

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5687305号  
(P5687305)

(45) 発行日 平成27年3月18日(2015.3.18)

(24) 登録日 平成27年1月30日(2015.1.30)

(51) Int.Cl.

F I

<b>C 0 7 K</b>	<b>1 6 / 2 8</b>	<b>( 2 0 0 6 . 0 1 )</b>	C 0 7 K	1 6 / 2 8	Z N A
<b>C 1 2 N</b>	<b>5 / 1 0</b>	<b>( 2 0 0 6 . 0 1 )</b>	C 1 2 N	5 / 0 0	1 0 2
<b>A 6 1 K</b>	<b>3 9 / 3 9 5</b>	<b>( 2 0 0 6 . 0 1 )</b>	A 6 1 K	3 9 / 3 9 5	N
<b>A 6 1 P</b>	<b>3 5 / 0 0</b>	<b>( 2 0 0 6 . 0 1 )</b>	A 6 1 P	3 5 / 0 0	
<b>A 6 1 P</b>	<b>2 9 / 0 0</b>	<b>( 2 0 0 6 . 0 1 )</b>	A 6 1 P	2 9 / 0 0	

請求項の数 8 (全 18 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-97970 (P2013-97970)  
 (22) 出願日 平成25年5月7日(2013.5.7)  
 (62) 分割の表示 特願2008-4299 (P2008-4299)  
       の分割  
       原出願日 平成20年1月11日(2008.1.11)  
 (65) 公開番号 特開2013-227315 (P2013-227315A)  
 (43) 公開日 平成25年11月7日(2013.11.7)  
       審査請求日 平成25年6月6日(2013.6.6)

微生物の受託番号 IPOD FERM BP-10830  
 微生物の受託番号 IPOD FERM BP-10831

(73) 特許権者 501416243  
 株式会社ジーンテクノサイエンス  
 北海道札幌市中央区北2条西9丁目1番地  
 (74) 代理人 100092783  
 弁理士 小林 浩  
 (74) 代理人 100126354  
 弁理士 藤田 尚  
 (74) 代理人 100104282  
 弁理士 鈴木 康仁  
 (72) 発明者 今 重之  
 北海道札幌市北区北17条西6丁目1-1  
 -803  
 (72) 発明者 上出 利光  
 北海道札幌市清田区真栄5条3丁目8番2  
 号

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗ヒト $\alpha$ 9インテグリン抗体とその用途

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号1、3、および5のアミノ酸配列をそれぞれ重鎖の相補性決定領域(CDRH)のCDRH1、CDRH2、およびCDRH3として含有し、かつ、配列番号7、9、および11のアミノ酸配列をそれぞれ軽鎖の相補性決定領域(CDRL)のCDRL1、CDRL2、およびCDRL3として含有する、抗ヒト $\alpha$ 9インテグリン抗体であって、21C5抗体及び24I11抗体に比べて少量で、OPNペプチドまたはテネイシンCフラグメントと $\alpha$ 9インテグリン発現細胞との接着を阻害する、抗ヒト $\alpha$ 9インテグリン抗体。

【請求項2】

Y9A2と同等の量でOPNペプチドまたはテネイシンCフラグメントと $\alpha$ 9インテグリン発現細胞との接着を阻害する、請求項1に記載の抗ヒト $\alpha$ 9インテグリン抗体。

【請求項3】

モノクローナル抗体である、請求項1または2に記載の抗ヒト $\alpha$ 9インテグリン抗体。

【請求項4】

ヒト化抗体である、請求項1~3のいずれかに記載の抗ヒト $\alpha$ 9インテグリン抗体。

【請求項5】

請求項1~4のいずれかに記載の抗ヒト $\alpha$ 9インテグリン抗体を有効成分として含む、癌、炎症性疾患、感染症、自己免疫疾患または骨疾患の治療剤。

【請求項6】

10

20

請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の抗ヒト 9 インテグリン抗体および抗ヒト 4 インテグリン抗体の両方を有効成分として含む、癌、炎症性疾患、感染症、自己免疫疾患または骨疾患の治療剤。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の抗ヒト 9 インテグリン抗体を有効成分として含む、癌、炎症性疾患、感染症、自己免疫疾患または骨疾患の診断剤。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の抗ヒト 9 インテグリン抗体を産生する細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、抗ヒト 9 インテグリン抗体とその用途に関する。より具体的には、本発明は、ヒト 9 インテグリンを特異的に認識するモノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体ならびにヒト抗体、上記モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞、上記モノクローナル抗体の製造方法、上記ハイブリドーマ細胞の製造方法、上記抗ヒト 9 インテグリン抗体を含有する治療剤、上記ヒト 9 インテグリン抗体を含有する診断剤、ヒト 9 インテグリンの活性を阻害する化合物のスクリーニング方法等に関する。

【背景技術】

【0002】

細胞と細胞外マトリックスとの接着は、インテグリンに代表される膜貫通細胞接着タンパク質を介して行われる。インテグリンは 鎖と 鎖の 1 : 1 のヘテロ二量体で構成され、現在までに 鎖 18 種類、 鎖 8 種類が発見され、それらの組合せで、少なくとも 24 種類が同定確認されている。各インテグリンはそれぞれが特異的な細胞外マトリックス(リガンド)を認識することが知られている。また、インテグリンを含む膜貫通細胞接着タンパク質の役割は、細胞と細胞外マトリックスの接着、固定のみならず、細胞外マトリックスからの情報を細胞内シグナルに変換し、細胞の増殖、運動、細胞死、分化などの調節を担っていることが解明されてきている。

20

【0003】

インテグリンはリガンドに対する特異性や機能からサブファミリーに分類され、コラーゲン受容体、ラミニン受容体、ファイブロネクチン、ピトロネクチンなどに含まれる Arg - Gly - Asp (RGD) 配列を認識する RGD 受容体、白血球にのみに存在する白血球特異的受容体に区別される。 4 インテグリンおよび 9 インテグリンは、これらのどれにも属さないサブファミリーであり 4 インテグリンサブファミリーと呼ばれている。

30

【0004】

4 および 9 インテグリンに結合するリガンドとして、オステオポンチン (osteopontin; 以下、OPN と略称する)、ファイブロネクチンの EDA 部位、プロペプチド - フォンビルプラントファクター (pp-vWF)、組織型トランスグルタミナーゼ (tTG)、第 XIII 血液凝固因子そして Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) などが知られている。また、 4 インテグリンが特異的に認識するリガンドとしてファイブロネクチンの CS-1 ドメイン、MadCAM-1 (47) などが知られている。一方、 9 インテグリンが特異的に認識するリガンドは、テネイシン C、プラスミンなどが知られている。

40

【0005】

細胞外マトリックス (ECM) の一種である OPN は分子量約 41 kDa の分泌型酸性リン酸化糖タンパク質であり、乳汁、尿、腎尿細管、破骨細胞、骨芽細胞、マクロファージ、活性化 T 細胞、腫瘍組織などに広く発現が認められている分子である。分子中央部に細胞接着配列 GRGDS とヒト OPN では SVVYGLR 配列、マウス OPN では SLAYGLR 配列、その直後にはトロンピン切断部位を有しており、GRGDS 配列を介して RGD 受容体のインテグリンと、SVVYGLR 配列あるいは SLAYGLR 配列を介し

50

て 4 ( 4 1 ) と 9 ( 9 1 ) インテグリンと接着する。

【 0 0 0 6 】

4 1 はトロンピンで切断されていない O P N ( 非切断型 O P N ) とトロンピンで切断された N 末端フラグメント ( 切断型 O P N ) の両方に結合し、 9 1 は切断型 O P N にのみ結合するという様式の差も見出されている。

【 0 0 0 7 】

4 と 9 インテグリンおよび 1 のインテグリン・サブユニットのアミノ酸配列は公知であり、 G e n B a n k に登録されている。また、これらのインテグリンは種間でアミノ酸配列の類似性が高いことが知られている。

