

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公開特許公報** (A) (11)特許出願公開番号

特開2001 - 264329

(P2001 - 264329A)

(43)公開日 平成13年9月26日 (2001 . 9 . 26)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/53			G 0 1 N 33/53	D
		33/531		A
		33/577		B
// C 1 2 N 15/02			C 1 2 N 15/00	C
		15/09		ZNA A
審査請求 有 請求項の数 35 O L (全 57数)				

(21)出願番号 特願2001 - 38309(P2001 - 38309)

(22)出願日 平成13年2月15日(2001 . 2 . 15)

(31)優先権主張番号 09/504262

(32)優先日 平成12年2月15日(2000 . 2 . 15)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 397067152

ファイザー・プロダクツ・インク

アメリカ合衆国コネチカット州グロトン市

イースタン・ポイント・ロード

(72)発明者 キンバリー スー ジョンソン

アメリカ合衆国,コネチカット 06340,グロ

トン,イースタン ポイント ロード,ファ

イザー グローバル リサーチ アンド

デベロップメント

(74)代理人 100077517

弁理士 石田 敬 (外 4 名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 尿中 I I 型コラーゲン断片測定のための検定

(57)【要約】

【課題】 I I 型コラーゲン断片について尿をモニタリングするための新規方法の提供。

【解決手段】 I I 型コラーゲン断片に関して尿をモニタリングするための方法であって、前記の尿を、I I 型コラーゲン断片と特異的に結合し、I 型または I I I 型コラーゲン断片とのいかなる結合も実質的に排除する捕獲抗体と接触させ、前記の尿を、コラゲナーゼ生成コラーゲン断片と特異的に結合する検出抗体と接触させ、そして前記の捕獲および検出抗体に結合された I I 型コラーゲン断片の量を検出することを包含する方法が提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 I I型コラーゲン断片に関して尿をモニタリングするための方法であって、

a) 前記の尿を、I I型コラーゲン断片と特異的に結合する捕獲抗体と接触させて、I型またはI I型コラーゲン断片とのいかなる結合も実質的に排除し、

b) 前記の尿を、コラゲナーゼ生成コラーゲン断片と特異的に結合する検出抗体と接触させ、そして

c) 前記の捕獲および検出抗体に結合されたI I型コラーゲン断片の量を検出することを包含する方法。

【請求項2】 前記捕獲および検出抗体がモノクローナル抗体である、請求項1記載の方法。

【請求項3】 前記検出抗体が配列番号1および2で記述される配列に対して活性である、請求項1記載の方法。

【請求項4】 前記検出抗体が配列番号32で記述されるものと少なくとも95%相同であるV_H配列、および配列番号33で記述されるものと少なくとも95%相同であるV_L配列を有する、請求項3記載の方法。

【請求項5】 前記検出抗体が配列番号32で記述されるV_H配列と同一のCDR、および配列番号33で記述されるV_L配列と同一CDRを有する、請求項3記載の方法。

【請求項6】 前記捕獲抗体が配列番号3および4で記述される配列に対して活性である、請求項1記載の方法。

【請求項7】 前記捕獲抗体が配列番号48で記述されるものと少なくとも95%相同であるV_H配列、および配列番号49で記述されるものと少なくとも95%相同であるV_L配列を有する、請求項6記載の方法。

【請求項8】 前記捕獲抗体が配列番号48で記述されるV_H配列と同一のCDR、および配列番号49で記述されるV_L配列と同一CDRを有する、請求項6記載の方法。

【請求項9】 前記接触工程a)およびb)が同時に起こる、請求項1記載の方法。

【請求項10】 前記接触工程後および前記検出工程前に、前記捕獲抗体磁気物質上に固定される、請求項9記載の方法。

【請求項11】 前記捕獲抗体がビオチニル化され、前記磁気物質が磁気ストレプトアビジンビーズである、請求項10記載の方法。

【請求項12】 大多数の非結合物質が前記固定化捕獲抗体から分離される、請求項10記載の方法。

【請求項13】 前記固定化捕獲抗体が前記検出工程c)前に緩衝化溶液中に再懸濁される、請求項12記載の方法。

【請求項14】 前記接触工程a)およびb)が連続して起こる、請求項1記載の方法。

【請求項15】 前記接触工程a)後および前記接触工

程b)前に、前記捕獲抗体が磁気物質上に固定される、請求項14記載の方法。

【請求項16】 前記捕獲抗体がビオチニル化され、前記磁気物質が磁気ストレプトアビジンビーズである、請求項15記載の方法。

【請求項17】 大多数の非結合物質が前記固定化捕獲抗体から分離される、請求項15記載の方法。

【請求項18】 前記固定化捕獲抗体が前記検出工程c)前に緩衝化溶液中に再懸濁される、請求項17記載の方法。

【請求項19】 前記捕獲抗体が5~20μg/mlの濃度で前記接触工程a)に存在する、請求項1記載の方法。

【請求項20】 前記捕獲抗体が10μg/mlの濃度で前記接触工程a)に存在する、請求項19記載の方法。

【請求項21】 前記検出抗体が10~30μg/mlの濃度で前記接触工程b)に存在する、請求項1記載の方法。

【請求項22】 前記検出抗体が20μg/mlの濃度で前記接触工程b)に存在する、請求項21記載の方法。

【請求項23】 前記検出工程が酵素反応の結果、電気化学的シグナル、光学的シグナル、放射性シグナル、蛍光シグナルを検出することにより、またはシンチレーション近似検定(SPA)により実施される、請求項1記載の方法。

【請求項24】 前記検出工程が電気化学発光、発光または光放射、により実施され、シンチレーション計数器により読み取られる、請求項1記載の方法。

【請求項25】 前記接触工程a)およびb)が50~250mMの濃度のトリス、pH7.4、0.5~2.0%の濃度のトゥイーン-20(商標)、0.5~2.0%の濃度のBSAおよび100~200mMの濃度のNaClを包含する緩衝液中で実施される、請求項1記載の方法。

【請求項26】 以下の：

d)一連の対照試料を前記捕獲抗体と接触させ、
e)前記対照試料を前記検出抗体と接触させ、そして
f)前記捕獲および検出抗体と結合した前記対照試料中のI I型コラーゲン断片の量を検出する工程をさらに包含する、請求項1記載の方法。

【請求項27】 前記対照試料が対照尿中に稀釈された既知量のI I型コラーゲン断片を包含する、請求項26記載の方法。

【請求項28】 前記接触工程b)後および前記検出工程c)前に非結合検出抗体を除去するさらなる工程を包含する、請求項1記載の方法。

【請求項29】 I I型コラーゲン断片に関して尿をモニタリングするためのキットであって、

a) I I型コラーゲン断片と特異的に結合し、I型またはI I型コラーゲン断片とのいかなる結合も実質的に排除する捕獲抗体、

b) コラゲナーゼ生成コラーゲン断片と特異的に結合する検出抗体、

c) 容器、ならびに

d) I I型コラーゲン断片に関して生物媒質をモニタリングするための前記一次抗体および前記二次抗体を用いる方法を説明する使用説明書を包含するキット。

【請求項30】 前記検出抗体が、配列番号32で記述されるものと少なくとも95%相同であるV_H配列、および配列番号33で記述されるものと少なくとも95%相同であるV_L配列を有し、そして前記捕獲抗体が、配列番号48で記述されるものと少なくとも95%相同であるV_H配列、および配列番号49で記述されるものと少なくとも95%相同であるV_L配列を有する、請求項29記載のキット。

【請求項31】 前記検出抗体が配列番号32で記述されるV_H配列と同一のCDR、および配列番号33で記述されるV_L配列と同一のCDRを有し、そして前記捕獲抗体が配列番号48で記述されるV_H配列と同一のCDR、および配列番号49で記述されるV_L配列と同一のCDRを有する、請求項29記載のキット。

【請求項32】 以下の：

e) 既知量のI I型コラーゲン断片を含有する対照尿を包含する陽性対照流体、および

f) 前記キットを用いて検査中の試料を稀釈するための対照尿を包含する稀釈流体をさらに包含する、請求項29記載のキット。

【請求項33】 免疫学的結合事象の存在を検出するためのバイオセンサーチップであって、配列番号1または2で記述される配列に対して活性な一次抗体、あるいは配列番号3または4で記述される配列に対して活性な二次抗体を包含するチップ。

【請求項34】 I I型コラーゲンの分解に関連した疾病状態を治療するのに有用であると考えられる薬剤を評価するための臨床試験の実施方法であって、

a) 一組の患者から収集された尿中のI I型コラーゲン断片のレベルを測定し、

b) 前記患者の第一小群に前記薬剤を、および前記患者の第二小群にプラセボを投与し、

c) 前記薬剤または前記プラセボの投与後に工程a)を反復し、そして

d) 前記第二小群の患者に生じるあらゆる低減と比較した場合に統計学的に有意である程度に前記第一小群の患者の前記尿中に存在するI I型コラーゲン断片の量を前記薬剤が低減しているか否かを確定する方法であり、統計学的に有意の低減が前記薬剤が前記の疾病状態を治療するのに有用であることを示す方法。

【請求項35】 前記疾病状態が変形性関節症または慢性関節リウマチである、請求項34記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】 関連出願の参照

本出願は、米国特許第09/184,658号(1998年11月2日提出)(この記載内容は、参照により本明細書中に含まれ

る)の一部継続出願である。

産業上の利用分野

本発明は、生物媒質中のI I型コラーゲン断片の検出方法に関する。特に、本発明は、I I型コラーゲンの切断に起因する尿に見出されるタンパク質断片の定量方法に関する。

【0002】 発明の背景

関節軟骨の生理学的代謝回転は、合成と分解との間の微妙な平衡を表す。それは、成人における軟骨の正常な増殖および発達および保持の一特徴である。正味軟骨損失は、関節炎の一特徴である。それは障害および低文化的な生活基準に深く関連する。慢性関節リウマチおよび変形性関節症における軟骨破壊は、一般に、併存臨床症状および放射線学的知見に基づいて診断される。関節軟骨への損害は、それが放射線学的に検出され得るずっと前、疾病の初期に起こる。損害は、広範な且つおそらくは不可逆的な軟骨損失が認められた後のみ検出される。したがって、軟骨損害の初期診断のための生化学的マーカーを臨床医が有し、そこで広範な損害が成される前に治療が早期に開始され得ることは、非常に重要である。さらに、このようなマーカーは、急速に進行する可能性が高い登録のための被験者の選択における臨床試験の計画に用いられ得る。さらに、治療効果は、時宜にかなった方法でモニタリングされ得る。T I I N E分析も、化合物有効性が測定され得る情報を提供し得る。ちょうどI I型コラーゲンがほとんどの他の組織、例えば皮膚、骨、靭帯および腱の細胞外マトリックスの原繊維構築を形成するように、I I型コラーゲンは、軟骨マトリックスの原繊維主鎖の大部分を構成する。関節疾病中の関節軟骨の破壊は、一部は、主に原繊維性I I型コラーゲンおよび集合性プロテオグリカンから成る細胞外マトリックスの分解による。関節軟骨では、I I型コラーゲン原繊維は引張り強さおよび構造に関与し、一方、プロテオグリカンは正常関節接合および機能に必要な圧縮剛性を提供する。これらの結合組織構成成分が分解される正確なメカニズムは十分には分かっていない。哺乳類では、重要なメカニズムは、らせん(ネイティブ)コラーゲンの部位特異的切断が可能な酵素の一群であるコラゲナーゼ、MMP-1、MMP-8、MMP-13およびMT1-MMPを包含する。3つの型のコラーゲンはすべて、ヒトにおいては、コラゲナーゼにより細胞外で切断されて、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により同定可能な3/4および1/4長鎖断片を生成するきつく巻かれた三重らせんから成る。

【0003】 発明の要約

第一の局面において、本発明は、I I型コラーゲン断片に関して尿をモニタリングするための方法であって、前記の尿を、I I型コラーゲン断片と特異的に結合し、I I型またはI I I型コラーゲン断片とのいかなる結合も実質的に排除する捕獲抗体と接触させ、前記の尿を、コラ

ゲナーゼ生成コラーゲン断片と特異的に結合する検出抗体と接触させ、そして前記の捕獲および検出抗体に結合されたII型コラーゲン断片の量を検出することを包含する方法を提供する。

【0004】第一の局面の好ましい実施態様では、検出抗体は配列番号1および2で記述される配列に対して活性である。第一の局面の別の好ましい実施態様では、検出抗体は配列番号32で記述されるものと少なくとも95%相同であるV_H配列、および配列番号33で記述されるものと少なくとも95%相同であるV_L配列を有する。

【0005】第一の局面の別の好ましい実施態様では、検出抗体は配列番号32で記述されるV_H配列と同一のCDR、および配列番号33で記述されるV_L配列と同一CDRを有する。第一の局面の別の好ましい実施態様では、捕獲抗体は配列番号3および4で記述される配列に対して活性である。

【0006】第一の局面の別の好ましい実施態様では、捕獲抗体は配列番号48で記述されるものと少なくとも95%相同であるV_H配列、および配列番号49で記述されるものと少なくとも95%相同であるV_L配列を有する。第一の局面の別の好ましい実施態様では、捕獲抗体は配列番号48で記述されるV_H配列と同一のCDR、および配列番号49で記述されるV_L配列と同一CDRを有する。

【0007】抗体を生物媒質と接触させる順序は逆であり得る、と当業者は認識する。さらに、ある実施態様では、本発明のこの局面は前記のようなII型コラーゲンに関して尿をモニタリングするための方法であって、前記接触工程が同時に起こる方法を包含する。第一の局面の別の好ましい実施態様では、抗体接触工程は、連続して、ならびに捕獲抗体を包含する接触工程後に、そして検出抗体を包含する接触工程前に起こり、前記の捕獲抗体は磁気物質上に固定される。

【0008】第一の局面の別の好ましい実施態様では、前記の方法は、一連の対照試料を前記の捕獲抗体と接触させ、前記の対照試料を前記の検出抗体と接触させ、そして前記の捕獲および検出抗体と結合した前記の対照試料中のII型コラーゲン断片の量を検出する工程をさらに含む。本発明の第二の局面では、II型コラーゲン断片に関して尿をモニタリングするためのキットであって、II型コラーゲン断片と特異的に結合し、I型またはIII型コラーゲン断片とのいかなる結合も実質的に排除する捕獲抗体、コラーゲナーゼ生成コラーゲン断片と特異的に結合する検出抗体、容器、ならびにII型コラーゲン断片に関して生物媒質をモニタリングするための前記の一次抗体および前記の二次抗体を用いる方法を説明する使用説明書を包含するキットが提供される。

【0009】第二の局面の好ましい実施態様では、前記の検出抗体は、配列番号32で記述されるものと少なくとも95%相同であるV_H配列、および配列番号33で記

述されるものと少なくとも95%相同であるV_L配列を有し、そして前記の捕獲抗体は、配列番号48で記述されるものと少なくとも95%相同であるV_H配列、および配列番号49で記述されるものと少なくとも95%相同であるV_L配列を有する。

【0010】第二の局面の別の好ましい実施態様では、前記の検出抗体は配列番号32で記述されるV_H配列と同一のCDR、および配列番号33で記述されるV_L配列と同一のCDRを有し、そして前記の捕獲抗体は配列番号48で記述されるV_H配列と同一のCDR、および配列番号49で記述されるV_L配列と同一のCDRを有する。

【0011】第二の局面の別の好ましい実施態様では、前記のキットは、既知量のII型コラーゲン断片を含有する対照尿を包含する陽性対照流体、および前記のキットを用いて検査されている試料を稀釈するための対照尿を包含する稀釈流体をさらに包含する。本発明の第三の局面では、免疫学的結合事象の存在を検出するためのバイオセンサーチップであって、配列番号1または2で記述される配列に対して活性な一次抗体、または配列番号3または4で記述される配列に対して活性な二次抗体を包含するチップが提供される。

【0012】本発明の第四の局面では、II型コラーゲンの分解に関連した疾病状態に関して患者を診断するための方法であって、前記の患者から収集された尿中の非定型的多量のII型コラーゲン断片の存在を検出する工程を包含する方法が提供される。本発明の第五の局面では、II型コラーゲンの分解に関連した疾病状態を治療するのに有用であると考えられる薬剤を評価するための臨床試験の実施方法であって、一組の患者から収集された尿中のII型コラーゲン断片のレベルを測定し、前記の患者の第一小群に前記の薬剤を、および前記の患者の第二小群にプラセボを投与し、前記の薬剤または前記のプラセボの投与後に前記の測定工程を反復し、そして前記の第二小群の患者に生じるあらゆる低減と比較した場合に統計学的に有意である程度に前記の第一小群の患者の前記の尿中に存在するII型コラーゲン断片の量を前記の薬剤が低減しているか否かを確定する方法であり、統計学的に有意の低減が前記の薬剤が前記の疾病状態を治療するのに有用であることを示す方法が提供される。

【0013】本発明で有用なのは、配列番号1または配列番号2として配列表に記述されるような構造で本質的に構成されるペプチドと結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞系統または大腸菌培養であって、ATCC HB-12436という同定特徴を有する細胞系統である。配列番号3または4として配列表に記述されるような構造で本質的に構成されるペプチドと結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞系統または大腸菌培養であって、ATCC HB-12435という同定特徴を有する細胞系統も、本発明で有用である。

【0014】発明の詳細な説明

I I型コラーゲンは、関節軟骨にその引張り強さおよび剪断耐性を与える構造タンパク質である。それは、圧縮耐性を付与し、そうして、浸透圧的に加圧された軟骨の形態を直接確定するプロテオグリカンの封じ込めのための構造的基礎も提供する。したがって、I I型コラーゲンの構造的完全性は、関節軟骨の物理的特性および耐久性の主要決定因子である。

【0015】関節軟骨の進行性不全は、関節疾患の特質の1つである。その不全がI I型コラーゲン構造の変化に基づいている場合、I I型コラーゲンの破壊を特異的に測定するための方法を有することは有益である。関節軟骨からのI I型コラーゲンの断片は、滑液中に放出され、次にリンパ、血液を介して運搬されて、尿中に放出される。放出断片の測定は、I I型コラーゲン破壊をモニタリングして、関節疾患の開始を検出し、疾患進行を測定するための方法を提供する。さらに、疾病中のI I型コラーゲン破壊に及ぼす疾患修正療法の作用を測定するのにも有用である。

【0016】コラーゲン破壊をモニタリングするために、種々の方法が利用されてきた。哺乳類組織においては、コラゲナーゼは、I I型コラーゲンの細胞外破壊に関与する速度制限細胞外酵素であると考えられる

(1)。3/4および1/4サイズ片へのコラーゲンのコラゲナーゼ断片化は、1967年という早い時期に同定された(2、3)。一般に、I I型コラーゲンの初期切断に関与する4種類の同定済み哺乳類コラーゲン(MMP-1、MMP-8、MMP-13およびMT1-MMP)が存在する(4、5、29)。他の酵素がさらにI I型コラーゲンの断片化に関与する。原繊維コラーゲンのリソソーム破壊は、骨および肝臓で起こることが知られている(6、7)。コラーゲンは、高ヒドロキシプロリン含量により特性化される少数タンパク質の1つであるため、尿中ヒドロキシプロリンの測定値が、コラーゲン代謝回転の測定値として検査された(8)。しかしながら、シグナルのほとんどが、皮膚、骨および結合組織中に大量に見出されるI型およびI I型コラーゲンに由来するため、I I型コラーゲンの破壊を測定するのに有用な方法は見出されていない。したがって、ヒドロキシプロリンの極端に小部分の1日尿分泌を提供するに過ぎないために、I I型コラーゲンのモニタリングに関してはそれは有益でない(8)。それゆえ、コラーゲンまたはコラーゲンの破壊生成物をモニタリングするための努力は、免疫学的検出方法に集中した。

【0017】抗体は、コラーゲン型および切断部位に独特のコラーゲン断片を識別し得るし、コラーゲン破壊の特定の様式をモニタリングし得るかもしれない(9)。ポリクローナルおよびモノクローナル抗体がIおよびI I型コラーゲンまたはそれらの断片に対して調製されており、そして、I型およびI I型コラーゲンのコラ

ーゲン破壊生成物に関する検定が立案されてきた(Eyre(10)参照)。実際、これらの検定は、骨吸収をモニタリングするためにクリニックでルーチンに用いられる。I I型コラーゲンの破壊生成物に対する抗体を用いる相対的に少数の方法が報告されている。

【0018】I I型コラーゲンに対するポリクローナルおよびモノクローナル抗体が、調製されてきた(9、11~13)。これらの抗体は、コラーゲン断片の定量的確定というよりむしろ、無傷I I型コラーゲンの検出のために利用されている。しかしながら、Eyre(14)は、架橋残基を含有するI I型コラーゲン断片に対するモノクローナル抗体を調製した。彼は、彼の発行済み特許と類似したI I型コラーゲン特異的配列を含有する架橋断片を基礎にしたI I型コラーゲンの破壊に関する検定を開発した(10)。DodgeとPooleは、ネイティブI I型またはその他のコラーゲンと非反応性である変性I I型コラーゲンに対するポリクローナル抗体を調製した(15、16)。エピトープがシーケンシングされ、その後、HollanderとPoole(17、18、19)は、モノクローナル抗体を用いて、配列番号12および13として配列表に記述される配列を有するI I型コラーゲン断片に対する競合的抗体検定を立案した。HollanderとCroucher(20)も、配列番号67、68または69として配列表に略記されたペプチドに対して向けられる抗体を用いて、捕獲ELISAを作製した。Billingham等(21)は、I I型コラーゲンのコラーゲン切断部位ネオエピトープに対するポリクローナル抗体(配列番号2として配列表に記述される配列を有する)を調製し、競合的I I型コラーゲン検定を立案した。Srinivas、BarrachおよびChichester(22~24)は、抗原としてI I型コラーゲンの臭化シアンを用いるI I型コラーゲン検定のための多面的モノクローナル抗体を調製した。抗体と反応性のエピトープは同定されていない(25)が、しかしそれらはI I型コラーゲンを検定し得る。

【0019】捕獲ELISAは、それが同一分子中の2つの異なるアミノ酸エピトープを同等に認識する2つの抗体を基礎にしているために、高特異性を得るための信頼できる方法である。抗体結合部位は6つという少ないアミノ酸を含有するので、捕獲検定においては15~20アミノ酸という小型の配列が2つの抗体により認識され得る。競合検定は単一抗体を使用し、したがって6~8アミノ酸という小さいポリペプチドの測定を可能にするが、しかしそれらは二元的抗体測定の特異性を欠く。さらに、競合検定は、100~10,000分の1の検出限界をしばしば有する捕獲ELISAの感受性を欠く。したがって、捕獲ELISAは、タンパク質の代謝断片を測定するための好ましい方法を提供する。例えば、捕獲ELISAは、血中の構造タンパク質エラスチンの破壊断片を測定するために用いられてきた(26)。捕獲ELISAは、21アミノ酸の生物学的に活性なペプチドエンド

