添加し、室温にて 3分間インキュベートし、0.18M 硫酸  $50\mu\text{L}$ を添加して反応停止後、吸光度450nmで検出した。

その結果、3H3, 4C12, 2A12ではELISA中に混在させた遊離の抗原が酸化LDL/ $\beta_2\text{GPI}$ 複合体の場合、固相の酸化LDL/ $\beta_2\text{GPI}$ への結合阻害が顕著であり、 $\beta_2\text{GPI}$ では阻害がかからなかった。2H6では、遊離の抗原が酸化LDL/ $\beta_2\text{GPI}$ 複合体でも阻害が起こる一方で $\beta_2\text{GPI}$ の混在でも若干阻害が見られた。3D4では、遊離の抗原が酸化LDL/ $\beta_2\text{GPI}$ 複合体よりも、 $\beta_2\text{GPI}$ による阻害の方が高い阻害が見られた (図14)。

【0112】

30

40

50

[参考例 6]

抗体の動脈硬化巣免疫組織染色

apoE<sup>-/-</sup>マウスおよび LDLR<sup>-/-</sup>マウス (Jackson Labより入手し、岡山大学内動物実験施設にて系統維持) を8週齢までは、普通飼料で飼育し (オリエンタル酵母NMF) し、それ以降に高脂肪食 (コレステロール1%、コール酸1%、無塩バター15%を普通飼料に配合) を4-6ヶ月負荷すると、胸部あるいは腹部大動脈に動脈硬化巣(プラーク)が現れ、肥厚、粥腫が出現する。そこで、8ヶ月齢のこれらマウスを屠殺し、特に今回は、胸部大動脈、大動脈の起始部、および大動脈弁の凍結切片を作製し、標本とし観察した。

蛍光免疫染色抗体法のためには、凍結切片を調製後、パラホルムアルデヒド固定し実験に供した。

10

免疫組織染色

結果、C57BL/6系統のマウスを普通飼料で飼育したものに対し、3H3抗体、Mac3を用いる免疫蛍光染色では、泡沫化マクロファージが集簇してできた粥腫が染まった。3H3によっても同様な部位が染まっている (図15)。

動脈硬化好発モデルマウス (高脂肪食を負荷したapoE<sup>-/-</sup>) の大動脈弁の免疫蛍光染色を酸化LDL/ $\beta_2$ GPI複合体を認識する他の抗体で行ったものと比較した。粥腫の染色陽性例は、粥腫の染色陽性例は、3H3および抗体Aのみである (図16)。

Cy5.5、Alexaなどを標識した粥腫に特異的な種々のモノクローナル抗体で動脈硬化巣の特異的な免疫染色が可能となった。

20

【0113】

[参考例 7]

イメージング

in vivoイメージング:

Xenogen社のIVIS (登録商標) Imaging System、IVIS200により、イメージングを行った (Excitation: 640 nm, Emission: 720 nm.)。

実験1: 実施例6と同様に作製した高脂肪食負荷apoE<sup>-/-</sup>マウスに尾静脈より、Cy5.5標識モノクローナル抗体 (0.25 mg/ml) を0.15 ml/head投与した。生理食塩水 (PBS、対照)、Cy5.5標識抗体A、Cy5.5標識3H3抗体の3種類を投与した。投与して24時間後に胸部皮膚を剥がし、生きた状態で全身を撮影した (図23)。

実験2: 更に胸部大動脈が繋がった状態で心臓を摘出して撮影した (図23)。3H3投与で大動脈起始部が強く染まる。抗体Aでも幾分染まるが3H3の場合ほど蛍光強度は強くない。2A12では全く染まらない。

30

大動脈起始部の一定面積あたりの蛍光強度を測定した。PBSを投与した対照マウスの蛍光を1.0とした。3H3投与で、対照の3倍程度の蛍光が確認された。その他の抗体投与では蛍光強度に大きな変化は見られなかった (図29)。尚、この蛍光部位を解剖後確認したところ、臨床所見上の粥腫と一致していた。

以上、今回の抗体群の特異性試験を表3にまとめた。

【0114】

【表 3】

酸化LDL/ $\beta_2$ GPI複合体に特異的な抗体

40

	固相抗原への結合		競合阻害(酸化LDL/ $\beta_2$ GPI固相)		イメージング
	$\beta_2$ GPI	酸化LDL/ $\beta_2$ GPI	$\beta_2$ GPI 酸化	LDL/ $\beta_2$ GPI	
1H4	-	+	ND	ND	-
2A12	+	++	-	++	-
2H6	++	+++	++	++	-
3D4	++	++	++	-	-
3H3	-	++	-	++	+++
4C12	-	+	-	++	-
4F10	+	-	ND	ND	-

50

## 【0115】

固相酸化LDL/ $\beta_2$ GPI複合体或いは固相 $\beta_2$ GPI ELISA液中に競合阻害抗原として、 $\beta_2$ GPIとの阻害性を確認したところ、固相酸化LDL/ $\beta_2$ GPI複合体の場合：3D4>2H6>4C12>3H3、固相 $\beta_2$ GPIの場合：2H6>3D4（4C12、3H3は固相 $\beta_2$ GPIに弱くしか反応せず）。3H3は液中フリーの酸化LDL/ $\beta_2$ GPI複合体（非変性）への特異性が高い。

## 【0116】

[参考例8]

酸化LDL/ $\beta_2$ GPI複合体を認識するマウスモノクローナル抗体の可変領域遺伝子の解析

解析したモノクローナル抗体は、4種類のC1one (3H3, 4C12, 2H6, 3D4)である。

これら4種類のC1oneの抗体サブクラスは、3H3と4C12がIgG2b、2H6と3D4はIgG1である。 10  
(L鎖可変領域遺伝子の解析)

4種 (3H3, 4C12, 2H6, 3D4) のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞をRPMI1640+10%FCS培地でそれぞれ培養した。そのハイブリドーマ細胞からQuickPrep micro RNA purification kit (Amersham Biosciences, code 27-9255-01)を用いてmRNAを得た。そのmRNAをFirst-Strand cDNA Synthesis kit (Amersham Biosciences, code 27-9261-01)を用いてcDNAとした。このcDNAを鋳型としてPCR法で遺伝子を増幅させるのであるが、以下に示す11パターンのPrimerの組み合わせによりPCR反応を行った。ここで、MKV1~MKV11のPrimer配列は、多くのモノクローナル抗体のシグナル配列を解析することで、ほぼ全てのモノクローナル抗体のL鎖シグナルは配列をこの11種類のPrimer配列で網羅するように設定されている。この11種類のMKV primerとマウスL鎖定常領域配列に相当するMKC p 20 primer間における11パターンのPCR反応から少なくとも1種類のPCR反応で目的のL鎖可変領域が増幅されてくる。

## 【0117】

PCR反応条件は、以下のとおり。

マウスハイブリドーマからのcDNA	4 $\mu$ L	
2.5 mM dNTPs	4 $\mu$ L	
MKV1~MKV11 primer(20 $\mu$ M)の11種類中の1つ	2.5 $\mu$ L	
MKC primer(20 $\mu$ M)	2.5 $\mu$ L	
DMSO	2.5 $\mu$ L	
$\times 10$ pfu polymerase Buffer	5 $\mu$ L	30
pfu polymerase	1 $\mu$ L	
滅菌水	28.5 $\mu$ L	
Total	50 $\mu$ L	
94 $^{\circ}$ C	2 min	
94 $^{\circ}$ C	1 min 55 $^{\circ}$ C 2min 72 $^{\circ}$ C 2min (30サイクル)	
72 $^{\circ}$ C	4min	
4 $^{\circ}$ C	無制限時間	

## 【0118】

PrimerのDNA配列は以下を参照。

MKV1 primer: ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTG (配列番号: 63)	40
MKV2 primer: ATGGAGWCAGACACACTCCTGYTATGGGTG (配列番号: 64)	
MKV3 primer: ATGAGTGTGCTCACTCAGGCCTGGSGTTG (配列番号: 65)	
MKV4 primer: ATGAGGRCCCCTGCTCAGWTTYTTGMMTCTTG (配列番号: 66)	
MKV5 primer: ATGGATTTWCAGGTGCAGATTWCAGCTTC (配列番号: 67)	
MKV6 primer: ATGAGGTKCYTYGYSAGYTYCTGRGG (配列番号: 68)	
MKV7 primer: ATGGGCWTCAGATGGAGTCACAKWYYCWGG (配列番号: 69)	
MKV8 primer: ATGTGGGGAYCTKTTYQMMTTTTTCAATTG (配列番号: 70)	
MKV9 primer: ATGGTRTCCWCASCTCAGTTCCTTG (配列番号: 71)	
MKV10 primer: ATGTATATATGTTTGTGTCTATTTCT (配列番号: 72)	
MKV11 primer: ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCC (配列番号: 73)	50

MKC primer: ACTGGATGGTGGGAAGATGG (配列番号: 74)

(M=A or C, R=A or G, W=A or T, S=C or G, Y=C or T, K=G or T)

【0 1 1 9】

PCR反応によりL鎖可変領域が増幅してきたPCR primerの組み合わせは、以下になる。

3H3: MKV7 - MKC

4C12: MKV7 - MKC

2H6: MKV5 - MKC

3D4: MKV4 - MKC

PCR増幅したL鎖可変領域遺伝子はpCR2.1ベクター (Invitogen) に挿入された。

L鎖可変領域遺伝子が挿入されたPCR2.1ベクターは、DNAシーケンサー (Applied Biosystems製: 3130 Genetic Analyzer) によりDNA塩基配列が解読された。

