

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2008/032712

発行日 平成22年1月28日 (2010. 1. 28)

(43) 国際公開日 平成20年3月20日 (2008. 3. 20)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/18 (2006.01)	C07K 16/18	4B024
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	4B064
C07K 14/47 (2006.01)	C07K 14/47	4C085
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 V	4H045
A61K 39/395 (2006.01)	A61K 39/395 N	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 32 頁) 最終頁に続く

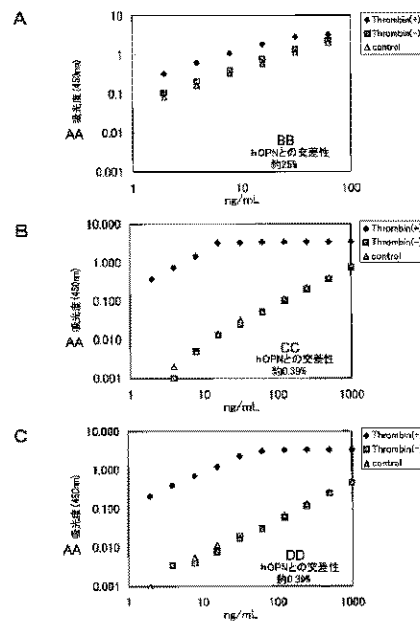
出願番号 特願2008-534349 (P2008-534349)
 (21) 国際出願番号 PCT/JP2007/067666
 (22) 国際出願日 平成19年9月11日 (2007. 9. 11)
 (31) 優先権主張番号 特願2006-245966 (P2006-245966)
 (32) 優先日 平成18年9月11日 (2006. 9. 11)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(71) 出願人 399032282
 株式会社 免疫生物研究所
 群馬県高崎市あら町5-1
 (74) 代理人 110000590
 特許業務法人 小野国際特許事務所
 (72) 発明者 小林 浩子
 福島県福島市春日町17-19-301
 (72) 発明者 長谷川 正裕
 三重県津市江戸橋2-174 国立大学法人三重大学内
 (72) 発明者 清藤 勉
 群馬県高崎市あら町5-1 株式会社免疫生物研究所内
 Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA53 BA80 CA02
 CA09 EA04 HA01 HA11
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 モノクローナル抗体およびその用途

(57) 【要約】

全長OPNを認識せずに、OPN N-halfのみを認識する抗体およびその用途を提供することを目的とする。C末端のアミノ酸配列がYGLR (配列番号1)であるタンパク質またはポリペプチドを認識し、アミノ酸配列YGLRをC末端以外に有するタンパク質またはポリペプチドを実質的に認識しないことを特徴とするモノクローナル抗体および前記抗体を利用したOPN N-halfの測定方法、OPN N-halfと関連する疾患の診断方法、重篤度の判定方法、治療方法を提供する。



AA. ABSORBANCE (450 nm)
 BB. CROSS REACTIVITY WITH hOPN: ABOUT 25%
 CC. CROSS REACTIVITY WITH hOPN: ABOUT 0.39%
 DD. CROSS REACTIVITY WITH hOPN: ABOUT 0.39%

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

C末端のアミノ酸配列がYGLR（配列番号1）であるタンパク質またはポリペプチドを認識し、アミノ酸配列YGLRをC末端以外に有するタンパク質またはポリペプチドを実質的に認識しないことを特徴とするモノクローナル抗体。

【請求項 2】

C末端のアミノ酸配列がYGLR（配列番号1）であるタンパク質またはポリペプチドが、トロンピンで切断されたオステオポンチンのN末端フラグメントであり、アミノ酸配列YGLRをC末端以外に有するタンパク質またはポリペプチドが、オステオポンチンである請求項1に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 3】

トロンピンで切断されたオステオポンチンのN末端フラグメントと、9インテグリンまたは4インテグリンとの結合を阻害するものである請求項1または2に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 4】

ヒト、ブタ、サル、ハムスター、イヌ、マウスまたはラットのトロンピンで切断されたオステオポンチンのN末端フラグメントを認識するものである請求項1ないし3の何れかに記載のモノクローナル抗体。

【請求項 5】

請求項1ないし4の何れかに記載のモノクローナル抗体を含む第1の試薬と、前記第1の試薬に含まれるモノクローナル抗体と認識部位が異なり、かつ、トロンピンで切断されたオステオポンチンのN末端フラグメントを認識する抗体を含む第2の試薬とを含有することを特徴とするトロンピンで切断されたオステオポンチンのN末端フラグメントの測定キット。

【請求項 6】

関節リウマチと変形性関節炎とを鑑別するものである請求項5に記載の測定キット。

【請求項 7】

変形性関節炎の重篤度を判定するものである請求項5に記載の測定キット。

【請求項 8】

検体中のトロンピンで切断されたオステオポンチンのN末端フラグメントを、請求項1ないし4の何れかに記載のモノクローナル抗体で測定することを特徴とするトロンピンで切断されたオステオポンチンのN末端フラグメントの測定方法。

【請求項 9】

請求項1ないし4の何れかに記載のモノクローナル抗体を用いて、検体中のトロンピンで切断されたオステオポンチンのN末端フラグメント量を測定し、その量を指標として関節リウマチを診断する方法。

【請求項 10】

検体が尿である請求項9に記載の関節リウマチを診断する方法。

【請求項 11】

請求項1ないし4の何れかに記載のモノクローナル抗体を用いて、検体中のトロンピンで切断されたオステオポンチンのN末端フラグメント量を測定し、その量を指標として関節リウマチと変形性関節炎とを鑑別する方法。

【請求項 12】

更に、検体中のオステオポンチン量を測定し、トロンピンで切断されたオステオポンチンのN末端フラグメント量とオステオポンチン量に対するトロンピンで切断されたオステオポンチンのN末端フラグメント量の比率を指標とするものである請求項11に記載の関節リウマチと変形性関節炎とを鑑別する方法。

【請求項 13】

検体が関節液である請求項11または12に記載の関節リウマチと変形性関節炎とを鑑別する方法。

10

20

30

40

50

【請求項 1 4】

請求項 1 ないし 4 の何れかに記載のモノクローナル抗体を用いて、検体中のトロンピンで切断されたオステオポンチンの N 末端フラグメント量を測定し、その量を指標として変形性関節炎の重篤度を判定する方法。

【請求項 1 5】

更に、検体中のオステオポンチン量を測定し、トロンピンで切断されたオステオポンチンの N 末端フラグメント量とオステオポンチン量に対するトロンピンで切断されたオステオポンチンの N 末端フラグメント量の比率を指標とするものである請求項 1 4 に記載の変形性関節炎の重篤度を判定する方法。

【請求項 1 6】

検体が関節液である請求項 1 4 または 1 5 に記載の変形性関節炎の重篤度を判定する方法。

10

【請求項 1 7】

請求項 1 ないし 4 の何れかに記載のモノクローナル抗体を有効成分とする炎症性疾患治療剤。

【請求項 1 8】

炎症性疾患が、肝炎である請求項 1 7 に記載の炎症性疾患治療剤。

【請求項 1 9】

肝細胞の壊死を抑制するものである請求項 1 8 に記載の炎症性疾患治療剤。

【請求項 2 0】

炎症性疾患患者に、請求項 1 7 ないし 1 9 の何れかに記載の炎症性疾患治療剤を投与することを特徴とする炎症性疾患の治療方法。

20

【請求項 2 1】

請求項 1 ないし 4 の何れかに記載のモノクローナル抗体を有効成分とする自己免疫疾患治療剤。

【請求項 2 2】

自己免疫疾患が、リウマチである請求項 2 1 に記載の自己免疫疾患治療剤。

【請求項 2 3】

自己免疫疾患患者に、請求項 2 1 または 2 2 に記載の自己免疫疾患治療剤を投与することを特徴とする自己免疫疾患の治療方法。

30

【請求項 2 4】

タグと共に発現させた目的タンパク質を、タグを認識する抗体を用いて検出・精製する目的タンパク質の検出・精製方法において、タグとして C 末端のアミノ酸配列が Y G L R (配列番号 1) であるタンパク質またはポリペプチドを用い、タグを認識する抗体として請求項 1 ないし 4 の何れか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目的タンパク質の検出・精製方法。

【請求項 2 5】

目的タンパク質をコードするポリヌクレオチドおよび C 末端のアミノ酸配列が Y G L R (配列番号 1) であるタンパク質またはポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを有する組換えベクター。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、C 末端に特定のアミノ酸配列を有するタンパク質またはポリペプチドを特異的に認識するモノクローナル抗体およびその用途に関する。

【背景技術】

【0002】

オステオポンチン(以下、「OPN」という)は、骨に多く含まれる酸性のカルシウム結合性の糖タンパク質であり、成熟体 OPN は生体内のトロンピンにより切断されて、OPN の N 末端フラグメント(以下、「OPN N-half」という)および C 末端フラ

50

グメント（以下、「OPN C-half」という）の2つになる。例えば、ヒトオステオポンチン（以下、「hOPN」という）であれば、hOPNのアミノ酸配列の168番目のアルギニン残基のC末端側で切断されて、hOPN N-halfとhOPN C-halfの2つになる。

【0003】

上記OPNは、多種の生理学的病理学的に重要な機能を担っており、例えば、細胞接着、細胞遊走、腫瘍形成、免疫応答および補体が媒介する細胞溶解の阻害等の機能を持っている。この多様な機能は、多種の細胞表面受容体により媒介されている。トロンピンにより切断されたOPN N-halfは、C末端側にSVVYGLR配列を露出し、この配列を介して 9および 4インテグリンと結合することが明らかにされている。

10

【0004】

本出願人はこれまでOPNの生体内における機能を研究し、その結果、上記OPN N-halfと各種疾患の関連を徐々に明らかにしてきている。例えば、本出願人による国際特許出願（特許文献1）ではリウマチ患者において全OPNに占めるOPN N-halfの割合が増大することを報告している。

【0005】

このようにOPN N-halfと疾患との関連は徐々に明らかになってきているが、その他疾患との関連を更に明らかにするためにも、OPN N-halfを正確に測定することは重要であった。しかし、上記国際特許出願で本出願人が報告している2K1抗体は、OPN N-halfのC末側に認識領域をもつものの、トロンピンにより切断されていないOPNも認識するため、条件によってはOPN N-halfを正確に測定しているとは言い難かった。

20

【0006】

また、上記OPN N-halfはOPNのトロンピンによる切断によりSVVYGLR配列を露出し、この配列を介して 9および 4インテグリンと結合するという事実から、この結合を効果的に阻害するためには前記配列の少なくとも一部と特異的に結合する抗体が必要であった。

【特許文献1】WO02/081522国際公開パンフレット

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

30

【0007】

従って、本発明は全長OPNを認識せずに、OPN N-halfのみを認識する抗体の提供およびこの抗体を利用してOPN N-halfを正確に測定する方法等を提供することを課題とするものである。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者は、上記課題を解決するために鋭意研究をした結果、特定のアミノ酸配列からなるポリペプチドを抗原として得られた、C末端に特定のアミノ酸配列を有するタンパク質またはポリペプチドを特異的に認識するモノクローナル抗体が、上記課題を解決することを見出し、本発明を完成させた。

