

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



# [12] 发明专利说明书

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

G01N 33/564 (2006.01)

专利号 ZL 02826290.5

[45] 授权公告日 2008 年 5 月 28 日

[11] 授权公告号 CN 100389826C

[22] 申请日 2002.12.26 [21] 申请号 02826290.5

[30] 优先权

[32] 2001.12.28 [33] JP [31] 400677/2001

[86] 国际申请 PCT/JP2002/013650 2002.12.26

[87] 国际公布 WO2003/057251 日 2003.7.17

[85] 进入国家阶段日期 2004.6.28

[73] 专利权人 协和发酵工业株式会社

地址 日本东京

[72] 发明人 田村忠史 内井雅子 须田敏郎

三木一郎 田中亨

[56] 参考文献

CN1247568 A 2000.3.15

EP0799835 A 1997.10.8

CN1064813 A 1992.9.30

WO0062809 A 2000.10.26

JP2001046066 A 2001.2.20

EP0882794 A 1998.12.9

‘Cooperation of endothelin - 1 and FGF8 in Meckel’s cartilage formation’. KURIHARA YUKIKO ET AL. : DEVELOPMENT GROWTH & DIFFERENTIATION, Vol. 43, . 2001

审查员 周 洋

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利  
商标事务所

代理人 王 健

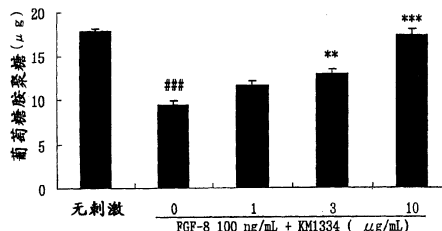
权利要求书 7 页 说明书 121 页 附图 34 页

[54] 发明名称

关节炎的治疗药

[57] 摘要

本发明提供作为有效成分含有抗 FGF - 8 中和抗体的关节炎的预防药或治疗药、软骨保护剂、关节破坏抑制剂、滑膜增殖抑制剂，以及作为有效成分含有抗 FGF - 8 抗体的关节炎的诊断药和使用该抗体的关节炎的判定方法。



- 1、一种用于抑制关节损伤的药物，其中，作为有效成分含有与FGF-8特异性结合并且抑制FGF-8活性的IgG抗体。
- 2、根据权利要求1所述的药物，其特征在于，与FGF-8特异性结合并且抑制FGF-8活性的IgG抗体是单克隆抗体。
- 3、根据权利要求2所述的药物，其中，单克隆抗体是选自杂交瘤产生的抗体、人源化抗体以及它们的抗体片段中的抗体。
- 4、根据权利要求3所述的药物，其中，杂交瘤是杂交瘤KM1334(FERM BP-5451)。
- 5、根据权利要求3所述的药物，其中，人源化抗体是人型嵌合抗体或人型互补决定区CDR移植抗体。
- 6、根据权利要求5所述的药物，其中，人型嵌合抗体是由与FGF-8特异性结合并且抑制FGF-8活性的单克隆抗体的抗体重链可变区VH和抗体轻链可变区VL、以及人抗体的抗体重链恒定区CH以及抗体轻链恒定区CL构成的人型嵌合抗体。
- 7、根据权利要求6所述的药物，其中，人型嵌合抗体是以下(a)~(c)中任一种人型嵌合抗体：
  - (a) VH含有序列编号5所示氨基酸序列的人型嵌合抗体
  - (b) VL含有序列编号6所示氨基酸序列的人型嵌合抗体
  - (c) VH含有序列编号5所示氨基酸序列并且VL含有序列编号6所示氨基酸序列的人型嵌合抗体。
- 8、根据权利要求7所述的药物，其中，人型嵌合抗体是转化体KM3034(FERM BP-7836)产生的人型嵌合抗体。
- 9、根据权利要求5所述的药物，其中，人型CDR移植抗体是含有与FGF-8特异性结合并且抑制FGF-8活性的单克隆抗体的VH和VL的CDR以及人抗体的CH以及CL的人型CDR移植抗体。
- 10、根据权利要求9所述的药物，其中，人型CDR移植抗体是由与FGF-8特异性结合并且抑制FGF-8活性的单克隆抗体的VH以及VL

的CDR、人抗体的VH以及VL的框架区FR、以及人抗体的CH以及CL构成的人型CDR移植抗体。

11、根据权利要求9或10所述的药物，其中，人型CDR移植抗体是以下(a)~(c)中任一种人型CDR移植抗体：

(a) VH的CDR1、CDR2以及CDR3分别含有序列编号7、8和9所示的氨基酸序列的人型CDR移植抗体

(b) VL的CDR1、CDR2以及CDR3分别含有序列编号10、11和12所示的氨基酸序列的人型CDR移植抗体

(c) VH的CDR1、CDR2以及CDR3分别含有序列编号7、8和9所示的氨基酸序列、并且VL的CDR1、CDR2以及CDR3分别含有序列编号10、11和12所示的氨基酸序列的人型CDR移植抗体。

12、根据权利要求9或10所述的药物，其中，人型CDR移植抗体是以下(a)~(c)中任一种人型CDR移植抗体：

(a) VH含有序列编号18所示的氨基酸序列中选自第12号的Lys、13号的Lys、40号的Ala、41号的Pro、48号的Met、68号的Val、70号的Ile、74号的Thr、76号的Thr、82号的Glu、87号的Arg以及95号的Tyr中的至少一种以上氨基酸残基被取代为其它氨基酸残基的氨基酸序列的人型CDR移植抗体

(b) VL含有序列编号19所示的氨基酸序列中选自第2号的Ile、3号的Val、14号的Thr、15号的Pro、50号的Gln、51号的Leu以及92号的Tyr中的至少一种以上氨基酸残基被取代为其它氨基酸残基的氨基酸序列的人型CDR移植抗体

(c) VH含有序列编号18所示的氨基酸序列中选自第12号的Lys、13号的Lys、40号的Ala、41号的Pro、48号的Met、68号的Val、70号的Ile、74号的Thr、76号的Thr、82号的Glu、87号的Arg以及95号的Tyr中的至少一种以上氨基酸残基被取代为其它氨基酸残基的氨基酸序列、并且VL含有序列编号19所示的氨基酸序列中选自第2号的Ile、3号的Val、14号的Thr、15号的Pro、50号的Gln、51号的Leu以及92号的Tyr中的至少一种以上氨基酸残基被取代为其它氨基酸残基的氨基酸序列

的人型CDR移植抗体。

13、根据权利要求9或10所述的药物，其中，人型CDR移植抗体是以下(a)~(c)中的任一种人型CDR移植抗体：

(a) VH含有序列编号18或20所示的氨基酸序列的人型CDR移植抗体

(b) VL含有序列编号19、21、42、43、44、45、46、47、50或51所示的氨基酸序列的人型CDR移植抗体

(c) VH含有序列编号18或20所示的氨基酸序列，并且VL含有序列编号19、21、42、43、44、45、46、47、50或51所示的氨基酸序列的人型CDR移植抗体。

14、根据权利要求13所述的药物，其中，人型CDR移植抗体是以下(a)~(c)中的任一种人型CDR移植抗体：

(a) VH含有序列编号18所示氨基酸序列，并且VL含有序列编号21所示氨基酸序列的人型CDR移植抗体

(b) VH含有序列编号18所示氨基酸序列，并且VL含有序列编号44所示氨基酸序列的人型CDR移植抗体

(c) VH含有序列编号18所示氨基酸序列，并且VL含有为序列编号50所示氨基酸序列的人型CDR移植抗体。

15、根据权利要求9或10所述的药物，其中，人型CDR移植抗体是以下(a)~(c)中的任一种人型CDR移植抗体：

(a) 转化体KM8037 (FERM BP - 8084) 产生的人型CDR移植抗体

(b) 转化体KM8035 (FERM BP - 8082) 产生的人型CDR移植抗体

(c) 转化体KM8036 (FERM BP - 8083) 产生的人型CDR移植抗体。

16、根据权利要求3所述的药物，其中，抗体片段是选自Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、单链抗体scFv、二聚体可变区V区片段diabody、二硫键稳定的V区片段dsFv以及含有CDR的肽的抗体片段。

17、根据权利要求1所述的药物，其中，用于抑制关节损伤的药物是关节炎的诊断用药。

18、根据权利要求1所述的药物，其中，用于抑制关节损伤的药物是用于关节炎患者的关节破坏抑制剂。

19、根据权利要求1所述的药物，其中，用于抑制关节损伤的药物是用于关节炎患者的软骨保护剂。

20、根据权利要求1所述的药物，其中，用于抑制关节损伤的药物是用于关节炎患者的滑膜增殖抑制剂。

21、根据权利要求1所述的药物，其中，用于抑制关节损伤的药物是用于关节炎患者的关节炎的预防药或治疗药。

22、与FGF-8特异性结合并且抑制FGF-8活性的IgG抗体在用于制备关节破坏抑制剂、软骨保护剂、滑膜增殖抑制剂、或者关节炎的预防药或治疗药中的应用。

23、与FGF-8特异性结合并且抑制FGF-8活性的IgG抗体在用于制备关节炎的诊断用药中的应用。

24、根据权利要求22或23所述的应用，其中，与FGF-8特异性结合的IgG抗体是多克隆抗体或单克隆抗体。

25、根据权利要求24所述的应用，其中，单克隆抗体是选自杂交瘤产生的抗体、人源化抗体以及它们的抗体片段中的抗体。

26、根据权利要求25所述的应用，其中，杂交瘤是杂交瘤KM1334(FERM BP-5451)。

27、根据权利要求25所述的应用，其中，人源化抗体是人型嵌合抗体或人型CDR移植抗体。

28、根据权利要求27所述的应用，其中，人型嵌合抗体是由与FGF-8特异性结合的单克隆抗体的VH以及VL、以及人抗体的CH以及CL构成的人型嵌合抗体。

29、根据权利要求28所述的应用，其中，人型嵌合抗体是以下(a)~(c)中任一种人型嵌合抗体：

(a) VH含有序列编号5所示氨基酸序列的人型嵌合抗体

(b) VL含有序列编号6所示氨基酸序列的人型嵌合抗体

(c) VH含有序列编号5所示氨基酸序列，并且VL含有序列编号6所示氨基酸序列的人型嵌合抗体。

30、根据权利要求29所述的应用，其中，人型嵌合抗体是转化体KM3034 (FERM BP - 7836) 产生的人型嵌合抗体。

31、根据权利要求27所述的应用，其中，人型CDR移植抗体是含有与FGF - 8特异性结合的单克隆抗体的VH以及VL的CDR和人抗体的CH以及CL的人型CDR移植抗体。

32、根据权利要求31所述的应用，其中，人型CDR移植抗体是由与FGF - 8特异性结合的单克隆抗体的VH以及VL的CDR、人抗体的VH以及VL的FR、以及人抗体的CH以及CL构成的人型CDR移植抗体。

33、根据权利要求31或32所述的应用，其中，人型CDR移植抗体是以下(a) ~ (c)中任一种人型CDR移植抗体：

(a) VH的CDR1、CDR2以及CDR3分别含有序列编号7、8和9所示的氨基酸序列的人型CDR移植抗体

(b) VL的CDR1、CDR2以及CDR3分别含有序列编号10、11和12所示的氨基酸序列的人型CDR移植抗体

(c) VH的CDR1、CDR2以及CDR3分别含有序列编号7、8和9所示的氨基酸序列、并且VL的CDR1、CDR2以及CDR3分别含有序列编号10、11和12所示的氨基酸序列的人型CDR移植抗体。

34、根据权利要求31或32所述的应用，其中，人型CDR移植抗体是以下(a) ~ (c)中任一种人型CDR移植抗体：

(a) VH含有序列编号18所示的氨基酸序列中选自第12号的Lys、13号的Lys、40号的Ala、41号的Pro、48号的Met、68号的Val、70号的Ile、74号的Thr、76号的Thr、82号的Glu、87号的Arg以及95号的Tyr中的至少一种以上氨基酸残基被取代为其它氨基酸残基的氨基酸序列的人型CDR移植抗体

(b) VL含有序列编号19所示的氨基酸序列中选自第2号的Ile、3号的Val、14号的Thr、15号的Pro、50号的Gln、51号的Leu以及92号的

Tyr中的至少一种以上氨基酸残基被取代为其它氨基酸残基的氨基酸序列的人型CDR移植抗体

(c) VH含有序列编号18所示的氨基酸序列中选自第12号的Lys、13号的Lys、40号的Ala、41号的Pro、48号的Met、68号的Val、70号的Ile、74号的Thr、76号的Thr、82号的Glu、87号的Arg以及95号的Tyr中的至少一种以上氨基酸残基被取代为其它氨基酸残基的氨基酸序列、并且VL含有序列编号19所示的氨基酸序列中选自第2号的Ile、3号的Val、14号的Thr、15号的Pro、50号的Gln、51号的Leu以及92号的Tyr中的至少一种以上氨基酸残基被取代为其它氨基酸残基的氨基酸序列的人型CDR移植抗体。

35、根据权利要求31或32所述的应用，其中，人型CDR移植抗体是以下(a)~(c)中的任一种人型CDR移植抗体：

(a) VH含有序列编号18或20所示的氨基酸序列的人型CDR移植抗体

(b) VL含有序列编号19、21、42、43、44、45、46、47、50或51所示的氨基酸序列的人型CDR移植抗体

(c) VH含有序列编号18或20所示的氨基酸序列、并且VL含有序列编号19、21、42、43、44、45、46、47、50或51所示的氨基酸序列的人型CDR移植抗体。

36、根据权利要求35所述的应用，其中，人型CDR移植抗体是以下

(a)~(c)中的任一种人型CDR移植抗体：

(a) VH含有序列编号18所示氨基酸序列并且VL含有序列编号21所示氨基酸序列的人型CDR移植抗体

(b) VH含有序列编号18所示氨基酸序列，并且VL含有序列编号44所示氨基酸序列的人型CDR移植抗体

(c) VH含有序列编号18所示氨基酸序列，并且VL含有序列编号50所示氨基酸序列的人型CDR移植抗体。

37、根据权利要求31或32所述的应用，其中，人型CDR移植抗体是以下(a)~(c)中的任一种人型CDR移植抗体：

(a) 转化体KM8037 (FERM BP - 8084) 产生的人型CDR移植抗体

(b) 转化体KM8035 (FERM BP - 8082) 产生的人型CDR移植抗体

(c) 转化体KM8036 (FERM BP - 8083) 产生的人型CDR移植抗体。

38、根据权利要求25所述的应用,其中,抗体片段是选自Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、单链抗体scFv、二聚体V区片段diabody、二硫键稳定的V区片段dsFv以及含有CDR的肽的抗体片段。

## 关节炎的治疗药

### 技术领域

本发明涉及到作为有效成分含有抗FGF-8抗体的关节炎的预防药或治疗药、关节炎破坏抑制剂、软骨保护剂、滑膜增殖抑制剂、关节炎的诊断药以及采用该抗体的关节炎的判定方法。

### 背景技术

在高龄社会中，患有关节病症的人确实正在增加。对称之为关节疾病的代表性的变形性关节炎、或关节风湿病的疾病进行早期诊断和筛选、或患者的预后判定确实非常重要，该治疗可以提高很多高龄人的生活质量，但十分有效的诊断和治疗方法还没有确立。

关节软骨是富含包被关节可动面的少数软骨细胞和丰富的细胞外基质的组织，没有血管和神经分布，主要接受来自包被关节内面的滑膜产生的滑液的营养补给。另外不仅没有血管，而且对来自富含血管网的周围组织的血管的侵入表现出强的抵抗性。软骨细胞对细胞外基质合成、分解两方面进行复杂调控，对细胞外基质的恒定性的维持起着中心作用。细胞因子、生长因子等化学因子和荷重负荷等的力学因子通过作用于软骨细胞，改变细胞外基质合成、分解的两者平衡，影响细胞外基质代谢。

变形性关节炎的原因为年龄增长或机械的应力，引起关节软骨表面的崩坏以及伴随而来的关节边缘的新的软骨的增殖、关节的变形、适合性的破绽，甚至发展到关节滑膜的发炎。变形性关节炎是关节的软骨的慢行变性，以常常疼痛和功能丧失为特征的单关节病（Manek M.J.and Lane N.E.,Am.Fam.Physician,61,1795-1804,2000）。

关节风湿病是以免疫异常或感染症为起因，炎性细胞浸润滑膜，进而，伴随血管新生，滑膜纤维芽细胞的增殖亢进，形成称之为血管翳的

炎性滑膜肉芽组织。如果形成血管翳，骨和软骨的破坏发展，引起关节不可逆的损伤。在骨和软骨被破坏过程中，大量存在的胶原和蛋白聚糖等各种细胞外基质被分解。

在变形性关节炎和关节风湿病等的关节病中，滑膜炎症和细胞外基质的破坏与关节软骨的功能丧失有关。

变形性关节炎和关节风湿病从病因论的观点看是完全不同的疾病，但在关节软骨破坏机制上有许多共通点。在关节滑液以及滑膜、软骨等的关节局部产生、分泌多种基质金属蛋白酶，在关节局部检测出过量的基质金属蛋白酶。基质金属蛋白酶由于分解多种细胞外基质，这是关节破坏的一个原因。虽然他们是由炎症滑膜、巨噬细胞、中性白细胞和软骨细胞产生的，但他们的产生受到在相同的关节局部产生分泌的种种细胞因子、活性氧、一氧化氮、前列腺素、生长因子等调节。有报道说他们诱导滑膜细胞、软骨细胞产生基质金属蛋白酶后，促进细胞外基质的分解。

根据这些报道认为除了变形性关节炎和关节风湿病之外，在由于自身抗体的出现和免疫复合体的组织沉着引起的炎性组织损伤的原因不明的疾病中，关节病高频率出现的全身性红斑狼疮、强直性关节炎、伴随合并干癣病患者的滑膜增殖直至骨破坏的干癣性关节炎、确认椎间盘的细胞外基质的破坏的椎间盘疾病、急性结晶性滑膜炎（痛风、假痛风）的关节病（広畑和志等人编 风湿病学 同人书院 1989年）中，通过抑制滑膜的增殖和软骨破坏，可以进行治疗。

以往，关节风湿病的药物治疗法主要是为了减轻关节的疼痛和炎症，使用以种种非甾体消炎药、氢化泼尼松等类固醇剂和氨甲蝶呤为首的抗风湿药（治疗，78，3553-3558，南山堂，1996）。在变形性关节炎中，为了消除疼痛和炎症，给予各种非甾体消炎药和镇痛剂，关节注入剂透明质酸制剂等。抑制软骨破坏的透明质酸作为软骨保护剂使用（Creamer P.,J.Rheum.,20,1461-1464,1993, Arthritis Rheum.,43,1905-1915, 2000）。另外也实施理疗法、骨切除术、人工关节置换术等手术疗法。对于全身性红斑狼疮，使用非甾体消炎药和氢化

泼尼松等类固醇剂，对强直性关节炎的非甾体消炎药和抗风湿药柳氮磺胺吡啶，对于伴随合并干癣病患者的滑膜增殖直至骨破坏的干癣性关节炎使用非甾体消炎药、抗风湿药和类固醇的关节内注入，对于确认椎间盘的细胞外基质的破坏的椎间盘疾病使用非甾体消炎药和镇痛药，对于急性结晶性滑膜炎使用非甾体消炎药和秋水仙素（広畑和志等人编 风湿病学 同文书院 1989年），这样的药物疗法是对症疗法，充分抑制关节的破坏是困难的。

现在，在关节风湿病的治疗中，要预防关节破坏少的积极疗法的选择正被人们接受，在尽可能早的阶段诊断为关节风湿病，如何适当选择以柳氮磺胺吡啶为首的抗风湿药成为关键，但还不是充分有效的疗法。

作为存在于生物体内的各种各样的生长因子之一的纤维芽细胞增殖因子（以下略为FGF）作为作用于血管内皮细胞的乙酰肝素结合性增殖因子已为人们所知。另外，在FGF家族中存在19种以上，而FGF-2（碱性FGF）和FGF-1（酸性FGF）等人们很早就知道。FGF受体到现在为止已经发现了7种，在细胞内区域编码酪氨酸激酶。

FGF-8是作为雄激素诱导增殖因子（AIGF）从表现出性激素依赖性增殖的鼠乳腺癌细胞株SC-3（Nakamura N.et al.,J.Steroid Biochem.,27,459-464,1987）的培养上清中分离出的因子，由于雄激素刺激，产生诱导，自分泌使SC-3细胞增殖的增殖因子（Tanaka A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 8928-8932, 1992）。有报道说FGF-8促进前列腺癌的细胞和纤维芽细胞的增殖（Tanaka A. et al., FEBS Lett., 363, 226-230, 1995）。报道说FGF-8与FGF受体-2IIIc、FGF受体-3IIIc、FGF受体-4的3种受体结合（Ornitz D.M.et al.,J.Biol.Chem.,271,15292-15297,1996）。在FGF的作用中与多配体蛋白聚糖等膜型乙酰肝素硫酸蛋白聚糖的结合是不可缺的。与乙酰肝素硫酸的结合是为了在局部稳定蓄积FGF所必需的。认为在炎症等组织改变的情况下，通过乙酰肝素硫酸被分解，FGF由细胞外基质游离出来，发挥其活性。在软骨中含有象FGF-2那样的强的血管新生因子（Sato H.et al.,J. Biol.Chem.,273,12307-12315,1998）。而对于关节炎来说，滑

膜细胞、软骨细胞和侵入的炎症细胞显著地合成高水平的FGF-1和FGF-2 (Sano H.et al.,J.Cell Biol.,110,1417-1426,1990、Remmers E.F.,Growth factors,2,179-188,1990)、风湿病患者的关节液中的FGF-2的浓度与关节病症有关 (Manabe N.et al.,Rheumatology,38,714-720,1999)。FGF-2与变形性关节炎中的骨刺形成有关 (Uchino M.et al.,Clin.Orthopl.,377,119-125,2000)。这些报告表明FGF-1和FGF-2与关节炎有关。

在使用FGF-8人工破坏特定基因小鼠的报告中,认为FGF-8出现在关节发生阶段 (Haraguchi R.et al.,Development,127,2471-2479,2000;Lewandoski M.et al.,Nat.Genet.,26,460-463,2000),但还不了解FGF-8与关节炎的关系。

### 发明内容

本发明的目的在于提供关节炎的预防药或治疗药、关节炎破坏抑制剂、软骨保护剂、滑膜增殖抑制剂、关节炎的诊断药以及关节炎的判定方法。

本发明提供以下(1)~(51)。

(1)一种关节炎的预防药或治疗药,含有与FGF-8特异性结合并且抑制FGF-8活性的抗体作为有效成分。

(2)根据上述(1)所述的医药,其中,与FGF-8特异性结合并且抑制FGF-8活性的抗体是单克隆抗体。

(3)根据上述(2)所述的医药,其中,单克隆抗体是选自杂交瘤产生的抗体、人源化抗体以及它们的抗体片段中的抗体。

(4)根据上述(3)所述的医药,其中,杂交瘤是杂交瘤KM1334(FERM BP-5451)。

(5)根据上述(3)所述的医药,其中,人源化抗体是人型嵌合抗体或人型互补决定区(CDR)移植抗体。

(6)根据上述(5)所述的医药,其中,人型嵌合抗体是由与FGF-8特异性结合并且抑制FGF-8活性的单克隆抗体的抗体重链可变区

(VH)以及抗体轻链可变区(VL)、以及人抗体的抗体重链恒定区(CH)以及抗体轻链恒定区(CL)构成的人型嵌合抗体。

(7)根据上述(6)所述的医药,其中,人型嵌合抗体是以下(a)~(c)中任一种人型嵌合抗体:

(a) VH含有序列编号5所示氨基酸序列的人型嵌合抗体

(b) VL含有序列编号6所示氨基酸序列的人型嵌合抗体

(c) VH含有序列编号5所示氨基酸序列,并且VL含有序列编号6所示氨基酸序列的人型嵌合抗体。

(8)根据上述(7)所述的医药,其中,人型嵌合抗体是转化体KM3034(FERM BP-7836)生产的人型嵌合抗体。

(9)根据上述(5)所述的医药,其中,人型CDR移植抗体是含有与FGF-8特异性结合并且抑制FGF-8活性的单克隆抗体的VH以及VL的CDR和人抗体的CH以及CL的人型CDR移植抗体。

(10)根据上述(9)所述的医药,其中,人型CDR移植抗体是由与FGF-8特异性结合并且抑制FGF-8活性的单克隆抗体的VH以及VL的CDR、人抗体的VH以及VL的框架区(FR)、以及人抗体的CH以及CL构成的人型CDR移植抗体。

(11)根据上述(9)或(10)所述的医药,其中,人型CDR移植抗体是以下(a)~(c)中任一种人型CDR移植抗体:

(a) VH的CDR1、CDR2以及CDR3分别含有序列编号7、8和9所示的氨基酸序列的人型CDR移植抗体

(b) VL的CDR1、CDR2以及CDR3分别含有序列编号10、11和12所示的氨基酸序列的人型CDR移植抗体

(c) VH的CDR1、CDR2以及CDR3分别含有序列编号7、8和9所示的氨基酸序列、并且VL的CDR1、CDR2以及CDR3分别含有序列编号10、11和12所示的氨基酸序列的人型CDR移植抗体。

(12)根据上述(9)或(10)所述的医药,其中,人型CDR移植抗体是以下(a)~(c)中任一种人型CDR移植抗体:

(a) VH含有序列编号18所示的氨基酸序列中选自第12号的Lys、

13号的Lys、40号的Ala、41号的Pro、48号的Met、68号的Val、70号的Ile、74号的Thr、76号的Thr、82号的Glu、84号的Ser、87号的Arg以及95号的Tyr中的至少一种以上氨基酸残基被取代为其它氨基酸残基的氨基酸序列的人型CDR移植抗体

(b) VL含有以下氨基酸序列的人型CDR移植抗体,即序列编号19所示的氨基酸序列中选自第2号的Ile、3号的Val、14号的Thr、15号的Pro、50号的Gln、51号的Leu以及92号的Tyr中的至少一种以上氨基酸残基被取代为其它氨基酸残基的氨基酸序列

(c) VH含有序列编号18所示的氨基酸序列中选自第12号的Lys、13号的Lys、40号的Ala、41号的Pro、48号的Met、68号的Val、70号的Ile、74号的Thr、76号的Thr、82号的Glu、84号的Ser、87号的Arg以及95号的Tyr中的至少一种以上氨基酸残基被取代为其它氨基酸残基的氨基酸序列、并且VL含有序列编号19所示的氨基酸序列中选自第2号的Ile、3号的Val、14号的Thr、15号的Pro、50号的Gln、51号的Leu以及92号的Tyr中的至少一种以上氨基酸残基被取代为其它氨基酸残基的氨基酸序列的人型CDR移植抗体。

(13) 根据上述(9)或(10)所述的医药,其中,人型CDR移植抗体是以下(a)~(c)中的任一种人型CDR移植抗体:

(a) VH含有序列编号18或20所示的氨基酸序列的人型CDR移植抗体

(b) VL含有序列编号19、21、42、43、44、45、46、47、50或51所示的氨基酸序列的人型CDR移植抗体

(c) VH含有序列编号18或20所示的氨基酸序列、并且VL含有序列编号19、21、42、43、44、45、46、47、50或51所示的氨基酸序列的人型CDR移植抗体。

(14) 根据上述(13)所述的医药,其中,人型CDR移植抗体是以下(a)~(c)中的任一种人型CDR移植抗体:

(a) VH含有序列编号18所示氨基酸序列,并且VL含有序列编号21所示氨基酸序列的人型CDR移植抗体

(b) VH含有序列编号18所示氨基酸序列, 并且VL含有序列编号44所示氨基酸序列的人型CDR移植抗体

(c) VH含有序列编号18所示氨基酸序列, 并且VL含有序列编号50所示氨基酸序列的人型CDR移植抗体。

(15) 根据上述(9)或(10)所述的医药, 其中, 人型CDR移植抗体是以下(a)~(c)中的任一种人型CDR移植抗体:

(a) 转化体KM8037(FERM BP-8084)生产的人型CDR移植抗体

(b) 转化体KM8035(FERM BP-8082)生产的人型CDR移植抗体

(c) 转化体KM8036(FERM BP-8083)生产的人型CDR移植抗体。

(16) 根据上述(3)所述的医药, 其中, 抗体片段是选自Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、单链抗体(scFv)、二聚体可变区(V区)片段(diabody)、二硫化物稳定的V区片段(dsFv)以及含有CDR的肽的抗体片段。

(17) 一种关节炎的诊断药, 其中, 作为有效成分含有与FGF-8特异性结合的抗体。

(18) 根据上述(17)所述的诊断药, 其中, 与FGF-8特异性结合的抗体是多克隆抗体或单克隆抗体。

(19) 根据上述(18)所述的诊断药, 其中, 单克隆抗体是选自杂交瘤生产的抗体、人源化抗体以及它们的抗体片段中的抗体。

(20) 根据上述(19)所述的诊断药, 其中, 杂交瘤是杂交瘤KM1334(FERM BP-5451)。

(21) 根据上述(19)所述的诊断药, 其中, 人源化抗体是人型嵌合抗体或人型CDR移植抗体。

(22) 根据上述(21)所述的诊断药, 其中, 人型嵌合抗体是由与FGF-8特异性结合的单克隆抗体的VH以及VL、以及人抗体的CH以及CL构成的人型嵌合抗体。

(23) 根据上述(22)所述的诊断药, 其中, 人型嵌合抗体是以下

(a) ~ (c) 中任一种人型嵌合抗体:

(a) VH含有序列编号5所示氨基酸序列的人型嵌合抗体

(b) VL含有序列编号6所示氨基酸序列的人型嵌合抗体

(c) VH含有序列编号5所示氨基酸序列, 并且VL含有序列编号6所示氨基酸序列的人型嵌合抗体。

(24) 根据上述(23)所述的诊断药, 其中, 人型嵌合抗体是转化体KM3034 (FERM BP - 7836) 生产的人型嵌合抗体。

(25) 根据上述(21)所述的诊断药, 其中, 人型CDR移植抗体是含有与FGF - 8特异性结合的单克隆抗体的VH以及VL的CDR和人抗体的CH以及CL的人型CDR移植抗体。

(26) 根据上述(25)所述的诊断药, 其中, 人型CDR移植抗体是由与FGF - 8特异性结合的单克隆抗体的VH以及VL的CDR、人抗体的VH以及VL的FR、以及人抗体的CH以及CL构成的人型CDR移植抗体。

(27) 根据上述(25)或(26)所述的诊断药, 其中, 人型CDR移植抗体是以下(a) ~ (c)中任一种人型CDR移植抗体:

(a) VH的CDR1、CDR2以及CDR3分别含有序列编号7、8和9所示的氨基酸序列的人型CDR移植抗体

(b) VL的CDR1、CDR2以及CDR3分别含有序列编号10、11和12所示的氨基酸序列的人型CDR移植抗体

(c) VH的CDR1、CDR2以及CDR3分别含有序列编号7、8和9所示的氨基酸序列、并且VL的CDR1、CDR2以及CDR3分别含有序列编号10、11和12所示的氨基酸序列的人型CDR移植抗体。

(28) 根据上述(25)或(26)所述的诊断药, 其中, 人型CDR移植抗体是以下(a) ~ (c)中任一种人型CDR移植抗体:

(a) VH含有序列编号18所示的氨基酸序列中选自第12号的Lys、13号的Lys、40号的Ala、41号的Pro、48号的Met、68号的Val、70号的Ile、74号的Thr、76号的Thr、82号的Glu、84号的Ser、87号的Arg以及95号的Tyr中的至少一种以上氨基酸残基被取代为其它氨基酸残基的氨基酸序列的人型CDR移植抗体

(b) VL含有序列编号19所示的氨基酸序列中选自第2号的Ile、3号的Val、14号的Thr、15号的Pro、50号的Gln、51号的Leu以及92号的Tyr中的至少一种以上氨基酸残基被取代为其它氨基酸残基的氨基酸序列的人型CDR移植抗体

(c) VH含有序列编号18所示的氨基酸序列中选自第12号的Lys、13号的Lys、40号的Ala、41号的Pro、48号的Met、68号的Val、70号的Ile、74号的Thr、76号的Thr、82号的Glu、84号的Ser、87号的Arg以及95号的Tyr中的至少一种以上氨基酸残基被取代为其它氨基酸残基的氨基酸序列、并且VL含有序列编号19所示的氨基酸序列中选自第2号的Ile、3号的Val、14号的Thr、15号的Pro、50号的Gln、51号的Leu以及92号的Tyr中的至少一种以上氨基酸残基被取代为其它氨基酸残基的氨基酸序列的人型CDR移植抗体。

(29) 根据上述(25)或(26)所述的诊断药, 其中, 人型CDR移植抗体是以下(a)~(c)中的任一种人型CDR移植抗体:

(a) VH含有序列编号18或20所示的氨基酸序列的人型CDR移植抗体

(b) VL含有序列编号19、21、42、43、44、45、46、47、50或51所示的氨基酸序列的人型CDR移植抗体

(c) VH含有序列编号18或20所示的氨基酸序列、并且VL含有序列编号19、21、42、43、44、45、46、47、50或51所示的氨基酸序列的人型CDR移植抗体。

(30) 根据上述(29)所述的诊断药, 其中, 人型CDR移植抗体是以下(a)~(c)中的任一种人型CDR移植抗体:

(a) VH含有序列编号18所示氨基酸序列并且VL含有序列编号21所示氨基酸序列的人型CDR移植抗体

(b) VH含有序列编号18所示氨基酸序列并且VL含有序列编号44所示氨基酸序列的人型CDR移植抗体

(c) VH含有序列编号18所示氨基酸序列并且VL含有序列编号50所示氨基酸序列的人型CDR移植抗体。

(31) 根据上述(25)或(26)所述的诊断药, 其中, 人型CDR移植抗体是以下(a)~(c)中的任一种人型CDR移植抗体:

(a) 转化体KM8037(FERM BP-8084)生产的人型CDR移植抗体

(b) 转化体KM8035(FERM BP-8082)生产的人型CDR移植抗体

(c) 转化体KM8036(FERM BP-8083)生产的人型CDR移植抗体。

(32) 根据上述(19)所述的诊断药, 其中, 抗体片段是选自Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、单链抗体(scFv)、二聚体化V区片段(diabody)、二硫键稳定的V区片段(dsFv)以及含有CDR的肽的抗体片段。

(33) 一种关节炎的判定方法, 其特征在于, 利用与FGF-8特异性结合的抗体检测和/或定量试样中的FGF-8。

(34) 根据上述(33)所述的判定方法, 其中, 与FGF-8特异性结合的抗体是多克隆抗体或单克隆抗体。

(35) 根据上述(34)所述的判定方法, 其中, 单克隆抗体是选自杂交瘤生产的抗体、人源化抗体以及它们的抗体片段中的抗体。

(36) 根据上述(35)所述的判定方法, 其中, 杂交瘤是杂交瘤KM1334(FERM BP-5451)。

(37) 根据上述(35)所述的判定方法, 其中, 人源化抗体是人型嵌合抗体或人型CDR移植抗体。

(38) 根据上述(37)所述的判定方法, 其中, 人型嵌合抗体是由与FGF-8特异性结合的单克隆抗体的VH以及VL、以及人抗体的CH以及CL构成的人型嵌合抗体。

(39) 根据上述(38)所述的判定方法, 其中, 人型嵌合抗体是以下(a)~(c)中任一种人型嵌合抗体:

(a) VH含有序列编号5所示氨基酸序列的人型嵌合抗体

(b) VL含有序列编号6所示氨基酸序列的人型嵌合抗体

(c) VH含有序列编号5所示氨基酸序列, 并且VL含有序列编号6

所示氨基酸序列的人型嵌合抗体。

(40) 根据上述(39)所述的判定方法,其中,人型嵌合抗体是转化体KM3034(FERM BP-7836)生产的人型嵌合抗体。

(41) 根据上述(37)所述的判定方法,其中,人型CDR移植抗体是含有与FGF-8特异性结合的单克隆抗体的VH以及VL的CDR和人抗体的CH以及CL的人型CDR移植抗体。

(42) 根据上述(41)所述的判定方法,其中,人型CDR移植抗体是由与FGF-8特异性结合的单克隆抗体的VH以及VL的CDR、人抗体的VH以及VL的FR、以及人抗体的CH以及CL构成的人型CDR移植抗体。

(43) 根据上述(41)或(42)所述的判定方法,其中,人型CDR移植抗体是以下(a)~(c)中任一种人型CDR移植抗体:

(a) VH的CDR1、CDR2以及CDR3分别含有序列编号7、8和9所示的氨基酸序列的人型CDR移植抗体

(b) VL的CDR1、CDR2以及CDR3分别含有序列编号10、11和12所示的氨基酸序列的人型CDR移植抗体

(c) VH的CDR1、CDR2以及CDR3分别含有序列编号7、8和9所示的氨基酸序列、并且VL的CDR1、CDR2以及CDR3分别含有序列编号10、11和12所示的氨基酸序列的人型CDR移植抗体。

(44) 根据上述(41)或(42)所述的判定方法,其中,人型CDR移植抗体是以下(a)~(c)中任一种人型CDR移植抗体:

(a) VH含有序列编号18所示的氨基酸序列中选自第12号的Lys、13号的Lys、40号的Ala、41号的Pro、48号的Met、68号的Val、70号的Ile、74号的Thr、76号的Thr、82号的Glu、84号的Ser、87号的Arg以及95号的Tyr中的至少一种以上氨基酸残基被取代为其它氨基酸残基的氨基酸序列的人型CDR移植抗体

(b) VL含有序列编号19所示的氨基酸序列中选自第2号的Ile、3号的Val、14号的Thr、15号的Pro、50号的Gln、51号的Leu以及92号的Tyr中的至少一种以上氨基酸残基被取代为其它氨基酸残基的氨基酸序

## 列的人型CDR移植抗体

(c) VH含有序列编号18所示的氨基酸序列中选自第12号的Lys、13号的Lys、40号的Ala、41号的Pro、48号的Met、68号的Val、70号的Ile、74号的Thr、76号的Thr、82号的Glu、84号的Ser、87号的Arg以及95号的Tyr中的至少一种以上氨基酸残基被取代为其它氨基酸残基的氨基酸序列、并且VL含有序列编号19所示的氨基酸序列中选自第2号的Ile、3号的Val、14号的Thr、15号的Pro、50号的Gln、51号的Leu以及92号的Tyr中的至少一种以上氨基酸残基被取代为其它氨基酸残基的氨基酸序列的人型CDR移植抗体。

(45) 根据上述(41)或(42)所述的判定方法, 其中, 人型CDR移植抗体是以下(a)~(c)中的任一种人型CDR移植抗体:

(a) VH含有序列编号18或20所示的氨基酸序列的人型CDR移植抗体

(b) VL含有序列编号19、21、42、43、44、45、46、47、50或51所示的氨基酸序列的人型CDR移植抗体

(c) VH含有序列编号18或20所示的氨基酸序列、并且VL含有序列编号19、21、42、43、44、45、46、47、50或51所示的氨基酸序列的人型CDR移植抗体。

(46) 根据上述(45)所述的判定方法, 其中, 人型CDR移植抗体是以下(a)~(c)中的任一种人型CDR移植抗体:

(a) VH含有序列编号18所示氨基酸序列, 并且VL含有序列编号21所示氨基酸序列的人型CDR移植抗体

(b) VH含有序列编号18所示氨基酸序列, 并且VL含有序列编号44所示氨基酸序列的人型CDR移植抗体

(c) VH含有序列编号18所示氨基酸序列, 并且VL含有序列编号50所示氨基酸序列的人型CDR移植抗体。

(47) 根据上述(41)或(42)所述的判定方法, 其中, 人型CDR移植抗体是以下(a)~(c)中的任一种人型CDR移植抗体:

(a) 转化体KM8037(FERM BP-8084)生产的人型CDR移植抗

体

(b) 转化体KM8035 (FERM BP - 8082) 生产的人型CDR移植抗体

(c) 转化体KM8036 (FERM BP - 8083) 生产的人型CDR移植抗体。

(48) 根据(35)所述的判定方法, 其中, 抗体片段是选自Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、单链抗体(scFv)、二聚体可变区(V区)片段(diabody)、二硫化物稳定的V区片段(dsFv)以及含有CDR的肽的抗体片段。

(49) 一种关节破坏抑制剂, 其中, 含有与FGF-8特异性结合并且抑制FGF-8活性的抗体作为有效成分。

(50) 一种软骨保护剂, 其中, 含有与FGF-8特异性结合并且抑制FGF-8活性的抗体作为有效成分。

(51) 一种滑膜增殖抑制剂, 其中, 含有与FGF-8特异性结合并且抑制FGF-8活性的抗体作为有效成分。

本发明的关节炎的预防药或治疗药中所用的抗体, 只要是与FGF-8特异性结合, 并且抑制FGF-8活性的抗体(以下, 也称为“抗FGF-8中和抗体”)就可以, 例如可以举出对FGF-8具有中和活性的抗体以及该抗体的片段等。

