

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02017/065203

発行日 平成30年9月27日(2018.9.27)

(43) 国際公開日 平成29年4月20日(2017.4.20)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13 Z N A	4 B O 6 4
C O 7 K 16/24 (2006.01)	C O 7 K 16/24	4 B O 6 5
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z	4 H O 4 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 25 頁) 最終頁に続く

出願番号 特願2017-545449 (P2017-545449)	(71) 出願人 591281220 日本全薬工業株式会社 福島県郡山市安積町笹川字平ノ上1番地の1
(21) 国際出願番号 PCT/JP2016/080339	
(22) 国際出願日 平成28年10月13日(2016.10.13)	
(31) 優先権主張番号 特願2015-203123 (P2015-203123)	(74) 代理人 110002572 特許業務法人平木国際特許事務所
(32) 優先日 平成27年10月14日(2015.10.14)	(72) 発明者 津久井 利広 福島県郡山市安積町笹川字平ノ上1番地の1 日本全薬工業株式会社内
(33) 優先権主張国 日本国(JP)	(72) 発明者 影山 みゆき 福島県郡山市安積町笹川字平ノ上1番地の1 日本全薬工業株式会社内
	(72) 発明者 加藤 正浩 福島県郡山市安積町笹川字平ノ上1番地の1 日本全薬工業株式会社内 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 イヌアトピー性皮膚炎の治療及び診断のために用いる抗イヌTARC抗体

(57) 【要約】

イヌアトピー性皮膚炎の治療及び診断のために用いる抗イヌTARC抗体及びそれを用いたイヌアトピー性皮膚炎の治療又は診断法の提供。

配列番号2で表されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域及び配列番号4で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む、イヌTARCに結合する抗イヌTARCモノクローナル抗体又はイヌTARCに結合するその機能的断片。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域及び配列番号 4 で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む、イヌTARCに結合する抗イヌTARCモノクローナル抗体又はイヌTARCに結合するその機能的断片。

【請求項 2】

配列番号 2 で表されるアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、イヌTARCへの結合活性を有する重鎖可変領域、及び配列番号 4 で表されるアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、イヌTARCへの結合活性を有する軽鎖可変領域を含む、イヌTARCに結合する抗イヌTARCモノクローナル抗体又はイヌTARCに結合するその機能的断片。

10

【請求項 3】

配列番号 1 で表される塩基配列からなるDNAがコードする重鎖可変領域及び配列番号 3 で表される塩基配列からなるDNAがコードする軽鎖可変領域を含む、イヌTARCに結合する抗イヌTARCモノクローナル抗体又はイヌTARCに結合するその機能的断片。

【請求項 4】

配列番号 1 で表される塩基配列と90%以上の配列同一性を有する塩基配列がコードするイヌTARCへの結合活性を有する重鎖可変領域、及び配列番号 3 で表される塩基配列と90%以上の配列同一性を有する塩基配列がコードするイヌTARCへの結合活性を有する軽鎖可変領域を含むイヌTARCに結合する抗イヌTARCモノクローナル抗体又はイヌTARCに結合するその機能的断片。

20

【請求項 5】

重鎖定常領域及び軽鎖定常領域がイヌIgG抗体の定常領域である、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の抗イヌTARCモノクローナル抗体又はイヌTARCに結合するその機能的断片。

【請求項 6】

機能的断片がFab、Fab'、F(ab')₂、ジスルフィド結合Fv(dsFv)、二量体化V領域(dibody)、一本鎖Fv(scFv)及びCDRからなる群から選択されるペプチド断片である請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のイヌTARCに結合する抗イヌTARCモノクローナル抗体又はイヌTARCに結合するその機能的断片。

30

【請求項 7】

配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなる、抗イヌTARCモノクローナル抗体の重鎖可変領域であるポリペプチド。

【請求項 8】

配列番号 4 で表されるアミノ酸配列からなる、抗イヌTARCモノクローナル抗体の軽鎖可変領域であるポリペプチド。

【請求項 9】

配列番号 1 で表されるDNA配列からなる、抗イヌTARCモノクローナル抗体の重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 10】

配列番号 3 で表されるDNA配列からなる、抗イヌTARCモノクローナル抗体の軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド。

40

【請求項 11】

請求項 9 に記載のポリヌクレオチド、請求項 10 に記載のポリヌクレオチド、又は請求項 9 に記載のポリヌクレオチドと請求項 10 に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 12】

請求項 11 に記載のベクターを含む細胞。

【請求項 13】

配列番号 1 で表されるDNA配列からなる、抗イヌTARCモノクローナル抗体の重鎖可変領域をコードするDNAを抗体の重鎖定常領域をコードするDNAと連結し、配列番号 3 で表され

50

るDNA配列からなる、抗イヌTARCモノクローナル抗体の軽鎖可変領域をコードするDNAを抗体の軽鎖定常領域をコードするDNAと連結し、得られたDNAコンストラクトを発現ベクターに挿入し、該ベクターで宿主細胞又は宿主動物を形質転換し、該宿主細胞又は宿主動物により抗体を産生させることを含む、抗イヌTARCモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項 14】

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のイヌTARCに結合する抗イヌTARCモノクローナル抗体又はイヌTARCに結合するその機能的断片を用いて、イヌTARCを測定する免疫学的測定方法。

【請求項 15】

ELISAである、請求項 14 記載の免疫学的測定方法。

10

【請求項 16】

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のイヌTARCに結合する抗イヌTARCモノクローナル抗体又はイヌTARCに結合するその機能的断片を含む、イヌアトピー性皮膚炎の検出試薬。

【請求項 17】

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のイヌTARCに結合する抗イヌTARCモノクローナル抗体又はイヌTARCに結合するその機能的断片を用いてイヌから採取した血液、血清又は血漿中のTARCを測定することを含む、イヌのアトピー性皮膚炎を検出する方法。

【請求項 18】

以下の(i) ~ (iv)のいずれかの重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む、イヌTARCに結合する抗イヌTARCモノクローナル抗体又はイヌTARCに結合するその機能的断片：

20

- (i) 配列番号 19 で表されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域及び配列番号 21 で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域；
- (ii) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域及び配列番号 25 で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域；
- (iii) 配列番号 27 で表されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域及び配列番号 29 で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域；及び
- (iv) 配列番号 31 で表されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域及び配列番号 33 で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域。

【請求項 19】

以下の(i) ~ (iv)のいずれかの重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む、イヌTARCに結合する抗イヌTARCモノクローナル抗体又はイヌTARCに結合するその機能的断片：

30

- (i) 配列番号 19 で表されるアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、イヌTARCへの結合活性を有する重鎖可変領域、及び配列番号 21 で表されるアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、イヌTARCへの結合活性を有する軽鎖可変領域；
- (ii) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、イヌTARCへの結合活性を有する重鎖可変領域、及び配列番号 25 で表されるアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、イヌTARCへの結合活性を有する軽鎖可変領域；
- (iii) 配列番号 27 で表されるアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、イヌTARCへの結合活性を有する重鎖可変領域、及び配列番号 29 で表されるアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、イヌTARCへの結合活性を有する軽鎖可変領域；及び
- (iv) 配列番号 31 で表されるアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、イヌTARCへの結合活性を有する重鎖可変領域、及び配列番号 33 で表されるアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、イヌTARCへの結合活性を有する軽鎖可変領域。

40

【請求項 20】

以下の(i) ~ (iv)のいずれかの重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む、イヌTARCに結合する抗イヌTARCモノクローナル抗体又はイヌTARCに結合するその機能的断片：

50

- (i) 配列番号 18 で表される塩基配列からなるDNAがコードする重鎖可変領域及び配列番号 20 で表される塩基配列からなるDNAがコードする軽鎖可変領域；
- (ii) 配列番号 22 で表される塩基配列からなるDNAがコードする重鎖可変領域及び配列番号 24 で表される塩基配列からなるDNAがコードする軽鎖可変領域；
- (iii) 配列番号 26 で表される塩基配列からなるDNAがコードする重鎖可変領域及び配列番号 28 で表される塩基配列からなるDNAがコードする軽鎖可変領域；及び
- (iv) 配列番号 30 で表される塩基配列からなるDNAがコードする重鎖可変領域及び配列番号 32 で表される塩基配列からなるDNAがコードする軽鎖可変領域。

【請求項 2 1】

以下の(i)～(iv)のいずれかの重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む、イヌTARCに結合する抗イヌTARCモノクローナル抗体又はイヌTARCに結合するその機能的断片；

- (i) 配列番号 18 で表される塩基配列と90%以上の配列同一性を有する塩基配列がコードするイヌTARCへの結合活性を有する重鎖可変領域、及び配列番号 20 で表される塩基配列と90%以上の配列同一性を有する塩基配列がコードするイヌTARCへの結合活性を有する軽鎖可変領域；
- (ii) 配列番号 22 で表される塩基配列と90%以上の配列同一性を有する塩基配列がコードするイヌTARCへの結合活性を有する重鎖可変領域、及び配列番号 24 で表される塩基配列と90%以上の配列同一性を有する塩基配列がコードするイヌTARCへの結合活性を有する軽鎖可変領域；
- (iii) 配列番号 26 で表される塩基配列と90%以上の配列同一性を有する塩基配列がコードするイヌTARCへの結合活性を有する重鎖可変領域、及び配列番号 28 で表される塩基配列と90%以上の配列同一性を有する塩基配列がコードするイヌTARCへの結合活性を有する軽鎖可変領域；及び
- (iv) 配列番号 30 で表される塩基配列と90%以上の配列同一性を有する塩基配列がコードするイヌTARCへの結合活性を有する重鎖可変領域、及び配列番号 32 で表される塩基配列と90%以上の配列同一性を有する塩基配列がコードするイヌTARCへの結合活性を有する軽鎖可変領域；

