

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5019464号
(P5019464)

(45) 発行日 平成24年9月5日(2012.9.5)

(24) 登録日 平成24年6月22日(2012.6.22)

(51) Int.Cl.	F 1		
C 0 7 K 1 6 / 1 8 (2006.01)	C 0 7 K 1 6 / 1 8	Z N A	
C 1 2 N 5 / 1 0 (2006.01)	C 1 2 N 5 / 0 0	I O 2	
C 1 2 P 2 1 / 0 8 (2006.01)	C 1 2 P 2 1 / 0 8		
C 1 2 N 1 5 / 0 9 (2006.01)	C 1 2 N 1 5 / 0 0	A	
A 6 1 K 3 9 / 3 9 5 (2006.01)	A 6 1 K 3 9 / 3 9 5	D	
請求項の数 12 (全 39 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願2007-552991 (P2007-552991)	(73) 特許権者	307010166
(86) (22) 出願日	平成18年12月28日(2006.12.28)		第一三共株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2006/326280		東京都中央区日本橋本町三丁目5番1号
(87) 国際公開番号	W02007/077934	(74) 代理人	100140109
(87) 国際公開日	平成19年7月12日(2007.7.12)		弁理士 小野 新次郎
審査請求日	平成21年8月20日(2009.8.20)	(74) 代理人	100146581
(31) 優先権主張番号	特願2005-380009 (P2005-380009)		弁理士 石橋 公樹
(32) 優先日	平成17年12月28日(2005.12.28)	(74) 代理人	100089705
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		弁理士 社本 一夫
微生物の受託番号	IPOD FERM BP-10718	(74) 代理人	100075270
			弁理士 小林 泰
		(74) 代理人	100080137
			弁理士 千葉 昭男
		(74) 代理人	100096013
			弁理士 富田 博行
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 抗ペリオスチン抗体およびそれを含有するペリオスチンが関与する疾患の予防または治療用医薬組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

抗細胞接着活性を有するペリオスチンの抗細胞接着活性に関与する領域を特異的に認識し、且つ当該ペリオスチンの抗細胞接着活性を中和する活性を有する抗体であって、

前記領域が配列番号3、4、21、22、23、24、および26で示されるアミノ酸配列から成る群から選択されるいずれか1つのアミノ酸配列である、前記抗体。

【請求項2】

前記領域が配列番号3、4又は21で示されるアミノ酸配列である、請求項1記載の抗体。

【請求項3】

抗体がモノクローナル抗体である、請求項1または2に記載の抗体。

【請求項4】

ハイブリドーマ細胞株FERM BP-10718により産生される、請求項3に記載の抗体。

【請求項5】

配列番号3、4及び21で示されるアミノ酸配列から成る群から選択されるいずれか1つのアミノ酸配列からなるペプチド又は当該ペプチドのN末端にCys基を付加したペプチドでヒトを除く哺乳動物を免疫した後、当該動物の抗体産生細胞をミエローマ細胞と融合させて得られるハイブリドーマ。

【請求項6】

ハイブリドーマ細胞株 F E R M B P - 1 0 7 1 8。

【請求項 7】

配列番号 3、4 及び 21 で示されるアミノ酸配列から成る群から選択されるいずれか 1 つのアミノ酸配列からなるペプチド又は当該ペプチドの N 末端に C y s 基を付加したペプチドでヒトを除く哺乳動物を免疫した後、当該動物の抗体産生細胞をミエローマ細胞と融合させ、得られたハイブリドーマを培養する工程を有する請求項 3 に記載の抗体を製造する方法。

【請求項 8】

ハイブリドーマがハイブリドーマ細胞株 F E R M B P - 1 0 7 1 8 である、請求項 7 の製造方法。

10

【請求項 9】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体を含有する医薬組成物。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体を含有する、心不全、心筋梗塞、心拡大、心肥大、心線維化、心筋症、心筋炎、または弁膜症の予防または治療用医薬組成物。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体を用いて、生体試料中の抗細胞接着活性を有するペリオスチンを検出又は定量する方法。

【請求項 12】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体を含む、心不全、心筋梗塞、心拡大、心肥大、心線維化、心筋症、心筋炎、または弁膜症の診断薬。

20

【発明の詳細な説明】

[0 0 0 1]

技術分野

[0 0 0 2]

本発明は、抗細胞接着作用を有するペリオスチンに対する抗体、特に抗細胞接着作用を中和する能力を有する抗ペリオスチン抗体に関する。更に詳しくは、心肥大組織をはじめとして組織再構築の間質において特異的に発現する、抗細胞接着作用を有するペリオスチンの抗細胞接着活性に関与する領域を特異的に認識する抗ペリオスチン抗体であって、心不全などのペリオスチンが関与する疾患の予防もしくは治療またはこれらの疾患の診断に有用な抗体に関する。

30

背景技術

[0 0 0 3]

慢性心不全は、心筋収縮力の低下により、心臓が各臓器へ十分量の血液を拍出できない状態に陥る疾患である。従来、その治療には、心筋収縮力を増加させるジギタリス製剤等の強心剤が使用されてきた。しかし、これらの薬剤は心筋エネルギーの過剰消費により、長期投与においては生命予後を悪化させることが明らかになっている。そのため、最近では、心不全状態で亢進している交感神経系やレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系による心臓への過剰な負荷を軽減させる利尿剤や 遮断薬、アンジオテンシン阻害薬による治療が主流になってきている。しかし、依然として、心不全患者は激しい運動ができないなど日常生活が制限され、生活の質を保つことができず、さらに、心不全患者の生命予後を十分に担保できていないため、生活の質の改善および長期生命予後の改善が可能である有効な新規心不全治療薬の開発が望まれている。

40

[0 0 0 4]

一方、ペリオスチンは、細胞外マトリックスタンパク質の一種であり、分子量約 9 万のポリペプチドからなる。各ポリペプチド鎖には、シグナル配列、システインリッチドメイン、4 回繰り返しドメイン、C 末端ドメインが含まれている。

[0 0 0 5]

ペリオスチンは、当初、骨芽細胞特異的因子 - 2 (O S F - 2) と呼ばれ、マウス骨芽細胞株 M C 3 T 3 - E 1 細胞に特異的に発現している遺伝子として分離同定されたが (特許

50

文献 1、非特許文献 1)、後に現在の名称であるペリオスチンと呼ばれるようになり、骨芽細胞における接着促進活性が報告された(非特許文献 2)。

【0006】

初期の研究では、ペリオスチンは骨組織に特異的に発現する細胞外マトリックスであると考えられていた。しかし、現在では骨組織のみならず心不全(非特許文献 3、非特許文献 4)、動脈瘤(非特許文献 5)、高転移性癌(非特許文献 6、非特許文献 7、非特許文献 8)、子癇前症(非特許文献 9)等の発症において極めて高く発現しており、また正常組織においてもごく僅かであるが発現していることが明らかになっている。また、いくつかのペリオスチンスプライシングバリエントが骨芽細胞で発現していることも明らかになっている(非特許文献 1、非特許文献 2、非特許文献 10、特許文献 3)。

10

【0007】

ペリオスチンの作用について、細胞接着作用に関しては、811アミノ酸から成るペリオスチンスプライシングバリエント(図 1における PN-2に相当)(非特許文献 2)および782アミノ酸から成るペリオスチンスプライシングバリエント(非特許文献 11)が細胞接着作用を有すると報告されていた。これに対し、838アミノ酸から成るペリオスチンスプライシングバリエント(図 1における PN-1に相当)は、該ペリオスチンスプライシングバリエントをコーティングしたプレートには心線維芽細胞が接着しないこと、すなわち細胞接着活性を有しないこと、正常ラットに比べ心不全モデルラットにおいて838アミノ酸から成るペリオスチンスプライシングバリエント(図 1における PN-1に相当)の遺伝子発現が有意に増加していること、加えてそれが心拡大を惹起させる増悪因子であること、およびこのタンパク質の発現を抑制すると有意に生存率が上昇したことが報告されている(非特許文献 3)。さらに、838アミノ酸から成るペリオスチンスプライシングバリエントに対するアンチセンスヌクレオチドを用いて、該ペリオスチンスプライシングバリエントの発現を抑制することによる心不全の予防剤または治療剤について報告されている(特許文献 2)。

20

【0008】

このように、ペリオスチン遺伝子の発現が心不全の病態に関連することが示唆されているが、ペリオスチンスプライシングバリエントの構造と心不全の関連については不明である。そこで、本発明者らは、抗体を用いて心不全病態に関与するペリオスチンの構造を明らかにすることを試みた。

30

[0009]

ペリオスチン抗体については、ペリオスチンの細胞遊走阻害に関する抗体(非特許文献 12)およびペリオスチンによる細胞の増殖抑制活性を有する抗体(非特許文献 13)が報告されている。しかし、ペリオスチンの細胞接着活性に関与する領域の構造に関する抗体の報告は未だなく、また、ペリオスチンの細胞接着活性と心不全などの疾患との関係についての報告も何らなされていない。

特許文献 1: 特開平 5 - 268982 号公報

特許文献 2: 再公表特許 WO 02 / 020055 号公報

特許文献 3: 国際公開 WO 2005 / 019471 号公報

非特許文献 1: Takeshita S. et al., Biochem J (1993) 294, 271 - 8

40

非特許文献 2: Horiuchi K. et al., J. Bone Miner. Res. (1999) 14, 1239 - 49

非特許文献 3: Katsuragi N. et al., Circulation (2004) 110, 1806 - 13

非特許文献 4: Wang D. et al., Hypertension (2003) 42, 88 - 95

非特許文献 5: Peters DG. et al., Stroke (2001) 32, 1036 - 42

非特許文献 6: Shao R. et al., Mol Cell Biol. (2004

50

) 24, 3992 - 4003

非特許文献7: Gonzalez H E . et al . , Arch Otolaryngol Head Neck Surg . (2003) 129 , 754 - 9

非特許文献8: Sasaki H . et al . , Breast Cancer Res Treat . (2003) 77 , 245 - 52

非特許文献9: Sasaki H . et al . , Am J Obstet Gynecol . (2002) 186 , 103 - 8

非特許文献10: Litvin J . et al . , J Cell Biochem . (2004) 92 , 1044 - 61

非特許文献11: Gillan L . et al . , Cancer Res . (2002) 62 , 5358 - 64 10

非特許文献12: Lindner V . et al . , Arterioscler Thromb Vasc Biol . (2005) 25 , 77 - 83

非特許文献13: Tai I T . et al . , Carcinogenesis (2005) 26 , 908 - 15

発明の開示

[0010]

本発明の目的は、生活の質の改善および長期生命予後の改善が可能である有効な新規心不全の予防剤または治療剤等を提供することである。詳しくは、抗細胞接着活性を有するペリオスチンの抗細胞接着活性に關与する領域を特異的に認識する抗体を提供することである。また、該抗体を産生するハイブリドーマ、該ハイブリドーマの製造方法、該ハイブリドーマを培養することによる該抗体の製造方法を提供する。さらに、該抗体を含有する抗細胞接着活性を有するペリオスチンが關与する疾患を予防または治療するための医薬組成物を提供する。さらに、該医薬組成物を患者に投与することからなる抗細胞接着活性を有するペリオスチンが關与する疾患の予防または治療方法、ならびに該疾患の診断方法を提供する。 20

[0011]

本発明者らは、細胞接着活性を有しないペリオスチンスプライシングバリエント (P N - 1) が抗細胞接着活性、すなわち接着した細胞を剥離する活性を有することを明らかにし、また、一方、細胞接着活性を有するペリオスチン (P N - 2) は抗細胞接着活性を有さない、すなわち接着した細胞を剥離しないことを確認した。そして、抗細胞接着活性を有するペリオスチンスプライシングバリエント (P N - 1) と、抗細胞接着活性を示さないペリオスチン (P N - 2) において、その構造と細胞接着における活性の相違に注目し、抗細胞接着活性を有するペリオスチンスプライシングバリエントに特異的に存在する領域を阻害することにより、抗細胞接着活性を有するペリオスチン関連疾患の予防または治療が可能であると考えた。つまり、該領域に対する阻害物質が、抗細胞接着活性を有するペリオスチン関連疾患の予防または治療剤として有用であると考えた。 30

[0012]

心不全時に発現が亢進するペリオスチンスプライシングバリエントを調べた結果、スプライシングバリエントが形成されるC - 末端ドメインは、exon (エクソン) 15 から 23 で構成されているが、ラットでは、下記 (1) から (4) が存在することが明らかとなった。 40

(1) 全てを保持しているもの (P N - 1 と呼ぶ ; 配列番号 1 として示す 838 アミノ酸からなる ; cDNA 配列を配列番号 6 として示す)、

(2) Exon - 17 が欠失しているもの (P N - 2 と呼ぶ ; 配列番号 5 として示す 811 アミノ酸からなる ; P N - 1 から配列番号 3 で示される 27 アミノ酸 (Exon - 17) が欠失しているもの ; cDNA 配列を配列番号 7 として示す)、

(3) Exon - 21 が欠失しているもの (P N - 3 と呼ぶ ; 810 アミノ酸からなる)、

(4) Exon - 17 と Exon - 21 が欠失しているもの (P N - 4 と呼ぶ ; 783 ア 50

ミノ酸からなる)

また、ラット以外でも、マウス及びヒトについてPN-1及びPN-2が見出されている(マウスPN-1:配列番号8(アミノ酸配列)、配列番号9(cDNA配列);マウスPN-2:配列番号10(アミノ酸配列)、配列番号11(cDNA配列);ヒトPN-1:配列番号12(cDNA配列);ヒトPN-2:配列番号13(アミノ酸配列)、配列番号14(cDNA配列))。そして、これらのうち、ラットの心肥大組織ではPN-1が多く発現しており、PN-2およびPN-3の発現量は少なかった。そこで、本発明者らは、PN-1とPN-2の構造上異なる部位であり、PN-1のみに存在するExon-17部位の阻害物質として、該部位がコードするアミノ酸配列部分を特異的に認識する抗体の作製を検討した。

【0013】

抗体を作製するためには、免疫原として用いる物質が親水性であることが必要であり、また、タンパク質のような大きなポリペプチドの一部を用いて抗体を作製する際には、免疫原として使用する部分が、該タンパク質の表面に出ており、エピトープ部分を構成していることが必要である。そこで、Exon-17ペプチド鎖を抗原として用いることの可能性を検討するために、最初に、バイオインフォマティクス分野で汎用されているAccelrys社のソフト、Mac Vector 7.2を使用してエピトープ検索を行なった。その結果、“親水性(Hydrophilicity)”、“表面への露出のしやすさ(Surface Probability)”および“抗原性(Antigenicity)”から見て、Exon-17領域のTTKIITKLVEPKIKVIQGS LQPIIKTE(配列番号3)は殆どが疎水性領域であり、タンパク質分子の表面に出ていた可能性が非常に低いことが示唆され、抗原性を有しておらず、抗体が作製できないと考えられ、実際に抗体を作製することは困難であることが予想された。

【0014】

しかしながら、本発明者らは、PN-1の機能を特異的に阻害するためには、PN-1に特異的に存在するExon-17がコードするペプチド領域に対する抗体の使用が最適であるとの考えのもと、Exon-17がコードするアミノ酸配列に対する抗体の作製を遂行した。Exon-17領域がコードするペプチドを構成する27アミノ酸からなるペプチドを合成し、ウサギに免疫させ、得られた血清からIgG画分を精製し、抗Exon-17ペプチドポリクローナル抗体を作製した。次に80%コンフルエントに培養した心線維芽細胞にペリオスチンタンパク質PN-1を添加すると、ほぼ100%の細胞の脱離(すなわち、抗細胞接着活性)が観察された。この実験系に抗Exon-17ペプチド抗体を投与した結果、ペリオスチンタンパク質PN-1による細胞の脱離を抑制したことから、該抗Exon-17ペプチド抗体はペリオスチンタンパク質PN-1に対する中和活性を持つ抗体であることが明らかとなった。次に、急性心筋梗塞モデルラットを作製し、抗Exon-17ペプチド抗体を週に一度投与し続けたところ、モデル作製後4週間で心臓の拡大が有意に抑えられ、また心機能が改善されることが明らかとなった。さらに、モデル作製後8週間でも、上述の効果が持続すること、および心線維化が抑制されることが明らかとなった。これにより、抗Exon-17ペプチド抗体が心不全病態の進行とともに起こる心拡大および心線維化を抑制する活性、ならびに心機能を改善させる活性を持つ抗体であることが明らかとなり、本発明を完成するに至った。

【0015】

本発明は、前記の課題を解決するものとして、心不全時等の心臓に特異的に発現する抗細胞接着活性を有するペリオスチンに対する抗体、特に抗細胞接着活性に關与する領域を特異的に認識する抗体を提供するものである。

【0016】

すなわち、本発明としては、以下を挙げることができる。

(1) 抗細胞接着活性を有するペリオスチンの抗細胞接着活性に關与する領域を特異的に認識し、且つ当該ペリオスチンの抗細胞接着活性を中和する活性を有する抗体。

(2) 抗細胞接着活性を有するペリオスチンの抗細胞接着活性に關与する領域が、エクソン-17又は当該エクソンの一部によりコードされるアミノ酸配列である(1)記載の抗体。

10

20

30

40

50

(3) エクソン - 17 又は当該エクソンの一部によりコードされるアミノ酸配列が、配列番号 3、4、21、22、23、24、26 および 34 で示されるアミノ酸配列から成る群から選択されるいずれか 1 つのアミノ酸配列である (2) 記載の抗体。

(4) アミノ酸配列が、配列番号 3、4 又は 21 で示されるアミノ酸配列である (3) 記載の抗体。

(5) 抗体が、モノクローナル抗体である (1) ~ (4) のいずれかに記載の抗体。

(6) ハイブリドーマ細胞株 F E R M B P - 1 0 7 1 8 により産生される (5) 記載の抗体。

(7) 配列番号 3、4 及び 21 で示されるアミノ酸配列から成る群から選択されるいずれか 1 つのアミノ酸配列からなるペプチド又は当該ペプチドの N 末端に C y s 基を付加したペプチドで哺乳動物を免疫した後、当該動物の抗体産生細胞をミエローマ細胞と融合させて得られるハイブリドーマ。

(8) ハイブリドーマ細胞株 F E R M B P - 1 0 7 1 8 。

(9) 配列番号 3、4 及び 21 で示されるアミノ酸配列から成る群から選択されるいずれか 1 つのアミノ酸配列からなるペプチド又は当該ペプチドの N 末端に C y s 基を付加したペプチドで哺乳動物を免疫した後、当該動物の抗体産生細胞をミエローマ細胞と融合させ、得られたハイブリドーマを培養する工程を有する (5) 記載の抗体を製造する方法。

