

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02002/101046

発行日 平成16年9月24日(2004.9.24)

(43) 国際公開日 平成14年12月19日(2002.12.19)

(51) Int. Cl.⁷

C 1 2 N 15/02
 A 6 1 K 39/395
 A 6 1 P 29/00
 A 6 1 P 43/00
 C 0 7 K 16/40

F I

C 1 2 N 15/00 Z N A C
 A 6 1 K 39/395 N
 A 6 1 P 29/00 1 0 1
 A 6 1 P 43/00 1 0 5
 C 0 7 K 16/40

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 47 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2003-503796 (P2003-503796)	(71) 出願人	000001029 協和醗酵工業株式会社 東京都千代田区大手町1丁目6番1号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2002/005788	(72) 発明者	三木 一郎 静岡県駿東郡長泉町下土狩1188 協和醗酵工業株式会社 医薬総合研究所内
(22) 国際出願日	平成14年6月11日(2002.6.11)	(72) 発明者	太田 聡 東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内
(31) 優先権主張番号	特願2001-176256 (P2001-176256)	(72) 発明者	設楽 研也 東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内
(32) 優先日	平成13年6月11日(2001.6.11)	(72) 発明者	古谷 安希子 東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		
(81) 指定国	AP (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, C H, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, P T, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW		

(54) 【発明の名称】 MT4-MMP触媒ドメインと結合するモノクローナル抗体

(57) 【要約】

本発明は、天然のMT4-MMP、または可溶化MT4-MMPに対して反応するモノクローナル抗体に関する。天然のMT4-MMPの触媒ドメインを特異的かつ効率的に認識できるモノクローナル抗体およびこれを含むヒト型キメラ抗体、CDR移植抗体、一本鎖抗体、ジスルフィド安定化抗体と、これらを用いたMT4-MMP蛋白質の検出および定量方法を提供する。さらに本発明は、これらの抗体を用いた、炎症、癌などのMT4-MMPが関与する各種疾病の診断方法、診断薬および治療薬を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

MT4 - MMP 触媒ドメインと特異的に結合するモノクローナル抗体。

【請求項 2】

MT4 - MMP 触媒ドメインが、配列番号 6 で示されるアミノ酸配列の 128 ~ 296 番目からなるアミノ酸配列である、請求項 1 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 3】

モノクローナル抗体が、ハイブリドーマ KM2895、ハイブリドーマ KM2896、ハイブリドーマ KM2897 およびハイブリドーマ KM2904 からなる群から選ばれるハイブリドーマが生産するモノクローナル抗体である、請求項 1 または 2 記載のモノクローナル抗体。

10

【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ。

【請求項 5】

ハイブリドーマが、ハイブリドーマ KM2895、ハイブリドーマ KM2896、ハイブリドーマ KM2897 およびハイブリドーマ KM2904 からなる群から選ばれるハイブリドーマである、請求項 4 記載のハイブリドーマ。

【請求項 6】

モノクローナル抗体が、遺伝子組換え抗体である、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体。

20

【請求項 7】

遺伝子組換え抗体が、ヒト化抗体、抗体断片から選ばれるモノクローナル抗体である、請求項 6 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 8】

ヒト化抗体がヒト型キメラ抗体である請求項 7 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体の抗体重鎖 (H鎖) 可変領域 (V領域) および抗体軽鎖 (L鎖) V領域と、ヒト抗体の H鎖定常領域 (C領域) および L鎖 C領域とからなる請求項 8 に記載されたヒト型キメラ抗体。

30

【請求項 10】

H鎖 V領域 および L鎖 V領域のアミノ酸配列が、モノクローナル抗体 KM2895、KM2896、KM2897 および KM2904 から選ばれるモノクローナル抗体の H鎖 V領域 および L鎖 V領域のアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を有する、請求項 9 に記載のヒト型キメラ抗体。

【請求項 11】

ヒト化抗体が相補性決定領域移植抗体 (CDR 移植抗体) である請求項 7 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 12】

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体の H鎖 および L鎖の V領域相補性決定領域と、ヒト抗体の H鎖 および L鎖の C領域 および V領域フレームワーク領域とからなる請求項 11 に記載の CDR 移植抗体。

40

【請求項 13】

H鎖 V領域 および L鎖 V領域のアミノ酸配列が、モノクローナル抗体 KM2895、KM2896、KM2897 および KM2904 から選ばれるモノクローナル抗体の H鎖 V領域 および L鎖 V領域のアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を有する、請求項 12 に記載の CDR 移植抗体。

【請求項 14】

抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')₂、一本鎖抗体 およびジスルフィド安定化抗体からなる群より選ばれる抗体である請求項 7 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 15】

50

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載されたモノクローナル抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域を含む請求項 1 4 記載の一本鎖抗体。

【請求項 1 6】

一本鎖抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域のアミノ酸配列が、モノクローナル抗体 KM 2 8 9 5、KM 2 8 9 6、KM 2 8 9 7 および KM 2 9 0 4 から選ばれるモノクローナル抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域のアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を有する、請求項 1 5 記載の一本鎖抗体。

【請求項 1 7】

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域を含む請求項 1 4 記載のジスルフィド安定化抗体。

10

【請求項 1 8】

ジスルフィド安定化抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域のアミノ酸配列が、モノクローナル抗体 KM 2 8 9 5、KM 2 8 9 6、KM 2 8 9 7 および KM 2 9 0 4 から選ばれるモノクローナル抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域のアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を有する、請求項 1 7 記載のジスルフィド安定化抗体。

【請求項 1 9】

モノクローナル抗体が、薬剤と化学的または遺伝子工学的に結合させた融合抗体である、請求項 1 ~ 3、6 ~ 1 8 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 2 0】

請求項 1 ~ 3、6 ~ 1 9 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体を用いて MT 4 - M 20
MP 触媒サブユニットを免疫学的に検出する方法。

20

【請求項 2 1】

免疫学的に検出する方法が、免疫学的測定法、ウェスタンブロッティング、免疫組織染色法、免疫細胞染色法およびドットブロッティングからなる群から選ばれる方法である、請求項 2 0 記載の方法。

【請求項 2 2】

請求項 1 ~ 3、6 ~ 1 9 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体を用いることを特徴とする、MT 4 - MMP 触媒サブユニットを免疫学的に定量する方法。

【請求項 2 3】

免疫学的に定量する方法が、免疫学的測定法、ウェスタンブロッティング、免疫組織染色法、免疫細胞染色法およびドットブロッティングからなる群から選ばれる方法である、請求項 2 2 記載の方法。

30

【請求項 2 4】

請求項 1 ~ 3、6 ~ 1 9 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体を用いることを特徴とする、MT 4 - MMP が関与する疾患の診断方法。

【請求項 2 5】

MT 4 - MMP が関与する疾患が、慢性関節リウマチである請求項 2 4 記載の診断方法。

【請求項 2 6】

請求項 1 ~ 3、6 ~ 1 9 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体を有効成分として含む、MT 4 - MMP が関与する疾患の診断薬。

40

【請求項 2 7】

MT 4 - MMP が関与する疾患が、慢性関節リウマチである請求項 2 6 記載の診断薬。

【請求項 2 8】

請求項 1 ~ 3、6 ~ 1 9 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体を有効成分として含む、MT 4 - MMP が関与する疾患の治療薬。

【請求項 2 9】

MT 4 - MMP が関与する疾患が、慢性関節リウマチである請求項 2 8 記載の治療薬。

【請求項 3 0】

請求項 1 ~ 3、6 ~ 1 9 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体を含む試薬。

【請求項 3 1】

50

請求項 30 記載の試薬を含む MT4 - MMP が関与する疾患を検出するキット。

【請求項 32】

MT4 - MMP が関与する疾患が慢性関節リウマチである請求項 31 記載のキット。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、MT4 - MMP 触媒ドメインに特異的に反応するモノクローナル抗体に関する。さらに、本発明は、該モノクローナル抗体を用いた、炎症、癌などの MT4 - MMP が関与する疾患の診断方法、診断薬、治療薬、試薬およびキットに関する。

背景技術

マトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinase; MMP) は結合組織性細胞、上皮細胞、白血球、癌細胞等の非常に多岐にわたる細胞から生産され、細胞外マトリックスの構成蛋白質を分解する酵素である。MMP は生理的条件下で発生、分化、組織形成、組織修復等の生命維持に重要な現象に関わっていると共に、関節炎、糸球体腎炎等の組織破壊を伴う様々な疾患や、癌細胞の転移浸潤にも関与していると考えられている。MMP は活性中心部に Zn^{2+} を有する、非活性な前駆体プロペプチドとして生産され、後に細胞外で活性化される等の特徴を示すプロテアーゼ群であり、これまでに 20 種を超す MMP が報告されている [J. Clin. Oncol., 18, 1135 - 1149 (2000)]。 10

膜結合型マトリックスメタロプロテアーゼ (membrane type - matrix metalloproteinase; MT - MMP) は最近相次いで発見された MMP 遺伝子ファミリーのメンバーであり、これまでに 6 種 (MT1 - MMP、MT2 - MMP、MT3 - MMP、MT4 - MMP、MT5 - MMP、MT6 - MMP) の存在が報告されている。いずれも MMP に共通のプロペプチドドメイン、活性ドメイン、ヘモペキシンドメイン構造を持ち、さらに、C 末端側に MT - MMP 以外の MMP にはない細胞膜貫通ドメインと予想される疎水性領域を有する。機能については不明な点が多いが、MT1 - MMP (MMP - 14)、MT2 - MMP (MMP - 15)、MT3 - MMP (MMP - 16)、MT5 - MMP (MMP - 24) は比較的活性ドメインのアミノ酸配列でのホモロジーが高く、また、いずれも前駆体 MMP - 2 を成熟体 MMP - 2 に変換する活性を有することが報告されており [Eur. J. Biochem., 231, 602 - 608 (1995), J. Biol. Chem., 274, 8925 - 8932 (1999)] 30、MMP カスケードの上流に位置することも考えられている。一方、MT4 - MMP (MMP - 17)、MT6 - MMP (MMP - 25) はアミノ酸配列での高い相同性を有するが、MT1 - MMP、MT2 - MMP、MT3 - MMP、MT5 - MMP とは相同性が低い。したがって、MT4 - MMP (MMP - 17)、MT6 - MMP (MMP - 25) は前駆体 MMP - 2 の活性化を引き起こさないと考えられている [J. Biol. Chem., 275, 14046 - 14055 (2000), Cancer Res., 60, 877 - 882 (2000)]。また、MT4 - MMP および MT6 - MMP は膜貫通ドメインと予想された疎水性領域を持つにもかかわらず、MT1 - MMP、MT2 - MMP、MT3 - MMP、MT5 - MMP に認められる 20 ~ 23 アミノ酸から構成される細胞質内ドメイン構造を欠いており、glycosyl - phosphatidyl inositol (GPI) アンカー型の存在様式を持つことも報告されている。したがって、MT4 - MMP および MT6 - MMP は公知の MMP または MT - MMP とはアミノ酸配列だけではなく、存在様式も異なっていると考えられる [J. Biol. Chem., 274, 34260 - 34266 (1999), F E B S L e t t . , 480, 142 - 146 (2000)]。 40

MT4 - MMP はこれまでにノーザンブロットィングによる mRNA の発現解析により、ヒトでは白血球に多く発現が認められるが、他の組織では脳、結腸、卵巣、精巣に局限して発現していることが明らかになった [Cancer Res., 56, 944 - 949 (1996)]。また、様々な腫瘍細胞株、正常繊維芽細胞株にも mRNA の発現が認められることが報告されており [Matrix Biol., 18, 145 - 148 (19 50

99)、W000/18805]、他のMMPと同様に組織破壊を伴う様々な疾患や、癌細胞の転移浸潤にも関与していると考えられている。

細胞や組織における特定の蛋白質の機能や発現を調べる手段として、抗原特異性が高くアフニティの高い抗体は蛋白質の機能解析においてきわめて重要である。MT4-MMPに対する抗体としては、配列番号6に記載されたアミノ酸配列の335番目から526番目に相当するヘモペキシンドメインを含む321番目から550番目のアミノ酸配列を免疫原として作製されたモノクローナル抗体が知られている[W000/18805]。該抗体は、ウェスタンブロッティングなどの蛋白質変性条件下での検出、MT4-MMPトランスフェクタントのように大量に蛋白質を発現している細胞への検出には有用である。しかしながら、該抗体は通常の細胞株あるいは白血球上に発現している天然のMT4-MMP、または可溶化MT4-MMPに対して反応性が非常に弱い。

10

発明の開示

本発明の目的は、細胞株あるいは白血球上に発現している天然のMT4-MMP、組織や血清中に存在する可溶化MT4-MMPに対して反応性を有するモノクローナル抗体を提供することにある。本発明のモノクローナル抗体は、MT4-MMPが関与する疾患の診断または治療に有用である。

本発明は、以下の(1)~(32)に関する。

(1) MT4-MMP触媒ドメインと特異的に結合するモノクローナル抗体。

(2) MT4-MMP触媒ドメインが、配列番号6で示されるアミノ酸配列の128~296番目からなるアミノ酸配列である、上記(1)記載のモノクローナル抗体。

20

(3) モノクローナル抗体が、ハイブリドーマKM2895、ハイブリドーマKM2896、ハイブリドーマKM2897およびハイブリドーマKM2904からなる群から選ばれるハイブリドーマが生産するモノクローナル抗体である、上記(1)または(2)記載のモノクローナル抗体。

(4) 上記(1)~(3)のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ。

(5) ハイブリドーマが、ハイブリドーマKM2895、ハイブリドーマKM2896、ハイブリドーマKM2897およびハイブリドーマKM2904からなる群から選ばれるハイブリドーマである、上記(4)記載のハイブリドーマ。

(6) モノクローナル抗体が、遺伝子組換え抗体である、上記(1)~(3)のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体。

30

(7) 遺伝子組換え抗体が、ヒト化抗体、抗体断片から選ばれるモノクローナル抗体である、上記(6)に記載のモノクローナル抗体。

(8) ヒト化抗体がヒト型キメラ抗体である上記(7)に記載のモノクローナル抗体。

(9) 上記(1)~(3)のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体の抗体重鎖(H鎖)可変領域(V領域)および抗体軽鎖(L鎖)V領域と、ヒト抗体のH鎖定常領域(C領域)およびL鎖C領域とからなる上記(8)に記載のヒト型キメラ抗体。

(10) H鎖V領域およびL鎖V領域のアミノ酸配列が、モノクローナル抗体KM2895、KM2896、KM2897およびKM2904から選ばれるモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を有する、上記(9)に記載のヒト型キメラ抗体。

40

(11) ヒト化抗体が相補性決定領域移植抗体(CDR移植抗体)である上記(7)に記載のモノクローナル抗体。

(12) 上記(1)~(3)のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体のH鎖およびL鎖のV領域相補性決定領域と、ヒト抗体のH鎖およびL鎖のC領域およびV領域フレームワーク領域とからなる上記(11)に記載のCDR移植抗体。

(13) H鎖V領域およびL鎖V領域のアミノ酸配列が、モノクローナル抗体KM2895、KM2896、KM2897およびKM2904から選ばれるモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を有する、上記(12)に記載のCDR移植抗体。

50

(14) 抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')₂、一本鎖抗体およびジスルフィド安定化抗体からなる群より選ばれる抗体である上記(7)に記載のモノクローナル抗体。

(15) 上記(1)~(3)のいずれか1項に記載されたモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域を含む上記(14)記載の一本鎖抗体。

(16) 一本鎖抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のアミノ酸配列が、モノクローナル抗体KM2895、KM2896、KM2897およびKM2904から選ばれるモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を有する、上記(15)記載の一本鎖抗体。

(17) 上記(1)~(3)のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域を含む上記(14)記載のジスルフィド安定化抗体。 10

(18) ジスルフィド安定化抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のアミノ酸配列が、モノクローナル抗体KM2895、KM2896、KM2897およびKM2904から選ばれるモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を有する、上記(17)記載のジスルフィド安定化抗体。

(19) モノクローナル抗体が、薬剤と化学的または遺伝子工学的に結合させた融合抗体である、上記(1)~(3)、(6)~(18)のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体。

(20) 上記(1)~(3)、(6)~(19)のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体を用いてMT4-MMP触媒サブユニットを免疫学的に検出する方法。 20

(21) 免疫学的に検出する方法が、免疫学的測定法、ウェスタンブロッティング、免疫組織染色法、免疫細胞染色法およびドットブロッティングからなる群から選ばれる方法である、上記(20)記載の方法。

(22) 上記(1)~(3)、(6)~(19)のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体を用いることを特徴とする、MT4-MMP触媒サブユニットを免疫学的に定量する方法。

(23) 免疫学的に定量する方法が、免疫学的測定法、ウェスタンブロッティング、免疫組織染色法、免疫細胞染色法およびドットブロッティングからなる群から選ばれる方法である、上記(22)記載の方法。

(24) 上記(1)~(3)、(6)~(19)のいずれか1項に記載されたモノクローナル抗体を用いることを特徴とする、MT4-MMPが関与する疾患の診断方法。 30

(25) MT4-MMPが関与する疾患が、慢性関節リウマチである上記(24)記載の診断方法。

(26) 上記(1)~(3)、(6)~(19)のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体を有効成分として含む、MT4-MMPが関与する疾患の診断薬。