【請求項 2 2】

重鎖定常領域及び軽鎖定常領域がイヌIgG抗体の定常領域である、請求項 18～21のいずれか1項に記載の抗イヌTARCモノクローナル抗体又はイヌTARCに結合するその機能的断片。

【請求項 2 3】

機能的断片がFab、Fab'、F(ab')₂、ジスルフィド結合Fv(dsFv)、二量体化V領域(dibody)、一本鎖Fv(scFv)及びCDRからなる群から選択されるペプチド断片である請求項 18～22のいずれか1項に記載のイヌTARCに結合する抗イヌTARCモノクローナル抗体又はイヌTARCに結合するその機能的断片。

【請求項 2 4】

配列番号 19、23、27又は31で表されるアミノ酸配列からなる、抗イヌTARCモノクローナル抗体の重鎖可変領域であるポリペプチド。

【請求項 2 5】

配列番号 21、25、29又は33で表されるアミノ酸配列からなる、抗イヌTARCモノクローナル抗体の軽鎖可変領域であるポリペプチド。

【請求項 2 6】

配列番号 18、22、26又は30で表されるDNA配列からなる、抗イヌTARCモノクローナル抗体の重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 2 7】

配列番号 20、24、28又は32で表されるDNA配列からなる、抗イヌTARCモノクローナル抗体の軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 2 8】

請求項 24に記載のポリヌクレオチド、請求項 25に記載のポリヌクレオチド、又は請

10

20

30

40

50

求項 26 に記載のポリヌクレオチドと請求項 27 に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 29】

請求項 28 に記載のベクターを含む細胞。

【請求項 30】

(i) 配列番号 18 で表されるDNA配列からなる、抗イヌTARCモノクローナル抗体の重鎖可変領域をコードするDNAを抗体の重鎖定常領域をコードするDNAと連結し、配列番号 20 で表されるDNA配列からなる、抗イヌTARCモノクローナル抗体の軽鎖可変領域をコードするDNAを抗体の軽鎖定常領域をコードするDNAと連結し、

(ii) 配列番号 22 で表されるDNA配列からなる、抗イヌTARCモノクローナル抗体の重鎖可変領域をコードするDNAを抗体の重鎖定常領域をコードするDNAと連結し、配列番号 24 で表されるDNA配列からなる、抗イヌTARCモノクローナル抗体の軽鎖可変領域をコードするDNAを抗体の軽鎖定常領域をコードするDNAと連結し、

(iii) 配列番号 26 で表されるDNA配列からなる、抗イヌTARCモノクローナル抗体の重鎖可変領域をコードするDNAを抗体の重鎖定常領域をコードするDNAと連結し、配列番号 28 で表されるDNA配列からなる、抗イヌTARCモノクローナル抗体の軽鎖可変領域をコードするDNAを抗体の軽鎖定常領域をコードするDNAと連結し、又は

(iv) 配列番号 30 で表されるDNA配列からなる、抗イヌTARCモノクローナル抗体の重鎖可変領域をコードするDNAを抗体の重鎖定常領域をコードするDNAと連結し、配列番号 32 で表されるDNA配列からなる、抗イヌTARCモノクローナル抗体の軽鎖可変領域をコードするDNAを抗体の軽鎖定常領域をコードするDNAと連結し、

得られたDNAコンストラクトを発現ベクターに挿入し、該ベクターで宿主細胞又は宿主動物を形質転換し、該宿主細胞又は宿主動物により抗体を産生させることを含む、抗イヌTARCモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項 31】

請求項 18 ~ 23 のいずれか 1 項に記載のイヌTARCに結合する抗イヌTARCモノクローナル抗体又はイヌTARCに結合するその機能的断片を用いて、イヌTARCを測定する免疫学的測定方法。

【請求項 32】

ELISAである、請求項 31 記載の免疫学的測定方法。

【請求項 33】

請求項 18 ~ 23 のいずれか 1 項に記載のイヌTARCに結合する抗イヌTARCモノクローナル抗体又はイヌTARCに結合するその機能的断片を含む、イヌアトピー性皮膚炎の検出試薬。

【請求項 34】

請求項 18 ~ 23 のいずれか 1 項に記載のイヌTARCに結合する抗イヌTARCモノクローナル抗体又はイヌTARCに結合するその機能的断片を用いてイヌから採取した血液、血清又は血漿中のTARCを測定することを含む、イヌのアトピー性皮膚炎を検出する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、イヌアトピー性皮膚炎の治療及び診断のために用いる抗イヌTARC抗体及びその利用法に関する。

【背景技術】

【0002】

アトピー性皮膚炎は、しばしばアトピー素因を有し、慢性の湿疹性皮膚病変を長期にわたって繰り返す病気である。また、血液学的所見として、しばしば末梢血の好酸球数増多、血清IgE値の高値などの異常が認められる。アトピー性皮膚炎の主な要因として、免疫学的異常と非免疫学的異常が報告されている。近年、ヒトばかりではなくイヌ等の愛玩動物においてもアトピー性皮膚炎が増えており、その検出、治療法の確立が望まれている。

【 0 0 0 3 】

アトピー性皮膚炎と関連している物質としてケモカインがある。マクロファージ由来のケモカインについて報告されている（特許文献1及び特許文献2参照）。ケモカインは、分子量が約8～14kDaの白血球に走化作用を有するサイトカインの総称で、炎症細胞間の連絡を担当するメディエーターとして、種々の炎症の発生、進展に中心的な役割を果たす。ケモカインは構造上4個のシステイン配列の違いによりC、CC、CXC、CX3Cの4つに大別される。ケモカインにはそれぞれ受容体が存在し、Cケモカインには、Cケモカイン受容体（XCR）、CCケモカインにはCCケモカイン受容体（CCR）、CXCケモカインにはCXCケモカイン受容体（CXCR）、CX3CケモカインにはCX3Cケモカイン受容体（CX3CR）とに大別され、ケモカインと受容体の相互作用により、それぞれのケモカインに対応した受容体をもつ細胞が遊走し病態の形成・維持に重要な役割を果たすと考えられている。このうち、ヘルパーT細胞Th2特異的に発現されるCCケモカイン受容体4（CCR4）に結合するとされているTARC（Thymus Activation-Regulated Chemokine）が特にアトピー性皮膚炎と関連が深いと考えられている。例えば、アトピー性皮膚炎患者の罹患部に浸潤しているCD4陽性T細胞は、CCR4陽性であり、末梢血中のCCR4陽性メモリーT細胞も、アトピー性皮膚炎の患者では健康人に比べ優位に増加しているという報告がある。さらに、末梢血中のCCR4陽性細胞数と好酸球数、IgE値、及び臨床的な重症度が相関していることも報告されている。さらに、ヒトアトピー性皮膚炎患者において、血中TARC値が高値を示し、罹患部におけるTARCの産生も亢進しているという報告もある（特許文献3及び特許文献4参照）。

10

【 0 0 0 4 】

これらの報告はTARCがアトピー性皮膚炎の疾患マーカーとなり得ること、TARCがアトピー性皮膚炎の治療標的となり得ることを示唆しているものの、TARCが健常部でも発現が認められるという報告もあり、TARCの有用性についての検討は未だ十分ではない。

20

【 0 0 0 5 】

さらに、これまでの報告は、アトピー性皮膚炎モデルマウスを用いた検討及びヒトを用いた検討であったが、アトピー性皮膚炎の発症機構が動物間で同じとは限らず、イヌに特異的な診断法、治療法の確立が望まれていた。

【 0 0 0 6 】

イヌTARCについては、前田ら（非特許文献1参照）がアミノ酸配列、mRNAのDNA配列を決定しているが、アトピー性皮膚炎の検出に適したイヌTARC抗体は得られていなかった。一方、ヒト等の他種の抗TARC抗体は市販されていたが、イヌTARCとは反応しないという問題をかかえており、また、市販の抗TARC抗体はTARCとの親和性が不十分で、特に細胞組織の免疫染色時に染色像が明瞭に得られないなどの問題が指摘されていた。

30

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 0 7 】

【 特許文献 1 】 特表2001-520002号公報

【 特許文献 2 】 特表平10-507646号公報

【 特許文献 3 】 EP1221618A1号公報

【 特許文献 4 】 国際公開第02/53758号

40

【 非特許文献 】

【 0 0 0 8 】

【 非特許文献 1 】 J. Vet. Med. Sci. 63(9):1035-1038, 2001

【 非特許文献 2 】 J. Invest. Dermatol. 115(4):640-646, 2000

【 非特許文献 3 】 Uchidaら ; International Immunology. 14(12):1431-1438, 2002

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 9 】

本発明は、イヌアトピー性皮膚炎の治療及び診断のために用いる抗イヌTARC抗体及びそれを用いたイヌアトピー性皮膚炎の治療又は診断法の提供を目的とする。

50

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者は、イヌのアトピー性皮膚炎にもTARCが関与していると考え、既に知られているイヌTARC遺伝子配列をもとに作製されたりコンビナントイヌTARCを用い、抗イヌTARCモノクローナル抗体を作製し、複数のクローンからイヌTARCを高い感度及び特異性で検出し得る抗イヌTARCモノクローナル抗体を選択し、該モノクローナル抗体の可変領域の配列を決定し、本発明を完成させるに至った。

