

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580029608.6

[51] Int. Cl.

C07K 16/40 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)

[43] 公开日 2007年8月15日

[11] 公开号 CN 101018810A

[51] Int. Cl. (续)

C12N 9/99 (2006.01)

C12N 15/02 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

C12Q 1/02 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[22] 申请日 2005.7.4

[21] 申请号 200580029608.6

[30] 优先权

[32] 2004.7.2 [33] JP [31] 197010/2004

[86] 国际申请 PCT/JP2005/012706 2005.7.4

[87] 国际公布 WO2006/004207 日 2006.1.12

[85] 进入国家阶段日期 2007.3.2

[71] 申请人 株式会社洛科摩基因

地址 日本神奈川县

[72] 发明人 中岛利博 山崎聪士 张 蕾
天野彻也

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 郭文洁 刘 玥

权利要求书 2 页 说明书 26 页 序列表 8 页
附图 5 页

[54] 发明名称

抗滑膜素抗体

[57] 摘要

本发明涉及针对滑膜素的抗体或其片段，以提供识别滑膜素部分的单克隆抗体，该抗体能抑制滑膜素自身泛素化。

1. 一种针对滑膜素的抗体或其片段，它能抑制滑膜素的自身泛素化。

2. 权利要求 1 的抗体或其片段，其特征在于，它不影响滑膜素的底物蛋白质的泛素化。

3. 权利要求 1 或 2 的抗体或其片段，其抗体是单克隆抗体。

4. 权利要求 1-3 中任一项所述的能抑制滑膜素自身泛素化的抗体或其片段，是用包含序列号 3~5 所示的任一氨基酸序列的肽作抗原免疫动物，通过其抗体产生细胞与骨髓瘤细胞的细胞融合而获得的杂交瘤产生的，是针对滑膜素的单克隆抗体或其片段。

5. 一种杂交瘤，是包含序列号 3~5 所示任一氨基酸序列的肽作抗原免疫动物，将免疫动物的抗体产生细胞与骨髓瘤细胞融合而获得的，它产生能抑制滑膜素自身泛素化的单克隆抗体。

6. 一种方法，其是能抑制滑膜素自身泛素化的针对滑膜素的单克隆抗体的制备方法，用包含序列号 3~5 所示任一氨基酸序列的肽作抗原免疫动物，培养其抗体产生细胞与骨髓瘤细胞的融合细胞，从所得培养物中获取上述单克隆抗体。

7. 一种含有权利要求 1~4 任一项中抗体或其片段的药物组合物。

8. 权利要求 7 的医药组合物，它用于治疗或预防关节风湿病、癌症、纤维症、动脉硬化、Castleman 病、多发骨髓瘤、局限性回肠炎、全身性若年特发性关节炎、脑肿瘤、舌癌、咽喉癌、肺癌、乳腺癌、食道癌、胃癌、胰腺癌、胆道癌、胆囊癌、十二指肠癌、大肠癌、肝癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌、肾癌、膀胱癌、横纹肌肉瘤、纤维肉瘤、骨肉瘤、软骨肉瘤、皮肤癌、急性骨髓性白血病、急性淋巴性白血病、慢性淋巴细胞白血病、成人型 T 细胞白血病、恶性淋巴瘤。

9. 一种滑膜素自身泛素化的抑制剂，它含有权利要求 1~4 任一项中的抗体或其片段。

10. 一种滑膜素含有细胞的检测试剂，它含有权利要求 1~4 任一项中的抗体或其片段。

11. 一种因滑膜素引起的细胞增殖性疾病的检测用试剂，它含有权利要求 1~4 任一项中的抗体或其片段。

12. 权利要求 11 的试剂，其中细胞增殖性疾病至少选自关节风湿

病、癌症、纤维症、动脉硬化、Castleman病、多发骨髓瘤、局限性回肠炎、全身性若年特发性关节炎、脑肿瘤、舌癌、咽喉癌、肺癌、乳腺癌、食道癌、胃癌、胰腺癌、胆道癌、胆囊癌、十二指肠癌、大肠癌、肝癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌、肾癌、膀胱癌、横纹肌肉瘤、纤维肉瘤、骨肉瘤、软骨肉瘤、皮肤癌、急性骨髓性白血病、急性淋巴性白血病、慢性淋巴细胞白血病、成人型T细胞白血病、恶性淋巴瘤中的一种。

13. 权利要求 10~12 任一项中的试剂，其中细胞选自滑膜细胞、破骨细胞、角化上皮细胞、血液细胞、癌细胞、骨髓细胞、成纤维细胞、血管内皮细胞、真皮细胞、肌肉细胞、神经细胞、淋巴细胞、血管平滑肌细胞、肝细胞、色素细胞、脂肪细胞、子宫内皮细胞、肺泡上皮细胞、未分化间质系细胞、外胚层顶脊中的任一种。

14. 一种抑制滑膜素自身泛素化的方法，其特征在于，使权利要求 1~4 任一项中的抗体或其片段与滑膜素进行反应。

15. 一种滑膜素表达细胞的检测方法，其特征在于，使权利要求 1~4 任一项中的抗体或其片段与生物样品进行反应。

16. 一种因滑膜素引起的细胞增殖性疾病的检测方法，其特征在于，使权利要求 1~4 任一项中的抗体或其片段与从待检者采集的生物样品进行反应。

17. 权利要求 16 的方法，其中细胞增殖性疾病至少选自关节风湿病、癌症、纤维症、动脉硬化、Castleman病、多发骨髓瘤、局限性回肠炎、全身性若年特发性关节炎、脑肿瘤、舌癌、咽喉癌、肺癌、乳腺癌、食道癌、胃癌、胰腺癌、胆道癌、胆囊癌、十二指肠癌、大肠癌、肝癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌、肾癌、膀胱癌、横纹肌肉瘤、纤维肉瘤、骨肉瘤、软骨肉瘤、皮肤癌、急性骨髓性白血病、急性淋巴性白血病、慢性淋巴细胞白血病、成人型T细胞白血病、恶性淋巴瘤中的一种。

18. 权利要求 15~17 任一项中的方法，其中细胞选自滑膜细胞、破骨细胞、角化上皮细胞、血液细胞、癌细胞、骨髓细胞、成纤维细胞、血管内皮细胞、真皮细胞、肌肉细胞、神经细胞、淋巴细胞、血管平滑肌细胞、肝细胞、色素细胞、脂肪细胞、子宫内皮细胞、肺泡上皮细胞、未分化间质细胞、外胚层顶脊中的任一种。

抗滑膜素抗体

技术领域

本发明涉及抗滑膜素抗体。更详细地讲，本发明涉及能抑制滑膜素自身泛素化的抗体，含有该抗体的医药组合物，应用上述抗体检测表达滑膜素的细胞的方法。

技术背景

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种关节的滑膜组织异常增殖的全身性炎症性疾病。滑膜细胞(synovial cells)是一种成纤维细胞样细胞，在关节的滑膜内形成1~6层上皮样细胞层，提供滑液中的蛋白聚糖和透明质酸。可以观察到RA患者的关节内滑膜组织增殖，结果引起多层结构，滑膜细胞浸润到其它组织。此外，RA患者的血清中存在针对自身免疫球蛋白(IgG)Fc段的自身抗体。这种叫做RA因子的自身抗体很久以来已用作RA的特征性诊断指标。

但是作为自身免疫性疾病的RA的病因尚未明确。基于RA因子检测的RA诊断，并未阐明疾病特异性抗体的产生系统，因此，它与病因的关联还不明确。

RA的病态/病情经过从(a)生物体内的多种免疫反应，及(b)伴随骨破坏的关节滑膜增殖这2个方面考虑，与前者免疫反应相关的有许多研究，正在阐明其分子水平的本质。但是，与后者关节滑膜细胞相关的研究，不局限于RA本身，其细胞生物学特征尚未明确。

因此为了阐明RA的发病经过，本发明者们研究了慢性、难治性疾病的发病和进展背后的分子机制。首先，以RA患者的人滑膜培养细胞作为免疫原，获得抗人滑膜细胞抗体，与滑膜细胞的cDNA文库进行免疫筛选，寻找在RA患者的滑膜组织中表达的新基因。成功分离出该基因，鉴于表达其所编码的蛋白质的组织为滑膜细胞(synovial cell)，故将其命名为滑膜素(synoviolin)，阐明了其生理意义(WO02/052007号小册子)。发明者们发现的滑膜素，与作为RA疾病的主因的滑膜组织的异常增殖密切相关，期待在诊断中能提供重要信息。此外，通过蛋白质结构预测得知，滑膜素编码具有环指功能域(RING finger motif)

的 E3 泛素连接酶。该功能域对蛋白质的泛素化发挥重要作用。实际上，证明它具有自身泛素化的活性，所以推测其对蛋白质功能有调控作用。

本发明者们，在进行滑膜素与信号转导相关的研究时初次发现，滑膜素具有泛素化连接酶作用，能引起自身泛素化（self-ubiquitination）。

发明的公开

如上所述，期望开发出能抑制滑膜素自身泛素化反应的抗体、含有该抗体的医药组合物等。

为了解决上述课题，本发明者们进行了广泛研究，结果在滑膜素具有泛素化连接酶作用，能引起自身泛素化（self-ubiquitination）的基础上，发现了抑制滑膜素自身泛素化的抗体，从而完成了本发明。

也就是说，本发明如下：

（1）一种能抑制滑膜素自身泛素化的、针对滑膜素的抗体或其片段。该抗体或其片段可以不影响滑膜素的底物蛋白质的泛素化。此外，该抗体可以是单克隆抗体。

（2）上述能抑制滑膜素自身泛素化的抗体或其片段，是用包含序列号 3~5 任一项所示的氨基酸序列的多肽为抗原免疫动物，通过其抗体产生细胞与骨髓瘤细胞的细胞融合获得的杂交瘤产生的、针对滑膜素的单克隆抗体或其片段。

（3）一种杂交瘤，是包含序列号 3~5 所示任一氨基酸序列的多肽作抗原免疫动物，将免疫动物的抗体产生细胞与骨髓瘤细胞融合获得的，它产生能抑制滑膜素自身泛素化的单克隆抗体。

（4）一种能抑制滑膜素自身泛素化的、针对滑膜素的单克隆抗体的制备方法，其特征在于，用包含序列号 3~5 所示任一氨基酸序列的多肽作抗原免疫动物，培养其抗体产生细胞与骨髓瘤细胞的融合细胞，从所得培养物中获取上述单克隆抗体。

（5）一种含有（1）或（2）中抗体或其片段的医药组合物。该医药组合物可用于治疗或预防，例如细胞增殖性疾病：关节炎、癌症、纤维症、动脉硬化、Castleman 病、多发骨髓瘤、局限性回肠炎、全身性若年特发性关节炎、脑肿瘤、舌癌、咽喉癌、肺癌、乳腺癌、食道癌、胃癌、胰腺癌、胆道癌、胆囊癌、十二指肠癌、大肠癌、肝

癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌、肾癌、膀胱癌、横纹肌肉瘤、纤维肉瘤、骨肉瘤、软骨肉瘤、皮肤癌、急性骨髓性白血病、急性淋巴性白血病、慢性淋巴细胞白血病、成人型T细胞白血病、恶性淋巴瘤。

(6) 一种滑膜素自身泛素化的抑制剂，其含有(1)或(2)中的抗体或其片段。

(7) 一种含滑膜素的细胞的检测试剂，其含有(1)或(2)中的抗体或其片段。

(8) 一种因滑膜素引起的细胞增殖性疾病的检测用试剂，它含有(1)或(2)中的抗体或其片段。细胞增殖性疾病包括，例如关节炎、癌症、纤维症、动脉硬化、Castleman病、多发骨髓瘤、局限性回肠炎、全身性若年特发性关节炎、脑肿瘤、舌癌、咽喉癌、肺癌、乳腺癌、食道癌、胃癌、胰腺癌、胆道癌、胆囊癌、十二指肠癌、大肠癌、肝癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌、肾癌、膀胱癌、横纹肌肉瘤、纤维肉瘤、骨肉瘤、软骨肉瘤、皮肤癌、急性骨髓性白血病、急性淋巴性白血病、慢性淋巴细胞白血病、成人型T细胞白血病、恶性淋巴瘤等。另外，上述细胞选自滑膜细胞、破骨细胞、角化上皮细胞、血液细胞、癌细胞、骨髓细胞、成纤维细胞、血管内皮细胞、真皮细胞、肌肉细胞、神经细胞、淋巴细胞、血管平滑肌细胞、肝细胞、色素细胞、脂肪细胞、子宫内皮细胞、肺泡上皮细胞、未分化间质系细胞、外胚层顶脊。