(27) MT4-MMPが関与する疾患が、慢性関節リウマチである上記(26)記載の診断薬。

(28) 上記(1)~(3)、(6)~(19)のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体を有効成分として含む、MT4-MMPが関与する疾患の治療薬。

(29) MT4-MMPが関与する疾患が、慢性関節リウマチである上記(28)記載の治療薬。 40

(30) 上記(1)~(3)、(6)~(19)のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体を含む試薬。

(31) 上記(30)記載の試薬を含むMT4-MMPが関与する疾患を検出するキット。

(32) MT4-MMPが関与する疾患が慢性関節リウマチである上記(31)記載のキット。

本発明のMT4-MMP触媒ドメインと特異的に結合するモノクローナル抗体としては、MT4-MMP触媒ドメインと特異的に結合するモノクローナル抗体であればいかなるものでもよい。好ましくは、配列番号6で示されるMT4-MMPのアミノ酸配列の128 50

～ 296番目からなるMT4-MMP触媒ドメインと特異的に結合するモノクローナル抗体があげられる。

モノクローナル抗体としては、ハイブリドーマにより生産される抗体、および抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した形質転換体により生産される遺伝子組換え抗体をあげることができる。

すなわち、MT4-MMP触媒ドメイン蛋白質、あるいはMT4-MMP触媒ドメイン蛋白質のアミノ酸配列[W000/18805]に基づいて化学合成したペプチドなどを抗原として調製し、該抗原を免疫した動物より抗原特異性をもつ抗体生産細胞を誘導し、さらに、それと骨髄腫細胞とを融合させてハイブリドーマを調製し、該ハイブリドーマを培養するか、あるいは該ハイブリドーマ細胞を動物に投与して該動物を腹水癌化させ、該培養液または腹水を分離、精製することにより抗MT4-MMP触媒ドメインモノクローナル抗体を取得することができる。

10

本発明の遺伝子組換え抗体は、上記本発明のモノクローナル抗体を遺伝子組換え技術を用いて改変したものである。遺伝子組換え抗体としては、ヒト化抗体および抗体断片など、遺伝子組換えにより製造される抗体を包含する。遺伝子組換え抗体において、モノクローナル抗体の特徴を有し、抗原性が低く、血中半減期が延長されたものは、治療薬として好ましい。本発明におけるヒト化抗体とは、ヒト型キメラ抗体およびヒト型CDR(Complementary Determining Region; 相補性決定領域; 以下、CDRと記す)移植抗体を包含する。

本発明の抗体断片は、MT4-MMP触媒ドメインに特異的に結合するFab(Fragment of antigen bindingの略)、Fab'、F(ab')₂、一本鎖抗体(single chain Fv; 以下、ScFvと称す)およびジスルフィド安定化抗体(disulfide stabilized Fv; 以下、dsFvと称す)を包含する。

20

ヒト型キメラ抗体は、ヒト以外の動物の抗体可変領域重鎖(以下、VHと称す)および可変領域軽鎖(以下、VLと称す)とヒト抗体の定常領域重鎖(以下、CHと称す)およびヒト抗体の定常領域軽鎖(以下、CLと称す)とからなる抗体を意味する。

本発明のヒト型キメラ抗体は、MT4-MMP触媒ドメインに特異的に結合するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマより、VHおよびVLをコードするcDNAを取得し、ヒト抗体CHおよびヒト抗体CLをコードする遺伝子を有する宿主細胞用発現ベクターに、該cDNAをそれぞれ挿入してヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築し、該ベクターを宿主細胞へ導入し、該宿主細胞に本発明のヒト型キメラ抗体を発現させることにより、製造することができる。

30

本発明のヒト型キメラ抗体のC領域の構造としては、いずれのイムノグロブリン(Ig)クラスに属するものでもよいが、IgG型、さらにはIgG型に属するIgG1、IgG2、IgG3、IgG4等のイムノグロブリンのC領域が好ましい。

ヒト型CDR移植抗体は、ヒト抗体のVHおよびVLのCDRをヒト以外の動物の抗体のCDR配列でそれぞれ置換した抗体を意味する。

本発明のヒト型CDR移植抗体は、MT4-MMP触媒ドメインに特異的に結合する、ヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDR配列で任意のヒト抗体のVHおよびVLのCDR配列をそれぞれ置換したV領域をコードするcDNAを構築し、ヒト抗体のCHおよびヒト抗体のCLをコードする遺伝子を有する宿主細胞用発現ベクターにcDNAをそれぞれ挿入してヒト型CDR移植抗体発現ベクターを構築し、該ベクターを宿主細胞へ導入し、該宿主細胞に本発明のヒト型CDR移植抗体を発現させることにより製造することができる。

40

本発明のヒト型CDR移植抗体のC領域の構造としては、いずれのイムノグロブリン(Ig)クラスに属するものでもよいが、IgG型、さらにはIgG型に属するIgG1、IgG2、IgG3、IgG4等のイムノグロブリンのC領域が好ましい。

Fabは、IgGのヒンジ領域で2本のH鎖を架橋している2つのジスルフィド結合の上部のペプチド部分を酵素パピインで分解して得られた、H鎖のN末端側約半分とL鎖全体

50

で構成された、分子量約5万の抗原結合活性を有するフラグメントである。

本発明のF a bは、M T 4 - M M P触媒ドメインと特異的に結合する抗体をパピイン処理して得ることができる。または、該抗体のF a b断片をコードするD N Aを宿主細胞用発現ベクターに挿入し、該ベクターを宿主細胞へ導入し、該宿主細胞に本発明のF a bを発現させることにより製造することができる。

F a b 'は、上記F (a b ')₂のヒンジ間のジスルフィド結合を切断した分子量約5万の抗原結合活性を有するフラグメントである。

本発明のF a b 'は、M T 4 - M M P触媒ドメインと特異的に結合する抗体を還元剤ジチオスレイトール処理して得ることができる。または、該抗体のF a b '断片をコードするD N Aを宿主細胞用発現ベクターに挿入し、該ベクターを宿主細胞へ導入し、該宿主細胞に本発明のF a b 'を発現させることにより製造することができる。

10

F (a b ')₂は、I g Gのヒンジ領域の2個のジスルフィド結合の下部を酵素トリプシンで分解して得られた、2つのF a b領域がヒンジ部分で結合して構成された、分子量約10万の抗原結合活性を有するフラグメントである。

本発明のF (a b ')₂は、M T 4 - M M P触媒ドメインと特異的に結合する抗体をトリプシン処理して得ることができる。または、該抗体のF (a b ')₂断片をコードするD N Aを宿主細胞用発現ベクターに挿入し、該ベクターを宿主細胞へ導入し、該宿主細胞に本発明のF (a b ')₂を発現させることにより製造することができる。

一本鎖抗体(s c F v)は、一本のV Hと一本のV Lとを適当なペプチドリンカー(以下、Pと称す)を用いて連結した、V H - P - V LないしはV L - P - V Hポリペプチドを示す。本発明のs c F vに含まれるV HおよびV Lは、本発明のモノクローナル抗体あるいはヒト型C D R移植抗体のいずれをも用いることができる。

20

本発明のs c F vは、M T 4 - M M P触媒ドメインと特異的に結合する抗体を生産するハイブリドーマまたは形質転換体よりV HおよびV Lをコードするc D N Aを取得し、一本鎖抗体発現ベクターを構築したのち該c D N Aを挿入し、該発現ベクターを宿主細胞へ導入して発現させることにより、製造することができる。

ジスルフィド安定化抗体(d s F v)は、V HおよびV L中のそれぞれ1アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドをジスルフィド結合を介して結合させたものをいう。システイン残基に置換するアミノ酸残基はR e i t e rらにより示された方法[プロテイン・エンジニアリング(P r o t e i n E n g i n e e r i n g) , 7 , 6 9 7 (1 9 9 4)]に従って、抗体の立体構造予測に基づいて選択することができる。本発明のジスルフィド安定化抗体に含まれるV HあるいはV Lはモノクローナル抗体あるいはヒト型C D R移植抗体のいずれをも用いることができる。

30

本発明のジスルフィド安定化抗体は、M T 4 - M M P触媒ドメインと特異的に結合する抗体を生産するハイブリドーマまたは形質転換体よりV HおよびV Lをコードするc D N Aを取得し、該c D N Aを適当な発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを宿主細胞へ導入し発現させることにより、製造することができる。

融合抗体は、上述の抗体に薬剤を化学的あるいは遺伝子工学的に結合させたものをいう。薬剤としては、放射線同位元素、蛋白質、低分子などいかなるものでもよい。融合抗体を診断薬として使用する場合は、免疫学的測定法で用いられる標識体があげられる。標識体としては、アルカリフォスファターゼ、ペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼなどの酵素、アクリジニウムエステル、ロフィンなどの発光物質、F I T C、R I T Cなどの蛍光物質などがあげられる。

40

本発明の融合抗体は、M T 4 - M M P触媒ドメインと特異的に結合する抗体を薬剤と化学的に結合させることにより製造することができる。また、薬剤が蛋白質であるときの融合抗体については、抗体をコードするc D N Aに蛋白質をコードするc D N Aを連結させ、該c D N Aを適当な発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを宿主細胞に導入して発現させることにより製造することができる。

以下に、本発明をさらに詳細に説明する。

1. 抗M T 4 - M M P (もしくはM M P - 1 7と表記する) 触媒ドメインモノクローナル

50

抗体の作製方法

(1) 抗原の調製

抗原としては、MT4-MMP触媒ドメインを細胞内に発現した細胞あるいはその画分、またはMT4-MMP触媒ドメイン蛋白質もしくはMT4-MMP触媒ドメインの部分蛋白質あるいは該蛋白質と抗体のFc部分との融合蛋白質などがあげられる。

MT4-MMP触媒ドメインを発現した細胞としては、U937 (human histiocytic lymphoma)、THP-1 (human monocyte)、Jurkat (human acute T cell leukemia) などをあげることができる [WO00/18805]。該細胞をそのまま抗原とすることもできるが、後述する通常の酵素の分離、精製法を用いて該細胞から分画したMT4-MMP触媒ドメインを抗原とすることもできる。

10

さらに、上述の細胞から、遺伝子工学的手法を用いて、MT4-MMP触媒ドメインをコードするDNAを取得し、MT4-MMP触媒ドメイン蛋白質、MT4-MMP触媒ドメイン部分蛋白質、あるいは該蛋白質と抗体のFc部分との融合蛋白質などを発現させて抗原とすることもできる。以下にその方法を述べる。

MT4-MMP触媒ドメインをコードするDNAを取得するために、WO00/18805に記載されたcDNA、あるいは上述したMT4-MMP触媒ドメインを発現した細胞より、常法 [モレキュラー・クローニング第2版 (Molecular Cloning 2nd edition, Cold Spring Harbor Lab. Press New York (1989); 以下、モレキュラー・クローニング第2版と略す) やカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、サブルメント1~38 (Current Protocols in Molecular Biology Supplement 1-38; 以下、カレント・プロトコールズと略す)] によりcDNAライブラリーを作製する。

20

すなわち、mRNAを抽出し、該mRNAよりcDNAを合成する。得られたcDNAをクローニングベクターに組み込み宿主細胞に導入することによりcDNAライブラリーを作製する。該ライブラリーより目的とするcDNAを含有する形質転換体を選択することによりMT4-MMP触媒ドメインをコードするDNAを取得することができる。

MT4-MMP触媒ドメインを発現した細胞から全RNAを調製する方法としては、グアニジン/セシウムクロライド法やグアニジンチオシアネート法 [Methods in Enzymol., 154, 3 (1987)] などがあげられる。また、全RNAからmRNAを調製する方法としては、オリゴdTセルロースなどを用いたカラム法またはバッチ法などがあげられる。また、ファーストラック・mRNA・アイソレーション・キット (インビトロジェン社)、クイック・プレップ・mRNA・ピュリフィケーション・キット (ファルマシア社) などのキットを用いてmRNAを調製することもできる。

30

上述で得られたmRNAからcDNAを合成する方法としては、オカヤマバーグ法 [Mol. Cell. Biol., 2, 161 (1982)] やグブラーホフマン法 [Gene, 25, 263 (1983)] 等があげられる。また、スーパースク립ト・プラスミド・システム・フォー・cDNA・シンセシス・アンド・プラスミド・クローニング (キブコBR社)、ザップ-cDNA・シンセシス・キット (ストラタジーン社) などのキットを用いてcDNAを合成することもできる。

40

cDNAを組み込むためのクローニングベクターとしては、宿主細胞内で自律複製可能で該cDNAを安定保持できるものであれば、ファージベクター、プラスミドベクターなどいずれでもよい。具体的には、ZAP Express [ストラタジーン社、Strategies, 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK (+) [Nucleic Acids Research, 17, 9494 (1989)]、zap II (ストラタジーン社)、gt10、gt11 [DNA Cloning, A Practical Approach, 1, 49 (1985)]、Triplex (クローンテック社)、EXCell (ファルマシア社)、pT7T3 18U (ファルマシア社)、pcD2 [Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983)]、

50

pUC18 [Gene, 33, 103 (1985)], pAMo [J. Biol. Chem., 268, 22782 (1993)], 別名 pAMoPRC3Sc (特開平05-336963)]等をあげることができる。

宿主微生物としては、大腸菌に属する微生物であればいずれでも用いることができる。具体的には、Escherichia coli XLI-Blue MRF' [ストラタジーン社, Strategies, 5, 81 (1992)], Escherichia coli C600 [Genetics, 39, 440 (1954)], Escherichia coli YIO88 [Science, 222, 778 (1983)], Escherichia coli YIO90 [Science, 222, 778 (1983)], Escherichia coli NM522 [J. Mol. Biol., 48, 427-448 (1981)], JM105 [Gene, 38, 275 (1985)], Escherichia coli SOLRTM Strain [ストラタジーン社より市販]および Escherichia coli LE392 (モレキュラー・クロニング第2版)等が用いられる。

cDNAを上述のクロニングベクターに組み込み、該クロニングベクターを宿主細胞に導入することによりcDNAライブラリーを作製する。

該クロニングベクターがプラスミドの場合には、エレクトロポレーション法あるいはカルシウムクロライド法などにより宿主細胞に導入する。該クロニングベクターがファージの場合には、インビトロパッケージング法などにより宿主細胞に導入する。

上述で取得されたcDNAライブラリーから、MT4-MMP触媒ドメインをコードするDNAを含む形質転換株については、例えばW000/18805に掲載されたMT4-MMP触媒ドメインをコードするDNAの塩基配列を基にプローブを作製して、蛍光物質、放射線、酵素などで該プローブをラベル化し、ブランクハイブリダイゼーション、コロニーハイブリダイゼーション、サザンハイブリダイゼーションなどを行うことにより、ハイブリダイズする形質転換株を選択することができる。

上述で取得されたMT4-MMP触媒ドメインをコードする全長あるいはその部分断片cDNAを適当なベクターのプロモーター下流に挿入した組み換え体ベクターを造成し、それを宿主細胞に導入することにより得られたMT4-MMP触媒ドメイン発現細胞を、適当な培地中で培養することにより細胞内あるいは培養上清中にMT4-MMP触媒ドメインの全長あるいは部分断片をそのままあるいは融合蛋白質として生産することができる。

宿主としては、細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞など、目的とする遺伝子を発現できるものであれば、いずれでもよい。細菌としては、エシェリヒア・コリ (Escherichia coli)、バチルス・ズブチリス (Bacillus subtilis)等のエシェリヒア属、バチルス属等の細菌が例示される。酵母としては、サッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae)、シゾサッカロミセス・ポンベ (Schizosaccharomyces pombe)等が例示される。動物細胞としては、ヒトの細胞であるナマルバ細胞、サルの細胞であるCOS細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞等が例示される。昆虫細胞としては、Sf9、Sf21 (ファーマンジェン社)、High Five (インビトロジェン社)等が例示される。

本発明のDNAを導入するベクターとしては、該DNAを組み込むことができ、宿主細胞で発現できるものであればいかなるベクターでも用いることができる。細菌、例えばエシェリヒア・コリ (Escherichia coli)を宿主として用いる場合の発現ベクターとしては、プロモーター、リボゾーム結合配列、本発明のDNA、転写終結配列、場合によってはプロモーターの制御配列より構成されているのが好ましいが、例えば、市販のpGEX (ファルマシア社)、pETシステム (ノバジェン社)などが例示される。細菌への組換えベクターの導入方法としては、細菌にDNAを導入する方法であれば、例えば、カルシウムイオンを用いる方法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 69, 211 (1972)], プロトプラスト法 (特開昭63-248394)等、いずれの方法も用いられる。酵母を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例

10

20

30

40

50

え、YEp13 (ATCC37115)、YEp24 (ATCC37051)、Ycp50 (ATCC37419)等が用いられる。

酵母への組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であれば、例えば、エレクトロポレーション法 [Methods. Enzymol., 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84, 1929 (1978)]、酢酸リチウム法 [J. Bacteriol., 153, 163 (1983)]等、いずれの方法も用いられる。

動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、pAGE107 [特開平3-22979; Cytotechnology, 3, 133 (1990)], pAGE103 [J. Biochem., 101, 1307 (1987)]等が用いられる

10

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいかなるものを用いてもよいが、例えば、サイトメガロウイルス (CMV) のIE (immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40あるいはメタロチオネインのプロモーター等があげられる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターとともに用いてもよい。