【 0 0 0 8 】

W O 0 2 / 0 8 1 5 2 2 には、 O P N 欠損マウスや O P N に対する中和抗体を用いた O P N 機能抑制による、リウマチ様関節炎や肝炎の治療効果について開示されている。また、この公報には、炎症性疾患発症には 4 インテグリン、 9 インテグリンの認識配列である S V V Y G L R 配列が重要であること、 O P N に対する受容体が免疫担当細胞などにおいて発現し、炎症性疾患に関連していることが開示されている。

【特許文献 1】 W O 0 2 / 0 8 1 5 2 2

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 9 】

現在、癌、炎症性疾患、感染症、自己免疫疾患および骨疾患の治療薬は種々知られているが、より改善された治療効果を有する癌、炎症性疾患、感染症、自己免疫疾患および骨疾患の予防薬および/または治療薬等を開発することが望まれている。

【 0 0 1 0 】

現在までに、本発明者らは、インテグリン、特に 9 インテグリンに着目し、種々の研究を行った結果、 9 インテグリンに対する特異的阻害抗体が癌抑制効果および抗炎症効果を有することを見出し、5 種類のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞 ( 1 K 1 1、 2 1 C 5、 2 4 I 1 1、 2 5 B 6、および 2 8 S 1 ) を作製した ( それぞれ、 F E R M B P - 1 0 5 1 0、 F E R M B P - 1 0 5 1 1、 F E R M B P - 1 0 5 1 2、 F E R M B P - 1 0 5 1 3、および F E R M B P - 1 0 8 3 2 として、茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6 ( 郵便番号 3 0 5 - 8 5 6 6 )、独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに ( 最初の 4 つは 2 0 0 6 年 2 月 1 5 日付で、最後の 1 つは 2 0 0 7 年 5 月 2 9 日付で ) 寄託されている ) 。

【 0 0 1 1 】

このような状況下、さらに薬効の優れたモノクローナル抗体または代替的なモノクローナル抗体が求められている。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 2 】

本発明者らは、前述の 5 種類のモノクローナル抗体より薬効的に優れた、または代替的なモノクローナル抗体を開発するため、鋭意研究し、新規なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞の作製に成功して、本発明を完成した。

【 0 0 1 3 】

すなわち、本発明は、以下に記載の抗ヒト 9 インテグリン抗体、そのモノクローナル抗体、その産生細胞、上記抗体を含有する治療剤、 9 インテグリン活性を阻害する化合物のスクリーニング方法等を提供する。

( 1 ) 配列番号 1 ~ 1 2 のうちのいずれかのアミノ酸配列を含有する、抗ヒト 9 インテグリン抗体。

( 2 ) 配列番号 1、 3、 5、 7、 9、または 1 1 のアミノ酸配列を含有する抗ヒト 9 インテグリン抗体。

( 3 ) 配列番号 1、 3、 5、 7、 9、および 1 1 のアミノ酸配列を含有する抗ヒト 9 インテグリン抗体。

10

20

30

40

50

(4) 配列番号 2、4、6、8、10、または 12 のアミノ酸配列を含有する抗ヒト 9 インテグリン抗体。

(5) 配列番号 2、4、6、8、10、および 12 のアミノ酸配列を含有する抗ヒト 9 インテグリン抗体。

(6) 重鎖の相補性決定領域 (CDRH) におけるアミノ酸配列として配列番号 1 ~ 6 のいずれかのアミノ酸配列を、軽鎖の相補性決定領域 (CDRL) におけるアミノ酸配列として配列番号 7 ~ 12 のいずれかのアミノ酸配列を含有する抗ヒト 9 インテグリン抗体。

(7) ヒト 9 インテグリンと、9 インテグリンのリガンドとの結合を阻害する、上記 (1) ~ (6) のいずれかに記載の抗ヒト 9 インテグリン抗体。

(8) モノクローナル抗体である、上記 (1) ~ (7) のいずれかに記載の抗ヒト 9 インテグリン抗体。

(9) キメラ抗体である、上記 (1) ~ (8) のいずれかに記載の抗ヒト 9 インテグリン抗体。

(10) ヒト化抗体である、上記 (1) ~ (8) のいずれかに記載の抗ヒト 9 インテグリン抗体。

(11) ヒト抗体である、上記 (1) ~ (8) のいずれかに記載の抗ヒト 9 インテグリン抗体。

(12) 受託番号 FERM BP - 10830 または FERM BP - 10831 で標示されるハイブリドーマ細胞により産生される抗ヒト 9 インテグリン抗体。

(13) 上記 (1) ~ (12) のいずれかに記載の抗ヒト 9 インテグリン抗体を有効成分として含む、癌、炎症性疾患、感染症、自己免疫疾患または骨疾患の治療剤。

(14) 上記 (1) ~ (12) のいずれかに記載の抗ヒト 9 インテグリン抗体および抗ヒト 4 インテグリン抗体の両方を有効成分として含む、癌、炎症性疾患、感染症、自己免疫疾患または骨疾患の治療剤。

(15) 上記 (1) ~ (12) のいずれかに記載の抗ヒト 9 インテグリン抗体を有効成分として含む、癌、炎症性疾患、感染症、自己免疫疾患または骨疾患の診断剤。

(16) 上記 (1) ~ (12) のいずれかに記載の抗ヒト 9 インテグリン抗体を産生する細胞。

(17) 受託番号 FERM BP - 10830 または FERM BP - 10831 で標示されるハイブリドーマ細胞。

(18) 9 インテグリンのアミノ酸配列を含有するペプチドを用いることを特徴とする、9 インテグリンの活性を阻害する化合物のスクリーニング方法。

#### 【発明の効果】

##### 【0014】

本発明により、新規な抗 9 インテグリン抗体が提供される。本発明の抗 9 インテグリン抗体は、優れた 9 インテグリン機能抑制作用を示し、癌 (例えば、癌細胞の増殖、転移)、炎症性疾患 (例えば、関節リウマチ、変形性関節症、肝炎、気管支喘息、綿維症、糖尿病、動脈硬化、多発性硬化症、炎症性腸疾患 (潰瘍性大腸炎、クローン病等))、感染症 (例えば、肝炎)、自己免疫疾患 (例えば、全身性エリテマトーデス、多発性筋炎、自己免疫性甲状腺疾患、尿細管間質性腎炎、重症筋無力症) および骨疾患 (例えば、骨粗鬆症) 等に対する治療効果を奏する。また、本発明の抗 9 インテグリン抗体および抗 4 インテグリン抗体の両者を含有する医薬組成物は、さらに改善された、癌、炎症性疾患等の治療効果を奏する。本発明の抗体は、細胞や組織における 9 インテグリンの発現を病理学的に検出できることから、診断薬としても利用できる。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

##### 【0015】

#### [発明の経緯]

4 インテグリンに対する抗体である Tysabri (登録商標) (natalizumab) は 2004 年 11 月にバイオジェン・アイデック (Biogen Idec Inc.、米マサチューセッツ州) とエ

10

20

30

40

50

ラン (Elan Corporation、アイルランド) が多発性硬化症治療薬として米食品医薬品局 (FDA) から承認を受けている。また、Tysabri (登録商標) はクローン病、リウマチ様関節炎等の疾患を対象として臨床開発されている。なお、P4C2 という抗ヒト  $\alpha 4 \beta 1$  インテグリン・モノクローナル抗体が実験室レベルで用いられている。

【0016】

しかし、 $\alpha 9 \beta 1$  インテグリンに対する抗体はヒトおよびモルモットの  $\alpha 9 \beta 1$  インテグリンに特異性を示す Y9A2 と呼ばれるモノクローナル抗体 (A.Wang et al., (1996) Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 15、664-672) が実験用として供されているが、臨床的に用いられていない。

【0017】

本発明では、以下の点を注意深く進めることにより、より優れた薬効が期待できる  $\alpha 9 \beta 1$  インテグリンに対する新たな抗体を得ることができた。

【0018】

(1) ヒト  $\alpha 9 \beta 1$  インテグリン過剰発現株の作製

$\alpha 9 \beta 1$  インテグリンに対する抗体を作製するために、マウス線維芽細胞である NIH-3T3 細胞へ遺伝子導入を行い、ヒト  $\alpha 9 \beta 1$  インテグリンを過剰発現する細胞株を樹立し、この細胞を抗原としてマウスに免疫した。

