

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4980068号
(P4980068)

(45) 発行日 平成24年7月18日 (2012. 7. 18)

(24) 登録日 平成24年4月27日 (2012. 4. 27)

(51) Int. Cl.	F I
C O 7 K 16/18 (2006. 01)	C O 7 K 16/18
C O 7 K 7/06 (2006. 01)	C O 7 K 7/06 Z N A
C O 7 K 7/08 (2006. 01)	C O 7 K 7/08
C 1 2 N 15/02 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 C

請求項の数 20 (全 17 頁)

(21) 出願番号	特願2006-543353 (P2006-543353)	(73) 特許権者	507274087
(86) (22) 出願日	平成16年11月12日 (2004. 11. 12)		パトリス・リミテッド
(65) 公表番号	特表2007-537995 (P2007-537995A)		オーストラリア国ビクトリア 3000,
(43) 公表日	平成19年12月27日 (2007. 12. 27)		メルボルン, フリンダーズ・レイン 51
(86) 国際出願番号	PCT/DE2004/002503		7, レベル 2
(87) 国際公開番号	W02005/049635	(74) 代理人	100140109
(87) 国際公開日	平成17年6月2日 (2005. 6. 2)		弁理士 小野 新次郎
審査請求日	平成19年11月12日 (2007. 11. 12)	(74) 代理人	100075270
(31) 優先権主張番号	10353175.0		弁理士 小林 泰
(32) 優先日	平成15年11月14日 (2003. 11. 14)	(74) 代理人	100080137
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		弁理士 千葉 昭男
		(74) 代理人	100096013
			弁理士 富田 博行
		(74) 代理人	100091638
			弁理士 江尻 ひろ子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 脂肪を減少する効果を有するヒト単クローン抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

精製抗体またはその機能性フラグメントであって、軽鎖可変領域 (V_L) 配列および重鎖可変領域 (V_H) 配列を含み：

ここで該重鎖可変領域 (V_H) 配列は、配列番号：3 のアミノ酸配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含み、かつ、ここで該抗体またはその機能性フラグメントは、低比重リポタンパク (LDL) および酸化LDL (oxLDL) の少なくとも1つと結合する、精製抗体またはその機能性フラグメント。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の精製抗体またはその機能性フラグメントであって、ここで該抗体またはその機能性フラグメントが LDL コレステロールに結合する、精製抗体またはその機能性フラグメント。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の精製抗体またはその機能性フラグメントであって、ここで該低比重リポタンパク (LDL) または該酸化LDL (oxLDL) がヒトおよび他の動物の体内に存在し、相補的な糖鎖構造を有するものである、精製抗体またはその機能性フラグメント。

【請求項 4】

請求項 1 に記載の精製抗体またはその機能性フラグメントであって、ここで該重鎖可変領域 (V_H) 配列が配列番号：3 と少なくとも95%同一である、精製抗体またはその機能性フラグメント。

10

20

【請求項 5】

請求項 1 に記載の精製抗体またはその機能性フラグメントであって、ここで該重鎖可変領域（V_H）配列が配列番号：3 と少なくとも 98 % 同一である、精製抗体またはその機能性フラグメント。

【請求項 6】

請求項 1 に記載の精製抗体またはその機能性フラグメントであって、ここで該重鎖可変領域（V_H）配列が配列番号：3 と少なくとも 99 % 同一である、精製抗体またはその機能性フラグメント。

【請求項 7】

請求項 1 に記載の精製抗体またはその機能性フラグメントであって、ここで該軽鎖可変領域（V_L）配列が配列番号：1 のアミノ酸配列と少なくとも 75 % 同一である、精製抗体またはその機能性フラグメント。

10

【請求項 8】

請求項 1 に記載の精製抗体またはその機能性フラグメントであって、ここで該軽鎖可変領域（V_L）配列が配列番号：1 のアミノ酸配列と少なくとも 80 % 同一である、精製抗体またはその機能性フラグメント。

【請求項 9】

請求項 1 に記載の精製抗体またはその機能性フラグメントであって、ここで該軽鎖可変領域（V_L）配列が配列番号：1 のアミノ酸配列と少なくとも 85 % 同一である、精製抗体またはその機能性フラグメント。

20

【請求項 10】

請求項 1 に記載の精製抗体またはその機能性フラグメントであって、ここで該軽鎖可変領域（V_L）配列が配列番号：1 のアミノ酸配列と少なくとも 90 % 同一である、精製抗体またはその機能性フラグメント。

【請求項 11】

請求項 1 に記載の精製抗体またはその機能性フラグメントであって、ここで該軽鎖可変領域（V_L）配列が配列番号：1 のアミノ酸配列と少なくとも 95 % 同一である、精製抗体またはその機能性フラグメント。

【請求項 12】

請求項 1 に記載の精製抗体またはその機能性フラグメントであって、ここで該重鎖可変領域（V_H）配列が、配列番号：3 の Ser-Tyr-Ala-Met-His (CDR1) アミノ酸 31－35、配列番号：3 の Val-Ile-Ser-Tyr-Asp-Gly-Ser-Asn-Lys-Tyr-Tyr-Ala-Asp-Ser-Val-Lys-Gly (CDR2) アミノ酸 50－66、および配列番号：3 の Asp-Arg-Leu-Ala-Val-Ala-Gly-Lys-Thr-Phe-Asp-Tyr (CDR3) アミノ酸 99－110 と少なくとも 90 % の同一性を有する配列を含む、精製抗体またはその機能性フラグメント。

30

【請求項 13】

請求項 1 に記載の精製抗体またはその機能性フラグメントであって、ここで該重鎖可変領域（V_H）配列が、配列番号：3 の Ser-Tyr-Ala-Met-His (CDR1) アミノ酸 31－35、配列番号：3 の Val-Ile-Ser-Tyr-Asp-Gly-Ser-Asn-Lys-Tyr-Tyr-Ala-Asp-Ser-Val-Lys-Gly (CDR2) アミノ酸 50－66、および配列番号：3 の Asp-Arg-Leu-Ala-Val-Ala-Gly-Lys-Thr-Phe-Asp-Tyr (CDR3) アミノ酸 99－110 を含む、精製抗体またはその機能性フラグメント。

40

【請求項 14】

請求項 1 に記載の精製抗体またはその機能性フラグメントであって、ここで該重鎖可変領域（V_H）配列が配列番号：3 を含む、精製抗体またはその機能性フラグメント。

【請求項 15】

請求項 1 に記載の精製抗体またはその機能性フラグメントであって、ここで該軽鎖可変領域（V_L）配列が配列番号：1 を含む、精製抗体またはその機能性フラグメント。

