

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5437633号  
(P5437633)

(45) 発行日 平成26年3月12日(2014.3.12)

(24) 登録日 平成25年12月20日(2013.12.20)

(51) Int.Cl.	F I
<b>C 0 7 K 16/18 (2006.01)</b>	C O 7 K 16/18
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A
<b>C 0 7 K 14/47 (2006.01)</b>	C O 7 K 14/47
<b>G O 1 N 33/53 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/53 V
<b>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 N
請求項の数 23 (全 24 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号 特願2008-534349 (P2008-534349)  
 (86) (22) 出願日 平成19年9月11日(2007.9.11)  
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2007/067666  
 (87) 国際公開番号 W02008/032712  
 (87) 国際公開日 平成20年3月20日(2008.3.20)  
 審査請求日 平成22年3月16日(2010.3.16)  
 (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)

微生物の受託番号 IPOD FERM BP-10897

(73) 特許権者 399032282  
 株式会社 免疫生物研究所  
 群馬県藤岡市中字東田1091番地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  
 審査官 三原 健治

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) 【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】

ハイブリドーマ(Human Osteopontin Hybridoma. 34

E3 : F E R M B P - 1 0 8 9 7 ) が産生する 3 4 E 3 抗体である請求項 1 ないし 4 の何れかに記載のモノクローナル抗体。

【請求項 6】

請求項 1 ないし 5 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 7】

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 6 に記載の測定キット。 10

【請求項 8】

変形性関節炎の重篤度を判定するものである請求項 6 に記載の測定キット。

【請求項 9】

関節リウマチ診断用である請求項 6 に記載の測定キット。

【請求項 10】

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 5 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 11】

請求項 1 ないし 5 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ためのデータを提供する方法。 20

【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ためのデータを提供する方法。

【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ためのデータを提供する方法。 30

【請求項 14】

請求項 1 ないし 5 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ためのデータを提供する方法。

【請求項 15】

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 14 に記載の変形性関節炎の重篤度を判定するためのデータを提供する方法。

【請求項 16】

検体が関節液である請求項 14 または 15 に記載の変形性関節炎の重篤度を判定するためのデータを提供する方法。 40

【請求項 17】

請求項 1 ないし 5 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 18】

炎症性疾患が、肝炎である請求項 17 に記載の炎症性疾患治療剤。

【請求項 19】

肝細胞の壊死を抑制するものである請求項 18 に記載の炎症性疾患治療剤。

【請求項 20】

請求項 1 ないし 5 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リウマチ治療剤。

【請求項 2 1】

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 5 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 2】

請求項 2 1 に記載の目的タンパク質の検出・精製方法に用いる組換えベクターであって、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。

10

【請求項 2 3】

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抗原とし、これを動物(ただし、ヒトを除く)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 Y G L R であるタンパク質またはポリペプチド、アミノ酸配列 Y G L R 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利用してスクリーニングすることにより得ることを特徴とする請求項 1 ないし 5 の何れかに記載のモノクローナル抗体の製造方法。

20

【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 - h a l f」という)および C 末端フラグメント(以下、「OPN C - h a l f」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 - h a l f と hOPN C - h a l f の 2 つになる。

30

【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 - h a l f は、C 末端側に S V V Y G L R 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。

40

【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 - h a l f 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 - h a l f 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 - h a l f 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 - h a l f 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らが報告している 2 K 1 抗体は、OPN N - h a l f 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

50

れていないOPNも認識するため、条件によってはOPN N - h a l f を正確に測定しているとは言い難かった。

【0006】

また、上記OPN N - h a l f はOPNのトロンピンによる切断によりS V V Y G L R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】

10

【0007】

従って、本発明は全長OPNを認識せずに、OPN N - h a l f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 - h a l f 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】

本発明者らは、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、上記課題を解決し

20

【0009】

また、本発明者らは、このモノクローナル抗体を利用すれば、OPN N - h a l f 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 - h a l f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認識し、アミノ酸配列Y G L RをC末端以外に有するタンパク質

30

【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。

40

【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】

50

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。

【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。

【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。

【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。

【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

10

20

30

40

50

://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B A A 0 3 5 5 4のものをh O P N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イン(C)を付けて結合させることが好ましい。

**【0023】**

抗原に用いられる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。

10

**【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「K L H」という)、卵白アルブミン(以下、「O V A」という)、ウシ血清アルブミン(以下「B S A」という)、ウサギ血清アルブミン(以下「R S A」という)、サイログロブリン等が挙げられ、このうちK L H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。

20

**【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-バ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化炭化水素としては、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化炭化水素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】**