本发明的关节炎的预防药或治疗药中所用的抗FGF-8中和抗体, 可以通过从与FGF-8特异性结合的抗体(以下也称为“抗FGF-8抗体”)中选择具有抑制FGF-8活性能力的抗体而获得。作为FGF-8的活性, 只要是FGF-8具有的生物活性, 可以是任意的活性, 具体可以举出促进小鼠乳腺癌细胞株SC-3(Nakamura N.et al., J Steroid Biochem., 27, 459-464, 1987)、小鼠纤维胚细胞株NIH/3T3(ATCC编号: CRL-1658)或人前列腺癌细胞株LNCaP(ATCC编号: CRL-1740)的增殖的活性; 促进滑膜细胞增殖的活性; 促进软骨细胞的细胞外基质的分解的活性; 促进源于软骨细胞的基质金属蛋白酶-3的产生的活性。

抗FGF-8抗体可以采用众所周知的手段(Harlow E. and Lane D., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory,

1988) 制备。

作为在本发明的关节炎的预防药或治疗药中使用的抗FGF-8中和抗体,可以使用多克隆抗体或单克隆抗体中任一种,但最好使用单克隆抗体。

作为单克隆抗体可以举出由杂交瘤产生的抗体、人源化抗体以及这些抗体的抗体片段。

在本发明的关节炎的预防药或治疗药中使用的、通过杂交瘤产生的抗FGF-8中和单克隆抗体,具体的可以通过下述方法制备。

即,作为抗原制备FGF-8蛋白质,从免疫该抗原的动物诱导具有抗原特异性的浆细胞,进而使其与骨髓瘤细胞融合制备杂交瘤,或培养该杂交瘤或给予动物该杂交瘤细胞使该动物腹水癌化,从该培养液或腹水中分离纯化与FGF-8特异性结合的抗体。从所得抗体中选择抑制FGF-8活性的抗体。作为这种抗FGF-8中和单克隆抗体,可以举出特开平9-271391中公开的属于小鼠IgG1亚类的杂交瘤KM1334(FREMBP-5451)产生的单克隆抗体KM1334。

作为本发明的关节炎的预防药或治疗药中使用的人源化抗体,可以举出利用基因重组技术改变上述抗FGF-8中和单克隆抗体的人源化抗体。该抗体为抗原性低,并且血液中半衰期延长的抗体,作为预防药或治疗药是优选的。

作为本发明的关节炎的预防药或治疗药中使用的人源化抗体,包括人型嵌合抗体以及人型互补决定区(complementarity determining region; 以下简称为CDR)移植抗体。

人型嵌合抗体是指由人以外的动物的抗体的重链可变区(以下将可变区称为V区,将重链可变区称为VH)以及轻链V区(以下称为VL)、人抗体的重链恒定区(以下将恒定区称为C区,将重链恒定区称为CH区)以及人抗体的轻链C区(以下称为CL)构成的抗体。作为人以外的动物有小鼠、大鼠、豚鼠、兔等,只要能够制作杂交瘤,可以使用任何动物。

作为本发明的关节炎的预防药或治疗药中使用的人型嵌合抗体,可

以通过以下方法制备，即，从对由产生抗FGF-8中和单克隆抗体的杂交瘤获得的编码该抗体的H链以及L链的cDNA中，取得编码VH以及VL的DNA，分别插入具有编码人抗体的CH以及CL的DNA的动物细胞用表达载体中，构建人型嵌合抗体表达载体，然后再导入动物细胞中，最后使其表达制备。

作为人型嵌合抗体的CH，只要是属于免疫球蛋白（hIg），则可以是任何CH，但是，优选hIgG类的CH，可以使用属于hIgG类的 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ 、 $\gamma 4$ 等的亚类中的任一种。另外，作为人型嵌合抗体的CL，只要是属于hIg就可以，可以使用 $\kappa$ 类或 $\lambda$ 类的CL。

作为与FGF-8特异性结合并且抑制FGF-8活性的人型嵌合抗体（以下也称为抗FGF-8中和嵌合抗体），可以举出由与FGF-8特异性结合并且抑制FGF-8活性的单克隆抗体的VH以及VL和人抗体的CH以及CL构成的抗FGF-8中和嵌合抗体，优选VH含有序列编号5所示的氨基酸序列的人型嵌合抗体、VL含有序列编号6所示的氨基酸序列的人型嵌合抗体以及VH含有序列编号5所示的氨基酸序列并且VL含有序列编号6所示的氨基酸序列的人型嵌合抗体。具体可以举出抗体的VH由序列编号5记载的氨基酸序列构成、CH由人 $\gamma 1$ 亚类的氨基酸序列构成、抗体的VL由序列编号6记载的氨基酸序列构成、CL由人 $\kappa$ 类的氨基酸序列构成的人型嵌合抗体KM3034以及KM3334。

生产人型嵌合抗体KM3034的转化体KM3034于平成13年12月26日以保藏号FERM BP-7836保藏于独立行政法人产业技术研究所专利生物保藏中心（〒305-8566 日本国茨城县筑波市东1丁目1番地中央第6）。

人型CDR移植抗体是指在人抗体上以人以外的动物抗体的CDR序列分别置换人以外的动物抗体的VH以及VL的CDR的抗体。

本发明的关节炎的预防药或治疗药中使用的人型CDR移植抗体，可以通过以下方法制备，即，构建对以人以外的动物抗FGF-8中和抗体的VH以及VL的CDR序列分别置换任意的人抗体的VH以及VL的CDR序列的V区进行编码的DNA，分别插入具有编码人抗体的CH以及人抗体的CL的基因的动物细胞用表达载体中，构建人型CDR移植抗体表达

载体，然后导入动物细胞中，最后使其表达而制备。

作为人型CDR移植抗体的CH，只要是属于hIg就可以，但是优选hIgG类的CH，可以使用属于hIgG类的 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ 、 $\gamma 4$ 等的亚类中的任一种。另外，作为人型CDR移植抗体的CL，只要是属于hIg就可以，可以使用 $\kappa$ 类或 $\lambda$ 类的CL。

作为与FGF-8特异性结合，并且抑制FGF-8活性的人型CDR移植抗体（以下也称为“抗FGF-8中和CDR移植抗体”），可以举出含有与FGF-8特异性结合并且抑制FGF-8活性的单克隆抗体的VH以及VL的CDR和人抗体的CH以及CL的CDR移植抗体、由与FGF-8特异性结合并且抑制FGF-8活性的单克隆抗体的VH以及VL的CDR、人抗体的VH以及VL的框架区（以下简称为FR）以及人抗体的CH以及CL构成的人型CDR移植抗体。优选（a）VH的CDR1、CDR2以及CDR3分别含有序列编号7、8和9所示的氨基酸序列的人型CDR移植抗体，（b）VL的CDR1、CDR2以及CDR3分别含有序列编号10、11和12所示的氨基酸序列的人型CDR移植抗体，（c）VH的CDR1、CDR2以及CDR3分别含有序列编号7、8和9所示的氨基酸序列、并且VL的CDR1、CDR2以及CDR3分别含有序列编号10、11和12所示的氨基酸序列的人型CDR移植抗体，更优选（a）VH含有序列编号18所示氨基酸序列的人型CDR移植抗体，（b）VL含有序列编号19所示氨基酸序列的人型CDR移植抗体，（c）VH含有序列编号18所示氨基酸序列并且VL含有序列编号19所示氨基酸序列的人型CDR移植抗体。进一步优选（a）VH含有序列编号18所示的氨基酸序列中选自第12号的Lys、13号的Lys、40号的Ala、41号的Pro、48号的Met、68号的Val、70号的Ile、74号的Thr、76号的Thr、82号的Glu、84号的Ser、87号的Arg以及95号的Tyr中的至少一种以上的氨基酸残基被取代为其它氨基酸残基的氨基酸序列，（b）VL含有序列编号19所示的氨基酸序列中选自第2号的Ile、3号的Val、14号的Thr、15号的Pro、50号的Gln、51号的Leu以及92号的Tyr中的至少一种以上的氨基酸残基被取代为其它氨基酸残基的氨基酸序列，（c）VH含有序列编号18所示的氨基酸序列中选自第12号的Lys、13号的Lys、40号的Ala、41

号的Pro、48号的Met、68号的Val、70号的Ile、74号的Thr、76号的Thr、82号的Glu、84号的Ser、87号的Arg以及95号的Tyr中的至少一种以上的氨基酸残基被取代为其它氨基酸残基的氨基酸序列、并且VL含有序列编号19所示的氨基酸序列中选自第2号的Ile、3号的Val、14号的Thr、15号的Pro、50号的Gln、51号的Leu以及92号的Tyr中的至少一种以上氨基酸残基被取代为其它氨基酸残基的氨基酸序列的人型CDR移植抗体。具体地说，可以举出（a）VH含有序列编号18或20所示的氨基酸序列的人型CDR移植抗体，（b）VL含有序列编号19、21、42、43、44、45、46、47、50或51所示的氨基酸序列的人型CDR移植抗体，（c）VH含有序列编号18或20所示的氨基酸序列、并且VL含有序列编号19、21、42、43、44、45、46、47、50或51所示的氨基酸序列的人型CDR移植抗体，优选（a）VH含有序列编号18所示氨基酸序列并且VL含有序列编号21所示氨基酸序列的人型CDR移植抗体，（b）VH含有序列编号18所示氨基酸序列并且VL含有序列编号44所示氨基酸序列的人型CDR移植抗体，（c）VH含有序列编号18所示氨基酸序列并且VL含有序列编号50所示氨基酸序列的人型CDR移植抗体。作为这种人型CDR移植抗体，可以举出VH由序列编号18记载的氨基酸序列并且CH由人 $\gamma$ 1亚类的氨基酸序列构成、VL由序列编号21记载的氨基酸序列并且CL由人 $\kappa$ 类的氨基酸序列构成的人型CDR移植抗体HVOLV6、HVOLV6/CHO；VH由序列编号18记载的氨基酸序列并且CH由人 $\gamma$ 1亚类的氨基酸序列构成、VL由序列编号44记载的氨基酸序列并且CL由人 $\kappa$ 类的氨基酸序列构成的人型CDR移植抗体HVOLV3-1/CHO；VH由序列编号18记载的氨基酸序列并且CH由人 $\gamma$ 1亚类的氨基酸序列构成、VL由序列编号50记载的氨基酸序列并且CL由人 $\kappa$ 类的氨基酸序列构成的人型CDR移植抗体HVOLV4-1/CHO。

生产人型CDR移植抗体HVOLV6的转化体KM8037于平成14年6月20日以保藏号FERM BP-8084保藏于独立行政法人产业技术研究所专利生物保藏中心（〒305-8566 日本国茨城县筑波市东1丁目1番地中央第6）。生产人型CDR移植抗体HVOLV3-1的转化体KM8036，于平成

14年6月20日以保藏号FERM BP - 8083保藏于独立行政法人产业技术研究所专利生物保藏中心(〒305 - 8566 日本国茨城县筑波市东1丁目1番地中央第6)。生产人型CDR移植抗体HVOLV4 - 3的转化体KM8035, 在平成14年6月20日作为FERM BP - 8082保藏在独立行政法人产业技术综合研究所专利生物保藏中心(〒305 - 8566 日本国茨城县筑波市东1丁目1番地中央第6)。

在本发明的关节炎的预防药或治疗药中使用的抗FGF - 8中和抗体中也包括抗体片段。抗体片段包括作为与FGF - 8特异性结合并且抑制FGF - 8活性的抗体片段的Fab (fragment of antigen binding的简称)、 $F(ab')_2$ 、Fab'、单链抗体(single chain Fv, 以下简称为scFv)、二聚体V区片段(diabody)、二硫键稳定化抗体(disulfide stabilized Fv, 以下简称为dsFv)以及含有CDR的肽。

Fab是由H链的N末端侧大致一半与整个L链构成的、分子量约5万的具有抗原结合活性的片段, 他是通过木瓜蛋白酶对在IgG的铰链区交联两根H链的两个二硫键结合的上部肽部分进行分解而得到。

$F(ab')_2$ 是分子量约10万的具有抗原结合活性的抗体片段, 在通过蛋白质分解酶胃蛋白酶处理IgG的铰链区的两个二硫键结合的下部而得到的片段中(在H链的234号氨基酸残基处切断)比Fab借助铰链区的二硫键结合的片段稍大。

Fab'是切断上述 $F(ab')_2$ 的铰链间的二硫键的分子量约5万的、具有抗原结合活性的片段。

ScFv是利用适当的肽接头(以下称为P)对一条VH以及一条VL进行连接的VH - P - VL或VL - P - VH多肽。在本发明的关节炎的预防药或治疗药中使用的ScFv所含有的VH以及VL只要是抗FGF - 8中和单克隆抗体, 可以是任意的VH和VL。

diabody(双抗体)是由抗原结合特异性相同或不同的scFv形成二聚体的抗体片段, 对相同的抗原具有二价的抗原结合活性或者对于不同的抗原分别具有特异的抗原结合活性。

dsFv是指通过二硫键使VH以及VL中的各1个氨基酸残基被置换为

半胱氨酸残基的多肽结合的片段。置换为半胱氨酸残基的氨基酸残基，可以通过Reiter等提出的方法（Reiter Y. et al., Protein Eng., 7 697-704, 1994），根据抗体的立体结构预测进行选择。在本发明的关节炎的预防药或治疗药中使用的dsFv所含有的VH或VL只要是抗FGF-8中和单克隆抗体，可以是任意的VH和VL。

在本发明的关节炎的预防药或治疗药中使用的含有CDR的肽，其构成中含有抗FGF-8中和抗体的VH或VL的CDR的至少一个区以上。含有多个CDR的肽，可以直接制备或通过适当的肽接头结合制备。

以下对本发明中使用的抗FGF-8中和抗体的具体制作方法和活性评价方法、含有该抗体的关节炎的预防药或治疗药、抗FGF-8抗体的关节炎的诊断药、使用抗FGF-8抗体的关节炎的判定方法进行说明。

### 1.抗FGF-8中和抗体（多克隆抗体、单克隆抗体）的制作方法

#### （1）抗原的制备

作为制备抗FGF-8中和抗体所必需的抗原，可以举出产生FGF-8的细胞或细胞组分、或FGF蛋白质、该蛋白质的部分片段、具有该蛋白质的氨基酸序列的部分序列的肽等。

FGF-8蛋白质以及该蛋白质的部分片段可以通过以下方式制备，即，制备将编码FGF-8的全长或其部分片段DNA（Tanaka A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 8928-8932, 1992, Tanaka A. et al., FEBS Lett., 363, 226-230, 1996）插入适当的载体的启动子下游的重组载体，将其导入宿主细胞获得FGF-8表达细胞，然后通过适当的培养基中培养该FGF-8表达细胞，从而在细胞内或培养上清液中直接产生或作为融合蛋白而产生。另外，具有FGF-8蛋白质的部分序列的肽，可以利用肽合成仪制备。

编码FGF-8的全长或其部分片段的DNA，可以通过以表达FGF-8的SC-3等的细胞制备的cDNA作为模板的聚合酶链式反应[Polymerase Chain Reaction, 以下简称为PCR; Sambrook J., et al., Molecular Cloning 3<sup>rd</sup> edition, Cold Spring Harbor Laboratory, 2001, Ausubel F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley&Sons,

1987-2001 (以下记为**Current Protocols in Molecular Biology**) ]制备。

作为宿主,只要是能够表达目的基因的都可以,例如细菌、酵母、动物细胞、昆虫细胞等。作为细菌可以举出大肠杆菌(*Escherichia coli*)、枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)等的大肠杆菌属,芽孢杆菌属的细菌。作为酵母可以举出酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、*Schizosaccharomyces pombe*等。作为动物细胞可以举出人的细胞,即Namalwa细胞、猴的细胞即COS细胞、中国仓鼠细胞即CHO细胞等。作为昆虫细胞可以举出Sf9、Sf21(ファーミンジエン公司生产)、High Five(インビトロジエン公司生产)等。

作为导入编码FGF-8的全长或其部分片段DNA的载体,可以只要是能够重组该DNA并在宿主细胞内表达的载体,可以使用任何载体。

以细菌例如大肠杆菌(*Escherichia coli*)作为宿主使用时的表达载体,优选由启动子、核糖体结合序列、编码FGF-8的全长或其部分片段DNA、复制终结序列、基于不同情况的启动子控制序列构成的载体,例如可以举出市售的pGEX-2T(Amersham Biosciences公司生产)、pET17b(Novagen公司生产)等。

作为向细菌导入重组载体的方法,只要是在细菌中导入DNA的方法,可以使用任何方法,例如使用钙离子的方法(Cohen S. N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 69, 2110-2114, 1972)、原生质体法(特开昭63-248394)等方法。

在作为宿主细胞使用酵母时,作为表达载体例如可以使用YEp13(ATCC37115)、YEp24(ATCC37051)、YCp50(ATCC37419)等。

作为向酵母导入重组载体的方法,只要是将DNA导入酵母的方法可以使用任意的的方法,例如电穿孔法(Becker D. M. and Guarente L., Methods. Enzymol., 194, 182-187, 1991)、原生质体法(Hinnen A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1929-1933, 1978)、醋酸锂法(Ito H. et., J. Bacteriol., 153, 163-168, 1983)等。

在作为宿主细胞使用动物细胞时,作为表达载体例如可以使用pAGE107(特开平3-22979; Miyaji H. et al., Cytotechnology, 3, 133-140,

1990)、pAGE103(Mizukami T. and Itoh S., J. Biochem., 101, 1307-1310, 1987)等。

作为启动子只要是在动物细胞中能够表达的都可以使用,例如可以举出巨细胞病毒(CMV)的IE(immediate early)基因的启动子、SV40或金属硫因的启动子等。另外,也可以将入CMV的IE基因的增强子与启动子一起使用。

作为向动物细胞导入重组载体的方法,只要是将DNA导入动物细胞的方法都可以使用,例如电穿孔法(Miyaji H. et al., Cytotechnology, 3, 133-140, 1990)、磷酸钙法(特开平2-227075)、脂[质]转[染]法(Felgner P. L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413-7417, 1987)等。

在作为宿主使用昆虫细胞时,例如可以通过Current Protocols in Molecular Biology, O' Reilly et al., Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual, Oxford University Press, 1994等记载的方法表达蛋白质。即,将以下叙述的重组基因导入载体与(昆虫)杆状病毒(Baculovirus)共同导入昆虫细胞,在昆虫细胞培养上清液中获得重组病毒,然后使昆虫感染重组病毒,从而获得蛋白质表达昆虫细胞。

作为基因导入载体,例如可以使用pVL1392、pVL1393(都是ファーマーミンジエン社制)、pBlueBac4.5(インビトロジエン公司生产)等。

作为Baculovirus,例如可以使用作为感染射干科昆虫病毒的Autographa californica nuclear polyhedrosis virus等。

作为用于制备重组病毒的、向昆虫细胞共同导入上述重组基因导入载体和上述Baculovirus的方法,例如可以使用磷酸钙法(特开平2-227075)、脂[质]转[染]法(Felgner P. L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413-7417, 1987)等。

另外,也可以通过使用ファーマーミンジエン公司生产的バキユロゴールド引酵物试剂盒(starter kit)等制作重组杆状病毒,然后使该重组病毒感染前述的Sf9、Sf21或High Five等的昆虫细胞,从而产生蛋白质(Bio/Technology, 6, 47, 1988)。

作为基因的表达方法,除了只让FGF-8蛋白质在细胞内表达外,

也开发了分泌产生、融合蛋白质表达等，可以使用任意方法。例如可以根据<<分子克隆>>第3版记载的方法进行。

将通过上述方式得到的转化体在培养基中培养，使在培养物中蓄积产生FGF-8蛋白质，然后从培养物中提取FGF-8蛋白质，从而可以将FGF-8蛋白质的全长或部分片段直接作为FGF-8蛋白质或作为融合蛋白而制备。

在培养基中培养转化体的方法，可以根据在宿主培养中通常所用的方法进行。

作为以大肠菌或酵母等的微生物为宿主对得到的转化体进行培养的培养基，只要是含有微生物生长所需的碳源、氮源、无机盐类并且能够有效进行转化体的培养的培养基，可以使用天然培养基、合成培养基中的任一种（分子克隆第3版）。培养是在通常的振荡培养或深部通气搅拌培养等的好氧条件下、15~40℃培养16~96小时。在培养期间将pH保持在3.0~9.0。pH的调节可以使用无机或有机酸、碱溶液、尿素、碳酸钙、氨等进行。在培养中根据需要也可以在培养基中添加氨苄青霉素或四环素等抗生素。

作为以动物细胞为宿主对得到的转化体进行培养的培养基，可以使用通常所用的RPMI 1640培养基、Eagle的MEM培养基或者在这些培养基中添加胎牛血清（以下简称为FBS）等的培养基等。通常在5% CO<sub>2</sub>存在下、35~37℃，培养3~7天，在培养中根据需要也可以在培养基中添加卡那霉素、青霉素等抗生素。

作为以昆虫细胞为宿主对得到的转化体进行培养的培养基，可以使用通常所用的TNM-FH培养基（ファーミンジエン公司生产）、SF900IISFM（インピトロジエン公司生产）、EX-CELL400、EX-CELL405[都是JRH Biosciences公司生产]等。培养可以在25~30℃培养1~4天，在培养过程中也可以根据需要在培养基中添加庆大霉素等抗生素。

在上述的动物细胞以及昆虫细胞的培养中，可能的话，由于很容易直接将FGF-8的全长或部分片段作为FGF-8蛋白，或进行融合蛋白的

纯化，因此优选使用不添加血清的培养基。

在使FGF-8的全长或者部分片段直接或作为融合蛋白在宿主细胞内蓄积时，培养结束后，对细胞进行离心，悬浮于水系缓冲液中后，通过超声波法、法式冲压法等对细胞进行破碎，从该离心上清液中回收该蛋白质。

另外，在细胞内形成不溶体时，通过蛋白质变性剂使不溶体可溶化后，在不含有蛋白质变性剂的溶液或蛋白质变性剂的浓度稀释成蛋白质不变性的程度的溶液中，进行稀释或透析，可以形成蛋白质的立体结构。

在FGF-8蛋白质的全长或部分片段、或者这些蛋白质的融合蛋白是在细胞外分泌时，可以从培养上清液中回收表达蛋白。

对于分离纯化，可以单独或组合使用溶剂萃取、基于有机溶剂的分级沉淀、盐析、透析、离心、超滤、离子交换色谱、凝胶过滤色谱、疏水性色谱、亲水性色谱、逆相色谱、结晶、电泳等的分离操作来进行。

具有FGF-8的氨基酸序列的部分序列的肽，可以通过Fmoc（苄基甲基氧基羰基）法、tBoc（叔丁基氧基羰基）法等化学合成法制备。另外，也可以使用Advanced ChemTech公司、Applied Biosystems公司、Protein Technologies公司、岛津制作所等的肽合成机制备。

## （2）动物的免疫与抗体产生细胞的制备

以上述得到的该蛋白质作为抗原对动物进行免疫。作为免疫的方法，可以直接在动物的皮下、静脉或腹腔内给予抗原，但是优选使抗原性高的载体蛋白质与抗原结合而给予，或者将抗原与适当的佐剂一起给予。

作为载体蛋白质，可以举出匙孔X血蓝蛋白（Keyhole limpet hemocyanin）、牛血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白等，作为佐剂可以举出弗罗因德完全佐剂（Complete Freund's Adjuvant）、氢氧化铝凝胶与百日咳菌疫苗等。

作为免疫动物，可以举出兔、山羊、小鼠、大鼠、仓鼠等的非人哺乳动物。

抗原的给予，在第一次给予后，每1~2周给予3~10次。抗原的给

予量优选每只动物50~100 $\mu$ g。在各给予后,在第3~7日从免疫动物的眼底静脉丛或尾静脉采血,对于与该血清的抗原的特异性结合性,可以通过以下所示的酶免疫测定法[酶免疫测定法 第3版 医学书院 1987年 antibodies a laboratory manual( Chapter 14)、Goding J.W., Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 1996(以下简称单克隆抗体)]等确认。

酶免疫测定法可以通过以下方式进行。

将抗原蛋白或表达抗原蛋白的细胞等涂层在板上,将从免疫动物采集的血清作为第一抗体使其反应。在第一抗体反应后,对板进行清洗添加第二抗体。反应后,进行对应于标记第二抗体的物质的检测反应,测定抗体效价。

所谓第二抗体,是指用过氧化物酶等酶或生物素等对可以识别第一抗体的抗体进行标记的物质。具体的说,若免疫动物使用小鼠,则作为第二抗体使用能够识别小鼠免疫球蛋白的抗体。

另外,将该血清显示充分抗体效价的非人哺乳动物作为抗体产生细胞的供给源。

在抗原最终给予后3~7日,根据众所周知的方法(antibodies a laboratory manual)从免疫动物摘出抗体产生细胞,使抗体产生细胞与骨髓瘤细胞融合。

多克隆抗体可以通过对该血清进行分离纯化而制备。该多克隆抗体是否具有抑制FGF-8活性的中和活性,可以通过以下1.(4)中所述的细胞增殖抑制分析法进行检测。

单克隆抗体可以通过使该抗体产生细胞与源于非人哺乳动物的骨髓瘤细胞融合制作杂交瘤,对该杂交瘤进行培养或给予动物后使该细胞腹水癌化,对该培养液或腹水进行分离或纯化而制备。

抗体产生细胞是从给予抗原后的非人哺乳动物脾细胞、淋巴结、末梢血液等中采集的细胞。

### (3) 骨髓瘤细胞的制备

作为骨髓瘤细胞可以使用从小鼠中获得的株化细胞即8-氮杂鸟嘌呤

吟耐性小鼠 (BALB/c由来) 骨髓瘤细胞株 P3 - X63Ag8 - U1 (Kohler G and Milstein C, Eur. J. Immunol., 6 511 - 519, 1976)、SP2/0 - Ag14 (Shulman M. et al., Nature, 276 269 - 270, 1998)、P3 - X63 - Ag8653 (Kearney J. F. et al., J. Immunol., 123 1548-1550, 1979)、P3 - X63 - Ag8 (Kohler G and Milstein C, Nature, 256 495-479, 1975) 等, 只要是在体外 (in vitro) 能够增殖的骨髓瘤细胞, 可以是任意的骨髓瘤细胞。对于这些细胞株的培养以及传代可以根据众所周知的方法 (antibodies a laboratory manual), 在细胞融合前确保  $2 \times 10^7$  个以上的细胞数。

#### (4) 细胞融合与单克隆抗体的选择

对上述得到的抗体产生细胞与骨髓瘤细胞进行清洗后, 加入聚乙二醇1000 (PEG - 1000) 等细胞凝集性溶剂, 使细胞融合, 悬浮于培养基中。在细胞的清洗中可以使用 MEM 培养基或 PBS (1.83g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、0.21g/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、7.65g/L NaCl, pH7.2) 等。另外, 作为使融合细胞悬浮的培养基, 使用 HAT 培养基 [在正常培养基 (添加 1.5mmol/L 白蛋白、50 $\mu\text{mol/L}$  2 - 巯基乙醇、10 $\mu\text{g/mL}$  庆大霉素以及 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基) 中加入 100 $\mu\text{mol/L}$  贺克沙霉素、15 $\mu\text{mol/L}$  胸腺嘧啶脱氧核苷以及 0.4 $\mu\text{mol/L}$  氨基蝶呤的培养基], 以便可以选择性地只获得目的融合蛋白。

在培养后, 取部分上清液, 通过下述的酶免疫测定法, 选择与抗原蛋白质反应而非抗原蛋白质不反应的样品。然后, 通过限界稀释法进行克隆, 通过酶免疫测定法选择稳定并且抗体效价高的杂交瘤株作为与 FGF - 8 特异性结合的单克隆抗体产生杂交瘤株。

酶免疫测定法通过与 1.(2) 中所述方法相同的方法进行, 作为第一抗体使用杂交瘤培养上清液或通过下述方法得到的纯化抗体。

单克隆抗体与 FGF - 8 的特异性结合也可以根据表面胞质团共鸣 (Karlsson R et al., J. Immunol. Methods, 145, 229-240, 1991) 来评价。

作为抗 FGF - 8 单克隆抗体的具体例子, 可以举出特开平 9 - 271391 中记载的属于小鼠 IgG1 亚类的杂交瘤 KM1334 (FREM BP - 5451) 产生的单克隆抗体 KM1334。

通过在靶细胞中使用小鼠乳癌细胞株SC-3 (Nakamura N. et al., *J Steroid Biochem.*, 27, 495-464, 1987)、小鼠纤维芽细胞株NIH/3TS (ATCC编号: CRL-1658)、或者人前列腺癌细胞株LNCap (ATCC编号: CRL-1740)的增殖抑制分析法来检测由上述选择的杂交瘤产生的抗FGF-8单克隆抗体是否抑制FGF-8活性。作为方法,在利用含有FGF-8(1~100ng/mL或睾丸素的培养基培养靶细胞时,以培养上清液或根据下述2.(5)纯化的抗FGF-8单克隆抗体的最终浓度变为0.001~100 $\mu$ g/mL的方式进行阶段稀释并添加在培养基中。在培养24~72小时后,利用MTT[3-(4,5-二甲基-2-噻唑-2-基)-2,5-二苯基-2H-四唑 溴化物]溶液、セルカウンテイク试剂盒或WST-1试剂盒等测定活细胞数。与不添加抗FGF-8单克隆抗体的情况相比,在活细胞数减少与抗FGF-8单克隆抗体有浓度依赖性时,可以确认该抗FGF-8单克隆抗体是抑制FGF-8活性的抗FGF-8中和抗体。

另外,也可以利用以Bolton-Hunter法(Bolton A. E. and Hunter W. M., *Biochem. J.*, 133, 529-539, 1973)等<sup>125</sup>I标记的FGF-8与上述细胞株结合系统,测定抗FGF-8单克隆抗体向FGF-8细胞表面上的受体结合抑制活性。

上述单克隆抗体KM1334是具有抑制FGF-8活性的抗FGF-8中和抗体,优选作为关节炎的预防药或治疗药。

#### (5) 单克隆抗体的制备

单克隆抗体可以通过以下方式进行制备,即,在腹腔内给予培养杂交瘤细胞所得的培养液或降植烷(Pristane, 2,6,10,14-四甲基十五烷)0.5mL,饲养2周,在如此所得的8~10周龄的小鼠或裸鼠腹腔给予产生单克隆抗体的杂交瘤细胞使其腹水癌化,然后从腹水中分离纯化,从而制备单克隆抗体。

作为分离、纯化单克隆抗体的方法,可以举出离心、基于40~50%饱和硫酸铵的盐析、辛酸沉淀法、利用DEAE-葡聚糖柱、阴离子交换柱、蛋白质A或G-柱或凝胶过滤柱等的色谱层析法等,这些方法可以单独使用也可以组合使用。根据该方法可以回收IgG或IgM级分而获得

纯化单克隆抗体。

纯化的单克隆抗体的亚类的确定，可以利用单克隆抗体的类型试剂盒进行确定。蛋白质量可以通过劳里（Lowry）法或通过280nm的吸光度计算出。

所谓抗体的亚类是指在一类内的不同类型，对于小鼠可以举出IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3，对于人可以举出IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。特别是小鼠IgG3、IgG2a、人IgG1类型具有补体依存性细胞损伤活性以及抗体依存性细胞损伤活性，在治疗应用上是有效的。

## 2.抗FGF-8中和人源化抗体的制作方法

### (1) 人源化抗体表达用载体的构建

为了从人以外的动物的抗体制作人源化抗体，要构建必要的人源化抗体表达用载体。所谓人源化抗体表达用载体是指导入编码人抗体的C区，即CH以及CL的基因的动物细胞用表达载体，可以通过在动物细胞用表达载体上分别插入编码人抗体的CH以及CL的基因来构建。

人抗体的C区可以是任意的人抗体的CH以及CL，例如可以举出人抗体的 $\gamma$ 1亚类的CH、 $\gamma$ 4亚类的CH以及 $\kappa$ 类的CL等。作为编码人抗体的CH以及CL的DNA，可以使用由外显子和内含子构成的染色体DNA，另外也可以使用cDNA。作为动物细胞用表达载体，只要是能够导入编码人抗体C区的基因并且表达的载体，可以使用任意载体。

例如可以举出pAGE107（特开平3-22979；Miyaji H. et al., Cytotechnology, 3, 133-140, 1990）、pAGE103（Mizukami T. and Itoh S., J. Biochem., 101, 1307-1310, 1987）、pHSG274（Brady G. et al., Gene, 27, 223-232, 1984）、pKCR（O'Hare K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 78, 1527-1531, 1981）、pSG1 $\beta$ d2-4（Miyaji H. et al., Cytotechnology, 4, 173-180, 1990）等。作为动物细胞用表达载体中所用的启动子和增强子，可以举出SV40的初期启动子和增强子（Mizukami T. and Itoh S., J. Biochem., 101, 1307-1310, 1987）、莫洛尼小鼠白血病病毒的LTR启动子和增强子（Kuwana Y. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 149, 960-968, 1987）、以及免疫球蛋白H链的启动子（Mason J. O. et al., Cell,

41, 479-487, 1985) 和增强子 (Gillies S. D. et al., Cell, 33, 717-728, 1983) 等。

人源化抗体表达用载体可以使用抗体H链、L链存在各个载体上的类型或存在同一载体上的类型(串连型)中任一类型,但是从人源化抗体表达载体的构建的容易程度、向动物细胞导入的容易程度、在动物细胞内的抗体H链和L链的表达量的平衡的观点来看,串连型的人源化抗体表达用载体是优选的(Shitara K. et al., J Immunol. Methods, 167, 271-278, 1994)。作为串连型的人源化抗体表达用载体可以举出pKANTEK93(WO97/10354)、pEE18(Bentley K. J. et al., Hybridoma, 17, 559-567, 1998)等。

构建的人源化抗体表达用载体可以在人型嵌合抗体以及人型CDR移植抗体在动物细胞内表达中使用。

(2) 编码人以外的动物的抗FGF-8中和抗体的VH以及VL的DNA的获得

编码人以外的动物的抗FGF-8中和抗体、例如小鼠抗FGF-8中和单克隆抗体的VH以及VL的DNA可以通过以下方式获得。

从产生小鼠抗FGF-8中和单克隆抗体的细胞、例如产生小鼠FGF-8中和抗体的杂交瘤等提取mRNA,合成cDNA。将合成的cDNA插入噬菌体或质粒等的载体中,制作cDNA文库。作为探针使用小鼠抗体的C区部分或V区部分,分别从该文库中分离具有编码VH的cDNA的重组噬菌体或重组质粒以及具有编码VL的cDNA的重组噬菌体或重组质粒。

对重组噬菌体或重组质粒上的VH以及VL的全部碱基序列进行确定,从而由碱基序列推定VH以及VL的全部氨基酸序列。

作为人以外的动物,可以举出小鼠、大鼠、仓鼠、兔等,只要能够制作杂交瘤可以使用任意动物。作为从杂交瘤中制备全RNA的方法,可以举出硫氰酸胍-三氟乙酸法(Okayama H. et al., Methods Enzymol., 154, 3-28, 1987),另外作为从全RNA制备mRNA的方法,可以举出低聚(dT)固定化纤维素柱法(《分子克隆》,第3版)等。另外,作为从杂交瘤制备mRNA的试剂盒,可以举出FastTrack mRNA分离试剂盒

(インビトロジエン公司生产)、QuickPrep mRNA分离试剂盒(Amersha Biosciences公司生产)等。

作为cDNA的合成以及cDNA文库的制作方法可以举出通常的方法(《分子克隆》,第3版;Current Protocols in Molecular Biology)、或者使用市售的试剂盒例如cDNA合成用SuperScript Choice System(SuperScript Choice System for cDNA Synthesis,インビトロジエン公司生产)或ZAP-cDNA合成试剂盒(ストラタジ-ン公司生产)、TimeSaver cDNA合成试剂盒(Amersha Biosciences公司生产)的方法等。

在cDNA文库的制作时导入将从杂交瘤提取的mRNA作为铸模合成的cDNA的载体,只要是导入该cDNA的载体,可以使用任意载体。例如可以使用ZAP Express(ストラタジ-ン公司生产)、pBluescript IISK(±)(ストラタジ-ン公司生产)、λZAPII(ストラタジ-ン公司生产)、λgt10(ストラタジ-ン公司生产)、λgt11(ストラタジ-ン公司生产)、Lambda BlueMid(Clontech公司生产)、λExcell(Amersha Biosciences公司生产)、pcD2(Okayama H. and Berg P., Mol. Cell. Biol., 3, 280-289, 1983)以及pUC18(Yanisch-Perron C. et al., Gene, 33, 103-119, 1985)等的噬菌体或质粒载体。

作为导入通过噬菌体或质粒载体构建的cDNA文库的大肠菌,只要是导入该cDNA文库并且能够表达以及维持的大肠菌,可以任意使用。例如可以使用XL1-Blue MRF'(ストラタジ-ン公司生产)、C600(Appleyard R.K.Genetics, 39, 440-452, 1954)、Y1088(Yong R.A.and Davis R.,Science,222,778-782,1983)、Y1090(Yong R.A.and Davis R.,Science,222,778-782,1983)、NM522(Gough J.A.and Murray N.E.,J.Mol.Biol.,166,1-19,1983)、K802(Wood W.B.,J.Mol.Biol., 16, 118-133, 1966)和JM(Yanisch-Perron C. et al.,Gene,33,103-119,1985)等。

作为编码来自cDNA文库的人以外的动物的抗FGF-8中和抗体的VH以及VL的cDNA克隆的选择法,可以使用从用同位素或荧光标记的

探针的菌落杂交法或噬斑杂交法（分子克隆 第3版）选择的方法。而制备引物，将由mRNA合成的cDNA或cDNA文库作为模板，通过PCR也可以制备编码VH以及VL的cDNA。

通过上述方法选择的cDNA的碱基序列可以用被克隆到适当载体的该cDNA，进行双脱氧反应（Sanger F.et al., Proc.Natl.Acad.USA 74,5463-5467,1977），通过使用ABI377（Applied Biosystem公司生产）等DNA测序仪进行解析决定。

（3）人以外的动物的抗FGF-8中和抗体的VH以及VL的氨基酸序列解析和CDR的氨基酸序列鉴定

通过对从2.（2）获得的、决定的cDNA的碱基序列推定该cDNA编码的VH和VL的全氨基酸序列，与已知的抗体的VH和VL的全氨基酸序列（Sequences of Proteins of Immunological Interest,US Dept.Health and Human Services,1991,以下记为“Sequences of Proteins of Immunological Interest”）进行比较，可以确认获得的cDNA是否编码含有分泌信号序列的抗体的VH和VL的完全氨基酸序列。有关含有分泌信号序列的抗体的VH和VL的完全氨基酸序列通过与已知的抗体的VH和VL的全氨基酸序列（Sequences of Proteins of Immunological Interest）进行比较，可以推定分泌的信号序列的长度和N末端氨基酸序列，进一步了解他们属于的亚类。

另外，利用BLAST（Altschul S.F.et al.,J.Mol.Biol.,215,403-410,1990）等同源性检索程序对任意的数据库，例如SWISS-PROT和PIR-Protein等进行获得的VH和VL的完全氨基酸序列的同源性检索，可以研究序列是否是新序列。

形成抗体的抗原结合部位的VH和VL是由序列相对保守的4个FR和连接他们的序列富于变化的3个CDR（CDR1、CDR2、CDR3）构成的（Sequences of Proteins of Immunological Interest）。而VH和VL的各个CDR的氨基酸序列可以通过与已知的抗体的V区的氨基酸序列（Sequences of Proteins of Immunological Interest）比较进行鉴定。

（4）抗FGF-8中和嵌合抗体表达载体的构建

在编码2.(1)中构建的人源化抗体表达用载体的人抗体的CH和CL的基因的上游插入编码人以外的动物的抗FGF-8中和抗体的VH以及VL的DNA,可以构建抗FGF-8中和嵌合抗体表达载体。例如,以含有编码人以外的动物的抗FGF-8中和抗体的VH以及VL的DNA的质粒作为模板,通过使用由适当的限制性内切酶的识别序列和编码V区的碱基序列构成的5'末端一侧和3'末端一侧的引物的PCR法对抗体的VH和VL进行扩增,将各个扩增产物克隆到pBluescript II SK(-)(ストラタジ-ン公司生产)等质粒中,利用2.(2)所述的方法决定碱基序列,获得具有编码抗FGF-8中和抗体的VH以及VL的氨基酸序列的DNA序列的质粒。从得到的质粒分离编码抗FGF-8中和抗体的VH以及VL的DNA,使他们可以以适当方式表达那样克隆到编码2.(1)所述的人源化抗体表达用载体的人抗体的CH和CL的基因的上游,可以构建抗FGF-8中和嵌合抗体表达载体。