【0019】

(2) ハイブリドーマのスクリーニング

細胞融合で得られた種々のハイブリドーマからヒト  $\alpha 9 \beta 1$  インテグリンのみに反応するクローンを効率よく得るために、同じインテグリンファミリーであるヒト  $\alpha 4 \beta 1$  インテグリンを CHO-K1 細胞に発現させた細胞を用いて他のインテグリンとは交差反応性を示さず、親細胞 (CHO-K1) の細胞表面抗原とは反応しないクローンを選抜することにより、効率的にヒト  $\alpha 9 \beta 1$  インテグリンに特異的に反応する阻害抗体を得た。

【0020】

[本発明の抗  $\alpha 9 \beta 1$  インテグリン抗体]

本発明は、ヒト  $\alpha 9 \beta 1$  インテグリンに対するモノクローナル抗体を提供する。本発明において、「抗体」とは、抗原である  $\alpha 9 \beta 1$  インテグリンまたはその部分ペプチドに特異的に結合する抗体分子全体またはその断片 (例えば、Fab、Fab<sub>2</sub>、F(ab')<sub>2</sub>、などの断片) を意味し、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。好ましくは、本発明においてはモノクローナル抗体を意味する。また、本発明において「抗体」は、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体を包含する。

【0021】

本発明において、抗体が、あるタンパク質またはその断片に「特異的に結合する」とは、その抗体が他のアミノ酸配列に対するその親和性よりも、これらのタンパク質またはその断片の特定のアミノ酸配列に対して実質的に高い親和性で結合することを意味する。ここで、「実質的に高い親和性」とは、所望の測定装置または方法によって、その特定のアミノ酸配列を他のアミノ酸配列から区別して検出することが可能な程度に高い親和性を意味し、典型的には、結合定数 ( $K_a$ ) が少なくとも  $10^7 M^{-1}$ 、好ましくは、少なくとも  $10^8 M^{-1}$ 、より好ましくは、 $10^9 M^{-1}$ 、さらにより好ましくは、 $10^{10} M^{-1}$ 、 $10^{11} M^{-1}$ 、 $10^{12} M^{-1}$  またはそれより高い、例えば、最高で  $10^{13} M^{-1}$  またはそれより高いものであるような結合親和性を意味する。

【0022】

本発明における「モノクローナル抗体」は、抗原に対して高度に特異的であり、単一の抗原を認識するものをいう。

【0023】

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

10

20

30

40

50

## 【0024】

上記「キメラ抗体」とは、本発明で得られた抗ヒト 9 インテグリン抗体の定常領域をヒトの抗体と同じ定常領域を有するように遺伝子工学的に改変したヒト・マウス・キメラ抗体（欧州特許公開公報 E P 0 1 2 5 0 2 3 参照）を指す。「ヒト化抗体」とは、本発明で得られた抗ヒト 9 インテグリン抗体の H 鎖と L 鎖の相補認識領域（CDR）以外の一次構造をヒトの抗体に対応する一次構造に遺伝子工学的に改変した抗体を言う。「ヒト抗体」とは、ヒトの抗体産生に関与する遺伝子を導入したトランスゲニック動物を用いて作製したモノクローナル抗体（欧州特許公開公報 E P 0 5 4 6 0 7 3 参照）を意味する。

## 【0025】

より具体的には、本発明は、まず、これまで作製された抗ヒト 9 インテグリン抗体と異なる抗ヒト 9 インテグリン抗体を提供する。本発明の好ましい態様による抗体は、配列番号 1、3、5、7、9、または 11 のアミノ酸配列を含有する。さらに好ましい抗体は、配列番号 1、3、5、7、9、および 11 のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列のうち、2 以上、3 以上、4 以上、5 以上、または 6 個を有する抗ヒト 9 インテグリン抗体である。

10

## 【0026】

また、本発明の他の態様による抗体は、配列番号 2、4、6、8、10、または 12 のアミノ酸配列を含有する。さらに好ましい抗体は、配列番号 2、4、6、8、10、および 12 のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列のうち、2 以上、3 以上、4 以上、5 以上、または 6 個を有する抗ヒト 9 インテグリン抗体である。

20

## 【0027】

本発明において特に好ましい抗体は、受託番号 F E R M B P - 1 0 8 3 0 または F E R M B P - 1 0 8 3 1 で標示されるハイブリドーマ細胞により産生される抗ヒト 9 インテグリン抗体である。

## 【0028】

以下、抗 9 インテグリン・モノクローナル抗体の作製について詳述するが、該抗体の作製はこれに限定されることはない。

## [ 9 インテグリン（抗原） ]

## 【0029】

本発明において抗原として使用する 9 インテグリンは、（1）ヒトやその他の哺乳動物の 9 インテグリンを発現するあらゆる細胞、またはそれらの細胞が存在するあらゆる組織に由来するタンパク質、（2）9 インテグリンをコードする遺伝子 DNA、好ましくは c DNA を細菌、酵母、動物細胞等の細胞株に導入、発現させた組換えタンパク質であってもよく、また（3）合成タンパク質であってもよい。

30

## 【0030】

また、本発明の 9 インテグリンには、各種哺乳動物の 9 インテグリンのアミノ酸配列、特に好ましくはヒト 9 インテグリンのアミノ酸配列（配列番号：13）と実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドも包含される。

## 【0031】

ここで「実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチド」とは、天然型の 9 インテグリン、特に好ましくはヒト由来の 9 インテグリンと実質的に同等の生物学的性質を有する限り、該アミノ酸配列中の複数個のアミノ酸、好ましくは 1 ~ 10 個のアミノ酸、特に好ましくは 1 ~ 数個（例えば、1 ~ 5 個、1 ~ 4 個、1 ~ 3 個、1 ~ 2 個）のアミノ酸が置換、欠失および/または修飾されているアミノ酸配列を有する変異ポリペプチド、ならびに該天然型の 9 インテグリン、特に好ましくはヒト由来の 9 インテグリンのアミノ酸配列中に、複数個のアミノ酸、好ましくは 1 ~ 10 個のアミノ酸、特に好ましくは 1 ~ 数個（例えば、1 ~ 5 個、1 ~ 4 個、1 ~ 3 個、1 ~ 2 個）のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を有する変異ポリペプチドを意味する。さらに、そのような置換、欠失、修飾及び付加の複数個を有する変異ポリペプチドであってもよい。

40

## 【0032】

50

本発明の $\alpha 9$ インテグリン、特にヒト由来の $\alpha 9$ インテグリンは、遺伝子組換え技術のほか、化学的合成法、細胞培養方法等のような当該技術分野において公知の方法あるいはその修飾方法を適宜用いることにより製造することができる。

【0033】

また、変異ポリペプチドの製造方法としては、例えば、合成オリゴヌクレオチド部位突然変異導入法(gapped duplex法)、亜硝酸あるいは亜硫酸処理によってランダムに点突然変異を導入する方法、Ba131酵素等により欠失変異体を作製する方法、カセット変異法、リンカースキャニング法、ミスインコーポレーション法、ミスマッチプライマー法、DNAセグメント合成法などを挙げることができる。

【0034】

また、本発明の $\alpha 9$ インテグリンには、該 $\alpha 9$ インテグリンの「一部」も包含される。ここで「一部」とは、OPN、テネイシンC、VCAM-1等の $\alpha 9$ インテグリンリガンドと結合するために必要な領域を含む部分をいう。該 $\alpha 9$ インテグリンの「一部」は、後述する当該技術分野において公知の方法あるいはその修飾方法に従って、遺伝子組換え技術または化学的合成法により製造することもできるし、また細胞培養方法により単離した $\alpha 9$ インテグリン、特に好ましくはヒト由来の $\alpha 9$ インテグリンをタンパク分解酵素等により適切に切断することで製造することができる。