【請求項 16】

請求項 1 に記載の精製抗体またはその機能性フラグメントであって、ここで該機能性フラ

50

グメントが、 V_H 、 F_V 、 F_{ab} 、 F_{ab}' および $F(ab')_2$ からなる群より選択される、精製抗体またはその機能性フラグメント。

【請求項 17】

請求項 1 に記載の精製抗体またはその機能性フラグメントであって、ここで該抗体またはその機能性フラグメントが単クローン抗体である、精製抗体またはその機能性フラグメント。

【請求項 18】

請求項 1 に記載の精製抗体またはその機能性フラグメントであって、ここで該抗体またはその機能性フラグメントがハイブリドーマによって産生される、精製抗体またはその機能性フラグメント。

10

【請求項 19】

LDL を減少するための、請求項 1 ～ 18 のいずれか一項に記載の精製抗体、その機能性フラグメントまたはポリペプチドの使用。

【請求項 20】

LDL コレステロールを減少するための、請求項 1 ～ 18 のいずれか一項に記載の精製抗体、その機能性フラグメントまたはポリペプチドの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

この発明は精製ポリペプチド (SAM-6.10)、ならびにこれに通常アジュバント および／または担体物質を組み合わせて脂肪を減少する効果を有する薬剤を製造するための、および腎臓疾患を治療する薬剤を製造するためのその使用に関する。

20

【背景技術】

【0002】

体内の過剰なコレステロール (高リポタンパク血症) は血管内部の層の硬化 (動脈硬化プラーク) を招き、動脈壁を次第に硬化し、しかも厚くする。極端な場合には、血管を閉塞したり、あるいはプラークが破裂した場合には血栓形成を招くおそれがある。動脈硬化症は、その二次疾患 (冠動脈疾患、心臓発作、末梢動脈疾患および発作) とともに、西欧諸国においていまだにもっとも多い死因である。医療のために使用可能な財源全体の優に半分以上が、動脈硬化症の影響のために費やされるものと推定されている。動脈硬化症の原因を明確にするために、多くの学説が展開されているが、脂質説が最も重要視されている。

30

【0003】

一般的に、血液中の LDL コレステロールのレベルまたは酸化 LDL コレステロールのレベルが高いほど、血管硬化のリスクが高いとすることができ、これは例えば、心臓発作という結果を伴う。太りすぎや高コレステロール血症は、動脈硬化症を進行させる最も重要なリスク要因である。

【0004】

定義と用語

コレステロールのような脂肪は水にも、血漿にも溶けない。それにもかかわらず個体の体内領域への脂肪の輸送を可能にするために、その脂肪は血液中に生じるとすぐに特定のアルブミン様物質 (タンパク質) と結合する。脂質 (脂肪) およびタンパク質を含む、これらの化合物はリポタンパク質と呼ばれる。

40

【0005】

血漿の「リポタンパク質」は、脂質 (コレステロール、トリグリセリド、およびリン脂質) およびアポリポタンパクを含む、高分子量の水溶性複合体である。コレステロール含有リポタンパク LDL コレステロールは動脈硬化を引き起こし、「悪玉」コレステロールとしても知られ、コレステロールが酸化型である場合は体に対してよりいっそう危険なものである。

【0006】

50

「コレステロール」は体内のいたるところで合成され、そして細胞膜およびリポタンパク質の必須成分である。やはり内在的に合成されるトリグリセリドおよびリン脂質とは対照的に、コレステロール分子のステロール環は再度分解されることがなく、コレステロールは肝臓内で胆汁酸に変換するか、変化することなく胆汁とともに消化管中に排出される。

【0007】

コレステロールは血漿中に、25乃至40%が遊離（エステル化しない）コレステロールとして、および60乃至75%が不飽和脂肪酸でエステル化されて存在する。これら二つの形のコレステロールを合わせて、総コレステロールとして知られている。その低い水溶性のために、コレステロールはアポリポタンパクとの複合体として血漿中に輸送される。血液中において、総コレステロールの約70パーセントが低比重リポタンパク（LDL）を介して輸送される。

10

【0008】

「トリグリセリド」は3つの脂肪酸残基を有するグリセリンのエステルである。コレステロールと同様にして、トリグリセリドは溶解性が低いためにアポリポタンパク質と結合して血漿中に輸送される。

【0009】

「リポタンパク質」は肝臓あるいは消化管内で合成され、コレステロールのような脂溶性物質を血液中に輸送する。

【0010】

リポタンパク質はその比重に応じて5つの比重クラス、すなわちカイロミクロン、超低比重リポタンパク（VLDL）、低比重リポタンパク（LDL）および高比重リポタンパク（HDL）とに区分されている。カイロミクロンは、空腹時血清中の生理的濃度が他のリポタンパクと異なって非常に低く、外因性グリセリドを輸送するための媒体である。その他のリポタンパクの生理的分布は、次の通りである：すなわち、VLDL 10%、LDL 70%、そしてHDL 20%である。VLDLはLDLの前駆体であり、かつ内在性グリセリドを輸送する媒体である。LDLはVLDLの加水分解によって生成される。LDLおよびHDLはいずれも細胞コレステロールホメオスタシスの制御因子であって、HDLとともに脂肪分解（トリグリセライドをグリセロールと遊離脂肪酸とに分ける）も調節する。LDLは約20nmの直径を有する。HDLは最も小さく（7-10nm）、そして最もタンパク質に富むリポタンパクである。天然のLDL（LDL）に加え、酸化LDL（oxLDL）もまた血清中に検出することができる。oxLDLは特定のリガンドを介して内在性血漿タンパク質、特に糖タンパク質と相互作用し、oxLDL糖タンパク複合体を形成する。

20

30

【0011】

「アポリポタンパク」はリポタンパク質の一成分であり、極性脂質と共に、外殻の一種として、リポタンパク質のコアを取り囲んでいる。アポリポタンパクBのみを含有しているLDLを除いて、個々のリポタンパク質クラスは、異なる構造を有する複数のアポリポタンパククラスを有する。

【0012】

リポタンパク質輸送

コレステロールは主として、2種類のリポタンパク質クラスであるLDLおよびHDLを介して輸送される。LDLは、LDLのための特定の受容体を持っている末梢細胞にコレステロールを輸送する役目を主に果たす。HDLは肝外細胞および血管壁からのコレステロールの除去を可能にし、促進し、そしてそのコレステロールを肝臓へ輸送する。