【0 1 2 0】

(H鎖可変領域遺伝子の解析)

4種 (3H3, 4C12, 2H6, 3D4) のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞をRPMI1640+10%FCS培地でそれぞれ培養した。そのハイブリドーマ細胞からQuickPrep micro RNA purification kit (Amersham Biosciences, code 27-9255-01)を用いてmRNAを得た。そのmRNAをFirst-Strand cDNA Synthesis kit (Amersham Biosciences, code 27-9261-01)を用いてcDNAとした。このcDNAを鋳型としてPCR法でH鎖可変領域遺伝子を増幅させるのであるが、以下に示す12パターンのPrimerの組み合わせによりPCR反応を行った。ここで、MHV1~MHV12のPrimer配列は、多くのモノクローナル抗体のシグナル配列を解析することで、ほぼ全てのモノクローナル抗体のH鎖シグナルは配列をこの12種類のPrimer配列で網羅するように設定されている。この12種類のMHV primerとマウスH鎖定常領域配列に相当するMHCG2bあるいはMHCG1 primer間における12パターンのPCR反応から少なくとも1種類のPCR反応で目的のH鎖可変領域が増幅されてくる。ここで、MHCG2b Primerは、マウスIgG2bのH鎖定常領域に相当する配列を持ち、MHCG1 Primerは、マウスIgG1のH鎖定常領域に相当する配列である。それゆえ、IgG2b サブクラスである3H3 cloneと4C12 cloneのPCR増幅には、MHCG2b Primerが用いられ、IgG1サブクラスである2H6 cloneと3D4 cloneのPCR増幅には、MHCG1 Primerが用いられた。

【0 1 2 1】

PCR反応条件は、以下のとおり。

マウスハイブリドーマからのcDNA	4 $\mu$ L
2.5 mM dNTPs	4 $\mu$ L
MHV1~MHV12 primer(20 $\mu$ M)の12種類中の1つ	2.5 $\mu$ L
MHCG2b あるいはMHCG1 primer(20 $\mu$ M)	2.5 $\mu$ L
DMSO	2.5 $\mu$ L
$\times 10$ pfu polymerase Buffer	5 $\mu$ L
pfu polymerase	1 $\mu$ L
滅菌水	28.5 $\mu$ L
Total	50 $\mu$ L

94 $^{\circ}$ C 2 min

94 $^{\circ}$ C 1 min 55 $^{\circ}$ C 2min 72 $^{\circ}$ C 2min (30サイクル)

72 $^{\circ}$ C 4min

4 $^{\circ}$ C 無制限時間

【0 1 2 2】

PrimerのDNA配列は以下を参照。

MHV1 primer: ATGAAATGCAGCTGGGGCATSTTCTTC (配列番号: 75)

MHV2 primer: ATGGGATGGAGCTRTATCATSYTCTT (配列番号: 76)

MHV3 primer: ATGAAGWTGTGGTTAACTGGGTTTTT (配列番号: 77)

MHV4 primer: ATGRACCTTGGGYTCAGCTTGRTTT (配列番号: 78)

MHV5 primer: ATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTTTCCTT (配列番号: 79)

MHV6 primer: ATGGCTGTCYTRGSGCTRCTCTTCTGC (配列番号: 80)  
 MHV7 primer: ATGGRATGGAGCKGGRTCTTTMTCTT (配列番号: 81)  
 MHV8 primer: ATGAGAGTGCTGATTCTTTTGTC (配列番号: 82)  
 MHV9 primer: ATGGMTTGGGTGTGGAMCTTGCTATTCCTG (配列番号: 83)  
 MHV10 primer: ATGGGCAGACTTACATTCTCATTCCCTG (配列番号: 84)  
 MHV11 primer: ATGGATTTTGGGCTGATTTTTTTTATTG (配列番号: 85)  
 MHV12 primer: ATGATGGTGTAAAGTCTTCTGTACCTG (配列番号: 86)  
 MHCG2b primer: CAGTGGATAGACTGATGGGGG (配列番号: 87)  
 MHCG1 primer: CAGTGGATAGACAGATGGGGG (配列番号: 88)

(M=A or C, R=A or G, W=A or T, S=C or G, Y=C or T, K=G or T)

10

【0 1 2 3】

PCR反応によりH鎖可変領域が増幅してきたPCR primerの組み合わせは、以下になる。

3H3: MHV4 - MHCG2b

4C12: MKV4 - MHCG2b

2H6: MHV4 - MHCG1

3D4: MHV1 - MHCG1

【0 1 2 4】

PCR増幅したH鎖可変領域遺伝子はpCR2.1ベクター (Invitrogen) に挿入された。

H鎖可変領域遺伝子が挿入されたPCR2.1ベクターは、DNAシーケンサー (Applied Biosystems製: 3130 Genetic Analyzer) によりDNA塩基配列が解読された。

20

その結果、本発明に用いることのできる3H3のアミノ酸配列、CDRが明らかになった (図30)。

3H3抗体のアミノ酸配列、塩基配列は以下のとおりである。

<3H3抗体>

配列番号53: 重鎖可変領域のアミノ酸配列

配列番号54: 重鎖CDR1のアミノ酸配列

配列番号55: 重鎖CDR2のアミノ酸配列

配列番号56: 重鎖CDR3のアミノ酸配列

配列番号57: 重鎖可変領域の塩基配列

配列番号58: 軽鎖可変領域のアミノ酸配列

30

配列番号59: 軽鎖CDR1のアミノ酸配列

配列番号60: 軽鎖CDR2のアミノ酸配列

配列番号61: 軽鎖CDR3のアミノ酸配列

配列番号62: 軽鎖可変領域の塩基配列

配列番号107: 重鎖FR1のアミノ酸配列

配列番号108: 重鎖FR2のアミノ酸配列

配列番号109: 重鎖FR3のアミノ酸配列

配列番号110: 重鎖FR4のアミノ酸配列

配列番号111: 軽鎖FR1のアミノ酸配列

配列番号112: 軽鎖FR2のアミノ酸配列

40

配列番号113: 軽鎖FR3のアミノ酸配列

配列番号114: 軽鎖FR4のアミノ酸配列

【0 1 2 5】

[参考例9]

IVIS 200および3次元CTを用いた画像解析に関する検討

Computed Tomography (CT) 画像を統合することによる、動脈硬化病巣の3次元 (局在) イメージ得るための実験を実施した。

In vivo蛍光イメージング:

IVIS 200 Imaging System (Xenogen社) を用いて、蛍光イメージングを行った (Cy5.5の場合Excitation: 640 nm、Emission: 720 nm、Alexa Fluor 750の場合Excitation: 745 50

nm、Emission: 800 nm)。Cy5.5標識3H3抗体 (IgG) 0.25 mg/ml、0.15 ml/1匹、またはAlexa Fluor750標識3H3抗体1.0~1.5 mg/ml、0.15 ml/1匹を高脂肪食負荷ApoE<sup>-/-</sup>マウスの尾静脈より投与し、2~24時間後に、IVIS 200にて麻酔吸入下でin vivo蛍光を観察・撮影した。ApoE<sup>-/-</sup>マウスでは黒い体毛が蛍光を吸収するため体毛を剃って観察した。はじめに反射光による蛍光観察を行い、その後、透過光による蛍光観察を行って、マウスの3次元 (3D) 画像を作成し、光源情報と融合させた (図25 A :統合前のIVISによる3次元画像)。図の赤い点の部分が3H3に標識した蛍光シグナルであり、濃度が濃いほど、蛍光強度が強い、即ち、イメージング剤が局在化していることを示す。

Ex vivoイメージング:

3D-CT解析の終了後マウスを安楽死させ、PBS 10 mlで心灌流し、心臓および大動脈を摘出し、IVIS 200により反射蛍光画像を得た。 10

CT イメージング:

eXplore Locus CT System (GE Healthcare)によりCTイメージングを行った。IVIS 200によりイメージングを行ったのと同じマウス個体を用い、麻酔吸入下にX線照射を行い、CT画像を得た。

蛍光とCTの画像統合:

IVIS 200により検出した蛍光イメージング画像と、CTを用いて撮影した画像を、汎用3D可視化ソフト (Amira、Mercury Computer Systems)を用いて統合させた (図25 B :統合後の3次元CT画像)。

なお、一連の手順を模式的に示した (図24)。

20

- (A) IVIS 200による特異抗体を用いた蛍光イメージング (反射)。  
 (B) 統合前のIVIS 200による特異抗体を用いた蛍光イメージング (透過光; 左) と CT像 (中) 統合図 (右): 蛍光イメージング (透過光; 左)中の赤い点の部分について濃度が濃いほど、蛍光強度が強い、即ち、イメージング剤が局在化集中した部分 (3H3結合 反応性が高い部位) であることを示す。  
 (C) IVISによる蛍光シグナルと3次元CTの統合画像: コンピューターの仮想空間上に3次元像を動画として構成 (3次元グラフィックスのアニメーション) として、多方面からその標識された位置を確認した写真である。