なお、ショッテン-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。

30

**【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。

40

**【0030】**

50

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。

10

【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。

20

【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。

30

【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方法は、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ムを得、当該ハイブリドーム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

40

50

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。

10

【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、炎症反応に關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。

20

【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關与していると考えられるので、これらのインテグリンとOPN N-half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。

30

【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、点滴用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。

40

【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、<sup>32</sup>P、<sup>125</sup>

50

I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、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、トロンピンで切断されたOPN N-hal 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-hal 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、トロンピンで切断されたOPN N-hal fを認識する抗体としては、例えば、OPN N-hal 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-hal 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-hal 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-hal 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、AAH02113、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:IPVKQADSGSSEEEKQ(配列番号6)

mOPN-1ペプチド:LPVKVTDSGSSEEEKLY(配列番号7)

rOPN-1ペプチド:LPVKVAEFGSSEEEKAHY(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 (0-17) Rabbit IgG Affinity Purify  
(製品番号:18621)

Anti-Human Osteopontin (0-17) Rabbit IgG Affinity Purify

10

20

30

40

50

(製品番号：18625)

Anti-Rat Osteopontin (O-17) Rabbit IgG Affinity Purify

(製品番号：18628)

【0052】

本発明抗体とOPN-N-half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。

10

【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キングする。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。

20

【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0.01~100µg/ml程度、好ましくは0.1~20µg/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、300µl/ウェル以下で20~150µl/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。

30

【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。

40

【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

50

発明抗体とOPN N-ha1f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-ha1f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、<sup>32</sup>P、<sup>125</sup>I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-ha1f-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-ha1f-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-ha1f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、2Nの水酸化ナトリウムを加えて酵素反応を止め、415nm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-ha1f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-ha1fの濃度を算出することもできる。

**【0061】**

上記で説明したOPN N-ha1f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-ha1f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-ha1f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-ha1f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-ha1f濃度を測定し、その平均値を算出しておく。次

10

20

30

40

50

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。

#### 【0067】

本発明抗体はC末端がアミノ酸配列YGLR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、Hisタグ、Flag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。

#### 【0068】

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YGLRであるタンパク質またはポリペプチド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。

#### 【0069】

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pEU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SP6等のプロモーターを挿入したものが好ましい。

【0070】

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pGEXベクター、pQEベクター等が挙げられる。

【0071】

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YGLRであるタンパク質またはポリペプチド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0.1Mグリシン-塩酸バッファー(pH2.5)等により結合を解離させ、組換えタンパク質を精製する。

10

【0072】

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】

【0073】

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。

20

【0074】

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HPLC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hOPN 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からなるアミノ酸配列(hOPN N-halfのアミノ酸配列の162~168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「hOPN-7ペプチド」という))にシスチン(C)を付けたものである。また、ポリペプチド(b)はhOPN N-half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hOPN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。

30

ポリペプチド(a)：CSVVYGLR(配列番号9)

ポリペプチド(b)：IPVKQADSGSSEKQC(配列番号10)

ポリペプチド(c)：CVDTYDGRGDSVVYGLRS(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EMCS(N-(6-Maleimidocaproyloxy)-succinimide)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EMCSのモル比はそれぞれ1:300:400とした。

40

【0076】

まず、実施例1の各ポリペプチド4mgを、それぞれ約1mlの蒸留水に溶解した。一方、1mlの0.01Mリン酸バッファー(pH7.0)に5mg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EMCS80mg/ml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-EMCS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

50

加えることにより、EMCSで架橋されたポリペプチドとサイク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、PBSを用いて透析し、結合物として10mg/ml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ク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)とサイクログロブリンとの結合物を用い、これを用いてBALB/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、X63-Ag8-653をポリエチレングリコール仲介細胞融合に付し、文献(J. Immunol. 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。

10

【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GIT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(1,000rpm、15min)により細胞を取り除いた後、硫酸アンモニウム50%飽和状態にして4で一晩静置し、沈殿を遠心(1,000rpm、30min)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(binding buffer: Protein A MAPS I Kit製)に溶解させた後、プロテインAカラム(Pharmacia-Amersham製)に通してIgGを吸着させた。その後、このカラムにPBS透析を一晩行って抗体を精製し、ヒトOPN N-half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(Human Osteopontin Hybridoma. 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)。

20

30

【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)とサイク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50μl(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。

40

【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)とサイク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：

50

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。

【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。

【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に対してウエスタンブ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ブロットを行った。この結果も図2に示した。

ポリペプチド（d）：CVDVPNGRGRGDSLAYGLR（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。