40

【0009】

また、本発明者は、このモノクローナル抗体を利用すれば、OPN N-halfを正確に測定できることを見出した。更に、前記抗体は、OPN N-halfと関連する疾患の診断や重篤度の判定、治療等に利用可能なことを見出した。更にまた、前記抗体は、C末端が前記アミノ酸配列であるタンパク質またはポリペプチドを認識するので、前記タンパク質またはポリペプチドをタグとすれば目的タンパク質の検出・精製等に利用可能なことを見出し、本発明を完成させた。

【0010】

すなわち、本発明はC末端のアミノ酸配列がYGLR（配列番号1）であるタンパク質またはポリペプチドを認識し、アミノ酸配列YGLRをC末端以外に有するタンパク質ま

50

たはポリペプチドを実質的に認識しないことを特徴とするモノクローナル抗体である。

【0011】

また、本発明は前記モノクローナル抗体を含む第1の試薬と、前記第1の試薬に含まれるモノクローナル抗体と認識部位が異なり、かつ、トロンピンで切断されたオステオポンチンのN末端フラグメントを認識する抗体を含む第2の試薬とを含有することを特徴とするトロンピンで切断されたオステオポンチンのN末端フラグメントの測定キットである。

【0012】

更に、本発明は検体中のトロンピンで切断されたオステオポンチンのN末端フラグメントを、前記モノクローナル抗体で測定することを特徴とするトロンピンで切断されたオステオポンチンのN末端フラグメントの測定方法である。

10

【0013】

また更に、本発明は前記モノクローナル抗体を用いて、検体中のトロンピンで切断されたオステオポンチンのN末端フラグメント量を測定し、その量を指標として関節リウマチを診断する方法、関節リウマチと変形性関節炎とを鑑別する方法または変形性関節炎の重篤度を判定する方法である。

【0014】

更にまた、本発明は前記モノクローナル抗体を有効成分とする炎症性疾患治療剤および炎症性疾患患者に前記炎症性疾患治療剤を投与することを特徴とする炎症性疾患の治療方法である。

【0015】

また、本発明は前記モノクローナル抗体を有効成分とする自己免疫疾患の治療剤および自己免疫疾患患者に前記自己免疫疾患の治療剤を投与することを特徴とする自己免疫疾患の治療方法である。

20

【0016】

更に、本発明はタグと共に発現させた目的タンパク質を、タグを認識する抗体を用いて検出・精製する目的タンパク質の検出・精製方法において、タグとしてC末端のアミノ酸配列がYGLRであるタンパク質またはポリペプチドを用い、タグを認識する抗体として前記モノクローナル抗体を用いることを特徴とする目的タンパク質の検出・精製方法である。

【0017】

また更に、本発明は目的タンパク質をコードするポリヌクレオチドおよびC末端のアミノ酸配列がYGLRであるタンパク質またはポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを有する組換えベクターである。

30

【発明の効果】

【0018】

本発明のモノクローナル抗体は、C末端に特定のアミノ酸配列を有するタンパク質またはポリペプチドを特異的に認識するので、C末端が前記アミノ酸配列であるOPN N-halfを認識し、前記アミノ酸配列をC末端以外に有するOPNを実質的に認識しない抗体である。

【0019】

従って、このモノクローナル抗体は、このモノクローナル抗体が認識するOPN N-halfの正確な測定、OPN N-halfと関連する疾患の診断や重篤度の判定、治療、前記抗体と特異的に結合するアミノ酸配列をタグとした目的タンパク質の検出・精製等に利用可能である。

40

【発明を実施するための最良の形態】

【0020】

本発明のモノクローナル抗体（以下、「本発明抗体」という）は、C末端のアミノ酸配列がYGLR（配列番号1）であるタンパク質またはポリペプチドを認識し、アミノ酸配列YGLRをC末端以外に有するタンパク質またはポリペプチドを実質的に認識しないことを特徴とするものである。なお、本発明抗体がアミノ酸配列YGLRをC末端以外に有

50

するタンパク質またはポリペプチドを実質的に認識しないとは、本発明抗体が前記タンパク質またはポリペプチドに結合する割合が1.0質量%（以下、単に「%」という）以下、好ましくは0～0.5%であることをいう。

【0021】

本発明抗体は、上記特徴を有するものであれば、その作製法は特に限定されない。具体的に本発明抗体は、C末端のアミノ酸配列がYGLRであるタンパク質またはポリペプチドを抗原とし、これを動物に免疫を行い、当該動物から抗体を採取した後、C末端のアミノ酸配列がYGLRであるタンパク質またはポリペプチド、アミノ酸配列YGLRをC末端以外に有するタンパク質またはポリペプチド等を利用してスクリーニングすることにより得られる。以下に本発明抗体の作製法を詳細に説明する。

10

【0022】

上記抗原として用いるC末端のアミノ酸配列がYGLRであるタンパク質またはポリペプチドとしては、特に制限されないが、例えば、C末端のアミノ酸配列がYGLRであるOPN N-halfのC末端からN末端側へ4～10個程度、好ましくは、5～7個程度連続したアミノ酸配列からなるポリペプチドが挙げられる。具体的なポリペプチドとしては、hOPN N-halfのC末端からN末端側へ7つ連続したアミノ酸配列SVVYGLR（配列番号2）からなるポリペプチド（以下、「hOPN-7ペプチド」という）が挙げられる。このhOPN-7ペプチドはhOPNのアミノ酸配列（配列番号3）の162番目から168番目に一致する。なお、hOPNのアミノ酸配列としては、アクセッションナンバーBAA03554、AAC28619等のものがPubmed（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?DB=pubmed>）等から参照できるが、本発明においてはBAA03554のものをhOPNのアミノ酸配列として使用した。また、前記ポリペプチドには抗原性を高めるために生体高分子化合物を結合させ結合物とし、これを抗原とすることが好ましい。更に、この場合には前記ポリペプチドのN末端のアミノ酸にシスティン（C）を付けて結合させることが好ましい。

20

【0023】

抗原に用いられるC末端のアミノ酸配列がYGLRであるタンパク質またはポリペプチドは、特に限定されることなく種々の方法で得ることができる。このうちポリペプチドは、例えば、当業界で公知の方法により合成してもよいし、シンペップ社（Synpep Corporation）およびタナ社（TANA Laboratories, USA）等から合成品を購入することもできる。

30

【0024】

上記ポリペプチドに結合させる生体高分子化合物の例としては、スカシ貝のヘモシアニン（以下「KLH」という）、卵白アルブミン（以下、「OVA」という）、ウシ血清アルブミン（以下「BSA」という）、ウサギ血清アルブミン（以下「RSA」という）、サイログロブリン等が挙げられ、このうちKLHおよびサイログロブリンが好ましい。

【0025】

上記ポリペプチドと生体高分子化合物との結合は、例えば、混合酸無水物法（B. F. Erlanger, et al. :J. Biol. Chem. 234 1090 1094(1954)）または活性化エステル法（A. E. KARU, et al. :J. Agric. Food Chem. 42 301 309(1994)）等の公知の方法によって行うことができる。

40

【0026】

混合酸無水物法において用いられる混合酸無水物は、上記ポリペプチドを通常のショッテン-パウマン反応に付すことにより得られ、これを生体高分子化合物と反応させることにより目的とするポリペプチドと生体高分子化合物との結合物が作成される。この混合酸無水物法において使用されるハロゲン酸エステルとしては、例えばクロロ蟻酸メチル、ブromo蟻酸メチル、クロロ蟻酸エチル、ブromo蟻酸エチル、クロロ蟻酸イソブチル等が挙げられる。当該方法におけるペプチドとハロゲン酸エステルと高分子化合物の使用割合は、広い範囲から適宜選択され得る。

【0027】

50

なお、ショットテン - バウマン反応は塩基性化合物の存在下に行われるが、当該反応に用いられる塩基性化合物としては、ショットテン - バウマン反応に慣用の化合物、例えば、トリエチルアミン、トリメチルアミン、ピリジン、ジメチルアニリン、N - メチルモルホリン、ジアザビスクロノネン (DBN)、ジアザビスクロウンデセン (DBU)、ジアザビスクロオクタン (DABCO) 等の有機塩基、炭酸カリウム、炭酸ナトリウム、炭酸水素カリウム、炭酸水素ナトリウム等の無機塩基等を使用することができる。

【0028】

また、上記反応は通常 - 20 から 100 、好ましくは 0 から 50 において行われ、反応時間は 5 分から 10 時間程度、好ましくは 5 分から 2 時間である。

【0029】

得られた混合酸無水物と生体高分子化合物との反応は、通常 - 20 から 150 、好ましくは 0 から 100 において行われ、反応時間は 5 分から 10 時間程度、好ましくは 5 分から 5 時間である。混合酸無水物法は一般に溶媒中で行われるが、溶媒としては、混合酸無水物法に慣用されているいずれの溶媒も使用可能であり、具体的にはジクロロメタン、クロロホルム、ジクロロエタン等のハロゲン化炭化水素、ベンゼン、トルエン、キシレン等の芳香族炭化水素類、ジエチルエーテル、ジオキサソラン、テトラヒドロフラン、ジメトキシエタン等のエーテル類、酢酸メチル、酢酸エチル等のエステル類、N, N - ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、ヘキサメチルリン酸トリアミド等の非プロトン性極性溶媒等が挙げられる。

【0030】

一方、活性化エステル法は、一般に以下のように行うことができる。まず、上記ポリペプチドを有機溶媒に溶解し、カップリング剤の存在下にて N - ヒドロキシコハク酸イミドと反応させ、N - ヒドロキシコハク酸イミド活性化エステルを生成する。

【0031】

当該反応に用いられるカップリング剤としては、縮合反応に慣用されている通常のカップリング剤を使用でき、例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミド、カルボニルジイミダゾール、水溶性カルボジイミド等が挙げられる。また、有機溶媒としては、例えば N, N - ジメチルホルムアミド (DMF)、ジメチルスルホキシド、ジオキサソラン等が使用できる。反応に使用するポリペプチドと N - ヒドロキシコハク酸イミド等のカップリング剤のモル比は好ましくは 1 : 10 ~ 10 : 1、最も好ましくは 1 : 1 である。反応温度は、0 ~ 50 、好ましくは 22 ~ 27 で、反応時間は 5 分 ~ 24 時間、好ましくは 1 ~ 2 時間である。反応温度は各々の融点以上沸点以下の温度で行うことができる。

【0032】

カップリング反応後、反応液を生体高分子化合物を溶解した溶液に加え反応させると、例えば生体高分子化合物が遊離のアミノ基を有する場合、当該アミノ基と上記ペプチドのカルボキシル基の間に酸アミド結合が生成される。反応温度は、0 ~ 60 、好ましくは 5 ~ 40 、より好ましくは 22 ~ 27 で、反応時間は 5 分 ~ 24 時間、好ましくは 1 ~ 16 時間、より好ましくは 1 ~ 2 時間である。