(10) ハイブリドーマが、ハイブリドーマ細胞株 F E R M B P - 1 0 7 1 8 である (9) の製造方法。

(11) (1) ~ (6) のいずれかに記載の抗体を含有する医薬組成物。

(12) (1) ~ (6) のいずれかに記載の抗体を含有する、抗細胞接着活性を有するペリオスチンが関与する疾患の予防又は治療用医薬組成物。

(13) 前記疾患が、心不全、心筋梗塞、心拡大、心肥大、心線維化、心筋症、心筋炎、弁膜症、癌、動脈瘤、動脈硬化、中枢神経変性疾患、腎臓病、関節リウマチ、骨粗しょう症、肺気腫、肺高血圧症、慢性閉塞性肺疾患 (C O P D)、腎炎、膵炎、肝炎、肝線維症又は肺線維症である (12) 記載の医薬組成物。

(14) (1) ~ (6) のいずれかに記載の抗体を患者に投与することからなる、抗細胞接着活性を有するペリオスチンが関与する疾患の予防又は治療方法。

(15) 前記疾患が、心不全、心筋梗塞、心拡大、心肥大、心線維化、心筋症、心筋炎、弁膜症、癌、動脈瘤、動脈硬化、中枢神経変性疾患、腎臓病、関節リウマチ、骨粗しょう症、肺気腫、肺高血圧症、慢性閉塞性肺疾患 (C O P D)、腎炎、膵炎、肝炎、肝線維症又は肺線維症である (14) 記載の予防または治療方法。

(16) (1) ~ (6) のいずれかに記載の抗体を用いて、生体試料中のペリオスチン量を測定することからなる、抗細胞接着活性を有するペリオスチンが関与する疾患を診断する方法。

(17) 用いる抗体が、標識化された抗体である (16) 記載の診断方法。

(18) 前記疾患が、心不全、心筋梗塞、心拡大、心肥大、心線維化、心筋症、心筋炎、弁膜症、癌、動脈瘤、動脈硬化、中枢神経変性疾患、腎臓病、関節リウマチ、骨粗しょう症、肺気腫、肺高血圧症、慢性閉塞性肺疾患 (C O P D)、腎炎、膵炎、肝炎、肝線維症または肺線維症である (16) 又は (17) 記載の診断方法。

(19) (1) ~ (6) のいずれかに記載の抗体を用いて、生体試料中の抗細胞接着活性を有するペリオスチンを検出又は定量する方法。

(20) (1) ~ (6) のいずれかに記載の抗体を含む、抗細胞接着活性を有するペリオスチンが関与する疾患の診断薬。

(21) 前記疾患が、心不全、心筋梗塞、心拡大、心肥大、心線維化、心筋症、心筋炎、弁膜症、癌、動脈瘤、動脈硬化、中枢神経変性疾患、腎臓病、関節リウマチ、骨粗しょう症、肺気腫、肺高血圧症、慢性閉塞性肺疾患 (C O P D)、腎炎、膵炎、肝炎、肝線維症または肺線維症である、(20) 記載の診断薬。

【図面の簡単な説明】

[0 0 1 8]

10

20

30

40

50

[図 1] 図 1 は、ラットのペリオスチンのスプライシングバリエーションを示す模式図である。

[図 2] 図 2 は、ラット P N - 1 の抗細胞接着作用を測定した結果を示す図である（実施例 2）。

[図 3] 図 3 は、抗ラット E x o n - 1 7 ペプチド抗体のラット P N - 1 活性阻害について測定した結果を示す図である（実施例 3）。

[図 4 - 1] 図 4 - 1 は、急性心筋梗塞モデル作成後 4 週間後における抗ラット E x o n - 1 7 ペプチド抗体による心拡大の抑制を測定した結果を示す図である（実施例 4：前壁厚、後壁厚）。

[図 4 - 2] 図 4 - 2 は、急性心筋梗塞モデル作製後 4 週間後における抗ラット E x o n - 1 7 ペプチド抗体による心拡大の抑制を測定した結果を示す図である（実施例 4：拡張末期心内径、収縮末期心内径、心機能）。

[図 4 - 3] 図 4 - 3 は、急性心筋梗塞モデル作製後 4 週間後における抗ラット E x o n - 1 7 ペプチド抗体による心拡大の抑制を測定した結果を示す図である（実施例 4：心拍数、梗塞エリア）。

[図 5 - 1] 図 5 - 1 は、急性心筋梗塞モデル作製後 8 週間後における抗ラット E x o n - 1 7 ペプチド抗体による心拡大の抑制を測定した結果を示す図である（実施例 4：前壁厚、後壁厚）。

[図 5 - 2] 図 5 - 2 は、急性心筋梗塞モデル作製後 8 週間後における抗ラット E x o n - 1 7 ペプチド抗体による心拡大の抑制を測定した結果を示す図である（実施例 4：拡張末期心内径、収縮末期心内径、心機能）。

[図 5 - 3] 図 5 - 3 は、急性心筋梗塞モデル作製後 8 週間後における抗ラット E x o n - 1 7 ペプチド抗体による心拡大の抑制を測定した結果を示す図である（実施例 4：心拍数、梗塞エリア）。

【 図 6 - 1 】 図 6 - 1 は、抗ラット E x o n - 1 7 ペプチド抗体によって処置したモデルラットの血行動態を示す図である（実施例 4：L V P、心拍数）。

【 図 6 - 2 】 図 6 - 2 は、抗ラット E x o n - 1 7 ペプチド抗体によって処置したモデルラットの血行動態を示す図である（実施例 4：(+) d P / d t、(-) d P / d t）。

【 図 6 - 3 】 図 6 - 3 は、抗ラット E x o n - 1 7 ペプチド抗体によって処置したモデルラットの血行動態を示す図である（実施例 4：S B P、D B P、L V E D P）。

【 図 7 】 図 7 は、抗ラット E x o n - 1 7 ペプチド抗体によって処置したモデルラットの組織学的に検討した結果を示す図である（実施例 4）。

【 図 8 】 図 8 は、抗ラット E x o n - 1 7 ペプチド抗体によって処置したモデルラットの心筋細胞の短軸径を示す図である（実施例 4）。

【 図 9 - 1 】 図 9 - 1 は、抗ラット E x o n - 1 7 ペプチド抗体によって処置したモデルラットの遺伝子発現解析の結果を示す図である（実施例 4：G 3 P D H）。

【 図 9 - 2 】 図 9 - 2 は、抗ラット E x o n - 1 7 ペプチド抗体によって処置したモデルラットの遺伝子発現解析の結果を示す図である（実施例 4：E T - 1 / G 3、A n g i o t e n s i n o g e n / G 3）。

【 図 9 - 3 】 図 9 - 3 は、抗ラット E x o n - 1 7 ペプチド抗体によって処置したモデルラットの遺伝子発現解析の結果を示す図である（実施例 4：- M H C / G 3、- M H C / G 3）。

【 図 9 - 4 】 図 9 - 4 は、抗ラット E x o n - 1 7 ペプチド抗体によって処置したモデルラットの遺伝子発現解析の結果を示す図である（実施例 4：C o l - I / G 3、C o l - I I I / G 3）。

【 図 9 - 5 】 図 9 - 5 は、抗ラット E x o n - 1 7 ペプチド抗体によって処置したモデルラットの遺伝子発現解析の結果を示す図である（実施例 4：T G F - / G 3、T N F - / G 3）。

【 図 1 0 】 図 1 0 は、ヒト P N - 1 の抗細胞接着作用を測定した結果を示す図である（実施例 1 5）。

10

20

30

40

50

【図11】図11は、抗ヒトExon-17モノクローナル抗体のヒトPN-1活性阻害について測定した結果を示す図である（実施例16）。

【図12-1】図12-1は、急性心筋梗塞モデル作製後4週間後における抗ヒトExon-17モノクローナル抗体による心拡大の抑制を測定した結果を示す図である（実施例17：前壁厚、後壁厚）。

【図12-2】図12-2は、急性心筋梗塞モデル作製後4週間後における抗ヒトExon-17モノクローナル抗体による心拡大の抑制を測定した結果を示す図である（実施例17：拡張末期心内径、収縮末期心内径、心機能）。

【図12-3】図12-3は、急性心筋梗塞モデル作製後4週間後における抗ヒトExon-17モノクローナル抗体による心拡大の抑制を測定した結果を示す図である（実施例17：心拍数、梗塞エリア）。

10

発明を実施するための最良の形態

[0019]

1つの態様において、本発明は、抗細胞接着活性を有するペリオスチンに対する抗体を提供する。ここで、ペリオスチンは、細胞外マトリックスの一種であり、いくつかのサブライシングバリエーションの存在が知られており、そのいくつかは、心不全時等の心臓に特異的に発現する。心不全時等の心臓に特異的に発現するペリオスチンサブライシングバリエーションの機能を阻害する物質、すなわち阻害剤として、本発明においては、特異性が高い、ヒトへの安全性が高い、などの理由から、抗体を使用できる。本発明では、サブライシングバリエーションが形成されるC-末端ドメインのExon-17領域がコードするアミノ酸配列からなるペプチドを化学合成したものを抗原として、抗体を作製できるが、係るペプチドは、ペリオスチンタンパク質の酵素消化や遺伝子工学的手法などによっても得られ、その由来は問わない。

20

[0020]

本発明において、「抗細胞接着活性を有する」とは、接着している細胞を剥離若しくは脱離させる作用を有することである。また、「抗細胞接着活性を有さない」とは、接着している細胞を剥離若しくは脱離させることができないことであり、この時、細胞は接着状態を維持することとなる。抗細胞接着活性の有無は、心線維芽細胞などの細胞を培養プレートで培養して該細胞を培養プレートに接着させた後、検定用試料を添加して培養、洗浄して剥離した細胞を除去した後に、残存している細胞を染色し、接着していた細胞の残存状態を確認することにより、判断することができる。

30

[0021]

また、本発明において、抗細胞接着活性を有するペリオスチンとしては、好ましくは、配列番号1（ラットペリオスチンPN-1、838アミノ酸）、配列番号2（ヒトペリオスチンPN-1、836アミノ酸：ラットペリオスチンよりもN末端のシグナル配列が2アミノ酸少ない）、または配列番号8（マウスペリオスチンPN-1）のアミノ酸配列からなるペリオスチンを挙げることができる。

[0022]

ペリオスチンの抗細胞接着活性に関与する領域としては、例えばExon-17部位を挙げることができる。具体的には、例えば、配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するペリオスチンの配列番号3で示されるアミノ酸配列部分（配列番号1の672～698アミノ酸）、配列番号2で示されるアミノ酸配列を有するペリオスチンの配列番号4で示されるアミノ酸配列部分（配列番号2の670～696アミノ酸）、配列番号8で示されるアミノ酸配列を有するペリオスチンの配列番号21で示されるアミノ酸配列部分（配列番号8の672～698アミノ酸）が挙げられ、さらに、配列番号22、配列番号23、配列番号24または配列番号26で示されるアミノ酸配列、並びに配列番号34（配列番号22または配列番号23で示されるアミノ酸配列、並びに配列番号22または配列番号23のN末端アミノ酸残基1番目から6番目のアミノ酸配列）が挙げられる。

40

[0023]

[0024]

50

「ペリオスチンの抗細胞接着活性を中和する」とは、上述の「ペリオスチンの抗細胞接着活性に關与する領域」が有する作用ないし活性を阻害することであり、具体的には、例えば、上述の抗細胞接着活性に關与する部位を特異的に認識できる抗体を用いて、ペリオスチンの有する作用ないし活性を阻害することである。

[0 0 2 5]

1つの態様において、本発明の抗体は、上記のような抗原を用いて得られるモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体である。ここで、「モノクローナル抗体」とは、前述の抗原に反応性を有する任意のモノクローナル抗体であって、「モノクローナル抗体」には、前記の抗原を、マウス、ラット、ハムスター、モルモットあるいはウサギ等の哺乳動物に免疫して得られる天然型抗体、遺伝子組換技術を用いて製造され得るキメラモノクローナル抗体（キメラ抗体）及びヒト化モノクローナル抗体（ヒト化抗体；CDR-grafted抗体）、並びにヒト抗体産生トランスジェニック動物等を用いて製造され得るヒトモノクローナル抗体（ヒト抗体）も包含される。また、本発明の抗体は、IgG（IgG1, IgG2, IgG3, IgG4）、IgM、IgA、IgDあるいはIgE等のいずれのアイソタイプを有するモノクローナル抗体をも包含する。好ましくは、IgG（IgG1, IgG2, IgG3, IgG4）またはIgMである。

[0 0 2 6]

抗原に上記ペプチドを用いる場合には、それ自身抗原として用いることも可能であるが、抗原性を高めるために、上記ペプチドをポリビニルピロリドン、ラテックス、ポリメチルメタクリレートなどの巨大分子の物質に吸着させて免疫する方法、KLH（Keyhole Limpet Hemocyanin：スカシ貝ヘモシアニン）やBSA（牛血清アルブミン）などのキャリアー蛋白に結合して用いる方法等があり、いずれの方法をも使用することができる。一般的にはペプチドをキャリアー蛋白に結合して用いる方法が好ましく、結合方法は公知の方法を用いることができる（例えば、「続医薬品の開発、14巻、廣川書店、1991」）。ペプチドはキャリアー蛋白と結合させて方向性を持たせるために、ペプチドのC末端またはN末端にシステイン基を導入し、システイン基を介してキャリアー蛋白と結合させる方法が用いられる。この目的に合った結合方法であれば当技術分野において一般に用いられている架橋剤を用いることができる。スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート（以下「SMCC」と略す）や3-マレイミドベンゾイックアシッド-N-ヒドロキシサクシンイミドエステル（MBS）などが適している。モノクローナル抗体は、ケーラーとミルシュタインによる細胞融合法（G.Kohler et al Nature (1975) 256,495-7）により作製されたハイブリドーマを培養して分泌させ、その培養液から分離することにより調製される。すなわち、Exon-17がコードするアミノ酸配列を有するペプチド等で哺乳動物を免疫した後、この動物の抗体産生細胞をミエローマ細胞と融合させハイブリドーマを得る。Exon-17に結合する抗体を産生するハイブリドーマの検索は、例えばハイブリドーマ上清について抗原を固定したマイクロプレートを用いる酵素免疫測定法（以下「ELISA」と略す）によって行われる。免疫に使用する動物としては特に制限はなく、各種の哺乳動物、例えばマウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ネコ、イヌ等を使用することができる。モノクローナル抗体の作製には、上記の免疫動物のうち、取扱い易さ等の理由により一般にはBalb/cマウスが用いられるが、他の系統のマウスを使用することもできる。その際、免疫に用いる抗原の濃度は、十分な量の抗原刺激を受けたリンパ球が形成されるよう選択し、好ましくは1~100 µgの抗原を適当な濃度に生理食塩水などで希釈し、フロイント完全アジュバントあるいはフロイント不完全アジュバント等の懸濁液とし、動物に腹腔内注射または皮下注射などによって投与する。投与は2~4週毎に1~数回行う。最終免疫は通常1~100 µgの抗原を添加した生理食塩溶液を静脈注射または皮下注射などにより投与して行われる。最終免疫の数日後に細胞融合のため免疫した動物から抗原産生細胞、例えばリンパ球、好ましくは脾臓細胞またはリンパ節細胞を取り出す。次に、抗体産生細胞として脾臓細胞を用いた場合について説明するが、脾臓細胞以外の抗体産生細胞も同様に細胞融合に供し得る。細胞融合は、最終免疫3~4日後に無菌的に取り出した脾臓から調

10

20

30

40

50

製した脾臓細胞と適当なミエローム細胞を融合促進剤の存在下で細胞融合させる。融合に用いるミエローム細胞は、哺乳動物からのものでよいが、一般には、免疫に用いた動物と同じ種の動物に由来するものが好適であり、既に公知の種々の細胞株、例えばマウスではSP2/0-Ag14(SP2)[[Nature, 276, 269(1978)], NS-1-Ag4/1 (NS-1)、P3-X63Ag8U.1 (P3U1) [Curr. Top. Microbiol. Immunol. 81, 1-7(1978) : ATCCから入手可、ATCC No. CRL-1597]、P3-NS1-1-Ag4-1、P3-X63Ag8 (P3)、FO、X63Ag8.653 (X63.653)、210.RCY3.Ag1.2.3、S194/5XX0.BU1、SKO-007、GM15006TG-A12等が好適に使用され、ラットではY3.Ag1.2.3等が好適に使用される。好ましい融合促進剤として例えば、平均分子量が1000~6000のポリエチレングリコール(PEG)のほかセンダイウィルスも使用できる。融合時の脾臓細胞とミエローム細胞の混合比率は、一般に10:1~2:1の範囲が好ましい。

10

【0027】

融合した細胞よりハイブリドーマの分離は、未融合の脾臓細胞、未融合のミエローム細胞及び融合した細胞の混合物を未融合のミエローム細胞が生存できない選択培地で、未融合の細胞が死滅するまでの適当な時間(約1週間)培養することにより行える。選択培地は、例えばHAT培地(ヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含む培地)が使用される。この選択培地中では、未融合のミエローム細胞は死滅し、また未融合の脾臓細胞は、非腫瘍性細胞であるので、一定期間後(約1週間後)死滅するので、生育できる細胞を選択することによりハイブリドーマを得ることができる。目的の抗体を産生するハイブリドーマは、通常の限界希釈法によって、目的とする抗体の産生株の検索及び単クローン化が行える。このようにして得られた本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、生育に適した培地中で生育でき、また超低温冷凍庫や液体窒素中などで容易に長期に保存が可能である。このようにして得られたハイブリドーマは、栄養培地中あるいは哺乳動物の腹腔内で増殖させることにより抗体を産生させることができ、産生した抗体は培養上清あるいはその哺乳動物の腹水または血清から精製することができる。本発明のハイブリドーマとしては、例えば、平成18年11月1日付け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にFERM BP-10718として寄託されているハイブリドーマを使用することができる。抗体の精製は、遠心分離、透析、硫酸アンモニウム等による塩析、DEAEカラム等によるイオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過、アフィニティークロマトグラフィーなどの一般的な単離、精製方法を用いて行うことができる。かくして得られたモノクローナル抗体のアイソタイプ及びサブクラスの決定は以下のように行うことができる。まず、同定法としてはオクテルロニー(Ouchterlony)法、ELISA法、またはRIA法が挙げられる。オクテルロニー法は簡便ではあるが、モノクローナル抗体の濃度が低い場合には濃縮操作が必要である。一方、ELISA法またはRIA法を用いる場合は、培養上清をそのまま抗原吸着固相と反応させ、さらに第二次抗体として各種イムノグロブリンアイソタイプ、サブクラスに対応する抗体を用いることにより、モノクローナル抗体のアイソタイプ、サブクラスを同定することが可能である。また、さらに簡便な方法として、市販の同定用のキット(例えば、マウスタイパーキット;バイオラッド社製)等を利用することもできる。さらに、タンパク質の定量は、フォーリンロウリー法、及び280nmにおける吸光度[1.4(OD280)=イムノグロブリン1mg/ml]より算出する方法により行うことができる。この様にして得られた本発明のモノクローナル抗体は、配列番号1または配列番号2で示されるアミノ酸配列、配列番号3または配列番号4で示されるアミノ酸配列、配列番号34で示されるアミノ酸配列を有するペリオスチン(PN-1)、配列番号3または配列番号4で示されるアミノ酸配列からなるペプチド、または配列番号34で示されるアミノ酸配列を有するペプチドを特異的に認識する。好ましくは、本発明のモノクローナル抗体は、アミノ酸配列YTTKIITKVV(配列番号26)からなるペプチド、すなわちヒトペリオスチンExon-17ペプチド鎖のアミノ酸配列(配列番号4)におけるN末端から1番目のチロシンから9番目のバリンまでのアミノ酸配列からなるペプチド、およびヒトペリオスチンPN-1のアミノ酸配列(配列番号2)におけるN末端から669番目のチロシンから679番目のバリンまでのアミノ酸配列からなるペプチドを特異的に認識して結合することができる。すなわち、ヒトペリオスチンExon-17ペプチド