【0035】

抗原としてはまた、 $\alpha 9$ インテグリンを組換え技術により細胞膜上に過剰発現する細胞自体、あるいはその膜画分等を用いることができる。

【0036】

本発明の $\alpha 9$ インテグリンには、ヒト $\alpha 9$ インテグリンのアミノ酸配列(配列番号13)と実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドも包含される。また、特に本発明ではヒト $\alpha 9$ インテグリンを組換え技術により細胞膜上に過剰発現する細胞自体が好適に用いられる。したがって、後述するような、ヒト $\alpha 9$ インテグリンをコードする遺伝子(例えば、cDNA)を公知の遺伝子工学技術を用いてクローニングし、ヒト $\alpha 9$ インテグリンを細胞膜上に過剰発現する細胞自体、またはその細胞膜画分を抗原として調製する場合もある。

【0037】

[抗体産生細胞の調製]

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

【0038】

治療の対象がヒトであり、 $\alpha 9$ インテグリン阻害抗体産生動物がマウスの場合には、ヒト・マウスのキメラ抗体やヒト化抗体を用いるのが望ましく、さらには、抗体産生に関するヒト遺伝子を導入したマウス等のトランスジェニック動物を用いてヒト型モノクローナル抗体を作成して用いるのが望ましい。

[抗体産生細胞とミエローム細胞との細胞融合]

【0039】

ミエローム細胞としては、マウス、ラット、ヒト等に由来する細胞が用いられる。例えばマウスミエロームP3U1、P3X63-Ag8、P3X63-Ag8-U1、P3NS1-Ag4、SP2/0-Ag14、P3X63-Ag8-653等があげられるが、抗体産生細胞とミエローム細胞とは同種動物、特に同系統の動物由来であることが好ましい。ミエローム細胞は凍結保存するか、ウマ、ウサギまたはウシ胎児血清を添加した一般的な培地で継代して維持することができる。細胞融合には対数増殖期の細胞を用いるのが好ましい。本発明ではP3X63-Ag8-653が好適に用いられる。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 4 0 】

抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合させてハイブリドーマを形成させる方法としては、ポリエチレングリコール ( P E G ) を用いる方法、センダイウイルスを用いる方法、電気融合装置を用いる方法などがあげられる。例えば P E G 法の場合、約 3 0 ~ 6 0 % の P E G ( 平均分子量 1 0 0 0 ~ 6 0 0 0 ) を含む適当な培地または緩衝液中に脾細胞とミエローマ細胞を 1 ~ 1 0 : 1、好ましくは 5 ~ 1 0 : 1 の混合比で懸濁し、温度約 2 5 ~ 3 7、p H 6 ~ 8 の条件下で、約 3 0 秒 ~ 3 分間程度反応させればよい。反応終了後、P E G 溶液を除いて培地に再懸濁し、セルウェルプレート中に播種して培養を続ける。

## 【 0 0 4 1 】

## [ ハイブリドーマ細胞の選別 ]

モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞の選別は、公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。通常、H A T ( ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン ) を添加した動物細胞用培地で行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマ細胞が生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1 ~ 2 0 %、好ましくは 1 0 ~ 2 0 % の牛胎児血清を含む R P M I 1 6 4 0 培地、1 ~ 1 0 % の牛胎児血清を含む G I T 培地 ( 和光純薬工業 ( 株 ) ) あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地 ( S F M - 1 0 1、日水製薬 ( 株 ) ) などを用いることができる。培養温度は、通常 2 0 ~ 4 0、好ましくは約 3 7 である。培養時間は、通常、5 日 ~ 3 週間、好ましくは 1 週間 ~ 2 週間である。培養は、通常 5 % C O<sub>2</sub> 下で行なうことができる。

## 【 0 0 4 2 】

本発明のモノクローナル抗体の産生は、新臨床免疫実験操作法 ( part 3 )、科学評論社、1997 に記載される細胞 E L I S A 法を用いて確認およびスクリーニングできる。免疫に用いた細胞をスクリーニングに使用するとバックグラウンドが高くなることや偽陽性が多くなることが予想される場合、免疫に用いた細胞とは別の細胞で過剰発現するヒト 9 インテグリンに反応し、かつ、ヒト 4 インテグリンを過剰発現する細胞に反応しないクローンを抗ヒト 9 インテグリン抗体とすることができる。このようなクローンから限界希釈法を 1 から 5 回、好適には 2 から 4 回繰り返すことによりモノクローナル抗体を調製できる。

## 【 0 0 4 3 】

## [ 抗体の分離精製 ]

得られた抗体は、均一にまで精製することができる。抗体の分離、精製は通常のタンパク質で使用されている分離、精製方法を使用すればよい。例えばアフィニティークロマトグラフィー等のクロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、透析、S D S ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動等を適宜選択、組み合わせれば、抗体を分離、精製することができる ( Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988 ) が、これらに限定されるものではない。アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、プロテイン A カラム、プロテイン G カラムが挙げられる。例えばプロテイン A カラムを用いたカラムとして、Hyper D, POROS, Sepharose F. F. ( Amersham Biosciences ) 等が挙げられる。

## 【 0 0 4 4 】

## [ 抗体の標識化 ]

得られた抗体を、公知の方法または市販のキットを用いて各種標識化 ( 例えば、ビオチン標識、F I T C 標識、A P C 標識 ) できる。本発明では、Biotin Labeling Kit ( 同仁化学 ) を用いたビオチン標識が好適に用いられる。

## 【 0 0 4 5 】

このようにして得られたモノクローナル抗体は、必要により精製した後、常法に従って製剤化し、癌、炎症性疾患、感染症、自己免疫疾患および骨疾患等の予防および / または治療剤として用いることができる。これらの予防および / または治療剤としての剤形は注射剤、点滴用剤などの非経口製剤とすることができ、創意工夫により経口製剤として使用

10

20

30

40

50

することができる。また、製剤化に当たっては、薬事上および薬学的に許容される範囲内で、剤形に適した担体、希釈剤もしくは添加剤などを使用することができる。

【0046】

[抗体の薬理学的効果]

インテグリンの役割は、細胞と細胞外マトリックス(ECM)の接着、固定のみならず、細胞外マトリックスからの情報を細胞内シグナルに変換し、細胞の増殖、運動、細胞死、分化などの調節を担っていることが解明されてきている。従って、得られたモノクローナル抗体は、ECMと $\alpha$ 9インテグリンとの結合を阻害することにより、ECMからの情報の細胞内シグナル伝達を遮断できることから、ECMが関与する疾患の治療が可能である。 $\alpha$ 9インテグリンに結合するECM、および $\alpha$ 9リガンドとしてOPN、ファイブロネクチン、プロペプチド-フォンビルプラントファクター(pp-vWF)、組織型トランスグルタミナーゼ(tTG)、第XIII血液凝固因子、Vascular Cell Adhesion Molecule

1 e-1(VCAM-1)、テネイシンC、プラスミンなどが知られている。これらのECMと $\alpha$ 9インテグリンを発現している細胞や癌細胞を用い、得られたモノクローナル抗体の存在下での結合阻害を*in vitro*で観察することにより、本発明のモノクローナル抗体の対象疾患を見出すことができる。

【0047】

[抗体を含有する医薬]

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

【0048】

投与量は、投与対象、対象疾患、症状、投与ルートなどによっても異なるが、例えば、癌患者の予防および/または治療のために使用する場合には、本発明の抗体を1回量として、通常0.01~20mg/kg体重程度、好ましくは0.1~10mg/kg体重程度、さらに好ましくは0.1~5mg/kg体重程度を、1月1~10回程度、好ましくは1月1~5回程度、静脈注射により投与するのが好都合である。他の非経口投与および経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合には、その症状に応じて増量または投与回数を増加させてもよい。

【0049】

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

【0050】

すなわち、非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、点鼻剤、坐剤などが用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤などの剤形を包含する。このような注射剤は、公知の方法に従って、例えば、上記抗体を通常注射剤に用いられる無菌の水溶性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール、その他の補助薬を含む等張液などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール(例、エタノール)、ポリアルコール(例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール)、非イオン界面活性剤〔例、ポリソルベート80、ポリソルベート20、HCO-50(polyoxyethylene(50mol)adduct of hydrogenated castor oil)〕などと併用してもよい。油性液としては