(9) 一种抑制滑膜素自身泛素化的方法，其特征在於使(1)或(2)中的抗体或其片段与滑膜素进行反应。

(10) 一种滑膜素表达细胞的检测方法，其特征在於使(1)或(2)中的抗体或其片段与生物样品进行反应。

(11) 一种因滑膜素引起的细胞增殖性疾病的检测方法，其特征在於让(1)或(2)中的抗体或其片段与从待检者采集的生物样品进行反应。细胞增殖性疾病及细胞的种类与前面相同。另外，上述细胞选自滑膜细胞、破骨细胞、角化上皮细胞、血液细胞、癌细胞、骨髓细胞、成纤维细胞、血管内皮细胞、真皮细胞、肌肉细胞、神经细胞、淋巴细胞、血管平滑肌细胞、肝细胞、色素细胞、脂肪细胞、子宫内皮细胞、肺泡上皮细胞、未分化间质细胞、外胚层顶脊。

本说明书中所引用的所有技术文献均作为参考在此引用。

附图简述

图 1 是用 SL-1 抗体对关节炎患者 (RA: 2 样本) 及变形性关节炎患者 (OA: 2 样本) 来源的滑膜细胞进行 Western 印迹的结果照片图。

图 2 是用 SL-1 抗体对 RA 患者来源的滑膜细胞进行荧光免疫染色的结果照片图。

图 3 是用 SL-1 抗体对 RA 患者来源的滑膜组织的免疫染色结果及 HE 染色图像。

图 4 是通过 Western 印迹分析 SL-1 抗体抑制 MBP-dTM Syno-His 融合蛋白自身泛素化的照片。

图 5 是通过 Western 印迹分析 SL-1 抗体不影响因滑膜素引起的 GST-P4HA1 融合蛋白的泛素化的照片。

实施发明的最佳状态

以下对本发明进行详细说明。

1. 概要

本发明的抗体是针对滑膜素的抗体，能够抑制滑膜素的自身泛素化。是用滑膜素的 RING finger 区域的部分氨基酸序列构成的肽作抗原进行免疫而获得的。

泛素化是在泛素活化酶 (E1)、泛素偶联酶 (E2)、泛素连接酶 (E3) 等酶的共同作用下，使底物蛋白质顺次结合泛素的过程。泛素化的生理意义，传统的认识是作为标签修饰，将蛋白质输送到蛋白酶体系的蛋白质降解结构中。通过后来的研究，现在的观点是泛素化的意义在于，将其定位于调控蛋白质功能的可逆性蛋白质修饰系统。

本说明书中“自身泛素化(self-ubiquitination, autoubiquitination)”是指由于滑膜素具有泛素连接酶活性，滑膜素自身成为泛素化的底物蛋白，不需其它泛素连接酶自己就能结合泛素。滑膜素的自身泛素化是由本发明者们发现滑膜素具有连接酶活性而阐明的。也就是说，在小鼠中，通过过表达滑膜素可自然发生伴随滑膜细胞增殖的关节病 (WO02/052007) (Amano T, et al., Genes Dev. 17(19):2436-49, 2003)。另一方面，E3 泛素连接酶的 RING finger 结构域是酶的活性中心，即使该结构域中仅 1 个氨基酸发生了置换完全失去酶活性。实际上，表

达滑膜素的酶活性中心的1个氨基酸突变体(C307S)的小鼠中完全不出现关节炎(如上, Amano T,等)。这提示自身泛素化对滑膜素的功能表达很重要, 滑膜素的自身泛素化成为滑膜素的代表性功能。而且, 其自身泛素化不仅能观察到内源性的滑膜素的全长分子, 而且还可产生仅滑膜素的胞内部分与标签蛋白质融合的滑膜素。在以上发现的基础上, 本发明者们进行广泛研究, 完成了本发明的抗体。

本发明中的“抗体”是指所有能与抗原滑膜素或其部分片段结合的抗体分子(既可以是多克隆抗体也可是单克隆抗体), 此外还包括其片段, 即具有抗原抗体反应活性的活性片段, 具体而言, 包括 Fab、F(ab')₂、重组体 Fv、单链 Fv。

2. 滑膜素

(1) 滑膜素及其等价的蛋白质

为了获得滑膜素的抗体, 除滑膜素之外, 可应用与之同等或等价的蛋白质、它们的片段或部分肽等作为免疫原。它们中的任何一种均可成为抗滑膜素抗体的抗原。其理由是, 与其说, 通常抗体是通过识别抗原蛋白质结构整体而诱导产生, 倒不如说, 是通过识别作为表位部分的蛋白质表面的微小区域而被诱导的。这些表位部位是由多肽链的连续部分或不连续部分而形成的。因此, 对于滑膜素的一种类型的抗体, 作为表位发挥作用的部位对应滑膜素的固定的肽部位。

本发明中使用的滑膜素的种类, 可以是人、小鼠、大鼠等来源的滑膜素, 但并不限于此。作为滑膜素, 可使用例如包含序列号 2 中氨基酸序列多肽。

还可应用与滑膜素同等或等价的蛋白质作为抗原(如后述)。

(2) 从生物样品进行制备

可从 RA 患者的滑膜组织中获得滑膜素。由于滑膜细胞可以在体外培养, 所以可以从其培养物中回收滑膜素。具体而言, 以通过外科滑膜切除术(synovectomy)从 RA 患者切除的滑膜组织等为基础, 从该组织中分离出滑膜细胞。若培养分离的细胞, 可作为附着性细胞回收滑膜细胞。(Nakajima T et. al., J. Clin. Invest. 92:186-193, 1993)。可联合应用公知的蛋白质纯化技术从回收的细胞中提取、纯化滑膜素。所得滑膜素或其片段可作为获得抗体的免疫原。

(3) 通过基因工程技术进行制备

滑膜素不仅可以从生物样品获得，也可将表达滑膜素的基因重组到适当的表达体系中，作为基因重组体的表达产物而获得。

编码滑膜素的多聚核苷酸的来源不限。也就是说，除基因组 DNA、cDNA 之外，也可合成。此外，核酸既可以是 DNA，也可是 RNA。只要是编码滑膜素，包含基于遗传密码子简并的具有任意碱基序列的多聚核苷酸，或者含有修饰的核苷酸的序列。

分离编码滑膜素的多聚核苷酸，可以从上述 RA 患者的滑膜细胞提取出的 mRNA 为基础获得 cDNA 文库，进行克隆。也就是说，通过 PCR 等扩增 cDNA 文库，筛选杂交的克隆，获得预期的多聚核苷酸 (Short J.M, et. al., Nucleic Acid Res. 16:7583-7600, 1988)。编码序列号 2 中所示多肽的 DNA 的碱基序列示于序列号 1 中。作为将编码滑膜素的多聚核苷酸重组到适当的表达体系的合适的宿主/载体体系，具体实例有表达载体 pGEX 和大肠杆菌。

除此之外，利用细菌作宿主时，有商品化的利用 His tag、HA tag、FLAG tag 等的融合蛋白质的表达载体。作为宿主/载体体系，利用毕赤酵母 (Pichia) 属酵母的表达体系、或者以昆虫细胞作宿主的利用杆状病毒载体的表达体系，可有效表达有糖链修饰的蛋白质。再者，利用哺乳动物的细胞，可进行利用巨细胞病毒 (CMV) 启动子、Rous 肉瘤病毒 (RSV) 启动子、或者 SV40 等的启动子的载体进行转染。

另外，本发明中也可从上述滑膜素基因或上述载体收集滑膜素。也就是说，本发明中通过无活细胞的无细胞蛋白质合成体系，可生产滑膜素。

无细胞蛋白质合成体系是应用细胞提取液在试管等人工容器内合成蛋白质的体系。本发明中使用的无细胞蛋白质合成体系也包含以 DNA 为模板合成 RNA 的无细胞转录体系。

该情况下，与上述宿主对应的生物，相当于下面细胞提取液的来源生物。此时，上面的细胞提取液可使用真核细胞来源的或原核细胞来源的提取液，例如使用小麦胚芽、兔网织红细胞、小鼠 L-细胞、HeLa 细胞、CHO 细胞、芽殖酵母、大肠杆菌等的提取液。这些细胞提取液既可是浓缩的也可是未浓缩的。

细胞提取液可通过，例如超滤、透析、聚乙二醇(PEG)沉淀等获得。

此外，本发明中，也可应用商品化的试剂盒进行无细胞蛋白质合成。这样的试剂盒包括，例如 PROTEIOS™（東洋紡）、TNT™ System（Promega）、合成装置 PG-Mate™（東洋紡）、RTS（Roche diagnostics）等。

通过如上细胞蛋白质合成而获得的滑膜素，可适当选择前述的色谱进行纯化。

（4）滑膜素具有同等功能的蛋白质

能成为制备抗滑膜素单克隆抗体的抗原的蛋白质，不仅包含从滑膜细胞提取出的人滑膜素，还包含与滑膜素具有同等功能的各种蛋白质。这样的蛋白质可以是人工合成的也可是天然产生的。还包含人滑膜素的氨基酸序列中因1个或数个氨基酸发生置换、缺失、附加和/或插入等而发生突变的蛋白质，或者氨基酸侧链等发生修饰的修饰蛋白质、与其它蛋白质的融合蛋白质。

这些蛋白质中氨基酸的突变或修饰个数、或者突变或修饰部位无特殊限制，只要能保持滑膜素的功能即可。例如可使用序列号2中所示的氨基酸序列中因1个或几个（例如1个或数个）氨基酸发生置换、缺失、附加和/或插入等而突变的蛋白质，或者氨基酸侧链等发生修饰的修饰蛋白质。

具体的讲，可使用

(i) 序列号2中所示的氨基酸序列中1个或几个（例如1个或数个）（例如1~10个，优选1~5个）氨基酸缺失了的氨基酸序列；

(ii) 序列号2中所示的氨基酸序列中1个或几个（例如1个或数个）（例如1~10个，优选1~5个）氨基酸被其它的氨基酸置换了的氨基酸序列；

(iii) 序列号2中所示的氨基酸序列中附加了1个或几个（例如1个或数个）（例如1~10个，优选1~5个）其它氨基酸的氨基酸序列；

(iv) 包含组合了上述(i)~(iii)的氨基酸序列、且具有与上述滑膜素同样作用的突变型滑膜素多肽。

另外，本发明中使用的多肽，只要其具有与滑膜素同等的功能，也可是与上述滑膜素的氨基酸序列具有同源性的多肽。包括与上述滑膜素多肽的氨基酸序列具有约85%以上、优选约90%以上、更优选约

95%以上的同源性的氨基酸序列等。

编码上述序列号 2 中所示氨基酸序列中 1 个或多个氨基酸发生缺失、附加或插入的氨基酸序列的多聚核苷酸,可参照「Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed.」(Cold Spring Harbor Press 1989)、
「Current Protocols in Molecular Biology」(John Wiley & Sons 1987-1997)、Kunkel T.A, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488-92, 1985 等中描述的位点特异性突变诱导方法等方法进行制备。

另外,向多聚核苷酸中导入突变时可按照 Kunkel 法和 Gapped duplex 法等公知的技术方法,应用利用了位点特异性突变诱导方法的突变导入试剂盒进行,例如应用 QuikChangeTM Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene 公司)、GeneTailorTM Site-Directed Mutagenesis System (Invitrogen)、TaKaRa Site-Directed Mutagenesis System (Mutan-K、Mutan-Super Express Km 等: TaKaRa 公司)等。

上述“同等功能的蛋白质”是指,第 1,与滑膜素在免疫学上同等的蛋白质。也就是说,作为与滑膜素同等功能的蛋白质,包含滑膜素的功能域,只要其能与特异性识别滑膜素、存在于 RA 患者血清中的抗体进行反应即可。

第 2,与滑膜素同等功能的蛋白质是根据与滑膜素结合的配体蛋白质的结合特性而定义的。例如, HMG-CoA Reductase Degradation 3 (Hrd3)、原胶原-脯氨酸、2-酮戊二酸 4-过氧化物酶 (プロリン 4 ヒドラキシラーゼ (hydraxylase))、 α 多肽 I (P4HA1)、Homocysteine-inducible endoplasmic reticulum stress-inducible ubiquitin-like domain member 1 (Herp) 等 (专利 2003-295951、专利 2004-076931、专利 2003-350704)。

第 3,与人滑膜素同等功能的蛋白质包括具有促进滑膜增生活性的蛋白质。导入了人滑膜素基因的转基因小鼠中,可观察到显著频率的伴随关节炎的指肿胀,组织学上可确认这些指关节中出现伴随滑膜增生的骨破坏和异常的骨新生。

第 4,与人滑膜素同等功能的蛋白质包括具有参与正常骨形成或四肢发育活性的蛋白质。在发育过程中,滑膜素在头顶骨、四肢、耳等骨和软骨形成的部位强表达,在四肢形成期,可观察到在 Apical Ectodermal Ridge (AER; 外胚层顶脊) 及软骨、骨骺部位强表达。