【0011】

すなわち、本発明は以下のとおりである。

[1] 配列番号2で表されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域及び配列番号4で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む、イヌTARCに結合する抗イヌTARCモノクローナル抗体又はイヌTARCに結合するその機能的断片。 10

[2] 配列番号2で表されるアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、イヌTARCへの結合活性を有する重鎖可変領域、及び配列番号4で表されるアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、イヌTARCへの結合活性を有する軽鎖可変領域を含む、イヌTARCに結合する抗イヌTARCモノクローナル抗体又はイヌTARCに結合するその機能的断片。

[3] 配列番号1で表される塩基配列からなるDNAがコードする重鎖可変領域及び配列番号3で表される塩基配列からなるDNAがコードする軽鎖可変領域を含む、イヌTARCに結合する抗イヌTARCモノクローナル抗体又はイヌTARCに結合するその機能的断片。 20

[4] 配列番号1で表される塩基配列と90%以上の配列同一性を有する塩基配列がコードするイヌTARCへの結合活性を有する重鎖可変領域、及び配列番号3で表される塩基配列と90%以上の配列同一性を有する塩基配列がコードするイヌTARCへの結合活性を有する軽鎖可変領域を含むイヌTARCに結合する抗イヌTARCモノクローナル抗体又はイヌTARCに結合するその機能的断片。

[5] 重鎖定常領域及び軽鎖定常領域がイヌIgG抗体の定常領域であり、[1]~[4]のいずれかの抗イヌTARCモノクローナル抗体又はイヌTARCに結合するその機能的断片。

[6] 機能的断片がFab、Fab'、F(ab')₂、ジスルフィド結合Fv(dsFv)、二量体化V領域(diabody)、一本鎖Fv(scFv)及びCDRからなる群から選択されるペプチド断片である[1]~[5]のいずれかのイヌTARCに結合する抗イヌTARCモノクローナル抗体又はイヌTARCに結合するその機能的断片。 30

[7] 配列番号2で表されるアミノ酸配列からなる、抗イヌTARCモノクローナル抗体の重鎖可変領域であるポリペプチド。

[8] 配列番号4で表されるアミノ酸配列からなる、抗イヌTARCモノクローナル抗体の軽鎖可変領域であるポリペプチド。

[9] 配列番号1で表されるDNA配列からなる、抗イヌTARCモノクローナル抗体の重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド。

[10] 配列番号3で表されるDNA配列からなる、抗イヌTARCモノクローナル抗体の軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド。 40

【0012】

[11] [9]のポリヌクレオチド、[10]のポリヌクレオチド、又は[9]のポリヌクレオチドと[10]のポリヌクレオチドを含むベクター。 40

[12] [11]のベクターを含む細胞。

[13] 配列番号1で表されるDNA配列からなる、抗イヌTARCモノクローナル抗体の重鎖可変領域をコードするDNAを抗体の重鎖定常領域をコードするDNAと連結し、配列番号3で表されるDNA配列からなる、抗イヌTARCモノクローナル抗体の軽鎖可変領域をコードするDNAを抗体の軽鎖定常領域をコードするDNAと連結し、得られたDNAコンストラクトを発現ベクターに挿入し、該ベクターで宿主細胞又は宿主動物を形質転換し、該宿主細胞又は宿主動物により抗体を産生させることを含む、抗イヌTARCモノクローナル抗体の製造方法。

[14] [1]~[6]のいずれかのイヌTARCに結合する抗イヌTARCモノクローナル抗体又は 50

イヌTARCに結合するその機能的断片を用いて、イヌTARCを測定する免疫学的測定方法。

[15] ELISAである、[14]の免疫学的測定方法。

[16] [1]~[6]のいずれかのイヌTARCに結合する抗イヌTARCモノクローナル抗体又はイヌTARCに結合するその機能的断片を含む、イヌアトピー性皮膚炎の検出試薬。

[17] [1]~[6]のいずれかのイヌTARCに結合する抗イヌTARCモノクローナル抗体又はイヌTARCに結合するその機能的断片を用いてイヌから採取した血液、血清又は血漿中のTARCを測定することを含む、イヌのアトピー性皮膚炎を検出する方法。

[18] 以下の(i)~(iv)のいずれかの重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む、イヌTARCに結合する抗イヌTARCモノクローナル抗体又はイヌTARCに結合するその機能的断片：

- (i) 配列番号19で表されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域及び配列番号21で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域；
- (ii) 配列番号23で表されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域及び配列番号25で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域；
- (iii) 配列番号27で表されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域及び配列番号29で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域；及び
- (iv) 配列番号31で表されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域及び配列番号33で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域。

[19] 以下の(i)~(iv)のいずれかの重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む、イヌTARCに結合する抗イヌTARCモノクローナル抗体又はイヌTARCに結合するその機能的断片：

- (i) 配列番号19で表されるアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、イヌTARCへの結合活性を有する重鎖可変領域、及び配列番号21で表されるアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、イヌTARCへの結合活性を有する軽鎖可変領域；
- (ii) 配列番号23で表されるアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、イヌTARCへの結合活性を有する重鎖可変領域、及び配列番号25で表されるアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、イヌTARCへの結合活性を有する軽鎖可変領域；
- (iii) 配列番号27で表されるアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、イヌTARCへの結合活性を有する重鎖可変領域、及び配列番号29で表されるアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、イヌTARCへの結合活性を有する軽鎖可変領域；及び
- (iv) 配列番号31で表されるアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、イヌTARCへの結合活性を有する重鎖可変領域、及び配列番号33で表されるアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、イヌTARCへの結合活性を有する軽鎖可変領域。

[20] 以下の(i)~(iv)のいずれかの重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む、イヌTARCに結合する抗イヌTARCモノクローナル抗体又はイヌTARCに結合するその機能的断片：

- (i) 配列番号18で表される塩基配列からなるDNAがコードする重鎖可変領域及び配列番号20で表される塩基配列からなるDNAがコードする軽鎖可変領域；
- (ii) 配列番号22で表される塩基配列からなるDNAがコードする重鎖可変領域及び配列番号24で表される塩基配列からなるDNAがコードする軽鎖可変領域；
- (iii) 配列番号26で表される塩基配列からなるDNAがコードする重鎖可変領域及び配列番号28で表される塩基配列からなるDNAがコードする軽鎖可変領域；及び
- (iv) 配列番号30で表される塩基配列からなるDNAがコードする重鎖可変領域及び配列番号32で表される塩基配列からなるDNAがコードする軽鎖可変領域。

【0013】

[21] 以下の(i)~(iv)のいずれかの重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む、イヌTARCに結合する抗イヌTARCモノクローナル抗体又はイヌTARCに結合するその機能的断片：

- (i) 配列番号18で表される塩基配列と90%以上の配列同一性を有する塩基配列がコードするイヌTARCへの結合活性を有する重鎖可変領域、及び配列番号20で表される塩基配

10

20

30

40

50

列と90%以上の配列同一性を有する塩基配列がコードするイヌTARCへの結合活性を有する軽鎖可変領域；

(ii) 配列番号22で表される塩基配列と90%以上の配列同一性を有する塩基配列がコードするイヌTARCへの結合活性を有する重鎖可変領域、及び配列番号24で表される塩基配列と90%以上の配列同一性を有する塩基配列がコードするイヌTARCへの結合活性を有する軽鎖可変領域；

(iii) 配列番号26で表される塩基配列と90%以上の配列同一性を有する塩基配列がコードするイヌTARCへの結合活性を有する重鎖可変領域、及び配列番号28で表される塩基配列と90%以上の配列同一性を有する塩基配列がコードするイヌTARCへの結合活性を有する軽鎖可変領域；及び

(iv) 配列番号30で表される塩基配列と90%以上の配列同一性を有する塩基配列がコードするイヌTARCへの結合活性を有する重鎖可変領域、及び配列番号32で表される塩基配列と90%以上の配列同一性を有する塩基配列がコードするイヌTARCへの結合活性を有する軽鎖可変領域；

[22] 重鎖定常領域及び軽鎖定常領域がイヌIgG抗体の定常領域である、[18]~[21]のいずれかの抗イヌTARCモノクローナル抗体又はイヌTARCに結合するその機能的断片。

[23] 機能的断片がFab、Fab'、F(ab')₂、ジスルフィド結合Fv(dsFv)、二量体化V領域(diabody)、一本鎖Fv(scFv)及びCDRからなる群から選択されるペプチド断片である[18]~[22]のいずれかのイヌTARCに結合する抗イヌTARCモノクローナル抗体又はイヌTARCに結合するその機能的断片。

[24] 配列番号19、23、27又は31で表されるアミノ酸配列からなる、抗イヌTARCモノクローナル抗体の重鎖可変領域であるポリペプチド。

[25] 配列番号21、25、29又は33で表されるアミノ酸配列からなる、抗イヌTARCモノクローナル抗体の軽鎖可変領域であるポリペプチド。

[26] 配列番号18、22、26又は30で表されるDNA配列からなる、抗イヌTARCモノクローナル抗体の重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド。

[27] 配列番号20、24、28又は32で表されるDNA配列からなる、抗イヌTARCモノクローナル抗体の軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド。