10

20

30

40

50

、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプル、バイアル、シリンジに充填される。直腸投与に用いられる坐剤は、上記抗体を通常の点鼻薬用基剤、坐薬用基剤に混合することによって調製される。また、上記抗体を適当な賦形剤を添加することにより、凍結乾燥製剤を調製し、用時、注射用水、生理食塩水などで溶解して注射液とすることもできる。なお、一般的に抗体などのタンパク質の経口投与は消化器により分解されるため、困難とされるが、抗体断片や修飾した抗体断片と剤形の創意工夫により、経口投与の可能性もある。

#### 【0051】

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

#### 【0052】

なお前記した各組成物は、上記抗体との配合により好ましくない相互作用を生じない限り他の活性成分を含有してもよい。例えば、本発明の医薬製剤は、上記抗体に加えて、抗ヒト 4 インテグリン抗体を含有させることができる。この場合の混合比は特に限定されないが、例えば、抗ヒト 9 インテグリン抗体：抗ヒト 4 インテグリン抗体の比率を1～99：99～1の比率の範囲内で調整することができる。

#### 【0053】

##### [本発明のモノクローナル抗体を含有する診断剤]

本発明のモノクローナル抗体を含有してなる医薬組成物は、炎症性疾患、例えばリウマチ関節炎、肝炎、気管支喘息、線維症、糖尿病、癌転移、動脈硬化、多発性硬化症、肉芽腫等の診断剤、また臓器移植後の慢性拒絶反応抑制、全身性自己免疫疾患・エリテマトーデス・ぶどう膜炎・ベーチェット病・多発性筋炎・糸状体増殖性腎炎・サルコイドーシス等の自己免疫疾患の診断剤として用いることができる。本発明のモノクローナル抗体は、9 インテグリンを特異的に認識することができるので、被検液中の 9 インテグリンの定量、特にサンドイッチ免疫測定法、競合法、あるいはイムノメトリック法などによる定量などに使用することができる。これら個々の免疫学的測定法を本発明の測定方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要としない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。

#### 【0054】

以上のように、本発明の抗体を用いることによって、9 インテグリンを感度良く定量することができる。さらに、本発明の抗体を用いる、生体内での 9 インテグリンの定量法を利用することにより、9 インテグリンが関連する各種疾患の診断をすることができる。例えば、9 インテグリンの濃度の増減が検出された場合は、9 インテグリンが関連する疾患、例えば炎症性疾患である可能性が高いまたは将来罹患する可能性が高いと診断することができる。また、本発明のモノクローナル抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する 9 インテグリンを特異的に検出するために使用することができる。また、9 インテグリンを精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画に含まれる 9 インテグリンの検出、被検細胞内における 9 インテグリンの挙動の分析等に使用することができる。

#### 【0055】

##### [ヒト 9 インテグリンの活性を阻害する化合物のスクリーニング方法]

本発明の抗体が認識するヒト 9 インテグリン上のエピトープを利用して、ヒト 9 インテグリンの活性を阻害する化合物をスクリーニングすることができる。具体的には、本発明は、ヒト 9 インテグリンのアミノ酸配列を含有するペプチド（以下、「ペプチドA」という）を用いることを特徴とする、ヒト 9 インテグリンの活性を阻害する低分子化

10

20

30

40

50

合物のスクリーニング方法を提供する。

【0056】

本発明のスクリーニング方法においては、例えば、(i)ペプチドAと、ヒト 9インテグリンのリガンド(例えば、テネイシンC、プラスミンなど)とを接触させた場合と(ii)ペプチドAと、リガンドおよび試験化合物とを接触させた場合との比較を行なう。工程(i)と(ii)の比較は、例えば、ペプチドAに対するリガンドの結合量を測定することにより行う。そのような結合量の比較を容易にするために、公知の手法によって標識したリガンドを用いることが好ましい。このような方法によって得られた候補化合物について、ヒト 9インテグリンの活性を阻害するか否かの確認実験を行って、ヒト 9インテグリンの活性を阻害する化合物を得る。

10

【0057】

ここで被験物質としては、ポリペプチド、タンパク質、生体由来の非ペプチド性化合物、合成化合物、微生物培養物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液等を用いることができ、新規化合物であっても、公知の化合物であっても良い。

【0058】

選択される化合物は、本発明の抗体同様、癌、炎症性疾患、感染症、自己免疫疾患および骨疾患等の予防および/または治療剤として用いることができる。

【0059】

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

20

【実施例】

【0060】

(実施例1)

[ヒト 9インテグリンに対する抗体の作製]

ヒト 9インテグリンに対する抗体作製は、以下のようにしてBALB/cマウス3匹に対して免疫を行った。まず、ヒト 9インテグリン発現細胞(ヒト 9/N I H - 3 T 3細胞)を $3 \times 10^6$ 細胞/匹を腹腔内投与し、さらにその1週間後と2週間後に、ヒト 9/N I H - 3 T 3細胞を $3 \times 10^6$ 細胞/匹を腹腔内投与した。さらに一週間後、ヒト 9/N I H - 3 T 3細胞を $2 \times 10^6$ 細胞/匹を静脈内投与した。ヒト 9/C H O - K 1細胞及びヒト 9インテグリンを内在的に発現するヒトメラノーマ細胞株(G 3 6 1細胞)に反応し、且つ、ヒト 4インテグリン発現C H O - K 1細胞に反応しないクローンを抗 9インテグリン抗体とした。その結果、抗ヒト 9インテグリン抗体を産生するハイブリドーマ細胞2クローン(K 3 3 N、M 3 5 A)を樹立した。

30

【0061】

ここで得られたハイブリドーマ細胞K 3 3 NおよびM 3 5 Aは、2007年5月29日に茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6(郵便番号305-8566)、独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センターにそれぞれ受託番号F E R M B P - 1 0 8 3 0およびF E R M B P - 1 0 8 3 1として寄託されている。

【0062】

(実施例2)

[抗ヒト 9インテグリン抗体の相補認識領域(CDR)の解析]

ヒト 9インテグリン抗体(K 3 3 N、M 3 5 A)を産生するハイブリドーマからmRNAを抽出して、逆転写によってcDNAを作製した。このcDNAを鋳型とし、ScFvクローニング用プライマー(Light Primer Mix、Heavy Primer Mix;アマシャムバイオサイエンス社)を用いてPCRを行い、抗体の重鎖と軽鎖の可変領域をそれぞれ伸長・増幅した。次に、PCR産物を常法に基づいてpCRII TOP0 vectorに組み込んだ。これをシーケンシングしてアミノ酸配列を決定した。各抗体について3回ずつ上記の操作を行った。

40

【0063】

その結果、K 3 3 NおよびM 3 5 Aの重鎖および軽鎖の可変領域とCDR領域のアミノ酸配列は図1Aおよび図1Bに示す通りとなった。CDR領域のアミノ酸配列は、具体的

50

には、以下の通りである。

【 0 0 6 4 】

(重鎖)

[ C D R H 1 ]

K 3 3 N : S Y Y M N ( 配列番号 1 )

M 3 5 A : S Y W I H ( 配列番号 2 )

[ C D R H 2 ]

K 3 3 N : W I F P G S G N T K Y N E K F K G K ( 配列番号 3 )

M 3 5 A : E I N P S S G R T N F I E N F E T K ( 配列番号 4 )

[ C D R H 3 ]

K 3 3 N : S W V S Y E R G Y Y F D Y ( 配列番号 5 )

M 3 5 A : L A Y G N Y S W F A Y ( 配列番号 6 )

【 0 0 6 5 】

(軽鎖)

[ C D R L 1 ]

K 3 3 N : R A S E N I Y Y S L A ( 配列番号 7 )

M 3 5 A : R A S E T V D S Y G N T F M H ( 配列番号 8 )

[ C D R L 2 ]

