(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2008-509881
(P2008-509881A)
(43) 公表日 平成20年4月3日(2008.4.3)

(51) Int.Cl.		F I			テーマコード (参考)
C07K 16/18	**(2006.01)**	C07K	16/18		4B024
C12N 15/02	**(2006.01)**	C12N	15/00	C	4B064
C12N 5/10	**(2006.01)**	C12N	5/00	B	4B065
C12P 21/08	**(2006.01)**	C12P	21/08		4C085
G01N 33/53	**(2006.01)**	G01N	33/53	S	4H045

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 26 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2007-514145 (P2007-514145)
(86) (22) 出願日 平成17年6月1日 (2005.6.1)
(85) 翻訳文提出日 平成19年1月29日 (2007.1.29)
(86) 国際出願番号 PCT/GB2005/050077
(87) 国際公開番号 WO2005/118645
(87) 国際公開日 平成17年12月15日 (2005.12.15)
(31) 優先権主張番号 091280
(32) 優先日 平成16年6月3日 (2004.6.3)
(33) 優先権主張国 タイ (TH)
(31) 優先権主張番号 0418415.6
(32) 優先日 平成16年8月18日 (2004.8.18)
(33) 優先権主張国 英国 (GB)

(71) 出願人 506402344
ザ・ナショナル・リサーチ・カウンセル・オブ・タイランド
タイ王国，１０９００，バンコク，チャトゥチャク，パホリョチン・ロード１９６

(71) 出願人 506402768
ザ・タイランド・リサーチ・ファンド
タイ王国，１０４００，バンコク，サムセンナイ・ファヤタイ，パホリョチン・ロード９７９，ＳＭタワー１４Ｆ

(71) 出願人 506402355
チアング・マイ・ユニバーシティ
タイ王国，５０２００，チアング・マイ，ファカルティ・オブ・メディシン，デパートメント・オブ・バイオケミストリ
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】コンドロイチン硫酸エピトープに対する抗体

(57)【要約】
【課題】関節炎や他の軟骨劣化をテストする抗体を提供する。関節滑液流体における軟骨劣化産生物を検出し早い段階での診断テストを可能にする。病気をモニタリングするだけでなく病気の異なる段階での予後マーカーとしても役立つテスト用抗体を提供する。
【解決手段】コンドロイチン硫酸エピトープに特化するＷＦ６抗体と、かかる抗体を産生するハイブリドーマセルラインである。この抗体は軟骨及び肉腫のような結合組織の病気の診断と治療に有用である。テストキット及び薬剤も提供する。セルラインＷＦ６又はその機能的な誘導体により産生されるＷＦ６抗体、あるいはＷＦ６抗体に対する均等な特性を有する抗体又はその機能的な誘導体である。アクセッション番号ＰＴＡ－６１５７のもとで、ＡＴＣＣによりデポジットされたハイブリドーマセルも提供する。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
セルラインＷＦ６あるいはその機能的な誘導体により産生されるＷＦ６抗体、あるいは前記ＷＦ６抗体に対する均等な特性を有する抗体又はその機能的な誘導体。
【請求項２】
アクセッション番号ＰＴＡ－６１５７のもとで、アメリカンタイプカルチャーコレクション（ＡＴＣＣ）によりデポジットされたハイブリドーマセル。
【請求項３】
請求項２のセルにより産生される抗体又はその機能的な誘導体。
【請求項４】
８シュガーモノマーを包含するコンドロイチン硫酸オリゴ糖分エピトープを認識する抗体又はその機能的な誘導体で、前記エピトープは少なくとも１つのコンドロイチン６硫酸ユニットを包含している抗体又はその機能的な誘導体。
【請求項５】
前記コンドロイチン６硫酸ユニットがターミナルユニットである請求項４記載の抗体。
【請求項６】
前記エピトープはさらに少なくとも１つのコンドロイチン４硫酸ユニットを包含する請求項４又は５記載の抗体。
【請求項７】
抗体を産生する方法であって、
　好適な成長媒体の中で、アクセッション番号ＰＴＡ－６１５７のもとでＡＴＣＣによりデポジットされたハイブリドーマセル、あるいはセルラインＰＴＡ－６１５７により産生されるＷＦ６抗体に対して均等な特性を有する抗体を産生するハイブリドーマセルを培養する工程と、
　抗体を得るための上澄み液成長物を収穫する工程とを包含する抗体産生方法。
【請求項８】
モノクローナル抗体を産生する方法であって、
　アクセッション番号ＰＴＡ－６１５７のもとでＡＴＣＣによりデポジットされたハイブリドーマセル、あるいはセルラインＰＴＡ－６１５７により産生されたＷＦ６抗体に対して均等な特性を有する抗体を産生するハイブリドーマセルを、宿主の哺乳動物の腹膜内へと注入する工程と、
　腫瘍を発育させる工程と、
　前記宿主の哺乳動物から腹水流体を抽出する工程とを包含するモノクローナル抗体産生方法。
【請求項９】
前記哺乳動物はねずみ，りす，ビーバーなどの齧歯類動物である請求項８記載の抗体産生方法。
【請求項１０】
前記哺乳動物はバルブ／シーマウスである請求項９記載の抗体産生方法。
【請求項１１】
モノクローナル抗体を産生する方法であって、
　アクセッション番号ＰＴＡ－６１５７のもとでＡＴＣＣによりデポジットされたハイブリドーマセル、あるいはセルラインＰＴＡ－６１５７により産生されたＷＦ６抗体に対して均等な特性を有する抗体を産生するハイブリドーマセルから誘導された腫瘍を有する宿主の哺乳動物から腹水流体を抽出する工程を包含するモノクローナル抗体産生方法。
【請求項１２】
結合組織の病気を診断する方法であって、
　患者からサンプルを取得する工程と、
　そのサンプルを、セルラインＰＴＡ－６１５７により産生されたＷＦ６抗体、あるいはＷＦ６抗体に対して均等な特性を有する抗体、あるいはその機能的な誘導体に、接触させ

る工程と、
前記抗体が前記サンプルに結合するのを検出する工程とを包含する病気診断方法。
【請求項１３】
前記サンプルは関節滑液流体から取得されたものである請求項１２記載の病気診断方法。
【請求項１４】
前記検出工程は、ＥＬＩＳＡ，間接ＥＬＩＳＡ，競争関係ＥＬＩＳＡ，サンドイッチＥＬＩＳＡ，放射線免疫分析，蛍光免疫分析，化学発光免疫分析，免疫ブロッティング，免疫組織着色，流体注入分析，免疫バイオセンサーを包含するグループから選定される請求項１２記載の病気診断方法。
【請求項１５】
前記検出工程はさらに前記サンプル内で結合している抗体のレベルを計量化する工程を包含する請求項１２記載の病気診断方法。
【請求項１６】
前記結合組織の病気は、骨の関節炎，リューマチ性関節炎，肉腫を含む結合組織のガンを包含するグループから選定される請求項１２記載の病気診断方法。
【請求項１７】
ＷＦ６抗体、あるいはＷＦ６抗体に対する均等な特性を有する抗体、あるいはその機能的な誘導体を、結合組織の病気の診断に用いる薬剤を準備するために用いるＷＦ６抗体の使用方法。
【請求項１８】
結合組織の病気を診断する方法であって、
サンプル内に少なくとも８シュガーモノマーを包含し、少なくともその１つがコンドロイチン６硫酸であるコンドロイチン硫酸オリゴ糖分の存在を検出する工程を包含する病気診断方法。
【請求項１９】
サンプル内に少なくとも８シュガーモノマーを包含し、少なくともその１つがコンドロイチン６硫酸であるコンドロイチン硫酸オリゴ糖分を検出する方法であって、
そのサンプルを、ＷＦ６抗体、あるいはＷＦ６抗体に対して均等な特性を有する抗体、あるいはその機能的な誘導体に、接触させる工程と、
前記抗体が前記サンプルに結合するのを検出する工程とを包含する検出方法。
【請求項２０】
ＷＦ６抗体、あるいはＷＦ６抗体に対して均等な特性を有する抗体、あるいはその機能的な誘導体を包含するテストキット。
【請求項２１】
ＷＦ６抗体、あるいはＷＦ６抗体に対して均等な特性を有する抗体、あるいはその機能的な誘導体と、薬学的に受け入れ可能な担体とを包含する薬剤合成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は抗体（antibody）及び抗体を産生する方法に関する。また本発明は一面では診断方法、テストキット、及び抗体を用いた薬剤混合物にも関する。より詳細には、本発明における抗体はコンドロイチン（chondroitin ）硫酸に特化した抗体である。
【背景技術】
【０００２】
軟骨（cartilage ）の破壊の引き金となる骨の関節炎（osteoarthritis）や他の病気から生じる結合組織の病気は、経済的及び社会的な損失を引き起す原因であり、主要な健康問題（１，２）であると考えられている。
【０００３】
骨の関節炎は関節の軟骨の劣化によって生じる。７５歳以上の人口の６０％程度はこの病気（３）で苦しんでいると推定される。骨の関節炎の真の原因は今なお不明であるが、