[28] [24]のポリヌクレオチド、[25]のポリヌクレオチド、又は[26]のポリヌクレオチドと[27]のポリヌクレオチドを含むベクター。

[29] [28]のベクターを含む細胞。

[30](i) 配列番号18で表されるDNA配列からなる、抗イヌTARCモノクローナル抗体の重鎖可変領域をコードするDNAを抗体の重鎖定常領域をコードするDNAと連結し、配列番号20で表されるDNA配列からなる、抗イヌTARCモノクローナル抗体の軽鎖可変領域をコードするDNAを抗体の軽鎖定常領域をコードするDNAと連結し、

(ii) 配列番号22で表されるDNA配列からなる、抗イヌTARCモノクローナル抗体の重鎖可変領域をコードするDNAを抗体の重鎖定常領域をコードするDNAと連結し、配列番号24で表されるDNA配列からなる、抗イヌTARCモノクローナル抗体の軽鎖可変領域をコードするDNAを抗体の軽鎖定常領域をコードするDNAと連結し、

(iii) 配列番号26で表されるDNA配列からなる、抗イヌTARCモノクローナル抗体の重鎖可変領域をコードするDNAを抗体の重鎖定常領域をコードするDNAと連結し、配列番号28で表されるDNA配列からなる、抗イヌTARCモノクローナル抗体の軽鎖可変領域をコードするDNAを抗体の軽鎖定常領域をコードするDNAと連結し、又は

(iv) 配列番号30で表されるDNA配列からなる、抗イヌTARCモノクローナル抗体の重鎖可変領域をコードするDNAを抗体の重鎖定常領域をコードするDNAと連結し、配列番号32で表されるDNA配列からなる、抗イヌTARCモノクローナル抗体の軽鎖可変領域をコードするDNAを抗体の軽鎖定常領域をコードするDNAと連結し、

得られたDNAコンストラクトを発現ベクターに挿入し、該ベクターで宿主細胞又は宿主動物を形質転換し、該宿主細胞又は宿主動物により抗体を産生させることを含む、抗イヌTARCモノクローナル抗体の製造方法。

10

20

30

40

50

【0014】

[31] [18]~[23]のいずれかのイヌTARCに結合する抗イヌTARCモノクローナル抗体又はイヌTARCに結合するその機能的断片を用いて、イヌTARCを測定する免疫学的測定方法。

[32] ELISAである、[31]の免疫学的測定方法。

[33] [18]~[23]のいずれかのイヌTARCに結合する抗イヌTARCモノクローナル抗体又はイヌTARCに結合するその機能的断片を含む、イヌアトピー性皮膚炎の検出試薬。

[34] [18]~[23]のいずれかのイヌTARCに結合する抗イヌTARCモノクローナル抗体又はイヌTARCに結合するその機能的断片を用いてイヌから採取した血液、血清又は血漿中のTARCを測定することを含む、イヌのアトピー性皮膚炎を検出する方法。

10

【0015】

本明細書は本願の優先権の基礎となる日本国特許出願番号2015-203123号の開示内容を包含する。

【発明の効果】

【0016】

本発明のイヌTARCモノクローナル抗体は、市販のTARCモノクローナル抗体がイヌTARCに反応しないという問題を解決する。さらに、イヌTARCの濃度を変化させたときの反応性が直線性を有するため、既に知られているTARC抗体と比較し、高感度及び高特異性でイヌTARCを測定することができる。従って、本発明の抗体により、また高感度のELISAを構築し、イヌアトピー性皮膚炎の診断に有効な手段を提供することが出来る。また、本発明の抗

20

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】抗イヌTARCモノクローナル抗体のイヌTARCとの反応性を示す図である。

【図2】CT-1抗体を用いてTARCタンパク質の濃度を変化させたときの反応性を示す図である。

【図3】CT-1抗体を用いて正常イヌ被験体及びアトピー性皮膚炎に罹患しているイヌ被験体の血清中のイヌTARCを測定した結果を示す図である。

【図4】組換え抗イヌTARCモノクローナル抗体作製に用いたプライマーの配列を示す図である。

30

【図5】組換え抗イヌTARCモノクローナル抗体の反応性をウエスタンブロットにより確認した結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0018】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0019】

本発明はイヌTARCに特異的に結合するモノクローナル抗体CT-1抗体の重鎖可変領域及び軽鎖(鎖)可変領域を含むイヌTARCに特異的に結合する抗イヌTARCモノクローナル抗体である。

【0020】

さらに、本発明は前記CT-1抗体の重鎖可変領域若しくは軽鎖(鎖)可変領域であるポリペプチド並びにそれらの可変領域をコードするポリヌクレオチドも包含する。

40

【0021】

また、本発明はイヌTARCに特異的に結合するモノクローナル抗体R1、R5、R7又はCT-3抗体の重鎖可変領域及び軽鎖(鎖)可変領域を含むイヌTARCに特異的に結合する抗イヌTARCモノクローナル抗体である。

【0022】

さらに、本発明は前記R1、R5、R7又はCT-3抗体の重鎖可変領域若しくは軽鎖(鎖)可変領域であるポリペプチド並びにそれらの可変領域をコードするポリヌクレオチドも包含する。

50

【0023】

本発明の抗体は、抗体の機能的断片又はその修飾物も包含する。例えば、抗体の機能的断片は、抗体の断片であって抗原に特異的に結合し得る断片である。機能的断片としては、Fab、F(ab')₂、Fv、1個のFabと完全なFcを有するFab/c、H鎖若しくはL鎖のFvを適当なリンカーで連結させたシングルチェーンFv(scFv)又はCDR等が挙げられる。ポリヌクレオチドは、DNAもRNAも包含する。

【0024】

CT-1抗体の重鎖可変領域をコードするDNAの塩基配列は配列番号1で表される塩基配列からなり、重鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号2で表されるアミノ酸配列からなる。また、CT-1抗体の軽鎖可変領域をコードするDNAの塩基配列は配列番号3で表される塩基配列からなり、軽鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号4で表されるアミノ酸配列からなる。

10

【0025】

R1抗体の重鎖可変領域をコードするDNAの塩基配列は配列番号18で表される塩基配列からなり、重鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号19で表されるアミノ酸配列からなる。また、R1抗体の軽鎖可変領域をコードするDNAの塩基配列は配列番号20で表される塩基配列からなり、軽鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号21で表されるアミノ酸配列からなる。

【0026】

R5抗体の重鎖可変領域をコードするDNAの塩基配列は配列番号22で表される塩基配列からなり、重鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号23で表されるアミノ酸配列からなる。また、R5抗体の軽鎖可変領域をコードするDNAの塩基配列は配列番号24で表される塩基配列からなり、軽鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号25で表されるアミノ酸配列からなる。

20

【0027】

R7抗体の重鎖可変領域をコードするDNAの塩基配列は配列番号26で表される塩基配列からなり、重鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号27で表されるアミノ酸配列からなる。また、R7抗体の軽鎖可変領域をコードするDNAの塩基配列は配列番号28で表される塩基配列からなり、軽鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号29で表されるアミノ酸配列からなる。

30

【0028】

CT-3抗体の重鎖可変領域をコードするDNAの塩基配列は配列番号30で表される塩基配列からなり、重鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号31で表されるアミノ酸配列からなる。また、CT-3抗体の軽鎖可変領域をコードするDNAの塩基配列は配列番号32で表される塩基配列からなり、軽鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号33で表されるアミノ酸配列からなる。

【0029】

重鎖可変領域は配列番号2、19、23、27又は31で表わされるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域のみならず、該アミノ酸配列において、1若しくは数個、例えば、1~10個、好ましくは1~5個、さらに好ましくは1若しくは2個、さらに好ましくは1個のアミノ酸が欠失、置換、付加されたアミノ酸配列からなり、抗体の重鎖可変領域の活性、すなわちイヌTARCへの結合活性を有するタンパク質からなる重鎖可変領域も含む。軽鎖可変領域は配列番号4、21、25、29又は33で表わされるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域のみならず、該アミノ酸配列において1若しくは数個、例えば、1~10個、好ましくは1~5個、さらに好ましくは1若しくは2個、さらに好ましくは1個のアミノ酸が欠失、置換、付加されたアミノ酸配列からなり、抗体の軽鎖可変領域の活性、すなわちイヌTARCへの結合活性を有するタンパク質からなる軽鎖可変領域も含む。

40

【0030】

このような配列番号2、19、23、27若しくは31、又は4、21、25、29若しくは33のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加

50

されたアミノ酸配列として、配列番号2、19、23、27若しくは31、又は4、21、25、29若しくは33のアミノ酸配列と、BLAST (Basic Local Alignment Search Tool at the National Center for Biological Information (米国国立生物学情報センターの基本ローカルアラインメント検索ツール))等(例えば、デフォルトすなわち初期設定のパラメータ)を用いて計算したときに、少なくとも85%以上、好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは97%以上の配列同一性を有しているものが挙げられる。

【0031】

このような配列番号2、19、23、27若しくは31、又は4、21、25、29若しくは33のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質は配列番号2又は4のアミノ酸配列を有するタンパク質と実質的に同一である。

【0032】

また、上記の配列番号1、18、22、26若しくは30、又は3、20、24、28若しくは32で表される配列からなる塩基配列とBLAST (Basic Local Alignment Search Tool at the National Center for Biological Information (米国国立生物学情報センターの基本ローカルアラインメント検索ツール))等(例えば、デフォルトすなわち初期設定のパラメータ)を用いて計算したときに、少なくとも85%以上、好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは97%以上の配列同一性を有している塩基配列からなるDNAであって、抗体の重鎖可変領域又は軽鎖可変領域の活性、すなわちイヌTARCへの結合活性を有するタンパク質をコードするDNAも本発明の抗体の重鎖可変領域又は軽鎖可変領域をコードするDNAに含まれる。