動物細胞への組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であれば、例えば、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84, 7413 (1987)]等

20

、いずれの方法も用いられる。
昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばカレント・プロトコールズ (サプリメント1~34)、バキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ、ア・ラボラトリー・マニュアル (Baculovirus expression vectors, A laboratory manual)等に記載された方法によって、蛋白質を発現することができる。すなわち、以下に述べる組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得たのち、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、蛋白質発現昆虫細胞を取得する。

遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBac111 (ともにインビトロジェン社)等が用いられる。

30

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフア・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus)などが用いられる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84, 7413 (1987)]等が用いられる。

また、ファーミンジェン社バキュロゴールドスターターキットなどを用いて組み換えバキュロウイルスを作製したのち、前述したSf9、Sf21あるいはHigh Five等の昆虫細胞に該組み換えウイルスを感染させることにより蛋白質を生産させることもできる [Bio/Technology, 6, 47 (1988)]。

40

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、分泌生産、融合蛋白質発現等が開発されており、いずれの方法も用いることができる。例えば、モレキュラー・クローニング第2版に記載されている方法に準じて行うことができる。

融合させる蛋白質としては、
- ガラクトシダーゼ、プロテインA、プロテインAのIgG結合領域、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ、ポリ(Arg)、ポリ(Glu)、プロテインG、マルトース結合蛋白質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、ポリヒスチジン鎖 (His-tag)、Sペプチド、DNA結合蛋白質ドメイン、Tac抗原、チオレドキシン、グリーン・フルオレッセント・プロテイン、および任意の

50

抗体のエピトープなどがあげられる [山川彰夫 実験医学, 13, 469 - 474 (1995)]。

以上のようにして得られる形質転換体を培地に培養し、培養物中にMT4-MMP触媒ドメインの全長あるいは部分断片をそのままあるいは融合蛋白質を生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、MT4-MMP触媒ドメインの全長あるいは部分断片をそのままあるいは融合蛋白質として製造することができる。

本発明の形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行われる。

大腸菌あるいは酵母等の微生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含み、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい (モレキュラー・クローニング第2版)。培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養などの好氣的条件下、15~40℃で16~96時間行う。培養期間中、pHは3.0~9.0に保持する。pHの調整は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。培養中は必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI1640培地、EagleのMEM培地またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等が用いられる。培養は、通常5%CO₂存在下、35~37℃で3~7日間行い、培養中は必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地 [ファーマンジェン (Pharmingen) 社]、Sf900ISFM [ライフテクノロジー (Life Technologies) 社]、ExCell11400、ExCell11405 [いずれもJRHバイオサイエンス (JRH Biosciences) 社] 等が用いられる。培養は、25~30℃で1~4日間行い、培養中は必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

上記において、動物細胞および昆虫細胞の培地に血清を添加していない培地で培養が可能な場合には、MT4-MMP触媒ドメインの全長あるいは部分断片をそのままあるいは融合蛋白質の精製が容易になるため、血清無添加の培地を用いることが好ましい。

MT4-MMP触媒ドメインの全長あるいは部分断片をそのままあるいは融合蛋白質として宿主細胞内に蓄積された場合には、培養終了後、細胞を遠心分離し、水系緩衝液にけん濁後、超音波法、フレンチプレス法などにより細胞を破砕し、その遠心分離上清に該蛋白質を回収する。

さらに、細胞内に不溶体を形成した場合には、不溶体を蛋白質変性剤で可溶化後、蛋白質変性剤を含まないあるいは蛋白質変性剤の濃度が蛋白質が変性しない程度に希薄な溶液に希釈、或いは透析し、蛋白質の立体構造を形成させることができる。

MT4-MMP触媒ドメインの全長あるいは部分断片をそのままあるいは融合蛋白質として細胞外に分泌された場合には、培養上清中に発現蛋白質を回収することができる。単離精製については、溶媒抽出、有機溶媒による分別沈殿、塩析、透析、遠心分離、限外ろ過、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、結晶化、電気泳動などの分離操作を単独あるいは組み合わせて行うことができる。

あるいは、部分配列を有するポリペプチドは、5~30残基の蛋白質部分配列が選択される。天然の構造を有する該蛋白質を認識する抗体を取得するためには、立体構造上で蛋白質表面に存在する部分配列を抗原ペプチドとして選択する。立体構造上で蛋白質表面に存在する部分配列の予測方法としては、Genetyx Macなど市販の蛋白質配列解析ソフトなどがあげられる。一般的に親水性の低い部分は立体構造上蛋白質の内部に存在する場合が多く、親水性の高い部分は蛋白質表面に存在する場合が多い。また、蛋白質のN末端、C末端は蛋白質表面に存在する場合が多い。しかしながら、このように選択した部

10

20

30

40

50

分ペプチドが目的通りの抗体を確立する抗原となるとは限らない。

部分ペプチドを、後述するキャリア蛋白質と架橋させるために、部分ペプチドの末端にシステインを付加する。蛋白質の内部配列を選択した場合には、必要に応じペプチドのN末端はアセチル化、C末端はアミド化する。

部分ペプチドは、一般的な液相ペプチド合成法、固相ペプチド合成法、およびそれらを適宜組み合わせる方法、またはそれらに準じる方法によって合成することができる[ザ・ペプタイズ、アナリシス、シンセシス、バイオロジー、第1巻(The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology, vol. 1)、エアハルト・グロス(Erhard Gross)およびヨハン・マインホフアー(Johannes Meinhof)編、アカデック・プレス(Academic Press) 10
、1979年、第2巻1980年、第3巻1981年;ペプチド合成の基礎と実験、泉屋信夫ら、丸善、1985年;続医薬品の開発、第14巻、ペプチド合成、矢島治明監修、廣川書店、1991年;インターナショナル・ジャーナル・オブ・ペプタイド・アンド・プロテイン・リサーチ(International Journal of Peptide Protein Research)、35巻、161頁(1990年)参照]。
また、部分ペプチドは、自動ペプチド合成機を用いて合成することもできる。ペプチド合成機によるペプチドの合成は、島津製作所製ペプチド合成機、アプライド・バイオシステム社(Applied Biosystems, Inc., USA、以後ABI社と略称する)ペプチド合成機、アドバンスト・ケムテック社(Advanced Chem Tech Inc., USA、以後ACT社と略称する)ペプチド合成機等の市販のペプチド合成機上で、適当に側鎖を保護したN - Fmoc - アミノ酸あるいはN - Boc - アミノ酸等を用い、それぞれの合成プログラムに従って実施することができる。 20

ここで、原料となる保護アミノ酸および担体樹脂は、ABI社、島津製作所、国産化学(株)、ノバ・バイオケム社(Nova Biochem)、渡辺化学(株)、AGT社、またはペプチド研究所(株)等から入手することができる。また、部分ペプチドの原料となる保護アミノ酸、保護有機酸、保護有機アミンは報告されている合成法[ザ・ペプタイズ、アナリシス、シンセシス、バイオロジー、第1巻(The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology, vol. 1)、エアハルト・グロス(Erhard Gross)およびヨハン・マインホフアー(Johannes Meinhof)編、アカデミック・プレス(Academic Press)、1 30
979年、第2巻1980年、第3巻1981年;ペプチド合成の基礎と実験、泉屋信夫ら、丸善、1985年;続医薬品の開発、第14巻、ペプチド合成、矢島治明監修、廣川書店、1991年;インターナショナル・ジャーナル・オブ・ペプタイド・アンド・プロテイン・リサーチ(International Journal of Peptide Protein Research)、35巻、161頁(1990年)参照]に従って、あるいはそれに準じて合成することができる。

(2) 動物の免疫と抗体生産細胞の調製

上記で得られた該蛋白質を抗原として免疫する。免疫する方法としては、動物の皮下、静脈内または腹腔内に抗原をそのまま投与してもよいが、抗原性の高いキャリア蛋白質を結合させて投与したり、あるいは適当なアジュバントとともに抗原を投与することが好ましい。 40

キャリア蛋白質としては、スカシガイヘモシアニン、キーホールリンペットヘモシアニン、牛血清アルブミン、牛チログロブリン等があげられ、アジュバントとしては、フロインドの完全アジュバント(Complete Freund's Adjuvant)、水酸化アルミニウムゲルと百日咳菌ワクチン等があげられる。

免疫動物としては、ウサギ、ヤギ、マウス、ラット、ハムスターなどの非ヒト哺乳動物があげられる。

抗原の投与は、1回目の投与の後、1~2週間毎に3~10回行う。抗原の投与量は動物1匹当たり50~100 μ gが好ましい。各投与後、3~7日目に免疫動物の眼底静脈叢あるいは尾静脈より採血し、該血清の抗原との反応性について、酵素免疫測定法[酵素免 50

疫測定法（ELISA法）：医学書院刊（1976年）]などで確認する。そして、該血清が十分な抗体価を示した非ヒト哺乳動物を、血清または抗体生産細胞の供給源とする。モノクローナル抗体は、該抗体生産細胞と非ヒト哺乳動物由来の骨髓腫細胞とを融合させてハイブリドーマを作製し、該ハイブリドーマを培養するか、動物に投与して該細胞を腹水癌化させ、該培養液または腹水を分離、精製することにより調製することができる。抗体生産細胞は、抗原投与された非ヒト哺乳動物脾細胞、リンパ節、末梢血などから採取する。

（3）骨髓腫細胞の調製

骨髓腫細胞としては、マウスから得られた株化細胞である、8 - アザグアニン耐性マウス（BALB/c由来）骨髓腫細胞株P3 - X63Ag8 - U1（P3 - U1）[Eur. J. Immunol., 6, 511（1976）]、SP2/0 - Ag14（SP - 2）[Nature, 276, 269（1978）]、P3 - X63 - Ag8653（653）[J. Immunol., 123, 1548（1979）]、P3 - X63 - Ag8（X63）[Nature, 256, 495（1975）]など、イン・ビトロ（in vitro）で増殖可能な骨髓腫細胞であればいかなるものでもよい。これらの細胞株の培養および継代については公知の方法[アンチボディズ - ア・ラボラトリー・マニュアル（Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 8, 1988）；以下、「アンチボディズ」と記す]に従い、細胞融合時まで 2×10^7 個以上の細胞数を確保する。

（4）細胞融合とモノクローナル抗体の選択

上記で得られた抗体生産細胞と骨髓腫細胞とを洗浄したのち、ポリエチレングライコール - 1000（PEG - 1000）などの細胞凝集性媒体を加え、細胞を融合させ、培地中に懸濁させる。細胞の洗浄にはMEM培地またはPBS（リン酸二ナトリウム1.83g、リン酸一カリウム0.21g、食塩7.65g、蒸留水1リットル、pH7.2）などを用いる。また、融合細胞を懸濁させる培地としては、目的の融合細胞のみを選択的に得られるように、HAT培地[正常培地[RPMI - 1640培地にグルタミン（1.5mM）、2 - メルカプトエタノール（ 5×10^{-5} M）、ジェンタマイシン（10 μ g/mL）および牛胎児血清（FCS）（CSL社、10%）を加えた培地]にヒポキサンチン（ 10^{-4} M）、チミジン（ 1.5×10^{-5} M）およびアミノプテリン（ 4×10^{-7} M）を加えた培地]を用いる。

培養後、培養上清の一部をとり、酵素免疫測定法により、抗原蛋白質に反応し、非抗原蛋白質に反応しないサンプルを選択する。ついで、限界希釈法によりクローニングを行い、酵素免疫測定法により安定して高い抗体価の認められたものをモノクローナル抗体生産ハイブリドーマ株として選択する。

酵素免疫測定法

抗原蛋白質あるいは抗原蛋白質を発現した細胞などを96ウェルプレートにコートし、ハイブリドーマ培養上清もしくは上述の方法で得られる精製抗体を第一抗体として反応させる。第一抗体反応後、プレートを洗浄して第二抗体を添加する。第二抗体とは、第一抗体のイムノグロブリンを認識できる抗体を、ビオチン、酵素、化学発光物質あるいは放射線化合物等で標識した抗体である。具体的にはハイブリドーマ作製の際にマウスを用いたのであれば、第二抗体としては、マウスイムノグロブリンを認識できる抗体を用いる。反応後、第二抗体を標識した物質に応じた反応を行ない、抗原に特異的に反応するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマとして選択する。

本発明のハイブリドーマ株の具体例としては、ハイブリドーマ株KM2895、KM2896、KM2897およびKM2904があげられる。ハイブリドーマ株KM2895およびKM2904は、平成13年5月24日付で、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6）に、FERMBP - 7601およびFERMBP - 7602としてそれぞれ寄託されている。

（5）モノクローナル抗体の調製

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ細胞を培養して得られる培養液、またはプリスタン処理 [2 , 6 , 10 , 14 - テトラメチルペンタデカン (P i s t a n e) 0 . 5 m L を腹腔内投与し、2週間飼育する] した 8 ~ 10 週令のマウスまたはヌードマウスに、モノクローナル抗体生産ハイブリドーマ細胞を腹腔内投与して腹水癌化させた腹水から、分離、精製することにより調製できる。

モノクローナル抗体を分離、精製する方法としては、遠心分離、40 ~ 50 % 飽和硫酸アンモニウムによる塩析、カプリル酸沈殿法、DEAE - セファロースカラム、陰イオン交換カラム、プロテイン A (または G) カラムあるいはゲル濾過カラム等を用いるクロマトグラフィー等を、単独または組み合わせて行う方法があげられる。この方法により、Ig G あるいは Ig M 画分を回収し、精製モノクローナル抗体を取得することができる。

10

精製モノクローナル抗体のサブクラスの設定は、モノクローナル抗体タイピングキットなどを用いて行うことができる。蛋白質量は、ローリー法あるいは 280 nm での吸光度より算出することができる。

抗体のサブクラスとは、クラス内のアイソタイプのこと、マウスでは、Ig G 1、Ig G 2 a、Ig G 2 b、Ig G 3、ヒトでは、Ig G 1、Ig G 2、Ig G 3、Ig G 4 があげられる。マウス Ig G 1、Ig G 2 a およびヒト Ig G 1 タイプは、補体依存性細胞傷害活性 (以下、CDC 活性) および抗体依存性細胞傷害活性 (以下、ADCC 活性) を有し、治療への応用上、有用である。

2 . 組換え抗体の作製方法 (I) - 抗 M T 4 - M M P 触媒ドメインヒト化抗体の作製方法 (1) ヒト化抗体発現用ベクターの構築

20

ヒト以外の動物の抗体からヒト化抗体を作製するために必要なヒト化抗体発現用ベクターを構築する。ヒト化抗体発現用ベクターとは、ヒト抗体の C 領域である C H および C L をコードする遺伝子が組み込まれた動物細胞用発現ベクターであり、動物細胞用発現ベクターにヒト抗体の C H および C L をコードする遺伝子をそれぞれ挿入することにより構築されたものである。

ヒト抗体の C 領域としては、例えば、ヒト抗体 H 鎖では C 1 や C 4、ヒト抗体 L 鎖では C 等の任意のヒト抗体の C 領域を用いることができる。ヒト抗体の C 領域をコードする遺伝子としてはエキソンとイントロンより成る染色体 DNA または c DNA を用いることもできる。動物細胞用発現ベクターとしては、ヒト抗体 C 領域をコードする遺伝子を組み込み発現できるものであればいかなるものでも用いることができる。

30

例えば、p A G E 1 0 7 [C y t o t e c h n o l o g y , 3 , 1 3 3 (1 9 9 0)]、p A G E 1 0 3 [J . B i o c h e m . , 1 0 1 , 1 3 0 7 (1 9 8 7)]、p H S G 2 7 4 [G e n e , 2 7 . , 2 2 3 (1 9 8 4)]、p K C R [P r o c . N a t l . A c a d . S c i . , 7 8 , 1 5 2 7 (1 9 8 1)]、p S G 1 d 2 - 4 [C y t o t e c h n o l o g y , 4 , 1 7 3 (1 9 9 0)] 等があげられる。動物細胞用発現ベクターに用いるプロモーターとエンハンサーとしては、S V 4 0 の初期プロモーターとエンハンサー [J . B i o c h e m . , 1 0 1 , 1 3 0 7 (1 9 8 7)]、モロニーマウス白血病ウイルスの L T R プロモーターとエンハンサー [B i o c h e m . B i o p h y s . R e s . C o m u n . , 1 4 9 , 9 6 0 (1 9 8 7)]、および免疫グロブリン H 鎖のプロモーター [C e l l , 4 1 , 4 7 9 (1 9 8 5)] とエンハンサー [C e l l , 3 3 , 7 1 7 (1 9 8 3)] 等があげられる。

40

ヒト化抗体発現用ベクターは、抗体 H 鎖、L 鎖が別々のベクター上に存在するタイプあるいは同一のベクター上に存在するタイプ (タンデム型) のどちらでも用いることができるが、ヒト化抗体発現ベクターの構築のしやすさ、動物細胞への導入のし易さ、動物細胞内での抗体 H 鎖および L 鎖の発現量のバランスがとれる等の点でタンデム型のヒト化抗体発現用ベクターの方が好ましい [J . I m m u n o l . M e t h o d s , 1 6 7 , 2 7 1 (1 9 9 4)]。

(2) ヒト以外の動物の抗体の V H および V L をコードする c D N A の取得

ヒト以外の動物の抗体、例えば、マウス抗 M T 4 - M M P 触媒ドメインモノクローナル抗体の V H および V L をコードする c D N A は以下のようにして取得する。

