

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-524733

(P2014-524733A)

(43) 公表日 **平成26年9月25日(2014.9.25)**

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 B O 2 4
C O 7 K 16/40 (2006.01)	C O 7 K 16/40 Z N A	4 B O 6 3
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 6 4
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 C	4 B O 6 5
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 D	4 C O 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 55 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2013-549652 (P2013-549652)
 (86) (22) 出願日 平成24年4月27日 (2012.4.27)
 (85) 翻訳文提出日 平成25年12月10日 (2013.12.10)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2012/061795
 (87) 国際公開番号 WO2012/148003
 (87) 国際公開日 平成24年11月1日 (2012.11.1)
 (31) 優先権主張番号 特願2011-101752 (P2011-101752)
 (32) 優先日 平成23年4月28日 (2011.4.28)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(71) 出願人 507206192
 S B I バイオテック株式会社
 東京都港区六本木一丁目6番1号
 (74) 代理人 110000855
 特許業務法人浅村特許事務所
 (72) 発明者 山崎 智英
 東京都港区白金台4-7-4 白金台S T
 ビル S B I バイオテック株式会社内
 (72) 発明者 ザオ、ジン
 東京都港区白金台4-7-4 白金台S T
 ビル S B I バイオテック株式会社内
 (72) 発明者 石田 晃司
 東京都港区白金台4-7-4 白金台S T
 ビル S B I バイオテック株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗ヒト受容体型プロテインチロシンホスファターゼα抗体

(57) 【要約】

ヒト受容体型プロテインチロシンホスファターゼ (ヒト P T P R S) の細胞外ドメインに結合する抗体、またはその抗原結合領域を含む断片。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト受容体型プロテインチロシンホスファターゼ（ヒトPTPRS）の細胞外ドメインに結合するモノクローナル抗体、またはその抗原結合領域を含む断片。

【請求項 2】

形質細胞様樹状細胞に結合する請求項 1 に記載のモノクローナル抗体、またはその抗原結合領域を含む断片。

【請求項 3】

受託番号FERM BP - 11356として寄託されたハイブリドーマ9H5 - 4、
 受託番号FERM BP - 11357として寄託されたハイブリドーマ10F7 - 38、
 受託番号FERM BP - 11358として寄託されたハイブリドーマ13G5 - 52、
 受託番号FERM BP - 11359として寄託されたハイブリドーマ13G5 - 57、
 受託番号FERM BP - 11360として寄託されたハイブリドーマ14A8 - 85、
 受託番号FERM BP - 11361として寄託されたハイブリドーマ22H8 - 84、
 受託番号FERM BP - 11362として寄託されたハイブリドーマ49F2 - 30、
 または受託番号FERM BP - 11363として寄託されたハイブリドーマ55E7 - 79が産生するモノクローナル抗体、またはその抗原結合領域を含む断片。

10

【請求項 4】

請求項 1 または 2 に記載のモノクローナル抗体のいずれかを産生するハイブリドーマ。

【請求項 5】

受託番号FERM BP - 11356として寄託されたハイブリドーマ9H5 - 4、受託番号FERM BP - 11357として寄託されたハイブリドーマ10F7 - 38、受託番号FERM BP - 11358として寄託されたハイブリドーマ13G5 - 52、受託番号FERM BP - 11359として寄託されたハイブリドーマ13G5 - 57、受託番号FERM BP - 11360として寄託されたハイブリドーマ14A8 - 85、受託番号FERM BP - 11361として寄託されたハイブリドーマ22H8 - 84、受託番号FERM BP - 11362として寄託されたハイブリドーマ49F2 - 30、または受託番号FERM BP - 11363として寄託されたハイブリドーマ55E7 - 79が産生するモノクローナル抗体、またはその抗原結合領域を含む断片。

20

【請求項 6】

請求項 5 に記載のハイブリドーマを培養し、培養物からモノクローナル抗体を採取する工程を含む、モノクローナル抗体の製造方法。

30

【請求項 7】

次の工程を含む、ヒトPTPRSに結合するモノクローナル抗体を産生する細胞の製造方法；

(1) ヒトPTPRSの細胞外ドメインを含む外来性のタンパク質を発現する細胞を免疫動物に投与する工程、および

(2) 前記免疫動物の抗体産生細胞から、ヒトPTPRSに結合する抗体を産生する抗体産生細胞を選択する工程。

【請求項 8】

ヒトPTPRSを発現する細胞が、ヒトPTPRSの細胞外ドメインを含むアミノ酸配列をコードする外来性のポリヌクレオチドを発現可能に保持する細胞である請求項 7 に記載の方法。

40

【請求項 9】

前記細胞が動物細胞である請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記細胞がヒト由来の細胞である請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記ヒト由来の細胞が、HEK - 293T細胞である請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

50

得られた抗体産生細胞をクローン化する工程を付加的に含む、請求項 7 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

請求項 9 に記載の方法によって得られた抗体産生細胞を培養し、その培養物からモノクローナル抗体を採取する工程を含む、ヒト P T P R S の細胞外ドメインに結合するモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項 14】

下記の工程によって得ることができる、ヒト P T P R S を認識するモノクローナル抗体、またはその抗原結合領域を含む断片：

(1) ヒト P T P R S の細胞外ドメインを含むタンパク質を外来性に発現する細胞を免疫動物に投与する工程、

(2) 前記免疫動物の抗体産生細胞から、ヒト P T P R S に結合する抗体を産生する抗体産生細胞を選択する工程、および

(3) 工程(2)で選択された抗体産生細胞を培養しその培養物からヒト P T P R S を認識する抗体を回収する工程。

【請求項 15】

(a) ヒト P T P R S の細胞外ドメインを含むアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを外来性に発現可能に保持する動物細胞、またはその細胞膜分画を含む、ヒト P T P R S に結合する抗体を製造するための免疫原。

【請求項 16】

動物細胞がヒト由来の細胞である請求項 15 に記載の免疫原。

【請求項 17】

ヒト P T P R S の細胞外ドメインに結合するモノクローナル抗体、またはその抗原結合領域を含む断片を被検細胞と接触させ、該細胞に結合したモノクローナル抗体、またはその抗原結合領域を含む断片を検出する工程を含む、形質細胞様樹状細胞の検出方法。

【請求項 18】

ヒト P T P R S の細胞外ドメインに結合するモノクローナル抗体、またはその抗原結合領域を含む断片を含む、形質細胞様樹状細胞の検出用試薬。

【請求項 19】

次の成分のいずれかを形質細胞様樹状細胞に接触させる工程を含む、形質細胞様樹状細胞の活性抑制方法：

(a) ヒト P T P R S に結合し、形質細胞様樹状細胞の活性を抑制するモノクローナル抗体、またはその抗原結合領域を含む断片、

(b) (a) のモノクローナル抗体の相補性決定領域を移植したイムノグロブリン、またはその抗原結合領域を含む断片。

【請求項 20】

次の成分のいずれかを生体に投与する工程を含む、生体中の形質細胞様樹状細胞の活性抑制方法：

(a) ヒト P T P R S に結合し、形質細胞様樹状細胞の活性を抑制するモノクローナル抗体、またはその抗原結合領域を含む断片、

(b) (a) のモノクローナル抗体の相補性決定領域を移植したイムノグロブリン、またはその抗原結合領域を含む断片。

【請求項 21】

形質細胞様樹状細胞の活性が、インターフェロン産生活性およびインターフェロン産生細胞の生存のいずれか、または両方である請求項 19 または請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

次の成分のいずれかを有効成分として含む、形質細胞様樹状細胞の活性抑制剤：

(a) ヒト P T P R S に結合し、形質細胞様樹状細胞の活性を抑制するモノクローナル抗体、またはその抗原結合領域を含む断片、

(b) (a) のモノクローナル抗体の相補性決定領域を移植したイムノグロブリン、また

10

20

30

40

50

はその抗原結合領域を含む断片。

【請求項 23】

形質細胞様樹状細胞の活性が、インターフェロン産生活性およびインターフェロン産生細胞の生存のいずれか、または両方である請求項 22 に記載のインターフェロン産生細胞の活性抑制剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒト受容体型プロテインチロシンホスファターゼ に結合する抗体に関する。以下、「プロテインチロシンホスファターゼ」を P T P と略し、「受容体型プロテインチロシンホスファターゼ」を R P T P または P T P R と略し、「受容体型プロテインチロシンホスファターゼ」を R P T P - 、 P T P - 、 P T P R S と略することがあり、「ヒト」および「マウス」をそれぞれ h および m という接頭語で表示することがある。

10

【背景技術】

【0002】

インターフェロン（以下、「インターフェロン」を I F N と略することがある。）は、抗ウイルス免疫応答における最も重要なサイトカインである。ヒトの血中のインターフェロン産生細胞（I P C：I P C は、樹状細胞（D C）の前駆細胞と位置付けられる未分化のリンパ球系樹状細胞である。I P C は、形質細胞様樹状細胞またはプラズマ細胞様樹状細胞（p l a s m a c y t o i d d e n d r i t i c c e l l：p D C）と呼ばれることがある。以下、I P C と p D C はこれを同義であるとし、以下原則として用語 p D C で統一する。）は、C D 4 と主要組織適合複合体クラス II 蛋白質を発現する。しかし、このような細胞の数は少なくまた細胞は急速にアポトーシスを起こし、さらにリニエージマーカーを欠いていることから、今までそれらの細胞は単離され詳しい特徴づけがされていなかった。p D C は、C D 4 ⁺ C D 1 1 c ⁻ 2 型樹状細胞前駆細胞であることがわかり、微生物による刺激後、他の血液細胞よりも、2 0 0 ~ 1 0 0 0 倍多い I F N を産生することがわかっている。したがって、p D C 2 は抗ウイルスおよび抗腫瘍免疫応答において決定的な免疫系エフェクター細胞である。

20

I F N および I F N は、抗ウイルス活性または抗腫瘍活性を有する I 型 I F N として知られている。一方で、I F N は自己免疫疾患に関連していることが明らかにされた。たとえば、以下の自己免疫疾患患者において I F N の異常産生が報告されている。そして I F N の中和によって自己免疫症状が緩和される可能性が示唆されている。

30

全身性エリテマトーデス（Shiozawa et al., Arthr. & Rheum. 35, 412, 1992）、慢性関節リウマチ（Hopkins et al., Clin. Exp. Immunol. 73, 88, 1988）、さらに、組み換え I F N ₂ や I F N の投与によって自己免疫疾患症状が発現または悪化した例が報告されている（Wada et al., Am.J. Gastroenterol. 90, 136, 1995; Perez et al., Am. J. Hematol. 49, 365, 1995; Wilson LE et al, Semin Arthritis, Rheum. 32, 163-173, 2002）。

【0003】

また、I F N が樹状細胞（D C）の分化を誘導していることも明らかになった。樹状細胞は抗原提示細胞でもあるため、樹状細胞の分化誘導は、自己免疫疾患における重要なメカニズムを構成していると考えられる。実際、I F N の樹状細胞の分化誘導は、全身性エリテマトーデスの発症に密接に関連していることが示唆されている（Blanco et al., Science, 16:294,1540-1543,2001）。このように、I F N の抗腫瘍活性と自己免疫疾患との密接な関連性が指摘されている。また、I F N は乾癬の発症にも密接に関わっている（Nestle FO et al., J.Exp.Med. 202, 135-143, 2005）。

40

【0004】

わずかな量の p D C しか血中に存在していない。末梢血リンパ球における p D C の割合は、1%以下と考えられている。しかし p D C はきわめて高い I F N の産生能を有する。p D C の I F N 産生能は、たとえば 3 0 0 0 p g / m L / 1 0 ⁴ c e l l s に達する。す

50

なわち、細胞の数は少ないが、ウイルス感染時に産生される血中の I F N または I F N の大部分は、p D C によってもたらされていると考えられうる。

【 0 0 0 5 】

p D C は、ウイルス刺激によって樹状細胞に分化し、T 細胞による I F N - や I L - 1 0 の産生を誘導する。また p D C は、I L - 3 刺激によっても樹状細胞に分化する。I L - 3 刺激によって分化した樹状細胞は、T 細胞による T h 2 サイトカイン (I L - 4 、 I L - 5 、 I L - 1 0) の産生を誘導する。このように p D C は、刺激の違いによって異なる樹状細胞に分化する性質をもつ。

【 0 0 0 6 】

したがって p D C は、1 つは I F N 産生細胞としての側面、他は樹状細胞の前駆細胞としての側面の、2 つの側面をもつ細胞である。いずれの細胞も、免疫システムにおいて重要な役割を担っている。すなわち p D C は、様々な面で免疫システムを支える重要な細胞の一つである。

10

【 0 0 0 7 】

I F N のような液性因子の活性調節には、当該因子を認識する抗体の投与が有効である。たとえばインターロイキン (I L) - 1 または I L - 4 に対する抗体によって自己免疫疾患を治療する試みが実用化された (Guler et al., Arthritis Rheum, 44, S307, 2001)。またインターフェロン (I F N s) においても同様に、中和抗体が自己免疫疾患の治療薬となりうると考えられている (Stewart, TA. Cytokine Growth Factor Rev. 14; 139 -154, 2003)。p D C が産生する I F N に対しても同様のアプローチが有効であろうことは予想できる。しかしこのようなアプローチは、産生された液性因子の作用の阻害に基づいている。もし目的とする液性因子の産生を直接的に制御することができれば、より本質的な治療効果を達成することができる。

20

【 0 0 0 8 】

ヒト p D C を認識する抗体が報告されている。たとえば、抗 B D C A - 2 モノクローナル抗体は、ヒト p D C に特異的なモノクローナル抗体である (Dzionek A. et al., J. Immunol 165: 6037-6046, 2000)。抗 B D C A - 2 モノクローナル抗体は、ヒト p D C の I F N 産生を抑制する作用を有することが明らかにされた (J. Exp. Med. 194:1823-1834, 2001)。また、マウスのインターフェロン産生細胞を認識するモノクローナル抗体が、インターフェロンの産生を抑制することも報告された (Blood 2004 Jun 1;103/11:4201-4206. Epub 2003 Dec)。マウスの p D C に対するモノクローナル抗体が樹状細胞数を減少させることが報告された (J. Immunol. 2003, 171:6466-6477)。

30

【 0 0 0 9 】

同様にヒト p D C を認識し、その活性を調節しうる抗体が提供されれば有用である。たとえば本発明者らは既に、L y 4 9 Q を認識する抗体がマウス p D C に特異的に結合することを明らかにしている。しかし L y 4 9 Q に対する抗体は、マウス p D C の活性には干渉しなかった (Blood, 1 April 2005, vol. 105, No. 7, pp. 2787-2792 : W O 2 0 0 4 / 1 3 3 2 5 A 1)。

【 0 0 1 0 】

プロテインホスファターゼはグリコーゲン代謝の研究において見出された脱リン酸化酵素である。プロテインチロシンホスファターゼ (P T P) のほかに、プロテインセリン/スレオニンホスファターゼ、リン脂質特異的ホスファターゼ等が発見されており、これらはプロテインホスファターゼのスーパーファミリーを形成している。これらのうちプロテインチロシンホスファターゼは、タンパク質のチロシン残基に認められる可逆的なリン酸化修飾のうちリン酸化を担う酵素である。一方、タンパク質のチロシン残基に認められる可逆的なリン酸化修飾のうちリン酸化を担う酵素としてプロテインチロシンキナーゼ (P T K) がある。

40

【 0 0 1 1 】

プロテインチロシンホスファターゼ (P T P) はその細胞外ドメインにおけるリガンドの結合情報を細胞内ドメインのホスファターゼ活性に変換するが、プロテインチロシンキ

50

ナーゼ (PTK) がリガンドの結合により活性化されるのに対し、プロテインチロシンホスファターゼ (PTP) は通常、リガンドの結合により不活性化されると考えられている。したがって、プロテインチロシンホスファターゼ (PTP) とプロテインチロシンキナーゼ (PTK) のいずれにおいてもリガンド刺激はリン酸化レベルの上昇につながるものの、シグナル特性には大きな違いが予想されている。プロテインチロシンキナーゼ (PTK) の場合、受容体同士が相互にリン酸化し活性化されるというポジティブ・フィードバック制御が行われ、プロテインチロシンキナーゼ (PTK) 分子の局所の活性化が細胞膜上の他のプロテインチロシンキナーゼ (PTK) 分子に伝播し、その結果広範囲でリン酸化が上昇する。一方で、プロテインチロシンホスファターゼ (PTP) においてはリガンドが結合した分子のみが不活性化され、基質のリン酸化は局所的に上昇するに留まる。多くの生理機能、細胞機能に関わるプロテインチロシンホスファターゼ (PTP) は脳神経生化学、免疫学、ガン、糖尿病などの広い領域において注目を浴びている (自然科学研究機構、基礎生物学研究所、統合神経生物学研究部門のホームページ <http://niwww3.nibb.ac.jp/RPTP.pdf> の写し)。

10

【0012】

プロテインチロシンホスファターゼファミリーは、細胞膜貫通領域を有する受容体型と非受容体型に分類することができる。哺乳類には21分子の受容体型プロテインチロシンホスファターゼ (RPTP または PTPR とも略される) が存在し、8つのサブファミリーに分類され、各サブファミリーは特有の細胞外構造を有し、イムノグロブリン様ドメイン、フィブロネクチンIII型様ドメイン、炭酸脱水酵素様ドメイン、MAMドメインなどが認められる (Nat Rev Mol Cell Biol., Vol. 7, 833-846, 2006)。

20

【0013】

ヒト受容体型プロテインチロシンホスファターゼ (hRPTP -、hPTP - または hPTPRS と略されるが、ここでは主として hPTPRS の略記が用いられる) は、LAR (白血球抗原関連プロテインチロシンホスファターゼ)、受容体型プロテインチロシンホスファターゼ (PTP -) とともに R2A サブファミリーに属する。PTPRファミリーの酵素は動物の発生初期から成熟後までの神経系を含む様々な組織で発現しているが、それぞれの生理機能についてはリガンド分子と基質分子の同定が容易でないことがあり明らかになっているものは少ない。

樹状細胞 (DC) は、血液中、リンパ組織中などに存在する生体内における主要な抗原提示細胞であり、骨髄系樹状細胞 (mDC) と形質細胞様樹状細胞 (pDC) に大きく分類される。pDC はその細胞表面に Toll 様受容体として TLR7 および TLR9 を選択的に発現し、I型インターフェロン および、特にインターフェロン を産生する。

30

最近の研究により、樹状細胞に作用してその成熟や活性化を制御する種々のリガンド分子が明らかにされ、また、その受容体からの細胞内シグナル伝達機構が明らかになりつつある。しかしながら、樹状細胞の機能の調節および制御機構については不明な点が多い。他の多くの細胞で明らかにされてきたのと同様に、樹状細胞においても、タンパク質のリン酸化が受容体からのシグナル伝達・細胞運動/遊走性の制御等に重要な役割を果たしていると考えられている。タンパク質リン酸化の負の調節因子であるプロテインホスファターゼは、シグナルの強さ、長さを適正に保ち、結果、樹状細胞の活性化や機能を調節する因子として、有力な候補である。

40

(財団法人北海道科学技術総合振興センター (略称: ノーステック財団) のホームページ中の、田沼延公 (北海道大学遺伝子病制御研究所) 「樹状細胞成熟過程で誘導されるチロシンホスファターゼの機能解析」 http://www.noastec.jp/kinouindex/data2005/pdf/01/01_20.pdf)

【0014】

国際公開 WO 95 / 9656 A 1号公報は RPTP - (PTPRS) とそれをコードする核酸を開示しているが、開示されているアミノ酸配列はラット由来のものであり、PTPRS に特異的な抗体については言及がない。抗ヒト PTPRS 抗体についても国際公開 WO 95 / 9656 A 1号公報は開示していない。

50

国際公開WO2007/41317A1号公報は、少なくともRPTP- がRPTP- と特異的に結合し、免疫細胞の免疫応答性を抑制する単離された抗体またはその抗原結合フラグメントに関する。この文献には、RPTPと特異的に結合する抗体を使用することによりポックスウイルスポリペプチドA41LとRPTPとの結合を競合的に阻害し、結果的に免疫細胞の免疫応答性の抑制が達成される旨が記載されている。しかし、この文献はRPTP- (PTPRS)と特異的に結合する抗体を実際に取得したことを開示してはならず、その実施例の記載から判断する限り、A41Lと結合する免疫細胞で発現されたRPTPが、同じサブタイプR2Aに属するRPTP-、RPTP- およびLARの一部であることを確認し、LARのイムノグロブリン様ドメインとFcとの融合タンパク質(LAR(Igドメイン)-Fc融合タンパク質)を作成したに過ぎない。国際公開WO2007/41317A1号公報には、RPTP- のみに特異的な抗体やその作成が開示されているとは言いがたい。

10

RPTP-、即ち本願で言うPTPRSの特定の部位にのみ結合する抗体や、同じサブタイプR2Aに属するRPTP- やLARには結合せずにRPTP- (PTPRS)に特異的に結合し得る抗体は得られていない。ヒトPTPRSがpDCにおいて特異的な発現が見られる分子であるが、これまでヒトPTPRSに対する抗体は得られていない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0015】

【特許文献1】国際公開WO2004/13325A1号公報

【特許文献2】国際公開WO95/9656A1号公報

【特許文献3】国際公開WO2007/41317A1号公報

【非特許文献】

【0016】

【非特許文献1】Shiozawa et al., Arthr. & Rheum. 35, 412, 1992

【非特許文献2】Hopkins et al., Clin. Exp. Immunol. 73, 88, 1988

【非特許文献3】Wada et al., Am.J. Gastroenterol. 90, 136, 1995

【非特許文献4】Perez et al., Am. J. Hematol. 49, 365, 1995

【非特許文献5】Wilson LE et al, Semin Arthritis. Rheum. 32, 163-173, 2002

【非特許文献6】Blanco et al., Science, 16:294,1540-1543,2001

【非特許文献7】Nestle FO et al., J.Exp.Med. 202, 135-143, 2005

【非特許文献8】Guler et al., Arthritis Rheum., 44. S307, 2001

【非特許文献9】Stewart, TA. Cytokine Growth Factor Rev. 14; 139-154, 2003

【非特許文献10】Dzionek, A. et al. J.Immunol. 165: 6037-6046, 2000

【非特許文献11】J. Exp. Med.194:1823-1834, 2001

【非特許文献12】Blood 2004 Jun 1;103/11:4201-4206. Epub 2003 Dec

【非特許文献13】J. Immunol. 2003, 171:6466-6477

【非特許文献14】Blood, 1 April 2005, Vol. 105, No. 7, pp. 2787-2792

【非特許文献15】<http://niwww3.nibb.ac.jp/RPTP.pdf>

【非特許文献16】Nat Rev Mol Cell Biol., Vol. 7, 833-846, 2006

【非特許文献17】http://www.noastec.jp/kinouindex/data2005/pdf/01/01_20.pdf

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0017】

本発明の目的は、ヒト受容体型プロテインチロシンホスファターゼ (ヒトPTPRS、hRPTP-)に結合する抗体の提供、ならびにpDCの検出、同定、または単離である。また本発明の目的は、pDCの活性の調節である。

【0018】

本発明者らは、ヒトpDCに関する研究を通じて、PTPRSの発現がpDCにおいて

50

特異的に亢進していることを確認した。そこで本発明者らは、P T P R S の抗体の作成と、その作用の解明を試みた。

【 0 0 1 9 】

生体由来の微量のタンパク質を認識する抗体を得るためには、一般に、遺伝子組み換え技術によって作製されたタンパク質が免疫原として利用される。本発明者らは、既に明らかにされているヒト P T P R S の c D N A の塩基配列とそれによってコードされるアミノ酸配列 (GenBank Accession No. NM_002856.3) の情報を基に、ヒト P T P R S の発現を試みた。

【 0 0 2 0 】

タンパク質の抗体を得るために、天然のタンパク質の部分アミノ酸配列を免疫原として利用することもしばしば試みられる。しかし、抗体が細胞表面の分子を認識するためには、細胞表面においてエピトープとして抗体により認識される部分を構成している領域が選択されるべきである。したがって、断片アミノ酸配列を免疫原としてヒト P T P R S に特異的な抗体を得ることは、現実的でないと考えられた。

10

【 0 0 2 1 】

このような状況の下で、本発明者らは、特殊な免疫原を利用することによって p D C に結合する抗体が得られることを明らかにした。さらに、こうして得られた抗体がヒト p D C を特異的に認識し、さらにその活性を調節する作用を有することを確認して本発明を完成した。

即ち本発明は、以下の抗ヒト P T P R S 抗体、その製造方法、ならびにその用途に関する。

20

本発明は以下の通りである。

(1) ヒト受容体型プロテインチロシンホスファターゼ (ヒト P T P R S) の細胞外ドメインに結合するモノクローナル抗体、またはその抗原結合領域を含む断片。