K 3 3 N : N A N S L E D ( 配列番号 9 )

M 3 5 A : L A S N L E S ( 配列番号 1 0 )

[ C D R L 3 ]

K 3 3 N : K Q A Y D V P Y T ( 配列番号 1 1 )

M 3 5 A : Q Q N N E D P Y T ( 配列番号 1 2 )

【 0 0 6 6 】

なお、図 1 A および図 1 B には、上記の配列解析方法 ( G T S ) とは異なる解析方法 (異なる配列解析ソフトウェア) を使用して得た配列 ( J N Bio および T a k a r a ) も示している。それぞれの方法の詳細は以下の通りである。

【 0 0 6 7 】

[ JN Biosciences の配列解析法 ( K 3 3 N ) ]

ハイブリドーマ細胞 ( K 3 3 N ) を 10% 牛胎児血清 ( FBS ; HyClone ) 含有 TIL Media I 培地 ( 免疫生物研究所 ) で 7 . 5 % C O <sub>2</sub> 、 3 7 ° C で培養し、増殖させた。全 RNA は、Invitrogen のプロトコールに従い、TRIzol 試薬 ( Invitrogen ) を用い、約 3 × 1 0 <sup>6</sup> 個のハイブリドーマ細胞から抽出した。オリゴdT-プライマーを使用した逆転写反応での cDNA の作製は、GeneRacer Kit ( Invitrogen ) を用い、Invitrogen のプロトコールに従った。H鎖とL鎖の可変領域 cDNA は、マウス定常領域 1 と にそれぞれ相当する 3' primer および GeneRacer Kit 添付の GeneRacer 5' primer ( 5' -CGACTGGAGCACGAGGACACTGA-3' ( 配列番号 1 4 ) ) を用い、Phusion DNA polymerase ( New England Biolabs ) を使用し、PCR で増幅した。H鎖可変領域 ( VH ) の PCR 増幅のための 3' primer は 5' -GCCAGTGGATAGACAGATGG-3' ( 配列番号 1 5 ) である。L鎖可変領域 ( VL ) の PCR 増幅のための 3' primer は、5' -GATGGATACAGTGGTGCAGC-3' ( 配列番号 1 6 ) である。増幅した VH と VL の cDNA は配列決定のために pCR4B lunt-TOPO vector ( Invitrogen ) 中でサブクローニングした。可変領域の DNA 配列解析は T o c o r e ( Menlo Park ) で行った。

【 0 0 6 8 】

[ Takara の配列解析法 ( M 3 5 A ) ]

ハイブリドーマ細胞 ( M 3 5 A ) を培養、増殖させた後、細胞の全 RNA は RNAiso ( タカラバイオ社 ) を用いて、Acid Guanidine-Phenol-Chloroform 法 ( AGPC 法 ) で抽出した。抽出した RNA は常法により DNase I 処理を行った後、フェノールクロロホルム処理を行い、DNase I を除き、エタノール沈殿で精製した。得られた RNA は再度蒸留水に懸濁して解析に用いた。DNase I 処理後の RNA 約 1 μg を鋳型に、Random Primer ( 9mer ) を用いて逆転写酵素 Reverse Transcriptase M-MLV ( RNase H free ) で逆転写反応を行った。可変領域

10

20

30

40

50

のPCR 増幅には、各逆転写反応液の一部を鋳型とし、H 鎖はプライマーHeavy Primer 1 とHeavy Primer 2 (アマシャムバイオサイエンス社)を、L 鎖にプライマーLight Primer Mix (アマシャムバイオサイエンス社)をそれぞれ用い、PCR 酵素にはタカラTaKaRa LA Taq を使用した。

【0069】

PCRによって得たDNA断片をアガロースゲルによって電気泳動し、バンドを切り出し、ゲルを溶かし出すことによってDNAの精製を行った。精製したDNAをpMD20-T vectorにTAクローニングした。可変領域のDNA配列解析はpMD20-T vectorに含まれるM13-47 primer配列を用いて遺伝子配列を決定した。シーケンス反応にはBigDye Terminators v3.1 cycle sequencing kit (アプライドバイオシステムズ社)を使用し、同社のプロトコールに従ってABI3730シーケンサー(アプライドバイオシステムズ社)により行った。

【0070】

図1 Aおよび図1 Bから明らかなように、用いる解析方法(または解析ソフトウェア)により、得られる配列に多少の違いがみられるが、C D Rのアミノ酸配列に関しては、解析方法の違いによる差異は見られなかった。

【0071】

(実施例3)

[抗ヒト 9 インテグリン抗体の細胞接着阻害効果]

細胞接着する際には 9 インテグリンがOPN、ファイブロネクチン、テネイシンC、VCAM-1などの細胞外マトリックス(ECM)を含むリガンドと結合することから、得られた新規な抗ヒト 9 インテグリン抗体の細胞接着阻害を 9 インテグリン発現細胞(ヒトメラノーマ細胞G361)とリガンドの結合阻害で検討した。

【0072】

OPNペプチドはBSA(ウシ血清アルブミン)を結合したSVVYGLRペプチド、TN-Cfn3(RAA)はヒトテネイシンCのFibronectin Type III repeatの三番目の領域を大腸菌にて発現させたタンパク(この領域内のRGD配列をRAA配列に変換した。)を用いた。

【0073】

OPNペプチドまたはテネイシンCフラグメント(TN-Cfn3(RAA))(5 μg/mL)を96穴プレートに37 ー時間放置後、0.5%BSA/PBSでブロックした。ヒトメラノーマ細胞G361は、 $1 \times 10^5$ 個/mLになるように0.25%BSA/DMEM培地で調整し、各濃度の抗ヒト 9 インテグリン抗体を添加した。抗体を添加したG361細胞を200 μLずつ固相した96穴プレートに入れ、37 ー1時間反応させた。二回PBSにて洗浄後、接着細胞を0.5%クリスタルバイオレッド/20%メタノールで固定、染色した。3回、蒸留水で洗浄後、20%酢酸で溶解し、590 nmにおける吸光度を測定した。なお、陰性対照としてヒト・オステオポンチンに対するモノクローナル抗体(5A1)、陽性対照として先に調製した抗ヒト 9 インテグリン抗体5種類(1K11、21C5、24I11、25B6、28S1)を用いた。

【0074】

OPNペプチドへのG361細胞の接着に及ぼす抗ヒト 9 インテグリン抗体の影響を図2に、テネイシンCフラグメントでの結果を図3に示す。

【0075】

OPNペプチドへのG361細胞の接着において、M35Aは陰性対象5A1と陽性対象1K11、25B6、28S1と同様に細胞接着阻害の効果が小さかった。一方、K33Nは陽性対象21C5、24I11に比べて少量で細胞接着を阻害し、Y9A2と同等の細胞接着阻害効果を示した。テネイシンCフラグメントへのG361細胞の接着では、M35Aは細胞接着阻害の効果が小さかったが、K33Nは少量で細胞接着を阻害し、Y9A2と同じ程度にその細胞接着阻害効果が陽性対象21C5、24I11に比べて明らかに強かった。このように、特にK33Nは他の抗体と比較しても格別顕著な細胞接着阻害効果を示した。

10

20

30

40

50

## 【0076】

(実施例4)

[抗ヒト 9 インテグリン抗体の認識部位の差異]

新規に作製した抗ヒト 9 インテグリン抗体 K 3 3 N の細胞接着阻害効果が Y 9 A 2 と同様な挙動を示したので、ヒト 9 インテグリン発現細胞 (h 9 / CHO) に対する両抗体の競合反応を FACS で検出することにより、認識部位の差異を調べた。

## 【0077】

ビオチン標識した K 3 3 N または Y 9 A 2 (5 μg / mL、100 μL) にその 100 倍量の K 3 3 N、Y 9 A 2、陰性対象 IgG (0.5 mg / mL、100 μL) を加えた後、ヒト 9 インテグリン細胞 (h 9 / CHO、 $1 \times 10^7$  / mL、100 μL) と反応 (4、30 分) させ、FACS バッファー (0.5% BSA / PBS) で細胞を洗浄した。ストレプトアビジン標識 APC (0.5 μg / mL、100 μL) を細胞溶液に加え、(4、20 分) で反応させ、再度 FACS バッファーで細胞を洗浄した後、7-AD (0.05 mg / mL、20 μL) を用いて死細胞の染色を行った。その後、再度 FACS バッファーで洗浄して、細胞を FACS で測定した。