いくつかの報告によれば、この病気が軟骨で成長する間、亜軟骨（subchondral ）や関節滑液（synovial）の膜にいくつかの変化が生じる。この病気の原因により、影響を受けた軟骨は外部からの衝撃に対する抵抗を失い、結合組織の弾性と円滑性をも失う。
【０００４】
リューマチ性関節炎は骨関節炎（ＯＡ）に類似した軟骨の進行性の破壊であるが、リューマチ性関節炎（ＲＡ）で苦しむ患者は、軟骨の主要構成要素である巨大分子が、蛋白質の加水分解によって裂けたり破壊されたりするのをを経験する。それから劣化した産生物が関節滑液流体へと解放される。関節軟骨の表面と軟骨厚さの劣化は、影響を受けた結合組織をＸ線診断することにより評価できるが、これはこれらの病気に罹患してから長い期間を経過した後に明らかになることであり、治療（４，５）をするにはしばしば遅すぎることになる。
【非特許文献１】この分野における多数の従来技術文献を本明細書の末尾に記載したので参照されたい。
【発明の開示】
【発明が解決しようとする課題】
【０００５】
従って、関節炎及び／又は他の軟骨劣化のための代替的なテストを供給することが、患者にとって利益となろう。特に、関節滑液流体における軟骨劣化産生物を検出することは、診断テストの発展を補助することになり、早い段階での診断テストを可能にすることになる。かかるテストは、病気をモニタリングするだけでなく、病気の異なる段階での予後マーカーとしても役立つことになる。
【０００６】
変質した結合組織の病気（６）を診断するためのテストは存在している。プロテオグリカン（proteoglycans ）とそれらの断片、特にグリコースアミノグリカン（glycosaminoglycans）の量を計量することが、プロテオグリカン断片に特定のモノクローナル抗体を与え、他の生物化学的マーカーを軟骨内に与える免疫分析によって実施されている。モノクローナル抗体は、アンチケラタン硫酸ペプチド（KS-peptides ）（７）、コンドロイチン硫酸エピトープ（CS-epitope）（８，９）及びヒアルロナン（hyaluronan）（HA）（１０）のようなプロテオグリカン断片に対して産生されてきた。これらの抗体及び免疫分析における結合プロテインを用いることにより、特にＥＬＩＳＡをベースとした技術により、これら生物分子の定量化テストを実施することが可能となってきた。
【０００７】
さらに、ある種のガンはこれら及び関連する生物分子（biomolecules）を過剰に産生することが知られている。さらに、ガンはそれらを包囲する結合組織における生物分子を劣化させる多くの酵素（enzymes ）を産生することができる。従って、コンドロイチン硫酸を含むプロテオグリカンは、ガンの存在を示す有用なマーカーとなり得るし、病気の予後あるいは病気の活動性を判断するためのポテンシャルマーカーとなり得る。
【０００８】
本発明者等は、特別なコンドロイチン硫酸エピトープに特化したモノクローナル（monoclonal）抗体を産生するハイブリドーマ（hybridoma ）セルライン（cell line ）を産生した。この抗体はＷＦ６と命名され、そのセルラインは、２００４年８月１１日に、アクセッション番号ＰＴＡ－６１５７のもとで、アメリカンタイプカルチャーコレクション（ＡＴＣＣ）により、ブタペスト条約に従ってデポジット（寄託）された。このセルラインは本明細書及び特許請求の範囲において「ＷＦ６セルライン」と表記するが、単に「ＷＦ６」と表記すればそれは抗体を意味する。ここに示される抗体は、コンドロイチン硫酸を包含する短いオリゴ糖分（oligosaccharide ）エピトープ、特に少なくとも１つのコンドロイチン６硫酸ユニットを含むエピトープを特別に認識するように示されている。
【０００９】
コンドロイチン硫酸の鎖は、繰り返すジサッカライド（disaccharide）ユニット、β１－３リンケージ内にリンクされたＤグルクロネート（glucuronate ）及びＮアセチルＤガ

ラクトースアミン（galactosamine ）硫酸から構成されている。コンドロイチン硫酸オリゴ糖分は多重のコンドロイチン硫酸ユニットから構成されている。コンドロイチン硫酸はフォームの番号で判別され、それらの主要なものはコンドロイチン４硫酸（コンドロイチン硫酸Ａ，ＣＳＡとしても表記される）、コンドロイチン６硫酸（コンドロイチン硫酸Ｃ，ＣＳＣとしても表記される）及びコンドロイチン硫酸Ｄ，ＣＳＤである。

【課題を解決するための手段】

【００１０】

本発明はその第１の面において、セルラインＷＦ６により産生されるＷＦ６抗体、又はＷＦ６抗体に対する均等な特性を有する抗体を提供する。

【００１１】

本発明はまたそのような抗体の機能的な誘導体（derivatives ）をも包含し、これは同一の特性を示す。機能的誘導体は、Ｆａｂ，Ｆａｂ’及びＦ（ａｂ）$_2$断片、単一鎖抗体、さらに抗体の化学的あるいは酵素による裂開により得られた機能的断片、あるいはファージ（phage ）ディスプレイ技術のような分子生物化学的方法により得られた機能的断片を含む。空想的な（chimeric）抗体もまた本発明の範囲内に包含される。本発明はさらに標識（labelled）抗体及びその機能的誘導体をも包含する。標識抗体には、酵素で結合された抗体、ビオチンを用いたバイオティニレイテッド（biotinylated）抗体、蛍光及び放射線による標識抗体、ゴールド（gold）標識抗体、その他類似の抗体を包含する。当業者であれば、かかる誘導体を用意するための好適な技術を認識できるであろうし、ＷＦ６抗体の特性を決定するのに用いられる詳細な技術を用いて、必要な特性を有する抗体が用意できることを確認できるであろう。

【００１２】

本発明はさらに、アクセッション番号ＰＴＡ－６１５７のもとで、２００４年８月１１日に、アメリカンタイプカルチャーコレクション（ＡＴＣＣ）によりデポジットされたハイブリドーマセルを提供する。本発明はさらにかかるセルの機能的な誘導体、すなわち、ＷＦ６抗体と同じ特性を有する抗体を産生することが可能なように誘導されたセルにも言及する。本発明はさらに前記セルにより産生される抗体、及びかかる抗体の機能的誘導体をも提供する。

【００１３】

本発明はさらに、８シュガー（sugar ）モノマー（monomers）を包含するコンドロイチン硫酸オリゴ糖分エピトープを認識するモノクローナル抗体で、前記エピトープが少なくとも１つのコンドロイチン６硫酸ユニットを包含しているモノクローナル抗体を提供する。好適には、前記コンドロイチン６硫酸ユニットはターミナル（terminal：末端）ユニットである。エピトープの検出は６サルファターゼ（sulfatase ）を有するオリゴ糖分の温浸（消化）により廃止され、また４サルファターゼによる温浸（消化）によっても廃止される。従って、エピトープはまた少なくとも１つのコンドロイチン４硫酸ユニットを包含すると信じられる。我々は、少なくともシーケンス（遺伝子配列）ΔＤＣＣＣはＷＦ６抗体により検出されると信じているし、他の特別なシーケンスもまた検出できるものと信じている。

【００１４】

本発明はさらに、モノクローナル抗体を産生する方法であって、好適な成長媒体の中で、アクセッション番号ＰＴＡ－６１５７のもとで、２００４年８月１１日に、アメリカンタイプカルチャーコレクション（ＡＴＣＣ）によりデポジットされたハイブリドーマセル、あるいはＷＦ６抗体に対して均等な特性を有する抗体を産生するハイブリドーマセルを培養する工程と、抗体を得るために上澄み液（supernatant ）成長物（growth）を収穫する工程とを包含する抗体産生方法を提供する。

【００１５】

本発明はさらに、モノクローナル抗体を産生する方法であって、アクセッション番号ＰＴＡ－６１５７のもとで、２００４年８月１１日に、アメリカンタイプカルチャーコレクション（ＡＴＣＣ）によりデポジットされたハイブリドーマセル、あるいはＷＦ６抗体に

対して均等な特性を有する抗体を産生するハイブリドーマセルを、宿主（host）の哺乳動物（mamal ）の腹膜（peritoneum）内へと注入する工程と、腫瘍（tumour）を発育させる工程と、前記宿主の哺乳動物から腹水（ascitic ）流体を抽出する工程とを包含するモノクローナル抗体産生方法を提供する。この方法はさらに、抗体を産生するための注入（注射）に先立って、宿主の哺乳動物に、例えばプリスタン（pristane）注射などにより食物補給（priming ）をする工程を含むことができる。宿主の哺乳動物はヒトではない動物が好適であり、より好適には、ねずみ，リス，ビーバーなどの齧歯動物、さらに好適にはマウスが望ましい。宿主の哺乳動物は同じタイプが好適であり、オプションとしてハイブリドーマを産生するのに用いられるセルの１つと同じ免疫学的な背景を有するものが望ましい。例えば、ハイブリドーマ（ＷＦ６セルラインの場合と同様の）を産生するために、セルラインＸ６３ＡＧ８．６５３が用いられるときは、宿主の哺乳動物はバルブ／シー（Balb/c）マウスが好適である。