【0033】

上記いずれかの方法により得られた反応物を、透析、脱塩カラム等によって精製することにより、上記ペプチドと生体高分子化合物との結合物 (以下、単に「結合物」ということがある) を得ることができる。

【0034】

次に、上記のようにして得られた結合物を抗原として用いた本発明抗体 (モノクローナル抗体) の製造方法について説明する。なお、抗体の調製にあたっては、抗原として結合物を用いる以外は、公知の方法、例えば続生化学実験講座、免疫生化学研究法 (日本生化学会編) 等に記載の方法を適宜利用することができる。

【0035】

上記結合物を抗原とした具体的な免疫方法としては、まず、結合物をリン酸ナトリウム緩衝液 (以下、「PBS」という) に溶解し、これとフロイント完全アジュバントまたは

10

20

30

40

50

不完全アジュバント、あるいはミョウバン等の補助剤と混合し、これを抗原として動物を免疫する。

【0036】

免疫される動物としては当該分野で常用されたものをいずれも使用できるが、例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ウマ等の哺乳動物を挙げることができる。また、免疫の際の免疫原の投与法は、皮下注射、腹腔内注射、静脈内注射、皮内注射、筋肉内注射のいずれでもよいが、皮下注射または腹腔内注射が好ましい。免疫は、1回または適当な間隔で複数回、好ましくは1週間ないし5週間の間隔で複数回行うことができる。

【0037】

最後に、常法に従い、上記の免疫を行った動物から得た免疫細胞と、ミエローム細胞とを融合させてハイブリドーマを得、当該ハイブリドーマの培養物から抗体を採取する。そして、その抗体をC末端のアミノ酸配列がYGLRであるタンパク質またはポリペプチド等を利用してスクリーニングすることによって本発明抗体を得ることができる。具体的なスクリーニング法としては、まず、C末端のアミノ酸配列がYGLRであるタンパク質またはポリペプチドと結合する抗体を採取し、次いで、アミノ酸配列YGLRをC末端以外に有するタンパク質またはポリペプチドと実質的に結合しない抗体を採取する方法等が挙げられる。C末端のアミノ酸配列がYGLRであるタンパク質またはポリペプチドとしてはヒト、マウス、ラット等のOPN N-half等のタンパク質またはYGLR(配列番号1)、VYGLR(配列番号17)等のポリペプチドが挙げられる。また、アミノ酸配列YGLRをC末端以外に有するタンパク質またはポリペプチドとしては、ヒト、マウス、ラット等のOPN等のタンパク質またはVYGL(配列番号18)、SVVYGL(配列番号19)、SVVYG(配列番号20)等のポリペプチドが挙げられる。

【0038】

斯くして得られる本発明抗体はC末端のアミノ酸配列がYGLRであるタンパク質またはポリペプチドを認識し、アミノ酸配列YGLRをC末端以外に有するタンパク質またはポリペプチドを実質的に認識しないものである。そしてこの抗体はポリペプチドまたはタンパク質のC末端がYGLRのもののみを認識するので、このアミノ酸配列をC末端に有するhOPN N-half等を認識することができる。一方、この抗体は前記アミノ酸配列をC末端以外に有するトロンピンで切断されていないhOPNは認識することができない。また、アミノ酸配列YGLRは91、41、47等の9インテグリンまたは4インテグリンが認識するアミノ酸配列SVVYGLRに含まれているため、この本発明抗体はOPN N-halfと9インテグリンまたは4インテグリンとの結合を阻害することができる。更に、本発明抗体は、その認識部位がYGLRであることから、このアミノ酸配列がC末端にあるブタ(アクセッションナンバー:P14287)、サル(XP_001093307)、ハムスター(CAI65407)、イヌ(ABA40758)マウス(AAA57265等)、ラット(BAA19247等)のOPN N-halfも認識することができる。

【0039】

本発明抗体は上記したようにOPN N-halfと9インテグリンまたは4インテグリンとの結合を阻害することができる。これらのインテグリンは、炎症反応に関与していることから、インテグリン活性を阻害する薬剤は、潜在的には抗炎症作用を有していると考えられている。従って、本発明抗体は、リウマチ、肝炎、関節炎等の炎症性疾患の治療に有効である。

【0040】

なお、本発明抗体は以下の実施例で示すように、コンカナバリンA(以下、「ConA」という)誘導性肝炎において、肝細胞の壊死を抑制し、ALT(アラニンアミノトランスフェラーゼ)値の上昇を抑制することができる。従って、本発明抗体は特に肝炎の治療剤とすることが好ましい。

【0041】

また、リウマチの炎症にはインテグリンが協同的に関与していると考えられるので、こ

これらのインテグリンとOPN N - h a l fの結合を幅広く遮断する本発明抗体はリウマチやそれ以外の自己免疫疾患の症状の憎悪を抑えることができる。従って、本発明抗体を有効成分とすることでリウマチ性関節炎・若年性関節リウマチや慢性リウマチ等のリウマチ、乾癬性関節炎・乾癬等の治療、臓器移植後の慢性拒絶反応抑制、全身性自己免疫疾患・エリテマトーデス・ぶどう膜炎・ベーチェット病・多発性筋炎・糸状体増殖性腎炎・サルコイドーシス等の自己免疫疾患の治療剤とすることができる。

【0042】

本発明抗体を上記治療剤とするには、本発明抗体を必要によりさらに精製し、その後、常法に従って製剤化すればよい。この治療剤の剤型の例としては、注射剤、点滴剤等の非経口剤が挙げられ、これらは静脈内投与、皮下投与等により投与することが好ましい。また、製剤化にあたっては、薬学的に許容される範囲で、これら剤型に応じた担体や添加剤を使用することができる。上記製剤化に当たっての本発明抗体の添加量は、患者の症状の程度、年齢や使用する製剤の剤型あるいは本発明抗体の結合力価等により異なるが、例えば0.1mg/kgないし100mg/kg程度である。

【0043】

更に、本発明抗体は必要により標識または固相化することにより免疫学的測定法に利用することができる。

【0044】

本発明抗体の標識は、西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)、アルカリホスファターゼ等の酵素、フルオレセインイソシアネート、ローダミン等の蛍光物質、³²P、¹²⁵I等の放射性物質、化学発光物質等の標識物質と本発明抗体とを常法で結合させることにより行われる。

【0045】

また、本発明抗体の固相化は適切な固相に本発明抗体を結合させることにより行われる。固相としては、免疫化学的測定法において慣用される固相の何れをも使用することができる。例えば、ポリスチレン製の96穴マイクロタイタープレート、アミノ基結合型のマイクロタイタープレート等のプレートや、各種のビーズ類が挙げられる。本発明抗体を固相に結合させるには、例えば、本発明抗体を含む緩衝液を固相上に加え、インキュベーションすればよい。

【0046】

更に、本発明抗体は、本発明抗体と認識部位が異なり、かつ、トロンビンで切断されたOPN N - h a l fを認識する抗体(以下、「OPN - 1抗体」という)と組み合わせることにより、OPN N - h a l fを正確に測定することができる。

【0047】

このような本発明抗体と認識部位が異なり、かつ、トロンビンで切断されたOPN N - h a l fを認識する抗体としては、例えば、OPN N - h a l fの全部または1部を抗原とし、常法により得ることができるポリクローナル抗体やモノクローナル抗体が利用できる。

【0048】

上記抗原として用いるOPN N - h a l fの全部または1部としては、特に制限されないが、例えば、OPN N - h a l fのN末端側のアミノ酸配列を有するポリペプチド、好ましくは前記アミノ酸配列中、5~30個程度、好ましくは10~20個程度連続したアミノ酸配列からなるポリペプチドが挙げられる。このポリペプチドは、測定対象となるOPNまたはOPN N - h a l fの由来となる動物に併せて適宜選択すればよく、例えば、測定対象がhOPNであればhOPNのアミノ酸配列(配列番号3)の17~31番目に該当するhOPN - 1ペプチド、マウスOPN(以下、「mOPN」という)であればmOPNのアミノ酸配列(配列番号4)の17~32番目に該当するmOPN - 1ペプチド、ラットOPN(以下、「rOPN」という)であればrOPNのアミノ酸配列(配列番号5)の17~33番目に該当するrOPN - 1ペプチド等が挙げられる。なお、mOPNのアミノ酸配列としては、アクセッションナンバーAAA57265、AAH02

10

20

30

40

50

113、AAH57858、AAH80720、CAA36132およびNP033289のものがPubMedから参照できるが、本発明においてはAAA57265を使用した。また、rOPNのアミノ酸配列としてもAAH78874およびBAA19247のものがPubMedから参照できるが、本発明においてはBAA19247のものを使用した。

【0049】

hOPN - 1ペプチド：IPVKQADSGSSEKQ（配列番号6）

mOPN - 1ペプチド：LPVKVTDSGSSEKLY（配列番号7）

rOPN - 1ペプチド：LPVKVAEFGSSEKAHY（配列番号8）

【0050】

また、上記ペプチドを用いてOPN - 1抗体を作製する場合、抗原として前記本発明抗体の作製方法と同様に、上記ペプチドと生体高分子化合物との結合物を利用しても良い。この上記ペプチドと生体高分子化合物との結合物は、上記ペプチドのC末端側のアミノ酸に、例えばリジン・システイン（KC）を付けて結合させることが好ましい。

【0051】

上記のようなOPN - 1抗体としては株式会社免疫生物研究所から市販されている下記のものを利用することもできる。

Anti Mouse Osteopontin (017) Rabbit IgG Affinity Purify
（製品番号：18621）

Anti Human Osteopontin (017) Rabbit IgG Affinity Purify
（製品番号：18625）

Anti Rat Osteopontin (017) Rabbit IgG Affinity Purify
（製品番号：18628）

【0052】

本発明抗体とOPN - 1抗体とを用いたOPN N - halfの具体的な測定方法としては、放射性同位元素免疫測定法（RIA法）、ELISA法（E. Engvall et al., (1980): Methods in Enzymol., 70, 419-439）、蛍光抗体法、ブランク法、スポット法、凝集法、オクタロニー（Ouchterlony）、イムノクロマト法等の、一般の免疫化学的測定法において使用されている種々の方法（「ハイブリドーマ法とモノクローナル抗体」、株式会社R&Dプランニング発行、第30頁 - 第53頁、昭和57年3月5日）が挙げられる。

【0053】

これらの測定方法は種々の観点から適宜選択することができるが、感度、簡便性等の点からはELISA法が好ましい。より具体的な、OPN N - halfの測定について、ELISA法の一つであるサンドイッチ法を例にとってその手順を説明すれば次の通りである。