## 【0078】

図4に示すように、ヒト 9 インテグリン発現細胞に対してビオチン標識 Y 9 A 2 と無標識 Y 9 A 2 を競合反応させると蛍光物質が結合した細胞が明らかにバックグランド近辺まで減少しているが、ビオチン標識 Y 9 A 2 と無標識 K 3 3 N の共存下では蛍光物質が結合した細胞の減少はみられるものの、バックグランド近辺まで減少しなかった。一方、ヒト 9 インテグリン発現細胞に対してビオチン標識 K 3 3 N に無標識 K 3 3 N を添加すると競合し、蛍光物質が結合した細胞が明らかに減少したが、無標識 Y 9 A 2 を添加しても蛍光物質が結合した細胞が無標識 K 3 3 N 添加までは減少しなかった。したがって、Y 9 A 2 と K 3 3 N が同じエピトープを認識する場合には競合を示すが、完全な競合を呈しなかったことから、Y 9 A 2 と K 3 3 N は異なるエピトープを認識しており、同一の抗体でないこと示唆された。

## 【産業上の利用可能性】

## 【0079】

本発明の抗 9 インテグリン抗体は、優れた 9 インテグリン機能抑制作用を示し、癌 (例えば、癌細胞の増殖、転移)、炎症性疾患 (例えば、関節リウマチ、変形性関節症、肝炎、気管支喘息、綿維症、糖尿病、動脈硬化、多発性硬化症、炎症性腸疾患 (潰瘍性大腸炎、クローン病等))、感染症 (例えば、肝炎)、自己免疫疾患 (例えば、全身性エリテマトーデス、多発性筋炎、自己免疫性甲状腺疾患、尿細管間質性腎炎、重症筋無力症) および骨疾患 (例えば、骨粗鬆症) 等に対する治療効果を奏する。また、本発明の抗 9 インテグリン抗体および抗 4 インテグリン抗体の両者を含有する医薬組成物は、さらに改善された癌、炎症性疾患等の治療効果を奏する。本発明の抗体は、細胞や組織における 9 インテグリンの発現を病理学的に検出できることから、診断薬としても利用できる。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0080】

【図1A】抗ヒト 9 インテグリン抗体 (K 3 3 N および M 3 5 A) の重鎖の相補認識領域 (CDR) を含む可変領域のアミノ酸配列を解析した結果を示す図である。K 3 3 N および M 3 5 A のそれぞれについて、2つの異なる配列解析ソフトウェアを使用した結果を示す。

【図1B】抗ヒト 9 インテグリン抗体 (K 3 3 N および M 3 5 A) の軽鎖の相補認識領域 (CDR) を含む可変領域のアミノ酸配列を解析した結果を示す図である。K 3 3 N および M 3 5 A のそれぞれについて、2つの異なる配列解析ソフトウェアを使用した結果を示す。

【図2】抗ヒト 9 インテグリン抗体 (本発明の2クローン (K 3 3 N、M 3 5 A)、その他の5クローン (1 K 1 1、2 1 C 5、2 4 I 1 1、2 5 B 6、2 8 S 1)、および Y 9 A 2) の細胞接着阻害効果をヒト 9 インテグリン発現細胞 (ヒトメラノーマ細胞 G 3

10

20

30

40

50

61) と OPN の  $\alpha 9$  インテグリン結合部位ペプチド (S V V Y G L R) で調べた結果を示す図である。陰性対照としてヒト・オステオポンチンに対するモノクローナル抗体 (5A1) を用いた。

【図3】抗ヒト  $\alpha 9$  インテグリン抗体 (本発明の2クローン (K33N、M35A)、その他の5クローン (1K11、21C5、24I11、25B6、28S1)、および Y9A2) の細胞接着阻害効果をヒト  $\alpha 9$  インテグリン発現細胞 (ヒトメラノーマ細胞 G361) とテナイシンCフラグメントの  $\alpha 9$  インテグリン結合部位ペプチドで調べた結果を示す図である。陰性対照としてヒト・オステオポンチンに対するモノクローナル抗体 (5A1) を用いた。

【図4】ヒト  $\alpha 9$  インテグリン発現細胞に対する新規な抗ヒト  $\alpha 9$  インテグリン抗体 (K33N) と Y9A2 との競合反応を調べた結果を示す図である。