【００１６】

本発明はさらに、モノクローナル抗体を産生する方法であって、アクセッション番号ＰＴＡ－６１５７のもとで、２００４年8月１１日に、アメリカンタイプカルチャーコレクション（ＡＴＣＣ）によりデポジットされたハイブリドーマセル、あるいはＷＦ６抗体に対して均等な特性を有する抗体を産生するハイブリドーマセルから誘導された腫瘍を有する宿主の哺乳動物から腹水流体を抽出する工程を包含するモノクローナル抗体産生方法を提供する。

【００１７】

本発明はさらに、結合組織の病気を診断する方法であって、患者からサンプルを取得する工程と、そのサンプルを、セルラインＷＦ６により産生されたＷＦ６抗体、あるいはＷＦ６抗体に対して均等な特性を有する抗体、あるいはその機能的な誘導体に、接触させる工程と、前記抗体が前記サンプルに結合するのを検出する工程とを包含する病気診断方法に言及する。抗体は、コンドロイチン６硫酸成分を有する断片を含む軟骨や他の結合組織の劣化した産生物を検出させるようになる。

【００１８】

前記サンプルは関節滑液流体、他の細胞流体、血清（serum ）、だ液（sputum）、組織サンプル、組織培養媒体、軟骨などから取得されることができる。

【００１９】

抗体とサンプルとの接触工程は、生物体の中で起こることもできるし、試験管の中で起こることもできるし、元の位置で起こることもできる。

【００２０】

前記検出工程は、ＥＬＩＳＡ，間接ＥＬＩＳＡ，競争関係（competitive ）ＥＬＩＳＡ，サンドイッチＥＬＩＳＡ，放射線免疫分析，蛍光免疫分析，化学発光免疫分析，免疫ブロッティング（blotting），免疫組織着色（immunohistostaining ），免疫クロマトグラフィー、免疫拡散、流体注入分析，共有焦点マイクロスコープ（顕微鏡）などの好適な検出手段を含むことができる。

【００２１】

前記検出工程はさらに前記サンプル内で結合している抗体のレベルを計量化する工程を包含することができ、このことは病気の予後を判断するのに役立つ。

【００２２】

前記結合組織の病気は、骨の関節炎，リューマチ性関節炎，肉腫を含む結合組織のガン、子宮頸部及び卵巣のガン、プロテオグリカンを含むコンドロイチン硫酸を産生するガン組織などを包含するグループ（群）から選定されることができる。

【００２３】

本発明はさらに、セルラインＷＦ６により産生されるＷＦ６抗体、あるいはＷＦ６抗体に対する均等な特性を有する抗体、あるいはそれらの機能的な誘導体を、結合組織の病気の診断に用いる薬剤（medicament）を準備するために用いるようなＷＦ６抗体の使用方法を提供する。

【００２４】
本発明はさらに、結合組織の病気を診断する方法であって、サンプル内に少なくとも８シュガーモノマーを包含し、少なくともその１つがコンドロイチン６硫酸であるコンドロイチン硫酸オリゴ糖分の存在を検出する工程を包含する病気診断方法を提供する。この検出は、好適には、ＷＦ６抗体あるいはそれと均等な特性を有する抗体を用いて実行される。

【００２５】
本発明はさらに、サンプル内に少なくとも８シュガーモノマーを包含し、少なくともその１つがコンドロイチン６硫酸であるコンドロイチン硫酸オリゴ糖分を検出する方法であって、そのサンプルを、ＷＦ６セルラインにより産生されたＷＦ６抗体、あるいはＷＦ６抗体に対して均等な特性を有する抗体、あるいはその機能的な誘導体に、接触させる工程と、前記抗体が前記サンプルに結合するのを検出する工程とを包含する検出方法を提供する。

【００２６】
本発明はさらに、セルラインＷＦ６により産生されたＷＦ６抗体、あるいはＷＦ６抗体に対して均等な特性を有する抗体、あるいはその機能的な誘導体を包含するテストキットを提供する。当業者であれば、抗体とターゲットとの結合を検出する好適なプロトコルを認識することができるであろうし、例として各種のプロトコルについて以下に説明する。このキットはさらに抗体とターゲットとの結合を検出するのに好適な１つ又は複数の試薬を含むことができる。

【００２７】
本発明はさらに、セルラインＷＦ６により産生されたＷＦ６抗体、あるいはＷＦ６抗体に対して均等な特性を有する抗体、あるいはその機能的な誘導体と、薬学的に受け入れ可能な担体（carrier ）とを包含する薬剤合成物を提供する。

【００２８】
本発明のこれら及び他の特徴は添付図面を参照した以下の記載によって明らかとなろう。

図１は各種コンドロイチン硫酸によるＷＦ６抗体の反応に対する阻止（inhibition）を示すグラフ。

図２はコラムクロマトグラフィーにより溶離されコンドロイチナーゼＡＢＣで消化されたＣＳ－Ｃからのコンドロイチン６硫酸を含むオリゴ糖分の断片の吸収プロフィルを示すグラフ。

図３は競争関係ＥＬＩＳＡを用いて、ＷＦ６抗体に対するＩＣ５０を、図２の各断片における尿酸のレベルとして示すグラフ。

図４はイオン交換ＦＰＬＣにより分析された図２の断片６のコラムプロフィルを示すグラフ。

【００２９】
図５はＷＦ６抗体の反応により基板のサルファターゼの効果を示すグラフ。

図６は第１の抗体としてＷＦ６を用いたヒトの皮膚組織断面の免疫着色を示す組織断面図。

図７は軟骨の劣化した動物モデルからの軟骨の尿酸の量を示すグラフ。

図８は動物モデルからのサンプルにおけるＷＦ６エピトープのレベルを時間軸上に示すグラフ。

【００３０】
図９は骨の関節炎及びリュウマチ性関節炎のヒト患者の血清におけるＷＦ６エピトープのレベルを示すグラフ。

図１０は軟骨の劣化した犬をモデルにしたＷＦ６エピトープのレベル上にキトサンポリサルフェートの効果を示すグラフ。

図１１はレチノイク酸により誘導された軟骨移植におけるＷＦ６エピトープのレベルを示すグラフ。

図１２はガン患者からの血清におけるＷＦ６エピトープを含むプロテオグリカンのレベルを示すグラフである。

【００３１】

１．コンドロイチン６硫酸に対する抗体を産生するハイブリドーマセルの産生

サメの胎児の軟骨から精製されたプロテオグリカン（Ａ１Ｄ１断片）が、バルブ／シーマウスにおける免疫応答を誘導するための抗原（antigen ）として用いられた。コンドロイチン６硫酸（コンドロイチン硫酸Ｃ；ＣＳ－Ｃ）に対する抗体の高い滴定濃度（titer ）を与えるマウスからの脾臓セルが、骨髄セルラインＸ６３Ａｇ８．６５３と５対１の比率で融合させられた。融合させられたセルは、ヒポキサンチン（hypoxanthine），アミノプテリン（aminopterine）及びサイミン（thymine ）を含む媒体中で培養された。培養されたセルはそれから、被覆抗原としてコンドロイチン６硫酸（コンドロイチン硫酸Ｃ）を用いたＥＬＩＳＡ技術によって、抗体の産生のための試験に向けられた。

【００３２】

ポジティブセルラインは、限定された希釈化技術を用いて、モノクローンとして分離された。コンドロイチン６硫酸に対する特性を有する抗体を結果的に産生したセルラインは、ＷＦ６と呼ばれ、この抗体のイソタイプ（isotype ）はカッパライト（Kappalight）鎖を有するＩｇＭであることが判明した。このセルラインは、アクセッション番号ＰＴＡ－６１５７のもとで、２００４年８月１１日に、アメリカンタイプカルチャーコレクション（ＡＴＣＣ）によりデポジットされた。

【００３３】

２．腹水流体及び血清不要媒体におけるコンドロイチン６硫酸に対するモノクローナル抗体の産生

このモノクローナル抗体ＷＦ６（ＭＡｂＷＦ６）の大量生産は、バルブ／シーマウスの腹腔（腹膜内凹所）内へと注入されるハイブリドーマセルを用いて、実行することができる。マウスには１週間前に０．５ミリリットルのプリスタン（pristane）が注射されていた。腹水流体のサンプルは、２～４週後に取得され、そこには大量のＭＡｂＷＦ６が含まれる。