【0054】

まず、工程（A）として、本発明抗体を担体に固相化し、次いで、工程（B）として、抗体が固相化されていない担体表面をOPN N - halfと無関係な、例えばタンパク質等によりブロックする。更に、工程（C）として、これに各種濃度のOPN N - halfを含む検体を加え、OPN N - halfと本発明抗体との複合体を生成させた後、工程（D）として、標識したOPN - 1抗体を加え、これにOPN N - halfと抗体との複合体を結合させ、最後に工程（E）として、標識量を測定することにより、予め作成した検量線から検体中のOPN N - halfの量を決定することができる。なお、工程（A）と工程（D）に用いる抗体は逆の場合でも測定が可能であるが、本発明抗体を固相化した方が検出感度の点から好ましい。

【0055】

具体的に工程（A）において、本発明抗体を固相化するために用いられる担体としては、特別な制限はなく、免疫化学的測定法において常用されるものをいずれも使用することができる。例えば、ポリスチレン製の96穴マイクロタイタープレートあるいは、アミノ

10

20

30

40

50

基結合型のマイクロタイタープレートが挙げられる。また、上記抗体を固相化させるには、例えば、上記抗体を含む緩衝液を担体上加え、インキュベーションすればよい。緩衝液としては公知のものが使用でき、例えば10mMのPBSを挙げることができる。緩衝液中の上記抗体の濃度は広い範囲から選択できるが、通常0.01~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 程度、好ましくは0.1~20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ が適している。また、担体として96ウェルのマイクロタイタープレートを使用する場合には、300 μl /ウェル以下で20~150 μl /ウェル程度が望ましい。更に、インキュベーションの条件にも特に制限はないが、通常4程度で一晩のインキュベーションが適している。

【0056】

また、工程(B)のブロッキングは、工程(A)で本発明抗体を固相化した担体において、後に添加する検体中のOPN N-halfが抗原抗体反応とは無関係に吸着される部分が存在する場合があるので、それを防ぐ目的で行う。ブロッキング剤としては、例えば、BSAやスキムミルク溶液や、ブロックエース(Block-Ace:大日本製薬製(コードNo.UK-25B))等の市販のブロッキング剤を使用することができる。具体的なブロッキングは、限定されるわけではないが、例えば抗原を固相化した部分に、ブロックエースを適量加え、約4で、一晩のインキュベーションをした後、緩衝液で洗浄することにより行われる。

【0057】

更に、工程(C)において、OPN N-halfを含む検体を固相化した本発明抗体と接触させ、この固相化した本発明抗体でOPN N-halfを捕捉し、固相化した本発明抗体とOPN N-halfとの複合体を生成させる。この複合体を生成させるための条件は限定されるわけではないが、4~37程度で約1時間~1晩の反応を行えばよい。反応終了後、緩衝液で担体を洗浄し、未反応のタンパク質等を除去させることが好ましい。この反応に用いる緩衝液としては、10mMのPBS(pH7.2)および0.05%(v/v)のTween20の組成のものが好ましい。

【0058】

また更に、工程(D)において、固相化した本発明抗体に捕捉されたOPN N-halfに、常法により西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)、アルカリホスファターゼ等の酵素、フルオレセインイソシアネート、ローダミン等の蛍光物質、³²P、¹²⁵I等の放射性物質、化学発光物質等の標識物質で標識したOPN-1抗体を加え、固相化した本発明抗体-OPN N-half-標識したOPN-1抗体の複合体を形成させる。この反応終了後、緩衝液で担体を洗浄し、未反応のタンパク質等を除去させることが好ましい。この反応に用いる緩衝液としては、前記したものが使用される。この工程(D)において使用される標識したOPN-1抗体の量は、固相化した本発明抗体に対して約5,000~10,000倍、好ましくは最終吸光度が1.5~2.0となるように希釈された量である。希釈には緩衝液を用いることができ、反応条件は特に限定されるわけではないが、4~37程度で約1時間行い、反応後、緩衝液で洗浄することが好ましい。以上の反応により、固相化した本発明抗体-OPN N-half-標識したOPN-1抗体の複合体を形成させることができる。

【0059】

最後に工程(E)において、OPN-1抗体の標識に用いた標識物質と反応する発色基質溶液を加え、吸光度を測定することによって検量線からOPN N-halfの量を算出することができる。

【0060】

標識抗体の標識物質として、西洋わさびペルオキシダーゼを使用する場合には、例えば、過酸化水素と3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(以下「TMB」という)を含む発色基質溶液を使用することができる。発色反応の条件は、限定されるわけではないが、発色基質溶液を加え約25で約30分間反応させた後、1~2Nの硫酸を加えて酵素反応を停止させることにより行うことができる。TMBを使用する場合、発色は450nmの吸光度により測定する。一方、標識物質として、アルカリホスファターゼを使用する

場合には、p - ニトロフェニルリン酸を基質として発色させ、2 Nの水酸化ナトリウムを加えて酵素反応を止め、415 nmでの吸光度を測定する方法が適している。なお、既知の濃度のOPN N - h a l fを添加した反応液の吸光度により予め作成しておいた検量線を用いて、検体中のOPN N - h a l fの濃度を算出することもできる。

【0061】

上記で説明したOPN N - h a l fの測定方法を実施するには、本発明抗体を含む第1の試薬と、OPN - 1抗体を含む第2の試薬とを含有することを特徴とするOPN N - h a l fの測定キット(以下、「本発明キット」という)を利用することが好ましい。

【0062】

なお、本発明キットは常法により作製することができる。具体的には、本発明抗体またはOPN - 1抗体のいずれかを標識抗体とし、他に、希釈用緩衝液、標準物質、基質用緩衝液、停止液、洗浄液等を組み合わせればよい。

【0063】

上記の測定方法や測定キットを利用することにより、血漿、血清、尿、関節液等の検体中のOPN N - h a l fを正確に測定することができる。

【0064】

また、上記の測定方法や測定キットを利用して上記検体中、特に尿中のOPN N - h a l fを測定し、その量を指標とすれば、関節リウマチを診断することができる。具体的には、まず、複数名の健常者または関節リウマチ患者の尿を採取し、上記の測定方法や測定キットを利用してOPN N - h a l f濃度を測定し、その平均値を算出しておく。次に、被験者の尿中のOPN N - h a l f濃度を測定し、その値が健常者の平均値よりも有意に高い(例えば、1500 pM以上)場合または関節リウマチ患者の平均値よりも有意に低い値(例えば、1500 pM未満)でない場合には、その被験者が関節リウマチであると診断することができる。

【0065】

更に、上記の測定方法や測定キットを利用して上記検体中、特に関節液中のOPN N - h a l fを測定し、その量を指標とすれば、関節リウマチと変形性関節炎とを鑑別することができる。具体的には、まず、複数名の変形性関節炎患者または関節リウマチ患者の膝関節液を採取し、上記の測定方法や測定キットを利用してOPN N - h a l f濃度を測定し、その平均値を算出しておく。次に、被験者のOPN N - h a l f濃度を測定し、その値が変形性関節炎患者の平均値よりも有意に高い(例えば、200 pM以上)場合または関節リウマチ患者の平均値よりも有意に低い値(例えば、200 pM未満)でない場合には、その被験者が関節リウマチであると診断することができる。また、この鑑別においては、関節液中のOPN濃度を測定し、これから全OPN(OPNとOPN N - h a l f)に対するOPN N - h a l fの比率を算出し、この結果と併せて鑑別しても良い。具体的に、本実施例においては、関節液中の全OPNに対するOPN N - h a l fの比率が、8.52%以上であればその被験者が関節リウマチであると診断することができる。なお、関節液中のOPN濃度は、市販のOPN測定キット(例えば、Human Osteopontin Assay Kit (L) IBL(株式会社免疫生物研究所製(製品番号:27158)))等を利用して測定することができる。

【0066】

また更に、関節液中のOPN N - h a l fの量は、変形性関節炎のグレードと相関が認められるので、これを指標とすれば、上記鑑別の他に、変形性関節炎の重篤度を判定することもできる。具体的に関節液中のOPN N - h a l fの量は、軽度よりも中等度、重度で高値(軽度は平均値55.0 pMに対し、中等度では163.9 pMおよび重度では142.2 pMの平均値)を示す。また、関節液中の全OPN(OPNとOPN N - h a l f)に対するOPN N - h a l fの比率も変形性関節炎のグレードと相関が認められるので、この結果と併せて変形性関節炎の重篤度を判定しても良い。具体的に、本実施例においては、関節液中の全OPNに対するOPN N - h a l fの比率が、0.93%以下であればその被験者が変形性関節炎の軽度であり、1.81%以上であればその被

10

20

30

40

50

験者が変形性関節炎の中等度あるいは重度であると判定することができる。

【 0 0 6 7 】

本発明抗体はC末端がアミノ酸配列 Y G L R であるタンパク質またはポリペプチドを特異的に認識するので、前記抗体が認識するタンパク質またはポリペプチドを、 H i s タグ、 F l a g タグ等の周知のタグと同様にして目的タンパク質の検出・精製等に用いることができる。

【 0 0 6 8 】

具体的に、目的タンパク質の検出であれば、まず、C末端のアミノ酸配列が Y G L R であるタンパク質またはポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと、検出の対象となる目的タンパク質をコードするポリヌクレオチドを常法により作製し、これらをベクターに組み込んで組換えベクターを作製する。次に、この組換えベクターを用いて周知のタンパク質発現系で目的タンパク質とC末端がアミノ酸配列 Y G L R であるタンパク質またはポリペプチドとを含む組換えタンパク質を発現させる。最後に、この組換えタンパク質を常法により標識した本発明抗体で検出する。

10

【 0 0 6 9 】

上記目的タンパク質の検出に用いられるベクターとしては、タンパク質発現系が小麦胚芽抽出液を用いた無細胞合成系であれば p E U ベクター等が挙げられる。この場合、ベクターは目的タンパク質をコードするポリヌクレオチドの 3 ' 末端に、C末端のアミノ酸配列が Y G L R であるタンパク質またはポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを結合させたものを挿入したものが好ましく、また、目的タンパク質をコードするポリヌクレオチドの 5 ' 末端に S P 6 等のプロモーターを挿入したものが好ましい。

20

【 0 0 7 0 】

また、上記目的タンパク質の検出に用いられるベクターとしては、タンパク質発現系が大腸菌等を用いた細胞合成系であれば p G E X ベクター、 p Q E ベクター等が挙げられる。

【 0 0 7 1 】

一方、目的タンパク質の精製であれば、上記と同様にして周知のタンパク質発現系で目的タンパク質とC末端がアミノ酸配列 Y G L R であるタンパク質またはポリペプチドとを含む組換えタンパク質を発現させ、これを担体に固定化した本発明抗体に結合させる。次に、これを 0.1 M グリシン - 塩酸バッファー (p H 2.5) 等により結合を解離させ、組換えタンパク質を精製する。

30

【 0 0 7 2 】

上記目的タンパク質の精製において本発明抗体を固定化する担体としてはホルミルセルロファイン (生化学工業株式会社製) が挙げられ、また、固定化方法としてはアミノ基を利用する方法が挙げられる。