セリンを測定するために用いられてきた(27)。28アミノ酸グルカゴンペプチドの異なる代謝断片を測定するためには、捕獲ELISA対が用いられてきた(28)。このような結果に基づいて、II型コラーゲンのコラーゲナーゼ依存性代謝を測定するための捕獲ELISAを構築するために用いられ得る最小22アミノ酸のペプチド断片が選択された。

【0020】本発明は、II型コラーゲン代謝の2つの型の検定を提供する。両検定とも、それに対して抗体が予め調製されていないII型コラーゲンの限定配列に対する抗体(ポリクローナル、モノクローナルまたは遺伝子工学処理抗体)を基礎にする。配列は、酸性残基に富み、即ち、1個の残基によりC末端に欠失が作られた配列番号3として配列表に記述された配列である。哺乳類細胞外アスパルチルまたはグルタミルエンドペプチダーゼは未だ記載されていないので、酸性残基に富んだコラーゲン断片は、さらなる代謝を存在し続けると予測される。したがって、このような断片は、体液中で測定可能である。それらの残基またはそれらの残基を含有するコラーゲン断片に対する抗体は、コラーゲン代謝物質の生成の方法とは無関係な、体液中のII型断片の検出の一般的方法を提供する。本発明は、II型コラーゲン配列に特異的で且つその配列を含有するコラーゲン断片と結合するモノクローナル抗体5109および5109の遺伝子工学処理変異体を提供する。

【0021】一次検定は、II型コラーゲンの破壊を査定するための一般的方法である。この検定は、1個の残基によりC末端に欠失が作られた配列番号3として配列表に記述された配列の量を定量するための一般競合方法、ならびにその密接に関連した同種のもを提供する。二次検定に関しては、配列番号14として配列表に記述された配列に対して、付加的抗体が作られた。グリシン(配列番号14の残基9)上に遊離C末端カルボキシル基が存在する。この配列は、コラーゲナーゼがII型コラーゲンを切断し、したがってそれがネオエピトープとして分類される場合に得られ、即ちネイティブ配列(配列番号15として配列表に記述された配列は、-GP0GPQG/LAG-(この場合、コラーゲナーゼは/で切断する)を継続する)に存在しないが、コラーゲンがコラーゲナーゼにより切断される場合に生じる。その配列に対するポリクローナル抗体は、前に報告されている(22)。モノクローナル抗体9A4およびそれから遺伝子工学処理された誘導体は、配列番号2として配列表に記述されたネオエピトープ配列と反応するが、しかし非切断II型コラーゲンまたはI型コラーゲンとは反応できない。ネオエピトープ配列はコラーゲナーゼにより切断される場合にはII型コラーゲンに独特であるが、一方、相同および弱交差反応性配列は、コラーゲナーゼにより切断される場合に合い型コラーゲン中に生成される(配列表に記述された場合の配列番号16)。これは、II型コラーゲ

ンに関しても言える。空は、コラーゲナーゼにより切断された場合、配列番号2として配列表に記述される配列を生じる。したがって、ネオエピトープ抗体はII型コラーゲンに対する完全特異性を欠き、単独で用いられた場合にコラーゲナーゼによるII型コラーゲンの切断を選択的に検出できない。しかしながら、抗体5109および抗体9A4がサンドイッチ検定で併用されると、2つの抗体は一緒になって、コラーゲナーゼにより生成されるII型コラーゲン代謝物質を選択的に検出し得る。さらに、サンドイッチ型の検定が本発明で提供する利点は、9A4単独を基礎にした簡易競合検定と比較して、検出限界が100分の1である。本発明に記載した抗体を用いるサンドイッチ検定フォーマットは、したがって、正常および病的状態におけるコラーゲナーゼによるII型コラーゲン代謝をモニタリングするための独特の方法を提供するが、これは前に記載されたことがない。

【0022】単独で、抗体9A4は、コラーゲン型を識別する必要がない限り、I型またはII型またはIII型コラーゲンのコラーゲナーゼ切断断片の検出のための用途を有する新規のモノクローナル抗体である。

参考文献

- Harris et al., N. Engl. J. Med., 291:557-63, 1974.
- Nagai et al., Biochemistry, 5:3123-3130 (1966).
- Sakai et al., Biochemistry, 6:518-528 (1967).
- Pendas et al., Genomics, 26:615-18 (1995).
- Michell et al., J. Clin. Invest., 97:761-68 (1996).
- Maciewicz et al., FEBS Lett., 269:189-93 (1990).
- van Noorden et al., Bioc. Biop. Res. Comm., 178:178-84 (1991).
- Kivirikko, Int. Rev. Connect. Tissue Res., 5:93-163 (1970).
- Timpl. Methods Enzymol., 82:472-98 (1982).
- Eyre, U.S. Patent 5,320,970 (1994).
- Holmdahl et al., J. Immunology, 61:369-74 (1977).
- Punjabi et al., J. Immunol., 141:3819-22 (1988).
- Jasin et al., J. Clin. Invest., 87:1531-36 (1991).
- Norlund et al., Trans. Orthoped. Res. Assoc., 22:313 (1997).
- Dodge et al., J. Clin. Invest., 83:647-61 (1989).
- Dodge et al., Matrix, 11:330-38 (1991).
- Poole, PCT Publication WO 94/14070 (1994).
- Hollander et al., J. Clin. Invest., 93:1722-32

- (1994) .
19. Hollander et al., J. Clin. Invest., 96:2859-69 (1995) .
20. Hollander et al., PCT Publication W098/3523520 (1998) .
21. Billingham et al., J. Clin. Invest., 99:1534-45 (1997) .
22. Srinivas et al., J. Immunol. Meth., 159:53-62 (1993) .
23. Srinivas et al., Agents Actions, 41:193-99 (1994) .
24. Srinivas et al., Immunol. Invest., 23:85-98 (1994) .
25. Chichester et al., Pharm. Pharmacol., 48:694-98 (1998) .
26. Baydanoff et al., Atherosclerosis, 66:163-68 (1987) .
27. Hamaoki et al., Hybridoma, 9:63-69 (1990) .

定義

免疫グロブリン (I g) : アミノ酸配列およびグリコシル化の程度によって、約23 kDの2つの軽鎖および約53 ~ 70 kDの2つの重鎖から成る天然四量体タンパク質。四量体タンパク質の多量体も形成される (I g Mおよび I g A) 。 2種類の軽鎖、カッパ (κ) およびデルタ (δ) と、数種類の重鎖ガンマ (γ) 、ミュー (μ) 、アルファ (α) 、デルタ (δ) およびイプシロン (ϵ) が存在する。サブクラスも存在する。各鎖は、軽鎖でも重鎖でも、2つの部分から作られる。いずれかの鎖のN末端から開始する最初の部分は、可変ドメインと呼ばれる。軽鎖のC末端半分は、軽鎖の定常部と呼ばれ、それは、軽鎖が κ 型であるか δ 型であるかの主要決定因子である。重鎖の定常部は、重鎖のおよそC末端3/4から成り、免疫グロブリン分子の種類 (I g G₁、 I g M等) を決定する。即ち、重鎖は I g G₁ に対応し、 μ 重鎖は I g M に対応する等である。

【0023】 V_L および V_H : 軽鎖の可変ドメイン (V_L) および重鎖の可変ドメイン (V_H) のアミノ酸配列は一緒になって、免疫グロブリン分子の結合特異性および結合定数を決定する。可変ドメインは、軽鎖の約半分の長さおよび重さの約4分の1の長さから成り、両鎖に関して、鎖のN末端で開始する。可変部は各々、相補性決定領域またはCDRとして知られている3つの超可変セグメントを含有する。

【0024】 CDRおよびFR : 各可変ドメイン V_L または V_H は、3つのCDR : CDR 1、CDR 2およびCDR 3から成る。CDRの前、間および後の介在配列セグメントは、枠組み構造セグメント (FR) として知られている。各 V_L または V_H は、4つのFRセグメントFR 1、FR 2、FR 3およびFR 4から成る。

V または V : V_L ドメインは、軽鎖の産生的再配列

(V J C または V J C) 中にどの定常部 (C または C) が用いられるかによって、またはである。

【0025】抗体 : 抗体は、タンパク質、糖タンパク質、ウイルス細胞、担体と結合した化学物質およびその他の物質によるチャレンジにตอบสนองして免疫系のB細胞により産生される特異的免疫グロブリン分子である。抗体は、その結合相手が未知である単なる免疫グロブリン分子である。抗体が結合する物質は、抗原と呼ばれる。このような抗体のその抗原との結合は高度に純化され、重鎖および軽鎖の可変ドメインにおけるアミノ酸配列中の変化により生成され得る特異性の多さが顕著である。

【0026】ポリクローナル抗体 : 正常免疫感作は、同一抗原に対する広範な種々の抗体をもたらす。各Bリンパ球は一免疫応答において常態では限定アミノ酸配列の1つの免疫グロブリン分子を産生するが、しかし、多数のBリンパ球が刺激されて、抗原と反応する免疫グロブリン分子、即ち抗体を作る。これらの異なる抗体は、免疫グロブリン分子の可変部における異なるアミノ酸配列により特性化され、これが結合の微妙な特異性および親和性の差を生じる。このような抗体は、ポリクローナル抗体と呼ばれ、免疫応答に利用される異なる免疫グロブリン分子に見出されるアミノ酸配列の多様性から生じる結合特異性および結合定数の多様性を増強する。

【0027】モノクローナル抗体 (mAb) : 単一抗体分子を産生するBリンパ球は、不死Bリンパ球細胞株、即ち骨髓腫細胞とハイブリダイズされて、抗体産生不死細胞株、即ちハイブリドーマを誘導し得る。このようにして形成されるハイブリッドは、選択、希釈、サブクロニングおよび再増殖により単一遺伝子細胞株に分離され、したがって各細胞株は単一遺伝子系統を示す。それは独特の配列の単一抗体を産生する。このような細胞株により産生される抗体は、その純粋遺伝子素性を参照し、そして混合遺伝子背景、即ち多重B細胞から産生されるポリクローナル抗体とそれを区別して、「モノクローナル抗体」またはmAbと呼ばれる。mAbは純粋化学試薬であるため、それは免疫検定において一貫した均一な結果を生じる。さらに、mAbは不死細胞株により産生されるため、試薬供給が制限されない。これらの理由のために、mAbは、診断目的に関してポリクローナル抗体よりはるかに好ましい。

【0028】遺伝子工学処理抗体 : 抗体の結合特異性は軽鎖および重鎖の可変部に存在するので、抗体は定常部を変更または除去するために遺伝子工学処理され、そして適正になされた場合には、それは、異なる特性および分子量を有するが、しかし同一または非常によく似た抗原結合特性を有する抗体分子を生じ得る。例えば、 V_L および V_H 遺伝子は、クローン化され、それらの間の適切なリンカーを用いて集合 (または V_H および V_L) され得る。このような新規の遺伝子工学処理分子は、一本鎖抗

体(略してscFv)と呼ばれ、典型的には、リンカーのデザインおよび他の配列の付加によって25~28 kDの分子量を有して、精製、安定性、転送、検出等に役立つ。一本鎖抗体の多量体は、各 V_H/V_L 対のオーダーが変わり得るリンカーの適切な使用により作製され得る。さらに、 V_L および V_H 領域のアミノ酸配列のいくつかの変化は、望ましい抗原結合特性を保持しながらなされ得る。遺伝子工学処理抗体の無限の多様性は、抗原に対する結合特異性を保持するが、しかし特定の要件を満たすよう調製される元の抗体配列に由来する、ということが分かる。遺伝子工学処理抗体のその他の例としては、Fab、 $F(ab)_2$ 、キメラ抗体、ヒト化抗体等が挙げられるが、これらに限定されない。再検討のためには、Winter and Milstein, Nature, 349:243-299 (1991) 参照。

【0029】二重特異性抗体：常態では、IgG抗体は2つの同一軽鎖および2つの同一重鎖を有する。したがって、免疫グロブリン分子中に2つの同一抗体結合部位が存在する。対照してみると、二重特異性抗体は、2つの異なる特異性を有する単一免疫グロブリン分子である。それは2つのモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞株の融合により作られ得るが、この場合、各ハイブリドーマは異なる抗原特異性を有し、その組成物が各ハイブリドーマ融合相手からの1つの軽鎖および1つの重鎖から成る四量体である抗体を産生する細胞株(クアドローマ)に対する選択を示す。クアドローマにより産生される抗体は、各親特異性の1つの軽鎖および1つの重鎖のみを有し、各重/軽鎖対のための1つの結合部位を有し、そして二重特異性であり、即ちそれは異なる特異性の2つの結合部位を有する。二重特異性抗体は、遺伝子工学処理によっても作られ得る。それはさらに別のリンカーを介して別の抗体分子の V_L -リンカー- V_H に連結される一抗体の V_L -リンカー- V_H を包含し得る。 V_L および V_H のオーダーは変更され得るが、しかし最終結果は二重特異性抗体である。

【0030】エピトープ：抗原のサイズ、構造および配座によって、抗体は全構造の小部分のみと結合し得る。抗体が結合する抗原分子の一部は、そのエピトープと呼ばれる。異なる抗体は同一抗原上の異なるエピトープにマッピングされ得る。

ネオエピトープ：抗原は、特定の抗体と結合し得ないように隠蔽されるエピトープを有し得る。しかしながら、抗原の配座変化は、分子表面の非フォールディングまたは非被覆部分によるエピトープの出現を引き起こし得る。これは、ここでは抗体をエピトープと結合させる。別の局面では、抗原上の酵素の作用は、抗体が結合し得る新規のエピトープの出現を生じ得る。例えば、タンパク質分解酵素による切断後、新規のN末端および新規のC末端配列が生成される。エピトープは親分子中では観察されないために、親分子における何らかの変化後、エ

ピトープが明示され、ここで抗体を結合し得えて、ネオエピトープと呼ばれる。

【0031】TIINE：「II型コラーゲンネオエピトープ」の略語であって、この用語は、9A4抗体により認識される特異的コラーゲンネオエピトープを示すために用いられる。

生物媒質：これは、抗原を含有し、本手法による検定の対象であり得るあらゆる生物流体と定義され得る。これらの例としては、血液、滑液、尿、糞便、精液、唾液、脊髄液、細気管支洗浄液、リンパ液、眼の硝子体液、組織抽出物、組織培養上清、軟骨抽出物等が挙げられる。生物媒質はヒト試料に限定される必要はないが、しかし前記の例と同様の様式で、類似の種々の動物(マウス、ラット、ハムスター、モルモット、イヌおよびウシが検査された)媒質からも得られ得る。

【0032】イムノアッセイ：特定の分子または同種分子組であり得る物質を認識する抗体の結合特性を用いることを基礎にした物質(複合生物学的物質、例えばタンパク質、または簡単な化学物質)に関する検定。検定は、1つ又はそれ以上の抗体を包含し得る。

直接検定：抗体は例えば生物検体(細胞、組織、組織切片等)中の抗原、あるいは固体表面に吸着または化学結合される抗原と直接的に結合する。抗体それ自体は、通常は、抗原に結合される抗体の量の確定を可能にするよう標識される。あるいは、抗体(ここでは第一抗体と呼ばれる)は、第一抗体の結合が生じたことを実証する第二標識化抗体を用いて検出される。

【0033】競合検定：単一抗体分子の結合特性に基づいた検定。典型的には、標識化抗原は、未知の抗原と競合するよう用いられ、未知の抗原により以下に多くの標識化抗原が表示されるかに換算して未知の抗原の量が確定される。標識は、放射性、光学的、酵素的、蛍光的分極化、蛍光急冷またはその他の標識であり得る。抗体は、一重特異性または二重特異性であり得る。

【0034】サンドイッチ検定：これは、両抗体が抗原と結合して、2つの抗体をそれらの間の抗原とともに含有する三量体免疫複合体またはサンドイッチを形成する二重抗体検定である。ある抗体は、検出表面または小室に免疫複合体を局限するために利用される。この抗体は「捕獲抗体」と呼ばれる。その他の抗体は、免疫複合体が検出されるようにする標識を保有する。それは「検出抗体」と呼ばれる。免疫複合体が形成されない(抗原が存在しない)場合には、捕獲抗体は検出抗体を検出器にもたらし得ない。抗原が存在する場合には、免疫複合体が形成され、捕獲抗体は、免疫複合体中の検出抗体の量が存在する抗原の量と定量的に関連するように、検出抗体と接合される。

【0035】検定は、多数の方法でフォーマットされ得る。例えば、捕獲抗体は、各々、測定装置に免疫複合体を局限化する一手段として、固体表面と化学的に結合さ

れるか、または非特異的に表面に吸着されて、ビオチニル化を介してアビジン様分子（例えば、アビジン、ストレプトアビジン、ニュートラビジン等）またはアビジン被覆表面に付着され、あるいは磁気粒子またはビーズと結合され得る。

【0036】検出抗体は放射能標識され得るか、あるいは、ELISA（酵素結合イムノソルベント検定）としてフォーマットされる場合、それは種々の考え得る酵素増幅系、例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）、アルカリ性ホスファターゼ（AP）、ウレアーゼなどを有し得る。それは、電気化学的、光学的、蛍光またはその他の検出方法を用いて、免疫複合体中の検出抗体の量を確定し得る。

【0037】検出装置で免疫複合体を捕獲するための種々の方法、ならびに免疫複合体の量を測定するための種々の検出系を用いたサンドイッチ検定において、2つの抗体が対合される場合に多数の例が得られる、ということはすぐに分かる。分子生物学的技法： V_L および V_H コード領域のヌクレオチド配列はここでは本発明の抗体を提供するために、当業者は、 V_H および V_L 領域をコードする完全遺伝子および完全機能性抗体をin vitroで産生し得る。それは付加される重鎖および軽鎖の定常部を有するあらゆる所定の種類の免疫グロブリン分子として産

*生され得るし、あるいはそれは、適切な場合に付加されるタグを有するリンカーにより接合される V_L および V_H を有するscFvとして産生され得る。構築された遺伝子は、慣用的組換え技法により工学処理されて、例えば発現可能なプラスミド中の遺伝子挿入物を提供する。その後、プラスミドは、細菌、例えば大腸菌またはバチルス種、酵母細胞、例えばPichia pastorisであり得る宿主細胞中で、あるいは哺乳類細胞株中で、例えばSp2/0、Ag8またはCHO細胞中で発現され得る。

【0038】相同性：本出願全体に亘って、アミノ酸または核酸相同性に関する参照がなされる場合はいつでも、別記しない限り、BLASTP、BLASTNおよびFASTA（Atschul et al., J. Mol. Biol., 215:403-10（1990））が相同性を算出するために用いられた。BLAST XプログラムはNCBIおよびその他の供給元から公的に入手可能である（BLAST Manual, Altschul et al., NCBI NLMNIG Bethesda, MD 20894;およびAltschul et al., 同上）。

【0039】略語
核酸、アミノ酸、ペプチド、保護基、活性基および類似部分は、略書される場合、IUPAC IUB（Commission on Biological Nomenclature）に、または関連業界の習慣にしたがって略記される。以下に実例を挙げる。

標準略語

HPLC 高速液体クロマトグラフィー
SDS-PAGE ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳

動

PCR ポリメラーゼ連鎖反応
Oligo オリゴヌクレオチド
RT 室温、約22
試薬：
EDTA エチレンジアミン四酢酸
SDS ドデシル硫酸ナトリウム
TW-20 トゥイーン-20（商標）
NFDM 脱脂乾燥乳
DPBS ダルベッコリン酸塩緩衝化生理食塩水
Bt ビオチニル化
HAT ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン含有培地
HT ヒポキサンチン、チミジン含有培地
HRP ホースラディッシュペルオキシダーゼ

免疫グロブリン様分子または鎖

V_H または V_H 重鎖の可変部
 V_L または V_L 軽鎖の可変部
scFv V_L および V_H を含有する一本鎖抗体

核酸

RNA リボ核酸
DNA デオキシリボ核酸
cDNA 相補的DNA
mRNA メッセンジャーRNA

プリン	ピリミジン
A : アデニン	T : チミン
G : グアニン	C : シトシン
	U : ウラシル

【0041】アミノ酸一文字暗号：三文字暗号：フルネーム

【0042】

【表2】

G : Gly : グリシン	V : Val : バリン	L : Leu : ロイシン
A : Ala : アラニン	I : Ile : イソロイシン	S : Ser : セリン
D : Asp : アスパラギン酸	K : Lys : リジン	R : Arg : アルギニン
H : His : ヒスチジン	F : Phe : フェニルアラニン	Y : Tyr : チロシン
T : Thr : スレオニン	C : Cys : システイン	M : Met : メチオニン
E : Glu : グルタミン酸	W : Trp : トリプトファン	P : Pro : プロリン
Q : Hyp : ヒドロキシプリン	N : Asn : アスパラギン	Q : Gin : グルタミン

【0043】実施例

実施例 1

モノクローナル抗体9A4の生成および特性化

最初に、K L Hマレイミド (Pierce Chemical, Rockford, IL) と共有結合され、完全フロイントアジュバント (DIFCO, Detroit, MI) 中に投与された、配列番号 17 として配列表に記述された配列を有するペプチドを用いて、Balb/cマウス (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) を免疫感作した。力価が1:100,000になるまで、不完全フロイントアジュバント (DIFCO, Detroit, MI) を用いて約5ヶ月間、毎月、マウスに追加免疫投与した。融合前10日に、マウスに追加免疫を静注した。脾臓細胞を収集し、50% P E G - 1450 (ATCC) を用いてP3X63Ag8.653 (American Type Culture Collection, Bethesda, MD) から得られた非 I g 分泌細胞株と融合した。それらを15%ウシ胎仔血清 (Hyclone, Provo, Utah) を含有するH A T培地 (Sigma, St. Louis, MO) 中の96ウエル顕微滴定プレート中に10⁶細胞/ウエルでプレート化した。10日後、一次 E L I S A によりウエルをスクリーニングした。陽性抗体産生ウエルの同定のために、10 n g/ml のピオチニル化ペプチド (Bt-AEGPPGQG) [配列番号 14 の残基 1 上でピオチニル化] をストレプトタビジン (10 μg/ml) 被覆プレート (Pierce Chemical) に付加し、そして2 μl の各ハイブリドーマ上清を、0.05% TW-20 (Sigma) を含有する100 μl の D P B S (Gibco, Grand Island, NY) に付加した。ウサギ抗マウス I g G - H R P (Jackson Immuno Research, West Grove, PA) により、E L I S A 陽性ウエルを検出した。