【００３４】

大量生産のための別の技術としては、血清不要（serum-free）媒体を利用する方法がある。ハイブリドーマセルＷＦ６は、子牛の胎児の血清をイスカブ（Iscove's）で修正したイーグル（Eagle's ）の媒体を１０％とし、商用の血清不要媒体で増加させながら血清の量を５％、１％、０％に徐々に減少させて培養することができる。最終的な媒体は、成長ファクターで系統化された１００％血清不要媒体となる。このセルは５％CO_2内で、３７°Ｃ、湿度９５％で培養された。この媒体の上澄み液はさらに、ＥＬＩＳＡ技術によって抗体反応が評価され、アンモニウム硫酸沈殿及びクロマトグラフィーを用いてさらに精製されることができる。

【００３５】

３．ＥＬＩＳＡによるモノクローナル抗体ＷＦ６の特性決定

３．１　プレート（ポリスチレン，マキシソープヌンク製（Maxisorp Nunc ：商標名））にプロテオグリカン（断片Ａ１，サメの軟骨のプロテオグリカンの凝集体）を被覆し、１％ＢＳＡでブロックした。

【００３６】

３．２　ＭＡｂＷＦ６の最適な希釈と阻止液（inhibitor ）を含む反応阻止混合物を用意し、あるいは標準又は未知のサンプルの等量（それぞれ１７５＋１７５μＬ）をプラスチックチューブ（１．５ｍＬチューブ）内に用意し、３７°Ｃで１時間インキュベート（最適温度に保持）した。

【００３７】

３．３　反応阻止混合物を、ウェル（well）あたり１００μＬで、前記３．２の状態から被覆及びブロックがされたプレートに追加し、サンプル（３ウェル）をそれぞれ３倍にし、３７°Ｃで１時間インキュベートした。

【００３８】
３．４　プレートを洗浄バッファ（ＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎ０．０５％）で３回洗浄し、過酸化物が結合されたａｎｔｉ－ＩｇＭ抗体をウェルにつき１００μＬを追加する前に、乾燥させ、３７°Ｃで１時間インキュベートした。
【００３９】
３．５　プレートを洗浄バッファで３回洗浄し、ＯＰＤ基板（ウェルあたり１００μＬ）を追加する前に乾燥させ、暗がり（dark）内で１５分間インキュベートし、４Ｍ硫酸（ウェルあたり５０μＬ）を追加することにより反応を停止させた。それからプレートの吸収性をマイクロプレートリーダーで測定したところ、４９２／６９０ｎｍであった。
【００４０】
３．６　図１に、吸収性に対する阻止液（又は標準）の濃度を、反応阻止グラフにしてプロットして示した。テスト混合物の範囲は、コンドロイチン硫酸Ａ～Ｅ、及びＡ１Ｄ１プロテオグリカン断片である。
【００４１】
　モノクローナル抗体は、コンドロイチン６硫酸（ＣＳ－Ｃ）とＣＳ－Ｄだけに反応（阻止反応として計測）を示すことが判明した。後に、ＣＳ－Ｄ標準混合物は、我々がＷＦ６抗体は特定のパターンの硫酸を有する混合物を含むコンドロイチン６硫酸のための特性を示すものと信じていたように、いくらかのコンドロイチン６硫酸ユニットを含んでいたことが判明した。
【００４２】
４　コンドロイチン６硫酸を含むオリゴ糖分に対するモノクローナル抗体ＷＦ６の特性
４．１　商用のサメ軟骨（シグマアルドリッチケミカル製）からのコンドロイチン６硫酸（ＣＳ－Ｃ）がコンドロイチナーゼＡＢＣで温浸（消化）された。コンドロイチナーゼＡＢＣは、各種サイトにおいてＣＳ－Ｃを小さなオリゴ糖分に分裂させる働きをする。分裂させられた生産物は、生産物の非減少端部において二重結合を有し、これは最大で２３２ｎｍの吸収性を有する。
【００４３】
４．２　酵素による温浸（消化）からの生産物は、ＢｉｏＧｅｌＰ６コラムを用いたコラムクロマトグラフィーによって分離された。コラム断片の吸収性が測定され、そのプロフィルを図２に示す。
【００４４】
４．３　生産物は図２に示すように１０の断片に分割された。各断片はプールされ、フリーズドライ法により濃縮され、ＭＡｂＷＦ６に対する反応は前記セクション３で述べた方法を用いて判定された。各断片からの反応は、５０％の阻止率（ＩＣ５０：５０％阻止濃度）を与える尿酸量を計算することで比較され、計算の結果は図３に示した。阻止率％は：％阻止＝１００［（（Ａ（サンプル）－Ａ（ブランク））／（Ａ（コントロール：照査基準）－Ａ（ブランク））×１００）］，ここでＡは吸収率（absorbance）、という式で計算される。
【００４５】
　阻止反応を示し続けたオリゴ糖分の断片は断片１～６であることが判明し、従来の研究から知られた標準と比較して、我々は断片番号６が８－１２シュガーユニット（オクタサッカライドーデカサッカライド）を有するオリゴ糖分を含むものと判定した。
【００４６】
４．４　オリゴ糖分の断片番号６は、さらにＦＰＬＣを用いたイオン交換クロマトグラフィー、及び溶離剤としてリチウムパーコレート（percholate）を用いたＭｏｎｏ－Ｑコラムクロマトグラフィーによって、さらに精製された。得られたコラムプロフィルを図４に示す。
【００４７】
　上記の実験結果により、ゲル濾過物からのオリゴ糖分は、各種のコンドロイチン６硫酸オリゴ糖分から成ることが判明した。このことは、Ｍｏｎｏ－Ｑイオン交換ＦＰＬＣが指

紋として示すように、モノクローナル抗体ＷＦ６は、硫酸化の特定のパターンを有するコンドロイチン６硫酸を含むオリゴ糖分と反応することを示している。

【００４８】

５．位置６での硫酸群はモノクローナル抗体ＷＦ６に対する反応に顕著である

５．１　図４に示すコラムプロフィルからのオリゴ糖分断片ｄ，ｅ，ｆが、４硫酸及び６硫酸による温浸（消化）にさらされた。

【００４９】

５．２　これら２つの酵素からの産生物が、前記セクション３で述べた競争関係ＥＬＩＳＡ技術を用いて、ＭＡｂＷＦ６に対する反応がさらに評価された。

【００５０】

５．３　各産生物における反応の比較を、予備的に温浸されたサンプルを含めて、図５に示した。オリゴ糖分における硫酸群はＭＡｂＷＦ６に対する反応にとって必要であることが判明した。

【００５１】

　結論：上記セクション３～５で述べた結果を総合すると、ＭＡｂＷＦ６は、コンドロイチン６硫酸を含む少なくとも８シュガーユニットを有するオリゴ糖分とポリ糖分に対して反応性を有することが示されたことになる。さらに、このＭＡｂＷＦ６の反応性は、末端の残部において、６硫酸の機能的なグループを必要とする。なぜならば、６硫酸はこの位置を認識するからである。さらに、４硫酸は、オリゴ糖分の鎖と共に特定の硫酸パターンを含むアクセサリーグループであることが必要である。

【００５２】

６．組織の免疫組織着色でのモノクローナル抗体ＷＦ６の使用

６．１　組織着色での常用手法により処理されてきた病理学研究室からの皮膚組織サンプルが、この研究のために選定された。

【００５３】

６．２　ＰＢＳ（例として、１対５００の腹水流体と、１対１００の組織培養媒体）におけるＭＡｂＷＦ６の最適な希釈が、組織断面がスライドに固定された後での着色処理における第１の抗体として用いられた。

【００５４】

６．３　洗浄バッファを用いてスライドから余分な抗体が洗い落とされ、過酸化物と結合されたａｎｔｉ－ＩｇＭ抗体と共に再着色された。

【００５５】

６．４　余分な結合抗体と非反応抗体がスライドから洗浄され、不溶性の基板が追加された。

【００５６】

６．５　酵素反応が停止し、酸及び過剰な色が洗い落とされた。それからサンプルは、図６に示すような光マイクロスコープのもとで観察された。

【００５７】

７　動物モデルでの軟骨劣化を評価するためのモノクローナル抗体ＷＦ６の適用

７．１　ヒドロコーチゾン（Ｓｏｌｕ－Ｃｏｒｔｅｆ：商標名）の関節内注入（注射）による軟骨劣化の分化誘導（induction ）についての過去の報告（１９８９年、コングタウェラート等）にあるように、動物のモデルについて実施した。うさぎを２つのグループに分け、コントロール（照査基準）は通常の塩溶液注射とし、実験されるグループは毎週にわたり１２週まで２００ｍｇのヒドロコーチゾン注射を受けた。各週において、動物は注射前に、血清標本をとるために血を出さされた。

【００５８】

７．２　各週での血清サンプルは、前記セクション３で述べた方法を用いて、ＷＦ６エピトープのレベルのために分析評価された。この研究に加えて、ＭＡｂ３Ｂ３（１９９０年、カターソン等）もまた、前記報告と同様に、軟骨内の生体内化学的物質合成（biosynthesis）として用いられた。