#### (5) 编码抗FGF-8中和CDR移植抗体的V区的DNA的构建

编码抗FGF-8中和移植抗体的VH和VL的DNA可以象以下那样构建。首先,选择移植人以外动物的抗FGF-8中和抗体的VH和VL的CDR的氨基酸序列的人抗体的VH和VL的FR的氨基酸序列。作为人抗体的VH和VL的FR的氨基酸序列只要是来自人抗体的序列,可以用任意序列。例如登录在Protein Data Bank等的数据库的人抗体的VH和VL的FR的氨基酸序列、人抗体的VH和VL的FR的各个亚类的共通氨基酸序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)等,为了制作具有充分活性的人型CDR移植抗体,希望选择与人以外动物的抗FGF-8中和抗体的VH和VL的FR的氨基酸序列尽可能高的同源性、最好是具有60%以上同源性的氨基酸序列。

接下来,将作为目的的人以外动物的抗FGF-8中和抗体的VH和VL的CDR的氨基酸序列移植到选择的人抗体的VH和VL的FR的氨基酸序列,设计抗FGF-8中和CDR移植抗体的VH和VL的氨基酸序列。考虑抗体基因的碱基序列中出现的密码子的使用频率(Sequences of Proteins of Immunological Interest)将设计的氨基酸序列转换为碱基序

列，设计编码抗FGF-8中和CDR移植抗体的VH和VL的氨基酸序列的碱基序列。根据设计的碱基序列，合成由100~150碱基长构成的数条合成DNA，用他们实施PCR法。此时，优选根据PCR的反应效率和可合成的DNA长度设计VH、VL 4条合成的DNA。另外通过在位于两端的合成DNA的5'末端导入适当的限制性内切酶的识别序列，可以很容易地克隆到2.(1)构建的人源化抗体表达用载体。PCR反应后，将扩增产物克隆到pBluescript II SK(-) (ストラタジ-ン公司生产)等质粒中，利用2.(2)所述的方法决定碱基序列，获得具有编码所期望的抗FGF-8中和CDR抗体的VH以及VL的氨基酸序列的碱基序列的质粒。

#### (6) 抗FGF-8中和CDR抗体的VH以及VL的氨基酸序列的改变

人型CDR移植抗体只是将作为目的的人以外动物的抗体的VH和VL的CDR移植到人抗体的VH和VL的FR，其抗原结合活性与原来的人以外动物的抗体活性相比降低了 (Tempest P.R. et al., Bio/technology, 9, 266-271, 1991)。其原因可能是在原来的人以外的动物的抗体的VH和VL中，不仅CDR，而且FR的几个氨基酸残基也直接或间接地与抗原结合活性有关，这些氨基酸残基伴随着CDR的移植，变化为与人抗体的VH和VL的FR不同的氨基酸残基。为了解决这一问题，在人型CDR移植抗体的人抗体的VH和VL的FR的氨基酸序列中，对与直接参与与抗原结合的氨基酸残基或与CDR的氨基酸残基相互作用，维持抗体的空间结构，间接参与与抗原结合的氨基酸残基进行鉴定，将他们改变为原来人以外的动物抗体中出现的氨基酸残基，可以使低下的抗原结合活性上升 (Tempest P.R. et al., Bio/technology, 9, 266-271, 1991)。在人型CDR移植抗体的制作中，如何有效地对那些与抗原结合活性有关的FR的氨基酸残基进行鉴定是最重要的方面，因此通过X射线晶体解析 (Bernstein F.C. et al., J.Mol.Biol., 112, 535-542, 1977) 或计算机模拟 (Tempest P.R. et al., Protein Engineering, 7, 1501-1507, 1994) 等可以进行抗体的空间结构的构建和解析。这些抗体空间结构的信息为人型CDR移植抗体的制作带来了许多有益的信息，但可适应所有抗体的人型CDR移植抗体的制作法还未确立，目前，就各种各样的抗体制作数种改变体，

研究与各个抗原结合活性的关系等种种试行错误是必要的。

人抗体的VH和VL的FR的氨基酸残基的改变可以用改变用合成DNA作引物进行PCR达到。有关PCR后的扩增产物通过2.(2)所述的方法决定其碱基序列，确认实施目的改变后可以获得含有导入目的变异的DNA的载体（以下称之为氨基酸序列改变载体）。

只要是在窄的区域的氨基酸序列的改变，可以通过使用由20~35碱基构成的变异导入引物的PCR变异导入法进行。具体来说，合成由含有编码改变后的氨基酸残基的DNA序列的20~35碱基构成的有意义变异引物和反义变异引物，以含有编码应当改变的VH和VL的氨基酸序列的DNA的质粒为模板，进行2阶段的PCR。将最终扩增片段亚克隆到适当的载体后，决定其碱基序列，获得含有导入目的变异的DNA的氨基酸序列改变载体。

#### (7) 抗FGF-8中和CDR移植抗体表达载体的构建

在编码2.(1)中记载的人源化抗体表达用载体的人抗体的CH和CL的DNA的上游插入编码2.(5)和(6)中构建的编码抗FGF-8中和CDR移植抗体的VH以及VL的DNA，可以构建抗FGF-8中和CDR移植抗体表达载体。例如，在2.(5)和(6)中构建编码抗FGF-8中和CDR移植抗体的VH以及VL时使用的合成DNA中，在位于两端的合成DNA的5'末端导入适当的限制性内切酶的识别序列，使他们可以以适当方式表达那样克隆到编码2.(1)所述的人源化抗体表达用载体的人抗体的CH和CL的DNA的上游。

#### (8) 人源化抗体的一过性表达和活性评价

为了有效地对制作的多种人源化抗体的抗原结合活性进行评价，可以使用2.(4)所述的抗FGF-8中和嵌合抗体表达载体，2.(7)所述的抗FGF-8中和CDR移植抗体表达载体，或对他们进行改变后的表达载体，进行人源化抗体的一过性表达。作为导入表达载体的宿主细胞，只要是可以表达人源化抗体的宿主细胞，可以使用任意细胞，从其表达量高出发，一般使用COS-7细胞(ATCC编号:CRL-1651)(Warr G.W.et al.,Methods in Nucleic Acids Research,CRC Press, 283,1990)。作为表

达载体向COS-7细胞的导入法，如DEAE-葡聚糖法（Warr G.W.et al.,Methods in Nucleic Acids Research,CRC Press,283,1990）、脂（质）转染法（Felgner P.L.et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 84,7413-7417,1987）等。

表达载体导入后，培养上清中的人源化抗体的表达量以及抗原结合活性可以通过作为第一抗体使用培养上清、作为第二抗体可以使用标记的抗人免疫球蛋白抗体的1.(2)所述的酶免疫测定法等测定。另外，通过1.(4)所述的细胞增殖抑制分析确认是否保持抑制FGF-8活性的中和活性。

#### (9) 人源化抗体稳定表达以及活性评价

通过将2.(4)所述的抗FGF-8中和嵌合抗体表达载体，2.(7)所述的抗FGF-8中和CDR移植抗体表达载体导入适当的宿主细胞，可以获得稳定生产人源化抗体的转化体。

作为表达载体向宿主细胞的导入法，如电穿孔法（特开平2-257891；Miyaji H.et al.,Cytotechnology,3,133-140,1990）等。

作为导入抗FGF-8中和嵌合抗体表达载体和抗FGF-8中和CDR移植抗体表达载体的宿主细胞，只要是使人源化抗体表达的宿主细胞，可以使用任意的细胞。例如，小鼠SP2/0-Ag14细胞（ATCC编号：CRL-1581）、小鼠P3X63-Ag8.653细胞（ATCC编号：CRL-1580）、二氢叶酸还原酶（以下略为DHFR）基因缺损的CHO细胞的CHO/DG44细胞（Urlaub G.and Chasin L.A., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 77,4216-4220,1980）、大鼠YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20细胞（ATCC编号：CRL-1662、以下称之为YB/0细胞）等。

表达载体导入后，稳定生产人源化抗体的转化体可以通过在含有G418（G418 Sulfate；Sigma Aldrich公司生产）等药物的动物细胞培养用培养基中培养进行选择（Shitara K.et al.,J.Immunol. Methods,167,271-278,1994）。作为动物细胞培养用培养基可以使用RPMI 1640培养基（日水制药公司生产）、GIT培养基（日本制药公司生产）、EX-CELL302培养基（JRH Bio Sciences公司生产）、IMDM

培养基（インビトロジエン公司生产）、杂交瘤SFM培养基（インビトロジエン公司生产）、或向这些培养基中添加了FBS等各种添加物的培养基等。通过在培养基中对得到的转化体进行培养，可以使人源化抗体表达蓄积在培养上清中。培养上清中的人源化抗体的表达量以及抗原结合活性可以通过上述1.(4)所述的ELISA等测定。另外转化体利用DHFR基因扩增体系等可以使人源化抗体的产量上升（Shitara K. et al., *J. Immunol. Methods*, 167. 271-278, 1994）。

人源化抗体可以用蛋白A柱从转化体的培养上清进行纯化（*Antibodies A Laboratory Manual*, chapter 8; monoclonal antibodies）。另外，也可以使用通常蛋白质中使用的纯化方法。例如，将凝胶过滤、离子交换色谱以及超滤等组合进行纯化。纯化的人源化抗体的H链、L链或抗体分子整体的分子量可以通过聚丙烯酰胺电泳（SDS - PAGE; Laemmli U.K., *Nature*, 227, 680-685, 1970）或 Western Blotting 法（*Antibodies A Laboratory Manual*）等测定。

纯化的人源化抗体的抗原结合活性可以通过作为第一抗体使用纯化的人源化抗体、作为第二抗体可以使用标记的抗人免疫球蛋白抗体的上述1.(2)所述的酶免疫测定法、表面胞质团共振（Karlsson R et al., *J. Immunol. Methods*, 145, 229-240, 1991）等测定。另外，通过1.(4)所述的细胞增殖抑制分析确认是否保持抑制FGF - 8活性的中和活性。

### 3.抗体片段的制作

抗体片段可以通过1.和2.所述的抗FGF - 8中和单克隆抗体、抗FGF - 8中和人源化抗体为基础的基因工程手法或蛋白质化学手法进行制作。作为抗体片段如Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、scFv、diabody、dsFv、含有CDR的肽等。

#### (1) Fab的制作

Fab可以通过用蛋白水解酶番木瓜蛋白酶对抗FGF - 8中和抗体进行处理制作。番木瓜蛋白酶处理后，只要原来抗体是具有蛋白A结合性的IgG亚类，通过蛋白A柱，分离为IgG分子和Fc片段，可以回收均一的Fab（monoclonal antibodies）。不带有蛋白A结合性的IgG亚类的抗体

情形，通过离子交换层析，Fab可以回收在以低盐浓度洗脱的级分中（monoclonal antibodies）。而Fab也可以用大肠杆菌通过基因工程手法进行制作。例如将编码2.(2)、（5）和（6）所述的抗体的V区的DNA克隆到Fab表达用载体，可以制作Fab表达载体。作为Fab表达用载体只要是Fab用的可以整合表达DNA的载体，可以使用任意载体。例如pIT106（Better M.et al.,Science,240,1041-1043,1988）等。将Fab表达载体导入适当的大肠杆菌，可以使Fab生成蓄积在包涵体或外周胞质层。由包涵体可以通过通常蛋白质用的再折叠法变成具有活性的Fab，而表达在胞质时，具有活性的Fab漏出到培养上清中。再折叠后或从培养上清中可以通过使用使抗原结合的柱子对均一的Fab进行纯化（BorrebeckK.,Antibody Engineering:A Practical Guide,Oxford Univesrsity Press,1991）。

### （2）F(ab')<sub>2</sub>的制作

F(ab')<sub>2</sub>可以通过用蛋白水解酶胃蛋白酶对抗FGF-8中和抗体进行处理制作。胃蛋白酶处理后，通过与Fab同样的纯化操作，可以回收均一的F(ab')<sub>2</sub>（monoclonal antibodies）。另外，也可以通过用N,N'-o-亚苯基二马来酰亚胺或二马来酰亚胺己烷等那样的马来酰亚胺对3.(3)所述的Fab'进行处理，使硫醚键生成的方法，以及用二硫代二（2-硝基苯甲酸）进行处理，使二硫键生成的方法也可以制作（McCafferty J.et al.,Antibody Engineering:A Practical Approach, IRL Press,1996）。

### （3）Fab'的制作

Fab'可以通过用二硫苏糖醇等还原剂对3.(2)所述的F(ab')<sub>2</sub>进行处理得到。而Fab'也可以用大肠杆菌通过基因工程手法进行制作。例如将编码2.(2)、（5）和（6）所述的抗体的V区的DNA克隆到Fab'表达用载体，可以制作Fab'表达载体。作为Fab'表达用载体只要是可以整合表达编码2.(2)、（5）和（6）所述的抗体的V区的DNA的载体，可以使用任意载体。例如pAK19（Carter P.et al.,Bio/Technology, 10, 163-167, 1992）等。将Fab'表达载体导入适当的大肠杆菌，可以使Fab'生成蓄积在包涵体或外周胞质层。由包涵体可以通过通常蛋白质用的再折叠法变

成具有活性的Fab'，而表达在胞质层时，通过溶菌酶进行部分消化、渗透压冲击、超声等处理破碎细菌，可以从菌体外回收。再折叠后或从菌的破碎液中通过使用蛋白G柱等，可以纯化均一的Fab'（McCafferty J.et al.,*Antibody Engineering:A Practical Approach*, IRL Press,1996）。

#### （4）svFv的制作

svFv可以通过基因工程手法用噬菌体或大肠杆菌制作。例如，通过编码由12个残基以上的氨基酸序列构成的多肽接头的DNA连接编码2.(2)、（5）和（6）所述的抗体的VH以及VL的DNA，制作编码scFv的DNA。多肽接头的付加要不妨碍VH、VL与抗原的结合那样最适化是重要的，例如，可以使用Pantoliano等人报道的（Pantoliano M.W.et al.,*Biochemistry*,30,10117-10125,1991）或对他进行改变的多肽接头。

将制作的DNA克隆到scFv表达用载体，可以制作scFv表达载体。作为scFv表达用载体只要是可以整合表达scFv的DNA的，可以使用任意的载体。如，pCANTAB5E（Amersham Biosciences公司生产）、Phfa（Lah M.et al.,*Hum.Antibodies Hybridomas*,5,48-56,1994）等。通过将scFv表达载体导入适当的大肠杆菌，使辅助噬菌体感染，可以得到在噬菌体表面scFv以与噬菌体表面蛋白质融合的形式表达的噬菌体。另外，将scFv表达载体导入适当的大肠杆菌，可以使scFv生成蓄积在包涵体或外周胞质层。由包涵体可以通过通常蛋白质用的再折叠法变成具有活性的scFv，而表达在胞质层时，通过溶菌酶进行部分消化、渗透压冲击、超声等处理破碎细菌，可以从菌体外回收。再折叠后或从菌的破碎液中通过使用阳离子交换柱等，可以纯化均一的scFv（McCafferty J.et al.,*Antibody Engineering:A Practical Approach*, IRL Press,1996）。

#### （5）diabody的制作

通过将制作上述的scFv时的多肽接头做成3~10个残基左右可以制作diabody。使用一种抗体的VH和VL时，可以制作2价抗体，使用两种抗体的VH和VL时，可以制作具有2种特异性的diabody（Le Gall F.et al.,*FEBS Lett.*,453,164-168,1999,Courage C.et al.,*Int.J.Cancer*,77.763-768,1998）。

### (6) dsFv的制作

dsFv可以通过基因工程手法用大肠杆菌制作。首先,在编码2.(2)、(5)和(6)所述的抗体的VH以及VL的DNA的适当位置导入变异,制作编码的氨基酸残基被置换为半胱氨酸的DNA。氨基酸残基向半胱氨酸残基的改变可以通过使用2.(6)的PCR法的变异导入法进行。将制作的各个DNA克隆到dsFv表达用载体,可以制作VH和VL的表达载体。作为dsFv表达用载体只要是可以整合表达dsFv用的DNA的载体,可以使用任意载体。例如pUL19(Reiter Y.et al.,Protein Eng.,7,697-704,1994)等。将VH和VL的表达载体导入适当的大肠杆菌,可以使VH和VL生成蓄积在包涵体或外周胞质层。由包涵体或外周胞质层得到VH和VL,进行混合,通过通常蛋白质用的再折叠法使二硫键形成,可以制作具有活性的dsFv。在重折叠后,可以通过离子交换层析和凝胶过滤等进一步进行纯化(Reiter Y.et al.,Protein Eng.,7,697-704,1994)。

### (7) 含有CDR的肽的制作

含有CDR的肽可以通过Fmoc法或tBoc法等化学合成法制作。另外制作编码含有CDR的肽的DNA,将制作的DNA克隆到适当的表达载体,可以制作CDR肽表达载体。作为表达用载体只要是可以整合表达编码含有CDR的肽的DNA的载体,可以使用任意载体。例如pLEX(インビトロジエン公司生产)、pAX4a+[MoBiTec公司生产]等。将表达载体导入适当的大肠杆菌,可以使含有CDR的肽生成蓄积在包涵体或外周胞质层。由包涵体或外周胞质层可以得到含有CDR的肽,通过离子交换色谱和凝胶过滤等进行纯化(Reiter Y.et al.,Protein Eng.,7,697-704,1994)。

### (8) 活性评价

上述抗体片段的抗原结合活性可以使用抗体片段作为第一抗体,通过上述1.(2)所述的酶免疫测定法、表面胞质团共振(Karlsson R et al., J. Immunol. Methods, 145, 229-240, 1991)等进行测定。另外,通过1.(4)所述的细胞增殖抑制分析确认是否保持抑制FGF-8活性的中和活性。

## 4.本发明的预防药和治疗药

抗FGF-8中和抗体由于可以与滑膜和软骨的细胞以及组织上的FGF-8结合,抑制由于FGF-8诱导的软骨细胞外基质的分解,抑制软骨的破坏,所以成为软骨的保护剂。另外由于该抗体具有抑制由FGF-8诱导的滑膜细胞的增殖的能力,所以成为滑膜细胞的增殖抑制剂。由于关节的破坏伴随着软骨的破坏和滑膜细胞的增殖,所以该抗体通过抑制滑膜细胞的增殖和软骨的破坏而成为关节破坏的抑制剂。关节炎是伴随着关节的破坏的疾病,该抗体由于抑制关节的破坏而成为关节炎的治疗药和预防药。关节炎包括变形性关节炎和关节风湿病、全身性红斑狼疮、强直性关节炎、干癣性关节炎、椎间盘疾病、急性结晶性滑膜炎(包括痛风、假痛风)等。

人源化抗体与人以外的动物的单克隆抗体比较,由于几乎是来自人抗体的氨基酸序列的一部分,所以在人体内表现出很高的效果,而且免疫原性低,预期其效果持续时间长,所以作为预防药和治疗药很理想。

含有抗FGF-8中和抗体的药,作为治疗药虽然可单独给药,但通常都是与药理学上容许的一种或一种以上的载体一起混合,作为通过制剂学技术领域常见的任意方法制造的药剂提供最好。

给药途径希望使用治疗时效果最好的途径,如可以口服给药、或经口腔内、气管内、直肠内、皮下、肌肉内、关节内、以及静脉内等非口服给药,抗体或肽制剂时,最好是经关节内和静脉内给药。

给药方式,如喷雾剂、胶囊剂、片剂、颗粒剂、糖浆制剂、乳剂、栓剂、注射剂、软膏、贴剂等。

作为适用于口服的制剂,如乳剂、糖浆、胶囊、片剂、散剂、颗粒剂等。

象乳剂和糖浆那样的液体制品可以使用水、蔗糖、山梨糖醇、果糖等糖类,聚乙二醇、丙二醇等醇类,芝麻油、橄榄油、大豆油等油类,p-羟基苯甲酸酯等防腐剂,草莓香料、薄荷香料等香料类等作为添加剂制造。

胶囊、片剂、散剂、颗粒剂等可以使用乳糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖醇等赋形剂,淀粉、藻酸钠等崩解剂,硬脂酸镁、滑石等滑润剂,聚

乙烯醇、羟丙基甲基纤维素、明胶等粘合剂，脂肪酸酯等表面活性剂，甘油等可塑剂等作为添加剂制造。

作为适用于非口服的制剂，如注射剂、栓剂、喷雾剂等。

注射剂可以用盐溶液、葡萄糖溶液、或由两者混合物组成的载体等制备。

栓剂可以用可可脂、氢化脂肪或羧酸等载体制备。

而喷雾剂可以用抗体或肽本身、或者不刺激患者口腔和气管粘膜，而且使该抗体或肽以微细的粒子分散，使其容易吸收的载体等制备。

作为载体，具体来说，如乳糖、甘油等。根据该抗体或肽以及使用的载体的性质，可以做成烟雾剂、干燥粉末等制剂。另外，在这些非口服制剂中，也可以添加口服制剂中作为添加剂列举的成分。

给药量或给药次数因目的治疗效果、给药方法、治疗期间、年龄、体重等而有所不同，通常成人为每天 $10\mu\text{g}/\text{kg} \sim 20\text{mg}/\text{kg}$ 。

抗FGF-8中和抗体抑制软骨细胞外基质的分解以及抑制滑膜细胞的增殖可以使用以下(1)和(2)所示的体外的分析体系确认。而作为关节炎的治疗药和预防药也可以将该抗体用于以下(3)所示的关节炎病理模型鼠，通过看是否可以减轻他的关节炎症状进行评价。

#### (1) FGF-8对软骨破坏的抑制活性

软骨的破坏通过将使用软骨细胞或软骨器官的软骨的细胞外基质的分解、从软骨细胞或滑膜细胞产生的破坏因子的增加作为指标的分析，以及由于软骨破坏的进展引起的软骨下骨的破坏可以分别通过以骨吸收量作为指标的分析进行评价。

##### (a) 软骨细胞外基质的分解

在FGF-8存在下添加和不添加抗FGF-8中和抗体的情况下对初代培养的兔关节软骨细胞进行培养，通过测定培养后残留在培养板上的细胞外基质的量对软骨破坏作用进行评价。细胞外基质量是以经番木瓜蛋白酶处理能够游离出来的葡萄糖胺聚糖的量进行测定。由于FGF-8诱导的细胞外基质的减少在由于抗FGF-8中和抗体的添加受到抑制时，可以认为该抗体具有抑制软骨破坏的作用。

软骨破坏作用也可以按照 Price 等人的方法 (Price J.S. et al., *Arthritis Rheum.*, 42, 137-147, 1999) 在 FGF-8 存在下添加和不添加抗 FGF-8 中和抗体的情况下对初代培养的牛鼻中隔软骨器官进行培养, 通过测定培养后软骨器官中的细胞外基质的量对软骨破坏作用进行评价。由于 FGF-8 诱导的细胞外基质的减少在通过抗 FGF-8 中和抗体的添加受到抑制时, 可以认为该抗体具有抑制软骨破坏的作用。细胞外基质的量是以通过二甲基亚甲基法 (Chandrasekhar S. et al., *Anal. Biochem.* 161 103-108, 1987) 对经番木瓜蛋白酶处理培养后的器官, 能够游离出来的葡萄糖胺聚糖的量进行测定, 或根据东京卫生年报, 36, 277, 1985, 以胶原的量作为羟脯氨酸浓度的测定来测定的。

#### (b) 与软骨破坏有关的因子的产生

作为与软骨破坏有关的因子如前列腺素 E<sub>2</sub>、基质金属蛋白激酶 3、一氧化氮。在 FGF-8 存在下添加和不添加抗 FGF-8 中和抗体的情况下对兔关节软骨细胞或兔滑膜细胞进行培养, 以这些因子从该细胞的产生量对培养上清的前列腺素 E<sub>2</sub>、基质金属蛋白激酶 3、一氧化氮进行测定。FGF-8 促进前列腺素 E<sub>2</sub>、基质金属蛋白激酶 3、一氧化氮的产生由于抗 FGF-8 中和抗体的添加受到抑制时, 可以认为该抗体具有抑制软骨破坏的作用。

前列腺素 E<sub>2</sub> 可以通过前列腺素 E<sub>2</sub> EIA 系统 (Amersham Biosciences 公司生产)、基质金属蛋白激酶 3 可以通过兔基质金属蛋白激酶 3 ELISA 系统 (Amersham Biosciences 公司生产), 一氧化氮可以通过使用 Griess 试剂的方法 (Green L.C. et al., *Anal. Biochem.* 126, 131-138 1982) 进行测定。

#### (c) 骨吸收

骨吸收可以通过在 FGF-8 存在下添加和不添加抗 FGF-8 中和抗体的情况下对鼠头盖骨进行培养, 测定培养上清中的钙浓度或羟脯氨酸浓度来测定。由于 FGF-8 促进骨吸收在添加抗 FGF-8 中和抗体时受到抑制时, 可以认为该抗体具有抑制软骨破坏的作用。培养上清中的钙浓度可以使用钙 C-测试和光 (和光纯药工业公司生产) 进行测定。培养

血清中的羟脯氨酸浓度可以根据东京卫生年报, 36, 277, 1985的报道进行测定。

### (2) 滑膜细胞的增殖抑制作用

滑膜细胞的增殖可以在FGF-8存在下添加和不添加抗FGF-8中和抗体的情况下对人或兔的滑膜细胞进行培养, 通过测定 $[^3\text{H}]$ 胸腺嘧啶整合量来评价。由于FGF-8促进的 $[^3\text{H}]$ 胸腺嘧啶整合量在添加抗FGF-8中和抗体时受到抑制时, 可以认为该抗体具有抑制滑膜细胞增殖的作用。

### (3) 用关节炎病理模型动物在体内的评价

用下述的关节炎病模型动物, 可以评价FGF-8或抗FGF-8中和抗体对关节破坏的效果。将抗FGF-8中和抗体用于关节炎病理模型动物, 当该模型动物的关节炎症状减轻时, 认为可以用作关节炎的治疗药和预防药。

作为表现出类似于关节风湿病的病理模型动物, 主要有在足关节自然发生关节炎的MRL-lpr小鼠(Hang L.et al.,J.Exp.Med.,155,1690-1701,1982、可从日本チヤ-ルス-リバ-购买到)、对免疫结核死菌后诱导的大鼠·佐剂关节炎模型(Pearson CM.et al.,Arth.Rheum.,5,654-658,1962; Taurog J.D.et al.,Cell.Immunol.,75,271-282,1983; Bendele A.et al.,J.Rheumatol.,26,1225-1229,1999), 将关节中许多II型胶原与佐剂一起免疫后发病的小鼠·胶原关节炎模型(Stuart J.M.et al.,Annu.Rev.Immunol.,2,199-218,1984; Kamada H.et al.,Jpn.J.Pharmacol.,70,169-175,1996)等。这些模型动物表现出类似于关节风湿病的症状, 可以广泛地用于关节炎治疗药的评价。

使用大鼠·佐剂关节炎模型时, 分别就佐剂处理足(在急性炎症之后又发生慢性炎症的二相性炎症反应)和佐剂非处理足(从致敏1周左右引起慢性炎症)随时间对后肢足 浮肿容积进行测定。另外进行左右后肢的软X射线摄影, 就骨破坏和关节的变形进行评价。另外通过测定尿中的葡萄糖胺聚糖量可以对全身的软骨破坏进行评价, 通过测定尿中的脱氧吡啶啉量和羟脯氨酸量对全身的骨破坏进行评价。尿中的葡萄糖胺

聚糖量可以用二甲基亚甲基蓝法 (Chandrasekhar S. et al., Anal. Biochem. 161 103-108, 1987), 而尿中的脱氧吡啶啉量可以使用オステオリンクス「DPD」(住友制药公司生产), 尿中的羟脯氨酸量可以根据池田的方法(池田真悟等, 东京卫研年报. 36, 277-282, 1985)进行测定。另外可以使用アスプロ-GP(大塚制药)对作为全身的炎症反应指标的血清中的粘蛋白浓度进行测定, 按照Tracey等人的方法(Tracey W.R., et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 272, 1011-1015, 1995)对血清中的一氧化氮浓度进行测定。

使用小鼠·胶原关节炎模型时, 对体重和关节炎记分的随时间变化、血清中抗胶原抗体效价进行测定。另外解剖后, 进行关节部的病理组织学研究。关节炎记分通过0至4分、全肢最高16分的记分进行评价。记分基准为0: 正常; 1: 发现弱红斑, 2: 发现弱肿胀和红斑, 3: 发现强肿胀和红斑, 通过触知发现温感, 4: 发现随着手指变形引起的显著的肿胀。

作为变形性关节病模型, 更多地使用用狗、兔等大动物, 通过膝半月月的切除和韧带的切离, 使关节产生动摇, 使慢性关节的变性发生的模型(以下称之为实验变形性关节病模型)(伊藤隆太, 用于新药开发的动物模型利用集成, 变形性关节病, R&D计划, 1985年, Guingamp C. et al., Arthritis Rheum., 40, 1670-1679, 1997; van der Kraan P.M. et al., Am. J. Pathol., 135, 1001-1014, 1989)。另外, 通过向大鼠膝关节内注入一碘代乙酸, 促进关节软骨的细胞外基质葡萄糖胺聚糖的游离, 作为引起关节破坏的大鼠·一碘代乙酸诱发变形性关节病模型。

通过兔膝关节半月板部分切除形成实验变形性关节病模型可以通过Colombo等人的方法(Colombo C. et al., Arthritis Rheum., 26, 875-886, 1983)和菊地等人的方法(菊地寿辛等人, 关节外科, 15, 92-98, 1966)制作。

大鼠·一碘代乙酸诱发变形性关节病模型基于Guingamp等人的方法(Guingamp C. et al., Arthritis Rheum., 40, 1670-1679, 1997), 向大鼠的膝关节内注入一碘代乙酸进行制作。

这些变形性关节炎动物模型可以通过在一定期间后摘出膝关节膝盖骨，用番木瓜蛋白酶进行处理，通过用二甲基亚甲基蓝法（Chandrasekhar S. et al., Anal. Biochem. 161 103-108, 1987）测定葡萄糖胺聚糖量，对关节破坏（细胞外基质的分解）进行评价。另外进行膝关节的病理组织学的研究。

作为将抗FGF-8中和抗体用于模型动物时的剂型以及给药途径，可以根据对象模型动物的性质和病情适当地选择。例如，可以直接地，或者与其他药理学上容许的载体、赋形剂、稀释剂等一起对模型动物经口或不经过口（腹腔内、静脉内、关节内、肌肉内、皮下给药等）给药。

抗FGF-8中和抗体的配合量以及给药量可以根据该制剂的给药方法、给药方式、使用目的、模型动物的具体症状、模型动物的体重等分别决定，没有特别限定，给药量每天大概为 $1\mu\text{g}/\text{kg} \sim 100\text{mg}/\text{kg}$ ，给药间隔可以是1天1次，也可以1天分为2~4次，或4次以上的次数给药。另外也可以通过点滴等连续给药。当给药到关节等局部时，每一处大约可给药 $1\mu\text{g}$ 至 $100\text{mg}$ 。

### 5. 本发明的诊断药

FGF-8诱导关节中的滑膜细胞的增殖、软骨细胞外基质的破坏。上述的FGF-8抗体由于与FGF-8特异性结合，可以对FGF-8进行检测和定量，所以可以用作关节炎的诊断药。作为可以诊断的关节炎，如上述4.所述的疾病。FGF-8的检测和定量可以按照下述6.所述方法进行。

作为本发明诊断药使用的抗FGF-8抗体，只要是与FGF-8特异性结合的抗体都可以，可以使用多克隆抗体或单克隆抗体中的任一种，最好使用单克隆抗体。

作为单克隆抗体，如通过杂交瘤生产的抗体、人源化抗体和这些抗体的抗体片段。

本发明诊断药中使用的抗FGF-8抗体可以象上述的抗FGF-8中和抗体的制造法那样制造，但不需要抑制FGF-8的活性。也可以将抗FGF-8中和抗体作为本发明的诊断药所用的抗FGF-8抗体来使用。作为

本发明诊断药使用的抗FGF-8抗体的具体例子如杂交瘤KM1334 (FERM BP-5451)生产的单克隆抗体KM1334、转化体KM3034 (FERM BP-7836)生产的人型嵌合抗体KM3034、转化体KM3334生产的人型嵌合抗体KM3334、转化体KM8037 (FERM BP-8084)生产的人型CDR移植抗体HV0LV6、转化体KM8034生产的人型CDR移植抗体HV0LV6/CHO、转化体KM8036 (FERM BP-8083)生产的人型CDR移植抗体HV0LV3-1/CHO以及转化体KM8035 (FERM BP-8082)生产的人型CDR移植抗体HV0LV4-3/CHO。

含有抗FGF-8抗体的诊断药根据下述6.所述那样的判定方法也可以含有用于进行抗原抗体反应的试剂、该反应的检测用试剂。作为用于进行抗原抗体反应的试剂,如缓冲剂、盐等。作为检测用试剂如识别抗FGF-8抗体的标记二次抗体、在对应于标记的底物等通常的免疫学检测法中使用的试剂。

#### 6.本发明的关节炎的判定方法

作为用本发明的判定方法判定的关节炎如上述4.所述的疾病。在这些疾病的患者的关节中,与健康人比较,认为具有诱导滑膜细胞的增殖、软骨的细胞外基质的破坏的活性的FGF-8的量增加了。

作为本发明的关节炎的判定方法,例如使用通过活组织等检查从被检查者采取的关节的滑膜和软骨的细胞或组织切片、以及由该细胞或组织制备的细胞提取液、滑液等,象下述那样对细胞或组织中存在的FGF-8进行免疫学检测和/或定量的方法。

作为使用针对FGF-8的抗体对在关节中表达的FGF-8进行免疫学检测和/或定量的方法,可以使用荧光抗体法、酶免疫测定法(ELISA)、放射性物质标记免疫抗体法(RIA)、免疫组织染色法、免疫细胞染色法、免疫印迹法、免疫沉降法、三明治(Sandwich)ELISA法(富山朔二和安东民卫,单克隆抗体实验手册,讲谈社科学,1987年、日本生化学会、续生化实验讲座5,免疫生化研究法,东京化学同人,1986年)等。

荧光抗体法可以使用文献(单克隆·抗体、富山朔二和安东民卫,单

克隆抗体实验手册, 讲谈社科学, 1987年)等所述方法进行。具体来说, 在分离的关节的细胞和组织等中使抗FGF-8抗体反应, 再使用异硫氰酸酯荧光素(FITC)或藻红素等荧光物质标记的抗免疫球蛋白抗体反应后, 用细胞流式细胞计进行测定荧光色素的方法。

酶免疫测定法(ELISA)是使抗FGF-8抗体与分离的关节的细胞或组织、滑液等反应, 再使实施了过氧化物酶、碱性磷酸酶等的酶标记的抗免疫球蛋白抗体反应后, 加入通过酶反应发色的底物, 进行反应, 用吸光光度计测定发色色素的方法。

放射性物质标记免疫抗体法(RIA)是使抗FGF-8抗体与分离的关节的细胞或组织、滑液等反应, 再使实施了放射性同位素标记的抗免疫球蛋白抗体反应后, 用闪烁计数器等测定放射能的方法。

免疫组织染色法、免疫细胞染色法是使抗FGF-8抗体与分离的关节的细胞或组织等反应, 再使实施了FITC等荧光物质、过氧化物酶、碱性磷酸酶等的酶标记的抗免疫球蛋白抗体反应; 酶标记的情形下, 加入通过酶反应发色的底物, 进行反应后, 用显微镜进行观察的方法, 可以使用文献(单克隆抗体, 富山朔二和安东民卫, 单克隆抗体实验手册, 讲谈社科学, 1987年)等所述方法进行。

免疫印迹是将分离的关节的细胞或组织、他们的破碎液、滑液等溶解于含有SDS的样品用缓冲液, 进行SDS-PAGE后, 转移到聚偏氟乙烯(PVDF)膜上, 使抗FGF-8抗体反应, 再使实施了过氧化物酶、碱性磷酸酶等的酶标记的抗免疫球蛋白抗体反应后, 加入通过酶反应发色或化学发光的底物, 进行反应, 作为带检测出的方法。

免疫沉降法是使分离的关节的细胞或组织的破碎液、滑液与固定于颗粒等上的抗FGF-8抗体等反应, 通过离心等将颗粒分离后, 用含有SDS的样品用缓冲液进行处理颗粒, 用闪烁计数器等检测溶解的FGF-8的方法。

三明治ELISA是使用抗原表位各不相同的两种抗FGF-8抗体的酶免疫测定法中的一种。将其中的一种抗体固定于培养板上, 使分离的关节的细胞或组织、他们的破碎液、滑液反应后, 再使另一种抗FGF-8

抗体与结合于培养板上的抗FGF-8抗体的FGF-8反应。再使实施了过氧化物酶、碱性磷酸酶等的酶标记的抗免疫球蛋白抗体反应后，加入通过酶反应发色的底物，进行反应，用吸光光度计测定发色色素的方法。

#### 附图的简单说明

图1是表示兔软骨细胞的FGF-8引起细胞外基质的分解作用的图。纵轴表示残留在细胞外基质中的葡萄糖胺聚糖的量，横轴表示FGF-8的浓度（ng/mL）。值表示平均值±标准误差，\*\*\*表示 $P<0.001$ （无刺激组对比、Dunnett检测）。

图2是表示抗FGF-8中和抗体KM1334对兔软骨细胞的FGF-8引起细胞外基质的分解的抑制作用的图。纵轴表示残留在细胞外基质中的葡萄糖胺聚糖的量，横轴表示KM1334的浓度（ $\mu\text{g/mL}$ ）。值表示平均值±标准误差，###表示 $P<0.001$ （无刺激组对比、Student的t-检测），\*\*表示 $P<0.01$ ，\*\*\*表示 $P<0.001$ （0组为对比，Dunnett检测）。

图3是表示由兔软骨细胞的FGF-8促进细胞外基质金属蛋白激酶3的产生和抗FGF-8中和抗体KM1334产生的抑制作用的图。纵轴表示残留在培养液中的基质金属蛋白激酶3的量（ng/孔），横轴表示KM1334的浓度（ $\mu\text{g/mL}$ ）。值表示平均值±标准误差，##表示 $P<0.01$ （无刺激组对比、Aspin-Welch检测），\*\*\*表示 $P<0.001$ （0组为对比，Dunnett检测）。

图4是表示兔滑膜细胞的FGF-8促进增殖作用的图。纵轴表示整合到兔滑膜细胞中的 $[^3\text{H}]$ 胸腺嘧啶的放射活性，横轴表示FGF的浓度（ng/mL）。值表示平均值±标准误差，\*表示 $P<0.05$ （无刺激组对比、Steel检测）。

图5是表示抗FGF-8中和抗体KM1334对由兔滑膜细胞的FGF-8引起的增殖促进的抑制作用的图。纵轴表示整合到兔滑膜细胞中的 $[^3\text{H}]$ 胸腺嘧啶的放射活性，横轴表示KM1334的浓度（ $\mu\text{g/mL}$ ）。值表示平均值±标准误差，###表示 $P<0.001$ （无刺激组对比、Student的t-检测），\*\*\*表示 $P<0.001$ （0组为对比，Dunnett检测）。

图6是表示由人滑膜细胞的FGF-8引起的增殖促进作用的图。纵轴表示整合到人滑膜细胞中的 $[^3\text{H}]$ 胸腺嘧啶的放射活性，横轴表示FGF-8的浓度( $\text{ng/mL}$ )。值表示平均值 $\pm$ 标准误差，\*\*\*表示 $P<0.001$ (无刺激组对比, Dunnett检测)。

图7是表示抗FGF-8中和抗体KM1334对由人滑膜细胞的FGF-8引起的增殖促进的抑制作用的图。纵轴表示整合到兔滑膜细胞中的 $[^3\text{H}]$ 胸腺嘧啶的放射活性，横轴表示KM1334的浓度( $\mu\text{g/mL}$ )。值表示平均值 $\pm$ 标准误差，###表示 $P<0.001$ (无刺激组对比, Aspin-Welch检测)，\*表示 $P<0.05$ (0组为对比, Steel检测)。

图8是表示由于FGF-8注入引起的关节细胞外基质分解的图。纵轴表示关节洗净液中的葡萄糖胺聚糖浓度( $\mu\text{g/mL}$ )。值表示平均值 $\pm$ 标准误差，\*\*表示 $P<0.01$ (生理盐水注入组对比, Student的t-检测)。

图9是表示由于FGF-8注入引起的关节的膝盖骨破坏的图。纵轴表示膝盖骨重量( $\text{mg}$ )。值表示平均值 $\pm$ 标准误差，\*表示 $P<0.05$ (生理盐水注入组对比, Student的t-检测)。

图10是表示抗FGF-8中和抗体KM1334对胶原关节炎病小鼠的关节炎记分的随时间变化的抑制作用的图。纵轴表示关节炎记分，横轴表示从胶原初次致敏开始的经过天数。值表示平均值 $\pm$ 标准误差，\*表示 $P<0.05$ (给予生理盐水组对比, Wilcoxon顺位和检测)，#表示 $P<0.05$ (给予溶剂组对比, Wilcoxon顺位和检测)。