(2) 形質細胞様樹状細胞に結合する前記 (1) に記載のモノクローナル抗体、またはその抗原結合領域を含む断片。

(3) 受託番号 F E R M B P - 1 1 3 5 6 として寄託されたハイブリドーマ 9 H 5 - 4

、
受託番号 F E R M B P - 1 1 3 5 7 として寄託されたハイブリドーマ 1 0 F 7 - 3 8

、
受託番号 F E R M B P - 1 1 3 5 8 として寄託されたハイブリドーマ 1 3 G 5 - 5 2

30

、
受託番号 F E R M B P - 1 1 3 5 9 として寄託されたハイブリドーマ 1 3 G 5 - 5 7

、
受託番号 F E R M B P - 1 1 3 6 0 として寄託されたハイブリドーマ 1 4 A 8 - 8 5

、
受託番号 F E R M B P - 1 1 3 6 1 として寄託されたハイブリドーマ 2 2 H 8 - 8 4

、
受託番号 F E R M B P - 1 1 3 6 2 として寄託されたハイブリドーマ 4 9 F 2 - 3 0

、または

受託番号 F E R M B P - 1 1 3 6 3 として寄託されたハイブリドーマ 5 5 E 7 - 7 9 が産生するモノクローナル抗体、またはその抗原結合領域を含む断片。

40

(4) 前記 (1) または (2) に記載のモノクローナル抗体のいずれかを産生するハイブリドーマ。

(5) 受託番号 F E R M B P - 1 1 3 5 6 として寄託されたハイブリドーマ 9 H 5 - 4

、
受託番号 F E R M B P - 1 1 3 5 7 として寄託されたハイブリドーマ 1 0 F 7 - 3 8

、
受託番号 F E R M B P - 1 1 3 5 8 として寄託されたハイブリドーマ 1 3 G 5 - 5 2

50

受託番号 F E R M B P - 1 1 3 5 9 とし て 寄 託 さ れ た ハ イ ブ リ ド ー マ 1 3 G 5 - 5 7
 、
 受託番号 F E R M B P - 1 1 3 6 0 とし て 寄 託 さ れ た ハ イ ブ リ ド ー マ 1 4 A 8 - 8 5
 、
 受託番号 F E R M B P - 1 1 3 6 1 とし て 寄 託 さ れ た ハ イ ブ リ ド ー マ 2 2 H 8 - 8 4
 、
 受託番号 F E R M B P - 1 1 3 6 2 とし て 寄 託 さ れ た ハ イ ブ リ ド ー マ 4 9 F 2 - 3 0
 、 または
 受託番号 F E R M B P - 1 1 3 6 3 とし て 寄 託 さ れ た ハ イ ブ リ ド ー マ 5 5 E 7 - 7 9
 が 産 生 す る モ ノ ク ロ ー ナ ル 抗 体 、 ま た は そ の 抗 原 結 合 領 域 を 含 む 断 片 。

(6) 前 記 (5) に 記 載 の ハ イ ブ リ ド ー マ を 培 養 し 、 培 養 物 か ら モ ノ ク ロ ー ナ ル 抗 体 を 採 取 す る 工 程 を 含 む 、 モ ノ ク ロ ー ナ ル 抗 体 の 製 造 方 法 。

(7) 次 の 工 程 を 含 む 、 ヒ ト P T P R S に 結 合 す る モ ノ ク ロ ー ナ ル 抗 体 を 産 生 す る 細 胞 の 製 造 方 法 ；

- 1) ヒ ト P T P R S の 細 胞 外 ド メ イ ン を 含 む 外 来 性 の タ ン パ ク 質 を 発 現 す る 細 胞 を 免 疫 動 物 に 投 与 す る 工 程 、 お よ び
- 2) 前 記 免 疫 動 物 の 抗 体 産 生 細 胞 か ら 、 ヒ ト P T P R S に 結 合 す る 抗 体 を 産 生 す る 抗 体 産 生 細 胞 を 選 択 す る 工 程 。

(8) ヒ ト P T P R S を 発 現 す る 細 胞 が 、 ヒ ト P T P R S の 細 胞 外 ド メ イ ン を 含 む ア ミ ノ 酸 配 列 を コ ー ド す る 外 来 性 の ポ リ ヌ ク レ オ チ ド を 発 現 可 能 に 保 持 す る 細 胞 で あ る 前 記 (7) に 記 載 の 方 法 。

(9) 前 記 細 胞 が 動 物 細 胞 で あ る 前 記 (8) に 記 載 の 方 法 。

(1 0) 前 記 細 胞 が ヒ ト 由 来 の 細 胞 で あ る 前 記 (9) に 記 載 の 方 法 。

(1 1) 前 記 ヒ ト 由 来 の 細 胞 が 、 H E K - 2 9 3 T 細 胞 で あ る 前 記 (1 0) に 記 載 の 方 法 。

(1 2) 得 ら れ た 抗 体 産 生 細 胞 を ク ロ ー ン 化 す る 工 程 を 付 加 的 に 含 む 、 前 記 (7) ~ (1 1) の い ず れ か 一 項 に 記 載 の 方 法 。

(1 3) 前 記 (9) に 記 載 の 方 法 に よ っ て 得 ら れ た 抗 体 産 生 細 胞 を 培 養 し 、 そ の 培 養 物 か ら モ ノ ク ロ ー ナ ル 抗 体 を 採 取 す る 工 程 を 含 む 、 ヒ ト P T P R S の 細 胞 外 ド メ イ ン に 結 合 す る モ ノ ク ロ ー ナ ル 抗 体 の 製 造 方 法 。

(1 4) 下 記 の 工 程 に よ っ て 得 る こ と が で き る 、 ヒ ト P T P R S を 認 識 す る モ ノ ク ロ ー ナ ル 抗 体 、 ま た は そ の 抗 原 結 合 領 域 を 含 む 断 片 ；

- 1) ヒ ト P T P R S の 細 胞 外 ド メ イ ン を 含 む タ ン パ ク 質 を 外 来 性 に 発 現 す る 細 胞 を 免 疫 動 物 に 投 与 す る 工 程 、
- 2) 前 記 免 疫 動 物 の 抗 体 産 生 細 胞 か ら 、 ヒ ト P T P R S に 結 合 す る 抗 体 を 産 生 す る 抗 体 産 生 細 胞 を 選 択 す る 工 程 、 お よ び
- 3) 工 程 2) で 選 択 さ れ た 抗 体 産 生 細 胞 を 培 養 し そ の 培 養 物 か ら ヒ ト P T P R S を 認 識 す る 抗 体 を 回 収 す る 工 程 。

(1 5) (a) ヒ ト P T P R S の 細 胞 外 ド メ イ ン を 含 む ア ミ ノ 酸 配 列 を コ ー ド す る ポ リ ヌ ク レ オ チ ド を 外 来 性 に 発 現 可 能 に 保 持 す る 動 物 細 胞 、 ま た は そ の 細 胞 膜 分 画 を 含 む 、 ヒ ト P T P R S に 結 合 す る 抗 体 を 製 造 す る た め の 免 疫 原 。

(1 6) 動 物 細 胞 が ヒ ト 由 来 の 細 胞 で あ る 前 記 (1 5) に 記 載 の 免 疫 原 。

(1 7) ヒ ト P T P R S の 細 胞 外 ド メ イ ン に 結 合 す る モ ノ ク ロ ー ナ ル 抗 体 、 ま た は そ の 抗 原 結 合 領 域 を 含 む 断 片 を 被 検 細 胞 と 接 触 さ せ 、 該 細 胞 に 結 合 し た モ ノ ク ロ ー ナ ル 抗 体 、 ま た は そ の 抗 原 結 合 領 域 を 含 む 断 片 を 検 出 す る 工 程 を 含 む 、 形 質 細 胞 様 樹 状 細 胞 の 検 出 方 法 。

(1 8) ヒ ト P T P R S の 細 胞 外 ド メ イ ン に 結 合 す る モ ノ ク ロ ー ナ ル 抗 体 、 ま た は そ の 抗 原 結 合 領 域 を 含 む 断 片 を 含 む 、 形 質 細 胞 様 樹 状 細 胞 の 検 出 用 試 薬 。

(1 9) 次 の 成 分 の い ず れ か を 形 質 細 胞 様 樹 状 細 胞 に 接 触 さ せ る 工 程 を 含 む 、 形 質 細 胞 様 樹 状 細 胞 の 活 性 抑 制 方 法 ；

10

20

30

40

50

(a) ヒト P T P R S に結合し、形質細胞様樹状細胞の活性を抑制するモノクローナル抗体、またはその抗原結合領域を含む断片、

(b) (a) のモノクローナル抗体の相補性決定領域を移植したイムノグロブリン、またはその抗原結合領域を含む断片。

(20) 次の成分のいずれかを生体に投与する工程を含む、生体中の形質細胞様樹状細胞の活性抑制方法：

(a) ヒト P T P R S に結合し、形質細胞様樹状細胞の活性を抑制するモノクローナル抗体、またはその抗原結合領域を含む断片、

(b) (a) のモノクローナル抗体の相補性決定領域を移植したイムノグロブリン、またはその抗原結合領域を含む断片。

(21) 形質細胞様樹状細胞の活性が、インターフェロン産生活性およびインターフェロン産生細胞の生存のいずれか、または両方である前記(19)または前記(20)に記載の方法。

(22) 次の成分のいずれかを有効成分として含む、形質細胞様樹状細胞の活性抑制剤：

(a) ヒト P T P R S に結合し、形質細胞様樹状細胞の活性を抑制するモノクローナル抗体、またはその抗原結合領域を含む断片、

(b) (a) のモノクローナル抗体の相補性決定領域を移植したイムノグロブリン、またはその抗原結合領域を含む断片。

(23) 形質細胞様樹状細胞の活性が、インターフェロン産生活性およびインターフェロン産生細胞の生存のいずれか、または両方である前記(22)に記載のインターフェロン産生細胞の活性抑制剤。

【発明の効果】

【0022】

本発明は、ヒト P T P R S を特異的に認識する抗体、その抗体の製造に有用な免疫原、およびその免疫原を利用する抗ヒト P T P R S 抗体の製造方法を提供する。ヒト P T P R S は、R P T P ファミリーに属する膜タンパク質である。本発明者らは、ヒト P T P R S を特異的に認識する抗体が容易に得られることを明らかにした。本発明によって得ることができる抗ヒト P T P R S 抗体は、他の R P T P ファミリーを発現している細胞と、ヒト p D C を識別する、高い特異性を有する抗体である。

【0023】

好ましい態様において、本発明によって提供された抗ヒト P T P R S 抗体は、ヒト p D C と結合する。しかも本発明の抗体は、ヒト p D C を特異的に認識する。したがって p D C の検出や単離に有用である。p D C は、タイプ 1 I F N の大部分を産生する細胞である。したがってその検出や単離は、自己免疫疾患のような、p D C が関与する疾患の診断や研究において重要である。

【0024】

さらに、本発明によって提供された抗ヒト P T P R S 抗体は、好ましい態様において、ヒト p D C の活性を調節する作用を有する。したがって、本発明の抗ヒト P T P R S 抗体は、p D C の活性抑制に利用することができる。したがって、本発明の抗体を利用した p D C の活性抑制を利用すれば、I F N の発現が亢進した自己免疫疾患の患者においても、治療効果を期待することができる。

【0025】

p D C は、わずかな細胞で多量の I F N を産生する。I F N の中和には、I F N の分子数に応じた抗体が必要である。しかし本発明においては、産生細胞の活性が直接抑制される。その結果、抗 I F N 抗体による中和と比較して、より少量の抗体で強力な I F N の抑制効果を期待できる。さらに、持続的に I F N が産生されている場合には、I F N の抗体による中和は一過的な抑制に留まると予想されるが、本発明においては、p D C の活性が抑制されることから、長期間にわたる I F N 産生抑制効果が期待できる。

【図面の簡単な説明】

【0026】

10

20

30

40

50

【図1】図1はPTPRSのアミノ酸配列(配列番号1)である。PTPRSは、免疫グロブリン様ドメイン(Ig-like domain)およびフィブロネクチンIII型様ドメインを細胞外領域に有する、一回膜貫通膜タンパク質である。また、細胞内領域に2つのプロテインチロシンホスファターゼ領域(PTP domain)を有する。

【図2】図2は各種免疫細胞におけるPTPRSの相対発現レベルを示すグラフである。PTPRSがpDC特異的に発現していることが示された。

【図3】図3はPTPRS遺伝子の発現の各組織間での比較を示すグラフである。PTPRS mRNAが膵臓や卵巣に比較的高い発現を示し、他の組織にも広範囲に発現している。

【図4】図4はヒトPTPRS(hPTPRS)発現細胞のFACSソーティングによる選択を示す。

【図5】図5は免疫したhPTPRS/D2SC/1細胞を用いたハイブリドーマのFACSスクリーニングを示す。抗hPTPRS抗体を産生する13個のハイブリドーマが得られた。

【図6】図6はCAL-1細胞を用いたFACSスクリーニングを示す。

【図7】図7はヒト末梢血pDCを用いたFACSスクリーニングを示す。

【図8】図8はhPTPRSと他のPTPRとの相同性を示すグラフである。PTPRSはPTPRファミリーに属し、そのうちいくつかのファミリー分子のアミノ酸配列はPTPRSのアミノ酸配列に対して高い相同性を有する。

【図9A】図9AはPTPRSを認識し、ヒトpDCに特異的に結合する抗体を産生する10種類のハイブリドーマ細胞培養上清(2G6、4B2、2G2、9H5、10F7、22H8、49F2、14A8、55E7、13G5)がPTPRSのみに特異的に結合するかどうかを示す試験結果である(hPTPREは細胞表面に発現しなかった)。その結果、2G6はPTPRFと交差反応性を示し(図9のD)、また4B2はPTPRDと交差反応性を示した(図9のC)。それ以外の9種類の抗体はPTPRS特異的な結合を示した。

【図9B】図9BはPTPRSを認識し、ヒトpDCに特異的に結合する抗体を産生する10種類のハイブリドーマ細胞培養上清(2G6、4B2、2G2、9H5、10F7、22H8、49F2、14A8、55E7、13G5)がPTPRSのみに特異的に結合するかどうかを示す試験結果である(hPTPREは細胞表面に発現しなかった)。その結果、2G6はPTPRFと交差反応性を示し(図9のD)、また4B2はPTPRDと交差反応性を示した(図9のC)。それ以外の9種類の抗体はPTPRS特異的な結合を示した。

【図9C】図9CはPTPRSを認識し、ヒトpDCに特異的に結合する抗体を産生する10種類のハイブリドーマ細胞培養上清(2G6、4B2、2G2、9H5、10F7、22H8、49F2、14A8、55E7、13G5)がPTPRSのみに特異的に結合するかどうかを示す試験結果である(hPTPREは細胞表面に発現しなかった)。その結果、2G6はPTPRFと交差反応性を示し(図9のD)、また4B2はPTPRDと交差反応性を示した(図9のC)。それ以外の9種類の抗体はPTPRS特異的な結合を示した。

【図9D】図9DはPTPRSを認識し、ヒトpDCに特異的に結合する抗体を産生する10種類のハイブリドーマ細胞培養上清(2G6、4B2、2G2、9H5、10F7、22H8、49F2、14A8、55E7、13G5)がPTPRSのみに特異的に結合するかどうかを示す試験結果である(hPTPREは細胞表面に発現しなかった)。その結果、2G6はPTPRFと交差反応性を示し(図9のD)、また4B2はPTPRDと交差反応性を示した(図9のC)。それ以外の9種類の抗体はPTPRS特異的な結合を示した。

【図10】図10は抗PTPRS抗体のサルとの交差反応性の試験結果である。すべてのハイブリドーマ細胞培養上清はカニクイザルのpDC細胞群(Lineage-CD123+ HLA-DR+)に特異的に結合した。

10

20

30

40

50

【図11A】図11Aはハイブリドーマのシングル化ソーティングを示す。FACS Aria (BD)を用いて単一細胞ソーティングを行い、そして、ハイブリドーマの細胞培養上清を用い、D2SC/1細胞とhPTPRS/D2SC/1細胞を染色し、シングルハイブリドーマを選択した。

【図11B】図11Bはハイブリドーマのシングル化ソーティングを示す。FACS Aria (BD)を用いて単一細胞ソーティングを行い、そして、ハイブリドーマの細胞培養上清を用い、D2SC/1細胞とhPTPRS/D2SC/1細胞を染色し、シングルハイブリドーマを選択した。

【図11C】図11Cはハイブリドーマのシングル化ソーティングを示す。FACS Aria (BD)を用いて単一細胞ソーティングを行い、そして、ハイブリドーマの細胞培養上清を用い、CAL-1細胞を染色し、シングルハイブリドーマを選択した。

【図11D】図11Dはハイブリドーマのシングル化ソーティングを示す。FACS Aria (BD)を用いて単一細胞ソーティングを行い、そして、ハイブリドーマの細胞培養上清を用い、ヒトpDCを染色し、シングルハイブリドーマを選択した。

【図12】図12はハイブリドーマの培養上清から得た精製抗体のエンドトキシン濃度を示す。いずれも基準値である0.3 EU/mg Ab以下であった。

【図13】図13は精製抗体の細胞表面上のヒトPTPRSに対する結合能の試験結果である。いずれの抗体も結合能を維持していることが確認できた。

【図14】図14は精製抗体がヒト末梢血のpDC細胞群(BDCA2+)に対する特異的な結合を示す。

【図15】図15は抗ヒトPTPRS抗体がマウスPTPRSにも結合するのかどうかを試験した結果である。49F2-30、13G5-52、13G5-57、および22H8-14はmPTPRS/CHOに結合した。

【図16】図16は抗PTPRS抗体のhPTPRS発現細胞への捕体依存的細胞傷害活性を示す。ヒトPTPRS/CHO(図16A)およびマウスPTPRS/CHO(図16B)に対する抗PTPRS抗体の補体依存的細胞傷害活性を測定した。その結果、ヒトPTPRS/CHOのターゲットに対し、13G5-52と13G5-57は約20%のCDC活性を示し(A)。一方で、マウスPTPRS/CHOのターゲットに対しては、13G5-52と13G5-57は約100%のCDC活性を示した(B)。

【図17】図17は抗hPTPRSキメラ抗体のch49F2-30(図17A)、ch9H5-4、ch13G5-57およびch22H8-84(図17B)がエフェクター細胞数依存的にターゲットのhPTPRS/CHO細胞を傷害することを示す。

【図18】図18は抗PTPRSキメラ抗体のch49F2-30、ch9H5-4、ch13G5-57およびch22H8-84処理によってIFN産生が完全に阻害されることが示され(図18A)、pDC細胞群がコントロール抗体のSynagis処理よりも減少していることがわかった(図18Bおよび図18C)。

【発明を実施するための形態】

【0027】

ヒトPTPRSは、プラズマ細胞様樹状細胞pDCにおいて特異的な発現が見られる分子である。しかしヒトPTPRSを認識する抗体の製造方法は確立されていなかった。

【0028】

ヒトPTPRSは、4つのアイソフォームが知られており、1948個のアミノ酸残基からなるアイソフォーム1、1910個のアミノ酸残基からなるアイソフォーム2、1501個のアミノ酸残基からなるアイソフォーム3、および1505個のアミノ酸残基からなるアイソフォーム4がある。これらは、その構造中に細胞外構造として3つのIgドメイン(第一のIgドメイン、第二のIgドメイン、第三のIgドメイン)、フィブロネクチンII I型様ドメインと、膜貫通ドメイン(トランスメンブランダドメイン、TM領域)と、細胞内構造として2つのホスファターゼドメイン(D1およびD2ドメイン)が認められる。プロテインチロシンホスファターゼ(PTP)活性は細胞膜に近いD1ドメインのみが有している。図1にはシグナルペプチドと代表的なドメインをアミ

10

20

30

40

50

ノ酸配列中にマークしてある。

ヒトPTPRSのアイソフォーム3は配列番号1(図1)の831~851を膜貫通ドメインとして含む膜貫通タンパク質である。N末端を含む1501アミノ酸残基のうち、29アミノ酸残基(配列番号1における1から29)がシグナル配列で、30~830が細胞外ドメインを構成する。一方C末端側は細胞内ドメインである。PTPRSにおいては細胞外環境にあるリガンドが活性を制御しうると考えられている。

【0029】

本発明者らは遺伝子発現解析によって、ヒトPTPRSがヒトpDCにおいて特異的に発現していることを確認した。彼らは、ヒトPTPRSを他の分子と識別できる抗体が得られれば、pDCの研究に有用であろうと考えた。ところがヒトPTPRSを含むPTPファミリーには、類似する構造をもつ多くの分子が存在する。RPTP-であるPTPRSや、PTPRA(RPTP-)、PTPRD(RPTP-)、PTPRE(RPTP-)、PTPRF(RPTP-)などの分子は、特に相同性の高いアミノ酸配列を含む(図8)。したがって、細胞外ドメインを構成するアミノ酸配列の部分配列を使ったドメインペプチドを免疫原として使い、各々からこれらの分子を相互に識別することができる抗体を得ることは困難であろうと考えた。そこで本発明者らは、ヒトPTPRSを発現する細胞を免疫原として使い、ヒトPTPRSに対する抗体の取得を試みた。

10

【0030】

本発明者らはヒトPTPRSを認識する抗体を取得するために研究を重ね、特定の形質転換細胞を免疫原として使うことによって、目的とする抗体が得られることを明らかにして本発明を完成した。すなわち本発明は、ヒトPTPRSの細胞外ドメインに結合するモノクローナル抗体、またはその抗原結合領域を含む断片に関する。

20

【0031】

本発明において、ヒトPTPRSはヒトpDCに発現している天然の分子、またはヒトpDCに発現しているヒトPTPRSと免疫学的に同等な分子と定義することができる。本発明において、抗体がヒトPTPRSに結合することは、たとえば次のようにして確認することができる。

- ヒト細胞との反応性に基づく確認：

本発明者らの得た知見によれば、ヒトPTPRSは、ヒトpDCに特異的な発現が見られることから、pDCのマーカーとして利用できると考えられる。

30

【0032】

このようなヒトPTPRSの発現プロファイルに基づけば、まず、pDCの少なくとも一部のサブセットとの結合活性は、本発明におけるヒトPTPRSに結合する抗体の重要な特徴の一つである。ある細胞がpDCであることは、各細胞群に固有の細胞表面マーカーによって確認することができる。たとえば、細胞表面マーカーに結合する抗体と、結合活性を確認すべき抗体による二重染色によって、目的とする細胞に対して結合することが確認される。すなわち、本発明におけるpDCは、たとえばBDCA2を発現する細胞を含む。

【0033】

- ヒトPTPRS遺伝子を発現する形質転換細胞との反応性に基づく確認：

40

本発明者らは、特定の条件でヒトPTPRS遺伝子を発現させたときに、ヒトpDCで発現しているヒトPTPRSの免疫学的特徴が再構成されることを確認した。したがってヒトPTPRSをコードする遺伝子を人為的に導入した細胞に対する抗体の反応性に基づいて、ヒトPTPRSとの反応性を確認することができる。すなわち本発明は、ヒトPTPRSの細胞外ドメインを構成するアミノ酸配列を細胞外ドメインとして含む分子と結合するモノクローナル抗体、またはその抗原結合領域を含む断片に関する。なお細胞外ドメインは、配列番号1に示したアミノ酸配列のN末端から配列番号1(図1)における30~830に相当するアミノ酸配列によって構成される。

例えば、ヒトPTPRSをコードするDNAを含む発現ベクターで形質転換した細胞においては、ヒトpDCで発現しているPTPRSの免疫学的特徴が維持される。したがっ

50

て、ヒトPTPRSを発現する形質転換細胞は、本発明におけるヒトPTPRSの細胞外ドメインに対する抗体の結合性を確認するための細胞として好ましい。本発明において、形質転換細胞によって抗体の反応性を確認するときには、対照として、形質転換されていない細胞を利用するのが望ましい。

【0034】

次に、本発明におけるヒトPTPRSに結合する抗体は、ヒトPTPRS以外のPTPファミリーを発現していることが知られている細胞群との交差性が見られる抗体であっても見られない抗体であってもよい。交差性が見られない抗体は本発明におけるヒトPTPRSに結合する抗体として好ましい。具体的には、pDCに対する結合を確認した条件と同じ条件の下で、ヒトPTPRS以外のPTPファミリーを発現していることが知られている細胞群との結合がある抗体は、本発明におけるヒトPTPRSに結合する抗体として好ましい。

10

【0035】

すなわち本発明におけるヒトPTPRSの細胞外ドメインに結合するモノクローナル抗体とは、好ましくは、以下の免疫学的特徴を有するモノクローナル抗体を含む。

a) ヒトpDCと結合する、

b) ヒトpDCと結合する条件下で、単球、マクロファージ、B細胞、CD34陽性細胞ならびにこれらの細胞に由来する樹状細胞からなる群から選択される1または複数種との結合が確認できない。

特に、ヒトpDCと結合する条件下で、単球、マクロファージ、B細胞、CD34陽性細胞およびこれらの細胞に由来する樹状細胞からなる群から選択される1または複数種との結合が確認できない抗体は、本発明のモノクローナル抗体として好ましい。