【００５９】
７．３　この研究の最後に、全ての動物は犠牲になり、関節軟骨が、軟骨の乾燥重量についての尿酸として、プロテオグリカン量を分析するために、集積された。このデータを図７に示す。
【００６０】
７．４　各週でのＷＦ６エピトープ及び３Ｂ３エピトープのレベルは、各週、各エピトープの相対変化のパーセンテージを計算するのに用いられた。その結果を図８に示す。
【００６１】
　モノクローナル抗体ＷＦ６は、コンドロイチン６硫酸エピトープを含むプロテオグリカンの定量化のために、免疫分析（競争ＥＬＩＳＡ）の技術に使用できるようにあるいは適用できるようにすることができ、この分析は軟骨の劣化を知るマーカーとして使用できることを示している。図８は、ＷＦ６エピトープが、ヒドロコーチゾン処理された動物において、通常の塩溶液で処理された動物よりも、極めて高いレベルにあることを示しており、この図はまた病気の活動を早期に示す指標となることを示している。
【００６２】
８　骨関節炎（ＯＡ）及びリューマチ性関節炎（ＲＡ）の診断でのバイオマーカー定量化のためのＭＡｂＷＦ６の適用
８．１　ＯＡ及びＲＡの患者及びそれ以外の患者からのヒト血清サンプルが、ＷＦ６エピトープを分析するために採取された。サンプルは、不特定の結合を減少させるために６％ＢＳＡで５倍に希釈された。
【００６３】
８．２　全ての血清サンプルは、上記セクション３で述べた競争関係ＥＬＩＳＡを利用し、相対的標準としてサメのプロテオグリカン断片Ａ１を用いて、分析にかけられた。
【００６４】
８．３　各グループにおけるボランティア達の年齢には大きな差はなかった。
【００６５】
８．４　個別のサンプルからのＷＦ６エピトープのレベルは、図９に分散グラフとしてプロットした。
【００６６】
　ＭＡｂＷＦ6 は、ＯＡ及びＲＡの診断のための免疫理論的手法を用いて、量的分析に用いることができることは判明した。しかしながら、各グループのいくつかのサンプル内では今なお数値のオーバーラップが存在し、これは病気のステージの変化によるものか、個別の患者の処置（治療）によるものと思われた。加えて、これは、ＷＦ６エピトープのレベルが病気の活動や予後をモニターするのに用いることができることを示すものと理解できよう。
【００６７】
９　動物モデルでの処置をモニターするためのモノクローナル抗体ＷＦ６の適用
９．１　十字形靱帯の横断面は、６頭の犬の後ろ足に外科的手術を施して（バチステ等，２００４参照）、軟骨の劣化（ＯＡ）を起こさせるのに用いられる。
【００６８】
９．２　これらの犬は２つのグループ（３頭ずつ）に分けられ、１つのグループは通常の塩水溶液が筋肉注射され、他のグループにはポテンシャルな抗－骨関節炎の薬剤であるキトサン（chitosan）多硫化物（polysulfate ）が、体重に対して３ｍｇ／ｋｇで服用されるように、注射された。注射は毎週、８週にわたって実施された。
【００６９】
９．３　犬の第３のグループは外科的手術を受けることはなく、キトサン多硫化物が、体重に対して３ｍｇ／ｋｇで服用されるように、筋肉注射された。
【００７０】
９．４　全ての動物が観察され、獣医によってケアされた。血清標本のために血液が、セクション３で述べた方法により、ＷＦ６の測定に用いられるように採取された。

【００７１】
９．５　全ての実験動物の相対的な変化は、各グループで平均化され、図１０に研究の時間に対する相対的な変化のグラフをプロットした。
【００７２】
　ＭＡｂＷＦ6 は、動物モデルにおいて、エピトープを定量化する手法に用いることができることと、軟骨の退化のような病気の治療をモニターするためのマーカーとしても適用できることが、判明した。
【００７３】
１０　軟骨移植の組織培養モデルにおける軟骨劣化モニタリングでのモノクローナル抗体ＷＦ６の適用
１０．１　豚の軟骨が殺菌されて小片に切断され、３７°Ｃ、二酸化炭素５％のもとで、血清不要媒体に培養された。
【００７４】
１０．２　レチノイク（retinoic）酸が、軟骨劣化の刺激のために、１０μＭの濃度で培養体に追加された。
【００７５】
１０．３　媒体は、上記セクション３に述べた方法を用いて、ＷＦ６エピトープのレベルを定めるために、１日置きに４週間にわたって採取された。
【００７６】
１０．４　各週ごとのＷＦ６エピトープのレベルを、図１１に培養の時間（日）に対するレベルとしてプロットした。
【発明の効果】
【００７７】
　ＭＡｂＷＦ6 は、コントロールと比較したときに、レチノイク酸の誘導を用いて、よく確立された技術により、試験管の中で軟骨劣化をモニターするのに用いることができることが、判明した。このデモンストレーションは、ＭＡｂＷＦ6が、試験管の中での軟骨劣化のためのリサーチツールとして適用できることを示した。
【００７８】
１１　卵巣ガン血清サンプルでのバイオマーカーの定量化のためのモノクローナル抗体ＷＦ６の適用
　従前の報告（ナッシュ等，２００２）から、正常組織と比べてガン組織ではコンドロイチン硫酸の生体内化学的物質合成のレベルが増加していることが知られていた。さらに、ガン細胞はいくつかの種類の酵素で、それらを包囲する結合組織を劣化させることができるような酵素を産生することができる。このことは、ガン細胞を、組織内に侵入させ、他の領域へと転移させることになる。従って、我々は、ＭＡｂＷＦ６は、この腫瘍組織を含む病気の原因を診断するために用いることができると考える。
【００７９】
１１．１　血清サンプルが、通常の患者と、腫瘍（ガン以外）を有する患者と、卵巣ガンを有する患者とから採取された。この研究は、倫理委員会の承認を得ていた。
【００８０】
１１．２　全ての血清サンプルが、ＷＦ６エピトープのレベルを判定するためにテストされ、通常の患者と、ガン以外の腫瘍を有する患者と、ガンを有する患者とのグループ間で比較された。その結果を図１２に示す。
【００８１】
　ＷＦ６エピトープは、ヒトのガン状態（卵巣ガン）を知るバイオマーカーとして使用できることが判明した。
【００８２】
　以下に多数の非特許文献を従来技術として示す。
１　ハウエルＤＳ，「骨関節炎の病因」，Am J Med　１９８６；８０（４Ｂ）：２４－８
２　ムイルＨ，ハーディンガムＴＥ，「プロテオグリカンの構造」，バイオケミストリー

オブカーボヒドレート，W.J.Ehelan Ed.１９７５；５：１５３
３　ホーホベルクＭｃ，アルトマンＲＤ，ブラントＫＤ，クラークＢＭ，ディエッペＰＡ，グリフィンＭＲ，モスコウィッツＲW，シュニッツエルＴＪ，「骨関節炎の医学的管理のためのブイドセリン，パートＩＩ，膝の骨関節炎」，アメリカンカレッジオブリューマトロジー，Arthritis Rheum １９９５；３８（ＩＩ）：１５４１－６
【００８３】
４　ファスベンダーＨＧ，「各種関節炎における結合部破壊」，アーティキュラーカーティレジバイオケミストリー　１９８６：３７１－９０
５　セズネＴ，ハイネガルトＤ，「リューマチ性関節炎における軟骨特有プロテインの解放により示される非関節型軟骨の困難性」；Arthritis Rheum ；３２（９）：１０８０－８６
６　ハーディンガムＴ，ベイリシスＭ，「関節軟骨のプロテオグリカン：老化及び結合部の病気における変化」，関節炎及びリューマチについてのセミナー　１９９０；２０（３）：１２－３３
【００８４】
７　カターソンＢ，クリストナーＪＥ，ベーカーＴＲ，「角膜及び骨格のケラタン硫酸を特に認識するモノクローナル抗体の特徴」，J Biol Chem １９８３；２５８：８８４８－５４
８　カターソンＢ，クリストナーＪＥ，ベーカーＴＲ，「コンドロイチン硫酸イソマーに対するモノクローナル抗体：プロテオグリカンメタボリズムを調査するためのプローブとしてのそれらの使用」，Biochem Soc Trans.１８，８２０－３
９　ナタチャイＴ（１９９６），「コンドロイチン６硫酸に対するモノクローナル抗体の産生と特徴」，M.S.Thesis　チアング・マイ・ユニバーシティ，１９９７
【００８５】
１０　ダムラサモンＳ（１９９７），「血清総合シアリク酸及びヒアルロン酸の定量化のための方法の開発」，M.S.Thesis　チアング・マイ・ユニバーシティ，１９９８
１１　ハイネガードＤ，ハスコールＶＣ，「軟骨プロテオグリカンの集合体ＩＩＩ，集合体のトリプシン消化から分離されたプロテインの特徴」，J Biol Chem１９７４；２４９（１３）：４２５０－６
１２　フレーザーＪＲ，アペルグレンＬＥ，ローランＴＣ，「循環するヒアルロン酸の組織吸い上げ：完全体オートラジオグラフィック研究」，Cell Tissue Res １９８３；２３３：２８５－９３
【００８６】
１３　ラトクリフェＡ，シュレティW，カターソンＢ，「関節滑液流体洗浄及び犬の実験による骨関節炎と廃用退化からの関節軟骨におけるネイティブコンドロイチン硫酸エピトープの定量化」，Arthritis Rheum １９９３；３６（４）：５４３－５１
１４　ケンプソンＧＥ，テユークＭＡ，ディンゲルＪＴ，バレットＡＪ，ホースフィールドＰＨ，「ヒトの大人の関節軟骨の機械的特性上での蛋白質加水分解酵素の効果」，Biochim Biophys Acta　１９７６；４２８（３）：７４１－６０
１５　ラトクリフＡ，セイベルＭＪ，「骨関節炎のバイオケミカルマーカー」，Curr Opin Rheumatol １９９０；２：７７０－６
【００８７】
１６　カターソンＢ，ベーカーＪＲ，クリストナーＪＥ，「結合組織プロテオグリカンの検出と判定のための免疫論理学的方法」，J Invest Dermatol １９８２；７９（suppl １）：４５ｓ－５０ｓ
１７　ウイリアムスＪＭ，ダウニーＣ，トナーＥＪ，「うさぎの膝結合部での軟骨プロテオグリカン劣化に続く血清ケラタン硫酸のレベルの増加」，ArthritisRheum １９８８；３１（５）：５５７－６０
１８　スイートＭＢ，コエルホＡ，シュニッツラーＣＭ，シュニッツァーＴＪ，レンツＭＥ，ジャキムＩ，クエトゥルナーＫＥ，トナーＥＪ，「骨関節炎患者の血清ケラタン硫酸

