

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5399710号
(P5399710)

(45) 発行日 平成26年1月29日(2014.1.29)

(24) 登録日 平成25年11月1日(2013.11.1)

(51) Int.Cl.		F I	
C07K	16/18	(2006.01)	C O 7 K 16/18 Z N A
C12N	15/02	(2006.01)	C 1 2 N 15/00 C
C07K	16/46	(2006.01)	C O 7 K 16/46
C12P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P 21/08
A61K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K 39/395 N

請求項の数 15 (全 34 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2008-541053 (P2008-541053)	(73) 特許権者	501416243 株式会社ジーンテクノサイエンス 北海道札幌市中央区北2条西9丁目1番地
(86) (22) 出願日	平成19年10月25日(2007.10.25)	(74) 代理人	100092783 弁理士 小林 浩
(86) 国際出願番号	PCT/JP2007/071279	(74) 代理人	100126354 弁理士 藤田 尚
(87) 国際公開番号	W02008/050907	(74) 代理人	100104282 弁理士 鈴木 康仁
(87) 国際公開日	平成20年5月2日(2008.5.2)	(72) 発明者	今 重之 北海道札幌市中央区北2条西9丁目1番地 株式会社ジーンテクノサイエンス内
審査請求日	平成22年10月12日(2010.10.12)	(72) 発明者	木村 千恵美 北海道札幌市北区北21条西5丁目1-1 6 ラブランカ・215 204 最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	特願2006-290737 (P2006-290737)		
(32) 優先日	平成18年10月26日(2006.10.26)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		
微生物の受託番号	IPOD FERM BP-10440		
微生物の受託番号	IPOD FERM BP-10441		
前置審査			

(54) 【発明の名称】細胞外マトリックスタンパク質のアミノ酸配列RGDに対する抗体およびその製法と用途

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

重鎖の相補性決定領域1(CDRH1)、2(CDRH2)、および3(CDRH3)におけるアミノ酸配列として、それぞれ配列番号1、3、および5のアミノ酸配列を、軽鎖の相補性決定領域1(CDRL1)、2(CDRL2)、および3(CDRL3)におけるアミノ酸配列として、それぞれ配列番号7、9、および11のアミノ酸配列を含む抗RGD抗体。

【請求項2】

重鎖の相補性決定領域1(CDRH1)、2(CDRH2)、および3(CDRH3)におけるアミノ酸配列として、それぞれ配列番号2、4、および6のアミノ酸配列を、軽鎖の相補性決定領域1(CDRL1)、2(CDRL2)、および3(CDRL3)におけるアミノ酸配列として、それぞれ配列番号8、10、および12のアミノ酸配列を含む抗RGD抗体。

【請求項3】

ヒト、マウス、またはその両方の細胞外マトリックスタンパク質のRGD配列を特異的に認識する請求項1または2に記載の抗RGD抗体。

【請求項4】

モノクローナル抗体である、請求項1～3のいずれかに記載の抗RGD抗体。

【請求項5】

ヒトおよびマウスの細胞外マトリックスタンパク質のRGD配列を特異的に認識する、

請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の抗 R G D 抗体。

【請求項 6】

ヒト、マウス、またはその両方の細胞外マトリックスタンパク質と R G D 受容体との結合を阻害する請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の抗 R G D 抗体。

【請求項 7】

キメラ抗体である請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の抗 R G D 抗体。

【請求項 8】

ヒト化抗体である請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の抗 R G D 抗体。

【請求項 9】

受託番号 F E R M B P - 1 0 4 4 0、F E R M B P - 1 0 4 4 1 で標示されるハイブリドーマ細胞により産生される抗 R G D モノクローナル抗体。 10

【請求項 10】

請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の抗 R G D 抗体を有効成分として含む癌、炎症性疾患、感染症、自己免疫疾患または骨疾患の治療剤。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の抗 R G D 抗体を有効成分として含む癌、炎症性疾患、感染症、自己免疫疾患または骨疾患の診断剤。

【請求項 12】

受託番号 F E R M B P - 1 0 4 4 0 または F E R M B P - 1 0 4 4 1 で表示されるハイブリドーマ細胞から抗体を産生することを特徴とする、請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の抗 R G D 抗体の製造方法。 20

【請求項 13】

請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の抗 R G D 抗体の相補性決定領域をヒト抗体に遺伝子工学的に組込んだキメラ抗体の製造方法。

【請求項 14】

請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載のモノクローナル抗体の相補性決定領域をヒト抗体に遺伝子工学的に組込んだヒト化抗体の製造方法。

【請求項 15】

受託番号 F E R M B P - 1 0 4 4 0 または F E R M B P - 1 0 4 4 1 で表示されるハイブリドーマ細胞。 30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞外マトリックスタンパク質のアミノ酸配列 R G D に対する抗体および当該抗体を用いた癌、炎症性疾患、自己免疫疾患、感染症、骨疾患の予防、治療方法および診断方法に関する。

【背景技術】

【0002】

細胞接着は、多細胞生物の生命維持に重要な役割を果たしている。多細胞生物の細胞接着は、細胞 - 細胞外マトリックス間接着と細胞 - 細胞間接着に分類され、細胞 - 細胞外マトリックス間接着にはインテグリンが、細胞 - 細胞間接着にはカドヘリン、クローディン、ネクチンなどが細胞接着に関与していることが解明されてきている。また、これらの接着分子は、細胞接着の役割だけでなく、細胞内へのシグナル伝達にも直接関わっていることも明らかになりつつある。 40

細胞と細胞外マトリックスを連結する接着は、インテグリンに代表される膜貫通細胞接着タンパク質により構成されている。インテグリンは、鎖と鎖のヘテロ二量体で構成され、異なる鎖と鎖の組合せで、少なくとも 2 4 種類のインテグリン分子が存在し、それぞれ特異的な細胞外マトリックス分子と結合する。それにより、インテグリンを含む膜貫通細胞接着タンパク質は、細胞と細胞外マトリックスの接着のみならず、細胞外マトリックスからの情報を細胞内へシグナルとして伝達し、細胞の増殖、運動、細胞死、分化 50

などを調節している (F. G. Giancotti, et al., Science, 285, 1028 - 1032, 1999)。

細胞外マトリックス分子の種類は、コラーゲン群 (タイプ I ~ X I X など)、非コラーゲン性糖タンパク質群 (オステオポンチン、ピトロネクチン、ファイブロネクチン、フォンビルブランド因子、ラミニン、テネイシン、フィブリノーゲン、トロンボスポンジンなど)、エラスチン群およびプロテオグリカン群 (ヘパラン硫酸プロテオグリカンなど) に分類され、多くのタンパク質が知られている。これらの細胞外マトリックス分子 (リガンド) は、対応するインテグリンに結合すると、細胞内のシグナル伝達経路を活性化し、続いて細胞骨格形成、移動、増殖、分化などを調節する。すなわち、リガンドと結合したインテグリンは、細胞表面のレセプター型チロシンキナーゼと協同してこれらのシグナル活性経路を制御し、リガンドの種類により、それに対応するインテグリンはそれぞれ異なるシグナルを伝達する。多くの細胞外マトリックスタンパク質に共通して存在する細胞接着領域として、R G D (アルギニン - グリシン - アスパラギン酸) 配列がある。従って、細胞外マトリックスタンパク質の R G D 配列は、インテグリンと接着することにより多様な機能を発揮することから、医薬標的として注目され、多くの低分子化合物や合成ペプチドが作製されている。

R G D 配列と結合するインテグリンとして、 $\alpha 3 \beta 1$ 、 $\alpha 5 \beta 1$ 、 $\alpha 8 \beta 1$ 、 $\alpha v \beta 1$ 、 $\alpha v \beta 3$ 、 $\alpha v \beta 5$ 、 $\alpha v \beta 6$ 、 $\alpha v \beta 8$ が存在する。インテグリンを介するシグナル伝達機構の研究は、これまで $\alpha 5 \beta 1$ とその特異的なリガンドであるファイブロネクチンとの相互作用の解明を中心に進められてきた。その結果、 $\alpha 5 \beta 1$ は細胞接着と細胞移動だけでなく、細胞の分化や細胞死をも制御することが明らかになった (S. M. Frisch et al.: Curr. Opin. Cell Biol., 9, 701 - 706, 1997)。しかし、リガンドによってインテグリンを介するシグナルは異なり、ファイブロネクチンが接着した内皮細胞は増殖因子の刺激により増殖活性を示すが、同様な細胞がラミニン - 1 に接着すると、増殖活性がなくなり、逆に増殖抑制を示す。また、ラミニン - 10 / 11 から $\alpha 3 \beta 1$ を介するシグナルは、ファイブロネクチンから $\alpha 5 \beta 1$ を介するシグナルと異なり、癌細胞の運動を強く促進し (J. Gu et al., J. Biol. Chem., 276, 27090 - 27097, 2001)、血液飢餓によるアポトーシスを強く回避する (J. Gu et al., J. Biol. Chem., 277, 19922 - 19928, 2002)。

R G D 配列と結合するインテグリンのうち、 αv インテグリンは破骨細胞や新生血管に高発現しており、 αv インテグリンは、骨粗鬆症や癌治療薬の標的分子になっている。また、 $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンは腫瘍細胞上に高発現しており、癌の悪性化に関与していることが示されている。これらのことから、抗 $\alpha 5 \beta 1$ インテグリン抗体 (Volociximab)、抗 $\alpha 4 \beta 1$ インテグリン抗体 (Natalizumab)、抗 $\alpha v \beta 3$ インテグリン抗体 (Vitaxin) は、細胞外マトリックスタンパク質がインテグリンに結合するのを阻害するアンタゴニストとしてインテグリンに対する抗体医薬品として開発されている。

一方、R G D 配列を含有する細胞外マトリックスタンパク質としては、コラーゲン、オステオポンチン (OPN)、ピトロネクチン、ファイブロネクチン、フォンビルブランド因子、ラミニン、テネイシン、フィブリノーゲン、トロンボスポンジン等が知られている。また、ウイルスや細菌も R G D 配列を有し、細胞への接着に関与している。R G D 配列を含有する OPN は、骨に多く含有されるカルシウム結合性の酸性糖タンパク質で、細胞接着、細胞遊走、腫瘍形成、免疫応答ならびに補体介在の細胞溶解など多くの重要な機能を担っている。また、OPN の欠損マウスや中和抗体を用いた解析から、肝炎、関節リウマチ等の自己免疫疾患や癌転移に関与することが示されている。そこで、R G D を介する細胞と細胞外マトリックスタンパク質の接着を阻害することにより、骨粗鬆症や癌の治療が期待されるので、インテグリンとは逆に細胞外マトリックスタンパク質側からもアンタゴニスト医薬品が開発されている。