20

【0036】

あるいは本発明におけるヒトPTPRSの細胞外ドメインに結合するモノクローナル抗体とは、好ましくは、以下の免疫学的特徴を有するモノクローナル抗体を含む。

c) ヒトPTPRSをコードするDNAを発現可能に保持した発現ベクターで形質転換された形質転換細胞と結合する、

d) c)の形質転換細胞と結合する条件下で、c)の形質転換される前の宿主細胞との結合が確認できない。

【0037】

本発明において、抗ヒトPTPRSモノクローナル抗体が、PTPファミリーの他の分子と交差しないことは、各PTPファミリーを強制発現させた細胞を使って確認することができる。すなわち、各PTPファミリーのアミノ酸配列をコードするcDNAを適当な宿主細胞に導入して強制発現させる。得られた形質転換細胞に対して、交差性を確認すべき抗ヒトPTPRSモノクローナル抗体を接触させる。そして、ヒトPTPRS以外のPTPファミリー分子を発現する細胞に対する結合が見られなければ、その抗体がヒトPTPRSを他のPTPファミリー分子と免疫学的に識別できることが確認できる。例えば後に述べる実施例においては、本発明によって得られた抗ヒトPTPRSモノクローナル抗体のほとんどが、特にPTPRSとの相同性の高かったPTPRA、PTPRD、およびPTPRFと交差しないことが確認されている。したがって、ヒトPTPRSと結合し、同じ条件においてPTPRA、PTPRD、およびPTPRFとの結合が検出できないモノクローナル抗体は、本発明における好ましいモノクローナル抗体である。これらPTPファミリー分子をPTPRSと免疫学的に識別することができる抗体を利用すれば、PTPRSの発現の変化を特異的に検出することができる。なお、PTPRSとの相同性の高い分子のなかで、PTPREの発現は細胞内で確認できるが細胞外では発現しないことが判明した。ゆえに抗体としてはPTPREには結合しない。

30

40

【0038】

結合活性を確認すべきモノクローナル抗体と、各種の細胞との結合は、たとえばフローサイトメトリーの原理で確認することができる。フローサイトメトリーの原理による抗体の反応性の確認のためには、抗体をあらかじめ検出可能なシグナルを生成する分子または

50

原子団で標識しておくことが有利である。一般的には、蛍光標識や発光標識が利用される。蛍光標識した抗体と細胞との結合をフローサイトメトリーの原理で解析するために、蛍光標示式細胞分取器 (fluorescence-activated cell sorter; FACS) を利用することができる。FACS を利用することによって、複数の抗体と細胞との結合を効率的に確認することができる。

【0039】

具体的には、たとえば pDC を同定することができることがあらかじめ明らかな抗体 A と、pDC との結合特性を解析すべき抗体 B を同時に pDC を含む細胞群に反応させる。抗体 A と抗体 B にはあらかじめ互いに識別できる蛍光シグナルを標識しておく。もし両者のシグナルが同じ細胞群から検出されれば、それらの抗体が同じ細胞群に結合していることが確認できる。すなわち、抗体 A と抗体 B が同じ結合特性を有していることがわかる。もしもそれらが異なる細胞群に結合したときは、両者の結合特性が異なることが明らかである。

10

【0040】

本発明における好ましいモノクローナル抗体の例として、たとえば、ハイブリドーマ 9H5-4、10F7-38、13G5-52、13G5-57、14A8-85、22H8-84、49F2-30 または 55E7-79 が産生するモノクローナル抗体を示すことができる。

ハイブリドーマ 9H5-4、10F7-38、13G5-52、13G5-57、14A8-85、22H8-84、49F2-30 および 55E7-79 は、2011年4月1日付けで産業技術総合研究所内特許生物寄託センターに対して、それぞれ受託番号 FERMBP-11356、FERMBP-11357、FERMBP-11358、FERMBP-11359、FERMBP-11360、FERMBP-11361、FERMBP-11362 および FERMBP-11363 として寄託されている。以下に、寄託を特定する内容を記載する。

20

(a) 寄託機関の名称・あて名

名称：産業技術総合研究所 特許生物寄託センター

あて先：日本国茨城県つくば市東1丁目1番1号つくば中央第6（郵便番号305-8566）

(b) 寄託日：2011年3月17日

30

(c) 受領番号 FERMBP-11356 (ハイブリドーマ 9H5-4)

(c) 受領番号 FERMBP-11357 (ハイブリドーマ 10F7-38)

(c) 受領番号 FERMBP-11358 (ハイブリドーマ 13G5-52)

(c) 受領番号 FERMBP-11359 (ハイブリドーマ 13G5-57)

(c) 受領番号 FERMBP-11360 (ハイブリドーマ 14A8-85)

(c) 受領番号 FERMBP-11361 (ハイブリドーマ 22H8-84)

(c) 受領番号 FERMBP-11362 (ハイブリドーマ 49F2-30)

(c) 受領番号 FERMBP-11363 (ハイブリドーマ 55E7-79)

【0041】

本発明のモノクローナル抗体は、その抗原結合領域を含む断片であってもよい。たとえば IgG の酵素的な消化によって生成される、抗原結合部位を含む抗体断片も、本発明における抗体として利用することができる。具体的には、パインまたはペプシンによる消化によって、Fab または F(ab')₂ などの抗体断片を得ることができる。これらの抗体断片は、抗原との結合親和性を有する抗体分子として利用しうことは周知である。あるいは、必要な抗原結合活性を維持している限り、遺伝子組み換えによって構築された抗体を用いることもできる。遺伝子組み換えによって構築された抗体としては、たとえばキメラ抗体、CDR 移植抗体、シングルチェーン Fv、diabody、線状抗体、および抗体断片より形成された多特異性抗体などを示すことができる。モノクローナル抗体、またはそれを産生する抗体産生細胞をもとに、これらの抗体を得る方法は公知である。

40

【0042】

50

本発明のモノクローナル抗体は、特定の形質転換細胞を免疫原とすることによって得ることができる。すなわち本発明は、以下を含む、ヒトPTPRSの細胞外ドメインに結合するモノクローナル抗体を産生する細胞の製造方法に関する。

(1) ヒトPTPRSの細胞外ドメインを含む外来性の蛋白質を発現する細胞を免疫動物に投与し、そして

(2) 前記免疫動物の抗体産生細胞から、ヒトPTPRSに結合する抗体を産生する細胞を選択する。

このようにして得られた抗体産生細胞、または不死化された当該抗体産生細胞を培養し、その培養物から目的とするモノクローナル抗体を回収することができる。抗体産生細胞を不死化するための方法については種々の方法が公知である。

【0043】

本発明において免疫原として用いられる形質転換細胞は、たとえば下記のヒトPTPRSの細胞外ドメインを含むアミノ酸配列をコードする外来性のポリヌクレオチド(a)を発現可能に保持した細胞を調製することによって得ることができる。

本発明において、外来性のポリヌクレオチドとは、当該ポリヌクレオチドが人為的に宿主細胞に導入されたものであることをいう。細胞としてヒト細胞が用いられる場合には、ヒトの細胞にヒトの遺伝子が導入される。このような組み合わせにおいても、人為的に導入されたポリヌクレオチドは、外来性のポリヌクレオチドとよばれる。したがって、ヒトPTPRSの異所性(ectopic)の発現は、外来性のポリヌクレオチドの発現に含まれる。

【0044】

本発明において、ヒトPTPRSの細胞外ドメインとは、配列番号1に記載のアミノ酸配列の細胞外ドメインに相当する30~830位のアミノ酸配列をいう。たとえば、N末端側から順に、以下に示す各領域を含むアミノ酸配列は、本発明におけるヒトPTPRSの細胞外ドメインを含むアミノ酸配列として好ましい。

[シグナル配列+細胞外ドメイン+膜貫通ドメイン+細胞内領域]

あるいは、下記のように細胞内領域を部分的に欠くアミノ酸配列も、本発明におけるヒトPTPRSの細胞外ドメインを含むアミノ酸配列に含まれる。

[シグナル配列+細胞外ドメイン+膜貫通ドメイン+細胞内領域の一部]

さらに、下記のように細胞内領域を欠いた構造も、本発明におけるヒトPTPRSの細胞外ドメインを含むアミノ酸配列に含まれる。

[シグナル配列+細胞外ドメイン+膜貫通ドメイン]

【0045】

前記構造において、細胞外ドメイン以外の領域は、配列番号1に示すアミノ酸配列から選択された配列であることもできるし、その他の相同なアミノ酸配列を組み合わせることもできる。たとえば、シグナル配列、膜貫通ドメイン、および細胞内領域を構成するアミノ酸配列は、ヒトPTPRS以外のPTPファミリー分子のアミノ酸配列とすることもできる。あるいは、ヒト以外の種のPTPファミリーのアミノ酸配列を組み合わせることもできる。さらに、細胞外ドメイン以外の領域を構成するアミノ酸配列には、各領域の機能を維持できる範囲で、変異を含むことができる。また、各領域の間に、その他の領域を介在させることもできる。たとえば、シグナル配列と細胞外ドメインの間に、FLAGなどのエピトプタグを挿入することもできる。特にシグナル配列は、タンパク質に翻訳された後、細胞膜表面に移送される段階でプロセシングされて除去される領域である。したがって、翻訳されたタンパク質の細胞膜の通過を誘導する任意のアミノ酸配列を、シグナル配列として利用することができる。より具体的には、ヒトPTPRSのアミノ酸配列(配列番号1)は、ヒトPTPRSの細胞外ドメインを含むアミノ酸配列として好ましい。

【0046】

したがって、本発明において、前記(a)を構成するポリヌクレオチドは、前記構造[シグナル配列+細胞外ドメイン+膜貫通ドメイン+細胞内領域]を構成するアミノ酸配列をコードする任意の塩基配列を利用することができる。たとえば配列番号1のアミノ酸配列は、配列番号2に記載の塩基配列によってコードされている。

10

20

30

40

50

【0047】

本発明において、免疫原として用いられる形質転換細胞を得るには、適当な宿主細胞に、上記ポリヌクレオチド(a)を発現可能に保持した発現ベクターを導入すればよい。

【0048】

本発明において、好ましい宿主細胞は、哺乳動物細胞である。具体的には、ヒト、サル、マウス、またはラットに由来する細胞を宿主細胞として利用することができる。特にヒト由来の細胞は、宿主細胞として好ましい。例えば、HEK-293T細胞は、本発明における宿主細胞として利用することができる好ましいヒト胚由来の腎細胞株である。HEK-293T細胞は、ATCC CRL-11268として入手することができる。他の免疫動物に由来する細胞も、宿主細胞として利用することができる。免疫動物に由来する細胞を免疫原として利用すれば、宿主細胞に対する免疫応答が少ない。そのため、外来性に発現しているヒトPTPRSの細胞外ドメインに対する抗体を効率的に得ることができる。したがって、たとえば、マウスを免疫動物とするときには、マウス由来の細胞を宿主細胞として利用することもできる。

10

【0049】

前記ポリヌクレオチドは、宿主細胞において発現を誘導できるベクターに搭載して細胞に形質転換することができる。哺乳動物細胞において発現を誘導できる市販のベクターを利用すればよい。例えば、pCMV-Script(R) Vector、pSG5 Vector (Stratagene製)、pcDNA3.1 (Invitrogen製)などの発現ベクターを本発明に利用することができる。

20

【0050】

こうして得られた形質転換細胞は、必要に応じてアジュバント等の付加的な成分とともに免疫動物に投与される。アジュバントとしては、フロインドのコンプリートアジュバントなどを利用することができる。マウスを免疫動物に用いる場合、形質転換細胞は、 $10^4 \sim 10^9$ 個の細胞、より具体的には $10^4 \sim 10^6$ 個の細胞を投与することができる。一般に、免疫原は、抗体価が上昇するまで間隔をあけて複数回投与される。たとえば、短期間免疫法の場合は、2~4日、より具体的には3日の間隔で形質転換細胞を投与し、2~3回の投与の後に抗体産生細胞を回収することができる。また週1回程度の間隔で5~6回投与した後に抗体産生細胞を回収することもできる。

【0051】

本発明においては、モノクローナル抗体を得るために、回収された抗体産生細胞がクローニングされる。クローニングのために、抗体産生細胞を不死化するのが好ましい。たとえばハイブリドーマ法に代表される細胞融合法や、エプスタイン・バール・ウイルス(EBV)による形質転換を、抗体産生細胞を不死化するための方法として利用することができる。

30

【0052】

抗体産生細胞は、1つの細胞が1種類の抗体を産生している。したがって、1つの細胞に由来する細胞集団を確立すること(すなわちクローニング)ができれば、モノクローナル抗体を得ることができる。ハイブリドーマ法とは、抗体産生細胞を適当な細胞株と融合させ、不死化(immortalize)した後にクローニングする方法をいう。不死化された抗体産生細胞は、限界希釈法(limiting dilution method)などの手法によりクローニングすることができる。ハイブリドーマ法に有用な多くの細胞株が知られている。これらの細胞株は、リンパ球系細胞の不死化効率に優れ、かつ細胞融合に成功した細胞の選択に必要な各種の遺伝マーカーを有している。さらに抗体産生細胞の取得を目的とする場合には、抗体産生能を欠落した細胞株を用いることもできる。

40

【0053】

たとえばマウスミエロマP3x63Ag8.653(ATCC CRL-1580)やP3x63Ag8U.1(ATCC CRL-1597)は、マウスやラットの細胞融合法に有用な細胞株として広く用いられている。一般にハイブリドーマは、同種の細胞の融合によって作成されるが、近縁の異種間でのヘテロハイブリドーマからモノクローナル抗体を取得することもできる。

【0054】

50

細胞融合の具体的なプロトコルは公知である。すなわち、免疫動物の抗体産生細胞を適当な融合パートナーと混合し、細胞融合させる。抗体産生細胞には、脾細胞、リンパ節から採取されたリンパ球細胞、末梢血B細胞などが用いられる。融合パートナーとしては、先に述べた各種の細胞株を利用することができる。細胞融合には、ポリエチレングリコール法や、電気融合法が用いられる。

次に、融合細胞が有する選択マーカーに基づいて、細胞融合に成功した細胞が選択される。たとえばHAT感受性の細胞株を細胞融合に用いた場合には、HAT培地において成育する細胞を選択することによって、細胞融合に成功した細胞が選択される。さらに選択された細胞が産生する抗体が、目的とする反応性を有していることを確認する。

【0055】

各ハイブリドーマは、抗体の反応性に基づいて、スクリーニングされる。すなわち、先に述べたような方法によって、ヒトPTPRSに結合する抗体を産生するハイブリドーマが選択される。好ましくは、選択されたハイブリドーマをサブクロニングし、最終的に目的とする抗体の産生が確認された場合に、本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマとして選択する。

【0056】

具体的には、ヒト細胞との反応性、またはヒトPTPRS遺伝子を発現する形質転換細胞との反応性に基づいて、目的とするハイブリドーマを選択することができる。細胞に結合する抗体は、イムノアッセイの原理によって検出することができる。たとえば、細胞を抗原として利用するELISAを、目的とする抗体の検出に利用することができる。具体的には、ヒトpDC、または免疫原として利用した形質転換細胞を固定化した担体に、ハイブリドーマの培養上清を接触させる。培養上清が目的とする抗体を含む場合には、抗体が担体に固定化された細胞に捕捉される。次いで、固相を培養上清から分離し、必要に応じて洗浄した後に、固相に捕捉された抗体を検出することができる。抗体の検出には、抗体を認識する抗体を利用することができる。たとえば、マウスの抗体は、抗マウスイムノグロブリン抗体によって検出することができる。もし抗体を認識する抗体をあらかじめ標識しておけば、その検出が容易である。標識としては、酵素、蛍光色素、発光色素などを利用することができる。

一方、細胞を固定化する担体としては、粒子や、マイクロタイタープレートの内壁を利用することができる。プラスチック製の粒子や容器の表面に、細胞を物理吸着によって固定することができる。たとえばポリスチレン製のビーズや反応容器を、細胞を固定するための担体として利用することができる。

【0057】

ハイブリドーマの選択において、ヒトPTPRSではなく、免疫原に用いた形質転換細胞の宿主細胞に対する抗体の産生が予測される場合がある。たとえば、実施例に示したように、ヒト細胞を免疫原としマウスを免疫動物に利用すると、ヒト細胞が異物として認識され、それに結合する抗体の産生が予測される。本発明においては、ヒトPTPRSを認識する抗体の取得を目的とする。したがって、ヒトPTPRS以外のヒト細胞抗原を認識する抗体を取得する必要はない。このような抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングで排除するために、抗体の反応性の確認に先立ち、目的としない抗体を予め吸収することができる。

【0058】

目的としない抗体は、存在が予測される抗体が結合する抗原によって吸収することができる。具体的には、たとえばヒトPTPRS以外のヒト細胞抗原に対する抗体は、ヒトPTPRSの発現が検出できない細胞によって吸収することができる。本発明において、免疫原に用いた宿主細胞は、目的としない抗体を吸収するための抗原として好ましい。

【0059】

必要に応じて、抗原に対する結合活性が確認されたモノクローナル抗体の、pDCの活性に与える実際の影響が確認される。pDCに対する影響は、たとえば後に述べるような方法によって確認することができる。

10

20

30

40

50

【0060】

本発明のモノクローナル抗体は、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを培養して得られた培養物から回収することができる。ハイブリドーマは、*in vitro*または*in vivo*で培養することができる。*in vitro*においては、RPMI1640などの公知の培地を用いて、ハイブリドーマを培養することができる。培養上清には当該ハイブリドーマが分泌したイムグロブリンが蓄積される。したがって、培養上清を採取し、必要に応じて精製することにより、本発明のモノクローナル抗体を得ることができる。培地には血清を添加しない方が、イムグロブリンの精製が容易である。しかし、ハイブリドーマのより迅速な増殖と、抗体産生の促進を目的として、約10%のウシ胎児血清を培地に加えることもできる。

10

【0061】

ハイブリドーマは、*in vivo*において培養することもできる。具体的には、ヌードマウスの腹腔にハイブリドーマを接種することにより、腹腔内でハイブリドーマを培養することができる。モノクローナル抗体は、腹水中に蓄積する。したがって、腹水を採取し、必要に応じて精製すれば、必要なモノクローナル抗体を得ることができる。得られたモノクローナル抗体は、目的に応じて適切に修飾または加工することができる。

【0062】

本発明のモノクローナル抗体は、当該ハイブリドーマから抗体の抗原結合領域をコードするcDNAを取得し、これを適当な発現ベクターに挿入することによって発現させることができる。抗体の可変領域をコードするcDNAを取得し、適当な宿主細胞に発現させる技術は公知である。また抗原結合領域を含む可変領域を、定常領域と結合させることによってキメラ抗体とする手法も公知である。

20

【0063】

例えば本発明における好ましいモノクローナル抗体として、受託番号FERM BP - 11356として寄託されたハイブリドーマ9H5 - 4、受託番号FERM BP - 11357として寄託されたハイブリドーマ10F7 - 38、受託番号FERM BP - 11358として寄託されたハイブリドーマ13G5 - 52、受託番号FERM BP - 11359として寄託されたハイブリドーマ13G5 - 57、受託番号FERM BP - 11360として寄託されたハイブリドーマ14A8 - 85、受託番号FERM BP - 11361として寄託されたハイブリドーマ22H8 - 84、受託番号FERM BP - 11362として寄託されたハイブリドーマ49F2 - 30、または受託番号FERM BP - 11363として寄託されたハイブリドーマ55E7 - 79などが産生するモノクローナル抗体を示すことができる。

30

可変領域を含むキメラ抗体、または可変領域を構成するCDRを移植したヒト化抗体として、IgGまたはIgM由来の定常領域を有する抗体は、本発明における好ましい抗体に含まれる。本発明者らは、PTPRSに対するモノクローナル抗体がPTPRS発現細胞に対するCDC作用を有することを確認している。したがって、IgGまたはIgM由来の定常領域を有する抗体は、CDC作用によるPTPRS発現細胞に対する細胞傷害作用を有する。このような抗体は、pDCなどのPTPRS発現細胞の細胞数の抑制に有用である。

40

ヒトPTPRSを認識するキメラ抗体、またはヒト化抗体は、それをコードするポリヌクレオチドを利用して遺伝子工学的に製造することができる。

【0064】

国際公開WO2007/041317号(特表2009-510102A号)にヒトPTPRSの構造が明らかにされてからすでに4年近くを経過しているが、未だにヒトPTPRSを特異的に認識できる抗体は得られていない。本発明の免疫原によって、初めてヒトPTPRSを認識する抗体が提供された。すなわち本発明は、下記の工程によって得ることができる、ヒトPTPRSを認識する抗体を提供した。

- (1) ヒトPTPRSの細胞外ドメインを含むタンパク質を免疫動物に投与する工程、
- (2) 前記免疫動物の抗体産生細胞から、ヒトPTPRSに結合する抗体を産生する抗体

50

産生細胞を選択する皇帝、および

(3)(2)で選択された抗体産生細胞を培養しその培養物からヒトPTPRSを認識する抗体を回収する工程。

【0065】

ヒトPTPRSは、ヒトpDCにおいて特異的に発現していることが明らかにされた。本発明者らのSAGEによる遺伝子発現解析においても、ヒトpDCにおける特異的な発現が確認された。しかし過去の報告においては、ヒトPTPRSの発現レベルはいずれもmRNAに基づいて解析されていた。ヒトPTPRSの検出が可能な抗体が提供されていなかったため、タンパク質の発現状態を解析することは従来行われなかった。本発明によって提供されたヒトPTPRSの細胞外ドメインに結合する抗体は、ヒトPTPRSタンパク質の解析を実現した。

10

【0066】

実際に本発明者らが確認したところ、本発明に基づくヒトPTPRSの細胞外ドメインに結合するモノクローナル抗体は、ヒトpDCを特異的に検出した。すなわち本発明は、ヒトPTPRSの細胞外ドメインに結合するモノクローナル抗体、またはその抗原結合領域を含む断片を被検細胞に接触させ、細胞に結合したモノクローナル抗体、またはその抗原結合領域を含む断片を検出する工程を含む、形質細胞様樹状細胞の検出方法に関する。

【0067】

本発明に基づいてヒトPTPRSを検出することによって、ある細胞がpDCであるかどうかを確認することができる。すなわち本発明は、ヒトPTPRSを指標とするpDCの同定方法を提供する。あるいは本発明に基づいてヒトPTPRSが検出された細胞を分離することによって、ヒトpDCを分離することができる。すなわち本発明は、ヒトPTPRSを指標とするpDCの分離方法を提供する。

20

【0068】

本発明において、ヒトPTPRSの細胞外ドメインに結合するモノクローナル抗体、またはその抗原結合領域を含む断片は、あらかじめ標識しておくことができる。たとえば、発光色素や蛍光色素で標識することにより、抗体を容易に検出することができる。より具体的には、蛍光色素標識抗体をpDCを含む可能性のある細胞集団と接触させ、本発明の抗体が結合した細胞を蛍光色素を指標として検出することができる。さらに、蛍光色素が検出された細胞を分離すれば、pDCを分離することができる。一連の工程は、FACSの原理により容易に実施することができる。

30

【0069】

あるいは本発明の抗体をあらかじめ磁性粒子などの固相担体に結合しておくこともできる。固相担体に結合した抗体がヒトPTPRSを認識し、pDCが固相担体に捕捉される。その結果、pDCを検出または分離することができる。

【0070】

本発明に基づくpDCの検出に必要な抗体は、pDC検出用試薬として供給することができる。すなわち本発明は、ヒトPTPRSの細胞外ドメインに結合するモノクローナル抗体、またはその抗原結合領域を含む断片を含む、pDCの検出用試薬を提供する。本発明のpDCの検出用試薬には、抗体のほか、陽性対照、または陰性対照を組み合わせることができる。たとえば、免疫原に利用したヒトPTPRSの細胞外ドメインを発現する形質転換細胞や、ヒトから採取されたpDCなどを陽性対照として利用することができる。通常、ヒトpDCは末梢血からはわずかしが得ることができない。したがって、特に形質転換細胞は、本発明の試薬における陽性対照として好ましい。一方、陰性対照には、ヒトPTPRSを発現しない任意の細胞を利用することができる。

40

【0071】

すなわち本発明は、ヒトPTPRSの細胞外ドメインに結合するモノクローナル抗体、またはその抗原結合領域を含む断片とを含む、ヒトpDCの検出用キットを提供する。

【0072】

また本発明者らは、ヒトPTPRSの細胞外ドメインに結合する抗体がpDCに与える

50

影響を解析した。その結果、ヒトPTPRSの細胞外ドメインに結合する抗体は、pDCの活性を抑制することが確認された。すなわち本発明は、次の成分のいずれかをpDCに接触させる工程を含む、インターフェロン産生細胞の活性抑制方法に関する。