【0044】E L I S A における陽性ウエルに、BIAcore (商標) 系での選択を2回施した。BIAevaluation (商標) パージョン2.1ソフトウェア (Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ) を用いて確定されるようなスローオフレートを示す抗体を産生するウエルをBIAcore系で探した。Pharmacia Amine Coupling Kit (Pharmacia Bi

osensor) を用いてストレプトタビジン (Pierce Chemical) を100 μl/ml で、35分間、5 μl/分の流量を用いて、p H 4.0 で、カルボキシル化デキストラン被覆バイオセンサーチップ (Pharmacia Biosensor) と接合させた。典型的には、2000RU を付加した。配列表に記述したような配列番号 14 の1つの残基に関してピオチニル化したペプチド (100 ng/ml) を、100 μl/分の流量で10秒間、ストレプトタビジンチップ上を通した。抗体を含有する候補上清をチップ上を通して (2 μl/分で30秒間)、付加抗体の量を書き留めた。緩衝液をH B S (H E P E S 緩衝化生理食塩水, Pharmacia Biosensor) に変えて、次の80秒間、解離速度を書き留めた。各実行間の30秒間にチップを0.1 N H C l で洗浄し、残留抗体を除去して、あらゆる非特異的結合を取り除いた。BIAevaluation運動分析ソフトウェアバージョン2.1を用いて、オフレートを確認した。最遅速オフレートを有するクローンを、さらなる分析のために選択した。これらのクローンには、9A4、11F2および3H10が含まれた。

【0045】これらのクローンのさらなる特性化を以下のように実施した：I型コラーゲン、コラゲナーゼにより切断されたI型コラーゲン、I I型コラーゲンおよびコラゲナーゼにより切断されたI I型コラーゲンから成る4つの調製物を、各々、B I A 2000計器上で別々の流動細胞と結合させた。Pharmaciaアミンカップリングキット (Pharmacia Biosensor) を用いて、35分間、5 μl/分の流量を用いて、p H 4.0 で、カルボキシル化デキストラン被覆バイオセンサーチップ (Pharmacia Biosensor) と接合させた。4つの流動細胞は、それぞれ8000、7000、4000および4000RU を付加した。細胞を0.1 N H C l で洗浄してそれらを洗浄にしてあらゆる非結合物質を除去し、実行間にそれらを洗浄してあらゆる残留抗体を除去した。全抗体調製物をプロテインGクロマトグラフィー (Pharmacia Biotechnology, Piscataway, NJ) により精製し、10 μg/ml で動かした。4つの表面の

各々との全結合を記録した。コラゲナーゼ切断 I I 型コラーゲン (I 型 = 11 RU; I I 型 = 280 RU) との選択的結合を示し、非切断化コラーゲン (I 型 = 3 RU; I I 型 = 6 RU) との有意の結合を欠いたために、抗体9A4が選択された。

【0046】5%ウシ胎仔血清 (Hyclone) を含有する H T 培地 (Sigma) 中での稀釈を制限することにより3回サブクロニング後、安定9A4モノクローナルハイブリドーマを得た。それを、ATCC-HB-12436としてアメリカ培養細胞コレクションに寄託した。

実施例 2

モノクローナル抗体 5 1 0 9 の生成および特性化

最初に、K L H マレイミド (Pierce Chemical) と共有結合され、完全フロイントアジュバント (DIFCO) 中に投与された、配列番号 1 8 として配列表に記述された配列を有するペプチドを用いて、Balb/cマウスを免疫感作した。力価が1:100,000になるまで、不完全フロイントアジュバント (DIFCO) を用いて約5ヶ月間、毎月、マウスに追加免疫投与した。融合前10日に、マウスに追加免疫を静注した。脾臓細胞を収集し、50% P E G - 1450 (ATCC) を用いてP3X63Ag8.653 (ATCC) から得られた非 I g 分泌細胞株と融合した。それらを15%ウシ胎仔血清 (Hyclone) を含有する H A T 培地 (Sigma) 中の96ウエル顕微滴定プレート中に10⁶細胞/ウエルでプレート化した。10日後、E L I S A によりウエルをスクリーニングした。陽性抗体産生ウエルの同定のために、10 ng/ml のピオチニル化ペプチド (配列表に記述したような配列番号 1 9 の残基 1 上でピオチニル化) をストレプトタビジン (10 μg/ml) 被覆プレート (Pierce Chemical) に付加し、そして2 μl の各ハイブリドーマ上清を、0.05% TW -20 (Sigma) を含有する100 μl の D P B S に付加した。ウサギ抗マウス I g G - H R P (Jackson Immuno Research) により、E L I S A 陽性ウエルを検出した。

【0047】陽性ウエルに、最遅速オフレートを示す抗体を有したものに関してBIAcore (商標) 系での選択を2回施した。Pharmaciaアミンカップリングキット (Pharmacia Biosensor) を用いてストレプトタビジン (Pierce Chemical) を100 μl/ml で、35分間、5 μl/分の流量を用いて、p H 4.0 で、カルボキシル化デキストラン被覆バイオセンサーチップ (Pharmacia Biosensor) と接合させた。典型的には、2000 RU を付加した。配列表に記述したような配列番号 1 9 の残基 1 に関してピオチニル化したペプチド (100 ng/ml) を、100 μl/分の流量で10秒間、ストレプトタビジンチップ上を通した。抗体を含有する上清をチップ上を通して (2 μl/分で30秒間)、付加抗体の量を書き留めた。緩衝液を H B S (Pharmacia Biosensor) に変えて、次の80秒間、解離速度を書き留めた。各実行間の30秒間にチップを0.1 N H C l で洗浄し、残留抗体を除去して、あらゆる非特異的結合を取り除いた。BIAevaluation運動分析ソフトウェア

ジョン2.1を用いて、オフレートを確定した。遅速オフレートを有するクローンを探した。さらなる分析のためにm A b 5109を選択した。

【0048】I型コラーゲン、コラゲナーゼにより切断されたI型コラーゲン、I I型コラーゲンおよびコラゲナーゼにより切断されたI I型コラーゲンから成る4つの調製物を、各々、4つのチャンネルBIAcore (商標) 系の単一チャンネルと結合させた。Pharmaciaアミンカップリングキット (Pharmacia Biosensor) を用いて、35分間、5 μl/分の流量を用いて、p H 4.0 で、これらをカルボキシル化デキストラン被覆バイオセンサーチップ (Pharmacia Biosensor) と接合させた。4つの流動細胞は、それぞれ8000、7000、4000および4000RUを付加した。細胞を0.1 N H C l で洗浄してそれらを清浄にしてあらゆる非結合化物質を除去し、実行間にそれらを清浄化してあらゆる残留抗体を除去した。全抗体調製物をプロテインGクロマトグラフィー (Pharmacia Biotech) により精製し、10 μg/ml で動かした。4つの表面の各々との全結合を記録した。コラゲナーゼ切断コラーゲン (切断化 I 型 = 23 RU; 切断化 I I 型 = 173 RU) との選択的結合を示し、非切断化コラーゲン (I 型 = 23 RU; I I 型 = 15 RU) との有意の結合を欠いたために、抗体5109が選択された。5%ウシ胎仔血清 (Hyclone) を含有する H T 培地 (Sigma) 中での稀釈を制限することにより9回サブクロニング後、安定5109モノクローナルハイブリドーマを得た。それを、ATCC-HB-12435としてアメリカ培養細胞コレクションに寄託した。

【0049】実施例 3

捕獲抗体として9A4を、検出抗体としてモノクローナル抗体5109を用いるサンドイッチ検定の説明
モノクローナル抗体9A4 (捕獲抗体) を、100 μl/ウエルを用いて、0.05 M ホウ酸ナトリウム緩衝液、p H 8.5 中に10 μg/ml で 9A4 を含有する (4、5 および 6 の番号を付けた対照ウエル以外。表1参照) Nunc Maxisorp (商標) (VWR, Boston, MA) 96ウエルプレートに付加し、4 で18~48時間インキュベートした。

【0050】0.05% TW - 20 (Sigma) を含有する D P B S (D P B S / T W - 20) を用いて、3回、プレートを洗浄した。200 μl/ウエルを用いた。プレート中のウエルを、新たに調製された D P B S 中に溶解させた1% 脱脂乾燥乳 (N F D M) (N F D M D P B S) で遮断した。即ち、室温で1時間インキュベートした100 μl/ウエルを用いて、使用当日以下の間、氷上に保持した。

【0051】遮断溶液を捨て、ウエルを200 μl の D P B S / T W - 20 で1回洗浄した。ペプチド130を0.1% N F D M D P B S 中で、表1に示した濃度に稀釈した。ペプチド130は、配列番号 2 0 として配列表に記述された配列を有し、Anaspec Inc (San Jose, CA) により合成され、精製されたものであった。ペプチド130 (配列番

号20)の稀釈液、適切な稀釈での検体および対照を、*【0052】
表1に示したような顕微滴定プレートの特定のウエル中【表3】
に入れた。

表1. マイクロタイター・プレートと抗体コーティング・スキームのアウトライン

		ペプチド130 (配列番号20) ng/ml											
ペプチド	130	2	1.33	0.889	0.59	0.4	0.26	0.18	0.12	0.08	0.05	0.03	0.02
		//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//
	サンプル	サンプル	サンプル	サンプル	サンプル	サンプル	サンプル	サンプル	サンプル	サンプル	サンプル	サンプル	サンプル
		//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//
		//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//
		//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//
		//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//
対照		1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6

【0053】

表2. 対照ウエルへの添加

【表4】

	対照:		ビオチン化 5109	抗-ビオチン抗体 HRP-標識
	9A4	130		
1	+	-	-	+
2	+	+	-	+
3	+	-	+	+
4	-	+	+	+
5	-	+	-	+
6	-	-	+	+

【0054】ウエルを200 μ l / ウエルのDPBS / TW-20で3回洗浄した。ビオチン接合mAb5109 (Bt-5109) を、1、2および5以外のすべてのペプチド130 (配列番号20) 含有ウエル、全試料ウエルおよび全対照ウエルに付加した。0.1% NFDMPBS中に1 μ g/mlのBt-5109 (100 μ l / ウエル) を各ウエルに付加し、プレートを37 $^{\circ}$ Cで40分間インキュベートした。
【0055】注: 1 mgのmAb5109当たり37 μ gのビオチン-N-ヒドロキシスクシニアミド (Pierce Chemical) を用いて2時間、mAb5109をビオチン化した後、10kDのカットオフ透析カセット (Pierce Chemical) を用いて一夜透析した。200 μ l / ウエルのDPBS / TW-20でウエルを3回洗浄した。HRPと接合させ

30 たマウスモノクローナル抗ビオチン抗体 (Jackson ImmunoResearch) を0.1% NFDMPBS中に/5000稀釈し、100 μ l / ウエルを全ウエルに付加して、室温で30分間インキュベートした。

【0056】200 μ l / ウエルのDPBS / TW-20でウエルを3回洗浄した。100 μ l / ウエルの1工程Turbo (3, 3', 5, 5' -テトラメチルベンジジンを用いるために用意する; Pierce Chemical) を各ウエルに付加し、室温で約10分間インキュベートした。2 NH₂SO₄で発色を停止させた。450 nmでの分光光度計で結果を読み取った。

【0057】

【表5】

表3. 9A4捕獲/Bt-5109検出サンドイッチ・アッセイの
ための標準曲線データ

E311	ペプチド130 (配列番号20)		log		線形		線形回帰	
	ng/ml	nM	nM	OD450	回帰	勾配	切片	
1	10	5.88	0.769	0.78		0.029	0.024	
2	5	2.94	0.468	0.74				
3	2.5	1.47	0.167	0.698				
4	1.25	0.735	-0.134	0.623	0.618			
5	0.625	0.368	-0.435	0.483	0.474			
6	0.313	0.184	-0.736	0.326	0.331			
7	0.156	0.092	-1.037	0.151	0.187			
8	0.078	0.046	-1.338	0.072	0.044			
9	0.039	0.023	-1.639	0.039				
10	0.020	0.011	-1.94	0.005				
11	0.010	0.006	-2.241	-5E-04				
12	0	0		-0.006				

【0058】ペプチド130の濃度および450 nmで読み取られるその結果生じた光学密度(表3)から、標準曲線を作図した(図1)。他の適切なペプチドまたはコラーゲン断片に置き換えて、図1と同様の標準曲線を調製し得る。その単位は、標準のモル当量に換算して表した。この場合、単位は、ペプチド130(配列番号20)のnM当量であった。

【0059】曲線の線状部分に亘って、回帰直線を用いて、データを適合させた。所定の場合では、標準曲線は0.735 nM~0.46 nMで線状であって、濃度が対数スケールで示される場合(本実施例、図1と同様)、回帰曲線は、曲線のちょうど線状部分を用いて得られる。線状部分の外側にある試料に関しては、濃度はグラフから読み落とされるか、または試料が曲線の標準部分内になるよう希釈され得るか、またはそれらは検出限界以下である。

【0060】log(nM)とOD450との間の回帰は、0.029 OD450/ log(nM)の勾配および0.024 OD450の切片を示す。未知の試料を動かす場合、検量線を用いて、試料の光学密度からコラーゲナーゼ-生成II型コラーゲン断片

20の濃度を確定し得る。以下の方程式が用いられる：

$$\text{Log(濃度)} = (\text{試料OD450} - \text{切片}) / \text{勾配}$$
 試料：所定の場合、滑液の未知の試料は0.229というOD450を示した。したがって、

$$\text{Log(濃度)} = (\text{試料OD450} - 0.024) / 0.029 = -0.949$$
 抗logを考慮すると、滑液中の断片の濃度 = 0.112 nM。

【0061】実施例4

捕獲抗体としてモノクローナル抗体5109を、検出抗体として9A4を用いるサンドイッチ検定の説明
 モノクローナル抗体5109(捕獲抗体)を、100 μL/ウエルを用いて、0.05 Mホウ酸ナトリウム緩衝液、pH8.5中に10 μg/mlで5109を含有する(4、5および6の番号を付けた対照ウエル以外。表1参照) Nunc Maxisorp(商標)(VWR, Boston, MA) 96ウエルプレートに付加し、4で18~48時間インキュベートした。

【0062】200 μL/ウエルのDPBS/TW-20を用いて、3回、プレートを洗浄した。プレート中のウエルを、100 μL/ウエルの新たに調製されたDPBS中に溶解した1% NFD Mで遮断し、室温で1時間インキュベートした。遮断溶液を捨て、ウエルを200 μLのDPBS/TW-20で1回すすいだ。ペプチド130(配列番号20)を0.1% NFD M DPBS中で、表4に示した濃度に希釈した。ペプチド130(配列番号20)の希釈液、適切な希釈での未知の検体および対照を、表4に示したような顕微滴定プレートの特定のウエル中に入れた。

【0063】

【表6】

表4. マイクロタイター・プレートと抗体コーティング・スキームのアウトライン

		ペプチド130 (配列番号20) ng/ml											
ペプチド	130	2	1.33	0.889	0.59	0.4	0.26	0.18	0.12	0.08	0.05	0.03	0.02
		//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//
		サンプル	サンプル	サンプル	サンプル	サンプル	サンプル	サンプル	サンプル	サンプル	サンプル	サンプル	サンプル
		//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//
		//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//
		//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//
		//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//
対照		1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6

【0064】

表5. 対照ウェルへの添加

【表7】

	対照:		ビオチン化 9A4	抗-ビオチン抗体 HRP-標識
	5109	130		
1	+	-	-	+
2	+	+	-	+
3	+	-	+	+
4	-	+	+	+
5	-	+	-	+
6	-	-	+	+

【0065】ウエルを200 μ l / ウエルのDPBS / TW-20で3回洗浄した。ビオチン接合モノクローナル抗体9A4 (Bt-9A4) を、1、2および5以外のすべてのペプチド130 (配列番号20) 含有ウエル、全試料ウエルおよび全対照ウエルに付加した。0.1% NFDMPBS中に1 μ g/mlのBt-9A4 (100 μ l / ウエル) を各ウエルに付加し、プレートを37 $^{\circ}$ Cで40分間インキュベートした。

【0066】注: 1 mgのモノクローナル抗体9A4当たり37 μ gのビオチン-N-ヒドロキシスクシニアミド (Pierce Chemical) を用いて2時間、9A4をビオチニル化した後、10 kDのカットオフ透析カセット (Pierce Chemical) を用いて一夜透析した。200 μ l / ウエルのDPBS / TW-20でウエルを3回洗浄した。HRPと接合させ

たマウスモノクローナル抗ビオチン抗体 (Jackson ImmunoResearch) を0.1% NFDMPBS中に/5000稀釈し、100 μ l / ウエルを全ウエルに付加して、室温で30分間インキュベートした。

【0067】200 μ l / ウエルのDPBS / TW-20でウエルを3回洗浄した。100 μ l / ウエルの1工程Turbo (商標) (3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジンを用いるために用意する; Pierce Chemical) を各ウエルに付加し、室温で約10分間インキュベートした。2 NH₂S₂O₈で発色を停止させた。450 nmでの分光光度計で結果を読み取った。

【0068】

【表8】

表6. 5109捕獲/Bt-9A4検出²⁸サンドイッチ・アッセイのための標準曲線データ

Clr7	ペプチド130 (配列番号20)		log		線形		線形回帰	
	ng/ml	nM	nM	OD450	回帰	勾配	切片	
1	10	5.88	0.769	0.64		0.42	0.70	
2	5	2.94	0.468	0.65				
3	2.5	1.47	0.167	0.62				
4	1.25	0.735	-0.134	0.61				
5	0.625	0.368	-0.435	0.57				
6	0.313	0.184	-0.736	0.52	0.52			
7	0.156	0.092	-1.037	0.40	0.39			
8	0.078	0.046	-1.338	0.23	0.26			
9	0.039	0.023	-1.639	0.11	0.13			
10	0.020	0.011	-1.94	0.04	0			
11	0.010	0.006	-2.241	0.01				
12	0	0		-0.01				

【0069】ペプチド130(配列番号20)の濃度および450 nmで読み取られるその結果生じた光学密度から、標準曲線を作図した。他の適切なペプチドまたはコラーゲン断片に置き換えて、標準曲線を調製し得る。必要とされる単位は、標準のモル当量に換算して表した。この場合、単位は、ペプチド130(配列番号20)のnM当量に換算すると適切であった。

【0070】曲線の線状部分に亘って、回帰直線を用いて、データを適合させた。所定の場合では、標準曲線は0.3125 nM~0.195 nMで線状であって、濃度が対数スケールで示される場合(本実施例の図と同様)、回帰曲線は、曲線のちょうど線状部分を用いて得られる。線状部分の外側にある試料に関しては、濃度はグラフから読み落とされるか、または試料が曲線の標準部分内になるよう希釈され得るか、または試料中のコラーゲン断片の濃度は検出限界以下であり得る。

【0071】log(nM)とOD450との間の回帰は、0.42 OD450 nm/ log(nM)の勾配および0.70 OD450 nmの切片を示す。試料を動かす場合、検量線を用いて、試料の光学密度からコラーゲン断片の濃度を確定し得る。試料：所定の場合、関節炎患者からのヒト尿の未知の試料は0.124というOD450を示した。

【0072】 $\text{Log(濃度)} = (\text{試料OD450} - 0.70) / 0.42 = -1.36$
抗logを考慮すると、尿中の断片の濃度=0.44 nM。別の場合には、標準曲線は0.249という勾配および0.638という切片を示した。ヒト変形性関節症血漿の未知の試料は、0.172というOD450 nmを有した。変形性関節症血漿の試料は、68 pMという断片濃度を有した。

【0073】実施例5

競合検定におけるII型コラーゲン断片の量を直接測定するために用いられ得る抗体5109

濃度分析(BIA Applications Handbook, Pharmacia Biosensor, June, 1994 Edition, p. 6-2~6-9)の適応に際して、ストレプトタビジン(Pierce Chemical, Rockford, IL)を100 µg/mlでPharmaciaアミンカップリングキット(Pharmacia Biosensor)を用いて、35分間、5 µl/分の流量を用いて、pH4.0で、カルボキシル化デキストラン被覆バイオセンサーチップ(Pharmacia Biosensor)と接合させた。典型的には、2000 RUを付加した。配列番号19として配列表に記述された配列を有するピオチニル化ペプチド(100 ng/ml)を、5 µl/分の流量で2分間、ストレプトタビジンチップ上を通した。144 RUのペプチドをストレプトタビジン表面に付加した。mAb 5109を6.3 µg/mlの濃度で、単独で、あるいは標準濃度のペプチド054(配列番号19)との混合物中、または5109および試料の希釈物と未知量のコラーゲン断片との混合物中で、10 µl/分の流量で1分間、ペプチド表面上を通した。BIAevaluation(商標)運動分析ソフトウェアバージョン2.1を用いて、各曲線に関する会合相の線状部分の勾配を分析した。競合ペプチド054(配列番号19)対勾配の標準曲線を作図した。試料勾配対標準曲線の勾配を比較して、エピトープの量を算出することにより、試料中のコラーゲンエピトープの量を確定した。各注入間に、チップを0.1 N HClで30秒間清浄化し、抗体を除去した。

【0074】

【表9】

表7. 標準量のペプチド054 (配列番号19) と混合された5109

	ペプチドの 希釈054 M	log M	r0 勾配	線形 回帰値
1	1.34E-0.6	-5.87	0.187	
2	6.71E-07	-6.17	0.208	
3	3.36E-07	-6.47	0.375	
4	1.68E-07	-6.78	0.729	2.16
5	8.39 E-08	-7.08	12.7	10.09
6	4.19 E-08	-7.38	17.1	18.03
7	2.10 E-08	-7.68	25.7	25.96
8	1.05 E-08	-7.98	22.5	
9	5.24 E-09	-8.28	26.6	
10	2.62 E-09	-8.58	24.0	
11	1.31 E-09	-8.88	26.6	
12	6.55 E-10	-9.18	25.6	
13	0		23	

$$\begin{aligned} \text{線形回帰勾配} &= -26.36 \\ y\text{-切片} &= -176 \end{aligned}$$

【0075】試料：ウシ鼻軟骨のコラーゲナーゼ - 3 MM P - 13消化物の上清。試料を、2倍、4倍および8倍に希釈したBIAcore (商標)チップ上で動かした。054ペプチド (配列番号19) に関するコラーゲンの算定量を確定した。結果は、表8の第4列に示されている。力価を

掛けた後、コラーゲンのモル濃度 (M) をペプチド054 (配列番号19) 標準に関して確定し得る。

【0076】

【表10】

表8. ペプチド054 (配列番号19) 濃度に関する、未知のサンプルの力価及び濃度

	力価	勾配	M (054)	nM (054)
5109	単独	6.648	ハック'ラウト'	
5109+	1:2	3.539	4E-08	80
5109+	1:4	4.885	2E-08	80
5109+	1:8	5.825	8E-09	64

【0077】希釈のための修正後の結果 (最後列) の非矛盾性は、未知の試料の3つの別々の希釈液 (最後列の隣) から算出される値の一致により示される。75 nMのII型コラーゲン断片の平均値が、ウシ鼻軟骨上清に関して得られる。