50

抗MT4-MMP触媒ドメインモノクローナル抗体を生産する細胞、例えば、マウスMT4-MMP触媒ドメイン抗体生産ハイブリドーマ等よりmRNAを抽出し、cDNAを合成する。合成したcDNAを、ファージあるいはプラスミドなどのベクターに挿入し、cDNAライブラリーを作製する。該ライブラリーより、ヒト以外の動物の抗体、例えば、マウス抗体のC領域部分あるいはV領域部分をプローブとして用い、VHをコードするcDNAを有する組換えファージあるいは組換えプラスミド、およびVLをコードするcDNAを有する組換えファージあるいは組換えプラスミドをそれぞれ単離する。組換えファージあるいは組換えプラスミド上の目的とする抗体のVHおよびVLの全塩基配列を決定し、塩基配列よりVHおよびVLの全アミノ酸配列を推定する。

(3) ヒト型キメラ抗体発現ベクターの構築

前記2(1)で構築したヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のCHおよびCLをコードする遺伝子上流に、ヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを挿入し、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。例えば、キメラ抗体発現用ベクターのヒト抗体のCHおよびCLをコードする遺伝子上流にあらかじめヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLをコードするcDNAをクローニングするための制限酵素の認識配列を設けておき、このクローニングサイトにヒト以外の動物の抗体のV領域をコードするcDNAを下記に述べる合成DNAを介して挿入することにより、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを製造することができる。合成DNAは、ヒト以外の動物の抗体のV領域の3'末端側の塩基配列とヒト抗体のC領域の5'末端側の塩基配列とからなるものであり、両端に適当な制限酵素部位を有するようにDNA合成機を用いて製造する。

(4) ヒト以外の動物の抗体のCDR配列の同定

抗体の抗原結合部位を形成するVH及びVLは、配列の比較的保存された4個のフレームワーク領域(以下、FR領域と称す)とそれらを連結する配列の変化に富んだ3個の相補性決定領域(CDR)から成っている[シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト(Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, (1991); 以下、シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレストと記す]。そして各CDRアミノ酸配列(CDR配列)は、既知の抗体のV領域のアミノ酸配列(シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト)と比較することにより同定することができる。

(5) ヒト型CDR移植抗体のV領域をコードするcDNAの構築

ヒト型CDR移植抗体のVHおよびVLをコードするcDNAは以下のようにして取得することができる。

まず、目的のヒト以外の動物の抗体のV領域のCDRを移植するためのヒト抗体のV領域のFRのアミノ酸配列をVH、VLそれぞれについて選択する。ヒト抗体のV領域のFRのアミノ酸配列としては、ヒト抗体由来のV領域のFRのアミノ酸配列であればいかなるものでも用いることができる。

例えば、Protein Data Bankに登録されているヒト抗体のV領域のFRのアミノ酸配列、ヒト抗体のV領域のFRの各サブグループの共通アミノ酸配列(シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト)があげられるが、十分な活性を有するヒト型CDR移植抗体を創製するためには、目的のヒト以外の動物の抗体のV領域のアミノ酸配列と高い相同性、好ましくは65%以上の相同性を有することが望ましい。次に、選択したヒト抗体のV領域のFRのアミノ酸配列をコードするDNA配列と目的のヒト以外の動物の抗体のV領域のCDRのアミノ酸配列をコードするDNA配列を連結させて、VH、VLそれぞれのアミノ酸配列をコードするDNA配列を設計する。CDR移植抗体可変領域遺伝子を構築するために設計したDNA配列を得るためには、全DNA配列をカバーするように各鎖について数本の合成DNAを設計し、それらを用いてポリメラーゼ・チェイン・リアクション(Polymerase Chain Reaction; 以下、PCRと記す)を行う。PCRでの反応効率および合成可能なDNAの長さから各鎖について、好ましくは、6本の合成DNAを設計する。反応後、増幅断

10

20

30

40

50

片を適当なベクターにサブクローニングし、その塩基配列を決定し、目的のヒト型CDR移植抗体の各鎖のV領域のアミノ酸配列をコードするcDNAを含むプラスミドを取得する。また、約100塩基よりなる合成DNAを用いてセンス、アンチセンスともに全配列を合成し、それらをアニーリング、連結することで、目的のヒト型CDR移植抗体の各鎖のV領域のアミノ酸配列をコードするcDNAを構築することもできる。

(6) ヒト型CDR移植抗体のV領域のアミノ酸配列の改変

ヒト型CDR移植抗体は目的のヒト以外の動物の抗体のV領域のCDRのみをヒト抗体のV領域のFR間に、単純に移植しただけでは、抗体の有する結合活性はもとのヒト以外の動物の抗体の活性に比べて低下してしまうことが知られている[Bio/Technology, 9, 266(1991)]。そこでヒト抗体のV領域のFRのアミノ酸配列のうち、直接抗原との結合に関与しているアミノ酸残基、CDRのアミノ酸残基と相互作用をしているアミノ酸残基、あるいは抗体の立体構造の維持に関与している等の可能性を有するアミノ酸残基をもとのヒト以外の動物の抗体に見出されるアミノ酸残基に改変し、結合活性を上昇させることが行われている。そして、それらのアミノ酸残基を効率よく同定するため、X線結晶解析あるいはコンピューターモデリング等を用いた抗体の立体構造の構築および解析を行っている。しかし、いかなる抗体にも適応可能なヒト型CDR移植抗体の製造法は未だ確立されておらず、現状では個々の抗体によって種々の試行錯誤が必要である。

選択したヒト抗体のV領域のFRのアミノ酸配列の改変は各種の変異導入プライマーを用いて前記2(5)に記載のPCRを行うことにより達成できる。PCR後の増幅断片を適当なベクターにサブクローニング後、その塩基配列を決定し、目的の変異が導入されたcDNAを含むベクター(以下、アミノ酸配列改変ベクターと称す)を取得する。

また、狭い領域のアミノ酸配列の改変であれば、20~35塩基からなる変異導入プライマーを用いたPCR変異導入法により行うことができる。具体的には、改変後のアミノ酸残基をコードするDNA配列を含む20~35塩基からなるセンス変異プライマー及びアンチセンス変異プライマーを合成し、改変すべきV領域のアミノ酸配列をコードするcDNAを含むプラスミドを鋳型として2段階のPCRを行う。最終増幅断片を適当なベクターにサブクローニング後、その塩基配列を決定し、目的の変異が導入されたcDNAを含むアミノ酸配列改変ベクターを取得する。

(7) ヒト型CDR移植抗体発現ベクターの構築

前記2(1)のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のCH及びCLをコードする遺伝子の upstream に、前記2(5)および2(6)で取得したヒト型CDR移植抗体のVH及びVLをコードするcDNAを挿入し、ヒト型CDR移植抗体発現ベクターを構築することができる。例えば、ヒト型CDR移植抗体のVH及びVLのアミノ酸配列をコードするcDNAを構築するためのPCRの際に5'末端および3'末端の合成DNAの末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、所望のヒト抗体のC領域をコードする遺伝子の upstream にそれらが適切な形で発現するように挿入することができる。

(8) ヒト化抗体の一過性(トランジェント)発現および活性評価

多種類のヒト化抗体の活性を効率的に評価するために、前記2(3)のヒト型キメラ抗体発現ベクター、および前記2(7)のヒト型CDR移植抗体発現ベクターあるいはそれらの改変ベクターをCOS-7細胞(ATCC CRL 1651)に導入してヒト化抗体の一過性発現[Methods in Nucleic Acids Res., CRC Press, p. 283(1991)]を行い、その活性を測定することができる。

COS-7細胞への発現ベクターの導入法としては、DEAE-デキストラン法[Methods in Nucleic Acids Res., CRC Press, p. 283(1991)]、リポフェクション法[Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84, 7413(1987)]等があげられる。

ベクターの導入後、培養上清中のヒト化抗体の活性は前記1(4)に記載の酵素免疫測定法(ELISA法)等により測定することができる。

(9) ヒト化抗体の安定(ステーブル)発現および活性評価

前記 2 (3) のヒト型キメラ抗体発現ベクターおよび前記 2 (7) のヒト型 C D R 移植抗体発現ベクターを適当な宿主細胞に導入することによりヒト化抗体を安定に生産する形質転換株を得ることができる。

宿主細胞への発現ベクターの導入方法としては、エレクトロポレーション法 [特開平 2 - 2 5 7 8 9 1、C y t o t e c h n o l o g y , 3 , 1 3 3 (1 9 9 0)] 等があげられる。

ヒト化抗体発現ベクターを導入する宿主細胞としては、ヒト化抗体を発現させることができる宿主細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができる。例えば、マウス S P 2 / 0 - A g 1 4 細胞 (A T C C C R L 1 5 8 1)、マウス P 3 X 6 3 - A g 8 . 6 5 3 細胞 (A T C C C R L 1 5 8 0)、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子 (以下、D H F R 遺伝子と称す) が欠損した C H O 細胞 [P r o c . N a t l . A c a d . S c i . , 7 7 , 4 2 1 6 (1 9 8 0)]、ラット Y B 2 / 3 H L . P 2 . G 1 1 . 1 6 A g . 2 0 細胞 (A T C C C R L 1 6 6 2、以下、Y B 2 / 0 細胞と称す) 等があげられる。

ベクターの導入後、ヒト化抗体を安定に生産する形質転換株は、特開平 2 - 2 5 7 8 9 1 に開示されている方法に従い、G 4 1 8 および F C S を含む R P M I 1 6 4 0 培地により選択する。得られた形質転換株を培地中で培養することで培養液中にヒト化抗体を生産蓄積させることができる。培養液中のヒト化抗体の活性は前記 1 (4) に記載の方法などにより測定する。また、形質転換株は、特開平 2 - 2 5 7 8 9 1 に開示されている方法に従い、D H F R 遺伝子増幅系等を利用してヒト化抗体の生産量を上昇させることができる。ヒト化抗体は、形質転換株の培養上清よりプロテイン A カラムを用いて精製することができる (アンチボディズ第 8 章)。また、通常の蛋白質で用いられる精製方法を使用することができる。例えば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィーおよび限外濾過等を組合せて行い、ヒト化抗体を精製することができる。精製したヒト化抗体の H 鎖、L 鎖あるいは抗体分子全体の分子量は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (S D S - P A G E) [N a t u r e , 2 2 7 , 6 8 0 (1 9 7 0)] やウエスタンブロッティング法 (アンチボディズ第 1 2 章) 等で測定する。

精製したヒト化抗体の反応性、また、ヒト化抗体の M T 4 - M M P 触媒ドメインに対する結合活性は、前記 1 (4) に記載の方法などにより測定することができる。

3 . 組換え抗体の作製方法 (I I)

(1) 抗体断片 F a b、F a b '、F (a b ')₂ の作製方法

上述した抗体を酵素で処理することにより、抗体断片を生成させる。酵素としては、パパイン、トリプシンなどをあげることができる。

または、該抗 M T 4 - M M P 触媒ドメイン抗体の F a b、F a b ' あるいは F (a b ')₂ 断片をコードする D N A を動物細胞用発現ベクターに挿入し、該ベクターを動物細胞へ導入することにより発現させ、F a b、F a b ' あるいは F (a b ')₂ を製造することができる。

抗体断片は、ゲル濾過、イオン交換、アフィニティークロマトグラフィーおよび限外濾過等を組み合わせて行い、精製することができる。精製した F a b、F a b '、F (a b ')₂ 分子量は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (S D S - P A G E) [N a t u r e , 2 2 7 , 6 8 0 (1 9 7 0)] やウエスタンブロッティング法 (アンチボディズ第 1 2 章) 等で測定する。

精製した F a b、F a b '、F (a b ')₂ の反応性、また、F a b、F a b '、F (a b ')₂ の M T 4 - M M P 触媒ドメインに対する結合活性の測定は前記 1 (4) に記載の方法などにより測定することができる。

(2) 抗 M T 4 - M M P 触媒ドメイン一本鎖抗体の作製方法

前記 2 (2)、2 (5) および 2 (6) に記載のヒト以外の動物の抗体あるいはヒト型 C D R 移植抗体の V H および V L をコードする c D N A を一本鎖抗体発現用ベクターに挿入することによりヒト以外の動物の抗体の一本鎖抗体あるいはヒト型 C D R 移植抗体の一本鎖抗体の発現ベクターを構築することができる。ここで用いる一本鎖抗体発現用ベクターとしてはヒト以外の動物の抗体あるいはヒト型 C D R 移植抗体の V H および V L をコード

10

20

30

40

50

する cDNA を組み発現できるものであれば、いかなるものでも用いることができる。例えば、pAGE107 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、pAGE103 [J. Biochem., 101, 1307 (1987)]、pHSG274 [Gene, 27, 223 (1984)]、pKCR [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 78, 1527 (1981)]、pSG1 d2-4 [Cytotechnology, 4, 173 (1990)] 等があげられる。一本鎖抗体を発現させるための宿主としては、大腸菌、酵母、動物細胞等の中から適切なものを選択することができるが、その場合の発現用ベクターとしては、それぞれの宿主に適切なものを選択すればよい。

また、適切なシグナルペプチドをコードする cDNA を発現用ベクターに挿入することで一本鎖抗体を細胞外に分泌させる、ペリプラズマ領域に輸送させる、あるいは細胞内に留まらせることができる。 10

選択された発現用ベクターに、VH-P-VL あるいは VL-P-VH (P はペプチドリンカー) からなる一本鎖抗体をコードする cDNA を適切なプロモーター、シグナルペプチドの下流に挿入することにより、目的の一本鎖抗体をコードする cDNA が挿入された一本鎖抗体発現ベクターを構築することができる。

一本鎖抗体をコードする cDNA は、VH をコードする cDNA と VL をコードする cDNA とを、両端に適当な制限酵素の認識配列を有するペプチドリンカーをコードする合成 DNA を用いて連結することにより得ることができる。リンカーペプチドは、リンカーペプチドの付加により VH、VL の抗原に対する結合の妨害にならぬように最適化することが重要である。例えば Pantoliano らにより示されたもの [Biochemistry, 30, 10117 (1991)] あるいはそれを改変したものをを用いることができる。 20

(3) 抗 MT4-MMP 触媒ドメインジスルフィド安定化抗体の作製方法

ジスルフィド安定化抗体は、ヒト以外の動物の抗体の VH および VL をコードする cDNA あるいはヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL をコードする cDNA のそれぞれの適切な位置の 1 アミノ酸残基に相当する DNA 配列をシステイン残基に相当する DNA 配列に改変し、発現および精製したのち、ジスルフィド結合を形成させることで作製することができる。アミノ酸残基のシステイン残基への改変は前記 2(5) の PCR を用いた変異導入法により行うことができる。得られた改変 VH および改変 VL をコードする cDNA を適切な発現用ベクターに挿入することによりジスルフィド安定化抗体 H 鎖発現ベクターおよびジスルフィド安定化抗体 L 鎖発現ベクターを構築することができる。ここで用いるジスルフィド安定化抗体発現用ベクターとしては改変 VH および改変 VL をコードする cDNA を組み発現できるものであれば、いかなるものでも用いることができる。例えば、pAGE107 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、pAGE103 [J. Biochem., 101, 1307 (1987)]、pHSG274 [Gene, 27, 223 (1984)]、pKCR [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 1527 (1981)]、pSG1 3d2-4 [Cytotechnology, 4, 173 (1990)] 等があげられる。ジスルフィド安定化抗体を形成させるためにジスルフィド安定化抗体 L 鎖発現ベクターおよびジスルフィド安定化抗体 H 鎖発現ベクターを発現させるための宿主としては、大腸菌、酵母、動物細胞等の中から適切なものを選択することができるが、その場合の発現用ベクターとしては、それぞれの宿主に適切なものを選択すればよい。 30

また、適切なシグナルペプチドをコードする cDNA を発現用ベクターに挿入することでジスルフィド安定化抗体を細胞外に分泌させる、ペリプラズマ領域に輸送させる、あるいは細胞内に留まらせることができる。 40

(4) 各種抗体の発現および活性評価

前記 3(1) ~ (3) で構築された抗体断片発現ベクター、一本鎖抗体発現ベクター、ジスルフィド安定化抗体 H 鎖発現ベクターあるいはジスルフィド安定化抗体 L 鎖発現ベクターをエレクトロポレーション法 [特開平 2-257891、Cytotechnology] 50

y, 3, 133 (1990)]等の方法により宿主細胞へ導入することにより、目的の抗体断片、一本鎖抗体、ジスルフィド安定化抗体H鎖あるいはジスルフィド安定化抗体L鎖を生産する形質転換株を取得することができる。発現ベクターの導入後、培養上清等に含まれる抗体断片、一本鎖抗体、ジスルフィド安定化抗体H鎖あるいはジスルフィド安定化抗体L鎖の発現は前記1(4)に記載の方法等により確認することができる。