图11是表示抗FGF-8中和抗体KM1334对佐剂关节炎病大鼠的佐剂非处置足的足容积量增加的抑制作用的图。纵轴表示足容积( $\text{mL}$ )。值表示平均值 $\pm$ 标准误差，###表示 $P<0.001$ (未处置组对比, Aspin-Welch检测)，\*\*表示 $P<0.01$ (生理盐水注入组对比, Student的t-检测)。

图12是表示双氯芬酸钠、甲氨蝶呤、以及氢化泼尼松对佐剂关节炎病大鼠的佐剂非处置足的足容积量增加的抑制作用的图。纵轴表示足容积( $\text{mL}$ )。值表示平均值 $\pm$ 标准误差，###表示 $P<0.001$ (未处置组对比, Aspin-Welch检测)，\*\*\*表示 $P<0.001$ (给予溶剂组对比, Student的t

检测),  $\dagger\dagger$ 表示 $P<0.01$ ,  $\dagger\dagger\dagger$ 表示 $P<0.001$  (给予溶剂组对比, Aspin - Welch检测)。

图13是表示抗FGF - 8中和抗体KM1334对佐剂关节炎病大鼠尿中的葡萄糖胺聚糖量上升的抑制作用的图。纵轴表示葡萄糖胺聚糖浓度/肌酸酐浓度比 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。值表示平均值 $\pm$ 标准误差,  $\#\#\#$ 表示 $P<0.001$  (未处置组对比、Aspin - Welch检测),  $\#\#\#$ 表示 $P<0.001$  (生理盐水注入组对比, Student的t - 检测)。

图14是表示双氯芬酸钠、甲氨蝶呤、以及氢化泼尼松对佐剂关节炎病大鼠尿中的葡萄糖胺聚糖量上升的抑制作用的图。纵轴表示葡萄糖胺聚糖浓度/肌酸酐浓度比 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。值表示平均值 $\pm$ 标准误差,  $\#\#\#$ 表示 $P<0.01$  (未处置组对比、Aspin - Welch检测),  $\#\#\#$ 表示 $P<0.05$  (生理盐水注入组对比, Student的t - 检测)。

图15是表示抗FGF - 8中和抗体KM1334对佐剂关节炎病大鼠尿中的脱氧吡啶啉 (deoxypyridinoline) 上升的抑制作用的图。纵轴表示脱氧吡啶啉浓度/肌酸酐浓度比 (nmol/mmol)。值表示平均值 $\pm$ 标准误差,  $\#\#\#$ 表示 $P<0.001$  (未处置组对比、Aspin - Welch检测),  $\#\#\#$ 表示 $P<0.05$  (生理盐水注入组对比, Student的t - 检测)。

图16是表示双氯芬酸钠、甲氨蝶呤、以及氢化泼尼松对佐剂关节炎病大鼠尿中的脱氧吡啶啉量上升的抑制作用的图。纵轴表示脱氧吡啶啉浓度/肌酸酐浓度比 (nmol/mmol)。值表示平均值 $\pm$ 标准误差,  $\#\#\#$ 表示 $P<0.001$  (未处置组对比、Student的t - 检测),  $\#\#\#$ 表示 $P<0.01$  (溶剂注入组对比, Student的t - 检测)。

图17是表示抗FGF - 8中和抗体KM1334对佐剂关节炎病大鼠尿中的羟脯氨酸上升的抑制作用的图。纵轴表示羟脯氨酸浓度/肌酸酐浓度比 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。值表示平均值 $\pm$ 标准误差,  $\#\#\#$ 表示 $P<0.001$  (未处置组对比、Student的t - 检测),  $\#\#\#$ 表示 $P<0.01$  (溶剂给予组对比, Student的t - 检测)。

图18是表示抗FGF - 8中和抗体KM1334对一碘代乙酸诱发变形性关节炎病模型大鼠中的关节软骨破坏的抑制作用的图。纵轴表示关节洗净

液中的葡萄糖胺聚糖浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )。值表示平均值 $\pm$ 标准误差, ##表示  $P < 0.01$  (假手术组对比、Aspin - Welch检测), \*表示  $P < 0.05$  (生理盐水注入组对比, Student的  $t$  - 检测)。

图19是表示质粒pKM1334CH-H5的构建步骤的图。

图20是表示质粒pKM1334CH-L4的构建步骤的图。

图21是表示质粒pKANTEX1334的构建步骤的图。

图22是表示抗FGF - 8中和小鼠抗体KM1334、抗FGF - 8中和抗体KM3034和KM3334对小鼠乳腺癌细胞株SC - 3细胞的FGF - 8依赖增殖的中和活性的图。横轴表示抗体浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )，纵轴表示将只添加了FGF - 8时的增殖作为100%时的相对增殖 (%)。○为KM1334、□为KM3034、△为KM3334、×为阴性对照的KM2760的活性。

图23是表示质粒pKM1334HVO的构建步骤的图。

图24是表示质粒pKANTEX1334HVOLVO的构建步骤的图。

图25是表示通过ELISA测定抗FGF - 8中和嵌合抗体KM3334、抗FGF - 8中和CDR移植抗体HVOLVO、HVOLV6、HV6LV6对FGF - 8的结合活性的结果的图。横轴表示抗体浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )，纵轴表示结合活性 ( $\text{OD}_{415}$ )。△为KM3334、○为HVOLVO、□为HVOLV6、×为HV6LV6的活性。

图26是表示通过BIAcore 2000测定抗FGF - 8中和嵌合抗体KM3334、抗FGF - 8中和CDR移植抗体HVOLVO、HVOLV6、HV6LV6对FGF - 8的结合活性的结果的图。横轴表示时间 (秒)，纵轴表示共振信号 (RU)。

图27是表示质粒pKM1334LV3-1的构建步骤的图。

图28是表示质粒pKM1334LV4-2的构建步骤的图。

图29是表示质粒pKM1334LV3-2的构建步骤的图。

图30是表示通过BIAcore 2000测定抗FGF - 8中和嵌合抗体KM3334、抗FGF - 8中和CDR移植抗体HVOLVO/CHO、HVOLV6/CHO、HVOLV4 - 1/CHO、HVOLV4 - 2/CHO、HVOLV3 - 1/CHO、HVOLV3 - 2/CHO、HVOLV2 - 1/CHO、HVOLV2 - 2/CHO

对FGF-8的结合活性的结果的图。横轴表示时间(秒),纵轴表示共振信号(RU)。

图31是表示抗FGF-8中和嵌合抗体KM3034、抗FGF-8中和CDR移植抗体HVOLV6/CHO、HVOLV4-1/CHO、HVOLV3-1/CHO、HVOLV2-1/CHO对小鼠乳腺癌细胞株SC-3细胞的FGF-8依赖增殖的中和活性的图。横轴表示抗体浓度( $\mu\text{g/mL}$ ),纵轴表示将只添加了FGF-8时的增殖作为100%时的相对增殖(%)。○为KM3034、●为HVOLV6/CHO、◇为HVOLV4-1/CHO、△为HVOLV3-1/CHO、□为HVOLV2-1/CHO、×为阴性对照的KM2760的活性。

图32是表示质粒pKM1334LV3-3的构建步骤的图。

图33是表示通过BIAcore 2000测定抗FGF-8中和嵌合抗体KM3334、抗FGF-8中和CDR移植抗体HVOLV6/CHO、HVOLV3-1/CHO、HVOLV4-3/CHO、HVOLV3-3/CHO对FGF-8的结合活性的结果的图。横轴表示时间(秒),纵轴表示共振信号(RU)。

图34是表示抗FGF-8中和嵌合抗体KM3334、抗FGF-8中和CDR移植抗体HVOLV6/CHO、HVOLV3-1/CHO、HVOLV4-3/CHO、HVOLV3-3/CHO对小鼠乳腺癌细胞株SC-3细胞的FGF-8的结合活性的结果的图。横轴表示抗体浓度( $\mu\text{g/mL}$ ),纵轴表示将只添加了FGF-8时的增殖作为100%时的相对增殖(%)。○为KM3034、●为HVOLV6/CHO、△为HVOLV3-1/CHO、▲为HVOLV4-3/CHO、■为HVOLV3-3/CHO、×为阴性对照的KM2760的活性。

### 具体实施方式

以下给出本发明的实施例和参考例。

实施例1 兔软骨细胞的FGF-8引起的细胞外基质的分解和抗体引起的抑制

兔关节软骨细胞是按照田村等人的方法(Tamura T. et al., Eur. J. Pharmacol., 419, 269-274, 2001)从3周龄的雌性新西兰白兔的两膝和肩分离培养的。即摘出两膝关节和两肩关节,采取骨端软骨。用磷

酸缓冲生理盐水洗净后，将软骨切碎，通过在含有0.4%肌动蛋白酶（アクチナ-ゼ）E的添加10vol% FBS的DMEM（以下将含有FBS的DMEM记为FBS/DMEM）中，37℃下处理1小时，再在含有0.025w/v%的胶原酶P的添加10vol% FBS的DMEM中，37℃下处理5~6小时，将软骨细胞从软骨组织中分离出来、采取。将采取的软骨细胞悬浮于10vol% FBS/DMEM，调整到100,000个/mL。将含有该软骨细胞的培养液接种到24孔板的各个孔中，每孔1mL，然后在5% CO<sub>2</sub> - 95%空气气相下于37℃下进行培养。在软骨细胞达到铺满程度后，将培养液置换成0.5vol% FBS/DMEM，培养24小时。除去培养液，添加1mL的0.5vol% FBS/DMEM（无刺激组），或含有FGF-8[1、10或100ng/mL; Peprtech公司生产]的0.5vol% FBS/DMEM后培养48小时。在研究抗FGF-8中和抗体的作用时，添加1mL含有FGF-8（100ng/mL）的0.5vol% FBS/DMEM（0组），或含有FGF-8（100ng/mL）和抗FGF-8中和抗体KM1334（1、3或10μg/mL）的0.5vol% FBS/DMEM后培养48小时。除去培养液，通过二甲基亚甲基法（DMMB）（Chandrasekhar S. et al., Anal. Biochem. 161 103-108, 1987）对残留在板上的细胞外基质的葡萄糖胺聚糖量进行测定。即，向加入5mmol/L L-半胱氨酸盐酸盐-水和物后活化的保存用番木瓜蛋白酶缓冲液（0.1mol/L乙酸钠、50mmol/L EDTA、pH5.8）加入终浓度为20μg/mL的番木瓜蛋白酶（Sigma Aldrich公司生产），将该液添加到培养上述软骨细胞的板的各个孔中，每孔1mL，于60℃下消化过夜。向75μL的该消化液添加25μL盐酸胍缓冲液（2.88mol/L盐酸胍、50mmol/L乙酸钠、pH6.8）和200μL DMMB溶液，测定530/590nm的吸光度。由作为标准使用的硫酸软骨素（来自鲸的软骨，生化学工业公司生产）的吸光度算出各个样品的葡萄糖胺聚糖的浓度。实验在各个条件下都进行了3例，求平均值和标准误差。

图1和图2给出了算出的结果。FGF-8在100ng/mL浓度下可以使细胞外基质中的葡萄糖胺聚糖残存量显著地降低（图1）。

这表明FGF-8具有促进细胞外基质的分解的作用。另外，抗FGF-8中和抗体KM1334在3μg/mL以上的抗体浓度下对FGF-8促进软骨

的细胞外基质的分解显著地抑制（图2）。因此通过给予抗FGF-8中和抗体可以抑制关节炎的细胞外基质的分解。

**实施例2 FGF-8促进兔软骨细胞的细胞外基质金属蛋白激酶3的产生和抗体引起的抑制**

兔关节软骨细胞是按照实施例1所述方法分离培养的。在软骨细胞达到铺满程度后，将培养液置换成0.5vol% FBS/DMEM，培养24小时。除去培养液，添加1mL的0.5vol% FBS/DMEM（无刺激组），含有FGF-8（100ng/mL）的0.5vol% FBS/DMEM(0组)、或含有FGF-8（100ng/mL）和抗FGF-8中和抗体KM1334（1、3或10 $\mu$ g/mL）的0.5vol% FBS/DMEM后培养48小时。48小时后，回收培养液，用兔细胞外基质金属蛋白激酶3 ELISA系统（Amersham·Biosciences公司生产）测定培养液中的细胞外基质金属蛋白激酶3浓度。实验在各个条件下都进行了3例，求平均值和标准误差。

图3给出了实验结果。FGF-8在100ng/mL浓度下可以使来自软骨细胞的细胞外基质金属蛋白激酶3量显著地增加（无刺激组对0组、 $P=0.0079$ ）。这表明FGF-8通过来自软骨细胞的细胞外基质金属蛋白激酶3的产生诱导具有促进细胞外基质的分解的作用。另外，抗FGF-8中和抗体KM1334在1 $\mu$ g/mL以上的抗体浓度下对FGF-8促进软骨细胞的细胞外基质金属蛋白激酶3的产生显著地抑制（图2）。抗FGF-8中和抗体KM1334的1、3或10 $\mu$ g/mL的抑制率分别为72、74、100%。因此通过给予抗FGF-8中和抗体可以抑制来自软骨细胞的细胞外基质金属蛋白激酶3的产生，抑制关节炎的细胞外基质的分解。

**实施例3 FGF-8促进兔滑膜细胞的增殖和抗体产生的抑制**

兔关节滑膜细胞是按照Hamilton等人的方法（Hamilton J.and Slywka J.,J.Immunol.126,851-855,1981）采集。将分离的滑膜细胞悬浮于含有10vol% FBS的RPMI 1640培养基（以下将含有FBS的RPMI 1640培养基记为FBS/RPMI 1640培养基），每10,000个接种到96孔的培养板

中，培养24小时后，除去各个孔的培养液，添加200 $\mu$ L的0.2vol % FBS/RPMI 1640（无刺激组），或含有FGF-8（1、10或100ng/mL）的0.2vol % FBS/RPMI 1640。当研究抗FGF-8中和抗体的作用时，向各个孔添加200 $\mu$ L含有FGF-8（100ng/mL）的0.2vol % FBS/RPMI 1640（0组），或含有FGF-8（100ng/mL）和抗FGF-8中和抗体KM1334（0.1、0.3、1、3或10 $\mu$ g/mL）的0.2vol % FBS/RPMI 1640。培养48小时后，每孔添加9.25kBq的 $^3$ H]胸腺嘧啶。再培养24小时，用液相闪烁计数器（1205 $\beta$ 板，Perkin Elmer Life science 日本）测定整合到细胞内的 $^3$ H]胸腺嘧啶的放射性活性。实验在各个条件下都进行了6例，求平均值和标准误差。

图4和图5给出了实验结果。FGF-8在100ng/mL浓度下可以有意义地促进 $^3$ H]胸腺嘧啶向兔滑膜细胞的整合（图4）。这表明FGF-8具有促进兔滑膜细胞增殖的作用。另外，抗FGF-8中和抗体KM1334在3 $\mu$ g/mL以上的抗体浓度下对依赖FGF-8的 $^3$ H]胸腺嘧啶整合的促进显著地抑制（图5）。因此通过给予抗FGF-8中和抗体可以抑制关节炎的滑膜的增殖。

#### 实施例4 FGF-8促进人滑膜细胞的增殖和抗体产生的抑制

使用关节风湿病患者的人滑膜细胞（由东洋纺购入），进行与实施例3同样的实验。FGF-8的浓度为10、100或500ng/mL，与抗FGF-8中和抗体KM1334共存的FGF-8浓度调整到500ng/mL。实验在各个条件下都进行了6例，求平均值和标准误差。

图6和图7给出了实验结果。FGF-8在500ng/mL浓度下可以显著地促进 $^3$ H]胸腺嘧啶向人滑膜细胞的整合（图6）。这表明FGF-8具有促进人滑膜细胞增殖的作用。另外，抗FGF-8中和抗体KM1334在1 $\mu$ g/mL以上的抗体浓度下对依赖FGF-8的 $^3$ H]胸腺嘧啶整合的促进显著地抑制（第7图）。因此通过给予抗FGF-8中和抗体可以抑制关节炎的滑膜的增殖。

### 实施例5 使用抗FGF-8抗体的滑膜染色

从人关节风湿病患者摘出滑膜，按照文献的方法（Tanaka A. et al, Cancer Res. 58, 2053-2056, 1998），制作石蜡切片，用抗FGF-8抗体KM1334进行组织免疫染色。结果4例人关节风湿病中有3例的滑膜细胞中FGF-8呈阳性。因此，可以确认FGF-8存在于人滑膜中。另外通过使用抗FGF-8抗体检测人关节风湿病的滑膜细胞，可以判定人关节风湿病。

### 实施例6 由关节内注入FGF-8而诱发的关节炎

用FGF-8，象以下那样诱发Sprague-Dawley系大鼠（雄性、7周龄、日本チャールス・リバー公司）关节炎样病症。使用生理盐水（大塚制药工厂公司生产）终浓度为1mg/mL那样地制备的50 $\mu$ L FGF-8注入到大鼠膝关节内。另外，建立向膝关节内注入50 $\mu$ L生理盐水的对照组。一组3只。注入FGF-8或生理盐水3天后，按照Yamada等人的方法（Yamada A. et al., Inflamm. Res., 49, 144-146, 2000），用含有0.38% w/v柠檬酸钠的生理盐水30 $\mu$ L洗膝关节包内，回收洗净液。该操作重复进行10次，回收300 $\mu$ L的关节洗净液。按照实施例1所述的DMMB法测定关节洗净液中的葡萄糖胺聚糖的量。另外，将膝关节的膝盖骨取出，按照实施例1所述的方法用番木瓜蛋白酶消化软骨部分，测定硬骨的重量。

图8和图9给出了实验结果。图8表示关节洗净液中的葡萄糖胺聚糖的浓度。由于注入FGF-8，关节洗净液中的葡萄糖胺聚糖的浓度比注入生理盐水组上升1.9倍（ $P = 0.0034$ ）。这表明由于FGF-8的注入，关节软骨的细胞外基质分解亢进。图9表示番木瓜蛋白酶消化后的膝盖骨重量。由于FGF-8的注入，膝盖骨的重量下降到注入生理盐水组的40%（ $P = 0.0454$ ）。这表明由于FGF-8的注入，膝盖骨的破坏亢进。因此，FGF-8在生物体内诱导关节破坏，引起关节炎那样的症状。

### 实施例7 用小鼠·胶原关节炎模型的评价

小鼠·胶原关节炎模型用DBA/1J系小鼠（雄性、7周龄、日本チャ-

ルス・リバ - 公司 ) , 按照鎌田等人的方法 ( Kamada H. et al., Jpn. J. Pharmacol., 70, 169-175, 1996 ) 象以下那样制作。

将来自牛软骨的II型胶原溶液 ( 胶原技术研修公司生产 ) 在冰冷下与付氏完全佐剂 ( ヤトロン公司生产 ) 混合, 使其形成乳剂, 将II型胶原的终浓度调整到1.5mg/mL, 然后将调整后的乳剂100 $\mu$ L注射到鼠的尾根部皮内, 进行致敏, 再于21天后, 按照同样操作进行追加免疫。一组10只。对于给予KM1334组, 用生理盐水 ( 大塚制药工厂公司生产 ) 将抗FGF - 8抗体KM1334溶解, 使终浓度为2mg/mL, 于从上述小鼠·胶原关节炎模型的初次致敏开始后的第21、25、28、32、35和39天, 1天1次地向各个个体腹腔内给药200 $\mu$ L。另外对于给予生理盐水对照组, 代替抗FGF - 8抗体KM1334溶液, 只向腹腔内注入生理盐水。而作为阳性对照, 对于给予双氯芬酸组, 将非甾体抗炎药双氯芬酸钠 ( Sigma Aldrich 公司生产 ) 溶解于0.5w/v% 甲基纤维素溶液中, 终浓度为0.3mg/mL, 于从上述小鼠·胶原关节炎模型的初次致敏开始后的第21、25、28、32、35和39天, 1天1次地按照每100g体重1mL经口给药。另外预设未处置组, 不进行胶原致敏和给药。胶原关节炎中的全肢浮肿的随时间变化用一肢0到4分、全肢合计最高16分的记分评价。记分基准为0: 正常; 1: 发现弱红斑, 2: 发现弱肿胀和红斑, 3: 发现强肿胀和红斑, 通过触知发现温感, 4: 发现随着手指变形引起显著的肿胀。

图10给出了实验结果。在给予抗FGF - 8抗体KM1334组, 在第42天确认34% (  $P = 0.0204$  ) 的显著的关节炎记分的抑制, 其抑制程度与阳性对照的给予双氯芬酸组同等程度 ( 图10 )。这表明通过给予抗FGF - 8中和抗体, 可以抑制关节炎。

#### 实施例8 用大鼠·佐剂关节炎模型的评价

大鼠·佐剂关节炎模型用Lewis系大鼠 ( 雌性、8周龄、日本チャールス・リバ - 公司 ) , 按照 Pearson 等人的方法 ( Pearson CM. et al., Arth. Rheum., 5, 654-658, 1962 ) 象以下那样制作。

将 *Mycobacterium butyricum* ( デイフコ公司生产 ) 悬浮于液体石

蜡（和光纯药工业公司生产），终浓度为6mg/mL，高压灭菌，然后将灭菌后的溶液100 $\mu$ L注射到大鼠的右侧足趾部皮内，进行致敏。一组8~10只。对于给予KM1334组，用生理盐水将抗FGF-8抗体KM1334溶解，使终浓度为2mg/mL，于从上述大鼠·佐剂关节炎模型的致敏日以及致敏开始后的第3、7、10、14和17天，1天1次地向各个个体腹腔内给药0.5mL $\mu$ L。另外对于给予生理盐水组，代替抗FGF-8抗体KM1334溶液只向腹腔内注入生理盐水。而作为阳性对照，对于给予双氯芬酸组，将消炎药双氯芬酸钠溶解于0.5w/v%甲基纤维素溶液中，终浓度为0.3mg/mL，于从佐剂致敏日开始后的第4、从7开始的11天、从14开始的第18天，1天1次地按照每100g体重1mL经口给药。对于给予甲氨蝶呤组，将作为代谢拮抗药的注射用甲氨蝶呤<sup>R</sup>50mg（日本ワイスレダリ-公司生产）悬浮于0.5w/v%甲基纤维素溶液中，终浓度为0.01mg/mL，象与双氯芬酸组同样那样给药。对于氢化泼尼松给予组，将作为甾体类药物氢化泼尼松（Sigma-Aldrich公司生产）悬浮于0.5w/v%甲基纤维素溶液中，终浓度为0.3mg/mL，象双氯芬酸组那样给药。另外作为溶剂给予组，同样经口只给予0.5w/v%甲基纤维素溶液。另外预设未处置组，进行Mycobacterium butyricum致敏和给药。佐剂处置足和非处置足的容积用大鼠后肢足浮肿测定装置（TK-101、ユニコム公司生产）随时间进行测定。

图11和图12给出了致敏后第21天的测定结果。在抗FGF-8中和抗体KM1334给予组，于佐剂非处置足可以看到69%（ $P=0.0010$ ）的显著的足容积增加的抑制（图11）。在双氯芬酸给予组可以看到45%（ $P<0.0001$ ），在甲氨蝶呤给予组可以看到90%（ $P<0.0001$ ），在氢化泼尼松给予组可以看到51%（ $P=0.0029$ ）的显著的足容积增加的抑制（图12）。即，抗FGF-8中和抗体KM1334表现出比双氯芬酸或氢化泼尼松高的浮肿抑制作用。

用致敏开始后第20天至第21天24小时蓄尿，测定尿中的葡萄糖胺聚糖、脱氧吡啶啉、羟脯氨酸以及肌酸酐。尿中的葡萄糖胺聚糖量按照实施例1所述的DMMB法进行测定。尿中羟脯氨酸量按池田等人方法（池

田真悟等, 东京卫研年报.36, 277 - 282, 1985) 进行测定。即, 向0.8mL尿中添加0.8mL氨基酸分析用盐酸(关东化学公司生产), 于110℃下水解15小时。向水解的样品0.5mL添加2mL的1.2mol/L的氢氧化钠溶液, 进行中和。向0.5mL中和处理的样品中添加1mL异丙醇, 添加1mLOxidant溶液后充分搅拌, 于室温下静置5分钟。Oxidant溶液是将醋酸钠3水和物5.7g、柠檬酸三钠2水和物3.75g、柠檬酸一水和物0.602g溶解于约50mL蒸馏水中, 加38.5mL异丙醇, 再加蒸馏水, 成为100mL的醋酸柠檬酸缓冲液, 使用时将该缓冲液与用蒸馏水配制的7w/v%氯胺T溶液(对甲苯磺酰胺钠三水和物, 和光纯药工业公司生产)按照4:1比例充分混合后的溶液。然后添加1mL Ehrlich试剂, 充分搅拌, 于恒温器中于60℃, 加热20分钟。Ehrlich试剂是将17.6g的p-二甲基氨基苯醛(和光纯药工业公司生产)溶解于20.9mL的过氯酸(关东化学公司生产), 加异丙醇做成100mL的溶液。加温后, 用流水冷却, 测定562nm的吸光度。用L-羟脯氨酸(和光纯药工业公司生产)的吸光度做成的检量线, 算出各个样品的羟脯氨酸浓度。尿中的脱氧吡啶啉量用オリンクス「DPD」(住友制药公司生产)测定。尿中的肌酸酐量用肌酸酐测试和光(和光纯药工业公司生产)检测。由于要对个体间的尿浓度的差进行修正, 对于每个个体算出葡萄糖胺聚糖浓度/肌酸酐浓度、脱氧吡啶啉浓度/肌酸酐浓度、或羟脯氨酸浓度/肌酸酐浓度的比, 作为各自的指标。

图13到图17给出了实验结果。尿中的葡萄糖胺聚糖量在生理盐水给予组上升到未处置组的2.2倍( $P < 0.0001$ ) (图13)。这表明随着关节炎的进展, 软骨破坏亢进。在给予抗FGF-8中和抗体KM1334组, 对于尿中的葡萄糖胺聚糖量的上升, 可以看到73% ( $P = 0.0064$ ) 的显著的抑制(图13)。在给予甲氨蝶呤组, 可以看到对尿中的葡萄糖胺聚糖量的上升的79% ( $P = 0.0465$ ) 的显著的抑制。虽然不显著, 但在双氯芬酸给予组可以看到40%, 在氢化泼尼松给予组可以看到18%的尿中的葡萄糖胺聚糖量的降低(图14), 即, 抗FGF-8中和抗体KM1334显示出与甲氨蝶呤同等程度的软骨破坏抑制作用。

尿中的脱氧吡啶啉量在生理盐水给予组上升到未处置组的1.8倍 ( $P < 0.0001$ ) (图15)。这表明随着关节炎的进展, 软骨破坏亢进。在给予抗FGF-8中和抗体KM1334组, 对于尿中的脱氧吡啶啉量的上升, 可以看到41% ( $P = 0.0185$ ) 的显著的抑制。在双氯芬酸给予组可以看到88% ( $P = 0.0016$ ) 的显著的尿中的脱氧吡啶啉量上升的抑制。虽然不显著, 但在给予甲氨蝶呤组, 可以看到34%, 在氢化泼尼松给予组可以看到38%的脱氧吡啶啉量的降低 (图16)。即, 抗FGF-8中和抗体KM1334显示出超过甲氨蝶呤和氢化泼尼松的骨破坏抑制作用。

尿中的羟脯氨酸量在生理盐水给予组上升到未处置组的1.8倍 ( $P = 0.0002$ ) (图17)。这表明随着关节炎的进展, 骨破坏亢进。在给予抗FGF-8中和抗体KM1334组, 对于尿中的羟脯氨酸量的上升, 虽然不显著, 但可以看到48%的降低。

在致敏后第21天, 在胫骨骨干部切断佐剂非处置足, 采集, 用10vol% 磷酸缓冲液福尔马林溶液固定。然后, 用软X射线发生装置SOFRONSRO-M50 (ソフロン公司生产), 于29kV、4mA、2分钟条件下拍摄软X射线照片。用实体显微镜观察照片, 对骨破坏打分。打分是通过观察有无踵骨 (一边作为1个部位, 合计5个部位) 的骨糜烂, 有糜烂为1分, 没有为0分, 一肢最高为5分来进行。

第1表和第2表给出了打分结果。值表示平均值±标准误差, \*表示 $P < 0.05$ 、\*\*表示 $P < 0.01$ 、\*\*\*表示 $P < 0.001$  (溶剂给予组对比, Wilcoxon 顺位和检测)。

第1表

给予组	骨破坏打分	(抑制率)
未处置组	0.0±0.0	-
生理盐水	4.4±0.3	-
KM1334	3.2±0.5	27%

第2表

给予组	骨破坏打分	(抑制率)
未处置组	0.0±0.0	-
溶剂	4.6±0.3	-
双氯芬酸	3.1±0.6*	33%
甲氨蝶呤	0.9±0.4***	80%
氢化泼尼松	1.8±0.7**	61%

在给予抗FGF-8中和抗体KM1334组, 虽然不显著, 但可看到骨破坏打分的27%降低(第1表)。在双氯芬酸给予组可以看到33%( $P = 0.0362$ )、在给予甲氨蝶呤组, 可以看到80%( $P = 0.0006$ ), 在氢化泼尼松给予组可以看到61%( $P = 0.0032$ )骨破坏打分降低(第2表)。即, 抗FGF-8中和抗体KM1334显示出与双氯芬酸同等程度的骨破坏打分降低。

制作福尔马林固定的佐剂非处置足的石蜡切片。进行苏木精/伊红染色, 对从胫骨到中足骨的骨、关节和关节周围区域进行组织病理学评价。对于向关节周围组织或关节腔的血浆漏出通过一肢0到4分的打分进行评价。打分的基准为0: 没有变化, 1: 发现极轻度的变化, 2: 发现轻度变化, 3: 发现中等程度变化, 4: 发现重度变化。

第3表给出了结果。值表示平均值±标准误差, \*表示 $P < 0.05$ 、\*\*表示 $P < 0.01$ (生理盐水给予组对比, Wilcoxon顺位和检测)。

第3表

给予组	病理打分			
	向关节周围 的血液漏出	(抑制率)	向关节腔的 血细胞和血 浆漏出	(抑制率)
未处置	0.0±0.0	-	0.0±0.0	-
生理盐水	3.4±0.2	-	2.7±0.2	-
KM1334	2.0±0.4**	41%	1.6±0.3*	41%

在给予抗FGF-8中和抗体KM1334组,可以看到血浆向关节周围组织的漏出降低41% ( $P = 0.0022$ )、血细胞和血浆向关节腔的漏出降低41% ( $P = 0.0156$ ) (第3表)。因此通过给予抗FGF-8中和抗体,可以抑制关节炎中的浮肿形成,和软骨以及骨破坏。

### 实施例9 用小鼠·一碘代乙酸诱发变形性关节炎模型的评价

小鼠·佐剂关节炎模型用Sprague-Dawley系大鼠(雄性、7周龄、日本チャールス・リバー公司),按照Guingamp等人的方法(Guingamp C.et al.,*Arthritic Rheum.*,40,1670-1679,1997)象以下那样制作。

用生理盐水配制终浓度为10mg/mL的一碘代乙酸(Sigma Aldrich公司生产),将25 $\mu$ L配制的一碘代乙酸注入大鼠的右膝关节内。一组10只。对于KM1334给予组,用生理盐水(大塚制药工厂公司生产)溶解抗FGF-8中和抗体,使终浓度为4mg/mL,在注入一碘代乙酸时,每100g体重向腹腔内一次注入0.5mL。而对于生理盐水组,取代抗体溶液,只向腹腔内注入生理盐水。另设置假手术组,将生理盐水注入膝关节内,不给药。一碘代乙酸注入3日后,按照实施例6所述的方法,回收关节洗净液。用实施例1所述的DMMB法测定关节洗净液中的葡萄糖胺聚糖量。

图18给出了测定结果。由于一碘代乙酸的注入,关节洗净液中的葡萄糖胺聚糖浓度上升到假手术组的1.6倍( $P = 0.0014$ )。这表明由于一碘代乙酸注入,关节软骨的细胞外基质分解亢进。对于由于一碘代乙酸注入使得关节洗净液中的葡萄糖胺聚糖浓度上升,在抗FGF-8中和抗体给予组,可以看到42% ( $P = 0.0188$ )的有意义的抑制。因此,通过给予抗FGF-8中和抗体,可以抑制关节炎中的关节软骨的破坏。

### 参考例1 抗FGF-8中和嵌合抗体的生产

#### 1.编码小鼠的抗FGF-8中和抗体的V区的cDNA的分离和解析

(1)从生产小鼠的抗FGF-8中和抗体的杂交瘤细胞制备mRNA  
使用mRNA制备试剂盒ファストトラックmRNA分离试剂盒(イン

ビトロジエン公司生产), 按照附带的使用说明书从生产小鼠的抗FGF-8中和抗体的杂交瘤KM1334 (FERM BP-5451、特开平9-271391) 的 $1 \times 10^7$ 细胞制备约 $8 \mu\text{g}$ 的mRNA。

### (2) 抗FGF-8中和鼠抗体的H链和L链cDNA文库的制作

使用タイムセ-バ-cDNA合成试剂盒 (Amersha Biosciences公司生产), 按照附带的使用说明书由上述(1)中获得的KM1334的mRNA  $5 \mu\text{g}$ 合成两端含有EcoRI-NotI接头的cDNA。然后, 使用 $\lambda$ ZAPII克隆试剂盒 (ストラタジ-ン公司生产), 制作cDNA文库。首先, 将cDNA全量溶解于 $20 \mu\text{L}$ 的灭菌水后, 通过琼脂糖凝胶电泳进行分级, 分别回收大约 $0.1 \mu\text{g}$ 的对应于IgG类抗体的H链的约 $1.5 \text{kb}$ 的cDNA片段和对应于 $\kappa$ 类的L链的约 $1.0 \text{kb}$ 的cDNA片段。然后, 按照附带的使用说明书将约 $1.5 \text{kb}$ 的cDNA片段 $0.1 \mu\text{g}$ 以及约 $1.0 \text{kb}$ 的cDNA片段 $0.1 \mu\text{g}$ 和用限制性内切酶RcoRI消化后经小牛小肠由来的碱性磷酸酶对末端进行脱磷酸化的 $\lambda$ APII载体 $1 \mu\text{g}$ 连接起来。

使用Gigapack II Packaging Extracts Gold (ストラタジ-ン公司生产), 按照附带的使用说明书, 将连接后的各个反应液中的 $4 \mu\text{L}$ 包装到 $\lambda$ 噬菌体中, 使适量的噬菌体感染大肠杆菌菌株XL1-Blue (ストラタジ-ン公司生产), 作为KM1334的H链cDNA文库和L链cDNA文库分别获得约 $8.1 \times 10^4$ 个和 $5.5 \times 10^4$ 个的噬菌体克隆。接下来, 按照常规方法 (《分子克隆》, 第3版), 将各个噬菌体固定于尼龙膜上。

### (3) 抗FGF-8中和小鼠抗体的H链和L链cDNA的克隆

使用ECL直接核酸标记检测系统 (ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection Systems, Amershm Biosciences公司生产), 按照附带的使用说明书, 以含有小鼠抗体的C区的cDNA [H链含有鼠 $C\gamma 1$ cDNA的DNA片段 (French D.L.et al., J/Immunol., 146, 2010-2016, 1991), L链含有鼠 $C\kappa$ cDNA的DNA片段 (Hieter P.A.et al., Cell, 22, 197-207, 1980)] 作为探针检测上述(2)制作的KM1334的H链cDNA文库和L链cDNA文库的尼龙膜, 获得H链、L链各10个与探针密切结合的噬菌体克隆。接下来, 按照 $\lambda$ ZAPII克隆试剂盒 (ストラタジ-

ン公司生产)的使用说明书,通过体内切除(in vivo excision)将各个噬菌体克隆转换为质粒。使用Big Dye Terminator Kit Ver.2(0)和DNA测序仪决定上述得到的各个质粒中含有的cDNA的碱基序列。结果,得到了含有存在推定cDNA的5'末端起始密码子为ATG序列存在的全长的功能的H链cDNA的质粒pKM1334H7-1和含有L链cDNA的质粒pKM1334L7-1。

#### (4) 抗FGF-8中和小鼠抗体的V区的氨基酸序列解析

序列1表示质粒pKM1334H7-1含有的VH的全碱基序列、序列2表示推定的全氨基酸序列、序列3表示质粒pKM1334L7-1含有的VL的全碱基序列、序列4表示推定的全氨基酸序列。由与已知的小鼠抗体的序列资料(Sequence of Proteins of Immunological interest)的比较和与通过使用蛋白质测序仪PPSQ-10(岛津制作所制造)进行自动Edman降解对纯化的抗FGF-8中和小鼠抗体KM1334的H链和L链的N末端氨基酸序列解析的结果比较,分离的各个cDNA是编码含有分泌信号序列的抗FGF-8中和小鼠抗体KM1334的全长cDNA,就H链来说,序列2表示的氨基酸序列的1至19,就L链来说,序列4表示的氨基酸序列的1至19是分泌信号序列。序列5和6分别表示除去分泌信号序列的VH和VL的氨基酸序列。

接下来,就抗FGF-8中和小鼠抗体KM1334的VH和VL的氨基酸序列是否为新的序列进行研究。作为序列解析系统使用GCG数据库[版本9.1、Genetics Computer Group公司制作],通过BLAST(Altschul S.F. et al., J.Mol.Biol.,215,403-410,1990)对已知的蛋白质的氨基酸序列数据[PIR-Protein(Release 56.0)]进行检索。结果,没有看到与H链、L链完全一致的序列,确认抗FGF-8中和小鼠抗体KM1334的VH和VL的氨基酸序列是新的氨基酸序列。

另外,通过与已知的抗体的氨基酸序列比较,对抗FGF-8中和小鼠抗体KM1334的VH和VL的氨基酸序列进行了鉴定。序列7、8和9分别表示抗FGF-8中和小鼠抗体KM1334的VH的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列,序列10、11和12分别表示VL的CDR1、CDR2和CDR3的氨

基酸序列。

## 2. 抗FGF-8中和嵌合抗体用动物细胞稳定表达

(1) 含有编码抗FGF-8中和嵌合抗体的VH的DNA的质粒pKM1334CH-H5的构建

以参考例1的1.(3)得到的50ng的质粒pKM1334H7-1为模板,以分别含有序列13、14所述的碱基序列的合成DNA[GENSET公司生产]作为引物,使他们的终浓度为 $0.3\mu\text{mol/L}$ ,按照KOD Plus聚合酶(东洋纺织公司生产)附带的使用说明书,总量为 $50\mu\text{L}$ ,首先在 $94^\circ\text{C}$ 加热2分钟后,于 $94^\circ\text{C}$ 15秒钟、 $57^\circ\text{C}$ 30秒钟、 $68^\circ\text{C}$ 1分钟的条件下进行30次循环的PCR。对该反应液进行纯化后,溶解于灭菌水,用10单位的限制性内切酶EcoRI(宝酒造公司生产),于 $37^\circ\text{C}$ 下反应1小时。将该反应液通过琼脂糖凝胶电泳进行分级,回收约 $0.3\mu\text{g}$ 的约 $0.48\text{kb}$ 的EcoRI片段(5'末端一侧为EcoRI、3'末端一侧为平末端)。

然后,使10单位的限制性内切酶EcoRI和10单位的限制性内切酶EcoRV(宝酒造公司生产)于 $37^\circ\text{C}$ 下与 $3\mu\text{g}$ 的质粒pBluescript SK(-)反应1小时。将该反应液通过琼脂糖凝胶电泳进行分级,回收约 $2\mu\text{g}$ 的约 $2.95\text{kb}$ 的EcoRI-EcoRV片段。

然后,将上述得到的编码VH的DNA的EcoRI片段 $0.1\mu\text{g}$ 和来自质粒pBluescript SK(-)的EcoRI-EcoRV片段 $0.1\mu\text{g}$ 加到总量 $10\mu\text{l}$ 的灭菌水中,用Ligation High(东洋纺织公司生产)进行连接。用这样得到的重组质粒DNA溶液转化大肠杆菌XL1-Blue株,得到图19给出的含有编码抗FGF-8中和嵌合抗体的VH的DNA的质粒pKM1334CH-H5。

(2) 编码抗FGF-8中和嵌合抗体的LH的DNA的质粒的构建

以参考例1的1.(3)得到的50ng的质粒pKM1334L7-1为模板,以分别含有序列15、16所述的碱基序列的合成DNA(ジェンセット公司生产)作为引物,使他们的终浓度为 $0.3\mu\text{mol/L}$ ,按照KOD Plus聚合酶附带的使用说明书,总量为 $50\mu\text{L}$ ,首先在 $94^\circ\text{C}$ 加热2分钟后,于 $94^\circ\text{C}$ 15秒钟、 $57^\circ\text{C}$ 30秒钟、 $68^\circ\text{C}$ 1分钟的条件下进行30次循环的PCR。对该反应液进行纯化后,溶解于灭菌水,用10单位的限制性内切酶EcoRI于 $37^\circ\text{C}$