実施例6

9A4に関連した遺伝子工学処理抗体の調製

遺伝子工学処理抗体および生物学的に活性なまたは関連した分子としてのそれらのその後の評価のための基礎は、親抗体のV_LおよびV_Hドメインのクローニング (適正な形状へのアッセムブリーを用いて) および特性化である。目的の抗体のV_LおよびV_H構造配列、ならびに本発明に記載した抗原との活性結合部位を形成する特定のV_L-V_H組合せの独自性を、我々は確定した。9A4可変

部遺伝子をクローニングする前に、可変ドメインがクローニングされたときに正確な可変ドメインが実際に得られ、骨髄腫融合相手由来の他のもの、またはハイブリドーマを生成する場合に用いられるB細胞からの不活性擬似遺伝子は得られないということが確認され得るよう

20 に、親9A4 I g G 1 抗体の可変ドメインの部分のタンパク質配列を確定することが必要であった。回転ボトル中で9A4ハイブリドーマを増殖させることにより、9A4 I g G 1 を含有する培養上清を生成した。上清を、二塩基性リン酸ナトリウムを用いてpH7.5に調整し、3 M塩化ナトリウムを用いて塩濃度を150 mMの最終濃度に調整した。濾過 (0.2 μ) 上清を、20 ml / 分の流量で15 ml床容積のプロテインG (Pharmacia) に通した。150 mM NaCl溶液でカラムをさらに洗浄後、抗体を100 mMグリ

シン、pH3.1で溶離した。マウス免疫グロブリンアイソタイプキット(Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)からの抗血清を用いて抗体をアイソタイプ化し、軽鎖を有するIgG1クラスネズミ抗体であることが判明した。

【0078】いくつかの単離タンパク質はそれらのアミノ末端で「遮断される」ことが観察されている。「遮断される」とは、ポリペプチド鎖のアミノ末端のアミノ酸残基は、細胞作用により、またはポリペプチド鎖がエドマン分解に耐性であるような方法での何らかの特異性化学変化により、翻訳後に、その構造中で化学的に修飾されている、ということを意味する。エドマン分解法は、タンパク質のアミノ酸配列を確定するために、過去40年間に亘ってルーチンに用いられた化学手法である。シーケンエーターまたはタンパク質シーケンサーとして知られている実験室計器で通常は自動化されるエドマン分解技法の使用は、タンパク質生化学の当業者に周知の標準手法である。

【0079】遮断の一般方式は、アミノ末端グルタミル残基のピログルタミル残基への転換である。これは、新規のアミド連鎖が前者アミノ基とカルボキシル基との間に形成されるために、エドマン反応に非許容可能である構造を形成するためのグルタミル残基の環化により起こる。このような状況では、タンパク質のアミノ末端から配列情報を得る能力は、化学的または酵素的な方法によるピログルタミル残基の除去によっている。重要な方法は、ピログルタメートアミノペプチダーゼと呼ばれる酵素(EC 3.4.19.3)を用いてピログルタミル残基を除去することである。溶液中に存在するかまたは膜物質、例えばPVDf(ポリビニリデンジフルオリド)に電気プロットされ得る遮断化タンパク質を、十分量のタンパク質が非遮断化されて自動エドマン化学によるアミノ酸配列の決定を成功させ得るまで、ピログルタメートアミノペプチダーゼの溶液で処理する。これに関する方法の例は、Fowler et al., "Removal of N-Terminal Blocking Groups from Proteins" in Current Protocols in Protein Science., pp.11.7.1-11.7.17 (Eds. Coligan et al.), John Wiley, New York (1996)に記載されている。

【0080】本発明の研究では、試料緩衝液中に還元剤(β-メルカプトエタノール)を用いることによるSDS*

*S-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により、mAb9A4の重および軽鎖を分離した。電気泳動後、ゲル中のポリペプチドをPVDf膜に電気プロットし、クーマシーブリリアントブルーR-250で染色することにより検出した。次に、9A4の重および軽鎖を含有するバンドをプロットから切り出して、ピログルタメートアミノペプチダーゼで別々に処理した。各場合に、それは、この処理後に、エドマン分解によるアミノ末端配列情報を得ることができることを立証した。Perkin-Elmer Applied Biosystems Model 494 Prociseタンパク質シーケンサーで、シーケンシングを実施した。

【0081】タンパク質からの内部(即ち、N末端でない)アミノ酸配列情報を得ることが望ましい場合、タンパク質のプロット化試料をトリプシンで消化し、その結果生じた消化物をHPLCにより分別して、個々のペプチドを得て、これをその後シーケンシングし得る。本発明の研究の特異性を以下に示す。

【0082】ピログルタメートアミノペプチダーゼ(PGAP)によるN末端脱遮断
トリス-Gly4~20%ポリアクリルアミドゲル(Novex, San Diego)上でのSDS-PAGEにより、抗体(9A4)をその構成重および軽鎖に分離した。次にそれをProBlott(商標)(Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA)上で電気プロットして、Ponceau S(Sigma)染色によりバンドを可視化した。

【0083】9A4軽鎖を含有する膜を切り出し、0.1Mリン酸ナトリウム、10mMNa₂EDTA、5mMジチオエリトリトール、5%グリセロールおよび0.1%還元トリトンX-100を含有する緩衝液中で30分間、インキュベートした。ポリグルタメートアミノペプチダーゼ(20mg)(Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)をバイアルに付加し、内容物を静かに混合し、反応物を37℃で一夜インキュベートした。膜を取り出し、水中で広範囲に洗浄して、すべての塩、洗剤および酵素を除去した。次に膜を、N末端配列分析のために、メーカーにより提供された処方箋にしたがって、Applied Biosystems Model 494タンパク質シーケンサー(Perkin-Elmer)中に入れた。

【0084】重鎖を前記と同様の方法で処理した。

【0085】

表9. 9A4タンパク質配列決定のN-末端配列結果

サンプル	配列データファイル	配列
軽鎖	9A4L_7 3-22-96	IVLTQSPVFMSPGQKVTM (注1)
重鎖	9A4H_4 3-26-96	IQLVQSGPELKKPGQTVKI(S) (注2)

括弧内の残基は推定判定を示す。

注1: この配列は配列番号33の残基9~28に対応する。

注2: この配列は配列番号32の残基13~32に対応する。

【0086】前記で得られたN末端配列データの他に、9A4抗体軽鎖の内部シーケンシングも、Fernandez et al., Anal. Biochem., 218:112-17 (1994) から開発された方法にしたがって、実施した。9A4軽鎖に対応する4つのバンドをProBloom (商標) から切り出して、0.1 M トリス - HCl、pH 8.8中に10%アセトニトリルおよび0.1%還元トリトンX-100を含有する緩衝液中で30分間インクとした。シーケンシング等級修飾化トリプシン (0.2 mg) (Promega, Madison, WI) を付加し、バンドを37 °Cで一晩インキュベートした。その結果生じたペプ*

*チドを、洗浄 (H₂O中の60%アセトニトリルおよび0.1% TFAを用いて) および音波処理により、膜から抽出した。Vydac C18 218TPカラム (1.0 x 250 cm) (Vydac, Hesperia, CA) 上での逆相HPLCにより、ペプチドを分離した。手で視覚的にピークを収集し、前記のように494型タンパク質シーケンサー上での自動エドマンシーケンシングにより選定ピークを分析した。

【0087】
【表12】

表10. ペプチド断片タンパク質配列決定についてのN-末端配列結果

配列データファイル	配列
9A4L_10	DSTYSMSSTL (C _κ 配列)
9A4L_12	LLIHATSNLASGVPVR (注1)
9A4L_13	FSGGGSGTYSLTISR (注2)
9A4L_14	XFNR (C _κ 配列)
9A4L_15	(H) NSYTCEATHK (C _κ 配列)
9A4L_16	(Q) NGVLNGTSY (C _κ 配列)
9A4L_17	LEIIR (注3)

括弧内の残基は推定判定を示す。

注1 : この配列は配列番号33の残基52~67に対応する。
注2 : この配列は配列番号33の残基68~83に対応する。
注3 : この配列は配列番号33の残基110~114に対応する。

【0088】成熟9A4軽鎖 (V_L - C_{κappa}) アミノ酸配列を以下に示す :

1 QIVLTOSPVF MSASPGKVT MTCSSSSVS YMYWYQQKPG SSPRLLIHAT SNLASGVPVR
61 FSGGGSGTSY SLTISRMEAE DAATYYCQQW RSYTRTFGGG TKLEII*RADA APTVSIFFPS
121 SEQLTSGGAS VVCFLNFPYP KDINVKWKID GSERONGVLN SWTDQDSKDS TYSMSSTLTL
181 TKDEYERHNS YTCEATHKTS TSPIVKSFNR NEC

【0089】
【化1】

【0090】自動エドマンシーケンシング (前記表9も参照) により、下線を付したアミノ酸をシーケンシングした。クローン化DNAから得られた配列は、上に示した元の抗体タンパク質の断片からのアミノ酸配列と比較した場合、クローン化された遺伝子は9A4V_L (クローン化V_L (下記参照) およびネズミC_{κappa} (Kabat et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, NIH, 5th Edition, publication #91-3242, 1991") のDNAシーケンシングから得られる配列とエドマン分解により得られる配列との比較) に関して正しいものである、ということを示す。

【0091】前記のアミノ酸106は、通常は、J1生殖細胞系列セグメント中のLys残基であるが、しかし9A4V_L に関して上に示したIle残基に突然変異化された。アミノ酸106はV_L ドメインの末端に印を付けるが、一方、アミノ酸107 (Arg) はC_{κappa} ドメインの起点に印を付け

る。
mAb 9A4のV_L およびV_H 配列のクローニングおよび確定
9A4ハイブリドーマ細胞株を、5%ウシ胎仔血清 (Hyclone) を含有するHT培地 (Sigma) 中で増殖させた。メーカーのプロトコールによりPharmacia Quick Prep (商標) mRNA抽出キット (Pharmacia) を用いて、1 x 10⁷細胞を含有する細胞ペレットから、mRNAを抽出した。次に、メーカーにより提供されるプロトコールにより、Boehringer MannheimのcDNAキット (Indianapolis, IN) を用いて、V_L およびV_H 遺伝子セグメントの両方に関して、cDNAを合成した。V_L cDNA反応に用いられ、配列番号21として配列表に記述されたオリゴ (MLKと呼ばれる) はネズミ軽鎖 領域に特異的であったが、一方、V_H cDNA反応に用いられるオリゴ (MHGと呼ばれる) はネズミ重鎖 領域のC_H 2ドメインのセグメントに特異的である。MHGの配列は、

配列番号22として配列表に記述される。このオリゴは、4つのネズミIgGアイソタイプ、例えばIgG1、IgG2a、IgG2bおよびIgG3とアニーリングするよう設計された。配列番号22のヌクレオチド5のIgG1に関して単一塩基ミスマッチが認められるが、しかしこれがアニーリングおよびcDNAのその後の生成を妨げないことは当業者には明らかである。Oligo Etc. (Wilsonville, OR)、Genosys (The Woodlands, TX) またはPerkin-Elmer Applied Biosystems (Foster City, CA) によりオリゴを合成した。

【0092】アミノ末端アミノ酸配列データを用いて、下記のようにPCRにより正しい9A4V_H遺伝子を単離するために考え得るオリゴを生成した。配列番号32の残基13~32に対応するV_Hアミノ末端領域に関して上に示した20のアミノ酸配列に基づいて、成熟形態の選定抗体重鎖のアミノ末端アミノ酸が実際はGln残基(配列番号32の残基12)であった場合に、Sequences of Proteins of Immunological interest, Volume II, 1991から*

264: 5'- GG CTG TGG AAC TTG CTA TTC (SEQ ID NO: 23)

RFT2: 5'- GG GTG TGG ACC TTG CCA TTC (SEQ ID NO: 24)

2H1: 5'- GG GTG TGG ACC TTG CTA TTC (SEQ ID NO: 25)

【0094】これらの配列は、対応する抗体のV_Hsに関するシグナルペプチド中のアミノ酸-11~-17をコードする(Kabat et al., 上記、参照)。したがって、MHMISCと呼ばれる選定5'オリゴは、真の9A4V_Hを単離するよう設計した。MHMISの配列は、配列番号26として配列表に記載される。9A4V_Lを単離するために、既知のネズミ軽鎖のリーダーペプチドセグメントとアニーリングするよう、一連の5つの縮退オリゴ組を設計した。これらのオリゴを5つの別々のPCR増幅に用いた(下記参照)。5つの縮退オリゴ組の配列は、Dow Chemical Company (Midland MI) により提供され、これによって承認される。真正9A4V_Lを生じた5'オリゴ組はMK3であって、その配列は、配列番号27として配列表に記述されている。これらのオリゴは、シグナルペプチド中の残基-8~-14をコードする。

【0095】MIGG1CH1と呼ばれ、その配列は配列番号28として配列表に記載されているネズミIgG1重鎖定常部(C_H1ドメインからの)の、そしてMLKNと呼ばれ、その配列は配列番号29として配列表に記載されている軽鎖の定常部の既知の配列から、V_LおよびV_HPCRのための逆プライマーを設計した。これらのオリゴを、DNA合成に用いられる3'プライマーに対して(上流)入れ子にした。

【0096】アニーリングセグメントは配列番号29のヌクレオチド10で開始する。対応する前記のオリゴおよび1ngの9A4ハイブリドーマcDNAを用いて、9A4V_HおよびV_L遺伝子を増幅した。メーカーの使用説明書に

*のKabatデータベースを用いて、既知の抗体の配列を9A4V_Hの配列と比較した。成熟9A4V_Hの最初の20個のアミノ酸と適合する抗体V_Hドメインとしては、以下のものが挙げられる:mAb264(Nottenburg et al., J. Immunol., 139:1718-1726(1987)); MAbRFT2(Heinrich et al., J. Immunol., 143:3589-3597(1989)); およびMAB2H1(Li et al., Mol. Immunol., 27:303-311(1990))。成熟抗体のアミノ末端に対応する元のDNA配列を得ることは重要であるため、5'PCRオリゴはアミノ末端から、即ちシグナルペプチドセグメント中に5'(上流)をアニーリングするよう設計されるべきである。9A4V_Hの最初の20個のアミノ酸が同一である前記の3つの抗体のDNA配列は、既知のシグナルペプチドDNAおよびアミノ酸配列を有した。そのDNA配列をここで示す:(下線を付したヌクレオチドは配列間の差を示す)

【0093】

【化2】

CTA TTC (SEQ ID NO: 23)

CCA TTC (SEQ ID NO: 24)

CTA TTC (SEQ ID NO: 25)

したがって、ネイティブタグポリメラーゼを有するGene Amp(商標)キット(Perkin Elmer)を用いて、PCRを生じさせた。変性、アニーリングおよび重合の温度は、それぞれ94、55および72で45、45および60秒間であった。V_HPCRおよびV_LPCRに関しては、アニーリング温度を60に変えた。PCRを、36回+72で7分間の最後の重合サイクルを実行して、その後、4に保持した。PCR生成物をシーケンシングして、V_LおよびV_HのDNAおよび誘導アミノ酸配列を決定し、立証した。配列決定に用いたオリゴは、V_Lに関してはMK3およびMLKN、そしてV_Hに関してはMIGG1CH1であり、それぞれ配列番号27、29および28として配列表に記載されている。

【0097】9A4V_HおよびV_Lに対応するDNA配列は、それぞれ配列番号5および6として配列表に記載されている。9A4V_HおよびV_L遺伝子の誘導アミノ酸配列は、それぞれ配列番号32および33として配列表に別々に記述されている。意外なことに、オリゴMHMISC(配列番号26)は、9A4IgG1のタンパク質シーケンシングにより確定された成熟タンパク質V_Hの最初の20個のアミノ酸と正確に対応するV_H配列を首尾良く提供した。5'PCRオリゴMHMISC(配列番号26)の3'に隣接して、9A4V_Hのリーダーペプチドセグメント中のDNA配列はmAb2H1の対応するセグメントとほとんど同一であり、したがって、2H1と同一の生殖細胞系列V_H遺伝子から得られると思われる。V_H領域の2つの抗体間のアミノ酸配列には3つの差、即

ち、CDR1に1つ、CDR2に1つそしてFR3に1つのみが認められる。これらは、これらの2つの抗体に関しては親和性突然変異工程中に生じたもので、それぞれの標的に対する抗体の各々の特異性および親和性を限定する場合に一役を演じ得ると思われる。9A4V_HはネズミJ_H2接合セグメント遺伝子を利用し、配列番号32の残基114(CDR3内)~126をコードする。

【0098】9A4可変重鎖は、KabatマウスIg重鎖I族に属する(ここで同定されるV_H遺伝子は、Kabatデータベースから得た。http://immuno.bme.nwu.edu/famgro 10 up.html)。9A4V_H重鎖(配列番号5)は、データベースID番号001246に最もよく似ている。これら2つのV_H遺伝子には2つの差が認められるだけで、1つはFR(無症候突然変異)に、そして他方は、9A4はIleを、そして001246はMetを有するアミノ酸位置45(配列番号32)でCDR1に生じる。これらの遺伝子とともに、同一生殖細胞系列V_Hから得られると考えられる。

【0099】本発明の方法は、V_H遺伝子生成物がこの他の抗体のV_Lを有する生産的抗体V_L-V_H対を形成する場合に、それが9A4と類似の方法(特異性および親和性)で結合するように、9A4V_H生殖系列遺伝子に関連した他の抗体のV_H遺伝子を用いて実施し得る。9A4V_L遺伝子および誘導アミノ酸配列は、それぞれ配列番号6および33として配列表に記述されている。9A4V_L遺伝子の誘導アミノ酸配列は、前記のような真性9A4軽鎖のタンパク質シーケンシングからのすべてのペプチド断片と適合する。9A4可変軽鎖は、KabatマウスXI族に属し、データベースID番号006306に最もよく似ている。10個のヌクレオチドミスマッチが認められ、7個のアミノ酸差を生じる。これらの差のうち2つはFR1に、30 2つはCDR2に、1つがFR3にそして2つがCDR3に生じる。大多数の変化がCDRで起こるために、これら2つの遺伝子は、同一のまたは少なくとも非常によく似た生殖細胞系列V_Lから得られることにより関連すると考えられる。

【0100】本発明の方法は、V_L遺伝子生成物がこの他の抗体のV_Hを有する生産的抗体V_L-V_H対を形成する場合に、それが9A4と類似の方法(特異性および親和性)で結合するように、9A4V_L生殖系列遺伝子に由来するかまたは関連した他の抗体のV_L遺伝子を用いて実施 40 し得る。本発明の方法は、V_LおよびV_H遺伝子生成物が生産的抗体V_L-V_H対を形成する場合に、この他のまたは9A4と異なる抗体が9A4と類似の方法(特異性および親和性)で本質的に結合するように、V_LおよびV_Hがともに本明細書中に開示した9A4V_LおよびV_H生殖系列遺伝子に由来する抗体を用いて実施し得る。

【0101】本発明の9A4抗体の遺伝子工学処理バージョンを設計し、構築する基礎を、我々はここに有している。とともに一本鎖抗体(scFv)である2つの例を以下に示す。一例では、設計はベクターpCANTAB6中のV_H 50

-リンカー-V_L-HIS-MYCタグであり、他の場合は、scFvは、異なるリンカーを用いて反対配向で構築され、即ち、ベクターpATDFLAG中のV_L-リンカー-V_H-FLAGタグである。これらの例は限定的なものではなく、前記の抗体型、例えばFabを得るために、9A4の新規特性化V_HおよびV_Lドメイン(配列番号5および6)が一部または全部利用され得ること、あるいはVドメインの何らかの重要な部分だけを利用する新規の形状は、当業者には明らかである。

【0102】pCANTAB6における9A4scFv(V_H-リンカー-V_L)の構築

scFv抗体中にV_HおよびV_L断片のアッセムブリを調製するために、SOEing(重複伸張によるプライミング)PCRプライマーを利用した。2つのプライマーを設計し、V_H領域に関しては、Perkin Elmerから入手した。5'V_H末端プライマーに関してはSfiI部位を付加し、一方、V_Hプライマーに関しては3'末端に、(Gly₄Ser)₃リンカーを有する重複配列を付加した。5'V_Hプライマーは9A4VH5CANと呼ばれ、3'V_H 20 プライマーは9A4H3CANと呼ばれる。これらは、配列表の配列番号34および35に対応する。

【0103】V_Lに関しては、Gly₄Serリンカー領域への重複を有する5'末端プライマーおよびNotI制限部位を組み入れる3'プライマーを設計し、Perkin Elmerから入手した。5'プライマーは9A4VL5CANと呼ばれ、3'V_Lプライマーは9A4VL3CANILEと呼ばれる。これらは、配列表の配列番号36および37に対応する。

【0104】V_HおよびV_LDNA構成成分をPCRにより増幅し、その後アッセムブリ、プルスルーSOE-PCR工程により接合した。SOE-PCR反応後、~700bpと同一であるアガロースゲル中のバンドを切り出して、メーカーの指示にしたがってQIAquick(商標)ゲル精製キット(QIAGEN)を用いてゲル精製した。その結果生じたDNAをSfiIおよびNotIで消化し、pCANTAB6ベクターDNA(Cambridge Antibody Technology, Melbourne, Cambridgeshire, UKから入手)との結紮に用い、これも同一制限酵素で消化した。次に結紮DNAを用いて、エレクトロポレーションによりコンピテント大腸菌TG1細胞を形質転換した。コンピテント大腸菌TG1細胞を生成するための基本プロトコールを以下に示す。

【0105】2リットル円錐フラスコ中で37に予熱した500mlの2YT培地(Bio101, LaJolla, CA)に、2.5mlのTG1細胞の新鮮な一夜培養を接種した。600nmでのODが0.2~0.25になるまで、通常は1~1.5時間、37で激しく曝気しながら細胞を増殖させた。フラスコを氷上で30分間冷まし、次に250ml遠心分離ボトルに注ぎ入れて、予冷(4)Sorvall遠心分離器中で4,000rpmで15分間回転させて、細胞をペレットにした。細胞を元の容積の予冷水中に再懸濁し、前記と同様に再び回転

して、細胞をペレットにした。

【0106】細胞を元の半分の容積、即ち250 mlの予冷水中に再懸濁して、氷上に3分間放置し、次に前記と同様に再懸濁し、回転させた。次に細胞を20 mlの予冷10%グリセロール中に再懸濁し、予冷50 ml Falcon管に移して、15分間放置し、ベンチトップ型遠心分離器で4

で10分間、3,500 rpmで遠心分離した。
【0107】細胞を最終的に1.0~2.5 mlの予冷10%グリセロール中に再懸濁し、エレクトロポレーション工程で直接使用した。結紮DNA (25~250 ngの9A4V_H-L 10