40

【0013】

病理学

脂質代謝障害の病理について考慮するならば、一般的に、LDLコレステロールの上昇は、HDLコレステロールの低下と併せて動脈硬化のリスクをもっとも顕著に高めるといことができる。したがって病理学では、LDL（その粒子は動脈硬化プラークの形成に

50

実質的に寄与する) およびHDLは相反する役割を果たす。総コレステロール／HDLコレステロールの指数、そして、とくにLDLコレステロール／HDLコレステロールの指数が、心臓発作のリスクを評価するための決定的要因である。(疫学的研究(フラミンガム研究)もまたHDLコレステロールの防御効果に言及している。)動脈硬化の二次疾患は、冠状動脈性心臓疾患および末梢動脈疾患に加えて、心臓および脳の梗塞(卒中)を含む。

【0014】

oxLDLは、LDLと同様に、動脈硬化プラークをもたらすおそれがあり、oxLDLは体に対して最大の危険をもたらす。

【0015】

しかしoxLDLは、その他の疾病においても重要な役割を果たすと思われる。慢性腎臓不全症および糖尿病の患者では、oxLDL糖タンパク質複合体の濃度が健康な患者たちにおけるよりもはるかに高いのである。

【0016】

LDLもまた、肝臓によって、およびマクロファージによって、血液の循環から除かれる。マクロファージは免疫系の細胞で、大きな粒子の貪食をすることができる。

【0017】

「スカベンジャー経路」は、細胞がいかに粒子を取り込む(食作用)かを説明するための周知のモデルである。食細胞内部への固体粒子(デブリス、異物、バクテリア、あるいはLDLプラーク)の取り込みは、それに引き続く細胞内分解とともに、食作用によって行われる。食細胞は貪食細胞として知られ、そして主として組織マクロファージおよび移動性血中単球からなっている。

【0018】

食作用において、Fcおよび細胞膜上の補体レセプターに結合することによって粒子が食細胞の細胞膜に付着した後、収縮構造が細胞質内において活性化される。ついで、細胞膜の局所的な反転が、細胞質の空胞中に粒子を封入させる。

【0019】

いわゆるスカベンジャー食細胞は、髄質を含む線維中の、およびそれに沿ったリンパ節に見出される。

【0020】

リンパ液がリンパ節の輸入管から輸出管を通過する際、特定の抗原が食細胞によって除去される。

【0021】

多形核白血球およびマクロファージなどの食細胞への接着は、バクテリア(および他の抗原)の表面に免疫グロブリン(Ig)が接着することによって増加する。この接着の増加は、免疫グロブリンのFc成分が食細胞のFcレセプターに接着することにより影響されと思われる。抗原が抗体の接着(または結合)によって「食欲をそそる」ようにされた後、抗原および抗体の複合体が食細胞によって取り上げられ、食細胞によって速やかに摂取される。免疫グロブリンによる抗体表面の被覆もまたオプソニン媒介性(Fc)接着として知られ、免疫反応において重要な役割を果たす。

【0022】

菌体の表面に結合している抗体は細胞外液の特定の成分を固定することができる。一般名では、これらの成分は「補体」と名付けられている。動物実験によって、抗体で被われた細胞の食作用は、補体を欠損した動物では遅滞していることが示されてきた。したがって、オプソニン化は抗体および補体の間に相乗効果をもたらすことが明らかである。

【0023】

発明の説明

LDLコレステロールを減少させるための従来技術における薬剤は、コレステロール合成(CSE)のための鍵酵素を阻害することによって作用する。例えば、ある種のコレステロール合成阻害剤は商品名「リポベイ(Lipobay)として知られるようになった

10

20

30

40

50

物質である。C S E阻害剤の副作用は通常無視できないものであり、とくに、胃腸病、睡眠障害、めまい、視覚障害、アレルギー性反応、および脱毛等が挙げられる。これに対する対策は、専ら試験段階であって、特に、重症の家族性の高コレステロール血症の場合に限って、体細胞の遺伝子治療法がある。この治療法はL D Lレセプターの遺伝子を自原性肝臓細胞へ転移することから成っている。

【0024】

これまでに、脂肪減少剤として働き、副作用がほとんどない物質が市場で手に入ることはなかった。特に、細胞内における大量のリポタンパク質の蓄積を誘導する抗体はこれまでに知られていない。腎臓疾患（腎臓の糸球濾過系統における脂質誘導性の細胞損傷）におけるリポタンパク質の有害な作用は周知であるが、腎臓疾患、とくに糸球体壊死の、抗体を基本とする治療法はこれまでに全く存在しない。

10

【0025】

この発明の目的は、梗塞のリスクを減少するという有利な目標とともに、ヒト及び動物のL D Lコレステロールまたはo x L D Lコレステロールを減少させるための薬剤の製造のための新規な物質または新規な物質クラスを生成することにある。

【0026】

この目的を達成するために、ポリペプチドを提案する。そのアミノ酸配列は配列番号：1および／または配列番号：3のアミノ酸配列と本質的に同一であって、そして、
—低比重リポタンパク（L D L）および／または酸化L D L（o x L D L）、とくにL D Lコレステロールおよび／または酸化L D Lコレステロール（o x L D Lコレステロール）に結合する。

20

【0027】

この発明の要旨は、その配列がヒト単クローン抗体（S A M 6 . 1 0）の軽鎖（V L）または重鎖（V H）に全体的または部分的に一致する精製ポリペプチドが、低比重リポタンパク（L D L）および／またはo x L D Lの減少をもたらすという驚くべき観察結果にある。この性質の発見（それは、対応する医薬製剤における脂肪減少剤としての該ポリペプチドの使用を示唆する）は、該ポリペプチドの生化学的特徴付けの過程でなされた。好都合なことに、この発明によるポリペプチドあるいは該ポリペプチドのフラグメントの、L D Lおよび／またはo x L D Lへの結合ならびにV L D L、L D Lの前駆体への結合は、H D Lへの結合よりも強力なのである。この性質の結果として、この発明によるポリペプチドはL D L／H D Lおよび／またはo x L D L／H D Lのそれぞれの指数について低い値をもたらす、そしてしたがって、梗塞のリスクを最小限にする。

30

【0028】

該ポリペプチドと、低比重リポタンパク（L D Lおよび／またはo x L D L）もしくはL D Lコレステロールおよび／またはo x L D Lコレステロールとの特異的な結合は、E L I S A法によって実験的に証明されている。それと同じ実験で、この発明による物質の高比重リポタンパク（H D L）との結合が弱いことを証明することも可能であった。