20

30

40

50

鎖のアミノ酸配列（配列番号4）のN末端のスレオニンから9番目のバリンまでのアミノ酸配列部位（TTKIITKV；配列番号22）或いはその一部を特異的に認識することができる。さらに好ましくは、本発明のモノクローナル抗体は、ヒトペリオスチンExon-17ペプチド鎖（配列番号4）のN末端から1番目のチロシンから9番目のバリンまでのアミノ酸配列（YTTKIITKV；配列番号26）からなるペプチドにおいて、N末端から1番目および8～10番目のアミノ酸をアラニンに置換したペプチドを認識して結合することができる。すなわち、ヒトペリオスチンExon-17ペプチド鎖のアミノ酸配列（配列番号4）またはラットペリオスチンExon-17ペプチド鎖のアミノ酸配列（配列番号3）の少なくともN末端から1番目のトレオニンから6番目のトレオニンまでのアミノ酸配列部位（配列番号34）またはその一部を特異的に認識することができる。さらに、本発明のモノクローナル抗体は、ヒトペリオスチン-1タンパク質の抗細胞接着作用を抑制または阻害する、すなわちヒトペリオスチン-1タンパク質の抗細胞接着作用を中和する活性を有する。さらに、心不全時等に引き起こされる心拡大、心肥大および心線維化を抑制し、心機能を改善させることができる。

【0028】

本発明の抗体としてポリクローナル抗体を使用する場合、ポリクローナル抗体は通常行われている方法、例えば「日本生化学会編、新生化学実験講座12、東京化学同人、1992」記載の方法によって得ることができる。免疫動物としては、特に限定されるものではないが、馬、山羊、羊、ウサギ、モルモット、マウス、ニワトリなどが挙げられる。免疫動物としてウサギを用いる場合には、抗原を適当な濃度に生理食塩水などで希釈し、完全フロイントアジュバント、不完全フロイントアジュバントまたは水酸化アルミニウムアジュバントなどの懸濁液とし、10～1000 μ g/回/匹を注射し、さらに2～4週間後に追加免疫注射を1～3回行い、抗血清を得る。注射は多数箇所の皮下に行うのが好ましい。抗血清からポリクローナル抗体の調製は、上記モノクローナル抗体の精製と同様の方法で行うことができる。この様にして得られた本発明のポリクローナル抗体は、配列番号1または配列番号2で示されるアミノ酸配列、配列番号3または配列番号4で示されるアミノ酸配列、配列番号34で示されるアミノ酸配列を有するペリオスチン（PN-1）、配列番号3または配列番号4で示されるアミノ酸配列からなるペプチド、または配列番号34で示されるアミノ酸配列を有するペプチドを特異的に認識する。好ましくは、本発明のポリクローナル抗体は、アミノ酸配列YTTKIITKV（配列番号26）からなるペプチド、すなわちヒトペリオスチンExon-17ペプチド鎖のアミノ酸配列（配列番号4）におけるN末端から1番目のチロシンから9番目のバリンまでのアミノ酸配列からなるペプチド、およびヒトペリオスチンPN-1のアミノ酸配列（配列番号2）におけるN末端から669番目のチロシンから679番目のバリンまでのアミノ酸配列からなるペプチドを特異的に認識して結合することができる。すなわち、ヒトペリオスチンExon-17ペプチド鎖のアミノ酸配列（配列番号4）のN末端のスレオニンから9番目のバリンまでのアミノ酸配列部位（TTKIIITKV；配列番号22）或いはその一部を特異的に認識することができる。さらに好ましくは、本発明のポリクローナル抗体は、ヒトペリオスチンExon-17ペプチド鎖（配列番号4）のN末端から1番目のチロシンから9番目のバリンまでのアミノ酸配列（YTTKIIITKV；配列番号26）からなるペプチドにおいて、N末端から1番目および8～10番目のアミノ酸をアラニンに置換したペプチドを認識して結合することができる。すなわち、ヒトペリオスチンExon-17ペプチド鎖のアミノ酸配列（配列番号4）またはラットペリオスチンExon-17ペプチド鎖のアミノ酸配列（配列番号3）の少なくともN末端から1番目のトレオニンから6番目のトレオニンまでのアミノ酸配列部位（配列番号34）またはその一部を特異的に認識することができる。さらに、本発明のポリクローナル抗体は、ヒトペリオスチンPN-1タンパク質の抗細胞接着作用を抑制または阻害する、すなわちヒトペリオスチンPN-1タンパク質の抗細胞接着作用を中和する活性を有する。さらに、心不全時等に引き起こされる心拡大、心肥大および心線維化を抑制し、心機能を改善させることができる。

【0029】

10

20

30

40

50

ヒト型抗体の作製

免疫グロブリンG（以下、単に「IgG」という。）は、分子量約23000の軽ポリペプチド鎖（以下「軽鎖」という）、分子量約50000の重ポリペプチド鎖（以下「重鎖」という）の各2本ずつから構成される。重鎖、軽鎖とも約110残基からなる、アミノ酸配列が保存されている領域の繰り返し構造を持ち、これらはIgGの3次元構造の基本単位（以下、「ドメイン」という。）を構成する。重鎖および軽鎖は、それぞれ連続した4個、および2個のドメインから構成されている。重鎖、軽鎖いずれにおいても、アミノ末端のドメインは他のドメインに比べ各抗体分子間でのアミノ酸配列の変異が大きく、このドメインは可変ドメイン（variable domain：以下、「Vドメイン」という。）と呼ばれる。IgGのアミノ末端においては、重鎖、軽鎖のVドメインが相補的に会合し可変領域を形成している。これに対し、残余のドメインは、全体として定常領域を形成する。定常領域は、各動物種に特徴的な配列を有し、例えば、マウスIgGの定常領域はヒトIgGの定常領域とは異なっているので、マウスIgGはヒトの免疫系によって異物として認識され、その結果、ヒト抗マウス抗体（Human Anti Mouse Antibody：以下「HAMA」という。）応答が起こる（Schroff RW. et al Cancer Res. (1985)45,879-85）。従って、マウス抗体はヒトに繰り返し投与することはできない。このような抗体をヒトに投与するためには、抗体の特異性を保持したままHAMA応答を起こさないように抗体分子を修飾する必要がある。X線結晶構造解析の結果によれば、一般に、このようなドメインは3本から5本の鎖からなる逆平行シートが二層重なり合った長円筒状の構造をとる。可変領域では、重鎖、軽鎖のVドメインそれぞれにつき各3個のループが集合し、抗原結合部位を形成する。この各ループは相補性決定領域（complementarity determining region：以下、「CDR」という。）と呼ばれ、アミノ酸配列の変異が最も著しい。可変領域のCDR以外の部分は、一般に、CDRの構造を保持する役割を有し、「フレームワーク」と呼ばれる。カバトらは、重鎖、軽鎖の可変領域の一次配列を多数収集し、配列の保存性にに基づき、それぞれの一次配列をCDRおよびフレームワークに分類した表を作成した（Kabatt et al. SEQUENCES OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5th edition, NIH publication, No.91-3242, E.A.）。また、各フレームワークは、アミノ酸配列が共通の特徴を有する複数のサブグループに分類された。さらに、ヒトとマウスの間で対応するフレームワークが存在することも見いだされた。このようなIgGの構造的特徴に関する研究から以下のヒト化抗体の作製法が考案された。研究初期の段階では、マウス由来抗体の可変領域をヒト由来の定常領域に接合したキメラ抗体が提案された（Morrison SL. et al Proc Natl Acad Sci U S A. (1984)81,6851-5）。しかし、そのようなキメラ抗体は、依然として、多くの非ヒトアミノ酸残基を含むので、特に長期間投与した場合にはHAMA応答を誘導しうる（Begent et al., Br. J. Cancer, (1990)62, 487）。

【0030】

ヒトに対しHAMA応答を発現する可能性のある、非ヒト哺乳動物由来のアミノ酸残基を更に少なくする方法として、CDR部分のみをヒト由来の抗体に組み込む方法が提案された（Peter T et al. Nature, (1986) 321, 522-5）が、一般に、抗原に対する免疫グロブリン活性を保持するにはCDRのみの移植では不十分であった。一方、チョッチアらは、1987年、X線結晶構造解析データを用い、（a）CDRのアミノ酸配列中には、抗原に直接結合する部位とCDR自体の構造を維持する部位とが存在し、CDRの取り得る三次元構造は、複数の典型的なパターン（カノニカル構造）に分類されること、（b）カノニカル構造のクラスは、CDRのみならずフレームワーク部分の特定の位置のアミノ酸の種類によって決定されること、を見いだした（Chothia C. et al. J. Mol. Biol. (1987)196, 901-17）。この知見に基づき、CDR移植法を用いる場合、CDRの配列に加え一部のフレームワークのアミノ酸残基もヒト抗体に移植する必要性が示唆された（特表平4-502408号）。一般に、移植すべきCDRを有する非ヒト哺乳動物由来の抗体は「ドナー」、CDRが移植される側のヒト抗体は「アクセプター」と定義され、CDR移植法を実施する際に考慮すべき点は、可能な限りCDRの構造を保存し、免疫グロブリン分子の活性を保持することにある。この目的を達成するためには、（a）アクセプターは、いずれのサブグループに属するものを選択すべ

10

20

30

40

50

きか、及び、(b)ドナーのフレームワークからいずれのアミノ酸残基を選択すべきか、の2点に留意する必要がある。

【0031】

クィーンらは、ドナーのフレームワークのアミノ酸残基が、以下の基準の少なくともひとつに該当する場合、CDR配列とともにアクセプターに移植するデザインの方法を提唱した(特表平4-502408号)：

(a)アクセプターのフレームワーク領域中のアミノ酸がその位置において稀であり、ドナーの対応するアミノ酸がアクセプターの前記位置において普通であること

(b)該アミノ酸がCDRのひとつのすぐ近くであること

(c)該アミノ酸が三次元免疫グロブリンモデルにおいてCDRの約3 Å以内に側鎖原子を有し、そして抗原とまたはヒト化抗体のCDRと相互作用することができると予想されること。

10

【0032】

本発明の抗Exon-17モノクローナル抗体の重鎖または軽鎖をコードするDNAは、上記抗Exon-17モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞よりmRNAを調製し、該mRNAを逆転写酵素でcDNAに変換してから、該抗体の重鎖または軽鎖をコードするDNAをそれぞれ単離することにより得ることができる。

【0033】

ヒト抗体の作製

本発明における「ヒト抗体」あるいは「ヒト免疫グロブリン」とは、免疫グロブリンを構成するH鎖の可変領域(VH)及びH鎖の定常領域(CH)並びにL鎖の可変領域(VL)及びL鎖の定常領域(CL)を含む全ての領域がヒトイムノグロブリンをコードする遺伝子に由来するイムノグロブリンである。換言すれば、H鎖がヒト免疫グロブリン重鎖遺伝子に由来し、軽鎖がヒト免疫グロブリン軽鎖遺伝子に由来するものである抗体を意味する。ヒト抗体は、常法に従って、例えば、少なくともヒトイムノグロブリン遺伝子をマウス等のヒト以外の哺乳動物の遺伝子座中に組込むことにより作製されたトランスジェニック動物を、抗原で免疫感作することにより、前述したモノクローナル抗体の作製法と同様に製造することができる。例えば、ヒト抗体を産生するトランスジェニックマウスは、既報(Mendez MJ et al. Nature Genetics (1997) 15, 146-56, Green LL et al. Nature Genetics (1994) 7, 13-21, 表平4-504365号公報; 国際出願公開WO94/25585号公報; 日経サイエンス、6月号、第40~第50頁、1995年; Nils L onberg et al. Nature (1994) 368, 856-9, 及び特表平6-500233号公報)に記載の方法に従って作製することができる。

20

30

【0034】

本発明で使用される抗体は、抗体の分子全体に限らず、抗細胞接着活性を有するペリオスチンの該活性を中和するものであれば、抗体の断片または誘導體であってもよい。

【0035】

抗体断片としては、例えば、Fab、F(ab')₂、Fv、一本鎖抗体(scFv)、ジスルフィド安定化抗体(dsFv)、CDRを含有するペプチド等を挙げることができる。

40

【0036】

本発明の抗体断片のうちFab、F(ab')₂等は、ペリオスチンの抗細胞接着活性を阻害する抗体をパイン、ペプシン等の蛋白質分解酵素で処理して得ることができ、また、得られた抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させて作製することができる。

【0037】

本発明の抗体断片のうちscFvは、ペリオスチンの抗細胞接着活性を阻害する抗体のH鎖V領域とL鎖V領域を、適当なペプチドリンカー等を用いて連結し、作製することができる。また、上記抗体のH鎖またはH鎖V領域をコードする遺伝子、およびL鎖または

50

L鎖V領域をコードする遺伝子の全配列又は所望のアミノ酸配列をコードするDNA部分を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させて作製することができる。

[0 0 3 8]

本発明の抗体断片のうちdsFvは、ペリオスチンの抗細胞接着活性を阻害する抗体のH鎖V領域とL鎖V領域のそれぞれ1アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドを該システイン残基間でジスルフィド結合を介して結合させた抗体断片であり、システイン残基に置換するアミノ酸残基は、抗体の立体構造予測により選択することができる。該抗体断片をコードする遺伝子の全配列又は所望のアミノ酸配列をコードするDNA部分を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させて作製することができる。

10

[0 0 3 9]

本発明の抗体断片のうちCDRを含有するペプチドは、ペリオスチンの抗細胞接着活性を阻害する抗体のH鎖またはL鎖のCDR領域のうち、少なくとも1つのCDR領域以上を含んで構成される。また複数のCDR領域を適当なペプチドリンカーを介する等の方法により結合させてもよい。該CDRを含有するペプチドは、これをコードする遺伝子の全配列又は所望のアミノ酸配列をコードするDNA部分を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させて作製することができる。また、Fmoc法またはtBoc法等の化学合成によっても作製できる。

[0 0 4 0]

20

また、本発明では、上述の抗体または抗体断片に、蛋白質または低分子化合物を結合させた誘導体を使用することができ、これら修飾は、公知の方法で行うことができる。

[0 0 4 1]

[0 0 4 2]

1つの態様において、本発明の抗体、抗体断片又は誘導体は、抗細胞接着活性を有するペリオスチンが関与する疾患を予防または治療するために使用することができる。抗細胞接着活性を有するペリオスチンが関与する疾患とは、疾患の病態時に抗細胞接着活性を有するペリオスチンの遺伝子の発現が高く、該遺伝子によりコードされる蛋白質の産生が増加している疾患である。また、該遺伝子または蛋白質の増加により、病態が悪化する疾患のことである。このような抗細胞接着活性を有するペリオスチンが関与する疾患としては、特に限定されるものではないが、心不全、心筋梗塞、心拡大、心肥大、心線維化、心筋症、心筋炎、弁膜症、癌、動脈瘤、動脈硬化、中枢神経変性疾患、腎臓病、関節リウマチ、骨粗しょう症、肺気腫、肺高血圧症、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、腎炎(急性及び慢性)、膵炎(急性及び慢性)、肝炎(急性及び慢性)、肝線維症または肺線維症を挙げることができる。また、本発明の抗体を適用できる癌としては、これに限定されるものではないが、例えば、乳癌、大腸癌、肺癌、悪性黒色腫、骨癌、膵臓癌、胃癌、皮膚癌、子宮癌、卵巣癌、直腸癌、結腸癌、子宮癌、卵管癌、食道癌、小腸癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、副腎癌、前立腺癌、膀胱癌、及び腎臓癌を挙げることができ、特に好適には、乳癌、大腸癌、肺癌、及び悪性黒色腫を挙げることができる。

30

[0 0 4 3]

40

本発明はまた、上記の抗体をマーカー標識することにより作製した心不全などの抗細胞接着活性を有するペリオスチンが関与する疾患の診断薬である。ここでマーカーとしては、酵素、放射性同位元素、蛍光色素等を用いることができる。ここで用いる酵素としては、ターンオーバー数(turn over number)が大きく、かつ酵素と結合しても安定であること、基質と特異的に反応して発色させることができる等の条件を満たす物であれば特に制限されるものではなく、通常の酵素免疫アッセイ(EIA)に用いられる酵素を使用することができる。好ましい酵素の例としては、ペルオキシダーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、グルコース-6-リン酸脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素等を用いることができる。また、酵素阻害物質や補酵素等を用いることもできる。

50

【 0 0 4 4 】

これら酵素と抗体との結合は、マレイミド化合物等の架橋剤を用いる公知の方法により行うことができる。基質としては、使用する酵素に応じて公知の物質を使用することができる。例えば酵素としてペルオキシダーゼを使用する場合には、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジンを用いることができる。また酵素としてアルカリフォスファターゼを用いる場合には、パラニトロフェノール等を用いることができる。マーカーとして用いる放射性同位元素としては、 ^{125}I や ^3H 等の通常のラジオイムノアッセイ (RIA) で用いられているものを使用することができる。蛍光色素としては、フルオレッセンスイソチオシアネート (FITC) やテトラメチルローダミンイソチオシアネート (TRITC) 等の通常の蛍光抗体法に用いられるものを使用することができる。また、本診断薬は、不全心間質を特異的に染色することが可能な、免疫組織学的染色として使用することができる。また、放射性同位体を標識した場合には、体内に投与することによって、心不全時の病変部を画像化するために使用することもできる。