一本鎖抗体、ジスルフィド安定化抗体H鎖あるいはジスルフィド安定化抗体L鎖の回収および精製は公知の技術を組み合わせることにより達成することができる。例えば、抗体断片、一本鎖抗体、ジスルフィド安定化抗体H鎖あるいはジスルフィド安定化抗体L鎖が培地中に分泌される場合は、限外濾過により濃縮し、次いで各種クロマトグラフィーあるいはゲル濾過を行うことにより達成することができる。また、宿主細胞のペリプラズマ領域へと輸送される場合は、宿主細胞に浸透圧ショックを与えた後、限外濾過により濃縮し、次いで各種クロマトグラフィーあるいはゲル濾過を実行することにより達成することができる。抗体断片、一本鎖抗体、ジスルフィド安定化抗体H鎖あるいはジスルフィド安定化抗体L鎖が不溶性で、かつ顆粒(インクルージョン・ボディー)として存在している場合は、細胞の溶解、顆粒を単離するための遠心分離と洗浄を繰り返す、例えばグアニジン・塩酸による可溶化後、各種クロマトグラフィーあるいはゲル濾過を行うことにより達成することができる。

精製された一本鎖抗体は、前記1(4)に記載の方法等により測定することができる。精製されたジスルフィド安定化抗体H鎖とジスルフィド安定化抗体L鎖は、各々を混合したのち、活性を有する構造へと導く操作[リフォールディング操作、Molecular Immunology, 32, 249 (1995)]によりジスルフィド結合を形成させた後、抗原アフィニティークロマトグラフィーもしくはイオン交換クロマトグラフィーまたはゲル濾過により活性を有するジスルフィド安定化抗体を精製することができる。ジスルフィド安定化抗体の活性は前記1(4)に記載の方法等により測定することができる。

4. 融合抗体の作製方法

本発明で使用される抗体あるいは該抗体断片に、放射性同位元素、蛋白質、低分子の薬剤などを、化学的あるいは遺伝子工学的に結合させた融合抗体も抗体の誘導体として使用することができる。

抗体と毒素蛋白質とを化学的に結合させた融合抗体は、文献[Anticancer Research, 11, 2003 (1991); Nature Medicine, 3, 350 (1996)]記載の方法に従って作製することができる。

抗体と、毒素あるいはサイトカイン等の蛋白質とを遺伝子工学的に結合させた融合抗体は、文献[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 974 (1996); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 7826 (1996)]記載の方法に従って作製することができる。

抗体と低分子の薬剤を化学的に結合させた融合抗体は、文献[Science, 261, 212 (1993)]記載の方法に従って作製することができる。抗体と放射性同位元素を化学的に結合させた融合抗体は、文献[Antibody Immunocjugates and Radiopharmaceuticals, 3, 60 (1990); Anticancer Research, 11, 2003 (1991)]記載の方法に従って作製することができる。

これらの誘導体は、抗体分子の特異性に従って放射性同位元素、蛋白質(サイトカイン、トキシン、酵素など)、低分子の薬剤などを標的組織周辺に集積させることで、より効果的で副作用の少ない診断あるいは治療を可能にすることが期待される。

5. 抗体の使用方法(I)

上述した抗MT4-MMP触媒ドメイン抗体、該抗体断片あるいはそれらと他分子との融合抗体は、MT4-MMP触媒ドメインと結合し、抗体依存性細胞障害活性(ADCC活性)、補体依存性細胞障害活性(CDC活性)等の抗体のエフェクター活性を介してMT4-MMPを細胞表面に発現している細胞を破壊する。したがって、MT4-MMPが関与する疾患の治療に有用である。

10

20

30

40

50

MT4 - MMPに關与する疾患としては、変形性關節症、慢性關節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アレルギー性皮膚炎、乾せん、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植に伴う免疫反応、肝炎、腎炎、膵炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、創傷、角膜腫瘍、組織傷害または白血球の浸潤に伴う炎症疾患などがあげられる。

本発明の抗体を含有する医薬は、治療薬として単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。

投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の非経口投与をあげることができ、抗体製剤の場合、望ましくは静脈内投与をあげることができる。 10

投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤等があげられる。

経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等があげられる。

乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油等の油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。

カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。 20

非経口投与に適当な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。

注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製される。

座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製される。また、噴霧剤は該抗体そのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該抗体を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製される。 30

担体として具体的には乳糖、グリセリン等が例示される。該抗体および用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、通常成人1日当たり10 μ g/kg ~ 8 mg/kgである。

また、本発明で使用される抗体の各種腫瘍細胞に対する抗腫瘍効果を検討する方法は、インビトロ実験としては、CDC活性測定法、ADCC活性測定法等があげられ、インビボ実験としては、マウス等の実験動物での腫瘍系を用いた抗腫瘍実験等があげられる。

CDC活性測定法、ADCC活性測定法および抗腫瘍実験は、文献[Cancer Immunology Immunotherapy, 36, 373, 1993., Cancer Research, 54, 1511 (1994)]等記載の方法に従って行うことができる。 40

6. 抗体の使用法 (II)

また、本発明は、本発明のモノクローナル抗体を用いて、MT4 - MMP触媒ドメインまたは該ドメインを細胞外に発現した微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞を免疫学的に検出および定量する方法に関する。

本発明のモノクローナル抗体を用いて、MT4 - MMP触媒ドメインを細胞外に発現した微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞を、免疫学的に検出および定量する方法としては、蛍光抗体法、免疫酵素抗体法 (ELISA)、放射性物質標識免疫抗体法 (RIA) などの免疫学的測定法、免疫組織染色法、免疫細胞染色法などの免疫組織化学染色法 (ABC法) 50

、C S A法等)、ウェスタンブロットティング法、ドットブロットティング法、免疫沈降法[単クローン抗体実験マニュアル(講談社サイエンティフィック、1987年)、続生化学実験講座5免疫生化学研究法(東京化学同人、1986年)]などがあげられる。

免疫学的測定法としては、任意の公知の免疫学的測定方法があげられる。

上述のように、免疫学的測定法は標識方法の違いにより、放射免疫測定法(R I A)、酵素免疫測定法(E I AまたはE L I S A)、蛍光免疫測定法(F I A)、発光免疫測定法(l u m i n e s c e n t i m m u n o a s s a y)、物理化学的検出法(T I A, L A P I A, P C I A)などがあげられるが、好ましくは酵素免疫測定法があげられる。

酵素免疫測定法で用いる標識体としては、任意の公知(石川榮次ら編、酵素免疫測定法、医学書院)の酵素標識を用いることができる。例えば、アルカリフォスファターゼ標識、

10

ペルオキシダーゼ標識、ルシフェラーゼ標識等を用いることができる。
発光免疫測定法で用いる標識体としては、任意の公知[今井一洋編、生物発光と化学発光、廣川書店; 臨床検査42(1998)]の発光体標識を用いることができる。例えば、

アクリジニウムエステル標識、ロフィン標識等を用いることができる。
蛍光免疫測定法で用いる標識体としては、任意の公知(川生明著、蛍光抗体法、ソフトサイエンス社)の蛍光標識を用いることができる。例えば、F I T C標識、R I T C標識等

を用いることができる。
免疫学的測定法とは、上述した各種標識を施した抗原または抗体を用いて、抗体量または抗原量を測定する方法である。本発明の免疫学的測定法としては、抗原の検出または測定を行う方法であればいかなる方法でもよい。例えば、競合法、サンドイッチ法[免疫学イ

20

ラストレイテッド 第5版(南光堂)]があげられるが、サンドイッチ法が好ましい。
サンドイッチ法は、固相に第一の抗体を結合させた後、測定したい抗原をトラップさせ、標識した第二の抗体を反応させる方法である。サンドイッチ法に用いる抗体としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のいずれを用いてもよく、上述したF a b、F a b'、F (a b)₂などの抗体フラグメントを用いてもよい。サンドイッチ法で用いる2種類の抗体の組み合わせとしては、異なるエピトープを認識するモノクローナル抗体あるいは抗体フラグメントの組み合わせでもよいし、ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体あるいは抗体フラグメントの組み合わせでもよい。好ましくは、本発明のモノクローナル抗体であるK M 2 8 9 5およびK M 2 9 0 4の組み合わせがあげられる。

蛍光抗体法とは、M T 4 - M M P触媒ドメインを細胞外に発現した微生物、動物細胞ある

30

いは昆虫細胞に、本発明のモノクローナル抗体を反応させ、さらにフルオレシニン・イソチオシアネート(F I T C)などの蛍光物質でラベルした抗マウスI g G抗体あるいは結合断片を反応させた後、蛍光色素をフローサイトメーターで測定する方法である。
免疫酵素抗体法(E L I S A)とは、M T 4 - M M P触媒ドメインを細胞外に発現した微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞に、本発明のモノクローナル抗体を反応させ、さらにペルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素標識などを施した抗マウスI g G抗体あるいは結合断片を反応させた後、発色色素を吸光度計で測定する方法である。

放射性物質標識免疫抗体法(R I A)とは、M T 4 - M M P触媒ドメインを細胞外に発現した微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞に、本発明のモノクローナル抗体を反応させ、さらに放射線標識を施した抗マウスI g G抗体あるいは結合断片を反応させた後、シンチレー

40

ションカウンターなどで測定する方法である。
免疫細胞染色法、免疫組織染色法とは、M T 4 - M M P触媒ドメインを細胞外に発現した微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞に、本発明のモノクローナル抗体を反応させ、さらにF I T Cなどの蛍光物質、ペルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素標識を施した抗マウスI g G抗体あるいは結合断片を反応させた後、顕微鏡を用いて観察する方法である。

ウェスタンブロットティング法とは、M T 4 - M M P触媒ドメインを細胞外に発現した微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞の細胞抽出液をS D S - ポリアクリルアミドゲル電気泳動[Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988]で分画した後、該ゲルをP V D F膜あるいはニトロセルロース膜にブロットティングし、該膜に本発明のモノクローナル抗

50

体を反応させ、さらにFITCなどの蛍光物質、ペルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素標識を施した抗マウスIgG抗体あるいは結合断片を反応させた後、確認する方法である。

ドットブロッキング法とは、MT4-MMP触媒ドメインを細胞外に発現した微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞の細胞抽出液をニトロセルロース膜にブロッキングし、該膜に本発明のモノクローナル抗体を反応させ、さらにFITCなどの蛍光物質、ペルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素標識を施した抗マウスIgG抗体あるいは結合断片を反応させた後、確認する方法である。

免疫沈降法とは、MT4-MMP触媒ドメインを細胞外に発現した微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞の細胞抽出液を本発明のモノクローナル抗体と反応させた後、プロテインG-セファロース等のイムノグロブリンに特異的な結合能を有する担体を加えて抗原抗体複合体を沈降させる方法である。

MT4-MMPが関与する疾病の診断方法としては、各種ヒト腫瘍培養細胞またはバイオプシー等で患者より採取した細胞および該細胞より調製した細胞抽出液を用いて、MT4-MMP触媒ドメインを、上述のように免疫学的に検出または定量する方法があげられる。したがって、本発明のモノクローナル抗体は、上述のMT4-MMPが関与する疾病の診断薬として用いることができる。

7. 抗体の使用法 (III)

また、本発明の抗MT4-MMP触媒ドメインモノクローナル抗体は、MT4-MMPを精製するために使用することができる。具体的には、本発明の抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィを行う。

抗MT4-MMP触媒ドメインモノクローナル抗体を、プロテインG-セファロース等のイムノグロブリンに特異的な結合能を有する担体を用いて、あるいはアミノ基を介してイムノグロブリンを直接結合する種々のカップリングゲルを用いて担体に固定化し、抗体カラムを作製する。

サンプルとしてはMT4-MMPを発現した動物細胞あるいは昆虫細胞の細胞抽出液、あるいは各種ヒト腫瘍培養細胞またはバイオプシー等により患者より採取した細胞から調製した細胞抽出液を用いることができる。

抗体カラムに上記MT4-MMPサンプルを通塔後、カラム容量の10倍の0.5MのNaClを含むリン酸バッファー(pH7.2)にて洗浄する。その後、抗原抗体反応を解離させる条件(高pH、低pH、高塩濃度、界面活性剤、変性剤等)のバッファーにて溶出し、精製MT4-MMPを得る。なお、溶出はMT4-MMPの酵素活性を失活させない条件を用いる必要がある。

以下に実施例を用いて、本発明を具体的に説明するが、本発明がこれらの実施例に限定されるものでない。

発明を実施するための最良の形態

実施例1 ヒトMT4-MMP触媒ドメイン蛋白質の発現

(1) ヒトMT4-MMP遺伝子の配列情報

ヒトMT4-MMP cDNAの情報は、遺伝子配列データベースの一つであるGenbankに登録されている配列を使用した(Accession No. X89576)。その塩基配列を配列番号5に示す。ヒトMT4-MMP触媒ドメインをコードする塩基配列は、配列番号5の481~987番目の塩基配列に相当する。

(2) ヒトMT4-MMP触媒ドメインの増幅に用いたプライマーの設計

遺伝子操作的手法は特に断らない限りモレキュラークローニング第2版に記載されている方法により行った。

ヒトMT4-MMP触媒ドメインの増幅に用いたプライマーの塩基配列を配列番号1および2に示す。

また、クローニング用ベクターpCR-Blunt(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)のクローニングサイトの両側に位置する配列より、塩基配列確認用のプライマーを設計した。塩基配列確認用のプライマーの塩基配列を配列番号3および

4 に示す。

(3) PCR法によるヒトMT4 - MMP触媒ドメインの増幅

PCRの鑄型にはプラスミドhMT4 t / pRSET B [W000 / 18805] 1 μ Lを用いた。耐熱性酵素としてPLATINUM pfx DNA Polymerase (Life Technologies社製)を用い、全50mLの反応溶液[1x pfx Amplification buffer、MgSO₄ 1mM、各成分300mMのdNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、上記(2)で得られたプライマー-MT4 - MMPCDF1、MT4 - MMPCDR1各々0.3mM、PLATINUM pfx DNA Polymerase 1.25units]にてPCRを行った。サーマルサイクラーPTC-200 (MJ RESEARCH)を用い、94 で2分間加熱後、94 で15秒間、60 で30秒間、68 で1分間の工程を1サイクルとして25サイクル行い、更に68 で10分間加熱した。このPCR反応液のうち5mLをアガロース電気泳動にて解析し、予想される約0.5kbのDNA断片が増幅されたことを確認した。 10

(4) 増幅されたDNA断片の精製とベクターへの挿入

PCR反応液の残りを全量アガロース電気泳動にて分離し、約0.5kbのDNA断片を回収した。このDNA断片は、QIAEX II gel extraction kit (QIAGEN社製)を用い、キットに付属のマニュアルに従って精製した。ベクターDNAはZero Blunt PCR Cloning Kit (Invitrogen社製)に付属のpCR-Bluntを用いた。精製済みPCR産物約50ngおよびpCR-Blunt約25ngを混ぜ、このDNA溶液と等量のTakara ligation system ver. 2 (宝酒造社製)を加えて、16 で12時間結合反応を行った。この反応により得られた組換えプラスミドDNAを用いて大腸菌TOP10株 [遺伝子型: F, mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) 80 lacZ M15 lacX74 deoR recA1 araD139 (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R)endA1 nupG]を形質転換し、プラスミドpCR-BluntMT4MMPCDを得た。 20

(5) pCR-BluntMT4MMPCDの塩基配列の確認

pCR-BluntMT4-MMPCDに組み込まれているcDNAの塩基配列の確認は、ABI PRISM 377 DNA Sequencer (PE Applied Biosystems社製)により行なった。シーケンス反応はBig Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (PE Applied Biosystems)を用い、方法はキットの説明書に従った。シーケンス用のプライマーは上記(2)で得られたF1、R1プライマーを用い、両鎖の塩基配列を確認した。 30

シーケンスのデータ解析には、GENETYX WIN ver. 3.2 (ソフトウェア社製)を用いた。

クローニングした塩基配列を確認した結果、配列番号5に示す公知の配列 (Genbank Accession No. X89576)の484~1005番目に一致した。これは、ヒトMT4 - MMP触媒ドメインおよびヒンジ領域に相当する。 40

(6) pCR-Bluntから発現ベクターpET23a(+)への組み換え

pCR-BluntMT4MMPCD約6mgを10mM Tris-HCl (pH7.5)、10mM MgCl₂、100mM NaCl、0.01%牛血清アルブミン (BSA)、1mM dithiothreitol (DTT)、30units Nde I (New England Biolabs社製)および15units Not I (宝酒造社製)からなる反応液40 μ L中で37 で1時間消化反応を行いMT4 - MMP触媒ドメインを含むDNAを切り出した。この反応液をアガロース電気泳動にて分離し、約0.5kbのNde I - Not I DNA断片を回収した。DNA断片は、QIAEX II gel extraction kit (QIAGEN社製)を用いて精製した。 50

pET23a(+)(Novagen社製)の5 μ gを10mM Tris-HCl(pH7.5)、10mM MgCl₂、100mM NaCl、0.01% BSA、1mM DTT、30units NdeI(New England Biolabs社製)および15units NotI(宝酒造社製)からなる反応液40 μ L中で37 $^{\circ}$ Cにて2時間消化反応を行った。この反応液をアガロース電気泳動にて分離し、約3.7kbのDNA断片を回収した。DNA断片は、QIAEX II gel extraction kit(QIAGEN社製)を用いて精製した。