【0029】

この発明による抗体は、抗体を記載するための通常の命名法にしたがってV_L、V_H、F_v、F_c、F_{a b}、F_{a b}′、F（a b′）₂と名付けられているグループを含む。前記グループはまた、フラグメントとしても知られている。単一のフラグメントが、この発明によるポリペプチドの脂肪減少効果の要因となることはまったく可能である。この発明による物質のさらなる発展において、その物質はヒト単クローン抗体である。

40

【0030】

「機能性フラグメント」という用語は、この発明の趣旨において、完全なポリペプチドによっても示される生物学的活性のうちの少なくとも1つを有するポリペプチドを示す。抗体の場合には、例えば、すべてのC D R領域が特異的結合に必要なわけではないことが知られている。すなわち、抗体の特異的結合は、ただ1つのC D領域によってもたらされ得るが、全部で3つのC D領域が存在する。該抗体の抗原への特異的結合は、例えば、アポトーシスの誘導、あるいは細胞増殖の抑制をもたらすことができる。機能性フラグメン

50

トの生物学的活性は当業者に周知であるさまざまな方法で測定することができる。抗体とLDLとの間、特にLDLコレステロールとの間の相互作用を測定する方法はELISA法である。

【0031】

該ポリペプチド配列の相補性決定領域(CDRs)は、アミノ酸配列 Ser-Gly-Asp-Lys-Leu-Gly-Asp-Lys-Tyr-Ala-Cys (CDR1)、 Gln-Asp-Ser-Lys-Arg-Pro-Ser (CDR2) および 軽鎖の可変領域(VL)の配列番号: 1の Gfn-Ala-TrpAsp-Ser-Ser-Ile-Val-Val (CDR3) と本質的に同一なアミノ酸配列を含む; 図2も参照のこと。

10

【0032】

該ペプチド配列の相補性決定領域(CDRs)は、 Ser-Tyr-Ala-Met-His (CDR1)、 Val-Ile-Ser-Tyr-Asp-Gly-Ser-Asn-Lys-Tyr-Tyr-Ala-Asp-Ser-Val-Lys-Gly (CDR2) および 軽鎖の可変領域(V_H)の配列番号: 3の Asp-Arg-Leu-Ala-Val-Ala-Gly-Lys-Thr-Phe-Asp-Tyr (CDR3) と本質的に同一なアミノ酸配列を含む; 図4も参照のこと。

20

【0033】

ポリペプチドあるいは核酸配列は、参考文献としてまたは核酸配列(配列番号: 2および4)として引用されるアミノ酸配列(配列番号: 1および3)と少なくとも75%, 80%, 85%または90%の[同一性]を有するものであれば、「本質的に同一」と言える。該ポリペプチドまたは核酸配列のさらなる発展において、引用された参考文献と比較して少なくとも95%, 98%, 99%または100%の同一性が示され得る。ポリペプチドについては、比較部分が一般的に少なくとも5, 10, 15連続アミノ酸であること、好ましくは、少なくとも20または25連続アミノ酸であることが望ましい。

【0034】

この発明によるポリペプチドは、ハイブリドーマ技術(ケーラー、ミルシュタイン、Nature、1975、Vol. 256 495)の名前で知られた方法によって生成することができ、単クローン抗体の分離を可能にする。これは、無制限の生存能力および複製能力を有するミエローマ細胞(例えばHAB-1)と正常リンパ球との細胞融合によって得られるハイブリッド細胞の試験管内における分離に基づくものである。この方法によって製造されたハイブリドーマ細胞は双方の親細胞の性質を具備する。対応して、これらの細胞は、抗体(例えばSAM6.10)を産生するリンパ球の能力および無制限に分裂するミエローマ細胞の能力を備え、それによって多量の抗体を産生する能力を有する。該ハイブリドーマ細胞は複製し、そして所望の特異性の抗体を産生する細胞が選択される。この選択の培養およびその分離は、高い特異的反応性を有する抗体をもたらし、これらの抗体は特定の抗原決定因子とのみ反応する。

30

【0035】

血漿中における、低比重リポタンパク(LDL)レベル(またはLDLコレステロールレベル)、またはそれぞれの酸化型の実質的な減少の証拠は、検出可能範囲にHDLレベルが存在しない動物実験によって確認された。これらの本質的な特徴は、抗体の投与中には、動物の生命機能はいかなる影響も及ぼされないことであり、したがって、この発明による物質は、記載された限りにおいて副作用がないと言える。(この発明による抗体のメカニズムは、周知のスカベンジャー径路のメカニズムとの類似性により説明できるかもしれない。)

40

【0036】

この発明による薬剤を使用するための他の適応は、腎臓疾患、とくに糸球体壊死(糸球体硬化症)の治療である。

50

【0037】

この発明によるポリペプチドが、薬剤の製造のために、好ましくは精製された形態で用いられることは本発明の範囲に含まれ、精製のためには、当業者に周知のすべての方法（たとえば、アフィニティークロマトグラフィー、ゲル濾過）が考慮に入れられる。この発明による物質の適応としては、LDLまたはLDL-コレステロールの選択的減少に重きを置いて脂肪減少効果を最も重視する。LDLおよび／またはoxLDLがHDLよりも更に強力に結合するという性質の結果として、この発明によるポリペプチドは、LDL／HDLおよび／またはoxLDL／HDLの指数について低い値をもたらし、それによって梗塞のリスクを最小限にする。

【0038】

薬剤を製造するためのアジュバントおよび担体物質は当業者に周知であり、通常の手段を用いて製造することができる。（レミントン（Remington）：ザ・サイエンス・アンド・プラクティス・オブ・ファーマシー（The Science and Practice of Pharmacy）（第20版）、発行所エイ・アール・ゲンナロ・リピンコット・ウィリアムズ・アンド・ウイルキンス社（A. R. Gennaro, Lippincott Williams & Wilkins）、2000年、および製剤技術のエンサイクロペディア（Encyclopedia of Pharmaceutical Technology）、著者ジェイ・スワーブリック（J. Swarbrick）およびジェイ・シー・ボイルン（J. C. Boylan）、1998-1999、マーセル・デッカー、ニューヨーク（Marcel Dekker, New Yorkを参照のこと）。