【発明の開示】

【0003】

10

20

30

40

50

これまで R G D 配列を介するインテグリンとの相互作用を阻害する低分子化合物や合成ペプチド、O P N やインテグリンに対する抗体が作製されているが、R G D 配列に対する特異的抗体は存在しない。また、O P N やインテグリンに対する抗体は R G D 配列以外での細胞外マトリックスタンパク質とインテグリンの結合阻害により、目的外の生体内での作用が生じ、副作用の発生が懸念される。

従って、R G D 配列を介する接着を特異的に阻害することにより、炎症、癌、感染症、自己免疫、骨粗鬆症などの疾患に効率的な効果と同時に副作用の軽減が期待でき、これらの疾患に対してより優れた治療法の提供が強く望まれている。また、ヒトの O P N やインテグリンに対する抗体は病態モデル動物で効果を評価する際に、その抗体がその動物の標的タンパク質あるいはペプチドに交差反応しないため、その動物の標的タンパク質あるいはペプチドに対する異種動物の抗体で薬効評価するのが一般的で、ヒトに投与されるキメラ抗体、ヒト化抗体またはヒト抗体と病態モデル動物で評価する抗体とは全く異なる。これは医薬品の開発上で大きな問題点であるので、ヒトの治療に使用する抗体を用いて病態モデル動物でその治療効果を評価できることが囑望されている。

本発明者は、R G D 配列を介する細胞外マトリックスタンパク質とインテグリンの結合を阻害する目的で、R G D 配列に対する抗体の作製に関して種々の研究を行った結果、R G D 配列を含むマウス O P N の部分ペプチドでマウスのモノクローナル抗体を作製することができ、その R G D 配列に対する抗体はヒトの細胞外マトリックスタンパク質の R G D 配列にも交差反応し、抗炎症効果、抗癌効果などを有していることを見出し、本発明を完成した。

すなわち、具体的には、本発明は、以下に記載の抗 R G D 抗体、該抗 R G D 抗体の製造方法、該抗 R G D 抗体を有効性として含む、癌、炎症性疾患、感染症、自己免疫疾患または骨疾患の診断剤および治療剤、ならびに該抗 R G D 抗体のキメラ抗体、ヒト化抗体あるいはヒト抗体の製造方法等を提供するものである。

- (1) 配列番号 1 ~ 12 のうちのいずれかのアミノ酸配列を含む抗 R G D 抗体。
- (2) 配列番号 1、3、5、7、9 または 11 のアミノ酸配列を含む抗 R G D 抗体。
- (3) 配列番号 1、3、5、7、9 および 11 のアミノ酸配列を含む抗 R G D 抗体。
- (4) 配列番号 2、4、6、8、10 または 12 のアミノ酸配列を含む抗 R G D 抗体。
- (5) 配列番号 2、4、6、8、10 および 12 のアミノ酸配列を含む抗 R G D 抗体。
- (6) 重鎖の相補性決定領域 (C D R H) におけるアミノ酸配列として配列番号 1 ~ 6 のいずれかのアミノ酸配列を、軽鎖の相補性決定領域 (C D R L) におけるアミノ酸配列として配列番号 7 ~ 12 のいずれかのアミノ酸配列を含む、上記 (1) ~ (5) のいずれかに記載の抗 R G D 抗体。
- (7) ヒト、マウス、またはその両方の細胞外マトリックスタンパク質の R G D 配列を特異的に認識する上記 (1) ~ (6) のいずれかに記載の抗 R G D 抗体。
- (8) モノクローナル抗体である、上記 (1) ~ (7) のいずれかに記載の抗 R G D 抗体。
- (9) ヒトおよびマウスの細胞外マトリックスタンパク質の R G D 配列を特異的に認識するモノクローナル抗体。
- (10) ヒト、マウス、またはその両方の細胞外マトリックスタンパク質と R G D 受容体との結合を阻害する上記 (1) ~ (9) のいずれかに記載の抗 R G D 抗体。
- (11) キメラ抗体である上記 (1) ~ (10) のいずれかに記載の抗 R G D 抗体。
- (12) ヒト化抗体である上記 (1) ~ (10) のいずれかに記載の抗 R G D 抗体。
- (13) ヒト抗体である上記 (1) ~ (10) のいずれかに記載の抗 R G D 抗体。
- (14) 受託番号 F E R M B P - 10440、F E R M B P - 10441 で標示されるハイブリドーマ細胞により産生される抗 R G D モノクローナル抗体。
- (15) 上記 (1) ~ (14) のいずれかに記載の抗 R G D 抗体を有効成分として含む癌、炎症性疾患、感染症、自己免疫疾患または骨疾患の治療剤。
- (16) 上記 (1) ~ (14) のいずれかに記載の抗 R G D 抗体を有効成分として含む癌、炎症性疾患、感染症、自己免疫疾患または骨疾患の診断剤。

10

20

30

40

50

(17) CVDVPNGRGDSLAYGLR (配列番号13) を抗原として用いることを特徴とする、上記(1)～(14)のいずれかに記載の抗RGD抗体の製造方法。

(18) 上記(1)～(14)のいずれかに記載の抗RGD抗体の相補性決定領域をヒト抗体に遺伝子工学的に組込んだキメラ抗体の製造方法。

(19) 上記(1)～(14)のいずれかに記載のモノクローナル抗体の相補性決定領域をヒト抗体に遺伝子工学的に組込んだヒト化抗体の製造方法。

(20) CVDVPNGRGDSLAYGLR (配列番号13) を抗原として用いることを特徴とする、ヒト抗体の製造方法。

本発明のモノクローナル抗体は、マウスとヒトの細胞外マトリックスタンパク質に存在するアミノ酸配列RGDに特異的に反応し、一部の抗体はRGD構造を有する細胞外マトリックスタンパク質であるオステオポンチン(OPN)、ファイブロネクチン(FN)、ビトロネクチン(VN)、ラミニンと交差反応性を示した。また、本発明のモノクローナル抗体は、ヒトとマウスの細胞外マトリックスタンパク質に反応することから、病態モデル・マウスで薬効の評価を行うことが可能である。さらに、本発明のモノクローナル抗体は、細胞外マトリックスタンパク質が関与する肝炎などの炎症性疾患、癌の増殖・転移、リウマチなどの自己免疫疾患などの治療に用いることができる。

【図面の簡単な説明】

【0004】

図1は、ヒトおよびマウスのOPNの部分ペプチドを用いて、得られた抗体(4P11, 11M6, 25H15, 35B6)が認識するエピトープ解析結果を示す図である。

図2は、ヒトおよびマウスのOPNの部分ペプチドを用いて、得られた抗体(29R5, 30C17, 33E10, 38I8)が認識するエピトープ解析結果を示す図である。

図3は、マウスのOPNのRGDを含む部分ペプチドを用いて、得られた抗体(33E10, 35B6)が認識するエピトープ解析結果を示す図である。

図4は、マウスのOPNの部分ペプチドを用いて、得られた抗体(33E10, 35B6)が認識するエピトープ解析結果を示す図である。

図5は、マウスのOPNの部分ペプチド(CGDSLAYGLR (配列番号19))を用いて、得られた抗体(33E10, 35B6)が認識するエピトープ解析結果を示す図である。

図6は、抗RGD抗体の重鎖における相補性決定領域(CDR)を解析した結果を示す図である。なお、33E10および35B6の両方の重鎖の配列において、1番目のアミノ酸は示されていない(2番目のアミノ酸残基から示されている)。また、33E10の配列中の99番目の残基(F)および35B6の配列中の98番目の残基(F)は、KまたはRであり得る。

図7は、抗RGD抗体の軽鎖における相補性決定領域(CDR)を解析した結果を示す図である。

図8は、抗RGD抗体とRGD配列を含有する種々の細胞外マトリックスタンパク質との結合を調べた結果を示す図である。

図9は、抗RGD抗体のmOPN N-halfと癌細胞(NIH3T3細胞)における細胞接着阻害効果を調べた結果を示す図である。

図10は、抗RGD抗体の各種細胞外マトリックスタンパク質と癌細胞(NIH3T3細胞)における細胞接着阻害効果を調べた結果を示す図である。

図11は、抗RGD抗体の肝炎発症抑制効果を調べた結果を示す図である。

図12は、実験的肺転移モデルで抗RGD抗体の肺転移抑制効果を調べた結果を示す図である(A: 転移細胞数、B: 体重の推移)。

図13は、自然的肺転移モデルで抗RGD抗体の肺転移抑制効果を調べた結果を示す図である(A: 腫瘍サイズ、B: 転移細胞数、C: 体重の推移)。

図14は、抗RGD抗体のリウマチ病態モデルにおけるリウマチの治療効果を示す図である。

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 0 5 】

本発明者らは、以下の点を注意深く進めることにより、マウスとヒトの細胞外マトリックスタンパク質に存在するアミノ酸配列 R G D に特異的に反応するマウス・モノクローナル抗体を得ることができた。

まず、マウスの病態モデルで薬効評価する目的もあり、R G D 配列のモノクローナル抗体を作製するに当たり、ヒト O P N のアミノ酸配列ではなく、マウス O P N から設計した R G D 配列を含む部分ペプチドでマウスでのモノクローナル抗体作製を試みた。その結果、一般的には不可能であると考えられる、マウス O P N の部分ペプチドでマウスのモノクローナル抗体 8 種類を作製することができた。得られたモノクローナル抗体は R G D 配列を認識する抗体であることを確認した。また、得られたモノクローナル抗体は、抗体により反応性は異なるが、R G D 配列を含有するヒトの細胞外マトリックスタンパク質と交差反応することを見出した。さらに、これらのモノクローナル抗体は R G D 配列とインテグリンの結合を阻害することも確認した。

次に、得られたモノクローナル抗体の考えられる薬効を病態モデル・マウスで評価した。C o n A 投与で発症する劇症肝炎モデルにおいて得られたモノクローナル抗体投与で肝炎の指標である A S T と A L T が明らかに低下することが観察された。また、癌転移のモデルである実験的癌転移モデルと自然的癌転移モデルで得られたモノクローナル抗体の癌転移抑制効果を検討した。すなわち、実験的癌転移モデルではマウスの静脈内にマウスの癌細胞 B 1 6 - L u c を投与し、マウスの肺における癌転移の数を、自然的癌転移モデルでは B 1 6 - B L 6 細胞をマウスの足蹠に投与した後、その肺への転移数を計測し、得られたモノクローナル抗体の癌転移抑制効果を調べた。その結果、両モデルにおいて得られたモノクローナル抗体が癌転移の抑制効果を示した。さらに、T y p e I I コラーゲン抗体カクテルと L P S 投与によるリウマチ発症モデル・マウスで得られたモノクローナル抗体が明らかになりウマチに治療効果を示すことも確認した。