【0033】

また、上記の配列番号1、18、22、26若しくは30、又は3、20、24、28若しくは32で表される配列からなるDNAと相補的な配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができるDNAであって抗体の重鎖可変領域又は軽鎖可変領域の活性、すなわちイヌTARCへの結合活性を有するタンパク質をコードするDNAも本発明の重鎖可変領域又は軽鎖可変領域をコードするDNAに含まれる。すなわち、DNAを固定したフィルターを用いて、0.7~1.0MのNaCl存在下、68℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2倍濃度のSSC溶液(1倍濃度のSSCとは150mM NaCl、15mM クエン酸ナトリウムからなる)を用い、68℃で洗浄することにより同定することができる条件をいう。あるいは、サザンブロッティング法によりニトロセルロース膜上にDNAを転写、固定後、ハイブリダイゼーション緩衝液〔50% フォルムアミド、4×SSC、50mM HEPES(pH7.0)、10×デンハルト(Denhardt's)溶液、100µg/ml サケ精子DNA〕中で42℃で一晩反応させることによりハイブリッドを形成することができるDNAである。

【0034】

本発明のイヌTARCに特異的に結合する抗イヌTARCモノクローナル抗体の重鎖可変領域又は軽鎖可変領域は、イヌTARCを免疫原として用いて、マウスやラットの細胞を用いて、公知の方法により抗イヌTARC抗体産生ハイブリドーマを取得し、該ハイブリドーマから重鎖可変領域をコードするDNA又は軽鎖可変領域をコードするDNAを単離し、該DNAを発現させることにより得ることができる。

【0035】

免疫原として用いるイヌTARCは、例えば、前田(J. Vet. Med. Sci. 63(9):1035-1038, 2001)らの決定した塩基配列をもとに、組換えベクターを調製し、リコンビナントイヌTARCを発現させることにより製造することができる。

【0036】

また、前記の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含むイヌTARCに特異的に結合する抗イヌTARCモノクローナル抗体は、上記の重鎖可変領域及び重鎖定常領域並びに上記の軽鎖可変領域及び軽鎖定常領域とから構成される。重鎖定常領域は、3個のドメインC_H1、C_H2及びC_H3から構成されている。重鎖定常領域は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM又は

10

20

30

40

50

IgD定常領域であってもよいが、最も好適には、IgG1又はIgG4定常領域である。軽鎖定常領域は、1個のドメインC_Lで構成されている。軽鎖定常領域は、又は定常領域である。

【0037】

抗体をコードするDNAは、重鎖可変領域をコードするDNAと重鎖定常領域をコードするDNAを連結し、さらに軽鎖可変領域をコードするDNAと軽鎖定常領域をコードするDNAを連結することにより重鎖をコードするDNA及び軽鎖をコードするDNAとして得られる。可変領域の由来生物種と定常領域の由来生物種は異なってもよく、本発明の抗イヌTARC抗体は、可変領域の由来生物種と定常領域の由来生物種が異なるキメラ抗体も含む。例えば、配列番号1、18、22、26又は30で表されるDNAにコードされる重鎖可変領域及び配列番号3、20、24、28又は32で表されるDNAにコードされる軽鎖可変領域はマウス由来であるが、これをイヌ由来の抗体の定常領域をコードするDNAと連結させてマウス由来の可変領域とイヌ由来の定常領域を含むキメラ抗体を作製することができる。

10

【0038】

本発明の重鎖可変領域又は軽鎖可変領域は、重鎖可変領域をコードするDNA又は軽鎖可変領域をコードするDNAを発現ベクターに挿入し、発現用の宿主細胞を該ベクターを用いて形質転換し、宿主細胞を培養することにより細胞に産生させることができる。

【0039】

本発明の抗イヌTARCモノクローナル抗体は、上記の重鎖をコードするDNA及び軽鎖をコードするDNAを発現ベクターに挿入し、該ベクターを用いて宿主細胞を形質転換し、該宿主細胞を培養して産生させることができる。この際、上記の重鎖をコードするDNA及び軽鎖をコードするDNAを同じ発現ベクターに挿入し、該ベクターを用いて宿主細胞を形質転換してもよいし、重鎖をコードするDNAと軽鎖をコードするDNAを別々のベクターに挿入し、2つのベクターを用いて宿主細胞を形質転換してもよい。この際、特定のアイソタイプの重鎖定常領域及び軽鎖定常領域をコードするDNAを予め挿入したベクターに重鎖可変領域及び軽鎖可変領域をコードするDNAを挿入してもよい。また、該ベクターは宿主細胞からの抗体の分泌を促進するシグナルペプチドをコードするDNAを含んでいてもよい、この場合、シグナルペプチドをコードするDNAと抗体をコードするDNAをインフレームで連結するようにする。抗体が産生された後にシグナルペプチドを除去し、抗体を成熟タンパク質として得ることができる。

20

30

【0040】

この際、重鎖可変領域をコードするDNA、軽鎖可変領域をコードするDNA、重鎖可変領域をコードするDNAと重鎖定常領域をコードするDNAを連結したDNA、軽鎖可変領域をコードするDNAと軽鎖定常領域をコードするDNAを連結したDNAをプロモータ、エンハンサー、ポリアデニル化シグナル等のエレメントと機能的に連結してもよい。ここで機能的に連結とは、エレメントがその機能を果たすように連結することをいう。

【0041】

プロモータ及びエンハンサーとしては、サイトメガロウイルス(CMV)、シミアンウイルス40(SV40)、アデノウイルス由来のプロモータ及びエンハンサーを用いることができる。

40

【0042】

本発明の遺伝子を挿入するためのベクターは、動物細胞、細菌、酵母等の宿主中で複製可能なものであれば特に限定されず、例えば、プラスミド、ファージ等が挙げられる。発現ベクターの構築に用いられるベクターとしては、公知のものを用いることができる。例えば、Flexi(登録商標)ベクター(プロメガ社)、pUC19、pTV118 N(宝酒造社製)、pUEX2(アマシャム社製)、pGEX-4T、pKK233-2(ファルマシア社製)、pMAM-neo(クロンテック社製)等が挙げられる。

【0043】

発現ベクターは公知の方法で宿主細胞に導入し、宿主細胞を形質転換することができる。例えば、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム沈殿法、DEAE-デキストラント

50

ランスフェクション法等がある。

【0044】

宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌等の原核細胞も酵母、動物細胞等の真核細胞も用いることができるが、真核細胞を用いることが好ましい。動物細胞としては、ヒト胎児腎細胞株であるHEK293細胞、チャイニーズ・ハムスター・卵巣(CHO)細胞、カイコ等の鱗翅目昆虫細胞であるSf 21細胞、Sf 9細胞やTN5細胞、サルCOS細胞、マウス線維芽細胞等が挙げられ、酵母としてはサッカロマイセス・セレビシエ等が挙げられる。また、本発明の可変領域又は抗体は、カイコ虫体等の動物体を用いて産生することもできる。カイコ虫体を用いての産生は公知の方法により行うことができる。

【0045】

発現、産生された抗体の精製は、通常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、その他のクロマトグラフィー、フィルター、限外濾過、塩析、透析等を適宜選択、組み合わせることにより、抗体を分離、精製することができる(Antibodies A Laboratory Manual, Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)。また、抗イヌTARC抗体をアフィニータグ付きの状態に製造した後、アフィニータグを利用したアフィニティークロマトグラフィーにより精製することもできる。アフィニータグ配列としては、例えば、2~12個、好ましくは4個以上、さらに好ましくは4~7個、さらに好ましくは5個若しくは6個のヒスチジンからなるポリヒスチジン配列が挙げられる。この場合、ニッケルをリガンドとしたニッケルキレートカラムクロマトグラフィーを利用することにより合成タンパク質を精製することができる。また、ポリヒスチジンに対する抗体をリガンドとして固定化したカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーによっても精製することができる。その他、ヒスチジンを含む配列からなるHATタグ、HNタグ等も用いることができる。さらに、他のアフィニータグとして、V5タグ、Xpressタグ、AU1タグ、T7タグ、VSV-Gタグ、DDDDKタグ、Sタグ、CruzTag09、CruzTag22、CruzTag41、Glu-Gluタグ、Ha.11タグ、KT3タグ等がある。本発明は、これらのタグが結合した抗イヌTARC抗体も包含する。

【0046】

本発明のイヌTARCモノクローナル抗体は、イヌのアトピー性皮膚炎の検出及びイヌのアトピー性皮膚炎の治療の両方に用いることができるが、治療剤として用いる場合は、イヌの体内に投与した場合に免疫反応を惹起しないものが望ましい。このような抗体として、抗体の定常領域としてイヌの定常領域を含むキメラ抗体、定常領域と超可変領域を除く全ての可変領域をイヌの配列に置き換えたイヌ化抗体等が挙げられる。