レベル」, Arthritis Rheum １９８８；３１（５）：６４８－５２
【００８８】
１９　スペクターＴＤ，ウッドワードＬ，ホールＧＭ，ハモンドＡ，ウイリアムスＡ，バトラーＭＧ，ジェームスＩＴ，ハートＤＪ，トンプソンＰＷ，スコットＤＬ，「リューマチ性関節炎、骨関節炎及び炎症性病気におけるケラタン硫酸」, Ann Rheum Dis １９９２；５１（１０）：１１３４－７
２０　ゴッシュＰ，サザーランドＪＭ，テーラーＴＫ，ベレンガーＣＲ，ペティトＧＤ，「尻結合部の関節軟骨上で両側の中間的半月軟骨の効果」, J Rheumatol １９８４；１１（２）：１９７－２０１
２１　シャリフＭ，ジョージＥ，シェプストーンＬ，ヌードセンＷ，トナーＥＪ－ＭＡ，クシュナガンＪ，ディエッペＰ，「膝の骨関節炎の病気進行の予言となる血清ヒアルロン酸レベル」, Arthritis Rheum １９９５；３８：７６０－７
【００８９】
２２　クーパーＥＨ，ラズボーンＢＪ，「ヒアルロン酸の免疫計量測定での臨床的特徴」, Ann Clin Biochem　１９９０；２７：４４４－５１
２３　スミスＰＫ，クローンＲＩ，ハーマンソンＧＴ，マリックＡＫ，ガルテアＦＨ，プロレンザノＭＤ，フジモトＥＫ，ゴーケＮＭ，オルソンＢＪ，クレンクＤＣ，「ビシンコニニック（bicinchoninic ）酸によるプロテイン計測」, Anal Biochem　１９８５；１５０（１）：７６－８５
２４　ファーンデールＲＨ，バトルＤＪ，「ジメチレンブルーを用いた硫酸グリコースアミノグリカンの改良された計量化及び識別」, Biochemica-BiophysicaActa　１９８６；８８３：１７３－７７
【００９０】
２５　ブルメンクランツＮ，アズボーハンセンＧ，「尿酸の計量的判定のための新しい方法」, Anal Biochem　１９７３；５４：４８４－８９
２６　コングタウェラートＰ，ブルックスＰＭ，ゴッシュＰ，「ペントサンポリ硫酸（Cartrophen）がうさぎの結合部の軟骨からヒアルロン酸とプロテオグリカンによるヒドロコーチゾンの誘導損失を阻止すると共にその血清中のケラタン硫酸レベルを正常化する」, J Rheumatol.１９８９年１１月号；１６（１１）：１４５４－９
２７　カターソンＢ，マーモーディアンＦ，ソレルＪＭ，ハーディンガムＴＥ，ベイリシスＭＴ，カーネイＳＬ，ラトクリフェＡ，ムイルＨ，「組織発生及び病気におけるネイティブコンドロイチン硫酸構造の調和」, J Cell Sci. １９９０年１１月号；９７（Pt 3）：４１１－７
【００９１】
２８　バチステＤＬ，カークレーＡ，ラベルティＳ，タインＬＭ，スパウジＡＲ，ガティＪＳ，フォスターＰＪ，ホールズワースＤＷ，「試験管の外での骨関節炎のうさぎの前方十字形靱帯断面モデルにおける高精細ＭＲＩ及びマイクロＣＴ」, Osteoarthritis Cartilage. ２００４年８月号；１２（８）：６１４－２６
２９　ナッシュＭＡ，ディーバースＭＴ，フリードマンＲＳ，「ヒトの卵巣腫瘍におけるデコリン（decorin ）の表現」, Clin Cancer Res.２００２年６月号；８（６）：１７５４－６０
【図面の簡単な説明】
【００９２】
【図１】各種コンドロイチン硫酸によるＷＦ６抗体の反応に対する阻止を示すグラフ。
【図２】コラムクロマトグラフィーにより溶離されコンドロイチナーゼＡＢＣで消化されたＣＳ－Ｃからのコンドロイチン６硫酸を含むオリゴ糖分の断片の吸収プロフィルを示すグラフ。
【図３】競争ＥＬＩＳＡを用いて、ＷＦ６抗体に対するＩＣ５０を、図２の各断片における尿酸のレベルとして示すグラフ。
【図４】イオン交換ＦＰＬＣにより分析された図２の断片６のコラムプロフィルを示すグ

ラフ。
【図５】ＷＦ６抗体の反応により基板のサルファターゼの効果を示すグラフ。
【図６】第１の抗体としてＷＦ６を用いたヒトの皮膚組織断面の免疫着色を示す組織断面図。
【図７】軟骨の劣化した動物モデルから軟骨の尿酸の量を示すグラフ。
【図８】動物モデルからのサンプルにおけるＷＦ６エピトープのレベルを時間軸上に示すグラフ。
【図９】骨の関節炎及びリュウマチ性関節炎のヒト患者の血清におけるＷＦ６エピトープのレベルを示すグラフ。
【図１０】軟骨の劣化した犬をモデルにしたＷＦ６エピトープのレベル上にキトサンポリサルフェートの効果を示すグラフ。
【図１１】レチノイク酸により誘導された軟骨移植におけるＷＦ６エピトープのレベルを示すグラフ。
【図１２】ガン患者からの血清におけるＷＦ６エピトープを含むプロテオグリカンのレベルを示すグラフ。

【図１】

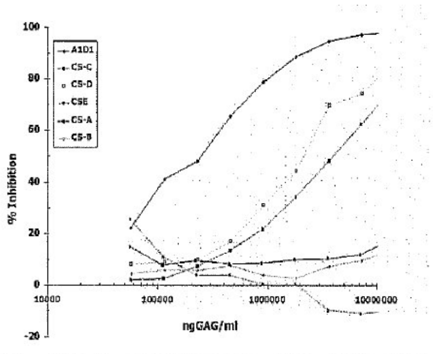

図1 各種コンドロイチン硫酸と反応させたモノクローナル抗体の特性

【図２】

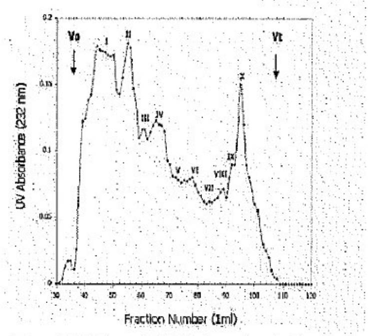

図2 バイオゲルP-6ゲル濾過上でコンドロイチナーゼABC
で温浸されたCS-Cからのコンドロイチン6硫酸を含む
オリゴ糖分のコラムプロフィル

【図３】

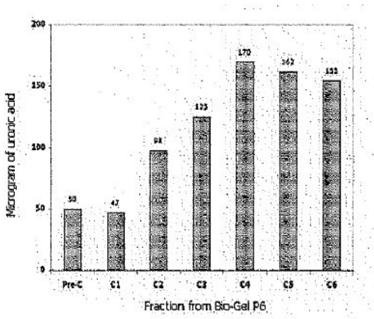

図3　競争関係ELISAを用いて50％阻止率でMAbWF6に反応するバイオゲルP-6コラムクロマトグラフィーからのオリゴ糖分の各断片における尿酸のレベル　グラフの数字は尿酸量マイクログラム