1 . 本発明の抗 R G D 抗体

本発明は、R G D 配列に対するモノクローナル抗体を提供する。より具体的には、本発明は、ヒトおよびマウスの細胞外マトリックスタンパク質のアミノ酸配列 R G D を特異的に認識するモノクローナル抗体を提供する。

本明細書中、「細胞外マトリックスタンパク質」とは、細胞外マトリックスを構成するタンパク質をいうものとし、これらには、例えば、オステオポンチン、ビトロネクチン、ファイブロネクチン、フォンビルブランド因子、コラーゲン、ラミニン、テネイシン、フィブリノーゲン、トロンボスポンジン、アンギオスタチン、プラスミン、V C A M - 1 等が含まれるが、これらに限定されない。なお、本明細書中、「細胞外マトリックス」は、当該分野で常用される意味に従い、組織中の細胞外の空間を満たしている生体高分子の複雑な集合体をいうものとする（例えば、「分子細胞生物学辞典」、3 2 3 頁、東京化学同人（1 9 9 7）を参照）。また、本明細書中、「細胞外マトリックスタンパク質」という用語は、「細胞外マトリックス分子」と互換的に使用される。

本明細書中、「抗体」とは、抗体分子全体またはその断片（例えば、F a b、F a b'、F (a b')₂、などの断片）を意味し、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。好ましくは、本発明においてはモノクローナル抗体を意味する。また、本発明において「抗体」は、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体を包含する。

本明細書中、抗体があるタンパク質またはその断片を「特異的に認識する」とは、その抗体が他のアミノ酸配列に対するその親和性よりも、これらのタンパク質またはその断片の特定のアミノ酸配列に対して実質的に高い親和性で結合することを意味する。ここで、「実質的に高い親和性」とは、所望の測定装置によって、その特定のアミノ酸配列を他のアミノ酸配列から区別して検出することが可能な程度に高い親和性を意味し、典型的には、結合定数 (K_d) が少なくとも 1 0⁷ M⁻¹、好ましくは、少なくとも 1 0⁸ M⁻¹、より好ましくは、1 0⁹ M⁻¹、さらにより好ましくは、1 0¹⁰ M⁻¹、1 0¹¹ M⁻¹、1 0¹² M⁻¹ またはそれより高い、例えば、最高で 1 0¹³ M⁻¹ またはそれより高いものであるような結合親和性を意味する。

本明細書中、「抗R G D抗体」とは、タンパク質またはポリペプチドまたはペプチド中のR G D配列を特異的に認識する抗体を意味する。

本明細書中、「モノクローナル抗体」とは、実質的に均質な抗体の集団、即ち、集団を構成する個々の抗体が、天然において起こり得る少量で存在する変異体を除いては均一である抗体集団から得られた抗体を指す。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、単一の抗原部位に対して作用するものである。さらに、異なるエピトープに対する異なる抗体を含むポリクローナル抗体と比べて、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一のエピトープに向けられる。その特異性に加えて、モノクローナル抗体は、他の免疫グロブリンが混在しないハイブリドーマの培養により、均一な抗体が恒常的に合成され、より簡便に精製できる点で有利である。「モノクローナル」という修飾語は、実質的に均一な抗体の集団より得られた抗体の特性を示唆するものであって、抗体が特定の方法により製造されることを限定するものではない。

10

本明細書中、「抗体断片」とは、全長抗体の一部を指し、抗原結合領域または可変領域のことである。例えば、抗体断片にはF a b、F a b'、F (a b')₂、およびF v断片が含まれる。これらの抗体断片は抗体のパパイン消化、ペプシン消化など一般的に知られている方法で作製することができる。

上記「キメラ抗体」とは、本発明で得られた抗R G D抗体の定常領域をヒトの抗体と同じ定常領域を有するように遺伝子工学的に改変したヒト・マウス・キメラ抗体（欧州特許公開公報E P 0 1 2 5 0 2 3参照）を指す。「ヒト化抗体」とは、本発明で得られた抗R G D抗体のH鎖とL鎖の相補性決定領域以外の一次構造をヒトの抗体に対応する一次構造に遺伝子工学的に改変した抗体を言う。「ヒト抗体」とは、ヒトの抗体産生に關与する遺伝子を導入したトランスゲニック動物を用いて作製したモノクローナル抗体（欧州特許公開公報E P 0 5 4 6 0 7 3参照）を意味する。

20

本発明において特に好ましい抗体は、本明細書の実施例に示される受託番号F E R M B P - 1 0 4 4 0、F E R M B P - 1 0 4 4 1で標示されるハイブリドーマ細胞により産生される抗R G D抗体である。

以下、抗R G Dモノクローナル抗体の作製について詳述するが、抗体の作製方法はこれに限定されるものではない。

2. R G D配列含有ペプチド（抗原）

本発明において抗原として使用するR G D配列含有ペプチドには、例えば、本実施例において用いたマウスの細胞外マトリックスタンパク質の細胞接着配列であるR G D配列を含むアミノ酸配列C V D V P N G R G D S L A Y G L R（配列番号13）のように、細胞接着配列である「R G D」配列を少なくとも含み、免疫により、R G D配列に対する抗体を産生することが可能なアミノ酸配列からなるペプチドが含まれる。

30

そのような「R G D配列含有ペプチド」、「R G D配列を含有するペプチド」、または「R G D配列を含むアミノ酸配列からなるペプチド」の例としては、R G D配列を含有する細胞外マトリックスタンパク質として知られているオステオポンチン（O P N）、ピトロネクチン、ファイブロネクチン、フォンビルブランド因子、コラーゲン、ラミニン、テネシシン、フィブリノーゲン、トロンボスポンジン等のR G D配列含有ペプチドが含まれる。また、本発明における「R G D配列含有ペプチド」、「R G D配列を含有するペプチド」、または「R G D配列を含むアミノ酸配列からなるペプチド」は、少なくとも約5個のアミノ酸、好ましくは、約5から約50個のアミノ酸、より好ましくは約10個から約20個のアミノ酸からなるアミノ酸配列である。なお、本明細書中、「R G D配列含有ペプチド」という用語は、「R G D配列を含有するペプチド」または「R G D配列を含むアミノ酸配列からなるペプチド」と互換的に使用される。

40

ここで、実質的に同等の抗原性を有する限り、該アミノ酸配列において、複数個のアミノ酸、好ましくは1ないし10個のアミノ酸、特に好ましくは1ないし数個（例えば、1ないし5個）のアミノ酸が置換、欠失、および/または修飾されているアミノ酸配列を含む変異ポリペプチド、あるいは該アミノ酸配列中に、複数個のアミノ酸、好ましくは1ないし10個のアミノ酸、特に好ましくは1ないし数個（例えば、1ないし5個）のアミノ

50

酸が付加または挿入されたアミノ酸配列を含む変異ポリペプチドも本発明において使用する「R G D配列含有ペプチド」または「R G D配列を含むアミノ酸配列からなるペプチド」に含まれる。さらに、「R G D配列含有ペプチド」または「R G D配列を含むアミノ酸配列からなるペプチド」は、そのような置換、欠失、修飾、付加、及び挿入を複数有する変異ポリペプチドであってもよい。

本発明において使用するR G D配列を含むアミノ酸配列からなるペプチドは、化学的合成法のほか、遺伝子組換え技術、細胞培養方法等のような当該技術分野において公知の方法あるいはその修飾方法を適宜用いることにより製造することができる。単離した細胞外マトリックスタンパク質をタンパク分解酵素等により適切に切断することで製造することができる。また、R G D配列を含むアミノ酸配列からなるペプチドは、マウス、ラット、ヒト、ブタ、サル、ウシ、ウサギ等の哺乳動物由来のものであり得、R G D配列に対する抗体を産生することが可能なR G D配列含有ペプチドであれば、その製法は特に限定されない。

上記のR G D配列を含有するペプチドを、さらにその抗原性を高めるために他の生体高分子と結合させてもよい。そのような抗原性を高める生体高分子の例としては、サイログロブリン、スカシ貝ヘモシアニン(K L H)、ウシ血清アルブミン(B S A)、卵白アルブミン(O V A)、ウシ・グロブリン等があるが、サイログロブリンがより好ましい。また、R G D配列を含むペプチドと生体高分子との結合はカップリング試薬法(活性エステルとマレインイミドの官能基を有する結合試薬:活性エステルでタンパク質またはペプチドのアミノ基と、マレインイミドでタンパク質またはペプチドのS H基と結合する。)(S . Y o s h i t a k e e t a l . , E u r . J . B i o c h e m . , 1 0 1 , 3 9 5 - 3 9 9 , 1 9 7 9 .) 混合酸無水物法(B . F . E r l a n g e r e t a l . , J . B i o l . C h e m . , 2 3 4 , 1 0 9 0 - 1 0 9 4 , 1 9 5 4 .)、活性エステル法(A . E . K a r u e t a l . , J . A g r i c . F o o d C h e m . , 4 2 , 3 0 1 - 3 0 9 , 1 9 9 4 .)等があり、好ましい方法としてはカップリング試薬法である。

3. 抗体産生細胞の調製

抗原は、免疫される動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常1~6週毎に1回ずつ、計2~10回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えば、マウス、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、ラット、ハムスター、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ等が挙げられるが、本発明ではマウスが好適に用いられる。

治療の対象がヒトであり、抗R G D抗体産生動物がマウスの場合には、ヒト・マウス・キメラ抗体やヒト化抗体を用いるのが望ましく、さらには、抗体産生に關与するヒト遺伝子を導入したマウス等のトランスジェニック動物を用いてヒト型モノクローナル抗体を作成して用いるのが望ましい。

4. 抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合

ミエローマ細胞としては、マウス、ラット、ヒト等に由来する細胞が用いられる。例えば、マウスミエローマP 3 U 1、P 3 X 6 3 - A g 8、P 3 X 6 3 - A g 8 - U 1、P 3 N S 1 - A g 4、S P 2 / 0 - A g 1 4、P 3 X 6 3 - A g 8 - 6 5 3等があげられるが、抗体産生細胞とミエローマ細胞とは同種動物、特に同系統の動物由来であることが好ましい。ミエローマ細胞は凍結保存するか、ウシ胎児血清を添加した一般的な培地で継代して維持することができる。細胞融合には対数増殖期の細胞を用いるのが好ましい。本発明ではP 3 X 6 3 - A g 8 - 6 5 3が好適に用いられる。

抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合させてハイブリドーマを形成させる方法としては、ポリエチレングリコール(P E G)を用いる方法、センダイウイルスを用いる方法、電気融合装置を用いる方法などがあげられる。例えば、P E G法の場合、約30~60%のP E G(平均分子量1000~6000)を含む適当な培地または緩衝液中に脾細胞とミエローマ細胞を1~10:1、好ましくは5~10:1の混合比で懸濁し、温度約25~37、p H 6~8の条件下で、約30秒~5分間程度反応させればよい。反応終了後

、PEG溶液を除いて培地に再懸濁し、セルウェルプレート中に播種して培養を続ける。

5. ハイブリドーマ細胞の選別

モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞の選別は、公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。通常、HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地で行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマ細胞が生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20%、好ましくは10～20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1～10%の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日水製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常、5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%CO₂下で行なうことができる。

10

本発明のモノクローナル抗体の産生は、リンパ球機能探索法（矢田純一、藤原道夫編著、中外医学社、588-592頁、1994）に記載されるELISA法を用いて確認およびスクリーニングできる。ELISAにて陽性反応が得られたクローンから限界希釈法を1から5回、好適には2から4回繰り返すことによりモノクローナル抗体を調製できる。細胞融合で得られた種々のハイブリドーマからRGD配列に反応するクローンを得るために、抗原としてRGD配列を含むペプチド、例えば、CVDVPNGRGDSLAYGLR（配列番号13）を96ウェルプレートに固相化し、ハイブリドーマの培養上清と反応後、酵素標識抗マウスIgG抗体で検出するELISA法でRGD配列を認識する抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングできる。

20

6. 抗体の分離精製

得られた抗体は、均一にまで精製することができる。抗体の分離、精製は通常のタンパク質で使用されている分離、精製方法を使用すればよい。例えばゲルろ過、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等のクロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、透析、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動等を適宜選択、組み合わせれば、抗体を分離、精製することができる（Antibodies: A Laboratory Manual, Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988）が、これらに限定されるものではない。アフィニティークロマトグラフィーに用いる担体としては、抗原結合樹脂、プロテインA結合樹脂、プロテインG結合樹脂が挙げられる。抗原結合樹脂として、チオールセファロースビーズ（Amersham Biosciences）等があり、これに抗原としてRGD配列を含むペプチド、例えば、CVDVPNGRGDSLAYGLR（配列番号13）を結合した担体を用いたアフィニティークロマトグラフィーが好ましい。

30

7. 抗体の製剤

このようにして得られたモノクローナル抗体は、常法に従って製剤化し、癌、炎症性疾患、感染症、自己免疫疾患および骨疾患等の予防および/または治療剤として用いることができる。これらの予防および/または治療剤としての剤形は注射剤、点滴用剤などの非経口製剤とすることができ、創意工夫により経口製剤として使用することができる。また、製剤化に当たっては、薬事上および薬学的に許容される範囲内で、剤形に適した担体、希釈剤もしくは添加剤などを使用することができる。

40

本発明のモノクローナル抗体を有効成分とする製剤は、癌、例えば癌細胞の増殖、転移、炎症性疾患（例えば変形性関節症、肝炎、気管支喘息、綿維症、糖尿病、動脈硬化、多発性硬化症、炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎、クローン病））、感染症（例えば肝炎）、自己免疫疾患（例えば関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、多発性筋炎、自己免疫性甲状腺疾患、尿細管間質性腎炎、重症筋無力症）および骨疾患（例えば骨粗鬆症）等の予防および/または治療剤として用いることができる。

投与量は、投与対象、対象疾患、症状、投与ルートなどによっても異なるが、例えば、癌患者の予防および/または治療のために使用する場合には、本発明の抗体を1回量とし

50

て、通常0.01~20mg/kg体重程度、好ましくは0.1~10mg/kg体重程度、さらに好ましくは0.1~5mg/kg体重程度を、1月1~10回程度、好ましくは1月1~5回程度、静脈注射により投与するのが好都合である。他の非経口投与および経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合には、その症状に応じて増量または投与回数を増加させてもよい。

本発明の抗体は、それ自体または適当な医薬組成物として投与することができる。上記投与に用いられる医薬組成物は、上記抗体またはその塩と薬理学的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むものである。このような組成物は、非経口投与または経口に適する剤形として提供される。

すなわち、非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、点鼻剤、坐剤などが用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤などの剤形を包含する。このような注射剤は、公知の方法に従って、例えば、上記抗体またはその塩を通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖、蔗糖、マンニトールなどその他の補助薬を含む等張液などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール(例、エタノール)、ポリアルコール(例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール)、非イオン界面活性剤〔例、ポリソルベート80、ポリソルベート20、HCO-50(polyoxyethylene(50mol)adduct of hydrogenated castor oil)〕などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、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などを併用してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプル、バイアル、シリンジに充填される。点鼻剤や坐剤は、上記抗体を通常の点鼻薬用基剤、坐薬用基剤に混合することによって調製される。なお、一般的に抗体などのタンパク質の経口投与は消化器により分解されるため、困難とされるが、抗体断片や修飾した抗体断片と剤形の創意工夫により、経口投与の可能性もある。

上記の非経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好適である。このような投薬単位の剤形としては、注射剤(アンプル、バイアル、プレフィルド・シリンジ)、点鼻剤、坐剤などが例示され、それぞれの投薬単位剤形当たり通常5~500mg、とりわけ注射剤では5~100mg、その他の剤形では10~250mgの上記抗体が含有されていることが好ましい。

なお、前記した各組成物は、上記抗体との配合により好ましくない相互作用を生じない限り他の活性成分を含有してもよい。

8. 本発明のモノクローナル抗体を含有する診断剤

本発明のモノクローナル抗体は、炎症性疾患、例えばリウマチ関節炎、肝炎、気管支喘息、線維症、糖尿病、癌転移、動脈硬化、多発性硬化症、肉芽腫等の診断剤、また臓器移植後の慢性拒絶反応抑制、全身性自己免疫疾患・エリテマトーデス・ぶどう膜炎・ベーチェット病・多発性筋炎・糸状体増殖性腎炎・サルコイドーシス等の自己免疫疾患の診断剤として用いることができる。本発明のモノクローナル抗体は、RGD配列を特異的に認識することができるので、被検液中の細胞外マトリックスタンパク質の定量をサンドイッチ免疫測定法、競合免疫測定法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどにより可能である。これら個々の免疫学的測定法を本発明の測定方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要としない。それぞれの方法における通常の方法に当業者の通常の技術的配慮を加えて測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。

以上のように、本発明の抗体を用いることによって、細胞外マトリックスタンパク質を感度良く定量することができる。さらに、本発明の抗体を用いる、生体内での細胞外マトリックスタンパク質の定量法を利用することにより、細胞外マトリックスタンパク質が関連する各種疾患の診断をすることができる。例えば、細胞外マトリックスタンパク質の濃度の増減が検出された場合は、細胞外マトリックスタンパク質が関連する疾患、例えば炎症性疾患である可能性が高いまたは将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

また、本発明のモノクローナル抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する細胞外マトリックスタンパク質のRGD配列を特異的に検出するために使用することができる。また、細胞外マトリックスタンパク質を精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画に含まれる細胞外マトリックスタンパク質の検出、被検細胞内における細胞外マトリックスタンパク質の挙動の分析等に使用することができる。

以下に実施例を示して本発明をより詳細に説明するが、これは本発明の範囲を限定するものではない。

【実施例】

【0006】

実施例1：抗体作製方法

細胞外マトリックスタンパク質の細胞接着配列であるRGD配列とSLAYGLR配列（配列番号25）とを含むCVDVPNGRGDSLAYGLR配列（配列番号13）を合成し、EMCS（Dojin社）を介してサイログロブリン（Sigma社）に結合させ、これを免疫原としてアジュバンドとともにマウスに免疫した。4回免疫後、脾細胞を回収し、ミエローマ細胞X63-Ag8-653と細胞融合した。HAT培地で選択後、抗原ペプチドを固相したELISA法で培養上清のスクリーニングを行い、RGD配列を認識する抗体を産生するハイブリドーマ（8クローン：4P11、11M6、25H15、29R5、30C17、33E10、35B6、38I8）を選択した。チオールセファロースビーズ（アマシャムバイオサイエンス社）を用いて抗原ペプチドカラムを作製し、ハイブリドーマの培養上清から、抗体を精製した。

なお、ここで得られたハイブリドーマ細胞33E10および35B6は、それぞれ受託番号FERM BP-10440およびFERM BP-10441として、2005年10月27日に茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566）、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託されている。

実施例2：エピトープの解析

[解析に用いたペプチド]

合成したマウスOPN由来の部分ペプチドを含むmOPN1（CLPVKTDSGSS EEKLY（配列番号14））、mOPN5（CVDVPNGRGDSLAYGLR（配列番号13））、CVDVPNGRGDS（配列番号15）、CPNGRGD（配列番号16）、CGRGDSLAYGLR（配列番号17）、CGDSLAYG（配列番号18）、CGDSLAYGLR（配列番号19）およびCSLAYGLR（配列番号20）、ヒトOPN由来の部分ペプチドhOPN5（CVDTYDGRGDSVVYGLRS（配列番号21））およびCSVVYGLR（配列番号22）、マウスとヒト共通の部分ペプチドを含むCGRGDS（配列番号23）を、EMCS（Dojin社）を介してBSA（Sigma社）に結合させELISA解析用ペプチドとして用いた。

[ELISA法]

96ウエルプレートに、ペプチド（10 μ g/ml）、あるいはタンパク質（5 μ g/ml）を37 $^{\circ}$ C、1時間放置して固定化し、0.1%BSA/PBS/0.05%NaNO₃溶液でブロッキング後、抗体を種々の濃度で37 $^{\circ}$ C、1時間反応させた。次に二次抗体として、HRP標識抗マウスIgG抗体（Jackson社）を37 $^{\circ}$ C、30分反応後、OPDで15分間発色、1N H₂SO₄で反応を停止させ、490nmにおける吸光度を測定した。

[エピトープマッピング]

合成したペプチドのサイログロブリン結合体をそれぞれ固定化した96ウエルプレートでELISAを行った。

その結果、図1、2、3、4および5に示すように、4P11、11M6、25H5、35B6および33E10はmOPN5およびhOPN5と結合したことから、マウスとヒトの両方の部分ペプチドを認識する抗体であった。その中で、33E10はRGD配列以降の配列を含むCSLAYGLR（配列番号20）、CSVVYGLR（配列番号22）には反応せず、CGRGDS（配列番号23）、CVDVPNGRGDS（配列番号1