下反应1小时。将该反应液通过琼脂糖凝胶电泳进行分级，回收约0.3 $\mu$ g的约0.45kb的EcoRI片段（5'末端一侧为EcoRI、3'末端一侧为平末端）。

然后，将上述得到的编码VL的DNA的EcoRI片段0.1 $\mu$ g和来自质粒pBluescript SK(-)的EcoRI-EcoRV片段0.1 $\mu$ g加到总量10 $\mu$ l的灭菌水中，用Ligation High进行连接。用这样得到重组质粒DNA溶液转化大肠杆菌XL1-Blue株，得到图20给出的含有编码抗FGF-8中和嵌合抗体的VL的DNA的质粒pKM1334CH-L4。

### （3）抗FGF-8中和嵌合抗体表达载体pKANTEX1334的构建

用WO97/10354所述的人源化抗体表达用载体pKANTEX93和参考例1的2.(1)和(2)得到的质粒pKM1334CH-H5和pKM1334CH-L4，象下述那样构建抗FGF-8中和嵌合抗体表达载体pKANTEX1334。

向参考例1的2.(1)得到的3 $\mu$ g的质粒pKM1334CH-H5中添加10单位的限制性内切酶NotI[New England Biolabs公司生产]和10单位的限制性内切酶ApaI（宝酒造公司生产），于37 $^{\circ}$ C下反应1小时。将该反应液通过琼脂糖凝胶电泳进行分级，回收约0.2 $\mu$ g的约0.48kb的NotI-ApaI片段。

然后向3 $\mu$ g的人源化抗体表达用载体pKANTEX93中添加10单位的限制性内切酶ApaI（宝酒造公司生产）和10单位的限制性内切酶NotI，于37 $^{\circ}$ C下反应1小时。将该反应液通过琼脂糖凝胶电泳进行分级，回收约2 $\mu$ g的约12.8kb的ApaI-NotI片段。

接下来，将上述得到的来自质粒pKM1334CH-H5的NotI-ApaI片段0.1 $\mu$ g和来自质粒pKANTEX93的ApaI-NotI片段0.1 $\mu$ g加到总量10 $\mu$ l的灭菌水中，用Ligation High进行连接。用这样得到的重组质粒DNA溶液转化大肠杆菌XL1-Blue株，得到图21所示的质粒pKANTEX1334H。

向参考例1的2.(2)得到的3 $\mu$ g的质粒pKM1334CH-L4中添加10单位的限制性内切酶EcoRI和10单位的限制性内切酶BsiWI（New England Biolabs公司生产），于37 $^{\circ}$ C下反应1小时。将该反应液通过琼脂糖凝胶电泳进行分级，回收约0.2 $\mu$ g的约0.45kb的EcoRI-BsiWI片段。

然后用10单位的限制性内切酶EcoRI和限制性内切酶BsiWI与上述

得到的3 $\mu$ g的质粒pKANTEX1334H于37 $^{\circ}$ C下反应1小时。将该反应液通过琼脂糖凝胶电泳进行分级，回收约2 $\mu$ g的约13.30kb的EcoRI-BsiWI片段。

接下来，将上述得到的来自质粒pKM1334CH-L4的EcoRI-BsiWI片段0.1 $\mu$ g和来自质粒pKANTEX1334H的EcoRI-BsiWI片段0.1 $\mu$ g加到总量10 $\mu$ l的灭菌水中，用Ligation High进行连接。用这样得到重组质粒DNA溶液转化大肠杆菌XL1-Blue株，得到图21所示的质粒pKANTEX1334。

使用Big Dye Terminator Kit Ver.2和DNA测序仪，用得到的质粒pKANTEX1334 400ng进行碱基序列解析。结果确认得到了目的DNA被克隆的质粒。

#### (4) 抗FGF-8中和嵌合抗体用CHO/DG44细胞的稳定表达

用上述参考例1的2.(3)得到的抗FGF-8中和嵌合抗体表达载体pKANTEX1334，象以下那样进行以DHFR基因缺损的CHO细胞CHO/DG44细胞 (Urlaub G.and Chasin L.A., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 77,4216-4220,1980) 作为宿主的抗FGF-8中和嵌合抗体表达。

将10 $\mu$ g的质粒pKANTEX1334通过电穿孔法 (Miyaji H.et al.,Cytotechnology, 3,133-140,1990) 导入到 $1.6 \times 10^6$ 细胞的CHO/GD44细胞后，悬浮于10~30mL的IMDM-1 $\times$ HTsupplement-dFBS (10) [含有10%透析FBS (以下略为dFBS) 和1 $\times$ HTsupplement (インビトロジエン公司生产) 的IMDM培养基 (インビトロジエン公司生产)]，注入96孔微量培养板 (旭テクノグラス公司生产)，每孔分注100 $\mu$ L。于5% CO<sub>2</sub>培养箱内，在37 $^{\circ}$ C下培养24小时后，将培养液换成培养基IMDM-dFBS (10) [不含有HTsupplement，而含有10% dFBS的IMDM培养基]，再培养1~2周。从抗性菌落出现，且铺满的孔回收上清，通过下述的参考例1的2.(6)所示的ELISA测定上清中的抗FGF-8中和嵌合抗体的抗原结合活性。

对于确认培养上清中抗FGF-8中和嵌合抗体的表达的孔的转化体，再接种到24孔板中，目的是利用dhfr基因扩增体系，使抗体表达量

增加,用含有50nmol/L的作为dhfr的抑制剂的甲氨蝶呤(Sigma Aldrich公司生产,以下略为MTX)IMDM-dFBS(10)培养2周。再将MTX浓度提高到200nmol/L、500nmol/L,在各个阶段各培养2周,诱导表现出500nmol/L MTX抗性的转化株。在转化株铺满孔时,通过参考例1的2.(6)所述的ELISA测定上清中的抗FGF-8中和嵌合抗体的抗原结合活性。最终,得到在含有500nmol/L MTX的IMDM-dFBS(10)的培养基中可增殖、而且高效表达抗FGF-8中和嵌合抗体的转化株。对于得到的转化株,通过限界稀释法进行单一细胞化(克隆),将抗FGF-8中和嵌合抗体表达最高的转化细胞命名为KM3034。而KM3034于平成13年12月26日以FERM BP-7836保藏于独立行政法人产业技术综合研究所专利生物保藏中心(〒305-8566日本国茨城县筑波市东1丁目1番地中央第6)。

#### (5) 抗FGF-8中和嵌合抗体用YB2/0细胞的稳定表达

用上述参考例1的2.(3)得到的抗FGF-8中和嵌合抗体表达载体pKANTEK1334,象以下那样进行抗FGF-8中和嵌合抗体在大鼠骨髓瘤YB2/0细胞(ATCC No.CRL-1662)的表达。

将10 $\mu$ g的质粒pKANTEK1334通过电穿孔法导入4 $\times$ 10<sup>6</sup>细胞的YB2/0细胞后,悬浮于40mL的杂交瘤-SFM-FBS(5)[含有5%FBS(PAA实验室公司生产)的杂交瘤-SFM培养基(インビトロジエン公司生产)],注入96孔培养板(住友ベークライト公司生产),每孔分注200 $\mu$ L。于5%CO<sub>2</sub>培养箱内,在37℃下培养24小时后,添加终浓度为1mg/mL的G418后,培养1~2周。从出现表现出G418抗性的转化株的菌落,且铺满的孔回收培养上清,通过下述的参考例1的2.(6)所述的ELISA测定上清中的抗FGF-8中和嵌合抗体的抗原结合活性。

对于确认培养上清中抗FGF-8中和嵌合抗体的表达的孔的转化株,为了利用dhfr基因扩增体系使抗体表达量增加,将上述转化株悬浮于用含有1mg/mL的G418和50nmol/L MTX的杂交瘤-SFM-FBS(5)培养基中,使之变为1~2 $\times$ 10<sup>5</sup>细胞/mL,分注于24孔培养板,每孔为1mL。于5%CO<sub>2</sub>培养箱内,在37℃下培养1~2周诱导表现出50nmol/L MTX抗

性的转化株。通过参考例1的2.(6)所述的ELISA测定确认转化株增殖的孔的培养上清中的抗FGF-8中和嵌合抗体的抗原结合活性。

对于确认培养上清中的抗FGF-8中和嵌合抗体表达的孔的转化株,按照与上述同样的方法,使MTX浓度上升,得到在含有终浓度为1mg/mL的G418、200nmol/L MTX的杂交瘤-SFM-FBS(5)培养基中可增殖、而且高效表达抗FGF-8中和嵌合抗体的转化株5-D。对于得到的转化株,通过限界稀释法进行单一细胞化(克隆),得到抗FGF-8中和嵌合抗体表达最高的转化细胞株。将抗FGF-8中和嵌合抗体表达最高的转化细胞株命名为KM3334。

#### (6) 通过ELISA测定抗体对FGF-8部分肽的结合活性

作为可与抗FGF-8抗体反应的人FGF-8的部分肽,合成由与抗FGF-8中和小鼠抗体KM1334(特开平9-271391)的抗原肽相同序列的序列17表示的氨基酸序列构成的肽。序列17是在人FGF-8的氨基酸序列的23~46的序列的C末端附加了用于制作结合的半胱氨酸残基的序列。以下,将该肽称之为化合物1。为了用于ELISA,用以下的方法制作与牛血清清蛋白(ナカライテスク公司生产,以下略称为BSA)的结合(以下称之为BSA-化合物1)。即,在一边搅拌下,一边向含有10mg的BSA的PBS 900 $\mu$ L滴入100 $\mu$ L的25mg/mL SMCC[4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧基N-羧基琥珀酰亚胺酯, Sigma Aldrich公司生产]的DMSO溶液,缓慢搅拌30分钟。将1mL反应液载到用25mL的PBS平衡的凝胶过滤柱(NAP-10柱),将用1.5mL的PBS洗脱的洗脱液作为BSA-SMCC溶液。各个级分的BSA浓度用280nm的吸光度进行测定。然后向1.0mg的化合物1中加入200 $\mu$ L DMSO,再加入800 $\mu$ L PBS,使其完全溶解后,在搅拌下添加上述的BSA-SMCC溶液(BSA换算2.5mg),于室温下缓慢搅拌3小时。于4 $^{\circ}$ C下将反应液对PBS透析过夜,添加终浓度为0.05%的迭氮钠后,将经孔径0.22 $\mu$ m膜过滤器过滤后的溶液作为BSA-化合物1溶液。

以0.5~1.0 $\mu$ g/ml的浓度向96孔的ELISA用板(グライナ-公司生产)分注上述制备的BSA-化合物1溶液,每孔50 $\mu$ L,于4 $^{\circ}$ C下放置过夜,

使其吸附。用PBS洗净后，加入含有1% BSA的PBS（以下称之为BSA - PBS），每孔100 $\mu$ L，于室温下反应1小时，封闭残存的活性基团。用含有0.05% Tween的PBS（以下称之为Tween - PBS）洗净各孔后，加入转化株的培养上清或纯化抗体，每孔50 $\mu$ L，于室温下反应1小时。反应后的各孔用Tween - PBS洗净后，将用BSA - PBS稀释到3000 ~ 6000倍的过氧化物酶标记的山羊抗人IgG（H&L）抗体溶液[American Qualex公司生产]作为二次抗体溶液，每孔加50 $\mu$ L，于室温下反应1小时。反应后的各个孔用Tween - PBS洗净后，每孔加入50 $\mu$ L的ABTS底物溶液[0.55g的2,2-连氮基-二(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸)铵溶解于1L的0.1mol/L柠檬酸缓冲液(pH4.2)，在使用前以1 $\mu$ L/mL的比例添加30%过氧化氢的溶液]，进行发色反应，5分钟后，每孔加入50 $\mu$ L的5% SDS溶液，终止反应。然后测定415nm的吸光度。

### 3. 抗FGF - 8中和嵌合抗体的纯化

#### (1) 来自CHO/DG44细胞的表达细胞的培养和抗体的纯化

将参考例1的2.(4)中得到的表达抗FGF - 8中和嵌合抗体的转化细胞株KM3034，使终浓度为1 ~ 2 $\times 10^5$ 细胞/ml那样悬浮于含有500nmol/L MTX 的IMDM-dFBS (10)的培养基中，向175cm<sup>2</sup>烧瓶(グライナー公司生产)中各注入40mL。在5% CO<sub>2</sub>培养箱中于37℃下培养5 ~ 7日，达到铺满时除去培养上清，用20mL的PBS洗净细胞。除去PBS，加入40mL的EX - CELL 301培养基(JRH生物科学公司生产)，在5% CO<sub>2</sub>培养箱中于37℃下培养7 ~ 14日后，回收培养上清。用Prosep - A[Millipore公司生产]柱，按照附带的说明书，从培养上清中纯化抗FGF - 8中和嵌合抗体。得到的抗FGF - 8中和嵌合抗体取名为KM3034。

#### (2) 来自YB2/0细胞的表达细胞的培养和抗体的纯化

将参考例1的2.(5)中得到的表达抗FGF - 8中和嵌合抗体的转化细胞株KM3334，在175cm<sup>2</sup>烧瓶，用含有200nmol/L MTX 和5% ダイゴ GF21 (和光纯药公司生产)杂交瘤 - SFM培养基，在5% CO<sub>2</sub>培养箱中于37℃下进行培养。培养8 ~ 10天后，从回收的培养上清用Prosep - A柱，按照附带的说明书，纯化抗FGF - 8中和嵌合抗体。得到的抗FGF - 8中

和嵌合抗体取名为KM3334。

#### 4.纯化的抗FGF-8中和嵌合抗体的解析

按照众所周知的方法(Nature,227,680,1970)对在参考例1的3.中得到的通过各种动物细胞表达、纯化的2种抗FGF-8中和嵌合抗体KM3034和KM3334各4 $\mu$ g进行电泳,对分子量和纯度进行解析。确认纯化的各个抗FGF-8中和嵌合抗体无论哪一种在非还原条件下分子量都是约150Kd的单一的带,而在还原条件下存在约50Kd和约25Kd的2条带。这些分子量几乎与由抗体的H链和L链的cDNA的碱基序列推定的分子量(H链:约49Kd,L链:约23Kd,分子全体:约144Kd)一致,另外,IgG型抗体与在非还原条件下分子量约150Kd,在还原条件下分子内的S-S键被切断,分解为分子量约为50Kd的H链和约25Kd的L链的报道(Antibodies: A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,Chapter 14,1988;Monoclonal Antibodies:Principles and practice Academic Press Limited, 1996)一致,由此确认抗FGF-8中和嵌合抗体是以正确的结构的抗体分子表达的,而且被纯化的。

#### 5.纯化的抗FGF-8中和嵌合抗体的中和活性评价

纯化的抗FGF-8中和嵌合抗体的中和活性的评价通过以下所示的小鼠乳腺癌细胞株SC-3的FGF-8依赖性增殖的抑制效果(Tanaka A.et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 8928-8932, 1992)测定。即,向含有2%浓度的经活性炭处理的FBS的DMEM: Ham's F12(1:1)培养基[DMEM培养基和Ham's F12培养基,(インビトロジエン公司生产)以1:1混合的培养基]以 $3.0 \times 10^4$ 细胞/mL的浓度悬浮SC-3细胞,以每孔150 $\mu$ L( $4.5 \times 10^3$ 细胞)接种到96孔板。在5% CO<sub>2</sub>培养箱中于37 $^{\circ}$ C下18小时后,用每孔100 $\mu$ L的试验培养基进行培养基交换。试验培养基通过将50ng/mL的FGF-8(R&D公司生产)和各种稀释浓度的抗FGF-8中和嵌合抗体溶解于含有0.1% BSA的DMEM: Ham's F12(1:1)培养基制作。而作为阴性对照的抗体使用W001/64754报道的针对人趋化因子CCR4的嵌合抗体KM2760。在5% CO<sub>2</sub>培养箱中于37 $^{\circ}$ C下48小时后,换成新配制的试验培养基,再培养48小时。每孔添加10 $\mu$ L的WST-1试剂

(ロシユ公司生产), 轻轻搅拌后, 在5% CO<sub>2</sub>培养箱中于37℃下1小时, 然后测定吸光度 (OD<sub>450/650</sub>)。图22中横轴表示添加的抗体浓度、纵轴表示相对于只添加50ng/mL的FGF-8时增殖的相对增殖(%)。相对于只添加50ng/mL的FGF-8时增殖的相对增殖(%)通过下面式子算出。

$$\begin{aligned} & \text{(式) 相对于添加FGF-8时增殖的相对增殖(\%)} \\ & = \{ (\text{添加FGF-8和抗体时的吸光度} - \text{未添加FGF-8和抗体时的吸光度}) / \\ & \quad (\text{只添加FGF-8时的吸光度} - \text{未添加FGF-8和抗体时的吸光度}) \} \times 100 \end{aligned}$$

就象图22所示的那样, 抗FGF-8中和小鼠抗体KM1334、抗FGF-8中和嵌合抗体KM3034和KM3334无论哪一个都表现出同等的SC-3细胞增殖抑制活性, 没有看到嵌合抗体化引起中和活性的降低。

## 参考例2 抗FGF-8中和CDR移植抗体的制作

### 1. 编码抗FGF-8中和CDR移植抗体的VH和VL的DNA的构建

(1) 抗FGF-8中和CDR移植抗体的VH和VL的氨基酸序列的设计  
首先象以下那样设计抗FGF-8中和CDR移植抗体的VH和VL的氨基酸序列。选择用于移植参考例1的1项(4)中鉴定的抗FGF-8中和小鼠抗体KM1334的VH的CDR的氨基酸序列的人抗体的VH的FR的氨基酸序列。カバツト等人报道了从氨基酸序列的同源性将已知的各种各样的人抗体的VH分为3种亚类(HSG I~II), 以及对于每个亚类的共有序列(Sequences of Proteins of Immunological interest)。由于认为这些共有序列对于人免疫原性有降低的可能性, 所以以这些共有的序列作为基础, 设计了抗FGF-8中和CDR移植抗体的VH的氨基酸序列。为了制作活性更高的抗FGF-8中和CDR移植抗体, 在设计时, 在人抗体的VH的3种亚类的共有序列的FR的氨基酸序列中, 选择与KM1334的VH的FR的氨基酸序列具有最高的同源性的FR的氨基酸序列。在第4表中, 给出了同源性检索的结果。就象第4表所示那样, KM1334的VH的FR的

氨基酸序列具有与亚类I最高的同源性。

第4表

人抗体的VH的各个亚类的共通序列的FR的氨基酸序列和  
KM1334的VH的FR的氨基酸序列的同源性

HSG I	HSG II	HSG III
79.3%	51.7%	59.8%

根据以上结果，将KM1334的VH的CDR的氨基酸序列移植到人抗体的VH的亚类I的共有序列的FR的氨基酸序列的适当位置，设计了序列18给出的抗FGF-8中和CDR移植抗体的VH的氨基酸序列HV.0。

然后象以下那样设计抗FGF-8中和CDR移植抗体的VL的氨基酸序列。选择用于移植参考例1的1.(4)中鉴定的抗FGF-8中和小鼠抗体KM1334的VL的CDR的氨基酸序列的人抗体的VL的FR的氨基酸序列。カバツト等人报道了从氨基酸序列的同源性将已知的各种各样的人抗体的VL分为4种亚类(HSG I~IV)，以及对于每个亚类的共有序列(Sequences of Proteins of Immunological interest)。与VH的情形一样，在人抗体的VL的4种亚类的共通序列的FR的氨基酸序列中，选择与KM1334的VL的FR的氨基酸序列具有最高的同源性的FR的氨基酸序列。

在第5表中，给出了同源性检索的结果。就象第5表所示那样，KM1334的VL的FR的氨基酸序列具有与亚类II最高的同源性。

第5表

人抗体的VL的各个亚类的共通序列的FR的氨基酸序列和  
KM1334的VL的FR的氨基酸序列的同源性

HSG I	HSG II	HSG III	HSG IV
66.3%	83.8%	66.2%	73.8%

根据以上结果,将KM1334的VL的CDR的氨基酸序列移植到人抗体的VH的亚类II的共有序列的FR的氨基酸序列的适当位置,设计了序列19给出的抗FGF-8中和CDR移植抗体的VL的氨基酸序列LV.0。

上述设计的抗FGF-8中和CDR移植抗体的VH的氨基酸序列HV.0和VL的氨基酸序列LV.0只是将抗FGF-8中和小鼠抗体KM1334的CDR的氨基酸序列移植到选择的人抗体的FR的氨基酸序列的序列。在多数场合下,就人型CDR移植抗体来说,只是通过小鼠抗体的CDR的氨基酸序列的移植,结合活性就已经降低了。为了避免这一现象,比较人抗体和鼠抗体的FR的氨基酸序列,在不同的FR的氨基酸残基中,可以将认为对结合活性有影响的氨基酸残基与CDR的氨基酸序列一起进行移植。因此在本参考例中,也研究了认为对结合活性有影响的FR的氨基酸残基的鉴定。

首先,利用计算机模拟手法构建了由上述设计的抗FGF-8中和CDR移植抗体的VH的氨基酸序列HV.0和VL的氨基酸序列LV.0构成的抗体V区(HVOLVO)的三维结构。关于三维结构座标制作使用softwareAbM[Oxford Molecular公司生产],关于三维结构的表示使用软件Pro-Explore(Oxford Molecular公司生产)或RasMol[Glaxo公司生产],分别按照附带的使用说明书进行。而抗FGF-8中和小鼠抗体KM1334的V区的三维结构的计算机模型也同样构建。另外,在HVOLVO的VH和VL的FR的氨基酸序列中,就与抗FGF-8中和小鼠抗体KM1334不同的氨基酸残基,由为依次改变为在抗FGF-8中和小鼠抗体KM1334的相当位置看到的氨基酸残基的氨基酸序列构成的改变体的V区三维结构模型也同样构建,对抗FGF-8中和小鼠抗体KM1334、HVOLVO以及改变体的V区的三维结构进行比较。结果,在HVOLVO的FR的氨基酸残基中,作为认为使抗原结合部位的三维结构变化、对抗体活性有影响的残基,在HV.0中选择12位的Lys、13位的Lys、40位的Ala、41位的Pro、48位的Met、68位的Val、70位的Ile、74位的Thr、76位的Thr、82位的Glu、87位的Arg、95位的Tyr,在LV.0中选择2位的Ile、3位的Val、14位的Thr、15位的Pro、50位的Gln、51位的Leu、92

位的Tyr, 进行氨基酸改变。在这些选择的氨基酸残基中, 至少有一个以上改变为小鼠抗体KM1334中出现的氨基酸残基, 象以下那样设计具有各种各样改变的人型CDR移植抗体的VH和VL。

具体来说, 作为VH, 设计了将序列12位的Lys、13位的Lys、40位的Ala、41位的Pro、48位的Met、95位的Tyr 6个残基分别改变为鼠抗体KM1334中出现的氨基酸残基Ala、Arg、Arg、Ser、Ile、Phe的序列20给出的氨基酸序列HV.6。作为VL, 设计了将序列2位的Ile、14位的Thr、15位的Pro、50位的Gln、51位的Leu、92位的Tyr 6个残基分别改变为鼠抗体KM1334中出现的氨基酸残基Val、Ser、Leu、Lys、Val、Phe的序列21给出的氨基酸序列LV.6。

## (2) 编码抗FGF-8中和CDR移植抗体的VH的DNA的构建

利用PCR, 象以下那样构建编码参考例2的1项(1)设计的抗FGF-8中和CDR移植抗体的VH氨基酸序列HV.0的DNA。

首先, 将抗FGF-8中和小鼠抗体KM1334的H链的分泌信号序列(序列2的1~19位的氨基酸序列)与设计的氨基酸序列相连。然后将得到的氨基酸序列转换为遗传密码子。当对一个氨基酸存在多个遗传密码子时, 考虑抗体的基因的碱基序列中出现的使用频率(Sequences of Proteins of Immunological interest), 决定对应的遗传密码子。连接决定的遗传密码子, 设计编码完全抗体V区的氨基酸序列的DNA的碱基序列。在该碱基序列的5'端和3'端付加含有用于对人源化抗体表达用载体克隆的限制性内切酶识别序列, 另外在5'末端付加M13引物RV(宝酒造公司生产)的序列、3'末端付加与M13引物M4(宝酒造公司生产)序列互补的序列。将设计的碱基序列(序列22)从5'末端一侧开始每141个碱基, 末端20个碱基重复那样分成4段, 化学合成相当于各个序列的有意义链、反意义链、有意义链、反意义链的序列23~26所示序列构成的4条DNA(GENSET公司生产)。

按照KOD聚合酶附带的使用说明书, 用 $0.1\mu\text{mol/L}$ 的各个合成DNA、 $0.5\mu\text{mol/L}$ 的M13引物RV、 $0.5\mu\text{mol/L}$ 的M13引物M4以及2.5单位的KOD聚合酶(东洋纺织公司生产), 配制总量 $50\mu\text{L}$ 的PCR反应液, 进行PCR。

反应条件为在94℃加热5分钟后，进行每一循环为94℃30秒钟、50℃30秒钟、74℃60秒钟的30次循环，再于74℃加热5分钟。将该反应液进行乙醇沉淀后，溶解于灭菌水中，用10单位的限制性内切酶EcoRI和10单位的限制性内切酶SpeI（宝酒造公司生产），于37℃下反应1小时。将该反应液通过琼脂糖凝胶电泳进行分级，回收约0.3μg的约0.47kb的EcoRI-SpeI片段。

然后使10单位的限制性内切酶EcoRI和10单位的限制性内切酶SpeI与3μg的质粒pBluescript II SK（-）（ストラタジ-ン公司生产）于37℃下反应1小时。将该反应液通过琼脂糖凝胶电泳进行分级，回收约2.9μg的约2.95kb的EcoRI-SpeI片段。

然后，将上述得到的编码抗FGF-8中和CDR移植抗体的VH的PCR产物的EcoRI-SpeI片段0.1μg和质粒pBluescript SK（-）的EcoRI-SpeI片段0.1μg加到总量10μl的灭菌水中，用ligation high进行连接。用这样得到重组质粒DNA溶液转化大肠杆菌DH5α株（东洋纺织公司生产），从转化株的10个克隆制备各个质粒DNA，利用Big Dye Terminator Kit Ver.2和DNA测序仪进行碱基序列解析。碱基序列解析的结果，得到了图23给出的含有目的碱基序列的质粒pKM1334HVO。

与上述编码HV.0的DNA同样设计（序列27），用由序列28~31所示序列构成的4条合成DNA（GENSET公司生产），与上述同样通过PCR进行构建编码在参考例2的1.（1）设计的抗FGF-8中和CDR移植抗体的VH的氨基酸序列HV.6的DNA。采取与pKM1334HVO同样的过程，得到含有编码HV.6的DNA的质粒pKM1334HV6。

### （3）编码抗FGF-8中和CDR移植抗体的VL的DNA的构建

与编码HV.0的DNA同样设计编码参考例2的1项（1）设计的抗FGF-8中和CDR移植抗体的VL氨基酸序列LV.0的DNA（序列32）。但合成DNA的设计时，作为分泌信号序列，使用抗FGF-8中和小鼠抗体KM1334的L链的分泌信号序列（序列4的1~19位的氨基酸序列）。与编码HV.0的DNA同样，通过使用分别由序列33至36的序列构成的4条合成DNA（GENSET公司生产）的PCR，构建编码LV.0的DNA。采取与

pKM1334HVO同样的过程，得到含有编码LV.6的DNA的质粒pKM1334LV0。

另外，与编码LV.0的DNA同样设计编码参考例2的1项(1)设计的抗FGF-8中和CDR移植抗体的VL的氨基酸序列LV.6的DNA(序列37)，用分别由序列38至41的序列构成的4条合成DNA(GENSET公司生产)，象上述那样通过PCR构建。采取与pKM1334HVO同样的过程，得到含有编码LV.6的DNA的质粒pKM1334LV6。

## 2. 抗FGF-8中和CDR移植抗体表达载体的构建

用WO97/10354所述的人源化抗体表达用载体pKANTEX93和参考例2的1.(2)和(3)得到的质粒pKM1334HVO和pKM1334LV0，象下述那样构建抗FGF-8中和CDR移植抗体表达载体pKANTEX1334HVOLVO。

向参考例2的1.(2)得到的3 $\mu$ g的质粒pKM1334HVO中添加10单元的限制性内切酶ApaI和10单元的限制性内切酶NotI(宝酒造公司生产)，于37 $^{\circ}$ C下反应1小时。将该反应液通过琼脂糖凝胶电泳进行分级，回收约0.3 $\mu$ g的约0.47kb的ApaI-NotI片段。

然后向3 $\mu$ g的人源化抗体表达用载体pKANTEX93中添加10单元的限制性内切酶ApaI(宝酒造公司生产)和10单元的限制性内切酶NotI，于37 $^{\circ}$ C下反应1小时。将该反应液通过琼脂糖凝胶电泳进行分级，回收约2 $\mu$ g的约12.8kb的ApaI-NotI片段。

接下来，将上述得到的来自质粒pKM1334HVO的NotI-ApaI片段0.1 $\mu$ g和来自质粒pKANTEX93的NotI-ApaI片段0.1 $\mu$ g加到总量10 $\mu$ l的灭菌水中，用ligation high进行连接。用这样得到重组质粒DNA溶液转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ 株，得到图24所示的pKANTEX1334HVO。

然后，向参考例2的1.(3)得到的3 $\mu$ g的质粒pKM1334LVO中添加10单元的限制性内切酶EcoRI和10单元的限制性内切酶BsiWI，于37 $^{\circ}$ C下反应1小时。将该反应液通过琼脂糖凝胶电泳进行分级，回收约0.3 $\mu$ g的约0.45kb的EcoRI-BsiWI片段。

然后用10单元的限制性内切酶EcoRI和10单元的限制性内切酶

BsiWI与上述得到的3 $\mu$ g的质粒pKANTEX1334HVO于37 $^{\circ}$ C下反应1小时。将该反应液通过琼脂糖凝胶电泳进行分级，回收约2 $\mu$ g的约13.30kb的EcoRI-BsiWI片段。

接下来，将上述得到的来自质粒pKM1334LVO的EcoRI-BsiWI片段0.1 $\mu$ g和来自质粒pKANTEX1334HVO的EcoRI-BsiWI片段0.1 $\mu$ g加到总量10 $\mu$ l的灭菌水中，用ligation high进行连接。用这样得到重组质粒DNA溶液转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ 株，得到图24所示的pKANTEX1334HVOLVO。

使用Big Dye Terminator Kit Ver.2和DNA测序仪，用得到的质粒400ng进行碱基序列解析。结果确认得到了目的DNA被克隆的质粒。

另外，用上述参考例2的1.(2)得到的质粒pKM1334HVO和参考例2的1.(3)得到的质粒pKM1334LV6，用与上述同样的方法构建表达载体pKANTEX1334HVOLV6。

另外，用上述参考例2的1.(2)得到的质粒pKM1334HV6和参考例2的1.(3)得到的质粒pKM1334LV6，用与上述同样的方法构建表达载体pKANTEX1334HV6LV6。

### 3.抗FGF-8中和CDR移植抗体用YB2/0细胞的稳定表达

分别用上述参考例2的2.得到的抗FGF-8中和CDR移植抗体表达载体 pKANTEX1334HVOLVO、pKANTEX1334HVOLV6、pKANTEX1334HV6LV6，按照上述参考例1的2.(5)所述的方法通过YB2/0细胞进行抗FGF-8中和CDR移植抗体的稳定表达。

### 4. 抗FGF-8中和CDR移植抗体的纯化

按照上述参考例1的3.(2)所述的方法，从参考例2的3.中得到的来自表达各种抗FGF-8中和CDR移植抗体的YB2/0的转化株的培养和上清纯化抗FGF-8中和CDR移植抗体。将来自导入pKANTEX1334HVOLVO的转化株的抗体取名为HVOLVO，将来自导入pKANTEX1334HVOLV6的转化株的抗体取名为HVOLV6，将来自导入pKANTEX1334HV6LV6转化株的抗体取名为HV6LV6。

### 5.纯化的抗FGF-8中和CDR移植抗体的解析

按照上述参考例1的4.所述的方法，对在参考例2的4.得到的各种抗

FGF - 8中和CDR移植抗体进行SDS - PAGE。结果确认无论哪一种抗体都是以正确结构的抗体分子表达的，而且被纯化了。

6.通过ELISA进行抗FGF - 8中和CDR移植抗体对FGF - 8的结合活性的测定

在参考例2的4.得到的各种抗FGF - 8中和CDR移植抗体对FGF - 8的结合活性通过上述参考例1的2.(6)所述的ELISA测定。作为阳性对照使用来自参考例1的3.(2)得到的YB2/0细胞的抗FGF - 8中和嵌合抗体KM1334。结果如图25所示。就象图25所示的那样，无论哪一种抗FGF - 8中和嵌合抗体都表现出与KM3334同等的FGF - 8结合活性，没有看到由于CDR移植引起的明显的结合活性的下降。

7. 抗FGF - 8中和CDR移植抗体对FGF - 8的结合活性的测定

为了对在参考例2的4.得到的各种抗FGF - 8中和CDR移植抗体对FGF - 8的结合活性进行更详细地研究，利用BIAcore 2000[BIAcore公司生产]，象以下那样对各种抗FGF - 8中和CDR移植抗体对FGF - 8的结合活性进行测定、比较。作为阳性对照使用来自参考例1的3.(2)得到的YB2/0细胞的抗FGF - 8中和嵌合抗体KM1334。

以下作为样品的稀释和测定中的缓冲液使用HBS - EP (BIAcore公司生产)。首先，组装传感器片CM5 (BIAcore公司生产)，通过胺偶合法将用10mmol/L乙酸缓冲液 (pH4.0) 溶解的31.25 $\mu$ g/mL的FGF - 8 (R&D 公司生产) 固定于传感器片表面。以共振信号 (RU) 为指标的固定化量是4498RU。

向FGF - 8固定化流动池中以20 $\mu$ L/分的流速，添加60 $\mu$ L的各种抗体溶液，然后，过3分钟后监测解离反应。解离反应后，连续2次向流动池中添加20 $\mu$ L的10mmol/L甘氨酸 - 盐酸溶液 (pH1.5)，使片表面再生。就各种浓度 (50 - 0.068 $\mu$ g/mL) 的抗体溶液进行该循环，得到各种浓度下的传感曲线。各个抗体的传感曲线是通过扣除作为阴性对照使用针对GD3 的嵌合抗体 KM871 (Shitara K.et al.,Cancer Immunol.Immunother.,36,373-380,1993) 得到的传感曲线作为特异的反应的传感曲线。图25表示50 $\mu$ g/mL的各种抗体的传感曲线。就象传感曲

线所表明的那样，无论哪一种抗体在解离反应中几乎看不到解离，求正确的解离速度常数是困难的。在此，各种抗体的结合活性的比较是通过比较结合反应时的结合[共振信号(RU)]的强弱进行的。结果如图26所示，嵌合抗体KM3334表现出最高的结合反应，CDR移植抗体HVOLV6也表现出与KM3334同等高的结合反应。另外，CDR移植抗体HVOLVO和CDR移植抗体HV6LV6与KM3334和HVOLV6比较，表现出低一些的结合反应。以上结果表明用ELISA没有确认的抗体间的结合活性的比较可以通过BIAcore 2000进行，而且通过VL的FR的6氨基酸残基的改变，CDR移植抗体的结合活性恢复到与嵌合抗体同等水平。而有关VH的FR的6氨基酸残基没有看到对应于结合活性恢复的效果。

将来自表现出与嵌合抗体KM3334同等高的结合反应的YB2/0细胞的CDR移植抗体HVOLV6命名为KM8037，来自高表达KM8037的YB2/0细胞的转化细胞株也同样命名为KM8037。转化细胞株KM8037于平成14年6月20日以FERM BP-8084保藏于独立行政法人产业技术综合研究所专利生物保藏中心(〒305-8566 日本国茨城县筑波市东1丁目1番地中央第6)。

### 参考例3 免疫原性更低的抗FGF-8中和CDR移植抗体的制作(1)

参考例2的结果清楚表明VL的FR含有来自小鼠抗体KM1334的6氨基酸残基的改变的抗FGF-8中和CDR移植抗体HVOLV6表现出与嵌合抗体同等的结合活性。在此，进一步对6残基的活性恢复的效果进行研究，象以下那样进行期待具有充分活性，而且来自小鼠抗体的氨基酸残基少，免疫原性更低的抗FGF-8中和CDR移植抗体的制作。

#### 1.VL的氨基酸材料的设计

就上述6氨基酸残基设计具有以下那样改变的6种VL氨基酸序列。无论哪一种都表现出来自LV.0的氨基酸残基的改变。

在LV.4-1中，将2位的Ile、50位的Gln、51位的Leu、92位的Tyr 4个残基分别改变为鼠抗体KM1334中出现的氨基酸残基Val、Lys、Val、Phe。

在LV.4-2中,将序列2位的Ile、14位的Thr、15位的Pro、92位的Tyr 4个残基分别改变为小鼠抗体KM1334中出现的氨基酸残基Val、Ser、Leu、Phe。

在LV.3-1中,将2位的Ile、51位的Leu、92位的Tyr 3个残基分别改变为小鼠抗体KM1334中出现的氨基酸残基Val、Val、Phe。

在LV.3-2中,将14位的Thr、15位的Pro、92位的Tyr 3个残基分别改变为小鼠抗体KM1334中出现的氨基酸残基Ser、Leu、Phe。

在LV.2-1中,将51位的Leu、92位的Tyr 2个残基分别改变为小鼠抗体KM1334中出现的氨基酸残基Val、Phe。

在LV.2-2中,将2位的Ile、92位的Tyr 2个残基分别改变为小鼠抗体KM1334中出现的氨基酸残基Val、Phe。

序列42~47分别表示LV.4-1、LV.4-2、LV.3-1、LV.3-2、LV.2-1、LV.2-2的氨基酸序列。

## 2. 编码VL的DNA的构建

象以下那样构建编码参考例3的1.设计的抗FGF-8中和CDR移植抗体的各种VL的氨基酸序列DNA。

### (1) 编码LV.4-1的DNA的构建

编码LV.4-1的DNA用由序列38、34、40、41的序列构成的4条合成DNA(GENSET公司生产),按照参考例2的1.(3)所述方法进行构建。结果得到了含有编码LV.4-1的DNA的质粒pKM1334LV4-1。

### (2) 编码LV.3-1的DNA的构建

以参考例2的1.(3)得到的质粒pKM1334LV6 50ng为模板,以由M13引物RV和由序列48的碱基序列构成的合成DNA(GENSET公司生产)作为引物,终浓度为 $0.3\mu\text{mol/L}$ ,按照KOD聚合酶附带的使用说明书,总量 $50\mu\text{L}$ ,首先在 $94^\circ\text{C}$ 加热2分钟后,进行每一循环为 $94^\circ\text{C}$ 15秒钟、 $50^\circ\text{C}$ 30秒钟、 $68^\circ\text{C}$ 1分钟秒钟的35次循环的PCR。将该反应液进行纯化后,溶解于灭菌水中,用10单位的限制性内切酶KpnI(宝酒造公司生产)和10单位的限制性内切酶SpeI,于 $37^\circ\text{C}$ 下反应1小时。将该反应液通过琼脂糖凝胶电泳进行分级,回收约 $0.3\mu\text{g}$ 的约0.22kb的KpnI-SpeI片段。

然后使10单位的限制性内切酶KpnI与参考例3的2.(1)得到3 $\mu$ g的质粒pKM1334LV4-1于37 $^{\circ}$ C下反应1小时。将该反应液通过琼脂糖凝胶电泳进行分级,回收约0.2 $\mu$ g的约0.21kb的KpnI片段。

然后使10单位的限制性内切酶KpnI和10单位的限制性内切酶SpeI与3 $\mu$ g的质粒pBluescript II SK (-)于37 $^{\circ}$ C下反应1小时。将该反应液通过琼脂糖凝胶电泳进行分级,回收约2 $\mu$ g的约2.95kb的KpnI-SpeI片段。

然后,将上述得到的VL DNA的KpnI-SpeI片段0.1 $\mu$ g和来自质粒pKM1334LV4-1的KpnI片段0.1 $\mu$ g,以及来自质粒pBluescript SK (-)的KpnI-SpeI片段0.1 $\mu$ g加到总量10 $\mu$ l的灭菌水中,用Ligation high进行连接。用这样得到重组质粒DNA溶液转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ 株,得到了图27给出的含有编码LV.3-1的DNA的质粒pKM1334LV3-1。

### (3) 编码LV.2-1的DNA的构建

除了使用参考例2的1.(3)得到的质粒pKM1334LVO代替质粒pKM1334LV4-1以外,利用与参考例3的2.(1)所述方法同样的方法得到含有编码LV.2-1的DNA的质粒pKM1334LV2-1。

### (4) 编码LV.2-2的DNA的构建

除了作为引物用序列49的合成DNA代替序列48的合成DNA以外,利用与参考例3的2.(1)所述方法同样的方法得到含有编码LV.2-2的DNA的质粒pKM1334LV2-2。

### (5) 编码LV.4-2的DNA的构建

使10单位的限制性内切酶KpnI与参考例参考例3的2.(4)得到的3 $\mu$ g质粒pKM1334LV2-2于37 $^{\circ}$ C下反应1小时。将该反应液通过琼脂糖凝胶电泳进行分级,回收约2 $\mu$ g的约3.16kb的KpnI片段。

然后使10单位的限制性内切酶KpnI与参考例2的1.(3)得到的3 $\mu$ g质粒pKM1334LV6于37 $^{\circ}$ C下反应1小时。将该反应液通过琼脂糖凝胶电泳进行分级,回收约0.2 $\mu$ g的约0.21kb的KpnI片段。

将上述得到的来自质粒pKM1334LV2-2的KpnI片段0.1 $\mu$ g和来自质粒pKM1334LV6的KpnI片段0.1 $\mu$ g加到总量10 $\mu$ l的灭菌水中,用Ligation high进行连接。用这样得到重组质粒DNA溶液转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ 株,

得到了图28给出的含有编码LV.4-2的DNA的质粒pKM1334LV4-2。

#### (6) 编码LV.3-2的DNA的构建

使10单位的限制性内切酶Tth111I(宝酒造公司生产)和Xmn I(New England Biolabs公司生产)与参考例3的2.(5)得到的3 $\mu$ g质粒pKM1334LV4-2于37 $^{\circ}$ C下反应1小时。将该反应液通过琼脂糖凝胶电泳进行分级,回收约2 $\mu$ g的约2.24kb的Tth111I-Xmn I片段。

然后使10单位的限制性内切酶Tth111I和Xmn I与参考例参考例2的1.(3)得到的3 $\mu$ g质粒pKM1334LVO于37 $^{\circ}$ C下反应1小时。将该反应液通过琼脂糖凝胶电泳进行分级,回收约1 $\mu$ g的约1.11kb的Tth111I-Xmn I片段。

然后,将上述得到的来自质粒pKM1334LV4-2的Tth111I-Xmn I片段0.1 $\mu$ g和来自质粒pKM1334LVO的Tth111I-Xmn I片段0.1 $\mu$ g加到总量10 $\mu$ l的灭菌水中,用Ligation high进行连接。用这样得到重组质粒DNA溶液转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ 株,得到了图29给出的含有编码LV.3-2的DNA的质粒pKM1334LV3-2。

#### 3.抗FGF-8中和CDR移植抗体表达载体的构建

通过用含有在参考例3的2.构建的编码各种VL的DNA的EcoRI-BsiWI片段置换参考例2的2.得到的含有编码表达载体pKANTEKX1334HVOLV6的DNA的EcoRI-BsiWI片段,构建含有编码各种VL的抗FGF-8中和CDR移植抗体表达载体。具体来说构建pKANTEKX1334HVOLV4-1、pKANTEKX1334HVOLV4-2、pKANTEKX1334HVOLV3-1、pKANTEKX1334HVOLV3-2、pKANTEKX1334HVOLV2-1、pKANTEKX1334HVOLV2-2 6种。

#### 4. 抗FGF-8中和CDR移植抗体用CHO/DG44细胞的稳定表达

分别用上述参考例2的2.得到的抗FGF-8中和CDR移植抗体表达载体pKANTEKX1334HVOLVO、pKANTEKX1334HVOLV6和参考例3的3.得到的各种抗FGF-8中和CDR移植抗体表达用载体,按照上述参考例1的2.(4)所述的方法进行FGF-8中和CDR移植抗体在CHO/DG44细胞的稳定表达。

## 5. 抗FGF - 8中和CDR移植抗体的纯化

按照上述参考例1的3.(1)所述的方法,从参考例3的4.中得到的来自表达各种抗FGF - 8中和CDR移植抗体的CHO/DG4细胞的转化株的培养和上清纯化抗FGF - 8中和CDR移植抗体。

将来自导入pKANTEX1334HVOLVO的转化株的抗体取名为HVOLVO/CHO,

将来自导入pKANTEX1334HVOLV6的转化株的抗体取名为HVOLV6/CHO,

将来自导入pKANTEX1334HVOLV4 - 1的转化株的抗体取名为HVOLV4 - 1/CHO,

将来自导入pKANTEX1334HVOLV4 - 2的转化株的抗体取名为HVOLV4 - 2/CHO,

将来自导入pKANTEX1334HVOLV3 - 1的转化株的抗体取名为HVOLV3 - 1/CHO,

将来自导入pKANTEX1334HVOLV3 - 2的转化株的抗体取名为HVOLV3 - 2/CHO,

将来自导入pKANTEX1334HVOLV2 - 1的转化株的抗体取名为HVOLV2 - 1/CHO,

将来自导入pKANTEX1334HVOLV2 - 2的转化株的抗体取名为HVOLV2 - 2/CHO.