可視光は生体内で吸収されてしまうためin vivo イメージングを行うには、生体に吸収されにくい波長である近赤外の蛍光標識が適している。今回は、Cy5.5またはAlexa Fluor 750により標識した抗体をマウスの尾静脈より投与して、IVIS200により蛍光を測定し、反射および透過による蛍光測定条件の検討を行った。Cy5.5標識抗体によるin vivoイメージングの反射蛍光画像では動脈硬化発症ApoE<sup>-/-</sup>マウスの大動脈弁および胸部大動脈の強いシグナルが観察された。さらに、ex vivoイメージングおよびex vivo蛍光顕微鏡観察により、静脈投与した蛍光標識抗体の動脈硬化巣への局在が確認できた。しかしながら、Cy5.5標識抗体を用いる場合、透過蛍光のシグナルが弱く、立体画像 (3次元) での蛍光位置特定が容易ではなかった。一方、Alexa Fluor 750標識抗体では、静脈内投与後2時間後強い特異的なシグナルが反射蛍光画像、透過蛍光画像の両方で得られ、それをもとに立体画像を構築すると、胸の内部に強い蛍光シグナルが認められた (図24 A、B中の左図)。続いて同じマウスについてCT撮影を行い、CT画像より骨と肺の臓器抽出を行って得られた画像 (図24 B中と、IVIS200により構築した蛍光イメージング画像をAmiraにより統合させた、統合3D画像 (図24 B右)を得たところ、心臓とその近傍の位置に蛍光シグナルが観察された。図の赤い点の部分について濃度が濃いほど、蛍光強度が強い、即ち、イメージング剤が局在化していることを示す。CT (中央) と3D-CT統合の画像を示した (図24 B右)。コンピューターの仮想空間上に3次元像を動画として構成し (3次元グラフィックスのアニメーション)、多方面からその標識された位置を確認した (図24 C)。

40

【0126】

上記実験の結果、蛍光標識3H3抗体によるin vivoイメージングの反射蛍光画像では動脈硬化発症ApoE<sup>-/-</sup>マウスの大動脈弁および胸部大動脈の強いシグナルが観察された。さらに、ex vivoイメージングおよびex vivo蛍光顕微鏡観察により、静脈投与した蛍光標識抗 50

体の動脈硬化巣への局在が確認できた。

【0127】

[参考例10]

#### キメラ抗体発現ベクターの作製

マウスH鎖の重鎖可変領域DNA（配列番号：57）を、HindIII, XhoIで切断して精製し、Lonza社のpEE6.4ベクター（ヒトIgG1定常領域をマルチクローニングサイトで組み込んである）に挿入し、キメラH鎖ベクターを作製した。同様に、マウスL鎖の軽鎖可変領域DNA（配列番号：62）をHindIII, BsiWIで切断して精製し、Lonza社のpEE14.4ベクター（ヒトKappa定常領域をマルチクローニングサイトに組み込んである）に挿入し、キメラL鎖ベクターを作製した。なお、重鎖のシグナル配列についてはヒトgermlineより選択したシグナル配列MELGLRWFLVAILEGVQC（配列番号：89）のシグナル配列を利用し、さらに軽鎖のシグナル配列についてはヒトgermlineより選択したシグナル配列MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARC（配列番号：90）のシグナル配列を利用した。

10

【0128】

[参考例11]

#### ヒト型化抗体可変領域の設計

CDR-grafting法に従い、ヒトフレームワークを選択し、マウスモノクローナル抗体3H3のCDRに置き換えた。

まず、H鎖可変領域フレームワーク、L鎖可変領域フレームワークそれぞれについてホモロジー検索を行った。

20

その結果、3H3抗体H鎖可変領域のフレームワーク（FR）領域（FR1領域（配列番号：107）、FR2領域（配列番号：108）、FR3領域（配列番号：109）、FR4領域（配列番号：110））は、ヒト抗体（Accession number AY882577（配列番号：95）のFR領域（FR1領域（配列番号：91）、FR2領域（配列番号：92）、FR3領域（配列番号：93）、FR4領域（配列番号：94））と高い相同性を持つことが分かった（図31（A）参照）。具体的には、H鎖について、マウス3H3抗体のFRと、CDR移植先ヒト抗体のFR部分の相同性は $80/87=91.9\%$ であった。

次に、これらのヒト抗体（Accession number AY882577）のFR領域に、3H3の重鎖CDR1～CDR3（配列番号：54～配列番号：56）が適切に移植されるように、アミノ酸配列を設計し、ヒト化抗体重鎖可変領域アミノ酸配列（配列番号：96）を設計した（図31（B）参照）。

30

重鎖のシグナル配列についてはヒトgermlineより選択したシグナル配列MELGLRWFLVAILEGVQCのシグナル配列を利用した。

3H3抗体H鎖可変領域と同様に、3H3抗体L鎖可変領域のフレームワーク（FR）領域（FR1領域（配列番号：111）、FR2領域（配列番号：112）、FR3領域（配列番号：113）、FR4領域（配列番号：114））も、ヒト抗体（Accession number AY942004（配列番号：103））のFR領域（FR1領域（配列番号：99）、FR2領域（配列番号：100）、FR3領域（配列番号：101）、FR4領域（配列番号：102））と高い相同性を持つことが分かった（図32（A）参照）。

具体的には、L鎖について、マウス3H3抗体のFRとCDR移植先ヒト抗体のFR部分の相同性は $65/80=81.3\%$ であった。

40

次に、ヒト抗体（Accession number AY942004）のFR領域に、3H3の軽鎖CDR1～CDR3（配列番号：59～配列番号：61）が適切に移植されるように、アミノ酸配列を設計し、ヒト化抗体軽鎖可変領域アミノ酸配列（配列番号：104）を設計した（図32（B）参照）。

軽鎖のシグナル配列についてはヒトgermlineより選択したシグナル配列MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARCのシグナル配列を利用した。

ヒト化抗体の重鎖及び軽鎖可変領域をコードするDNAは、50base程度の合成オリゴDNAを約20base程度ハイブリダイズするように設計し、これらの合成オリゴDNAをPCR法によりアッセムブリさせることにより作製した。重鎖可変領域をコードするDNAを、5'端の合成オリゴDNAの末端に挿入した制限酵素HindIII部位および3'端の

50

合成オリゴDNAの末端に挿入したXhoI部位で切断し、上記Lonza社のヒトIgG1定常領域がクローニングされたpEE6.4ベクターへクローニングした。また、軽鎖可変領域をコードするDNAを、5'端の合成オリゴDNAの末端に挿入した制限酵素HindIII部位および3'端の合成オリゴDNAの末端に挿入したBsiWI部位で切断し、上記ヒトκ鎖定常領域がクローニングされたpEE14.4ベクターへクローニングした。

上記の手法で作製したヒト化抗体3H3抗体の重鎖を3H3RHAと命名した(図33、シグナル配列-重鎖をコードする配列、塩基配列は配列番号97、アミノ酸配列は配列番号98)。同様に、ヒト化抗体3H3抗体の軽鎖を3H3RKAと命名した(図34、シグナル配列-軽鎖をコードする配列、塩基配列は配列番号105、アミノ酸配列は配列番号106)。

本明細書で開示した抗体の塩基配列およびアミノ酸配列は、以下の配列番号に従って配列表に記載されている。

<ヒト化3H3抗体>

配列番号96：重鎖可変領域のアミノ酸配列

配列番号98：重鎖のアミノ酸配列(シグナル配列を含む重鎖)

配列番号54：重鎖CDR1のアミノ酸配列

配列番号55：重鎖CDR2のアミノ酸配列

配列番号56：重鎖CDR3のアミノ酸配列

配列番号91：重鎖FR1のアミノ酸配列

配列番号92：重鎖FR2のアミノ酸配列

配列番号93：重鎖FR3のアミノ酸配列

配列番号94：重鎖FR4のアミノ酸配列

配列番号97：重鎖の塩基配列(シグナル配列を含む重鎖)

配列番号104：軽鎖可変領域のアミノ酸配列

配列番号106：軽鎖のアミノ酸配列(シグナル配列を含む軽鎖)

配列番号59：軽鎖CDR1のアミノ酸配列

配列番号60：軽鎖CDR2のアミノ酸配列

配列番号61：軽鎖CDR3のアミノ酸配列

配列番号99：軽鎖FR1のアミノ酸配列

配列番号100：軽鎖FR2のアミノ酸配列

配列番号101：軽鎖FR3のアミノ酸配列

配列番号102：軽鎖FR4のアミノ酸配列

配列番号105：軽鎖の塩基配列(シグナル配列を含む軽鎖)

【0129】

[参考例12]

トランスフェクション、発現

キメラ抗体のH鎖ベクター及びL鎖ベクター、ヒト化3H3抗体のH鎖ベクター及びL鎖ベクターについて、構築したH鎖ベクターとL鎖ベクターをそれぞれNotI、SalIで消化し、断片同士をライゲーションし、一つのベクターを構築した。その後、構築したDNAをPvuI切断により直鎖化し、エレクトロポレーションによりCHOK1SV細胞に導入した。エレクトロポレーション後、死細胞を含む細胞溶液をグルタミンフリーの10%FBSを含むグルタミンフリーDMEMに加え、50μlずつ96穴プレートに撒いた。24時間培養後、セクション試薬であるMSXを最終濃度25μMになるように、グルタミンフリーDMEM/10%FBS培地に溶解し、サプリメントとして、GS supplement(50倍溶液)を同培地に溶解し、先述した96穴プレートに150μlずつ添加した。その後、ELISAにて最も発現量の多いクローンを選択し、安定細胞株を樹立した。