10

【 0 0 4 5 】

本発明はまた、本発明の抗体、抗体断片又は誘導体を用いることによる、ヒト又は動物の血液から血清を調製した生体試料中、すなわち血清中における抗細胞接着活性を有するペリオスチンを検出または定量する方法であり、さらに検出又は定量することによる心不全などの抗細胞接着活性を有するペリオスチンが関与する疾患の診断方法である。本方法において、いわゆるサンドイッチ ELISA 法 (Enzyme-linked immunosorbent assay: 酵素免疫測定法) によって抗細胞接着活性を有するペリオスチンを検出することができる。本発明の診断キットを用いる場合には、まず抗ペリオスチン一次抗体を固相化したプレートに試料を接触させて両者を結合させ、この結合体にマーカー標識した抗ペリオスチン二次抗体を結合させ、この三者の結合体におけるマーカーのシグナル強度を測定することにより、抗細胞接着活性を有するペリオスチンを検出または定量することができる。特に抗細胞接着活性を有するペリオスチンは、心不全等の病態時に特異的に発現するスプライシングバリエーションであるので、その産生をモニターすることにより心不全等における病態の診断をすることができる。

20

【 0 0 4 6 】

このように、本発明の抗体を標識化して、二次抗体として使用する事が可能である。

【 0 0 4 7 】

本発明の抗体、抗体断片または誘導体を有効成分として含有する医薬組成物は、通常の製剤化の際に用いられる担体や賦形剤、その他の添加剤を用いて調製される。

30

【 0 0 4 8 】

本発明に係る医薬組成物の有効成分は、公知の薬理的に許容し得る担体、賦形剤、希釈剤等と混合して医薬に一般に使用されている投与方法、例えば、経口投与方法、又は静脈内投与、筋肉内投与もしくは皮下投与等の非経口投与方法によって投与するのが好ましい。本発明の医薬組成物は、例えば、有効成分を生理学的に許容される担体、香味剤、賦形剤、安定剤、希釈剤、乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤等と、適宜混和することにより製造することができ、錠剤、散剤、顆粒剤、溶液剤等として用いることができる。錠剤等に混和することができる添加剤としては、例えばゼラチンのような結合剤、コーンスターチのような潤沢剤等を用いることができ、また糖衣又は医溶性若しくは腸溶性物質のフィルムにより被膜してもよい。カプセルの剤型である場合には、前記の組成物に更に液状担体を含有させることができる。注射のための無菌組成物も、通常の処方を用いて製造することができる。注射用の水性液としては、ブドウ糖などを含む等張液などが挙げられ、ポリエチレングリコールのような適当な溶解補助剤などと併用してもよい。また、緩衝剤、安定剤、保存剤、酸化防止剤、無痛化剤などと配合してもよい。経口投与において、消化管内で有効成分が分解を受けやすい場合、消化管内で分解を受けにくい製剤、例えば活性成分をリポソーム中に包容したマイクロカプセル剤として経口投与することも可能である。また、直腸、鼻腔内、舌下、肺などの消化管以外の粘膜から吸収せしめる投与方法も可能である。この場合は、座剤、点鼻剤、舌下剤、経肺剤といった形態で投与するこ

40

50

とができる。

【0049】

本発明の医薬組成物の投与量は、治療に用いられる場合、治療に有効な投与量が決められるが、当該投与量は投与対象者の年齢、体重、症状の程度および投与経路等によって異なり、個々の場合に応じて決められる。通常、経口投与による場合、成人一日当たりの投与量は0.1～1000mg程度であり、これを1ないし数回に分けて投与すればよい。持続静脈内投与においては0.01μg/kg/min～1.0μg/kg/minの範囲で投与することができ、0.025μg/kg/min～0.1μg/kg/minで投与するのが望ましい。

【0050】

以下、実施例を用いて本発明について詳細かつ具体的に説明するが、本発明は以下の実施例によって限定されるものではない。

[実施例]

[製造例1] サブトラクション法によるペリオスチンの検索

1-1 心不全病態モデルラットの作製及び左心室サンプルの採取

雄性ダール食塩感受性ラット(Dahl-S)(清水実験材料)を6週齢より8%高食塩含有食で飼育し、心肥大期(11週齢)および心不全期(14週齢)に各3匹の左心室を採取した。

【0051】

1-2 mRNAの調整

総RNAは上記左心室約500mgからISOGÉN(ニッポンジーン社)を用いて説明書に記載の方法にしたがって調整した。次に心肥大期、心不全期それぞれ3匹分を合わせた総RNA約400μgよりFast Track 2.0 Kit(インビトロジェン社)を用いて説明書に記載の方法にしたがってmRNAを精製し、それぞれ約3μgのmRNAを回収した。

【0052】

1-3 cDNAサブトラクション

cDNAサブトラクションは、PCR-Select cDNA subtraction kit(クローンテック社)により、説明書に記載の方法にしたがって行った。すなわち、上記1-2で得られたmRNAそれぞれ2μgよりcDNAを合成し、制限酵素RsaIで消化した。次に、14週齢から合成されたcDNAをテスターcDNA、11週齢から合成されたcDNAをドライバーcDNAとし、テスターcDNAにkit添付の2種類のアダプターを別々に連結させた後、サブトラクトハイブリダイゼーションを行った。次に、アダプターに相補的なプライマーを用いてPCRを行い、発現量に違いのあるcDNA断片を特異的に増幅させ、増幅産物1を得た。

【0053】

また、同様のサブトラクションを11週齢から合成されたcDNAをテスターcDNA、14週齢から合成されたcDNAをドライバーcDNAとして行い、得られた増幅産物を増幅産物2とした。

【0054】

1-4 ドットプロットスクリーニング

A. ドットプロットの作製

増幅産物1をPCR IIベクター(インビトロジェン社)にTAクローニングし、挿入断片の入ったクローンを選択した。各クローンの挿入断片を増幅したPCR反応後、それぞれ1μLを熱処理後、2枚のナイロンメンブレンフィルター(ベーリンガー社)にドットプロットし、UVクロスリンカー(ストラタジーン社)により固定した。

【0055】

B. cDNAプローブの作製

増幅産物1を制限酵素RsaI及びEaeI、SmaIで消化し、アダプターを除去し、DIGハイプライムDNAラベリング/検出キットII(ベーリンガー社)を用いて説明

10

20

30

40

50

書に記載の方法に従ってDIG-dUTPでランダムプライム標識を行い、cDNAプローブ1を作製した。増幅産物2より同様にして、cDNAプローブ2を作製した。

【0056】

C.スクリーニング

上記Aで作製したドットプロットメンブランの1枚をcDNAプローブ1、他の1枚をcDNAプローブ2とハイブリダイゼーションを行った。具体的には、ベーリンガー社のDIGハイプライムDNAラベリング/検出キットIIを用いて、説明書に記載の方法にしたがい、DIGイーザーハイブ液中42℃で一晩ハイブリダイゼーションを行った。2×SSC、0.1%SDSで室温にて5分間2回、0.1×SSC、0.1%SDSで68℃にて15分間2回洗浄した後、キットに添付のブロッキングバッファー中でアルカリホスファターゼ標識抗DIG抗体と反応後、CSPD ready-to-useを加えて化学発光を進行させ、X線フィルムを露光させた。cDNAプローブ1でのシグナルがcDNAプローブ2でのシグナルより強いクローンをポジティブクローンとして選択し、塩基配列の決定を行った。

10

【0057】

1-5 塩基配列の決定

塩基配列は、THERMO Sequenase™ II dye terminator cycle sequencing kit (アマシャムファルマシア社)を用いて自動DNA配列読み取り装置モデル373A (PE Applied Biosystems社)で解析することにより決定した。得られた遺伝子配列をGenBankのデータベースに照会した結果、クローンの1つ(SF014)がマウスペリオスチン(GenBank Accession No. D13664)と86%ホモロジーのある遺伝子であることが判明した。

20

【0058】

[製造例2]ラットペリオスチン cDNAのクローニング

ラットペリオスチンcDNAの単離はgt10ベクターに挿入されたrat aorta cDNA library (クローンテック社)より作製した約4000クローンのファージサブプール10個(計約4万クローン)をSF014の塩基配列を基に設計したプライマー(1)5'-GTTCAATTGAAGGTGGCGATGGTC-3'(配列番号15)、(2)5'-GAGATAAAATCCCTGCATGGTCCT-3'(配列番号16)を用いてPCRスクリーニングを行い、3個のポジティブなサブプールを得た。そのうち1個のサブプールを上記PCRによって増幅された断片をAlkPhos Direct™ (アマシャムファルマシア社)を用いてアルカリフォスファターゼ標識したプローブを用いてハイブリダイゼーションによるスクリーニングを行い、1個のポジティブクローンラットペリオスチン#1を得た。その挿入断片をpBluescript II (ストラタジーン社)のEcoRI部位に組み込み、製造例1-5の方法に従って全塩基配列を決定した。

30

【0059】

得られたクローンの長さは約3kbであり、マウスペリオスチン(GenBank Accession No. D13664)の292番から3'-末端までに相当するものであり、5'-末端が欠けたクローンであることが示唆された。

40

【0060】

そこで、SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (クローンテック社)を用いて説明書に記載の方法にしたがって、rat aorta cDNAを鋳型として、上記プライマー(2)5'-GAGATAAAATCCCTGCATGGTCCT-3'(配列番号16)とラットペリオスチン#1の塩基配列を基に設計したプライマー(3)5'-CACGGTCGATGACATGGACAACACC-3'(配列番号17)を用いて5'-RACE反応を行った。得られたPCR産物をインビトロジェン社のPCR IIベクターにTAクローニングし、ラットペリオスチン5'RACE #1と命名した。塩基配列を製造例1-5の方法にしたがって決定した。

50

【0061】

その結果、ラットペリオスチン5' RACE #1は最初に得られたラットペリオスチン#1より5'方向に約300bp長いクローンであり、5'-末端はマウスペリオスチン(GenBank Accession No. D13664)の5'-末端より15bp長いクローンであった。さらにラットペリオスチン5' RACE #1の塩基配列を基に設計したプライマー(4)5'-ACGGAGCTCAGGGCTGAAGATG-3'(配列番号18)と上記プライマー(3)5'-CACGGTCGATGACATGGACAACACC-3'(配列番号17)を用いて上記rat aorta cDNA libraryより作製した約4万クロンのファージサブプール10個(計約40万クロン)をPCRスクリーニングすることにより2個のポジティブなサブプールを得た。そのうち1個のサブプールを上記PCRによって増幅される断片をプローブとしてハイブリダイゼーションによるスクリーニングを行い1個のポジティブクローンを得、ラットペリオスチン#2と命名した。挿入断片をpBluescriptII(ストラタジーン社)のEcoRI部位に組み込み、塩基配列を製造例1-5の方法にしたがって決定した。

10

【0062】

得られたクローンの長さは約2.6kbであり、5'-末端は5'-RACEで得られたクローンと同一であったが、3'-末端はマウスペリオスチン(GenBank Accession No. D13664)の2410番までに相当するクローンであった。また、先に得られたラットペリオスチン5' RACE #1の塩基配列とラットペリオスチン#2の相当する領域の塩基配列は全く同一であった。ラットペリオスチン#1とラットペリオスチン#2よりラットペリオスチンcDNAの完全長を完成させた。この完全長cDNAの塩基配列とこの塩基配列より翻訳されるアミノ酸配列を配列番号6及び1に示す。

20

【0063】

[製造例3] Myc-His-ラットペリオスチン融合タンパク質発現ベクターの構築

製造例2で得られたラットペリオスチン遺伝子のコード領域から翻訳されるタンパク質のカルボキシル末端にMycエピトープと6個のヒスチジンタグを有し、CMVプロモーターを有する発現ベクターを作製した。

【0064】

まず、pTracer-CMV2ベクター(インビトロジェン社)を制限酵素EcoRIとEcoRVで消化したベクター断片に、製造例2で得られたラットペリオスチン5' RACE #1を制限酵素EcoRIとHindIIIで消化して得られた約500bpの断片と製造例2で得られたラットペリオスチン#1を制限酵素HindIIIとHpaIで消化して得られた約2780bpの断片をライゲーションキット(宝酒造(株))を用いて連結し、得られたプラスミドをpTracer-CMV2/ラットペリオスチンと命名した。このようにして作製したpTracer-CMV2/ラットペリオスチンを制限酵素EcoRIとSmaIで消化し、ラットペリオスチン遺伝子のコード領域を含む約2330bpの断片を得、製造例2で得られたラットペリオスチン#1を鋳型としてその配列を基に設計したプライマー(5)5'-GACCCGGGAAGAACGCATCATC-3'(配列番号19)とラットペリオスチンの終止コドンの直前にBstEIIサイトが挿入されるように設計したプライマー(6)5'-TGGGTGAACCTGAGAACGGCCCTTCTCTTGATC-3'(配列番号20)を用いてPCRを行い、精製後、制限酵素SmaIとBstEIIで消化して約270bpの断片を得た。上記の2つの断片を、発現ベクター構築用のプラスミドpcDNA4/Myc-His/type C(インビトロジェン社)を制限酵素EcoRIとBstEIIで消化したベクター断片に、ライゲーションキット(宝酒造(株))を用いて連結し、得られたプラスミドをpcDNA4/Myc-His/ラットペリオスチンと命名した。挿入部分の全塩基配列は製造例に記載の方法により確認した。

30

40

【0065】

[製造例4] バキュロウイルス用発現ベクターの構築

50

製造例3で得られたプラスミドp c D N A 4 / M y c - H i s / ラットペリオスチンを、制限酵素S a c I及びP m e 1で消化し、ペプチド断片r a t P N - 1 / M y c - H i sを切り出した。これを、p F a s t B a c H T c (インビトロジェン社)を制限酵素S a c IとK p n I (b l u n t i n g)で消化して得られたベクター断片に、ライゲーションキット(宝酒造(株))を用いて連結し、得られた発現ベクターをp F a s t B a c / ラットペリオスチン - 1 / M y c - H i sと命名した。挿入部分の塩基配列は製造例1 - 5に記載の方法により確認した。

【0066】

[製造例5]組換えバキュロウイルスの調製および培養

E s c h e r i c h i a c o l iのD H 1 0 B A C細胞を、製造例5で得られたp F a s t B a c / ラットペリオスチン - 1 / M y c - H i sで形質転換し、組換えバキュロウイルスを調製した。得られたバキュロウイルスは、電気泳動およびP C Rにより、目的のものが挿入されていることを確認した。

10

【0067】

この組換えバキュロウイルスをM O I = 0 . 1にて感染させた昆虫S f 9細胞(2×10^6 cells/mL)を、無血清培地(S f - 9 0 0 I I S F M (インビトロジェン社製) 2 0 0 0 mL中にゲンタマイシンを5 0 μ g / mLの濃度になるように添加)中、2 8 °Cで4 ~ 5日培養した後、培養上清を回収した。

【0068】

[製造例6]ラットペリオスチンタンパク質の精製

製造例5で得られた培養上清2 0 0 0 mLを平衡化バッファー(5 0 mM酢酸ナトリウムバッファー pH6 . 0 0 . 1M塩化ナトリウム)で平衡化したS P s e p h a r o s e F a s t F l o w 1 0 mL b e dに供し、得られたFlow Through(通過分画)をS Pセファローズ通過分画とした。

20

【0069】

平衡化バッファーで2 8 0 nmの吸光度が0付近になるまで(約1 0 0 mL)洗浄し、S Pセファローズ洗浄分画とした。

【0070】

溶出バッファー(5 0 mMリン酸2水素ナトリウム(pH8 . 0)、0 . 5 M塩化ナトリウム、5 mMイミダゾール)1 0 0 mLで溶出し、S Pセファローズ溶出分画とした。次に、1 0 0 mLのS Pセファローズ溶出分画を、5 0 mMリン酸ナトリウムバッファーpH8 . 0、0 . 5 M塩化ナトリウムおよび5 mMイミダゾールで平衡化したN i - N T A a g a r o s e 5 mL b e dに供し、得られた通過分画をN i - N T Aアガロース通過分画とした。

30

【0071】

洗浄バッファー(5 0 mL リン酸2水素ナトリウム pH8 . 0、0 . 5 M塩化ナトリウム、5 mMイミダゾール)約5 0 mLで洗浄し、N i - N T Aアガロース洗浄分画とした。

【0072】

溶出バッファーは以下の通り((1)5 0 mMリン酸2水素ナトリウム、0 . 5 M塩化ナトリウム、2 0 mMイミダゾール、以降イミダゾール量が(2)3 0 mM、(3)4 0 mM、(4)5 0 mM、(5)6 0 mM)とし、それぞれ約2 5 mLで溶出し、N i - N T Aアガロース溶出分画(1)~(6)とした。

40

【0073】

ウエスタンブロット法により目的蛋白が含まれることが確認された分画を、1 mL以下に濃縮した。

【0074】

次に、脱気したP B S (-) (1 3 7 mM N a C l、8 . 1 mM N a 2 H P O 4、2 . 6 8 mM K C l、1 . 4 7 mM K H 2 P O 4)で平衡化したゲルろ過カラム(S e p h a c r y l S - 2 0 0 H R 1 1 mm x 9 5 cm;容量:9 0 b e d)に上記濃縮試

50

料を供し、PBS(-)で溶出し、凍結乾燥することにより、ラットペリオスチン精製タンパク質を得た。

【実施例1】

【0075】

ラットExon-17ペプチド鎖の合成およびポリクローナル抗体の作製

ノーマルのSDラットの心臓にPN-1遺伝子を高発現させると心拡大が惹起され、またダール心不全モデルラットの心臓にラットペリオスチンのアンチセンスオリゴヌクレオチドを投与すると生存率が改善されたことに加え、報告されてきたPN-2とは異なり、ラットPN-1には細胞接着作用が無いことが明らかとなったことを受け、ラットPN-1に特異的な構造は夫々の配列比較からExon-17配列であると同定した。このExon-17を構成するアミノ酸配列のN末端にCys残基を付加したペプチドを、純度80%以上にて10mg、化学合成した。キャリアタンパク質としてKLH6mgを結合させたものをウサギ(Kb1:JW)に免疫させた。免疫方法は初回免疫にはFCA(フロイント完全アジュバント)を使用し、2次免疫以降はFIA(フロイント不完全アジュバント)を使用した。また、投与部位は背部皮下20ヶ所、投与週は0、2、4、6週、投与量は初回免疫では800μgペプチド/匹、2次免疫以降では400μgペプチド/匹にて免疫した。抗体力価はELISA法にて測定し投与週7週目に全血清を集めた。その後、合成ペプチドを用いたアフィニティークラムを作製し、Exon-17ペプチドに特異的に反応する抗体のみを回収した。以降、上記の、ラットペリオスチンのExon-17がコードするペプチドに対するポリクローナル抗体を、抗ラットExon-17ペプチド抗体と称する。