【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、NaIO<sub>4</sub>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

10

20

30

40

50

も pH 9.5 の 0.1 M 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 1 mg に対して HRP が 0.4 mg 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 NaBH<sub>4</sub> 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。

#### 【0088】

##### (2) サンドイッチ ELISA 用プレートの作製

10 μg/ml の 39E1 抗体あるいは 34E3 抗体を 100 μl ずつ 96 well 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 / NaN<sub>3</sub> 溶液にてブロッキング

10

#### 【0089】

##### (3) 標準曲線の作製

上記(2)で作製した 96 well 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。

20

#### 【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。

30

mOPN - 1 ペプチド：LPVKVTDSGSSSEKLY (配列番号 7)

mOPN - 3 ペプチド：KSRSFQVSDQYPDATDE (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 0.1 M の炭酸緩衝液 (pH 9.5) で 20 μg/ml の濃度に調整した後、96 well の ELISA 用プレートに 50 μl / 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 / NaN<sub>3</sub> 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

40

ンパク質を固相化したE L I S A用プレートを作製した。次に、このプレートにB 1 6 - F 1 0細胞を0.25% B S A / D - M E Mで $1 \times 10^5$  cells/mlに調整した後、各ウエルに200  $\mu$  lずつ加え、これを1時間、37 でインキュベート後0.25% B S A / D - M E M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、各ウエルに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。全てのウエルは、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。各ウエルの上清をウエルに接着した細胞の相対的数を求めるために590 nm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G R G D Sを含まないポリペプチドであるm O P N - 1ペプチド、m O P N - 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m O P N - 5抗体が、m O P Nに含まれるポリペプチド(m O P N - 5ペプチド、m O P N - 7ペプチドおよびG R G D S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m O P N - 5、m O P N - 7およびG R G D Sペプチドでプレコートし、次いで10分間、37 の条件で0.5% B S AのP B S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B 1 6 - F 1 0を、0.25% B S Aを含むD - M E Mに懸濁させ、細胞懸濁液(細胞濃度は、 $5 \times 10^4$ 細胞/ウエル)200  $\mu$  l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、全てのウエルを0.25% B S Aを含むD - M E M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。全てのウエルは、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。各ウエルの上清をウエルに接着した細胞の相対的数を求めるために590 nm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m O P N - 5およびm O P N - 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G R G D S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、m O P N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G R G D Sペプチドを含むポリペプチド(d)を抗原として得られたm O P N - 5抗体がG R G D S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、m O P N - 5抗体が短いG R G D S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、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h O P N - 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S P 6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P C R法で、m R N A合成に必要なプロモーターからc D N Aの3'端までを合成した。更にこのP C R産物を鋳型としてm R N Aを合成し、そのm R N

10

20

30

40

50

A 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ティングを行った。また、対照として本出願人が報告しているW002/081522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ティングを行った。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)

10

【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。

20

【0097】

実施例 7

E L I S A 法による慢性関節リウマチ ( R A ) 患者尿中の O P N N - h a l f 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。

30

【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

40

\* s t u d e n t ' s t - t e s t

【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

50

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。

【0101】

実施例 8

E L I S A 法による変形性関節炎 ( O A ) および慢性関節リウマチ ( R A ) 患者膝関節液中の O P N N - h a l f 量の測定 :

変形性関節炎 ( O A ) 107 関節の膝関節液と関節リウマチ ( R A ) 18 関節の膝関節液を採取し、- 80 で凍結保存した。O A は K e l l g r e n & L a w r e n c e の g r a d e 1、2 に相当する軽度 45 関節、g r a d e 3 に相当する中等度 33 関節、g r a d e 4 に相当する重度 29 関節であり、R A は L a r s e n 分類 g r a d e I I I、I V、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、O P N N - h a l f 濃度を求めた。また、比較として Human O s t e o p o n t i n A s s a y K i t ( L ) - I B L ( 株式会社免疫生物研究所製 ( 製品番号 : 27158 ) ) を用いて全長 O P N 濃度も測定した。更に、O P N N - h a l f / O P N N - h a l f + 全長 O P N ( O P N N - h a l f 量 / O P N 全量 ) の値も求めた。これらの結果を表 2 に示した。

【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 (%)
O A	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%
R A		18	13.23	1231.9	14.46	8.52%

【0103】

O A と R A の比較 :

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

N - h a l f + 全長 O P N は、R A で高値 ( p < 0.0001 )

O A のグレード間での比較 :

- ・全長 O P N は相関無し
- ・ O P N 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 )
- ・ O P N N - h a l f / O P N N - h a l f + 全長 O P N 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 )