【0047】

本発明の抗イヌTARCモノクローナル抗体は、イヌのアトピー性皮膚炎の診断に用いることができる。すなわち、本発明の抗イヌTARCモノクローナル抗体を用いてイヌ生体試料中のTARCを免疫学的に検出することによりアトピー性皮膚炎を検出することができる。イヌTARCの検出は、イムノプロット法、酵素免疫測定法(EIA、ELISA)、放射線免疫測定法(RIA)、蛍光抗体法、凝集反応を利用した方法、イムノクロマトグラフィー法等の当業者に知られた免疫学的測定方法により行うことができる。ここで、イヌ生体試料とは、血清、血漿、尿、髄液、病変部組織等の体液又は組織をいう。

【0048】

例えば、酵素免疫測定法(EIA)においては、抗イヌTARCモノクローナル抗体をマイクロプレート、樹脂ビーズ、磁性化ビーズ等の担体に物理吸着や化学結合により固相化する。固相化量は、特に限定されないが担体がマイクロプレートの場合、1ウェル当たり数ngから数十µgが望ましい。固相化は固相化すべき抗体を適切な緩衝液に溶解し、担体と接触させることにより行うことができる。例えば、マイクロタイターウェルを用いる場合、適当な濃度に調製した抗体溶液をマイクロタイタープレートのウェルに分注し一定時間置くことにより固相化することができる。抗体を固相化した後は、アッセイ中の非特異的結合を防ぐためにウシ血清アルブミン、ヒト血清アルブミン、ウサギ血清アルブミン、卵白アルブミン等を含んだブロッキング溶液を用いてブロッキングを行うのが好ましい。次い

10

20

30

40

50

で、固相化担体と試料を反応させ、洗浄後、標識抗イヌTARC抗体を反応させる。標識は-D-ガラクトシダーゼ、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼやグルコースオキシダーゼ等の酵素を用いて行うことができる。例えば、ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)においては、多数のウェル(例えば、96ウェル)を有するマイクロタイタープレートに抗体を固相化させ、ウェル中で抗原抗体反応を行わせることにより一度に大量測定が可能になる。また用いる抗体及び試料の使用量を非常に少なくすることも可能である。さらに、全自動EIA測定装置などの自動測定機器を用いることも可能になる。

【0049】

アトピー性皮膚炎に罹患しているイヌ被験体においては、血中TARC濃度が増加する。イヌ被験体から採取した生体試料中のイヌTARCをin vitroで測定し、正常イヌ個体に比較して生体試料中のTARC濃度が有意に増加している場合、該イヌ被験体はアトピー性皮膚炎に罹患していると診断することができる。さらに、イヌ被験体から採取した生体試料中のTARCを測定することにより、アトピー性皮膚炎に罹患するリスクを評価することができる。イヌ被験体から採取した生体試料中のTARCをin vitroで測定し、正常イヌ個体に比較してTARC濃度が有意に増加している場合、該イヌ被験体はアトピー性皮膚炎に罹患するリスクが高いと評価することができる。すなわち、イヌ被験体の生体試料中のTARCを測定することにより、アトピー性皮膚炎に罹患するリスクの高いイヌ被験体をスクリーニングし、適切な処置を施すことが可能になる。

10

【0050】

この際、あらかじめ正常イヌ個体から採取した血中のTARC濃度を測定しておき、測定値からカットオフ値を定め、イヌ被験体の生体試料中のTARC濃度をカットオフ値と比較して診断することもできる。

20

【0051】

本発明は、イヌ生体試料中のイヌTARCの検出を可能にするキットの提供をも目的とするが、該キットは少なくとも抗イヌTARCモノクローナル抗体を含む。該キットが酵素免疫測定法に基づく場合は、抗体を固相化した担体を含んでいてもよく、抗体があらかじめ担体に結合していてもよい。また、該キットは適宜、ブロッキング溶液、反応溶液、反応停止液、試料を処理するための試薬等を含んでいてもよい。

【0052】

本発明の抗TARCモノクローナル抗体をイヌアトピー性皮膚炎の治療に用いることも可能である。

30

【0053】

本発明の抗体を含む製剤の投与形態は限定されず、経口、非経口、経粘膜(例えば舌下又は口腔投与)、局所、経皮、直腸、吸入(例えば鼻又は肺奥吸入)等により投与することができる。非経口投与として、静脈内、皮下、筋肉内注射等が挙げられる。局所又は経皮製剤は粉末、エマルジョン、懸濁液、スプレー、クリーム、軟膏、ローション及びペースト等の形態で用いられ、又は薬用膏薬、パッチ又は膜の形で用いられる。さらにシャンプー、リンスに本発明の抗体を含有させてもよい。治療に用いるに必要な本発明の抗体の量は、治療する病状の性質、被験体の年齢と状態で変わり、最終的には担当獣医が決めることができる。例えば、軟膏等の局所適用形態では、抗体を、例えば0.1~99%の濃度で含有し、1日あたり0.05~2mgの抗体を投与すればよい。所定の投与量は1回の投与で与えてもよいし、1日当たり2回、3回、4回又はそれ以上の分割投与の適当な間隔で与えてもよい。

40

【0054】

本発明は、抗イヌTARCモノクローナル抗体を有効成分として含む、イヌのアトピー性皮膚炎治療剤も包含し、さらに、抗イヌTARCモノクローナル抗体をイヌに投与することを含むイヌのアトピー性皮膚炎の治療法も包含する。さらにイヌTARCを分子標的とした治療剤も本発明の範囲に含まれる。

【実施例】

【0055】

50

本発明を以下の実施例によって具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

【0056】

実施例1 大腸菌による抗原用組換えイヌTARCタンパク質の作出

前田ら(J. Vet. Med. Sci. 63(9):1035-1038, 2001)が論文中で報告しているイヌTARCのタンパク質翻訳領域を全長を含むプラスミドDNAを鋳型とし、PCR法によりイヌTARCタンパクをコードするDNA断片を調製した。DNA断片を大腸菌発現ベクターであるpGEX4T-1(Amersham Bioscience社)に連結した。大腸菌の形質転換を行い、イヌTARC遺伝子が含まれる大腸菌クローンを選択しプラスミドDNAを精製した。得られたプラスミドDNAを大腸菌BL21株(TaKaRa社)に形質転換した。形質転換された大腸菌をLB培地(50 μ g/mLアンピシリン含)で培養し、培養液に100mM IPTGを添加して発現を誘導し、37 $^{\circ}$ Cでさらに3時間培養した。培養液を遠心管に移し、4 $^{\circ}$ Cで6,000rpm、10分間遠心して集菌した。

10

【0057】

上清を除去し、沈殿を氷冷しておいたソニケーションバッファー(50mM Tris-HCl、50mM NaCl、1mM EDTA、1mM DTT; pH8.0)に懸濁し、超音波処理を行い、大腸菌を破壊した。冷却しておいた10% Triton X-100を終濃度1%になるように添加し、4 $^{\circ}$ Cで18,000rpm、30分間遠心した。上清をグルタチオンセファロース4Bカラム(Amersham Bioscience社)及び、ゲル濾過カラムSuperose12HR10/30(Amersham Bioscience社)を用いたFPLCファルマシアFPLCシステムを用い、抗原として使用するイヌTARCタンパク質を精製した。

20

【0058】

実施例2 ハイブリドーマの作製と選別

実施例1で得た精製イヌTARCを100 μ g/100 μ Lの濃度に精製水に溶解し、この溶液を2週おきにBALB/cマウスの腹腔内に投与し免疫を行った。初回及び2回目の免疫においては等容量のフロイントコンプリートアジュバントとのエマルジョンを投与した。最終の免疫から3日目に脾臓を摘出し、Bリンパ球を分離し、マウスミエローマ細胞とをKoehlerとMilsteinらの方法(Koehler, G., et al. Nature vol. 256, 495-497, 1975)に従って細胞融合させた。ついで融合細胞を選択するためにHAT培地で培養することによりセレクションを行った。

【0059】

次にセレクションした細胞の中から特異性の高い抗イヌTARC抗体を産生しているハイブリドーマを、ソリッドフェーズELISAと還元処理後のウエスタンブロッティングの組合せにより選別し取得した。

30

【0060】

即ち、固相抗原(イヌTARC)にハイブリドーマの培養液を直接反応させ、反応性を確認する通常のソリッドフェーズELISAで陽性となり、かつ、還元処理後のウエスタンブロッティングにおいて陽性を示すようなハイブリドーマを選択した。

【0061】

実施例1で得た精製イヌTARC 100 μ l(10 μ g/ml 0.1 M NaHCO₃)を96ウェルイムノプレート(Nunc社)に添加し、室温で一夜固相化した。固相化後、それぞれのウェルを1%BSA-PBS100 μ Lで、37 $^{\circ}$ C、1時間ブロックした。ウェルを0.05% Tween 20を含むPBS(洗浄バッファー)で3回洗浄した後、各ハイブリドーマの培養液について、その50 μ lずつをそれぞれイヌTARCを固相化したウェルに添加し37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。1時間の反応後、各ウェルを洗浄バッファーで5回洗浄した。イヌTARCに結合した抗体(マウスIgG)を検出するために、パーオキシダーゼ(POD)標識されたヤギ抗マウスIgG()ポリクローナル抗体(Zymet社)を1%BSA-PBSで2000倍に希釈し、その50 μ Lを96-ウェルイムノプレートの各ウェルに添加し、37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。各ウェルを洗浄バッファーで5回洗浄後、酵素基質溶液(ABTS液)50 μ Lを各ウェルに添加、37 $^{\circ}$ C、10分間反応させた。酵素反応は各ウェルに50 μ Lの0.32%フッ化ナトリウム溶液を添加して停止させた。各ウェルの414nmの吸光度をイムノリーダー(BioRad社)で測定した。ソリッドフェーズELISAを各ハイブリドーマに対して行うことで、ハイブリドーマを選択した。得られたハイブリド