(a) ヒトPTPRSに結合し、pDCの活性を抑制するモノクローナル抗体、またはその抗原結合領域を含む断片、および

(b) (a)のモノクローナル抗体の相補性決定領域を移植したイムノグロブリン、またはその抗原結合領域を含む断片。

【0073】

あるいは本発明は、次の成分のいずれかを生体に投与する工程を含む、生体中のpDCの活性抑制方法に関する。

(a) ヒトPTPRSに結合し、pDCの活性を抑制するモノクローナル抗体、またはその抗原結合領域を含む断片、

(b) (a)のモノクローナル抗体の相補性決定領域を移植したイムノグロブリン、またはその抗原結合領域を含む断片、および

(c) (a)または(b)に記載の成分をコードするポリヌクレオチド。

【0074】

本発明においてpDCは、IFN産生能を有し、かつ細胞表面にヒトPTPRSを発現する細胞をいう。以下、特に断りの無い場合には、pDCは、樹状細胞の前駆細胞である細胞のみならず、IFN産生能を有し、かつ細胞表面にヒトPTPRSを発現する細胞を含む。このようなpDCの同定方法は公知である。たとえばいくつかの細胞表面マーカーを指標としてpDCを他の血液細胞と識別することができる。具体的には、ヒトpDCの細胞表面マーカーのプロファイルは次のとおりである(Shortman, K. and Liu, YJ, Nature Reviews 2: 151-161, 2002)。近年になって、BDCA-2陽性細胞をpDCと位置づける報告もある(Dzionek, A. et al. J. Immunol. 165: 6037-6046, 2000)。

[ヒトpDCの細胞表面抗原のプロファイル]

CD4陽性、CD123陽性、Lineage(CD3、CD14、CD16、CD19、CD20、CD56)陰性、CD11c陰性

したがって、これらの公知のマーカーの発現プロファイルを持ち、IFN産生能をも持つ細胞をpDCと言うこともできる。さらに、これらのマーカーの発現プロファイルの発現パターンとは異なるプロファイルを持つ細胞群であっても、IFN産生能を有する生体中の細胞はpDCに含まれる。

さらに、ヒトpDCに共通して見られる特徴として、以下のような特徴を示すことができる。

[細胞の形態上の特徴]

- プラズマ細胞に似ている
- 細胞表面が平滑な丸い細胞
- 比較的大きい核をもつ

[細胞の機能的な特徴]

- ウイルス感染時に、短期間に大量のI型IFNを産生する
- ウイルス感染後、樹状細胞に分化する

【0075】

本発明において、pDCの活性抑制とは、pDCが有する機能の少なくとも一つを抑制することをいう。pDCの機能として、IFNの産生と細胞生存を示すことができる。細胞の生存は、細胞数と言い換えることもできる。したがって、これらの機能の一方または両方を抑制することを、pDCの活性を抑制するという。pDCによって産生されるI型IFNが種々の疾患の原因となっていることが明らかにされている。したがって、pDCの細胞数やIFNの産生を抑制することは、それらの疾患の治療戦略として有用である。

たとえば、自己免疫性の疾患の病態とIFNの関連性が指摘されている。IFNの大部分がpDCによって産生されている。したがってその産生を抑制すれば、IFNによってもたらされる病態を緩和することができる。なお本発明において、pDCによるI

10

20

30

40

50

IFN産生抑制とはpDCが産生するIFNの少なくとも1種類のIFN産生を抑制することをいう。本発明における好ましいIFNは、I型IFNである。中でもIFN γ は重要である。

【0076】

すなわち本発明は、ヒトPTPRSの細胞外ドメインに結合する抗体を有効成分として含有する、IFN産生抑制剤に関する。あるいは本発明は、ヒトPTPRSの細胞外ドメインに結合する抗体を投与することを含む、IFNの産生抑制方法を提供する。さらに本発明は、ヒトPTPRSの細胞外ドメインに結合する抗体の、IFNの産生を抑制するための医薬組成物の製造における使用に関する。

【0077】

pDCには、少数の細胞で大量のIFNを産生する細胞が含まれる。たとえば、ウイルスなどで刺激を受けた樹状細胞の前駆細胞は、生体が産生するIFNの大部分を産生する。大量のIFNを産生するpDCの細胞数を抑制することは、結果としてIFNの産生量を抑制することになる。したがって、pDCの細胞数の抑制によっても、IFNによってもたらされる病態を緩和することができる。

本発明の好ましい態様において、抗ヒトPTPRSモノクローナル抗体は、ヒトPTPRS発現細胞に結合し、CDC(補体依存性の細胞傷害作用; Complement Dependent Cytotoxicity)作用によって細胞傷害作用を与えることが確認された。CDC作用は、抗体医薬の重要な作用機序の一つである。本発明の抗ヒトPTPRSモノクローナル抗体も、そのCDC作用により、pDCなどのヒトPTPRS発現細胞に対する強力な細胞傷害作用を有する。すなわち、好ましい態様において、IFN産生の抑制機構に加えて、pDCに対する細胞傷害作用によっても、IFN産生抑制効果を期待することができる。

【0078】

本発明に用いるヒトPTPRSの細胞外ドメインを認識する抗体は、先に述べたような方法に基づいて得ることができる。本発明における抗体は、任意のクラスであってよい。また抗体が由来する生物種も限定されない。さらに、抗体の抗原結合領域を含む断片を抗体として用いることができる。たとえばIgGの酵素的な消化によって生成される、抗原結合部位を含む抗体断片も、本発明における抗体として利用することができる。具体的には、パインまたはペプシンによる消化によって、FabまたはF(ab')₂などの抗体断片を得ることができる。これらの抗体断片は、抗原との結合親和性を有する抗体分子として利用しうことは周知である。あるいは、必要な抗原結合活性を維持している限り、遺伝子組み換えによって構築された抗体を用いることもできる。遺伝子組み換えによって構築された抗体の例としては、たとえばキメラ抗体、CDR移植抗体、シングルチェーンFv、diabody、線状抗体、および抗体断片より形成された多特異性抗体等を示すことができる。モノクローナル抗体を基に、これらの抗体を得る方法は公知である。

【0079】

本発明において、抗体は、必要に応じて修飾することができる。本発明によれば、ヒトPTPRSの細胞外ドメインを認識する抗体は、pDCの活性を抑制する作用を有する。すなわち、抗体そのものがpDCに対する細胞傷害作用を有している可能性が考えられた。強いエフェクター作用を示す抗体のサブクラスは公知である。あるいは、抗体を細胞傷害物質(cytotoxic agent)によって修飾することによって、pDCの活性抑制効果をさらに増強することができる。細胞傷害物質の例としては、以下のような物質を示すことができる。

トキシン類：緑膿菌毒素(Pseudomonas Endotoxin; PE)、ジフテリアトキシン、リシン

放射性同位元素：Tc99m、Sr89、I131、Y90

抗癌剤：カリキマイシン、マイトマイシン、パクリタキセル

タンパク質からなるトキシン類は、2官能性試薬によって抗体またはその断片などに結合することができる。あるいは、抗体をコードする遺伝子にトキシン類をコードする遺伝子を接合し、両者の融合タンパク質を得ることもできる。放射性同位元素を抗体に結合する方法も公知である。たとえば、キレート剤を利用して、抗体を放射性同位元素で標識す

10

20

30

40

50

る方法が公知である。さらに抗癌剤は、糖鎖または2官能性試薬の利用により、抗体に結合することができる。

【0080】

本発明においては、人為的に構造を改変された抗体を有効成分として利用することもできる。たとえば、抗体の細胞傷害作用や安定性を改善するための様々な修飾方法が公知である。具体的には、重鎖の糖鎖が改変されたイムノグロブリンが知られている(Shinkawa, T. et al., J. Biol. Chem 278:3466-3473, 2003.)。糖鎖の改変によって、イムノグロブリンのADCC(抗体依存性の細胞傷害;Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity)活性が増強された。

【0081】

ヒトPTPRSの細胞外ドメインに結合する抗体は、pDCに接触させるとその活性を抑制する。したがってこれらの抗体を、pDCの活性抑制剤、または抑制方法に利用することができる。すなわち本発明は、下記(a)-(c)からなる群から選択される少なくとも1種類の成分を有効成分として含む、pDCの活性抑制剤を提供する。あるいは本発明は、下記(a)-(c)からなる群から選択される少なくとも1種類の成分を投与することを含むpDCの活性抑制方法に関する。さらに本発明は、下記(a)-(c)からなる群から選択される少なくとも1種類の成分のpDC活性調節剤の製造における使用に関する。

(a)ヒトPTPRSの細胞外ドメインに結合する抗体、またはその抗原結合領域を含む断片、

(b)(a)の抗体の相補性決定領域を移植したイムノグロブリン、またはその抗原結合領域を含む断片。

本発明において、pDCの活性を抑制するモノクローナル抗体としては、ヒトPTPRSの細胞外ドメインを認識するモノクローナル抗体を利用することができる。本発明においては、1種類または複数種類のモノクローナル抗体を利用することができる。たとえば、ヒトPTPRSの細胞外ドメインを認識する複数種のモノクローナル抗体を配合して、本発明に利用することができる。

【0082】

抗体がpDCのIFN産生活性の抑制作用を有することは次のようにして確認することができる。pDCはウイルスの刺激によってIFNを大量に産生する。pDCに対するウイルス刺激の前、後、またはウイルス刺激と同時に抗体を与え、抗体を与えないpDCを対照として、IFNの産生能を比較する。IFN産生能は、pDCの培養上清中に含まれるIFN- γ やIFN- β を測定することによって評価することができる。比較の結果、抗体の添加によって、上清中のIFNの量が有意に低下すれば、試験された抗体は、IFN産生能を抑制する作用を有することが確認できる。これらIFNの測定方法は公知である。pDCは、生体におけるIFNの大部分を産生する細胞である。したがって、pDCのIFN産生能の抑制によって、生体のIFNの産生状態を調節することができる。

【0083】

本発明において、pDCの活性にはpDCの細胞数の維持が含まれる。したがって本発明におけるpDCの活性の抑制は、pDCの細胞数の抑制を含む。もしpDCの細胞数が、抗体の存在下で抑制されることが確認されれば、当該抗体がpDCの活性を抑制していることがわかる。比較対照としては、IFN産生と同様に、活性を確認すべき抗体と同じ動物種に由来する不活性なイムノグロブリンを用いることができる。pDCの細胞数は、細胞の計数によって定量的に比較することができる。細胞数は、FACSや顕微鏡によって計数することができる。

【0084】

また、pDCはウイルスなどの感染の結果DC2(Dendritic Cell 2)というTh2を誘導する細胞へ分化するともいわれている。もしウイルス刺激によるpDCのIFN産生を抑制できれば、Th2への分化も抑制できる可能性がある。したがって、IFN産生を抑制する本発明のモノクローナル抗体は、各種アレルギー疾患の治療効

10

20

30

40

50

果も期待できる。

【0085】

ヒトPTPRSの細胞外ドメインを認識する抗体を、その抗体が由来する生物種とは異なる宿主に投与する場合には、当該宿主にとって異物と認識されにくい形に加工するのが望ましい。たとえば、次のような分子に加工することにより、イムグロブリンを異物として認識されにくくすることができる。イムグロブリン分子を以下のように加工する手法は公知である。

- 定常領域を欠失した抗原結合領域を含む断片(Monoclonal Antibodies : Principles and Practice, third edition, Academic Press Limited. 1995; Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL PRESS, 1996)

- モノクローナル抗体の抗原結合領域と宿主のイムグロブリンの定常領域とで構成されるキメラ抗体(遺伝子発現実験マニュアル 講談社 1994年 (石田 功、安東 民衛 編))

- 宿主のイムグロブリンにおける相補性決定領域(CDR)をモノクローナル抗体のCDRに置換したCDR置換抗体(遺伝子発現実験マニュアル 講談社 1994年 (石田 功、安東 民衛 編))

【0086】

あるいは、ファージディスプレイ法(McCafferty J. et al., Nature 348:552-554,1990; Kretzschmar T et.al., Curr Opin Biotechnol 2002 Dec;13(6):598-602.)によって、ヒトのイムグロブリン可変領域遺伝子を取得することができる。ファージディスプレイ法においては、ヒトイムグロブリン可変領域をコードする遺伝子がファージ遺伝子に組み込まれる。多様なイムグロブリン遺伝子をソースとして、ファージライブラリーを作成することができる。ファージはファージ自身を構成するタンパク質の融合タンパク質として、当該可変領域を発現する。ファージによって発現されたファージ表面の可変領域は、抗原との結合活性を維持している。したがって、抗原を発現した細胞または抗原などに結合するファージを選択することによって、ファージライブラリーから、目的とする結合活性を有する可変領域を発現したファージをスクリーニングすることができる。さらに、こうして選択されたファージ粒子の中には、目的とする結合活性を有する可変領域をコードする遺伝子が保持されている。すなわち、ファージディスプレイ法においては、可変領域の結合活性を指標として、目的とする結合活性を有する可変領域をコードする遺伝子を取得することができる。

【0087】

本発明によるpDCの活性抑制剤、または抑制方法において、ヒトPTPRSの細胞外ドメインを認識する抗体、またはその少なくとも抗原結合領域を含む抗体断片は、タンパク質として、あるいはそのタンパク質をコードするポリヌクレオチドとして、投与することができる。ポリヌクレオチドを投与するには、目的とするタンパク質を発現できるように、適当なプロモーターの制御下に目的とするタンパク質をコードするヌクレオチドを配置したベクターを利用するのが望ましい。ベクターには、エンハンサーやターミネーターを配置することもできる。イムグロブリンを構成する重鎖と軽鎖の遺伝子を保持し、イムグロブリン分子を発現することができるベクターが公知である。イムグロブリンを発現することができるベクターは、細胞に導入することにより投与することができる。生体への投与にあたっては、生体への投与によって細胞に感染させることができるベクターはそのまま投与することができる。あるいは、いったん生体から分離したリンパ球にベクターを導入してその後生体に戻すこともできる(ex vivo)。

【0088】

本発明に基づくpDCの活性抑制剤、または抑制方法において、生体に投与されるモノクローナル抗体の量は、イムグロブリンとして体重1kgあたり、通常0.5mg~100mg、たとえば1mg~50mg、好ましくは2mg~10mgである。生体への抗体の投与間隔は、治療期間中の生体内におけるイムグロブリンの有効濃度が維持できるように適宜調節することができる。具体的には、抗体を1~2週間間隔で投与することができる。投与経路は、任意である。当業者は、治療に際して効果的な投与経路を適宜選択

10

20

30

40

50

することができる。具体的には、経口的な、または非経口的な投与を示すことができる。たとえば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、または皮下注射等により、全身的にまたは局所的に抗体を投与することができる。本発明における非経口投与に適切な製剤の例としては、注射剤、座剤、噴霧剤などがあげられる。また細胞に与える場合には、通常 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、好ましくは $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以上、より好ましくは $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以上、さらに好ましくは $0.5 \text{mg}/\text{mL}$ 以上のイムノグロブリンを与える。

【0089】

本発明に基づく pDC の活性抑制剤または抑制方法において、モノクローナル抗体は、任意の方法により生体に投与することができる。通常モノクローナル抗体は、薬学的に許容される担体と配合される。モノクローナル抗体には、必要に応じて増粘剤、安定剤、防腐剤および可溶化剤などの添加剤を配合することができる。このような担体または添加剤としては、ラクトース、クエン酸、ステアリン酸、ステアリン酸マグネシウム、スクロース、デンプン、タルク、ゼラチン、寒天、植物油、エチレングリコールなどがあげられる。「薬学的に許容される」という用語は、各国政府の監督当局により承認されているか、または各国の薬局方若しくは一般的に認知されている薬局方に動物、哺乳動物、および特にヒトへの使用に関して列記されていることをいう。本発明の pDC の活性抑制剤は、1 回または複数回の用量の凍結乾燥粉末または錠剤の形態で供給することができる。凍結乾燥粉末または錠剤には、さらに、投与の前に該組成物を所望の濃度となるように溶解するための注射用の滅菌済みの水、生理的食塩水または緩衝液を組み合わせることができる。

【0090】

さらに、イムノグロブリンを発現するベクターのかたちで投与する場合には、重鎖と軽鎖を別のプラスミドとしてコトランスフェクトするとして、体重 1kg あたり各プラスミドを $0.1 \sim 10 \text{mg}$ 、たとえば $1 \sim 5 \text{mg}$ を投与することができる。また *in vitro* において細胞に導入するためには、 $1 \sim 5 \mu\text{g}/10^6 \text{cell}$ のベクターが用いられる。

以下、実施例に基づいて本発明をさらに具体的に説明する。

ここに引用されたすべての先行技術文献は、参照として組み入れられる。

以下実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこの実施例により何ら制限されるものではない。

【実施例】

【0091】

実施例 1

A. PTPRS の発現解析

A-1) SAGE ライブラリーを用いた解析

ヒト単球、pDC、および単純ヘルペスウイルス (HSV) 処理した pDC における遺伝子の発現を、SAGETM (Serial Analysis of Gene Expression) 法により比較、解析した。解析方法は次のとおりである。

ヒト末梢血から、単球を CD14 陽性細胞として単離し、pDC を BDCA-4 陽性細胞として、セルソーターによって分離した。さらに pDC を HSV 存在下で 12 時間培養して、活性化した pDC を調製した。それぞれの細胞から RNA を取得し、I-SAGETM kit (Invitrogen 社) を用いて、SAGE ライブラリーを作製した。得られた約 10 万タグの塩基配列データを、SAGE Analysis Software (Invitrogen 社) で解析した。その結果、単球 / pDC / pDC + HSV のスコア値が 0 / 7 / 0 の遺伝子、すなわち pDC 特異的な発現を示す遺伝子として、既知の遺伝子である PTPRS (GenBank Acc#NM_002856.3) が見出された。PTPRS は、配列番号 2 に示す塩基配列によってコードされる。そしてそれは、免疫グロブリン様ドメイン (Ig-like domain) およびフィブロネクチン III 型様ドメイン (Fibronectin type III-like domain) を細胞外領域に有する、一回膜貫通膜タンパク質である。また、細胞内領域に 2 つのプロテインチロシンフォスファターゼ領域 (PTP domain) を有する (図 1)。

【0092】

A-2) 定量 RT-PCR による PTPRS mRNA のヒト各種免疫担当細胞における

発現解析

P T P R S の免疫細胞での発現をより詳細に検討した。ヒト末梢血から、セルソーターによって各細胞を分取した。分取した各細胞群から R N A を抽出し、c D N A を合成した。得られた c D N A を鋳型として、定法にしたがって定量的 R T - P C R を行い、P T P R S m R N A の発現レベルを解析した。恒常的に発現していることが知られている G A P D H (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) 遺伝子の発現レベルで標準化することにより、P T P R S 遺伝子の発現を各免疫細胞間で比較した。

用いたプライマーの塩基配列、および P C R の条件は以下のとおりである。

P T P R S 用 Forward primer: 5' CAC GGC CTA TGA CCT CCA 3' (配列番号 3)

P T P R S 用 Reverse primer: 5' AAG TTC TTG GGC GAG ACT TG 3' (配列番号 4)

G A P D H 用 Forward primer: 5' CCA CCC ATG GCA AAT TCC 3' (配列番号 5)

G A P D H 用 Reverse primer: 5' TGG GAT TTC CAT TGA TGA CAA G 3' (配列番号 6)

5 0 2 分を 1 サイクル、

9 5 1 0 分を 1 サイクル、

[9 5 1 5 秒、6 0 6 0 秒] を 5 0 サイクル。

単球、p D C、H S V で刺激した p D C、B 細胞 (CD19+細胞)、T 細胞 (CD3+細胞)、P M A (Phorbol 12-myristate 13-acetate) で刺激した活性化 T 細胞、N K 細胞 (CD56+細胞) について測定したところ、P T P R S が p D C 特異的に発現していることが示された。また、特徴として、H S V で刺激した p D C で、P T P R S の発現が低下することがわかった (図 2)。

【 0 0 9 3 】

A - 3) 定量的 R T - P C R によるヒト組織における P T P R S m R N A の発現解析

さらに、組織における発現を ABI PRISM 7000 (Applied Biosystem 社) を用いた定量 P C R により検討した。c D N A パネルとして、BD™ MTC multiple tissue cDNA panel (Human I; Cat.No.636742, Human immune; Cat.No.636748, Human blood fractions; Cat.No.636750; いずれも Becton Dickinson 社) を用いた。使用したプライマーの塩基配列を以下に示す。

P T P R S 用 Forward primer: 5' ACT CAC CCA CAC CCT ACA AGA 3' (配列番号 7)

P T P R S 用 Reverse primer: 5' CTT GGT GGT ACG GCC ATC 3' (配列番号 8)

G A P D H 用 Forward primer: 5' CCA CCC ATG GCA AAT TCC 3' (配列番号 5)

G A P D H 用 Reverse primer: 5' TGG GAT TTC CAT TGA TGA CAA G 3' (配列番号 6)

SYBR green PCR master mix kit (Applied Biosystem 社) を用いて、同じ会社から入手できる ABI PRISM 7000 により P C R を行った。解析には同じ会社から入手できる Sequence Detection System Software を用いた。反応条件は次のとおりである。

ステップ 1 : 5 0 , 2 分を 1 サイクル

ステップ 2 : 9 5 , 1 0 分を 1 サイクル

ステップ 3 : 9 5 , 1 5 秒、6 0 , 1 分を 4 0 サイクル

恒常的に発現していることが知られている G A P D H (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) 遺伝子の発現レベルで標準化することにより、P T P R S 遺伝子の発現を各組織間で比較した。その結果、組織において P T P R S m R N A が広範囲に発現していることが明らかになった (図 3)。

【 0 0 9 4 】

B . P T P R S 発現ベクターの作製

P T P R S タンパク質を発現させるため、P T P R S 遺伝子の発現ベクターの作製を行った。pCR4-TOPO クローニングベクターに組み込まれた P T P R S cDNA clone (Open Biosystem 社 cc# MHS1010-98052887) から P T P R S 遺伝子のみを取り出し、pcDNA3.1 発現ベクターに組み込んだ (P T P R S / pcDNA3.1)。得られた P T P R S / pcDNA3.1 プラスミドを鋳型に、EcoRI、Not I、および Kozak sequence (GCC GCC ACC) を含むプライマーで P T P R S 遺伝子を増幅した (プライマーの情報は下記に示す)。P C R 産物は pMX-IP レトロウイルスベクターに EcoRI と Not I サイトでクローニングされた (P T P R S / pMX-IP)。P C R 反応には KOD PI

10

20

30

40

50

us DNA polymerase (TOYOBO社) 1ユニットを用い、反応条件としては、94 2分を1サイクル行った後、[94 15秒、68 4分30秒]を25サイクルとした。

Forward primer (配列番号9): 5' aaa GAA TTC gcc gcc acc ATG GCG CCC ACC TGG GGC CCT3'

Reverse primer (配列番号10): 5' aaa gcg gcc gcT TAG GTT GCA TAG TGG TCA AAG C 3'

上記の塩基配列において、小文字は制限酵素EcoRIの切断部位またはNot Iの部位を示す。5'末端のaaaは酵素切断のための付加塩基である。

【0095】

C. ヒトPTPRS (hPTPRS) 発現細胞の作製

PTPRS遺伝子を含むレトロウイルスを作成するために、FuGENE kit(Roche社)を用いてヒト胚の腎細胞株であるHEK-293T細胞にPTPRS/pMX-IPとウイルスパッケージングベクター-PCL-ECOを一過性に遺伝子導入した。2日後に、ウイルスがhPTPRS遺伝子を含む細胞培養上清を回収し、BALB/Cマウスの脾臓由来の樹状細胞であるD2SC/1細胞(Paglia et al., J.Exp.Med., 178, 1893-1901(1993)に基づき作成)に感染させた。pMX-IPレトロウイルスベクターはpuromycin耐性遺伝子を含むことから、感染させたD2SC/1細胞をpuromycinと培養することで、hPTPRSを発現する細胞のみが生存できるようになり、そしてセクションが可能になる。hPTPRS発現D2SC/1細胞はFACSソーティングによってセレクトされ、培養された。hPTPRSの発現を確認するため、10 µg/mLヤギIgG (SantaCruz社)と市販されているhPTPRSポリクローナル抗体 (pAb; R&D社)をセレクトしたhPTPRS/D2SC/1細胞にそれぞれ100 µlずつ添加し、混合物を4 で30分間インキュベートした。PBSで細胞を洗浄した後、100倍希釈したFITCラベル化抗ヤギ IgG抗体 (SantaCruz社)を50 µLずつ添加し、4 で30分間インキュベートした。PBSで洗浄した後、FACSCalibur (BD)にてデータを取り込んだ(図4)。

【0096】

実施例 2

A. 抗ヒトPTPRSモノクローナル抗体の作製

A-1) 免疫

免疫原とする細胞として、上記hPTPRS/D2SC/I細胞を用いた。BALB/cマウスの麻酔後、足蹠 (footpad) に片足50 µlずつ Freund's Complete Adjuvant (CFA) エマルジョンを皮下注射した。計100 µl/マウスである。次の日、免疫原として準備したhPTPRS/D2SC/1細胞を Freund's Incomplete Adjuvant (IFA) でエマルジョンを作り、足蹠 (footpad) に皮下注射した (50 µl/片脚、計100 µl/マウス)。免疫は2日おきに計3回行い、最後の免疫の3日後に所属リンパ節を回収した。