【 実施例 】

【 0 0 7 3 】

以下、実施例を挙げ、本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらにより何ら制約されるものではない。また当業者は、本明細書の記載に基づいて容易に本発明に修飾、変更を加えることができるが、それらも本発明の技術的範囲に含まれる。

40

【 0 0 7 4 】

参 考 例 1

抗原用ポリペプチドの入手 :

抗原用ポリペプチドとして、下記のアミノ酸配列からなるポリペプチド (a) ~ (c) の H P L C クロマトグラフィー精製した状態の品をシンペップ社 (Synpep Corporation)、タナ社 (TANA Laboratories, USA) およびオースペップ社 (Auspep) より購入した。なお、ポリペプチド (a) は h O P N N - h a l f の C 末端のアミノ酸から N 末端側に連続したアミノ酸配列からなるアミノ酸配列 (h O P N N - h a l f のアミノ酸配列の 1 6 2 ~ 1 6 8 番目に該当するアミノ酸配列 (以下、この配列を有するポリペプチドを「 h O P N - 7 ペプチド」という)) にシステイン (C) を付けたものである。また、ポリ

50

ペプチド (b) は h O P N N - h a l f のアミノ酸配列の 17 ~ 31 番目に該当するアミノ酸配列にシスチン (C) を付けたものである。更に、ポリペプチド (c) は全長 h O P N のアミノ酸配列の 153 ~ 169 番目に該当するアミノ酸配列にシスチン (C) を付けたものである。

ポリペプチド (a) : C S V V Y G L R (配列番号 9)

ポリペプチド (b) : I P V K Q A D S G S S E E K Q C (配列番号 10)

ポリペプチド (c) : C V D T Y D G R G D S V V Y G L R S (配列番号 11)

【0075】

参考例 2

免疫用抗原の作製：

上記の各ポリペプチドとサイログロブリンとの結合物を E M C S (N - (6 - M a l e i m i d o c a p r o y l o x y) - s u c c i n i m i d e) 法により、以下のようにして作製した。なお、結合物を作るにあたり、サイログロブリンとポリペプチドと E M C S のモル比はそれぞれ 1 : 300 : 400 とした。

【0076】

まず、実施例 1 の各ポリペプチド 4 m g を、それぞれ約 1 m l の蒸留水に溶解した。一方、1 m l の 0.01 M リン酸バッファー (pH 7.0) に 5 m g のサイログロブリンを溶解したものと、ジメチルホルムアミドで溶解した E M C S 80 m g / m l とをそれぞれ上述モル相当量になるように混合し、サイログロブリン - E M C S 複合体溶液を作成した。この複合体溶液を 3 つに分け、その各々にそれぞれのポリペプチド溶液を上述モル相当量加えることにより、E M C S で架橋されたポリペプチドとサイログロブリンとの結合物溶液を作製した。

【0077】

この結合物溶液を、P B S を用いて透析し、結合物として 10 m g / m l になるように濃度を調製した。このようにして得られた上記の各ポリペプチドとサイログロブリンとの結合物を免疫用抗原として以下の実施例および参考例に用いた。

【0078】

実施例 1

モノクローナル抗体の作製：

免疫用抗原として、実施例 2 において得られたポリペプチド (a) とサイログロブリンとの結合物を用い、これを用いて B A L B / c マウスを免疫化した。マウスに 4 回免疫を行った後、免疫化されたマウスの脾単球細胞と融合パートナー、X 63 - A g 8 - 653 をポリエチレングリコール仲介細胞融合に付し、文献 (J . I m m u n o l . 146 : 3721 - 3728) 記載の方法によりハイブリドーマを選択した。選択は、固定化したポリペプチド (a) に反応する細胞を選択することにより行い、その結果、39E1 と 34E3 というハイブリドーマを得た。

【0079】

上記のようにして選択したハイブリドーマのそれぞれを無血清培地である G I T 培地 (和光純薬) 中で細胞の 80% が死滅するまで抗体を産生させた。次いでこの培地から遠心 (1,000 r p m , 15 m i n) により細胞を取り除いた後、硫酸アンモニウムの 50% 飽和状態にして 4 で一晩静置し、沈殿を遠心 (1,000 r p m , 30 m i n) により回収した。更にこの沈殿を、2 倍に希釈したバインディングバッファー (b i n d i n g b u f f e r : P r o t e i n A M A P S I I k i t 製) に溶解させた後、プロテイン A カラム (P h a r m a c i a - A m e r s h a m 製) に通して I g G を吸着させた。その後、このカラムに P B S 透析を一晩行って抗体を精製し、ヒト O P N N - h a l f の C 末端を含むポリペプチドを認識する抗体をそれぞれのハイブリドーマから得た。そしてこれらの抗体を 39E1 抗体および 34E3 抗体と名付けた。なお、モノクローナル抗体 34E3 抗体を産生するハイブリドーマ (H u m a n O s t e o p o n t i n H y b r i d o m a . 34E3) については、平成 18 年 7 月 11 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 (〒305 8566 日本国茨城県つくば市東 1 丁

10

20

30

40

50

目1番地1中央第6)にFERM BP-10897として国際寄託した(平成18年7月11日付で上記センターに国内寄託したFERM P-20957より移管)。

【0080】

参考例 3

ポリクローナル抗体の作製(1)：

免疫用抗原として、実施例2において得られたポリペプチド(b)とサイログロブリンとの結合物を用い、1週間、または2週間おきに結合物溶液の50 μ l(100mg/ml)を投与し、ウサギを免疫化した。抗原は初回免疫のみにフロイント完全アジュバントと混和し、二回目からはフロイント不完全アジュバントと混和した。その後、全採血を行い1,500rpmで15分間の遠心により抗血清を分離し、ウサギポリクローナル抗体(以下、この抗体を「hOPN-1抗体」という)を得た。

10

【0081】

参考例 4

ポリクローナル抗体の作製(2)：

免疫用抗原として、実施例2において得られたポリペプチド(c)とサイログロブリンとの結合物を用い、免疫化する動物としてマウスを用いる以外は参考例3と同様にしてマウスポリクローナル抗体(以下、この抗体を「hOPN-5抗体」という)を得た。

【0082】

参考例 5

OPNの作製：

hOPNはhOPNの遺伝子(アクセッションナンバー：J04765)をベクターであるpcDNA3.1へ常法(例えば、「分子生物学基礎実験法」、南江堂)に従い組み込み、更にそのベクターをチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞にトランスフェクションした。次に、この細胞を培養した際の培養上清から抗OPN-1抗体カラム(株式会社免疫生物研究所製)にて精製することにより得た。このhOPNをトロンピンを用いて37、90分処理することによりOPN N-halfを得た。更に、mOPNおよびrOPN、更にはそれらを上記と同様にトロンピンで処理してmOPNおよびrOPNのそれぞれのN-halfを得た。

20

【0083】

実施例 2

ウエスタンブロッティングによる抗体の特異性の確認：

実施例1で得られた39E1抗体および34E3抗体の特異性を確認するために、常法(例えば、「分子生物学基礎実験法」、南江堂)に従いウエスタンブロッティングを行った。なお、ウエスタンブロッティングには、参考例5で作製したhOPNまたはhOPN N-half、hOPNまたはhOPN N-halfにトロンピンを加えて37、90分で処理したもの(Thrombin(+))、hOPNまたはhOPN N-halfにトロンピンを加えず処理したもの(Thrombin(-))を用いた。また、対照として免疫に用いたポリペプチドが異なる参考例3で得たhOPN-1抗体および参考例4で得たhOPN-5抗体を用いて、同様にウエスタンブロッティングを行った。これらの結果を図1に示した。

30

40

【0084】

図1は、39E1抗体および34E3抗体がhOPNには反応せず、hOPN N-halfにのみ反応するという結果を示した。一方、hOPN-1抗体およびhOPN-5抗体はhOPNおよびhOPN N-halfの両方に反応していた。この結果により39E1抗体および34E3抗体がOPN N-halfにのみ反応する特異的な抗体であることが示された。

【0085】

実施例 3

ウエスタンブロッティングによる抗体の交差性の確認：

上記39E1抗体および34E3抗体を用いて、mOPNおよびrOPNに対してウエ

50

スタンプロットを行った結果を図2に示す。また、対照として本出願人の国際特許出願（WO02/081522国際公開パンフレット）に記載の以下のポリペプチド（d）（mOPNの138番目～153番目に該当するアミノ酸配列にシスティン（C）を付けたものである）を抗原として得られた抗体（以下、この抗体を「mOPN-5抗体」という）を用い、上記と同様にウエスタンプロットを行った。この結果も図2に示した。

ポリペプチド（d）：CVDVPNGRGDSLAYGLR（配列番号12）

【0086】

図2は、39E1抗体および34E3抗体がhOPN N-halfだけでなく、mOPN N-halfおよびrOPN N-halfに対しても反応することを示した。このことは39E1抗体および34E3抗体がhOPN N-half、mOPN N-halfおよびrOPN N-halfに交差性を有することおよび前記抗体の認識部位が、hOPN N-half、mOPN N-halfおよびrOPN N-halfのC末端に共通のアミノ酸配列であることを示した。

10

【0087】

実施例4

サンドイッチELISA法の構築：

（1）hOPN-1抗体とHRPとの結合物の作製

参考例3で得られたhOPN-1抗体と西洋わさびペルオキシダーゼ（HRP）との結合物を以下のように作製した。必要量のHRPを蒸留水に溶解し、NaIO₄で酸化させた後、pH4.4の1mM酢酸緩衝液に一晩透析した。また、hOPN-1抗体の2mgもpH9.5の0.1M炭酸緩衝液に一晩透析した。これらの透析したhOPN-1抗体とHRPを、抗体1mgに対してHRPが0.4mgになるように混合し、室温で2時間反応させた。次いで、これにNaBH₄を加え氷中で2時間反応させた後PBSに一晩透析した。更に、この反応物をゲル濾過し、hOPN-1抗体とHRPとの結合物（以下、これを「hOPN-1標識抗体」という）を作製した。

20

【0088】

（2）サンドイッチELISA用プレートの作製

10μg/mlの39E1抗体あるいは34E3抗体を100μlずつ96wellのELISA用プレートに加え、また比較の目的で同様にhOPN-5抗体を加えた。次いで、これを4℃で一晩反応させた後、1%BSA/PBS/NaN₃溶液にてブロッキングを行い、39E1抗体あるいは34E3抗体を固相化したサンドイッチELISA用プレートとした。また、上記（1）で作製したhOPN-1抗体とHRPとの結合物を標識抗体とした。