40

50

ーマについて3回クローニングを行い、8クローンのハイブリドーマを樹立した。

【0062】

実施例3 抗イヌTARCモノクローナル抗体CT-1の検定

8クローンのハイブリドーマのうち、CT-1、CT-2、CT-F及びCT-Gの産生するモノクローナル抗体(それぞれ、CT-1抗体、CT-2抗体、CT-F抗体及びCT-G抗体とする)についてELISAにてイヌTARCとの反応性を検定した。

【0063】

上記モノクローナル抗体をBlock Aceを用いて37℃、1.5時間ブロッキングしたマイクロプレートのウェルに固相化し、実施例1で作製した組換えイヌTARCタンパク質を添加し37℃で1.5時間反応させ抗体に結合させた。プレートを洗浄後1次抗体としてウサギ抗イヌTARCポリクローナル抗体を添加し37℃で1.5時間反応させ、さらにプレートを洗浄し、二次抗体としてHRP標識抗ウサギIgGを添加し、37℃で1.5時間反応させた。基質を添加し、各ウェルの発色を測定した。

【0064】

図1に各モノクローナル抗体の反応性を示す。図1にはTARCを添加した場合の結果とTARCを添加しない場合の結果を示す。

【0065】

図1の結果は、CT-F抗体及びCT-G抗体の反応性が高いことを示す。しかしながら、添加するTARCタンパク質の濃度を変化させたときの直線性はCT-1抗体が優れていた。図2にCT-1抗体を用いてTARCタンパク質の濃度を変化させたときの反応性を示す。図2に示すように $R^2=0.9968$ であり直線性は良好であった。

【0066】

実施例4 CT-1抗体を用いたイヌ被験体血清中のTARCタンパク質の測定

正常イヌ9頭、アトピー性皮膚炎に罹患しているイヌ9頭及び人為的にアレルゲンで感作したイヌ9頭より血液を採取し、血清中のTARCタンパク質濃度を測定した。感作は、Derf2アレルゲンを水酸化アルミニウムゲルと混合して2~3回皮下投与することにより行い、その後、血清中のanti-derf2 IgEの上昇によって感作の成立を確認した。

【0067】

結果を図3に示す。図3の結果は、CT-1抗体を用いた場合、イヌアトピー性皮膚炎を高感度で検出できることを示している。

【0068】

実施例5 CT-1抗体の可変領域の塩基配列の決定

CT-1抗体を産生するハイブリドーマより抗体の可変領域をコードするDNAを単離し、塩基配列の決定を行った。

【0069】

すなわち、ハイブリドーマからトータルRNAを調製し、トータルRNAを鋳型にSMARTer(商標) RACE cDNA Amplification Kit(TaKaRa Code Z4923N)と、ラット抗体(IgG)H鎖(重鎖)定常領域に特異的なプライマーを用いて、RT反応を行った。得られたcDNAを鋳型に、H鎖定常領域に特異的なプライマーによりRACE PCR反応を行った。得られたPCR産物を精製し、プラスミドベクターにクローニングした後、ランダムピックした48クローンについて塩基配列解析を行った。同様にハイブリドーマから調製したトータルRNAを鋳型にL鎖(軽鎖)についても解析を行った。

【0070】

用いたプライマーは以下のとおりであった。

H-RT1: TCCAKAGTTCCA (配列番号5)

H-PCR-NA: GGGAARTARCCCTTGACCAGGCA (配列番号6)

H-PCR-N2: GGGAARTAGCCTTTGACAAGGCA (配列番号7)

L-RT1: GCTGTCCTGATC (配列番号8)

L-PCR: CACTGCCATCAATCTTCCACTTGACA (配列番号9)

H-PCR-N1プライマーとH-PCR-N2プライマーは1:1に混合し、H-PCRプライマーとして

用いた。

【0071】

重鎖可変領域の塩基配列を配列番号1に示し、軽鎖(鎖)可変領域の塩基配列を配列番号3に示す。また、重鎖可変領域のアミノ酸配列を配列番号2に示し、鎖可変領域のアミノ酸配列を配列番号4に示す。

【0072】

実施例6 リコンビナントCT-1モノクローナル抗体の作製

イヌイムノグロブリンH鎖定常領域の3'末端側にNotI酵素サイトを付加した遺伝子を、KOD-Plus(東洋紡)を用いて製品添付プロトコルに従い、プライマー(1(配列番号10), 2(配列番号11))(図4)を用いて増幅した(IgG-C)。また同様にイヌイムノグロブリンL鎖定常領域の3'末端側にMluI遺伝子を付加した遺伝子をプライマー(3(配列番号12), 4(配列番号13))(図4)を用いて増幅した(IgG-kappa)。

10

【0073】

同様の方法でCT-1モノクローナル抗体のH鎖V領域を、5'末端にSalI酵素サイトを、3'末端にIgG-Cの5'末端側の配列と1部重複する配列を持つようにプライマー(5(配列番号14), 6(配列番号15))(図4)を用いて増幅した(CT1-mouseVH)。このCT1-mouseVHと上記のIgG-Cの混合物を鋳型として、プライマー(2(配列番号11), 5(配列番号14))(図4)を用いてオーバーラップPCRを行うことによってマウスイムノグロブリンH鎖可変領域とイヌイムノグロブリンH鎖定常領域を結合させ、CT-1モノクローナル抗体のH鎖をコードするキメラ遺伝子を得た(CT1-mouseVH-canineCH)。

20

【0074】

同様にCT-1モノクローナル抗体のL鎖V領域を5'末端にXhoI酵素サイトを、3'末端側にIgG-kappaの5'末端と1部重複する配列を持つようにプライマー(7(配列番号16), 8(配列番号17))(図4)を用いて増幅した(CT1-mouseVL)。このCT1-mouseVLと上記のIgG-kappaの混合物を鋳型として、プライマー(4, 7)(図4)を用いてオーバーラップPCRを行うことによってマウスイムノグロブリンL鎖可変領域とイヌイムノグロブリンL鎖定常領域を結合させ、CT-1モノクローナル抗体のL鎖キメラ遺伝子を得た(CT1-mouseVL-canineCL)。

【0075】

CT1-mouseVH-canineCH遺伝子及びCT1-mouseVL-canineCL遺伝子を、それぞれに付加した制限酵素配列を利用してpIRES Vector(Clontech)へサブクローニングしてキメラ抗体発現用プラスミドpIRES-chimeric CT-1を作製した。このpIRES-chimeric CT-1をLipofectamine200(invitrogen)を用いてHEK293細胞へ導入し、培養上清からキメラ型抗CT-1モノクローナル抗体を得た。結果を図5に示す。図5(2)が組換えキメラCT-1抗体である。

30

【0076】

実施例7 抗イヌTARK抗体であるR1抗体、R5抗体、R7抗体及びCT-3抗体の作製

CT-3抗体と同様の方法により、R1抗体、R5抗体、R7抗体及びCT-3抗体を得て、配列決定を行った。

【0077】

R1抗体の重鎖可変領域をコードするDNAの塩基配列は配列番号18で表される塩基配列からなり、重鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号19で表されるアミノ酸配列からなる。また、R1抗体の軽鎖可変領域をコードするDNAの塩基配列は配列番号20で表される塩基配列からなり、軽鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号21で表されるアミノ酸配列からなる。

40

【0078】

R5抗体の重鎖可変領域をコードするDNAの塩基配列は配列番号22で表される塩基配列からなり、重鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号23で表されるアミノ酸配列からなる。また、R5抗体の軽鎖可変領域をコードするDNAの塩基配列は配列番号24で表される塩基配列からなり、軽鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号25で表されるアミノ酸配列からなる。

【0079】

50

R7抗体の重鎖可変領域をコードするDNAの塩基配列は配列番号26で表される塩基配列からなり、重鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号27で表されるアミノ酸配列からなる。また、R7抗体の軽鎖可変領域をコードするDNAの塩基配列は配列番号28で表される塩基配列からなり、軽鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号29で表されるアミノ酸配列からなる。

【0080】

CT-3抗体の重鎖可変領域をコードするDNAの塩基配列は配列番号30で表される塩基配列からなり、重鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号31で表されるアミノ酸配列からなる。また、CT-3抗体の軽鎖可変領域をコードするDNAの塩基配列は配列番号32で表される塩基配列からなり、軽鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号33で表されるアミノ酸配列からなる。

10

【産業上の利用可能性】

【0081】

本発明の抗イヌTARC抗体をイヌアトピー性皮膚炎の診断及び治療に用いることができる。

【0082】

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願はそのまま引用により本明細書に組み入れられるものとする。