第5, 本发明中与人滑膜素同等功能的蛋白质, 也可基于滑膜素具有的生物化学活性, 例如泛素连接酶活性进行定义。这些生物化学活性表现在滑膜素中发现的各种结构域、实验结果等中。

(5) 与滑膜素融合蛋白质或修饰蛋白质

与滑膜素同等功能的蛋白质中也包含氨基酸残基的修饰、保守的置换、缺失、附加或插入、糖链等生理的或人为的修饰、荧光和放射性物质的标记、或与其它蛋白质的融合等加入了各种修饰的蛋白质。例如, 在上述基因重组体中, 有可能因表达的宿主而产生糖链修饰的差异。但是, 即使其糖链修饰不同, 但只要其显示滑膜素同样的性状, 均作为滑膜素或其同等功能的蛋白质。

作为与其它蛋白质的融合蛋白质的例子有, 附加了 FLAG 标签、HA 标签、或 His 标签等附加氨基酸序列、至少维持作为上述与滑膜素同等功能的蛋白质的至少一种性状的蛋白质。或者还包括, 即使具有不同于滑膜素的活性, 但拥有滑膜素拥有的至少一种功能的融合蛋白质。

由于滑膜素即使是其胞内结构域也能使自身泛素化, 所以, 本发明中应用的滑膜素是除去了细胞膜贯穿部位的滑膜素 dTM。例如, 本发明中也可应用该 dTM 与上述标签蛋白质融合了的 MBP-滑膜素 dTM-His。

或者还包括, 即使具有不同于滑膜素的活性, 但拥有滑膜素拥有的至少一种功能的融合蛋白质。

3. 抗原的制备

可应用上述滑膜素或其同等蛋白质作为制备抗滑膜素抗体的抗原。但是抗体的检测中不仅可应用抗原分子本身(即滑膜素或其等价蛋白质), 还可采用应用其蛋白质片段、片段肽、包含化学合成的寡肽与适当载体的复合体作抗原的多种方法。其理由是, 特别优势的表位、或者在临床上较有些意义的表位特异的分析体系, 不易受到非特异性反应的影响。也就是说, 由此可有效实施后述杂交瘤的克隆化和克隆筛选, 且能获得抗体效价高的抗滑膜素单克隆抗体。与可识别作为表位部位的抗原蛋白质高级结构中的多数区域相比, 优选虽然特异性稍低但可识别少数特定结构低级结构中也能识别特定的少数特定结

构。

在获得针对滑膜素的特异性及亲和性高的单克隆抗体的过程中，下述的途径是有效的。具体而言，在后述获得免疫学活性的功能域肽的方法的基础上，能确定出作为表位的功能域。

已知表位至少由 3 个氨基酸残基构成。与其它蛋白质间的免疫学识别则至少有 8 个氨基酸残基才能实现。因此，选自滑膜素或其等价蛋白质的氨基酸序列，至少是连续的 8 个氨基酸残基、通常为 9 个氨基酸残基、优选 10 个氨基酸残基、更优选 11~15 个氨基酸残基、尤其是与患者血清中的抗体反应的片段，可作为本发明中抗体检测用抗原。

再者，针对构成表位的寡肽，通过加入各种修饰而提高其免疫学反应性的方法是业内人士公知的。例如，添加人血清白蛋白等无活性蛋白质、或者附加了无义氨基酸序列的修饰可提高其免疫学反应性。

滑膜素的片段，可通过使用胰蛋白酶、糜蛋白酶、胃蛋白酶等蛋白酶进行消化，或应用溴化氢（ブロモシアン）等进行化学切断，或联合应用二者进行。可利用色谱、电泳等公知的分离技术，将目的肽从生成的肽混合物中分离纯化出来。

其它的方法，随机切断编码滑膜素的 DNA，将之插入到噬菌体载体中，制备提呈功能域肽的噬菌体库，由此而获得。用识别滑膜素的抗体进行免疫筛选，可确定出这些文库中有免疫学活性的功能域。

从上述观点看，通过检索滑膜素的亲水性谱与其它抗原性指标的分析方法，可首先确定出推断氨基酸残基数 14 个以上的、较适宜的肽部分。作为候选免疫原的这些肽也可通过液相法或固相法等肽合成技术这些公知技术合成。以 Merrifield 法为代表的固相合成法简便可在短时间内进行。

作为 α -氨基保护基可应用标准的叔丁基氧羰基（Boc），也可应用 Sheppard 等开发的 9-芴甲氧羰基（Fmoc）基（Atherton, E & Sheppard, R.C, J.Chem. Soc. Chem. Comm.165, 1985）（参照泉屋信夫、他著「ペプチド合成の基礎と実験」194~233 页、丸善、1985 年）。

本发明中也可利用基于固相合成法的自动化肽合成仪。合成的肽，可在三氟醋酸等从存在下从树脂上分离下来，然后通过逆相高效色谱进行纯化。纯化的肽其纯度在 85% 以上。

上述候选肽中，通过从免疫动物采集的多克隆抗体与滑膜素进行反应，酶标记抗 IgG 抗体进行检测反应显示阳性的肽，可作为本发明的制备抗体用的免疫抗原。

作为免疫原，尤其是有用的滑膜素片段，至少包括一个包含以下氨基酸序列的肽。

Syno-P3 (SLALTGAVVAHAYYC / 序列号: 3)、

Syno-P2 (TCRMDVLRASLPAQS / 序列号: 4)、

Syno-P1 (GAATTTAAGTSATAC / 序列号: 5)

这些肽与载体蛋白质结合而制备成的免疫原可产生滑膜素特异的、且具有足够亲和性的抗体。作为免疫原有用的滑膜素的上述肽与匙孔血蓝蛋白 (KLH) 载体蛋白结合，致敏动物。

为了获得免疫原而使用的其它载体物质包括结核菌素纯化蛋白衍生物、破伤风变性毒素、霍乱毒素及其 B 亚基、白喉毒素、卵白蛋白、牛血清白蛋白、大豆胰蛋白酶抑制剂、胞壁酰二肽、褐色的脂蛋白等。肽与载体结合的反应、试剂等可参照公知的文献(例如,大海忍、他著 細胞工学別冊 実験プロトコールシリーズ 新版 抗ペプチド抗体実験プロトコール 「遺伝子産物の同定からタンパク質機能解析まで」 秀潤社 1994 年; Coligan J.E et al., CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Vol. 1, p.9.4.1-9.4.11, 1991)。

4. 免疫

(1) 滑膜素多克隆抗体的制备

将如上制备的抗原施用给哺乳动物。对哺乳动物无特定限制，例如大鼠、小鼠、兔等，优选兔。

每只动物抗原的施用量是，不应用佐剂时，兔 1~10 mg，应用佐剂时 0.1~1 mg。佐剂包括完全氟氏佐剂 (FCA)、不完全氟氏佐剂 (FIA)、氧化铝佐剂等。主要通过注入到静脉内、皮下、腹腔内等进行免疫。此外，对免疫的间隔无特殊限制，数日~数周间隔、优选 2~5 周间隔，免疫 1~10 次，优选 2~5 次。然后，在最终免疫日 6~60 天后，用酶免疫测定法 (ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 或 EIA (enzyme immunoassay))、放射性免疫测定法 (RIA; radioimmuno assay) 等测定抗体效价，在小时最大抗体效价的时候采血，获得抗血

清。

其后，用 ELISA 法等测定抗血清中多克隆抗体对这些蛋白质的反应性。

(1) 滑膜素单克隆抗体的制备

(i) 抗体产生细胞的采集

用能成为免疫抗原的滑膜素或免疫学上同等的蛋白质、或其片段或片段肽作免疫原，单独或与载体及稀释剂一起施用到哺乳动物可能产生抗体的部位，以制备单克隆抗体。此时，为了提高抗体产生能力，优选与佐剂等混和施用 (Adv. Tubercul. Res., 1:130-148, 1956)。佐剂包括 FCA、FIA、氧化铝佐剂等。

单克隆抗体的获得是：让免疫细胞（具体而言抗体产生细胞）与骨髓瘤细胞间形成融合细胞，使该细胞克隆化，筛选出产生滑膜素特异的抗体的克隆 (Kohler, G. & Milstein, C, Nature 256: 495-7, 1975)。

免疫时，用包含上述肽的复合体（或者滑膜素或其免疫学上同等的蛋白质、或其片段）作免疫原，每次，例如 20 μg ~ 1 mg，与适当的佐剂溶解或混和后，给动物进行免疫。

作为免疫动物应用的哺乳动物包括小鼠、豚鼠、兔、大鼠、绵羊、山羊、猴、狗等，通常从容易操作考虑，特别优选小鼠或兔。希望抗体产生细胞与骨髓瘤细胞来源于同种类型的动物。施用，通常 3~6 个月，每 2~6 周施用一次，施用 2~10 次。

抗体产生细胞的采集是：从抗原致敏的上述动物中选择抗体效价得到认可的个体，在最终免疫的 2~5 天后，采集脾脏细胞、淋巴结细胞或 B 淋巴细胞。让其中所含抗体产生细胞与具有自身增殖能力的骨髓瘤细胞融合。通过筛选能产生本发明的抗滑膜素单克隆抗体的克隆，从所生成的杂交瘤中制备出能产生单克隆抗体的杂交瘤。其程序基本上按照 Kohler 的方法 ("Immunological Method", Academic Press, New York, 391, 1979)。

(ii) 细胞融合

可使用公知的技术进行融合操作，例如上述 Kohler 和 Milstein 的方法。骨髓瘤细胞包括 P3U1、NS-1、SP2/0 等来源于小鼠骨髓瘤的细胞株或其突变株等，但特别优选 P3U1。作为融合剂包括聚乙二醇 (PEG)、仙台病毒等，优选应用 PEG。融合时，将骨髓瘤细胞悬浮

到不含血清的 RPMI1640 培养基等中，向该悬浮液中加入上面制备的包含脾细胞等抗体产生细胞的溶液，静置。回收离心分离的细胞，加入含 PEG 的 RPMI1640 培养基，37 °C 培养 2~4 分钟，完成细胞融合。

离心，回收杂交瘤，转移到 HAT（次黄嘌呤、氨基喋呤及胸腺嘧啶核苷）培养基中，分到 96 孔培养板中，培养规定的时间。培养，通常在 5 % CO₂、孵箱中、20~40 °C、优选 34~38 °C。通常在 1 周后观察到杂交瘤形成的集落。培养的时间通常是 5 日~3 周，优选 1~2 周。

(iii) 抗体筛选及克隆化

单克隆抗体的筛选通常可用添加了 HAT 的动物细胞培养基进行。对筛选及培养用的培养基无特殊限制，只要杂交瘤能在其中生长即可。例如可应用杂交瘤培养用无血清培养基、含胎牛血清（fetal calf serum; FCS）的 RPMI 培养基、GIT 培养基等。

用酶抗体法等测定观察到增殖的孔的培养上清中针对肽的抗体效价，例如通过有限稀释法进行杂交瘤的克隆化，可获得本发明的杂交瘤的克隆。

对所形成的本发明的杂交瘤的筛选操作一般如下。向直接或与载体一起吸附了作为免疫原应用的肽的微孔等固相中，添加杂交瘤培养上清，接下来添加放射性物质、用酶等标记的抗免疫球蛋白抗体或 Protein A，检测结合到固相上的单克隆抗体，这样的方法很便利。或者向吸附了抗免疫球蛋白抗体或 Protein A 的固相中添加杂交瘤培养上清，接下来添加标记抗原，检测结合到固相上的单克隆抗体。

通过上述操作筛选出阳性孔，数日后，将一阳性株接种到一 96 孔培养板中，100 细胞/培养板，培养 10~14 天。确定集落，培养上清同样适用于上面筛选用的抗原固相化培养板，可同样进行检测。筛选的集落，在培养后进行再克隆化，培养 10~14 天，实施与上面同样的集落确定和培养上清的鉴定。筛选出亲株不同的孔，在 24 孔培养板中进行培养，回收上清，进行克隆的检测，鉴定抗体的亚型及抗体产生。

(iv) 单克隆抗体的产生及其分离

体外培养如上筛选出的克隆 SL-1，能产生本发明的单克隆抗体 SL-1 抗体。其培养，可使用该技术领域惯用的方法。

用体外培养的培养基培养杂交瘤 SL-1 时，可很容易的从其培养物

中分离出 SL-1 抗体。为了提高增殖速度、抗体产生率，可对培养基种类的选择与维持、培养条件的管理（例如培养基内氧浓度、搅拌速度、污染）进行探求。

利用除人之外的温血动物克隆培养时，可从其腹水和/或血液中收集单克隆抗体。例如，将克隆接种到补足了胎牛血清的 RPMI1640 培养基等中，使之达到规定的细胞密度，培养箱中，5 % CO₂ 存在下、37 °C 培养。接下来，将其培养物接种到预先施用了降植烷的小鼠腹腔内，在预定的时间内，按常规方法饲养。通常 1~2 周后，收集腹水，向其中添加硫酸铵，进行盐析沉淀。利用色谱等从其级分中分离、纯化单克隆抗体。