【0039】

材料と方法

リンパ球の不活化および抗体の一次試験

リンパ球は標準プロトコルを用いてヘテロミエローム（heteromyeloma）HAB-1と融合し（ファラー（Faller）ほか、1990）、培養することにより不活化される。要すれば、リンパ球はPEGを用いてHAB-1細胞と融合される。トリオーム（triome）は4枚の24-ウェルプレートに播種される。平均的な増殖頻度は80-90%であり；増殖しているクローンの50%が免疫グロブリンを分泌する。分泌されたヒト単クローン抗体の一次試験はELISAによって実施され、アイソタイプが決定された。該ヒト単クローン抗体は、免疫組織化学的、遺伝的、生化学的および分子生物学的技术によって更に分析されることができ。

【0040】

必要な材料；

- ・RPMI 1640（PAA社）添加物なし
- ・HAT添加RPMI 1640（HAT-添加物、PAA社）及び10%FCS、1%グルタミンおよび1%ペニシリン／ストレプトマイシン
- ・HAB-1（融合パートナー）を添加物なしのRPMIで2回洗浄する
- ・毎分1,500回転で5分間遠心分離する
- ・凍結したリンパ球（脾臓、リンパ節、または血液から）を解凍し、添加物なしのRPMIで2回洗浄する；これも遠心分離する
- ・添加物なしのRPMI各10mlに2つのペレットをそれぞれ懸濁し、ノイバウエル計算盤によって計数する
- ・Hab-1を1：2-1：3の割合でリンパ球に融合する
- ・二度目の洗浄の後に該細胞ペレットをひとまとめにし、混合し、毎分1,500回転で8分間遠心分離する
- ・50ml試験管をゆっくりと回転しながら、あらかじめ37℃に加熱しておいたPEG（ポリエチレングリコール1500、ロシュ社より）を該ペレットに注意深く滴下する
- ・わずかに再懸濁して、37℃の水浴中で、正確に90秒、回転させる
- ・次いで、添加物なしのRPMIでPEGを洗い流す（2個の10mlピペット容量いっ

10

20

30

40

50

ばい)

- ・ 毎分 1, 500 回転で 5 分間遠心分離する
- ・ 24 ウェルプレートに、HAT 添加 RPMI 培地 (HAT = ヒポキサンチン, アミノプテリン, チミジン) を、1 ウェルあたり 1 ml まく。
- ・ HAT 添加 RPMI を用いてペレットを懸濁する
- ・ 各ケースにつき 0.5 ml の細胞をピペットで 24 ウェルプレートにまく
- ・ 恒温器に融合プレートを置く
- ・ 1 週間に 1 度 HAT 添加 RPMI で培地を交換する

【0041】

SAM6. 10 抗体の精製

FPLC を介した陽イオン交換クロマトグラフィーによる培養上清の精製

【0042】

この目的のために、SAM-6. 10 IgM 抗体を産生するハイブリドーマ細胞を、特別な無血精培地 (AIMV 培地, Gibco 社) 中で培養し、そして比濁法を用いて培養上清中の IgM 含量を測定した。精製のために、培養上清を 5.9 の pH に調節し、その溶液を濾過した。結合のために、特別な陽イオンカラム (Hitrap (商標) SPFF カラム, 5 ml, アマシャム・バイオサイエンス社) を用いた。精製の開始時に、濾過した緩衝液 A (20 mM リン酸緩衝液、pH 5.9) を用いてカラムを平衡化した。次いで氷上で冷却した培養上清を、1 ml / 分の流速でカラムに添加した。上清の添加後、緩衝液 A を用いて、2 ml / 分の流速で 20 分間、すべての結合タンパク質が除去されるわけでは

【0043】

oxLDL の測定

測定は、スウェーデン国、ウプサラ州、メルコディア (Merckodia, Uppsala, Sweden) からの酸化 LDL ELISA テストキットを用いて行った。試験の原理：酸化 LDL ELISA は固相のツーサイト (two-site) 酵素イムノアッセイである。これは直接サンドウィッチ技術を基本とするもので、この技術において、2 種の単クローン抗体が酸化 LDL アポリポタンパク B 上の特定の抗原に対して指向される。培養の間に、試料中の酸化 LDL が、マイクロタイタープレートのウェルに結合した抗酸化 LDL 抗体と反応する。洗浄、すなわち試料中の非反応成分が除去された後、ペルオキシダーゼ共役抗ヒトアポリポタンパク B 抗体が、固相に結合した酸化 LDL を検出する。結合していない酵素で標識された抗体を除く、二度目のインキュベーションおよび洗浄の後、3, 3', 5, 5' テトラメチルベンジジン (TMB) との反応によって、該共役体が検出される。この反応は酸の添加によって停止されて比色エンドポイントが定められ、該比色エンドポイントは分光測光器によって 450 nm で読み取られる。

【0044】

SAM-6 の oxLDL への結合の測定

ELISA プレート (ベクトン ディッキンソン ラバレ ユーロップ, フランス国) (Becton Dickinson Labare Europ, France) を、異なる割合に酸化された LDL の断片とともに、4°C で一晚にインキュベートした。10% FCS を含有する RPMI 1640 培地を用いて、1 時間、非特異的結合部位をブロッキングした。次いで、このプレートを $60 \mu\text{g/ml}$ SAM-6 抗体とともに、37°C で 1 時間インキュベートした。PBS で 3 回洗浄した後に、ELISA プレートを HRP-結合二次抗体とともに、1 時間インキュベートした (ウサギ抗ヒト IgM, ダコ ハンブルグ, ドイツ国, 1:1000 (PBS 中))。次いで、このプレートを再度 PBS およびクエン酸緩衝液で洗浄し、OPD (ダコ・サイトメーション社, グロストルップ, デン

10

20

30

40

50

マーク国) (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) を加え、そして E L I S A リーダーによって、490nm における色彩変化を測定した。

【0045】

フローサイトメトリー (FACS 解析)

使用した 接着細胞は、トリプシン／EDTA で処理して培養瓶の底から剥離された。反応は 10ml RPMI 1640 培地 (+ 添加物) によって停止され、細胞は 1000 × g、5 分間でペレット化された。細胞を PBS で 2 回洗浄し、FACS 緩衝液 (PBS、0.01% アジ化ナトリウム) に懸濁し、そして 30 分間氷上に置いて細胞膜を再構成した。次いで、細胞を 1 × 10⁶ 細胞/ml の濃度に調節し、細胞懸濁液の 200 μl を FACS 反応容器に移した。それによって試験管 1 本当りの細胞の数は 2 × 10⁵ となった。細胞を 4℃、毎分 1400 回転で 5 分間、ペレット化し、これらのペレットを再懸濁して、氷上において一次抗体とともに 15 分間インキュベートした。一次抗体として、FACS 緩衝剤中の 100 μg/ml SAM-6 抗体 (総容量 200 μl) または 100 mg/ml LDL を用いた。100 μg/ml クロムピュア (Chrompure) ヒト IgM がアイソタイプ対照として作用した。もう一つの方法として、細胞を 30 分間 LDL であらかじめインキュベートし、それから 100 μg/ml SAM-6 抗体を 15 分添加した。