上述のMT4-MMP触媒ドメインを含むNdeI-NotI断片約50ngおよびpET23a(+)のNdeI、NotI処理済み断片約50ngを混ぜ、このDNA溶液と等量のTakara ligation system ver.2(宝酒造社製)を加えて、16 $^{\circ}$ Cで2時間結合反応を行った。この反応により得られた組換えプラスミドDNAを用いて大腸菌XL-1 Blue MRF'株[遺伝子型:(mcrA)183(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac[F'proAB lacI^qZM15Tn10(Tet^r)]]を形質転換し、プラスミドpET23aMT4MMPCDを得た。同様に、MT4-MMP触媒ドメインを含むNdeI-NotI断片をpET24a(+)(Novagen社製)に挿入してpET24aMT4-MMPCDを調製した。

(7) pET23aMT4-MMPCDの大腸菌BL21/DE3pLysS株への導入
大腸菌BL21/DE3pLysS株[遺伝子型:FompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻)gal dcm(DE3)pLysS]はlacUV5プロモーター下流にT7 RNA polymerase 遺伝子をもつ1ファージ、1DE3の溶原菌である。発現プラスミドを導入したBL21/DE3pLysSを培養し、isopropylthio-b-D-galactoside(IPTG)で誘導をかければ、まずT7 RNA polymeraseが発現し、続いて目的遺伝子の強力な転写が始まる。そこでpET23aMT4-MMPCDをBL21/DE3pLysSへ導入した。BL21/DE3pLysS competent cell(Novagen社製)20 μ Lに1 μ gのpET23aMT4MMPCDを加え、氷上で10分間放置した。42 $^{\circ}$ C、30秒間のヒートショックをかけた後、氷上に2分間置き、80 μ LのSOC(competent cellのキットに付属)を加え37 $^{\circ}$ Cに30分間放置した。全量を50 μ g/mLのアンピシリンナトリウム塩(ナカライテスク社製)を含むLuria Bertani(LB)プレートへまき、37 $^{\circ}$ Cでコロニーが直径1mm程度になるまで培養した。

(8) ヒト組換えMT4-MMP触媒ドメインの発現誘導

組換え大腸菌の培養は、100 μ g/mLのアンピシリンナトリウム塩(ナカライテスク社製)を含むLB液体培地で行った。

組換え大腸菌は2mLの培地に植菌した後、恒温振とう培養器BIO-SHAKER(型式BR-40LF, タイテック社製)を用いて37 $^{\circ}$ C、200回転/分(rpm)の条件で一晩振とう培養した。この前培養した培養液0.5mLを75mLの培地に植菌し、本培養を開始した。37 $^{\circ}$ C、200rpmで2時間振とう培養した後、終濃度1mMとなるようにIPTG(ナカライテスク社製)を加え、さらに37 $^{\circ}$ C、200rpmで4時間振とう培養してヒトMT4-MMP触媒ドメインの発現を誘導した。

(9) ヒト組換えMT4-MMP触媒ドメインの精製

75mLの培地を用いて発現誘導を行った菌体は、50mM Tris-HCl(pH7.4)50mLで1回洗浄した。菌体に0.1% Triton X-100、10mM EDTA(pH8.0)、10 μ g/mL DnaseI(Sigma-Aldrich社製)、0.1mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF)(Sigma-Aldrich社製)、0.1 μ g/mL leupeptin(ペプチド研究所社製)、0.1 μ g/mL pepstatin(ペプチド研究所社製)を含む50mM Tris-HCl(pH7.4)300mLを添加し、37 $^{\circ}$ Cで2時間保温した。遠心分離による沈殿の回収後、10mM EDTA(pH8.0)及び上述

の protease inhibitor を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) を用いて 4 回洗浄操作を行った。8 M 尿素を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) を沈殿に 2 mL 加えて溶解し、1.5 mL チューブに分注後、15000 rpm、4、20 分間の遠心分離を行い上清を回収した。上清は簡易ろ過カラム PD-10 (Amersham Pharmacia Biotech 社製) を用いて脱塩し、-20 に保存した。

(10) 酵素活性の測定

10 μ M 蛍光基質 MOCAc-Pro-Leu-Gly-Leu-A2pr(Dnp)-Ala-Arg-NH₂ (ペプチド研究所社製)、50 mM CaCl₂、0.005% Brij 35、62.5 nM ZnCl₂ からなるアッセイバッファー 190 μ L 中に、16 μ g/mL 酵素溶液 (8 M 尿素を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) で希釈) 10 μ L を添加して (終濃度 0.8 μ g/mL)、30~240 分間反応後の蛍光強度を測定した。酵素量の定量は、Protein Assay 試薬 (Bio-Rad 社製) を用いて、BSA を標準として行った。また、標準蛍光基質として MOCAc-Pro-Leu-Gly (ペプチド研究所社製) を用いて蛍光値と基質分解量の関係を算出した (蛍光値 = 基質分解量 \times 6943.4 + 116.48)。測定は ARVO (ベルトルド・ジャパン社製) を用いて、Ex. 320、Em. 393、Energy 2000、1 秒の条件にて行った。

pET システムを用いて発現誘導を行い、75 mL の培養菌体から 160 μ g/mL の酵素溶液が 2.5 mL 得られた。酵素活性の測定を行ったところ、MT4-MMP 活性が検出され、基質分解速度は 1.2 μ mol/mg protein/時間であった。通常 8 M Urea (ナカライテスク社製) 中に溶解し、4 保存を行ったが、使用する際は上記バッファーで 20 倍以上希釈し、25~90 分間静置してリフォールディングした後に適宜希釈して使用した。

実施例 2 抗 MT4-MMP 触媒ドメインと特異的に結合するモノクローナル抗体の製造

(1) 免疫原の調製

実施例 1 で得られた MT4-MMP 触媒ドメインを 50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、50 mM CaCl₂、500 nM ZnCl₂、0.005% Brij 35 溶液に MT4-MMP 触媒ドメインを加え、室温で 1 時間静置し、リフォールディングを行った後、免疫原として使用した。

(2) 動物の免疫と抗体生産細胞の調製

実施例 2 (1) で調製した MT4-MMP 触媒ドメイン 50 μ g をアルミニウムゲル 2 mg および百日咳ワクチン (千葉県血清研究所製) 1×10^9 細胞とともに 5 週令雌マウス (Balb/c) または週令ラット (SD) に投与し、2 週間後より 100 μ g の MT4-MMP 触媒ドメインを 1 週間に 1 回、計 4 回投与した。眼底静脈叢より採血し、その血清抗体価を以下に示す酵素免疫測定法で調べ、十分な抗体価を示したマウスから最終免疫 3 日後に脾臓を摘出した。脾臓を MEM 培地 (日水製薬社) 中で細断し、ピンセットでほぐし、遠心分離 (1200 rpm、5 分間) した後、上清を捨て、トリス-塩化アンモニウム緩衝液 (pH 7.65) で 1~2 分間処理し赤血球を除去し、MEM 培地で 3 回洗浄し、細胞融合に用いた。

(3) 酵素免疫測定法

アッセイ用の抗原には実施例 2 (1) で得られた MT4-MMP 触媒ドメインをリフォールディングしたものを用了。96 穴の EIA 用プレート (グライナー社製) に、上述のように調製した 10 μ g/mL の MT4-MMP 触媒ドメインを 50 μ L/穴で分注し、4 で一晩放置して吸着させた。洗浄後、1% BSA/PBS (Dulbecco's phosphate buffered saline without magnesium and calcium) を 100 μ L/穴で加え、室温 1 時間反応させて残っている活性基をブロックした。1% BSN/PBS を捨て、被免疫マウス抗血清、抗 MT4-MMP 触媒ドメインモノクローナル抗体の培養上清もしくは精製モノクローナル抗体を 50 μ L/穴で分注し、2 時間反応させた。0.05% Tween 20/PBS で洗浄

後、ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウスイムノグロブリン(ダコ社製)またはペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ラットイムノグロブリン(ダコ社製)を50 μ L/穴で加えて室温、1時間反応させ、0.05% Tween 20/PBSで洗浄後ABTS基質液[2,2'-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾール-6-スルホン酸)アンモニウム]を用いて発色させOD 415 nmの吸光度をプレートリーダー(NJ 2001;日本インターメッド社製)にて測定した。

(4) マウス骨髄腫細胞の調製

8-アザグアニン耐性マウス骨髄腫細胞株P3-U1を正常培地で培養し、細胞融合時に 2×10^7 以上の細胞を確保し、細胞融合に親株として供した。

(5) ハイブリドーマの作製

実施例2(2)で得られたマウス脾細胞と実施例2(4)で得られた骨髄腫細胞とを10:1になるよう混合し、遠心分離(1200 rpm、5分間)した後、上清を捨て、沈澱した細胞群をよくほぐした後、攪拌しながら、37 $^{\circ}$ Cで、ポリエチレングライコール-1,000(PEG-1,000)2g、MEM培地2mLおよびジメチルスルホキシド0.7mLの混液0.2~1mL/ 10^8 マウス脾細胞を加え、1~2分間毎にMEM培地1~2mLを数回加えた後、MEM培地を加えて全量が50mLになるようにした。遠心分離(900 rpm、5分間)後、上清を捨て、ゆるやかに細胞をほぐした後、メスピペットによる吸込み、吸出してゆるやかに細胞をHAT培地100mL中に懸濁した。

この懸濁液を96穴培養用プレートに100 μ L/穴ずつ分注し、5%CO₂インキュベーター中、37 $^{\circ}$ Cで10~14日間培養した。この培養上清を実施例2(3)に記載した酵素免疫測定法で調べ、MT4-MMP触媒ドメイン部分ペプチドに反応してコントロールペプチドに反応しない穴を選び、さらにHT培地と正常培地に換え、2回クローニングを繰り返して、抗MT4-MMPモノクローナル抗体生産ハイブリドーマを確立した。

以上の方法により、4個のマウスモノクローナル抗体KM2892、KM2893、KM2894、KM2895が選択された。また、同様の方法をラットに適用し、11個のラットモノクローナル抗体KM2896、KM2897、KM2898、KM2899、KM2900、KM2901、KM2903、KM2904、KM2906、KM2909、KM2910が選択された。

(6) モノクローナル抗体の精製

プリスタン処理した8週令ヌード雌マウス(Balb/c)に実施例2(5)で得られたハイブリドーマ株を $5 \sim 20 \times 10^6$ 細胞/匹それぞれ腹腔内注射した。注射して10~21日後に、ハイブリドーマは腹水癌化した。腹水のたまったマウスから、腹水を採取(1~8mL/匹)し、遠心分離(3000 rpm、5分間)して固形分を除去した。IgGは、カプリル酸沈殿法(アンチボディズ)により精製し、精製モノクローナル抗体とした。

抗体のサブクラスはサブクラスタイピングキットを用いて酵素免疫測定法により行い決定した(表1)。

10

20

30

表1

動物種	抗体名	クラス
マウス	KM2892	IgG1
	KM2893	IgG2a
	KM2894	IgA または IgE
	KM2895	IgG2a
ラット	KM2896	IgG2b
	KM2897	IgG2b
	KM2898	IgG2b
	KM2899	IgG2b
	KM2900	IgG2b
	KM2901	IgG2b
	KM2903	IgG2b
	KM2904	IgG2b
	KM2909	IgG2b
	KM2910	IgG2b
	KM2906	IgG2b

10

20

(7) MT4 - MMP 触媒ドメインとの反応性 (酵素免疫測定法)

実施例2(5)で選択された抗MT4 - MMPモノクローナル抗体のMT4 - MMP触媒ドメインとの反応性を実施例2(3)に示した酵素免疫測定法にて調べた。コントロールとして大腸菌を超音波破碎して得られた蛋白質(大腸菌由来蛋白質)を用いた。

第1図に示すように、MT4 - MMP触媒ドメインを免疫して得られた抗MT4 - MMPモノクローナル抗体である、マウスモノクローナル抗体KM2892、KM2893、KM2894およびKM2895、ならびにラットモノクローナル抗体KM2896、KM2897、KM2898、KM2899、KM2900、KM2901、KM2903、KM2904、KM2906、KM2909およびKM2910はMT4 - MMP触媒ド

30

(8) ウェスタンブロッティング

実施例2(5)で得られた抗MT4 - MMP触媒ドメインモノクローナル抗体を用い、MT4 - MMP蛋白質のウェスタンブロッティングによる検出を検討した。

蛋白質はMT4 - MMP遺伝子導入COS-1細胞膜画分及びコントロールとしてMT5 - MMP遺伝子導入COS-1細胞膜画分を用いた。各々の遺伝子導入細胞はW000/18805に記した方法で作製した。

各々の細胞膜画分を 1.25×10^2 cells/レーンでSDS - ポリアクリルアミド電気泳動(アンチポデイズ)にて分画後、PVDF膜にブロッティングする。1%BSA/PBSでブロッキング後、抗MT4 - MMPモノクローナル抗体の培養上清を室温で2時間反応させた。0.05%Tween20/PBSでよく洗浄した後、第二抗体としてペルオキシダーゼ標識抗マウスイムノグロブリン抗体(ダコ社製)もしくはペルオキシダーゼ標識抗ラットイムノグロブリン抗体(ダコ社製)を室温で1時間反応させた。0.05%Tween20/PBSでよく洗浄した後、検出はECL - ディテクションキット(アマシャム社製)を用いて行い、X線フィルム上に感光させた。その結果、抗MT4 - MMPモノクローナル抗体である、マウスモノクローナル抗体KM2892、KM2893、KM2894およびKM2895、ならびにラットモノクローナル抗体KM2896、KM2897、KM2898、KM2899、KM2900、KM2901、KM2903、KM2904、KM2906、KM2909およびKM2910により、MT4 - MMPの分子量に相当する70kDa(図中、矢印で表示)付近のバンドが検出された。ま

40

50

たMT5-MMPに対して、これらすべてのモノクローナル抗体は反応性を示さなかった。MT4-MMP、MT5-MMPに反応しない抗PEG化顆粒球コロニー刺激因子モノクローナル抗体KM511(特開平8-165300;FERMBP-4880)については、70kDa付近のバンドに特異的に反応しなかった。

以上の結果より、抗MT4-MMP触媒ドメインモノクローナル抗体は細胞上のMT4-MMP蛋白質をウエスタンブロッティングにより検出することができ、炎症、癌などのMT4-MMPが関与する各種疾病の診断に応用可能であることが示された。

(9) 免疫細胞染色

実施例2(5)で選択された抗MT4-MMPモノクローナル抗体を用い、細胞上に発現しているMT4-MMP蛋白質の免疫細胞染色による検出を検討した。

細胞は、COS1細胞(ATCC No. CRL-1650)、MT4-MMP遺伝子導入COS1およびMT5-MMP遺伝子導入COS1を用いた。MT4-MMP遺伝子導入COS1およびMT5-MMP遺伝子導入COS1については、W000/18805に記載の方法で製造した。

これらの細胞をトリプシンとEDTAの混合液を用いて浮遊化し、PBSで洗浄した後、細胞膜の抗体透過性を上げるため、100%メタノール(氷冷)にて4℃で10分間処理した。PBSで洗浄後、10μg/mLヒトイムノグロブリン(カッペル社製)にて室温で30分間ブロックした。細胞を 1×10^5 個/チューブで分注した後、遠心分離を行い、チューブの上清を除去し、抗MT4-MMPモノクローナル抗体の培養上清を加えて室温で30分間反応させた。

PBSで洗浄後、FITC標識抗マウスイムノグロブリン抗体(和光純薬社製)を100μL/チューブで分注し、4℃、30分間遮光反応させた。よくPBSで洗浄した後、セルアナライザー(コールター社;EPICS XLSYSTEMII)にて解析した。結果を表2に示す。

表2

mAb	反応性		
	COS1	MT4-MMP/COS1	MT5-MMP/COS1
KM2892	-	+	-
KM2893	-	++	-
KM2894	-	-	-
KM2895	-	++	-
KM2896	-	++	-
KM2897	-	++	-
KM2898	-	++	-
KM2899	-	++	+w
KM2900	-	+	-
KM2901	-	++	-
KM2903	-	++	-
KM2904	-	++	-
KM2906	-	++	+w
KM2909	-	++	-
KM2910	-	++	-

-: 反応なし、+w: 弱く反応、+: 反応性あり、++: 強く反応

COS1、MT4-MMP遺伝子導入COS1およびMT5-MMP遺伝子導入COS1細胞について、本発明の各種モノクローナル抗体KM2892、KM2893、KM2894、KM2895、KM2896、KM2897、KM2898、KM2899、KM2900、KM2901、KM2903、KM2904、KM2906、KM2909、

K M 2 9 1 0、およびネガティブコントロールでマウスの I g G 1 クラスの抗 P E G 化顆粒球コロニー刺激因子モノクローナル抗体 K M 5 1 1 (特開平 8 - 1 6 5 3 0 0 ; F E R M B P - 4 8 8 0) をそれぞれ反応させた結果を示している。

上述の抗 M T 4 - M M P モノクローナル抗体は、モノクローナル抗体 K M 2 8 9 4 を除いていずれも M T 4 - M M P 遺伝子導入 C O S 1 細胞との反応性が認められた。また、コントロールである C O S 1 細胞および M T 5 - M M P 遺伝子導入 C O S 1 細胞との反応性が認められなかった。

したがって、抗 M T 4 - M M P モノクローナル抗体は細胞上の M T 4 - M M P 蛋白質を免疫細胞染色により検出することができ、炎症、癌など M T 4 - M M P が関与する各種疾病の診断に応用可能であることが示された。