从培养物或腹水和/或血液分离单克隆抗体的方法，与常规的多克隆抗体的纯化方法相同，就是免疫球蛋白的分离纯化法。也就是说，可以适当的组合应用盐析法、透析法、过滤法、浓缩、乙醇沉淀法，等电点沉淀法、各种电泳法、离子交换（DEAE 树脂等）吸脱着法、超离心法、凝胶过滤法、特异的亲和纯化法等。随后对生成的单克隆抗体进行浓缩、干燥，按用途制备成液状或固体状。

(iv) 人源化或人型化抗体

本发明中抗体包括人型化或人源化抗体。

人抗体可与常规的单克隆抗体同样制备，只是把免疫体系换成成人，免疫哺乳动物即可。

人型化抗体是恒定区域和可变区域的一部分为人型的抗体，它是一种重组抗体，可变区域中框架区域（FR）来源于人，称为 CDR 的互补性决定区域（complementarity determining region）来源于小鼠。制备人型化抗体时，CDR 从小鼠抗体的可变区域移到人可变区域，然后将这些人型化的重构人可变区域连接到人恒定区域。人型化抗体的制备方法，可按照基因工程学方法获得，在该技术领域已经确立（杉村和久「本格化する抗体医療！抗体エンジニアリングと抗体医薬のすべて」Bio ベンチャー Vol.2 No.4 羊土社 2002 年）。

(3) 本发明的抗体的特征

(i) 能抑制滑膜素的自身泛素化

也就是说，可用于因滑膜素自身泛素化所导致的疾病的治疗。

(ii) 不影响滑膜素的底物蛋白 P4HA1 的泛素化

也就是说，对与 P4HA1 的泛素化相关的生理功能没有影响。

(iii) 本发明抗体的亚类是 IgG1。

5. 本发明单克隆抗体的用途

由于本发明的抗体（例如 SL-1 抗体）能特异性识别滑膜素或其部分肽，所以我们认为它有多种多样的利用形式。以下，以 SL-1 抗体为例说明其几个典型的利用方式。

(1) 抑制滑膜素自身泛素化反应

泛素化是在泛素活化酶（E1）、泛素偶联酶（E2）、泛素连接酶（E3）等酶的共同作用下，使底物蛋白质顺次结合泛素的过程。如上所述，滑膜素的自身泛素化是指，由于滑膜素具有泛素连接酶的活性，滑膜素自身可成为泛素化的底物蛋白质，不需其它泛素连接酶就能自己结合泛素。

上述泛素活化酶（E1）、泛素偶联酶（E2）等酶类有商品化的，可适当应用。其应用范围是，96 孔微孔培养板的每孔中，E1 10 ~ 50 ng，优选 20 ~ 40 ng，E2 0.1 ~ 0.5 μg ，优选 0.2 ~ 0.3 μg 。

作为对泛素化必要的低分子反应因子，可适当选择 MgCl_2 、 MgSO_4 等 Mg 盐、ATP、EDTA、NAF、DTT（二硫苏糖醇）、岗田酸（okadaic acid）等。这些化合物均有商品化的产品，很容易获得。

再者，溶解酶类或试剂的缓冲液、洗涤用缓冲液、测定用缓冲液、反应终止缓冲液等，可使用任意的公知的缓冲液（例如、Tris-HCl），只要其不使酶失活、或者抑制反应即可。

应用 His 标签融合蛋白质 MBP-dTM Syno-His，与如上制备的单克隆抗体、抗 FLAG 抗体或小鼠 IgG 混和，4 $^{\circ}\text{C}$ 1.5 小时，进行抗原抗体反应。

其后，进行自身泛素化反应。通常滑膜素的自身泛素化反应按以下条件进行。向一定量的成为反应溶剂的缓冲液（pH 6 ~ 8）中分别添加上述量的对滑膜素的自身泛素化必要的反应物质（滑膜素或其活性衍生物除外），室温孵育 5 ~ 30 分钟。然后添加滑膜素或其活性衍生物，或固化的滑膜素的活性衍生物，开始滑膜素的自身泛素化反应。室温 ~ 37 $^{\circ}\text{C}$ 的温度下，孵育 20 ~ 120 分钟，加入一定量的终止缓冲液（含有 0.2 M 硼酸缓冲液、TritonX-100 及 EDTA）终止反应。然后，

测定与滑膜素结合的泛素或未结合的泛素的含量，求出自身泛素化的程度。

(2) 检查、诊断、治疗效果或药效判定方面的利用

滑膜素在 RA 患者的滑膜组织中强表达。此外，在 RA 患者的血中可高频度地检测出识别滑膜素的抗体（自身抗体）。另一方面，在健康者的血中，基本上检测不出滑膜素的抗体。滑膜素抑制体外培养的滑膜细胞的增殖。对于促进滑膜细胞增殖的配体，认为其是与滑膜素相竞争的。基于这些信息，推定如下分子机制。即，滑膜素在滑膜细胞的强表达，促进与对滑膜细胞具有增殖促作用的滑膜素的配体的结合，结果促进滑膜细胞的增殖。因此，滑膜细胞的异常增殖即导致 RA 的病症。

基于这样的发现，利用 SL-1 抗体的免疫学特性可提供细胞增殖性疾病的检测方法或诊断方法。细胞增殖性疾病包括，例如关节炎、癌症、纤维症、动脉硬化、Castleman 病、多发骨髓瘤、局限性回肠炎、全身性若年特发性关节炎、脑肿瘤、舌癌、咽喉癌、肺癌、乳腺癌、食道癌、胃癌、胰腺癌、胆道癌、胆囊癌、十二指肠癌、大肠癌、肝癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌、肾癌、膀胱癌、横纹肌肉瘤、纤维肉瘤、骨肉瘤、软骨肉瘤、皮肤癌、急性髓性白血病、急性淋巴性白血病、慢性淋巴细胞白血病、成人型 T 细胞白血病、恶性淋巴瘤等，但并不限于于此。此外，与癌相关的不管是原发性还是转移性。另外，细胞包括滑膜细胞、破骨细胞、角化上皮细胞、血液细胞、癌细胞、骨髓细胞、成纤维细胞、血管内皮细胞、真皮细胞、肌肉细胞、神经细胞、淋巴细胞、血管平滑肌细胞、肝细胞、色素细胞、脂肪细胞、子宫内皮细胞、肺胞上皮细胞、未分化间质系细胞、外胚层顶脊等，但并不限于于此。

这些方法包括：

(i) 待检者的生物样品与本发明的抗体反应，检测样品中存在的疾病标记物的步骤，及

(ii) 将步骤(i)中的检测结果与疾病关联的步骤。

上面的标记物可应用以下(a)~(d)中所示的任一种标记物。这些标记物的测定方法后面讲述。

- (a) 滑膜素或与滑膜素同等功能的蛋白质;
- (b) 滑膜素或与滑膜素同等功能的肽
- (c) 与滑膜素或与滑膜素同等功能的蛋白质结合的抗体, 及
- (d) 与滑膜素或与滑膜素同等功能的肽结合的抗体。

例如, 若在从待检者获得的血液样品中能检测到与滑膜素或与滑膜素同等功能的蛋白质或肽反应的抗体, 则该待检者为 RA 的可能性高。

或者, 在从患者采集的滑膜组织中发现滑膜素或与滑膜素同等功能的蛋白质的表达, 则提示因 RA 造成的滑膜组织的增生。蛋白质的表达通常以蛋白质自身或携带其信息的 mRNA 的存在为指标进行检测。滑膜素的检测优选应用本发明的 SL-1 抗体进行滑膜素的检测。滑膜细胞、滑膜组织等、或体液中检测到滑膜素时, 认为 RA 为进行性。

除 RA 的诊断之外, 包含本发明抗体的免疫学分析用试剂对治疗效果或药效的判定有用。用基本上与 RA 的诊断同样的方法进行 RA 的治疗效果或药效的判定。滑膜组织和血液中滑膜素或其抗体的水平, 与编码这些蛋白质的基因的表达增减相关, 它们的检测具有可作为指示症状推移、疾病缓解的指标的意义。

本发明的 SL-1 抗体还可用于表达滑膜素的细胞的分离或检测。包括滑膜细胞、破骨细胞、角化上皮细胞、血液细胞、癌细胞、骨髓细胞、成纤维细胞、血管内皮细胞、真皮细胞、肌肉细胞、神经细胞、淋巴细胞、血管平滑肌细胞、肝细胞、色素细胞、脂肪细胞、子宫内皮细胞、肺胞上皮细胞、未分化间质系细胞、外胚层顶脊等, 但并不限于此。除在发生过程中的外胚层顶脊表达外, 滑膜素在风湿病滑膜细胞、滑膜、骨·软骨及成为肢体原基的未分化间质细胞中强表达。因此, 滑膜素可作为, 特别优选作为外胚层顶脊、风湿病滑膜细胞及未分化间质细胞的标记物使用。

也就是说, 以滑膜素的表达为指标, 可检测或分离滑膜细胞、破骨细胞、角化上皮细胞、血液细胞、癌细胞、骨髓细胞、成纤维细胞、血管内皮细胞、真皮细胞、肌肉细胞、神经细胞、淋巴细胞、血管平滑肌细胞、肝细胞、色素细胞、脂肪细胞、子宫内皮细胞、肺胞上皮细胞、未分化间质系细胞、外胚层顶脊, 特别是外胚层顶脊、风湿病滑膜细胞及未分化间质细胞。例如, 将针对滑膜素的抗滑膜素单克隆

抗体与用适当的荧光等标记的细胞进行反应，通过细胞分选等分离出表达滑膜素的细胞。分离出的未分化间质细胞在体外或体内对组织、例如、肌肉、肌腱、脂肪、及骨髓等的基质（stroma）、骨·软骨的形成、或关节的再建有用。再建的组织和器官不仅可在基础研究利用，还可有再生医学的应用。

本发明的抗体也可用于纯化滑膜素抗体柱的制备、纯化时各级分中存在的该蛋白质的检测。但与本发明相关的特异性抗滑膜素单克隆抗体的利用并不仅限于这些用途。

（3）应用免疫学分析用试剂的分析

下面，对包含 SL-1 抗体的免疫学分析用试剂如何在上述用途中使用进行具体讲述。

针对样品中的抗原或抗体的免疫学分析方法有很多，一般已经普及。应用针对滑膜素或其片段等的单克隆抗体的测定法无特殊限定。样本中的抗原量，既可通过化学的或物理的手段检测与滑膜素的量相对应的抗体或抗原-抗体复合体的量测定，也可从应用含已知量的抗原的标准溶液制备的标准曲线计算出其含量的测定方法。作为抗原-抗体复合体量的检测方法，具体而言，适于应用竞争法、免疫测定法、用悬液计测量悬液（nephelometry）、三明治法等。从灵敏度和特异性考虑，特别优选以下的三明治夹心法。

三明治法（例如 ELISA 法）是，将待检样本（含有定量对象滑膜素）与固相化的本发明的 SL-1 抗体进行反应（1 次反应），再与标记了的抗滑膜素抗体进行反应（2 次反应），通过测定固相化载体上标识剂的活性，可对待检样本中滑膜素的量进行定量。该情况下，1 次反应与 2 次反应可逆顺序进行，也可同时进行，也可错开时间进行。2 次反应中应用的抗体，优选应用其滑膜素结合部位与本发明的 SL-1 抗体不同的抗体。

使用本发明的单克隆抗体的免疫测定法是，将待检样本中的抗原与固相化抗原对一定量的标记化单克隆抗体进行竞争性反应后，分离固相与液相。或者，将待检样本中的抗原与过量的标记化单克隆抗体进行反应，接着加入固相化抗原，使未反应的标记化抗体结合到固相上后，分离固相与液相。接下来测定任一相中的标记量，对待检样本中的抗原量进行定量。

竞争法是，将待检样本中的抗原与标记抗原对抗体进行竞争性反应，然后分离（B/F 分离）未反应的标记抗原（F）、与抗体结合的标记抗原（B），测定 B、F 中的标记量，对待检样本中的抗原量进行定量。作为其它的方法，有应用可溶性抗体，使用聚乙二醇进行 B/F 分离、使用针对上述抗体的第 2 抗体等的液相法；应用固相化抗体作第 1 抗体，或者第 1 抗体用可溶性的，用固相化抗体作第 2 抗体。例如，将固化到载体上的本发明的抗滑膜素单克隆抗体及标记化的抗体与待检样本同时或连续进行竞争性结合反应，然后测定固相化载体上的标记剂的活性。