【0104】

この結果により、関節液中の O P N N - h a l f 濃度を測定することによりあるいは O P N 全量に対する O P N N - h a l f 量の比率を求めることにより、O A と R A の鑑別および O A 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 O P N N - h a l f 量の検出 :

実施例 8 で採取した患者膝関節液のうち、実施例 8 の E L I S A 法による測定結果で O

PN 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。

10

## 【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。

20

## 【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。

30

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 その他トロンピン開裂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)。

40

【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)

50

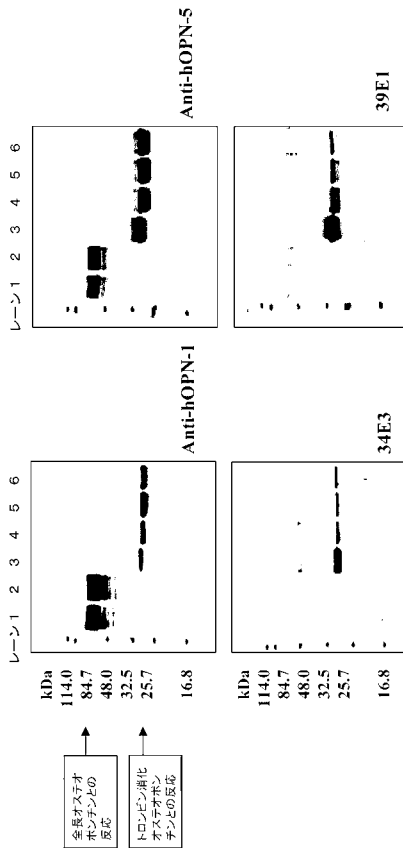
。

【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。

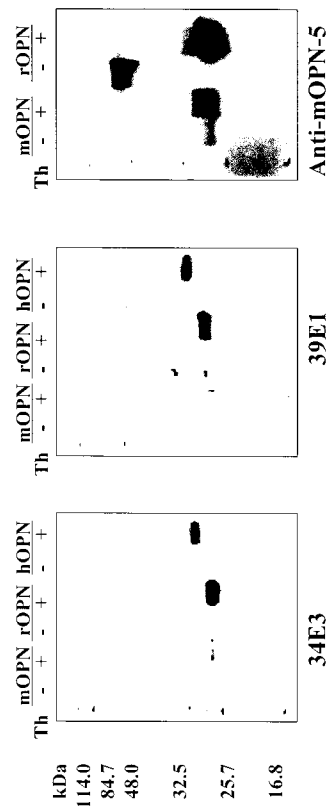
【図5】図5はマウスOPN由来の各種ポリペプチドに対する34E3抗体(34E3)、39E1抗体(39E1)およびmOPN-5抗体(M-5)の接着阻害活性を測定した結果を示す図面である(図中、AはmOPN-5ペプチドを用いた接着阻害試験の結果、BはmOPN-7ペプチドを用いた接着阻害試験の結果およびCはGRGDSペプチドを用いた接着阻害試験の結果を示す)。