実施例2

【0076】

*in vitro*におけるラットペリオスチンタンパク質(ラットPN-1)の抗細胞接着活性の有無の検討

文献記載の方法(Ruwhof C, van Wamel AE, Egas JM, van der Laarse A. Mol Cell Biochem. 2000 May; 208(1-2): 89-98、Ashizawa N, Graf K, Do YS, Nunohiro T, Giachelli CM, Meehan WP, Tuan TL, Hsueh WA. J Clin Invest. 1996 Nov. 15; 98(10): 2218-27)と同様な方法にて、ラットの心線維芽細胞を取得した。具体的には、生後1~2日齢のSDラット20匹をエーテル麻酔し、胸部をエタノールで消毒した。心臓を摘出しPBS(-)を入れたディッシュに入れ心臓を横断するように切って血液を出し、更にPBS(-)で3回洗浄後、出来るだけPBS(-)を捨て鉢にて細かく刻んだ。次に、PBS(-):コラゲナーゼ/トリプシンを1:1で混合し、37で15分間振盪した後、更にピペティングを行い出来る限り細胞を分離させた。次に、白金メッシュを遠心管に置いて細胞分離液をろ過し、10mlの10%血清入りM199培地と10mlのPBS(-)で白金メッシュを洗浄した。その後、遠心管を1500rpmで10分間遠心分離し、沈殿物として得られた細胞を、10%血清入りM199培地20mlで攪拌しディッシュに播いた。37、1時間放置後ディッシュに接着した細胞をラット心線維芽細胞として採取した。上述のラット心線維芽細胞を、96穴プレートに 6.4×10^4 個/100μlずつ播き、一夜培養後、培養液を10μg/mlのシクロヘキシミド(cycloheximide)を加えた10%FBS添加DMEM培地に変更し、37、1時間培養した。その後、予め37に温めたDMEM培地(serum free:無血清培地)で細胞を2度洗い、終濃度10μg/mlになるように製造例にしたがって製造したラットペリオスチンタンパク質(ラットPN-1)をDMEM培地(serum free)に添加した。陽性コントロールとして細胞接着促進作用を有するフィブロネクチンを、陰性コントロールとしてBSA(ウシ血清アルブミン)を用いた。37で1時間培養後の顕微鏡観察においてラットペリオスチンタンパク質(ラットPN-1)を添加した群は完全に細胞が剥がれたため、PBS(-)にて2度洗った後、10

10

20

30

40

50

%中性緩衝ホルマリン液にて30分間細胞を固定した。その後、PBS(-)にて3度洗った後、クリスタルバイオレットを用いて30分間細胞を染色した。その後、550nmのプレートリーダー(BIO-RAD、Model 680 MICRO PLATE READER)を用いて細胞の染色度を測定した(図2)。その結果、コントロールであるフィブロネクチンおよびBSAを投与した群ならびに無添加群では接着していた細胞の剥離は起こらず、抗細胞接着作用が見られなかったが、ラットペリオスチンタンパク質(ラットPN-1)を添加した群では細胞の剥離が認められたことから、ラットペリオスチンタンパク質(ラットPN-1)は接着細胞の剥離作用、すなわち抗細胞接着作用を有していることが明らかとなった。

実施例3

[0077]

*in vitro*における抗ラットExon-17ペプチド抗体の中和活性の検討実施例2と同様の方法で得たSDラット由来の心線維芽細胞を、96穴プレートに 6.4×10^4 個/100 μ lずつ播き、一夜培養後、培養液を10 μ g/mlのcycloheximideを加えた10%FBS添加DMEM培地に変更し、37 $^{\circ}$ C、1時間培養した。その後、予め37 $^{\circ}$ Cに温めたDMEM培地(serum free)で細胞を2度洗い、終濃度10 μ g/mlのラットペリオスチンタンパク質(ラットPN-1)と抗ラットExon-17ペプチド抗体を終濃度10 μ g/mlおよび100 μ g/mlになるようにDMEM培地(serum free)に添加した。陽性コントロールとしてラットペリオスチンタンパク質のみを、陰性コントロールとしてBSAを用いた。37 $^{\circ}$ Cで1時間培養後の顕微鏡観察においてラットペリオスチンタンパク質のみを添加した群はほぼ完全に細胞が剥がれたため、PBS(-)にて2度洗った後、10%中性緩衝ホルマリン液にて30分間細胞を固定した。その後、PBS(-)にて3度洗った後、クリスタルバイオレットを用いて30分間細胞を染色した。その後、550nmのプレートリーダー(BIO-RAD、Model 680 MICRO PLATE READER)を用いて細胞の染色度を測定した(図3)。その結果、抗ラットExon-17ペプチド抗体は、ラットペリオスチンタンパク質(ラットPN-1)による接着細胞の剥離を抑制する、つまりラットペリオスチンタンパク質(ラットPN-1)の抗細胞接着作用を抑制する、すなわちラットPN-1の抗細胞接着作用を中和する活性を有した抗体であることが判明した。

実施例4

[0078]

急性心筋梗塞モデルラットを用いた抗ラットExon-17ペプチド抗体の効果
体重250~300gのオスのルイスラットを用いて、ペントバルビタール麻酔薬(0.1ml/100g)を腹腔に投与し充分麻酔がかかった後に、ラット用手術台に固定した。経口より気管挿管しラット用のベンチレーターに接続し(一回換気量3ml、80回/分)、胸骨左第3肋間より皮膚を横切開して、その下にある大胸筋も横切開を加え、ラット用開胸器を用いて肋間を広げて心臓を露出させた。

[0079]

その後、左房の下付近にある左冠動脈を直径5mmの曲針を用いて1.0シルクで縛った。この時、左冠動脈の還流領域である前壁および側壁が赤色から白色に変化し冠血流が充分に遮断されており、同部位の壁運動が消失したことを目視下に確認し(シャムオベ群では針を冠動脈に通した後、糸で縛らず針を抜いた)、第3肋骨および第4肋骨を3.0シルクにて縛り固定した(この時肺を拡張させ胸郭の肺の外にある空気を出し、肺が拡張しやすいようにしてから縛った)。更に同様に皮膚の切開部位を3.0シルクにて縫い付けてからしばらく観察し、意識が回復し自発呼吸が出てきたことを確認してから抜管した。

[0080]

以上の手順により、順次、急性心筋梗塞モデルを作製した。

[0081]

翌日、イソフルレンによる経鼻麻酔下に経皮的な心臓超音波検査を行ない、梗塞サイズが左室全周の20%に満たない小さな梗塞モデルを除外した。その他の梗塞モデルを心機能

10

20

30

40

50

の悪い順に序列し、抗ラット Exon - 17 ペプチド抗体投与群とコントロール抗体（ウサギ IgG）投与群に交互に群分けし、各 200 μ g ずつを尾静脈より投与した。

【0082】

抗体は、モデル作製の翌日に投与し、更に初回投与の6日毎に計4回、各群に投与した。

【0083】

一方、1週間毎に8週間後まで経胸壁的に心臓超音波検査で心臓を評価した。8週間後には、ペントバルビタール麻酔薬下に気管挿管しベンチレーターに乗せた上で、左頸部より皮膚切開を行い、頸部の筋肉をピンセットで分けて、左総頸動脈を露出させ、左頸動脈起始部を糸かけて止血した上で、遠位部に小ハサミにて動脈に穴をあけ、同部位よりラットのミラーカテーテルを挿入し左心室内に圧モニターのあるカテーテルの先端が届くようにして、コンピューターに接続し、心機能および血圧等を測定した。

【0084】

モデル作製の4週後の心臓超音波検査の結果では、抗ラット Exon - 17 ペプチド抗体を投与した群ではウサギ IgG を投与したコントロール群に比べ、有意に、心臓の前壁厚および後壁厚が薄くなるのが抑制され、拡張末期心内径および収縮末期心内径の拡大が抑制され、ならびに心臓の収縮機能の指標である EF 値が上昇した。つまり、心拡大が抑えられ、心機能が改善したことが明らかとなった（図4-1～図4-3）。さらに、モデル作製の8週後の心臓超音波検査の結果においても、上記の4週後の結果と同様に、心拡大の抑制および心機能の改善が確認された（図5-1～図5-3）。この結果より、抗ラット Exon - 17 ペプチド抗体投与後約4週間後においても、該抗体による心拡大の抑制および心機能の改善効果が維持されることが示唆された。次に、血行動態においては、コントロール IgG 抗体投与群に比べ抗ラット Exon - 17 ペプチド抗体投与群では最大内圧変化率（ $(+)$ dP/dT）、最小内圧変化率（ $(-)$ dP/dT）及び左室拡張末期圧（LVEDP）に有意な差が得られたことから、心機能の改善が示唆された。（図6-1～図6-3）。マッソントリクローム染色した心臓切片において、抗ラット Exon - 17 ペプチド抗体を投与した群ではコントロール IgG 抗体を投与した群に比べ、青色に染まる部位が減少しており、線維化が抑制された（図7）。また、心筋細胞の短軸径の計測により抗ラット Exon - 17 ペプチド抗体を投与した群ではコントロール IgG 抗体を投与した群に比べ、有意に心筋細胞の短軸径の菲薄化が抑制されたことが明らかとなった（図8）。この結果は心臓超音波検査における結果と関連している。さらに、梗塞部位と非梗塞部位に分けた遺伝子発現解析の結果、非梗塞部位において、中和抗体投与群におけるエンドセリン-1（ET-1）、Collagen type I、III、TGF- β の発現量が、コントロール抗体投与群に比べ有意に減少し、sham群とほぼ同等になり、改善効果がみられた（図9-1～図9-5）。

【実施例5】

【0085】

ヒトペリオスチン-1 cDNA の完全長クローニング

ヒト心臓由来 Total RNA（クロンテック社製、Catalog No. 64100-1、Lot No. 4120493）1 μ g から作製した cDNA をテンプレートとして、全長クローニング用プライマーセンス鎖 5'-AAGCTAGCCACCATGATTCCTTTTACCCAT-3'（配列番号27）とアンチセンス鎖 5'-AACTCCACAATTTCCCTCAT-3'（配列番号28）を用いて KOD plus DNA ポリメラーゼ（東洋紡社製）により PCR を行い、得られた PCR 産物を Zero Blunt TOPO PCR Cloning kit（インビトロジェン社製）を用いてクローン化した。

【0086】

このクローン群からヒトペリオスチン Exon - 17 に相当する領域でセンス鎖 5'-TAA CCAAAGTTGTGGAACCAA-3'（配列番号29）を、また、Exon - 21 に相当する領域でアンチセンス鎖 5'-TGTGTCTCCCTGAAGCAGTC-3'（配列番号30）を作製し、これらのプライマーを用いて検出されるクローンを選別した。次に、選別したクローンの塩基配列を決定

10

20

30

40

50

リスプライシングの起きていないクローンを選別し、ヒトペリオスチン-1 cDNAの完全長クローニングを完成させ、得られたクローンはpCR4/ヒトペリオスチン-1と命名した。

【実施例6】

【0087】

in vitro 翻訳用ヒトペリオスチン-1発現ベクターの構築

実施例5で得られたプラスミドpCR4/ヒトペリオスチン-1を、制限酵素Pme I及びNot Iで消化し、DNA断片ヒトペリオスチン-1を切り出しblunting処理を行った。これを、CATCACCATCACCATCACTAA(6xHis+終止コドン)(配列番号31)を予め挿入したpTNT発現ベクター(プロメガ社製)のマルチクローニングサイトのMlu Iサイトを酵素消化後blunting処理を行い、ライゲーションキット(宝酒造(株)社製)を用いて連結した。

【0088】

次に、Hisタグとのフレームを合わせる目的で合成リンカー(sense鎖5'-CTAGAAGACGATTAAGGGAAGGTCGTTCTCAGCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCC-3'(配列番号32)とantisense鎖5'-GGGCCCTGGAACAGAAGTTCCAGCTGAGAACGACCTTCCCTTAATCGTCTT-3'(配列番号33))を作製し、制限酵素Xba IとSma Iで消化したベクター断片にライゲーションキットを用いて連結した。連結部分の塩基配列を確認し、得られた発現ベクターをpTNT/ヒトペリオスチン-1/Hisと命名した。

【実施例7】

【0089】

in vitro 翻訳によるタンパク質の合成

実施例6で得られた発現ベクターはTNT SP6 Quick Coupled Transcription/Translation Systems(プロメガ社製)に供してin vitroでのタンパク質の合成を行った。詳しくはpTNT/ヒトペリオスチン-1/His発現ベクター2µgに対し、SP6 Quick Master Mixを40µl、1mMメチオニン1µl、DEPC処理水にて総量50µlとし、30で90分間反応させ精製するまで-80で保存した。

実施例8

【0090】

ヒトペリオスチンタンパク質(PN-1)の精製

実施例7で得られた合成タンパク質はMagZ Protein Purification System(プロメガ社製)を用いて精製した。詳しくは実施例7で得られた合成タンパク質にMagZ Binding/Wash bufferを2倍量加え良く混ぜた試料をMagZ Binding Particleに添加した。これを4で1時間攪拌した後、上清を除いてMagZ Binding/Wash bufferにて4回MagZ Binding Particleを洗浄後、MagZ Elution bufferにて合成タンパク質を溶出し使用するまで-80で保存した。

実施例9

【0091】

ヒトペリオスチンのExon-17ペプチド鎖に対するモノクローナル抗体の作製

(1) 抗原の作製

ヒトペリオスチンExon-17を構成するアミノ酸配列(配列番号4)のN末端にCys残基を付加したペプチド(配列番号25)を、Fmoc法にて化学合成し、純度90%以上のペプチド10mgを得た。このペプチド5mgにキャリアタンパク質としてKLH(CALBIOCHEM社製)5mgを結合させ、抗原溶液を得た。すなわち、KLHをPBS(0.01M)に溶解して3.3mg/mLに調整し、0.2524mg/mLのMBS溶液(GEヘルスケアバイオサイエンス社製)を滴下して室温で60分間攪拌し反応させた。ジクロロメタンを用いてフリーのMBSを除き、KLH-MBを得た。このKLH-MB5mgと、0.01Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.2)に溶解した抗

10

20

30

40

50

原ペプチド5mgとを混合し、4で12時間攪拌して反応させ、抗原溶液を得た。

(2) 免疫

6週齢のBALB/c雌性マウス3匹の両足に、(1)で得られたKLH結合抗原ペプチド100μgを含む抗原溶液50μlと、FCA(フロイント完全アジュバント)50μlとの混合乳濁液全量を皮下注射した。その後2週間間隔で2回、用時調製した上記抗原溶液とFIA(フロイント不完全アジュバント)との混合乳濁液を両足に投与した。その後、そのマウスを頸椎脱臼により致死させ、無菌的に足部リンパ節を採取した。

RPMI培地(コージンバイオ株式会社製)を供給しながら上記リンパ節を破砕し、孔径約10μmのメッシュを通過させてRPMI培地に懸濁状態のリンパ節細胞を得た。これを1000rpm、10分間の遠心分離にかけて、リンパ節細胞を沈殿画分として得た。この沈殿画分に、0.84%の塩化アンモニウム溶液に20mMのHEPES緩衝液(pH7.4)を加えた溶液1mlを入れて溶血させ、赤血球を除いた後、1,000rpm、5分間の遠心分離にかけた。得られた沈殿画分(細胞画分)をRPMI培地で数回洗浄し、細胞融合に用いた。

10

(3) ミエローム細胞の調製

8-アザグアニン耐性でかつイムノグロブリン非分泌型のマウスミエローム細胞株P3X63Ag8U.1(P3U1株)を、20%のウシ胎児血清(FCS)を含むRPMI培地で、10%CO₂・37インキュベーター内で培養し、対数増殖期にある細胞を集め、1,000rpm、5分間の遠心分離にかけて沈殿画分として細胞のみを取得し、RPMI培地に懸濁させた。

20

(4) 細胞の融合

(2)で得た免疫化リンパ節細胞10⁸~3×10⁸個を含むRPMI培地と、(3)で得たミエローム細胞10⁸個を含むRPMI培地とを混合した後、1,000rpm、10分間の遠心分離にかけた。上清を静かに除いて沈殿画分として細胞を取得し、これに25%(w/v)のポリエチレングリコール1500(PEG1500、ペーリガー社製)1mlを加えた後、更にRPMI培地をゆっくりと加えて総量を10mlとした。これに20%FCSを含むRPMI培地10mlを加えて、少し静置させた後、1,000rpm、5分間の遠心分離にかけ、得られた沈殿画分(細胞画分)に20%FCSを含むRPMIを加えて細胞濃度が10⁶個/mlになるように調整した細胞懸濁液を、コーニング社製の96穴培養プレートに200μL/wellずつ分注した。5%CO₂・37インキュベーター中で24時間培養後、HAT溶液(インビトロジェン社製)を添加した後、更に2週間培養した。

30

(5) ELISA法によるスクリーニング

培養上清が抗原ペプチドと反応する陽性wellのスクリーニングを行った。

【0092】

アッセイ用の抗原溶液には、(1)で得られた抗原ペプチド2mgに、キャリアタンパク質として卵白アルブミン(OVA)を結合させたコンジュゲートを用いた。

【0093】

96穴マイクロタイタープレート(ファルコン353912)の各wellを、上記コンジュゲート1μg/mlで4下一夜静置してコーティングした。このプレートを洗浄後、(4)の培養上清(モノクローナル抗体を含む)50μlを各wellに滴下し、37のインキュベーター内で2時間放置した後、PBS(-)(リン酸緩衝液)で洗浄した。これにアルカリフォスターゼ結合ヒツジ抗マウスIgG抗体(Zymed社製)を加え、37インキュベーターで1時間放置し、PBS(-)で洗浄後、発色基質剤(ALP)を加えて20分間発色させ、プレートリーダー(BIO-RAD、Model 680MICROPLATE READER)で各wellのOD490nmの吸光度(抗体価)を測定し、抗原ペプチドとの反応性を確認し、培養上清が抗原ペプチドと反応する陽性wellを決定した。