Nephelometry 法是测定凝胶内或溶液中抗原抗体反应结果产生的不溶性沉淀物含量。因待检样本中抗原量少而仅得到微量的沉降物时，优选应用利用激光散射的 laser Nephelometry。

为了检测分析样品中的抗体，将抗原敏化的板与样品中的抗体进行反应，用特异的抗原标记抗体检测被捕捉到板表面的成为检测对象的抗体的方法是常用的抗体的免疫学分析方法（Immunochemistry, 8:871-879, 1971）。或者，可使用本发明的 SL-1 抗体作为标记抗体检测板上的未结合抗原。此外，将吸附了抗原的乳胶颗粒与样品混和，作为免疫学的凝集反应检测抗体的方法也是公知的（Plotz C.M & Singer J.M, Am. J. Med., 21:888-892, 1956）。免疫学的粒子凝集反应是一种能对 1 种试剂进行迅速分析的方法，是一种适于大规模筛选的方法。

本发明的 SL-1 抗体作为细胞分离或检测用试剂应用时，抗滑膜素单克隆抗体可与其它溶媒和溶质联合应用形成组合物。例如可与蒸馏水、pH 缓冲溶液、盐、蛋白质、表面活性剂等联合应用。

反应试剂有可通过适当的化学或物理的检测手段进行检测的标记。应用这样的标记物的测定方法中所使用的标记剂有，例如荧光物质、酶、放射性同位素、发光物质等。用酶进行标记时，叫做 ELISA 法，被广泛应用。

作为荧光物质，示例有荧光胺、荧光异硫氰酸盐等，作为酶有过氧化物酶、碱性磷酸酶、苹果酸脱氢酶、 α -糖苷酶、 α -半乳糖苷酶等，作为放射性同位素有 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^3H 、 ^{14}C 等，作为发光物质有虫荧光素、ルシゲニン、鲁米诺、鲁米诺衍生物等。

本发明的 SL-1 抗体或抗原与标记剂的结合也可应用生物素 - 亲和素体系。抗原或单克隆抗体的固相化中, 可应用物理吸附, 或者应用常规的蛋白质或酶等固相化, 固化中应用的活性结合的方法。作为载体可应用聚苯乙烯、聚丙烯酰胺、硅胶等合成树脂、琼脂糖、葡聚糖、纤维素等不溶性多糖类、或玻璃等。

作为反应溶媒, 给予最适的反应条件, 包含对反应生成物的稳定有用的缓冲液、反应物的稳定剂等。

作为检测手段, 包含分光器、放射线检测器、光发射检测器等能检测上述标记的仪器。

(4) 检查诊断用的试剂盒

本发明的 SL-1 抗体用于免疫学测定方法时, 没有特别的条件、操作等的限制。在各种方法中按常规条件操作进行。必要时可构建添加若干修饰的适当的测定体系。

为了能更简便、有效的进行测定, 将上述试剂试剂盒化。通过试剂盒化, 在普通的检查室或实验室, 无需特殊的分析仪器、熟练的操作、高难的知识, 即可高效地进行定量。对用于实施上述各种诊断方法或治疗判定方法的检测试剂盒的构成及形式无特殊限定, 对其内容没有限定, 只要其能达成预期的目的即可。通常由解释实行检测方法所得结果的使用说明书、反应试剂、进行反应时的反应介质、提供检验场所的基材等构成。此外, 期望还包含作为比较基准的或制备标准曲线的对照样品、检测器等。

(5) 医药组合物

本发明的抗体作为细胞增殖性疾病的治疗或预防用医药组合物应用。细胞增殖性疾病包括, 例如关节炎、癌症、纤维症、动脉硬化、Castleman 病、多发骨髓瘤、局限性回肠炎、全身性若年特发性关节炎、脑肿瘤、舌癌、咽喉癌、肺癌、乳腺癌、食道癌、胃癌、胰腺癌、胆道癌、胆囊癌、十二指肠癌、大肠癌、肝癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌、肾癌、膀胱癌、横纹肌肉瘤、纤维肉瘤、骨肉瘤、软骨肉瘤、皮肤癌、急性骨髓性白血病、急性淋巴性白血病、慢性淋巴细胞白血病、成人型 T 细胞白血病、恶性淋巴瘤等, 但并不限于此。此外, 与癌相关的不管是原发性还是转移性。

本发明的医药组合物, 包含以本发明的抗体或其片段作为有效成

分。此外优选以包含药学上允许的载体的医药组合物形式提供。

这里所讲“药学上许可的载体”包括赋形剂、稀释剂、增量剂、崩 剂、安定剂、保存剂、缓冲剂、乳化剂、芳香剂、着色剂、甘味剂、粘稠剂、矫味剂、溶解辅助剂或其它的添加剂等。通过使用一个以上的载体，可制备成注射剂、液剂、胶囊剂、悬浊剂、乳剂或糖浆等剂型的医药组合物。这些医药组合物可以经口施用也可非经口施用。作为非经口施用的其它形式，包含一个或一个以上的活性物质，包含按常规方法处方的注射剂等。

本发明的药剂的施用量根据患者的年龄、性别、体重及症状、治疗效果、施用方法、处理时间、或该药剂中所含活性成分 - 高亲和性抗体的种类而不同，通常每个成人，一次 $600\ \mu\text{g} \sim 6000\ \text{mg}$ ，优选 $6 \sim 600\ \text{mg}$ ，但并不限于该范围。

例如，注射剂时，可通过将其溶解或悬浮到，例如生理盐水或商品化的注射用蒸馏水等药学上许可的载体中，使其浓度达到 $1\ \text{mg}$ 抗体/ ml 载体 $\sim 100\ \text{mg}$ 抗体/ ml 载体，进行制备。这样制备的注射剂，对有必要进行处置的人患者，一次 $1\ \text{kg}$ 体重 $10\ \mu\text{g} \sim 100\ \text{mg}$ ，优选 $100\ \mu\text{g} \sim 10\ \text{mg}$ ，1 日施用 1 ~ 数次。施用方式包括静脉内注射、皮下注射、皮内注射、肌肉内注射或腹腔内注射等，但优选静脉内注射。此外，可根据情况，将注射剂制备成非水性稀释剂（例如，丙二醇、聚乙二醇、橄榄油等植物油、甲醇等醇类等）、悬浮剂或乳浊剂。这些注射剂的无菌化可通过用滤器过滤除菌、配合灭菌剂等进行。可将注射剂制备成用时制备的形式。也就是说，通过冷冻干燥等制成无菌的固体组合物，使用前溶解到无菌的注射用蒸馏水或其它溶剂中使用。

以下通过实施例对本发明再进行具体说明。这些实施例，业内人士可进行多种多样的改变。本发明不限于这些实施例。如果没有特殊说明，%表示重量%。

〔实施例1〕

本实施例，其目的是制备抗滑膜素单克隆抗体。

合成以下所示含人滑膜素的部分氨基酸序列的 3 种肽作为免疫用的肽，用于制备抗滑膜素单克隆抗体。这些氨基酸序列选自推测其有抗原性的区域。

Syno-P3 (SLALTGAVVAHAYYC) (序列号 3)、

**Syno-P2 (TCRMDVLRASLPAQS) (序列号 4)、及
Syno-P1 (GAATTTAGTSATAC) (序列号 5)**

各合成的肽中，借助氨基酸序列中的 Cys，可与匙孔藤血蓝蛋白 (KLH) 结合。将结合了 KLH 的各合成肽 50 μ g 溶解到 0.1 ml 生理盐水中，添加 0.1 ml 的氟氏完全佐剂 (FCA) 作为免疫原。将各免疫原分别注射 0.2ml 到 8 只小鼠 (BALB/c 雌性、5 周龄) 背部皮下，进行免疫。每 2 周免疫 1 次，共免疫 4 次，1 周后再免疫 1 次。最终免疫 8 日后，从心脏取血，获得血清 200 μ l 以上。从通过 ELISA 验证抗体效价升高的个体中取出脾细胞，进行细胞融合。

对于各免疫原，通过 ELISA 测定 3 只小鼠血清中的抗体效价。无论应用哪种免疫原，均可观察到其抗体效价上升的个体。可以确认这些免疫原均可作为滑膜素的免疫原应用。

将骨髓瘤细胞株(P3U1)与小鼠脾细胞以 1:10 混和，在 50 % PEG (和光纯药社 PEG1540) 存在下进行细胞融合。融合后，将脾细胞 5×10^5 个/ml 接种到 96 孔培养板中。在 HAT 培养基中培养 10~14 天后，确认细胞的增殖，进行培养上清的鉴定。

应用固化了各合成肽的 ELISA 板进行培养上清的鉴定。鉴定操作如下进行。将培养上清与 ELISA 板进行反应后，应用抗小鼠 IgG 山羊过氧化物酶 (POX) 进行阳性孔的筛选。筛选出供于克隆化的孔，其它阳性孔的细胞冷冻保存。

数日后，将一株细胞接种到一 96 孔培养板中，100 个细胞/培养板 (20 细胞/ml)，培养 10~14 天。判定集落，进行培养上清的鉴定。培养上清的鉴定是，将上清 50 μ l 加到上述筛选用抗原固相化的 ELISA 培养板中。使用抗小鼠 IgG 山羊-POX 作为第 2 抗体。筛选的集落，培养后进行亚克隆，培养 10~14 天，与上面同样进行集落判定和培养上清的鉴定。选择亲株不同孔，在 24 孔培养板中进行培养，回收上清，进行克隆的验证，鉴定抗体的亚类及抗体产生。克隆化的结果，作为能高效产生针对滑膜素的、具有极高亲和性的单克隆抗体的杂交瘤，筛选出以 Syno-P2 作免疫原而获得的克隆 SL-1。

[实施例 2]

本实施例，其目的是应用抗滑膜素单克隆抗体进行患者样品中滑膜素的检测。

(1) 用抗滑膜素单克隆抗体对患者来源的滑膜细胞进行 Western 印迹

应用实施例 1 中获得的识别 Syno-P2 的 SL-1 抗体, 用 SDS-PAGE 分离慢性关节风湿病患者 (RA) 来源的滑膜细胞的蛋白质, 进行 Western 印迹。Western 印迹的操作是, 应用实施例 1 的 SL-1 抗体作一抗, 应用抗小鼠 IgG 绵羊-HRP 作为标记抗体。

用变形性关节炎患者 (OA) 来源的滑膜细胞作对照进行分析。结果, RA 患者来源的滑膜细胞中可检测出特异的信号 (图 1「RA」泳道 1、2 的 85 kDa 附近的条带)。可以确认实施例 1 中所得 SL-1 抗体特异性识别滑膜素。

(2) 用抗滑膜素单克隆抗体对 RA 患者来源的滑膜细胞进行免疫荧光染色

应用 SL-1 抗体对 RA 患者来源的滑膜细胞进行免疫荧光细胞化学分析。免疫染色的操作是, 除应用实施例 1 的 SL-1 抗体作一抗, 应用抗小鼠 IgG 绵羊-FITC 作为标记抗体之外, 按照 WO02/052007 号的实施例 9 中描述的进行。可以检测到滑膜素的信号在 RA 患者来源的滑膜细胞中很强 (图 2 上), 但仅用二抗进行反应作为对照, 未检测出信号 (图 2 下)。

(3) 用抗滑膜素单克隆抗体对 RA 患者来源的滑膜组织进行免疫染色

应用 SL-1 抗体对 RA 患者来源的滑膜组织切片进行免疫染色。免疫染色的操作是, 除应用实施例 1 的 SL-1 抗体作一抗, 应用抗小鼠 IgG 绵羊-HRP 作为标记抗体之外, 按照 WO02/052007 号的实施例 9 中描述的进行。滑膜素在 RA 患者来源的滑膜组织中强表达 (图 3SL-1 抗体部分)。通过同时进行的 HE 染色观察到滑膜细胞的增殖层, 该部分即是单克隆抗体染色的部位。根据这些结果可以确认本发明的 SL-1 抗体特异性识别 RA 患者滑膜组织中的滑膜素 (图 3HE 染色部分)。

如上, 通过应用抗滑膜素抗体检测患者样品中的滑膜素, 可实施 RA 的检查和诊断。

[实施例 3]

本实施例的目的是开发滑膜素检测用 ELISA 法检测试剂。

将适量按实施例 1 的方法获得的 SL-1 抗体溶解到 PBS 中, 使其浓

度为 $20 \mu\text{g/ml}$ 。将溶液加到酶免疫测定 (EIA) 用 96 平底微孔板中, $100 \mu\text{l}$ / 孔, 室温下静置数小时。除去孔中的溶液, 用含 0.05 (V/V)% Tween20 的 PBS 洗涤, 加入含 1 (V/V)% - 胎牛白蛋白 (BFA) 的 PBS, $100 \mu\text{l}$ / 孔, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 静置一晚, 封闭单克隆抗体后, 除去 PBS, 获得抗体板。