## 6. 纯化的抗FGF - 8中和CDR移植抗体的解析

按照上述参考例1的4.所述的方法,对在参考例3的5.得到的各种抗FGF - 8中和CDR移植抗体进行SDS - PAGE。结果确认无论哪一种抗体都是以正确结构的抗体分子表达的,而且被纯化了。

## 7. 利用BIAcore生物传感器对抗FGF - 8中和CDR移植抗体对FGF - 8的结合活进行测定

为了对在参考例3的5.得到的各种抗FGF - 8中和CDR移植抗体对FGF - 8的结合活性进行更详细地研究,利用BIAcore 2000,用对FGF - 8的部分肽化合物1的C末端进行生物素标记的标记化合物,象以下那

样对各种抗FGF-8中和CDR移植抗体对FGF-8的结合活性进行测定、比较。作为阳性对照使用来自参考例1的3.(1)得到的CHO/DG44细胞的抗FGF-8中和嵌合抗体KM3034。

以下作为样品的稀释和测定中的缓冲液使用HBS-EP。首先, 组装传感器片SA(BIACORE公司生产), 以 $5\mu\text{L}/\text{min}$ 的流速添加 $5\mu\text{L}$ 的制备成 $0.05\mu\text{g}/\text{mL}$ 的C末端标记生物素的标记化合物1, 然后, 连续2次添加 $5\mu\text{L}$ 的 $10\text{mmol}/\text{L}$ 甘氨酸-盐酸溶液( $\text{pH}1.5$ ), 将片洗净。FGF-8肽的固定化量是35RU。

以 $20\mu\text{L}/\text{分}$ 的流速, 向FGF-8固定化流动池中添加 $60\mu\text{L}$ 的各种抗体溶液, 然后, 过3分钟后监测解离反应。解离反应后, 连续2次向流动池中添加 $20\mu\text{L}$ 的 $10\text{mmol}/\text{L}$ 甘氨酸-盐酸溶液( $\text{pH}1.5$ ), 使片表面再生。就各种浓度( $50 - 1.85\mu\text{g}/\text{mL}$ )的抗体溶液进行该循环, 得到各种浓度下的传感曲线。各个抗体的传感曲线是通过扣除作为阴性对照使用针对GD3的嵌合抗体KM871得到的传感曲线作为特异的反应的传感曲线。

图30表示 $16.7\mu\text{g}/\text{mL}$ 的各种抗体的传感曲线。就象传感曲线所表明的那样, 无论哪一种抗体在解离反应时几乎看不到解离, 求正确的解离速度常数是困难的。在此, 各种抗体的结合活性的比较是通过比较结合反应时的结合[共振信号(RU)]的强弱进行的。

结果如图30所示, 嵌合抗体KM3034和HVOLV6/CHO表现出最高的结合反应, 其次, HVOLV3-1/CHO、HVOLV4-1/CHO、HVOLV2-1/CHO也表现出高的结合反应。而HVOLV3-2/CHO、HVOLV2-2/CHO、HVOLV4-2/CHO表现出低的结合反应, HVOLV0/CHO表现出最低的结合反应。这些结果与用参考例2的7.所述的来自YB2/0细胞的CDR移植抗体的结果一致。

#### 8. 抗FGF-8中和CDR移植抗体对FGF-8的中和活性的测定

按照参考例2的5项所述的方法对在参考例3的7项中对FGF-8有高的结合反应的4种抗FGF-8中和CDR移植抗体HVOLV6/CHO、HVOLV3-1/CHO、HVOLV4-1/CHO、HVOLV2-1/CHO的FGF-8中和活性进行评价。作为阳性对照使用参考例1的3项(1)得到的来自

CHO/DG44细胞的抗FGF-8中和嵌合抗体KM3034,作为阴性对照使用W001/64754所述的针对人趋化因子CCR4的嵌合抗体KM2760。结果如图31所示。就象图31所示的那样, HVOLV6/CHO表现出与嵌合抗体KM3034同等的FGF-8中和活性,其次HVOLV3-1/CHO也表现出高的FGF-8中和活性。HVOLV4-1/CHO与HVOLV3-1/CHO相比,表现出比较低的FGF-8中和活性, HVOLV2-1/CHO的FGF-8中和活性最低。确认FGF-8中和活性的强弱与利用BIAcore的结合反应的强弱之间存在相关性。

#### 参考例4.免疫原性更低的抗FGF-8中和CDR移植抗体的制作(2)

参考例3的结果清楚表明LV6的6个氨基酸残基的改变中,51位的改变对于活性恢复是必需的。另外还暗示了2位的改变如果单独改变,对活性恢复的效果小,而通过与51位的改变组合,协同地对活性恢复有贡献。对于14位、15位的改变也表明通过与51位的改变的组合协调对活性恢复有贡献。另外,暗示了50位的改变效果小。在此为了对2位的改变和14位、15位的改变的哪一个对活性恢复的效果是否更高进行研究,另外为了对92位的改变的效果进行研究,对抗FGF-8中和CDR移植抗体的制作再进行研究。

##### 1.VL的氨基酸序列的再设计

设计具有以下那样改变的2种VL氨基酸序列。无论哪一种都表现出来自LV.0的氨基酸残基的改变。

在LV.4-3中,将14位的Thr、15位的Pro、51位的Leu、92位的Tyr 4个残基分别改变为小鼠抗体KM1334中出现的氨基酸残基Ser、Leu、Val、Phe。

在LV.3-3中,将14位的Thr、15位的Pro、51位的Leu 3个残基分别改变为小鼠抗体KM1334中出现的氨基酸残基Ser、Leu、Val。

序列50表示LV.4-3的氨基酸序列,而序列表示51LV.3-3的氨基酸序列。

##### 2.编码VL的DNA的构建

象以下那样构建编码参考例4的1.设计的抗FGF-8中和CDR移植

抗体的各种VL的氨基酸序列DNA。

#### (1) 编码LV.4-3的DNA的构建

按照参考例3的2.(5)所述方法构建。但是,用参考例3的2.(3)得到的质粒pKM1334LV2-1代替质粒pKM1334LV2-2,用参考例3的2.(6)得到的质粒pKM1334LV3-2代替质粒pKM1334LV6。结果得到了含有编码LV.4-3的DNA的质粒pKM1334LV4-3。

#### (2) 编码LV.3-3的DNA的构建

使10单位的限制性内切酶BamHI和10单位的限制性内切酶SpeI与3 $\mu$ g参考例4的2.(1)得到的质粒pKM1334LV4-3于37 $^{\circ}$ C下反应1小时。将该反应液通过琼脂糖凝胶电泳进行分级,回收约2.5 $\mu$ g的约3.23kb的BamHI-SpeI片段。

然后使10单位的限制性内切酶BamHI和10单位的限制性内切酶SpeI与3 $\mu$ g的参考例2的1.(3)得到的质粒pKM1334LVO于37 $^{\circ}$ C下反应1小时。将该反应液通过琼脂糖凝胶电泳进行分级,回收约0.15 $\mu$ g的约0.13kb的BamHI-SpeI片段。

然后,将上述得到的质粒pKM1334LV4-3的BamHI-SpeI片段0.1 $\mu$ g和来自质粒pKM1334LVO的BamHI-SpeI片段0.1 $\mu$ g加到总量10 $\mu$ l的灭菌水中,用ligation high进行连接。用这样得到重组质粒DNA溶液转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ 株,得到了图32给出的含有编码LV.3-3的DNA的质粒pKM1334LV3-3。

### 3.抗FGF-8中和CDR移植抗体表达载体的构建

通过用含有在参考例4的2.构建的编码各种VL的DNA的EcoRI-BsiWI片段置换参考例2的2.得到的含有编码表达载体pKANTEKX1334HVOLV6的VL的DNA的EcoRI-BsiWI片段,构建含有编码各种VL的DNA的抗FGF-8中和CDR移植抗体表达载体。具体来说

构建pKANTEKX1334HVOLV4-3、pKANTEKX1334HVOLV3-3这2种载体。

### 4. 抗FGF-8中和CDR移植抗体用CHO/DG44细胞的稳定表达

用上述参考例4的3.得到的各种抗FGF-8中和移植抗体表达载体,

按照上述参考例1的2.(4)所述的方法进行各种FGF-8中和CDR移植抗体在CHO/DG44细胞的稳定表达。

#### 5. 抗FGF-8中和CDR移植抗体的纯化

按照上述参考例1的3.(1)所述的方法,从参考例4的4.中得到的来自表达各种抗FGF-8中和CDR移植抗体的CHO/DG44细胞的转化株的培养和上清纯化抗FGF-8中和CDR移植抗体。将来自导入pKANTEX1334HVOLV4-3的转化株的抗体取名为HVOLV4-3/CHO,将来自导入pKANTEX1334HVOLV3-3的转化株的抗体取名为HVOLV3-3/CHO。

#### 6. 纯化的抗FGF-8中和CDR移植抗体的解析

按照上述参考例1的4.所述的方法,对在参考例4的5.得到的各种抗FGF-8中和CDR移植抗体进行SDS-PAGE。结果确认无论哪一种抗体都是以正确结构的抗体分子表达的,而且被纯化了。

#### 7. 抗FGF-8中和CDR移植抗体对FGF-8的结合活性的测定

按照参考例3的7.所示的方法,对参考例3的5.得到的抗FGF-8中和CDR移植抗体HVOLV6/CHO和HVOLV3-1/CHO、参考例4的5.得到的抗FGF-8中和CDR移植抗体HVOLV4-3/CHO和HVOLV3-3/CHO对FGF-8的结合活性进行测定。作为阳性对照使用来自参考例1的3.(1)得到的CHO/DG44细胞的抗FGF-8中和嵌合抗体KM3034。

图33表示16.7 $\mu$ g/mL的各种抗体的传感曲线。就象传感曲线所表明的那样,无论哪一种抗体在解离反应中几乎看不到解离,求正确的解离速度常数是困难的。在此,各种抗体的结合活性的比较是通过比较结合反应时的结合[共振信号(RU)]的强弱进行的。结果就象图33所表示的那样,嵌合抗体KM3034表现出最高的结合反应,其次, HVOLV4-3/CHO比HVOLV3-1/CHO还高、表现出与HVOLV6/CHO同等的结合反应。而HVOLV3-3/CHO比HVOLV3-1/CHO更低。以上结果表明有关结合反应的强弱,比起2位的改变,14位、15位的改变更协调地起作用,另外92位的改变对于活性的恢复是必需的。

#### 8. 抗FGF-8中和CDR移植抗体的对FGF-8的中和活性的测定

按照参考例2的5项所述的方法对在参考例3的5中得到的抗FGF-8中和CDR移植抗体HVOLV6/CHO和HVOLV3-1/CHO、参考例4的5中得到的抗FGF-8中和CDR移植抗体HVOLV4-3/CHO和HVOLV3-3/CHO的FGF-8中和活性进行评价。作为阳性对照使用参考例1的3项(1)得到的来自CHO/DG44细胞的抗FGF-8中和嵌合抗体KM3034,作为阴性对照使用W001/64754所述的针对人趋化因子CCR4的嵌合抗体KM2760。结果如图34所示。就象图34所表示的那样, HVOLV6/CHO和HVOLV3-1/CHO表现出与嵌合抗体KM3034同等的FGF-8中和活性。而HVOLV4-3/CHO和HVOLV3-3/CHO表现出同等的中和活性,其活性是嵌合抗体KM3034的1/2左右。HVOLV3-1/CHO和HVOLV4-3/CHO的FGF-8中和活性与由BIAcore引起的结合反应的强弱不相关,2位的氨基酸残基和14位、15位的氨基酸残基在对FGF-8的结合活性和对细胞的FGF-8中和活性中给予独立的影响。

通过以上的各种评价结果,将表现出与嵌合抗体KM3034同等的高结合反应和FGF-8中和活性的CHO/DG4细胞由来的CDR移植抗体HVOLV6/CHO命名为KM8034,而来自高表达KM8034的CHO/DG4细胞的转化细胞克隆也同样命名为KM8034,将表现出与KM8034同等的高结合反应的CHO/DG4细胞的CDR移植抗体HVOLV4-3/CHO命名为KM8035,而来自高表达KM8035的CHO/DG4细胞的转化细胞株也同样命名为KM8035。序列38给出了KM8035的VL的氨基酸序列LV.4-3。转化细胞株KM8035于平成14年6月20日以FERM BP-8082保藏于独立行政法人产业技术综合研究所专利生物保藏中心(〒305-8566 日本国茨城县筑波市东1丁目1番地中央第6)。将表现出与KM8034同等的高FGF-8中和活性的CHO/DG4细胞由来的CDR移植抗体HVOLV3-1/CHO命名为KM8036,而来自高表达KM8036的CHO/DG4细胞的转化细胞克隆也同样命名为KM8036。序列39给出了KM8036的VL的氨基酸序列LV.3-1。转化细胞株KM8036于平成14年6月20日以FERM BP-8083保藏于独立行政法人产业技术综合研究所专利生物保藏中心(〒305-8566 日本国茨城县筑波市东1丁目1番地中央第6)。

抗FGF-8中和CDR移植抗体KM8034表现出与嵌合抗体KM3034同等的高结合反应和FGF-8中和活性，而且，在人的免疫原性比嵌合抗体更低，所以预期治疗效果比嵌合抗体更高。就抗FGF-8中和CDR移植抗体KM8036和KM8035来说，与KM8034相比，结合活性和FGF-8中和活性可能低一些，由于各个来自小鼠抗体KM1334的V区FR的氨基酸残基变成了3残基和4残基，所以预期免疫原性比KM8034更低。

本发明提供作为有效成分含有抗FGF-8中和抗体的关节炎预防药或治疗药、软骨保护剂、关节破坏抑制剂、滑膜增殖抑制剂、以及作为有效成分含有抗FGF-8中和抗体的关节炎诊断药和使用该抗体的关节炎的判定方法。

## 序列表

<110> 协和发酵工业株式会社

<120> 关节炎的治疗药

<130> 1442

<150> JP2001-400677

<151> 2001-12-28

<160> 51

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 420

<212> DNA

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<220>

<223> 发明人：田村忠史；内井雅子；须田敏郎

发明人：三木一郎；田中亨

<220>

<221> 来源

<222> (1)..(420)

<223> /生物="小家鼠"

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(420)

<220>

<221> 信号肽

<222> (1)..(57)

<400> 1

atg gaa tgg atc tgg atc ttt ctc ttc ttc ctc tca gga act aca ggt	48
Met Glu Trp Ile Trp Ile Phe Leu Phe Phe Leu Ser Gly Thr Thr Gly	
1                                 5                                 10                                 15	

gtc tac tcc cag gtt cag ctg cag cag tct gga gct gag gtg gcg agg	96
Val Tyr Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Ala Arg	

20	25	30	
ccc ggg gct tca gtg aaa ctg tcc tgc aag gct tct ggc tac acc ttc			144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe			
35	40	45	
act gac tac tat cta aac tgg gtg aag cag agg tct gga cag ggc ctt			192
Thr Asp Tyr Tyr Leu Asn Trp Val Lys Gln Arg Ser Gly Gln Gly Leu			
50	55	60	
gag tgg att gga gag att gat cct gga agt gat agt ata tat tat aat			240
Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asp Pro Gly Ser Asp Ser Ile Tyr Tyr Asn			
65	70	75	80
gaa aac ttg gag ggc agg gcc aca ctg act gca gac aaa tcc tcc agc			288
Glu Asn Leu Glu Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser			
85	90	95	
aca gcc tac atg cag ctc aac agc ctg aca tct gag gac tct gca gtc			336
Thr Ala Tyr Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val			
100	105	110	
tat ttc tgt gca aga tat ggg tat tct aga tac gac gta agg ttt gtc			384
Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Gly Tyr Ser Arg Tyr Asp Val Arg Phe Val			
115	120	125	
tac tgg ggc caa ggg act ctg gtc act gtc tct aca			420
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Thr			
130	135	140	

<210> 2

<211> 140

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> 信号

<222> (1)..(19)

<400> 2

Met	Glu	Trp	Ile	Trp	Ile	Phe	Leu	Phe	Phe	Leu	Ser	Gly	Thr	Thr	Gly
1															
			5												15

Val Tyr Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Ala Arg  
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
 35 40 45

Thr Asp Tyr Tyr Leu Asn Trp Val Lys Gln Arg Ser Gly Gln Gly Leu  
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asp Pro Gly Ser Asp Ser Ile Tyr Tyr Asn  
 65 70 75 80

Glu Asn Leu Glu Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser  
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val  
 100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Gly Tyr Ser Arg Tyr Asp Val Arg Phe Val  
 115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Thr  
 130 135 140

<210> 3

<211> 393

<212> DNA

<213> 小家鼠

<220>

<221> 来源

<222> (1)..(393)

<223> /生物="小家鼠"

<220>

<221> CDS  
 <222> (1)..(393)

<220>  
 <221> 信号肽  
 <222> (1)..(57)

<400> 3

atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct gct	48
Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala	
1 5 10 15	
tcc agg agt gat gtt ttg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc	96
Ser Arg Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val	
20 25 30	
agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag agt ctt	144
Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu	
35 40 45	
gta cat agt aat gga aga acc tat tta gaa tgg tac ctg cag aaa cct	192
Val His Ser Asn Gly Arg Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro	
50 55 60	
ggc cag tca cca aag gtc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga att tet	240
Gly Gln Ser Pro Lys Val Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Ile Ser	
65 70 75 80	
ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca	288
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr	
85 90 95	
ctc aaa atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat ttc tgc	336
Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys	
100 105 110	
ttt cag ggt tca cat gtt ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg	384
Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu	
115 120 125	
gaa ata aaa	393
Glu Ile Lys	
130	

<210> 4

<211> 131

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> 信号

<222> (1)..(19)

<400> 4

Met·Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala  
1 5 10 15

Ser Arg Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val  
20 25 30

Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu  
35 40 45

Val His Ser Asn Gly Arg Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro  
50 55 60

Gly Gln Ser Pro Lys Val Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Ile Ser  
65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
85 90 95

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys  
100 105 110

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu  
115 120 125

Glu Ile Lys  
130

<210> 5

<211> 121

<212> PRT

<213> 小家鼠

&lt;400&gt; 5

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Ala Arg Pro Gly Ala  
 1                    5                    10                    15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 20                    25                    30

Tyr Leu Asn Trp Val Lys Gln Arg Ser Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35                    40                    45

Gly Glu Ile Asp Pro Gly Ser Asp Ser Ile Tyr Tyr Asn Glu Asn Leu  
 50                    55                    60

Glu Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65                    70                    75                    80

Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys  
 85                    90                    95

Ala Arg Tyr Gly Tyr Ser Arg Tyr Asp Val Arg Phe Val Tyr Trp Gly  
 100                    105                    110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Thr  
 115                    120

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 小家鼠

&lt;400&gt; 6

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly  
 1                    5                    10                    15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser

	20		25		30
Asn Gly Arg Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser					
	35		40		45
Pro Lys Val Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Ile Ser Gly Val Pro					
	50		55		60
Asp Arg Phe Ser 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 Phe Cys Phe Gln Gly					
	85		90		95
Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys					
	100		105		110

<210> 7  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 小家鼠

<400> 7  
 Asp Tyr Tyr Leu Asn  
 1 5

<210> 8  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 小家鼠

<400> 8  
 Glu Ile Asp Pro Gly Ser Asp Ser Ile Tyr Tyr Asn Glu Asn Leu Glu  
 1 5 10 15

Gly

<210> 9  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 小家鼠

<400> 9  
Tyr Gly Tyr Ser Arg Tyr Asp Val Arg Phe Val Tyr  
1 5 10

<210> 10  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> 小家鼠

<400> 10  
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Arg Thr Tyr Leu Glu  
1 5 10 15

<210> 11  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 小家鼠

<400> 11  
Lys Val Ser Asn Arg Ile Ser  
1 5

<210> 12  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 小家鼠

<400> 12  
Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr  
1 5

<210> 13  
<211> 22

- <212> DNA  
<213> 人工的
- <220>  
<223> 用于 KM1334 的 VH 的扩增的引物
- <400> 13  
ctgaattcgc ggccgctagt cc 22
- <210> 14  
<211> 39  
<212> DNA  
<213> 人工的
- <220>  
<223> 用于 KM1334 的 VH 的扩增的引物
- <400> 14  
atgggccctt ggtggaggct gtagagacag tgaccagag 39
- <210> 15  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> 人工的
- <220>  
<223> 用于 KM1334 的 VL 的扩增的引物
- <400> 15  
ctgaattcgc ggccgctgct gt 22
- <210> 16  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> 人工的
- <220>  
<223> 用于 KM1334 的 VL 的扩增的引物
- <400> 16  
atcgtacggt ttatttccag cttgggtcc 28

<210> 17  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>

<223> C末端附加半胱氨酸残基的人 FGF-8 的肽 (23~46 的氨基酸残基)

<400> 17

Gln Val Thr Val Gln Ser Ser Pro Asn Phe Thr Gln His Val Arg Glu  
 1                    5                    10                    15

Gln Ser Leu Val Thr Asp Gln Leu Cys  
                   20                    25

<210> 18  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>

<223> 设计的抗 FGF-8 中和 CDR 移植抗体的 VH 氨基酸序列、HV.0

<400> 18

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1                    5                    10                    15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
                   20                    25                    30

Tyr Leu Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
                   35                    40                    45

Gly Glu Ile Asp Pro Gly Ser Asp Ser Ile Tyr Tyr Asn Glu Asn Leu  
                   50                    55                    60

Glu Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Tyr Gly Tyr Ser Arg Tyr Asp Val Arg Phe Val Tyr Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 19

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 设计的抗 FGF-8 中和 CDR 移植抗体的 VL 氨基酸序列、LV.0

<400> 19

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
20 25 30

Asn Gly Arg Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Ile Ser Gly Val Pro  
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
85 90 95

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 20

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 设计的抗 FGF-8 中和 CDR 移植抗体的 VH 氨基酸序列、HV. 6

<400> 20

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Ala Arg Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
20 25 30

Tyr Leu Asn Trp Val Arg Gln Arg Ser Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Glu Ile Asp Pro Gly Ser Asp Ser Ile Tyr Tyr Asn Glu Asn Leu  
50 55 60

Glu Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Tyr Gly Tyr Ser Arg Tyr Asp Val Arg Phe Val Tyr Trp Gly

100

105

110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工的

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 设计的抗 FGF-8 中和 CDR 移植抗体的 VL 氨基酸序列、LV.6

&lt;400&gt; 21

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
 20 25 30

Asn Gly Arg Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

Pro Lys Val Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Ile Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Phe Gln Gly  
 85 90 95

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 22  
 <211> 504  
 <212> DNA  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 编码 HV.0 的 DNA

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (47)..(466)

<220>  
 <221> 信号肽  
 <222> (47)..(103)

<400> 22  
 caggaaacag ctatgacgaa ttcgcgccg cacactgact ctaacc atg gaa tgg 55  
 Met Glu Trp

atc tgg atc ttt ctc ttc ttc ctc tca gga act aca ggt gtc tac tcc 103  
 Ile Trp Ile Phe Leu Phe Phe Leu Ser Gly Thr Thr Gly Val Tyr Ser  
 -15 -10 -5 -1

cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag ccc ggg gcc 151  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

tca gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc act gac tac 199  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30

tat cta aac tgg gtg cgg cag gcc ccc gga caa ggg ctt gag tgg atg 247  
 Tyr Leu Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

gga gag atc gat cct gga agt gat agt ata tat tat aat gaa aac ttg 295  
 Gly Glu Ile Asp Pro Gly Ser Asp Ser Ile Tyr Tyr Asn Glu Asn Leu  
 50 55 60

gag ggc aga gtc acg att acc gcg gac aca tcc acg agc aca gcc tac 343  
 Glu Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65	70	75	80	
atg gag ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg tat tac tgt				391
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys				
	85	90	95	
gcg aga tat ggg tat tct aga tac gac gta agg ttt gtc tac tgg ggc				439
Ala Arg Tyr Gly Tyr Ser Arg Tyr Asp Val Arg Phe Val Tyr Trp Gly				
	100	105	110	
cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca gcctccacca agggcccact				486
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser				
	115	120		
agtcgtgact gggaaaac				504
<210>	23			
<211>	141			
<212>	DNA			
<213>	人工的			
<220>				
<223>	用于编码 HV.0 的 DNA 的构建的合成 DNA			
<400>	23			
caggaaacag ctatgacgaa ttcgcgccg cacactgact ctaacatgg aatggatctg				60
gatctttctc ttcttctct caggaactac aggtgtctac tcccaggtgc agctggtgca				120
gtctggggct gaggtgaaga a				141
<210>	24			
<211>	141			
<212>	DNA			
<213>	人工的			
<220>				
<223>	用于编码 HV.0 的 DNA 的构建的合成 DNA			
<400>	24			
aggatcgatc tctcccatcc actcaagccc ttgtccgggg gectgccgca cccagtttag				60

atagtagtca gtgaagggtg atccagaagc cttgcaggag accttcactg aggccccggg 120

cttcttcacc tcagccccag a 141

<210> 25

<211> 141

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于编码 HV. 0 的 DNA 的构建的合成 DNA

<400> 25

ggatgggaga gatcgatcct ggaagtgata gtatatatta taatgaaaac ttggagggca 60

gagtcacgat taccgaggac acatccacga gcacagccta catggagctg agcagcctga 120

gatctgagga cacggccgtg t 141

<210> 26

<211> 141

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于编码 HV. 0 的 DNA 的构建的合成 DNA

<400> 26

gttttcccag tcacgactag tgggcccttg gtggaggctg aggagacggt gaccagggtt 60

ccctggcccc agtagacaaa ccttacgtcg tatctagaat acceatatct cgcacagtaa 120

tacacggccg tgtcctcaga t 141

<210> 27

<211> 504

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 编码 HV. 6 的 DNA

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (47)..(466)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 信号肽

&lt;222&gt; (47)..(103)

&lt;400&gt; 27

caggaacag ctatgacgaa ttcgcgccg cacactgact ctaacc atg gaa tgg 55  
Met Glu Trp

atc tgg atc ttt ctc ttc ttc ctc tca gga act aca ggt gtc tac tcc 103  
Ile Trp Ile Phe Leu Phe Phe Leu Ser Gly Thr Thr Gly Val Tyr Ser  
-15 -10 -5 -1

cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg gcg agg ccc ggg gcc 151  
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Ala Arg Pro Gly Ala  
1 5 10 15

tca gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc act gac tac 199  
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
20 25 30

tat cta aac tgg gtg cgg cag agg tct gga caa ggg ctt gag tgg att 247  
Tyr Leu Asn Trp Val Arg Gln Arg Ser Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

gga gag atc gat cct gga agt gat agt ata tat tat aat gaa aac ttg 295  
Gly Glu Ile Asp Pro Gly Ser Asp Ser Ile Tyr Tyr Asn Glu Asn Leu  
50 55 60

gag ggc aga gtc acg att acc gcg gac aca tcc acg agc aca gcc tac 343  
Glu Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

atg gag ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg tat ttc tgt 391  
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys  
85 90 95

gcg aga tat ggg tat tct aga tac gac gta agg ttt gtc tac tgg ggc 439  
Ala Arg Tyr Gly Tyr Ser Arg Tyr Asp Val Arg Phe Val Tyr Trp Gly

100	105	110	
cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca	gcctccacca	agggccact	486
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
115	120		
agtcgtgact	gggaaaac		504
<210> 28			
<211> 141			
<212> DNA			
<213> 人工的			
<220>			
<223> 用于编码 HV. 6 的 DNA 的构建的合成 DNA			
<400> 28			
caggaaacag ctatgacgaa ttcgcgccc	cacactgact ctaaccatgg	aatggatctg	60
gatctttctc ttcttctct	caggaactac aggtgtctac	tcccaggtgc agctggtgca	120
gtctggggct	gaggtggcga	g	141
<210> 29			
<211> 141			
<212> DNA			
<213> 人工的			
<220>			
<223> 用于编码 HV. 6 的 DNA 的构建的合成 DNA			
<400> 29			
aggatcgate tctccaatcc actcaagccc	ttgtccagac ctctgccgca	cccagtttag	60
atagtagtca gtgaaggtgt atccagaagc	cttgcaggag accttactg	aggccccggg	120
cctcgccacc	tcagccccag	a	141
<210> 30			
<211> 141			
<212> DNA			

<213> 人工的

<220>

<223> 用于编码 HV.6 的 DNA 的构建的合成 DNA

<400> 30

ggattggaga gatcgatcct ggaagtgata gtatatatta taatgaaaac ttggagggca 60

gagtcacgat taccgaggac acatccacga gcacagccta catggagctg agcagcctga 120

gatctgagga cacggccgtg t 141

<210> 31

<211> 141

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于编码 HV.6 的 DNA 的构建的合成 DNA

<400> 31

gttttcccag tcacgactag tgggcccttg gtggaggctg aggagacggt gaccagggtt 60

ccctggcccc agtagacaaa ccttacgtcg tatctagaat acccatatct cgcacagaaa 120

tacacggccg tgtcctcaga t 141

<210> 32

<211> 459

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 编码 LV.0 的 DNA

<220>

<221> CDS

<222> (40)..(432)

<220>

<221> 信号肽

<222> (40)..(96)

&lt;400&gt; 32

caggaaacag ctatgacgaa ttcaggttgc ctctcaaa atg aag ttg cct gtt 54  
 Met Lys Leu Pro Val  
 -15

agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct gct tcc agg agt gat atc 102  
 Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala Ser Arg Ser Asp Ile  
 -10 -5 -1 1

gtg atg act cag tct cca ctc tcc ctg ccc gtc acc cct gga gag ccg 150  
 Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro  
 5 10 15

gcc tcc atc tcc tgc aga tct agt cag agt ctt gta cat agt aat gga 198  
 Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly  
 20 25 30

aga acc tat tta gaa tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct cca cag 246  
 Arg Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln  
 35 40 45 50

ctc ctg atc tat aaa gtt tcc aac cga att tct ggg gtc cca gac agg 294  
 Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Ile Ser Gly Val Pro Asp Arg  
 55 60 65

ttc agt ggc agt gga tcc ggg aca gat ttc aca ctg aaa atc agc agg 342  
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg  
 70 75 80

gtg gag gct gag gac gtc ggg gtt tat tac tgc ttt cag ggt tca cat 390  
 Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His  
 85 90 95

gtt ccg tac acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa 432  
 Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105 110

cgtacgacta gtcgtgactg ggaaaac 459

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 130

<212> DNA  
<213> 人工的

<220>  
<223> 用于编码 LV.0 的 DNA 的构建的合成 DNA

<400> 33  
caggaaacag ctatgacgaa ttcaggttgc ctctcaaaa tgaagttgcc tgtaggctg 60  
ttggtgctga tgttctggat tcctgcttcc aggagtgata tcgtgatgac tcagtctcca 120  
ctctccctgc 130

<210> 34  
<211> 130  
<212> DNA  
<213> 人工的

<220>  
<223> 用于编码 LV.0 的 DNA 的构建的合成 DNA

<400> 34  
agactggcct ggcttctgca ggtaccattc taaatagggtt ctccattac tatgtacaag 60  
actctgacta gatctgcagg agatggaggc cggctctcca ggggtgacgg gcagggagag 120  
tggagactga 130

<210> 35  
<211> 130  
<212> DNA  
<213> 人工的

<220>  
<223> 用于编码 LV.0 的 DNA 的构建的合成 DNA

<400> 35  
tgcagaagcc aggccagtct ccacagctcc tgatctataa agtttccaac cgaatttctg 60  
gggtcccaga caggttcagt ggcagtggat ccgggacaga tttcacactg aaaatcagca 120  
gggtggaggc 130

<210> 36  
 <211> 129  
 <212> DNA  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 用于编码 LV.0 的 DNA 的构建的合成 DNA

<400> 36  
 gttttccag tcacgactag tcgtacgitt gatttccacc ttggtccctt ggccgaacgt 60  
 gtacggaaca tgtgaaccct gaaagcagta ataaaccccg acgtcctcag cctccaccct 120  
 gctgatttt 129

<210> 37  
 <211> 459  
 <212> DNA  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 编码 LV.6 的 DNA

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (40)..(432)

<220>  
 <221> 信号肽  
 <222> (40)..(96)

<400> 37  
 caggaaacag ctatgacgaa ttcaggttgc ctctcaaa atg aag ttg cct gtt 54  
 Met Lys Leu Pro Val  
 -15  
 agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct gct tcc agg agt gat gtt 102  
 Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala Ser Arg Ser Asp Val  
 -10 -5 -1 1  
 gtg atg act cag tct cca ctg tcc ctg ccc gtc agt ctt gga gag ccg 150

Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Glu Pro	
5 10 15	
gcc tcc atc tcc tgc aga tct agt cag agt ctt gta cat agt aat gga	198
Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly	
20 25 30	
aga acc tat tta gaa tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct cca aag	246
Arg Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys	
35 40 45 50	
gtc ctg atc tat aaa gtt tcc aac cga att tct ggg gtc cca gac agg	294
Val Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Ile Ser Gly Val Pro Asp Arg	
55 60 65	
ttc agt ggc agt gga tcc ggg aca gat ttc aca ctg aaa atc agc agg	342
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg	
70 75 80	
gtg gag gct gag gac gtc ggg gtt tat ttc tgc ttt cag ggt tca cat	390
Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Phe Gln Gly Ser His	
85 90 95	
gtt ccg tac acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa	432
Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
120 125 130	
cgtacgacta gtcgtgactg ggaaaac	459
<210> 38	
<211> 130	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 用于编码 LV.6 的 DNA 的构建的合成 DNA	
<400> 38	
caggaaacag ctatgacgaa ttcaggttgc ctctcaaaa tgaagttgcc tgtaggctg	60
ttggtgctga tgttctggat tctgcttcc aggagtgatg ttgtgatgac tcagtctcca	120

ctctccctgc 130

<210> 39

<211> 130

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于编码 LV.6 的 DNA 的构建的合成 DNA

<400> 39

agactggcct ggcttctgca ggtaccattc taaataggtt ctccattac tatgtacaag 60

actctgacta gatctgcagg agatggaggc cggctctcca agactgacgg gcagggagag 120

tggagactga 130

<210> 40

<211> 130

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于编码 LV.6 的 DNA 的构建的合成 DNA

<400> 40

tgcagaagcc aggccagtct ccaaaggctc tgatctataa agtttccaac cgaatttctg 60

gggtcccaga caggttcagt ggcagtggat ccgggacaga tttcacactg aaaatcagca 120

gggtggaggc 130

<210> 41

<211> 129

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于编码 LV.6 的 DNA 的构建的合成 DNA

<400> 41  
 gttttcccag tcacgactag tcgtacgttt gatttcacc ttggtcctt ggccgaacgt 60  
 gtacggaaca tgtgaaccct gaaagcagaa ataaaccccg acgtcctcag cctccaccct 120  
 gctgatttt 129

<210> 42  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>

<223> 设计的抗 FGF-8 中和 CDR 移植抗体的 VL 氨基酸序列、LV. 4-1

<400> 42

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
 20 25 30

Asn Gly Arg Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

Pro Lys Val Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Ile Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Phe Gln Gly  
 85 90 95

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 43  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 设计的抗 FGF-8 中和 CDR 移植抗体的 VL 氨基酸序列、LV. 4-2

<400> 43  
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly  
 1                    5                    10                    15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
                   20                    25                    30

Asn Gly Arg Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
                   35                    40                    45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Ile Ser Gly Val Pro  
                   50                    55                    60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65                    70                    75                    80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Phe Gln Gly  
                   85                    90                    95

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
                   100                    105                    110

<210> 44  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>

<223> 设计的抗 FGF-8 中和 CDR 移植抗体的 VL 氨基酸序列、LV. 3-1

<400> 44

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
1                   5                   10                   15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
                  20                   25                   30

Asn Gly Arg Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
                  35                   40                   45

Pro Gln Val Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Ile Ser Gly Val Pro  
                  50                   55                   60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
65                   70                   75                   80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Phe Gln Gly  
                  85                   90                   95

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
                  100                   105                   110