-V_L-SfiI/NotIを有するpCANTAB6-SfiI/NotIベクター)を、以下のようにコンピテント大腸菌TG1細胞中にエレクトロポレーション処理した。
【0108】結紮DNAを、標準プロトコールによりエタノール沈降させた。DNAペレットを10μlの滅菌脱イオン化蒸留水中に溶解した。DNA(全細胞容積の10%まで)を100μlの細胞に付加し、予冷エレクトロポレーションキュベット(Biorad)に移して、氷上で放置した。エレクトロポレーションGene Pulser装置(Biorad)パラメーターを25μFD、2.5 kVに設定して、パルス 20

コントローラーを200 ohmに設定した。キュベットをティッシュで拭いて乾燥し、エレクトロポレーション小室に入れ、1回パルス処理した。典型的には、3.5~4.8 msec範囲の時間定数を得た。エレクトロポレーション処理細胞をすぐに、2%グルコースを補給した1 mlの2YT培地で希釈した。細胞を15 mlファルコン管に移して、37 °Cで1時間振盪した。
【0109】形質転換細胞混合物(20~1000μl)を、2YT、2%グルコースおよび100μg/mlアンピシリンを含有する適切なサイズの寒天培地(2YTAG)プレート 30

上に載せた。最初に、枠外に下流配列を置く、NotI部位に5つの塩基挿入を有するクローン(p9A4ICAT3-2)を得た。これを修正するために、9A4NOTFIX3と呼ばれる新規のオリゴを作製したが、この配列は配列番号38として配列表に記載されている。アニーリングオリゴのための標的としてp9A4ICAT3-2を含有する大腸菌細胞を用いたPCR増幅を、メーカーのプロトコールによりAdvantage KlenTaq(商標)ポリメラーゼミックス(Clontech, Palo Alto, CA)を用いて実施した。アニーリングオリゴ(各々35 pmol)は、9A4NOTFIX3およびpUC19Rであ 40

った。pUC19Rの配列は、配列番号39として配列表に記載されている。それは、SfiI部位から上流をアニーリングする。
【0110】PCRサイクル(Perkin Elmer Cetus Model 9600 thermal cycler)を以下のようにセットアップした: 1回目サイクルに関しては、DNAの変性は94 °Cで1分、アニーリングは60 °Cで45秒、そして重合は68 °Cで1.5分であった。2~31回目に関しては、変性時間を30秒に低減した以外は、同一の温度および時間を用いた。最終回(32回目)に関しては、重合を5分にし、そ 50

の後、サイクラーは試料を4 °Cに冷却した。TAクローニング系(Invitrogen)を用いて、その結果生じたPCR生成物を、メーカーが示唆したプロトコールを用いてプラスミドpCR2.1中でクローン化した。前記のKlenTaq(商標)ポリメラーゼを用いたPCRにより、オリゴ前方M13および逆M13(Invitrogen)(それぞれ、配列番号53および54として配列表に記載されている)を用いて、12の白色コロニーを、挿入物に関してスクリーニングした。3つのところには、アガロースゲル電気泳動で、的確なサイズの挿入物を生成した。9A4に関して正確なDNA配列を有するこれらのうちの1つおよびV_H-リンカー-V_L構築物を、さらなる研究のために選択した。SfiIおよびNotIでpCR2.1を消化し、QIAquickゲル抽出キットを用いて精製し、同一酵素で消化したpCANTAB6ベクターと結紮することにより、scFv遺伝子を含むDNA挿入物を得た。前記と同様にDNAをコンピテント大腸菌TG1細胞中にエレクトロポレーション処理し、活性scFvを含有するp9A4ICAT7-1(ATCC 98593)と呼ばれるクローンを生じた。この9A4scFvのDNA配列は配列番号7として配列表に記載されており、一方、アミノ酸配列は、配列番号40として別個に記載されている。配列番号7の位置29で開始するGTGコドンが開始コドン(Met)であることに留意されたい。使用したシーケンシングオリゴはpUC19RおよびFDTESEQで、これらはそれぞれ配列番号39および41として配列表に記載されている。

【0111】このscFv抗体に関するDNAおよびアミノ酸配列の特異的特徴に関しては、配列表の配列番号7および40に関する情報を参照されたい。遺伝子工学処理9A4V_H-リンカー-V_LフォーマットscFv抗体を大腸菌TG1細胞中で発現させ、NTA-Niアガロース(QIAgen)アフィニティークロマトグラフィーを用いて精製し、その後、スーパーデックス75ゲル濾過クロマトグラフィーによりモノマーscFv種を単離した。scFvの親抗原との結合を、BIAcore(商標)系で評価した(下記参照)。プラスミドpA4ICAT7-1を含有する大腸菌を、ATCC 98593としてアメリカ培養細胞コレクションに寄託した。

【0112】pATDFLAGにおける9A4scFv(V_L-リンカー-V_H)の構築
p9A4CAT7-1を包含する前記の実施例に対して逆形状のV_HおよびV_L断片のPCR-SOEアッセムブリ、即ちV_L-リンカー-V_Hを調製するために、SOEingオリゴを調製した。2つのプライマーを、V_Lリンカー領域に関して設計した: 5'末端に、NcoI部位を付加し、3'末端に、配列番号42として配列表に記載される25個のアミノ酸リンカー配列を有する重複配列(Pantokiano et al., Biochemistry, 30:10117-25 (1991))を付加した。5'V_Lプライマーは9A4V_L5ATDと呼ばれ、3'V_Lプライマーは9A4V_L3ATDILEと呼ばれ

た。これらのオリゴの配列は、それぞれ配列番号43および44として配列表に記述されている。

【0113】 V_H に関しては、リンカー領域への重複を有する5'末端プライマーおよび付加NheI部位有する3'末端PCRプライマーを設計した。5' V_H プライマーは9A4VH5ATDと呼ばれ、3' V_H プライマーは9A4VH3ATDと呼ばれた。これらのオリゴの配列は、それぞれ配列番号45および46として配列表に記述されている。

【0114】 V_L および V_H 構成成分をPCRにより増幅した。その後、 V_L および V_H を、オリゴ9A4VL5ATD (配列番号44) および9A4VH3ATD (配列番号46) を用いてSOE-PCR工程により、リンカー領域で接合した。約700 bpの的確なサイズのDNAを1%アガロースゲルから切り出して、QIAquick (商標) ゲル溶離キット (QIAGEN) を用いて溶離した。その結果生じたDNAを、5'末端で制限酵素NcoIを、3'末端でNheIを用いて末端でトリミングした。これを、同一制限酵素で処理した発現ベクターpATDFLAG (PCT WO 93/12231) と結紮した。メカのプロトコールにより結紮によってコンピテント大腸菌DH5細胞を形質転換し、選択剤として20 μ g/mlのクロラムフェニコールを含有する寒天プレート上に載せた。シーケンシングしたクローンのうちの2つ、即ち9A4IF-5および9A4IF-69はPCRまたは構築エラーを有さなかった。シーケンシングオリゴは、UNIVLSEQ-5' (配列番号30) およびTERMSEQ (-) (配列番号31) であった。

【0115】さらなる研究、ならびに工学処理9A4 s c F v 抗体の発現のために、9A4IF-5を含有する大腸菌を選択した。このs c F vのDNA配列は配列番号8として配列表に記述され、一方誘導アミノ酸配列は配列番号47として別個に記述されている。 V_L -L- V_H -FLA G9A4 s c F vの特異的特徴、例えばシグナルペプチド、リンカーおよびタグ位置は、配列番号8および47に関して配列表に示されている。記載した工学処理抗体は大腸菌からだけでなく、他の生物体、例えばP.pastoris、バキュロウイルス、バチルス種、哺乳類細胞等 (これらに限定されない) から同様に発現され得る、ということは、当業者には明らかである。

【0116】大腸菌からのこのs c F v生成物の発現および精製のために、20 μ g/mlのクロラムフェニコールを含有するLBブ罗斯の1~2リットル培養を37°Cで一晩、増殖させた。GS-3ローターを用いたSorvall遠心分離器で細胞をペレット化した。M2アフィニティークラム (Kodak, New Haven, CT) (これは前記の配列中に示したFLAGエピトープに特異的である) を用いたアフィニティークロマトグラフィーのための調製に際して、ペレット化大腸菌細胞をトリス/EDTA/スクロース培地中でプロセッシングして、細胞周辺分画を単離し、あるいは最小容量のDPBS緩衝液中で直接音波処理 (Soni

prep音波処理機) した。アフィニティークラムをDPBSで広範に洗浄して、粗製s c F v試料を投入後のあらゆる非結合物質を除去した。0.1 Mグリシン-HCl、pH3.1を用いて、s c F v抗体を溶離した。スーパーデックス-75ゲル濾過クロマトグラフィー (Pharmacia) により、モノマーs c F v種を単離した。SDS-PAGEおよびクーマシーブリリアントブルーR-250染色により、均質であるか否か抗体を判定した。抗体をOD 280 nmで分光光度計により定量したが、この場合、1.0 cm路長石英キュベットを用いて、吸光度1.4は1.0 mg/ml s c F vと等価であると定義した。プラスミドp9A4IF-5を含有する大腸菌を、ATCC-98592としてアメリカ培養細胞コレクションに寄託した。

【0117】p9A4ICAT7-1およびp9A4IF-5精製遺伝子生成物に関して、BIAcore (商標) 系で、抗体との結合を以下のように評価した。ストレプトタビジンチップを、前記の実施例1に示した配列番号14のピオチニル化ペプチドとともに投入した。両s c F v構築物は、抗原を結合することが示された。即ち、 1.2×10^{-7} MのKで結合する親9A4 IgGと比較して、9A4IF-5 s c F vは 1.1×10^{-7} MのKを有する。p9A4ICAT7-1 s c F vに関しては、オフレートは 1.2×10^{-3} /秒であったが、これに比して9A4 IgG (親抗体) に関する値は 1.76×10^{-2} /秒であった。これらのデータは、工学処理抗体の親和性が親と少なくとも同じくらいまたはそれ以上に良好であった、ということを示す。

【0118】BIAcore (商標) 系により確定された特異性および運動データにより立証されるように、前記の9A4 V_L および V_H ドメインを含有する2つの工学処理抗体は、前記の実施例3および4に記載した定量測定検定にそれらを用いるための望ましい特徴を有する。親9A4抗体の親和性および特異性を有する、本明細書中に開示した9A4 V_L および V_H のいくつかまたはすべてから成るその他の工学処理抗体は、したがって、本発明の方法に有用であると考えられる。

【0119】実施例7

5109に関連した遺伝子工学処理抗体の調製

5109可変部遺伝子をクローニングする前に、可変ドメインがクローニングされたときに正確な可変ドメインが実際に得られ、骨髄腫融合相手由来の他のもの、またはハイブリドーマを生成する場合に用いられるB細胞からの不活性擬似遺伝子は得られないということが確認されるように、親5109抗体の可変ドメインの部分のタンパク質配列を確定することが必要であった。回転ボトル中で5109ハイブリドーマを増殖させることにより、5109を含有する培養上清を生成した。上清を、二塩基性リン酸ナトリウムを用いてpH7.5に調整し、3 M塩化ナトリウムを用いて塩濃度を150 mMの最終濃度に調整した。濾過 (0.2 μ) 上清を、20 ml/分の流量で15 ml床容積のプロテインG (Pharmacia) に通した。150 mM NaCl溶

液でカラムをさらに洗浄後、抗体を100 mMグリシン、pH3.1で溶離した。マウス免疫グロブリンアイソタイプキット(Boehringer Mannheim)からの抗血清を用いて抗体をアイソタイプ化し、軽鎖定常ドメインを有するIgG1クラスネズミ抗体であることが判明した。
 【0120】本発明の研究では、試料緩衝液中に還元剤(-メルカプトエタノール)を用いることによるSDS-PAGEにより、mAb5109の重および軽鎖を分離した。電気泳動後、ゲル中のポリペプチドをPVDF膜に電気プロットし、クーマシーブリリアントブルーR-25*10

*0で染色することにより検出した。次に、5109の重および軽鎖を含有するバンドを切り出して、エドマン分解処理を施した。メーカーのプロトコールにより、Perkin-Elmer Applied Biosystems Model 494 Prociseタンパク質シーケンサーで、シーケンシングを実施した。得られた重および軽鎖の配列を表11に示す。それらはV_Hに関しては配列番号48の残基1~40に、V_Lに関しては配列番号49の残基1~39に対応する。

【0121】

【表13】
 表11. 5109のN-末端アミノ酸配列の残基

残基番号	重鎖	残基番号	軽鎖
1	E	1	D
2	V	2	V
3	Q	3	V
4	L	4	M
5	V	5	T
6	E	6	Q
7	S	7	T
8	G	8	P
9	G	9	L
10	G	10	T
11	S	11	L
12	V	12	S
13	Q	13	V
14	P	14	T
15	G	15	I
16	G	16	G
17	S	17	Q
18	L	18	S
19	K	19	A
20	L	20	S
21	S	21	I
22		22	
23	A	23	
24	A	24	K
25	S	25	S
26	G	26	S
27	F	27	Q
28	T	28	
29	F	29	L
30	N	30	L
31	T	31	G
32	Y	32	(S)
33	G	33	D
34	M	34	(G)
35	S	35	L
36	W	36	T
37	V	37	Y
38	R	38	(L)
39	Q	39	I
40	T	40	

推定アミノ酸を()により示す。注: V_H中の22位及びV_L中の23位は、通常Cysであり、それはエドマン分解により決定されることができない。

【0122】mAb5109のV_LおよびV_H配列のクローニングおよび確定
 5109ハイブリドーマ細胞株を、5%ウシ胎仔血清(Hyclone)を含有するHT培地(Sigma)中で増殖させた。細胞をペレット化(2.5 x 10⁷細胞/ペレット)し、使用まで-80で凍結した。メーカーの指示により、mRNA抽出(Oligotex(商標)DirectmRNAキット; QIAGEN)を実施した。次に、Boehringer Mannheimの第一鎖cDNAキットを用いて、V_LおよびV_H領域に関して、cDNAを合成した。V_LcDNA反応に用いられたオリゴはネズミ軽鎖領域(MLK)に特異的であったが、一方、V_HcDNA反応に用いられたオリゴ(MH

Gと呼ばれる)はネズミ重鎖C_H2領域のセグメント40に特異的であった。オリゴMLKおよびMHGの配列は、それぞれ配列番号21および22として配列表に記述される。

【0123】エドマン分解によりV_LおよびV_Hに関して得られたアミノ酸配列に基づいて、成熟分泌形態の重および軽鎖のN末端配列に関して、PCRプライマーを設計した。その配列をKabatデータベースと比較した。5109V_HはKabat I I I D亜群の成員にもっともよく似ていることが判明したが、一方、5109V_LはKabat I I 亜群の成員に最もよく似ていた。

【0124】5' V_Hプライマーおよび5' V_Lプライマ

一の配列は、それぞれ51-09V_H5' NDeおよび51-09V_L5' NDeと呼ばれ、配列番号50および51として配列表に記述される。IgG1重鎖定常部(C_H1ドメイン中のセグメントに対して)および軽鎖の定常部の既知の配列から、逆プライマーを設計した。これらの3'オリゴはともに、cDNAを生成するために用いられる元のオリゴの5'(上流)である。3'V_Hプライマー(MIGG1CH1と呼ばれる)および3'V_Lプライマー(MULK2と呼ばれる)は、それぞれ配列番号28および52として配列表に記述されている。

【0125】その結果生じたV_LおよびV_Hに関するPCR生成物をpCR2.1に結紮し、代表的クローンをその後のDNAシーケンシングのために選択した。Applied Biosystems Model 373ストレッチシーケンサーでDNAシーケンシングを実施し、売主により提供されたプロトコールにしたがってセットアップし、操作した。DNA配列決定のために、Invitrogen社製シーケンシングオリゴM13FおよびM13Rを用いた。その配列は、それぞれ配列番号53および54として配列表に記述されている。

【0126】5109V_LおよびV_H成熟アミノ末端に関してエドマン分解により確定された最初の21個のアミノ酸は、PCRによりクローン化された対応する遺伝子のDNAに由来する対応するアミノ酸配列と同一であることが判明した。5109V_HおよびV_LドメインのDNA配列は、それぞれ配列番号10および11として配列表に記述されている。5109V_HおよびV_Lのアミノ酸配列は、それぞれ配列番号48および49として配列表に別個に記述されている。前記のようにDNAはPCRアニーリングオリゴに対応するV_LおよびV_Hセグメントの各々のアミノ末端セグメント中の正しいアミノ酸をコードするが、一方、これらのオリゴに対応する抗体アミノ酸セグメントに関する正確なコドンは、それらがもとのハイブリドマDNA中に生じていたので、非多義性でない。5109V_Hは、そうでなければThr残基(配列番号10の位置328および330)をコードするが、しかし5109V_HではAla残基(配列番号48の位置110)である、コドン中の2つの突然変異を有するJ_H3接合セグメント遺伝子を利用する。

【0127】5109可変重鎖は、KabatマウスIg重鎖XIV族にもっともよく関連し、データベースID番号002754に最もよく似ている。これら2つのV_H遺伝子間には24ヌクレオチド差が認められ、14アミノ酸差を生じる。これらの高い数値の差に基づいて、これら2つの遺伝子は同一生殖細胞系列に由来しないと考えられる。しかしながら、2つは同一生殖細胞系列に由来し、ともにin vivoアフィニティー成熟工程で重度に突然変異を受け、その結果生じる分岐が増幅されたという可能性もある。

【0128】本発明の方法は、V_H遺伝子生成物がこの

他の抗体のV_Lを有する生産的抗体V_L-V_H対を形成する場合に、それが5109と類似の方法(特異性および親和性)で結合するように、5109V_H生殖系列遺伝子に関連した他の抗体のV_H遺伝子を用いて実施し得る。5109V_LはJ5接合セグメントを利用し、配列番号49のアミノ酸102~112をコードする。この抗体に関するCDR3は、そこに含有されるCys-94のために、相対的に稀である。CDR3は、配列番号49の残基94から102に及ぶ。5109一本鎖抗体が5109V_Lで工学処理された場合

(下記参照)には2つのバージョンが作られ、一方は親Cys-94を有し、他方はCys-94の代わりにSerを有する。【0129】5109V_LはKabatのマウスVI族に属し、データベースID番号005841、005842、005843および005844に最も類似する。データベース中の4つの抗体はそのヌクレオチド配列が同一であり、したがって5109V_Lとの比較が、それら4つのすべてに対して同時になされ得る。12個のヌクレオチドミスマッチが認められ、8個のアミノ酸差を生じる。これらの差のうちの1つはFR1に、3つはCDR1に、1つがFR2に、1つがCDR2に、1つがFR3に、そして1つがCDR3に生じる。これらの変化はV_L全体で生じるが、CDRに集中し、8つの差のうちの5つはこれらの超可変セグメントに存在する。したがって、これらの遺伝子は、同一のまたは少なくとも非常によく似た生殖細胞系列V_Lに由来することにより関連すると考えられる。

【0130】本発明の方法は、V_L遺伝子生成物がこの他の抗体のV_Hを有する生産的抗体V_L-V_H対を形成する場合に、それが5109と類似の方法(特異性および親和性)で結合するように、5109V_L生殖系列遺伝子に関連した他の抗体のV_L遺伝子を用いても実施し得る。本発明の方法は、V_LおよびV_H遺伝子生成物が生産的抗体V_L-V_H対を形成する場合に、この他のまたは5109と異なる抗体が5109と類似の方法(特異性および親和性)で本質的に結合するように、V_LおよびV_Hがともに本明細書中に開示した5109V_LおよびV_H生殖系列遺伝子に由来する抗体を用いて実施し得る。

【0131】pUC119における5109scFv工学処理抗体(V_H-リンカー-V_L)の構築V_HおよびV_L構成成分のアセンブリを調製するために、S0EingPCRプライマーを利用した。5109scFv抗チックに利用したオリゴはすべて、Beckman Oligo 1000MDNA合成機(Fullerton, CA)を用いて社内で合成した。5109VH5'、5109VH3'、5109VL5'、5109VL3'SERおよび5109VL3'CYSと呼ばれるこれら5つのPCRプライマーは、それぞれ配列番号55、56、57、58および59として配列表に記述されている。

【0132】オリゴ5109VL3'Ser(配列番号58)を用いて、配列番号49のCys-94をscFv構築物中でSer-94に変えて(配列番号63の位置248でのCys残基に対応する)、その結果生じるscFvの安定性を改良し得

た。別のプライマー5109VL3'Cys (配列番号59)も、元のCys配列を保持するために合成した。SOEing反応後、PCRによりDNAを増幅し、生成物をSfi IおよびNot Iで消化してその後発現ベクターpUC19に結紮するか、またはシーケンシングベクターpCR2.1に直接結紮した。pUC19結紮生成物をDH5 α コンピテント細胞中で形質転換し、一方pCR2.1結紮物をInfV α コンピテント細胞中で形質転換した。pUC19Rおよびmycseq10オリゴを用いてPCRにより、個々のクローンをスクリーニングした。陽性クローンからのDNAにシーケンシングを施した。

【0133】メーカーの指示にしたがって、Applied Biosystems Model 373ストレッチシーケンサーユニットを用いて、DNA配列を立証した。pUC119に直接結紮された考え得る5109scFv工学処理抗体のシーケンシングのために、以下のオリゴを用いた：pUC19R、MycSeq10、Gly4Ser5'、Gly4Ser3'。これらの配列は、それぞれ配列番号39、60、61および62として配列表に記述されている。

【0134】pCR2.1ベクターに結紮された5109DNAカセットに関しては、Invitrogenから購入したM13FおよびM13Rオリゴ (配列番号52および53)を、2つの内部オリゴとして配列番号61および62とともに、配列プライミング反応に利用した。pUC119に直接結紮されたクローンは、多数のPCRエラーを含有した。しかしながら、許容可能なクローンをpCR2.1ベクター中で同定した。次に、Sfi IおよびNot IでscFvを消化し、同様に消化したpUC119ベクターに結紮することにより、この構築物をサブクローニングした。pUC19RおよびMycSeq10オリゴ (配列番号39および60)を用いたPCR増幅により、挿入物に関してクローンをスクリーニングした。3つのクローンにスクリーニングを施した。1つのクローンを所望の配列を用いて同定し、p5109CscFv7と命名した (ATCC 98594)。DNAおよび誘導アミノ酸配列は、それぞれ配列番号9および63として配列表に記述されている。この工学処理抗体の配列特徴は、配列番号63に示されている。PCRにより5109scFvを生成する場合、突然変異 (PCRエラー) が配列番号9のヌクレオチド738で起きて、バリンからアラニンへのコドン変更によりコードされるアミノ酸を変えた。これは、配列番号63 (5109scFv配列) の位置237のAla残基に対応する。保存性差異として、それは遺伝子工学処理生成物の活性に影響することに関しては重要でないと考えられ、したがって前記のscFv構築物のV_Lにおいて前方に実行可能であった。もちろん、当業者には、このPCRエラーが修正可能であり、元のVal残基はこの位置で得られることは明らかである。