10

20

30

40

50

5) およびCPNGRGD (配列番号16) と反応したことから、これらペプチドの共通配列であるRGDを認識する抗体であり、マウスとヒトの両方に反応性を示す抗体であった。また、35B6はCGRGDS (配列番号23)、CVDVPNGRGDS (配列番号15) およびCPNGRGD (配列番号16) に反応せず、CGRGDSLAYGLR (配列番号17)、CGDSLAYG (配列番号18)、CGDSLAYGLR (配列番号19) に反応したことから、RGD配列のGDを含むRGD配列以降の配列も認識する抗体であることが示唆された。29R5、30C17および38I8はGRGDS (配列番号24)、SLAYGLR (配列番号25) またはSVVYGLR (配列番号26) と若干の反応性も見られたが、mOPN5のみと反応することから、マウスのOPNのVDVPNGRGDSLAYGLR (配列番号27) を認識する抗体であった。

10

実施例3：抗体のアミノ酸配列解析

ハイブリドーマ細胞を、RNeasy Miniキット (Qiagen社) を用いてRNAを抽出し、First-strand cDNA合成キット (アマシャムバイオサイエンス社) にてcDNAを作製した。Heavy primer増幅キット (アマシャムバイオサイエンス社) を用いてPCRを行い、抗体の重鎖 (Heavy chain) cDNAを伸張させ、pCRII-TOPOベクター (Invitrogen社) へ組み込み、cDNA配列、アミノ酸配列を決定した。CDR領域は、ABG: Directory of 3D structures of antibodies (<http://www.ibt.unam.mx/vir/structure/structures.html>) とblast for Ig sequence (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast>) を利用して決定した。

20

その結果、重鎖および軽鎖の可変領域とCDR領域は図6および図7に示すアミノ酸配列となった。具体的には、以下の通りである。

(重鎖)

[CDRH1]

33E10: GFTFTDYMI (配列番号1)

35B6: GYTFTNYWMH (配列番号2)

[CDRH2]

33E10: WLGFI RNKANGYTTEYSASVKG (配列番号3)

35B6: WIGNINPRNGDSNYNEKFRS (配列番号4)

30

[CDRH3]

33E10: GAY (配列番号5)

35B6: GYFDV (配列番号6)

(軽鎖)

[CDRL1]

33E10: RSSQSIVHSNGNTYLE (配列番号7)

35B6: KASQDINSYLS (配列番号8)

[CDRL2]

33E10: RVS NRFS (配列番号9)

35B6: RANRLVD (配列番号10)

40

[CDRL3]

33E10: GSFVPW (配列番号11)

35B6: YDEFPF (配列番号12)

なお、本実験では、ABGを用いてCDR領域を決定したが、使用するソフトウェアにより得られる結果に多少の違いが生じ得ることは当業者に理解され得る。

実施例4：RGDを有する細胞外マトリックスタンパク質との結合

[解析に用いたタンパク質]

ヒト・オステオポンチン (hOPN)、マウス・オステオポンチン (mOPN) は、それぞれの遺伝子を導入したCHO-K1細胞の培養上清から抗OPN抗体カラムを用いて精製した。ヒト・ビトロネクチン (VN) は旭テクノグラス社より、ヒト・ファイブロネ

50

クチン (FN)、ヒト・トロノスポンジン、マウス・ラミニンはSigma社から入手した。

[ELISA法]

96ウエルプレートに、ペプチド(10 µg/ml)、あるいはタンパク質(5 µg/ml)を37℃、1時間放置して固定化し、0.1%BSA/PBS/0.05%NaNO₃溶液でブロッキング後、抗体を種々の濃度で37℃、1時間反応させた。次に二次抗体として、HRP標識抗マウスIgG抗体(Jackson社)を37℃、30分反応後、OPDで15分間発色、1N H₂SO₄で反応を停止させ、490nmにおける吸光度を測定した。

[細胞マトリックスとの結合能]

hOPN、mOPN、FN、VNまたはラミニンをそれぞれ固定化した96ウエルプレートを用いてELISAを行った。

その結果を図8に示す。33E10は、ラミニンでの反応性は低いですが、調べた全ての細胞外マトリックスタンパク質と交差反応することが示唆された。35B6はhOPNとmOPNには反応するが、FN、VNおよびラミニンには反応しないことがわかった。

実施例5：細胞接着試験

[解析に用いたタンパク質]

ヒト・オステオポンチン(hOPN)、マウス・オステオポンチン(mOPN)は、それぞれの遺伝子を導入したCHO-K1細胞の培養上清から抗OPN抗体カラムを用いて精製した。mOPN N-halfは、マウスOPNのトロノピン切断部位のN末をGST融合タンパク質として大腸菌から精製した。ヒト・ファイブロネクチン(FN)、ヒト・ビトロネクチン(VN)、はSigma社から入手した。

[細胞接着試験方法]

タンパク質を96ウエルプレートに50 µlずつ添加し、37℃で1時間静置することにより固定化した。ブロッキング液(0.5%BSA/PBS)にてブロッキング後、PBSで1度洗浄し、0.25%BSA添加D-MEMで懸濁したNIH3T3細胞とモノクローナル抗体とを混合させ、1.0 × 10⁵個/mlとなるように200 µlずつ添加した。37℃、5%CO₂下で1時間反応後、0.5%クリスタルバイオレット(WAKO, Osaka, Japan)/20%メタノール溶液を50 µlずつウェルに加え、室温で30分間放置することにより細胞の固定と染色を行った。蒸留水でプレートを洗浄後、20%酢酸溶液にて転溶し、590nmにおける吸光度を測定した。

[細胞接着阻害能]

mOPN N-halfを固定化した96ウエルプレートにNIH3T3細胞と33E10または35B6を混和した溶液を入れ、NIH3T3細胞のmOPN N-halfとの接着に及ぼす抗体の影響を検討した(図9)。また、mOPN N-half、FNまたはVNをそれぞれ固定化した96ウエルプレートにNIH3T3細胞と33E10を混和した溶液を入れ、それぞれのタンパク質への細胞の接着に及ぼす抗体の影響を検討した(図10)。

その結果、図9および10に示すように、NIH3T3細胞はmOPN N-halfに接着し、抗RGD抗体で細胞接着が阻害され、33E10は35B6と比べRGD依存性接着阻害能が高かった。また、NIH3T3細胞は検討した全ての細胞外マトリックスタンパク質へ接着することが確認され、33E10はmOPN N-halfとの細胞接着を阻害するが、FNおよびVNとの細胞接着を阻害せず、OPNと細胞の接着を特異的に阻害すると示唆された。

実施例6：肝炎抑制試験

[肝炎モデル動物]

肝炎は、C57BL/6マウスにコンカナバリンA(ConA)(200 µg/匹)を尾静脈投与し、12時間後に肝炎のマーカーであるALT、ASTを調べるモデルを用いた。

[肝炎治療効果]

モノクローナル抗体を400 µg / 匹を尾静脈へ投与し、3時間後にCon Aを投与した後、その12時間後にALT、ASTを測定した。なお、マウスは1群5匹で実施し、コントロール抗体としてマウスIgGを用いた。

その結果を図11に示すが、25H15は肝炎発症を全く抑制せず、4P11、11M6、29R5、30C17および38I8は若干の抑制効果を示したが、33E10および35B6はALT、ASTの活性上昇が全く観察されないため、肝炎発症を抑制することが示唆された。

実施例7：癌転移抑制試験

[癌転移モデル動物]

実験的肺転移モデルは、C57BL/6マウスにマウスメラノーマ細胞株B16-Luc細胞(1×10⁵個/匹)を尾静脈投与し、14日後に肺転数を調べるモデルを用いた。

自然的肺転移モデルは、C57BL/6マウスの右後足蹠にB16-BL6細胞(4×10⁵)を皮下接種した。接種19日後に原発腫瘍を外科的に切除した。原発腫瘍切除14日後(B16-BL6細胞投与後33日後)に犠牲死させ、肺での腫瘍コロニー数を計測した。

[癌転移抑制効果]

実験的肺転移モデルでは、モノクローナル抗体400 µg / 匹とB16-Luc細胞とを混和して同時に投与し、14日後に肺転数を調べた。なお、コントロール抗体として、同じサブクラス(mIgG1)抗体を用いた。

その結果、図12に示すように、コントロールに比べ、33E10と35B6共に肺転数の平均は低下し、35B6は有意に肺転移を抑制した。

一方、自然的肺転移モデルにおいては、モノクローナル抗体を腫瘍移植後3、5、7、9、11、13、15、および17日目に200 µgを合計8回腹腔内投与し、腫瘍移植後19日目に原発腫瘍を外科的に切除するまでの原発腫瘍のサイズを測定した。さらに、原発腫瘍切除後14日目における肺での腫瘍コロニー数を計測した。なお、コントロール抗体として、同じサブクラス(mIgG1)抗体を用いた。

原発腫瘍サイズの経日的変化および肺転移した腫瘍数を図13に示す。33E10と35B6の投与により、原発腫瘍サイズはコントロールに比べて有意に小さく、33E10と35B6は共に腫瘍の増殖を抑制する効果が認められた。また、コントロール5匹中2匹の転移腫瘍数が多かったため、35B6は統計的に有意差が得られなかったが、転移腫瘍数の平均において33E10と35B6はコントロールに比較して少ないことから、33E10と35B6は共に癌の肺転移を抑制することが示唆された。

実施例8：関節リウマチ抑制試験

[関節リウマチ・モデル動物]

関節リウマチは、抗type II collagenに対する抗体を投与する関節用カクテル(IBL)を用いて、説明書に従って発症させた。すなわち、BALB/cマウスに抗type II collagen抗体カクテルを投与し、3日後にLPSを投与して発症させた。なお、関節炎の評価は、四肢それぞれについて次に示す関節炎スコア(0：症状無し。1：四肢の指など小関節が一本のみ腫脹発赤。2：小関節2本以上、あるいは手首や足首などの比較的大きな関節が腫脹発赤。3：1本の手や足全体が腫脹発赤。4：さらに1本の手や足の全体的な腫脹が最大限に達している。四肢の合計で最大16点になる。)で行った。

[関節リウマチ発症抑制効果]

モノクローナル抗体は、関節用カクテル投与の前日から関節用カクテル投与の6日後まで毎日200 µgを全8回腹腔内に投与し、関節用カクテル投与後毎日観察して関節炎スコアを算出した。

その結果、図14に示すように、33E10と35B6は共にコントロールに比べて関節炎スコアが小さく、33E10と35B6は共に関節リウマチ発症を抑制する効果を有するといえる。