培養上清中のIgG濃度は、培養上清を回収し、Goat anti-human IgG antibody, Fcγ fragment-specific(Stratech Scientific)、と Human IgG1/Kappa antibody(Bindingsite)でのサンドイッチELISAを行い、検出用として、Goat anti-human kappa light chain peroxidase conjugate(Sigma)を用い、市販の精製ヒトIgG(Cappel社)との比較により定量した。

【0130】

[参考例13]

抗原に対するELISA活性（ヒト化IgG1とキメラIgG1の比較；結合活性比較）

一部の条件を除き [参考例4] に記載の方法と同じ方法でキメラ抗体-IgG1、ヒト化3H3 (3H3RHA、3H3RKA) -IgG1の結合活性の濃度依存性を確認した。本方法は、吸収波長を650 nmに変更して検出し、IgG濃度が測定された培養上清を各横軸に記載の抗体濃度に希釈したサンプルとした点において [参考例4] に記載の方法と異なる。その結果、ヒト化IgG1はマウス可変領域を有するキメラIgG1とELISA結合活性の抗体濃度依存性が同等であった。なお、コントロールとしては293T細胞の培養上清を用いた (図35)。

【0131】

[参考例14]

Antibody-dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC)活性の低いIgG4型への変換

イメージング用途としては、IgG1型より、ADCC活性、CDC活性等の生理活性の低いIgG2又は4型が望ましいと考えられるため、ヒト化3H3 (3H3RHA、3H3RKA) -IgG1の定常領域をIgG4型へ変換した抗体を作製した。IgG4は不安定でヘテロな複合体を形成し、定常領域におけるKabat則によるナンバリングで241番目のアミノ酸であるセリンがその安定性に関わることが報告されており、このアミノ酸をIgG1型、IgG2型のプロリンへ変換することで安定性が改善されることが報告されている。そこで、241番目のアミノ酸をプロリンに変換した変異型IgG4をIgG1に換えて組み込んだpEE6.4ベクターを構築し、上記と同様の方法でヒト化3H3 (3H3RHA、3H3RLA) - IgG4を作成した (図36)。抗体発現、抗体濃度を測定後、結合活性比較を行った。

抗原に対するELISA活性（ヒト化変異型IgG4とキメラIgG1、ヒト化IgG1の比較；結合活性比較）

参考例13と同様の方法でヒト化3H3 (3H3RHA、3H3RLA) - IgG4抗体の結合活性をキメラ-IgG1、ヒト化3H3 (3H3RHA、3H3RLA) -IgG1と比較したところ、ELISA結合活性は同等であった (図37)。

【0132】

本実験により、近赤外蛍光物質 (Cy5.5、Alexa750) 標識抗体を用いることで、マウスにおける動脈硬化のイメージングが可能となったばかりではなく、3次元CTによる画像との統合も可能であることが判明した。またこの種の抗体がヒトの動脈硬化巣を検出できることも明らかになっており、本実験結果は臨床用の画像診断技術に繋がる。さらに、当該マウスイメージング技術は、創薬のためのスクリーニング系として既に実用可能なものである。

【産業上の利用可能性】

【0133】

従来の動脈硬化検査法では、動脈硬化の発症部位 (存在部位) が特定できない。これに対し、本発明は、動脈硬化巣 (特に石灰化病変) の存在部位やその大きさを視覚的に捉えることの出来る非侵襲的診断法を提供するものである。

動脈硬化好発モデルマウス (アポE欠質マウス：高い血漿コレステロール濃度を維持し、自然発生アテローム性動脈硬化様病変を発症する) と、当該イメージング用の抗体を用いることで、動脈硬化の治療薬のスクリーニング系が構築できる。

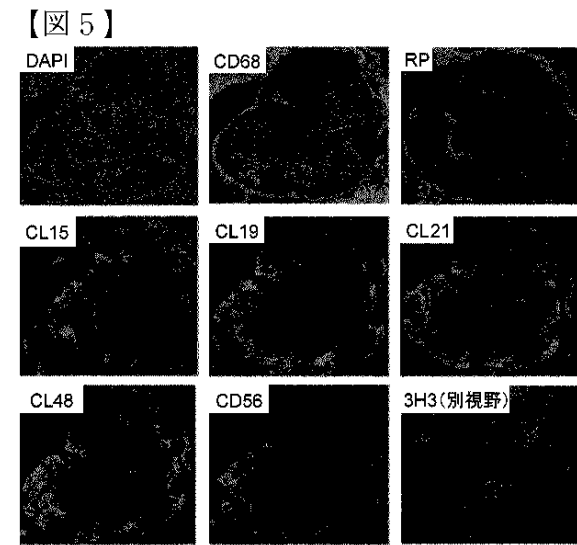
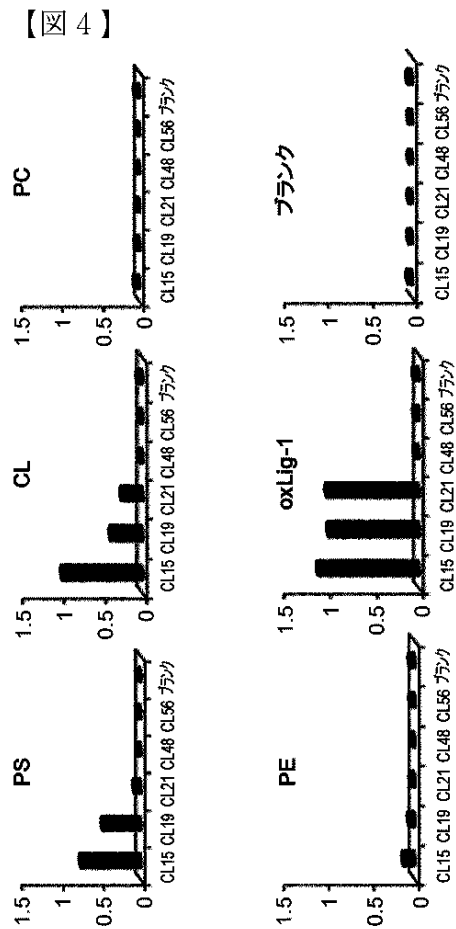
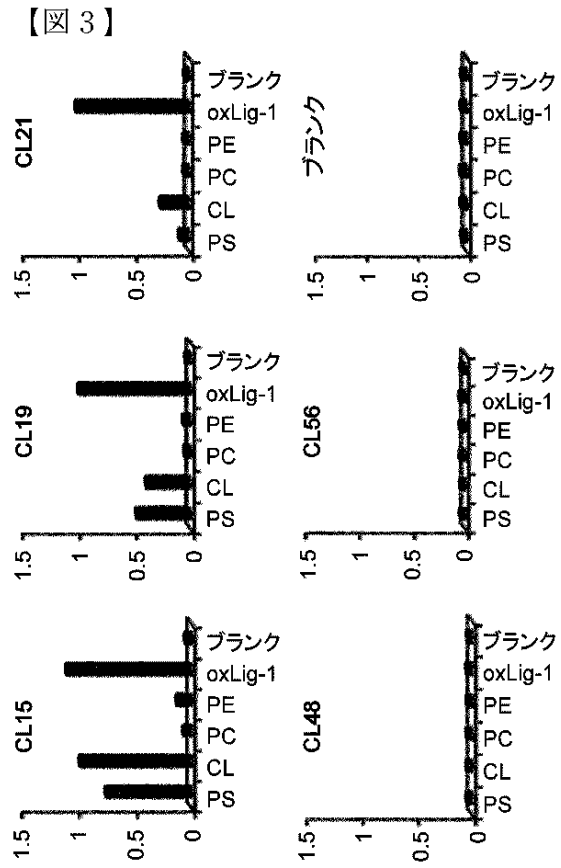
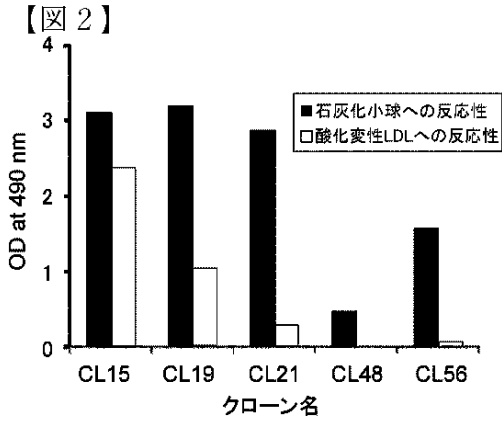
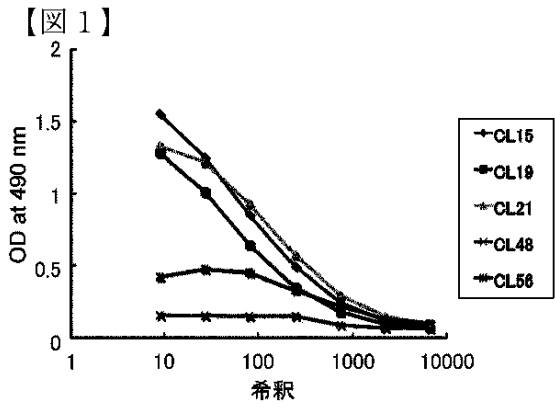
さらには、当該抗体をヒト化抗体に変換して、臨床診断用イメージングシステムを構築することが可能である。これにより、慢性的かつ無症候性に潜行進展するヒトの動脈硬化 (特に石灰化病変) をモニタリングでき、冠動脈石灰化は動脈硬化の早期より出現し、石灰化の程度と狭窄度が相関することが報告されており、また糖尿病患者において、冠動脈石灰化指数が冠動脈病変の重症度を反映することから、本発明は生活習慣病の予防、治療方針の一助になるといえる。