【0135】新規の一本鎖構築物が親分子の結合特性を保持したことを立証するために、5109scFvを大腸菌中で発現させて、精製した。100 μ g/mlアンピシリンお

よび2%グルコースを含有する2YTスターター培地 (50ml)に、-80 $^{\circ}$ Cグリセロールストック50 μ lを接種した。培養を300rpmで振盪しながら、30分でインキュベートした。100 μ g/mlアンピシリンおよび0.1%グルコースを補給した2YT培地を含有する6本の2リットルフラスコの各々に、5mlの一夜スターター培養を接種した。培養を濁るまで30分でインキュベートし、その後、IPTG (イソプロピル β -D-チオガラクトピラノシド; Boehringer Mannheim) を付加することにより最終濃度を1mMにさせた。scFvの生成のために、培養をさらに4時間増殖させた。細胞を5000xgで10分間、遠心分離した。細胞ペレットを、加工処理されるまで-20 $^{\circ}$ Cで保存した。

【0136】scFv精製のために、細胞ペレットをTES (0.2Mトリス-HCl、0.5mMEDTA、0.5Mスクロース)中に再懸濁した。再懸濁後、プロテアーゼ阻害剤 (完全プロテアーゼ阻害剤カクテル、Boehringer Mannheim) を含有する前記のTES緩衝液の1:5稀釈液を付加した。この調製物を4 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートさせた。インキュベーション後、細胞を12,000xgで15分間ペレット化した。その結果生じた上清にMgCl₂を付加して、最終濃度を5mMとした。Ni-NTAアガロース (QIAGEN) を、300mMNaCl、15mMイミダゾールおよび0.2%トリトン-Xを含有するPBS、pH7.4中で1回洗浄した。次に洗浄アガロースを付加し、スラリーを4 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートさせた。Ni-NTAアガロースビーズ+scFvを次に前記と同様に4回洗浄した。次にscFvを、250mMイミダゾールを含有する洗浄緩衝液中に溶離した。溶離液をNAP-25カラム (Pharmacia-Biotech, Uppsala, Sweden)上で脱塩し、Centriprep濃縮装置 (Amicon, Beverly, MA)を用いて濃縮した。生成物をSDS-PAGE上で電気泳動処理し、銀染色により可視化した。その結果生じたscFv生成物は、p5109CscFv7 (Cys) およびp5109SscFvA9 (Ser)に関して、それぞれ純度15%および75%であった。

【0137】Origen (商標) 法 (Technical manual, Origen (商標) Instrument, Igen Corporation, Gaithersburg, MD)を用いて、5109scFv種によるピオチニル化ペプチド225 (Anaspec, Inc. 製。配列番号64として配列表に記述された配列を有する)との結合を測定した。ピオチニル化ペプチド225を800 μ g/mlストレプトタビジン被覆磁気ビーズ (Dynabeads (商標), Igen, Gaithersburg, MD)に付加して、最終濃度を10nMとして、15分間インキュベートした。新規の遺伝子工学処理scFv抗体を、振盪しながら30分間、ペプチド/ビーズ溶液に付加した。9E10抗-mycタググルテニル化mAbを付加し、溶液を30分間インキュベートし、次に、200 μ lのIgen検定緩衝液 (Igen, Gaithersburg, MD)を付加し、ECLシグナルをOrigen (商標) 計器 (Igen) で読み取った。ATCCから入手した9E10細胞株からmAb9E10を生

成し、精製した。メーカーの使用説明書にしたがってN - ヒドロキシスクシンアミド誘導体Origen (商標) タグ - NHSEステル (Igen) を用いて、mAbをルテニル化した。5109 s c F v の非存在下で、2995 ECL単位のバックグラウンドシグナルを得た。5109 s c F v Cys構築物 (p5109CscFv7) の付加は、536,997 ECL単位を生じた。5109 s c F v Ser構築物 (p5109SscFvA9) の付加は、694,253 ECL単位を生じた。これらの結果は、両5109 s c F v 遺伝子工学処理抗体が生物学的に活性であり、そしてmAb5109と同一コラーゲン関連ペプチド断片に結合された、ということを実証する。p5109CscFv7を含有する大腸菌の培養は、ATCC-98594としてアメリカ培養細胞コレクションに寄託した。

【0138】Origen (商標) 法により確定された特異性データは、前記の5109 V_LおよびV_Hドメインを含有する工学処理抗体は、前記の実施例3および4に記載した定量的測定検定で用いるための望ましい特徴を有する、ということを実証する。親5109抗体の親和性および特異性を有する、本明細書中に開示した5109 V_LおよびV_Hのいくつかまたはすべてから成るその他の工学処理抗体は、

【0139】9A4および5109 V_LおよびV_Hドメインの組合せ、例えば本組成物の二重特異性 s c F v 二量体、5109 V_L - リンカー - 5109 V_H - リンカー - 9A4 V_L - リンカー - 9A4 V_H - タグ (単数または複数) から成る工学処理抗体も、前記の実施例3および4の唯一の抗体試薬と同様に有用であり得る、ということにも留意すべきである。その差は、単一二重特異性試薬が、9A4および5109を別々に用いるというよりむしろ一工程ELISAで用いられ得ることである。本発明の抗体の変動ドメインを包含する多数の遺伝子組成物が接合されて種々の二重特異性分子を作り、したがって実施例3および4に示した検定を簡易化し得ることは、当業者には明らかである。このような分子の親和力は、検定の全体的感度が有意に改良され得るようなものである。

【0140】実施例8

抗体のアミノ酸配列における突然変異または差異は結合特性 (親和性および特異性) を、したがって親抗体の効用を保持し得る。これを、9A4 V_H のCDR3における一連の突然変異体を生成することにより、以下で実証する。9A4と5109の両方の同一生殖細胞系列 V_L および V_H 遺伝子の他の領域におけるその他の突然変異は、本発明に開示した元の抗体に対して同一のまたはより良好な結合特性を有する抗体を生じ得ることは、当業者には明らかである。

【0141】9A4 V_H CDR3領域突然変異体の生成
9A4 s c F v のpCANTAB6誘導体、即ち、前記の実施例6に示した9A4ICAT7-1を出発物質として用いて、CDR3セグメントおよびCDR3に隣接するVernier残基にお

ける突然変異体を生成した。突然変異に対して標的化されるCDR3 V_H領域の親DNA配列は、配列番号7のヌクレオチド383~409を包含した。これらのヌクレオチドに対応する誘導アミノ酸は、配列番号40の残基119~127である。CDR3は残基121で開始して、126で終了する。この領域に無作為突然変異を導入するために、V_HおよびV_L領域を2つのPCRにより別々に増幅した。第一PCRでは、オリゴ (Oligos Etc. から入手) pUC19R (配列番号39) および9A4MUT (配列番号65) を用いてV_H部分を増幅したが、この場合、9A4MUTは突然変異を導入したオリゴであった。

【0142】9A4MUT (配列番号65) 中のヌクレオチド25~51を10%スパイクした。言い換えれば、記述したような配列は、位置25~51の各々に付加されるヌクレオチドの90%を占め、一方、他の3つのヌクレオチドは、25~51の各々の位置で、各々3.3%で増殖中のオリゴ鎖に導入された。これは、オリゴヌクレオチド合成の業界で周知の方法により成し遂げられた。無作為ヌクレオチドは実際にこの限定領域に導入された、という事実を以下で考察する。

【0143】第二PCRは、2つのオリゴを利用した: (これもOligos Etc. から入手) 9A4L5 (配列番号66) およびFDTETSEQ (配列番号41)。これは、3'末端のp9A4ICAT7-1におけるNot I部位までのリンカー-V_L部分を、第一PCRからの突然変異化VPCR生成物によりその後のアニーリングおよびアッセムブリを可能にする5'末端のV_Hへの重複とともに生成した。

【0144】PCRを、以下のようにセットアップした。突然変異体V_Hに関しては、各々50 pmolのオリゴpUC19R (配列番号39) および9A4MUT (配列番号65) を、100 μlの反応物中に用いた。鋳型DNA標的はSNAP (Invitrogen) 精製プラスミドDNA - p9A4ICAT7-1のアリコートであった。Taqポリメラーゼ (Perkin Elmer) を、30サイクルPCRに用いた。変性、アニーリングおよびポリメラーゼ反応時間ならびに温度は、それぞれ94で1分間、55で1分間、72で2分間であった。

【0145】30回、重合反応は全体で10分間に及んだ後、反応を4に冷却した。V_H種を用いて重複するV_Lに関しては、Klen Taq (商標) ポリメラーゼ (Clontech) およびTaqポリメラーゼ (Perkin Elmer) の両方を用いて、PCRをセットアップした。DNA生成物を、QIAGENゲル抽出キットを用いて精製した。全25回/2温度サイクル: 94で1分間、65で4分間での精製PCR生成物の各々のアリコート (1~2 μl) を用いて、そして最後に4に保持して、突然変異化V_HおよびV_Lに関するPCRアッセムブリ反応を実施した。この工程に関しては、オリゴは用いなかった。突然変異化9A4アッセムブリのPCRプルスルーに関しては、5 μlの非精製アッセムブリ反応物を鋳型として用い、そしてオリゴpUC19R (配列番号39) およびFDTETSEQ (配列番号41) をア

ニーリングプライマーとして用いた。的確なサイズの生成物を約900 bpで観察し、QIAgenゲル抽出キットを用いてゲル精製した。突然変異化9A4 s c F v 挿入物をSfi I およびNot Iで処理して、同一制限酵素で切断したpCANT AB6ベクターDNAとの結紮を調製した。結紮後、DNA混合物をエタノール沈降させて、24 μlの滅菌脱イオン化蒸留水中に溶解した。コンピテント大腸菌TG1細胞の調製およびエレクトロポレーションを、実施例6と同様に実行した。12回の別々のエレクトロポレーションを実施し、最後にプールし、プレート化した。全体で1.5 × 10⁶ クローンを得て、グリセロールストックとして-80 °Cで保存した。12のクローンの無作為サンプリングは、*

*これらのうちの9つ(1つのクローンは、配列データを得ることができなかった)が、オリゴFDTETSEQ(配列番号41)およびオリゴpUC19R(配列番号39)を用いて、PCRによりスクリーニングした場合に挿入物を有することを示した。QIAgenキットおよび確定されたCDR3 V_H中の配列を用いて、これらの挿入物を精製した。シーケンシングデータの結果を以下に示す。「親配列」のDNA配列は、配列番号7のヌクレオチド383~409として配列表に記述されている。

【0146】

【化3】

突然変異の数

親配列 :	5' - GCT AGG GGC GGT AGC CTT GAC TAC TGG -3'	-
9A4MUT-1:	5' - GCT <u>CGG</u> GGC GGT AGC CTT GAC TAC <u>CGG</u> -3'	2
9A4MUT-3:	5' - GCT <u>GGG</u> <u>CCC</u> <u>TGT</u> <u>ATC</u> CTT GAT TAC TGG -3'	6
9A4MUT-4:	5' - GCT <u>ACG</u> <u>GGA</u> GGT AGC CTT GAC TAC TGG -3'	2
9A4MUT-6:	5' - <u>GTT</u> <u>TGG</u> GGC <u>GGC</u> AGC <u>CCT</u> GAC <u>CAC</u> <u>AGG</u> -3'	6
9A4MUT-7:	5' - GCT <u>TGG</u> GGC <u>GGC</u> <u>AGG</u> <u>TAT</u> GAC TAC TGG -3'	5
9A4MUT-8:	5' - GCT ANG <u>GTC</u> <u>AGT</u> AGC CTT GAC <u>TCC</u> TGG -3'	3
9A4MUT-10:	5' - GCT <u>ACG</u> GGC <u>TGT</u> <u>AGT</u> <u>CAT</u> GAC TAC <u>CGC</u> -3'	6
9A4MUT-12:	5' - GCT AGG <u>GGT</u> <u>GGT</u> AGC CTT GAC TAC TGG -3'	1

【0147】前記の群の突然変異は、各クローンに関して、数が1から6まで変化し、それらは種々の位置で起こる。突然変異は、前記の種々のクローンで太下線で示されている(N=ヌクレオチドが割当られない)。この無作為方式で検査した8つのうち1クローン(9A4MUT-12)のみが、親アミノ酸配列を示した。前記の結果の無作為性に基づいて、良好な突然変異化ライブラリーが生成された。したがって、ピオチン選択を実施して、9A4に関するエピトープであるペプチド040(配列番号14)とのバインダーを見出した。

【0148】以下で得られる抗体に関するピオチン選択の説明

突然変異化ライブラリーストックの約100 μLのアリコート、100 μg/mlアンピシリンおよび2%グルコースを含む2 Y T培地25 mlに付加した。37 °Cで約60分間、または細胞が中間対数期(OD_{600 nm} = 0.5~1.0)に達するまで、培養をインキュベートした。次に、M13K07ヘルパーファージ(Pharmacia, Uppsala, Sweden)を培養に付加して、5 × 10⁸ pfu/mlの濃度にした。次に、振盪せずに、37 °Cで20分間、ヘルパーファージを培養に感染させた後、200 rpmで振盪しながら37 °Cでさらに25分間、感染させた。感染細胞を50 ml円錐遠心分離管に移して、3000 rpmで10分間、ペレット化した。100 μg/mlアンピシリンおよび50 μg/mlカナマイシンを含む2

Y T培地中に、細胞を再懸濁した。この培養を新鮮な250 mlフラスコに移して、30 °Cで2時間インキュベートしたが、この時間中にファージ粒子が生成された。14,000 rpmで2分間の遠心分離により、細胞を取り出した。次に、PBSおよびNFDMを付加して、最終濃度を1XPBSおよび3%NFDMとすることにより、室温で30分間、ファージのアリコート(1 ml)を遮断した。これは、200 μlの6XPBS、18%NFDM溶液を1 mlのファージに付加することにより成し遂げた。ピオチン化ペプチド040(配列番号14)を、10pM~1 μMの範囲の濃度でファージ溶液に付加した。この溶液を、室温で60分間インキュベートした。ストレプトタビジン被覆磁気ビーズ(Dynal, Oslo, Norway)を、PBS中の3%NFDM中で反転振盪しながら室温で遮断した。インキュベーション後、ストレプトタビジンビーズを磁気により試験管の側面に捕獲し、遮断溶液を注意深く吸い出した。次に、結合ペプチドを有する遮断ファージをストレプトタビジンビーズに付加し、15分間反転振盪しながら室温でインキュベートさせた。ビーズ複合体を磁気により捕獲し、非結合ファージを注意深く吸い出した。磁気結合ビーズ複合体を、0.1%TW-20を含むPBSで4回、PBS単独で1回洗浄した。最終捕獲後、ビーズ複合体をPBS中の100 mMトリエチルアミン100 μl中に再懸濁し、等容量の1 Mトリス、pH7.4で中和した。次に、中間対

数日大腸菌TG1細胞(10 ml)を100 µlのビーズ複合体に感染させた。浸透せずに37 °Cで20分間、次に、200 rpmで振盪しながら37 °Cでさらに25分間、感染を進行させた。次に、感染細胞をペレット化し、新鮮な2YT培地500 µl中に再懸濁して、100 µg/mlアンピシリンおよび2%グルコースを含有する243 x 243 mm²YT寒天プレート上で500 µlをプレート化した。プレートを30 °Cで一晩、インキュベートした。約16時間の増殖後、掻き集めることによりコロニーを回収し、液体培養を接種するために用いた。最低2回、最大で5回、選択工程を反復した。

【0149】ピオチン選択から回収したコロニーを増殖させ、s c F vの産生を誘導して、これを下記に略記するプロトコールにより精製した。

低張ショック法を用いたs c F v突然変異体クローンの調製

培養をペレット化し、0.8 mlの氷冷TES緩衝液(0.2 Mトリス-HCl、0.5nMEDTA、0.5 Mスクロース)中に再懸濁した。TES(氷冷1:5希釈液1.2 ml)を付加し、培養を氷上で30分間インキュベートした。細胞を、14,000 rpm(30分)で4 °Cでペレット化した。s c F v上清を、10 µlの1.0 MMgCl₂を含有する新しい試験管に付加した。50 mMNaリン酸塩、pH8.0、500 mMNaCl、20 mMイミダゾールおよび0.1%TW-20を含有するリン酸塩イミダゾール洗浄緩衝液中で洗浄することにより、NTA-アガロース(200 µl)(QIAgen)を調製した。s c F v上清をNTA-アガロースに付加

し、4 °Cで約30分間インキュベートした。NTA-アガロースをs c F vとともに回転させて、500容量の溶離緩衝液を付加した。溶離緩衝液は、50 mMNaリン酸塩、pH8.0、500 mMNaClおよび250 mMイミダゾールで構成された。溶離液を掻き混ぜ、遠心分離して、NTA-アガロースを除去した。メーカーの使用説明書にしたがって、NAP-5カラム(Pharmacia)上を通して、s c F v上清を緩衝液交換した。

【0150】s c F v構築物に関するオフレートの測定 BIAevaluation(商標)バージョン2.1ソフトウェアを用いてBIAcore(商標)システム(Pharmacia Biosensor)で得られた解離データの分析により、s c F v構築物に関するオフレートを測定した。BIAcoreシステムでデータを得るために、実施例1に前記したように、BIAcoreチップ上ストレプトタビジン表面を調製した。ピオチン化ペプチド(配列番号14)を調製したストレプトタビジン表面に、約2~11RU/表面の範囲のRU密度に結合させた。低レベルの誘導化は、物質運搬が問題である場合に得られる間違ったオフレートの発生を回避するのに役立った。精製s c F vをこれらの表面全体に注入して、構築物を60秒間結合させた。次に、PBS緩衝液単独を取り換えて、s c F vの解離をさらに280秒間進行させた。これらの解離データから、オフレートを算出した。

【0151】

【表14】

表12. 9A4 CDR3 V_H突然変異体配列のまとめ

アミノ酸配列をDNA配列決定の結果から決定した。
クローンICAT7-1のための親配列は配列番号40の
118~127に対応する。

クローン	配列										オフレート $\times 10^{-2} \text{ sec}^{-1}$
ICAT7-1	C	A	R	G	G	S	L	D	Y	W	0.3
15A	C	A	R	G	G	R	L	D	Y	W	0.35
16A	C	X	R	G	G	S	L	D	L	L	0.26
23A	C	G	R	G	R	S	L	D	Y	X	0.26
24A	C	G	R	G	G	S	L	E	Y	W	0.25
26A	X	X	R	G	X	S	X	E	Y	L	0.27
28A	X	X	R	G	G	T	X	E	Y	X	0.3
9B	C	X	R	G	G	S	F	E	Y	W	0.32
13B	C	X	R	G	G	S	X	D	F	W	0.26
14B	C	A	R	G	G	S	L	D	H	W	0.27
20B	C	G	R	G	G	N	L	D	H	C	0.28
26B	C	G	R	G	X	T	L	E	F	W	0.34
31B	C	G	R	G	G	S	L	D	Q	X	0.26
37B	C	G	R	G	G	T	L	D	X	X	0.33
38B	C	G	R	G	G	S	L	D	S	C	0.26
2C	C	G	R	G	S	S	X	D	Y	C	0.28
5C	C	A	R	G	G	S	L	D	S	W	0.25
9C	C	X	R	G	S	S	L	D	Y	X	0.99
10C	C	G	R	G	G	S	L	D	Y	C	0.94
20C	C	G	R	X	G	S	X	X	F	C	1.29
26C	C	X	R	G	X	S	L	D	I	X	0.95
29C	C	G	R	G	G	S	F	X	X	W	1.04
8D	C	A	R	G	G	S	L	D	N	W	1.04
16D	C	X	R	G	G	T	L	D	Y	W	1.14
17D	C	X	X	G	R	S	L	E	X	W	1.07
20D	C	X	R	G	X	T	L	X	Y	W	1.02
18E	C	A	R	G	G	S	L	D	V	W	1.4
13G	C	G	R	G	G	S	L	D	N	W	1.03
17G	C	X	R	G	G	S	L	D	F	W	1.03
1H	C	X	R	G	G	S	L	D	H	W	1.17
4H	C	X	R	G	G	S	L	X	V	W	1.03
1J	C	A	R	G	G	X	I	D	V	W	1.09
IF-5	C	A	R	G	G	S	L	D	Y	W	0.48

注：上記クローンICAT7-1とIF-5は、親配列をもつCDR3領域を示す。

【0152】標的と結合したままで、親抗体のアミノ酸配列に変化を生じ得ることは、前記のデータから明らかである。前記の抗体のオフレートの差は、突然変異のために抗体V_HまたはV_Lの異なる領域を標的化することにより、あるいは9A4または5109と同一生殖細胞系列V_LおよびV_H遺伝子由来のV_Lおよび/またはV_Hドメインを有する、免疫感作により得られる異なる抗体を見つけ出すことにより、大きさの水準内である一方、前記の実施例6および7に開示した親抗体に対して、可変性または増強結合特性を有する抗体が見出され得る。

【0153】実施例9

尿試料用に最適化されたサンドイッチ検定の説明
T I I N E断片の存在に関して患者生物流体を検査する場合、被験生物媒質として尿を用いるのが好ましい。尿は収集が非常に容易であり、収集は非侵襲的方法でなさ

れる。さらに、エピトープは、血中より尿中に高濃度で存在する。最も重要なのは、尿は、検定を阻害するタンパク質の含有が血液より少ないことである。したがって、尿中のT I I N E断片の測定を最適化する試験プロトコルを開発することは重要である。

【0154】目下の好ましいプロトコルでは、mAb 5109を捕獲抗体として、そしてmAb 9A4を検出抗体として用いる。これらの役割において各mAbを用いるのが好ましく、その限りでは、9A4は、所望のI I型コラーゲン断片の他に、I型およびI I I型コラーゲン由来の断片ともわずかに結合し得る。IおよびI I I型は、I I型コラーゲンに対して有意に余分量でヒト身体中に存在するため、IおよびI I I型断片は、I I g断片と比較して、尿中に超過量で存在する(約1,000倍以上。Kivirikko, Int. Rev. Connect. Tissue Res., 5:9

3-163 (1970) 参照)。したがって、9A4がより強力にI I型と結合する場合でも、それは尿中でIおよびI I型と有意に結合するが、これはこれらその他のコラーゲン断片が過剰量で存在するためである。