40

(6) 抗体産生細胞のクローニング

(5)のELISA法で抗原ペプチドとの反応性が確認された陽性well内の細胞が

50

ら、限界希釈法により、抗体産生細胞株のクローニングを行った。すなわち、陽性well内の細胞を96穴培養プレートの各wellに撒き込み、5%CO₂・37℃インキュベーター内で2週間培養した。各wellの培養上清について、(5)の方法と同様に、ELISA法にて、抗原ペプチドとの反応性を確認し、陽性wellについて、再度、限界希釈法によるクローニングを行い、抗原ペプチドとの反応性が高く、細胞コロニーの発育が良好な30個の細胞を得た。これら細胞を24穴培養プレートに移し、5%CO₂・37℃インキュベーター内で2週間培養した。培養上清について、再び、(5)の方法と同様に、ELISA法にて、抗原ペプチドとの反応性(抗体価)を確認した。OD490nmの吸光度が高かった10well内の細胞、すなわち10個のハイブリドーマ細胞株を、抗体産生細胞として有用であると判断し、選別した。

10

【0094】

【化1】

ハイブリドーマ細胞株

No.	OD値
1	0.41
2	0.37
3	0.68
4	0.24
5	0.33
6	0.32
7	0.33
8	0.32
9	0.12
10	0.3

20

30

40

【0095】

このようにして得た抗体産生細胞は、本発明抗体である抗ヒトExon-17モノクローナル抗体を常時産生するので、この抗体産生細胞を培養した培養液の上清液は、直接、本発明抗体溶液として使用することができる。なお、上記の抗ヒトExon-17モノクローナル抗体を産生する抗体産生細胞株(ハイブリドーマ)No.1(SBM337)は、平成18年11月1日付け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にFERM B

50

P - 10718として寄託されている。

(7) ヒトペリオスチンタンパク質 (PN - 1) との結合性の確認

(6) で得られた抗体産生細胞10個が産生する抗体と、ヒトペリオスチンタンパク質 (PN - 1) との結合性について、ドットプロット法にて確認した。すなわち、実施例8で得られた合成タンパク質 (30 µg/ml) を5 µl ずつHybond-ECLニトロセルロースメンブレン (GEヘルスケアバイオサイエンス株式会社製) にスポットし、TBS溶液 (10 mM Tris - HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl) で1回洗浄した。ブロッキングバッファー (ブロックエース、雪印乳業株式会社製) を加えて、室温で1時間振盪した。メンブレンに(6) で得られたモノクローナル抗体 (一次抗体) の1 µg/ml 濃度溶液を加えて3時間振盪した後、TBS溶液で10分間振盪洗浄を4回行った。メンブレンにHRP標識抗マウスIgG抗体 (プロメガ社製) (二次抗体) の0.4 mg/ml 濃度溶液を加えて室温にて1時間振盪した後、メンブレンをTBS溶液で10分間振盪洗浄を4回行った。検出用試薬 (ECL plus western blotting detection system、GEヘルスケアバイオサイエンス株式会社製) を加えて1分間反応させ、化学発光法により検出した。その結果、(6) でクローニングした抗体産生細胞10個全てが、ヒトペリオスチンPN - 1と結合することが確認された。

10

(8) モノクローナル抗体の大量調製と精製

BALB/cマウスの腹腔内にプリスタン[2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン (和光純薬製)] 0.5 ml を投与し、2~3週間飼育した。予め、対数増殖期に維持しておいたモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ No.1およびNo.3を回収し、培養上清を除いた沈殿画分の細胞にFCS不含のRPMI培地を加え、細胞数が 1×10^7 個/mlになるように細胞液を調製した。この細胞液を、プリスタン前投与したBALB/cマウスの腹腔中に注入し、3週間後頃から漏出した腹水を腹部より注射器で回収した。採取した腹水を、孔径0.22 µm のフィルターを用いて濾過した後、濾液をプロテインG-セファロースカラム (Millipore、11511324) によるアフィニティークロマトグラフィーによって常法に従い精製し、抗ヒトExon - 17モノクローナル抗体2種を調製した。

20

【実施例10】

【0096】

30

抗ヒトExon - 17モノクローナル抗体のヒトペリオスチンExon - 17ペプチド鎖における認識部位解析

得られたモノクローナル抗体2種 (No.1およびNo.3) についてヒトペリオスチンExon - 17ペプチド鎖における認識部位の解析 (エピトープの同定) を行った。すなわち、セルロースメンブレン上に、ヒトペリオスチンExon - 17ペプチド鎖 (配列番号4; 1位のスレオニンから27位のグルタミン酸まで) のN末端から-9番目のフェニルアラニンから、C末端から9番目のイソロイシンまでの計45個のアミノ酸からなるアミノ酸配列において、下記のアミノ酸10個からなるペプチド36種を膜結合型ペプチドアレイを作製した (シグマアルドリッチジャパン株式会社カスタムSpots サービス)。

【0097】

40

【化2】

1	FKEIPVTVYT	
2	KEIPVTVYTT	
3	EIPVTVYTTK	
4	IPVTVYTTKI	
5	PVTVYTTKII	
6	VTVYTTKIIT	
7	TVYTTKIITK	
8	VYTTKIITKV	10
9	YTTKIITKVV	
10	TTKIITKVVE	
11	TKIITKVVEP	
12	KIITKVVEPK	
13	IITKVVEPKI	
14	ITKVVEPKIK	
15	TKVVEPKIKV	
16	KVVEPKIKVI	20
17	VVEPKIKVIE	
18	VEPKIKVIEG	
19	EPKIKVIEGS	
20	PKIKVIEGSL	
21	KIKVIEGSLQ	
22	IKVIEGSLQP	
23	KVIEGSLQPI	
24	VIEGSLQPII	30
25	IEGSLQPIIK	
26	EGSLQPIIKT	
27	GSLQPIIKTE	
28	SLQPIIKTEG	
29	LQPIIKTEGP	
30	QPIIKTEGPT	
31	PIIKTEGPTL	
32	IIKTEGPTLT	40
33	IKTEGPTLTK	
34	KTEGPTLTKV	
35	TEGPTLTKVK	
36	EGPTLTKVKI	

【 0 0 9 8 】

このメンブレンを少量のメタノール中で5分間放置した後、TBS溶液で3回洗浄した。ブロッキングバッファー（カゼイン、SPOTsに添付）を加えて、室温で2時間攪拌した。メンブレンに実施例9（8）で得られたモノクローナル抗体（一次抗体）の1 μg / m

1 濃度溶液を加えて3時間振盪した後、TBS溶液中で10分間振盪洗浄を3回行った。メンブレンにHRP標識抗マウスIgG抗体(プロメガ社製)(二次抗体)の0.4 μg/ml濃度溶液を加えて2時間インキュベートした後、メンブレンをTBS溶液で5分間振盪洗浄を3回行った。検出用試薬(SuperSignal West Pico、Pierce社製)を加えて1分間反応させ、化学発光法により検出した。その結果、モノクローナル抗体No.1およびNo.3は、アミノ酸配列YTTKIITKVV(配列番号26)からなる合成ペプチドNo.9、すなわちヒトペリオスチンExon-17ペプチド鎖のアミノ酸配列(配列番号4)におけるN末端から1番目のチロシンから9番目のバリンまでであり、ヒトペリオスチンPN-1のアミノ酸配列(配列番号2)におけるN末端から669番目のチロシンから679番目のバリンまでのアミノ酸配列からなるペプチドとのみ反応し、結合した。

10

【実施例11】

【0099】

抗ラットExon-17ポリクローナル抗体のヒトペリオスチンExon-17ペプチド鎖における認識部位解析

実施例1で作製したポリクローナル抗体について、実施例10と同様に、ヒトペリオスチンExon-17ペプチド鎖における認識部位の解析(エピトープの同定)を行った。その結果、実施例10のモノクローナル抗体と同様に、該ポリクローナル抗体は合成ペプチドNo.9とのみ反応し、モノクローナル抗体と同様の部位を特異的に認識していることが明らかとなった。従って、ラットペリオスチンExon-17ペプチドを抗原としてポリクローナル抗体を作製しても、ヒトペリオスチンExon-17ペプチドを抗原としてモノクローナル抗体を作製しても、同様な特異性をもつ抗体が得られることが示唆された。

20

【実施例12】

【0100】

ラットペリオスチンタンパク質(PN-1)との結合性の確認

得られたモノクローナル抗体2種(No.1およびNo.3)について、ラットペリオスチンタンパク質(PN-1)との結合性について、ドットプロット法にて確認した。すなわち、製造例6で得られた精製タンパク質(30 μg/ml)を5 μlずつHybond-ECLニトロセルロースメンブレン(GEヘルスケアバイオサイエンス株式会社製)にスポットし、TBS溶液(10 mM Tris-HCl(pH 8.0)、150 mM NaCl)で1回洗浄した。ブロッキングバッファー(ブロックエース、雪印乳業株式会社製)を加えて、室温で1時間振盪した。メンブレンにモノクローナル抗体(一次抗体)の1 μg/ml濃度溶液を加えて3時間振盪した後、TBS溶液で10分間振盪洗浄を4回行った。メンブレンにHRP標識抗マウスIgG抗体(プロメガ社製)(二次抗体)の0.4 μg/ml濃度溶液を加えて室温にて1時間振盪した後、メンブレンをTBS溶液で10分間振盪洗浄を4回行った。検出用試薬(ECL plus western blotting detection system、GEヘルスケアバイオサイエンス株式会社製)を加えて1分間反応させ、化学発光法により検出した。その結果、得られたモノクローナル抗体2種はラットペリオスチンPN-1とも結合することが確認された。

30

40

【実施例13】

【0101】

抗ヒトExon-17モノクローナル抗体のエピトープ解析

実施例10の結果から、抗ヒトExon-17モノクローナル抗体のエピトープ部分はヒトペリオスチンExon-17ペプチド鎖(配列番号4)のN末端のスレオニンから9番目のバリンまでのアミノ酸配列(TTKIITKVV;配列番号22)を認識していることが明らかとなり、また実施例12の結果において、抗ヒトExon-17モノクローナル抗体がラットペリオスチンタンパク質(PN-1)とも結合することが確認された。このことから、抗ヒトExon-17モノクローナル抗体のエピトープ部分はヒトペリオスチンExon-17ペプチド鎖(配列番号4)のN末端のスレオニンから9番目のバリンまでの

50

アミノ酸配列 (TTKIITKVV; 配列番号 22) のうち、ヒトとラットの種間においてアミノ酸に相違がない部分、すなわち、ヒトペリオスチン Exon - 17 ペプチド鎖 (配列番号 4) またはラットペリオスチン Exon - 17 ペプチド鎖 (配列番号 3) の N 末端のスレオニンから 7 番目のリジンまでのアミノ酸配列の全部またはその一部分を認識していることが示唆された。そこで、さらに詳細にエピトープ部分を解析するために、アラニンスクランの手法にて解析を行った。

【 0 1 0 2 】

ヒトペリオスチン Exon - 17 ペプチド鎖 (配列番号 4) の N 末端から - 1 番目のチロシンから 9 番目のバリンまでのアミノ酸配列 (YTTKIITKVV; 配列番号 26) のうち、一部のアミノ酸をアラニンに変換した下記 10 種のペプチドを純度 80% 以上で合成した。

- # 1 YTTKIITKVV
- # 2 ATTKIITKAA
- # 3 AATKIITKAA
- # 4 AAAKIITKAA
- # 5 AAAAAITKAA
- # 6 AAAAAITKAA
- # 7 ATTKIITAAA
- # 8 ATTKIIAAAA
- # 9 ATTKIAAAAA
- # 10 ATTKAAAAAA

1 mg の合成ペプチドを PBS (-) 50 μ l で可溶化させ、1.5 μ l ずつ Hybrid-ECN 硝化セルロースメンブレン (GEヘルスケアバイオサイエンス株式会社製) にスポットし、TBS 溶液で 1 回洗浄した。ブロッキングバッファー (ブロックエース、雪印乳業株式会社製) を加えて、室温で 1 時間振盪した。メンブレンに実施例 9 (8) で得られたモノクローナル抗体 (一次抗体) の 1 μ g/ml 濃度溶液を加えて 3 時間振盪した後、TBS 溶液で 10 分間振盪洗浄を 4 回行った。メンブレンに HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (プロメガ社製) (二次抗体) の 0.4 μ g/ml 濃度溶液を加えて室温にて 1 時間振盪した後、メンブレンを TBS 溶液で 10 分間振盪洗浄を 4 回行った。検出用試薬 (SuperSignal West Pico, Pierce 社製) を加えて 1 分間反応させ、化学発光法により検出した。

【 0 1 0 3 】

その結果、該モノクローナル抗体は、上記合成ペプチド # 7 (ヒトペリオスチン Exon - 17 ペプチド鎖 (配列番号 4) の N 末端から - 1 番目のチロシンから 9 番目のバリンまでのアミノ酸配列 (YTTKIITKVV; 配列番号 26) からなるペプチドにおいて、N 末端から 1 番目および 8 ~ 10 番目のアミノ酸をアラニンに置換したペプチド) と強く反応し、# 1 (ヒトペリオスチン Exon - 17 ペプチド鎖の (配列番号 4) の N 末端から - 1 番目のチロシンから 9 番目のバリンまでのアミノ酸配列 (YTTKIITKVV; 配列番号 26) からなるペプチド) および # 2 (ヒトペリオスチン Exon - 17 ペプチド鎖 (配列番号 4) の N 末端から - 1 番目のチロシンから 9 番目のバリンまでのアミノ酸配列 (YTTKIITKVV; 配列番号 26) からなるペプチド) において、N 末端から 1 番目および 9 ~ 10 番目のアミノ酸をアラニンに置換したペプチド) とは弱く反応し、# 3 (ヒトペリオスチン Exon - 17 ペプチド鎖 (配列番号 4) の N 末端から - 1 番目のチロシンから 9 番目のバリンまでのアミノ酸配列 (YTTKIITKVV; 配列番号 26) からなるペプチド) において、N 末端から 1 ~ 2 番目および 9 ~ 10 番目のアミノ酸をアラニンに置換したペプチド) および # 8 (ヒトペリオスチン Exon - 17 ペプチド鎖 (配列番号 4) の N 末端から - 1 番目のチロシンから 9 番目のバリンまでのアミノ酸配列 (YTTKIITKVV; 配列番号 26) からなるペプチド) において、N 末端から 1 番目および 7 ~ 10 番目のアミノ酸をアラニンに置換したペプチド) とは更に弱く反応した。

実施例 14

[0 1 0 4]

抗ラットExon-17ポリクローナル抗体のヒトペリオスチンExon-17ペプチド鎖における認識部位解析

実施例1で作製したポリクローナル抗体について、実施例13と同様に、ヒトペリオスチンExon-17ペプチド鎖における認識部位の解析(エピトープの同定)を行った。その結果、実施例13のモノクローナル抗体と同様に、該ポリクローナル抗体は合成ペプチドNo. #7と強く反応し、#1および#2とは弱く反応し、#3および#8とは更に弱く反応し、モノクローナル抗体と同様の部位を特異的に認識していることが明らかとなった。従って、ラットペリオスチンExon-17ペプチドを抗原としてポリクローナル抗体を作製しても、ヒトペリオスチンExon-17ペプチドを抗原としてモノクローナル抗体を作製しても、同様な特異性をもつ抗体が得られることが示唆された。

10

実施例15

[0105]

in vitroにおけるヒトペリオスチンタンパク質(ヒトPN-1)の抗細胞接着活性の有無の検討

実施例2と同様に、ヒト心線維芽細胞(大日本製薬(株)社製、catalog No. CS-ABI-5118)を、96穴プレートに 6.4×10^4 個/ $100 \mu\text{l}$ ずつ播き、一夜培養後、培養液を $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ のシクロヘキシミド(cycloheximide)を加えた10%FBS添加CSC培地(Cell System Corporation製)に変えて、 37°C 、1時間培養した。その後、予め 37°C に温めたCSC培地(serum free)で細胞を2度洗い、終濃度 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ になるように実施例にしたがって作製したヒトペリオスチンタンパク質(ヒトPN-1)をCSC培地(serum free)に添加した。陽性コントロールとして細胞接着促進作用を有するフィブロネクチンを、陰性コントロールとして細胞接着作用を持たないBSA(ウシ血清アルブミン)を用いた。 37°C で3.5時間培養後の顕微鏡観察においてヒトペリオスチンタンパク質を添加した群は完全に細胞が剥がれたため、PBS(-)にて2度洗った後、10%中性緩衝ホルマリン液にて30分間細胞を固定した。その後、PBS(-)にて3度洗った後、クリスタルバイオレットを用いて30分間細胞を染色した。その後、 550nm のプレートリーダー(BIO-RAD、Model 680 MICRO PLATE READER)を用いて細胞の染色度を測定した(図10)。その結果、コントロールであるフィブロネクチンおよびBSAを投与した群ならびに無添加群では抗細胞接着作用が見られなかったが、ヒトペリオスチンタンパク質(ヒトPN-1)を添加した群では細胞の剥離が認められたことから、ヒトペリオスチンタンパク質(ヒトPN-1)は抗細胞接着作用を有していることが明らかとなった。

20

30

実施例16

[0106]

in vitroにおける抗ヒトExon-17モノクローナル抗体の中和活性の検討

実施例3と同様に、ヒト心線維芽細胞を、96穴プレートに 6.4×10^4 個/ $100 \mu\text{l}$ ずつ播き、一夜培養後、培養液を $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ のcycloheximideを加えた10%FBS添加CSC培地に変更し、 37°C 、1時間培養した。その後、予め 37°C に温めたCSC培地(serum free)で細胞を2度洗い、終濃度 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ のヒトペリオスチンタンパク質(ヒトPN-1)と抗ヒトExon-17モノクローナル抗体(No.1およびNo.3)を終濃度 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ になるようにCSC培地(serum free)に添加した。陽性コントロールとしてヒトペリオスチンタンパク質(ヒトPN-1)のみを、陰性コントロールとしてBSAを用いた。 37°C で3.5時間培養後の顕微鏡観察においてヒトペリオスチンタンパク質(ヒトPN-1)のみを添加した群はほぼ完全に細胞が剥がれたため、PBS(-)にて2度洗った後、10%中性緩衝ホルマリン液にて30分間細胞を固定した。その後、PBS(-)にて3度洗った後、クリスタルバイオレットを用いて30分間細胞を染色した。その後、 550nm のプレートリーダー(BIO-RAD、Model 680 MICRO PLATE READER)を用いて細胞の染色度を測定した(図11)。その結果、抗ヒトExon-17モノク

40

50

ローナル抗体は、ヒトペリオスチンタンパク質（ヒトPN-1）の抗細胞接着作用を抑制する、すなわちヒトペリオスチンタンパク質（ヒトPN-1）の抗細胞接着作用を中和する活性を有した抗体であることが判明した。