<210> 45

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 设计的抗 FGF-8 中和 CDR 移植抗体的 VL 氨基酸序列、LV. 3-2

<400> 45

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly  
1                   5                   10                   15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
 20 25 30

Asn Gly Arg Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Ile Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Phe Gln Gly  
 85 90 95

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 46

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 设计的抗 FGF-8 中和 CDR 移植抗体的 VL 氨基酸序列、LV. 2-1

<400> 46

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
 20 25 30

Asn Gly Arg Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

Pro Gln Val Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Ile Ser Gly Val Pro  
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Phe Gln Gly  
85 90 95

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 47

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 设计的抗 FGF-8 中和 CDR 移植抗体的 VL 氨基酸序列、LV. 2-2

<400> 47

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
20 25 30

Asn Gly Arg Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Ile Ser Gly Val Pro  
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Phe Gln Gly  
 85 90 95

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 48

<211> 39

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于编码 LV.3-1 的 DNA 的构建的引物

<400> 48

atggtacctg cagaagccag gccagtctcc acaggtcct 39

<210> 49

<211> 39

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于编码 LV.2-2 的 DNA 的构建的引物

<400> 49

atggtacctg cagaagccag gccagtctcc acagctcct 39

<210> 50

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 设计的抗 FGF-8 中和 CDR 移植抗体的 VL 氨基酸序列、LV.4-3

<400> 50

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly

1                    5                    10                    15  
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
                   20                    25                    30  
 Asn Gly Arg Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
                   35                    40                    45  
 Pro Gln Val Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Ile Ser Gly Val Pro  
                   50                    55                    60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
                   65                    70                    75                    80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Phe Gln Gly  
                   85                    90                    95  
 Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
                   100                    105                    110

<210> 51

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 设计的抗 FGF-8 中和 CDR 移植抗体的 VL 氨基酸序列、LV. 3-3

<400> 51

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly  
 1                    5                    10                    15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
                   20                    25                    30

---

Asn Gly Arg Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

Pro Gln Val Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Ile Ser Gly Val Pro  
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
85 90 95