【0097】

A-2) 細胞融合

免疫したマウスの両肢から所属リンパ節由来細胞を採取し、10% FBSを含むRPMI1640培地 (SIGMA社) で培養したマウスミエローム細胞P3-X63-Ag8.563を、リンパ節由来細胞とミエローム細胞の比が5:4になるように混和して、遠心分離により細胞を回収した。細胞融合のために混合細胞にPEG1500 (Roche社) を加えた。融合した細胞 (ハイブリドーマ) は洗浄し、細胞成長サプリメントを含む10% Fetal Bovine Serum (FBS)+ HAT (Sigma社)- RPMI1640培地 (2 mM L-Glutamine, 100Unit/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 10 mM HEPES, 1 mM Sodium Pyruvate, 50 µM 2-MEを含む) で培養した。

【0098】

A-3) 免疫したhPTPRS/D2SC/1細胞を用いたハイブリドーマのFACSスクリーニング

3×10^5 / wellのD2SC/1細胞またはhPTPRS/D2SC/1細胞に2.5 µg/mlに調製した抗CD16/32(2.4G2)を50 µLずつ添加しFCレセプターをブロックした。PBSで洗浄後、10 µg/mlに調製したヤギIgG、市販されている抗hPTPRS pAb (R&D社)、マ

10

20

30

40

50

ウス IgG_{2ak} (BioLegend社) と培養していたハイブリドーマの培養上清をそれぞれ 60 μl ずつ添加し、4 で 60 分間インキュベートした。PBS で洗浄後、細胞に 50 倍希釈した FITC ラベルされた抗ヤギ IgG 抗体と 100 倍希釈の PE ラベルされた抗マウス IgG 抗体 (BD社) を 50 μl ずつ添加し、遮光下 4 で 30 分間インキュベートした。PBS で洗浄し、細胞を PBS 200 μl で懸濁した。FACS Calibur (BD社) にてデータを取り込んだ。取り込んだデータを FSC と SSC のドットプロットで展開し、生細胞をゲーティングした。このゲート内の細胞のデータが 2,000 count になるまでデータを取り込んだ。その結果、抗 hPTPRS 抗体を産生する 13 個のハイブリドーマが得られた (2G6、28G10、4B2、2G2、9H5、10F7、22H8、49F2、9D2、14A8、55E7、13G5、16H2) (図 5)。

10

【0099】

A-4) CAL-1 細胞を用いた FACS スクリーニング

ヒトの pDC 様細胞株 CAL-1 細胞の 3×10^5 を上記各ハイブリドーマの培養上清 50 μl で 15 分間 4 で染めた。FACS バッファー (1% FBS+ PBS) で 1 度洗浄した後、遠心し、上清を除去した。PE ラベルされた抗マウス IgG 抗体 2 μg/ml を 20 分間 4 で反応させた。FACS バッファーで 1 度洗浄した後、遠心し、上清を除去した。細胞ペレットは FACS バッファーで再懸濁し、Calibur にて解析した。その結果、ハイブリドーマ培養上清の 2G6、4B2、2G2、9H5、10F7、22H8、49F2、14A8、55E7、13G5、16H2 は CAL-1 に良く反応した。一方で、28G10 と 9D2 はほとんど反応しなかった (図 6)。

20

【0100】

A-5) ヒト末梢血 pDC を用いた FACS スクリーニング

[ヒト PBMC の単離]

健常人から末梢血 20 ml を集め、HISTOPAQUE-1077 (SIGMA社) を用いた比重遠心で末梢血単核球 (PBMC) を分離した。 1×10^6 の PBMC をサンプルごとに染色した。FACS バッファーで細胞を洗浄した後、Fc block reagent (Miltenyi社) を 5 倍希釈で 25 μl ずつ加え、4 で 15 分間反応を行った。FACS バッファーで洗浄後、各ハイブリドーマの細胞培養上清 50 μl、10 μg/ml のヤギ IgG、抗 hPTPRS pAb、およびマウス IgG2a、を加え、4 で 20 分間反応させた。FACS バッファーで洗浄後、8 μg/ml の FITC ラベル化抗ヤギ IgG 抗体または 2 μg/ml の PE ラベル化抗マウス IgG 抗体を加え、4 で 20 分間反応を行った。FACS バッファーで洗浄後、APC ラベル化抗 BDCA2 抗体を 10 倍希釈の 50 μl で 4 で 20 分間反応させた。FACS バッファーで洗浄後、300 μl の FACS バッファーに細胞を再懸濁し、FACS calibur にて解析した。その結果、2G6、28G10、4B2、2G2、9H5、10F7、22H8、49F2、14A8、55E7、13G5 は pDC 細胞群に対して特異的な結合反応を示した。9D2 は pDC に結合を示す一方、pDC 以外の細胞群 (BDCA2-) にも反応を示した。16H2 は PBMC 自体に反応を示さなかった (図 7)。

30

【0101】

抗 PTPRS 抗体の特異性試験

PTPRS は PTPR ファミリーに属し、そのうちいくつかのファミリー分子のアミノ酸配列は PTPRS のアミノ酸配列に対して高い相同性を有する (図 8)。

40

A-6) PTPRS を認識し、ヒト pDC に特異的に結合する抗体を産生する 10 種類のハイブリドーマ細胞培養上清 (2G6、4B2、2G2、9H5、10F7、22H8、49F2、14A8、55E7、13G5) が PTPRS のみに特異的に結合するかどうかを検討した。特に PTPRS との相同性の高かった PTPRA (40%)、PTPRD (76%)、PTPRF (67%) の遺伝子導入細胞を分子の N 末端に FLAG タグを付加して作製し、染色した。遺伝子導入細胞での hPTPRE の発現は Western Blot で確認したが、細胞表面での発現は確認できなかった。したがって hPTPRE は細胞表面に発現しなかった。その結果、4B2 は hPTPRD に反応し (図 9C)、2G6 は hPTPRF に交差反応性を示した (図 9D)。それ以外の 8 種類の抗体は PTPRS 特異的な結合を示

50

した(図9A-D)。

【0102】

A-7) 抗PTPRS抗体のサルへの交差反応性

カニクイザルのPBMCは末梢血(10ml; 新日本科学社)よりHISTOPAQUE-1077(SIGMA社)を用いた比重遠心で分離した。FACSには、1サンプルあたり 5×10^5 の細胞を使用した。FACSバッファーで細胞を洗浄した後、FACSバッファーで希釈した10%のカニクイザルの血清を10 μ l加え、4で20分間反応を行った。FACSバッファーで洗浄後、各ハイブリドーマの細胞培養上清100 μ l、10 μ g/mlのマウスIgG2a、またはマウスIgG1、(BioLegend社)を加え、4で15分間反応させた。FACSバッファーで洗浄後、1 μ g/mlのAPCラベルされた抗マウスIgG抗体(BD社)を加え、4で20分間反応を行った。FACSバッファーで洗浄後、FITCラベル化抗Lineage1抗体(BD社)、PEラベル化抗CD123抗体(BD社)、およびPerCP7Cy5.5ラベル化抗HLA-DR抗体(BD社)を10倍希釈の25 μ lで4で15分間反応させた。FACSバッファーで洗浄後、300 μ lのFACSバッファーに細胞を再懸濁し、FACS caliburにて解析した。使用したハイブリドーマ培養上清は、PTPRS特異的で、CAL-1細胞やヒトpDCによく結合する49F2、55E7、14A8、13G5、10F7、22H8、9H5の7種類を選択した。その結果、すべてのハイブリドーマ細胞培養上清はカニクイザルのpDC細胞群(Lineage-CD123+HLA-DR+)に特異的に結合した(図10)。

10

【0103】

A-8) ハイブリドーマのシングル化

上記7種類(49F2、55E7、14A8、13G5、10F7、22H8、9H5)のハイブリドーマをそれぞれ回収し、ソーティングバッファー(1%FBS/PBS)で 1×10^5 cells/mlになるように懸濁した。FACS Aria(BD)を用いて単一細胞ソーティング(single cell sorting)を行った。データを取り込み、取り込んだデータをX軸: FSCとY軸: SSCの2次元ドットプロットで展開した。そのドットプロット上で生細胞をゲートで囲んだ。生細胞ゲート内の細胞からダブレットを除くためのゲートをかけ、その細胞集団を96穴平底プレートに1cell/wellとなるよう分取した。Single cell sortingした細胞は、HAT培地(RPMI1640+2 mM L-Glutamine, 100 Unit/ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin, 10 mM HEPES, 1 mM Sodium Pyruvate, 50 μ M 2-ME) + ハイブリドーマ成長サプリメントHFCs(Roche社)で培養した。その後、ハイブリドーマの細胞培養上清を用い、D2SC細胞とhPTPRS/D2SC細胞(図11AおよびB)、CAL-1細胞(図11C)、およびヒトpDC(図11D)を染色し、シングルハイブリドーマを選択した。

20

30

【0104】

実施例3

抗体精製

ProteinG Sepharose FastFlow(GEヘルスケア社)を用いた精製により、ハイブリドーマの培養上清から8種類(9H5-4、10F7-38、13G5-52、13G5-57、14A8-85、22H8-14、49F2-30、55E7-79)の精製抗体を得た。Pierce Rapid ELISA mouse mAb Isotyping Kit(Thermo Fisher Scientific社)を用いてアイソタイプを確認した。その結果、13G5-52と13G5-57はマウスIgG2b、55E7-79はマウスIgG2b、とマウスIgG1、の両方を有し、その他はマウスIgG1、であった。もし精製抗体にエンドトキシンが含まれていると、性質決定試験の結果に影響を与えることがある。そこで、エンドトキシン濃度の測定を行った。使用したキットはエンドスピー ES-50Mセット、トキシカラー DIA-MPセット、およびエンドトキシン標準品 CSE-Lセット(いずれも生化学バイオビジネス社)である。その結果、いずれの精製抗体も基準値である0.3 EU/mg Ab以下のエンドトキシン濃度であった(図12)。

40

【0105】

精製抗体の反応性の検討

精製抗体の結合能をヒトpDC様細胞株であるCAL-1細胞で確認した。(図13)。また、すべての抗体がヒト末梢血のpDC細胞群(BDCA2+)に対して結合能を維持していた

50

(図14)。

【0106】

ヒトPTPRSのマウスPTPRS (mPTPRS)に対するアミノ酸配列の相同性は約96%である。それらは非常に類似しているため、作製した抗ヒトPTPRS抗体がマウスPTPRSにも結合するのか検討した。mPTPRSの遺伝子を強制発現させたCHO細胞(チャイニーズハムスター卵巣細胞;以下mPTPRS/CHOとする。)を各抗PTPRS抗体10 μ g/mlで染色した。細胞数は1サンプルあたり2 \times 10⁵とした。FACSバッファーで洗浄後、PEラベル化抗マウスIgG抗体を50倍希釈し、25 μ lで染色した。その結果、49F2-30、13G5-52、13G5-57および22H8-84はmPTPRS/cROに結合した(図15)。

10

【0107】

実施例4

抗PTPRS抗体のhPTPRS発現細胞への捕体依存的細胞傷害活性

幼若ウサギcomplementを用いて、ヒトPTPRSを発現するCHO細胞(以下hPTPRS/CHOとする。)およびマウスPTPRS/CHO細胞(以下mPTPRS/CHOとする。)に対する抗PTPRS抗体の補体依存性細胞傷害活性(Complement-dependent cellular cytotoxicity;以下CDC活性とする)を測定した。活性は細胞から放出された乳酸脱水素酵素(lactate dehydrogenase: LDH)の測定値より算出した細胞毒性を指標として用いることにより得た。各細胞を2 \times 10⁴ cells/50 μ l/wellずつ96穴U底プレートに分注した。CDC培地(RPMI1640+0.1%BSA+10mM HEPES+2mM L-Glutamine+100Unit/ml Penicillin+100 μ g/ml Streptomycin)で18% Complement (CEDARLANE社)を調製した。コントロール抗体(マウスIgG1, またはマウスIgG2b,)と抗PTPRS抗体を3.3 μ g/mlと30 μ g/mlの2点調製した。アッセイはCytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega社)のキットを用いて行った。その結果、hPTPRS/CHOのターゲットに対し、13G5-52と13G5-57は約20%のCDC活性を示した(図16A)。一方で、mPTPRS/CHOのターゲットに対しては、13G5-52と13G5-57は約100%のCDC活性を示した(図16B)。

20

【0108】

実施例5

キメラ化抗体の作製

マウス抗PTPRS抗体を産生するハイブリドーマとしては、下記のものを使用した。

ハイブリドーマ 9H5-4 (寄託番号: FERM BP-11356)
 ハイブリドーマ 10F7-38 (寄託番号: FERM BP-11357)
 ハイブリドーマ 13G5-52 (寄託番号: FERM BP-11358)
 ハイブリドーマ 13G5-57 (寄託番号: FERM BP-11359)
 ハイブリドーマ 14A8-85 (寄託番号: FERM BP-11360)
 ハイブリドーマ 22H8-84 (寄託番号: FERM BP-11361)
 ハイブリドーマ 49F2-30 (寄託番号: FERM BP-11362)

30

1. 定常領域のアイソタイプ確認

7種類のハイブリドーマ(9H5-4、10F7-38、13G5-52、13G5-57、14A8-85、22H8-84、49F2-30)より産生された各マウス抗体の定常領域のアイソタイプを確認した。

40

確認にはmouse monoclonal antibody isotyping kit (カタログ番号: MMT1; Serotec Product社; オックスフォード, 英国)とPierce Rapid ELISA mouse mAb Isotyping Kit (Thermo Fisher Scientific社)、およびサンプルとして各9H5-4、10F7-38、13G5-52、13G5-57、14A8-85、22H8-84および49F2-30ハイブリドーマ培養上清を用いた。その結果、13G5-52および13G5-57ハイブリドーマの産生する抗体のアイソタイプは重鎖としてマウスIgG2b、軽鎖としてを含むアイソタイプであった。一方、9H5-4、10F7-38、14A8-85、22H8-84および49F2-30ハイブリドーマの産生する抗体のアイソタイプは重鎖と

50

してマウス IgG1、軽鎖として を含むアイソタイプであった。

【 0 1 0 9 】

2. マウス抗 P T P R S 抗体の可変領域をコードする c D N A のクローニング

2-1) total RNAの単離

市販のキット「RNeasy Mini Kit」(Qiagen社、カタログ番号:74106)を用いてキット添付の指示書にしたがい、7種類のハイブリドーマからtotal RNAを単離した。5×10⁶細胞数のハイブリドーマ細胞株から調製して、約30μgのtotal RNAが得られた。

【 0 1 1 0 】

2-2) マウス重鎖可変領域をコードする c D N A の増幅および断片化

2-1) で単離したtotal RNAのうち5μgを使用し、5' RACE PCR法によって、マウス重鎖可変領域をコードする c D N A を増幅した。増幅にあたっては、市販のキット「5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA ENDS, Version 2.0 Kit」(インビトロジェン社、カタログ番号:18374-058)を用いた。詳細は以下の通りである。まず、2-1) で得られたtotal cDNAから逆転写酵素によって、第1鎖cDNAを合成した。このとき、アンチセンスプライマー(GSP1)(配列番号11)は以下に示すものを用いた。

cDNAの増幅に用いたGSP1プライマーは各マウス重鎖のアイソタイプにしたがって用いた。たとえば以下のアンチセンスプライマーが重鎖にマウスIgG1を含む9H5-4、10F7-38、14A8-85、22H8-84、49F2-30ハイブリドーマの重鎖可変領域のクローニングに用いられる。

GSP1プライマー: mu IgG1 VH-GSP1

配列: 5'-CCA GGA GAG TGG GAG AGG CTC TTC TCA GTA TGG TGG-3'(36-mer)(配列番号39)

GSP2プライマー: mu IgG1 VH-GSP2

配列: 5'-GGC TCA GGG AAA TAG CCC TTG ACC AGG CAT CC-3'(32-mer)(配列番号40)

また、たとえば以下のアンチセンスプライマーが重鎖にマウスIgG1を含む9H5-4、10F7-38、14A8-85、22H8-84、49F2-30ハイブリドーマの重鎖可変領域のクローニングに用いられる。

GSP1プライマー: mu IgGH 1 GSP1

配列: 5'-TCC AGA GTT CCA GGT CAC TGT CAC-3'(24-mer)(配列番号11)

GSP2プライマー: mu IgGH 1 GSP2

配列: 5'-AGG GGC CAG TGG ATA GAC AGA TGG-3'(32-mer)(配列番号13)

さらに、以下のアンチセンスプライマーが重鎖にマウスIgG2bを含む13G5-52、13G5-57ハイブリドーマの重鎖可変領域のクローニングに用いられる。

GSP1プライマー: mu IgGH 2B-GSP1

配列: 5'-TCC AGA GTT CCA AGT CAC AGT CAC-3'(24-mer)(配列番号41)

GSP2プライマー: mu IgGH 2B-GSP2

配列: 5'-AGG GGC CAG TGG ATA GAC TGA TGG-3'(32-mer)(配列番号42)

【 0 1 1 1 】

そして、第1鎖cDNAの3'-末端に、ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ(TdT)を用いて、ヌクレオチドホモポリマーであるdCを付加した。そして、dC(アンカー配列)に相補的なヌクレオチドポリマーを有しているアンカープライマー(配列番号12)とアンチセンスプライマー(GSP2)を用いて、PCR法によってcDNAを増幅した。さらに、得られたPCR産物をテンプレートとし、AUAPプライマー(配列番号14)とアンチセンスプライマー(GSP2)を用いて、Nested PCR法によりcDNAを増幅した。さらに、このPCR産物を1.5%低融点アガロース法によって精製した。

5'RACE用アンカープライマー(配列番号12)5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACG GGI IGG IIG-3'(36-mer)

5'RACE用AUAPプライマー(配列番号14)5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC-3'(20-mer)

【 0 1 1 2 】

2-3) マウス軽鎖可変領域をコードする c D N A の増幅および断片化

2-1) で単離したtotal RNA から、2-2) と同様にして、マウス軽鎖可変領域をコードするcDNAを増幅した。

これら7種類の抗体はマウスIg 軽鎖を含むことから、以下のアンチセンスプライマーが軽鎖のクローニングに用いられる。

GSP1プライマー：Mu IgVL5RACE-GSP1

配列：5'-TTC ACT GCC ATC AAT CTT CCA CTT-3'(24-mer) (配列番号15)

GSP2プライマー：Mu IgVL5RACE-GSP2

配列：5'-GAT GGA TAC AGT TGG TGC AGC-3'(21-mer) (配列番号16)

得られたPCR産物を1.5%低融点アガロース法によって精製した。

【0113】

2-4) cDNAの塩基配列の確認とCDR領域の決定

2-2) で得られた重鎖可変領域、および2-3) で得られた軽鎖可変領域のcDNA断片をそれぞれ、市販のキット「Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit」(インビトロジェン社、カタログ番号：1325137)を用い、キット添付の指示書にしたがってpCR4Blunt-TOPO ベクターにクローニングし、大腸菌コンピテント細胞に導入して大腸菌形質転換体を得た。この形質転換体からプラスミドを得て、配列解析のために、プラスミドDNA試料をOperon Biotechnology Co. Ltd社(東京)に送付して、プラスミド中のcDNA塩基配列を確認した。配列の解析には「Sequencher DNA sequence assembly and analysis software version 4.2.2 (Gene Codes Corporation)」および「GENETYX-MAC Version.11.1.1」software (GENETYX CORPORATION)を用いた。

【0114】

相補性決定領域(以下、「CDR領域」と記す。)周辺に、フレームシフト、ナンセンス変異等を生じている転写物は除外し、正しい配列の転写物を抽出した。さらに、当該プラスミド中に含まれるcDNA塩基配列について、イムノグロブリンデータベース(IgBLAST, URL:www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/)と相同性を確認して、各々の可変領域内のCDR領域(CDR; CDR1, CDR2, CDR3)の配列を決定し、またフレームワーク領域と可変領域の配列はカバットナンバリングシステム(Kabat et al., 1991, sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health Publication No. 91-3242, 5th ed., United States Department of Health and Human Services, Bethesda, MD)を用いた分析方法にしたがって決定した。

得られた抗PTPRSマウス9H5-4抗体の重鎖可変領域の核酸配列は配列番号43、アミノ酸配列は配列番号44である。マウス9H5-4抗体の重鎖可変領域内のCDR1、CDR2、CDR3のアミノ酸配列はそれぞれ配列番号45、配列番号46、配列番号47である。

得られた抗FTPRSマウス9H5-4抗体の軽鎖可変領域の核酸配列は配列番号48、アミノ酸配列は配列番号49である。マウス9H5-4抗体の軽鎖可変領域内のCDR1、CDR2、CDR3のアミノ酸配列はそれぞれ配列番号50、配列番号51、配列番号52である。

また、得られた抗PTPRSマウス10F7-38抗体および14A8-85抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域の核酸配列は、CDR1、CDR2、CDR3の配列を含め、9H5-4抗体のものと同じであった。

得られた抗PTPRSマウス13G5-57抗体の重鎖可変領域の核酸配列は配列番号53、アミノ酸配列は配列番号54である。マウス13G5-57抗体の重鎖可変領域内のCDR1、CDR2、CDR3のアミノ酸配列はそれぞれ配列番号55、配列番号56、配列番号57である。

得られた抗FTPRSマウス13G5-57抗体の軽鎖可変領域の核酸配列は配列番号58、アミノ酸配列は配列番号59である。マウス13G5-57抗体の軽鎖可変領域内のCDR1、CDR2、CDR3のアミノ酸配列はそれぞれ配列番号60、配列番号61、配列番号62である。

また、得られた抗PTPRSマウス13G5-52抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変

10

20

30

40

50

領域の核酸配列は、CDR1、CDR2、CDR3の配列を含め、13G5-57抗体のものと同じであった。

得られた抗PTPRSマウス22H8-84抗体の重鎖可変領域の核酸配列は配列番号63、アミノ酸配列は配列番号64である。マウス22H8-84抗体の重鎖可変領域内のCDR1、CDR2、CDR3のアミノ酸配列はそれぞれ配列番号65、配列番号66、配列番号67である。

得られた抗FTPRSマウス22H8-84抗体の軽鎖可変領域の核酸配列は配列番号68、アミノ酸配列は配列番号69である。マウス22H8-84抗体の軽鎖可変領域内のCDR1、CDR2、CDR3のアミノ酸配列はそれぞれ配列番号70、配列番号71、配列番号72である。

得られた抗PTPRSマウス49F2-30抗体の重鎖可変領域の核酸配列は配列番号25、アミノ酸配列は配列番号26である。マウス49F2-30抗体の重鎖可変領域内のCDR1、CDR2、CDR3のアミノ酸配列はそれぞれ配列番号27、配列番号28、配列番号29である。

得られた抗FTPRSマウス49F2-30抗体の軽鎖可変領域の核酸配列は配列番号30、アミノ酸配列は配列番号31である。マウス49F2-30抗体の軽鎖可変領域内のCDR1、CDR2、CDR3のアミノ酸配列はそれぞれ配列番号32、配列番号33、配列番号34である。

得られた抗PTPRSマウス9H5-4抗体の重鎖可変領域の核酸配列(471bp)を以下に示す(配列番号43)。大文字はマウス9H5-4 VH可変領域を示し、小文字はマウスIgG1重鎖定常領域を示す。

```
ATGGAGTTGGGACTGAGCTGGGTATTTCTTGTGGCTCTTTTGAATGGTGTCCAGTGTCCAGGTGCAGCTTGTAGAGACCGG
GGGAGGCTTGGTGAGGCCTGGAAATTTCTGAAACTCTCCTGTGTTACCTCGGGATTCACTTTTCAGTAACCTACCGGATGC
ACTGGCTTCGCCAGCCTCCAGGGAAGAGGCTGGAGTGGATTGCTGTAATTACAGTCAAATCTGATAATTATGGAGCAAAT
TATGCAGAGTCTGTGAAAGGCAGATTTCACTATTTCAAGAGATGATTCAAAAAGCAGTGTCTACCTGCAGATGAACAGATT
AAGAGAGGAAGACACTGCCACTTATTATTGTAGTAGATCGGTCTACTATGGTTACGTCTAGCCTTTGACTACTGGGGCC
AAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAgccccaaacgacacccccatctgtctatccactggccccctaaagggc
```

マウス9H5-4抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列(157 a.a)を以下に示す(配列番号44)。大文字はVH可変領域の配列を示し、小文字はマウスIgG1重鎖定常領域を示す。下線部分はシグナル配列を示し、二重下線部分はCDR領域(CDR1、CDR2、CDR3)を示す。

MELGLSWVFLVALLNGVQCQVQLVETGGGLVLRPGNSLKLSCVTSSGFTFSNYRMHWLRQPPGKRLEWIAVITVKSDNYGAN
YAESVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNRLREEDTATYYCSRSVYYGYVLAFDYWGQGTTLTVSSaktppsvyplapkg

9H5-4抗体の重鎖可変領域のCDR1はNYRMH(配列番号45)であり、9H5-4抗体の重鎖可変領域のCDR2はVITVKSDNYGANYAESVKG(配列番号46)であり、9H5-4抗体の重鎖可変領域のCDR3はSVYYGYVLAFDY(配列番号47)である。