10

20

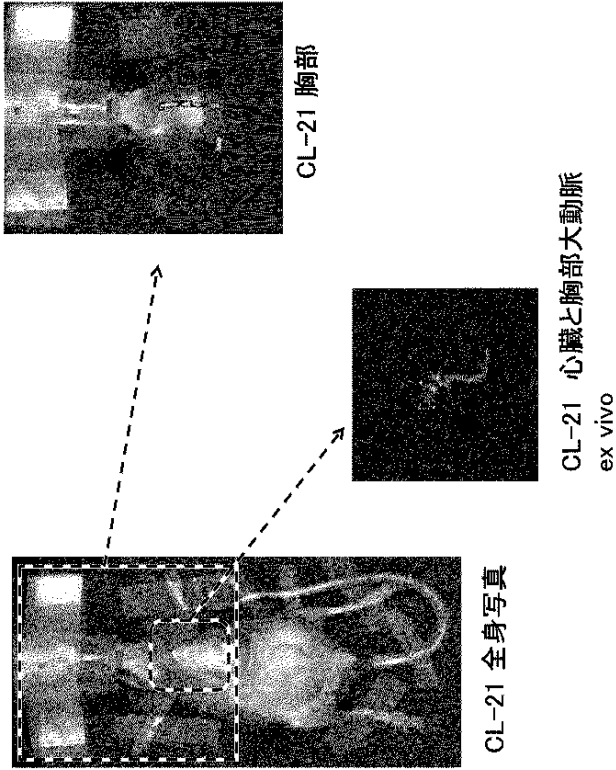
30

40

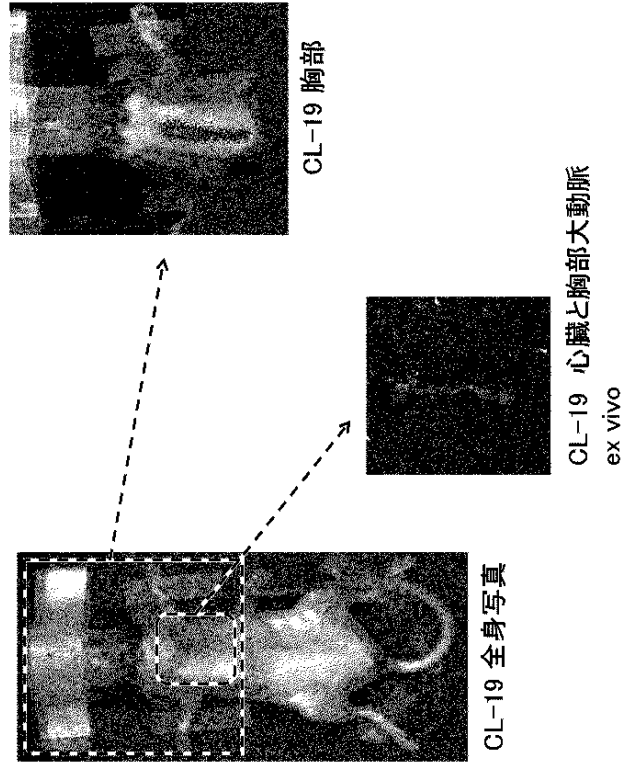




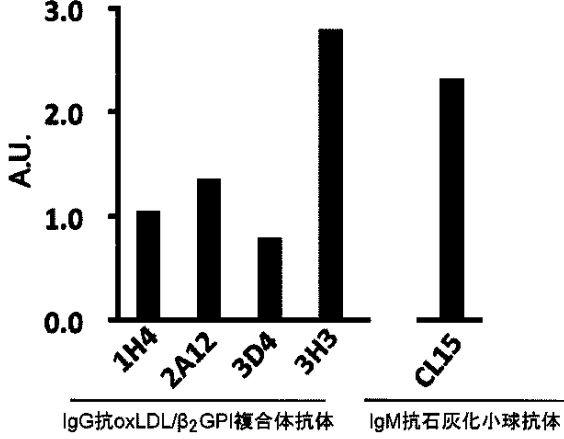
【図10】



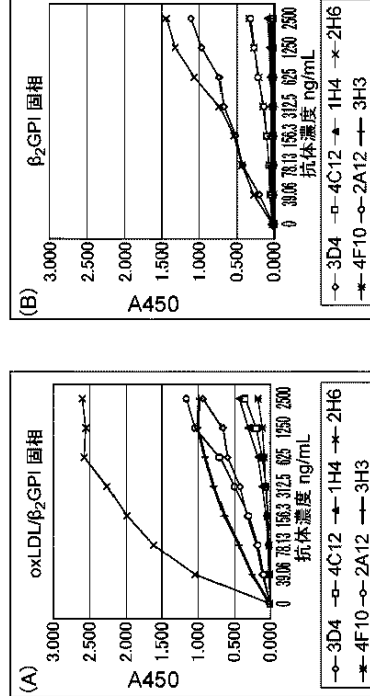
【図11】



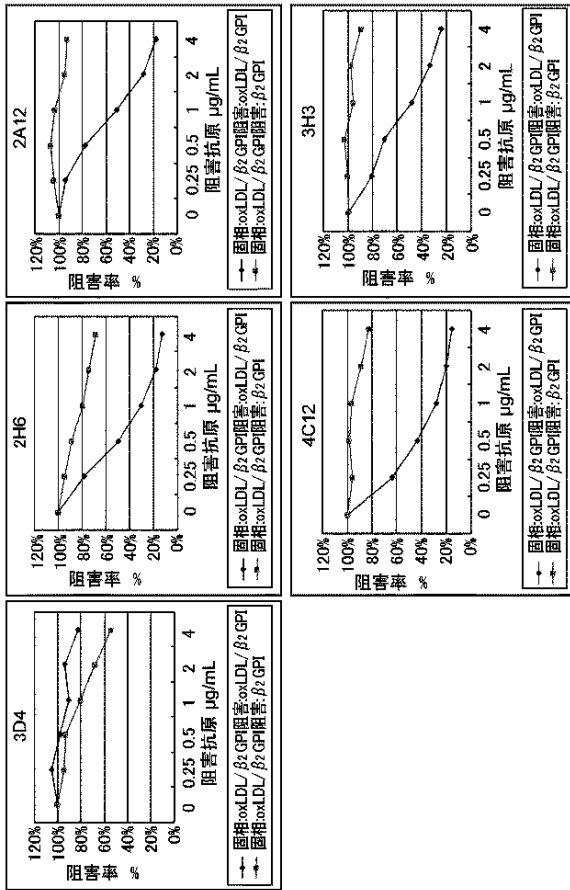
【図12】



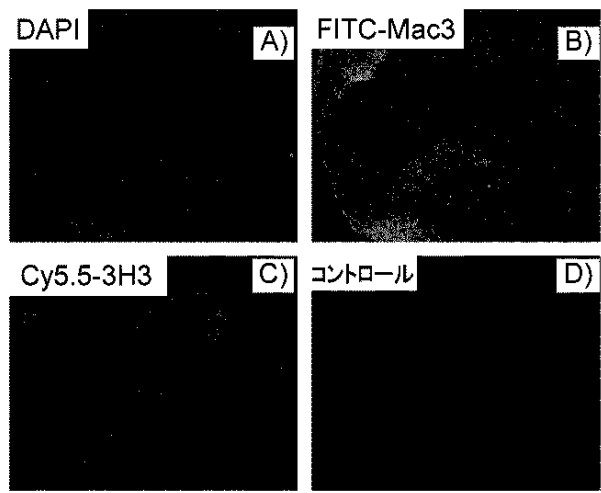
【図13】



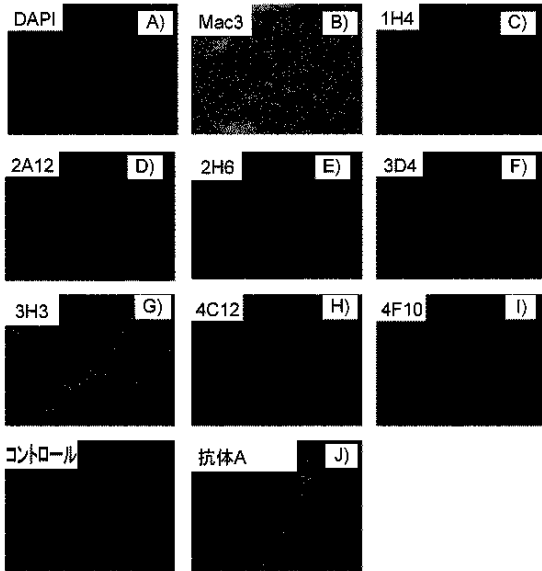
【図 1 4】



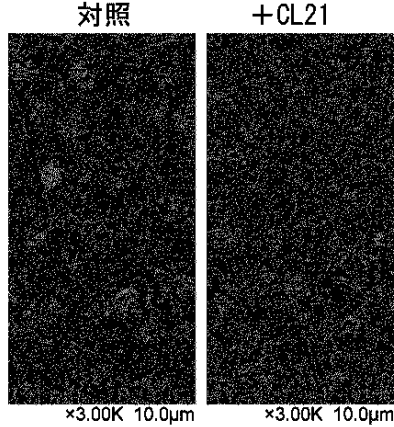
【図 1 5】



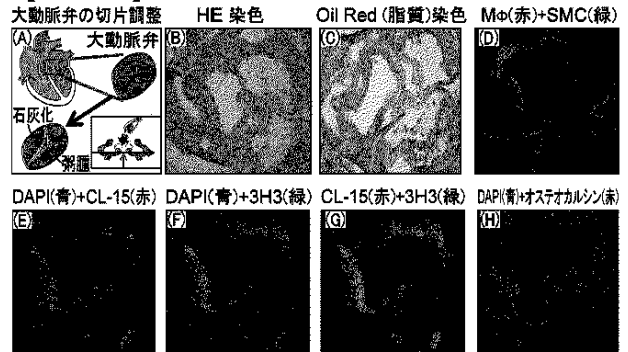
【図 1 6】



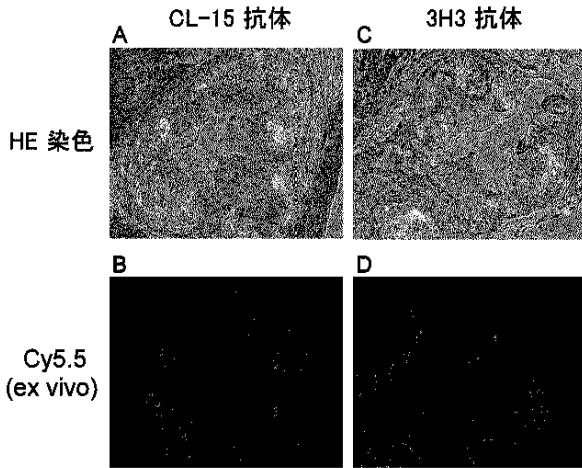
【図 1 7】



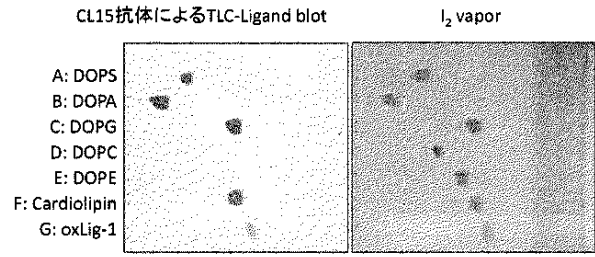
【図 1 8】



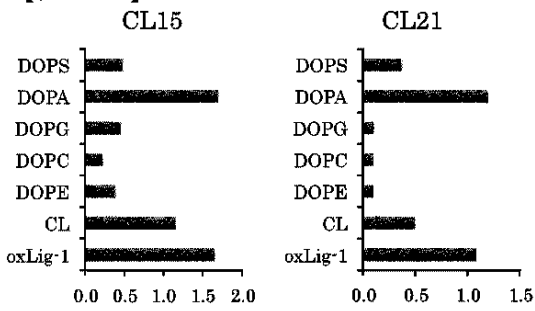
【図 1 9】



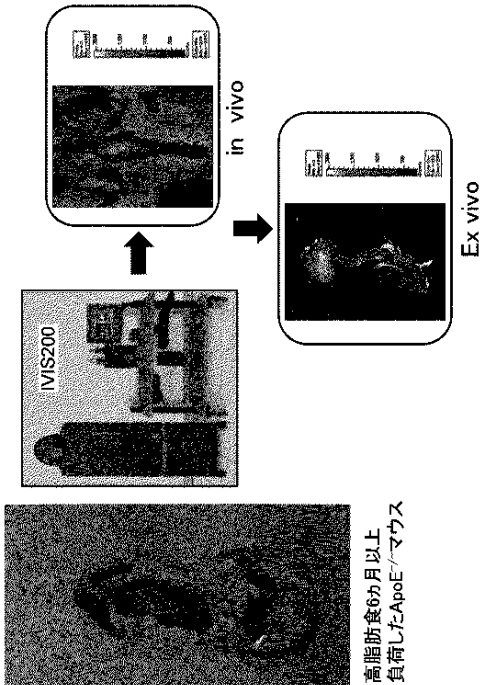
【図 2 1】



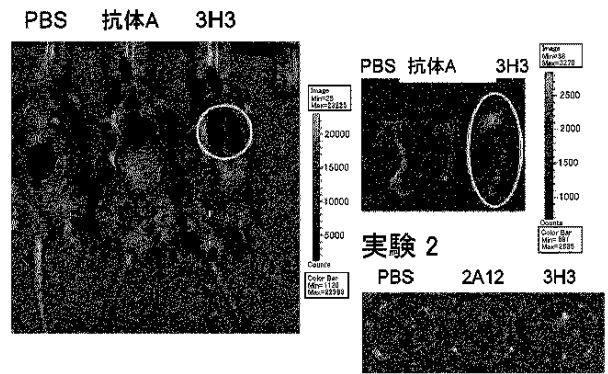
【図 2 0】



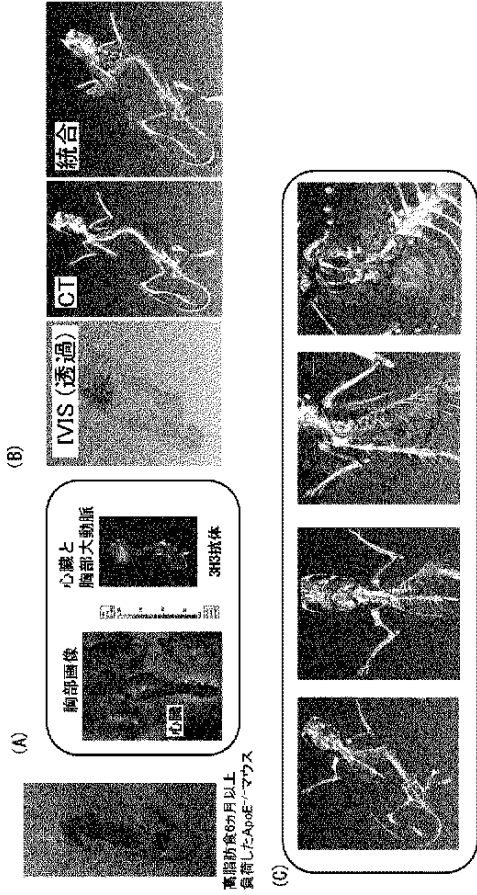
【図 2 2】



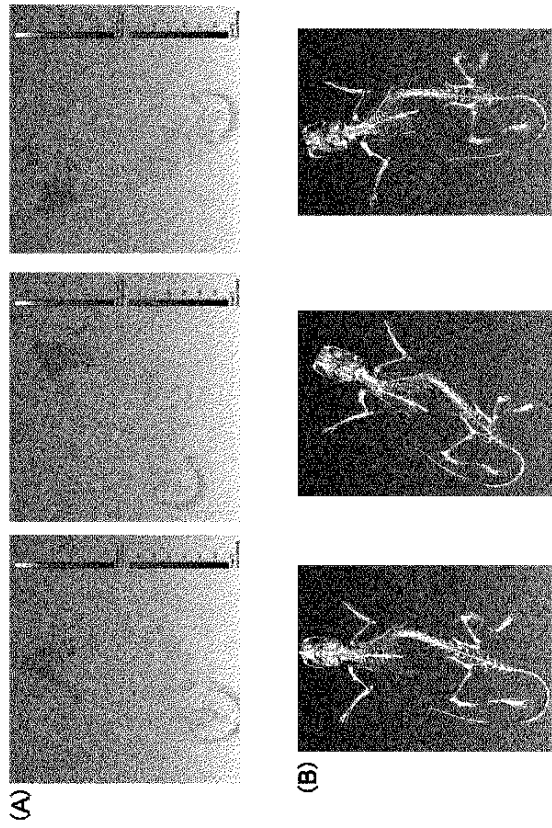
【図 2 3】  
実験 1



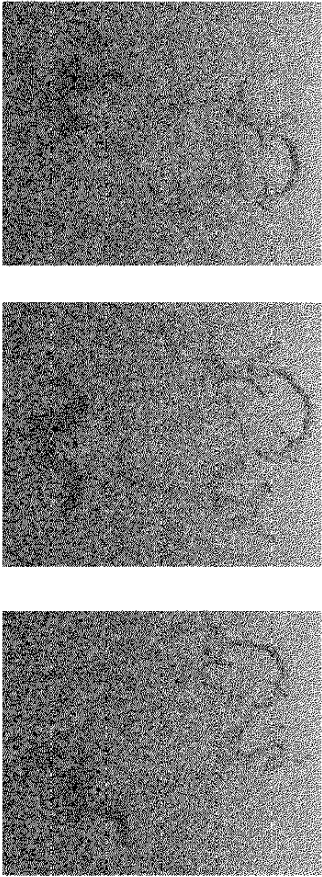
【図 2 4】



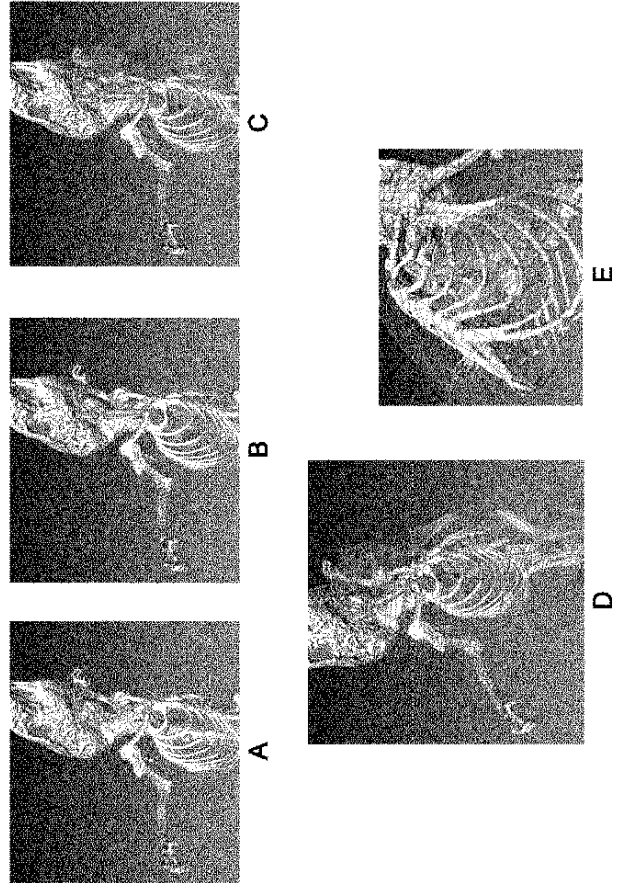
【図 2 5】



【図 2 6】



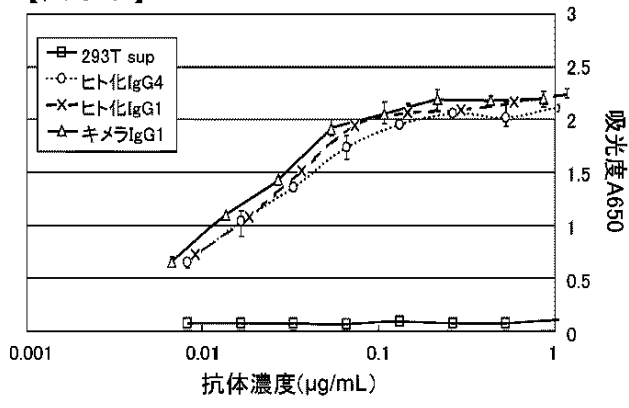
【図 2 7】







【図 3 7】



【配列表】

2009154283000001.app

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2009/061246
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K16/18(2006.01)i, A61K49/00(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i 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) C07K16/18, A61K49/00, C12P21/08, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2009 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2009 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2009 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA/BIOSIS/MEDLINE (STN), PubMed, JSTPlus (JDreamII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Eiji MATSUURA et al., "Kakkiteki na Domyaku Koka no Gazo Shindanho no Kakuritsu", Nanobio Hyoteki Iryoto no Aratana Iryo no Sozo to sono Kiban Gijutsu Kenkyu, 17 March, 2008 (17.03.08), pages 19 to 28	1-21