【図４】

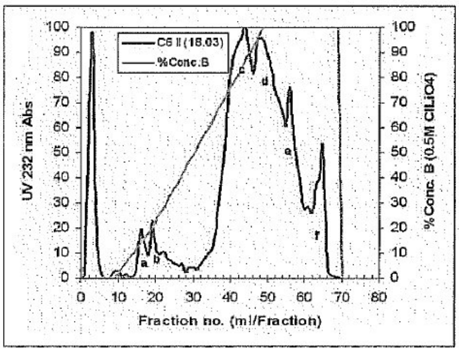

図4　Mono-Qイオン交換FPLC上でのバイオゲルP-6からの断片6のコラムプロフィル

【図５】

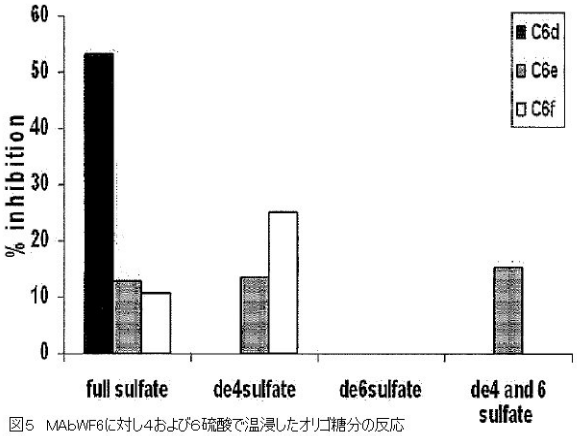

図5　MAbWF6に対し4および6硫酸で温浸したオリゴ糖分の反応における硫酸酵素の効果

【図６】

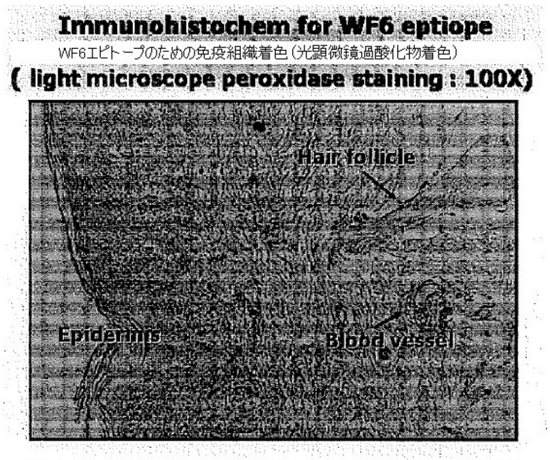

図6 プライマリ抗体としてMAbWF6を用いたヒトの皮膚組織断面の免疫組織着色

【図７】

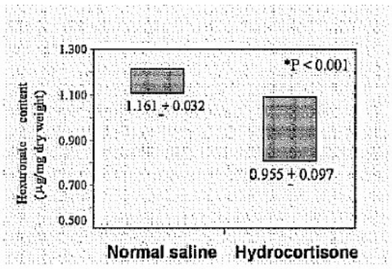

図7 常用塩水溶液およびヒドロコーチゾンの筋肉内注射
で処置された動物からの軟骨における尿酸としての
プロテオグリカンの量

【図８】

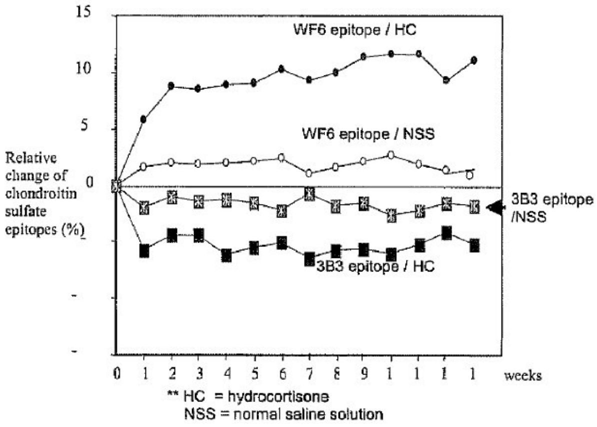

図8 常用塩水溶液およびヒドロコーチゾンのグループで処置された動物内の異化作用
マーカー及び3B3エピトープ同化作用マーカーとしてのWF6エピトープのレベル

【図９】

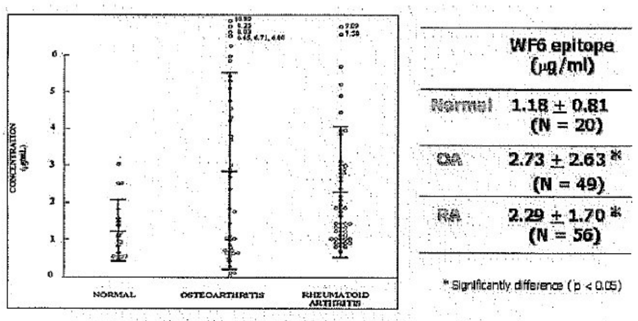

図９　正常（N=20）、OA（N=49）、RA（N=56）の血清におけるWF6エピトープのレベルを表す分散グラフで、学生テストでの顕著レベルが　p＜０．０５

【図１０】

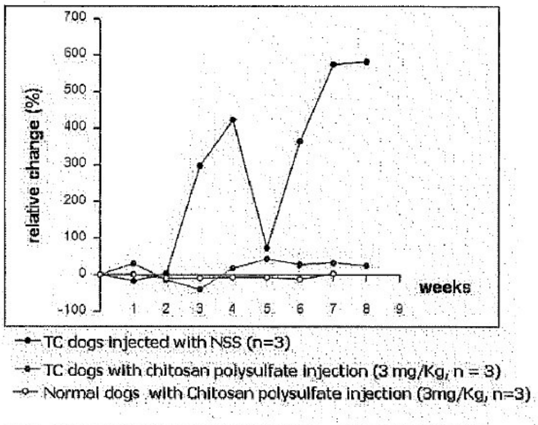

図１０　犬モデルで十字形靭帯断面内でのWF6エピトープ及び常用塩水溶液のレベル上でのキトサン多硫化物の効果の比較　相対変化は前処理時間に対するレベルのパーセントで判定される

【図１１】

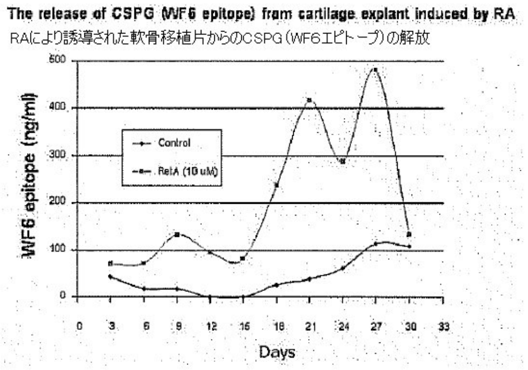

図１１　レチノール酸誘導による退化をモニターするためにモノクローナル抗体WF6を用いて競争関係ELISAにより定量化された軟骨移植培養液におけるWF6エピトープのレベル

【図１２】

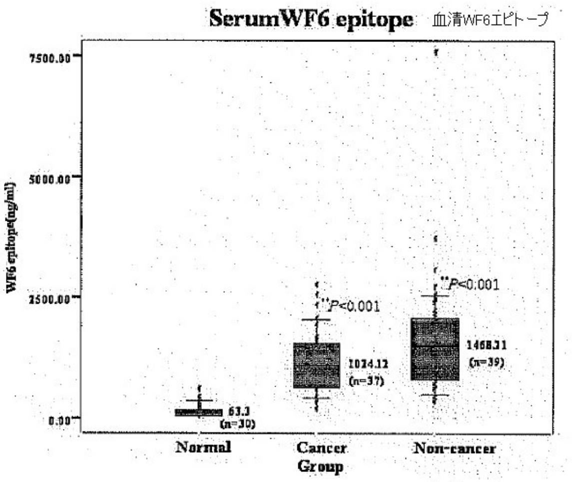

図12　正常グループ、卵巣ガングループ、非ガン性腫瘍グループからの血清における
コンドロイチン6硫酸WF6エピトープを含むプロテオグリカンのレベル
学生テストでの　p＜０．０５のグループ間での顕著な差異

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Application No
PCT/GB2005/050077

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C07K16/18 C07K16/30 C12N5/20 G01N33/53 A61K39/395
A61P19/02 A61P19/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C07K C12N G01N A61K A61P

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 practical, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, SCISEARCH, WPI Data, PAJ, PASCAL

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 90/04417 A (CATERSON, BRUCE; HARDINGHAM, TIMOTHY, E) 3 May 1990 (1990-05-03) pages 6-7,8,9; examples 1-3	4-6
X	PLAAS ANNA H K ET AL: "Glycosaminoglycan sulfation in human osteoarthritis: Disease-related alterations at the non-reducing termini of chondroitin and dermatan sulfate" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 273, no. 20, 15 May 1998 (1998-05-15), pages 12642-12649, XP002339999 ISSN: 0021-9258 abstract	4-6
Y	the whole document	1-3,7-21