10

【0046】

インキュベート後に、細胞を遠心分離機で分離し；上清を除去して、ペレットを 500 μl の冷却 FACS 緩衝液で洗浄した。その後、FITC 結合二次抗体 (ウサギ抗ヒト IgM, FITC 結合, SAM-6 または クロムピュア (Chrompure) ヒト IgM について 1:50 (FACS 緩衝液中)) で 15 分間、光を遮断してインキュベートした。再度洗浄後、細胞を 200 μl の冷却 FACS 緩衝液中に懸濁し、測定するまで氷上で、光を遮断して保存した。測定はフローサイトメーター (FACSscan; ベクトン デイッキンソン (Becton Dickinson), 米国) を用いて行った。

20

【0047】

SAM6. 10 抗体のインビボ (in vivo) 効果を 示すための動物実験

【0048】

実験 1: 500 μg 精製 SAM6. 10 抗体をマウスの腹腔内に注入した。血清中の LDL 濃度を 2 日後に測定した (下記の方法を参照のこと)。

30

【0049】

実験 2: 前記実験と同じ。

【0050】

実験 3: 1mg の精製 SAM6. 10 抗体をマウスの腹腔内に注入した。血清中の LDL 濃度を 14 日後に測定した。

対照 A: 通常値の対照マウス

対照 B: 通常値の対照マウス

【0051】

SAM6. 10 で処理した マウスでは、LDL の血清濃度が有意に減少した。 (図 6 および 7 を参照のこと)。

40

【0052】

毒性

精製した SAM6. 10 抗体 500 μg および 1mg を、それぞれマウスの腹腔内に注入した。

・急性毒性なし

・潜伏性の毒性なし (3 ヶ月間)。

【0053】

前記実験 1, 2 および 3 (上記参照) によって死んだマウスの臓器類を摘出し、調査した。肝臓、肺、心臓、脾臓、小腸、大腸、腎臓、胃および脳は いかなる形態変化も示さなかった。該器官は、何らかの脂質の蓄積について、さらに免疫組織化学的に調査した。ズ

50

ダン I I I を用いた染色は、どの器官についても脂質の蓄積を示さなかった。

【0054】

供死したマウスの器官をホルマリン中で固定してパラフィン中に包埋した。ズダン I I I 色素を用いて、以下のプロトコルにしたがって染色を行った。

【0055】

マクロファージのための／パラフィン切片におけるズダン I I I 染色
脱パラフィン

- ・キシレン1 5分
- ・キシレン2 5分
- ・100% エタノール1 5分
- ・100% エタノール2 5分
- ・メタノール 70ml
- ・+H₂O₂ 500μl 5分
- ・90% エタノール1 3分
- ・90% エタノール2 3分
- ・80% エタノール1 3分
- ・80% エタノール2 3分
- ・70% エタノール1 3分
- ・70% エタノール2 3分
- ・PBS中に切片を置く
- ・ズダン I I I とともに、切片を15分間インキュベートする
- ・蒸留水で洗浄する
- ・60%イソプロパノールに1回浸す
- ・蒸留水で洗浄する
- ・ヘマラウン (haemalaun) を用いて、6分間対比染色する
- ・切片を10分間浸し、蒸留水で洗浄し、グリセリン・ゼラチン中にマウントする

【0056】

マクロファージのズダン I I I 染色のために、接着性のマクロファージを目的のスライドガラス上で増殖させ、それから該当する試薬を用いて処理した。染色は次のように行なわれた。すなわち、

- ・細胞を60%イソプロパノール中で固定する(6分間)
- ・ズダン I I I とともに20分間インキュベートする
- ・蒸留水で洗浄する
- ・ヘマラウンを用いて、6分間対比染色する
- ・切片を10分間浸し、蒸留水で洗浄し、グリセリン・ゼラチン中にマウントする

【0057】

血液試料中の脂質の測定

血清中のさまざまな脂質の測定を、MODULAR DP800装置(ロシュ社)(Roche)で自動的に行った。LDLコレステロール値の測定は、試料を前処理することなく酵素的比色分析(CHOD/PAP)で行った。

【0058】

血清中の脂質濃度を測定するための試験原理：

HDL, VLDLおよびカイロミクロンは、洗剤1で選択的に加水分解される。これらのリポタンパク質中に遊離されたコレステロールは、コレステロールエステラーゼ(CE)およびコレステロールオキシダーゼ(CHOD)との酵素作用の結果として直ちに反応し、そして過酸化水素が生成する。後者はペルオキシダーゼ(POD)の存在下で、4-アミノアンチピリジンとともに無色の産物を形成する。この過程を通じて、LDL粒子は無傷のままである。LDLコレステロールの反応は洗剤2および結合剤N, N-ビス(4-スルホブチル)-m-トリイジン(DSBmT)の添加によって開始される。二番目の洗剤は、LDL粒子中のコレステロールを遊離する。酵素の反応によって、結合物質

の存在下で色素が形成される。形成された赤色キニーネイミン色素の強度は、LDLコレステロールの濃度に正比例する。これは552nmにおける吸光の増加を測定することによって測定される。

【0059】

ELISA (LDL/HDL)

— ELISAプレートを、LDL (ヒト血漿由来の低比重リポタンパク、シグマ社、 $10\mu\text{g/ml}$ (PBS中)) またはHDL (ヒトHDL、ケミコン (Chemicon) 社、 $10\mu\text{g/ml}$ (PBS中)) で前もってコートする→1ウェルあたり $50\mu\text{l}$

— 容器を覆って、 4°C で一晩保存する

— 翌日、プレートをPBSで2回洗浄する

— 各ウェル中に 100nl のRPMIをピペットで添加し、室温で1時間インキュベートする

— 次いでPBSで2回洗浄する

— それぞれのケースについて、 $50\mu\text{l}$ の陽性対照を各2ウェルずつピペットで添加する (二重測定)

陽性対照：ヒトに対する単クローン抗体とマウスの免疫グロブリンG2a、 $1:1000$ (PBS中)

— $50\mu\text{l}$ RPMIを陰性対照として一緒に行う (二重測定)

— $50\mu\text{l}$ の試料 (上清SAM6.10) を並べてピペットで添加する (二重測定)