与此不同的是, 按照常规方法用滑膜素免疫致敏兔, 制备多克隆抗体。按过碘酸氧化法用辣根过氧化物酶 (HRP) 标记多克隆抗体。应用 PBS 预平衡过的 Sephacryl S-300HR (Pharmacia 社), 通过凝胶过滤色谱, 获得纯化的标记抗体。该二次标记抗体作为包含盐、稳定剂、防腐剂等缓冲试剂的组合物。

按照常规的 EIA, 将适当稀释的患者的血液、尿等体液或组织等加到上面所得具有固相 SL-1 抗体的上述 96 孔微孔板中, 室温作用 1 小时。此时, 以只加稀释液的孔作对照。用含 0.05 % Tween20 的磷酸缓冲液洗涤后, 加入 HRP 标记的抗小鼠 IgG 兔抗体, 室温反应 30 分钟。用含 0.05 % Tween20 的磷酸缓冲液洗涤未反应的二抗后, 向各孔中加入底物缓冲液 - 含 0.015 % 过氧化氢的 0.1 M 柠檬酸缓冲液, 以及染色剂 O - 苯二胺柠檬酸缓冲液 (10 mg/ml), 室温反应 30 分钟后, 添加 2 M 硫酸终止显色反应。接着用酶标仪测定 492 nm 的吸光度, 由此求出待检样本中滑膜素的含量。

[实施例 4]

本实施例的目的是探讨滑膜素的自身泛素化。

滑膜素是具有 RING finger 功能域的 E3 泛素-蛋白质连接酶, RING finger 功能域是 E2 泛素结合酶的结合部位。此外, 已知 E3 泛素-蛋白质连接酶能使自身泛素化, 因此实验验证是否与滑膜素的自身泛素化相关。

用与滑膜素蛋白质的 RING finger 区域的 328 ~ 342 位氨基酸对应的肽作抗原, 制备小鼠单克隆抗体 SL-1 (实施例 1)。应用 His 标签融合蛋白质 MBP-dTM Syno-His、与一定浓度的 SL-1 抗体、抗 FLAG 抗体或小鼠 IgG 混合, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 1.5 小时, 进行抗原抗体反应。

其后, 应用体外泛素化反应体系检测滑膜素的自身泛素化。混和 E1 (酵母来源)、E2 (UbcH5c)、ATP、GST-HA-泛素、预先与抗体反应的各 MBP-dTM Syno-His, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、反应 120 分钟。反应后, 各

样品中加入 4 x SDS-PAGE 缓冲液, 5 分钟沸腾后, 在 10 % SDS-PAGE 上展开。用 Western 印迹分析法, 用 SL-1 抗体检测滑膜素泛素化的条带。

结果, 可以观察到 250 kDa 的条带以 SL-1 抗体量依赖性的方式受到抑制, 2 μ g 的 SL-1 抗体可抑制 MBP-dTM Syno-His 的自身泛素化。但是, 未见到等量的抗 FLAG 抗体和小鼠 IgG 对 250 kDa 条带的抑制作用(图 4 上)。此外, 同样的实验中, SL-1 抗体量到达 8 ~ 44 μ g/L 时也能抑制 250 kDa 附近的条带, 这提示 SL-1 抗体可抑制 MBP-dTM Syno-His 的自身泛素化(图 4 下)。由此表明, SL-1 抗体特异性抑制 MBP-dTM Syno-His 的自身泛素化。

[实施例 5]

本实施例的目的是探讨 SL-1 抗体是否对因滑膜素引起的泛素化产生影响。

泛素通过由活化酶 (E1)、结合酶 (E2)、连接酶 (E3) 构成的泛素体系与靶蛋白共价结合, 该反应反复进行形成多聚泛素链, 成为被蛋白酶体降解的标记。人们发现 P4HA1 是滑膜素的底物蛋白。P4HA1 是脯氨酰羟化酶的 α 亚单位。脯氨酰羟化酶是胶原产生过程中必须的、催化胶原的脯氨酸残基羟化的酶。因为发现了 SL-1 抗体具有抑制滑膜素自身泛素化的作用, 所以探讨该抗体是否对因滑膜素引起的 P4HA1 泛素化产生影响。

首先, 将 MBP-dTM Syno-His 与一定浓度的 SL-1 抗体、抗 FLAG 抗体或小鼠 IgG 混合, 4 $^{\circ}$ C 1.5 小时, 进行抗原抗体反应。其后, 在体外泛素化反应体系中, 将 2 μ g 的 GST 融合 P4HA1 蛋白质 GST-P4HA1 与 E1 (酵母来源)、E2 (UbcH5c)、ATP、GST-HA-泛素、预先与抗体反应的各 MBP-dTM Syno-His 混和, 37 $^{\circ}$ C、反应 120 分钟。反应后, 各样品中加入 4 x SDS-PAGE 缓冲液, 5 分钟沸腾后, 在 10 % SDS-PAGE 上展开。用 Western 印迹分析法, 用抗 GST 抗体检测 P4HA1 泛素化的条带。

结果表明, 4 μ g 的 SL-1 抗体可显著抑制 MBP-dTM Syno-His 的自身泛素化, 但 8 μ g 的 SL-1 抗体对 GST-P4HA1 的泛素化一点也没有抑制(图 5)。图 5 中, -E3 是不含滑膜素的样品, α -SL1 是添加抗体的样品, IgG 表示阴性对照, GST-P4HA1-Ubn 所示的 250 kDa 附近

的条带表示泛素化的 GST-P4HA1。因此可以明确，SL-1 抗体可特异性抑制滑膜素的自身泛素化，对 GST-P4HA1 的泛素化无影响。

产业上利用的可能性

本发明的抗体可调节滑膜素的自身泛素化。

另外，由于 RA 患者的血中发现识别滑膜素的自身抗体，所以在 RA 的诊断上可提供一全新的途径。因此，含有本发明抗体的医药组合物对 RA 治疗方法等的开发也能提供一全新的途径。

另外，本发明提供产生上述抗体的细胞、及利用上述单克隆抗体的滑膜素含有细胞的检测试剂盒。

滑膜的发育及骨·软骨、四肢的发育相关的滑膜素基因与 RA 的病态相关，RA 患者中能产生针对该基因产物的抗体。本发明的 SL-1 抗体可用于成为对 RA 诊断有用的标记物的滑膜素以及患者血清中高频度出现的抗体的特异性检测、定量，有利于对 RA 疾病的诊断和治疗效果的判定。

本发明的 SL-1 抗体，利用其高特异性，可及滑膜素作为细胞标记物应用，可从胚胎细胞获得未分化间质细胞，有望在再生医学中应用。

<110> Locomogene Inc.
 <120> 抗滑膜素抗体
 <130> G06-0076
 <150> JP2004-197010
 <151> 2004-07-02
 <160> 5
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 3374
 <212> DNA
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <220>
 <221> CDS
 <222> (403)..(2256)
 <400> 1
 gcccttctt atgagcatgc ctgtgtggg ttgacagtga gggtaataat gactgttg 60
 ttgattgtag atatagggct ctcccttga agtaattag gctcctaaa ttacctgtaa 120
 gatttcttg ccacagcacc cattctggtt aggctggtga tctctgagt agtgatagat 180
 tggttgggtg tgaggtttac aggtgtccc tctcttact cctggtgttg gctacaatca 240
 ggtggcgtct agagcagcat gggacagggt ggtaagggga gtcttctcat tatgcagaag 300
 tgatcaactt aaatctctgt cagatctacc ttatgtagc ccggcagtcg cgcggattga 360
 ggggctcgc ggcgctgggt tctgtgtctc cgggccaggg ca atg ttc cgc acg 414
 Met Phe Arg Thr
 1
 gca gtg atg atg gcg gcc agc ctg gcg ctg acc ggg gct gtg gtg gct 462
 Ala Val Met Met Ala Ala Ser Leu Ala Leu Thr Gly Ala Val Val Ala
 5 10 15 20
 cac gcc tac tac ctg aaa cac agc ttc tac ccc act gtg gtg tac ctg 510
 His Ala Tyr Tyr Leu Lys His Gln Phe Tyr Pro Thr Val Val Tyr Leu
 25 30 35
 acc aag tcc agc ccc agc atg gca gtc ctg tac atc cag gcc ttt gtc 558
 Thr Lys Ser Ser Pro Ser Met Ala Val Leu Tyr Ile Gln Ala Phe Val
 40 45 50
 ctt gtc ttc ctt ctg ggc aag gtg atg ggc aag gtg ttc ttt ggg caa 606
 Leu Val Phe Leu Leu Gly Lys Val Met Gly Lys Val Phe Phe Gly Gln
 55 60 65

ctg agg gca gca gag atg gag cac ctt ctg gaa cgt tcc tgg tac gcc 654
 Leu Arg Ala Ala Glu Met Glu His Leu Leu Glu Arg Ser Trp Tyr Ala
 70 75 80

gtc aca gag act tgt ctg gcc ttc acc gtt ttt cgg gat gac ttc agc 702
 Val Thr Glu Thr Cys Leu Ala Phe Thr Val Phe Arg Asp Asp Phe Ser
 85 90 95 100

ccc cgc ttt gtt gca ctc ttc act ctt ctt ctc ttc ctc aaa tgt ttc 750
 Pro Arg Phe Val Ala Leu Phe Thr Leu Leu Leu Phe Leu Lys Cys Phe
 105 110 115

cac tgg ctg gct gag gac cgt gtg gac ttt atg gaa cgc agc ccc aac 798
 His Trp Leu Ala Glu Asp Arg Val Asp Phe Met Glu Arg Ser Pro Asn
 120 125 130

atc tcc tgg ctc ttt cac tgc cgc att gtc tct ctt atg ttc ctc ctg 846
 Ile Ser Trp Leu Phe His Cys Arg Ile Val Ser Leu Met Phe Leu Leu
 135 140 145

ggc atc ctg gac ttc ctc ttc gtc agc cac gcc tat cac agc atc ctg 894
 Gly Ile Leu Asp Phe Leu Phe Val Ser His Ala Tyr His Ser Ile Leu
 150 155 160

acc cgt ggg gcc tct gtg cag ctg gtg ttt ggc ttt gag tat gcc atc 942
 Thr Arg Gly Ala Ser Val Gln Leu Val Phe Gly Phe Glu Tyr Ala Ile
 165 170 175 180

ctg atg acg atg gtg ctc acc atc ttc atc aag tat gtg ctg cac tcc 990
 Leu Met Thr Met Val Leu Thr Ile Phe Ile Lys Tyr Val Leu His Ser
 185 190 195

gtg gac ctc cag agt gag aac ccc tgg gac aac aag gct gtg tac atg 1038
 Val Asp Leu Gln Ser Glu Asn Pro Trp Asp Asn Lys Ala Val Tyr Met
 200 205 210

ctc tac aca gag ctg ttt aca ggc ttc atc aag gtt ctg ctg tac atg 1086
 Leu Tyr Thr Glu Leu Phe Thr Gly Phe Ile Lys Val Leu Leu Tyr Met
 215 220 225

gcc ttc atg acc atc atg atc aag gtg cac acc ttc cca ctc ttt gcc 1134
 Ala Phe Met Thr Ile Met Ile Lys Val His Thr Phe Pro Leu Phe Ala
 230 235 240

atc cgg ccc atg tac ctg gcc atg aga cag ttc aag aaa gct gtg aca 1182
 Ile Arg Pro Met Tyr Leu Ala Met Arg Gln Phe Lys Lys Ala Val Thr
 245 250 255 260

gat gcc atc atg tct cgc cga gcc atc cgc aac atg aac acc ctg tat 1230
 Asp Ala Ile Met Ser Arg Arg Ala Ile Arg Asn Met Asn Thr Leu Tyr
 265 270 275

cca gat gcc acc cca gag gag ctc cag gca atg gac aat gtc tgc atc 1278
 Pro Asp Ala Thr Pro Glu Glu Leu Gln Ala Met Asp Asn Val Cys Ile
 280 285 290

atc tgc cga gaa gag atg gtg act ggt gcc aag aga ctg ccc tgc aac 1326

Ile Cys Arg Glu Glu Met Val Thr Gly Ala Lys Arg Leu Pro Cys Asn
 295 300 305

cac att ttc cat acc agc tgc ctg cgc tcc tgg ttc cag cgg cag cag 1374
 His Ile Phe His Thr Ser Cys Leu Arg Ser Trp Phe Gln Arg Gln Gln
 310 315 320

acc tgc ccc acc tgc cgt atg gat gtc ctt cgt gca tgc ctg cca gcg 1422
 Thr Cys Pro Thr Cys Arg Met Asp Val Leu Arg Ala Ser Leu Pro Ala
 325 330 335 340