30

【0089】

（3）標準曲線の作製

上記（2）で作製した96wellのELISA用プレートと、上記（1）で作製したhOPN-1標識抗体を用いて、hOPN（Thrombin（-））およびhOPN N-half（Thrombin（+））の測定を行った。また、コントロールとしてhOPNの測定を行った。これらの結果を図3に示した。39E1抗体または34E3抗体とhOPN-1標識抗体を用いてhOPN N-halfの測定をした場合には、それぞれ濃度依存的に良好な直線性を示した。また、hOPNとの交差性はそれぞれ約0.39%であった。一方、hOPN-5抗体とhOPN-1標識抗体を用いてhOPN N-halfの測定をした場合にはいずれも濃度依存的に良好な直線性を示したものの、hOPNとの交差性が約25%もあった。

40

【0090】

実施例5

細胞接着阻害活性試験：

（1）マウスメラノーマ細胞接着試験

9および4インテグリンを有するマウスメラノーマ細胞株B16-F10（北海道大学より供与）を用いて、以下の方法によりこの細胞に対して接着活性を持つポリペプチ

50

ドを以下のポリペプチドを用いて検定した。まず、検定に用いたポリペプチドのうち、mOPNのアミノ酸配列（配列番号4）中、17～32番目のアミノ酸配列に該当するポリペプチド（mOPN-1ペプチド）、155～172番目のアミノ酸配列に該当するポリペプチド（mOPN-3ペプチド）、147～153番目のアミノ酸配列に該当するポリペプチド（mOPN-7ペプチド）、138～153番目のアミノ酸配列に該当するポリペプチド（mOPN-5ペプチド）、143～147番目のアミノ酸配列に該当するポリペプチド（GRGDSペプチド）はシンペップ社（Synpep Corporation）、タナ社（TANA Laboratories, USA）およびオースペップ社（Auspep）より購入した。また、全長OPN（Full mOPN）およびマウスOPN N-half（mOPN-N）の各タンパク質は参考例5と同様にして調製した。

mOPN-1ペプチド：LPVKVTDSSSEEEKLY（配列番号7）

mOPN-3ペプチド：KRSRFQVSDQYPDATDE（配列番号13）

mOPN-5ペプチド：VDVPNGRGDSLAYGLR（配列番号14）

mOPN-7ペプチド：SLAYGLR（配列番号15）

GRGDSペプチド：GRGDS（配列番号16）

【0091】

上記ポリペプチドまたはタンパク質はそれぞれ0.1Mの炭酸緩衝液（pH9.5）で20μg/mlの濃度に調整した後、96wellのELISA用プレートに50μl/wellずつ加えた。次いでこれを4℃で一晩反応させた後、0.5%BSA/PBS/NaN₃溶液にてブロッキングを行い、その後PBSで洗浄して上記ポリペプチドまたはタンパク質を固相化したELISA用プレートを作製した。次に、このプレートにB16-F10細胞を0.25%BSA/D-MEMで1×10⁵cells/mlに調整した後、各ウェルに200μlずつ加え、これを1時間、37℃でインキュベート後0.25%BSA/D-MEMで洗浄し、プレートから接着していない細胞を取り除いた。そして、各ウェルに0.5%クリスタルバイオレットを含む20%メタノールを加え、30分間染色した。全てのウェルは、水で3回すすぎ、接着した細胞は20%酢酸により転溶させた。各ウェルの上清をウェルに接着した細胞の相対的数を求めるために590nmの吸収を測定し、イムノリーダーで分析した。これらの結果を図4に示した。

【0092】

図4は、9および4インテグリンを有するマウスメラノーマ細胞株が、アミノ酸配列GRGDSを含まないポリペプチドであるmOPN-1ペプチド、mOPN-3ペプチドとは殆ど接着しないことを示した。

【0093】

(2) 接着阻害試験

39E1抗体、34E3抗体あるいはmOPN-5抗体が、mOPNに含まれるポリペプチド（mOPN-5ペプチド、mOPN-7ペプチドおよびGRGDSペプチド）に対する細胞の接着を阻害するかどうかを以下の方法で調べた。まず、96穴プレートを、4℃で一晩、種々の濃度のmOPN-5、mOPN-7およびGRGDSペプチドでプレコートし、次いで10分間、37℃の条件で0.5%BSAのPBSにより非特異的接着をブロックするための処理を行った。次に、マウスメラノーマ細胞B16-F10を、0.25%BSAを含むD-MEMに懸濁させ、細胞懸濁液（細胞濃度は、5×10⁴細胞/ウェル）200μlを、種々の濃度の前記抗体の何れかの存在下または非存在下で、96穴プレートに注入し、1時間、37℃でインキュベートした。インキュベート後、培地をプレートから除去し、全てのウェルを0.25%BSAを含むD-MEMで2回洗浄した。接着した細胞は固定し、20%メタノール中の0.5%クリスタルバイオレットで30分間染色した。全てのウェルは、水で3回すすぎ、接着した細胞は20%酢酸により転溶させた。各ウェルの上清をウェルに接着した細胞の相対的数を求めるために590nmの吸収を測定し、イムノリーダーで分析した。これらの結果を図5に示した。

【0094】

図5は、39E1抗体および34E3抗体が、マウスメラノーマ細胞株とmOPN-5

およびmOPN-7との接着を阻害することを示した。また、39E1抗体および34E3抗体は、マウスメラノーマ細胞株とGRGDSペプチドとの接着に影響を及ぼさないことから、39E1抗体および34E3抗体が、mOPNと4および9インテグリンとの接着を阻害することが確認された。なお、図5においてGRGDSペプチドを含むポリペプチド(d)を抗原として得られたmOPN-5抗体がGRGDSペプチドとマウスメラノーマ細胞株との接着を阻害していないのは、mOPN-5抗体が短いGRGDSペプチドを認識しないためである。

【0095】

実施例 6

39E1抗体および34E3抗体を用いた精製系の構築：

39E1抗体および34E3抗体の認識部位が、OPN N-halfのC末端のアミノ酸からN末端側に連続したアミノ酸配列であることを示すために以下の実験を行った。

まず、39E1抗体および34E3抗体の作製に用いたhOPN-7ペプチド内の異なる5つの部分を有する以下のポリペプチド(I)~(V)をコードするポリヌクレオチドを3'側に有し、5'側には、これらのポリペプチド(I)~(V)を結合させたい任意のポリペプチド配列のC末部分をコードするポリヌクレオチドを持つように設計した5パターンのプライマー(アンチセンスプライマー)を作製した。センスプライマーにはSP6プロモーターに対するプライマーを作製した。そしてこれらのアンチセンスプライマーとセンスプライマーを用いたPCR法で、mRNA合成に必要なプロモーターからcDNAの3'端までを合成した。更にこのPCR産物を鋳型としてmRNAを合成し、そのmRNAから更にそれぞれの塩基配列に対応したタンパク質を小麦胚芽抽出液(セルフリーサイエンス製)を用いた無細胞合成系で合成した。39E1抗体および34E3抗体と合成した各タンパク質およびコントロールとしてhOPN N-halfを用いてウエスタンブロットングを行った。また、対照として本出願人らが報告しているWO02/081522国際公開パンフレットに記載の上記ポリペプチド(c)を抗原としたモノクローナル抗体である2K1抗体を用いて、同様にウエスタンブロットングを行った。これらの結果を図6に示した。

ポリペプチド (I)	:	YGLR	(配列番号1)
ポリペプチド (II)	:	VYGLR	(配列番号17)
ポリペプチド (III)	:	VYGL	(配列番号18)
ポリペプチド (IV)	:	SVVYGL	(配列番号19)
ポリペプチド (V)	:	SVVYG	(配列番号20)

【0096】

図6は、39E1抗体および34E3抗体は、抗原に用いたhOPN N-halfのC末端のアミノ酸Rを含み、それからN末端側に連続したアミノ酸配列からなるポリペプチド(I)、(II)およびhOPN N-halfを認識し、hOPN N-halfのC末端のアミノ酸Rを含まないポリペプチド(III)~(V)は認識しないという結果を示した。一方、2K1抗体はポリペプチド(I)~(V)の何れをも認識できず、hOPN N-halfもほとんど認識しないという結果を示した。これらの結果より、39E1抗体および34E3抗体がトロンピン開裂されたhOPN N-halfのC末端のアミノ酸Rを認識していることを示すとともに、ポリペプチドやタンパク質の検出・精製タグとして有用であることが示された。

【0097】

実施例 7

E L I S A法による慢性関節リウマチ(RA)患者尿中のOPN N-half量の測定：

インフォームドコンセントを得た健常者23例およびRA患者25例について尿を採取し、Human Osteopontin Assay Kit (L) IBL(株式会社免疫生物研究所製(製品番号:27158)および実施例4で作製したE L I S A系を用いて、全長OPN濃度および

10

20

40

50

OPN N-half濃度を測定した。尿サンプル中の全長OPNおよびOPN N-half濃度はpM、また数値は平均±標準誤差で表した。これらの濃度を測定した結果を表1に示した。

【0098】

【表1】

	尿中全長OPN 濃度 (nM)	尿中OPN N-half 濃度 (pM)	OPN N-half 濃度の健常者に対する有意差* (p値)
健常者	381.4±59.3	801.5±178.4	—
RA患者	288.1±48.8	2128.4±429.4	p<0.01

* student's t-test

【0099】

測定の結果、尿中全長OPN濃度については、健常人とRA患者の間に統計的有意差は認められなかったが、尿中OPN N-half濃度は、健常者が801.5±178.4 pMであったのに対し、RA患者が2128.4±429.4 pMという結果となり、健常者尿の濃度よりも有意に高値を認めた。

【0100】

この結果より、本キットで測定される尿中OPN N-halfの測定が慢性関節リウマチ疾患の新しい診断マーカーとして用いられることが明らかとなり、これにより本発明のキットによる尿検体を利用した非侵襲的検査が可能となる。

20

【0101】

実施例8

E L I S A法による変形性関節炎(OA)および慢性関節リウマチ(RA)患者膝関節液中のOPN N-half量の測定:

変形性関節炎(OA)107関節の膝関節液と関節リウマチ(RA)18関節の膝関節液を採取し、-80℃で凍結保存した。OAはKellgren & Lawrenceのgrade 1、2に相当する軽度45関節、grade 3に相当する中等度33関節、grade 4に相当する重度29関節であり、RAはLarsen分類grade I、II、IV、Vの重度例である。関節液を10倍希釈後、実施例4で作製したE L I S Aキットを用いて、OPN N-half濃度を求めた。また、比較としてHuman Osteopontin Assay Kit (L) IBL(株式会社免疫生物研究所製(製品番号:27158))を用いて全長OPN濃度も測定した。更に、OPN N-half/OPN N-half+全長OPN(OPN N-half量/OPN全量)の値も求めた。これらの結果を表2に示した。

30

【0102】

【表2】

		n	全長 OPN (nM)	OPN-N half (pM)	OPN N half + OPN 全長 (nM)	OPN N-half/ OPN N-half + 全長 OPN (%)
OA	全部	107	7.16	112.2	7.28	1.54%
	軽度	45	5.86	55.0	5.92	0.93%
	中等度	33	8.89	163.9	9.05	1.81%
	重度	29	7.22	142.2	7.36	1.93%
RA		18	13.23	1231.9	14.46	8.52%