【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-half)。

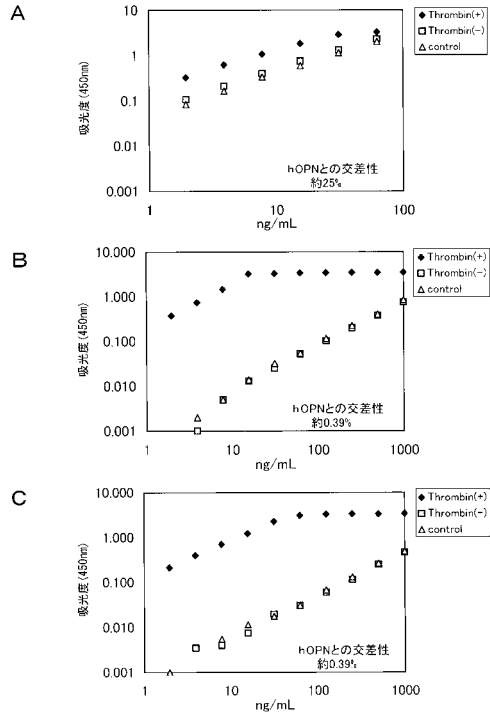
【図1】



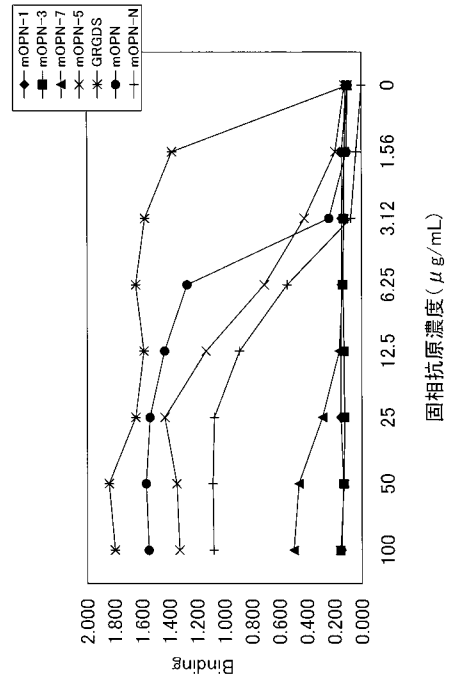
【図2】



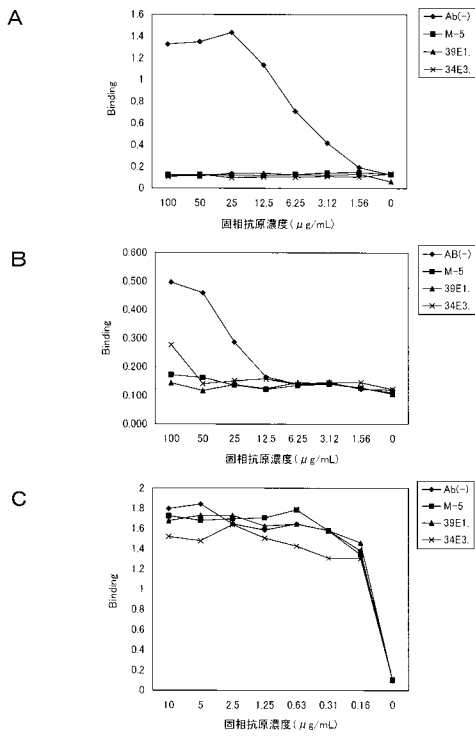
【 図 3 】



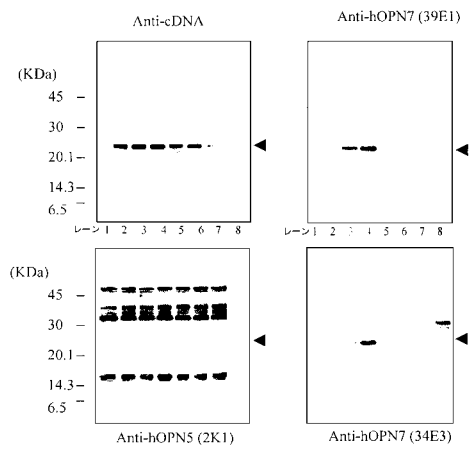
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



【配列表】

0005437633000001.app

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	
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	

- (56) 参考文献 国際公開第 0 2 / 0 8 1 5 2 2 ( WO , A 1 )  
 米国特許出願公開第 2 0 0 5 / 0 2 2 6 8 6 8 ( U S , A 1 )  
 J. Clin. Invest., vol. 112, pages 181-188 (2003)  
 GREEN, P.M. et al, Structural elements of the osteopontin SVVYGLR motif important for the interaction with  $\alpha 4$  integrins, FEBS Letters, 2 0 0 1 年, Vol.503, No.1, p.75-79  
 MYLES, T. et al, Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor, a Potential Regulator of Vascular Inflammation, Journal of Biological Chemistry, 2 0 0 3 年, Vol.278, No.51, p. 51059-51067

- (58) 調査した分野(Int.Cl., DB名)  
 C 0 7 K 1 6 / 0 0 - 1 6 / 4 6  
 C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0  
 C A p l u s / R E G I S T R Y ( S T N )

专利名称(译)	单克隆抗体及其用途		
公开(公告)号	<a href="#">JP5437633B2</a>	公开(公告)日	2014-03-12
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		
当前申请(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.ZNAA 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		
审查员(译)	三原贤治		
优先权	2006245966 2006-09-11 JP		
其他公开文献	JPWO2008032712A1		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明的目的是提供识别OPN N-半但不识别全长OPN的抗体及其用途。一种单克隆抗体，其特征在于它识别其中C-末端氨基酸序列是YGLR (SEQ ID NO: 1) 的蛋白质或多肽，并且它基本上不识别具有YGLR氨基酸序列的蛋白质或多肽。在C-末端外部，以及利用所述抗体测量OPN N-半的方法，用于诊断与OPN N-半部相关的疾病的方法，用于判断所述疾病的严重性的方法，以及治疗方法说疾病，提供。

	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