また、上述のように、ヒトペリオスチンタンパク質（ヒトPN-1）のExon-17に対する抗体であり、かつ、Exon-17のN末端1番目から6番目のアミノ酸配列或いはその一部を特異的に認識する抗体により、ヒトペリオスチンタンパク質（ヒトPN-1）の抗細胞接着作用が抑制されたことから、Exon-17、少なくともExon-17のN末端1番目から6番目のアミノ酸配列からなるペプチド部分又はその一部が、ヒトペリオスチンタンパク質（ヒトPN-1）の抗細胞接着作用に関与する領域を構成していることが示唆された。

10

実施例17

[0107]

急性心筋梗塞モデルラットを用いた抗ヒトExon-17モノクローナル抗体の効果

実施例4と同様に、体重250～300gのオスのルイスラットを用いて、ペントバルビタール麻酔薬（0.1ml/100g）を腹腔に投与し充分麻酔がかかった後に、ラット用手術台に固定した。経口より気管挿管しラット用のベンチレーターに接続し（一回換気量3ml、80回/分）、胸骨左第3肋間より皮膚を横切開して、その下にある大胸筋も横切開を加え、ラット用開胸器を用いて肋間を広げて心臓を露出させた。

[0108]

その後、左房の下付近にある左冠動脈を直径5mmの曲針を用いて1.0シルクで縛った。この時、左冠動脈の還流領域である前壁および側壁が赤色から白色に変化し冠血流が十分に遮断されており、同部位の壁運動が消失したことを目視下に確認し（シャムオペ群では針を冠動脈に通した後、糸で縛らず針を抜いた）、第3肋骨および第4肋骨を3.0シルクにて縛り固定した（この時肺を拡張させ胸郭の肺の外にある空気を出し、肺が拡張しやすいようにしてから縛った）。更に同様に皮膚の切開部位を3.0シルクにて縫い付けてからしばらく観察し、意識が回復し自発呼吸が出てきたことを確認してから抜管した。

20

[0109]

以上の手順により、順次、急性心筋梗塞モデルを作製した。

[0110]

翌日、イソフルレンによる経鼻麻酔下に経皮的な心臓超音波検査を行ない、梗塞サイズが左室全周の20%に満たない小さな梗塞モデルを除外した。その他の梗塞モデルを心機能の悪い順に序列し、抗ヒトExon-17モノクローナル抗体（No.3）投与群とコントロール抗体（ウサギIgG）投与群に交互に群分けし、各200μgずつを尾静脈より投与した。

30

[0111]

抗体は、モデル作製の翌日に投与し、更に初回投与の6日毎に計4回、各群に投与した。

[0112]

一方、1週間毎に4週間後まで経胸壁的に心臓超音波検査で心臓を評価した。モデル作製の4週後の心臓超音波検査の結果では、抗ヒトExon-17モノクローナル抗体を投与した群ではウサギIgGを投与したコントロール群に比べ、有意に、心臓の前壁厚および後壁厚が薄くなるのが抑制され、拡張末期心内径および収縮末期心内径の拡大が抑制され、ならびに心臓の収縮機能の指標であるFS値或いはEF値が上昇した。つまり、心拡大が抑えられ、心機能が改善したことが明らかとなった（図12-1～図12-3）。また、上述のように、急性心筋梗塞モデルラットにおいて、ヒトペリオスチンタンパク質（ヒトPN-1）のExon-17に対する抗体であり、かつ、少なくともExon-17のN末端1番目から6番目のアミノ酸配列を含んで構成されているエピトープを持つ抗体により、心拡大の抑制および心機能の改善効果が示されたことから、ヒトペリオスチンタンパク質（ヒトPN-1）のExon-17、特に少なくともExon-17のN末端

40

50

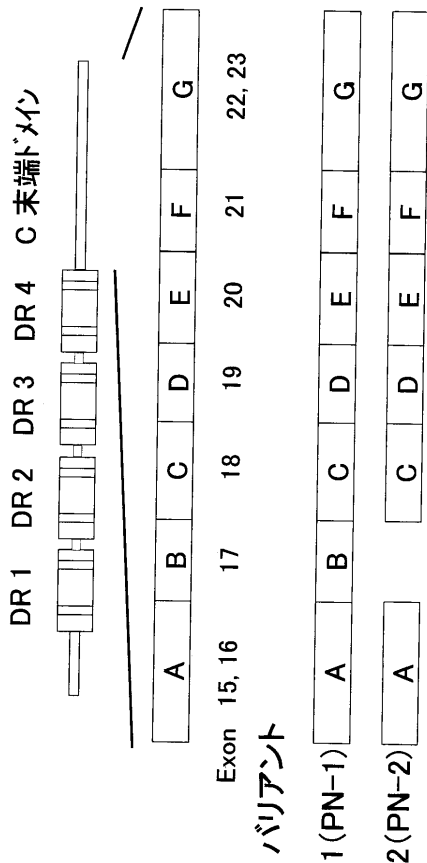
1番目から6番目のアミノ酸配列からなるペプチド部分を含む領域が、心筋梗塞後の心拡大および心機能の悪化に關与する領域であることが示唆された。

産業上の利用可能性

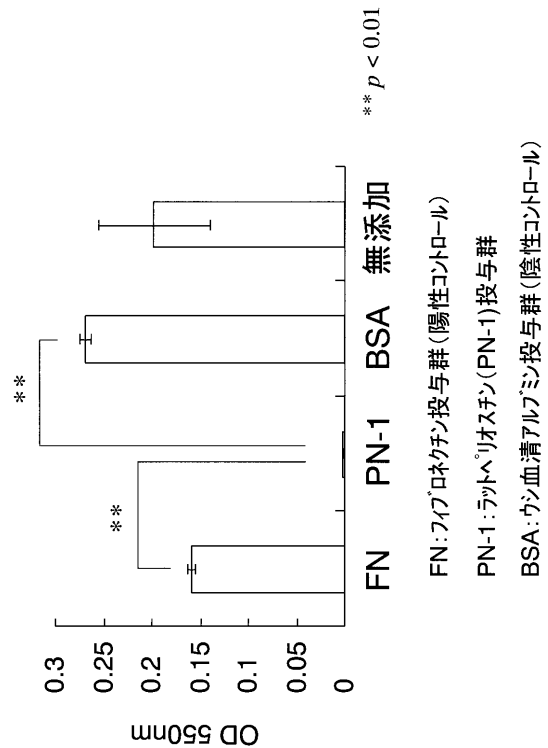
[0 1 1 3]

抗細胞接着活性を有するペリオスチンに対する抗体を用いることにより、心不全などの疾患で発現が増大する抗細胞接着活性を有するペリオスチンの作用を抑制し、病態の増悪の抑制および組織の機能の改善を行うことにより、ペリオスチンが關与する疾患の予防および治療を行うことができる。また、患者の生体試料中の該ペリオスチン量を測定することにより、疾患の有無および病状の進行程度を知ることができる。

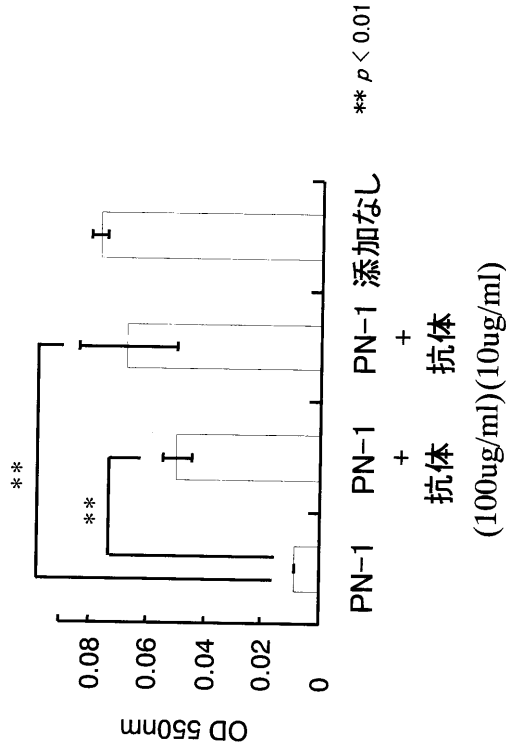
【 図 1 】



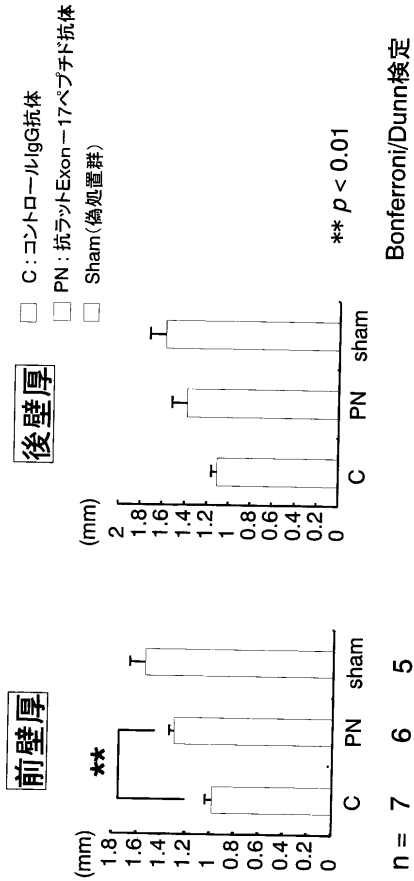
【 図 2 】



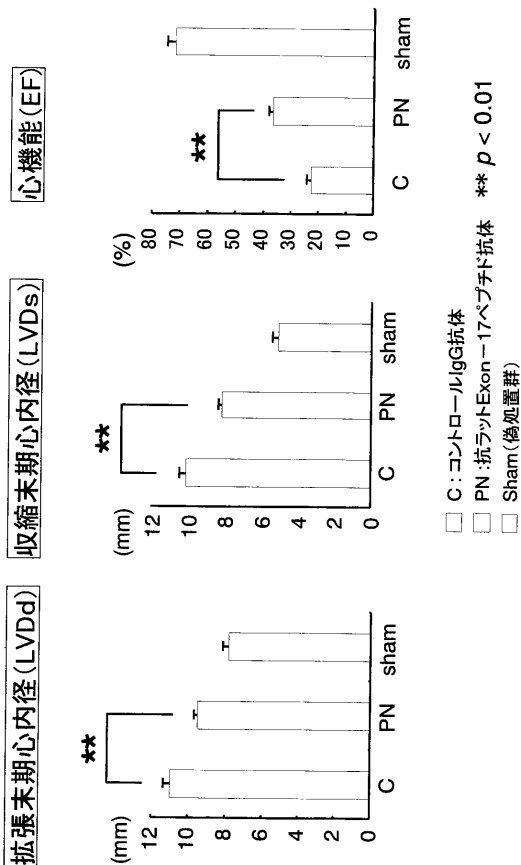
【 図 3 】



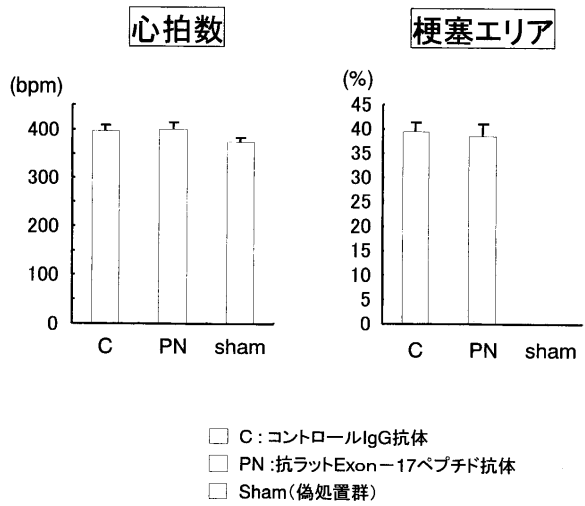
【 図 4 - 1 】



【 図 4 - 2 】



【 図 4 - 3 】



拡張末期心内径 (LVDD)

収縮末期心内径 (LVDS)

心機能 (EF)

心拍数

梗塞エリア

前壁厚

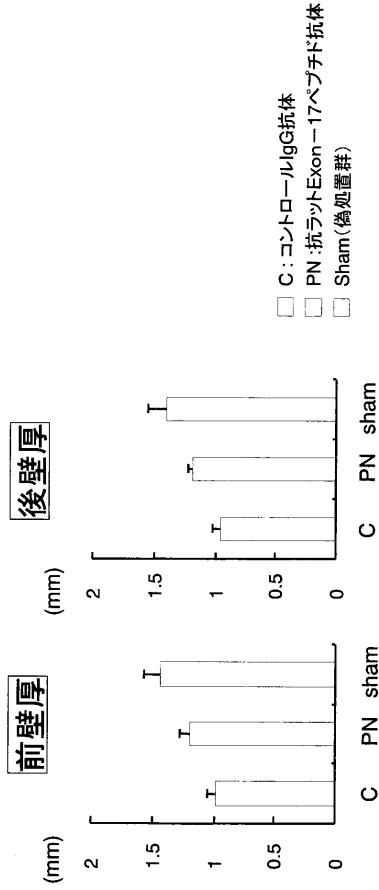
後壁厚

Bonferroni/Dunn検定

□ C : コントロールIgG抗体
 □ PN : 抗ラットExon-17ペプチド抗体
 □ Sham (偽処置群)

□ C : コントロールIgG抗体
 □ PN : 抗ラットExon-17ペプチド抗体
 □ Sham (偽処置群)