得られた抗PTPRSマウス9H5-4抗体の軽鎖可変領域の核酸配列(402bp)を以下に示す(配列番号48)。大文字はマウス9H5-4 VH可変領域を示し、小文字はマウスIg軽鎖定常領域を示す。

```
ATGATGTCTCTGCTCAGTTCCTTGGTCTCCTGTTGCTCTGTTTTCAAGGTACCAGATGTGATATCCAGATGACACAGAC
TACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCAGGGCAAGTCAGGACATTAGCAATTATTTAA
ACTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAAGTGTAAACTCCTGATCTACTACACATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCATCA
AGGTTCAAGTGGCAGTGGTCTGGAACAGATTATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCACTTACTT
TTGCCAACAGGGTAATACGCTTCCGTGGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAAcgggctgatgctgcaccaa
ct
```

マウス9H5-4抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列(134 a.a)を以下に示す(配列番号49)。大文字はマウス9H5-4 VH可変領域の配列を示し、小文字はマウスI

10

20

30

40

50

g 軽鎖定常領域を示す。下線部分はシグナル配列を示し、二重下線部分は C D R 領域 (C D R 1、C D R 2、C D R 3) を示す。

MMSSAQFLGLLLLCFQGTRCDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPS
RFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPWTFGGGKLEIKkradaapt

9 H 5 - 4 抗体の軽鎖可変領域の C D R 1 は RASQDISNYLN (配列番号 5 0) であり、9 H 5 - 4 抗体の軽鎖可変領域の C D R 2 は YTSRLHS (配列番号 5 1) であり、9 H 5 - 4 抗体の軽鎖可変領域の C D R 3 は QQGNTLP (配列番号 5 2) である。

抗 P T P R S マウス 1 3 G 5 - 5 7 抗体の重鎖可変領域の核酸配列 (465bp) を以下に示す (配列番号 5 3)。大文字はマウス 1 3 G 5 - 5 7 V H 可変領域を示し、小文字はマウス I g G 2 b 重鎖定常領域を示す。

10

ATGAACTTGGGGCTCAGCTTGATTTTCCTTGTCCTTGTTTTAAAAGGTGCCAGTGTGAAGTGAAGCTGGTGGAGTCTGG
 GGGAGGCTTAGTGACGCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAACCTCTGGATTCACTTTTCAGTGACTATTACATGT
 ATTGGGTTCCGACACTCCAGAGAAGAGGCTGGAGTGGGTCGCATACATTAGTAATGGTGGTGGTAGCACCTATTATCCA
 GACTGTAAAAGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAAATGAGCCGTCTGAAGTC
 TGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGACATGTTTACTACGGGAGGAACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAA
 CCTCAGTACCGTCTCCTCAgccaaaacaacacccccatcagtcctatccactggccccctaagggc

マウス 1 3 G 5 - 5 7 抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列 (155 a.a) を以下に示す (配列番号 5 4)。大文字は V H 可変領域の配列を示し、小文字はマウス I g G 2 b 重鎖定常領域を示す。下線部分はシグナル配列を示し、二重下線部分は C D R 領域 (C D R 1、C D R 2、C D R 3) を示す。

20

MNLGLSLIFLVLVLKGVQCEVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCATSGFTFSDYYMYWVRQTPEKRLEWVAYISNGGGSTYYP
DTVKGRFTISRDNKNTLYLQMSRLKSEDTAMYYCARHVVYGRNYAMDYWGQGSVTVSSaktppsvyplapkg

1 3 G 5 - 5 7 抗体の重鎖可変領域の C D R 1 は DYYMY (配列番号 5 5) であり、1 3 G 5 - 5 7 抗体の重鎖可変領域の C D R 2 は YISNGGGSTYYPDTVKG (配列番号 5 6) であり、1 3 G 5 - 5 7 抗体の重鎖可変領域の C D R 3 は HVVYGRNYAMDY (配列番号 5 7) である。

30

得られた抗 P T P R S マウス 1 3 G 5 - 5 7 抗体の軽鎖可変領域の核酸配列 (465bp) を以下に示す (配列番号 5 8)。大文字はマウス 1 3 G 5 - 5 7 V H 可変領域を示し、小文字はマウス I g 軽鎖定常領域を示す。

ATGAACTTGGGGCTCAGCTTGATTTTCCTTGTCCTTGTTTTAAAAGGTGCCAGTGTGAAGTGAAGCTGGTGGAGTCTGG
 GGGAGGCTTAGTGACGCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAACCTCTGGATTCACTTTTCAGTGACTATTACATGT
 ATTGGGTTCCGACACTCCAGAGAAGAGGCTGGAGTGGGTCGCATACATTAGTAATGGTGGTGGTAGCACCTATTATCCA
 GACTGTAAAAGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAAATGAGCCGTCTGAAGTC
 TGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGACATGTTTACTACGGGAGGAACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAA
 CCTCAGTACCGTCTCCTCAgccaaaacaacacccccatcagtcctatccactggccccctaagggc

マウス 1 3 G 5 - 5 7 抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列 (155 a.a) を以下に示す (配列番号 5 9)。大文字はマウス 1 3 G 5 - 5 7 V H 可変領域の配列を示し、小文字はマウス I g 軽鎖定常領域を示す。下線部分はシグナル配列を示し、二重下線部分は C D R 領域 (C D R 1、C D R 2、C D R 3) を示す。

40

MMSSAQFLGLLLLCFQGTRCDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPS
RFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEIKkradaaptvsifppsseqltsggasvvcf

1 3 G 5 - 5 7 抗体の軽鎖可変領域の C D R 1 は RASQDISNYLN (配列番号 6 0) であり、1 3 G 5 - 5 7 抗体の軽鎖可変領域の C D R 2 は YTSRLHS (配列番号 6 1) であり、1 3 G 5 - 5 7 抗体の軽鎖可変領域の C D R 3 は QQGNTLPY (配列番号 6 2) である。

50

抗 P T P R S マウス 2 2 H 8 - 8 4 抗体の重鎖可変領域の核酸配列 (458bp) を以下に示す (配列番号 6 3)。大文字はマウス 2 2 H 8 - 8 4 V H 可変領域を示し、小文字はマウス I g G 1 重鎖定常領域を示す。

ATGGAATGTAACCTGGATACTTCCTTTTATTCTGTGTCAGTAACTTCAGGTGTCTACTCACAGGTTTCAGCTCCAGCAGTCTGG
GGCTGAGCTGGCAAGACCTGGGGCTTCAGTGAAGTTGTCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTACTAGCTACTGGATGC
AGTGGGTAAAACAGAGGCCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGGGCTATTTATCCTGGAGATGGTGATACTAGGTACACT
CAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGCAGATAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCTTGGCATC
TGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGAAGGATTTACTACGGCTATTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAA
CCTCAGTCACCGTCTCCTCagccaaaacgacacccccatctgtctatccactggcccc

マウス 2 2 H 8 - 8 4 抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列 (152 a.a) を以下に示す (配列番号 6 4)。大文字は V H 可変領域の配列を示し、小文字はマウス I g G 1 重鎖定常領域を示す。下線部分はシグナル配列を示し、二重下線部分は C D R 領域 (C D R 1、C D R 2、C D R 3) を示す。

MECNWILPFISVTSGVYSQVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTSYWMQVVKQRPGGLEWIGAIYPGDGDRYT
QKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLASEDSAVYYCARRIYYGYYAMDYWGQGTSVTVSSaktppsvypla

2 2 H 8 - 8 4 抗体の重鎖可変領域の C D R 1 は SYWMQ (配列番号 6 5) であり、2 2 H 8 - 8 4 抗体の重鎖可変領域の C D R 2 は AIYPGDGDRYTQKFKG (配列番号 6 6) であり、2 2 H 8 - 8 4 抗体の重鎖可変領域の C D R 3 は RIYYGYYAMDY (配列番号 6 7) である。

得られた抗 P T P R S マウス 2 2 H 8 - 8 4 抗体の軽鎖可変領域の核酸配列 (430bp) を以下に示す (配列番号 6 8)。大文字はマウス 2 2 H 8 - 8 4 V H 可変領域を示し、小文字はマウス I g 軽鎖定常領域を示す。

ATGGAGACAGACACAATCCTGCTATGGGTGCTGCTGCTGCTGGGTTCCAGGCTCCACTGGTGACATTGTGCTGACCCAATC
TCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCCACCATCTCCTGCAAGGCCAGCCAAAGTGTGATTATGATGGTG
ATAGTTATATGAACTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAAACTCCTCATCTATGCTGCATCCAATCTAGAATCT
GGGATCCCAGCCAGGTTTGTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGC
TGCAACCTATTACTGTCAGCAAAGTAATGAGGATCCTCTCAGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA cgggctg
atgctgcaccaactgtatccatcaagggcg

マウス 2 2 H 8 - 8 4 抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列 (143 a.a) を以下に示す (配列番号 6 9)。大文字はマウス 2 2 H 8 - 8 4 V H 可変領域の配列を示し、小文字はマウス I g 軽鎖定常領域を示す。下線部分はシグナル配列を示し、二重下線部分は C D R 領域 (C D R 1、C D R 2、C D R 3) を示す。

METDTILLWVLLWVPGSTGDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGDSYMNWYQQKPGQPPKLLIYAASNLES
GIPARFSGSGSTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQSNEDPLTFGAGTKLELKradaaptvsikg

2 2 H 8 - 8 4 抗体の軽鎖可変領域の C D R 1 は KASQSVDYDGDSYMN (配列番号 7 0) であり、2 2 H 8 - 8 4 抗体の軽鎖可変領域の C D R 2 は AASNLES (配列番号 7 1) であり、2 2 H 8 - 8 4 抗体の軽鎖可変領域の C D R 3 は QSNEDPL (配列番号 7 2) である。

【 0 1 1 5 】

抗 P T P R S マウス 4 9 F 2 - 3 0 抗体の重鎖可変領域の核酸配列 (469bp) を以下に示す (配列番号 2 5)。大文字はマウス 4 9 F 2 - 3 0 V H 可変領域を示し、小文字はマウス I g G 1 重鎖定常領域を示す。

ATGAACTTCGGGCTCAGGTTGATTTTCTTCCCTCATTTTTAAAAGGTGTCCAGTGTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG
GGGAGACTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCAATTTTCAGTAGCTATGGCATGT
CTTGGGTTCCGCCAGACTCCAGACAAGAGGCTGGAGTGGGTGCGAACCATTAGTAGTGGTGGTAGTGACACCTATTATCCA
GACAGTGTGAAGGGGCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAACACACCCTGTACCTGCAAATGAGCAGTCTGAAGTC
TGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGACAGGTCTACTATGGTCTTTACTGGTATTTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGA

CCACGGTCACCGTCTCCTCAgccccaaacgacacccccatctgtctatccactggccccctaaggcgcaat

【 0 1 1 6 】

マウス 4 9 F 2 - 3 0 抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列(156 a.a) を以下に示す(配列番号 2 6)。大文字は V H 可変遺伝子を示し、小文字はマウス I g G 1 重鎖定常領域を示す。下線の配列はシグナル配列を示し、二重下線の配列は C D R 領域 (C D R 1、C D R 2、C D R 3) を示す。

MNFGRLRLIFLALILKGVQCEVQLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFIFSSYGMSWVRQTPDKRLEWVATISSGGSDTYYP
DSVKGRFTISRDNANNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARQVYYGLYWFYFDVWGAGTTVTVSS akttppsvyplapkg

10

4 9 F 2 - 3 0 抗体の重鎖可変領域の C D R 1 は SYGMS (配列番号 2 7)、4 9 F 2 - 3 0 抗体の重鎖可変領域の C D R 2 は TISSGGSDTYYPDSVKG (配列番号 2 8)、4 9 F 2 - 3 0 抗体の重鎖可変領域の C D R 3 は QVYYGLYWFYFDV (配列番号 2 9) である。

【 0 1 1 7 】

得られた抗 P T P R S マウス 4 9 F 2 - 3 0 抗体の軽鎖可変領域の核酸配列(413bp) を以下に示す(配列番号 3 0)。大文字はマウス 4 9 F 2 - 3 0 V L 可変領域を示し、小文字はマウス I g 軽鎖定常領域を示す。

ATGGAGTCACAGATTCAGGTCCTTTGTATTCGTGTTTCTCTGGTTGTCTGGTGTGACGGAGACATTGTGATGACCCAGTC
TCACAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCATCATTTGTAAGGCCAGTCAGGATGTGAATACTGCTGTAG
CCTGGTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAATTAAGTACTGATTTACTCGGCATCCTACCGGTACACTGGAGTCCCTGAT
CGCTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACGGATTTCACTTTACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAATTTATTA
CTGTCAGCAACATTATAGTACTCCGTACACGTTTCGGAGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAAacgggctgatgctgcaccaa
ctgtatccatcaa

20

【 0 1 1 8 】

マウス 4 9 F 2 - 3 0 抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列(137 a.a) を以下に示す(配列番号 3 1)。大文字はマウス 4 9 F 2 - 3 0 V L 可変領域を、小文字はマウス I g 軽鎖定常領域を示す。下線の配列はシグナル配列を示し、二重下線の配列は C D R 領域 (C D R 1、C D R 2、C D R 3) を示す。

MESQIQVFVFLWLSGVDGDIVMTQSHKFMSTSVGDRVSIICKASQDVNTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASRYRTGVPD
RFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAIYYCQQHYSTPYTFGGGTKLEIK radaaptvsi

30

4 9 F 2 - 3 0 抗体の軽鎖可変領域の C D R 1 は KASQDVNTAVA (配列番号 3 2)、4 9 F 2 - 3 0 抗体の軽鎖可変領域の C D R 2 は SASRYRT (配列番号 3 3)、4 9 F 2 - 3 0 抗体の軽鎖可変領域の C D R 3 は QQHYSTP (配列番号 3 4) である。

【 0 1 1 9 】

3. キメラ化抗体の発現ベクターの作製

3-1) ヒト I g G 定常領域をコードする c D N A のクローニング

ヒト P B M C の total RNA から、ヒト I g G 1 重鎖定常領域とヒト I g 軽鎖定常領域の c D N A をクローニングし、それぞれ、市販のキット「Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit」(インビトロジェン社、カタログ番号: 1325137) を用い、キット添付の指示書にしたがって pCR4Blunt-TOPO ベクターにクローニングし、大腸菌コンピテント細胞に導入して大腸菌形質転換体を得た。この形質転換体から上記プラスミドを得て、配列解析のために、プラスミド D N A 試料を Operon Biotechnology Co. Ltd 社(東京)に送付して、プラスミド中の c D N A 塩基配列を確認した。

40

【 0 1 2 0 】

3-2) キメラ 9 H 5 - 4 (1 0 F 7 - 3 8、1 4 A 8 - 8 5) 抗体の発現ベクターの作製

キメラ化 P T P R S 抗体の重鎖をコードする c D N A を調製するために、2-2 で得られたマウス 9 H 5 - 4 抗体の重鎖可変領域と、ヒト I g G 重鎖定常領域が組み込まれた pEE6.4 ベクター (Lonza Biologics 社, Slough, UK) を融合し、マウス 9 H 5 - 4 抗体の重鎖

50

可変領域をPCR法により増幅し、約450ベース長のPCR産物を得た。このとき、プライマーは以下のものである。得られたPCR産物を1.5%低融点アガロース法によって精製した。

キメラ9H5-4抗体の重鎖発現用プライマー

1) フォワードプライマー：chi10F7VH-1F(Hind3)

配列：5' ttt AAG CTT gcc gcc acc ATG GAG TTG GGA CTG AGC TGG 3' (39-mer) (配列番号73)

2) リバースプライマー：chi10F7VH-462R(ApaI)

配列：5' cga tgg gcc ctt ggt gct agc TGA GGA GAC TGT GAG AGT GGT 3' (42-mer) (配列番号74)

「9H5-4重鎖可変領域をコードするPCR産物」はPCR法によって2-2で得られたマウス9H5-4抗体の重鎖可変領域から得た。9H5-4重鎖可変領域をコードするPCR産物をHind IIIとApa I制限酵素で消化し、1.5%アガロースゲル法で精製した。これをddH₂Oで溶解し、重鎖可変領域をコードするcDNA断片の溶液とした。

得られたcDNAの9H5-4のV_Hコード領域を、Hind IIIとApaIをクローニングサイトとして、pEE6.4ベクター(Lonza Biologics社, Slough, UK)へのクローニングのための好適な制限部位(HindIIIおよびApaI)ならびに理想的Kozak配列(GCCGCCACC)を導入したプライマーchi10F7VH-1F(Hind3)およびchi10F7VH-462R(ApaI)を用いて、9H5-4のV_H領域を含むpCR4Blunt-TOPOプラスミドクローンからPCRで増幅した。Chi9H5-4VH-pEE6.4ベクターは、ヒトIgG1の重鎖定常領域を含む。V_HPCR断片を、HindIIIおよびApaIを用いて、インフレームでpEE6.4ベクターに挿入した。コンストラクトをcDNA塩基配列解析によって調べ、配列解析のために、プラスミドDNA試料をOperon Biotechnology Co. Ltd社(東京)に送付して、プラスミド中のcDNA塩基配列を確認した。

キメラ9H5-4抗体の軽鎖をコードするcDNAを調製するために、2-3で得られたマウス9H5-4抗体軽鎖可変領域と、3-2で得られたヒトIg 軽鎖定常領域を融合したPCRフラグメントを重複伸長PCR法に基づく手法によって730塩基の長さでPCR産物を増幅した。

9H5-4軽鎖可変領域をコードするPCR産物をHind IIIとEcoRI制限酵素で消化し、1.5%アガロースゲル法で精製した。これをddH₂Oで溶解し、軽鎖可変領域をコードするcDNA断片の溶液とした。

得られた9H5-4のV_LコードするcDNAを、pEE14.4ベクター(Lonza Biologics)へのクローニングのための好適な制限部位(HindIIIおよびEcoRI)ならびに理想的Kozak配列を導入した、プライマーchi11G9VL-1F(Hind)およびchi11G9VL-726R(RI)を用いて、9H5-4のV_L領域を含むpCR4Blunt-TOPOプラスミドクローンからPCRで増幅した。Chi9H5-4VL-pEE14.4ベクターは、カッパ軽鎖定常領域を含む。V_L PCR断片を、HindIIIおよびEcoRIを用いて、インフレームで、pEE14.4ベクターに挿入した。コンストラクトをcDNA塩基配列解析によって調べた。

キメラ9H5-4抗体の軽鎖発現用プライマー

1) フォワードプライマー：chi11G9VL-1F(Hind)

配列：5' acc AAG CTT gcc gcc acc ATG ATG TCC TCT GCT CAG TTC 3' (39-mer) (配列番号75)

2) リバースプライマー：chi11G9VL-408R

配列：5' agc cac agt tcg TTT GAT TTC CAG CTT GGT GCC 3' (33-mer) (配列番号76)

3) フォワードプライマー：chi11G9VL-385F

配列：5' CTG GAA ATC AAA cga act gtg gct gca cca tct 3' (33-mer) (配列番号77)

4) リバースプライマー：chi11G9VL-726R

配列：5' aaa GAA TTC cta gca ctc tcc cct gtt gaa 3' (30-mer) (配列番号78)

3-2) キメラ13G5-57(13G5-52)抗体の発現ベクターの作製

キメラ化PTPRS抗体の重鎖をコードするcDNAを調製するために、2-2で得られたマウス13G5-57抗体の重鎖可変領域と、ヒトIgG重鎖定常領域が組み込まれた

10

20

30

40

50

pEE6.4ベクター (Lonza Biologics社, Slough, UK) を融合した。9 H 5 - 4 抗体と同様の方法により P C R 産物を得て、さらに精製した。このとき、プライマーは以下のものである。

キメラ 1 3 G 5 - 5 7 抗体の重鎖発現用プライマー

1) フォワードプライマー : chi13G5.57VH-1F(Hind3)

配列 : 5' ttt AAG CTT gcc gcc acc ATG AAC TTG GGG CTC AGC TTG 3' (39-mer) (配列番号 7 9)

2) リバースプライマー : chi13G5.57VH-456R(ApaI)

配列 : 5' cga tgg gcc ctt ggt gct agc TGA GGA GAC GGT GAC TGA GGT 3' (42-mer) (配列番号 8 0)

キメラ 1 3 G 5 - 5 7 抗体の軽鎖をコードする c D N A を調製するために、2-3で得られたマウス 1 3 G 5 - 5 7 抗体軽鎖可変領域と、3-2で得られたヒト Ig 軽鎖定常領域を融合した P C R フラグメントを重複伸長 P C R 法に基づく手法によって730塩基の長さで P C R 産物を増幅した。

キメラ 1 3 G 5 - 5 7 抗体の軽鎖発現用プライマー

1) フォワードプライマー : chi11G9VL-1F(Hind)

配列 : 5' acc AAG CTT gcc gcc acc ATG ATG TCC TCT GCT CAG TTC 3' (39-mer) (配列番号 8 1)

2) リバースプライマー : chi11G9VL-408R

配列 : 5' agc cac agt tcg TTT GAT TTC CAG CTT GGT GCC 3' (33-mer) (配列番号 8 2)

3) フォワードプライマー : chi11G9VL-385F

配列 : 5' CTG GAA ATC AAA cga act gtg gct gca cca tct 3' (33-mer) (配列番号 8 3)

4) リバースプライマー : chi11G9VL-726R(RI)

配列 : 5' aaa GAA TTC cta gca ctc tcc cct gtt gaa 3' (30-mer) (配列番号 8 4)

キメラ 9 H 5 - 4 抗体の発現ベクターの作製と同様の方法で、キメラ 1 3 G 5 - 5 7 抗体の重鎖や軽鎖などの発現ベクターを作製した。

3-2) キメラ 2 2 H 8 - 8 4 抗体の発現ベクターの作製

キメラ化 P T P R S 抗体の重鎖をコードする c D N A を調製するために、2-2で得られたマウス 2 2 H 8 - 8 4 抗体の重鎖可変領域と、ヒト I g G 重鎖定常領域が組み込まれた pEE6.4ベクター (Lonza Biologics社, Slough, UK) を融合した。9 H 5 - 4 抗体と同様の方法により P C R 産物を得て、さらに精製した。このとき、プライマーは以下のものである。

キメラ 2 2 H 8 - 8 4 抗体の重鎖発現用プライマー

1) フォワードプライマー : chi22H8VH-1F(Hind3)

配列 : 5' ttt AAG CTT gcc gcc acc ATG GAA TGT AAC TGG ATA CTT 3' (39-mer) (配列番号 8 5)

2) リバースプライマー : chi22H8VH-456R(ApaI)

配列 : 5' cga tgg gcc ctt ggt gct agc TGA GGA GAC GGT GAC TGA GGT 3' (42-mer) (配列番号 8 6)

キメラ 2 2 H 8 - 8 4 抗体の軽鎖をコードする c D N A を調製するために、2-3で得られたマウス 2 2 H 8 - 8 4 抗体軽鎖可変領域と、3-2で得られたヒト Ig 軽鎖定常領域を融合した P C R フラグメントを重複伸長 P C R 法に基づく手法によって730塩基の長さで P C R 産物を増幅した。

キメラ 2 2 H 8 - 8 4 抗体の軽鎖発現用プライマー

1) フォワードプライマー : chi22H8VL-1F(Hind)

配列 : 5' acc AAG CTT gcc gcc acc ATG GAG ACA GAC ACA ATC CTG 3' (39-mer) (配列番号 8 7)

2) リバースプライマー : chi22H8VL-420R

配列 : 5' agc cac agt tcg TTT CAG CTC CAG CTT GGT CCC 3' (33-mer) (配列番号 8 8)

3) フォワードプライマー : chi22H8VL-397F

10

20

30

40

50

配列: 5' CTG GAG CTG AAA cga act gtg gct gca cca tct 3' (33-mer) (配列番号 89)
 4) リバースプライマー: chi49F2VL-726R(RI)

配列: 5' aaa GAA TTC cta gca ctc tcc cct gtt gaa 3' (30-mer) (配列番号 90)
 キメラ 9 H 5 - 4 抗体の発現ベクターの作製と同様の方法で、キメラ 2 2 H 8 - 8 4 抗体の重鎖や軽鎖などの発現ベクターを作製した。

3-2) キメラ化 P T P R S 抗体の重鎖をコードする c D N A の調製

キメラ化 P T P R S 抗体の重鎖をコードする c D N A を調製するために、2-2で得られたマウス 4 9 F 2 - 3 0 抗体重鎖可変領域と、3-1で得られたヒト IgG 重鎖定常領域を融合した P C R フラグメントを重複伸長 P C R 法に基づく手法によって 2 つの P C R フラグメントを交互し、ハイブリッド動作の結果として部分的に二重のフィラメント分子の形成を可能にするような方法で 1434 塩基の長さで P C R 産物を増幅した。このとき、プライマーは表 1 に示すものである (配列番号 17 ~ 24)。得られた P C R 産物を 1.5% 低融点アガロース法によって精製した。