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in 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

"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
10 August 2005	22/08/2005

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Domingues, H

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2004)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Application No
PCT/GB2005/050077

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CARLSON CATHY S ET AL: "Synovial fluid biomarker levels predict articular cartilage damage following complete medial meniscectomy in the canine knee" JOURNAL OF ORTHOPAEDIC RESEARCH, vol. 20, no. 1, 2002, pages 92-100, XP001207160 ISSN: 0736-0266 page 94	4-6
Y	the whole document	1-3,7-21
X	CHAN S S ET AL: "A sensitive assay for the measurement of serum chondroitin sulfate 3B3(-) epitope levels in human rheumatic diseases." CLINICAL AND EXPERIMENTAL RHEUMATOLOGY. 2001 SEP-OCT, vol. 19, no. 5, September 2001 (2001-09), pages 533-540, XP009052143 ISSN: 0392-856X the whole document	4-6
X	SLATER ROBERT R JR ET AL: "Monoclonal antibodies that detect biochemical markers of arthritis in humans" ARTHRITIS AND RHEUMATISM, vol. 38, no. 5, 1995, pages 655-659, XP009052134 ISSN: 0004-3591 the whole document	4-6
X	GARNERO PATRICK ET AL: "Review: Molecular basis and clinical use of biochemical markers of bone, cartilage, and synovium in joint diseases" ARTHRITIS AND RHEUMATISM, vol. 43, no. 5, May 2000 (2000-05), pages 953-968, XP002340001 ISSN: 0004-3591 page 961	4-6
Y	the whole document	1-3,7-21

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (January 2004)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB2005/050077

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: -
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/GB2005 /050077

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: -

Present claim 1, 17, 20 and 21 relate to an extremely large number of possible compounds. These claims refers to an antibody designated WF6 produced by a cell line also termed WF6. However, since no structural or functional definition of the antibody is provided in the claims, the person skilled in the art would not be able to determine which antibody(ies) is(are) covered by the claims. The designation WF6 is considered to be purely arbitrary.

It is also not clear what is meant by the expressions "a functional derivative thereof" and by "an antibody or functional derivative thereof having equivalent specificity to the WF6 antibody" present in claims 1, 12, 17 and 19. The expression "hybridoma cells producing an antibody having equivalent specificity to the WF6 antibody produced by the cell line PTA-6157" in claims 7-11 also lacks clarity.

In view of the above, a lack of clarity within the meaning of Article 6 PCT arises to such an extent as to render a meaningful search of said claims impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the application which do appear to be clear, namely for the search term "WF6"; for antibodies recognising chondroitin sulfate epitopes, particularly antibodies recognising a chondroitin sulfate epitope comprising 8 sugar monomers, the epitope including at least one chondroitin 6-sulfate unit (claims 4-6), and for the use of this type of antibodies in the diagnosis of connective tissue diseases, particularly osteoarthritis, rheumatoid arthritis and cancer; and for kits and pharmaceutical compositions comprising these antibodies.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

International Application No. PCT/GB2005 /050077

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-3, 7-17, 19-21

   Concern a WF6 antibody and a hybridoma cell that produces it; methods of producing said antibody; methods of diagnosing diseases of connective tissue, particularly osteoarthritis, rheumatoid arthritis and cancer, using said antibody; and a kit and a pharmaceutical composition comprising said antibody.

   ---

2. claims: 4-6 and 18

   Concern an antibody which recognises a chondroitin sulfate oligosaccharide epitope comprising 8 sugar monomers, the epitope including at least one chondroitin 6-sulfate unit; a method of diagnosing diseases of connective tissue comprising detecting the presence of said epitope.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Application No
PCT/GB2005/050077

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)			Publication date
WO 9004417	A	03-05-1990	AU	645742	B2	27-01-1994
			AU	4510989	A	14-05-1990
			CA	2001373	A1	24-04-1990
			EP	0439545	A1	07-08-1991
			JP	4502854	T	28-05-1992
			WO	9004417	A1	03-05-1990
			US	5374529	A	20-12-1994

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	***39/395***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｎ	
Ａ６１Ｐ	***29/00***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	29/00	１０１	
Ａ６１Ｐ	***19/02***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	19/02		

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

(74)代理人　100082854
弁理士　二宮　正孝
(72)発明者　コングタウェラート・プラチャ
タイ王国，５０２００，チアング・マイ，チアング・マイ・ユニバーシティ，ファカルティ・オブ・メディシン，デパートメント・オブ・バイオケミストリ
(72)発明者　ハーディンガム・ティム
イギリス，マンチェスターＭ１３９ＰＴ，ビルディング・オックスフォード・ロード，ユニバーシティ・オブ・マンチェスター２．２０５ストップフォード，スクール・オブ・バイオロジカル・サイエンシズ
(72)発明者　オングチャイ・シリワン
タイ王国，５０２００，チアング・マイ，チアング・マイ・ユニバーシティ，ファカルティ・オブ・メディシン，デパートメント・オブ・バイオケミストリ
(72)発明者　菅原　一幸
兵庫県神戸市東灘区本山北町４－１９－１，神戸薬科大学生化学研究室
(72)発明者　ポタチャロエン・ペラファン
タイ王国，５０２００，チアング・マイ，チアング・マイ・ユニバーシティ，ファカルティ・オブ・メディシン，デパートメント・オブ・バイオケミストリ
(72)発明者　ティエングブラナトハム・ナッタチャイ
タイ王国，５０２００，チアング・マイ，チアング・マイ・ユニバーシティ，ファカルティ・オブ・メディシン，デパートメント・オブ・バイオケミストリ

Ｆターム(参考)　4B024 AA01 AA11 BA43 DA02 GA03 GA30 HA15
4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 CC30 DA01 DA13
4B065 BA08 BB40 CA25 CA44 CA46
4C085 AA14 CC02 CC17
4H045 AA11 AA20 AA30 CA40 CA52 DA76 EA28 EA50 FA74

patsnap

专利名称(译)	针对硫酸软骨素表位的抗体		
公开(公告)号	JP2008509881A	公开(公告)日	2008-04-03
申请号	JP2007514145	申请日	2005-06-01
[标]申请(专利权)人(译)	泰国国家研究顾问 泰国研究基金 嘉环清迈大学		
申请(专利权)人(译)	泰国国家研究顾问 泰国研究基金 Chiangu我的大学		
[标]发明人	コングタウェラートプラチャ ハーディンガムティム オングチャイシリワン 菅原一幸 ポタチャロエンペラファン ティエングブラナトハムナッタチャイ		
发明人	コングタウェラート·プラチャ ハーディンガム·ティム オングチャイ·シリワン 菅原 一幸 ポタチャロエン·ペラファン ティエングブラナトハム·ナッタチャイ		
IPC分类号	C07K16/18 C12N15/02 C12N5/10 C12P21/08 G01N33/53 A61K39/395 A61P29/00 A61P19/02 C07K16/30 G01N33/574 G01N33/68		
CPC分类号	A61P19/02 A61P19/04 A61P29/00 C07K16/18 G01N33/57407 G01N33/6887 G01N2400/40 G01N2800/10 G01N2800/102		
FI分类号	C07K16/18 C12N15/00.C C12N5/00.B C12P21/08 G01N33/53.S A61K39/395.N A61P29/00.101 A61P19/02		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA43 4B024/DA02 4B024/GA03 4B024/GA30 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CC30 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/BA08 4B065/BB40 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA14 4C085/CC02 4C085/CC17 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/CA52 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	0401091280 2004-06-03 TH 2004018415 2004-08-18 GB		
其他公开文献	JP4896876B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

描述了对硫酸软骨素表位具有特异性的抗体，以及产生这种抗体的杂交瘤细胞系。 该抗体可用于诊断和治疗结缔组织疾病，例如关节炎和肉瘤。 还描述了测试试剂盒和药物组合物。

【図１２】

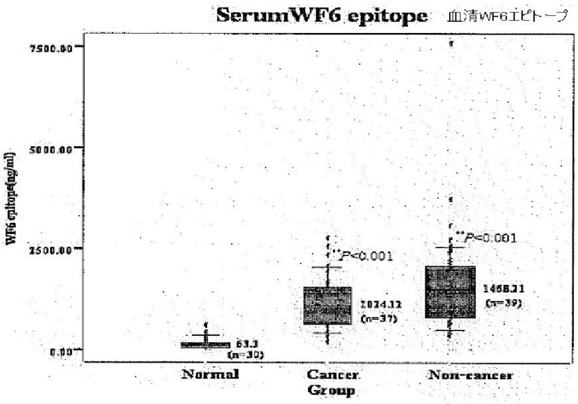

図１２　正常グループ、卵巣ガングループ、非ガン性腫瘍グループからの血清における
コンドロイチン６硫酸WF6エピトープを含むプロテオグリカンのレベル
学生テストでの　p＜０．０５のグループ間での顕著な差異