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

图1

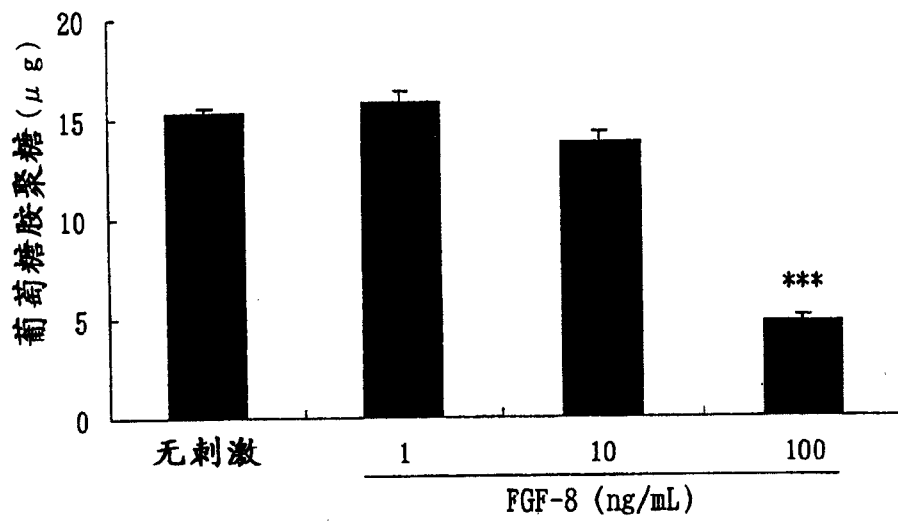


图 2

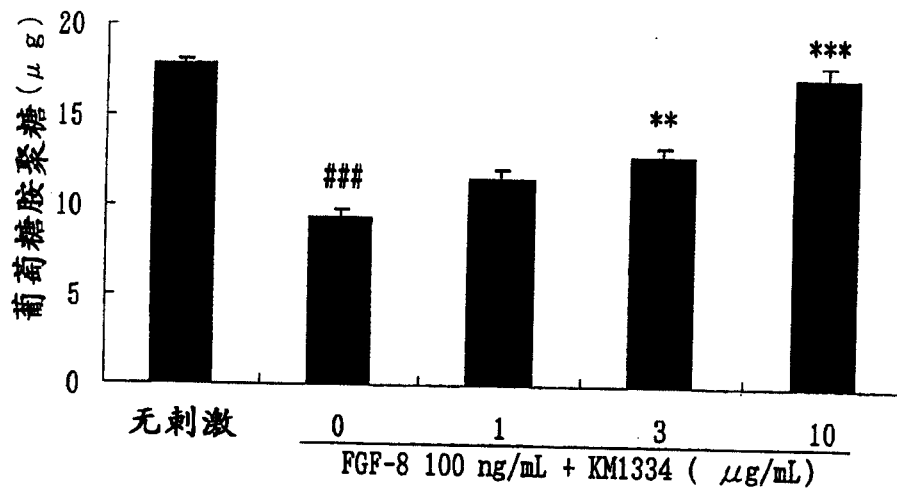


图 3

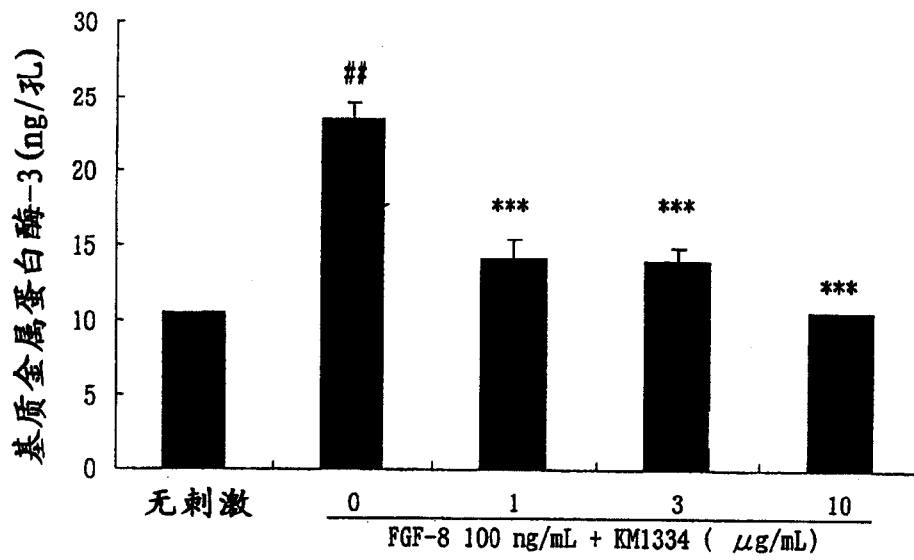


图 4

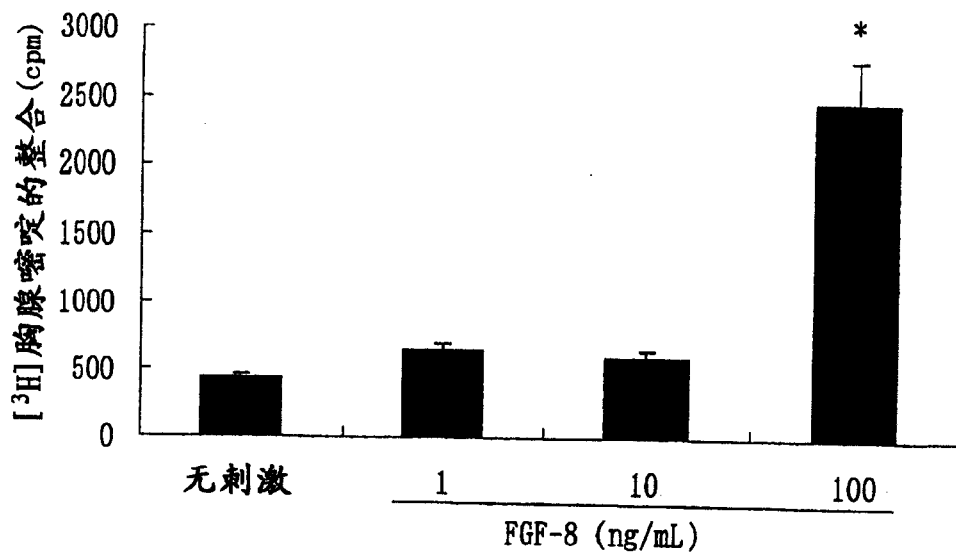


图5

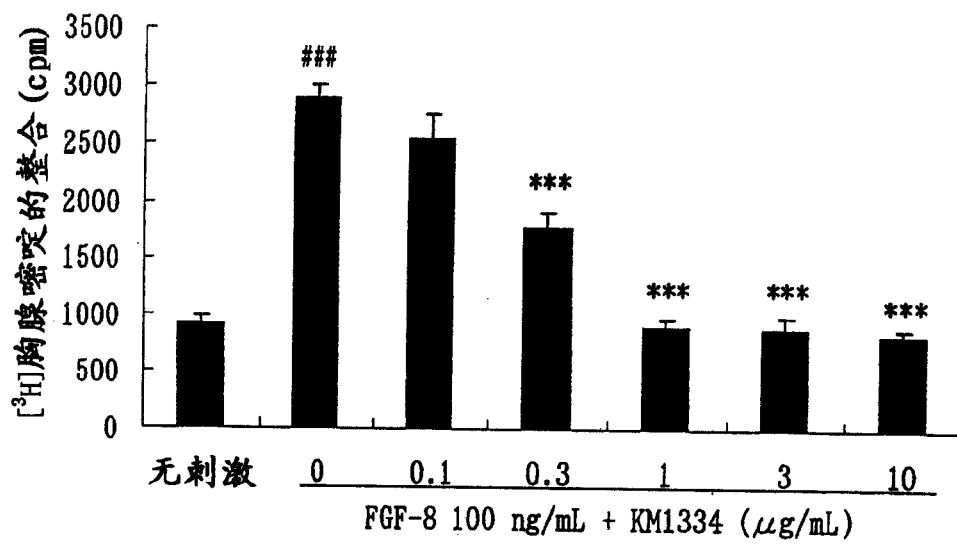


图6

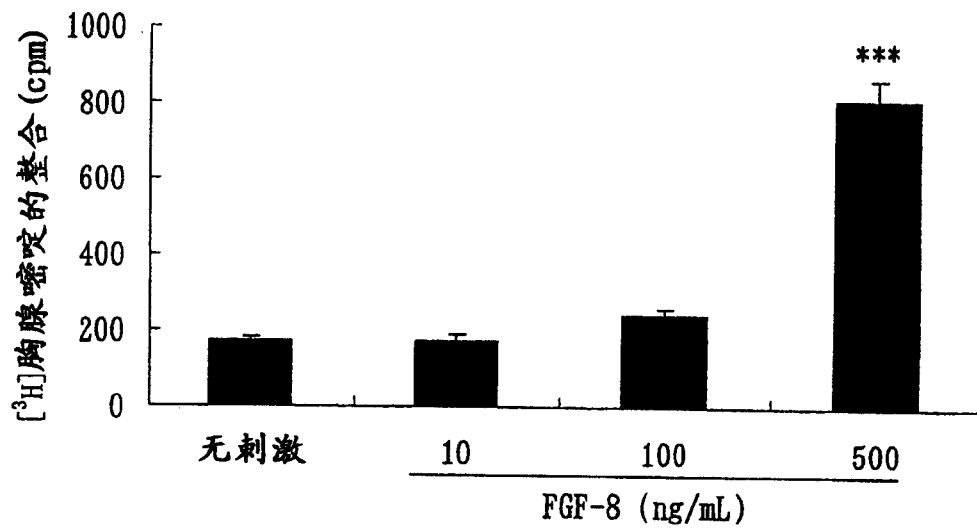


图 7

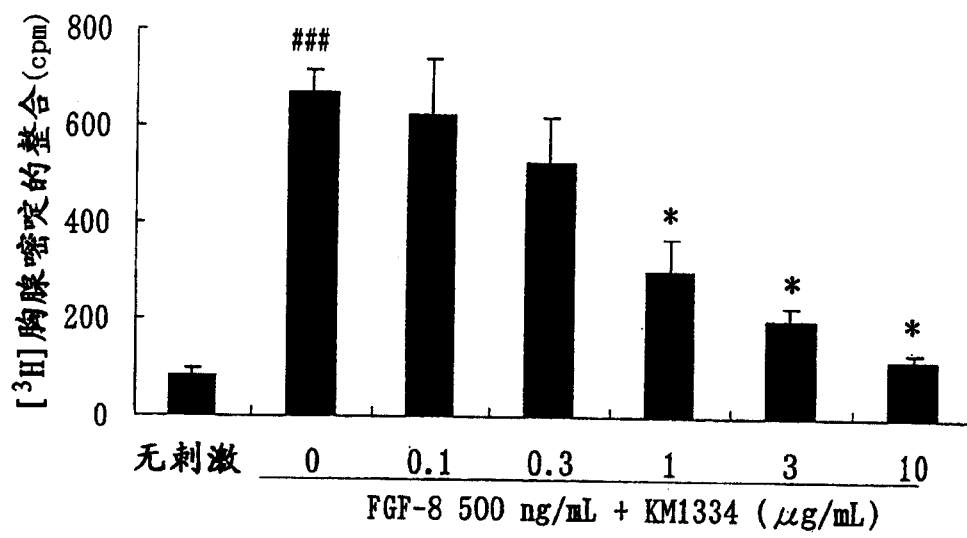


图8

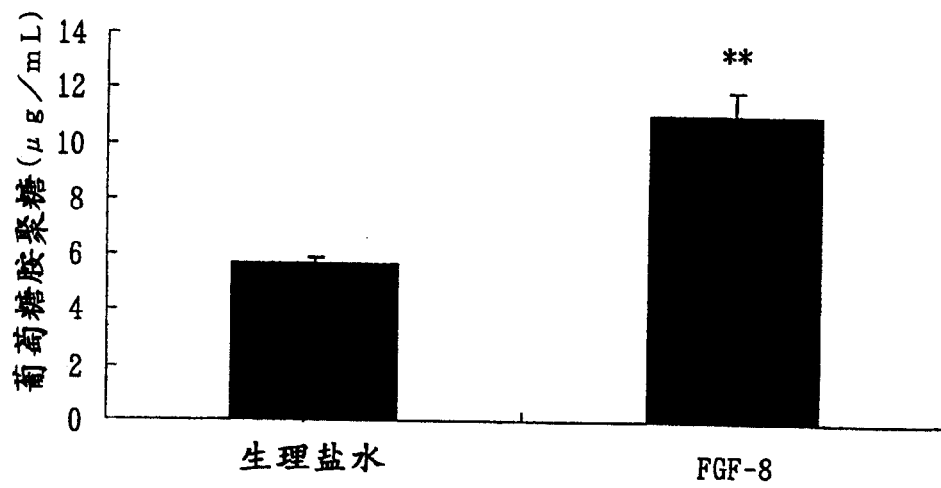


图9

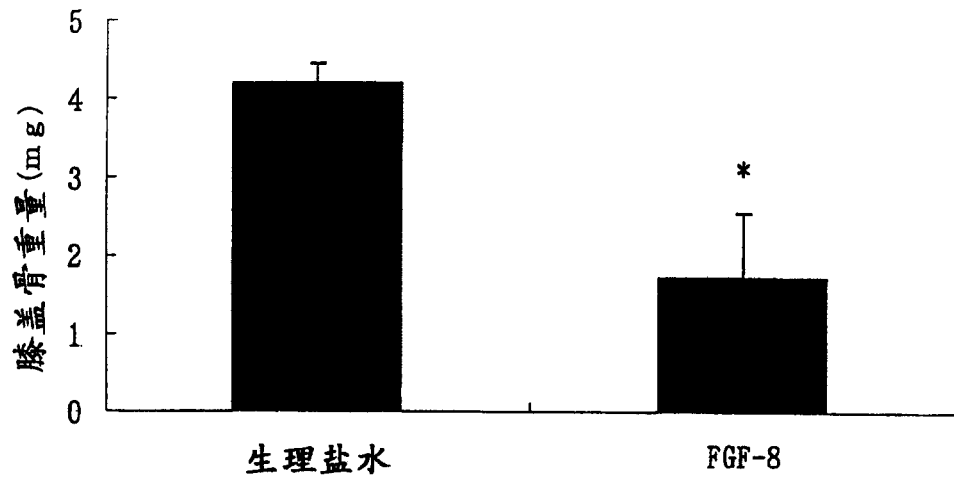


图 10

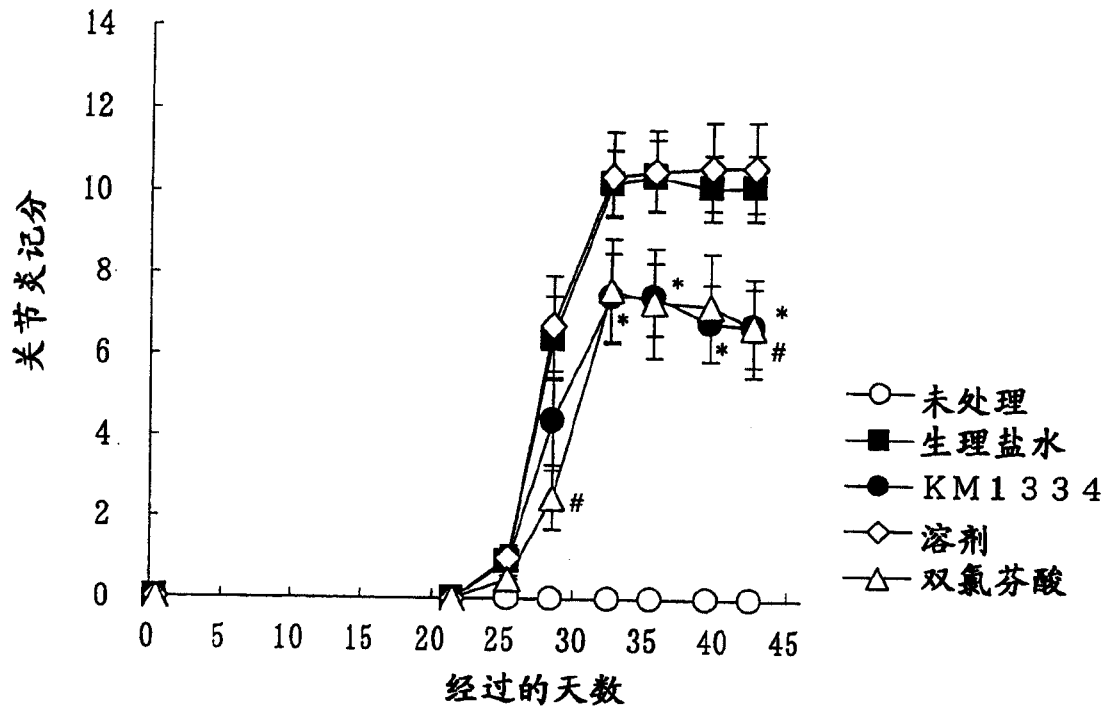


图11

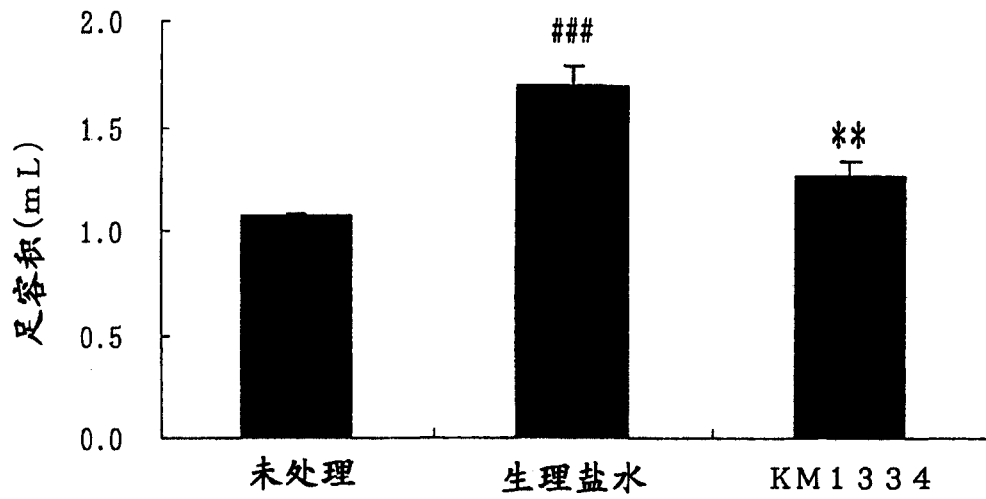


图12

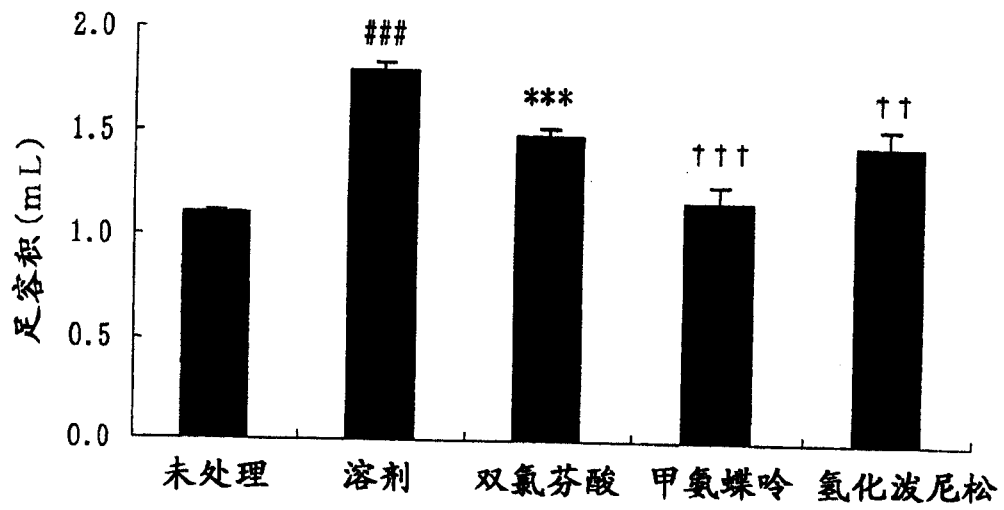


图13

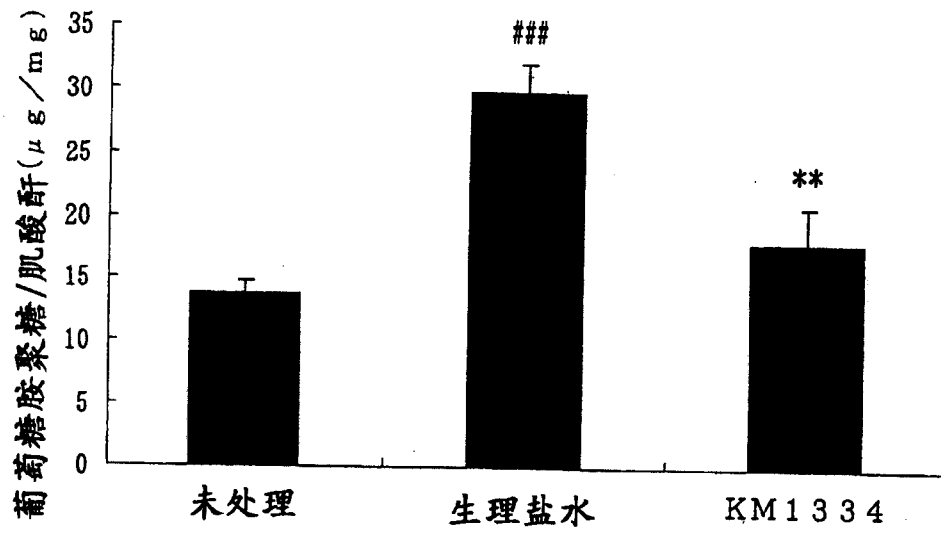


图 14

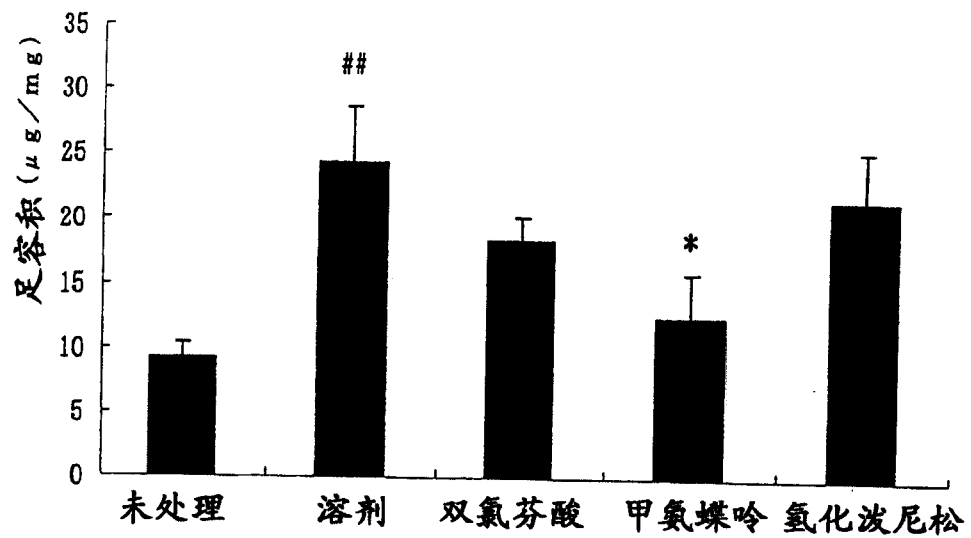


图15

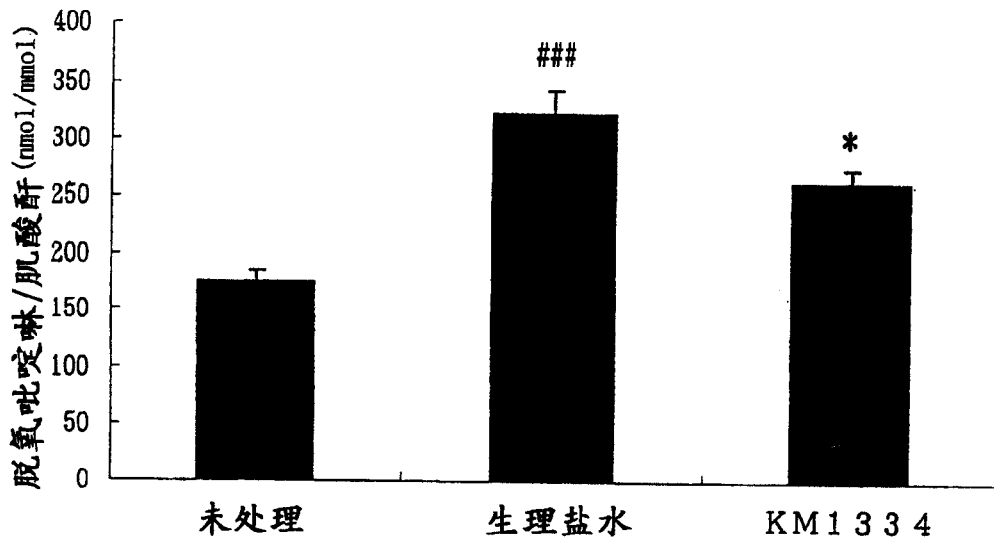


图16

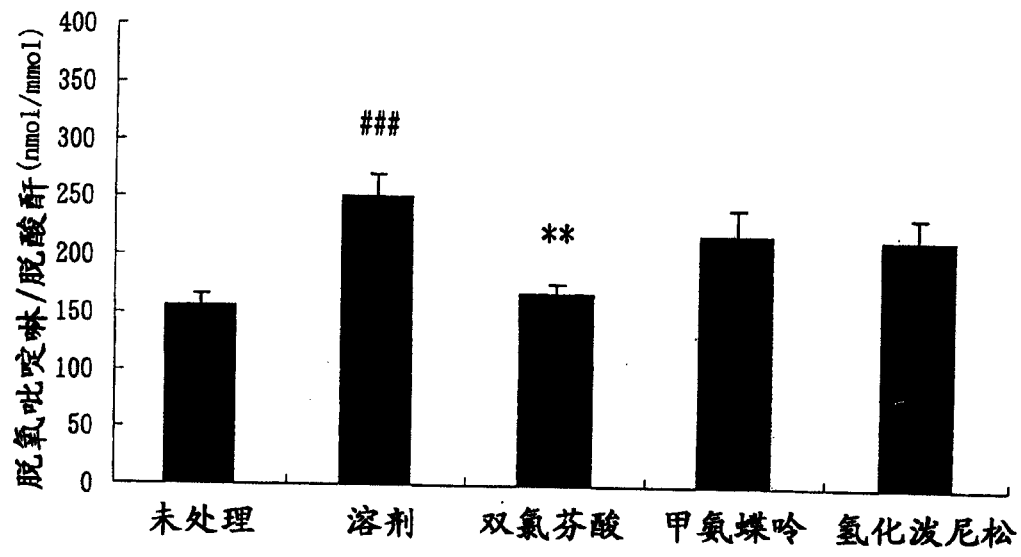


图17

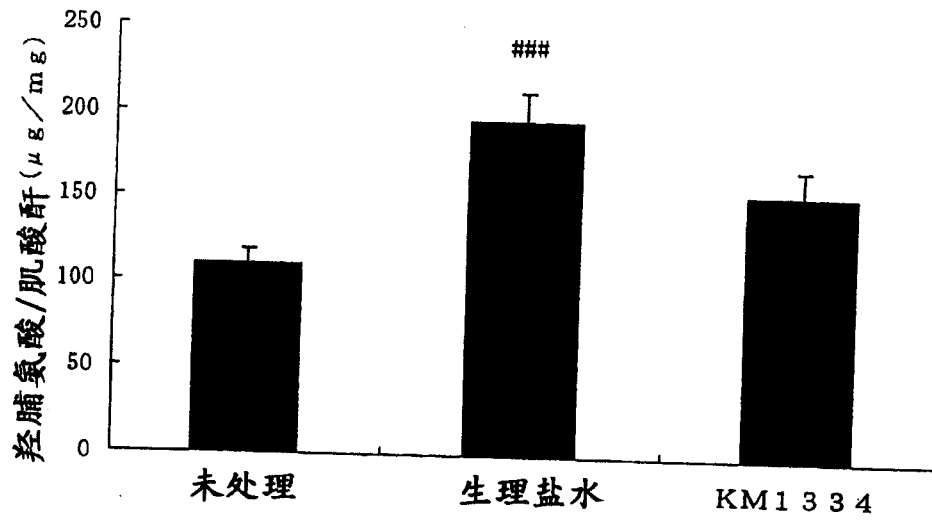


图18

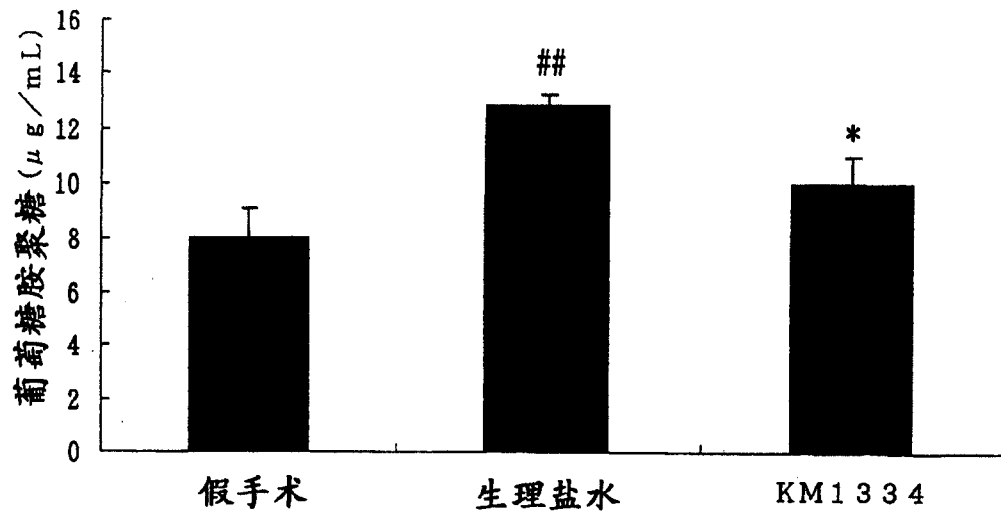


图 19

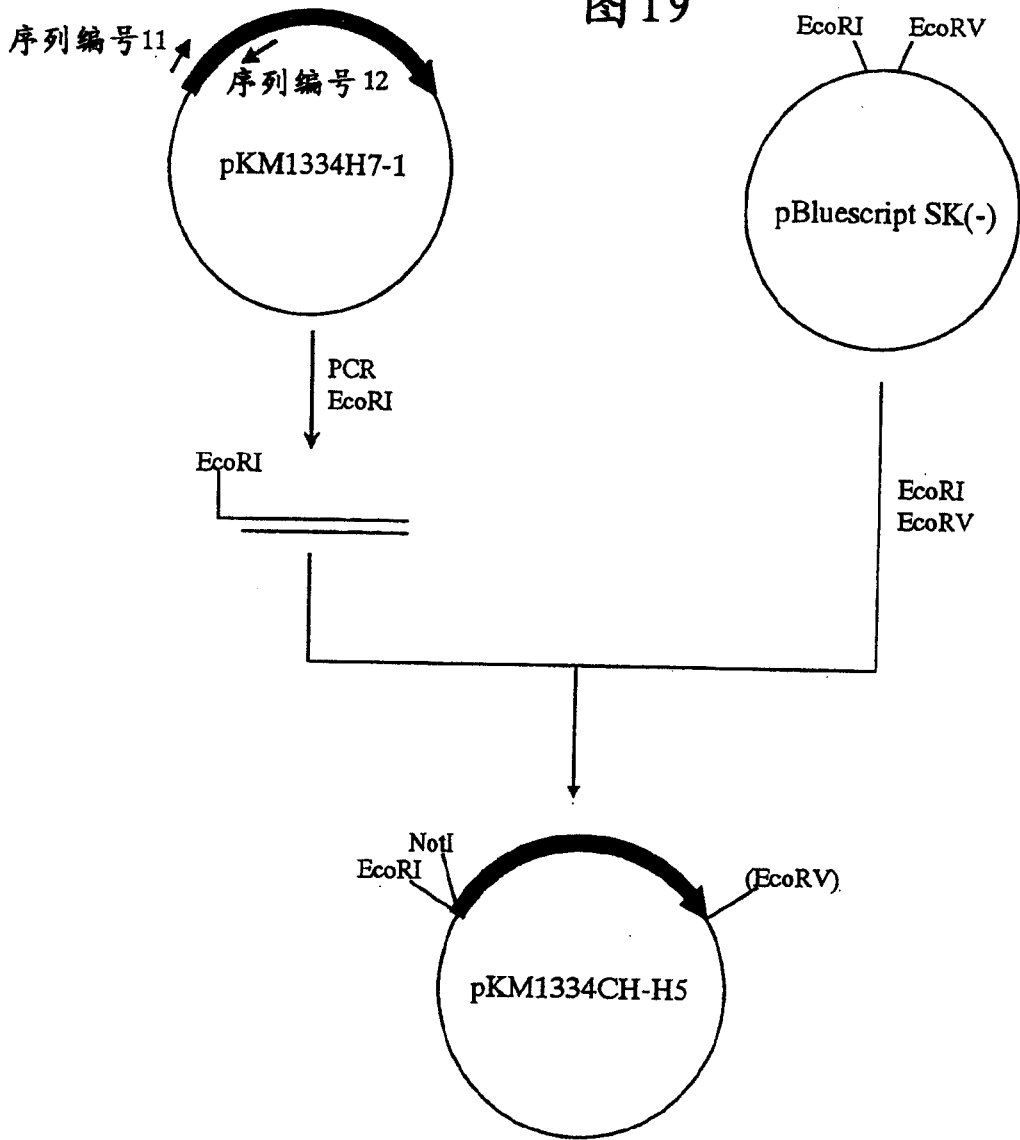


图 20

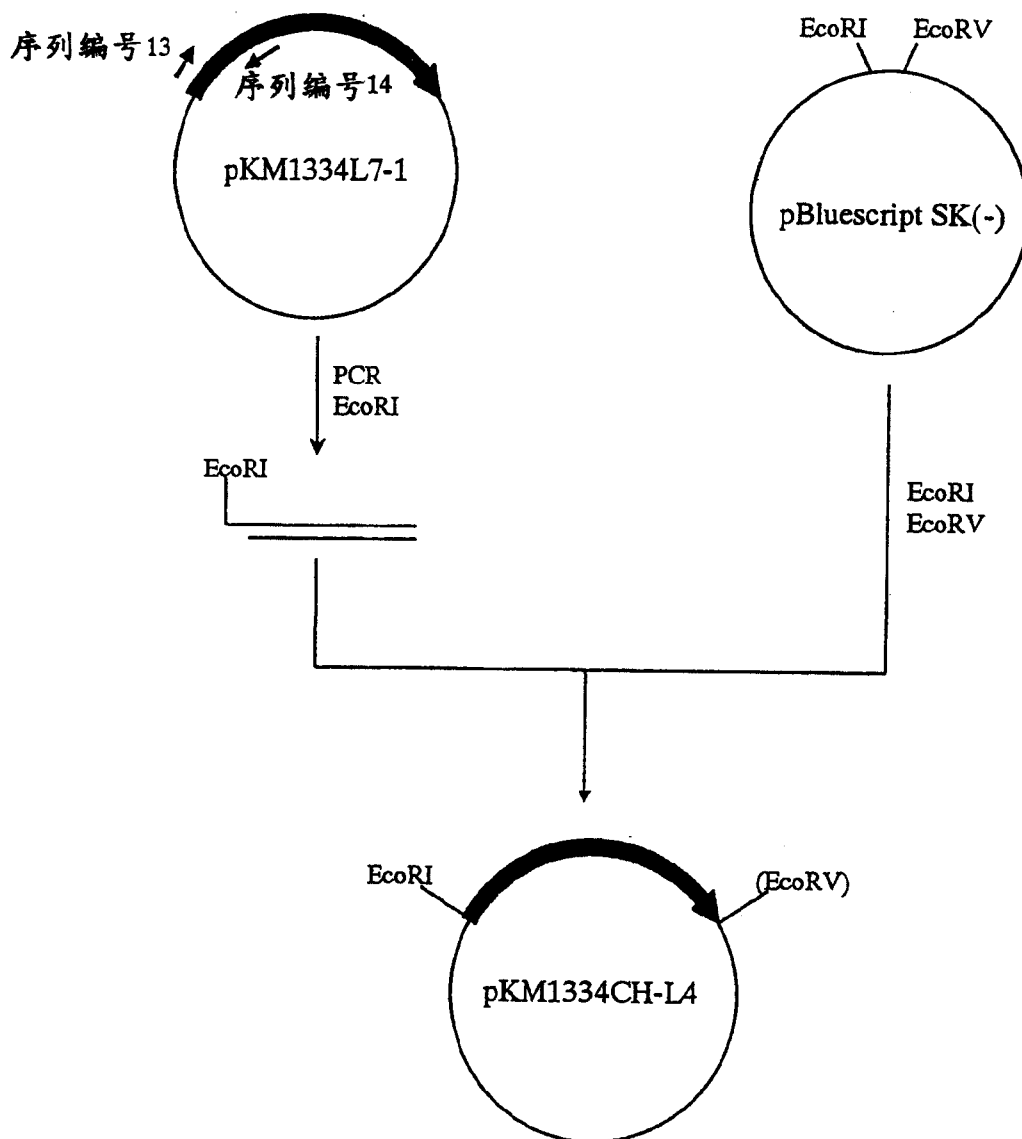


图 21

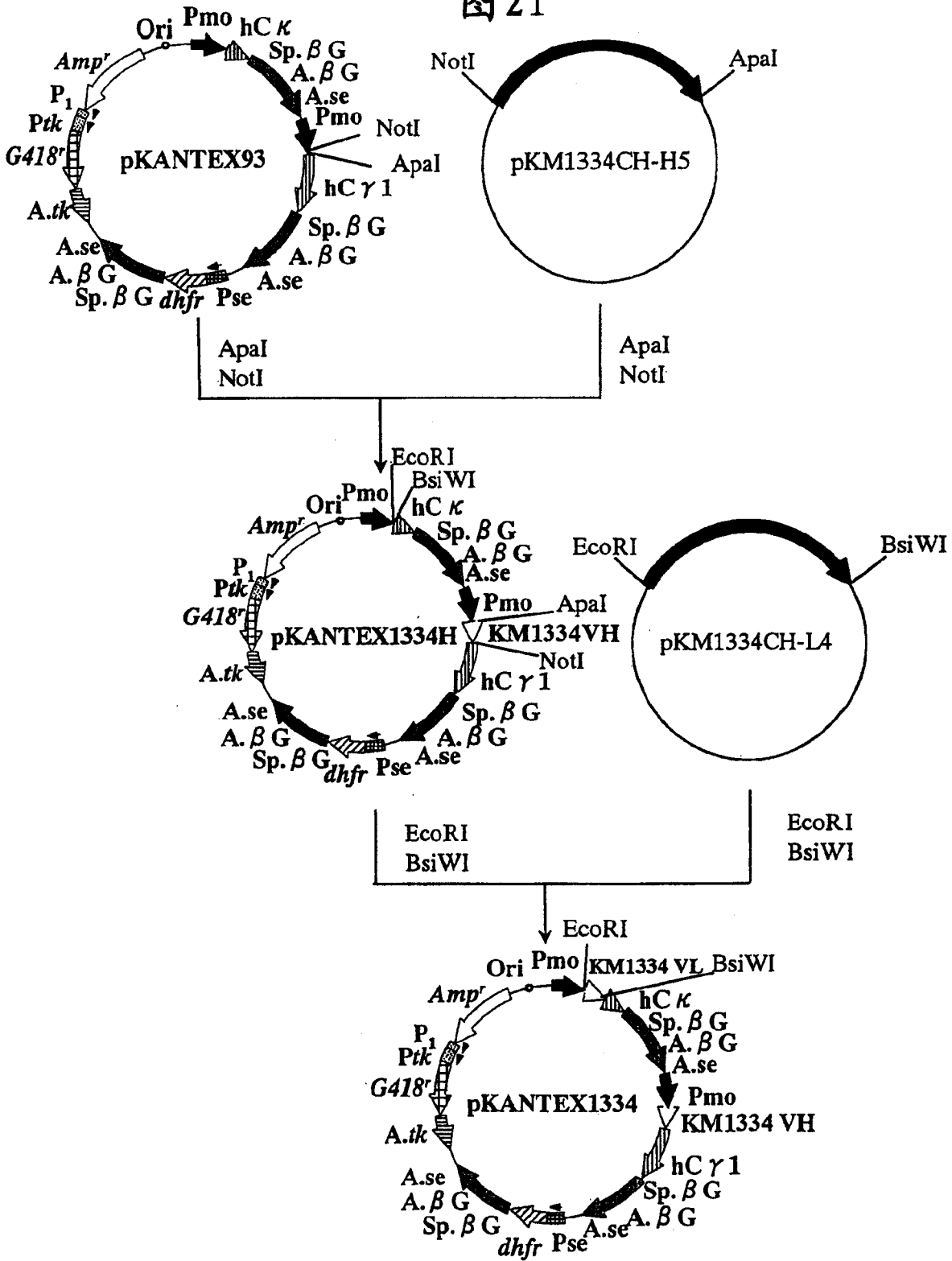


图 22

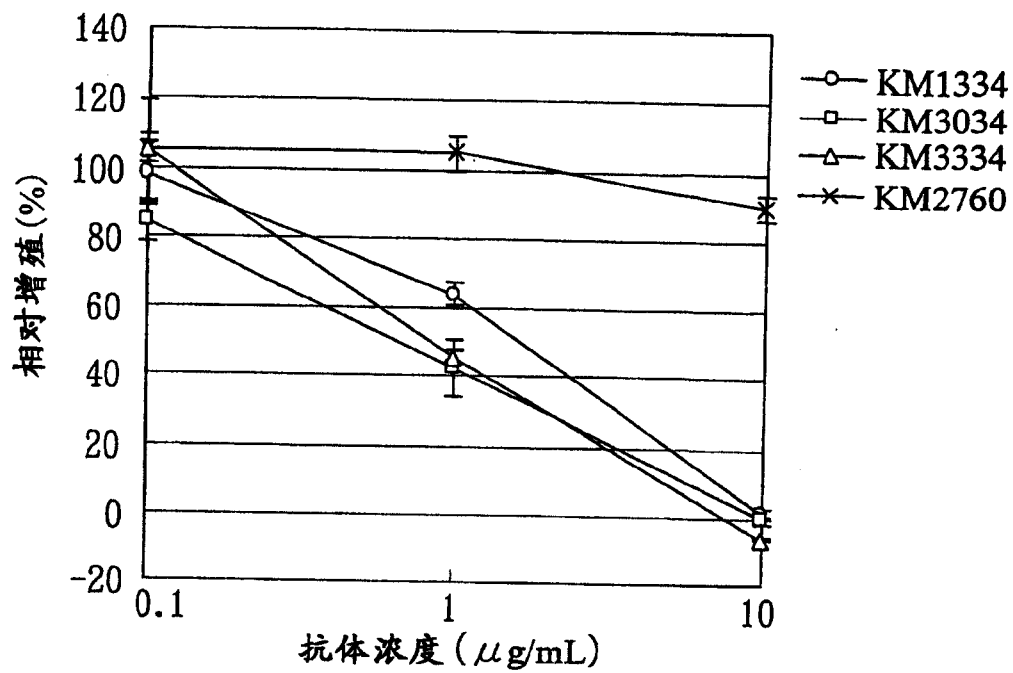


图 23

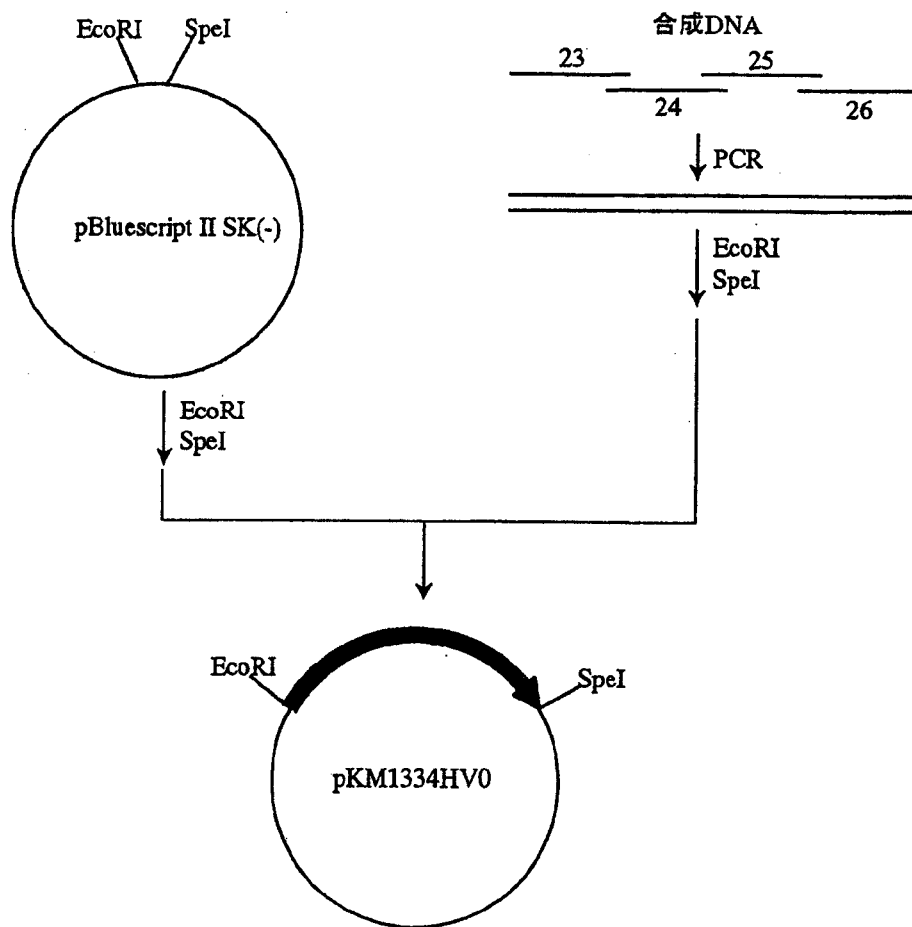


图 24

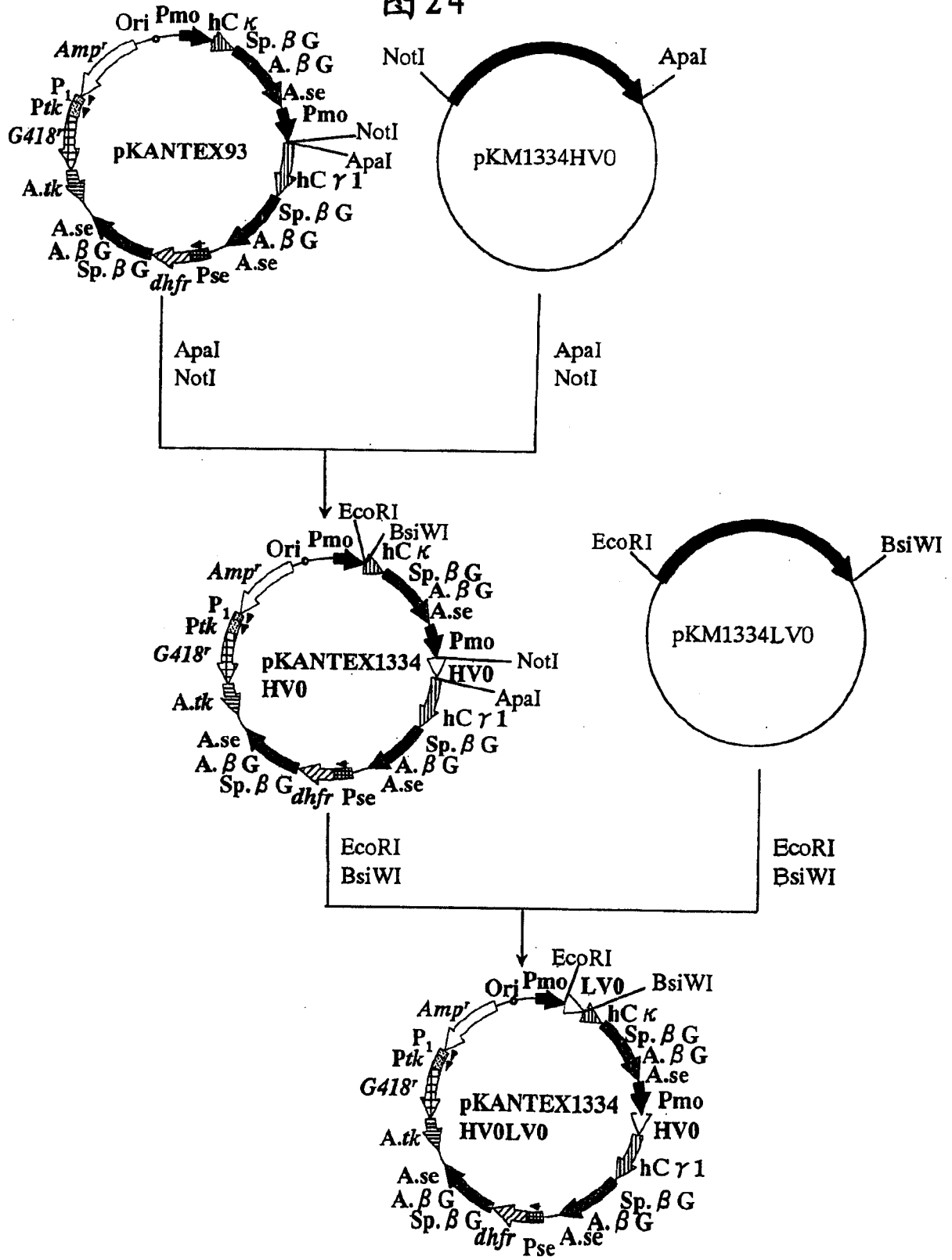


图 25

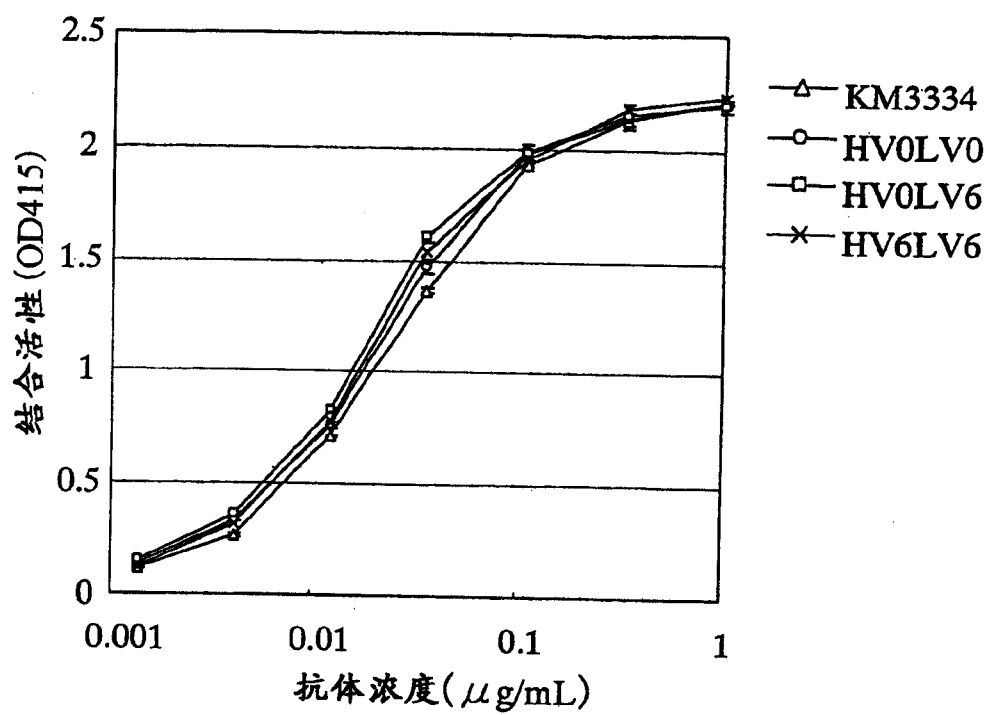


图 26

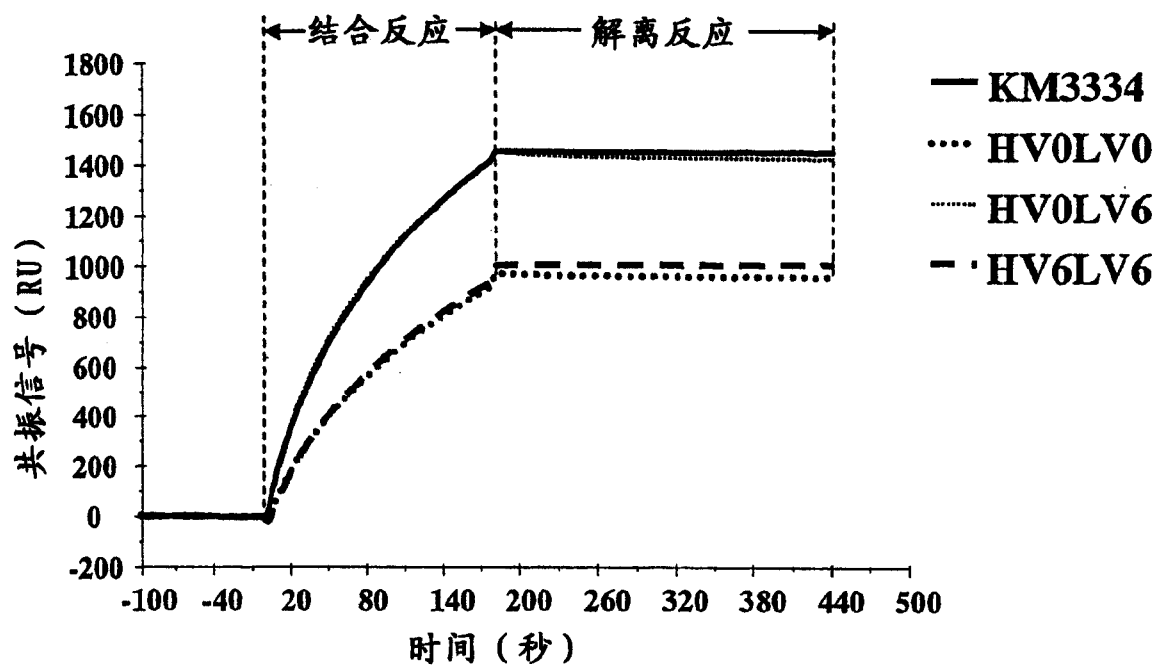


图 27

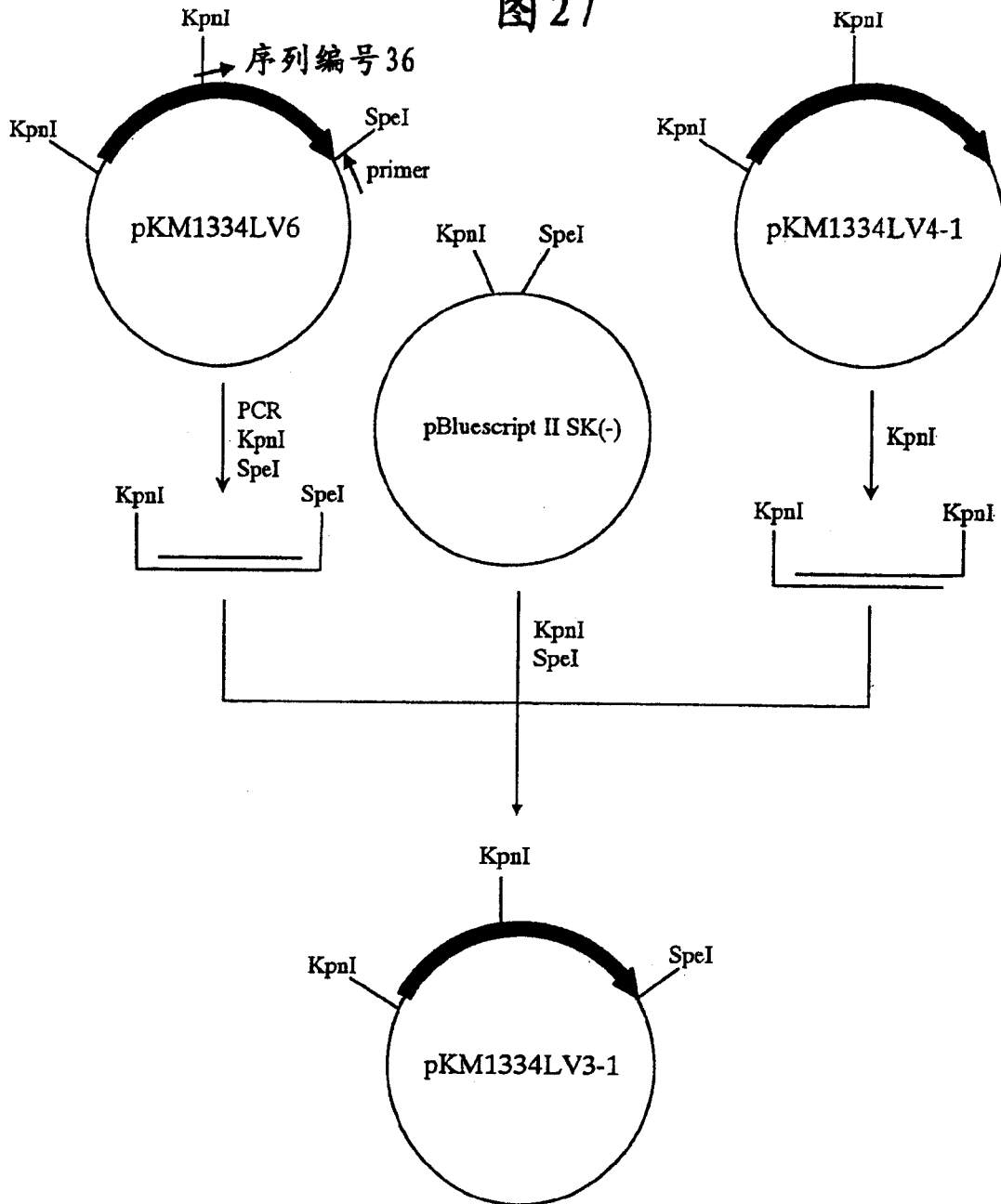


图 28

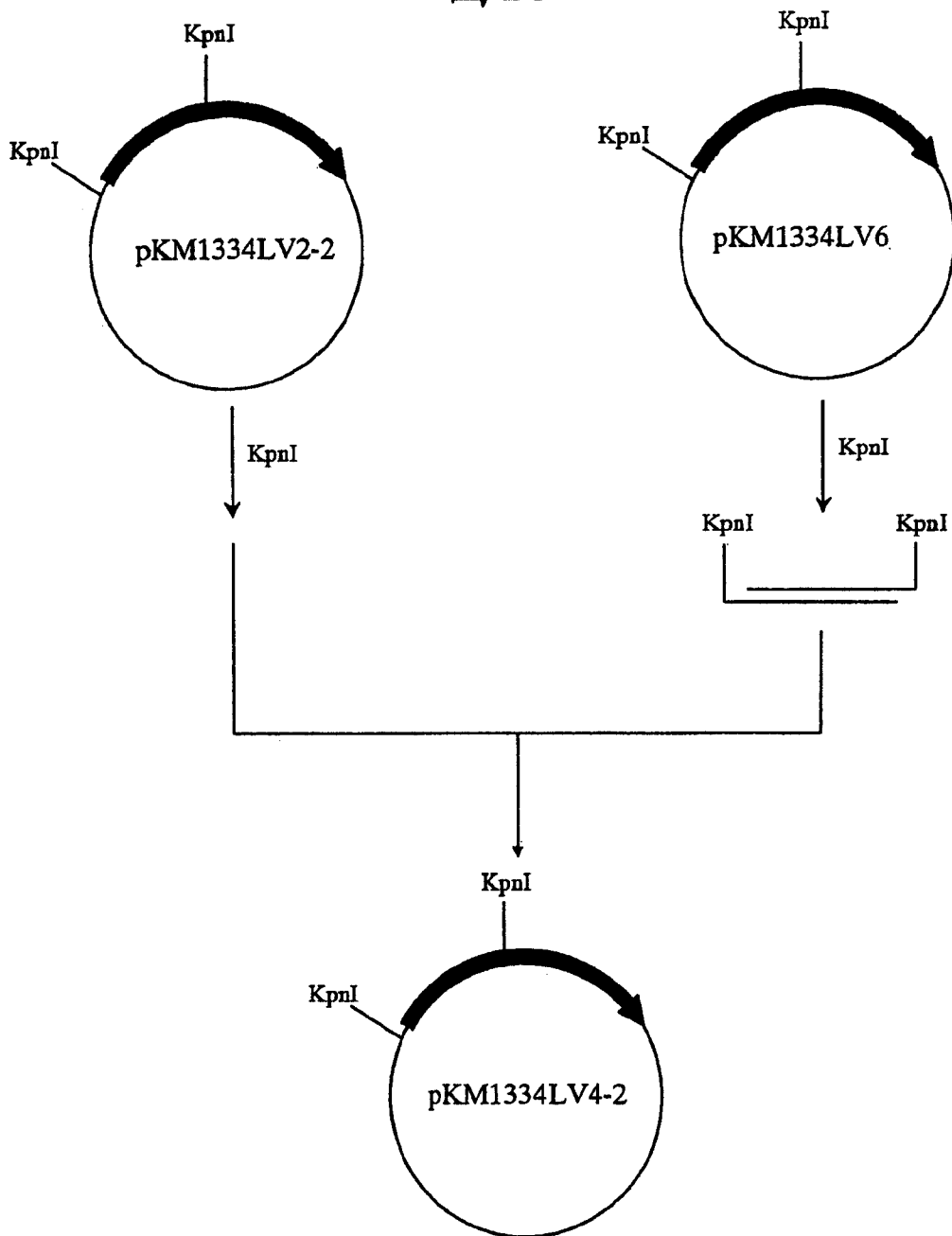


图 29

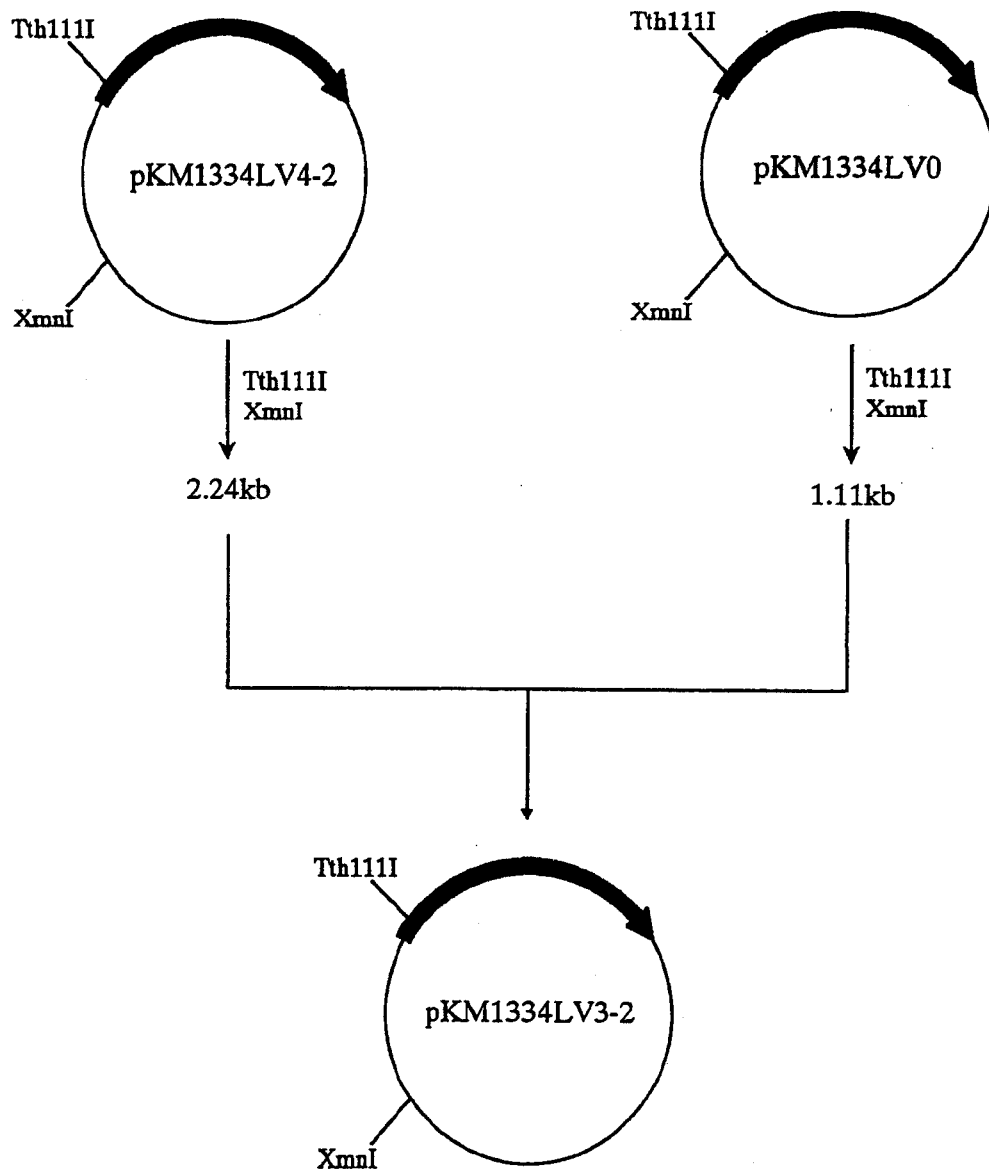


图 30

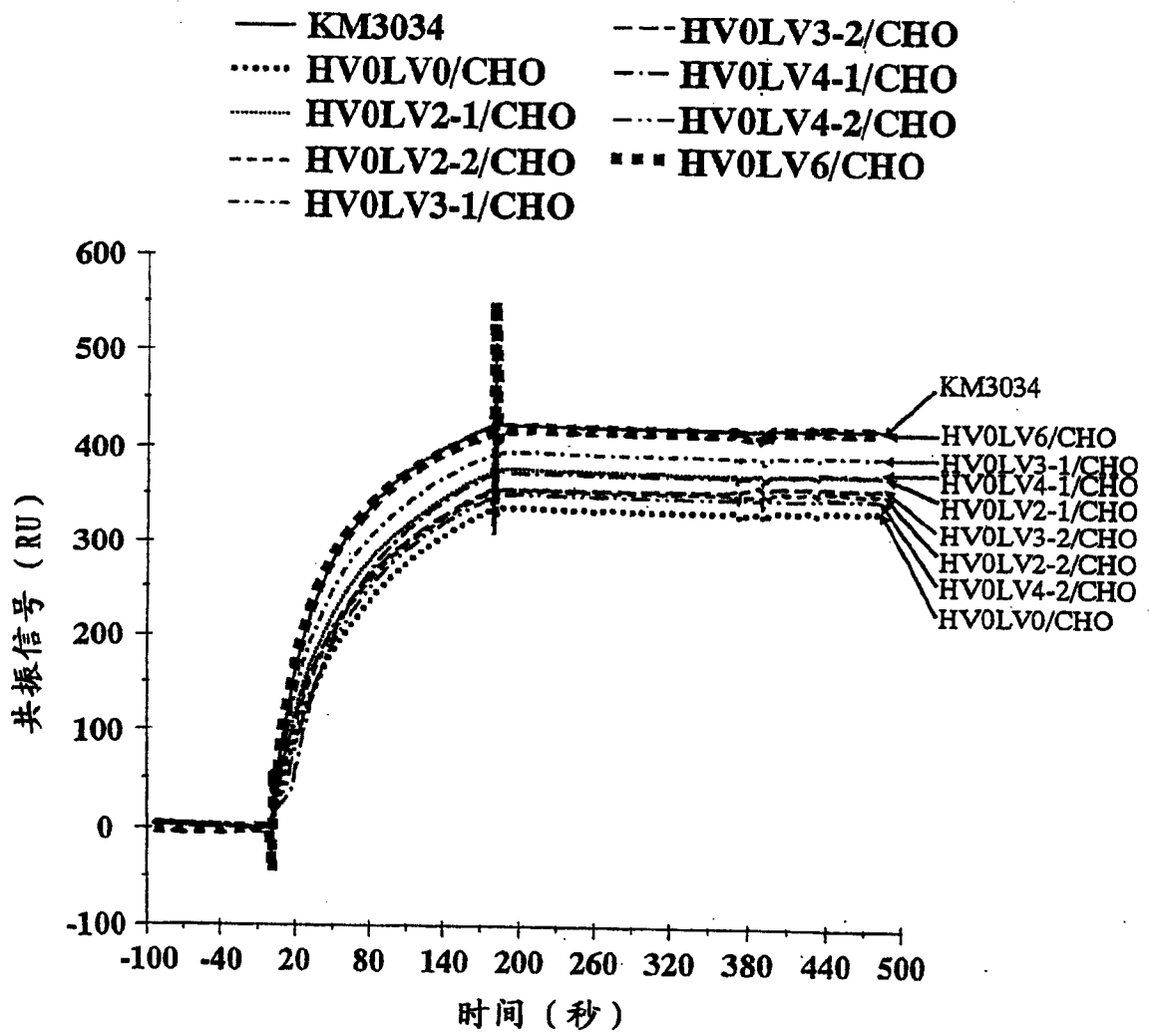


图 31

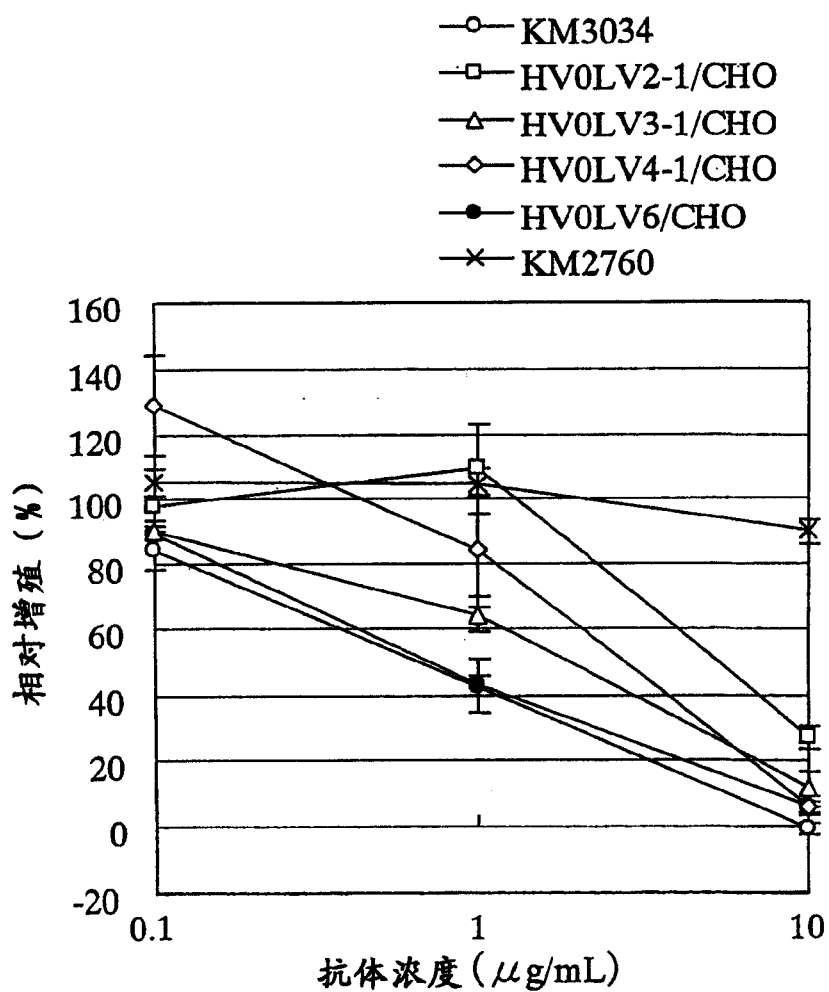


图 32

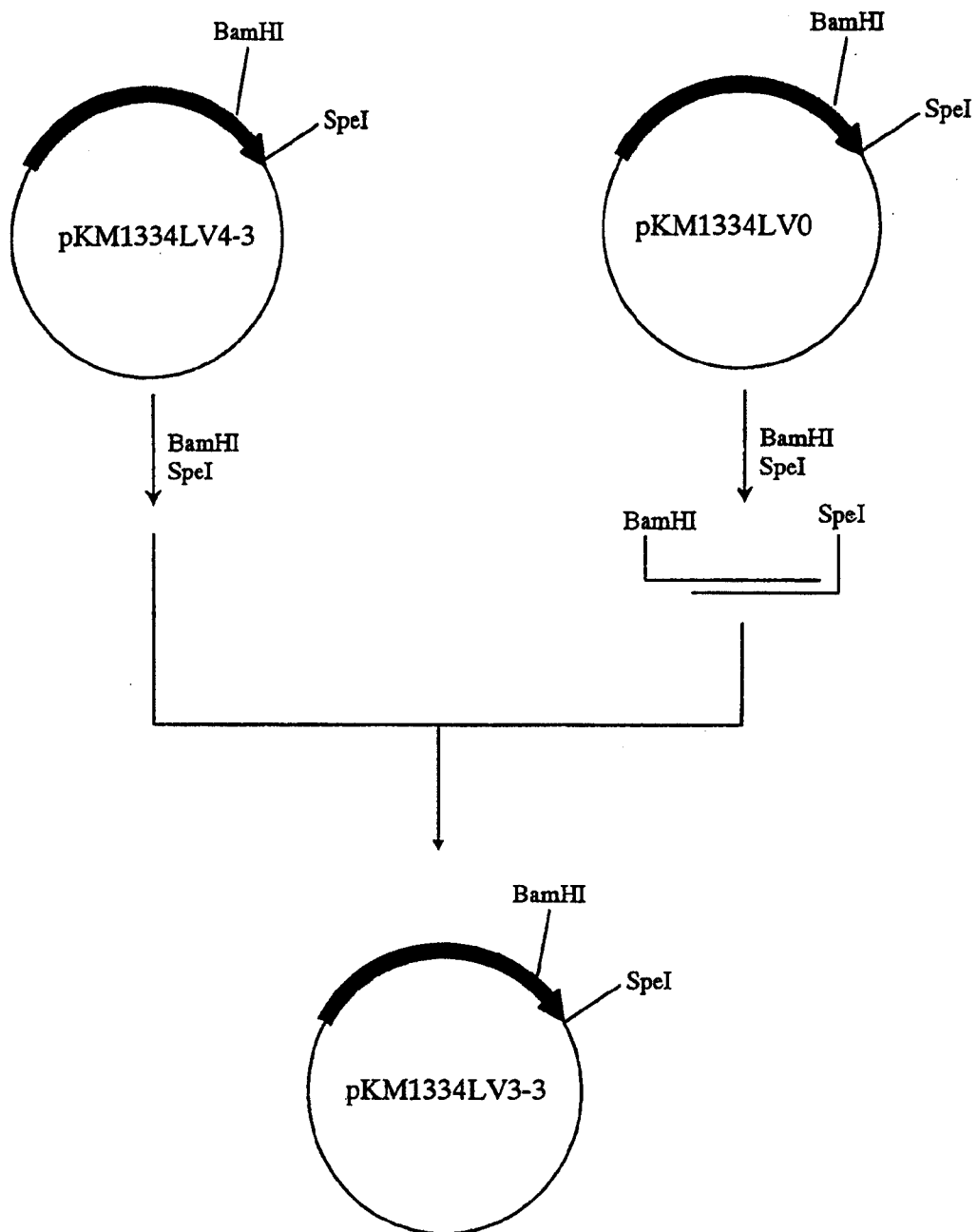


图 33

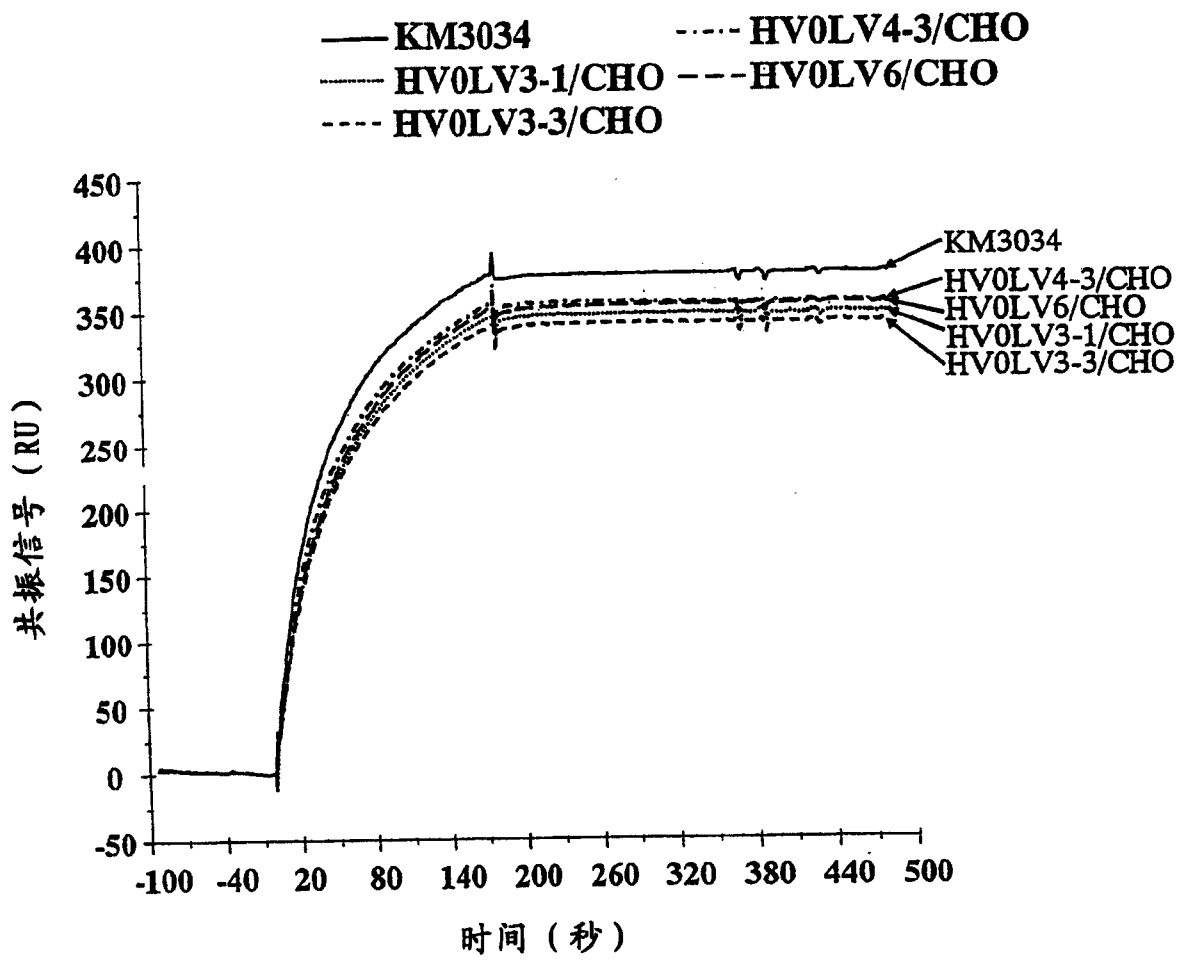


图 34