X	Eiji MATSUURA, "Kakkiteki na Domyaku Koka no Gazo Shindanho no Kakuritsu", Heisei 19 Nendo Monbu Kagakusho Tokubetsu Dengen Shozaiken Kagaku Gijutsu Shinko Jigyo 'Nanobai Hyoteki Iryoto no Aratana Iryo no Sozo to sono Kiban Gijutsu Kenkyu', Kenkyu Seika Hokokukai, [online], 13 March, 2008 (13.03.08), [retrieval date 09 July, 2009 (09.07.09)], Internet <URL: <a href="http://www.optic.or.jp/medical/itaku/dengen/080311.pdf">http://www.optic.or.jp/medical/itaku/dengen/080311.pdf</a> >	1-21
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 09 July, 2009 (09.07.09)		Date of mailing of the international search report 21 July, 2009 (21.07.09)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/061246

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Eiji MATSUURA, "Kakkiteki na Domyaku Koka no Gazo Shindanho no Kakuritsu", Heisei 19 Nendo Monbu Kagakusho Tokubetsu Dengen Shozaiken Kagaku Gijutsu Shinko Jigyo 'Nanobaio Hyoteki Iryoto no Aratana Iryo no Sozo to sono Kiban Gijutsu Kenkyu', Kenkyu Seika Hokokukai, 11 March, 2008 (11.03.08)	1-21
P,X	Eiji MATSUURA et al., "21 Seiki Iryo o Hiraku Morateki na Gazo Shindanho no Kakuritsu", Heisei 20 Nendo Monbu Kagakusho Tokubetsu Dengen Shozaiken Kagaku Gijutsu Shinko Jigyo 'Nanobaio Hyoteki Iryoto no Aratana Iryo no Sozo to sono Kiban Gijutsu Kenkyu' Kenkyu Seika Hokokukai Yoshishu, 10 March, 2009 (10.03.09), pages 17 to 21	1-21
P,X	Eiji MATSUURA, "21 Seiki Iryo o Hiraku Morateki na Gazo Shindanho no Kakuritsu", Site of Medical Techno Okayama, [online], 25 March, 2009 (25.03.09), [retrieval date 09 July, 2009 (09.07.09)], <URL:http://www.optic.or.jp/medical/itaku/dengen/matsuura.pdf>	1-21
P,X	Eiji MATSUURA et al., "21 Seiki Iryo o Hiraku Morateki na Gazo Shindanho no Kakuritsu", Heisei 20 Nendo Monbu Kagakusho Hojo Jigyo Seika Hokokusho (Tokubetsu Dengen Shozaiken Kagaku Gijutsu Shinko Jigyo Hojokin) 'Nanobaio Hyoteki Iryoto no Aratana Iryo no Sozo to sono Kiban Gijutsu Kenkyu' Kenkyu Seika Hokokusho, 25 March, 2009 (25.03.09), pages 82 to 95	1-21
A	Takao KOIDE et al., "Jin·Nyoro Kesseki no Shotai wa", Journal of Practical Pharmacy, Vol.38, 1987, pages 7 to 12	1-21
P,A	Takumi KOBUN, "Okadaihatsu Igaku·Iryo no Saizensen Vol.27 Kesseki kara Nazo no Biseibutsu", Okayama Nichinichi Shinbun, 23 February, 2009 (23.02.09)	1-21