10

20

30

40

50

【産業上の利用可能性】

【0007】

本発明のモノクローナル抗体は、細胞外マトリックスタンパク質の機能抑制により、癌（例えば癌細胞の増殖、転移）、炎症性疾患（例えば変形性関節症、肝炎、気管支喘息、綿維症、糖尿病、動脈硬化、多発性硬化症、炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎、クローン病））、感染症（例えば肝炎）、自己免疫疾患（例えば関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、多発性筋炎、自己免疫性甲状腺疾患、尿細管間質性腎炎、重症筋無力症）および骨疾患（例えば骨粗鬆症）等に対する治療効果を奏する。また、本発明のモノクローナル抗体は、体液、細胞または組織における細胞外マトリックスタンパク質を検出できることから、診断薬としても利用できる。

[配列表]

<210>	6	
<211>	5	
<212>	PRT	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	CDRH3 fragment	
<400>	6	10
Gly Tyr Phe Asp Val		
1	5	
<210>	7	
<211>	16	
<212>	PRT	
<213>	Artificial	
<220>		20
<223>	CDRL1 fragment	
<400>	7	
Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu		
1	5	10 15
<210>	8	30
<211>	11	
<212>	PRT	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	CDRL1 fragment	
<400>	8	
Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr Leu Ser		
1	5	10 40
<210>	9	
<211>	7	
<212>	PRT	
<213>	Artificial	

<220>

<223> CDRL2 fragment

<400> 9

Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDRL2 fragment

<400> 10

Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp

1 5

<210> 11

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDRL3 fragment

<400> 11

Gly Ser Phe Val Pro Trp

1 5

<210> 12

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDRL3 fragment

<400> 12

10

20

30

40

Tyr Asp Glu Phe Pro Phe
1 5

<210> 13
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

10

<220>
<223> partial peptide

<400> 13

Cys Val Asp Val Pro Asn Gly Arg Gly Asp Ser Leu Ala Tyr Gly Leu
1 5 10 15

Arg

20

<210> 14
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> partial peptide

30

<400> 14

Cys Leu Pro Val Lys Thr Asp Ser Gly Ser Ser Glu Glu Lys Leu Tyr
1 5 10 15

<210> 15
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

40

<220>
<223> partial peptide

<400> 15

Cys Val Asp Val Pro Asn Gly Arg Gly Asp Ser

1	5	10	
<210>	16		
<211>	7		
<212>	PRT		
<213>	Artificial		
<220>			10
<223>	partial peptide		
<400>	16		
Cys Pro Asn Gly Arg Gly Asp			
1	5		
<210>	17		
<211>	12		20
<212>	PRT		
<213>	Artificial		
<220>			
<223>	partial peptide		
<400>	17		
Cys Gly Arg Gly Asp Ser Leu Ala Tyr Gly Leu Arg			
1	5	10	30
<210>	18		
<211>	8		
<212>	PRT		
<213>	Artificial		
<220>			
<223>	partial peptide		
<400>	18		40
Cys Gly Asp Ser Leu Ala Tyr Gly			
1	5		
<210>	19		
<211>	10		