【0103】

50

OAとRAの比較：

- ・全長OPNは、有意差無し
- ・OPN N - h a l f は、RAで高値 (P = 0.0001)
- ・OPN N - h a l f +全長OPNは、有意差無し
- ・OPN N - h a l f / OPN

N - h a l f +全長OPNは、RAで高値 (p < 0.0001)

OAのグレード間での比較：

- ・全長OPNは相関無し
- ・OPN N - h a l f はグレードと正の相関有り (p = 0.0037、r = 0.282)、軽度より中等度、重度で高値 (p = 0.0363)
- ・OPN N - h a l f / OPN N - h a l f +全長OPNは、グレードと正の相関有り (p = 0.0048、r = 0.274)、軽度より中等度、重度で高値 (p = 0.0189)

10

【0104】

この結果により、関節液中のOPN N - h a l f濃度を測定することによりあるいはOPN全量に対するOPN N - h a l f量の比率を求めることにより、OAとRAの鑑別およびOAの重篤度の判定が可能となる。

【0105】

実施例 9

ウエスタンブロット法による患者膝関節液中のOPN N - h a l f量の検出：

20

実施例8で採取した患者膝関節液のうち、実施例8のELISA法による測定結果でOPN N - h a l f量が高値を示した膝関節液と測定値がほとんど認められなかった膝関節液を用いてウエスタンブロット法により本願のOPN N - h a l f抗体を用いて検出した。詳しくは、これら膝関節液の0.15mlをD - P B Sにて2倍に希釈し、これにDEAE Sepharose Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech製)を20μl添加し、室温で30分混和した。次にこれを1.0mlのPBSで5回洗浄し、0.7Mの塩化ナトリウム/PBS溶液の0.1mlで溶出させ、更に、これに等量の2倍のドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 緩衝液と混和し、煮沸処理を行い、ウエスタンブロットのサンプルとした。このサンプルに対し、実施例1で得られた34E3抗体を用いて常法 (例えば、「分子生物学基礎実験法」、南江堂) に従いウエスタンブロッティングを行った。

30

【0106】

実施例8のELISA法でOPN N - h a l f量が高値を示した患者膝関節液では、ウエスタンブロット法においてもその濃度に従ってOPN N - H a l fのバンドが認められた。一方、ELISA法では測定値がほとんど認められなかった膝関節液では、ウエスタンブロット法においてもOPN N - H a l fのバンドは認められなかった。

【0107】

実施例 10

肝炎モデルマウスへの34E3抗体投与：

C57BL/6マウスにConAを200ug/匹、静脈内投与し肝炎を発症させた。ConA投与の前3時間に、34E3抗体またはコントロール抗体を400ug/匹、静脈内投与した。ConA投与24時間後に、血清を回収し、ALT値を測定した。

40

【0108】

34E3抗体投与群は、コントロール抗体投与群と比べて有意にALTレベルの低下が見られた。このことから34E3抗体はConA投与による肝細胞の壊死を抑制できることが分かった。

【産業上の利用可能性】

【0109】

本発明のトロンピン開裂OPN (OPN N - h a l f) のC断端ペプチドを認識する抗体は、トロンピン開裂OPNを認識し、かつ全長OPNを認識しないものである。そし

50

て、これを利用したOPN N - h a l f測定キットは、これまで市販されているOPN測定キットと異なり、OPN N - h a l fを正確に測定することができる。

従って、本発明の測定キットは、OPNが関連する炎症系の疾患の診断や、発症に関するメカニズム等の研究に利用することができる。また、本抗体そのものを抗体医薬として炎症系疾患の治療剤としても用いることができ、更にはOPN N - h a l fその他トロンビン開裂OPNのC末断端を有するペプチドを精製するためのタグとして利用することができる。

【図面の簡単な説明】

【0110】

【図1】図1は34E3抗体、39E1抗体、hOPN - 1抗体およびhOPN - 5抗体を用いたウエスタンブロッティングを示す図面である（図中、レーン1はhOPN、2はhOPN Thrombin (-)、3はhOPN Thrombin (+)、4はhOPN N - h a l f、5はhOPN N - h a l f Thrombin (-)、6はhOPN N - h a l f Thrombin (+)を示す）。

10

【図2】図2は34E3抗体、39E1抗体およびmOPN - 5抗体を用いたウエスタンブロッティングを示す図面である。

【図3】図3は実施例4で作製したELISA用プレートを用いてhOPN N - h a l f (Thrombin (+))、hOPN (Thrombin (-))およびコントロール (hOPN) を測定した結果を示す図面である（図中、AはhOPN - 5抗体とhOPN - 1標識抗体により測定した結果、Bは34E1抗体とhOPN - 1標識抗体により測定した結果およびCは39E3抗体とhOPN - 1標識抗体により測定した結果を示す）。

20

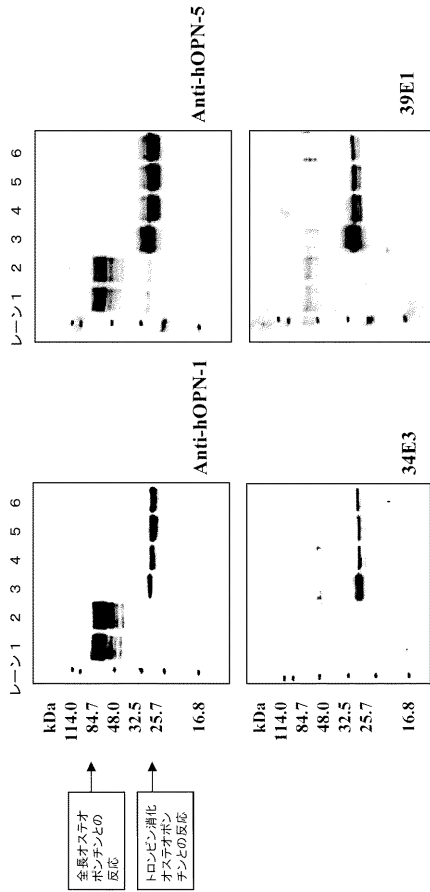
【図4】図4はマウスOPN由来の各種ポリペプチドの、マウスメラノーマ細胞株B16 - F10に対する接着試験の結果を示す図面である。

【図5】図5はマウスOPN由来の各種ポリペプチドに対する34E3抗体 (34E3)、39E1抗体 (39E1) およびmOPN - 5抗体 (M - 5) の接着阻害活性を測定した結果を示す図面である（図中、AはmOPN - 5ペプチドを用いた接着阻害試験の結果、BはmOPN - 7ペプチドを用いた接着阻害試験の結果およびCはGRGDSペプチドを用いた接着阻害試験の結果を示す）。

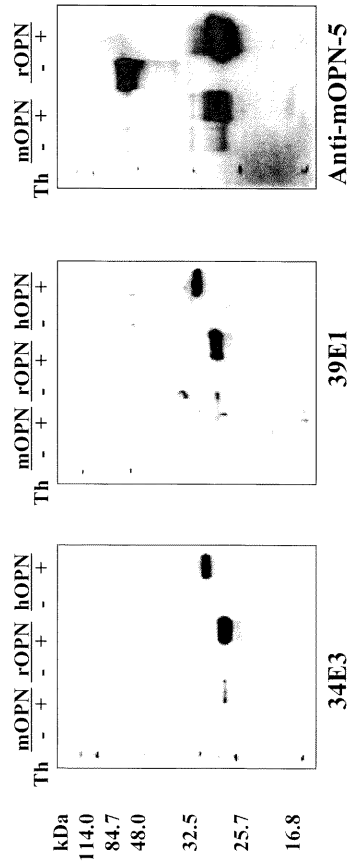
【図6】図6は34E3抗体、39E1抗体およびhOPN - 5抗体と各種ポリペプチドまたはタンパク質を用いたウエスタンブロッティングを示す図面である（図中、レーン1は - mRNA、2はcDNA、3はcDNA - YGLR、4はcDNA - VYGLR、5はcDNA - VYGL、6はcDNA - SVVYGL、7はcDNA - SVVYG、8は精製hOPN N - h a l f）。