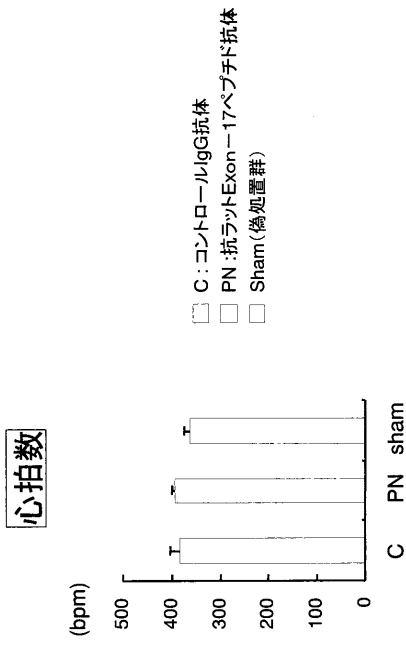
【 図 5 - 1 】



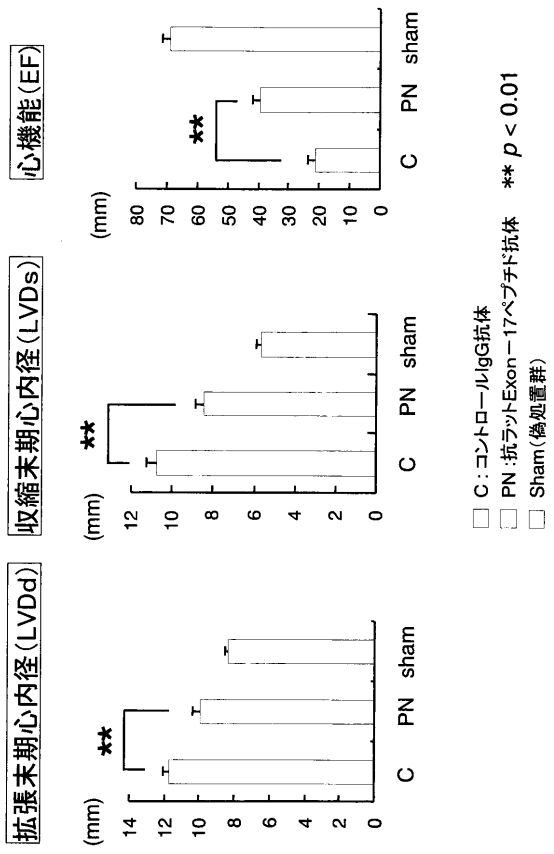
Bonferroni/Dunn検定

n = 7 6 5

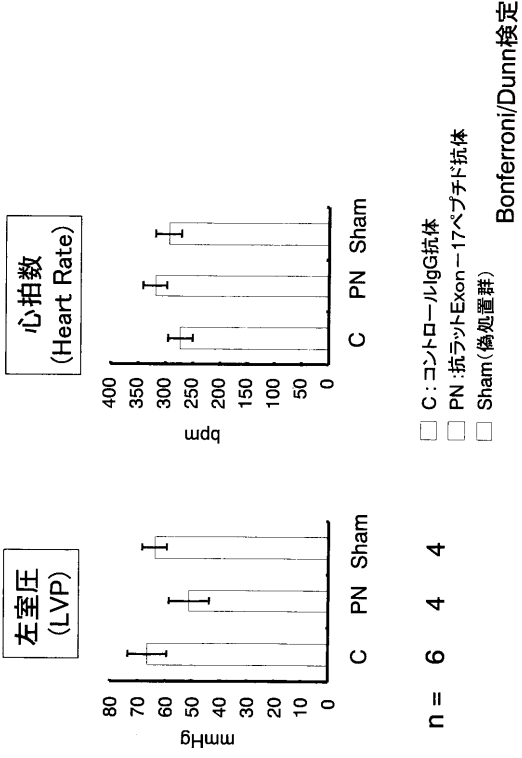
【 図 5 - 3 】



【 図 5 - 2 】



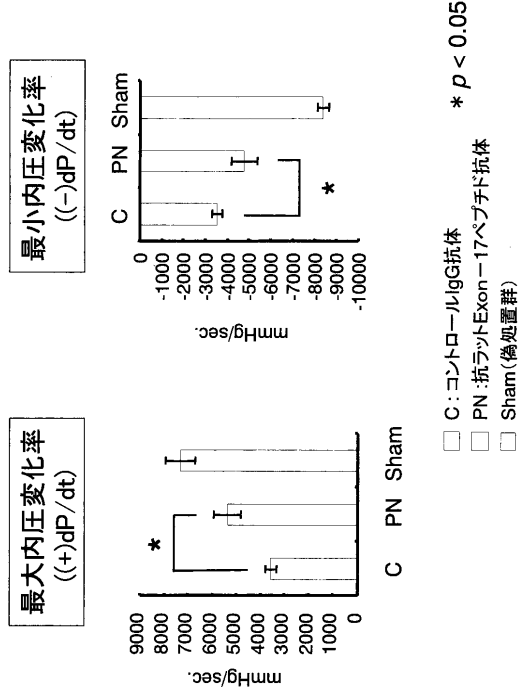
【 図 6 - 1 】



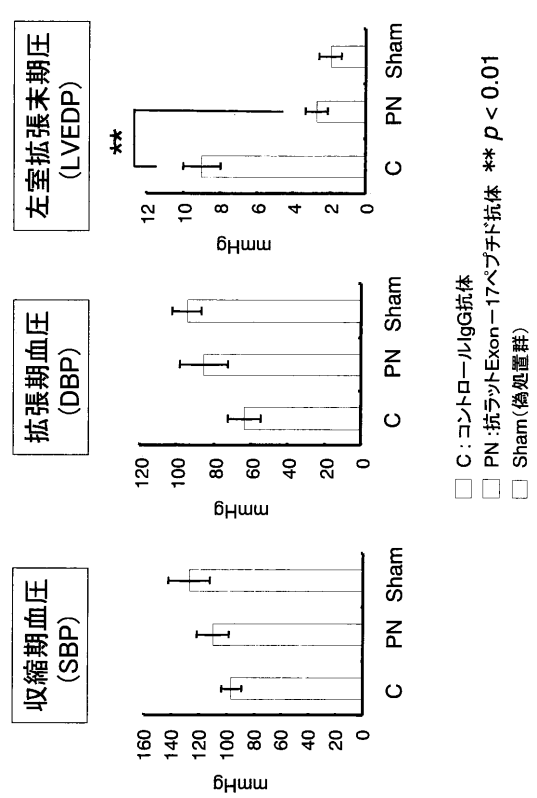
Bonferroni/Dunn検定

n = 6 4 4

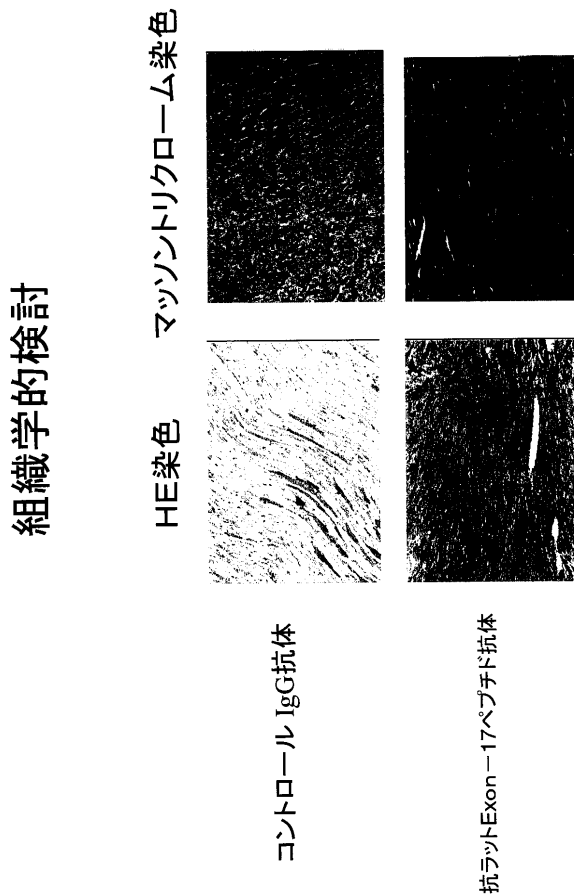
【 図 6 - 2 】



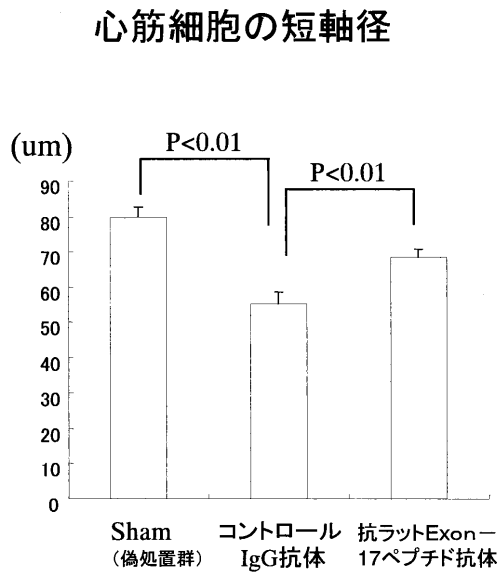
【 図 6 - 3 】



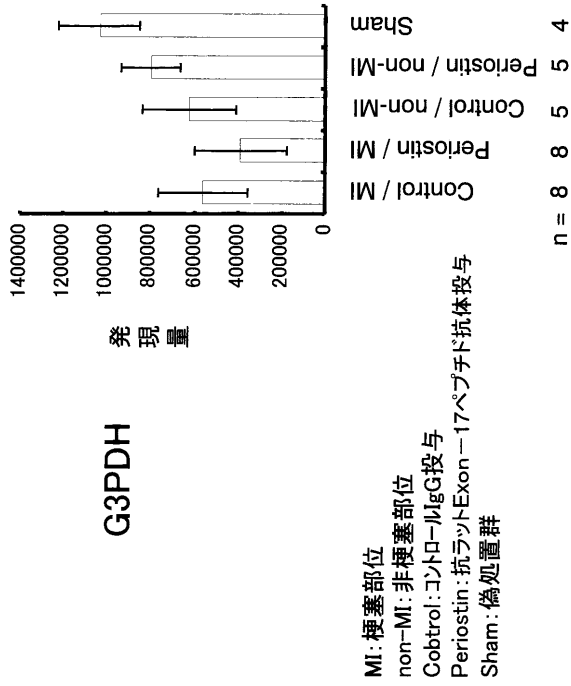
【 図 7 】



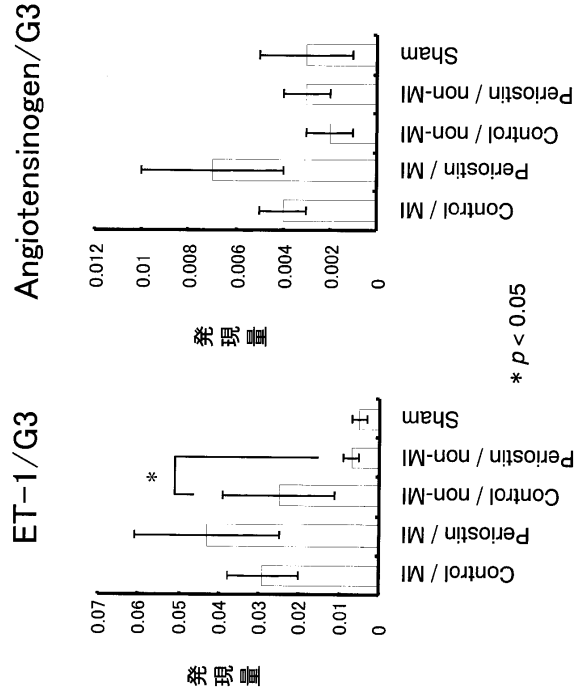
【 図 8 】



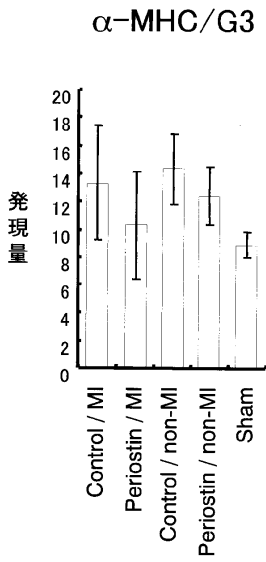
【図9-1】



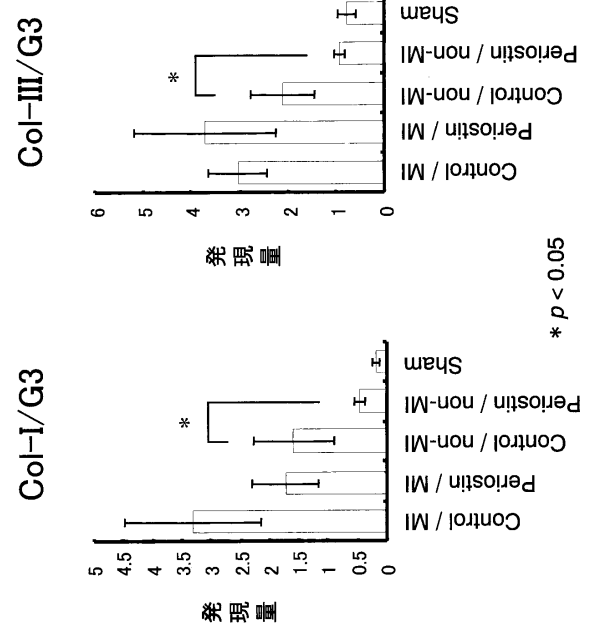
【図9-2】



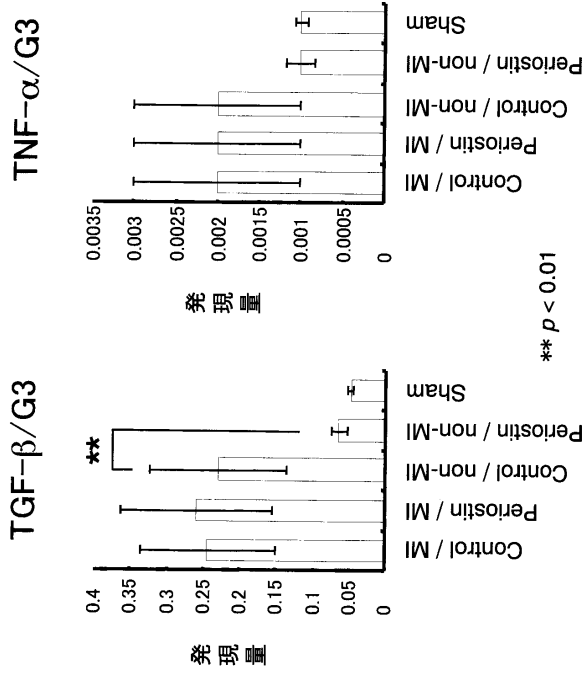
【図9-3】



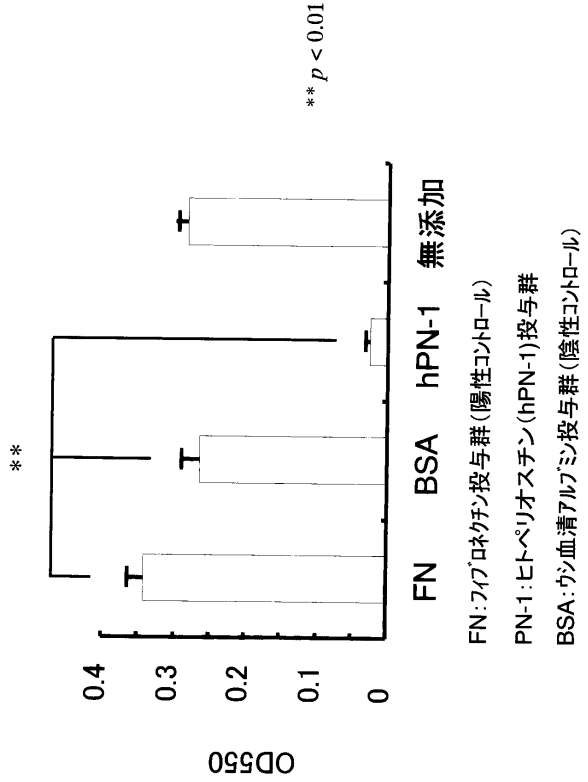
【図9-4】



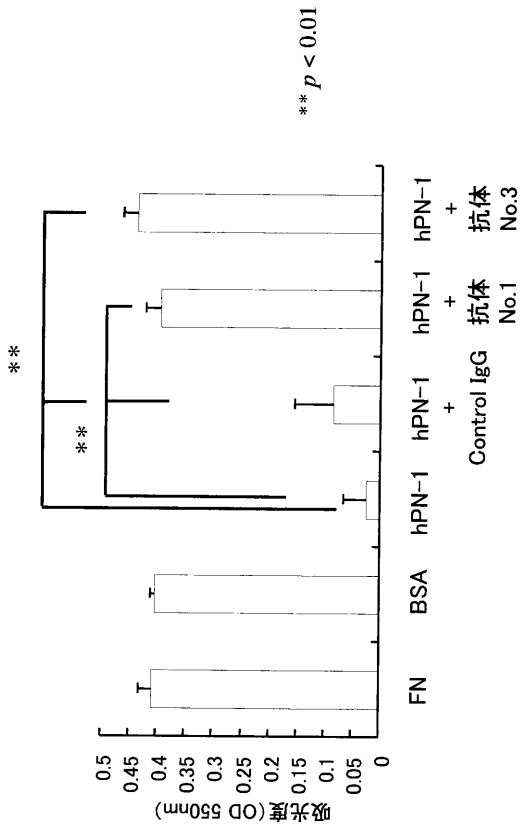
【 図 9 - 5 】



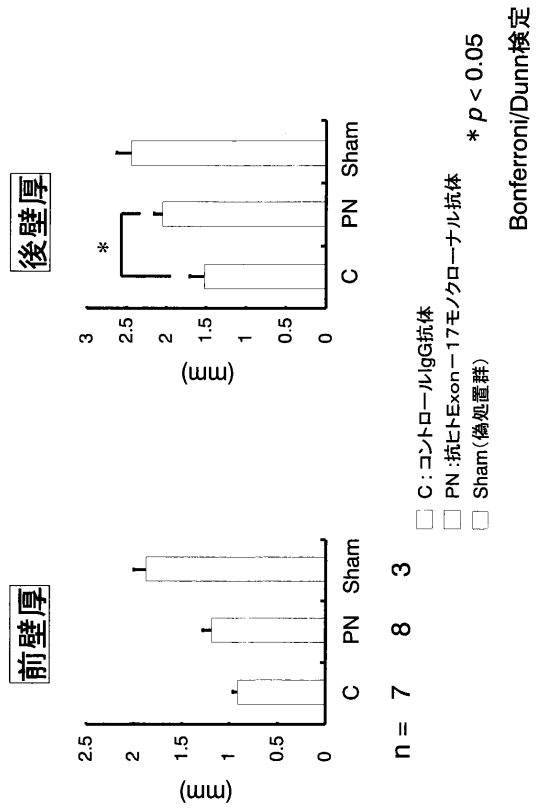
【 図 1 0 】



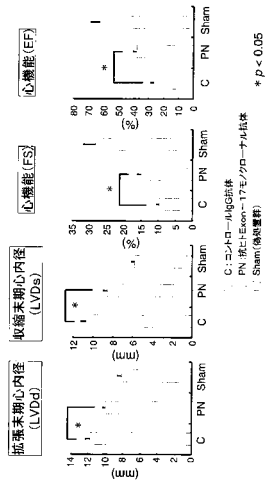
【 図 1 1 】



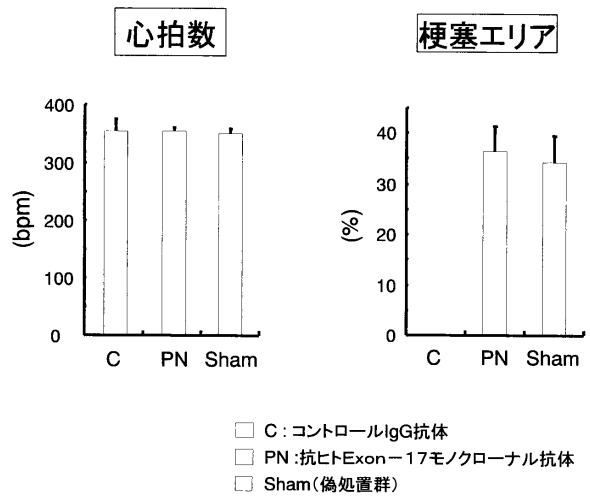
【 図 1 2 - 1 】



【図 1 2 - 2】



【図 1 2 - 3】



【配列表】

0005019464000001.app

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 9/04	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 9/10	(2006.01)	A 6 1 P 9/04	
A 6 1 P 9/00	(2006.01)	A 6 1 P 9/10	
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	A 6 1 P 9/00	
		G 0 1 N 33/53	D

(74)代理人 100118902

弁理士 山本 修

(73)特許権者 504176911

国立大学法人大阪大学
大阪府吹田市山田丘1番1号

(74)代理人 100140109

弁理士 小野 新次郎

(74)代理人 100089705

弁理士 社本 一夫

(74)代理人 100075270

弁理士 小林 泰

(74)代理人 100080137

弁理士 千葉 昭男

(74)代理人 100096013

弁理士 富田 博行

(74)代理人 100118902

弁理士 山本 修

(72)発明者 谷山 義明

大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人 大阪大学内

(72)発明者 森下 竜一

大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人 大阪大学内

(72)発明者 葛城 鳴門

大阪府茨木市三島丘2-30-3-410

審査官 清水 晋治

(56)参考文献 国際公開第2005/019471(WO, A2)

Circulation. 2004, Vol.110, No.13, p.1806-1813

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 14/00-19/00

C12N 15/00-15/90

CA/CAplus(STN)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

PubMed

JSTPlus/JMEDPlus(JDreamII)

医学・薬学予稿集全文データベース

SwissProt/PIR/GeneSeq

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

专利名称(译)	抗骨膜素抗体和用于预防或治疗其中涉及骨膜素的疾病的药物组合物		
公开(公告)号	JP5019464B2	公开(公告)日	2012-09-05
申请号	JP2007552991	申请日	2006-12-28
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人大阪大学		
申请(专利权)人(译)	Asubio制药社 国立大学法人大阪大学		
当前申请(专利权)人(译)	第一三共株式会社 国立大学法人大阪大学		
[标]发明人	谷山義明 森下竜一 葛城鳴門		
发明人	谷山 義明 森下 竜一 葛城 鳴門		
IPC分类号	C07K16/18 C12N5/10 C12P21/08 C12N15/09 A61K39/395 A61P43/00 A61P9/04 A61P9/10 A61P9/00 G01N33/53		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P1/16 A61P1/18 A61P11/00 A61P13/12 A61P19/02 A61P19/04 A61P19/10 A61P25/28 A61P29/00 C07K16/18 C07K16/22 C07K2317/76 G01N33/574 G01N2800/32		
FI分类号	C07K16/18.ZNA C12N5/00.102 C12P21/08 C12N15/00.A A61K39/395.D A61K39/395.N A61P43/00.111 A61P9/04 A61P9/10 A61P9/00 G01N33/53.D		
代理人(译)	石桥 公树 小林 泰 千叶昭夫 山本修		
审查员(译)	清水慎		
优先权	2005380009 2005-12-28 JP		
其他公开文献	JPWO2007077934A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供抗具有抗细胞粘附活性的骨膜素同种型的抗体，尤其是具有中和抗细胞粘附性能的抗骨膜素抗体，以及包含该抗体的骨膜素相关疾病的预防或治疗剂。。本发明还提供了通过使用该抗体检测和定量样品中骨膜素同种型的方法，以及诊断骨膜素相关疾病的方法，包括通过检测或定量方法测量骨膜素同种型的量。

No.	OD值
1	0.41
2	0.37
3	0.68
4	0.24
5	0.33
6	0.32
7	0.33
8	0.32
9	0.12
10	0.3