<400> 25

Ser Leu Ala Tyr Gly Leu Arg
1 5

<210> 26

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> partial peptide

<400> 26

Ser Val Val Tyr Gly Leu Arg
1 5

20

<210> 27

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> partial peptide

<400> 27

30

Val Asp Val Pro Asn Gly Arg Gly Asp Ser Leu Ala Tyr Gly Leu Arg
1 5 10 15

<210> 28

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> partial peptide

40

<400> 28

Leu Pro Val Lys Val Thr Asp Ser Gly Ser Ser Glu Glu Lys Leu Tyr
1 5 10 15

<210> 29
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> partial peptide

<400> 29

10

Val Asp Thr Tyr Asp Gly Arg Gly Asp Ser Val Val Tyr Gly Leu Arg
 1 5 10 15

Ser

<210> 30
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> partial peptide

<400> 30

Val Asp Val Pro Asn Gly Arg Gly Asp Ser
 1 5 10

30

<210> 31
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> partial peptide

40

<400> 31

Gly Arg Gly Asp Ser Leu Ala Tyr Gly Leu Arg
 1 5 10

<210> 32
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> partial peptide

<400> 32 10

Pro Asn Gly Arg Gly Asp
1 5

<210> 33
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial 20

<220>
<223> partial peptide

<400> 33

Gly Asp Ser Leu Ala Tyr Gly
1 5

<210> 34 30
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

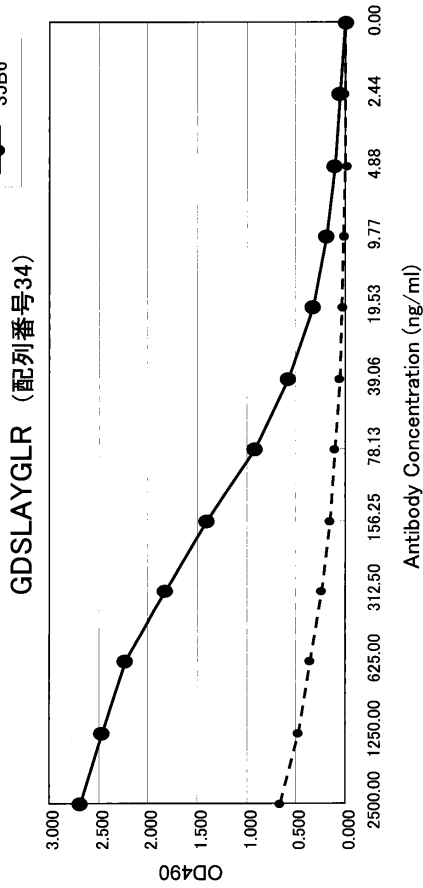
<220>
<223> partial peptide

<400> 34

Gly Asp Ser Leu Ala Tyr Gly Leu Arg 40
1 5

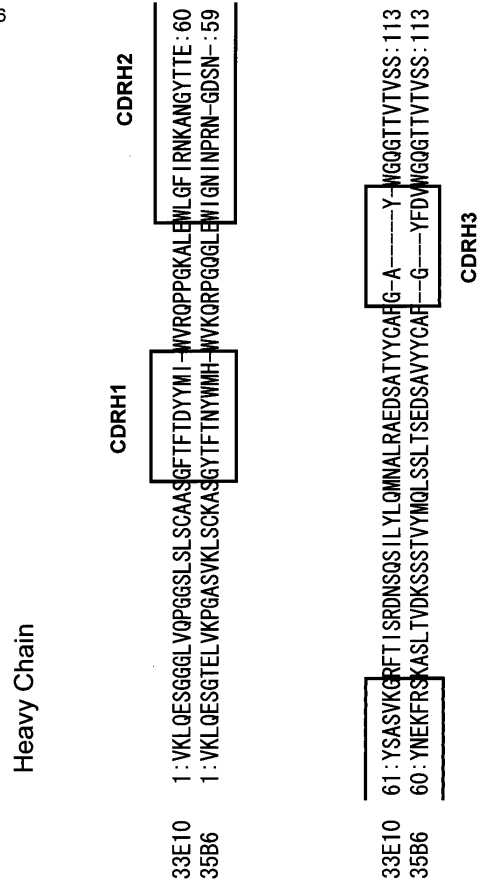
【 図 5 】

Fig. 5



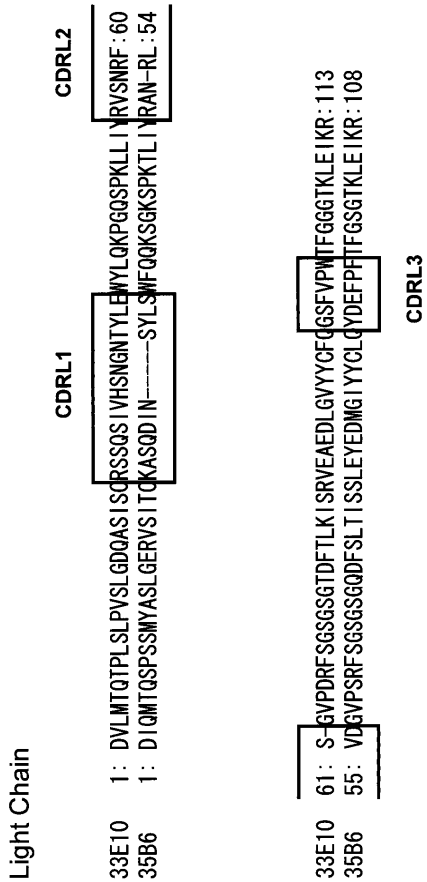
【 図 6 】

Fig. 6



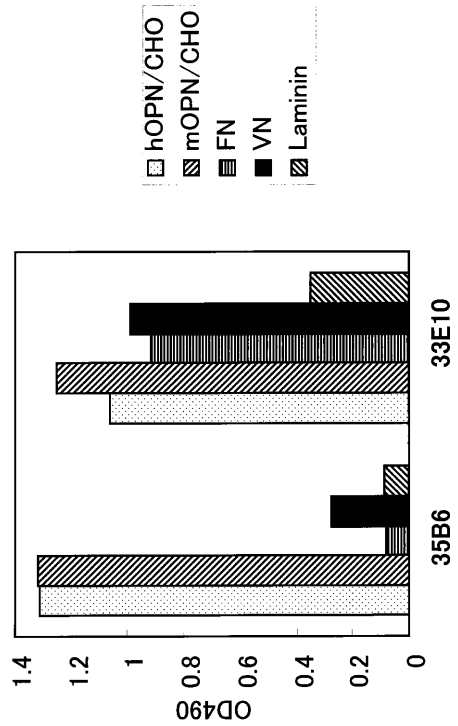
【 図 7 】

Fig. 7



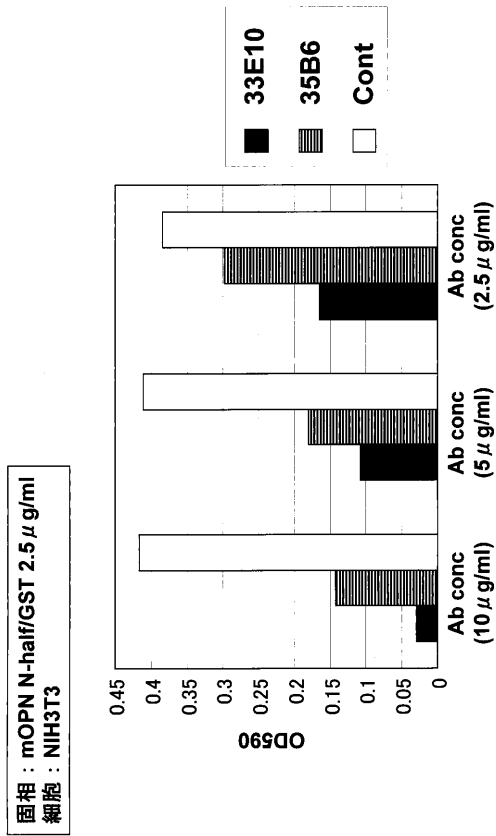
【 図 8 】

Fig. 8



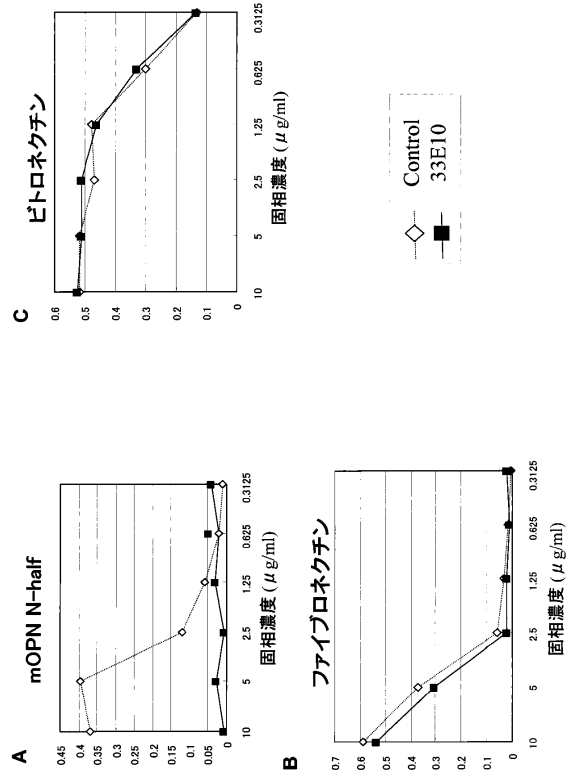
【 図 9 】

Fig. 9



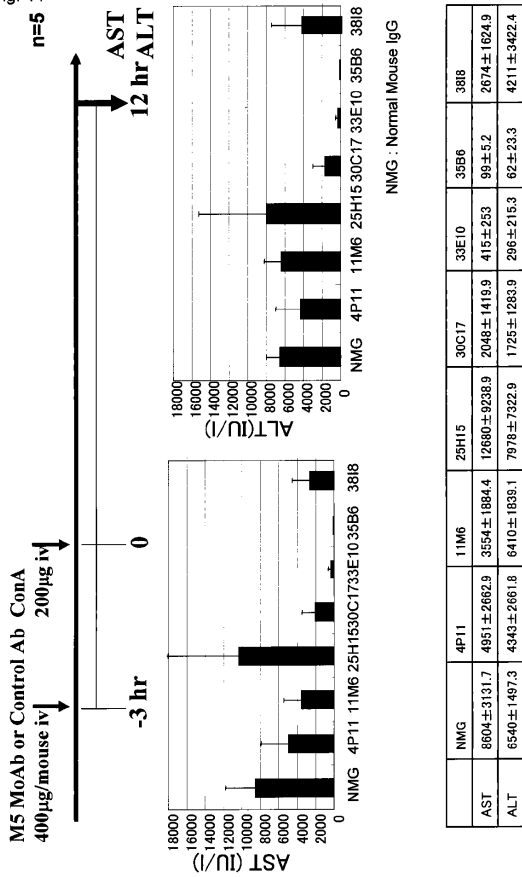
【 図 10 】

Fig. 10



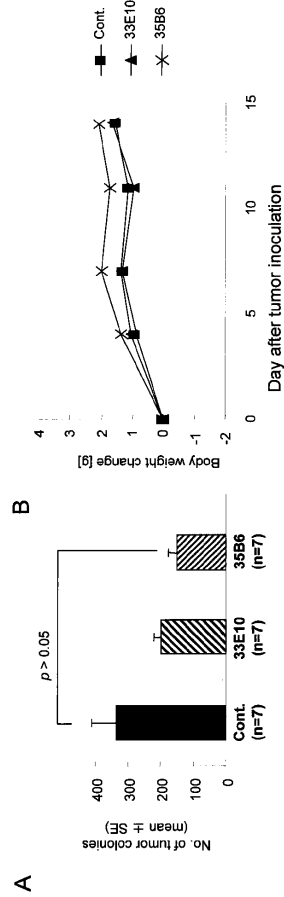
【 図 11 】

Fig. 11



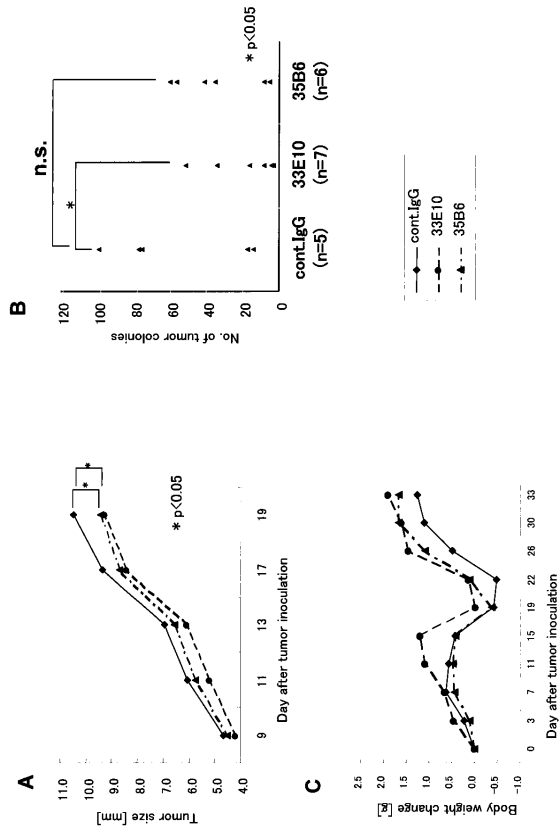
【 図 12 】

Fig. 12



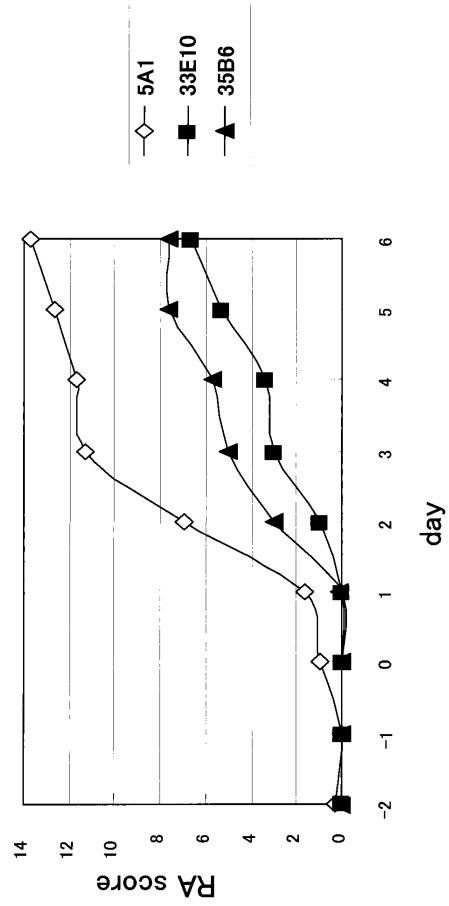
【 1 3 】

Fig. 13



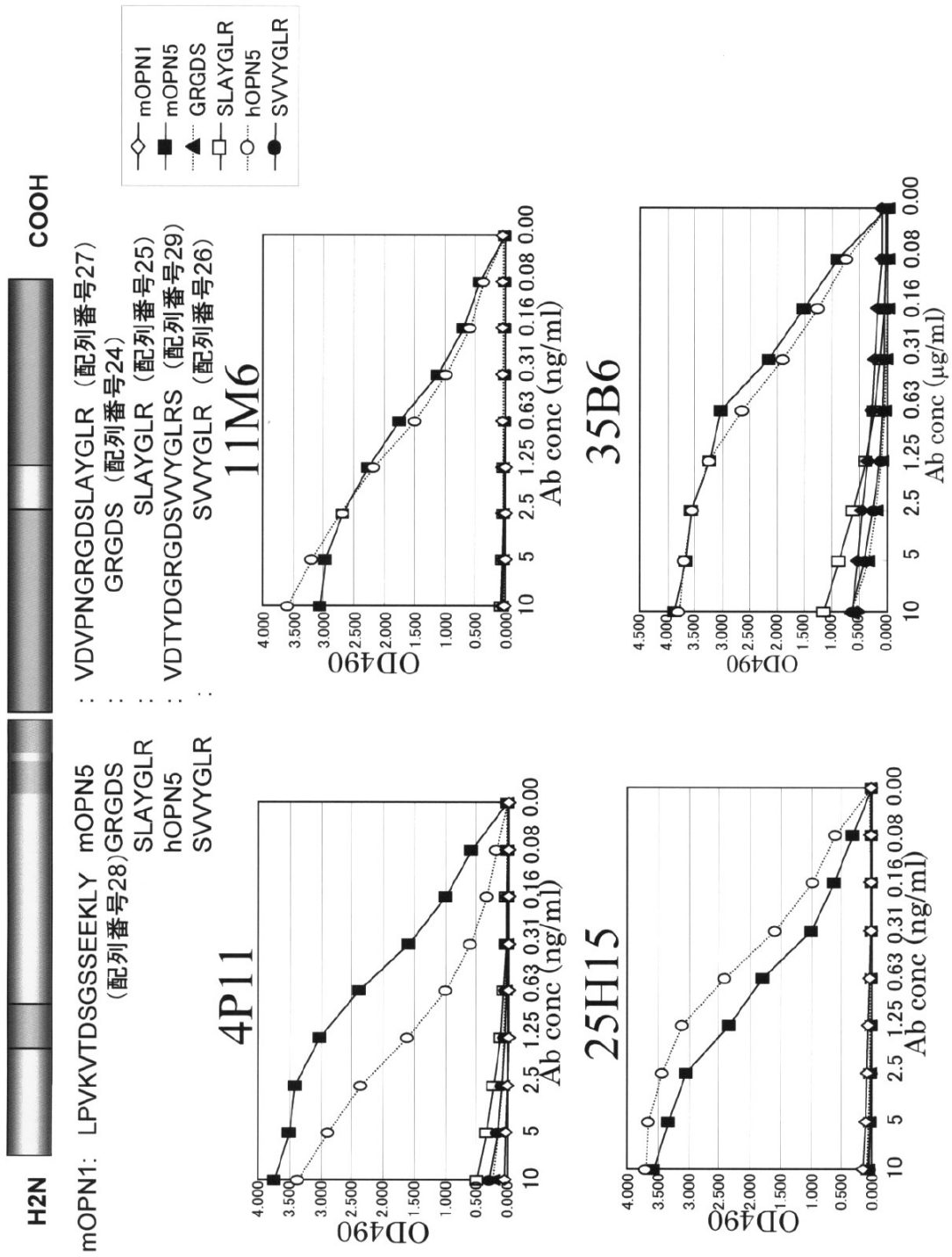
【 1 4 】

Fig. 14



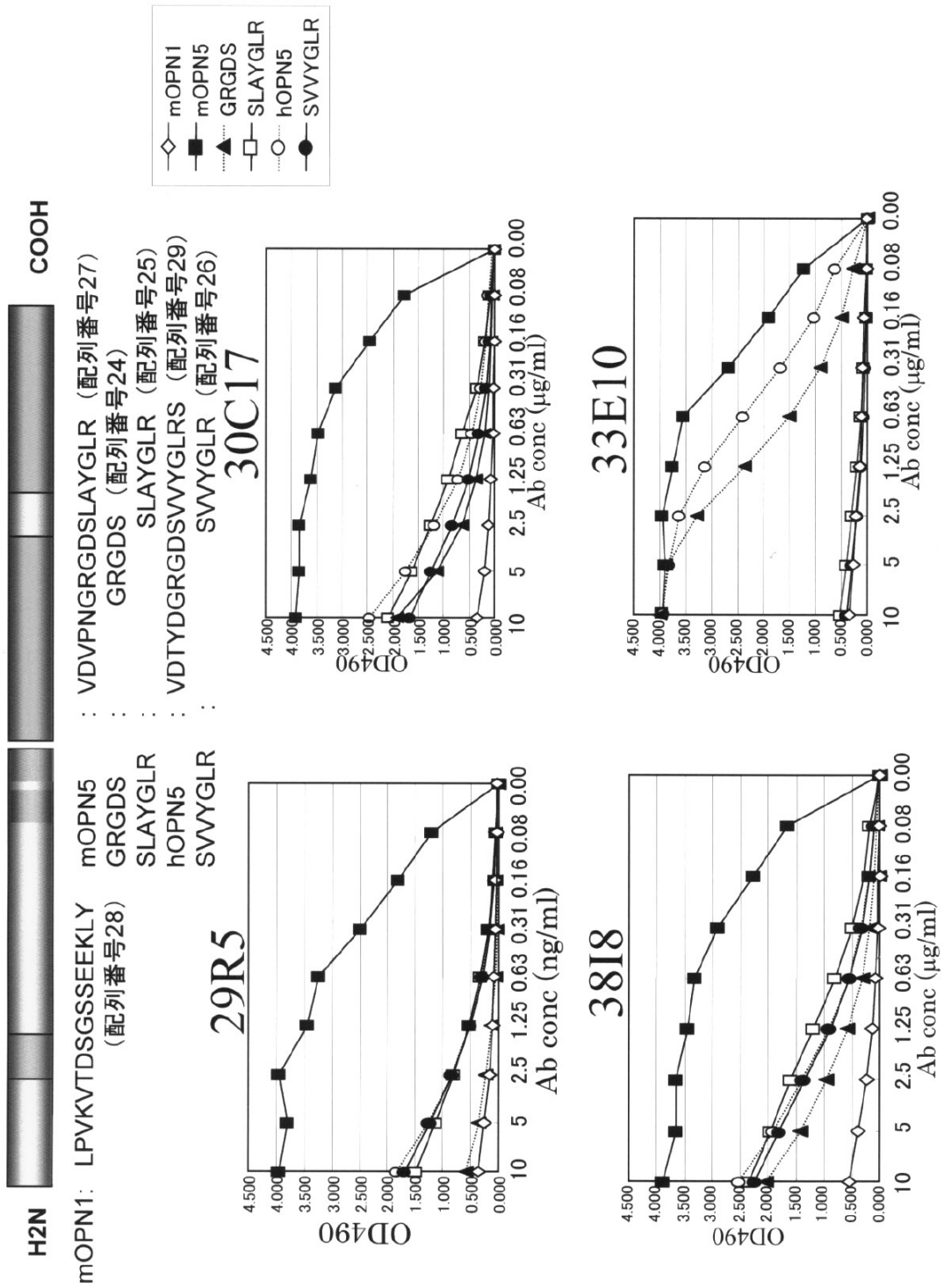