30

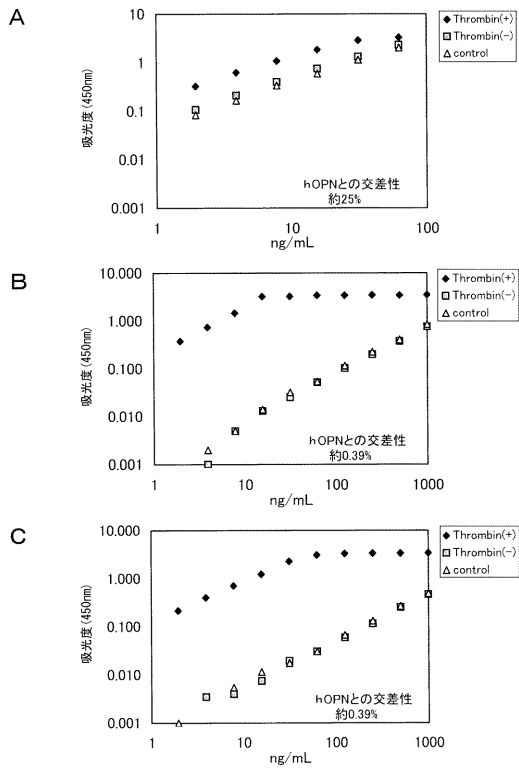
【 図 1 】



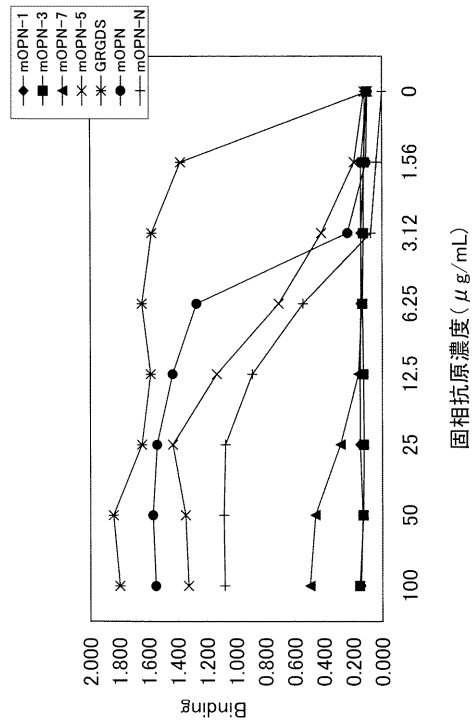
【 図 2 】



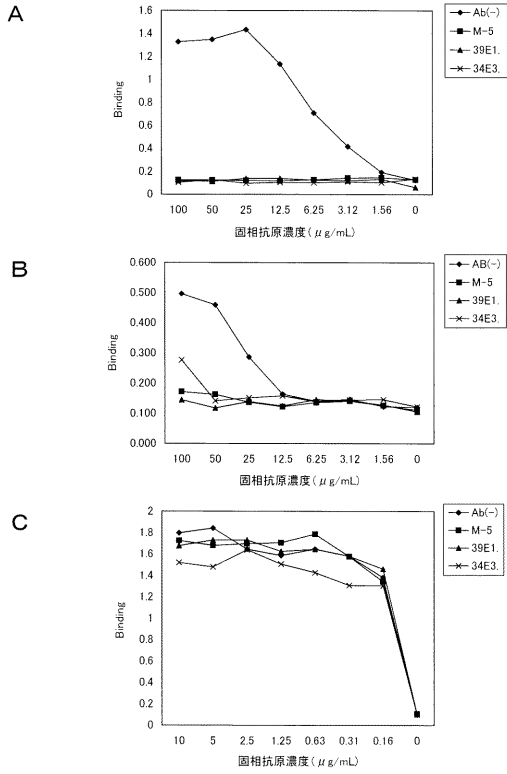
【 図 3 】



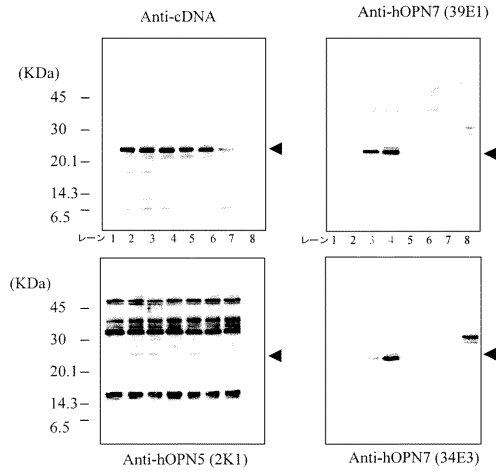
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



【 配列表 】

2008032712000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/067666

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N15/00(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P37/02(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)n 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) C12N15/00, A61K39/395, A61P37/02, C07K16/18, C12N15/09, G01N33/53, C12P21/08 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) BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/CAPLUS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/Geneseq, JMEDPlus/JST7580/JSTPlus (JDream2)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KON S. et al. 'Mapping of functional epitopes of osteopontin by monoclonal antibodies raised against defined internal sequences' J. Cell. Biochem. (2002) vol. 84, pp. 420-432	1-8, 11-19, 21, 22, 24
A	YOKOSAKI Y. et al. 'The integrin $\alpha_9\beta_1$ binds to a novel recognition sequence (SVVYGLR) in the thrombin-cleaved amino-terminal fragment of osteopontin' J. Biol. Chem. (1999) vol. 274, pp. 36328-36334	1-8, 11-19, 21, 22, 24
A	YAMAMOTO N. et al. 'Essential role of the cryptic epitope SLAYGLR within osteopontin in a murine model of rheumatoid arthritis' J. Clin. Invest. (2003) vol. 112, pp. 181-188	1-8, 11-19, 21, 22, 24
<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	"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	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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	
"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)	"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	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 27 November, 2007 (27.11.07)	Date of mailing of the international search report 11 December, 2007 (11.12.07)	
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer	
Facsimile No.	Telephone No.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/067666

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HOTTA H. et al. 'Detection of various epitopes of murine osteopontin by monoclonal antibodies' Biochem. Biophys. Res. Commun. (1999) vol. 257, pp. 6-11	1-8, 11-19, 21, 22, 24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/067666

Box No. 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.: 9, 10, 20, 23
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The inventions of claims 9 and 10 which relate to "a method for the diagnosis of rheumatoid arthritis", the invention of claim 20 which relates to "a method for the treatment of an inflammatory disease", and the invention of claim
(continued to extra sheet)
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:
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 No. 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:

The invention of claim 1 relates to "a monoclonal antibody which recognizes a protein or polypeptide having an amino acid sequence: YGLR (SEQ ID NO:1) at the C-terminus but does not substantially recognize a protein or polypeptide having an amino acid sequence: YGLR at any region other than the C-terminus". The invention of claim 25 relates to "a recombinant vector having a polynucleotide encoding a desired protein and a polynucleotide encoding a protein or polypeptide having an amino acid sequence: YGLR (SEQ ID NO:1) at the C-terminus".

The protein or polypeptide having an amino acid sequence: YGLR (SEQ ID NO:1)

(continued to extra 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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
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.:
1-24

Remark on Protest
the

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/067666

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet(2)

23 which relates to "a method for the treatment of an autoimmune disease" pertain to a method for diagnosis/treatment of the human body.

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

at the C-terminus is already known at the priority date of the present application, as disclosed in a document (KONS. et al., J. Cell. Biochem., vol.84, pp.420-432, 2002). Therefore, a fact that the only one common matter is a protein or polypeptide having an amino acid sequence: YGLR (SEQ ID NO:1) at the C-terminus cannot be regarded as a special technical feature in the meaning within PCT Rule 13.2.

Consequently, among the inventions of the claims, the inventions of claims 1-24 which relate to "a monoclonal antibody" and the invention of claim 25 which relates to "a recombinant vector" cannot be regarded as a group of inventions so related as to form a single general inventive concept. Thus, the present application appears to include two inventions corresponding to "a monoclonal antibody" and "a recombinant vector", respectively.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2007/067666	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/00(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P37/02(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)n			
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. C12N15/00, A61K39/395, A61P37/02, C07K16/18, C12N15/09, G01N33/53, C12P21/08			
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) BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/CAplus(STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/Geneseq, JMEDPlus/JST7580/JSTPlus(JDream2)			
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	
A	KON S. et al. 'Mapping of functional epitopes of osteopontin by monoclonal antibodies raised against defined internal sequences' J. Cell. Biochem. (2002) vol. 84, pp. 420-432	1-8, 11-19, 21, 22, 24	
A	YOKOSAKI Y. at al. 'The integrin $\alpha_9\beta_1$ binds to a novel recognition sequence (SVVYGLR) in the thrombin-cleaved amino-terminal fragment of osteopontin' J. Biol. Chem. (1999) vol. 274, pp. 36328-36334	1-8, 11-19, 21, 22, 24	
A	YAMAMOTO N. et al. 'Essential role of the cryptic epitope SLAYGLR within osteopontin in a murine model of rheumatoid arthritis' J. Clin. Invest. (2003) vol. 112, pp. 181-188	1-8, 11-19, 21, 22, 24	
☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。		☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。	
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 27. 11. 2007		国際調査報告の発送日 11. 12. 2007	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 石丸 聡 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	
		4B	3777

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 7 / 0 6 7 6 6 6

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	HOTTA H. et al. 'Detection of various epitopes of murine osteopontin by monoclonal antibodies' Biochem. Biophys. Res. Commun. (1999) vol. 257, pp. 6-11	1-8, 11-19, 21, 22, 24

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2007/067666

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲9, 10, 20, 23 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求の範囲9、10に記載の「関節リュウマチを診断する方法」、請求の範囲20に記載の「炎症性疾患の治療方法」、及び請求の範囲23に記載の「自己免疫疾患の治療方法」に係る発明は人の身体に関して実施する診断・治療方法である。
2. 請求の範囲_____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲_____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1には、「C末端のアミノ酸配列がYGLR (配列番号1) であるタンパク質またはポリペプチドを認識し、アミノ酸配列YGLRをC末端以外に有するタンパク質またはポリペプチドを実質的に認識しないことを特徴とするモノクローナル抗体」に係る発明が記載されている。一方、請求の範囲25には「目的タンパク質をコードするポリヌクレオチドおよびC末端のアミノ酸配列がYGLR (配列番号1) であるタンパク質またはポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを有する組換えベクター」に係る発明が記載されている。

(以下特別ページに続く)

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲1 - 24

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2007/067666

(第1ページの続葉(2)、第III欄の続き)

ここで、C末端のアミノ酸配列がYGLR(配列番号1)であるタンパク質またはポリペプチドは、文献(KON S. et al., J. Cell. Biochem., vol. 84, pp. 420-432, 2002)にも記載されているように本願優先日前から公知である。したがって、'C末端のアミノ酸配列がYGLR(配列番号1)であるタンパク質またはポリペプチド'でのみ共通していることは、PCT規則13.2における特別な技術的特徴であるとはいえない。

よって、請求の範囲に記載された発明のうち、1-24に記載された'モノクローナル抗体'に関する発明と、25に記載された'組換えベクター'に関する発明とは、単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとはいえず、本出願は、'モノクローナル抗体'と'組換えベクター'に対応する2個の発明を含むものと認められる。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00		
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 1/16		
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02		
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 19/02		
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 17/06		
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04		
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/04		
A 6 1 P 21/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/00		
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 21/00		
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	A 6 1 P 13/12		
	C 1 2 P 21/08		

(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,LV,MC,MT,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,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

Fターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA13
 4C085 AA14 BB11 CC02 CC04 CC05 DD22 DD23 DD32 DD42 EE01
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 CA40 DA76 DA86 EA20 EA50 FA74

(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)	单克隆抗体及其用途		
公开(公告)号	JPWO2008032712A1	公开(公告)日	2010-01-28
申请号	JP2008534349	申请日	2007-09-11
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社 免疫生物研究所		
申请(专利权)人(译)	株式会社 免疫生物研究所		
[标]发明人	小林浩子 長谷川正裕 清藤勉		
发明人	小林 浩子 長谷川 正裕 清藤 勉		
IPC分类号	C07K16/18 C12N15/09 C07K14/47 G01N33/53 A61K39/395 A61P29/00 A61P1/16 A61P43/00 A61P37/02 A61P19/02 A61P17/06 A61P37/04 A61P31/04 A61P17/00 A61P21/00 A61P13/12 C12P21/08		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P1/16 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P21/00 A61P29/00 A61P31/04 C07K16/18 C07K16/24 C07K2317/74 G01N33/6893 G01N2333/51 G01N2333/52		
FI分类号	C07K16/18 C12N15/00.ZNA.A C07K14/47 G01N33/53.V A61K39/395.N A61P29/00 A61P1/16 A61P43/00.105 A61P29/00.101 A61P37/02 A61P19/02 A61P17/06 A61P37/04 A61P31/04 A61P17/00 A61P21/00 A61P13/12 C12P21/08		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA53 4B024/BA80 4B024/CA02 4B024/CA09 4B024/EA04 4B024/HA01 4B024/HA11 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC02 4C085/CC04 4C085/CC05 4C085/DD22 4C085/DD23 4C085/DD32 4C085/DD42 4C085/EE01 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	2006245966 2006-09-11 JP		
其他公开文献	JP5437633B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

一个目的是提供一种仅识别OPN N-一半而不识别全长OPN及其用途的抗体。一种单克隆抗体，其特征在于识别具有C末端氨基酸序列YGLR (SEQ ID NO: 1) 的蛋白质或多肽，并且基本上不识别具有除C末端氨基酸序列YGLR的蛋白质或多肽，和提供使用抗体测量OPN N-一半的方法，诊断与OPN N-一半相关的疾病的方法，确定严重性的方法和治疗方法。