【 0 1 2 1 】

【表 1】

	プライマー名	配列	
キメラ 4 9 F 2 - 3 0 抗体の重鎖発現用プライマー			
1)	chi49F2VH-IF(Hind3)	5' acc AAG CTT gcc gcc acc ATG AAC TTC GGG CTC AGG TTG 3' (39-mer)	20
2)	chi49F2VH-447R	5' ctt ggt gct agc TGA GGA GAC GGT GAC CGT GGT 3' (33-mer)	
3)	chi49F2VH-424F	5' ACC GTC TCC TCA gct agc acc aag ggc cca tcg 3' (33-mer)	
4)	chi49F2VH-1434R(RI)	5' ttt GAA TTC tca ttt acc cgg aga cag gga 3' (30-mer)	
キメラ 4 9 F 2 - 3 0 抗体の軽鎖発現用プライマー			
5)	chi49F2VL-IF(Hind)	5' acc AAG CTT gcc gcc acc ATG GAG TCA CAG ATT CAG GTC 3' (33-mer)	30
6)	chi49F2VL-408R	5' agc cac agt tcg TTT TAT TTC CAG CTT GGT CCC 3' (33-mer)	
7)	chi49F2VL-385F	5' CTG GAA ATA AAA cga act gtg gct gca cca tct 3' (33-mer)	
8)	chi49F2VL-726R(RI)	5' aaa GAA TTC cta gca ctc tcc cct gtt gaa 3' (30-mer)	

【 0 1 2 2 】

2-2で得られたマウス 4 9 F 2 - 3 0 抗体重鎖可変領域と、3-1で得られたヒト IgG1 重鎖定常領域を c D N A がオーバーラップする領域を持つ。そこで、この領域を用い、重複伸長 P C R 法によって「4 9 F 2 - 3 0 重鎖可変領域をコードする P C R 産物」を得た。4 9 F 2 - 3 0 重鎖可変領域をコードする P C R 産物を Hind III と EcoR I 制限酵素で消化し、1.5% アガロースゲル法で精製した。これを ddH₂O で溶解し、重鎖可変領域をコードする c D N A 断片の溶液とした。

【 0 1 2 3 】

得られた c D N A の 4 9 F 2 - 3 0 の V_H コード領域を、Hind III と EcoR I をクローニングサイトとして、pEE6.4 ベクター (Lonza Biologics 社, Slough, UK) へのクローニングのための好適な制限部位 (Hind III および EcoR I) ならびに理想的 Kozak 配列 (GCCGCCACC) を導入したプライマー chi49F2VH-IF(Hind3) および chi49F2VH-1434R(RI) を用いて、4 9 F 2 - 3 0 の V_H 領域を含む pCR4Blunt-TOPO プラスミドクローンから P C R で増幅した。Chi49F2VH-pEE6.4 ベクターは、ヒト I g G 1 の重鎖定常領域を含む。V_H PCR 断片を、HindIII および EcoRI を用いて、インフレームで pEE6.4 ベクターに挿入した。コンストラクトを c D N

10

20

30

40

50

A塩基配列解析によって調べた。

【0124】

3-3) キメラ化PTPRS抗体の軽鎖をコードするcDNAの調製

キメラ化PTPRS抗体の軽鎖をコードするcDNAを調製するために、2-3で得られたマウス49F2-30抗体軽鎖可変領域と、3-2で得られたヒトIg 軽鎖定常領域を融合したPCRフラグメントを重複伸長PCR法に基づく手法によって726塩基の長さでPCR産物を増幅した。

【0125】

49F2-30軽鎖可変領域をコードするPCR産物をHind IIIとEcoR I制限酵素で消化し、1.5%アガロースゲル法で精製した。これをddH₂Oで溶解し、軽鎖可変領域をコードするcDNA断片の溶液とした。

得られた49F2-30のV_LコードするcDNAを、pEE14.4ベクター(Lonza Biologicals社)へのクローニングのための好適な制限部位(HindIIIおよびEcoRI)ならびに理想的Koza k配列を導入した、プライマーchi49F2VL-1F(Hind)およびchi49F2VL-726R(RI)を用いて、49F2-30のV_L領域を含むpCR4Blunt-TOPOプラスミドクローンからPCRで増幅した。Chi49F2VL-pEE14.4ベクターは、カッパ軽鎖定常領域を含む。V_LPCR断片を、HindIIIおよびEcoRIを用いて、インフレームで、pEE14.4ベクターに挿入した。コンストラクトをcDNA塩基配列解析によって調べた。

【0126】

3-4) キメラ化PTPRS抗体ダブルジーンLonza 発現ベクターの構築

キメラ化PTPRS抗体の重鎖発現ベクターおよびキメラ化PTPRS抗体の軽鎖発現ベクターを、標準的なクローニング技術によって、1つの2遺伝子ベクター中で組み合わせたキメラ化PTPRS抗体(ダブルジーン)Lonza 発現ベクターを構築した。

【0127】

4. HEK-293F細胞における一過性発現

以下の一過性発現vector DNA(80 μg)を使用した。

- 1)chi9H5-4VH/VL DG Lonza vector DNA
- 2)chi13G5-57VH/VL DG Lonza vector DNA
- 3)chi22H8-14VH/VL DG Lonza vector DNA
- 4)chi49F2-30VH/VL DG Lonza vector DNA

293F細胞をトランスフェクション前日に250 mLのエーレンマイヤーフラスコ(corning社 #431144)に 8×10^5 cells/mLで80 mLに合わせて37 °C、CO₂濃度8%の条件で振とう7日間培養した。

7日間培養後に、トランスフェクションを行った293F細胞の培養液を50 mLチューブに回収し、2,070g、4 °Cの条件で5分間遠心分離を行った。上清をポアサイズ0.45 μmのシリジフィルター(カタログ番号431220; CORNING社)でろ過を行い、培養上清をひとつにまとめた。

【0128】

5. 抗PTPRSキメラ化抗体の精製

キメラ9H5-4、13G5-57、22H8-14、49F2-30抗体をプロテインAアフィニティークロマトグラフィーによって精製した。4.で得られた粗抗体液を、それぞれプロテインAアフィニティークラム(rProteinA Sepharose Fast Flow(カタログ番号17-1279-01; Lot.311272; GE Healthcare社)で精製した。カラム条件は以下の通りである。結合バッファー(20 mM Sodium phosphate, 0.15 M NaCl, pH 7.4)、溶出バッファー(0.1M Glycine-HCl, pH 2.7)を用いてアフィニティー精製した。溶出画分は中和バッファー(1M Tris-HCl pH 9.5)を添加してpH7.2付近に調整した。精製後の抗体のバッファーをPBSに置換するために、Slide-A-Lyzer MINI Dialysis Unit 10kMWCOを用いてバッファーの交換を行った。

【0129】

精製抗体の濃度は280 nmの吸光度を測定し、1 mg/mlを1.38 ODとして算出した。

精製した抗 P T P R S キメラ化抗体 (c h 9 H 5 - 4 A b、 c h 1 3 G 5 - 5 7 A b、 c h 2 2 H 8 - 1 4 A b、 c h 4 9 F 2 - 3 0 A b) を S D S - P A G E、Flowcytometry 法によって分析した。

【 0 1 3 0 】

作製されたキメラ 9 H 5 - 4 抗体の重鎖、および軽鎖の核酸配列とアミノ酸配列は、それぞれ次の配列番号の通りである。

重鎖	軽鎖
配列番号 9 1 (核酸配列)	配列番号 9 3 (核酸配列)
配列番号 9 2 (アミノ酸配列)	配列番号 9 4 (アミノ酸配列)

抗 P T P R S キメラ 9 H 5 - 4 抗体の重鎖の核酸配列 (1419 bp) を以下に示す (配列番号 9 1)。大文字はキメラ 9 H 5 - 4 V H 可変領域を、小文字はヒト I g G 1 重鎖定常領域を示す。

ATGGAGTTGGGACTGAGCTGGGTATTTCTTGTGGCTCTTTTGAATGGTGTCCAGTGTCCAGGTGCAGCTTGTAGAGACCGG
GGGAGGCTTGGTGAGGCCTGGAAATTCCTGAAACTCTCCTGTGTTACCTCGGGATTCACTTTTCAGTAACCTACCGGATGC
ACTGGCTTCGCCAGCCTCCAGGGAAGAGGCTGGAGTGGATTGCTGTAATTACAGTCAAATCTGATAATTATGGAGCAAAT
TATGCAGAGTCTGTGAAAGGCAGATTCATATTTCAAGAGATGATTCAAAAAGCAGTGTCTACCTGCAGATGAACAGATT
AAGAGAGGAAGACACTGCCACTTATTATTGTAGTAGATCGGTCTACTATGGTTACGTCTAGCCTTTGACTACTGGGGCC
AAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAgctagcaccacagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcacc
tctgggggacagcggccctgggctgctgggcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgctgctggaactcaggcgc
cctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtctacagctcctcaggactctactccctcagcagcgtgggacccgtgc
cctccagcagcttgggacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagt
gagcccaaatctgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgccagcaccctgaactcctggggggaccgtcagcttctct
cttcccccaaaaccaaggaacacctcatgatctcccggacccctgagggtcacatgctggtgggggacgtgagccacg
aagacctgagggtcaagttcaactggtagctggacggcgtggagggtgataatgccaagacaagccgcgggaggagcag
tacaacagcagctaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaa
ggctccaacaaagccctcccagcccccctcgagaaaacctcctcaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgt
acacctgcccccatcccgggatgagctgaccaagaaccagggtcagcctgacctgacctgctgggcaaggcttctatcccagc
gacatcgccgtggagtgggagagcaatgggagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacgg
ctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcagggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgc
atgaggctctgcacaaccctacacgcagaagagccttctccctgtctccgggtaaatga

抗 P T P R S キメラ 9 H 5 - 4 抗体の重鎖のアミノ酸配列 (472 a.a.) を以下に示す (配列番号 9 2)。大文字はキメラ 9 H 5 - 4 V H 可変領域を、小文字はヒト I g G 1 重鎖定常領域を示す

MELGLSWVFLVALLNGVQCQVQLVETGGGLVRPNSLKLSCVTSGFTFNSNYRMHWLRQPPGKRLEWIAVITVKSNDNYGAN
YAESVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNRLREEDTATYYCSRSVYYGYVLAFDYWGQGTTLTVSSastkgpsvfp lapsskst
sggtaalgclvkdyfpepvtvswngsal tsgvhtfpav lqssg lyl ssvvtvpsss lgtqtyicnvnhkpsntkvdkkv
epksckthtppcpapel lggpsvflfpkpkd tlmisr tpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeq
ynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepqvylppsr del tknqvs l tclvkgyfyps
diavewesngqpennyktppvl dsdgsff lylsk l tvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqks lslspgk

抗 P T P R S キメラ 9 H 5 - 4 抗体の軽鎖の核酸配列 (705 bp) を以下に示す (配列番号 9 3)。大文字はキメラ 9 H 5 - 4 V L 可変領域を、小文字はヒト I g 軽鎖定常領域を示す。

ATGATGTCTCTGCTCAGTTCCTTGGTCTCCTGTTGCTCTGTTTTCAAGGTACCAGATGTGATATCCAGATGACACAGAC
TACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTACCATCAGTTGCAGGGCAAGTCAGGACATTAGCAATTATTTAA
ACTGGTATCAGCAGAAAACCAGATGGAACCTGTTAAACTCCTGATCTACTACACATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCATCA
AGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCACTTACTT
TTGCCAACAGGTAATACGCTTCCGTGGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAAcgaactgtggctgcaccat
ctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgtgctgctgaataacttctat
cccagagaggccaaagtacagtggaagg tggataacgccc tccaatcgggtaactcccaggagagtggtcacagagcagga

cagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgacct
gcaagtacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaagagcctcaacaggggagagtgcctag

抗 P T P R S キメラ 9 H 5 - 4 抗体の軽鎖のアミノ酸配列 (234 a.a.) を以下に示す (配列番号 9 4)。大文字はキメラ 9 H 5 - 4 V L 可変領域、小文字はヒト I g 軽鎖定常領域を示す。

MMSSAQFLGLLLLCFQGTRCDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPS
RFGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPWTFGGGKLEIKRtvaapsvfifppsdeqlksgtasvvcIlnnfy
preakvqwkvdnalqsgnsqesvteqdskdstyslssltltskadyekhkvyacevthqglsspvtksfnrgec

10

< 1 3 G 5 - 5 7 >

作製されたキメラ 1 3 G 5 - 5 7 抗体の重鎖、および軽鎖の核酸配列とアミノ酸配列は、それぞれ次の配列番号の通りである。

重鎖

軽鎖

配列番号 9 5 (核酸配列)

配列番号 9 7 (核酸配列)

配列番号 9 6 (アミノ酸配列)

配列番号 9 8 (アミノ酸配列)

抗 P T P R S キメラ 1 3 G 5 - 5 7 抗体の重鎖の核酸配列 (1413 bp) を以下に示す (配列番号 9 5)。大文字はキメラ 1 3 G 5 - 5 7 V H 可変領域を、小文字はヒト I g G 1 重鎖定常領域を示す。

ATGAACTTGGGGCTCAGCTTGATTTTCTTGTCTTGTGTTTTAAAGGTGTCAGTGTGAAGTGAAGCTGGTGGAGTCTGG
GGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAACCTCTGGATTCACTTTTCAGTGACTATTACATGT
ATTGGGTTCCGACACTCCAGAGAAGAGGCTGGAGTGGGTCGCATACATTAGTAATGGTGGTGGTAGCACCTATTATCCA
GACACTGTAAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAAATGAGCCGTCTGAAGTC
TGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGACATGTTACTACGGGAGGAACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAA
CCTCAGTCACCGTCTCCTCAgctagcaccaaggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctggg
ggcacagcggccctgggctgctgggcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcggtggaactcaggcgccctgac
cagcggcgtgcacaccttcccggctgtctacagctcctcaggactctactcctcagcagcgtggtgaccgtgccctcca
gcagcttgggacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaagggtggacaagaaagttagagccc
aaatctgtgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaactcctggggggaccgtcagctctcctcttccc
ccaaaaccaaggacacctcatgatctcccggacccctgagggtcacatgctgtgggtgggacgtgagccacgaagacc
ctgaggtaagttcaactggtagctggacggcgtggagggtgataatgccaagacaaagccgaggaggagcagtagaac
agcagctaccgtgtggtagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaaaggcaaggagtagaagtgcaaggctctc
caacaagccctcccagccccatcgagaaaaccttccaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacc
tgcccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctgggtcaaaggctctatcccagcgacatc
gccgtggagtgggagagcaatgggagccggagaacaactacaagaccacgacctcccgtgctggactccgacggctcctt
cttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgagg
ctctgcacaaccctacacgcagaagagcctctcccgtctccgggtaaatga

20

30

抗 P T P R S キメラ 1 3 G 5 - 5 7 抗体の重鎖のアミノ酸配列 (470 a.a.) を以下に示す (配列番号 9 6)。大文字はキメラ 1 3 G 5 - 5 7 V H 可変領域を、小文字はヒト I g G 1 重鎖定常領域を示す

MNLGLSLIFLVLVLKGVQCEVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCATSGFTFSDYYMYWVRQTPEKRLEWVAYISNGGGSTYYP
DTVKGRFTISRDNANTLYLQMSRLKSEDTAMYYCARHVVYGRNYAMDYWGQTSVTVSSastkgpsvflapsskts
gtaalgclvkdyfpepvtvswnsгалtsghvtfpavIqssglylssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvpe
kscdkthtppcpapelIggpsvflfppkpkdtlmsrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqn
styrvsvltvlhqdwIngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepqvylppsrdeltknqvsItclvkgyfypsd
avewesngqpennyktppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk

40

抗 P T P R S キメラ 1 3 G 5 - 5 7 抗体の軽鎖の核酸配列 (705 bp) を以下に示す (配列番号 9 7)。大文字はキメラ 1 3 G 5 - 5 7 V L 可変領域を、小文字はヒト I g

50

軽鎖定常領域を示す。

ATGATGTCCTCTGCTCAGTTCCTTGGTCTCCTGTTGCTCTGTTTTCAAGGTACCAGATGTGATATCCAGATGACACAGAC
TACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCAGGGCAAGTCAGGACATTAGCAATTTTAA
ACTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAACCTGTTAAACTCCTGATCTACTACACATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCATCA
AGGTTCACTGAGCAGTGGTCTGGAACAGATTATTCTCTACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCACTTACTT
TTGCCAACAGGGTAATACGCTTCCGTACACGTTCCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA_{cgaaactgtggctgcaccat}
_{ctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctat}
_{cccagagaggccaaagtacagtggaaggtggaataacgcccccaatcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcagga}
_{cagcaaggacagcaccfacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcct}
_{gcgaagtaccccatcagggcctgagctcgcccgctcacaagagcttcaacaggggagagtgctag}

10

抗 P T P R S キメラ 1 3 G 5 - 5 7 抗体の軽鎖のアミノ酸配列 (234 a.a.) を以下に示す (配列番号 9 8)。大文字はキメラ 1 3 G 5 - 5 7 V L 可変領域、小文字はヒト I g 軽鎖定常領域を示す。

MMSSAQFLGLLLLCFQGTRCDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPS
RFGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQNTLPYTFGGGKLEIKRtvaapsvfi fppsdeq|ksgtasvvc|lnnfy
preakvqwkvdna|qsgnsqesvteqdskdstys|sst|t|skadyekhkvyacevthqg|sspvtksfnrgec

作製されたキメラ 2 2 H 8 - 8 4 抗体の重鎖、および軽鎖の核酸配列とアミノ酸配列は、それぞれ次の配列番号の通りである。

20

重鎖	軽鎖
配列番号 9 9 (核酸配列)	配列番号 1 0 1 (核酸配列)
配列番号 1 0 0 (アミノ酸配列)	配列番号 1 0 2 (アミノ酸配列)

抗 P T P R S キメラ 2 2 H 8 - 8 4 抗体の重鎖の核酸配列 (1413 bp) を以下に示す (配列番号 9 9)。大文字はキメラ 2 2 H 8 - 8 4 V H 可変領域を、小文字はヒト I g G 1 重鎖定常領域を示す。

ATGGAATGTAACCTGGATACTTCCTTTTATTCTGTCTCAGTAACTTCAGGTGTCTACTCACAGGTTCCAGCTCCAGCAGTCTGG
GGCTGAGCTGGCAAGACCTGGGGCTTCAGTGAAGTTGTCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTACTAGCTACTGGATGC
AGTGGGTAAAACAGAGGCCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGGGCTATTTATCCTGGAGATGGTGATACTAGGTACACT
CAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGCAGATAAACTCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCTTGGC
TGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGAAGGATTTACTACGGCTATTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAA
CCTCAGTCACCGTCTCCTCAgctagcacc_{aaaggccccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcaccctctggg}
_{ggcacagcggccctgggctgcttggctcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcggtggaactcaggcgccctgac}
_{cagcggcgctgcacacccttcccggctgtcttacagctcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctcca}
_{gcagcttgggacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaagggtggacaagaaagttagagccc}
_{aaatctgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcaccctgaactcctggggggaccgtcagctctcctcttccc}
{ccaaaacc{caaggacaccctcatgatctcccggacccccgaggtcacatgctgtgggtgggagcgtgagccacgaagacc}}
_{ctgaggctcaagttcaactggctacgtggacggcgtggaggtgataatgccaagacaaagccgaggaggagcagtagaac}
_{agcagctaccgtgtggctcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaaatggcaaggagtacaagtgaaggtctc}
_{caacaagcccctccagccccatcgagaaaaccatctccaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacc}
_{tgcccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctgggtcaaaggcttctatcccagcgacatc}
_{gccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgctcccgtgctggactccgacggctcctt}
_{cttcccttacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgagg}
_{ctctgcacaaccctacacgcagaagagcctctcccgtctccgggtaaatga}

30

40

抗 P T P R S キメラ 2 2 H 8 - 8 4 抗体の重鎖のアミノ酸配列 (470 a.a.) を以下に示す (配列番号 1 0 0)。大文字はキメラ 2 2 H 8 - 8 4 V H 可変領域を、小文字はヒト I g G 1 重鎖定常領域を示す

MECNWILPFI LSVTSGVYSVQVLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTSYWMQWVKQRPGGLEWIGAIYPGDGDRYT
QKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLASEDSAVYYCARRIYYGYYYAMDYWGQTSVTVSSastkgpsvfp|apssksts

50

gtaalgc|vkdyfpepvtvswngal tsgvhtfpav|qssg|lys|ssvvtvpsss|gtqty|cnvnhkpsntkvdkkvep
kscdkthtccppcpele|ggpsvfl|fppkpkdt|lmisrtpevtcvvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqyn
styrvvsv|tlvhqdw|ngkeykckvsnk|l|papiekt|iskakgqprepqvyt|lppsrdel|tknqvs|l|cl|vkgyfypsdi
avewesngqpennykt|tppvl|dsdgsff|lysk|l|tvdk|srwqgnvf|scsvmheal|hnhytqks|l|l|spgk

抗 P T P R S キメラ 2 2 H 8 - 8 4 抗体の軽鎖の核酸配列 (717 bp) を以下に示す (配列番号 1 0 1)。大文字はキメラ 2 2 H 8 - 8 4 V L 可変領域を、小文字はヒト I g 軽鎖定常領域を示す。

ATGGAGACAGACACAATCCTGCTATGGGTGCTGCTGCTCTGGGTTCCAGGCTCCACTGGTGACATTGTGCTGACCCAATC
TCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCCACCATCTCCTGCAAGGCCAGCCAAAGTGTGATTATGATGGTG
ATAGTTATATGAACTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAAACTCCTCATCTATGCTGCATCCAATCTAGAATCT
GGGATCCCAGCCAGGTTTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGC
TGCAACCTATTACTGTGAGCAAAAGTAATGAGGATCCTCTCACGTTCCGGTGTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAAcaaacg
tggtgcaccatctgtcttcatcttcccggccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctg
aataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtg
cacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaacgagactacgagaaacaca
aagctacgctgcaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaagagcttcaacaggggagagtgctag

10

抗 P T P R S キメラ 2 2 H 8 - 8 4 抗体の軽鎖のアミノ酸配列 (238 a.a.) を以下に示す (配列番号 1 0 2)。大文字はキメラ 2 2 H 8 - 8 4 V L 可変領域、小文字はヒト I g 軽鎖定常領域を示す。

METDTILLWLLLLWVPGSTGDI VLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDDYDGD SYMNWYQQKPGQPPKLLIYAASNLES
GIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQSNEDPLTFGAGTKLELKr tvaapsvfi fppsdeqlksgtasvvc|l
nnfyprcakvqwkvdnalqsgnsqesvteqdsdstys|sst|l|l|skadyekhkvacevthqgl|sspv|tks|fnr|gec

20

作製されたキメラ 4 9 F 2 - 3 0 抗体の重鎖、および軽鎖の核酸配列とアミノ酸配列は、それぞれ次の配列番号の通りである。

重鎖 軽鎖
配列番号 3 5 (核酸配列) 配列番号 3 7 (核酸配列)
配列番号 3 6 (アミノ酸配列) 配列番号 3 8 (アミノ酸配列)

30

抗 P T P R S キメラ 4 9 F 2 - 3 0 抗体の重鎖の核酸配列 (1413 bp) を以下に示す (配列番号 3 5)。大文字はキメラ 4 9 F 2 - 3 0 V H 可変領域を、小文字はヒト I g G 1 重鎖定常領域を示す。

【 0 1 3 1 】
ATGAACTTCGGGCTCAGGTTGATTTTCTTGGCCCTCATTAAAAAGGTGTCAGTGTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG
GGGAGACTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCAATTTTCAGTAGCTATGGCATGT
CTTGGGTTCCGCCAGACTCCAGACAAGAGGCTGGAGTGGGTGCGAACCATTAGTAGTGGTGGTAGTGACACCTATTATCCA
GACAGTGTGAAGGGCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAACACACCCTGTACCTGCAAATGAGCAGTCTGAAGTC
TGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGACAGGCTACTATGGTCTTTACTGGTATTTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGA
CCACGGTCACCGTCTCCTCAgc tagcaccaagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctggg
ggcacagcggccccgggctgcccggctcaaggactacttccccgaaccggtagcgggtgctggaactcaggcgccccgac
cagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtagccgtgcccccca
gcagctggggcaccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttagagccc
aaatcttgtgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcaccctgaactcctggggggaccgtcagctcttctcttccc
cccaaaacccaaggacacctcatgatctcccggacccccgaggtcacatgctggtggtagcgtgagccacgaagacc
ctgaggtcaagttcaactggtagctggacggcgtggaggtgcaataatgccaaagacaaagccgcgggaggagcagtagaac
agcagctaccgtgtggtagcgtctcaccgtctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtagaagtgcaaggtctc
caacaaagccccccagcccccatcgagaaaacctctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacc
tgcccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctgggtcaaaggctctatcccagcgacatc
gccgtggagtgaggagagcaatgggcagccgggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctcctt

40

50

cttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcagggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgagg
ctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaata

【 0 1 3 2 】

抗 P T P R S キメラ 4 9 F 2 - 3 0 抗体の重鎖のアミノ酸配列 (470 a.a.) を以下に示す (配列番号 36)。大文字はキメラ 4 9 F 2 - 3 0 V H 可変領域を、小文字はヒト I g G 1 重鎖定常領域を示す。