実施例 3 フローサイトメーターを用いた血球系細胞株細胞表面上の M T 4 - M M P 解析
ヒト細胞株として U 9 3 7 (A T C C C R L - 1 5 9 3) を用い、下記の様に解析を行った。

各種細胞 2×10^5 個をポリエチレンチューブ (日本ベクトンデッキンソン社製) に入れ、1500 rpm (400 x g) 3 分間遠心分離した。上清を捨てた後、1% B S A / P B S で 5 m g / m L の濃度に希釈した精製抗体抗 M T 4 - M M P 抗体 5 0 m L を添加した。コントロール抗体には、1% B S A / P B S で 5 m g / m L の濃度に希釈したラット I g G 2 b 抗体もしくはマウス I g G 2 a 抗体をそれぞれ用いた。

攪拌後、氷上で 3 0 分間静置し、反応させ、冷却した P B S を 2 m L 加えて攪拌した後、1500 rpm (400 x g) 3 分間遠心分離し、上清を除去した (以下、この操作を遠心洗浄と記す)。1% B S A / P B S で 1 0 0 倍希釈したビオチン化抗マウス I g 抗体 (ダコ社製) もしくはビオチン化抗ラット I g 抗体 (ダコ社製) 5 0 m L を 2 次抗体として添加した。攪拌後、氷上で 3 0 分間静置した。遠心洗浄後、蛍光標識であるアビジン (S t r e p t a v i d i n - F I T C、B D P h a r M i n g e n 社製) を 1% B S A / P B S で 2 0 0 倍に希釈し、アビジン希釈液 5 0 m L をさらに添加し、攪拌後、氷上で 3 0 分間静置した。遠心洗浄後、P B S を 5 0 0 m L 添加し、攪拌した後、F A C S c a n (日本ベクトンデッキンソン社製) にて測定した。

U 9 3 7 細胞に対する抗体の反応性の結果を第 2 図に示す。第 2 図に示した通り、本発明のモノクローナル抗体である K M 2 8 9 5、K M 2 8 9 6、K M 2 8 9 7 および K M 2 9 0 4 は、U 9 3 7 細胞に対して強い反応性を示した。以上の結果は、M T 4 - M M P 触媒ドメインを認識するモノクローナル抗体を用いることにより、細胞膜表面上の天然の M T 4 - M M P を検出することが可能であると判断された。一方、W O 0 0 / 1 8 8 0 5 で開示されている抗 M T 4 - M M P モノクローナル抗体である K M 2 5 6 1 および K M 2 5 6 2 は M T 4 - M M P の発現量が多いと考えられる M T 4 - M M P トランスフェクタントには反応する [W O 0 0 / 1 8 8 0 5] が、U 9 3 7 細胞に発現している細胞表面上の M T 4 - M M P に対して反応しなかった。

従って、本発明の M T 4 - M M P 触媒ドメインに対するモノクローナル抗体は、細胞上の M T 4 - M M P 蛋白質を免疫細胞染色により検出することができる。従って、癌、炎症疾患などの M T 4 - M M P が関与する各種疾病の診断に応用可能であることが示された。

実施例 4 サンドイッチ E L I S A 法による M T 4 - M M P 定量系の検討

実施例 2 で製造された抗 M T 4 - M M P モノクローナル抗体のすべての組み合わせでサンドイッチ E L I S A を行って M T 5 - M M P に反応せず、M T 4 - M M P 特異的にかつ強く反応性を示すモノクローナル抗体の組み合わせを検討した。

9 6 穴平底プレート (M a x i s o r p、日本インターメッド社製) に、P B S で希釈した 5 m g / m L の抗 M T 4 - M M P モノクローナル抗体 5 0 m l を加え 4 で一晩静置し、プレートにコーティングした (以下、この抗 M T 4 - M M P モノクローナル抗体をコーティング抗体と称す)。P B S で 3 回洗浄した後、1% B S A / P B S を 2 0 0 m L / 穴加え、室温 2 ~ 4 時間静置し、抗体をブロッキングした。1% B S A / P B S 除去後、あらかじめリフォールディングした M T 4 - M M P、トリプシンで活性化した M T 5 - M M P [W O 0 0 / 1 8 8 0 5] または実施例 5 で得られた動物血清を 1% B S A / P B S で

10

20

30

40

50

種々の濃度に希釈し、50 mLを穴に加え室温2時間反応した。0.05% Tween 20 / PBSで3回洗浄した後、1% BSA / PBSで希釈した2 mg / mLのラット抗MT4 - MMPモノクローナル抗体を50 mL / 穴に加え、室温で1時間反応した(以下、このラット抗MT4 - MMPモノクローナル抗体を検出抗体と称す)。0.05% Tween 20 / PBSで3回洗浄した後、1% BSA / PBSで希釈したビオチン化抗ラットIg (DAKO社製、1 / 4000希釈)を50 mL / ウェルに加え、室温で1時間反応した。0.05% Tween 20 / PBSで3回洗浄した後、1% BSA / PBSで希釈したホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ・アビジンD (Vector社製、1 / 4000希釈)を50 mL / ウェルに加え、室温で20分間静置した。0.05% Tween 20 / PBSで3回洗浄した後、ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ・アビジンDの基質である、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン (TMB、SIGMA - Aldrich社) 100 mL / 穴に加え室温で発色させ、100 mLの10 vol% H₂SO₄を加えて反応を停止した。オートマチックプレートリーダーEL340 (Molecular Devices社)を用いて、波長450 nmの吸光度を測定し、Delta Soft (Bio Metallics, Inc., Ver. 3 - 1.3B)により算出した。スタンダードカーブは4-parameterを用いた。

第3図に示した様に、コーティング抗体としてはKM2895、検出抗体としてはKM2904の組み合わせにより、10 ~ 5000 ng / mLの濃度範囲でMT4 - MMPを特異的に検出することができた。

また、本方法は、濃度既知のMT4 - MMP蛋白質を標準サンプルとして用いることにより、サンプル中のMT4 - MMPの定量も行うことができる。

実施例5 ラットコラーゲン誘発関節炎血清におけるMT4 - MMPの定量

(1) ラットコラーゲン誘発関節炎 (Collagen-induced arthritis: CIA) モデル

慢性関節リウマチモデルの一つであるCIAモデルは以下のように作製した。

12週令DAラット(雌性、日本チャールスリバー社製)を実験に供した。ウシ関節由来タイプIIコラーゲン(コラーゲン技術研修会製)は、0.3 vol% 酢酸溶液に溶解して1 mg / mLとし、等量のincomplete Freund's adjuvant(以下IFA, DIFCO社製)と氷冷下でポリトロン(KINEMATICA社製)を用いて混合し、エマルジョンを調製した。コラーゲンは、凍結乾燥品を用時に酢酸溶液に溶解して用いた。

ラットをエーテル麻酔下で尾根部を剃毛し、エマルジョン化したコラーゲン溶液を尾根部皮内に27G注射針を用いて100 μL / siteで投与して感作を行った(n = 6)。同時に無処置群を設け、正常群(n = 6)とした。

(2) 血清の調整

血清は正常群、CIA発症群から感作後32日目に採血し、セパラピッドチューブミニS(積水化学社製)に採取し、毎分3000回転(1500 × g)、4で20分間遠心分離(日立小型冷却遠心機himac CF7D、ローターRT3S3、日立工機社製)を行い回収した。

(3) CIAモデル血清中のMT4 - MMP定量

実施例4で構築したサンドイッチELISAを用いて、CIAモデル血清中のMT4 - MMPの発現を検出した。血清中MT4 - MMP検出の結果、ラットCIAにおいて無処置群に比較し、有意な上昇が認められた(第4図、p = 0.0195)。統計解析には統計解析ソフトSAS(Release 6.12、SAS Inc.)を使用し、Student's t-testにより有意差検定を行なった。

また、サンドイッチELISAは、濃度既知のMT4 - MMP蛋白質を標準サンプルとして用いることにより、血清中等のMT4 - MMPの定量も行うことができる。

産業上の利用可能性

本発明によれば、MT4 - MMPに特異的に反応し、免疫学的測定法によりMT4 - MMP蛋白質を特異的に検出または定量することが可能な抗MT4 - MMPモノクローナル抗

体が提供される。本発明の抗MT4-MMPモノクローナル抗体およびこれを用いた診断用キットは、MT4-MMPが関与する各種疾病の診断において、高感度で信頼性の高い検出を可能にする。また、細胞上のMT4-MMPにも反応することから、本発明のモノクローナル抗体を含有する医薬品はMT4-MMPが関与する各種疾病の治療において有用である。

「配列表フリーテキスト」

配列番号1 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号2 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号3 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号4 - 人工配列の説明：合成DNA

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD

<120> Monoclonal antibody against catalytic domain of MT4-MMP

<130> 11389W01

<140>

<141>

10

<150> JP2001-176256

<151> 2001-06-11

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

20

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 1

ggatccatat gcaggctcca gccccacca ag

32

<210> 2

30

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 2

ggcggcgcgt tacacagaact cccgcacacc gtac

34

<210> 3

<211> 20

40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 3

gctcggatcc actagtaacg

20

<210> 4

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 4

gtgtgatgga tatctgc

17

<210> 5

<211> 2423

<212> DNA

<213> Homo sapiens

20

<400> 5

ccggcggggg cgcccgagg agcggagggc gccgggctgc ggaacgcgaa gcggagggcg 60

cgggaccctg cacgcgccc ggggcccac gtgagcgcc atg egg cgc cgc gca 114
 Met Arg Arg Arg Ala
 1 5

gcc egg gga ccc ggc ceg ceg ccc cca ggg ccc gga etc tcg cgg ctg 162
 Ala Arg Gly Pro Gly Pro Pro Pro Pro Gly Pro Gly Leu Ser Arg Leu
 10 15 20 30

30

ceg ctg ctg ceg ctg ceg ctg ctg ctg ctg ctg gcg ctg ggg acc cgc 210
 Pro Leu Leu Pro Leu Pro Leu Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Thr Arg
 25 30 35

ggg ggc tgc gcc gcg ceg gaa ccc gcg egg cgc gcc gag gac etc agc 258
 Gly Gly Cys Ala Ala Pro Glu Pro Ala Arg Arg Ala Glu Asp Leu Ser
 40 45 50

40

ctg gga gtg gag tgg cta agc agg ttc ggt tac ctg ccc ceg get gac 306
 Leu Gly Val Glu Trp Leu Ser Arg Phe Gly Tyr Leu Pro Pro Ala Asp

55	60	65		
ccc aca aca ggg cag ctg cag acg caa gag gag ctg tct aag gcc atc			354	
Pro Thr Thr Gly Gln Leu Gln Thr Gln Glu Glu Leu Ser Lys Ala Ile				
70	75	80	85	
aca gcc atg cag cag ttt ggt ggc ctg gag gcc acc ggc atc ctg gac			402	
Thr Ala Met Gln Gln Phe Gly Gly Leu Glu Ala Thr Gly Ile Leu Asp				
90	95	100		
gag gcc acc ctg gcc ctg atg aaa acc cca cgc tgc tcc ctg cca gac			450	
Glu Ala Thr Leu Ala Leu Met Lys Thr Pro Arg Cys Ser Leu Pro Asp				
105	110	115		10
ctc cct gtc ctg acc cag gct cgc agg aga cgc cag gct cca gcc ccc			498	
Leu Pro Val Leu Thr Gln Ala Arg Arg Arg Arg Gln Ala Pro Ala Pro				
120	125	130		
acc aag tgg aac aag agg aac ctg tgc tgg agg gtc cgg acg ttc cca			546	
Thr Lys Trp Asn Lys Arg Asn Leu Ser Trp Arg Val Arg Thr Phe Pro				
135	140	145		20
cgg gac tca cca ctg ggg cac gac acg gtg cgt gca ctc atg tac tac			594	
Arg Asp Ser Pro Leu Gly His Asp Thr Val Arg Ala Leu Met Tyr Tyr				
150	155	160	165	
gcc ctc aag gtc tgg agc gac att gcg ccc ctg aac ttc cac gag gtg			642	
Ala Leu Lys Val Trp Ser Asp Ile Ala Pro Leu Asn Phe His Glu Val				
170	175	180		30
gcg ggc agc acc gcc gac atc cag atc gac ttc tcc aag gcc gac cat			690	
Ala Gly Ser Thr Ala Asp Ile Gln Ile Asp Phe Ser Lys Ala Asp His				
185	190	195		
aac gac ggc tac ccc ttc gac gcc cgg cgg cac cgt gcc cac gcc ttc			738	
Asn Asp Gly Tyr Pro Phe Asp Ala Arg Arg His Arg Ala His Ala Phe				
200	205	210		
ttc ccc ggc cac cac cac acc gcc ggg tac acc cac ttt aac gat gac			786	
Phe Pro Gly His His His Thr Ala Gly Tyr Thr His Phe Asn Asp Asp				
215	220	225		40

gag gcc tgg acc ttc cgc tcc tcg gat gcc cac ggg atg gac ctg ttt	834	
Glu Ala Trp Thr Phe Arg Ser Ser Asp Ala His Gly Met Asp Leu Phe		
230	235	240
245		
gca gtg gct gtc cac gag ttt ggc cac gcc att ggg tta agc cat gtg	882	
Ala Val Ala Val His Glu Phe Gly His Ala Ile Gly Leu Ser His Val		
250	255	260
gcc gct gca cac tcc atc atg cgg ccg tac tac cag ggc ccg gtg ggt	930	
Ala Ala Ala His Ser Ile Met Arg Pro Tyr Tyr Gln Gly Pro Val Gly		10
265	270	275
gac ccg ctg cgc tac ggg ctc ccc tac gag gac aag gtg cgc gtc tgg	978	
Asp Pro Leu Arg Tyr Gly Leu Pro Tyr Glu Asp Lys Val Arg Val Trp		
280	285	290
cag ctg tac ggt gtg egg gag tct gtg tct ccc acg gcg cag ccc gag	1026	
Gln Leu Tyr Gly Val Arg Glu Ser Val Ser Pro Thr Ala Gln Pro Glu		
295	300	305
gag cct ccc ctg ctg ccg gag ccc cca gac aac cgg tcc agc gcc ccg	1074	
Glu Pro Pro Leu Leu Pro Glu Pro Pro Asp Asn Arg Ser Ser Ala Pro		
310	315	320
325		
ccc agg aag gac gtg ccc cac aga tgc agc act cac ttt gac gcg gtg	1122	
Pro Arg Lys Asp Val Pro His Arg Cys Ser Thr His Phe Asp Ala Val		
330	335	340
gcc cag atc egg ggt gaa gct ttc ttc ttc aaa ggc aag tac ttc tgg	1170	
Ala Gln Ile Arg Gly Glu Ala Phe Phe Phe Lys Gly Lys Tyr Phe Trp		30
345	350	355
egg ctg acg egg gac cgg cac ctg gtg tcc ctg cag ccg gca cag atg	1218	
Arg Leu Thr Arg Asp Arg His Leu Val Ser Leu Gln Pro Ala Gln Met		
360	365	370
cac cgc ttc tgg egg ggc ctg ccg ctg cac ctg gac agc gtg gac gcc	1266	
His Arg Phe Trp Arg Gly Leu Pro Leu His Leu Asp Ser Val Asp Ala		
375	380	385
		40

gtg tac gag cgc acc age gac cac aag atc gtc ttc ttt aaa gga gac	1314	
Val Tyr Glu Arg Thr Ser Asp His Lys Ile Val Phe Phe Lys Gly Asp		
390	395	400 405
agg tac tgg gtg ttc aag gac aat aac gta gag gaa gga tac cgc cgc	1362	
Arg Tyr Trp Val Phe Lys Asp Asn Asn Val Glu Glu Gly Tyr Pro Arg		
	410	415 420
ccc gtc tcc gac ttc age ctc ccg cct ggc ggc atc gac gct gcc ttc	1410	
Pro Val Ser Asp Phe Ser Leu Pro Pro Gly Gly Ile Asp Ala Ala Phe		10
	425	430 435
tcc tgg gcc cac aat gac agg act tat ttc ttt aag gac cag ctg tac	1458	
Ser Trp Ala His Asn Asp Arg Thr Tyr Phe Phe Lys Asp Gln Leu Tyr		
	440	445 450
tgg cgc tac gat gac cac acg agg cac atg gac ccc ggc tac ccc gcc	1506	
Trp Arg Tyr Asp Asp His Thr Arg His Met Asp Pro Gly Tyr Pro Ala		
	455	460 465
		20
cag agc ccc ctg tgg agg ggt gtc ccc agc acg ctg gac gac gcc atg	1554	
Gln Ser Pro Leu Trp Arg Gly Val Pro Ser Thr Leu Asp Asp Ala Met		
470	475	480 485
cgc tgg tcc gac ggt gcc tcc tac ttc ttc cgt ggc cag gag tac tgg	1602	
Arg Trp Ser Asp Gly Ala Ser Tyr Phe Phe Arg Gly Gln Glu Tyr Trp		
	490	495 500
aaa gtg ctg gat ggc gag ctg gag gtg gca ccc ggg tac cca cag tcc	1650	
Lys Val Leu Asp Gly Glu Leu Glu Val Ala Pro Gly Tyr Pro Gln Ser		30
	505	510 515
acg gcc cgg gac tgg ctg gtg tgt gga gac tca cag gcc gat gga tct	1698	
Thr Ala Arg Asp Trp Leu Val Cys Gly Asp Ser Gln Ala Asp Gly Ser		
	520	525 530
gtg gct gcg ggc gtg gac gcg gca gag ggg ccc cgc gcc cct cca gga	1746	
Val Ala Ala Gly Val Asp Ala Ala Glu Gly Pro Arg Ala Pro Pro Gly		
	535	540 545
		40
caa cat gac cag age cgc tcg gag gac ggt tac gag gtc tgc tca tgc	1794	