cag tca cca cca ccc ccg gag cct gcg gat cag ggg cca ccc cct gcc 1470
 Gln Ser Pro Pro Pro Glu Pro Ala Asp Gln Gly Pro Pro Pro Ala
 345 350 355

ccc cac ccc cca cca etc ttg cct cag ccc ccc aac ttc ccc cag ggc 1518
 Pro His Pro Pro Pro Leu Leu Pro Gln Pro Pro Asn Phe Pro Gln Gly
 360 365 370

ctc ctg cct cct ttt cct cca ggc atg ttc cca ctg tgg ccc ccc atg 1566
 Leu Leu Pro Pro Phe Pro Pro Gly Met Phe Pro Leu Trp Pro Pro Met
 375 380 385

ggc ccc ttt cca cct gtc ccg cct ccc ccc agc tca gga gag gct gtg 1614
 Gly Pro Phe Pro Pro Val Pro Pro Pro Ser Ser Gly Glu Ala Val
 390 395 400

gct cct cca tcc acc agt gca gca gcc ctt tct cgg ccc agt gga gca 1662
 Ala Pro Pro Ser Thr Ser Ala Ala Ala Leu Ser Arg Pro Ser Gly Ala
 405 410 415 420

gct aca acc aca gct gct ggc acc agt gct act gct gct tct gcc aca 1710
 Ala Thr Thr Thr Ala Ala Gly Thr Ser Ala Thr Ala Ala Ser Ala Thr
 425 430 435

gca tct ggc cca ggc tct ggc tct gcc cca gag gct ggc cct gcc cct 1758
 Ala Ser Gly Pro Gly Ser Gly Ser Ala Pro Glu Ala Gly Pro Ala Pro
 440 445 450

ggt ttc ccc ttc cct cct ccc tgg atg ggt atg ccc ctg cct cca ccc 1806
 Gly Phe Pro Phe Pro Pro Trp Met Gly Met Pro Leu Pro Pro Pro
 455 460 465

ttt gcc ttc ccc cca atg cct gtg ccc cct gcg ggc ttt gct ggg ctg 1854
 Phe Ala Phe Pro Pro Met Pro Val Pro Pro Ala Gly Phe Ala Gly Leu
 470 475 480

acc cca gag gag cta cga gct ctg gag ggc cat gag cgg cag cac ctg 1902
 Thr Pro Glu Glu Leu Arg Ala Leu Glu Gly His Glu Arg Gln His Leu
 485 490 495 500

gag gcc cgg ctg cag agc ctg cgt aac atc cac aca ctg ctg gac gcc 1950
 Glu Ala Arg Leu Gln Ser Leu Arg Asn Ile His Thr Leu Leu Asp Ala
 505 510 515

gcc atg ctg cag atc aac cag tac etc acc gtg ctg gcc tcc ttg ggg 1998
 Ala Met Leu Gln Ile Asn Gln Tyr Leu Thr Val Leu Ala Ser Leu Gly
 520 525 530

ccc ccc cgg cct gcc act tca gtc aac tcc act gag ggg act gcc act 2046
Pro Pro Arg Pro Ala Thr Ser Val Asn Ser Thr Glu Gly Thr Ala Thr
535 540 545

aca gtt gtt gct gct gcc tcc tcc acc agc atc cct agc tca gag gcc 2094
Thr Val Val Ala Ala Ala Ser Ser Thr Ser Ile Pro Ser Ser Glu Ala
550 555 560

acg acc cca acc cca gga gcc tcc cca cca gcc cct gaa atg gaa agg 2142
Thr Thr Pro Thr Pro Gly Ala Ser Pro Pro Ala Pro Glu Met Glu Arg
565 570 575 580

cct cca gct cct gag tca gtc ggc aca gag gag atg cct gag gat gga 2190
Pro Pro Ala Pro Glu Ser Val Gly Thr Glu Glu Met Pro Glu Asp Gly
585 590 595

gag ccc gat gca gca gag ctc cgc cgg cgc cgc ctg cag aag ctg gag 2238
Glu Pro Asp Ala Ala Glu Leu Arg Arg Arg Arg Leu Gln Lys Leu Glu
600 605 610

tct cct gtt gcc cac tga cactgcccc gcccagcccc agcctctgct 2286
Ser Pro Val Ala His
615