MNFGRLRLIFLALILKGVQCEVQLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFIFSSYGMSWVRQTPDKRLEWVATISSGGSDTYYP
DSVKGRFTISRDNANNTLYLQMSSSLKSEDTAMYCARQVYGLYWFYFDVWGAGTTVTVSSastkgpsvfplapsskts
gtaalgc lvkdyfpepvtvswngal tsgvhtfpav lqssg l y s l s s v v t v p s s l g t q t y i c n v n h k p s n t k v d k k v e p
kscdkthtppcpapel lggpsvf l f p p k p k d t l m i s r t p e v t c v v v d v s h e d p e v k f n w y v d g v e v h n a k t k p r e e q n
st y r v v s v l t v l h q d w l n g k e y k c k v s n k a l p a p i e k t i s k a k g q p r e p q v y t l p p s r d e l t k n q v s l t c l v k g f y p s d i
avewesngqpennykt t p p v l d s d g s f f l y s k l t v d k s r w q q g n v f s c s v m h e a l h n h y t q k s l s l s p g k

10

【 0 1 3 3 】

抗 P T P R S キメラ 4 9 F 2 - 3 0 抗体の軽鎖の核酸配列 (705 bp) を以下に示す (配列番号 37)。大文字はキメラ 4 9 F 2 - 3 0 V L 可変領域を、小文字はヒト I g 軽鎖定常領域を示す。

ATGGAGTCACAGATTCAGGTCTTTGTATTCGTGTTTCTCTGGTTGTCTGGTGTGACGGAGACATTGTGATGACCCAGTC
TCACAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCATCATTTGTAAGGCCAGTCAGGATGTGAATACTGCTGTAG
CCTGGTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAATTAAGTACTGATTTACTCGGCATCCTACCGGTACACTGGAGTCCCTGAT
CGCTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACGGATTTCACTTTACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAATTTATTA
CTGTCAGCAACATTATAGTACTCCGTACACGTTCCGAGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAAcaaacgtgtggctgcacccat
ctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgtgctgctgaataacttctat
cccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataaacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgctcacagagcagga
cagcaaggacagcacc tacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaacgagactacgagaaacacaaagtctacgcct
gcgaagt caccatcagggcctgagctcgccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgctag

20

【 0 1 3 4 】

抗 P T P R S キメラ 4 9 F 2 - 3 0 抗体の軽鎖のアミノ酸配列 (234 a.a.) を以下に示す (配列番号 38)。大文字はキメラ 4 9 F 2 - 3 0 V L 可変領域、小文字はヒト I g 軽鎖定常領域を示す。

MESQIQVFVFLWLSGVDGDI VMTQSHKFMSTSVGDRVSI ICKASQDVNTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYTGVPD
RFTGSGSGTDFTFI SSVQAEDLAIYYCQQHYSTPYTFGGGTKLEIKrtvaapsvfifppsdeqlksgtasvvc l l n n f y
p r e a k v q w k v d n a l q s g n s q e s v t e q d s k d s t y s l s s t l t l s k a d y e k h k v y a c e v t h q g l s s p v t k s f n r g e c

30

【 0 1 3 5 】

実施例 6

作製した抗ヒト P T P R S キメラ抗体 (c h 4 9 F 2 - 3 0 、 c h 9 H 5 - 4 、 c h 1 3 G 5 - 5 7 、 c h 2 2 H 8 - 8 4) の抗体依存性細胞傷害活性 (Antibody-dependent cellular cytotoxicity; A D C C 活性) を測定した。活性は細胞から放出された乳酸脱水素酵素 (L D H) の測定値より算出した細胞毒性を指標とした。エフェクター細胞となるヒト末梢血単核球は HISTOPAQUE-1077 を使った比重遠心で精製した。ターゲットとなる細胞は、C H O (チャイニーズハムスター卵巣細胞株) を使った h P T P R S 遺伝子の強制形質転換細胞を用いた (2×10^4 / well) 。エフェクターとターゲット細胞の割合が、10:1、20:1、40:1、および80:1になるように混合し、作製した抗ヒト P T P R S キメラ抗体 (c h 4 9 F 2 - 3 0 、 c h 9 H 5 - 4 、 c h 1 3 G 5 - 5 7 、 c h 2 2 H 8 - 8 4) またはコントロール抗体の Synagis を 10 μ g / ml を加えて、4時間 37 で培養し、抗体の細胞傷害活性効果を評価した。その結果、抗 h P T P R S キメラ抗体の c h 4 9 F 2 - 3 0 、 c h 9 H 5 - 4 、 c h 1 3 G 5 - 5 7 、 c h 2 2 H 8 - 8 4 はエフェクター細胞数依存的にターゲットの h P T P R S / C H O 細胞を傷害した (図 1 7 A および 図 1 7 B) 。この結果は、作製した抗 P T P R S キメラ抗体が、P T P R S を発現する細胞を選択的に傷害することを示した。

40

【 0 1 3 6 】

50

抗PTPRS抗体のpDCへの効果を検討した。ヒト末梢血からPBMCを精製し、10 µg/mlの抗ヒトPTPRSキメラ抗体と混合し24時間培養した。その後、pDCに発現している toll様レセプター9のリガンドであるCpG2216で24時間刺激し、IFN産生を誘導した。CpG刺激後、IFNの産生量を試験した。結果、作製した抗ヒトPTPRSキメラ抗体(ch49F2-30、ch9H5-4、ch13G5-57、ch22H8-84)処理によってIFN産生が完全に阻害されていた(図18A)。さらに、ch49F2-30、ch9H5-4、ch13G5-57、ch22H8-84処理した6時間後に細胞を回収し、pDC1を抗BDCA2抗体と抗BDCA4抗体の二重染色で確認すると、pDC細胞群がコントロール抗体のSynagis処理よりも減少していることがわかった(図18Bおよび図18C)。これらの結果は、抗PTPRSキメラ抗体がPTPRSを特異的に発現するpDCを傷害し、その結果、CpG2216刺激によるIFN産生を阻害したことを示した。

10

【産業上の利用可能性】

【0137】

本発明は、ヒトPTPRSを特異的に認識する抗体、その抗体の製造に有用な免疫原、およびその免疫原を利用する抗ヒトPTPRS抗体の製造方法を提供する。

【受託番号】

【0138】

FERM BP - 11356
 FERM BP - 11357
 FERM BP - 11358
 FERM BP - 11359
 FERM BP - 11360
 FERM BP - 11361
 FERM BP - 11362
 FERM BP - 11363

20

【配列表フリーテキスト】

【0139】

配列番号3：フォワードプライマー
 配列番号4：リバースプライマー
 配列番号5：フォワードプライマー
 配列番号6：リバースプライマー
 配列番号7：フォワードプライマー
 配列番号8：リバースプライマー
 配列番号9：フォワードプライマー
 配列番号10：リバースプライマー
 配列番号11：アンチセンスプライマー
 配列番号12：アンカープライマー
 配列番号12：nはデオキシイノシンである。
 配列番号13：アンチセンスプライマー
 配列番号14：AUAプライマー
 配列番号15：アンチセンスプライマー
 配列番号16：アンチセンスプライマー
 配列番号17：プライマー
 配列番号18：プライマー
 配列番号19：プライマー
 配列番号20：プライマー
 配列番号21：プライマー
 配列番号22：プライマー
 配列番号23：プライマー

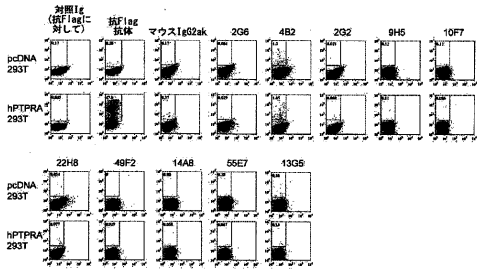
30

40

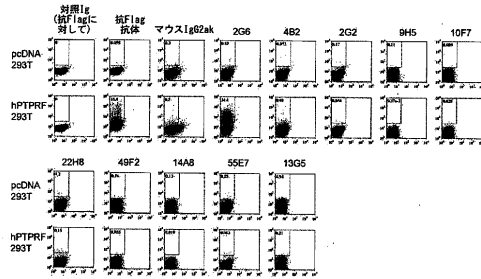
50

配列番号 24 : プライマー	
配列番号 35 : 抗 P T P R S キメラ 4 9 F 2 - 3 0 抗体重鎖核酸配列	
配列番号 36 : 抗 P T P R S キメラ 4 9 F 2 - 3 0 抗体重鎖アミノ酸配列	
配列番号 37 : 抗 P T P R S キメラ 4 9 F 2 - 3 0 抗体軽鎖核酸配列	
配列番号 38 : 抗 P T P R S キメラ 4 9 F 2 - 3 0 抗体軽鎖アミノ酸配列	
配列番号 39 : プライマー	
配列番号 40 : プライマー	
配列番号 41 : プライマー	
配列番号 42 : プライマー	
配列番号 73 : フォワードプライマー	10
配列番号 74 : リバースプライマー	
配列番号 75 : フォワードプライマー	
配列番号 76 : リバースプライマー	
配列番号 77 : フォワードプライマー	
配列番号 78 : リバースプライマー	
配列番号 79 : フォワードプライマー	
配列番号 80 : リバースプライマー	
配列番号 81 : フォワードプライマー	
配列番号 82 : リバースプライマー	
配列番号 83 : フォワードプライマー	20
配列番号 84 : リバースプライマー	
配列番号 85 : フォワードプライマー	
配列番号 86 : リバースプライマー	
配列番号 87 : フォワードプライマー	
配列番号 88 : リバースプライマー	
配列番号 89 : フォワードプライマー	
配列番号 90 : リバースプライマー	
配列番号 91 : 抗 P T P R S キメラ 9 H 5 - 4 抗体重鎖核酸配列	
配列番号 92 : 抗 P T P R S キメラ 9 H 5 - 4 抗体重鎖アミノ酸配列	
配列番号 93 : 抗 P T P R S キメラ 9 H 5 - 4 抗体軽鎖核酸配列	30
配列番号 94 : xx : 抗 P T P R S キメラ 9 H 5 - 4 抗体軽鎖アミノ酸配列	
配列番号 95 : 抗 P T P R S キメラ 1 3 G 5 - 5 7 抗体重鎖核酸配列	
配列番号 96 : 抗 P T P R S キメラ 1 3 G 5 - 5 7 抗体重鎖アミノ酸配列	
配列番号 97 : 抗 P T P R S キメラ 1 3 G 5 - 5 7 抗体軽鎖核酸配列	
配列番号 98 : 抗 P T P R S キメラ 1 3 G 5 - 5 7 抗体軽鎖アミノ酸配列	
配列番号 99 : 抗 P T P R S キメラ 2 2 H 8 - 8 4 抗体重鎖核酸配列	
配列番号 100 : 抗 P T P R S キメラ 2 2 H 8 - 8 4 抗体重鎖アミノ酸配列	
配列番号 101 : 抗 P T P R S キメラ 2 2 H 8 - 8 4 抗体軽鎖核酸配列	
配列番号 102 : 抗 P T P R S キメラ 2 2 H 8 - 8 4 抗体軽鎖アミノ酸配列	

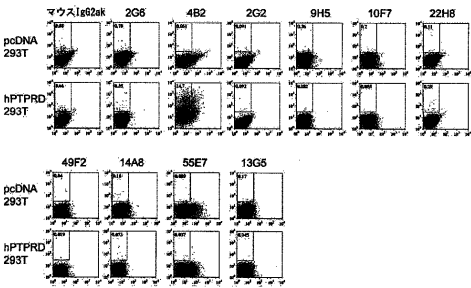
【 図 9 B 】



【 図 9 D 】

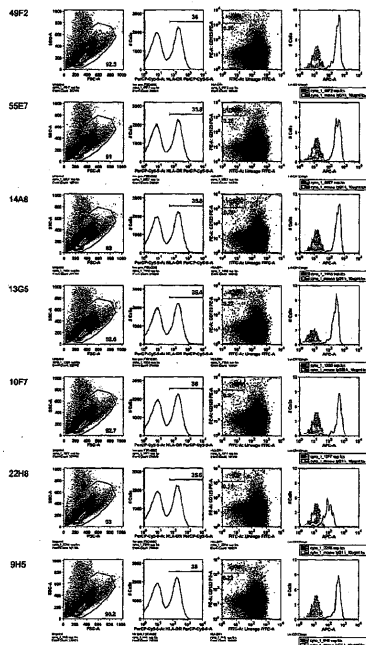


【 図 9 C 】

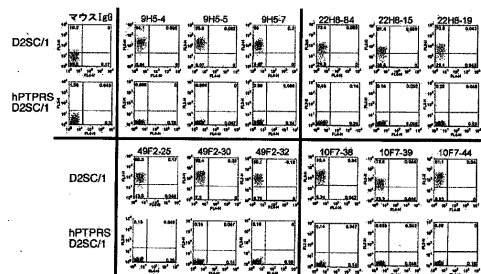


【 図 1 0 】

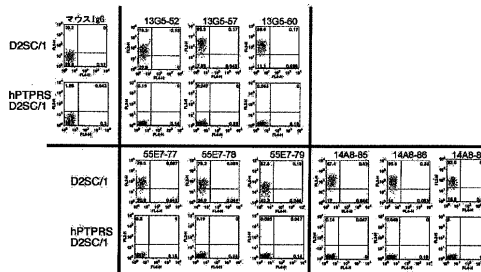
FIG. 10



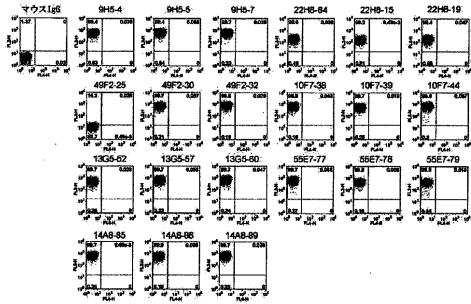
【 図 1 1 A 】



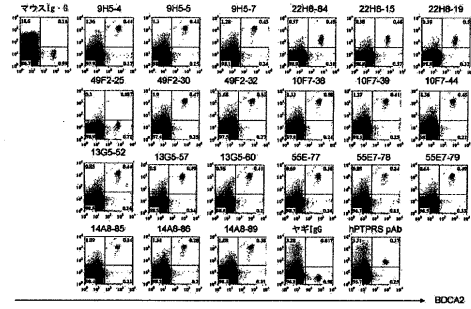
【 図 1 1 B 】



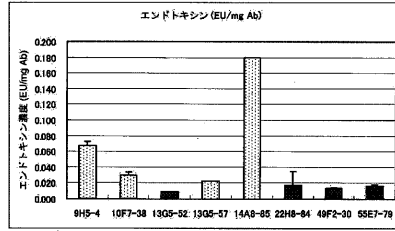
【図 1 1 C】



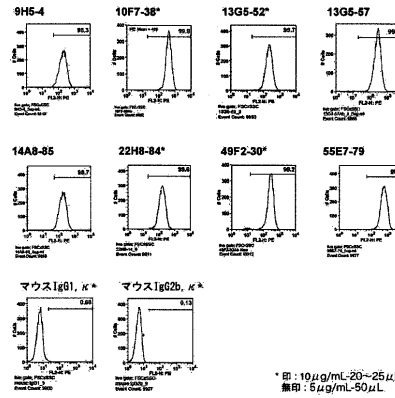
【図 1 1 D】



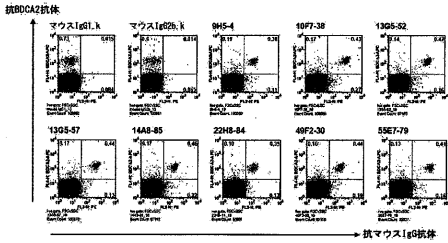
【図 1 2】



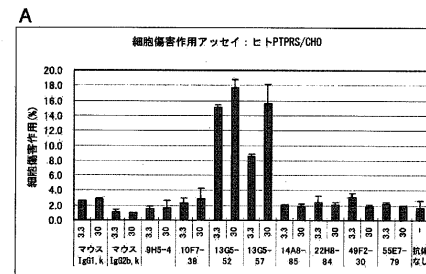
【図 1 3】



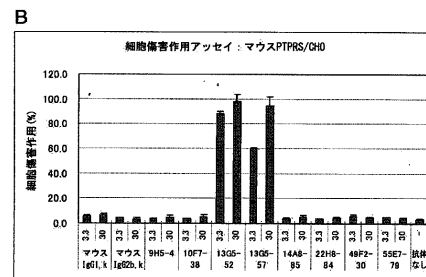
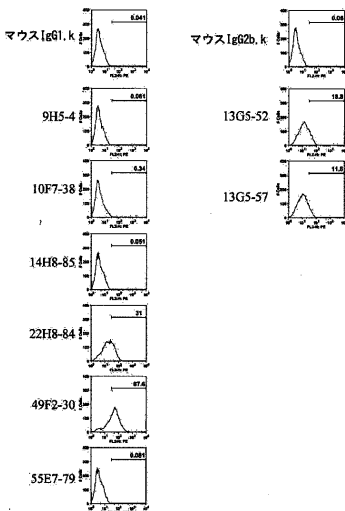
【図 1 4】



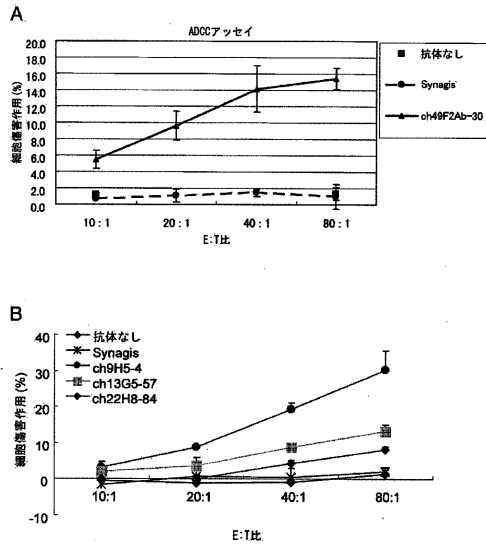
【図 1 6】



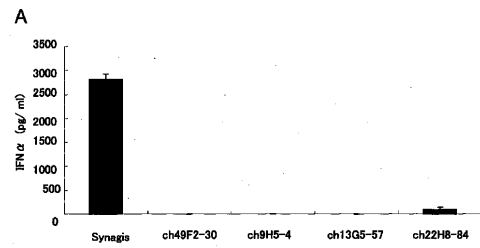
【図 1 5】



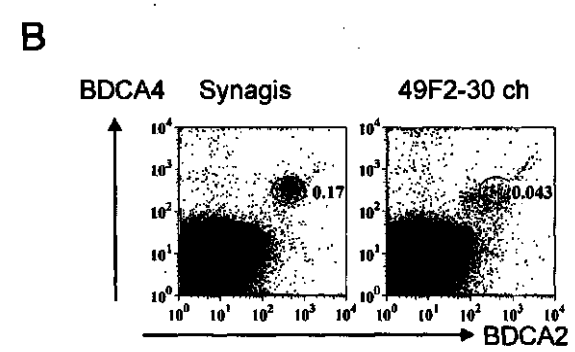
【 図 1 7 】



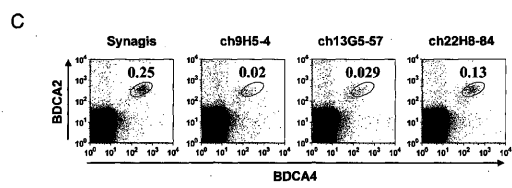
【 図 1 8 A 】



【 図 1 8 B 】



【 図 1 8 C 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/JP2012/061795

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/68 C07K16/28 ADD. A61K39/395		
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) C07K G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A A,P	WO 2010/056332 A1 (BRIGHAM & WOMENS HOSPITAL [US]; FRANK MARKUS H [US]; FRANK NATASHA Y [] 20 May 2010 (2010-05-20) page 51, line 28 page 52, line 1 ----- Abnova.com: "PTPRS monoclonal antibody (M01), clone 1H6", Online Catalogue 16 November 2011 (2011-11-16), XP002678787, Retrieved from the Internet: URL:http://www.abnova.com/Products/product s_detail.asp?Catalog_id=H00005802-M01 [retrieved on 2012-06-28] the whole document ----- -/--	1,2,4, 13,14, 18,22,23 7-12 3,5,6,17 1-23
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input checked="" 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		Date of mailing of the international search report
9 July 2012		25/07/2012
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Bumb, Peter

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/JP2012/061795

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YAN H ET AL: "A novel receptor tyrosine phosphatase-sigma that is highly expressed in the nervous system.", THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 25 NOV 1993 LNKD- PUBMED:8227050, vol. 268, no. 33, 25 November 1993 (1993-11-25), pages 24880-24886, XP002679488, ISSN: 0021-9258	15,16
Y	page 24881, right-hand column	7-12
X	DZIOONEK A ET AL: "BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction", THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS, US, vol. 194, no. 12, 17 December 2001 (2001-12-17), pages 1823-1834, XP002277387, ISSN: 0022-1007, DOI: 10.1084/JEM.194.12.1823 cited in the application	19-21
A	the whole document	17
A	DATABASE UniProt [Online] ebi; 11 January 2011 (2011-01-11), "(PTPRS HUMAN)", XP002679489, Database accession no. Q13332 the whole document	15,16
A	DATABASE UniProt [Online] EBI; 24 July 2007 (2007-07-24), "(PTPRS RAT)", XP002679490, Database accession no. Q64605 the whole document	15,16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/JP2012/061795

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010056332 A1	20-05-2010	AU 2009314556 A1	30-06-2011
		CA 2743464 A1	20-05-2010
		EP 2356446 A1	17-08-2011
		US 2011287034 A1	24-11-2011
		WO 2010056332 A1	20-05-2010

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/577 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	Y 4 H 0 4 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	G 0 1 N 33/577	B
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	P
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	U
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
C 1 2 N 5/071 (2010.01)	C 0 7 K 16/28	
C 1 2 N 5/0784 (2010.01)	C 1 2 Q 1/02	
	C 1 2 N 5/00	1 0 2
	C 1 2 N 5/00	2 0 2 A
	C 1 2 N 5/00	2 0 2 M

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, T M), EP(AL, 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, R S, SE, SI, SK, SM, 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, I D, 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, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA

(72)発明者 柴田 恭枝

東京都港区白金台4 - 7 - 4 白金台S Tビル S B I バイオテック株式会社内

(72)発明者 チョウ、ミンクウォン

東京都港区白金台4 - 7 - 4 白金台S Tビル S B I バイオテック株式会社内

(72)発明者 遠藤 まゆき

東京都港区白金台4 - 7 - 4 白金台S Tビル S B I バイオテック株式会社内

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA15 BA44 CA01 DA03 EA02 EA04 GA11 HA01
 4B063 QA01 QA18 QQ03 QQ08 QQ79 QR72 QR77 QS33 QS36
 4B064 AG27 BJ12 CA10 CA20 CC24 DA01 DA13
 4B065 AA90Y AA93X AB04 AC15 BA08 BD50 CA25 CA44 CA46
 4C085 AA14 CC02 DD63 EE01 GG02 GG03 GG05 GG06 GG08
 4H045 AA11 AA20 AA30 CA40 DA76 EA22 EA24 EA54 FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2014524733A5	公开(公告)日	2015-07-16
申请号	JP2013549652	申请日	2012-04-27
[标]申请(专利权)人(译)	SBI生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	SBI生物科技有限公司		
[标]发明人	山崎智英 ザオジン 石田晃司 柴田恭枝 チヨウミンクウオン 遠藤まゆき		
发明人	山崎 智英 ザオ、ジン 石田 晃司 柴田 恭枝 チヨウ、ミンクウオン 遠藤 まゆき		
IPC分类号	C12P21/08 C07K16/40 C12N15/09 C12N15/02 G01N33/53 G01N33/577 A61K39/395 A61P43/00 A61P37/06 C07K16/28 C12Q1/02 C12N5/10 C12N5/071 C12N5/0784		
CPC分类号	C07K16/2803 C07K16/40 G01N33/5058 G01N33/56972 A61P37/06 A61P43/00 C07K2317/24 C07K2317/33 C07K2317/732 C07K2317/734 C07K2317/76		
FI分类号	C12P21/08 C07K16/40.ZNA C12N15/00.A C12N15/00.C G01N33/53.D G01N33/53.Y G01N33/577.B A61K39/395.P A61K39/395.U A61P43/00.111 A61P43/00.105 A61P37/06 C07K16/28 C12Q1/02 C12N5/00.102 C12N5/00.202.A C12N5/00.202.M		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA15 4B024/BA44 4B024/CA01 4B024/DA03 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024 /GA11 4B024/HA01 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS33 4B063/QS36 4B064/AG27 4B064/BJ12 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064 /CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA90Y 4B065/AA93X 4B065/AB04 4B065/AC15 4B065/BA08 4B065/BD50 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA14 4C085/CC02 4C085/DD63 4C085 /EE01 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG05 4C085/GG06 4C085/GG08 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA22 4H045/EA24 4H045/EA54 4H045/FA74		
优先权	2011101752 2011-04-28 JP		
其他公开文献	JP6001557B2 JP2014524733A		

摘要(译)

一种与人受体蛋白酪氨酸磷酸酶 σ (人PTPRS) 的细胞外结构域结合的抗体, 或包含其抗原结合区的片段。