— 恒温器において1時間インキュベートする

— PBSで2回洗浄する

— PBS/0.05%ツイーン (Tween) で2回洗浄する

— PBSで2回洗浄する

— $50\mu\text{l}$ のそれぞれの二次抗体 (ペルオキシダーゼ結合) : すなわちSAM6.10について、ウサギ抗ヒトIgM $1:1000$ (PBS/0.05%ツイーン中) ; 陽性対照LDLについて、ウサギ抗マウスIgG類 $1:1000$ (PBSツイーンで) を、ピペットで添加する

— 恒温器内で1時間インキュベートする

— PBSで2回洗浄する

— PBS/0.05%ツイーンで1回洗浄する

— PBSで2回洗浄する

— クエン酸緩衝液で2回洗浄する

— 評価のため：OPD錠剤 (ダコ社、ハンプルグ) をクエン酸緩衝液+ H_2O_2 (3ml クエン酸緩衝液+1錠+ $5\mu\text{l}$ H_2O_2) に溶解する

— 各ウェルに $50\mu\text{l}$ の色素をピペットで添加する

— 陽性の反応 (黄色に着色) を示したときは、 $10\mu\text{l}$ 3M H_2SO_4 で停止する

【0060】

図面についての説明

配列表

図A (添付せず) は軽鎖の可変領域 (V_L) のアミノ酸配列 (配列番号: 1) を示す。

【0061】

図B (添付せず) は軽鎖の可変領域 (V_L) の核酸配列 (配列番号: 2) を示す。相補性決定領域 (CDRs) は水平線で示し、これらは配列番号: 2のヌクレオチド67-69 (CDR1), 145-165 (CDR2) および262-288 (CDR3) と実質的に同一である。

【0062】

図C (添付せず) は重鎖の可変領域 (V_H) のアミノ酸配列 (配列番号: 3) を示す。

【0063】

図D (添付せず) は重鎖の可変領域 (V_H) の核酸配列 (配列番号: 4) を示す。相補性決定領域 (CDRs) は水平線で示してあり、これらは配列番号: 4のヌクレオチド

10

20

30

40

50

91-105 (CDR1), 148-198 (CDR2) および 295-330 (CDR3) と実質的に同一である。

【0064】

細胞-生物学的実験

以下に説明する図は、この発明を限定する意図のものではなく、単に発明を説明し、そして実施例への参照とともに発明の実施可能性を立証するためのものである。

【0065】

図1は硫酸銅溶液によるインキュベーション時間依存的な oxLDL の測定を示す。この実験において、LDL (シグマ, タウフキルヘン, ドイツ国) (Sigma, Taufkirchen, Germany) を、 $20\mu\text{M}$ CuSO_4 とともに3時間および15時間、それぞれインキュベートすることによって酸化した。酸化LDLの量を、使用法の説明に従って、メルコディア (Merckodia) 酸化LDL ELISA を用いて測定した。酸化LDLの量はインキュベーション時間を長くすることによって増加することが、銅イオンで処理されなかった各LDL画分がすでに部分的に酸化型で存在することとともに、明らかに観察された。15時間のインキュベーション後に、酸化LDLの割合が約2倍になった。

【0066】

図2はSAM-6のoxLDLとの結合を示す。ELISA結合アッセイによってSAM-6とoxLDLとの結合を証明するために、検出の目的に必要な一次抗体SAM-6および二次抗体抗-ヒトIgMを添加する前に、ELISAプレートを、異なる度合に酸化されたLDLの画分であらかじめコートした。その結果は、酸化型で存在するLDLがより多く存在するほど、この発明による抗体SAM-6がより強力に結合することを示す。

【0067】

図3はFACS解析の結果を示す。この目的のために用いた細胞は、マウスマクロファージ細胞株P388D1 (IL-1) (DSMZ受取番号ACC288) のものである。図3Aは、LDLのマクロファージへの結合を示す。図3Bは、ヒト単クローン抗体SAM-6もまた、マクロファージに結合することを立証する。図3Cにおける対照IgMのマクロファージへの結合の証拠は、マクロファージが μ 受容体 (ミュー受容体) を保有することを実証する。図3Dにおけるシグナルの右寄りのシフトは、LDLおよびSAM-6の同時インキュベーションが、SAM-6の細胞への多重結合をもたらすことを実証する。

図4および図5は、ズダンIII染色の結果を示し、このためにマウスマクロファージ細胞株P388D1 (IL-1) が用いられた。図4は、SAM-6または1種類のIgM対照抗体のいずれかとともに48時間インキュベートされ、そして次いでズダンIII染色に供された細胞を示す。抗体SAM-6とともにインキュベートされた細胞は、その赤色の着色により、中性脂肪の明確な蓄積を示す。対照抗体とともにインキュベートされた細胞は、これに対し変化を示さない。

図5に示された染色のために、マクロファージはFCS添加ありおよびなしの両方について24時間培養された。次いで、さらなる24時間の間、LDLのみ、またはSAM-6のみ、またはLDLおよびSAM-6と一緒に、のいずれかがそれぞれ添加された。その後、ズダンIIIによる染色が行われた。図5A、5Cおよび5Eで示される図の左カラムは、FCSの添加なしで培養された細胞を示す。図5B、5Dおよび5Fで示される図の右カラムは、FCSの添加ありで培養された細胞を示す。

図5Aおよび5Bは、FCSなしで培養されたマクロファージおよびFCSの存在かで増殖したマクロファージの両方が、中性脂肪の基礎的な蓄積を示すことを実証する。図5Cは、SAM-6がFCSなしで培養されたマクロファージに添加されたときは、脂肪の蓄積が生じないことを実証する。図5Dに示されるように、そのいっぽうで、FCSとともに培養され、その後SAM-6が添加されたマクロファージにおいては、強化された脂質の蓄積が観察される。図5Eおよび5Fは、SAM-6およびLDLの共インキュベ-

ションにより、FCSとともに培養されたマクロファージおよびFCSの添加なしで増殖したマクロファージの両方において、細胞内の脂質の蓄積が実質的に増加することを実証する。

図6は、*in vivo*における抗体SAM-6のLDL値に対する影響を示す。この実験では、1ミリグラムの精製SAM-6抗体および、対照実験においては、1ミリグラムのヒトクロムピュアIgM（アイソタイプ対照）が、マウスの腹腔内に注入された。血液中のLDL濃度が、24時間後および48時間後に測定された。24時間後および48時間後に、SAM-6で処置されたマウスにおいて、血清LDLの明確な減少が観察される。血清中のLDLの測定は、MODULAR D P800装置（ロシュ社）を用いて自動的に行い、プロットされた値は、「LDLコレステロールダイレクト」診断キット（ロシュ ダイアグノスティックス社）の結果として得られた。