P,A	Takumi KOBUN, "Okadaihatsu Igaku·Iryo no Saizensen Vol.27 Kesseki kara Nazo no Biseibutsu", Okayama University Organization for Research Promotion & Collaboration Website, [online], 25 February, 2009 (25.02.09), [retrieval date 09 July, 2009 (09.07.09)], Internet, <URL:http://www.okayama-u.net/medic/icon/materials/results/0902vol27.pdf>	1-21
P,A	Takumi KOBUN, "Okadaihatsu Igaku·Iryo no Saizensen Vol.28 Nazo no Biseibutsu no Shotai wa?", Okayama Nichinichi Shinbun, 23 March, 2009 (23.03.09)	1-21

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/061246

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	Takumi KOBUN, "Okadaihatsu Igaku·Iryo no Saizensen Vol.28 Nazo no Biseibutsu no Shotai wa?", Okayama University Organization for Research Promotion & Collaboration Website, [online], 27 March, 2009 (27.03.09), [retrieval date 09 July, 2009 (09.07.09)], <URL:http://www.okayama-u.net/medic/icont/materials/results/0904vol28.pdf>	1-21
P, A	Takumi KOBUN, "Okadaihatsu Igaku·Iryo no Saizensen Vol.29 Sekkaika Shokyu ni Tokushu na Shishitsu", Okayama Nichinichi Shinbun, 20 April, 2009 (20.04.09)	1-21
P, A	Takumi KOBUN, "Okadaihatsu Igaku·Iryo no Saizensen Vol.29 Sekkaika Shokyu ni Tokushu na Shishitsu", Okayama University Organization for Research Promotion & Collaboration Website, [online], 24 April, 2009 (24.04.09), [retrieval date 09 July, 2009 (09.07.09)], Internet, <URL:http://www.okayama-u.net/medic/icont/materials/results/0904vol29.pdf>	1-21
P, A	Takumi KOBUN, "Okadaihatsu Igaku·Iryo no Saizensen Vol.30 Domyaku Koka nimo Hyoteki Iryo o Tekiyo", Okayama Nichinichi Shinbun, 25 May, 2009 (25.05.09)	1-21
P, A	Takumi KOBUN, "Okadaihatsu Igaku·Iryo no Saizensen Vol.30 Domyaku Koka nimo Hyoteki Iryo o Tekiyo", Okayama University Organization for Research Promotion & Collaboration Website, [online], 27 May, 2009 (27.05.09), [retrieval date 09 July, 2009 (09.07.09)], Internet, <URL:http://www.okayama-u.net/medic/icont/materials/results/0905vol30.pdf>	1-21