ctttgagca gccctcgtg gaacatgtcc tgccaccaag tgccagctcc ctctctgtct 2346

gcaccagga gtagtacc cagctctgag aaagaggcgg catcccctag gccaagtga 2406

aagaggctgg ggttccatt tgactccagt ccaggcagc catggggatc tcgggtcagt 2466

tccagccttc ctcccaact ctccagcct gtgttctgct ggggcatga aggcagaagg 2526

tttagcctt gagaagcct ctcttccc cacccttc caggagaagg ggctgccct 2586

ccaagcccta cttgtatgtg cggagtcaca ctgcagtgcc gaacagtatt agctccggt 2646

ccaagtgtg gactccagag gggtggagg caagctatga actgtctgc tgcccacc 2706

ctaagactgg taccattt cttttttac ctgatctcc ccagaagcct cttgtggtgg 2766

tgctgtgcc cctatgccc tgtggcatt ctgcgttta ctggcaacca cacaactcag 2826

ggaaaggaat gcctgggagt ggggtgcag cggggcagca ctgaggacc ctgccccgcc 2886

ctccccca ggccccctt cctgcagct tctcaagtga gactgacctg tctaccag 2946

cagccactgc ccagccgac tccaggcaag ggccagtgcg cctgctctg accactgcaa 3006

tcccagcgc caaggaagg cacttctcaa ctggcagaac ttctgaagt tagaattgga 3066

attactcct tactagtgc ttttgctta aatttctct tttgaagtg aatgctaat 3126

cccggaag aggaacagga gtccagact cctggtctt ccagttaga aaagctctg 3186

tgccaaggag ggaccacagg agctgggacc tgctgcccc tgcctttcc ctttggttt 3246

gtgttacaag agttgtgga gacagttca gatgattatt taattgtaa atattgtaca 3306

aattttaata gcttaaattg tatatacagc caaataaaaaa ctgcattaa caaaaaaaaa 3366

aaaaaaaa 3374

<210> 2
 <211> 617
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 2

Met Phe Arg Thr Ala Val Met Met Ala Ala Ser Leu Ala Leu Thr Gly
 1 5 10 15

Ala Val Val Ala His Ala Tyr Tyr Leu Lys His Gln Phe Tyr Pro Thr
 20 25 30

Val Val Tyr Leu Thr Lys Ser Ser Pro Ser Met Ala Val Leu Tyr Ile
 35 40 45

Gln Ala Phe Val Leu Val Phe Leu Leu Gly Lys Val Met Gly Lys Val
 50 55 60

Phe Phe Gly Gln Leu Arg Ala Ala Glu Met Glu His Leu Leu Glu Arg
 65 70 75 80

Ser Trp Tyr Ala Val Thr Glu Thr Cys Leu Ala Phe Thr Val Phe Arg
 85 90 95

Asp Asp Phe Ser Pro Arg Phe Val Ala Leu Phe Thr Leu Leu Leu Phe
 100 105 110

Leu Lys Cys Phe His Trp Leu Ala Glu Asp Arg Val Asp Phe Met Glu
 115 120 125

Arg Ser Pro Asn Ile Ser Trp Leu Phe His Cys Arg Ile Val Ser Leu
 130 135 140

Met Phe Leu Leu Gly Ile Leu Asp Phe Leu Phe Val Ser His Ala Tyr
 145 150 155 160

His Ser Ile Leu Thr Arg Gly Ala Ser Val Gln Leu Val Phe Gly Phe
 165 170 175

Glu Tyr Ala Ile Leu Met Thr Met Val Leu Thr Ile Phe Ile Lys Tyr
 180 185 190

Val Leu His Ser Val Asp Leu Gln Ser Glu Asn Pro Trp Asp Asn Lys
 195 200 205

Ala Val Tyr Met Leu Tyr Thr Glu Leu Phe Thr Gly Phe Ile Lys Val
 210 215 220

Leu Leu Tyr Met Ala Phe Met Thr Ile Met Ile Lys Val His Thr Phe
 225 230 235 240

Pro Leu Phe Ala Ile Arg Pro Met Tyr Leu Ala Met Arg Gln Phe Lys
 245 250 255

Lys Ala Val Thr Asp Ala Ile Met Ser Arg Arg Ala Ile Arg Asn Met
 260 265 270

Asn Thr Leu Tyr Pro Asp Ala Thr Pro Glu Glu Leu Gln Ala Met Asp
 275 280 285

Asn Val Cys Ile Ile Cys Arg Glu Glu Met Val Thr Gly Ala Lys Arg
 290 295 300

Leu Pro Cys Asn His Ile Phe His Thr Ser Cys Leu Arg Ser Trp Phe
 305 310 315 320

Gln Arg Gln Gln Thr Cys Pro Thr Cys Arg Met Asp Val Leu Arg Ala
 325 330 335

Ser Leu Pro Ala Gln Ser Pro Pro Pro Pro Glu Pro Ala Asp Gln Gly
 340 345 350

Pro Pro Pro Ala Pro His Pro Pro Pro Leu Leu Pro Gln Pro Pro Asn
 355 360 365

Phe Pro Gln Gly Leu Leu Pro Pro Phe Pro Pro Gly Met Phe Pro Leu
 370 375 380

Trp Pro Pro Met Gly Pro Phe Pro Pro Val Pro Pro Pro Ser Ser
 385 390 395 400

Gly Glu Ala Val Ala Pro Pro Ser Thr Ser Ala Ala Ala Leu Ser Arg
 405 410 415

Pro Ser Gly Ala Ala Thr Thr Thr Ala Ala Gly Thr Ser Ala Thr Ala
420 425 430

Ala Ser Ala Thr Ala Ser Gly Pro Gly Ser Gly Ser Ala Pro Glu Ala
435 440 445

Gly Pro Ala Pro Gly Phe Pro Phe Pro Pro Pro Trp Met Gly Met Pro
450 455 460

Leu Pro Pro Pro Phe Ala Phe Pro Pro Met Pro Val Pro Pro Ala Gly
465 470 475 480

Phe Ala Gly Leu Thr Pro Glu Glu Leu Arg Ala Leu Glu Gly His Glu
485 490 495

Arg Gln His Leu Glu Ala Arg Leu Gln Ser Leu Arg Asn Ile His Thr
500 505 510

Leu Leu Asp Ala Ala Met Leu Gln Ile Asn Gln Tyr Leu Thr Val Leu
515 520 525

Ala Ser Leu Gly Pro Pro Arg Pro Ala Thr Ser Val Asn Ser Thr Glu
530 535 540

Gly Thr Ala Thr Thr Val Val Ala Ala Ala Ser Ser Thr Ser Ile Pro
545 550 555 560

Ser Ser Glu Ala Thr Thr Pro Thr Pro Gly Ala Ser Pro Pro Ala Pro
565 570 575

Glu Met Glu Arg Pro Pro Ala Pro Glu Ser Val Gly Thr Glu Glu Met
580 585 590

Pro Glu Asp Gly Glu Pro Asp Ala Ala Glu Leu Arg Arg Arg Arg Leu
595 600 605

Gln Lys Leu Glu Ser Pro Val Ala His
610 615

<210> 3
<211> 15
<212> PRT

<213> 智人

<400> 3

Ser Leu Ala Leu Thr Gly Ala Val Val Ala His Ala Tyr Tyr Cys
1 5 10 15

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 4

Thr Cys Arg Met Asp Val Leu Arg Ala Ser Leu Pro Ala Gln Ser
1 5 10 15

<210> 5

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 5

Gly Ala Ala Thr Thr Thr Ala Ala Gly Thr Ser Ala Thr Ala Cys
1 5 10 15

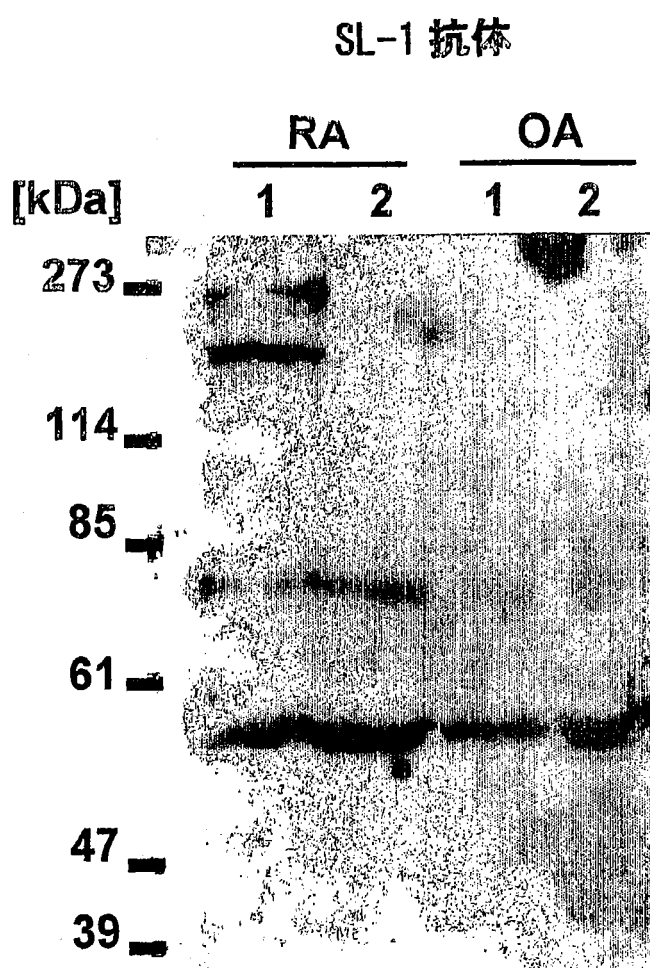


图 1

SL-1 抗体

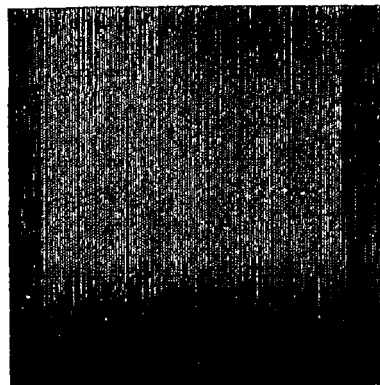


图 2

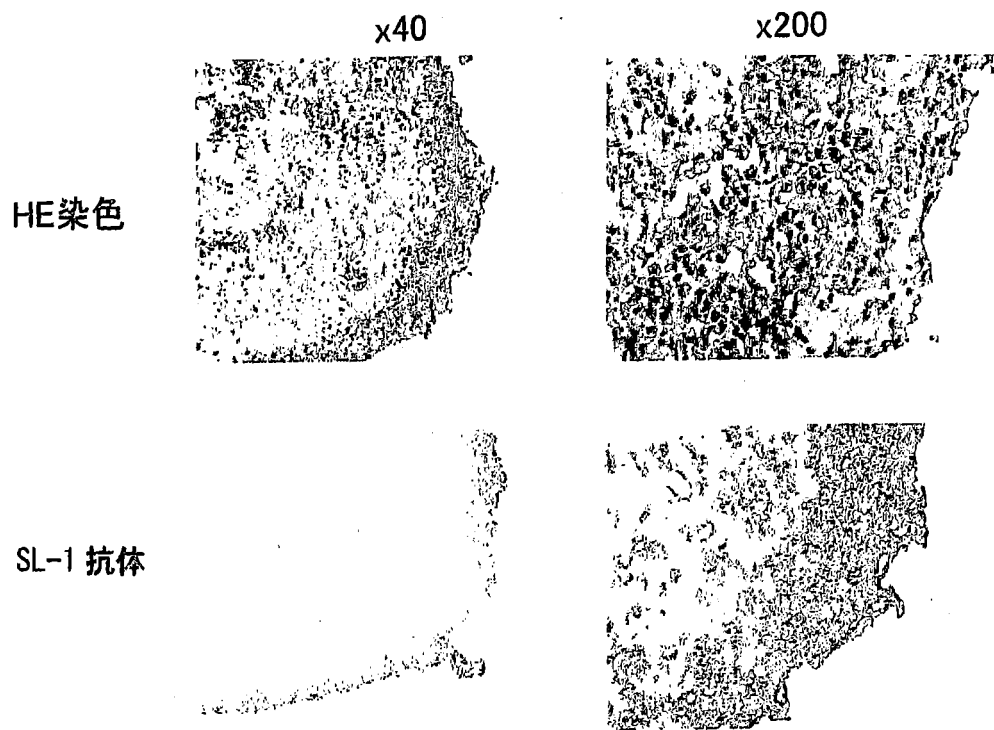


图 3

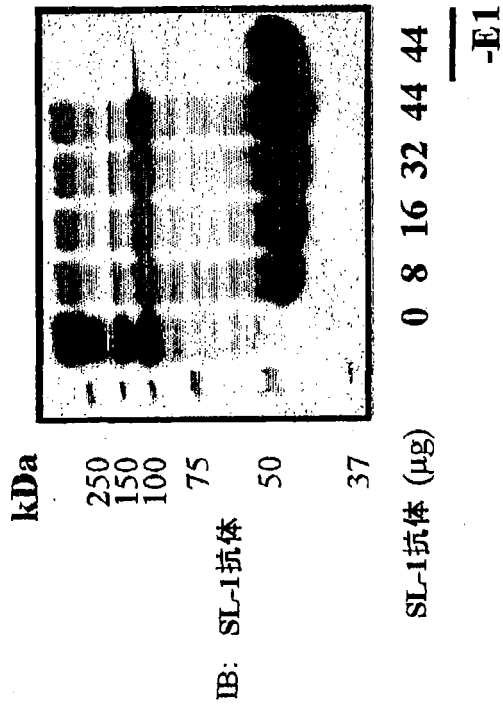
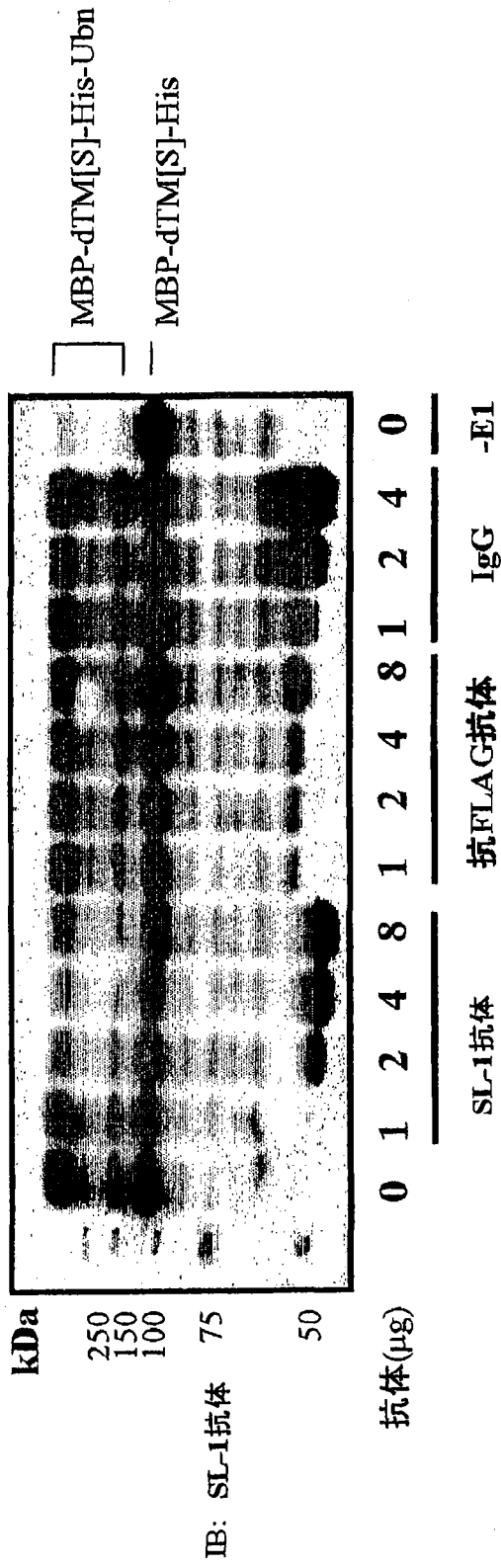


图 4

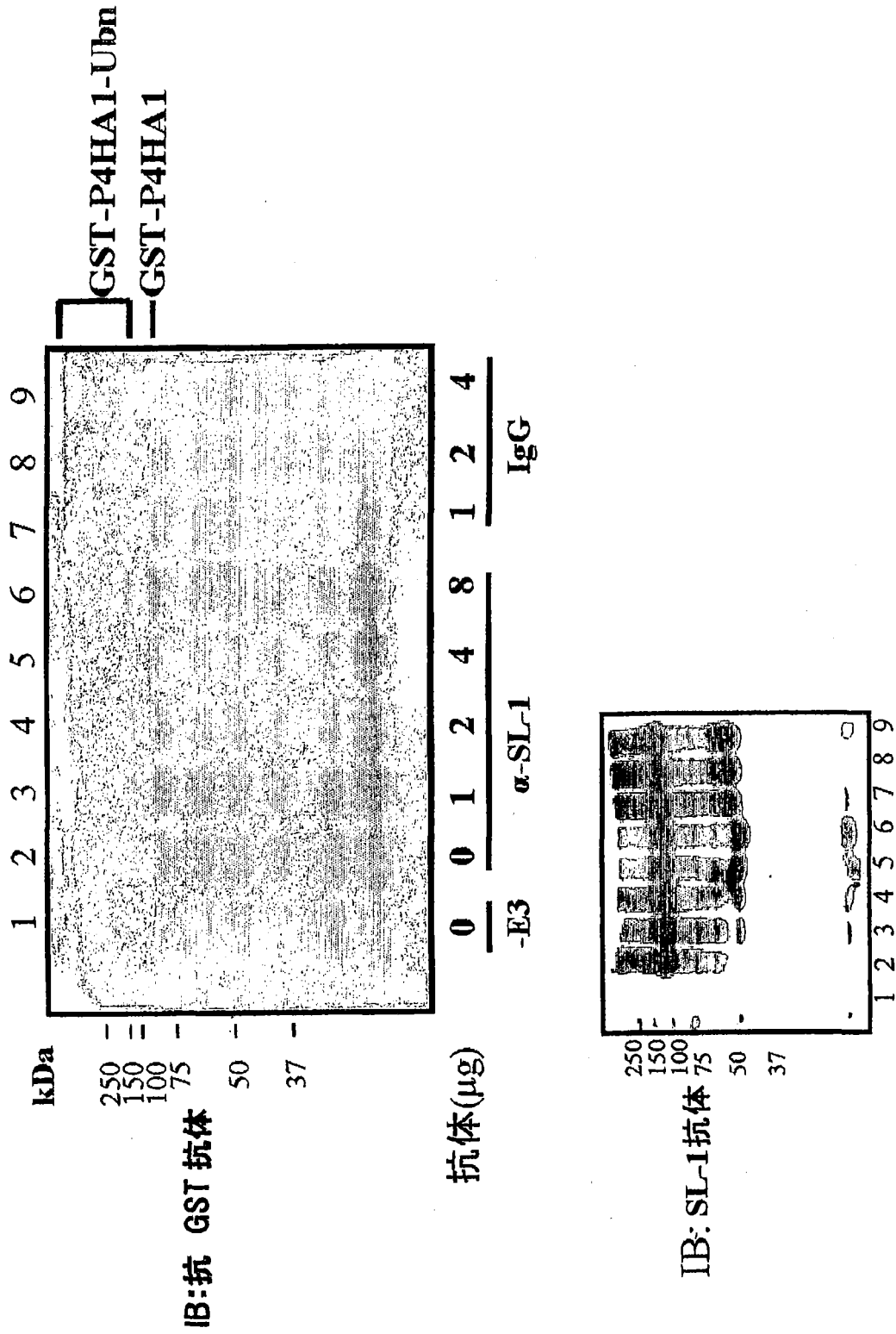


图 5

专利名称(译)	抗滑膜素抗体		
公开(公告)号	CN101018810A	公开(公告)日	2007-08-15
申请号	CN200580029608.6	申请日	2005-07-04
[标]发明人	中岛利博 山崎聪士 张蕾 天野彻也		
发明人	中岛利博 山崎聪士 张蕾 天野彻也		
IPC分类号	C07K16/40 A61K39/395 A61P19/02 A61P29/00 A61P35/00 C12N5/10 C12N9/99 C12N15/02 C12P21/08 C12Q1/02 G01N33/53		
CPC分类号	C12Q1/25 C07K16/40 A61K2039/505 C07K2316/96 A61P9/10 A61P19/02 A61P29/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 C07K2317/76		
代理人(译)	郭文洁 刘玥		
优先权	2004197010 2004-07-02 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及针对滑膜素的抗体或其片段，以提供识别滑膜素部分的单克隆抗体，该抗体能抑制滑膜素自身泛素化。

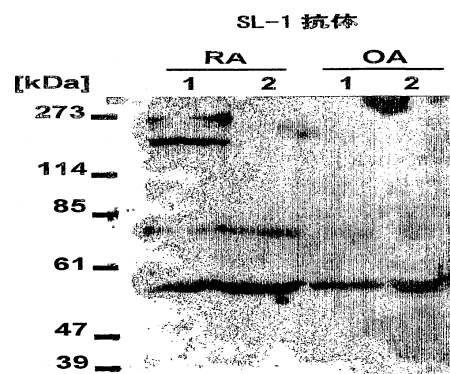


图 1