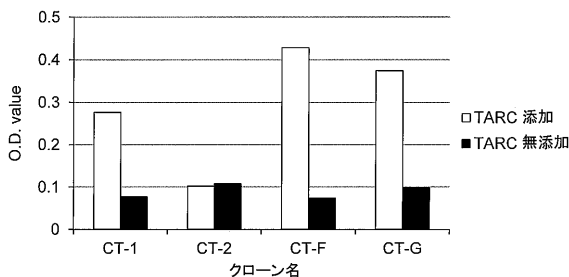
【配列表フリーテキスト】

【0083】

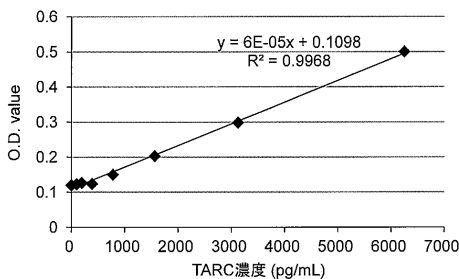
20

配列番号5～17 プライマー

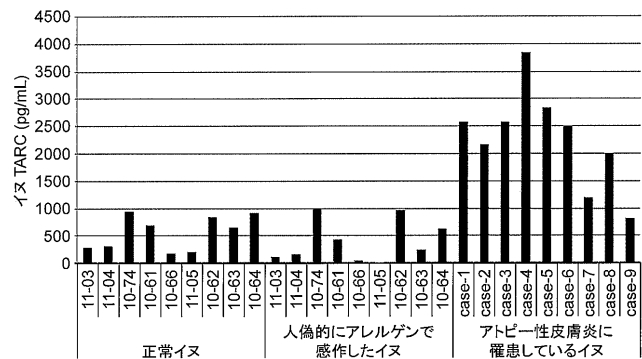
【図1】



【図2】



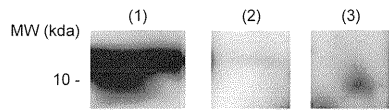
【図3】



【図4】

Primer name	Sequence (5'-3')	Direction	Target gene to amplify
1	GCCTCCACCACGGCCCC (配列番号10)	F	IgG-C
2	GCCGCGGCGCTCATTACCCGGAGAATGGG (配列番号11)	R	
3	AATGATGCCACGCCGCGT (配列番号12)	F	IgG-kappa
4	GGCACGCGTTTAGTCCACTCTCTGACACT (配列番号13)	R	
5	GCCGTCGACATGGGAAGTGTGCAGCCAT (配列番号14)	F	CT1-mouseVH
6	GGTGGAGGCTGCAGACAGTGACCAGAG (配列番号15)	R	
7	GCCTCGAGATGGGACTCAAGACTTTTGG (配列番号16)	F	CT1-mouseVL
8	GGCATCATCCGTTTCAGCTCCAGCTTGG (配列番号17)	R	

【 図 5 】



- (1) マウス腹水由来CT-1
- (2) 組換えキメラCT-1
- (3) 陰性対照 (メディウム)

【 配列表 】

2017065203000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2016/080339
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K16/18(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i 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) C07K16/18, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N15/09, C12P21/08, G01N33/53 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2016 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2016 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2016 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CApplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIX (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), UniProt/GeneSeq		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2005-104936 A (Nippon Zenyaku Kogyo Co., Ltd.), 21 April 2005 (21.04.2005), examples 1 to 3; paragraph [0025] (Family: none)	1-34
Y	MAEDA S. et al., Production of a monoclonal antibody to canine thymus and activation-regulated chemokine (TARC) and detection of TARC in lesional skin from dogs with atopic dermatitis, Vet. Immunol. Immunopathol., 2005, Vol.103, pp.83-92, abstract, page 85, left column, paragraph of '2.3. Production of monoclonal antibodies', page 90, right column, lines 1 to 3, page 91, left column, lines 42 to 48, fig. 3, 5	1-34
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 21 December 2016 (21.12.16)		Date of mailing of the international search report 10 January 2017 (10.01.17)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/080339

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2005-006583 A (Nippon Institute for Biological Science), 13 January 2005 (13.01.2005), paragraphs [0060], [0073] (Family: none)	1-34
Y	JP 2015-025006 A (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center), 05 February 2015 (05.02.2015), example 2 & US 2013/0171152 A1 example 2	1-34
A	WO 2015/069865 A1 (JANSSEN BIOTECH, INC.), 14 May 2015 (14.05.2015), claims & US 2015/0125458 A1 claims	1-34

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 6 / 0 8 0 3 3 9													
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K16/18(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i															
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. C07K16/18, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N15/09, C12P21/08, G01N33/53															
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2016年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2016年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2016年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2016年	日本国実用新案登録公報	1996-2016年	日本国登録実用新案公報	1994-2016年				
日本国実用新案公報	1922-1996年														
日本国公開実用新案公報	1971-2016年														
日本国実用新案登録公報	1996-2016年														
日本国登録実用新案公報	1994-2016年														
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) CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIX (STN), JSTplus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), UniProt/GeneSeq															
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 請求項の番号													
Y	JP 2005-104936 A (日本全薬工業株式会社) 2005.04.21, 実施例 1-3, 段落[0025] (ファミリーなし)	1-34													
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。															
<table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>の日の後に公表された文献</td> </tr> <tr> <td>「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</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「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</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「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)</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td>「&」同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</td> <td></td> </tr> </table>				* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献	「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	「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	「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	「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	「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)	「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	「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献	「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	
* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献														
「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	「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														
「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	「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														
「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)	「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														
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献														
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願															
国際調査を完了した日 21.12.2016		国際調査報告の発送日 10.01.2017													
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) 市島 洋介	4B 5804												
		電話番号 03-3581-1101	内線 3448												

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 6 / 0 8 0 3 3 9
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 請求項の番号
Y	MAEDA S. et al., Production of a monoclonal antibody to canine thymus and activation-regulated chemokine (TARC) and detection of TARC in lesional skin from dogs with atopic dermatitis, Vet. Immunol. Immunopathol., 2005, Vol.103, pp.83-92, 要約, 第85頁左欄「2.3. Production of monoclonal antibodies」の項, 第90頁右欄第1-3行, 第91頁左欄第42-48行, 図3, 図5	1-34
Y	JP 2005-006583 A (財団法人日本生物科学研究所) 2005.01.13, 段落[0060], 段落[0073] (ファミリーなし)	1-34
Y	JP 2015-025006 A (メモリアル スローナーケタリング キャンサー センター) 2015.02.05, 実施例2 & US 2013/0171152 A1, 実施例2	1-34
A	WO 2015/069865 A1 (JANSSEN BIOTECH, INC.) 2015.05.14, 特許請求の範囲 & US 2015/0125458 A1, 特許請求の範囲	1-34

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード(参考)
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21		
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10		
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P	21/08		
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53		P
			G 0 1 N	33/53		Q

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, T J, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, R O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, G T, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ , NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

(72)発明者 鈴木 理恵子

福島県郡山市安積町笹川字平ノ上1番地の1 日本全薬工業株式会社内

Fターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA01 DA13

4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AA90X AA90Y AB02 BA02 CA25 CA44

CA46

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 DA76 EA22 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)	抗犬TARC抗体用于治疗 and 诊断犬特异性皮炎		
公开(公告)号	JPWO2017065203A1	公开(公告)日	2018-09-27
申请号	JP2017545449	申请日	2016-10-13
申请(专利权)人(译)	Nihonzen'yakukogyo有限公司		
[标]发明人	津久井利広 影山みゆき 加藤正浩 鈴木理恵子		
发明人	津久井 利広 影山 みゆき 加藤 正浩 鈴木 理恵子		
IPC分类号	C12N15/13 C07K16/24 C12N15/63 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 G01N33/53		
FI分类号	C12N15/13.ZNA C07K16/24 C12N15/63.Z C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 G01N33/53.P G01N33/53.Q		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA72X 4B065/AA87X 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB02 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/DA76 4H045/EA22 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	2015203123 2015-10-14 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)
用于治疗 and 诊断犬特异性皮炎的抗犬TARC抗体以及使用该抗体的治疗或诊断犬特异性皮炎的方法。一种与犬TARC结合并与犬TARC结合的抗狗TARC单克隆抗体，其包含由SEQ ID NO：2表示的氨基酸序列组成的重链可变区和由SEQ ID NO：4表示的氨基酸序列组成的轻链可变区。该功能片段。

(19) 日本国特許庁 (JP)	再公表特許(A1)	(11) 国際公開番号
発行日 平成30年9月27日 (2018. 9. 27)		WO2017/065203
(51) Int. Cl.	FI	テーマコード (参考)
C12N 15/13 (2006.01)	C12N 15/13 ZNA	4B064
C07K 16/24 (2006.01)	C07K 16/24	4B065
C12N 15/63 (2006.01)	C12N 15/63 Z	4H045
C12N 1/15 (2006.01)	C12N 1/15	
C12N 1/19 (2006.01)	C12N 1/19	
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 25 頁) 最終頁に続く	
出願番号 特願2017-545449 (P2017-545449)	(71) 出願人 591281220	
(21) 国際出願番号 PCT/JP2016/080339	日本全薬工業株式会社	
(22) 国際出願日 平成28年10月13日 (2016.10.13)	福島県郡山市安積町笹川字平ノ上1番地の1	
(31) 優先権主張番号 特願2015-203123 (P2015-203123)	(74) 代理人 110002572	
(32) 優先日 平成27年10月14日 (2015.10.14)	特許業務法人平木国際特許事務所	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	津久井 利広	
	(72) 発明者 福島県郡山市安積町笹川字平ノ上1番地の1 日本全薬工業株式会社内	
	(72) 発明者 影山 みゆき	
	福島県郡山市安積町笹川字平ノ上1番地の1 日本全薬工業株式会社内	
	(72) 発明者 加藤 正浩	
	福島県郡山市安積町笹川字平ノ上1番地の1 日本全薬工業株式会社内	
	最終頁に続く	
(54) 【発明の名称】 イヌアトピー性皮膚炎の治療及び診断のために用いる抗イヌTARC抗体		