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 9 / 0 6 1 2 4 6	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K16/18(2006.01)i, A61K49/00(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K16/18, A61K49/00, C12P21/08, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2009年 日本国実用新案登録公報 1996-2009年 日本国登録実用新案公報 1994-2009年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CA/BIOSIS/MEDLINE (STN) PubMed JSTPlus (JDreamII)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
X	松浦栄次他, 画期的な動脈硬化の画像診断法の確立, ナノバイオ標的医療等の新たな医療の創造とその基盤技術研究, 2008.03.17, p.19-28	1-21	
X	松浦栄次, 画期的な動脈硬化の画像診断法の確立, 平成19年度文部科学省特別電源所在県科学技術振興事業「ナノバイオ標的医療等の新たな医療の創造とその基盤技術研究」研究成果報告会, [online], 2008.03.13, [検索日 2009.07.09], インターネット <URL:http://www.optic.or.jp/medical/itaku/dengen/080311.pdf>	1-21	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。	
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 09.07.2009		国際調査報告の発送日 21.07.2009	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 松原 寛子	4 B 4 1 5 4
		電話番号 03-3581-1101 内線	3448

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 9 / 0 6 1 2 4 6

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	松浦栄次, 画期的な動脈硬化の画像診断法の確立, 平成19年度文部科学省特別電源所在県科学技術振興事業「ナノバイオ標的医療等の新たな医療の創造とその基盤技術研究」研究成果報告会, 2008.03.11	1-21
P, X	松浦栄次他, 21世紀医療を拓く網羅的な画像診断法の確立, 平成20年度特別電源所在県科学技術振興事業『ナノバイオ標的医療等の新たな医療の創造とその基盤技術研究』研究成果報告会要旨集, 2009.03.10, p.17-21	1-21
P, X	松浦栄次, 21世紀医療を拓く網羅的な画像診断法の確立, メディカルテクノおかやまHP, [online], 2009.03.25, [検索日 2009.07.09], インターネット, <URL:http://www.optic.or.jp/medical/itaku/dengen/matsuura.pdf>	1-21
P, X	松浦栄次他, 21世紀医療を拓く網羅的な画像診断法の確立, 平成20年度文部科学省補助事業成果報告書(特別電源所在県科学技術振興事業補助金)『ナノバイオ標的医療等の新たな医療の創造とその基盤技術研究』研究成果報告書, 2009.03.25, p.82-95	1-21
A	小出卓生他, 腎・尿路結石の正体は, 薬局, Vol.38, 1987, p.7-12	1-21
P, A	公文裕巳, 岡大発医学・医療の最前線Vol.27 結石から謎の微生物, 岡山日日新聞, 2009.02.23	1-21
P, A	公文裕巳, 岡大発医学・医療の最前線Vol.27 結石から謎の微生物, 岡山大学 研究推進産学官連携機構 Website, [online], 2009.02.25, [検索日 2009.07.09], インターネット, <URL:http://www.okayama-u.net/medic/icon/materials/results/0902vol27.pdf>	1-21
P, A	公文裕巳, 岡大発医学・医療の最前線Vol.28 謎の微生物の正体は?, 岡山日日新聞, 2009.03.23	1-21
P, A	公文裕巳, 岡大発医学・医療の最前線Vol.28 謎の微生物の正体は?, 岡山大学 研究推進産学官連携機構 Website, [online], 2009.03.27, [検索日 2009.07.09], インターネット, <URL:http://www.okayama-u.net/medic/icon/materials/results/0904vol28.pdf>	1-21

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 9 / 0 6 1 2 4 6

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
P, A	公文裕巳, 岡大発医学・医療の最前線V o 1. 2 9 石灰化小球に特殊な脂質, 岡山日日新聞, 2009. 04. 20	1-21
P, A	公文裕巳, 岡大発医学・医療の最前線V o 1. 2 9 石灰化小球に特殊な脂質, 岡山大学 研究推進産学官連携機構 Website, [online], 2009. 04. 24, [検索日 2009. 07. 09], インターネット, <URL:http://www.okayama-u.net/medic/icont/materials/results/0904vol129.pdf>	1-21
P, A	公文裕巳, 岡大発医学・医療の最前線V o 1. 3 0 動脈硬化にも標的医療を適用, 岡山日日新聞, 2009. 05. 25	1-21
P, A	公文裕巳, 岡大発医学・医療の最前線V o 1. 3 0 動脈硬化にも標的医療を適用, 岡山大学 研究推進産学官連携機構 Website, [online], 2009. 05. 27, [検索日 2009. 07. 09], インターネット, <URL:http://www.okayama-u.net/medic/icont/materials/results/0905vol130.pdf>	1-21

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I			テーマコード(参考)
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/10	1 0 1	
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5	
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N	33/15	Z	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/50	Z	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	S	
	C 1 2 N	15/00	A	

(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,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),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,CL,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,KG,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,PE,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

## 特許法第30条第1項適用申請有り

(出願人による申告)平成19年度及び平成20年度、文部科学省特別電源所在県科学技術振興事業「ナノバイオ標的医療等の新たな医療の創造とその基盤技術研究事業」に係る委託研究、産業技術力強化法第19条の適用を受けるもの

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100130845

弁理士 渡邊 伸一

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889

弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 松浦 栄次

岡山県岡山市北区鹿田町2丁目5番1号 国立大学法人岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科内

(72)発明者 公文 裕巳

岡山県岡山市北区鹿田町2丁目5番1号 国立大学法人岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科内

(72)発明者 小島 和夫

長野県伊那市手良沢岡1063-103 株式会社医学生物学研究所内

Fターム(参考) 2G045 AA25 AA40 DA61 DA77 FB03

4B024 AA01 AA11 BA43 CA02 DA02 EA04 GA11 HA03

4B064 AG27 CA10 CA19 CA20 CC24 CE12 DA01 DA13

4C085 AA13 AA14 BB50 CC22 CC23 DD62 EE01 HH01 JJ01 KA04

KA05 KA27 LL01

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA76 EA28 EA50 FA72  
FA74 GA26

(注) この公表は、国際事務局（W I P O）により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願（日本語実用新案登録出願）の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	抗钙化小球的抗体及其用途		
公开(公告)号	<a href="#">JPWO2009154283A1</a>	公开(公告)日	2011-12-01
申请号	JP2010517987	申请日	2009-06-19
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社医学生物学研究所		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人冈山大学 株式会社医学生物学研究所		
[标]发明人	松浦 荣次 公文 裕巳 小島 和夫		
发明人	松浦 荣次 公文 裕巳 小島 和夫		
IPC分类号	C07K16/18 C12P21/08 A61K49/00 A61K39/395 A61P9/10 A61P43/00 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 C12N15/09		
CPC分类号	C07K16/18 A61K2039/505 C07K2317/56 C07K2317/565 G01N33/5088 G01N2800/323		
FI分类号	C07K16/18.ZNA C12P21/08 A61K49/00.Z A61K39/395.D A61K39/395.N A61P9/10.101 A61P43/00.105 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.S C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA40 2G045/DA61 2G045/DA77 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA43 4B024/CA02 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA03 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA13 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB50 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/HH01 4C085/JJ01 4C085/KA04 4C085/KA05 4C085/KA27 4C085/LL01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	清水 初衷 井上 隆一 佐藤 俊光 小林 智彦 渡边 真一 正人 大关 五十 岚弘		
优先权	PCT/JP2009/054475 2009-03-09 WO 2008162566 2008-06-20 JP 2008308016 2008-12-02 JP		
其他公开文献	JP5739157B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明人使用肾/尿路结石来源的钙化小球或颈动脉来源的动脉粥样硬化斑块进行免疫，然后通过用NLO筛选获得对钙化小球(NLO)具有特异性的抗体。本发明人证明了该抗体通过使用荧光标记的抗体对动脉硬化病变(钙化病变)和可视化的动脉粥样斑块(特别是钙化病变)特异性反应。因此，本发明人完成了本发明。

(5) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 16/18 (2006.01)</b>	C07K 16/18 ZNA	2G045
<b>C12P 21/08 (2006.01)</b>	C12P 21/08	4B024
<b>A61K 49/00 (2006.01)</b>	A61K 49/00 Z	4B064
<b>A61K 39/395 (2006.01)</b>	A61K 39/395 D	4C085
<b>A61P 9/10 (2006.01)</b>	A61K 39/395 N	4H045
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 68 頁) 最終頁に

出願番号	特願2010-517987 (P2010-517987)	(71) 出願人	504147243
(21) 国際出願番号	PCT/JP2009/061246		国立大学法人 岡山大学
(22) 国際出願日	平成21年6月19日 (2009.6.19)		岡山県岡山市北区津島中一丁目1番1号
(31) 優先権主張番号	PCT/JP2009/054475	(71) 出願人	390004097
(32) 優先日	平成21年3月9日 (2009.3.9)		株式会社医学生物学研究所
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		愛知県名古屋市中区栄四丁目5番3号
(31) 優先権主張番号	特願2008-162566 (P2008-162566)	(74) 代理人	100102978
(32) 優先日	平成20年6月20日 (2008.6.20)		弁理士 清水 初志
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(74) 代理人	100102118
(31) 優先権主張番号	特願2008-308016 (P2008-308016)		弁理士 春名 雅夫
(32) 優先日	平成20年12月2日 (2008.12.2)	(74) 代理人	100160923
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		弁理士 山口 裕孝
		(74) 代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