10

図7もまた、SAM-6.10の*in vivo*における影響を示し、値を計算するためにフリーデヴァルト（Friedewald）の式にしたがった間接法が用いられている。ここで、LDLの量は総コレステロール、HDLおよびトリグリセリドの間の差から計算される。実験を評価するこの方法にしたがえば、SAM6.10処置後の血清中のLDL濃度の減少は、さらにいっそう大きくなる。しかし、この間接測定法は、図6で用いられた方法と比較して、正確さが劣るものととらえなければならない。

【図面の簡単な説明】

【0068】

【図1】図1は硫酸銅溶液によるインキュベーション時間依存的なoxLDLの測定を示す。

20

【図2】図2はSAM-6のoxLDLとの結合を示す。

【図3】図3はFACS解析の結果を示す。

【図4】図4は、SAM-6または1種類のIgM対照抗体のいずれかとともに48時間インキュベートされ、そして次いでズダンIII染色に供された細胞を示す。

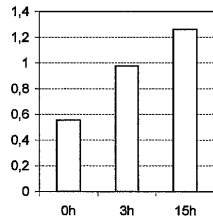
【図5】図5Aおよび5Bは、FCSなしで培養されたマクロファージおよびFCSの存在かで増殖したマクロファージの両方が、中性脂肪の基礎的な蓄積を示すことを実証する。図9Cは、SAM-6がFCSなしで培養されたマクロファージに添加されたときは、脂肪の蓄積が生じないことを実証する。図9Dに示されるように、そのいっぽうで、FCSとともに培養され、そしてその後にSAM-6が添加されたマクロファージにおいては、強化された脂質の蓄積が観察される。図9Eおよび9Fは、SAM-6およびLDLの共インキュベーションにより、FCSとともに培養されたマクロファージおよびFCSの添加なしで増殖したマクロファージの両方において、細胞内の脂質の蓄積が実質的に増加することを実証する。

30

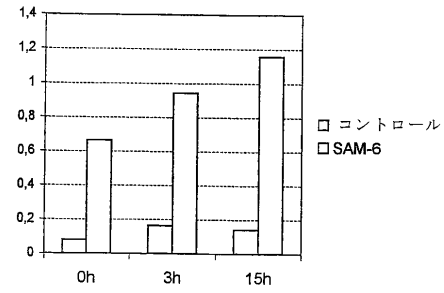
【図6】図6は、*in vivo*における抗体SAM-6のLDL値に対する影響を示す。

【図7】図7もまた、SAM-6.10の*in vivo*における影響を示す。

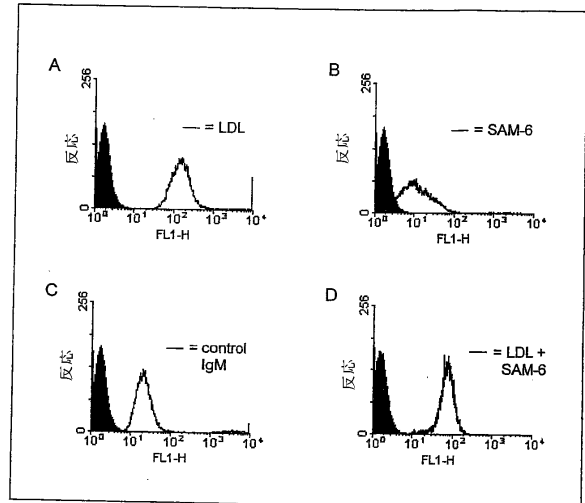
【図 1】



【図 2】

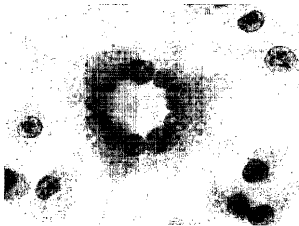


【図 3】



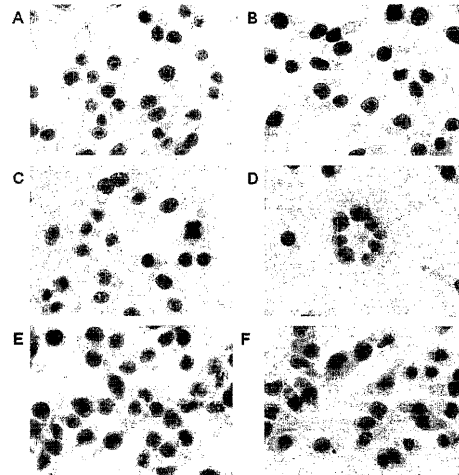
Figur 1

【図 4】



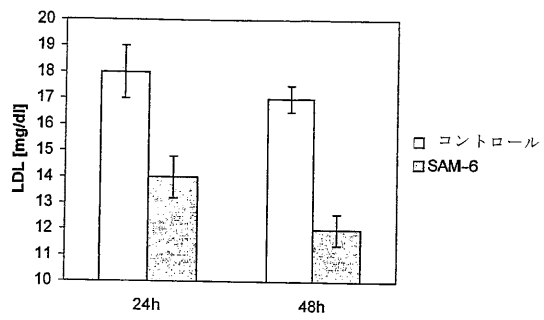
Figur 4

【図 5】

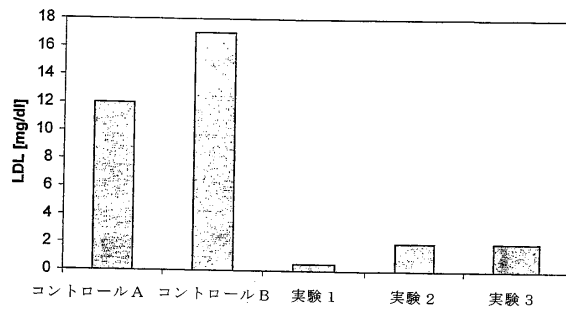


Figur 5

【図 6】



【図 7】



【配列表】

0004980068000001.xml

フロントページの続き

(72)発明者 フォルマーズ ハインツ

ドイツ連邦共和国 97084 ヴェルツブルグ ブダペスター シトラーセ 23

審査官 福間 信子

(56)参考文献 特開平07-067688 (JP, A)

国際公開第00/056772 (WO, A1)

国際公開第03/084477 (WO, A1)

国際公開第03/048321 (WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-90

BIOSIS/WPIDS(STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq

SwissProt/PIR/GeneSeq

PubMed