10

【図1A】

Anti-human  $\alpha 9$  integrin antibody Heavy chain CDR

K33N

GTS 1: -VKLQESGP~~EL~~VKPGASVKISCKASGYSFTSY~~MM~~WVKKRPGQGLEWIGW 50

JN Bio 1: QVQLQSGPEL~~VK~~PGASVKISCKASGYSFTSY~~MM~~WVKKRPGQGLEWIGW 50

GTS 51: IFPGSGNTKYNEKFKGKATLTADTSSSTAYMQVSSLTSEDSAVYFCARSW 100

JN Bio 51: IFPGSGNTKYNEKFKGKATLTADTSSSTAYMQVSSLTSEDSAVYFCARSW 100

GTS 101: VSYERGGYFDYWGGGTTLTVSS 122

JN Bio 101: VSYERGGYFDYWGGGTTLTVSS 122

M35A

GTS 1: VKLQESGTLK~~VK~~PGASVRLSCKASGYFTSY~~WIH~~-WVKGSPGGGLEWIGEL 50

Takara 1: VKLQESGTLK~~VK~~PGASVRLSCKASGYFTSY~~WIH~~-WVKGSPGGGLEWIGEL 50

GTS 51: NPSSGRTNFLENFETKKATLTVDRSSTAYMQLT-SLTSEDSAVYYCARLAY 100

Takara 51: NPSSGRTNFLENFETKKATLTVDRSSTAYMQLT-SLTSEDSAVYYCARLAY 100

GTS 101: GNYSW---FAYWGGGTTVTVSS 119

Takara 101: GNYSW---FAYWGGGTTVTVSS 119

【図1B】

Anti-human  $\alpha 9$  integrin antibody Light chain CDR

K33N

GTS 1: DIQMTQSPASLAASVGETVTLTCRASENLY~~YSL~~AWYQQKGGKSPQLLYN 50

JN Bio 1: DIQMTQSPASLAASVGETVTLTCRASENLY~~YSL~~AWYQQKGGKSPQLLYN 50

GTS 51: ANSLEDGVPSRFSGSGSGTQYSMKINSMPEDTATYFC~~KQAYD~~V~~PY~~TFGG 100

JN Bio 51: ANSLEDGVPSRFSGSGSGTQYSMKINSMPEDTATYFC~~KQAYD~~V~~PY~~TFGG 100

GTS 101: GTKLELK

JN Bio 101: GTKLEIK

M35A

GTS 1: QIVLTQSPASLAVSLGGRATISCRASETVDSYGN~~TFM~~H~~WY~~QQKPGGPPKL 50

Takara 1: DIVLTQSPASLAVSLGGRATISCRASETVDSYGN~~TFM~~H~~WY~~QQKPGGPPKL 50

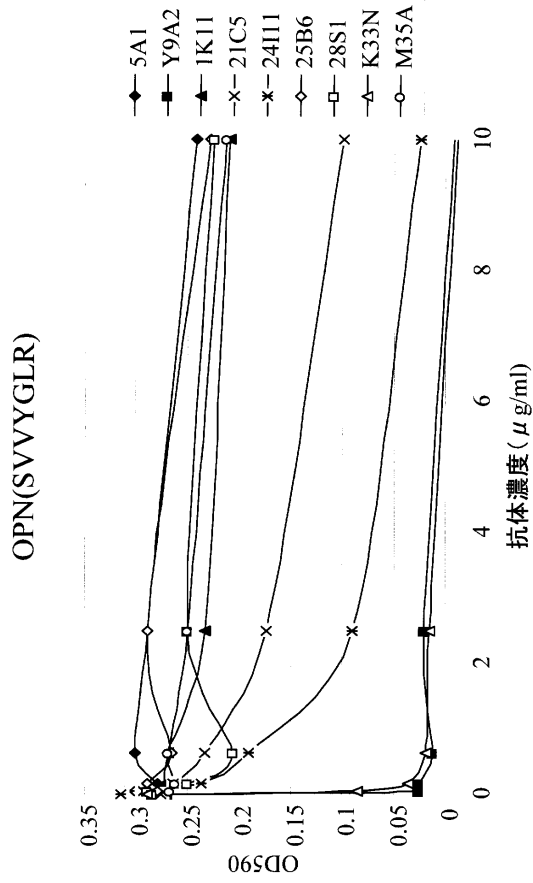
GTS 51: LIYL~~ASN~~LES~~GV~~PVRFSGSGSRDFTLTIDPVEADDAATYYCQ~~Q~~N~~N~~ED-PY 100

Takara 51: LIYL~~ASN~~LES~~GV~~PVRFSGSGSRDFTLTIDPVEADDAATYYCQ~~Q~~N~~N~~ED-PY 100

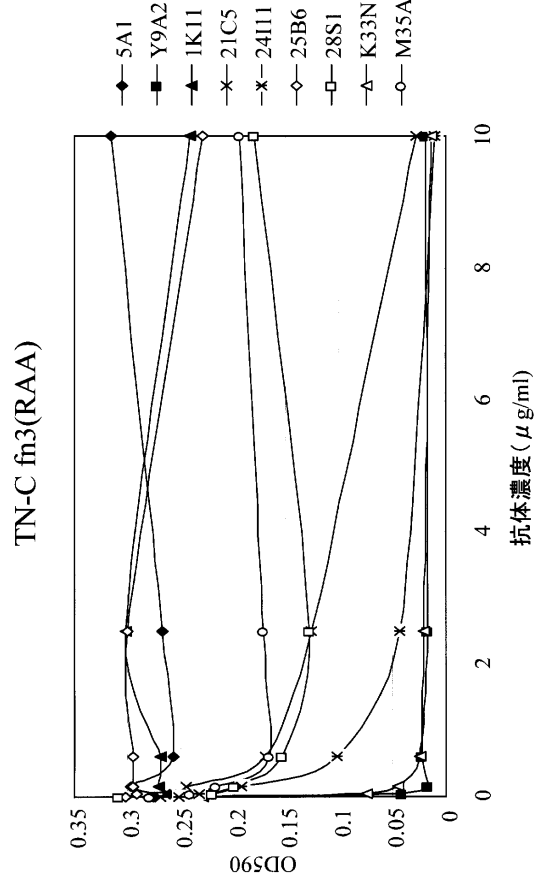
GTS 101: TFGGGT~~N~~WIKNGR 112

Takara 101: TFGGGTKLEIKR 112

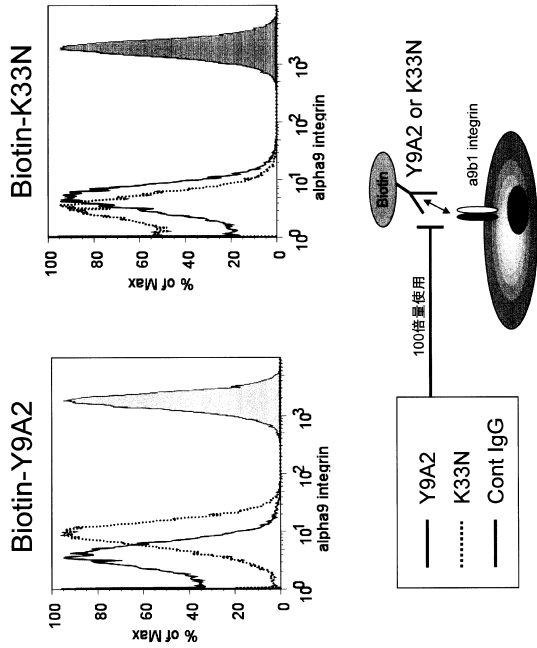
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



【配列表】

0005687305000001.app

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I		
A 6 1 P	31/00	(2006.01)	A 6 1 P	31/00	
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P	19/00	(2006.01)	A 6 1 P	19/00	
G 0 1 N	33/15	(2006.01)	G 0 1 N	33/15	Z
G 0 1 N	33/50	(2006.01)	G 0 1 N	33/50	Z
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
G 0 1 N	33/574	(2006.01)	G 0 1 N	33/574	A
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	A
A 6 1 P	35/04	(2006.01)	A 6 1 P	35/04	
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	11/06	(2006.01)	A 6 1 P	11/06	
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	1 0 1
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	1/04	
A 6 1 P	21/00	(2006.01)	A 6 1 P	21/00	
A 6 1 P	21/04	(2006.01)	A 6 1 P	21/04	
A 6 1 P	19/10	(2006.01)	A 6 1 P	19/10	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 1

審査官 長谷川 茜

- (56) 参考文献 国際公開第 2 0 0 6 / 0 7 5 7 8 4 ( W O , A 1 )  
 THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY , 1 9 9 9 年 , Vol.274, No.51 , pp.36328-36334  
 Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. , 1 9 9 6 年 , Vol.15, No.5 , pp.664-672

- (58) 調査した分野(Int.Cl. , D B 名)  
 C 0 7 K 1 4 / 0 0 - 1 9 / 0 0  
 C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0  
 P u b M e d  
 U n i P r o t / G e n e S e q  
 G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q  
 C A p l u s / B I O S I S / M E D L I N E ( S T N )

专利名称(译)	抗人α9整合素抗体及其用途		
公开(公告)号	<a href="#">JP5687305B2</a>	公开(公告)日	2015-03-18
申请号	JP2013097970	申请日	2013-05-07
申请(专利权)人(译)	有限公司基因技术和科学		
当前申请(专利权)人(译)	有限公司基因技术和科学		
[标]发明人	今重之 上出利光		
发明人	今重之 上出利光		
IPC分类号	C07K16/28 C12N5/10 A61K39/395 A61P35/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P37/02 A61P19/00 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/574 C12N15/09 A61P35/04 A61P19/02 A61P11/06 A61P3/10 A61P9/10 A61P25/00 A61P1/04 A61P21/00 A61P21/04 A61P19/10 A61P43/00		
FI分类号	C07K16/28.ZNA C12N5/00.102 A61K39/395.N A61P35/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P37/02 A61P19/00 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/574.A C12N15/00.A A61P35/04 A61P19/02 A61P11/06 A61P3/10 A61P9/10.101 A61P25/00 A61P1/04 A61P21/00 A61P21/04 A61P19/10 A61P43/00.101 A61P1/16 A61P13/12 A61P19/08 A61P29/00.101 A61P5/14 C12N15/13 C12N5/20		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/DA36 2G045/FB03 4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA20 4B024/EA04 4B024/HA12 4B065/AA90X 4B065/AA92X 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA30 4B065/BB25 4B065/BC03 4B065/BC07 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC02 4C085/EE01 4C085/EE03 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG05 4C085/GG08 4H045/AA11 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/EA51 4H045/EA52 4H045/FA74		
代理人(译)	小林 浩 藤田 尚 铃木康仁		
其他公开文献	JP2013227315A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

摘要：需要解决的问题：提供单克隆抗体或替代单克隆抗体，具有优异的药效。解决方案：提供：抗人α9整合素蛋白抗体，更具体地，提供单克隆抗体，嵌合抗体，人源化抗体和特异性识别人α9整合素蛋白的人抗体；产生单克隆抗体的杂交瘤细胞；制备单克隆抗体的方法；生产杂交瘤细胞的方法；含有抗人α9整合素蛋白抗体的治疗剂；含有α9整合素蛋白抗体的诊断剂；筛选抑制人α9整合素蛋白活性的化合物的方法；等等。