【0155】尿の未知の構成成分が検定結果を妨害して、不正確な読み取りが生じることも発見された。この作用を低減するよう努力するに際して、標準曲線を作成する対照試料は、好ましくは、プール対照尿中に稀釈される濃縮T I I N E断片(好ましくは、配列番号67のペプチド131)の連続稀釈溶液から作られるということ10が確定された。プール対照尿は、多数の被験者からの尿検体の混合であり、この場合、各試料は極少量、好ましくは測定不可能に低レベルのT I I N E断片を含有することが予め確定されていた。プール対照尿中で対照T I I N Eペプチドを稀釈することにより、タンパク質またはその他の尿成分により引き起こされる作用は対照曲線で再現され、被験試料に関するより正確な曲線が得られる。

【0156】尿により引き起こされる擬似作用を低減するためのさらなる工程において、Origenアナライザーで20の分析直前に磁気ビーズを用いて、検定中に非特異的結合物質を除去する。対照および被験試料を抗体(ピオチニル化捕獲抗体を含む)とともにインキュベートした後、磁気ストレプタビジンビーズを付加し、流体を除去する間、磁気を用いてビーズを試験管の内側に保持する。次にビーズを緩衝液中に再懸濁した後、検出抗体が発するシグナルを測定する。

【0157】T I I N E断片と結合する最適抗体に関しては、検定緩衝液が約7.5のpHを保持するのが好ましい。Origen(商標)システムの使用に関する発表済み30プロトコールは、10 mMトリス、pH7.5を含有する検定緩衝液を使用する。尿検体を分析する試みが最適未満であることが判明した後、10 mMは、pHを約7.5に保持するには不十分なトリス濃度であると確定した。トリスの最適濃度は約50~250 mMであり、約100 mMの濃度が本発明では最も好ましいということが、試験から確定された。本発明の好ましい実施態様では、検定緩衝液は、100 mMトリス、pH7.4、1%トゥイン-20(商標)、1% B S Aおよび140 mM N a C lから成るT T B N -100である。適切なpHに試料を保持し、そうでない場合に結果40を妨害しないあらゆる緩衝液が置き換えられ得る。

【0158】試料中に存在するT I I N E断片の量の正確な測定値を得るためには、適正濃度の抗体を有することが重要である。9A4の好ましい濃度は、約10~30 μg/mlであって、約20 μg/mlの濃度が本発明では最も好ましい。5109の好ましい濃度は、約5~20 μg/mlであって、約10 μg/mlの濃度が本発明では最も好ましい。最後に、T I I N E検定のための標準曲線は、限定範囲で線状である。典型的には、この範囲は約1.3 ng/ml(即ち、約20 fmol/反応)~約42.5 ng/ml(即ち、約625 fmol/反50

応)である。このように、既知量のT I I N Eを含有する対照試料は、好ましくは約1.3~約42.5 ng/mlの範囲の濃度のT I I N E断片を用いて調製する。未知の被験試料は、好ましくは、全濃度で、必要な場合には種々のレベルでプール対照尿中に稀釈して、2回ずつ試験する。そうすれば、各被験試料の少なくとも1つの濃度が対照曲線の線状部分内になると思われる。

【0159】好ましい検定では、捕獲抗体はピオチニル化され、試料とともにインキュベート後に磁気ストレプタビジンビーズに結合される。IGENからのOrigen(商標)系は、検出抗体からのシグナルを測定する本発明の好ましい方法である。この方法を先ず用いて、洗浄磁気ビーズをOrigen(商標)検定緩衝液中に再懸濁する。意外にも、この緩衝液中での再懸濁は、抗体サンドイッチ複合体を不安定にさせて、検定結果を変動させ得ることが発見された。この問題は、試料の迅速検査(これはしばしば実行不可能である)により、または抗体サンドイッチ複合体の安定性を促す異なる再懸濁緩衝液の使用により、克服し得る。安定性を促し、検出抗体シグナルの正確な測定値を提供するあらゆる緩衝液が、磁気ビーズを再懸濁するために用い得る。T T B N -100およびD P B Sはともに、この目的に良好に役立ち、D P B Sが本発明では最も好ましい再懸濁緩衝液である、ということが確定された。

【0160】Origen(商標)電気化学発光技法は、電気ポテンシャルの適用時にトリプロピルアミン(T P A)の存在下で発光反応に関与する非常に安定したルテニウム金属キレートを利用する。常磁性ビーズは固相として作用し、迅速検定運動を促進する。ビーズ/複合体を流動セルを通して移動させて、電極で磁気的に捕獲する。次に電圧を掛形質転換、発光レベルを測定する。Origen系は、液相中に抗原-抗体複合体を生成させ得る。この方法は、より迅速な結合運動を可能にし、したがって、インキュベーション時間を短くする。固相E L I S A検定に特徴的な洗浄工程は、この方法により有意に低減される。

【0161】Origen(商標)系の使用の意外な開発およびそれを用いて開発される種々の技法改良(本明細書中に記載し、特許請求されている)は、あらゆる形態のI I型コラーゲンペプチドの検出の改良である。位置774のI I型コラーゲンペプチドには天然変異も存在する。所定の個体内では、それらのI I型コラーゲンのいくつかは位置774にプロリンを含有し、一方それらのI I型コラーゲンの残りは、翻訳後修飾のために、この位置にヒドロキシプロリンを含有する。従来のE L I S Aベースの検定法は、等効力を有するこれらの異なるペプチドを検出しなかった。しかしながら、本発明の実施例に記載したような検定は、いずれのペプチドにも等しく有効に働く。検出におけるこの同値関係は、標識化9A4を検出抗体として用いる近似検定を用いても得られる。

【0162】本発明の好ましい検定を以下に示す。各対照または被験試料を直接または対照尿中に稀釈して検定し、分析物の所望の最終濃度を得た。各々50 μ lの被験または対照試料を、25 μ lの抗体混合物と併合し、室温で1時間インキュベートした。抗体混合物は、TTBN-100中の20 μ g/mlのルテニル化9A4および10 μ g/mlのビオチニル化5109で構成された。TTBN-100中に600 μ g/mlの磁気ストレプトタビジンビーズ25 μ lを付加し、インキュベーションを20分間継続した。磁気を用いて容器の内側にビーズを保持し、本質的にすべての流体を、ピペットを用いて除去した。ビーズを300 μ lのDPBS中に再懸濁し、メーカーの指示にしたがってIGENからのOrigen(商標)系を用いて結果を確定した。

【0163】この方法は信頼できる高再現可能測定値を提供するが、しかし、広範な洗浄工程を必要としないあらゆるサンドイッチイムノアッセイ法を、この結合および検定抗体対(5109および9A4)を持ち家同様の結果を生じるよう開発し得ると思われる。洗浄工程は、9A4モノクローナル抗体が低親和性バインダー(1.7 x 10⁻⁷M)であるため、最小化される必要がある。スループットを増大し、検定を自動化するために、検定は、Advantage System(Nichols, San Juan Capistrano, CA)を用いた使用に関して、目下、修正されつつある。検定の本実施態様では、5109抗体は依然としてビオチニル化されるが、しかしながら、検出抗体9A4は、アクリジニウムエステルで標識される。検体は、両抗体と同時にインキュベートされる。初期インキュベーション期間後、ストレプトタビジン被覆磁気粒子を反応混合物に付加し、そ

*の後二次インキュベーションを実施する。アクリジニウムエステルは、過酸化水素およびアルカリ溶液の付加により発光の引き金とされる。この処理は生成物を酸化させ、その後、基線状態に戻して、発光を生じ、これを2秒で定量し、システム発光計により相対光単位(RLU)で表す。結合標識の量は、II型コラーゲンの濃度に直接比例する。同様に、TIIINE検定は、シンチレーション近似値を用いて開発され得るが、この場合、5109mAbはSPAビーズに結合され、9A4mAbはBシンチレーション計数器で計数することにより確定される結合TIIINEに伴う[¹²⁵I]で標識された。TIIINE検定は、任意の数の穂写生または酵素的比色終点を用いることによって意図される。

【0164】実施例10

変形性関節症患者におけるTIIINE断片の測定
 実施例9に記載したのと同様の検定を用いて、TIIINE断片の尿中レベルを、変形性関節症患者および対照患者の両方で測定した(表13)。対照患者と比較した場合、TIIINE断片レベルの増大が変形性関節症患者に見出された、ということが示された。スポット尿検体から得られた安定疾患を有する個体における期間中のTIIINEレベルの患者内変動性は、約25%であった。変形性関節症患者間のTIIINEレベル増大は、関節間隙狭窄のラジオグラフ証拠およびKellgren評価により示されるように、より重症の疾患に関連していた(表14)。

【0165】

【表15】

表13. 正常と変形性関節炎(OA)被験者におけるTIIINEレベルの比較

II型コラーゲンの分布(TIIINE)			
	対照 (40未満)	対照 (Age-適合)	OA
N	20	33	126
範囲	256-916	250-4845	773-9770
平均	449	1066	2006
メジアン	336	900	1609
P値	← 0.048 → ← <0.0001 → ← <0.0001 →		

【0166】

【表16】

表14. T I I N E値とO Aの兆⁶²しの間の比較

ベースラインX-rays線との相関		
	第1サンプル (N=47)	第2サンプル (N=33)
Likert 等級	R=0.40 (p=0.006)	R=0.30 (p=0.087)
Knee 不良	R=0.25 (p=0.090)	R=0.24 (p=0.176)
Kellgren 等級	R=0.30 (p=0.0390)	R=0.38 (p=0.029)

【0167】さらなる研究で、9A4抗体を用いて、変形性関節症患者および対照患者からの軟骨試料に関して、免疫組織化学的試験を実施した。変形性関節症患者からの軟骨は9A4で染色されたが、一方対照患者からの軟骨は染色されなかった、ということが示された。これは、健康軟骨中には有意量の曝露ネオエピトープは存在しないが、一方疾患軟骨は有意量の曝露ネオエピトープを含有することを示す。これは、変形性関節症患者におけるコラゲナーゼ分解の結果であると仮定される。

【0168】タンパク質検出検定の場合と同様に、検出中の種がまさに当該タンパク質であることを確認しなければならない。5109アフィニティカラムに試料を通した試料からタンパク質を精製し、その後分画を質量分光測定分析することにより、本実施例に用いた試料中に存在する尿T I I N E断片の特異性を確認した(図4)。

実施例11

慢性関節リウマチ患者におけるT I I N E断片の測定モノクローナル抗体9A4および5109を電気化学発光検定に利用して、MMP-1、-8および-13 II型コラーゲン切断ネオエピトープの特異的検出を可能にした。尿T I I N Eのレベルを、慢性関節リウマチ患者および対照個体の試験においてモニタリングした。多数の被験

者に関して利用可能な基線、6ヶ月および2年X線結果を用いて、中等度のRAを有する個体150名から逐次検体を分析した。メトトレキセートまたはコルチコステロイドで処置した患者からの尿試料の遡及的分析からの結果を、標準NSAID処置単独を施された結果と比較した(図5)。

【0169】慢性関節リウマチ患者の中央値T I I N Eレベルは、対照集団で観察された値のほぼ2倍で、スポット尿T I I N Eレベルの変異性は約25%であった(図6)。メトトレキセート処置を受けている個体から観察された中央値T I I N Eレベルは、NSAID使用者よりも30%低かった。T I I N E値は、慢性関節疾患状態、例えば腫脹および疼痛性関節計数のいくつかの測定値、ならびにPhysician's Global Assessmentと関連した。さらに、T I I N EレベルをX線スコアと比較した場合、このマーカーは疾病状態の悪化に相関して観察され、それを予測する(表15)。これらの結果は、このマーカーが疾病の病因、段階に関連し、疾病結果を予測することが合理的に予期されることを示す。

【0170】

【表17】

表15. T I I N Eレベルは、短い及び⁶³期間RA試験における疾患重度と相関する。

3週間試験

変数	Spearman 相関	
	ベースライン	3週間
CRP	0.45 (p=0.0005)	0.42 (p=0.0016)
痛みのある関節	0.17 (p=0.2053)	0.27 (p=0.0469)
はれた関節	0.21 (p=0.1141)	0.42 (p=0.0014)
Physician's Global評価	0.30 (p=0.0264)	0.25 (p=0.0753)

・メトトレキアートは、T I I N Eレベルとの相関を逆転させる
(p=0.012)

2年間試験

ベースライン	6ヶ月間T I I N E	2年間T I I N E
むしばみ (Erosions)	1年間X-線値	2年間X-線値への変化
関節空間の減少	1年間X-線値への変化	

* p値<0.05

・高コラーゲン等級は、高X-線等級とX-線等級におけるポジティブな変化(悪化)の予示する。

【0171】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Saltarelli, Mary J.
Johnson, Kimberly S.
Otterness, Ivan G.

<120> Assays for Measurement of
Type II Collagen Fragments in Urine

<130> CIP of PC9946A

<140> B015178

<141> 2001-2-15

<160> 70

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly
1 5

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD#RES

<222> (3)

<223> Type II Collagen Fragment
with 4Hyp

<400> 2

Gly Pro Xaa Gly Pro Gln Gly

1 5
 <210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> DOMAIN
 <222> (1)..(10)
 <223> Type II Collagen Fragment

 <400> 3
 Gly Glu Pro Gly Asp Asp Gly Pro Ser
 1 5 10
 <210> 4
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> MOD#RES
 <222> (3)
 <223> Type II Collagen Fragment
 with 4Hyp
 <400> 4
 Gly Glu Xaa Gly Asp Asp Gly Pro Ser Gly
 1 5 10
 <210> 5
 <211> 408
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <220>
 <221> sig#peptide
 <222> (1)..(33)
 <223> Corresponds to portion of
 9A4 heavy chain signal peptide.
 <220>
 <221> V#region
 <222> (34)..(378)
 <223> Mature 9A4 heavy chain seq
 uence after cleavage of signal peptide
 .
 <220>
 <221> C#region
 <222> (379)..(408)
 <223> Portion of murine IgG1 CH1
 sequence.
 <400> 5
 ttcctgatgg cagctgccca aagtatccaa gcac
 agatcc agttggtgca gtctgtcct 60
 gagctgaaga agcctggaga gacagtcaag atct
 cctgca aggcttctgg ttataccttc 120
 acagactatt caatacactg ggtgaagcag gctc
 caggaa agggtttaa gtggatgggc 180
 tggataaaca ctgagactgg tgagccaaca tatg

<213> Mus musculus
 <220>
 <221> sig#peptide
 <222> (1)..(23)
 <223> Portion of 9A4 VL signal peptide.
 <220>
 <221> V#region
 <222> (24)..(341)
 <223> Mature 9A4 VL.
 <220>
 <221> C#region
 <222> (342)..(359)
 <223> Portion of murine C kappa constant region.
 <400> 6
 cctcagtcact actgtccaga ggacaaattg ttct
 caccca gtctccagta ttcattgtctg 60
 catctccagg ggagaaggtc accatgacct gcag
 tgccag ctcaagtgt agttacatgt 120
 actggtacca gcagaagcca ggatcctccc ccag
 actcct gattcatgcc acatccaacc 180
 tggcttctgg agtccctgtt cgcttcagtg gcgg
 tgggtc tgggacctct tactctctca 240
 caatcagccg aatggaggct gaagatgctg ccac
 ttatta ctgtcagcag tggagaagtt 300
 atacacggac gttcgggtgga ggcaccaagc tgga
 aatcat acgggctgat gctgcacca 359
 <210> 7
 <211> 883
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: 9A4 single chain antibody,
 VH - VL.
 <220>
 <221> sig#peptide
 <222> (29)..(94)
 <223> Engineered signal peptide
 in pCANTAB6; initiator methionine is
 coded for most likely by gtg codon.
 <220>
 <221> mat#peptide
 <222> (95)..(880)
 <223> Coding sequence for genet
 ically engineered single chain antibo
 dy
 - 9A4 VH - VL.
 <400> 7
 aagctttgga gccttgaga ttttcaacgt gaaa
 aaatta ttattcgcaa ttcctttagt 60
 tgttcctttt tatgcgccc agccggccat ggcc

tgaagatgct gccacttatt actgtcagca gtgg
 agaagt tatacacgga cgttcggtgg 780
 aggcaccaag ctggaatca tagcggccgc acat
 catcat caccatcacg gggccgcaga 840
 acaaaaactc atctcagaag aggatctgaa tggg
 gccgca tag 883
 <210> 8
 <211> 1340
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: 9A4 VL - VH single chain
 antibody.
 <220>
 <221> sig#peptide
 <222> (293)..(358)
 <223> pel B signal peptide in pA
 TDFLAG.
 <220>
 <221> mat#peptide
 <222> (359)..(1126)
 <223> Coding sequence for genet
 ically engineered single chain antibo
 dy
 - 9A4 VL - VH.
 <400> 8
 ctcatgtttg acagcttatt atcgatgaat tcca
 tcactt cctccggtt attgtcccc 60
 ggtgaaacg aggtcatcat ttcttccga aaaa
 acggtt gcatttaaat ctacatata 120
 taatactttc aaagactaca ttgtaagat ttga
 tgtttg agtcggctga aagatcgtac 180
 gtaccaatta ttgtttcgtg attgttcaag ccat
 aacact gtaggatag tggaaagagt 240
 gcttcatctg gttacgatca atcaaatatt caaa
 cggagg gagacgattt tgatgaata 300
 cctattgcct acggcagccg ctggattggt atta
 ctgct gcccaaccag ccatggccca 360
 aattgttctc acccagtctc cagtattcat gtct
 gcatct ccaggggaga aggtcacat 420
 gacctgcagt gccagctcaa gtgtaagta catg
 tactgg taccagcaga agccaggatc 480
 ctccccaga ctctgattc atgccacatc caac
 ctggct tctggagtcc ctgttcgctt 540
 cagtggcggg gggctcggga cctcttactc tctc
 acaatc agccgaatgg aggctgaaga 600
 tgctgccact tattactgtc agcagtggag aagt
 tataca cggacgttcg gtggaggcac 660
 caagctggaa atcactacta gtgcggacga tgcg
 aaaaag gatgctgcga agaaggatga 720
 cgctaagaaa gacgatgcta aaaaggacct cgag
 atccag ttggtgcagt ctggtcctga 780

<220>
 <221> sig#peptide
 <222> (29)..(94)
 <223> Engineered signal peptide
 in pCANTAB6; initiator methionine is
 coded for most likely by gtg codon.
 <220>
 <221> mat#peptide
 <222> (95)..(895)
 <223> Coding sequence for genet
 ically engineered single chain antibo
 dy
 - 5109 VH - VL.
 <400> 9
 aagctttgga gccttgaga tttcaacgt gaaa
 aaatta ttattcгаа ттсттtagt 60
 tgttcctttt tatgсggccc agccggccat ggcc
 gaagtг сagctggtgг agtctggggg 120
 aggctcagtг сagcctggag ggtccctgaa actc
 tcctgt гсagcctctг гattcacttt 180
 caatacctac ggcatgtctt gggttгccca gact
 ccagac aagaggctгг агtgggггсгс 240
 aaccattaat агтаатggгг гtctcacctt ttat
 гсagac агtgггаagg гccgattcac 300
 catttccaga gacaatгcca aaaacaccct gtat
 ctгcaa atgaacaggc тгаagtctгг 360
 ggactcaggc atgtattact гtгтаagagg atat
 агтаат tacгctгсгс гgggccaagg 420
 gссгсггггс actгtctгга гtgггггagg сггг
 tcaggc гgaggгггсa гсггсггггг 480
 сггatгггсгс gatgtггга тgaccцаac тсса
 сгсact ttггсгггга ссattгггсa 540
 atcagcctcc atctctггсa агтсaagtсa гagс
 сгсгга ggtagtгatг гattгсaгa 600
 ttгgattггг ttггггсaгa гgссaggссa ггсг
 ссaaag сгссгтаatсг тtсгггггсгс 660
 тгаattггсac тсгггagтсс сггсagгггг сact
 ггсagт гgatсagггга сagattтсac 720
 actgaaaatс агсagagсгг аггсггаага ttгг
 гgagтт тattattгсг гссaaggтac 780
 acattttссг сacagгггсг гггсггггсac сaag
 сгггггг сггaaagсгг ссгсagaaсгс 840
 aaaactсatс тсagaagagg atсггаatгг гgсс
 гсacat сaccacсatс accattaata 900
 agaattс
 907
 <210> 10
 <211> 348
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <220>
 <221> V#region
 <222> (1)..(348)

<400> 11
 gatgttgga tgacccaac tccactcact ttgt
 cggta ccattggaca atcagcctcc 60
 atctcttga agtcaagtca gagcctctta ggta
 gtgatg gattgacata ttgatttgg 120
 ttgttcaga ggcaggcca gtctcaaag cgcc
 taatct ttctggtgtc tgaattggac 180
 tctggagtcc ctgacagggt cactggcagt ggat
 cagga cagatttcac actgaaaac 240
 agcagagtgg aggcgaaga ttgggagtt tatt
 attgct gccaaggtac acattttcct 300
 cacacgttcg gtgctgggac caagctggag ctga
 aa 336

<210> 12

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD#RES

<222> (2)

<223> Type II collagen fragment
 with 4Hyp.

<220>

<221> MOD#RES

<222> (8)

<223> Type II collagen fragment
 with 4Hyp.

<220>

<221> MOD#RES

<222> (11)

<223> Type II collagen fragment
 with 4Hyp.

<400> 12

Ala Xaa Gly Glu Asp Gly Arg Xaa Gly Pro
 Xaa Gly Pro

1

5

10

<210> 13

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD#RES

<222> (9)

<223> Type II collagen fragment
 with 4Hyp.

<220>

<221> MOD#RES

<222> (15)

<223> Type II collagen fragment
 with 4Hyp.

<220>

<221> MOD#RES

<222> (18)

<213> Homo sapiens
 <220>
 <221> DOMAIN
 <222> (1)..(9)
 <223> Type II collagen fragment
 .
 <400> 14
 Ala Glu Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly
 1 5
 <210> 15
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> MOD#RES
 <222> (3)
 <223> Type II collagen fragment
 with 4Hyp.
 <220>
 <221> SITE
 <222> (7)
 <223> Collagenase cleaves on th
 e - COOH side of residue
 <400> 15
 Gly Pro Xaa Gly Pro Gln Gly Leu Ala Gly
 1 5 10
 <210> 16
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> DOMAIN
 <222> (1)..(7)
 <223> Type I collagen fragment.

 <400> 16
 Gly Thr Pro Gly Pro Gln Gly
 1 5
 <210> 17
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Modified Type II collagen
 fragment.
 <400> 17
 Cys Ala Glu Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly
 1 5 10
 <210> 18
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

fragment.

<400> 18

Cys Gly Glu Pro Gly Asp Asp Gly Pro Ser
 1 5 10

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> DOMAIN

<222> (1)..(9)

<223> Type II collagen fragment

.

<400> 19

Gly Glu Pro Gly Asp Asp Gly Pro Ser
 1 5

<210> 20

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> DOMAIN

<222> (1)..(19)

<223> Type II collagen fragment

.