Gln His Asp Gln Ser Arg Ser Glu Asp Gly Tyr Glu Val Cys Ser Cys
 550 555 560 565

acc tet ggg gca tcc tet ccc ccg ggg gcc cca ggc cca ctg gtg gct 1842
 Thr Ser Gly Ala Ser Ser Pro Pro Gly Ala Pro Gly Pro Leu Val Ala
 570 575 580

gcc acc atg etg ctg ctg ctg ccg cca ctg tea cca ggc gcc ctg tgg 1890
 Ala Thr Met Leu Leu Leu Leu Pro Pro Leu Ser Pro Gly Ala Leu Trp
 585 590 595

10

aca gcg gcc cag gcc ctg acg eta tgacacacag cgcgagccca tgagaggaca 1944
 Thr Ala Ala Gln Ala Leu Thr Leu
 600 605

gaggcgggtgg gacagcctgg ccacagaggg caaggactgt gccggagtec ctgggggagg 2004

tgctggcgcg g gatgaggac gggccaccct ggcaccggaa ggccagcaga gggcacggcc 2064

cgccagggtct gggcaggtct aggtggcaag gacggagctg tccctagtg agggactgtg. 2124

20

ttgactgacg agccgagggg tggccgetcc agaagggtgc ccagteagge cgcaccgccc 2184

ccagcctect ccggccctgg agggagcacc tgggctggg gcccacccc tetctgtgcc 2244

ggcgccacea accccaccca cactgctgcc tgggtgetccc gccgcccac agggcctccg 2304

tecccaggte ccagtgggg cagccctccc cacagacgag cccccacat ggtgcccggg 2364

cagtccccc ctgtgacggg ttccagacca acatgacctc tccctgettt gtagcggcc 2423

30

<210> 6

<211> 605

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Arg Arg Arg Ala Ala Arg Gly Pro Gly Pro Pro Pro Pro Gly Pro
 1 5 10 15

40

Gly Leu Ser Arg Leu Pro Leu Leu Pro Leu Pro Leu Leu Leu Leu Leu

Gly Met Asp Leu Phe Ala Val Ala Val His Glu Phe Gly His Ala Ile
 245 250 255

Gly Leu Ser His Val Ala Ala Ala His Ser Ile Met Arg Pro Tyr Tyr
 260 265 270

Gln Gly Pro Val Gly Asp Pro Leu Arg Tyr Gly Leu Pro Tyr Glu Asp
 275 280 285

Lys Val Arg Val Trp Gln Leu Tyr Gly Val Arg Glu Ser Val Ser Pro
 290 295 300

10

Thr Ala Gln Pro Glu Glu Pro Pro Leu Leu Pro Glu Pro Pro Asp Asn
 305 310 315 320

Arg Ser Ser Ala Pro Pro Arg Lys Asp Val Pro His Arg Cys Ser Thr
 325 330 335

His Phe Asp Ala Val Ala Gln Ile Arg Gly Glu Ala Phe Phe Phe Lys
 340 345 350

20

Gly Lys Tyr Phe Trp Arg Leu Thr Arg Asp Arg His Leu Val Ser Leu
 355 360 365

Gln Pro Ala Gln Met His Arg Phe Trp Arg Gly Leu Pro Leu His Leu
 370 375 380

Asp Ser Val Asp Ala Val Tyr Glu Arg Thr Ser Asp His Lys Ile Val
 385 390 395 400

30

Phe Phe Lys Gly Asp Arg Tyr Trp Val Phe Lys Asp Asn Asn Val Glu
 405 410 415

Glu Gly Tyr Pro Arg Pro Val Ser Asp Phe Ser Leu Pro Pro Gly Gly
 420 425 430

Ile Asp Ala Ala Phe Ser Trp Ala His Asn Asp Arg Thr Tyr Phe Phe
 435 440 445

40

Lys Asp Gln Leu Tyr Trp Arg Tyr Asp Asp His Thr Arg His Met Asp
 450 455 460

Pro Gly Tyr Pro Ala Gln Ser Pro Leu Trp Arg Gly Val Pro Ser Thr
 465 470 475 480

Leu Asp Asp Ala Met Arg Trp Ser Asp Gly Ala Ser Tyr Phe Phe Arg
 485 490 495

Gly Gln Glu Tyr Trp Lys Val Leu Asp Gly Glu Leu Glu Val Ala Pro
 500 505 510

Gly Tyr Pro Gln Ser Thr Ala Arg Asp Trp Leu Val Cys Gly Asp Ser
 515 520 525

10

Gln Ala Asp Gly Ser Val Ala Ala Gly Val Asp Ala Ala Glu Gly Pro
 530 535 540

Arg Ala Pro Pro Gly Gln His Asp Gln Ser Arg Ser Glu Asp Gly Tyr
 545 550 555 560

Glu Val Cys Ser Cys Thr Ser Gly Ala Ser Ser Pro Pro Gly Ala Pro
 565 570 575

20

Gly Pro Leu Val Ala Ala Thr Met Leu Leu Leu Leu Pro Pro Leu Ser
 580 585 590

Pro Gly Ala Leu Trp Thr Ala Ala Gln Ala Leu Thr Leu
 595 600 605

【図面の簡単な説明】

第1図は、MT4-MMP触媒ドメインを抗原として用いて得られた本発明のモノクローナル抗体のMT4-MMP触媒ドメインまたは大腸菌蛋白に対する反応性を、酵素免疫測定法で調べた結果を示すグラフである。 30

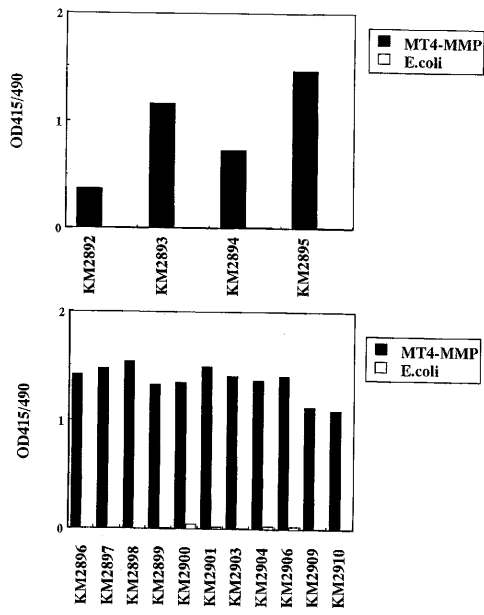
第2図は、MT4-MMP遺伝子導入COS-1細胞膜上に存在するMT4-MMP蛋白質を、本発明のモノクローナル抗体を用いた免疫細胞染色により検出した測定結果を示すチャートである。COS-1、MT5-MMP遺伝子導入COS-1をコントロール細胞として使用した。横軸は蛍光強度、縦軸は細胞数をそれぞれ表す。

第3図は、MT4-MMP蛋白質及びMT5-MMP蛋白質を、本発明のモノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISA系により検出した結果を示すグラフである。 はMT4-MMPに対する反応性を、 はMT5-MMPに対する反応性を示す。

第4図は、マウスコラーゲン誘発関節炎(CIA)モデル血清中に存在するMT4-MMP蛋白質を、本発明のモノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISA系により検出した結果を示すグラフである。正常ラット、関節炎発症ラット血清中のMT4-MMP蛋白質量を比較した。 40

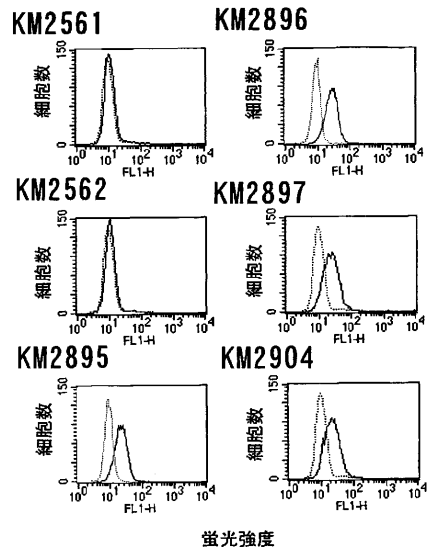
【 図 1 】

第 1 図



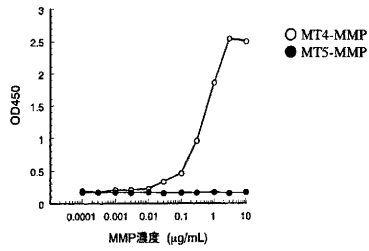
【 図 2 】

第 2 図



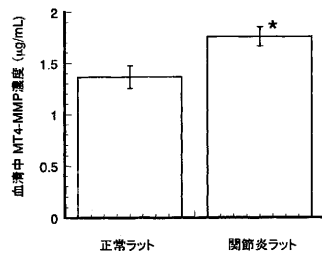
【 図 3 】

第 3 図



【 図 4 】

第 4 図



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP02/05788
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl. ⁷ C12N15/12, C12N15/08, C07K16/40, C12N5/20, A61K39/395, A61P29/00, A61P35/00, A61P43/00, G01N33/53 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) Int.Cl. ⁷ C12N15/12, C12N15/08, C06K16/40, C12N5/20, A61K39/395, A61P29/00, A61P35/00, A61P43/00, G01N33/53 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) SwissProt/PIR/GeneSeq, Medline/WPIDS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	English W.R. et al., Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MMP17) has tumor necrosis factor-alpha convertase activity but does not activate pro-MMP2, J.Biol.Chem.(2000 May), Vol.275, No.19, pages 14046 to 14055	1-32
Y	Wang Y. et al., Catalytic activities and substrate specificity of the human membrane type 4 matrix metalloproteinase catalytic domain, J.Biol.Chem., (1999), Vol.274, No.46, pages 33043 to 33049	1-32
Y	Fuente XS. et al., Molecular cloning of a novel membrane-type matrix metalloproteinase from a human breast carcinoma, (1996), Cancer Res., Vol.56, pages 944 to 949	6-32
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document 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 "I" 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 "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 18 September, 2002 (18.09.02)		Date of mailing of the international search report 08 October, 2002 (08.10.02)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP02/05788

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KAJITA M. et al., Human membrane type-4 matrix metalloproteinase (MT4-MMP) is encoded by a novel major transcript: isolation of complementary DNA clones for human and mouse mt4-mmp transcripts, (1999), FEBS Lett., Vol.457, pages 353 to 356	6-32
A	WO 00/18805 A (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 06 April, 2000 (06.04.00), & EP 118622 A1	1-32
A	Pantoliano M.W. et al., Conformational stability, folding, and ligand-binding affinity of single-chain Fv immunoglobulin fragments expressed in Escherichia coli, Biochemistry, (1991), Vol.30, No.42, pages 10117 to 10125	14-16
A	Robert EB. et al., Single-chain antigen-binding proteins, Science, (1988), Vol.242, pages 423 to 426	14-16
A	Webbwe KO. et al., Preparation and characterization of a disulfide-stabilized Fv fragment of the anti-tac antibody: comparison with its single-chain analog, (1995), Mol.Immunol., Vol.32, No.4, pages 249 to 258	14,17,18
A	Webbwe KO. et al., Rapid and specific uptake of anti-tac disulfide-stabilized Fv by interleukin-2 receptor-bearing tumors, (1995), Cancer Res., Vol.55, pages 318 to 323	19
A	Jones PT. et al., Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse, (1986), Nature, Vol.321, pages 522 to 525	11-13

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1998)

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JPO2/05788
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl. C12N15/12, C12N15/08, C07K16/40, C12N5/20, A61K39/395, A61P29/00, A61P35/00, A61P43/00, G01N33/53		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl. C12N15/12, C12N15/08, C07K16/40, C12N5/20, A61K39/395, A61P29/00, A61P35/00, A61P43/00, G01N33/53		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) SwissProt/PIR/GeneSeq, Medline/WPIDS(STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名、及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	English W. R. et al. Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MMP17) has tumor necrosis factor-alpha convertase activity but does not activate pro-MMP2, J. Biol. Chem. (2000 May), Vol. 275, No. 19, p. 14046-14055	1-32
Y	Wang Y. et al., Catalytic activities and substrate specificity of the human membrane type 4 matrix metalloproteinase catalytic domain, J. Biol. Chem., (1999), Vol. 274, No. 46, p. 33043-33049	1-32
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 の日後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 18. 09. 02	国際調査報告の発送日 08.10.02	
国際調査機関の名称及び先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 光本美奈子	4B 9359
	電話番号 03-3581-1101	内線 3448

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JPO2/05788
C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Puente XS. et al., Molecular cloning of a novel membrane-type matrix metalloproteinase from a human breast carcinoma, (1996), Cancer Res. Vol. 56, p. 944-949	6-32
Y	Kajita M. et al., Human membrane type-4 matrix metalloproteinase (MT4-MMP) is encoded by a novel major transcript: isolation of complementary DNA clones for human and mouse mt4-mmp transcripts, (1999), FEBS Lett., Vol. 457, p. 353-356	6-32
A	WO 00/18805 A (Kyowa Hakko Kogyo co. Ltd.) 2000.04.06 & EP 118622 A1	1-32
A	Pantoliano M. W. et al., Conformational stability, folding, and ligand-binding affinity of single-chain Fv immunoglobulin fragments expressed in Escherichia coli, Biochemistry, (1991), Vol. 30, No. 42, p. 10117-10125	14-16
A	Robert EB. et al., Single-chain antigen-binding proteins, Science, (1988), Vol. 242, p. 423-426	14-16
A	Webbwe KO. et al., Preparation and characterization of a disulfide-stabilized Fv fragment of the anti-tac antibody: comparison with its single-chain analog, (1995), Mol. Immunol., vol. 32., No. 4, p. 249-258	14, 17, 18
A	Webbwe KO. et al., Rapid and specific uptake of anti-tac disulfide-stabilized Fv by interleukin-2 receptor-bearing tumors, (1995), Cancer Res., Vol. 55, p. 318-323	19
A	Jones PT. et al., Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse, (1986), Nature, Vol. 321, p. 522-525	11-13

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	
C 0 7 K 16/46	C 0 7 K 16/46	
C 0 7 K 19/00	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 N 5/10	G 0 1 N 33/53	S
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/577	B
G 0 1 N 33/577	C 1 2 N 5/00	B
// C 1 2 P 21/08	C 1 2 P 21/08	

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

专利名称(译)	与mt4-mmp催化域结合的单克隆抗体		
公开(公告)号	JPWO2002101046A1	公开(公告)日	2004-09-24
申请号	JP2003503796	申请日	2002-06-11
申请(专利权)人(译)	协和醱酵工业株式会社		
[标]发明人	三木 一郎 太田 聡 設楽 研也 古谷 安希子		
发明人	三木 一郎 太田 聡 設楽 研也 古谷 安希子		
IPC分类号	C12N15/02 A61K39/00 A61K39/395 A61P29/00 A61P35/00 A61P43/00 C07K16/40 C07K16/46 C07K19/00 C12N5/10 C12N5/20 C12N9/64 C12N15/08 C12N15/12 G01N33/53 G01N33/577 C12P21/08		
CPC分类号	A61P29/00 A61P35/00 A61P43/00 C07K16/40 C07K2317/24 C12N9/6491		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.C A61K39/395.N A61P29/00.101 A61P43/00.105 C07K16/40 C07K16/46 C07K19/00 G01N33/53.S G01N33/577.B C12N5/00.B C12P21/08		
优先权	2001176256 2001-06-11 JP		
其他公开文献	JPWO2002101046A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

特异性结合MT4-MMP (膜型基质金属蛋白酶) 催化域的单克隆抗体是新的。还包括以下独立权利要求：(1) 产生新型单克隆抗体的杂交瘤；(2) 通过使用新型单克隆抗体对MT4-MMP催化结构域亚单位进行免疫学检测；(3) 通过使用新型单克隆抗体对MT4-MMP催化亚基进行免疫定量；(4) 使用新型单克隆抗体诊断MT4-MMP参与的疾病；(5) 以新型单克隆抗体为有效成分的MT4-MMP参与疾病的诊断；(6) 以新型单克隆抗体为有效成分的MT4-MMP参与疾病的治疗方法；(7) 含有新型单克隆抗体的试剂；(8) 用于检测MT4-MMP参与疾病的试剂盒，其包含(7)的试剂。活性：抗炎；抗类风湿；抗关节炎 抑制细胞生长。没有给出生物学数据。作用机理：未给出。

mAb	反応性		
	COS1	MT4-MMP/COS1	MT5-MMP/COS1
KM2892	-	+	-
KM2893	-	++	-
KM2894	-	-	-
KM2895	-	++	-
KM2896	-	++	-
KM2897	-	++	-
KM2898	-	++	-
KM2899	-	++	+w
KM2900	-	+	-
KM2901	-	++	-
KM2903	-	++	-
KM2904	-	++	-
KM2906	-	++	+w
KM2909	-	++	-
KM2910	-	++	-

-: 反応なし、+w: 弱く反応、+: 反応性あり、++: 強く反応