【 図 1 】

Fig. 1



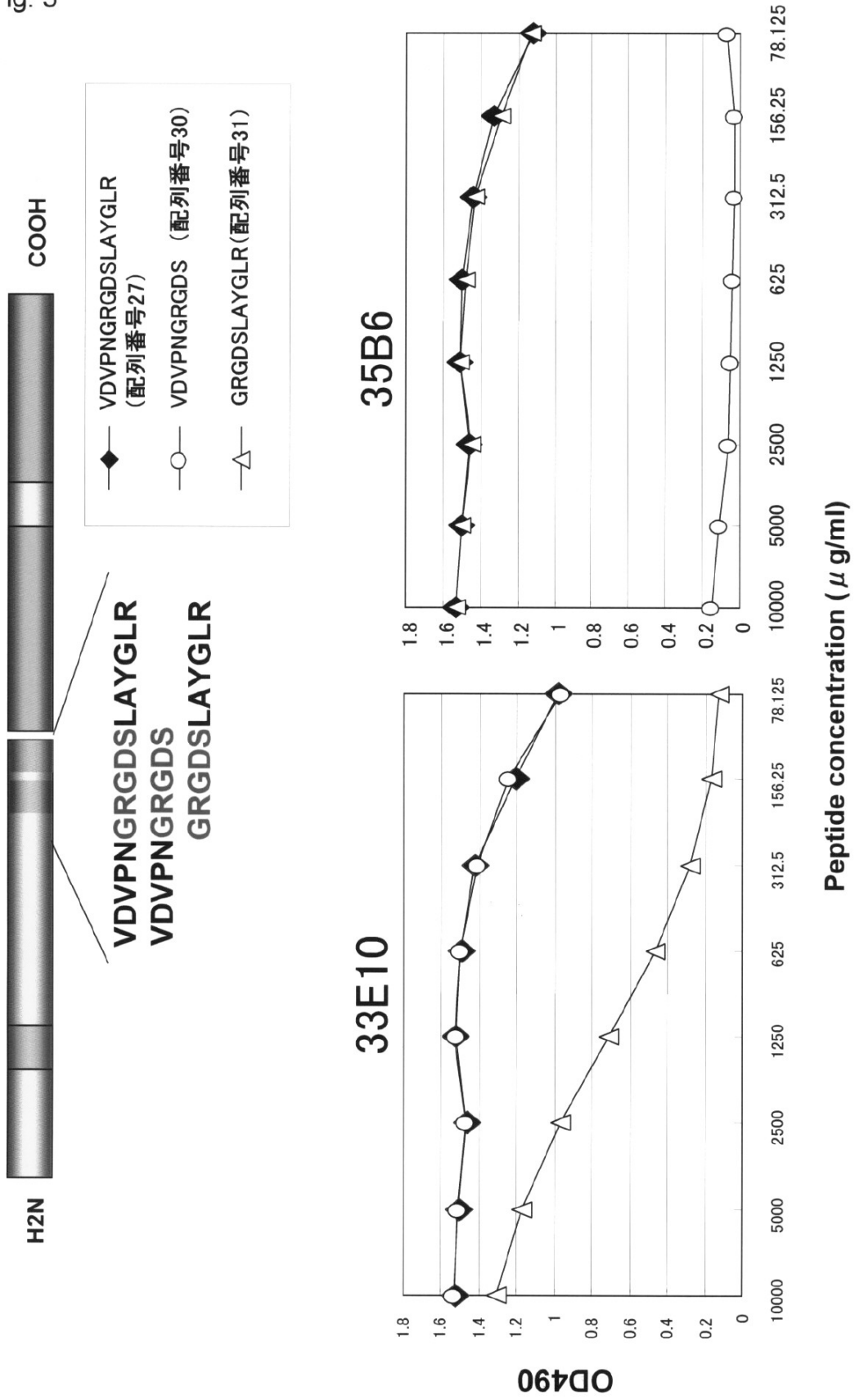
【 図 2 】

Fig. 2



【 図 3 】

Fig. 3



フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 29/00	(2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 31/00	(2006.01)	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 37/06	(2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 19/00	(2006.01)	A 6 1 P 19/00	
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/574	(2006.01)	G 0 1 N 33/574	A
C 1 2 N 5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/00	1 0 2

(72)発明者 上出 利光
北海道札幌市清田区真栄5条3丁目8番2号

審査官 伊達 利奈

(56)参考文献 特表2003-517284(JP,A)
特表2003-528322(JP,A)
特表平11-511478(JP,A)
国際公開第2003/027151(WO,A1)
国際公開第2002/081522(WO,A1)
国際公開第2004/103403(WO,A1)
Journal of Cellular Biochemistry, 2002, Vol.84, pp.420-432

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
C 0 7 K 1 6 / 0 0 - 1 6 / 4 6

PubMed

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

专利名称(译)	抗细胞外基质蛋白氨基酸序列RGD的抗体及其制备和应用		
公开(公告)号	JP5399710B2	公开(公告)日	2014-01-29
申请号	JP2008541053	申请日	2007-10-25
申请(专利权)人(译)	有限公司基因技术和科学		
当前申请(专利权)人(译)	有限公司基因技术和科学		
[标]发明人	今重之 木村千惠美 上出利光		
发明人	今重之 木村千惠美 上出利光		
IPC分类号	C07K16/18 C12N15/02 C07K16/46 C12P21/08 A61K39/395 A61P35/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P37/06 A61P19/00 G01N33/53 G01N33/574 C12N5/10		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P19/00 A61P19/10 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/12 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/06 C07K16/18 C07K16/44 C07K2317/34 C07K2317/565 C07K2317/76 G01N33/574 G01N33/6893 G01N2800/102 G01N2800/105 G01N2800/108 G01N2800/24 G01N2800/26		
FI分类号	C07K16/18.ZNA C12N15/00.C C07K16/46 C12P21/08 A61K39/395.N A61P35/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P37/06 A61P19/00 G01N33/53.D G01N33/574.A C12N5/00.102		
代理人(译)	小林 浩 藤田 尚 铃木康仁		
优先权	2006290737 2006-10-26 JP		
其他公开文献	JPWO2008050907A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供一种单克隆抗体，其特异性识别人和小鼠的细胞外基质蛋白的氨基酸序列中的RGD。通过特异性抑制RGD序列介导的粘附，可以同时发挥对炎症，癌症，感染性疾病，自身免疫疾病和骨质疏松症等疾病的有效效果，并且可以减少不良反应。因此，可以为这些疾病提供更好的治疗方法。

Fig. 7