<400> 20

Gly Glu Pro Gly Asp Asp Gly Pro Ser Gly
 Ala Glu Gly Pro Pro Gly
 1 5 10 15

Pro Gln Gly

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 21

ggagaagttg atgtcttg
 20

<210> 22

<211> 23

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 22

gaccttgcattgaactcct tgc
 23

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 23

ggctgtggaa cttgctattc
 20

<210> 24

<211> 20

gggtgtggac cttgccattc
20

<210> 25
<211> 20
<212> DNA
<213> Mus musculus
<400> 25
gggtgtggac cttgctattc
20

<210> 26
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence: Mixed oligonucleotide set a
s
PCR primers for murine VH signal pepti
de region.
<400> 26
ggstgtggam cttgcyattc
20

<210> 27
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence: Mixed oligonucleotide set a
s
PCR primers for murine VL signal pepti
de region.
<400> 27
gcttcctgct aatcaktg
18

<210> 28
<211> 21
<212> DNA
<213> Mus musculus
<400> 28
ggcagcagat ccaggggcca g
21

<210> 29
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence: Murine light chain Kappa
region primer with Hind III site.
<400> 29
gggaaagctt gttaactgct cactggatgg tgg

<221> DOMAIN
 <222> (114)..(119)
 <223> Portion of murine C kappa
 constant domain.
 <400> 33
 Ser Val Ile Leu Ser Arg Gly Gln Ile Val
 Leu Thr Gln Ser Pro Val
 1 5 10 15
 Phe Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val
 Thr Met Thr Cys Ser Ala
 20 25 30
 Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr
 Gln Gln Lys Pro Gly Ser
 35 40 45
 Ser Pro Arg Leu Leu Ile His Ala Thr Ser
 Asn Leu Ala Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Val Arg Phe Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 Thr Ser Tyr Ser Leu Thr
 65 70 75 80

 Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala
 Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95
 Trp Arg Ser Tyr Thr Arg Thr Phe Gly Gly
 Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110
 Ile Arg Ala Asp Ala Ala Pro
 115
 <210> 34
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: PCR - SOE primer for 5' 9A4
 VH region, including an Sfi I restrict
 ion endonuclease site.
 <400> 34
 gaggaggccc agccggccat ggcccagatc cagt
 tgggtgc agtctgg 47
 <210> 35
 <211> 61
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: PCR - SOE primer for 3' 9A4
 VH region, including linker segment of
 scFv for assembly PCR reaction
 with 9A4 VL.
 <400> 35
 gccgctgcca cctccgcctg accgcctcc acca

<211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: PCR - SOE primer for 3' 9A4
 VL region, including a Not I restricti
 on endonuclease site.
 <400> 37
 gaaggacgcc ggcgatgat ttccagcttg gtgc
 ctcc 38
 <210> 38
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: 9A4 scFv PCR primer,
 including a Not I restriction endonuc
 lease site.
 <400> 38
 aagaagcggc cgctatgatt tccagcttgg tgcc
 tc 36
 <210> 39
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli
 <400> 39
 agcggataac aatttcacac agg
 23
 <210> 40
 <211> 284
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: 9A4 scFv VH - VL.
 <220>
 <221> SIGNAL
 <222> (1)..(22)
 <223> pCANTAB6 signal peptide;
 Val at position 1 is most likely the
 initiator Met.
 <220>
 <221> DOMAIN
 <222> (23)..(137)
 <223> 9A4 VH domain.
 <220>
 <221> DOMAIN
 <222> (138)..(152)
 <223> 15 amino acid linker.
 <220>
 <221> DOMAIN

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial

Sequence: Single chain antibody linker
sequence.

<400> 42

Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala
Ala Lys Lys Asp Asp Ala

1 5 10 15
Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Leu
20 25

<210> 43

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial

Sequence: PCR - SOE primer for 5' 9A4
VL region, including an Nco I restriction
endonuclease site.

<400> 43

gaggagccat ggcccaaatt gttctcacc agtc
34

<210> 44

<211> 79

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial

Sequence: PCR - SOE primer for 3' 9A4
VL region, including linker segment of
scFv for assembly PCR reaction
with 9A4 VH.

<400> 44

ctttcttagc gtcaccttc ttcgagcat cctt
tttcgc atcgtccgca ctaagctga 60
tttccagctt ggtgcctcc
79

<210> 45

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial

Sequence: PCR - SOE primer for 5' 9A4
VH region, including linker segment of
scFv for assembly PCR reaction
with 9A4 VL.

<400> 45

ctgcaagaa ggatgacgct aagaaagacg atgc
taaaaa ggacctcgag atccagtgg 60
tgcagtctgg

<211> 278
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: 9A4 scFv VL - VH.
 <220>
 <221> SIGNAL
 <222> (1)..(22)
 <223> pel B signal peptide in pA
 TDFLAG.
 <220>
 <221> DOMAIN
 <222> (23)..(128)
 <223> 9A4 VL domain.
 <220>
 <221> DOMAIN
 <222> (129)..(153)
 <223> 25 amino acid linker.
 <220>
 <221> DOMAIN
 <222> (154)..(268)
 <223> 9A4 VH domain.
 <220>
 <221> SITE
 <222> (271)..(278)
 <223> FLAG tag.
 <400> 47
 Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala
 Gly Leu Leu Leu Leu Ala
 1 5 10 15
 Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Ile Val Leu
 Thr Gln Ser Pro Val Phe
 20 25 30
 Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr
 Met Thr Cys Ser Ala Ser
 35 40 45
 Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln
 Gln Lys Pro Gly Ser Ser
 50 55 60
 Pro Arg Leu Leu Ile His Ala Thr Ser Asn
 Leu Ala Ser Gly Val Pro
 65 70 75 80
 Val Arg Phe Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr
 Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
 85 90 95
 Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr
 Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
 100 105 110
 Arg Ser Tyr Thr Arg Thr Phe Gly Gly Gly
 Thr Lys Leu Glu Ile Ile
 115 120 125

Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly
 Trp Ile Asn Thr Glu Thr
 195 200 205
 Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys
 Gly Arg Phe Ala Phe Ser
 210 215 220
 Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu
 Gln Ile Asn Asn Leu Lys
 225 230 235 2
 40
 Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
 Arg Gly Gly Ser Leu Asp
 245 250 255
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
 Ser Ser Ala Ser Asp Tyr
 260 265 270
 Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 275
 <210> 48
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <220>
 <221> DOMAIN
 <222> (1)..(116)
 <223> Mature 5109 VH.
 <400> 48
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
 Ser Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp
 Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Asn Ser Asn Gly Gly Leu Thr
 Phe Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
 Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Arg Leu Lys Ser Gly Asp
 Ser Gly Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Arg Gly Tyr Ser Asn Tyr Ala Arg Trp
 Gly Gln Gly Ala Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ala
 115
 <210> 49
 <211> 112

Asp Gly Leu Thr Tyr Leu Ile Trp Leu Leu
 Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Arg Leu Ile Phe Leu Val Ser Glu
 Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val
 Tyr Tyr Cys Cys Gln Gly
 85 90 95
 Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Ala Gly
 Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

<210> 50
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <400> 50
 gaagtgcagc tggaggagtc tggg
 24

<210> 51
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <400> 51
 gatgttgta tgacccaac
 20

<210> 52
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <400> 52
 ctgatcagtc caactgttca ggac
 24

<210> 53
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Sequencing oligonucleotide
 .

<400> 53
 gtaaacgac ggccag
 16

<210> 54
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>

VH region, including an Sfi I restriction endonuclease site.

<400> 55
 gaagagcggc ccagccggcc atggccaag tgca
 gctggg ggagtctgg 49
 <210> 56
 <211> 74
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: PCR - SOE primer for 3' 5109

VH region including linker segment of scFv for assembly PCR reaction with 5109 VL.

<400> 56
 cgatccgcca ccgccgctgc cacctccgcc tgaa
 ccgcct ccaccactcg agacagtgac 60
 cagcgcccct tggc
 74
 <210> 57
 <211> 66
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: PCR - SOE primer for 5' 5109

VL region, including overlap into scFv linker segment.

<400> 57
 gggtcaggcg gaggtggcag cggcgggtggc ggat
 cgtctg atgtgtgat gaccctaaact 60
 ccactc
 66
 <210> 58
 <211> 87
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: PCR - SOE primer for 3' 5109

VL region, Ser version, including a Not I restriction endonuclease site.

<400> 58
 ggaaggagcg gccgctttca gctccagctt ggtc
 ccagca ccgaactgtg gaggaataatg 60
 tgtacctgg gagcaataat aaactcc

<210> 59
 <211> 36

<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence: Sequencing oligonucleotide
.
Primes in Gly4Ser linker region.
<400> 61
gaggcggttc aggcggag
 18

<210> 62
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence: Sequencing oligonucleotide
.
Primes in Gly4Ser linker region.
<400> 62
gatccgccac cgccgctg
 18

<210> 63
<211> 289
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence: 5109 VH - VL scFv.
<220>
<221> SIGNAL
<222> (1)..(22)
<223> pCANTAB6 signal peptide;
Val at position 1 is most likely
initiator Met.
<220>
<221> DOMAIN
<222> (23)..(138)
<223> 5109 VH domain.
<220>
<221> DOMAIN
<222> (139)..(154)
<223> 16 amino acid linker.
<220>
<221> DOMAIN
<222> (155)..(266)
<223> 5109 VL domain.
<220>
<221> SITE
<222> (270)..(279)
<223> myc tag.
<220>

1	5	10	15
Ala Gln Pro Ala Met Ala Glu Val Gln Leu			
Val Glu Ser Gly Gly Gly			
	20	25	30
Ser Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu			
Ser Cys Ala Ala Ser Gly			
	35	40	45
Phe Thr Phe Asn Thr Tyr Gly Met Ser Trp			
Val Arg Gln Thr Pro Asp			
	50	55	60
Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala Thr Ile Asn			
Ser Asn Gly Gly Leu Thr			
65	70	75	80
Phe Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe			
Thr Ile Ser Arg Asp Asn			
	85	90	95
Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn			
Arg Leu Lys Ser Gly Asp			
	100	105	110
Ser Gly Met Tyr Tyr Cys Val Arg Gly Tyr			
Ser Asn Tyr Ala Arg Trp			
	115	120	125
Gly Gln Gly Ala Leu Val Thr Val Ser Ser			
Gly Gly Gly Gly Ser Gly			
	130	135	140
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser			
Asp Val Val Met Thr Gln			
145	150	155	1
60			
Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly			
Gln Ser Ala Ser Ile Ser			
	165	170	175
Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Gly Ser			
Asp Gly Leu Thr Tyr Leu			
	180	185	190
Ile Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser			
Pro Lys Arg Leu Ile Phe			
	195	200	205
Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser Gly Val Pro			
Asp Arg Phe Thr Gly Ser			
	210	215	220
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile			
Ser Arg Ala Glu Ala Glu			
225	230	235	2
40			
Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Cys Gln Gly			
Thr His Phe Pro His Thr			
	245	250	255
Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys			
Ala Ala Ala Glu Gln Lys			
	260	265	270
Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ala Ala			

<211> 62
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: PCR spiking oligonucleotid
 e.
 <220>
 <221> misc#difference
 <222> (25)..(51)
 <223> 9A4 scFv PCR spiking oligo
 nucleotide. Level of spiking = 10% wit
 h
 nucleotides other than shown in this s
 egment. Sequence shown
 represents original.
 <400> 65
 gactgtgaga gtggtgcctt ggccccagta gtca
 aggcta cgcgccctag cacagaaata 60
 tg
 62
 <210> 66
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <220>
 <221> V#region
 <222> (1)..(26)
 <223> Portion of the JH segment
 of the 9A4 VH used as a PCR primer.
 <400> 66
 gcccaaggcac cactctcaca gtctcc
 26
 <210> 67
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> MOD#RES
 <222> (3)
 <223> Type II Collagen Fragment
 with 4Hyp.
 <220>
 <221> MOD#RES
 <222> (6)
 <223> Type II Collagen Fragment
 with 4Hyp.
 <220>
 <221> MOD#RES
 <222> (9)
 <223> Type II Collagen Fragment
 with 4Hyp.
 <220>

<221> MOD#RES
 <222> (3)
 <223> Type II Collagen Fragment
 with 4Hyp.
 <220>
 <221> MOD#RES
 <222> (12)
 <223> Type II Collagen Fragment
 with 4Hyp.
 <220>
 <221> MOD#RES
 <222> (15)
 <223> Type II Collagen Fragment
 with 4Hyp.
 <220>
 <221> MOD#RES
 <222> (18)
 <223> Type II Collagen Fragment
 with 4Hyp.
 <400> 70 65

66

【図面の簡単な説明】 Gly Glu Pro Gly Asp Asp Ala Gly Pro Ser) による5109a結合の阻害勾配対054濃度を表す。

【図1】図1は、ペプチド130(配列番号20)と得られた吸光度の読み標準曲線を表す。9A4捕獲/Bt-5109サンドイッチELISAが決定される。

【図2】図2は、5109捕獲/Bt-9A4検出サンドイッチ・アッセイのための標準曲線を表す。

【図3】図3は、標準曲線：ペプチド054(配列番号1

【図4】図4は、尿中のコラーゲン断片の質量分析の結果を表す。 15

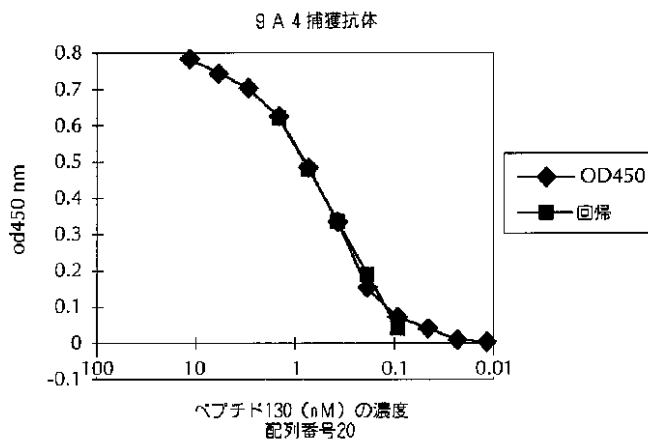
【図5】図5は、低TIINEレベルに関するDMARD処理の結果を表す。

【図6】図6は、対照及びRA集団におけるTIINEレベルの結果を表す。

【図1】

ペプチド130(配列番号20)と得られた吸光度の読み標準曲線は、9A4捕獲/Bt-5109サンドイッチELISAを決定する

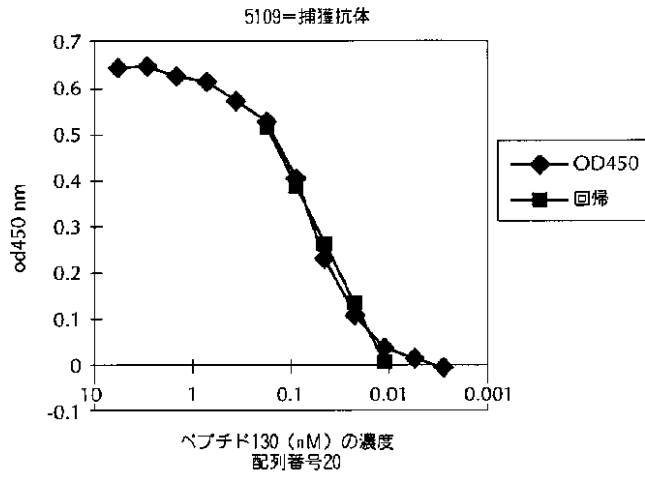
図1



【図2】

5109捕獲/Bt-9A4検出サンドイッチ・アッセイのための標準曲線

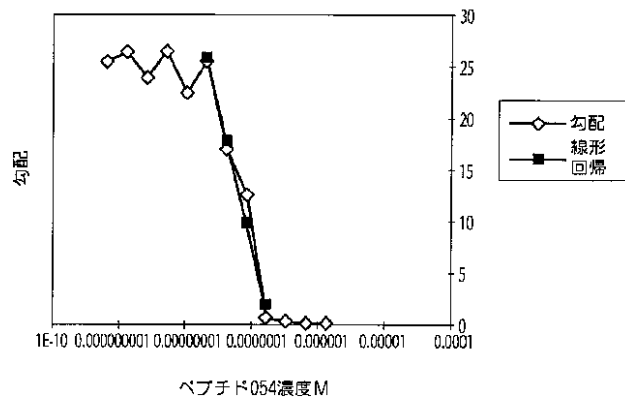
図2



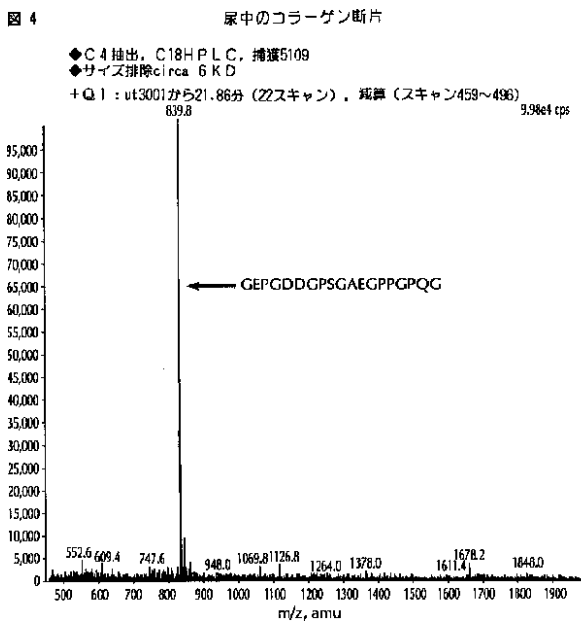
【図3】

標準曲線：
ペプチド054（配列番号19）による5109a
結合の阻害勾配対054濃度

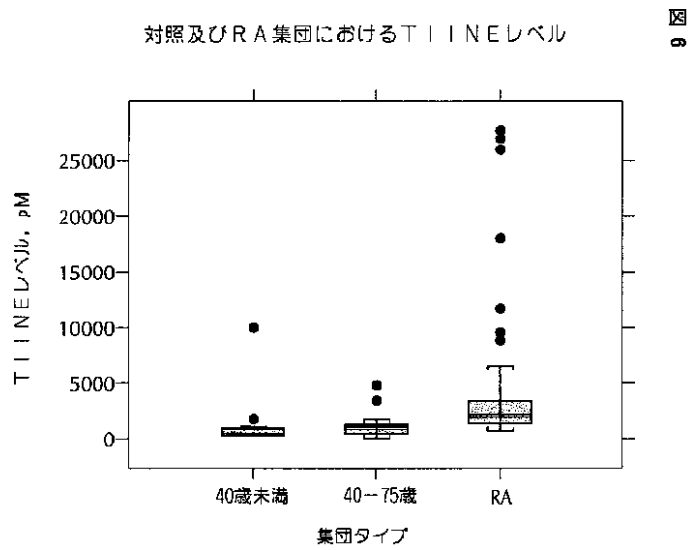
図3



【図4】

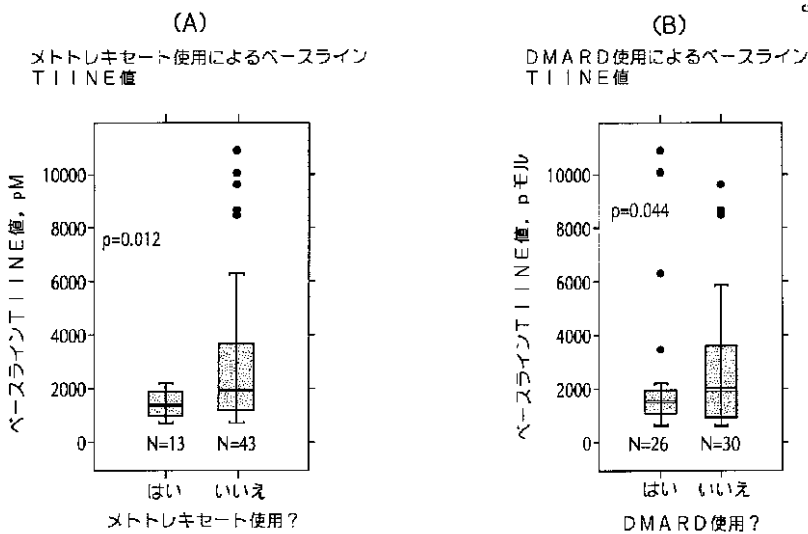


【図6】



【図5】

低TIIINEレベルに関するDMARD処理



フロントページの続き

(72)発明者 メアリー ジョセフィン サルタレリ
 アメリカ合衆国, コネチカット 06340,
 グロトン, イースタン ポイント ロード,
 ファイザー グローバル リサーチ
 アンド デベロップメント

(72)発明者 イバン ジョージ オッターネス
 アメリカ合衆国, コネチカット 06340,
 グロトン, ナンバー 5, モニュメント
 ストリート 241

专利名称(译)	測定尿中II型膠原片段的測定		
公开(公告)号	JP2001264329A	公开(公告)日	2001-09-26
申请号	JP2001038309	申请日	2001-02-15
[标]申请(专利权)人(译)	美国辉瑞有限公司		
申请(专利权)人(译)	辉瑞产品公司		
[标]发明人	キンバリー スー ジョンソン メアリー ジョセフィン サルタレリ イバン ジョージ オッターネス		
发明人	キンバリー スー ジョンソン メアリー ジョセフィン サルタレリ イバン ジョージ オッターネス		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/18 C12N15/02 C12N15/09 G01N33/531 G01N33/577 G01N33/68		
CPC分类号	C07K16/18 C07K2317/622 G01N33/6887 G01N2333/78 G01N2800/102 G01N2800/105 Y10S435/971		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/531.A G01N33/577.B C12N15/00.C C12N15/00.ZNA.A C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA53 4B024/CA04 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA03 4B024/GA14 4B024/GA25 4B024/HA15		
优先权	09/504262 2000-02-15 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种监测尿液中II型胶原蛋白片段的新方法。一种监测尿液中II型胶原蛋白片段的方法，其中所述尿液特异性结合II型胶原蛋白片段，其中基本上实现了对I型或III型胶原蛋白片段的任何结合。使尿液与特异性结合产生胶原酶的胶原片段的检测抗体接触，并检测与捕获和检测抗体结合的II型胶原片段的量。提供了一种方法，包括：

【表2】

G: Gly: グリシン	V: Val: バリン	L: Leu: ロイシン
A: Ala: アラニン	I: Ile: イソロイシン	S: Ser: セリン
D: Asp: アスパラギン酸	K: Lys: リジン	R: Arg: アルギニン
H: His: ヒスチジン	F: Phe: フェニルアラニン	Y: Tyr: チロシン
T: Thr: スレオニン	C: Cys: システイン	M: Met: メチオニン
E: Glu: グルタミン酸	W: Trp: トリプトファン	P: Pro: プロリン
Q: Hyp: ヒドロキシプロリン	N: Asn: アスパラギン	Q: Gin: グルタミン